報 文

酵素の安定化に関する研究 (第2報)

グリセリン=ポリオキシエチレン=エーテル
による安定化について

村 上 幸 子・船 田 正・石 田 紀 朗

日本油脂 (株) 油脂研究所 (兵庫県尼崎市大浜町 1-56)

Studies on the Stabilization of Enzyme. II.

Glycerol Poly(oxyethylene)Ethers as Enzyme-Stabilizing Agents

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)

Glycerol poly(oxyethylene)ether (GPEE) was found to effectively stabilize *Candida cylindracea* lipase in an aqueous solution (100 U/ml) at 50°C. That is, this lipase became thermally stable in the presence of GPEE. Polyoxyethyleneglycol (PEG) and polypropyleneglycol (PPG) were also tested as stabilizing agents of this lipase in an aqueous solution and found to be effective.

The relationship between the amount of additives in the lipase solution and their stabilizing extent was complicated. GPEE stabilized the lipase in proportion to its concentration and PEG brought about maximum stabilization at a concentration of 2.5 mmol/20 ml of solution. But stabilization became progressively less with increasing amount of PEG.

Consequently, each additive is considered to have individual mechanism for imparting stability to a lipase solution.

1 結 言

酵素を利用する化学反応は、常温常圧下での省エネルギープロセスであることや、酵素が基質に対して高い選択性をもつことなどの大きな利点から、近年、化学工業界においてもその利用が広く注目されつつある。

しかし酵素は、従来の化学触媒に比べて非常に不安定^{1),2)}であるため、工業的に利用するには長時間の使用に耐え得るものに改良することが望ましい。

一般に酵素は、基質の共存により安定化されるものが多いことから、著者らは先に、酵素の安定化剤について、基質(グリセリド)に似た構造を持つ物質に着目し、グリセリンの誘導体であるグリセリン=ポリオキシプロピレン=エーテルが、リパーゼの熱安定性を増大させることを見いだした³⁾。

そこで本報では、グリセリン=ポリオキシプロピレン=エーテルに比べて親水性の高い、グリセリンにオキシエチレン基(EO)の付加されたグリセリン=ポリオキシエチレン=エーテルについて、その添加効果を検討した。

またこの場合のリパーゼの安定化の機構を探る一つの手がかりとして、疎水基であるオキシプロピレン基(PO)を構成単位とする直鎖状のポリプロピレングリコール(PPG)、EOを構成単位とするポリエチレングリコール(PEG)、PPGあるいはPEGとグリセリンの混合物の添加効果について検討した。

2 実 験

2.1 試薬

酵素は *Candida cylindracea* の産生するリパーゼ OF (名糖産業製 360,000 IU/g) を 100 IU/ml の濃度に希釈して用いた。

添加剤として用いた化合物は、グリセリン、グリセリン=ポリオキシエチレン=エーテル(GPEE)、ポリプロピレングリコール(PPG)、ポリエチレングリコール(PEG)である。以上の化合物はすべて日本油脂(株)製のものであり、グリセリンは、局方濃グリセリンを、GPEEは、商品名ユニオックス G-140 (平均分子量 141)、G-450 (平均分子量 461)、G-750 (平均分子量 794) を、PPG

は商品名ユニオール D-400, PEG は商品名局方マクロゴール 400, いずれも平均分子量 400 のものを使用した。

2.2 実験方法

リパーゼ活性測定法ならびに, 残存活性測定法, 熱処理条件などは, 前報³⁾と同じである。

3 結果と考察

3.1 グリセリン=ポリオキシエチレン=エーテル (ユニオックス G-140, G-450, G-750) の添加による安定化

ユニオックス G-140, G-450, G-750 の添加により得られたリパーゼの 50°C での熱処理の各時間後の活性の変化, ならびにグリセリン, グリセリン=ポリオキシプロピレン=エーテル添加によるそれを **Table-1** に示す。

また, 20 ml のリパーゼ水溶液に対する添加剤の添加量と 50°C, 4 h, 熱処理後の残存活性を **Fig.-1** に示す。

なお, この熱処理条件でこの酵素は全く活性を示さな

Table-1 Effect of various polyethers and glycerol on lipase activity.

Polyether	Conc.* (mmol)	Lipase activity (%)				
		Treatment time (h)				
None	0	100	57	6	4	0
Uniox G-140	10	101	102	92	69	62
	5	98	96	92	52	38
	1	102	105	93	63	40
	0.5	100	91	85	51	35
	0.1	101	95	85	45	33
Uniox G-450	10	106	95	82	80	80
	5	100	79	64	63	60
	1	97	92	82	73	70
	0.5	105	107	105	90	54
	0.1	103	102	73	39	39
Uniox G-750	10	86	65	64	58	45
	5	97	71	36	24	25
	1	51	42	16	16	14
	0.5	67	58	20	19	18
	0.1	98	51	10	5	2
Glycerol	100	132	101	82	92	80
	10	117	95	26	20	12
	1	103	82	11	5	2
Glycerol poly (oxypropylene) ether TG-300	10	122	84	66	73	53
	5	126	90	64	54	37
	1	143	63	56	45	33
	0.5	123	85	37	32	30
	0.1	109	91	46	39	32

* in 20 ml lipase aqueous solution.

Lipase aqueous solution (100 U/ml) was incubated in the presence of polyether at 50°C.

Fig.-1 Relationship between concentration of glycerol poly(oxyethylene)ether and lipase activity under the condition at 50°C for 4 h.

いのであるが, (**Table-1**), ユニオックスシリーズはいずれもグリセリンを添加した場合と同様に, 添加量が増すに従い安定化効果も増していることが認められた。が, 安定化効果は, グリセリンに比した場合, G-750, G-140, G-450 の順に高くなっている。

添加剤添加直後の熱処理前 (0 h) における相対活性, すなわちオリブ油の加水分解時における添加剤の影響をみると (**Table-1**), グリセリンやグリセリンポリオキシプロピレン=エーテルは, その添加により, リパーゼ活性が, 無添加のものより高い値を示すが, これはこの化合物の反応促進効果によるものと考えられる。

一方, ユニオックスシリーズでは, G-450 において反応促進効果はわずかに観察されるのみで, G-750 に至っては, その添加によりリパーゼ活性が低下し反応阻害効果が見受けられる。また, グリセリン=ポリオキシエチレン=エーテルは, グリセリン=ポリオキシプロピレン=エーテルのように反応促進効果と相まって安定化効果を示すのではなく, 安定化作用のみで, より低濃度でより高い安定化効果を示していることがわかる。なかでも G-450 においてその効果は顕著であった。

G-140 は, グリセリンに EO を約 1 mol 付加したものであるが, **Fig.-1** において添加量と残存活性との関係にグリセリンと同様の傾向がみられるものの安定化効果は 3 倍強となっている。この効果の差は EO 1 mol の影響によるものである。このことは EO 単位当たり 3 個⁴⁾, 又はそれ以上の水が会合⁵⁾することより, 酵素の水和水が EO に会合し, 酵素の分子構造を安定に保持する結果によるものとも考えられる。

3.2 ポリプロピレングリコール (PPG) ならびにポリエチレングリコール (PEG) の添加による安定化

三種の平均分子量の異なる グリセリン=ポリオキシエチレン=エーテルのうち, 酵素の安定化に最大の効果の認められた G-450 に EO の付加モル数がほぼ匹敵する平均分子量 400 (約 8 mol 付加) のポリエチレングリコールならびに, ポリプロピレングリコールについて検討

Fig.-2 Relationship between concentration of PPG, PEG & glycerol and lipase activity under the condition at 50°C for 4 h.

した。50°C, 4 h, 熱処理後の残存活性と, PPG ならびに PEG の添加濃度との関係を **Fig.-2** に示す。

PPG では添加濃度と残存活性の間に負の相関が認められたのに対し, PEG では極大値を有することが認められた。これらは, グリセリンやグリセリン=ポリオキシエチレン=エーテルとは異なった傾向であり, 酵素の安定化に対する作用機作がかなり異なることを示唆するものである。

リパーゼは, 油脂という水不溶性基質に作用することから, リパーゼ分子が基質を認識し取り込む部位は疎水性が高いものと推定される。**Fig.-2** のように PPG の添加量が増すに従い安定化効果が小さくなる事実については, PPG の構成単位である疎水基 PO が, 酵素の疎水領域に作用し, その添加量が増すに従いリパーゼ分子の構造変化をひき起し, あるいはまた反応時に基質と酵素の接触を妨げることによるものと考えられる。

3.3 PEG ならびに PPG のグリセリン との併用効果

PEG ならびに PPG のそれぞれに対してグリセリンを一定割合で混合したものをリパーゼに添加し, 50°C, 4 h の熱処理を行い, その安定化効果をみた。**Fig.-3** 及び **Fig.-4** にその結果を示す。

PEG ならびに PPG のグリセリン 混合物の添加量とリパーゼの残存活性の間に PEG や PPG を単独に添加した場合と同様の傾向が認められたが, 安定化効果はおのおのを単独で添加した場合より優れ, グリセリンとの相乗効果は, 特に PPG において顕著であった。

PEG の場合には, 安定化効果が極大値をとる濃度は単独でも, またグリセリンと混合しても同じであった。

Fig.-3 Relationship between concentration of poly (propylene glycol) and lipase activity under the condition at 50°C for 4 h.

Fig.-4 Relationship between concentration of poly (propylene glycol) and lipase activity under the condition at 50°C for 4 h.

しかも, グリセリンとの混合効果はその極大値付近の PEG の濃度でのみ認められた。また, PEG とグリセリンの比が, 1:2 と 1:0.5 のものでは傾向としてその効果にさほど差異は認められなかった。

一方, PPG の場合には, グリセリンの比率が増すに従い安定化効果も高くなっている。この事実ならびに, グリセリンは親水性の高いものであり, これに比べて PPG はむしろ疎水性のものであることから, この二者の酵素を安定化する機構は競合するものではないと考えられる。

(昭和 58 年 12 月 5 日受理)

文 献

- 1) J.V. Fiore, F.F. Nord, *Arch. Biochem.*, **26**, 382 (1950)
- 2) C.V. Ronakrishnan, *Naturwissenschaften*, **41**, 16 (1950)
- 3) 村上幸子, 船田 正, 石田紀朗, 油化学, **32**, 493 (1983)
- 4) K. Lin, J.L. Parsons, *Macromolecules*, **2**, 529 (1969)
- 5) D.I.D. El Eini, B.W. Barry, C.T. Rhodes, *J. Colloid Interface Sci.*, **54**, 348 (1976)