[*Nippon Nōgeikagaku Kaishi* Vol. 53, No. 12, pp. 385~390, 1979]

ソバ α -グルコシダーゼの固定化とその性質

金谷憲一, 佐々木素喜*, 川嶋浩二**, 千葉誠哉, 下村得治
(北海道大学農学部農芸化学科, **農林水産省食品総合研究所)

昭和 54 年 2 月 26 日 受 理

Preparation and Properties of Immobilized Buckwheat α -Glucosidase

Ken-ichi KANAYA, Motoki SASAKI, Koji KAWASHIMA, *

Seiya CHIBA and Tokuji SHIMOMURA

*Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo 060*

**National Food Research Institute, Ministry of Agriculture,
Forestry and Fisheries, Yatabe-cho, Ibaraki 300-21*

Immobilized buckwheat α -glucosidase was prepared in bead shape by radiopolymerization of synthetic monomers. The most suitable ratio of the mixture of acrylamide containing methylenebisacrylamide, potassium acrylate, magnesium acrylate and enzyme solution was found to be 1:1:2:1. The highest activity of the immobilized enzyme was about 50% of that of the native enzyme. Optimum pH was shifted to acidic values by about 0.5 unit by the immobilization. The immobilization increased the stability of the enzyme against heat. Soluble starch was not so good substrate as maltose for the immobilized enzyme, though both substrates were hydrolyzed well by the native enzyme. Nigerose, kojibiose and so on were also produced from maltose or starch sugar by the transglucosylating activity of the immobilized α -glucosidase, as in the case of the native enzyme. A column system of the immobilized enzyme was useful to the enzymatic synthesis of various oligosaccharides. (Received February 26, 1979)

緒 言

1960年代以降, 酵素のもつ特異的な触媒活性を有効にかつ経済的に利用する観点から酵素の固定化の研究が活発に行われてきた。現在までに, 各種の方法⁽¹⁾により数多くの酵素の固定化が試みられ, 食品工業, 有機合成工業等に実際に利用あるいはその試みがなされている⁽²⁾。

α -グルコシダーゼはグルコ少糖類および α -グルカン類を加水分解するのみならず, 顕著な糖転移作用を有し^(3,4), その作用によりコジビオース, ニゲロース, イソマルトース等のグルコ少糖類, マンノース, フラクトース, ソルボース, キシロース等とグルコースから構成されるヘテロ少糖類⁽⁴⁾をも生成する酵素である。これら

の糖転移生成物は α -グルコシダーゼの作用機構を解明するうえで重要な基質であるのみならず, 最近, cyclodextrin glycosyltransferase の糖転移生成物である, その構造中にショ糖を含むデキストリン類⁽⁵⁾が虫歯の予防効果をもっていることでも示唆されるように, 上述の糖転移生成物の生理作用についても興味をもたれる。

しかしながら, これらの糖転移生成物を多量に調製することは, これらの糖の分離精製の煩雑さ以外に, 安定な酵素を多量に得がたいことから, 困難であった。したがって, 本研究はソバ α -グルコシダーゼ^(3,6)の固定化を試み, この固定化酵素を利用して多量の少糖類を合成することを目的とした。

本報では低温放射線重合法⁽⁷⁾によるソバ α -グルコシダーゼの固定化と得られた固定化酵素の諸性質およびそ

* 現在, 三機工業株式会社

の糖転移作用について述べる。

実験方法

1. 酵素の調製および固定化方法 ソバ α -グルコシダーゼは既報⁽⁶⁾の方法にしたがって調製した。

重合素材として次のものを使用した。AA 液：1.6% N, N' -メチレンビスアクリルアミドを含む 30% アクリルアミド液；ANa 液：30% アクリル酸ナトリウム液；AK 液：30% アクリル酸カリウム液；ACa 液：30% アクリル酸カルシウム液；AMg 液：2% N, N' -メチレンビスアクリルアミドを含む 30% アクリル酸マグネシウム液；PP 液：20% ポリビニルピロリドン液；HEMA 液：30% ハイドロキシエチルメタアクリレート液。各重合素材と酵素を Table I に示した割合で混合し、この混合液をあらかじめ -78°C に冷却した石油エーテル中に滴下し、ビーズ状に急速に凍結させた。次に、コバルト 60 ガンマー線 (382.5 krad) を照射し重合させた。冷却した 0.02M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 中で解凍後、同じ緩衝液で十分洗浄した。室温で乾燥後、粒状固定化ソバ α -グルコシダーゼ標品を得た。

2. 酵素活性の測定法 30ml の三角フラスコに一定量の固定化酵素標品と 0.1M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 3ml を加え、あらかじめ 37°C で 10~20 分間予温後、1% マルトース溶液 2ml を添加し、振盪 (130 回/分) させながら 60 分反応させた。反応終了後、1ml を取り、還元力の増加を Somogyi 変法⁽⁶⁾により測定し

た。

可溶性酵素の活性は、固定化酵素中に含まれる酵素量に相当する量 (5~10 μg) を用いて、固定化酵素の場合と同じ方法で測定した。

3. 固定化酵素による糖転移作用 固定化酵素カラム ($2 \times 5 \text{ cm}$) に 5% マルトース溶液あるいはあらかじめ部分精製した麦芽 α -アミラーゼを作用させ、 $\text{DE}=16.7$ に分解した澱粉糖溶液を流速を変えて (15~75 ml/時) 流し、 37°C , pH 5.0 で糖転移反応を行わせた。反応液を n -ブタノール・ピリジン・水 (6:4:3) を展開剤とするペーパークロマトグラフィーに供した。糖の発色は α -アニジジンフタレート試薬によった。

実験結果および考察

1. 固定化と保持活性

Table I に示した重合素材の組合わせは、これまでに多くの酵素について固定化を試みた結果から^(7,9,10)、本酵素にも有望と思われる組合わせを重点的に取り上げたものである。これらの重合素材の組合わせでソバ α -グルコシダーゼを低温放射線重合法⁽⁷⁾によりポリマー内に包埋固定し、それぞれの固定化酵素標品の保持活性を調べた。保持活性は、0.4% マルトースを基質とし、pH 5.0, 37°C で振盪させて測定し、同じ条件で測定した固定化前の酵素の活性を 100% とし、それに対する相対活性を意味する。

No. 1 および No. 3, No. 2 および No. 4, No. 6 およ

Table I. Retained Activities of Immobilized Buckwheat α -Glucosidase Prepared at Various Monomer Combinations

No.	Enzyme solution (1 mg/ml)	Combination (ml)							Activity ^a (%)
		AA	ANa	AK	ACa	AMg	PP	HEMA	
1	1	1	1		2				35
2	1	1	1			2			40
3	1	1		1	2				49
4	1	1		1		2			50
5	1		1	1	1	1			49
6	1			2		2			47
7	1			1		1	2		47
8	1			1		1		2	51
9	1					2		2	41
10	1					4			28
11	1		2			2			32
12	1	4							7

^a Activity of each immobilized enzyme was measured at 37°C in 0.05M sodium acetate buffer, pH 5.0, using 0.4% maltose as substrate. Retained activity is expressed as relative value to that of the native enzyme.

Abbreviations are shown in text.

び No. 11 のそれぞれの組合わせの重合素材を比較した場合、アクリル酸のナトリウム塩または、カリウム塩のいずれを用いたかが相違しているだけであり、それぞれの組合わせで架橋剤の濃度は一定であるにもかかわらず、保持活性はカリウム塩を用いた方がともに高い。また、No. 3, No. 4, No. 6 の架橋剤の濃度はそれぞれ違うが、保持活性はこれらの間でほとんど差は認められない。No. 12 のようにアクリルアミドのみを重合素材として用いたものは保持活性が低かった。これらのことは、今回用いた架橋剤の濃度の範囲内では、架橋剤の濃度の保持活性に対する影響は少なく、むしろカリウムイオンなどのカチオンが保持活性に影響していると推察される。しかしながら、アクリル酸とアクリルアミドの重合性の相違等により、ポリマー内への基質の易動性に差が生じ、固定化酵素の保持活性にも影響していることも否定はできないであろう。

固定化の際の酵素濃度は 1mg/ml と 0.5mg/ml の両濃度で行ったが、保持活性は両濃度で差はほとんど認められなかった。

2. 固定化 α -グルコシダーゼのくり返し使用時の安定性

Fig. 1. Stability of Immobilized Buckwheat α -Glucosidase Prepared at Various Monomer Combinations. Immobilized α -glucosidase preparations are denoted by the same abbreviations as shown in Table I. ●—●, No. 1; □—□, No. 3; △—△, No. 4; ▲—▲, No. 6; ○—○, No. 11. The reaction was performed for 24 hr at 37°C and pH 5.0, using 1% starch sugar (DE=10) as substrate. Each immobilized α -glucosidase preparation was used repeatedly.

上に述べた方法によって得られたそれぞれの酵素標品をくり返し使用して、その安定性を調べた。基質としてはあらかじめ可溶性澱粉を部分精製した麦芽 α -アミラーゼで分解して調製した澱粉糖 (DE=10) を用いた。30 ml 三角フラスコに 2% 澱粉糖 4 ml と 0.1M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 4 ml および各固定化酵素標品を加え、振盪させながら 37°C で 24 時間反応させた。反応終了後、0.4 ml を取り、還元力の増加を Somogyi 変法で測定して活性を調べた。グラスフィルターで固定化酵素を濾別し、0.1M 酢酸ナトリウム緩衝液 pH 5.0 で洗浄後、再び 1% 澱粉糖を含む反応液 8 ml の入った三角フラスコに添加して、同様に反応させた。この操作を 10~15 回くり返した。1 回目のそれぞれの固定化酵素標品の活性を 100% とし、2 回目以降の活性を相対的に表わした。使用した酵素量は 24 時間以内に基質が 80% 以上分解されない量とした。

Fig. 1 には得られた固定化酵素標品のうち 5 種の標品について示した。くり返し使用により、いずれの固定化酵素も徐々に活性の低下が認められた。No. 1 と No. 4 の標品が他の標品に比べて、活性の低下度が少なかった。No. 6 と No. 11 は 6 回の使用で活性が約 50% に低下したが、No. 1 と No. 4 では 80% 以上の活性が残存した。しかしながら、No. 1 と No. 4 の標品も 14~15 回の使用により活性は約 50% まで低下した。活性低下の原因として、グラスフィルターでの濾別の際に器具に付着してある程度の損失が避けられないこと、反応時の振盪のため、一部の粒が機械的に破損すること等より、見かけ上活性の低下が生ずることが考えられた。このため、粒状固定化酵素をカラムにつめ、連続的に基質を流し、基質の分解の程度を 24 時間ごとに測定したところ、くり返し使用試験の場合と同様に活性の低下が認められ、活性低下の原因が粒の単なる器具への付着による損失や機械的破損によるものではないことが判明した。また、固定化された酵素の脱離があるか否かについても検討した。それぞれの固定化酵素標品を 0.1M 酢酸ナトリウム緩衝液 pH 5.0 に懸濁し、25°C で 24 時間振盪後、固定化酵素をグラスフィルターで濾別した。濾液に基質を加え、37°C でインキュベートして、経時的に還元力の増加を測定した。その結果、脱離はほとんど認められなかった。37°C で長時間反応するために、熱による失活も考えられるが、重合素材により活性低下の程度に差があるのは酵素の安定性の面から興味深い。Fig. 1

に示した以外の固定化酵素標品はいずれの場合もくり返し使用により活性の低下が認められ、No. 1 および No. 4 の標品よりもくり返し使用時の安定性が劣っていた。

多孔性ガラスにジアゾ法によって固定化したインペルターゼ⁽¹¹⁾、DEAE-セルロースにイオン結合法で固定化したグルコアミラーゼ標品⁽¹²⁾は長期間の連続使用によってもほとんど活性の低下が認められないと報告されているが、現在まで得られた大部分の固定化酵素標品は連続使用によって、ある程度の活性の低下はまぬがれないようである⁽¹³⁾。

保持活性および連続使用時の安定性を考慮すると No. 4 (酵素: AA: AK: AMg=1:1:1:2) の固定化酵素標品が利用の面で最適と考えた。以下の実験はこの標品を用いて行った。

3. 固定化酵素の諸性質

固定化酵素の pH 依存性を可溶性酵素のそれと比較した。緩衝液として 0.3M 酢酸ナトリウム緩衝液を使用した。Fig. 2 に示されているように、最適 pH は固定化により約 0.5 程度酸性側に移動し、やや pH-活性曲線が幅の狭い形となった。

固定化により最適 pH および pH-活性曲線が変化する例は多く知られている⁽¹³⁾。とくに、イオン交換セルロース等のように電荷を帯びた担体に固定化した場合などは担体の静電的な性質により見かけ上最適 pH が移動すると報告されている⁽¹⁴⁾。ポリアクリルアミドゲルのように電氣的に中性の担体で包埋法により固定化された酵素

Fig. 2. pH-activity Profiles of Native and Immobilized Buckwheat α -Glucosidase. ●—●, native enzyme; ○—○, immobilized enzyme. Activity was measured in 0.3M sodium acetate buffer at each pH value at 37°C using maltose as substrate.

Fig. 3. Temperature-stability Curves of Native and Immobilized Buckwheat α -Glucosidase. After enzymes were incubated in 0.1M sodium acetate buffer (pH 5.0) at indicated temperature for 10 min, the remaining activities were measured at 37°C using 0.4% maltose as substrate. Symbols are the same as shown in Fig. 2.

では、最適 pH が移動する場合と移動しない場合の両方が知られている⁽¹³⁾。

Fig. 3 に温度安定性を比較した結果が示されている。固定化酵素および可溶性酵素を 0.1M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 中で、各温度で 10 分間保持した後、流水で急冷し残存活性を測定した。固定化により温度に対する安定性が増した。60°C、10 分間の処理により、可溶性酵素ではその残存活性は約 30% を示すにすぎなかったが、固定化酵素では 80% の活性が残存した。このように、固定化により温度安定性を増す例はこれまで多く知られている⁽¹³⁾。

また、本実験で調製された固定化 α -グルコシダーゼの乾燥標品は、本酵素の凍結乾燥標品と同様に、低温下 (4~6°C) において、長期間 (2 年間以上) 安定であった。

低温放射線重合法によりゲル内に包埋した本酵素の基質特異性を検討した。可溶性酵素の場合はマルトース等のグルコ少糖類のみならず可溶性澱粉をもよく加水分解する。固定化酵素では、マルトース等の低分子基質に対する作用は可溶性酵素の場合とほとんど変らない。しかし、可溶性澱粉に対する作用はきわめて弱く、分解限度が 15% 程度で、それ以上の分解は困難であった。(可溶性酵素は可溶性澱粉に対して 70~80% の分解限度を示す⁽¹⁵⁾。) このことはおそらく澱粉分子がゲル内に拡散し

れているために基質との結合が立体障害のために妨げられたためと推察される。澱粉にあらかじめ α -アミラーゼを作用させて調製した澱粉糖 (DE=16.7) はすみやかに分解され、分解限度は約 80% であった。

4. 固定化酵素の糖転移作用

粒状固定化ソバ α -グルコシダーゼをバッチ方式あるいはカラム方式で 5% マルトースまたは 5% 澱粉糖 (DE=10.0) に作用させ、可溶性酵素と同じように糖転移生成物を与えるか否かを検討した。その結果、可溶性酵素の場合と同様な糖転移作用を示し、いずれを基質とした場合も、ニゲロース、コージビオース、イソマルトース等が生成された。

固定化酵素をバッチ方式で 5% マルトースに作用させ、経時的に糖転移物の生成パターンを調べた結果、可溶性酵素の場合⁽³⁾と同じパターンを示した (Fig. 4)。

次にカラム方式により 5% マルトース溶液を種々の流速で流し、目的とする糖転移物 (今回はニゲロース) の生成が最大になる条件を検討した。

これに先だって、流速と基質の分解率の関係を調べた。固定化酵素を 2×5 cm のカラムにつめ 1% マルトース溶液を Fig. 5 に示された各 SV の流速ごとに流し、

Fig. 4. Paper Chromatogram of Transglucosylation Products from Maltose by Immobilized α -Glucosidase. The immobilized enzyme was incubated with 5% maltose in 0.1M sodium acetate buffer, pH 5.0, at 37°C. At various time intervals, an aliquot was taken up and spotted on paper. Solvent system was *n*-butanol, pyridine and water (6:4:3); detection, *p*-anisidine phthalate reagent.

37°C, pH 5.0 で反応させた。Fig. 5 に示されているように、SV=2 の速度 (30 ml/時) まではこの条件下で 100% 分解された。

同じ固定化酵素カラムに 5% マルトース溶液を各速度で通し、溶出液をペーパークロマトグラフィーに供し

Fig. 5. Relation between Flow Rate and Degree of Hydrolysis of 1% Maltose. Immobilized α -glucosidase was packed in column (2×5 cm). 1% maltose in 0.1M sodium acetate buffer (pH 5.0) was passed through the enzyme column at various flow rate at 37°C. *In this case, SV=1 corresponds to flow rate of 15 ml/hr.

Fig. 6. Effect of Flow Rate on Amount of Saccharides Produced from Maltose by Transglucosylation of Immobilized α -Glucosidase at Column System. 5% maltose solution was passed through the immobilized enzyme column (2×5 cm) at various flow rate at 37°C and pH 5.0. Procedure for paper chromatography was the same as described in Fig. 4. *In this case, SV=1 corresponds to flow rate of 15 ml/hr.

た。Fig. 6 に示されているように、流速により生じた糖転移物の量に差が認められた。各速度でニゲロースがどの程度生成されているかをペーパークロマトグラフィーの切り抜き法により調べた。すなわち、ニゲロース画分と他の糖の画分を切り抜き、水でそれぞれの糖を抽出後、糖量をフェノール硫酸法により定量した。その結果、SV=1~2 の流速で流したとき、ニゲロースの生成量が多く、全糖量の 3.0~3.4% を占めた。流速をこれ以上大きくするにしたがってニゲロースの生成量は減少し、SV=5 では全糖量の 1% を占めるにすぎなかった。

同様な事実が 5% 澱粉糖を基質とした場合にも観察された。

固定化ソバ α -グルコシダーゼを用いてカラム方式でニゲロース、コージビオース等の糖転移生成物を得るうえでの利点は、固定化酵素の一般的な利点である酵素を再利用できること以外に、目的とする糖転移生成物を効率よく生成する条件の設定が容易であり、かつ、その再現性が優れていることである。

要 約

(1) ソバ α -グルコシダーゼの固定化を各重合素材を用いて低温放射線重合法によって行った。アクリルアミド：アクリル酸カリウム：アクリル酸マグネシウム：酵素=1：1：2：1 の組成で固定化した酵素が保持活性(50%) および連続使用時の安定性の面で優れていた。

(2) 上記の重合素材で固定化した酵素の性質を調べた結果、最適 pH は可溶性酵素に比べて約 0.5 ほど酸性側に移動した。熱に対する安定性が増した。マルトース等の低分子基質をよく分解するが、可溶性澱粉には作用しがたく、その分解限度は可溶性酵素の場合に比較して

著しく低下した。

(3) 固定化ソバ α -グルコシダーゼは可溶性酵素の場合と同様に顕著な糖転移作用を示し、マルトースあるいは澱粉糖を基質として、ニゲロース、コージビオース等の糖転移生成物を与えた。固定化酵素カラムの使用によりきわめて効率よく、これらの糖転移生成物を調製することが可能になった。

- (1) 千畑一郎編：固定化酵素，講談社，東京，1975，p.9.
- (2) *idem., ibid.*, p.123.
- (3) M. Takahashi and T. Shimomura : *Agric. Biol. Chem.*, **32**, 929 (1968).
- (4) 千葉誠哉，下村得治：アミラーゼシンポジウム，**7**, 51 (1972).
- (5) 岡田茂孝，北畑寿美雄：日本食品工業学会誌，**22**, 420 (1975).
- (6) K. Kanaya, S. Chiba, T. Shimomura and K. Nishi : *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1929 (1976).
- (7) K. Kawashima and K. Umeda : *Biotechnol. Bioeng.*, **16**, 609 (1974).
- (8) 小林達吉，田淵武士：農化，**28**, 171 (1954).
- (9) K. Kawashima and K. Umeda : *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 599 (1975).
- (10) K. Kawashima and K. Umeda : *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1151 (1976).
- (11) R. D. Mason and H. H. Weetall : *Biotechnol. Bioeng.*, **14**, 637 (1972).
- (12) M. J. Bachler, G. W. Strandberg and K. L. Smiley : *ibid.*, **12**, 85 (1970).
- (13) 千畑一郎編：固定化酵素，講談社，東京，1975，p.87.
- (14) L. Goldstein, Y. Levin and E. Katchalski : *Biochemistry*, **3**, 1913 (1964).
- (15) M. Takahashi and T. Shimomura : *J. Fac. Agric. Hokkaido Univ.*, **57**, 25 (1972).