報 文**酵素水溶液の安定化に関する研究****安定化剤としてのグリセリン=ポリオキシプロ
ピレン=エーテルの効果**

村上幸子・船田 正・石田 祀朗

日本油脂 (株) 油脂研究所 (兵庫県尼崎市大浜町 1-56)

Study on the Stabilization of Lipase in Aqueous Solution**Glycerol Poly(oxypropylene) Ethers as an Lipase-Stabilizing Agent**

Sachiko MURAKAMI, Tadashi FUNADA, and Shiro ISHIDA

Research Laboratory of Oil and Fats, Nippon Oil & Fats Co. Ltd.

(1-56 Ohama-cho, Amagasaki-shi, Hyogo)

Enzymes are known to be unstable in the absence of any stabilizing agents. Especially, lipase (EC 3.1.1.3) is more unstable than others. Generally, enzymes are said to be stabilized by its substrate or polyols.

Glycerol or the substrate such as olive oil is found to stabilize lipase (from *Candida cylindracea*) in aqueous solution. For example, lipase is completely inactivated at 50°C for 4 h in aqueous solution (100 U/ml), however 80% of the lipase activity is preserved in the presence of 3.6 M glycerol under the same conditions.

We have investigated the series of glycerol derivatives which would stabilize the lipase in aqueous solution, and found that glycerol poly(oxypropylene)ethers could stabilize lipase more effectively than glycerol. Actually, 97% of the lipase activity was preserved in the presence of 1.05 M glycerol poly(oxypropylene)ether (TG-300) under the above conditions.

Poly(oxypropylene) groups as well as hydroxyl groups seem to stabilize lipase cooperatively. We believe that hydroxyl groups hold some parts of the enzyme, while poly(oxypropylene) groups hold other parts of the enzyme by the hydrophobic bond simultaneously. This type of complex makes lipase to be stabilized in the aqueous solution.

1 緒 言

一般に酵素は物理的、化学的に不安定な物質である。なかでも、リパーゼは他の酵素に比べ不安定であることが認められ、それに関する知見も数多く報告されている^{1)~8)}。近年、このリパーゼを触媒として工業的に使用したり、臨床試薬として使用するという試みが、行われている。これに伴い、耐熱性のある安定性の高いリパーゼを得ることが重要な課題となっている。この問題を解決するために、これらの条件を満たす新しいリパーゼを生産する菌を探索することも一法であるが、従来の不安定なリパーゼを安定化して使用する方が、合理的であると思われる。

古くから、基質や多価アルコールが、酵素に対し、安定化効果を示すことが知られている^{9)~12)}。著者らは、これに基づきリパーゼの基質であるグリセリドと類似の立体構造を持つグリセリンのポリエーテル化合物であるポリオキシプロピレントリオールについて、その添加による安定化効果を検討した結果、この化合物が、リパーゼを著しく安定化することを見いだした。以下にその結果を報告する。

2 実 験**2.1 試 薬**

リパーゼ: *Candida cylindracea* の産生するリパーゼ (粉末) 360,000 U/g 名糖産業 (株)

製 (以下リパーゼ CC と略す)

安定化剤: i) グリセリン 局方濃グリセリン純度 99.3% 日本油脂 (株) 製

ii) ポリエーテル 日本油脂 (株) 製
グリセリンのポリオキシプロピレンエーテルで、構造は

であり、その分析値を **Table-1** に示す。

Table-1 The characteristics of polyethers.

	TG-300	TG-400	TG-1000	TG-1500	TG-2000
Calcd. MW	306	405	1,000	1,440	1,885
OH Value	550	415	171	117	89
Moisture content	0.03	0.04	0.01	0.02	0.04
HLB ⁽³⁾	10.72	10.46	8.92	7.80	6.64

基質: 精製オリブ油 山桂産業製オリブ油を常法により精製した。けん化価 193, 酸価 0.2

2.2 実験方法

2.2.1 リパーゼ活性測定法

リパーゼの活性単位の測定は, Yamane ら¹⁴⁾ によるオリブオイルエマルジョン法によった。1 単位 (U) は, 所定の条件下でオリブ油を加水分解し, 1 min に 1 μmol の脂肪酸を遊離する酵素量である。

活性単位測定試料調製用ホモジナイザーは, 日本精機製作所 (株) 製 “Universal Homozinizer” を用いた。

2.2.2 リパーゼ残存活性測定法

岩井ら¹⁵⁾ によるリパーゼ活性測定法の変法であり, pH 7 の 0.1 M リン酸緩衝液 5 ml, リパーゼ CC 水溶液 1 ml, オリブ油 1 ml を, 50 ml スクリュー管に入れ, 37 $\pm$ 0.2 $^{\circ}\text{C}$ においてマグネティックスターラーにて 500 rpm のかくはんで, 1 h 反応後, アセトン-エタノールの等容量混液 20 ml を加え, 反応を停止する。遊離した脂肪酸を N/20 NaOH 水溶液で, 滴定する。

pH 7 の 0.1 M リン酸緩衝液 5 ml, オリブ油 1 ml で上記と同様に処理し, 滴定したものを空試験とする。

$$\text{残存活性 (\%)} = \frac{a-b}{a'-b} \times 100$$

a: 所定時間後の活性測定時における滴定値

a': 0 時間後の活性測定時における滴定値

b: 空試験における滴定値

2.2.3 リパーゼ水溶液安定性試験法

40 $^{\circ}\text{C}$, 50 $^{\circ}\text{C}$, 60 $^{\circ}\text{C}$ におけるリパーゼ水溶液 (100 U/ml)

Fig.-1 Thermostability of aqueous solution of lipase (100 U/ml) at 40 $^{\circ}\text{C}$, 50 $^{\circ}\text{C}$, and 60 $^{\circ}\text{C}$.

の安定性は, **Fig.-1** に示す通りである。

60 $^{\circ}\text{C}$ では 30 min で, 50 $^{\circ}\text{C}$ では 4 h で失活してしまうことから, 短時間で各添加剤の安定化効果と, 失活のタイムコースを知ることが可能な 50 $^{\circ}\text{C}$ を, 温度条件として選択した。

実験は, 100 U/ml のリパーゼ水溶液に所定の量の添加剤を加え, 50 $^{\circ}\text{C}$ の恒温水槽中に保ち, 各時間後にサンプリングし, 蒸留水で 20 倍に希釈後, リパーゼ水溶液の残存活性を測定した。

3 結果と考察

3.1 酵素反応時におけるポリエーテル類の影響

グリセリン, 各ポリエーテルの存在が, 酵素反応時にどのような影響を与えるのかを明らかにするために, まず, これらの反応時における添加効果をみた。すなわち安定性試験に際し, 50 $^{\circ}\text{C}$ の温度処理前に, リパーゼ残存活性測定法により活性を測定した。

Table-2 に示すように, TG-400 を除いては濃度によりその差はあるものの, 明らかな反応促進効果を示している。これはポリエーテルの適量の添加による界面活性効果であり, リパーゼの反応の場である界面を増加せしめたためと考えられる。

3.2 基質 (オリブ油), グリセリンによる安定化効果

従来より安定化効果の認められていたグリセリン^{9)~11)}, リパーゼの基質であるオリブ油の添加によるリパーゼ CC に対する安定化効果を検討し, その結果を **Fig.-2, 3** に示した。

これによると, グリセリンの場合には添加量と安定化効果が比例しているのに反し, オリブ油のそれらの間には, 顕著な関係が認められない (**Fig.-4, 5**)。

これは, グリセリンが親水性であり, 任意の濃度で水に溶解するのに反し, オリブ油は親油性であり, 水には溶解しないというように, 物理的, 化学的性質が, 全く異なるため, グリセリンとオリブ油のリパーゼ水溶液の

Table-2 Effect of polyethers in lipase reaction.

Polyether	Concn. (M)	Residual activity (%)
Control	0	100
Glycerol	3.6	131.7
	0.48	117.1
	0.05	103.4
TG-300	1.05	179.4
	0.44	122.2
	0.23	125.7
	0.05	143.1
	0.02	123.9
	0.005	109.4
TG-400	0.83	70.5
	0.42	77.6
	0.05	87.7
	0.025	69.0
	0.005	82.3
TG-1,000	0.25	111.9
	0.20	114.0
	0.05	105.2
	0.005	84.7
TG-1,500	0.07	92.7
	0.02	88.9
	0.005	107.9
TG-2,000	0.26	131.0
	0.16	76.0
	0.024	132.4
	0.005	71.1

Fig-2 Effect of glycerol in stabilizing lipase aqueous solution at 50°C.

安定化に対する作用機構が全く異なることが、予想される。

Bradbury らは、グリセリン、マンニト、ショ糖、エチレングリコールなどの多価アルコールが、アルデヒド脱水素酵素に対し、安定化効果があるとともに、酵素のキネティクスにも変化をもたらしていることを見いだ

Fig-3 Effect of oliveoil in stabilizing lipase aqueous solution (100 U/ml) at 50°C. **Fig-4** Effect of the concentration of glycerol in lipase aqueous solution (100 U/ml) at 50°C. **Fig-5** Effect of the concentration of olive oil in lipase aqueous solution (100 U/ml) at 50°C.

している¹⁶⁾。また Jakoby らは、グリセリンのアルデヒド脱水素酵素への影響を調べているが、それによると K_m 値の変化は、反応液の粘度や誘電率の変化とは関係なく酵素の構造との関連が深いとしている¹⁷⁾。

以上のことより、グリセリンが、酵素に対して安定化作用を示すのは、グリセリンと酵素の間に水素結合が形成され、グリセリンが酵素を取り囲むような形となり、酵素を安定化するものと推定される。

また、基質が酵素を安定化するのは、活性点に基質が結合することにより、エネルギー的に安定となるためとされている¹⁸⁾。またリパーゼは、水と油の界面に吸着されやすく、この界面において反応が進むことから、リパ

一ゼ自体の親水性の部位が水側に、親油性の部位が油側に保持され、構造的に安定化されると考えられる。

3.3 ポリエーテルによる安定化効果

TG-300, 400, 1000, 1500, 2000 のいずれのポリエーテルにおいてもリパーゼ水溶液の著しい安定化効果が認め

Fig.-6 Effect of TG-300 in stabilizing lipase aqueous solution (100 U/ml) at 50°C.

Table-3 Effect of polyether in stabilizing lipase aqueous solution (100 U/ml) at 50°C.

Polyether	Concn. (M)	Residual activity (%)			
		0.5 h	2 h	3 h	4 h
None	0	57.4	6.1	4.2	0
TG-300	1.05	94.9		88.6	97.5
	0.44	83.8	65.7	73.4	52.5
	0.23	89.7	63.9	54.0	36.7
	0.05	63.3	55.9	44.8	33.1
	0.02	85.4	36.8	32.2	30.2
	0.005	90.5	45.6	39.3	31.8
TG-400	0.83	19.8	0		
	0.42	78.6	61.8	55.2	40.8
	0.05	74.2	57.2	41.5	34.9
	0.025	103.4	71.6	46.7	34.9
	0.005	93.3	61.6	44.0	40.2
TG-1,000	0.25	77.6	35.6	25.5	45.6
	0.20	54.0	35.2	12.5	12.7
	0.05	36.9	35.7	22.1	11.7
	0.005	37.7	41.9	38.4	44.0
TG-1,500	0.07	45.9	70.0	15.2	14.6
	0.02	65.5		29.7	11.7
	0.005	21.8	10.8	19.6	13.9
TG-2,000	0.26	98.9	83.6	65.6	49.9
	0.16	78.5	52.0	47.1	22.6
	0.024	80.4	84.6	41.8	31.6
	0.005	74.2		36.3	35.8

められた (**Fig.-6, Table-3**)。

これは、先に述べた反応時における反応促進効果を差し引いて考えたとしても、著しい安定化効果と言えよう。

グリセリンが、3.60 M の濃度で、50°C, 4 h 後の残存活性が 80% であったのに対し、TG-300 においては 1.05 M の濃度で、残存活性が 97% という極めて高い安定化効果を示した。

ポリエーテルは、酵素水溶液中で酵素を保護するような形になっているとすれば、オキシプロピレン基の付加モル数や、ポリエーテルの添加モル数が残存活性に大きくかわってくるはずである。そこで各酵素水系中に存在するオキシプロピレン基の全モル濃度と、50°C, 4 h 後の残存活性との関係をみた (**Fig.-7**)。

Fig.-7 Effect of molar concentration of oxypropylene in stabilizing lipase aqueous solution (100 U/ml) at 50°C for 4 h.

HLB 値の高い、すなわち、水に対して分散が容易な TG-300, TG-400 には極大値が、また、分散が少々困難になってくる TG-1000, TG-1500, TG-2000 には極小値が存在している。すなわち、オキシプロピレン基の付加モル数の少ない TG-300, TG-400 は、その親水性から安定化に対しグリセリンと同様な作用機作で安定化

するとともに、酵素の 3 次、4 次構造を保持している疎水結合に、オキシプロピレン基が影響を与え、リパーゼ-ポリエーテル複合体を作り、安定化するものと考えられる。しかし、残存活性が極大値をとる濃度以上の濃度になると安定化効果が急速に低下することから、ポリエーテルがある濃度以上になると活性点をふさぐ結果となり、酵素反応に対し阻害効果を示すと考えられる。

Fig.-7 は、TG-1000, TG-1500, TG-2000 が安定化に対し、2 種の要因があることを示唆し、残存活性が極小値をとるところで、この 2 種の効果が相殺されると考えられる。すなわち、極小値をとるまでは、ポリエーテルは均一に分散し、各分子と酵素の間に、水素結合が形成され酵素は安定化するものと考えられる。また、極小値をとる濃度以上の濃度では、酵素の構造変化を伴う協同的結合^{19), 20)}が生じることにより安定化されと考えられる。

(昭和 58 年 4 月 1 日受理)

文 献

- 1) O. Rosenheim, *J. Physiol.*, **40**, 8 (1910)
- 2) W. von Paschenko-Jurewicz, H. Kraut, *Biochem. Z.*, **275**, 114 (1935)
- 3) W. von Paschenko-Jurewicz, H. Kraut, *Biochem. Z.*, **285**, 404 (1936)
- 4) W. Connstein, E. Hoyer, H. von Wartenberg, *Ber.*, **35**, 3988 (1902)
- 5) R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leiz, *Z. Physiol. Chem.*, **134**, 161 (1924)
- 6) J.V. Fiore, F.F. Nord, *Arch. Biochem.*, **26**, 382 (1950)
- 7) H.E. Longenecker, D.E. Halley, *J. Am. Chem. Soc.*, **59**, 2159 (1937)
- 8) C.V. Ramakrishnan, *Naturwissenschaften*, **41**, 16 (1954)
- 9) N. Kawashima, S. Shingh, S.G. Wildman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **42**, 664 (1971)
- 10) S.L. Bradbury, W.B. Jakoby, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 2373 (1972)
- 11) J. Jarabak, J.A. Adams, H.G. Williams-Ashman, P. Talalay, *J. Biol. Chem.*, **273**, 345 (1962)
- 12) D.M. Blow, T.A. Steitz, *Ann. Rev. Biochem.*, **39**, 363 (1970)
- 13) J.T. Davies, *Proc. Intern. Congr. Surface Active Substances, 2nd (London)*, **1**, 426 (1957)
- 14) T. Yamane, T. Funada, S. Ishida, *J. Ferment. Technol.*, **60**, 517 (1982)
- 15) 岩井美枝子, 大阪市立工業研究所報告, **39**, 5 (1965)
- 16) S.L. Bradbury, W.B. Jakoby, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 2373 (1982)
- 17) J.S. Myers, W.B. Jakoby, *J. Biol. Chem.*, **250**, 3785 (1975)
- 18) D.M. Blow, T.A. Steitz, *Ann. Rev. Biochem.*, **39**, 363 (1970)
- 19) Y. Nozaki, J. Reynolds, C. Tanford, *J. Biol. Chem.*, **249**, 4452 (1974)
- 20) C. Tanford, *J. Mol. Biol.*, **67**, 59 (1972)