

# 水溶性高分子，ポリビニルアルコールによる パパインの固定化

河邊誠一郎\*・河邊要太郎\*\*

岡山理科大学 基礎理学科\*， 応用化学科\*\*

(昭和57年9月24日 受理)

## 緒 言

酵素を固定化するにあたり，様々な方法および担体素材が紹介<sup>1)~4)</sup> されている。筆者らは，これまで温和な条件下で，酵素に与える影響が比較的小さく，長期間の使用に耐えうるという点から，光硬化性樹脂<sup>5),6)</sup> およびアクリルアミド樹脂<sup>7),8)</sup> を利用した酵素（パパイン）の包括固定について報告した。これら固定化担体は，その固定化操作および強度の点において十分良好な性質を示したが，その活性値または，担体の安全性という点に関し検討の必要があった。最近になって，調製操作の条件が温和で，更に簡単に固定化可能な素材，その素材と酵素との間でほとんど反応がなく酵素の活性におよぼす影響のほとんどない素材の開発検討がなされるようになり，安価でしかも安全性の高いカラギーナン，アルギン酸ソーダなどの天然担体を利用した報告<sup>9)~10)</sup> が見られる。筆者らも柑橘ペクチン<sup>11)</sup>，および愛玉子多糖<sup>12)</sup>，について報告した。本報告では，上記のもの以外で，繊維や糊などに利用され，数少ない水溶性高分子として知られるポリビニルアルコール（PVAと略す）が，前述の条件に近く固定化担体として利用可能な性質を持っていることから，この素材を用いたパパインの固定化を試みた。

## 実験方法

**材料。** 酵素には既に報告<sup>5)~8)</sup> した様な性質を持つパパイン（比活性 22.1 mU/mg）（東京化成㈱）を用いた。基質にはアミダーゼ活性を測定する目的で，低分子合成基質 N- $\alpha$ -benzoyl-DL-alginin-p-nitroanilid-HCl (SIGMA 製) (BAPNA と略す) を用いた。担体素材としての PVA は，平均重合度 500, 1500, 2000（石津製薬㈱）のもの，および PVA 117，平均重合度 1750（クラレ㈱）を使用した。

**PVA 包括パパインの調製** 10wt % PVA 水溶液を直径 4.5 cm のシャーレに一定 g 数分取し，これに各濃度の native パパイン水溶液を 1 ml 加え十分均一になるよう攪拌する。この混合液を完全に凍結した後，凍結乾燥によって結晶構造を保った板状固定化パパインを得た。固定化物は密封して，4℃にて保存した。

**酵素活性測定法** 既報<sup>5)~8)</sup> に示した方法に従ってアミダーゼ活性を測定した。基質に

は 1.2 mM・BAPNA 塩酸塩 (5%ジメチルスルフォオキシドを含む) pH 6.8,  $\frac{M}{10}$  リン酸緩衝液を用い 35°C で反応を行なった。その反応生成物 p-ニトロアニリンを 410 nm における分光分析により測定した。

### 結果と考察

**ケン化度と水溶解性** PVA の水に対する溶解性は、一般に重合度よりもケン化度に大きく影響されることが知られている<sup>13)~14)</sup>。その性質をまとめると表 1 のようになる。高

Table 1. Solubility of PVA<sup>14)</sup>

	Degree of saponification	Cold water	Warm water	Alcohol
High ratio of PVA	over 95%	Swelling	Soluble	Insoluble
↕	80%	Soluble	Insoluble	—
High ratio of PVAc*	below 50%	Insoluble	Insoluble	Soluble

\* polyvinyl acetate

ケン化度の PVA の中には冷水で多少溶解するものもあるが、大部分は加熱しなければ溶解しない。そこでこの性質を利用し、できるだけバラツキの少ない高ケン化度の中～低温水で溶けにくい PVA を得るために次のような処理を行った。まず、PVA を 45°C の温水中で 30 分間攪拌した後大量の氷水中に投入した。その上澄液を除去し、残渣をメタノール中に懸濁し脱水乾燥したものを温水処理 PVA として実験に供した。こうして処理した PVA および市販の未処理 PVA のケン化度を定法に従って測定した。その結果を表 2 に

Table 2. Degree of saponification of each PVA.

Degree of polymerization	Degree of saponification (mol %)	Degree of saponification (after treatment) (mol %)
500	87.6	—
1500	82.5	—
1750	95.6	98.7
2000	98.4	98.6

示す。この結果より平均重合度 1750, 2000 のものは低温ではほとんど水にとけず、500 および 1500 のものは溶解し易いことが予想され、実際にその通りの状態を示した。この低温水に溶け難い平均重合度 1750 および 2000 の PVA を前述の操作で温水処理するとわずか

ではあるがケン化度が上昇し, 温水に溶解易い(ケン化度の低い)成分がある程度除去されたものと考えられた. そこでこの点を確かめるために, この2つのPVAを用い各温度の水中にPVA担体を浸漬した場合のゲル担体の温度別耐水性をしらべた. 即ち各PVA凍結乾燥板状担体を用い各々の温度の水中に1時間浸漬した. これをとり出し十分乾燥した後その担体の重量を測定し, 浸漬前の重量と比較した. その結果, 図1に示すように温水処理したPVA担体は, 熱水安定性が向上し, PVAをそのまま担体調製したものに比

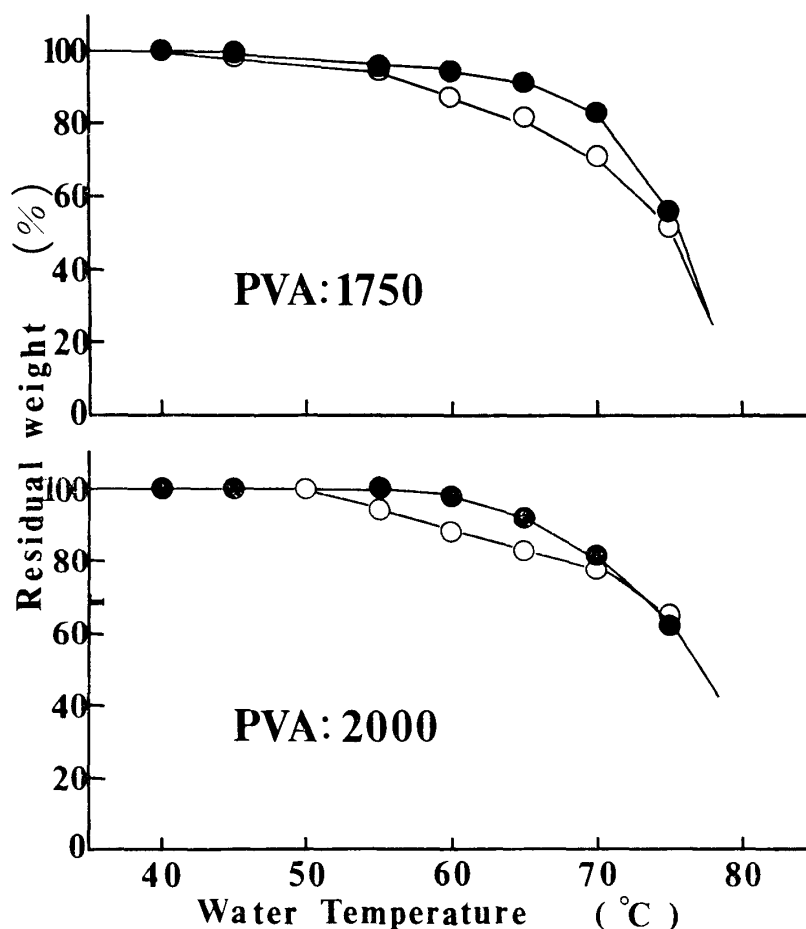


Fig. 1 Thermal stability of PVA in water

—●—: treated PVA with warm water  
—○—: untreated PVA

べ5~10°C高温水に耐えた. またこの耐熱水性は平均重合度1750のものより $\bar{P}$ 2000のPVAの方が5°C程度良好で60~65°Cまで耐えることがわかった. 以上の結果より, 固定化PVA担体素材としては, 温水処理を行なった平均重合度2000のPVAを主に使用した. パパインをはじめ, 一般の酵素反応の場合, その反応温度には35~40°Cが用いられることからPVA $\bar{P}$ 2000および1750は, 担体として十分利用できるものと考えられた.

#### 包括酵素量と樹脂量について

a) 樹脂量一定の場合の固定化パパインの活性. まずPVA $\bar{P}$ 2000(温水処理)の一定量(400mg)に, 様々な量の酵素パパインを包括させた固定化パパインの連続反応を行なっ

た。酵素（パパイン）の量は各々 5, 12.5, 25, 50mg 包括させた。連続反応にあたり、次のようにしてその反応を行なった。直径 4.5 cm のシャーレ中で凍結乾燥して得たパパイン包括固定化担体の約  $\frac{1}{4}$  量（約 100mg）を精秤し、15AG3 のガラスフィルター付試験管中で反応を行なった。反応に際し、第 1 回目だけは 5 ml の活性化剤（0.02 M・L-システインと 0.008 M・EDTA・2Na）で 35°C、30 分間担体を十分膨潤させると共に酵素を活性化させた。その後、液を流去し、残渣に改めて活性化剤 2 ml と基質・BAPNA 5 ml を加え定法通り反応を行なった。この反応操作を連続して行ないその相対活性をみたものを、図 2 に示した。

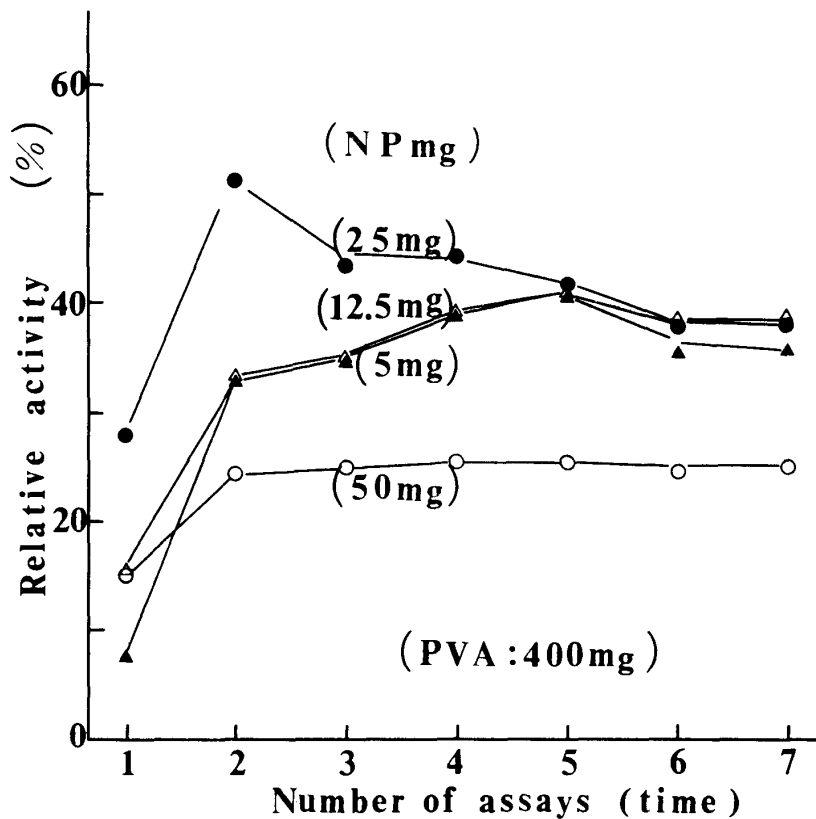


Fig. 2 Effect of the amount of additional papain on the activity of PVA entrapped papain. The activity of soluble native papain is taken as 100%.

この表面積、厚さが同じ固定化担体の場合、その相対活性は、酵素量 50mg/400mg PVA の場合を除き他はほぼ近似の活性を示した。酵素 50mg 包括の場合、包括能力を越えている（脱離する）ためか、安定な値を示すもののその相対活性値は 25% 程度の低いものとなった。これより PVA 樹脂 400 mg に対し 15~25mg の酵素量であることが望ましいものと考えられた。

b) 酵素量一定の場合の固定化パパインの活性。酵素パパインの量 20mg に PVA P̄ 2000 樹脂 50, 100, 200, 300, 400mg を各々加え固定化パパインを調製した。この担体の連続反応は、図 3 のようになった。反応方法は前記と同様にして行なった。その結果、樹脂量があまりに少ないと包括しきれず（最初の膨潤、活性化時に脱離したものと考えられる）相

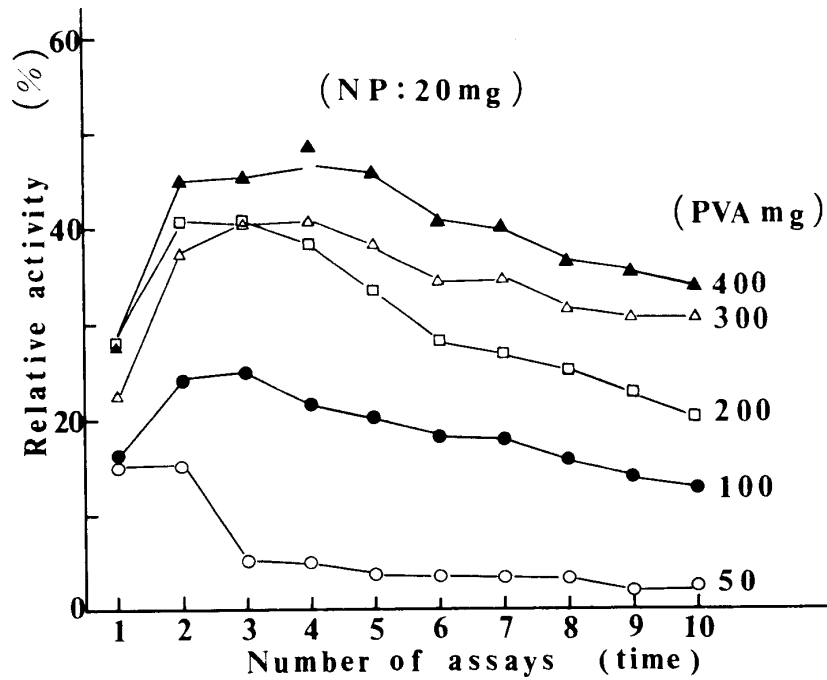


Fig. 3 Effect of the amount of additional PVA on the activity of PVA entrapped papain. The activity of soluble native papain is taken as 100%.

対活性は低い。その活性値, 安定性から考え酵素20mg当り PVA 量は 400 mg の割合(1:20)の時, 良好な固定化パパインが得られることがわかった。

c) 酵素量/樹脂量一定(1:20)の固定化パパイン活性。前述の通り酵素量と樹脂量の割

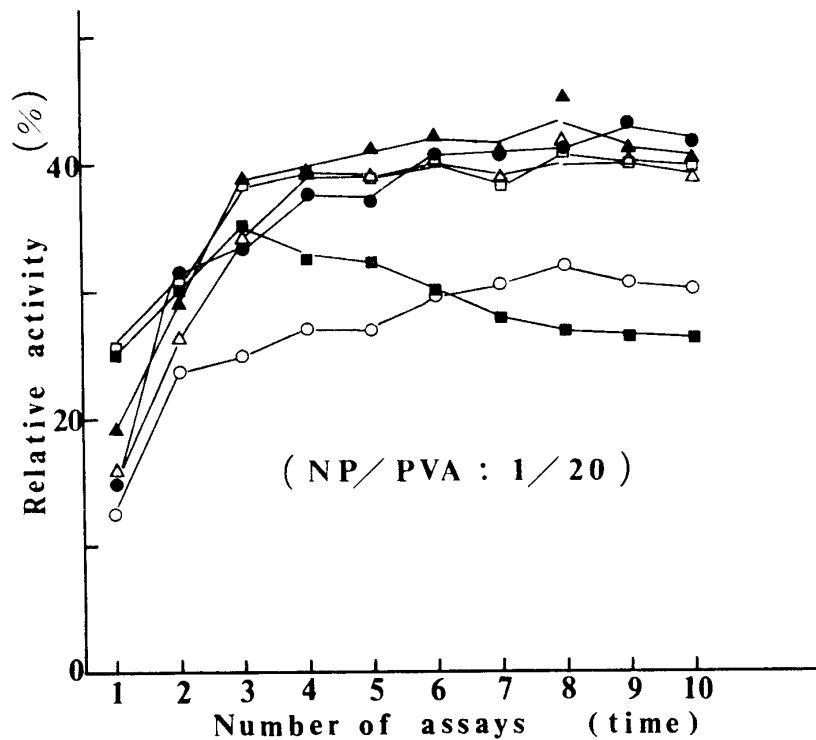


Fig. 4 Effect of total amount of PVA and papain on the activity of immobilized papain.

—■—: 315mg, —□—: 420mg, —▲—: 525mg,  
 —△—: 630mg, —●—: 735mg, —○—: 945mg.

合は1:20前後で良好な固定化パパインが得られることから、次にこの割合で、全体量を変えた場合の良好な固定化物調製について検討した。PVA P̄ 2000を300mg~900mgまで6種類の量に対し、酵素量を各々1/20ずつ加え担体を得た。これを前述の方法で連続反応させ活性を検討した。なおこの実験の場合にかぎり1反応ごとに30mlの緩衝液で担体を洗浄している点他と条件が異なる。その結果を図4に示した。この場合の固定化物は酵素と樹脂量の割合(1:20)、および全て直径4.5cmのシャーレで調製したため、その表面積は一定であるが、担体の厚さが異なるものである。その400~700mgを用いて固定化担体を調製した場合、その相対活性および安定性共に高い。これに対し300mgの場合、担体の厚さが薄く酵素保持能が小さくなるためか、安定性に欠け、また900mgの場合には逆に担体が厚すぎるためか、良好な固定化担体調製に至らなかった、と同時に酵素と基質の接触および拡散が阻害されたためもあり安定性は高いものの、相対活性値が低くなってしまった。

**連続酵素反応** 以上の結果より温水処理したPVA P̄ 2000を担体素材とし、その400mgと20mgのパパインを直径4.5cmのシャーレ中において均一混合溶液とした後、凍結乾燥して固定化パパインを得た。この固定化物を用い、定法通り、繰り返えし35回連続反応を行った結果を図5に示す。活性は3回目の反応でピークに達し、水溶性パパインの60%近

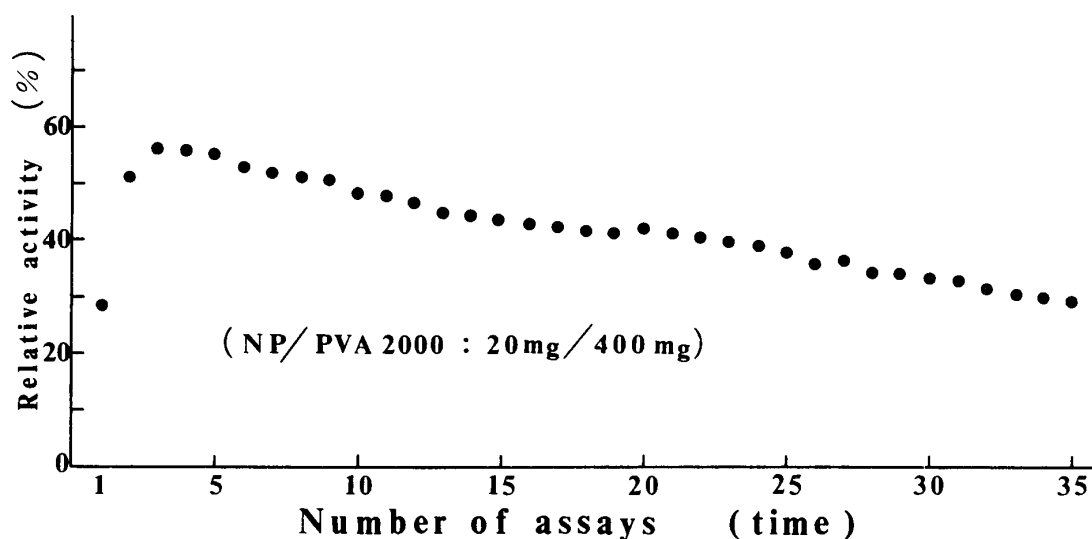


Fig. 5 Repeated use of immobilized papain. The activity of water soluble native papain is taken as 100%.

くの値を示した。そして以後徐々に低下し、その割合は1回ごとに約1%程度であった。これは、担体のPVAが、水溶性高分子であるために、温水処理や、凍結乾燥処理程度では、その性質を脱しきれず、長期間の浸水により担体が徐々に軟化、膨潤してゆくため、一部溶解し、それに伴ない酵素の脱離がおこってしまうためと考えられた。事実酵素の脱離が丁度この低下の割合と一致していることを確認している。しかしながら、単に樹脂と酵素を水に溶解し、混合して凍結乾燥するだけで約50~60回もの安全で高い活性値を持つ固定化酵素が得られ、安全性が特に要求される食品、医療関係への有効利用が可能となる

など，PVAは優秀な固定化担体となり得ることがわかった。なお，この脱離による活性低下の防止および高分子基質との反応性改善に関し現在更に検討している。

## 要 約

水溶性高分子：ポリビニルアルコール (PVA) によるパパインの固定化と，その調製条件を検討し，次の結果を得た。

- 1) 10% PVA 水溶液に酵素パパインを加え，その混合溶液を凍結乾燥すると簡単に固定化パパインが得られた。
- 2) あらかじめ PVA を温水処理すると，低ケン化度 PVA が溶出されるためにケン化度が上昇し，これを用いて調製した PVA 担体の熱水安定性は増加し，各種 PVA のうち，重合度2000の PVA が，最も高い耐熱水性を示した。
- 3) 温水処理した重合度2000の PVA 400mg に対し酵素(パパイン) 20mg (20:1)の割合で，4.5 cm のシャーレ中で調製した固定化担体が良好な性質を示した。
- 4) このようにして調製した固定化パパインは，35回以上の連続反応を行なっても，安定で高い活性値を示した。

本研究を行なうに当たり御指導，御鞭撻を賜りました早稲田大学理工学部，宇佐美昭次教授に厚くお礼申し上げます。

## 文 献

- 1) 千畑一郎(編)：固定化酵素，講談社サイエンティフィック (1975)。
- 2) Mosbach, K.: *Methods in Enzymology*, XLIV, Academic Press, New York (1976)。
- 3) Chang, T. M. S.: *Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins*, Vol. 1, 2, Plenum Press, New York (1977)。
- 4) Johnson, J. C.: *Immobilized Enzymes Preparation and Engineering Recent Advances*, Noyes Data Corporation (1979)。
- 5) 河邊誠一郎：岡山理科大学紀要，**15**，51 (1979)。
- 6) 河邊誠一郎：岡山理科大学紀要，**16**，117 (1980)。
- 7) 河邊誠一郎：食品照射，**15**，24 (1980)。
- 8) 河邊誠一郎，河邊要太郎：岡山理科大学紀要，**17**，45 (1981)。
- 9) Kierstan, M., Bucke, C.: *Biotechn. Bioeng.*, **19**，387 (1977)。
- 10) Tosa, T., Sato, T., Chibata, I.: *Biotech. Bioeng.*, **21**，1967 (1979)。
- 11) 河邊誠一郎，河邊要太郎，宇佐美昭次：日本食品工業学会，29回大会発表 (1982)，(投稿中)。
- 12) 河邊誠一郎，宇佐美昭次他：昭和57年度醸酵工学会，大会発表 (1982)。
- 13) 高分子化学協会編：ビニル樹脂の応用例，p 24，高分子化学協会，出版。
- 14) 日本化学会編：化学便覧応用編，p 908，丸善。

Immobilization of Papain by the Use of Water Soluble Polymer :  
Polyvinyl Alcohol (PVA)

Seiichiro KAWABE\* and Yohtaro KAWABE\*\*

*\*Department of Fundamental Natural Science, Okayama  
University of Science, Ridai-cho 1-1, Okayama 700, JAPAN*

*\*\*Department of Applied Chemistry, Okayama University of  
Science, Ridai-cho 1-1, Okayama 700, JAPAN*

(Received September 24, 1982)

Immobilization of papain by the use of water soluble polymer : polyvinyl alcohol (PVA) and the conditions for the preparation of immobilized papain were investigated. The results were obtained as follows :

1) To the 10% PVA water solution, papain was added, and the mixture was lyophilized, so that immobilized papain was easily obtained.

2) The PVA previously incubated in warm water resulted in a rise in the saponification rate, and also the PVA support prepared with the above PVA resulted in an increase in the thermal water stability. The PVA of 2000 degrees of polymerization was the best thermal water stability of the various PVA.

3) Immobilized papain prepared PVA and papain in the proportion of 400mg to 20mg in a schale of 4.5 cm diameter showed some favorable properties.

4) This immobilized papain could withstand the continuous reaction for over 35 times, and showed high activity and stability.