固定化酵素の製造に関する研究

(第8報) 粒状固定化インベルターゼについて

川嶋 浩二*・鈴木 忠直*・梅田 圭司*

Studies on the Preparation of Immobilized Enzymes by Radiopolymerization

Part VIII. On the bead shaped immobilized invertase

KOJI KAWASHIMA*, TADANAO SUZUKI* and KEIJI UMEDA*

Invertase was immobilized in an bead shaped polymer (0.5-1 mm diameter) by radiocopolymerization of some synthetic monomers at the frozen temperature. Some of the basic characteristics were investigated and enzyme column was tested.

1) Immobilized invertase preparations having high retained activities (60-90%) were prepared by polymerizing some monomers without acrylamide.

2) The optimum reaction temperature was about 65°C being 5°C higher than that of the native invertase.

3) Heat stability was greatly improved. After heating at 70°C for 12 min, immobilized invertase hold still 70% of the original activity but native one had 40%.

4) Immobilized invertase was more resistant to aniline, urea and Hg^{++} but on the contrary, more sensitive to SDS, guanine and Cu^{++} .

5) The K_m value was 2.45×10^{-2} mole and 1.75×10^{-2} mole for immobilized and native enzyme respectively.

6) The activation energy was increased by 0.9 Kcal/mole after immobilization.

7) When used as immobilized enzyme column, it was found to be more advantageous to increase the concentration of substrate and enzyme in the entrapping polymer.

8) 30% sucrose solution was continuously charged in to the column at the flow rate of SV 1. The substrate was completely decomposed up to 28 or 50 days.

9) There were no big differences on the basic characteristics between bead shaped and membranous immobilized invertase preparations except for the behaviour to some inhibitors.

(Received May 27, 1976)

先に我々は水溶性モノマー類の低温放射線共重合によりインベルターゼを膜状に固定化し、この膜状固定化インベルターゼに関する知見を報告した^{1,2)}。又、さらに低温放射線共重合により酵素を粒状に固定化する方法を報告した³⁾。従来用いられてきた固定化酵素の形態は、多くの場合不定形又は微粉末状であるが、分別、投入、混合、攪拌、充填などに関して使用に便利なのは粒状固定化酵素であり、特に工業的規模で大量に使用する場合はこの点が強調される。

ここでは、既報に従ってひきつづきインベルターゼを

粒状に固定化し、粒状固定化インベルターゼの基礎的諸性質およびその使用試験について述べる。

実験方法

1. 使用モノマーおよび酵素

低温放射線共重合に用いた水溶性モノマーは、アクリル酸のカルシウム塩 (ACa)、ナトリウム塩 (ANa)、および架橋剤として少量の N, N'-メチレンビスアクリルアミドを含んだアクリルアミド液 (AA) である。これらモノマー溶液の調整方法は前報に従った。

* 農林省食品総合研究所 (東京都江東区塩浜 1-4-12)

National Food Research Institute, Ministry of Agriculture and Forestry. Kōtō-ku, Tokyo.

酵素インペルターゼは *Candida utilis* 由来のインペルターゼで生化学工業 (pure grade) より購入し、そのまま使用した。

2. 固定化方法

n mg のインペルターゼを含む酵素モノマー混合液 5 ml を前報³⁾に従って粒状に重合させ、得られた固定化酵素標品を BI-n と表示した。B は粒状 (bead) を I は酵素 (invertase) を表し、n は酵素濃度を示す。なお、酵素-モノマー混合液を粒状に凍結させる際、冷媒には n-hexane を用いた。

3. 活性測定法

酵素反応は前報²⁾と同じく 40°C 20 分反応により行った。反応時の pH は native 酵素で 4.5 (クエン酸リン酸緩衝液)、固定化酵素では 4.0 である。ただし、細断した膜状固定化酵素の代りに得られた粒状固定化酵素 BI-n を繰り返し水洗後、その 1/50 を秤量して実験に供した。粒状固定化酵素の粒径は特に示さないかぎり直径がほぼ 0.5~1.0 mm のものを実験に供した。

活性測定は前報に従って、グルコースオキシダーゼ法又は WILLSTÄTTER-SHUEDELL 法により行った。

結果および考察

1. モノマー組成と保持活性

放射線重合させるモノマー類の組み合わせは AA : ANa : ACa : 酵素溶液が 1 : 1 : 2 : 1 の時が最も良く、これまでの報告では、この組成に従って酵素を固定化してきた。ただし、AA を含まないモノマー組成すなわち ANa, ACa および架橋剤を酵素液と組み合わせる可能性については従来検討していないので、この点についてまず検討を行った。BI-0.5 を作り、その 1/50 を用いて活性を測定した。又、比較のために native 酵素 (10 µg) を用いて同様に反応させた。

その結果、Table 1 に示したように、AA がなくても

本法により 60~90% と十分保持活性の高い粒状固定化インペルターゼが形成されることがわかったが、AA を含まない時は、固定化酵素標品が軟弱で物性的に取り扱いにくいことや、本報告では従来の膜状固定化インペルターゼとの比較を行う目的から、これまでの方法に従って AA を含んだ組成すなわち No. 1 を用いて実験を行うこととした。

2. 至適反応温度

次に粒状固定化インペルターゼの至適反応温度を検討した。酵素の至適反応 pH は前報¹⁾から、native 酵素で pH 4.5、膜状固定化酵素でほぼ pH 3.5~4.0 であったが、重合素材組成がこの時と同じであることから、粒状固定化標品についても至適反応 pH は 3.5~4.0 とし、pH 4.0 で反応を行うこととした。

固定化酵素 BI-0.5 を作ってその 1/50 を分取し、あらかじめ 40~80°C に保持しておいた基質 10 ml に添加し、10 分間反応させた。native 酵素は 5 µg/ml を 1 ml 用いて同様に操作した。

その結果、Fig. 1 に示したように native インペルターゼでは 60°C に最適反応温度があるのに対し、固定化インペルターゼでは 65°C 付近と、やや高温側に移行することがわかった。インペルターゼは、従来の報告では固定化すると至適反応温度の下がる例が多く、DEAE セルロースにイオン吸着させた固定化インペルターゼでは至適反応温度が 20°C 低下し⁴⁾、DEAA セルロースにイオン吸着させた場合も同様に約 10°C の低下を来している⁵⁾。又、さらに MASON らによれば、ポーラスガラスに共有結合させたインペルターゼでも 10°C 低下している⁶⁾。

3. 熱安定性

先の実験から固定化インペルターゼの至適反応温度はほぼ 65°C 付近にあると思われたので、ここでは更に 5°C 高い 70°C で酵素をあらかじめ加熱処理し、その残

Table 1. Combinations of synthetic monomers and invertase solution and the retained activities of the resulting bead shaped immobilized enzyme

No.	AA	ANa	ACa	Bis.*	Enzyme**	Retained activities***
1	1 ml	1 ml	2 ml	0 ml	1 ml	62.4
2	0	4	0	1	1	91.7
3	0	3	1	1	1	73.4
4	0	2	2	1	1	62.2
5	0	1	3	1	1	67.5

* 1.6% N, N'-methylene bis acrylamide aqueous solution. Other monomers are described in the text.

** 500 µg/ml.

*** Activity of native invertase (10 µg) was calculated as 100.

Fig. 1. Temperature-activity profile of Invertase —△— native (5 μ g), and —▲— immobilized (BI-0.5 $\times$ 1/50) in citrate buffer at pH 3.5 or 4.0 respectively reacted at various temperature for 10 min.

Fig. 2. Heat stability of invertase —●— immobilized (BI2 $\times$ 1/50) and —○— native (20 μ g) invertase in 2 ml of citrate buffer (pH 4.0 or pH 4.5 respectively) were heated at 70°C and the residual activities were compared.

存活性を求めた。

粒状固定化酵素は、BI-2 を作成しその 1/50 を秤量しクエン酸リン酸緩衝液 (pH 4.0) を 2 ml 加えた。native 酵素は 10 μ g/ml の溶液 (pH 4.5) を 2 ml 使用した。

これらの試料を 70°C の湯浴中に 2~12 分ひたして急冷した後、残存酵素活性を測定した。加熱処理しなかった酵素の活性を 100 として残存活性を示すと Fig. 2 のようになり、native 酵素は 70°C 12 分の加熱で 60% 失活したのに対し、固定化インベルターゼでは 30% と 1/2 の失活にすぎない。このように膜状インベルターゼ例¹⁾と同程度にここでも酵素は固定化することにより熱の安定性の向上することから熱安定性に関して本固定化法はかなり勝れたものを云えよう。

4. 阻害剤の添加効果

阻害剤としてエタノール、グアニジン、SDS、尿素、アニリンおよび三種の金属 (Hg, Zn, Cu) を用い、固定化酵素 (BI-2 の 1/50 量) および native 酵素 (20 μ g/ml, 液 1 ml) に添加した。

阻害剤、酢酸緩衝液 (pH 4.5, 固定化酵素の時は pH 3.5), および酵素を加えて全量を 10 ml とした。このまま 40°C に 1 時間振盪した後 10% 蔗糖液 1 ml を加え、40°C に 20 分反応させた。

一般酵素は固定化することにより変性されにくくなり、従って阻害剤への抵抗は増すがその逆の例もある。Table 2 からインベルターゼの特異的阻害剤アニリンに対しては固定化した方がより安定であった。又、尿素、Hg⁺⁺ に対しても同様な結果であった。根来⁷⁾および宇佐美⁴⁾も固定化酵素が Hg⁺⁺ に対し、より安定したとしている。一方、グアニジン、SDS、Cu⁺⁺ に対しては固定化すると逆に不安定化する。SDS はマイナスチャージなのに対し、固定化ポリマーがプラスチャージを帯びているため電気的な親和性により吸着され、SDS が溶液中よりもポリマー表面付近に高濃度に存在することも考えられるが推測の域を出ない。Cu⁺⁺ を含む溶液中でポリマーは経時的に Cu⁺⁺ を吸着して青色に着色化することから、酵素近傍では Cu⁺⁺ 濃度が高まっていると思われる。阻害剤の効果を膜状インベルターゼについての結果²⁾と比較すると、粒状固定化酵素の場合、Cu⁺⁺ による阻害が約 1/3 に軽減し、尿素、SDS による阻害度が 1.6 倍程度に高まるなど必ずしも一致しない。膜状固定

Table 2. Effects of inhibitors on the activity of invertase

Inhibitor	Concentration	Residual activity
ethanol	4%	n* 86.5 i** 86.0
guanidine	0.8 M	n 70.5 i 55.0
SDS	1%	n 85.3 i 53.0
urea	4 M	n 30.0 i 45.5
aniline	5 mM	n 20.5 i 32.4
NgCl ₂	5 mM	n 19.5 i 34.0
ZnCl ₂	5 mM	n 92.0 i 81.5
CuCl ₂	5 mM	n 69.2 i 41.5

* Native

** Immobilized

化酵素は細断して使用するため切断面が露出されるのでこれに起因するちがいがあのかも知れないが両者間の差が何に原因するのか不明である。

5. Km 値

固定化グルコミラーゼでは基質の分子量が小さい時程 Km 値は小さく、大分子量になると Km 値も大きくなることをすでに報告した¹⁰⁾。又、膜状固定化インベルターゼでは native と固定化したものとはそれぞれ 1.70×10^{-3} mole と、 1.95×10^{-3} mole ではほとんど差はみられなかった。

BI-2 を用意しその 1/200 を秤量し実験に供した。native インベルターゼは $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 液を 1 ml 用いた。基質の初濃度は最終的に $3 \times 10^{-3} \sim 3 \times 10^{-1} M$ とし、 40°C 10 分間反応させた。

その結果、Fig. 3 に示したように Km 値は、native インベルターゼで 1.75×10^{-3} mole、粒状固定化酵素で 2.45×10^{-3} mole となった。この値は膜状固定化インベルターゼの場合よりやや高い。細断した膜状固定化酵素より粒状固定化酵素の方が基質の拡散、浸入がスムーズに行われなとも解釈されるが、Km 値のこの程度の差はそれ程意義の大きなものとは思われず、膜状、粒状固定化酵素共、基質の拡散、浸透は native インベルターゼと大差なく、いわゆる基質の拡散抵抗に関して重大な差異はないであろう。

固定化による Km 値の変化は、インベルターゼの場合あまり大きくない。すなわち MASON⁶⁾ や MAEDA ら⁵⁾ は大差ないとし、FILIPPUSON ら⁸⁾ では約 2 倍程度になったとしている。これは基質の分子量が小さいため、固定化酵素内で基質が拡散する際、大きな影響を受けにくいためであろう。

6. 活性化エネルギー

Fig. 3. Lineweaver-burk plots of invertase —▲— native invertase ($5 \mu\text{g}$), —■— bead shaped immobilized invertase (BI-2 $\times$ 1/200).

粒状固定化インベルターゼ BI-1.0 をくり返し水洗後、その 1/100 を秤量し、pH 3.8 で各温度に 10 分間反応させた。反応温度は、 $30 \sim 50^\circ\text{C}$ まで 5°C 毎に行った。一方 native インベルターゼは固定化酵素の代りに、酵素液 1 ml ($10 \mu\text{g}$) を用いて pH 4.5 で同様に反応を行った。これより ARRHENIUS の関係式

$$\log k = \log A - \frac{AE}{2.303 RT}$$

から、 $k \approx v$ として活性化エネルギー AE を求めると、Fig. 4 から

$$AE_n = 3.8 \text{ Kcal/mole}$$

$$\text{また } AE_i = 4.7 \text{ Kcal/mole}$$

(n; native, i; immobilized)

となり、インベルターゼは固定化することにより、活性化エネルギー的にやや不利に、従って反応速度の鈍化することがわかった。

Fig. 4. Arrhenius plats of invertase —●— Immobilized (BI-1.0 $\times$ 1/100) and —○— native enzyme ($10 \mu\text{g}$) was subjected to the reaction at $30 \sim 50^\circ\text{C}$.

Fig. 5. Relation between the substrate flow rate and the degree of hydrolysis by the bead shaped immobilized invertase column 5% sucrose solution was subjected to the enzyme column. —○— BI-20, —●— BI-50, Reacted at 50°C

7. 粒状固定化酵素カラムとしての使用試験

先に膜状固定化インペルターゼを細断し酵素カラムとして使用した結果を報告した⁹⁾が、粒状固定化インペルターゼを用いて同様な試験を試みた。

BI-20 および BI-50 を調整し、直径 26 mm の温水ジャケット付カラムに充填した。固定化酵素の容積はほぼ 19~20 ml である。基質は 5% 又は 30% 蔗糖液 (pH 4.0, クエン酸緩衝液) で反応温度は 50°C である。

まず基質濃度およびカラムへの基質の流速と分解度との関係を見た (Fig. 5)。5% 基質の時、100% 分解率を割る流速は BI-20 で SV5, BI-50 で SV15 付近であり、酵素濃度を 2.5 倍にした時、流速は 3.0 倍上げられることから、この場合は高い酵素濃度にして用いる方が有利であると判断される。5% 基質の場合、粒状固定化酵素の基質分解力は、前報に示した膜状固定化インペルターゼを用いた時の結果に比べ、全体的にやや低い傾向にある。

一方、30% 基質を用いた場合、BI-20 では 100% 分解率を割る流速は SV1, BI-50 で SV3 である (Fig. 6)。こ

Fig. 6. Relation between the substrate flow rate and the degree of hydrolysis by the bead shaped immobilized invertase column

30% sucrose solution was subjected to the enzyme column. —□— BI-20, —■— BI-50, Reacted at 50°C

Fig. 7. Continuous hydrolysis of Sucrose by the bead shaped immobilized invertase column

30% sucrose solution was fed into the enzyme (BI-20) at the flow rate of SV1. Same experiments were repeated twice at 50°C

の場合も酵素濃度を高める方が効率の良い事がわかる。又、基質についてみると、濃度を 6 倍にした時、100% 分解率を割る流速が 1/5 になるにすぎないことから、基質濃度を高くする方が効率の良いことがわかった。30% 濃度の試験結果では、膜状固定化インペルターゼでの結果とほぼ同程度で大差はなかった。

次に、BI-20 カラムに SV1 で 30% 基質を流し長期間連続使用した。反応温度は 50°C である。その結果 Fig. 7 に示したように、54 日間完全に基質を分解した後、急激に活性を失った。外観上粒状ポリマーの破壊、分解は認められず、このように急激な活性の低下は酵素阻害剤の混入を疑わせるが、活性低下の原因は不明である。しかしくり返し同様の試験を行うと、28 日間基質を完全に分解してその後は徐々に分解度が低下した。この時のパターンは連続 47 日間 30% 蔗糖液を完全に分解した膜状固定化酵素での結果と類似する。長期間使用後の活性低下は熱失活、重金属など阻害剤の混入、蓄積、微生物の繁殖その他多くのファクターが関与するため、固定化酵素カラムの寿命には、かなりのバラつきが生じるものと思われる。

要 約

酵素インペルターゼを用いて粒状固定化酵素を作成し、その基礎的諸性質を検討すると共に、酵素カラムによる使用試験を試みた。その結果

(1) アクリルアミドを含まない重合素材組成で保持活性の高い (60~90%) 固定化インペルターゼを作ることができた。

(2) 至適反応温度は 65°C と native のものより 5°C 高かった。

(3) 熱安定性が向上し、70°C、2 分の加熱後も 70% の活性を保持した。一方、native 酵素では 40% に低下した。

(4) アニリン、尿素、水銀などの阻害剤に対して、より安定化したが、SDS、グアニジン、銅などには逆に不安定化した。

(5) Km 値は native インペルターゼで 1.75×10^{-2} mole なのに対し、固定化したものは 2.45×10^{-2} mole であった。

(6) 活性化エネルギーは固定化することにより、0.9 Kcal/mole だけ上昇した。

(7) 固定化酵素カラムとして使用するとき、基質濃度および酵素濃度共、高くすることが分解効率上有利であった。

(8) 固定化酵素カラムに SVI で 30% 蔗糖液を流し、長期間連続使用すると、28 日又は 54 日間基質を完全に分解することができた。

(9) 粒状固定化酵素の諸性質およびその使用試験の結果は、膜状固定化酵素での結果とほぼ同様で、固定化形態を変えたことによる大きな差はなかったが、2, 3 の阻害剤に対する挙動に関して差異がみられた。

文 献

- 1) KAWASHIMA, K. and UMEDA, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **40** 1151 (1976)
- 2) 川嶋浩二・梅田圭司: 食品工誌, **23**, 206 (1976).
- 3) KAWASHIMA, K. and UMEDA, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **40**, 1143 (1976).
- 4) 宇佐美昭次・野田治郎・後藤邦久: 醸工誌, **49**, 598 (1971).
- 5) MAEDA, H. and SUZUKI, H.: *Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 403 (1973).
- 6) MASON, R.D. and WEETAL, H.H.: *Biotechnol. Bioeng.*, **14**, 637 (1972).
- 7) 根来秀夫: 醸工誌, **48**, 689 (1970).
- 8) FILIPPUSON, H. and HORNBY, W.E.: *Biochem. J.*, **120**, 215 (1970).
- 9) 川嶋浩二・梅田圭司: 食品工誌, **23**, 211 (1976).
(昭和 51 年 5 月 27 日受理)