

愛玉子によるパピンの固定化

(天然物担体利用による酵素の固定化 (第3報))

河邊誠一郎*, 河邊要太郎**, 宇佐美昭次***

岡山理科大学 基礎理学科*

岡山理科大学 応用化学科**

早稲田大学 理工学部 応用化学科***

(昭和59年9月27日 受理)

緒 言

固定化酵素および固定化微生物を調製するにあたり、その担体には、より高い安全性と温和な調製条件を持つ素材が選ばれることが望ましい。これらの条件に近いものとして、これまで κ -カラギーナン、アルギン酸ソーダ、アガロースなどの海藻起源の天然多糖物が研究されており、筆者らは柑橘ペクチンを利用した固定化について報告^{1),2)}した。しかし、これらの素材に関しても、ある程度のゲル化の為に熱や薬品処理が要求される。

本報告で使用した愛玉子は、その種子を冷、温いずれの水を使用しても短時間その中に浸漬するだけで寒天状をした多糖と見られる硬いゲル状の物質が得られるなど特異な性質を有している。また、台湾に於ては食用として供されるなど、前述の条件に最も近い物質として利用しうるものと考えられた。その性質に関しては、1930年頃に三宅ら^{3)~7)}によっていくつかの報告があるのみで、以後詳細な報告は見られず、これを固定化に応用した報告は見当たらない。そこで、筆者らはこの素材を利用した場合の酵素固定の可能性とゲルの性質について検討し、いくらかの知見を得たのでここに報告する。

実 験 方 法

使用担体および固定化酵素調製 愛玉子 (Aigyokushi) は、学名を *Ficus pumila* L. var. *awkeotsang* Corner, 別名をカンテンイタビと呼ばれ台湾に特産する桑科、オオイタビ種の植物⁸⁾である。この果実中に多数の長楕円形の種子 (瘦果: 1×3 mm) を含み、この種子がアイギョクシと称される。これを水抽出することにより半透明寒天状のゲルが得られ清涼食品として利用⁹⁾される。この愛玉子瘦果 10g に一定濃度のパピン酵素 (東京化成工業㈱ 22.1 m U/mg) 水溶液 100 ml を直接加え室温で15分間十分に攪拌した後汚布で手早く絞り取る。このゾルの一定量をシャーレに分取し約5時間、4℃で放置しゲル化させる。ゲルの強化は水道水または低濃度の塩化カルシウムなどのゲル強化剤中に一定時間浸漬する。その後余分な強化剤、水溶性低分子夾雑物を蒸留水または水道水中で1夜4

℃で透析除去して固定化物を得る。また抽出後数分間放置した後、注射器を用いてゲル強化剤中に注入、滴下することによって糸状および球状のゲルを得ることも可能である。

こうして得られた担体はそのまま湿潤状態で、あるいは凍結乾燥した発泡乾燥状態で実験に供した。

酵素活性測定法 酵素活性の測定は、そのアミダーゼ活性¹⁰⁾を次のようにして求めた。すなわち 0.01 M・L-システインと 0.004 M・EDTA・2Na を含む 0.1 M リン酸緩衝液 pH6.8 中に酵素（固定化酵素）を加え、37℃ で 30 分間保ち活性化したのち 1.2 mM・N- α -ベンゾイル-DL-アルギニン-p-ニトロアニリド塩酸塩 (BAPNA・HCl: SIGMA Chemical 社製, 5%ジメチルスルホオキシドを含む) リン酸緩衝溶液を加え 30 分間振盪しながら...素反応を行なった。反応停止には 30%酢酸水溶液を用い、遊離生成した p-ニトロアニリン(p-NA) の量を 410 nm での分光分析により測定した。

パパインの金属修飾については、既報^{1-2), 11-13)}で示したと通り、Kimmel¹⁴⁾らのマーキュリー化法を参考に一部改良して行なった。

結果および考察

アイギョクシゲルの性質 a) **ゲル形成** アイギョクシゲル化物の性質は次のようである。ゲル形成は蒸留水 100 ml に対し種子 3~4 g 程度使用の場合より認められるが、十分な硬さを保持した良好な担体を得るためには種子 6~7 g 以上が必要である。しかし 15 g 以上使用すると処理中に硬化が進みすぎ、均一なゲルを得るのが困難となる。そこで固定化酵素の調製には、水 100 ml に対し種子 10 g を用いて行なった。種子 10 g を多量の水で完全に抽出を行なうと、総乾燥重量として 1060 mg の粗抽出物が得られる。このゲル物質は茶色半透明をしているが、十分透析することにより白色半透明となる。しかし、蒸留水中ではゲルは膨潤し軟弱となる。一方、この半透明ゲルを水道水またはアルカリ土類金属 (Ca^{2+} , Ba^{2+} など) および各種金属 (Zn^{2+} , $\text{Fe}^{2+,3+}$, $\text{Cu}^{+,2+}$, Ni^{2+} , $\text{Mn}^{2+,3+}$ など) の希薄塩溶液中に浸漬すると、徐々に硬化を示す。またアセトンやアルコールなどによりゾル状のものもゲル化沈澱させることができ、さらに水酸化ナトリウムなどのアルカリ処理で溶解性を示し、塩酸などの酸処理によりゲル化を示すが、いずれの場合も可逆的でペクチンやアルギン酸に似た多糖の性質が認められた。また、種子を摩砕したり、過剰な熱処理を行なうとゲル化の進行が困難となる性質を示す。抽出したままのゲルは、水を加え加熱すると溶解するが、冷却により再ゲル化する。一方ゲル強化剤を用いて処理したものは蒸留水中で長時間煮沸しても容易に溶解しない。

b) **組成** 透析したゲルを用いてアンスロン硫酸反応¹⁵⁾を行なうと、ウロン酸の発色を示し、その吸収曲線 (Fig. 1) は、ガラクトキロン酸の吸収に似た曲線を示した。この製精ゲルの酸加水分解物をペーパークロマトグラフィーにより分析した結果もガラクトキロン酸を主成分とし、それにガラクトース、マンノースと考えられる糖が若干含まれてい

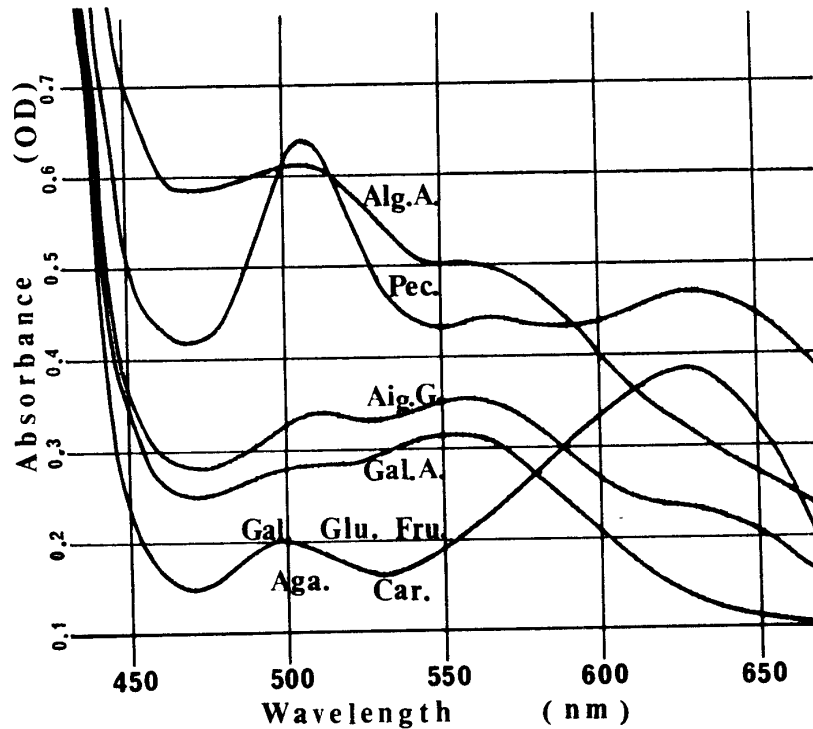


Fig. 1. Absorption spectra of sugars by Anthrone- H_2SO_4 reaction

Alg. A. : sodium alginate, Pec. : pectin,
 Alg. G. : aigyokushi gel, Gal. A. : galacturonic acid,
 { Gal. : galactose, Glu. : glucose, Fru. : fructose,
 { Aga. : agarose, Car. : κ -carrageenan.

ることが考えられ、ペクチンの組成に比較的類似していると思われる。

c) 分子量 その平均分子量については、ゲル物質の溶解性に検討の余地があるものの、ゲル透過法¹⁶⁾により推定した所では、柑橘ペクチン(約15~30万)より大きい35万程度の分子量と考えられる。

d) ゲル強化 アイギョクシ水抽出物はそのままで十分硬度のあるゲルを形成し、その凍結乾燥固定化担体もある程度までは役割を果たす。しかし反応条件(緩衝液、温度、pHなど)次第ではゲル強度が弱まる傾向が認められる。そのため、若干のゲル強化処理を行なう必要があると考えられた。そこで、前述の各種金属塩(1 M溶液、30分浸漬)のうち代表的なゲル強化剤処理によって得られたゲルが、0.1 M リン酸緩衝液中でその熱耐性にどのような挙動を示すかについて検討した。その結果を Table 1 に示す。Ca²⁺、Ba²⁺、Fe³⁺ および水道水(1夜浸漬)で処理した担体は、耐熱水性が高いが Cu²⁺ や K⁺ を用いた担体では、リン酸緩衝液中では容易に溶解してしまう。また水酸化カルシウムや酢酸バリウムを用いた担体は、溶液に白濁を生じるなど強化剤の緩衝液との反応や酵素活性への悪影響なども考えられ、塩化カルシウムまたは水道水による温和な処理が比較的良好と考えられた。これらの担体の耐性は既報^{1)~2)}のペクチン担体の場合に較べて5~15°C以上の高い耐性を示している。

Table 1. Thermal stability of aigyokushigel-entrapped papain

| Gelating agent | Temperature and residual rate (%) | | | | | |
|--------------------------------------|-----------------------------------|------|------|------|------|------|
| | 35°C | 45°C | 55°C | 60°C | 65°C | 70°C |
| CuSO ₄ | 100 | 70 | 40 | 10 | 0 | 0 |
| Ca(OH) ₂ | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| CaCl ₂ | 100 | 100 | 100 | 100 | 90 | 80 |
| Ba(CH ₃ COO) ₂ | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| FeCl ₃ | 100 | 100 | 100 | 100 | 95 | 95 |
| KCl | 100 | 90 | 70 | 65 | 60 | 30 |
| tap water (a night) | 100 | 100 | 100 | 100 | 50 | 0 |

{ in 0.1 M phosphate buffer, pH 6.8, 120rpm,
{ incubate for 1 hr., respectively.

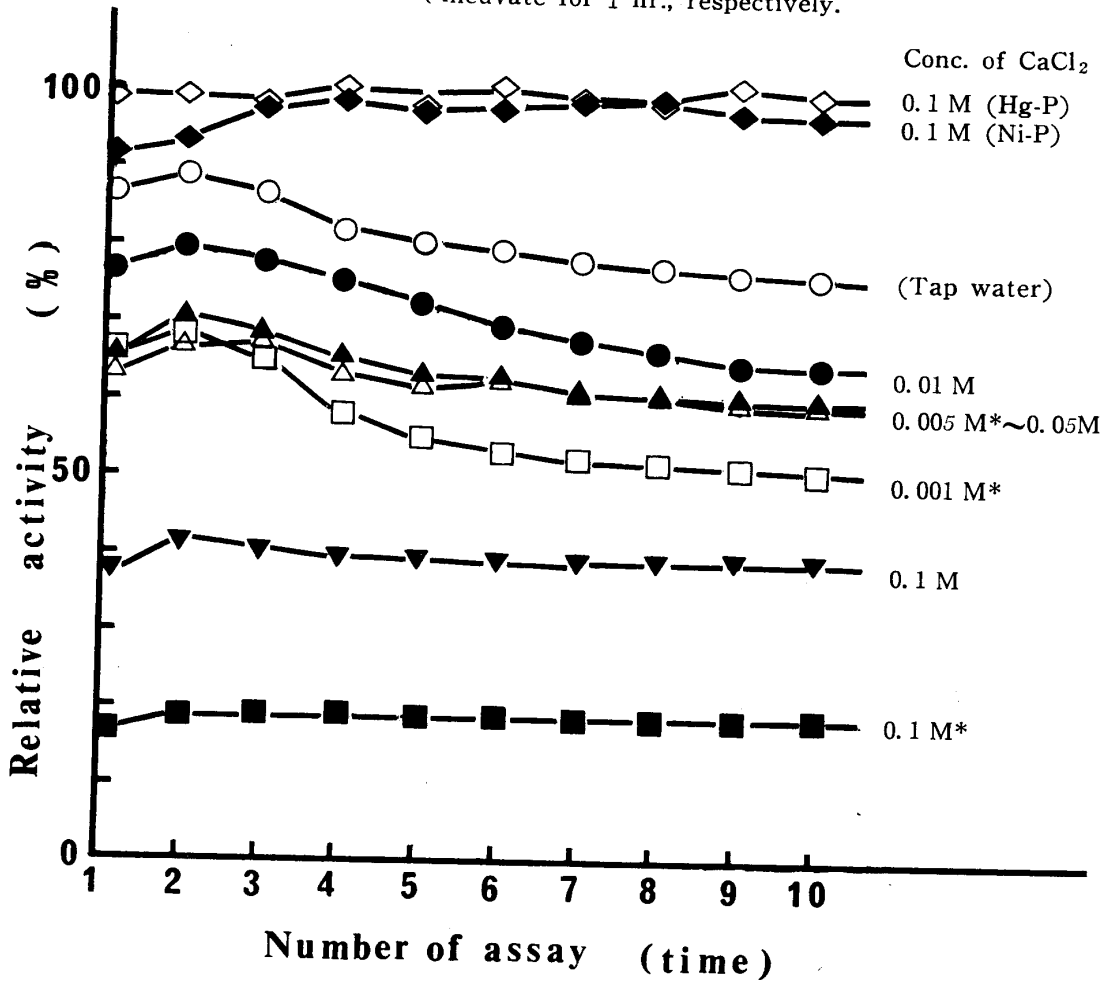


Fig. 2. Repeated use of immobilized papain

{Hg-P : Immobilized mercury-papain,
{Ni-P : Immobilized nickel-papain,

* : Supports in a state of yarn.

Each gels were prepared by various concentration of CaCl₂ or tap water. The activity of native papain is taken as 100 %.

連続酵素反応 以上のようにして得られた各種パパイン固定化担体を用いて、その連続酵素反応を検討した。反応は既報^{11)~13)}で示したようにガラス濾過器（ハリオ15 A-G3）を用いバッチ法で行なった。実験に際し1反応ごとに10 mlの緩衝液で洗浄した。第1回目の活性化にかぎり EDTA・2Naを含む通常通りの活性化剤を使用し、その後の活性化は担体への影響を考慮してペクチンの場合と同様、0.05M-L-システイン2 mlのみを基質1.2 mM・BAPNA 5 mlに同時添加して繰返し酵素反応を行なった。その結果を Fig 2 に示す。これよりパパインをそのまま固定化し、水道水中で1夜透析したものでは、最初90%程度の活性を示しその後70~75%で安定化する。一方1~50 mMの塩化カルシウムを用いてゲル強化したものは、60~80%の活性を示す。100 mM以上の濃度の塩化カルシウムを用いると、その活性は50%以下となるが、担体の硬度が高い為か、その安定性は初めから良好である。これに対し、あらかじめ水銀やニッケルでパパインの活性基(スルフヒドリル基)を保護してゲル固定したものでは、より高濃度のゲル強化剤を使用しても Ca^{2+} などによる酵素活性の阻害を受けないだけでなく L-システイン単独の活性化剤の使用も可能となるため担体の崩壊も起こさず長期間安定に100%近い活性を維持した良好な固定化パパインを得ることができる。一方糸状および球状の固定化物の場合低濃度のゲル化剤ではゲル化中の酵素およびゲル成分の流出があり、それに対し高濃度では活性阻害の影響が大きいため、金属による修飾が不可欠であるなどペクチンの場合と同様な考慮が必要と考えられる。またこの担体を用いると、微生物の固定にも有効であるという結果も得ている。更に詳細な点に関しては、現在検討中である。

要 約

台湾特産愛玉子種子を用いて酵素固定の可能性とゲルの性質について検討し、次の結果を得た。

- 1) 愛玉子種子表面にはガラクトキロン酸を主成分とするペクチン類似ゲル化多糖物質が含まれている。
- 2) この種子に水を加え短時間攪拌するだけで簡単にゲル物質が得られる。
- 3) アイギョクシゲルはそのままでも十分硬いが、アルカリ土類金属などで処理すると一層硬化し、水に不溶となる。
- 4) これを用いて酵素を包括固定し連続反応を行なうと、安定で高い活性値を示すなど酵素の固定化担体として非常に優れた性質を持つことが認められた。

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、加藤忠蔵教授、鈴木晴男教授、篠原功教授に厚く御礼申し上げます。

(本研究の一部は、早稲田大学理工学部、宇佐美教授の指導のもと、早稲田大学理工学研究員として行なったものである。)

文 献

- 1) 河邊誠一郎, 宇佐美昭次: 日食工誌, **30**(3), 140 (1983).
- 2) 河邊誠一郎, 宇佐美昭次: 日食工誌, **30**(9), 501 (1983).
- 3) 三宅捷, 大野成雄: 熱帯農学会誌, **2**, 1 (1930).
- 4) 三宅捷, 大野成雄: 熱帯農学会誌, **2**, 317 (1930).
- 5) 三宅捷, 大野成雄: 熱帯農学会誌, **4**, 295 (1932).
- 6) 三宅捷, 大野成雄: 熱帯農学会誌, **5**, 270 (1933).
- 7) 三宅捷, 上吹越勇: 熱帯農学会誌, **6**, 764 (1934).
- 8) 寺崎留吉: 日本植物図譜, p 126 (平凡社) (1977).
- 9) 朝日新聞社編: 週刊朝日百科世界の植物, **80**, 1887 (1977).
- 10) Erlanger, B. F., Kokowsky, N., Cohen, W.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **95**, 271 (1961).
- 11) 河邊誠一郎: 岡山理科大学紀要, **16**, 117 (1980).
- 12) 河邊誠一郎: 食品照射, **15**, 24 (1980).
- 13) 河邊誠一郎, 河邊要太郎: 岡山理科大学紀要, **17**, 45 (1981)
- 14) Kimmel, J. R., Smith, E. L.: *J. Biol. Chem.*, **207**, 515 (1954).
- 15) Koehler, L. H.: *Anal. Chem.*, **24**, 1516 (1952).
- 16) 志田, 間瀬, 笹川, 松田: 農化誌, **45**(10) 454 (1971).

Immobilization of Papain with Aigyokushi (*Ficus pumila*
L. var. awekeotsang Corner) seed Polysaccharide.

Seiichiro KAWABE*, Yohtaro KAWABE** and Shoji USAMI***

*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.

***Department of Applied Chemistry, Faculty of Science and
Engineering, Waseda University, Okubo, Shinjuku-ku, Tokyo 160 Japan.

Aigyokushi (*Ficus pumila L. var. awekeotsang Corner*) fruit contains the gelation material of polysaccharide and exhibits the unusual properties.

Aigyokushi hard gel of an agarose gel-like was easily able to obtain from a small amount of the seeds by stirring and extracting with distilled water for 15~20 minutes at room temperature. In analogy with pectin, the main component of the gel was composed of galacturonic acids.

The gel was became more hardening by the use of the alkaline earth metals and other several metals, whereupon the hardening gel was able to use very effectively as a support for immobilized enzyme. Activity of this immobilized papain was maintained at high levels and very stable for repeated usage.

It recognized that the propaties of aigyokushi gel were similer to, or more superior than that of pectine for support of immobilized enzyme reported in the previous paper^{1~2)}.