

# 光架橋性樹脂による酵素の固定（第2報）

## パパインの固定化における諸要因

河 邊 誠 一 郎

岡山理科大学基礎理学科，化学  
(昭和55年9月29日受理)

### 緒 言

酵素の新しい利用法の1つとして、酵素を固定化する研究が盛んに行なわれるようになってきた。概要は、前報<sup>1)</sup>でも述べたが、水溶性の酵素を水に不溶な状態にし、なおかつ正常な酵素反応を行なわせる方法である。この方法による最大の利点は、従来の1反応ごとの酵素の使い捨てを改め、同一の酵素で連続的に反応を行なえること、生成物溶液中に酵素が混入することがない点であり、酵素の工業、食品および医療への利用法として非常に有効である。

酵素の固定化法については、様々な方法が報告<sup>2-9)</sup>されているが、使用酵素および目的によって、固定化方法、使用担体を十分に吟味、選択する必要がある。

先に報告<sup>1)</sup>した光硬化性樹脂によるパパインの固定化法は、その固定化条件が非常に温和であり、操作も簡単であることから、酵素の固定化には非常に有効であることがわかった。本報告では先の報告で十分解明できなかった、パパインの光硬化性樹脂による固定化の際に見られる、様々な問題点について、更に検討した。

### 実 験 方 法

**固定化酵素の調製法** 光硬化性樹脂による固定化は、福井らの報告<sup>10-16)</sup>を参考に、一部改変を加えて行なった。使用した酵素は、既報<sup>17)</sup>の手順で調製したパパイニン、マーキュリーパパイニンを用いた。Polyethylene glycol dimethacrylate (以下 PEGM と略す、本品は新中村化学<sup>18)</sup>より提供を受けた) 4ml と Benzoin ethyl ether (以下 BE と略す) 60mg を 60°C 以下で溶解し均一にする。常温に戻した後、pH6.8,  $\frac{M}{10}$  phosphate buffer にとかけた酵素溶液 6ml (標準酵素液 50mg/ml) を加え十分攪拌する。これに東芝ケミカルランプ FL-20BLS20W (波長領域 300~400nm, 最大吸収波長 360nm) を 10cm の距離から 5 分間照射する。硬化した樹脂は、かるく洗浄した後、ホモジナイザーおよび、乳鉢で砕き 0~100mesh に揃え、更に水で十分洗浄した後、デシケーター中にて真空乾燥を行ない、N<sub>2</sub> 置換し乾燥状態 4°C で保存した。

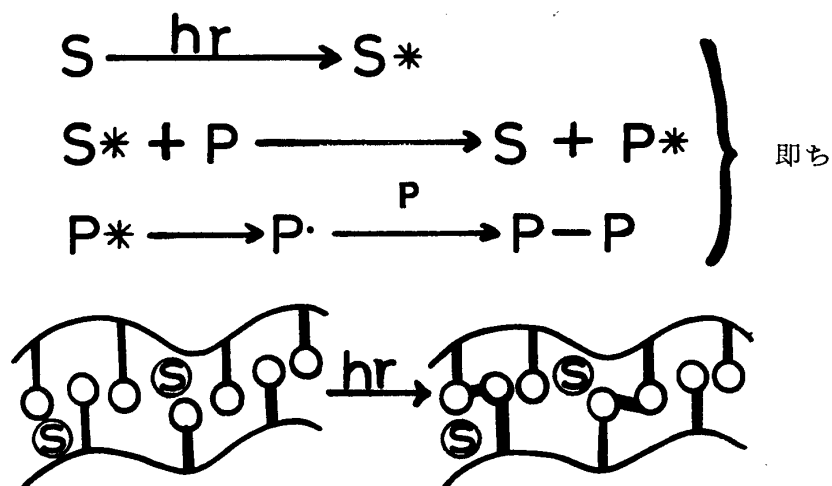
**酵素活性測定法** パパイニンの酵素活性の測定については、前報<sup>17-18)</sup>に示した方法に従って、そのアミダーゼ活性を測定した。すなわち、固定化酵素樹脂 (200mg) を L-cysteine

0.05M と EDTA 0.01M を含む pH 6.8,  $\frac{M}{10}$  phosphate buffer (2ml) 中で 35°C, 40 分間活  
 な性化を行なった。これに基質として, N- $\alpha$ -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide HCl (以  
 下 BAPA と略す, BDH Chemicals. Ltd, England) の  $1.2 \times 10^{-3}$ M 溶液 (5% dimethyl  
 sulfo oxide; DMSO と略す, を含む) (5ml) を加え, 35°C で 40 分間反応させた。反応停  
 止には 30% 酢酸溶液 (1ml) を用いた。

反応の結果生じた p-nitro aniline を分光分析 (410nm) で定量し, 酵素活性の基準とし  
 た。なお, 実験条件等の詳細については, そのつど説明する。

### 実験結果と考察

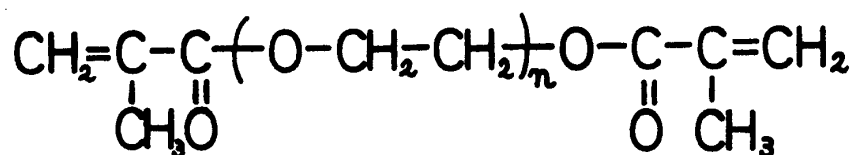
1). 光架橋反応<sup>19)</sup> 光硬化性樹脂は, 光に感ずる性質を有す高分子物質である。即ち光  
 エネルギーを高分子が吸収し, 吸収したエネルギーによって分子内または分子間に化学的  
 または構造的変化を生じる。この場合, 光を吸収するのが, 必ずしも高分子自身である必  
 要はなく, 本実験で行ったような共存させた感光性化合物 (増感剤) に吸収された光エネ  
 ルギーが反応の引き金となる場合も含まれる。本実験で使用した光硬化性樹脂 (PEGM)  
 の光架橋反応は, ポリマー中に含まれる官能基に増感剤 (BE) が関与して反応するもので,  
 次の様に光架橋反応が進むものと考えられる。



ただし { ~ : ポリマー鎖, O— : 感光性を持たない官能基, または反応部位,  
 ⊙ : 増感剤として吸収した光エネルギーを O— に伝達しそれらを励起, また  
 は活性化させる。  
 S : 増感剤, hr : 励起エネルギー,  
 P : 官能基, S\* : 励起状態の増感剤,  
 P\* : 励起状態の官能基, P· : ラジカル官能基。

以上のように反応が進み, この反応液中に混合させた酵素が, そのポリマー中に包括され  
 ると考えられている。

なお本実験で使用した polyethylene glycol dimethacrylate の構造は次の様である。



主に使用した NK エステル 14G は  $n=14$  である。

## 2). 固定化剤のパパインにおよぼす影響

PEGM の光架橋反応は、前述のとうり増感剤 BE の助けを借りて進行し、その架橋担体の網目の中に酵素パパインが包括されるものと考えられるが、その際使用した試薬による或程度の失活は、免れない。しかし、その程度が極力小さくなるような試薬を選び、方法および対策を講じる必要がある。そこで、固定化担体 (PEGM オリゴマー)、増感剤 (BE) の酵素 (パパイン) におよぼす影響を知り、保護および対策を検討した。

a) 光架橋性樹脂の選択 新中村化学<sup>(4)</sup>より提供された光硬化性樹脂 NK エステルのうち、水溶性のもの 4 種を選び、その酵素活性におよぼす影響を検討した。

NK エステルとして、9G ( $n=9$ ), 14G ( $n=14$ ), 共に dimethacrylate, A-9G ( $n=9$ ), A-14G ( $n=14$ ), 共に diacrylate, を用いた。これらの光架橋性オリゴマー 20% を含むリン酸緩衝液 1ml に活性化剤 2ml と酵素溶液 1ml を加え、定法に従って反応を行ない、その

Table 1. Effect of various photocrosslinkable oligomers on residual enzyme activity.

NK-ester	Residual enzyme activity	
	Native papain (%)	Mercury papain (%)
None	100	100
9G	51.5	65.7
A-9G	3.7	15.3
14G	59.9	72.2
A-14G	2.0	9.6

OD 値を測定した。その結を表 1. に示す。これより 14G, 即ち polyethylene glycol dimethacrylate ( $n=14$ ) が比較的酵素におよぼす影響が小さく、更にマーキュリー化による効果も大きいことがわかる。

b) NK エステル 14G の酵素におよぼす影響 表 1 より、検討した NK エステルのうち、NK エステル 14G がパパインにおよぼす影響が比較的小さいことがわかった。

この PEGM (14G) を用いて、更にこの酵素におよぼす影響を接触時間から検討した。NK エステル 14G を各濃度に調整し、この 1ml を酵素液 (5mg/ml) 1ml に加え、30分放置する。その後、活性化剤 1ml を加え 35°C で 15 分間活性化し基質 5ml を加え 35°C で 15 分間反応させた。その比活性は、放置せず、すぐ活性化、反応させたものを 100% とし、図 1 に示した。NK エステル 14G の濃度が高くなるにつれ、Native papain の活性は急激に低下する。一方パパインをあらかじめ  $\text{Hg}^{2+}$  で、その活性基 (-SH) を保護した

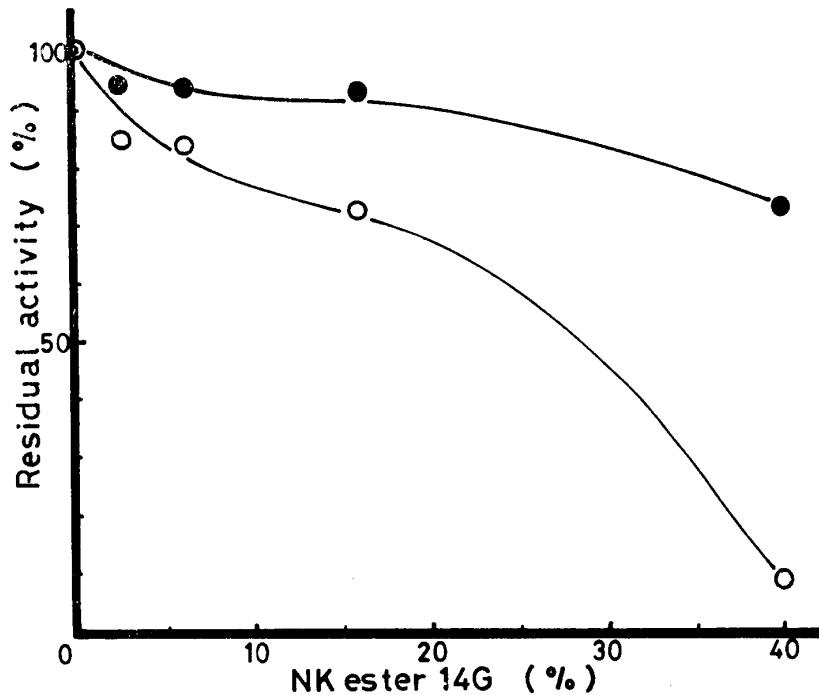


Fig. 1. Effect of NK-ester 14G (PEGM; n=14) concentration on residual enzyme (NP, MP) activity.

—○— : native papain, —●— : mercuri-papain.

Mercuri papain は30分間の接触の後も十分高い活性を示した。この結果より、パパインをあらかじめマーキュリー化しておく、かなりの保護効果が見られるものの、NK エステルの酵素活性におよぼす影響は大きく、固定化に際しては、酵素と PEGM オリゴマーとの接触時間は、出来るかぎり短時間となるようにした。

c) **Benzoyl ethylether** の酵素におよぼす影響 NK エステル 14G を光硬化させ、樹脂とする場合、それ単独では、重合完了までに非常に長時間を要する (100ppm 程度の重合禁止剤, hydroquinone を含有) が、このオリゴマーに 1% 程度の増感剤を添加することにより、数分間で重合が完了することを前報<sup>1)</sup>で示した。このような役割を持つ増感剤が、パパインの活性に、どのような影響をおよぼすものかについて検討した。増感剤として使用した BE 各一定量を酵素液 (5mg/ml) 1ml 中に加え、定法通り、活性化、反応を行った。その結果を表 2 に示す。この条件では、BE のパパイインへの影響は、比較的小

Table 2. Effect of initiator (BE) concentration on residual enzyme activity.

Benzoin ethyl ether	Residual enzyme activity	
	Native papain (%)	Mercury papain (%)
0	100	100
5	91.2	95.0
10	93.0	96.7
15	92.8	95.8
20	90.7	96.7

さいものと考えられるが、NK エステルの場合と同様に酵素の添加は、固定化直前が望ましい。表2の結果については、BE が水に難溶なために、酵素との十分な接触が出来なかったと思われるため、例えば、DMSO やアルコールなどの使用による十分な溶解後の反応の検討も必要と思われる。

## 2). 樹脂の吸着について

PEGM は、酵素反応生成物、p-NA を吸着する性質があることを前報で示した。この点に関し、更に詳細に検討した。

a) PEGM (NK エステル 14G) 樹脂への生成 p-NA の吸着 乾燥樹脂量および添加パパイン濃度が生成 p-NA の出現におよぼす影響について検討した結果を図2, に示した。

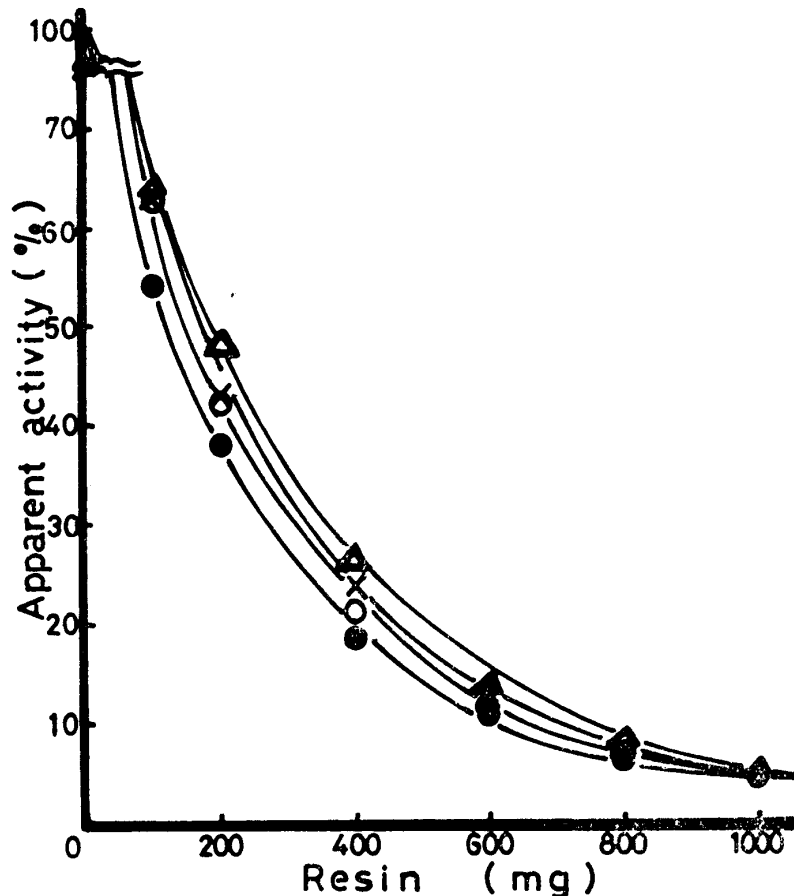


Fig. 2. Effect of resin weight and enzyme concentration on apparent activity.

—△—: native papain 15mg/ml, —×—: native papain 30mg/ml,  
—○—: native papain 48mg/ml, —●—: native papain 60mg/ml.

定法通り作成した、酵素を包括していない乾燥樹脂 (100mg~1000mg) に、各濃度 (15 mg/ml~60mg/ml) の Native papain 1ml を添加し、所定の反応を行った。その結果、樹脂量が増加するに従って p-NA の出現率が低下する。樹脂量 1000mg では大部分が吸着されてしまう。添加酵素濃度によりその吸着率は異なり、酵素量が増加するにつれ、吸着率は低下する傾向が認められた。この酵素量と p-NA 吸着の関係について更に検討した。

b) 固定化酵素濃度と生成 p-NA a) では、樹脂に各濃度の NP を添加した場合の吸着の関係について検討したが、固定化された酵素の生成 p-NA 出現への影響について検討した結果を図 3 に示した。樹脂 200mg 中に所定の酵素量 (4mg~20mg) が包括される

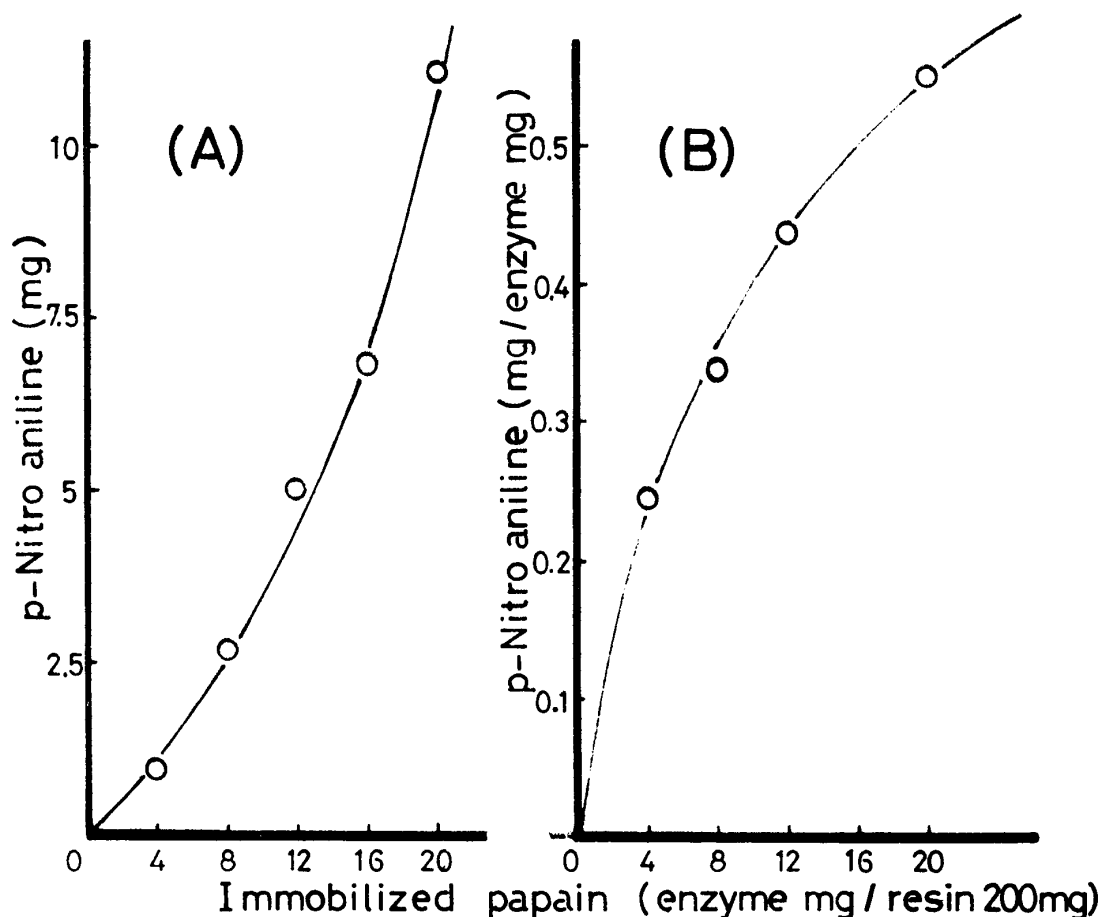


Fig. 3. Effect of immobilized papain weight on productive p-nitroanilin.

The weight of p-nitroaniline is an apparent value.

(A) : total weight of productiv p-nitroaniline.

(B) : productive p-nitroaniline per enzyme mg.

ように調整した固定化 MP を用い、定法通り活性を求めた。図 3-A は、全生成 p-NA 量を、図 3-B には、包括酵素 1mg 当りの生成 p-NA 量を示した。

前報<sup>1)</sup>で示した濃度範囲 (5mg) では、ほぼ直線上にあった生成 p-NA は、酵素濃度が、それ以上になると涙液中に現われてくる見掛けの生成 p-NA の量は、上昇曲線を描いて増加する。この結果を同量の酵素での出現生成 p-NA 量として図 3-B に示した。酵素濃度の高い程、同じ 1mg 酵素当りの出現 p-NA 量も徐々に増加していき一定 p-NA 量 (樹脂のない状態) に近づくと考えられる。この結果から PEGM 樹脂が、一定の飽和 (p-NA) 吸着量を持つこと、酵素タンパクが p-NA の樹脂への吸着を拮抗的に阻害することが考えられる。後者については、他のタンパクやアミノ酸 (例えばカゼイン、アルブミン、システインなど) を同時添加すると同様な阻害効果が期待される。今回アルブミン、カゼインを用い 40mg まで樹脂に添加してその阻害効果を検討したが、良い結果は得られなかった。

添加よりも酵素との同時固定や、別のタンパクを添加してみる等、生成物の吸着率を下げるよう引き続き検討している。次にもう1つの要因、樹脂の吸着量について検討した。

c) **p-Nitro aniline** の濃度および量と吸着の関係 a) の結果より p-NA の吸着率は樹脂量に大きく影響を受けていることがわかったが、この点について、p-NA の濃度、および容量と吸着の影響について検討した。p-NA 濃度  $1 \times 10^{-3}$  mM ~ 1 mM のものを 10 ml, 乾燥樹脂 200 mg に添加し40分間放置後、濾過し、その濾液の OD を測定し、図4に示した。

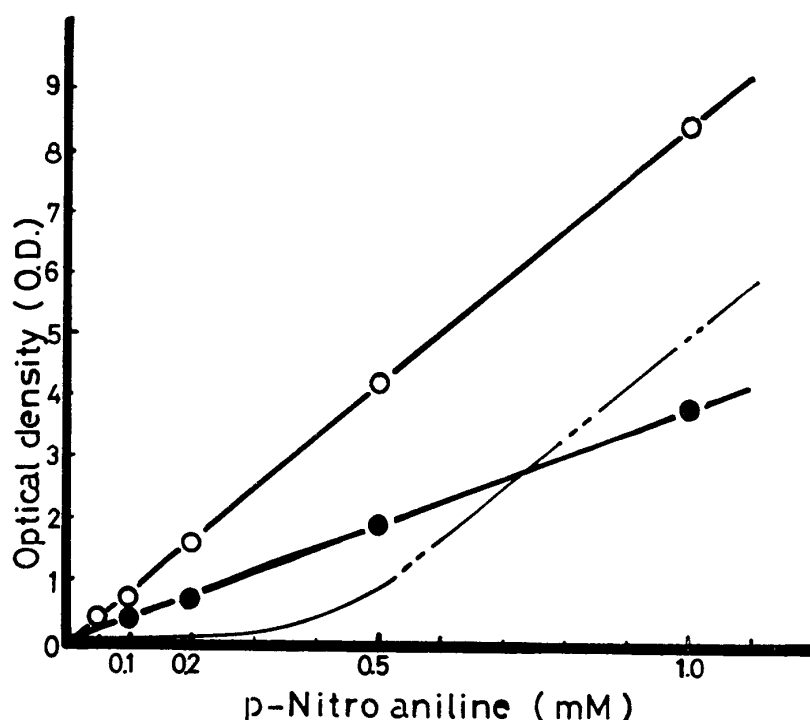


Fig. 4. Effect of p-nitroaniline concentration on adsorption with resin.  
 —○— : standard curve, — — — : presumptive curve,  
 —●— : added resin 200mg.

前述したように、樹脂 200mg への p-NA の吸着量は一定であり、その飽和量に達した後は p-NA の標準曲線と平行 (図中破線で示す) になるものと考えられたが、樹脂 200mg に対し、p-NA 1mM (10ml) 程度では、飽和に達しないものなのか、1mM まではほぼ一定の吸着率 (54.8%) が保たれている。

また、低濃度域からずっと比例関係にあることより、単に吸着のみではないとも考えられる。次に樹脂 200mg に 1mM の p-NA を 5ml ~ 40ml 添加した場合の吸着について検討した結果を図 5-A に、その結果をもとに 1mMp-NA 10ml 当りに換算した樹脂量に対する p-NA の出現率を図 5-B に示した。その結果、p-NA の出現割合は図 2 の値に近似しており、液量には関係なく樹脂量により一定であるように考えられた。また、別に行った湿潤樹脂と乾燥樹脂との p-NA の吸着結果からも、樹脂量により、吸着率が決まることが示唆された。

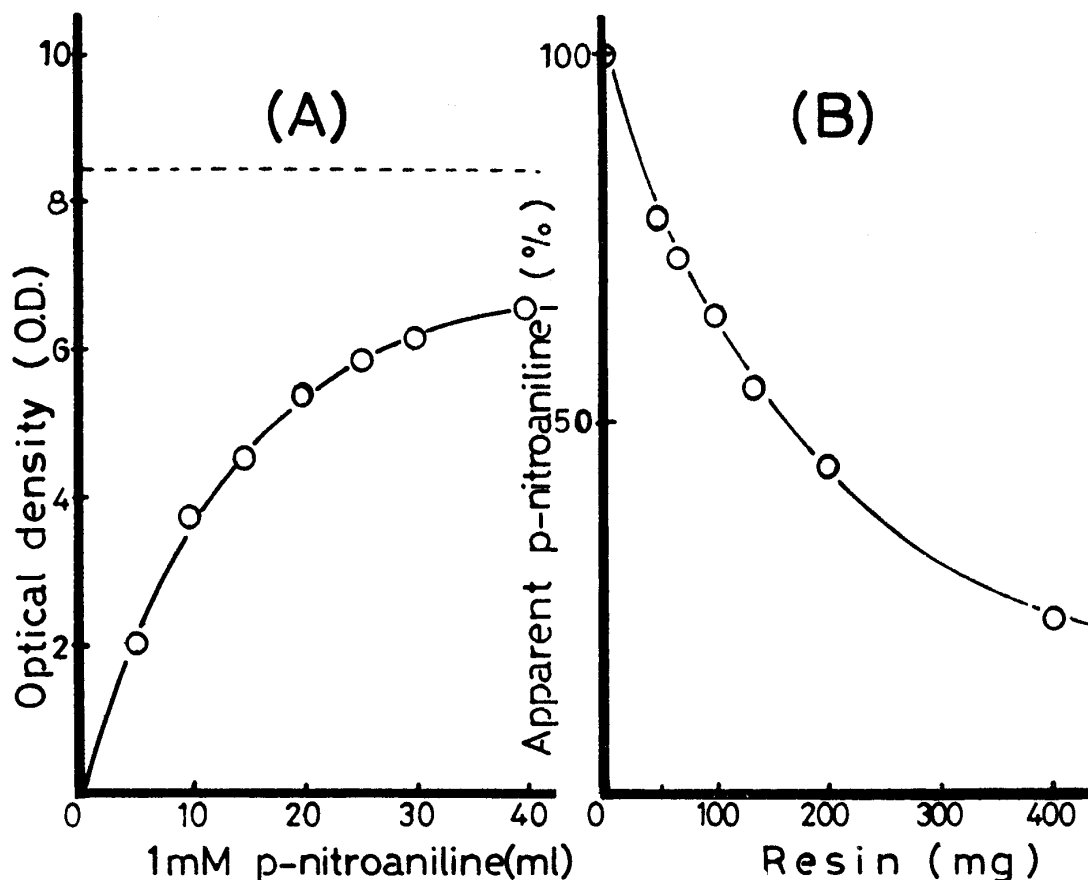


Fig. 5. (A): Effect of p-nitroaniline volume on adsorption with resin. -----: O. D. of 1mM p-nitroaniline.  
 (B): Effect of resin weight on apparent p-nitroaniline. The apparent p-nitroaniline is taken as additional 10ml p-nitroaniline on the basis of the result of 5-(A).

### 3). 固定化酵素の連続反応

前述の条件で調製した固定化酵素の諸性質に関しては、前報<sup>1)</sup>で触れた通りであるが、この固定化酵素の最大の利点である連続反応について、更に詳しく検討した。固定化パパイーン 1000mg を、ガラス濾過器 (G3.70×150mm) にとり活性化剤 10ml を添加し、35°C・10分間活性化し吸引濾過する。これに BAPA 10ml を添加し 35°C で 20分間酵素反応を行なった後、30%酢酸 1ml を入れた容器中に吸引濾過し、OD を測定した。樹脂は、25ml の緩衝液で洗浄した後、次の活性化、反応を行なった。その結果を図 6 に示す。値は 1 回目の活性を 100% とし、吸着は全く考えず、得られた値をそのまま示した。図より繰返し反応させるごとに、反応生成 p-NA の量は、急激に増加し、7 回目の反応でピークに達し、第 1 回目の反応による濾液の活性の約 3 倍もの高活性の反応濾液が得られたことがわかる。そしてそれ以降は、濾液の活性は徐々に低下している。この原因としては、基質および生成物の樹脂への吸着と飽和の問題、高分子ゲルの網目状組織の弛緩による影響等が考えられる。この曲線から、この固定化酵素は 80~100 回以上の繰返し、連続使用が可能と推察される (本実験では連続 14 時間、19 回繰返し反応)。ここでは、1 反応ごとに 25ml の緩衝



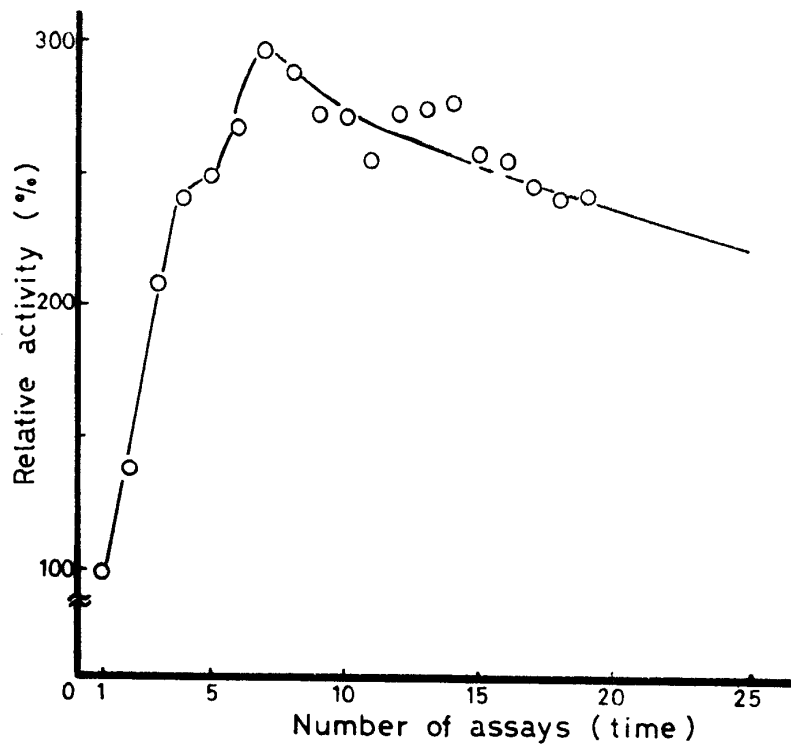


Fig. 6. Repeated use of immobilized papain. The activity of number 1 of assay is taken as 100%.

液で洗浄を行なったが、洗浄なしに連続反応を行なうと、もっと高い値が得られるものと考えられる。

以上、示したように、様々な問題点はあるものの、本固定化方法は非常に価値の高いものであることが分かった。

本研究を行なうに当たり御指導、御協力をいただきました早稲田大学理工学部、宇佐美昭次教授に深く感謝いたします。また、本実験に使用した光硬化性樹脂を提供いただいた新中村化学工業株式会社に感謝いたします。

#### 文 献

- 1) 河邊誠一郎, 岡山理科大学紀要, **15**, 51 (1980).
- 2) Chang, T. M. S., "Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins," Vol. 1, 2, Plenum Press, New York (1977).
- 3) Goldstein, L., Applied Biochemistry and Bioengineering, Immobilized Enzyme Principles, Vol. 1, Academic Press, New York (1976).
- 4) 千畑一郎(編), 固定化酵素, 講談社 (1975).
- 5) 近藤保 (編), マイクロカプセル化の新技术とその用途開発, 応用実例, 経営開発センター出版 (1978).
- 6) 辻阪好夫, 山田秀明, 鶴大典, 別府輝彦, 応用酵素学, 講談社 (1979).
- 7) 宇佐美昭次, 長谷川栄一, 唐沢昌彦, 醸協誌, **33**, 152 (1974).
- 8) 河邊誠一郎, 食品照射, **15** (1,2) 24 (1980)

- 9) 森山嘉夫, 村田義文, 河邊誠一郎, 宇佐美昭次, 早稲田大学理工学研究所報告, **90**, **44** (1979).
- 10) Tanaka, A., Fukui, S. and Hasegawa, E., *J. Ferment. Technol.*, **55**, 71 (1977).
- 11) Tanaka, A. and Fukui, S., *J. Ferment. Technol.*, **56**, 511 (1978).
- 12) Fukui, S. and Tanaka, A., *FEBS LETTERS*, **66**, 179 (1976).
- 13) Oster, G., *J. Polymer Sci.*, **22**, 185 (1956).
- 14) Oster, G., *J. Polymer Sci.*, **2**, pp. 1181 (1964).
- 15) Asada, M., Morimoto, K., Tanaka, A. and Kamikubo, T., *Agric. Biol. Chem.*, **43** (8) 1773 (1979).
- 16) Bernfeld, P., et al., *J. Science.*, **142**, 678 (1963).
- 17) 河邊誠一郎, 岡山理科大学紀要, **14**, 97 (1978).
- 18) 河邊誠一郎, 岡山理科大学紀要, **13**, 119 (1977).
- 19) 永松元太郎, 乾英夫, 感光性高分子, 講談社 (1978).

## Immobilization of Papain by the Use of Photo-crosslinkable Resin Oligomer (No. 2)

### Various Factors for Immobilization of Papain

Seichiro KAWABE

*Department of Fundamental Natural Science, Okayama  
University of Science, Okayama, Japan.*

(Received September 29, 1980)

In the previous paper, photocrosslinkable oligomers were found to be useful materials for immobilization of papain.

The photocrosslinking reaction could be occurred very easily and under very mild conditions.

In this paper, the effect of the immobilized materials on the papain reactions was investigated.

It became apparent that an initiator (benzoin ethyl ether) had little influence on the papain activity, on the other hand, photocrosslinking oligomers (polyethylene glycol dimethacrylate, and the like) had serious effect on that. In such cases, the papain activity was remarkably protected by modifying its active site with mercury. And also, it was found that the reaction product (p-nitroaniline) was adsorbed by the polyethylene glycol dimethacrylate resin.

The adsorption rate was approximately constant for each resin weight, and decreased with an increase in immobilized papain in resin.

This immobilized papain showed the excellent stability for at least 20 batch reactions (presumably more than 100).