固定化酵素の製造に関する研究

(第7報) 粒状固定化グルコアミラーゼについて

川 嶋 浩 二*・梅 田 圭 司*

Studies on the Preparation of Immobilized Enzymes by Radiopolymerization

Part VII. Preparation of bead shaped glucoamylase and its characteristics

KOJI KAWASHIMA* and KEIJI UMEDA*

Glucoamylase (E.C 3.2.1.3., α -1,4-glucan glucohydrolase) was immobilized in a bead shape (0.5-1 mm diameter) by radiopolymerization method under the frozen temperature (-86°C). The characteristics of the immobilized enzyme were investigated and the enzyme column was operated continuously. 1). The optimum reaction pH was 4.7 for native enzyme and 4.2 for immobilized one. 2). The smallest bead had the highest retained activity (67.5%) when soluble starch (Merck, Zulkowsky) was used as a substrate. 3). There was no big differences in the optimum reaction temperature between native and immobilized glucoamylase. 4). Km value of immobilized enzyme was 2.6 times (maltose as a substrate) or 7.3 times (soluble starch, Merck for analysis, as a substrate) higher than that of native enzyme. 5). Liquified starch (5.5% solution) was passed through the column (flow rate SV 2.3) in which bead shaped glucoamylase was packed and hydrolyzed to 94%.

At the fixed flow rate (SV 1.36), starch solution was hydrolyzed (over 90%) continuously up to 60 hours.

(Received Feb. 21, 1976)

近年蔗糖の価格は世界的な高騰を続けており、甘味資源の乏しい我国としては、澱粉からブドウ糖を得、更にこれを異性化して液糖を得ることは、甘味源を安定して確保する上で今後益々重要な意味を持つものと思われる。

ブドウ糖を異性化する際、固定化酵素を利用する試みはすでにいくつか報告されており¹⁾²⁾³⁾、價格的にも実用の可能性は十分あるものと考えられている。

一方、澱粉からブドウ糖を得るには通常酵素糖化法が行われており、この目的のために固定化グルコアミラーゼを製造し応用する報告もあるが⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾、その実用化までには、まだかなり検討すべき問題点が残されていると思われる。

我々は、低温放射線重合を利用して粒状の固定化酵素を製造する方法を開発した⁸⁾ので、グルコアミラーゼを粒状に固定化し、その諸性質を明らかにすると共に、こ

の固定化グルコアミラーゼを充填したカラムによる澱粉液の連続糖化を試みたので報告する。

実 験 方 法

1. 使用酵素

糖化用グルコアミラーゼ (E.C 3.2.1.3., α -1,4-glucan glucohydrolase, 天野製薬株式会社製, Rhizopus delemere type) をそのまま固定化に供した。

2. 固定化方法

既報⁸⁾に従ってグルコアミラーゼを粒状に固定化した。この時 30% アクリル酸ナトリウム液, 30% アクリル酸カルシウム液, 23% アクリルアミド液 (1.2% ビスアクリルアミドを含む) および x mg のグルコアミラーゼを含む酵素液を各々 1, 2, 1, 1 ml ずつ混合し、この酵素モノマー混合液 5 ml を粒状化して得られた固定化酵素を F- x と表示した。F は固定化酵素を意味し、 x

* 農林省食品総合研究所 (東京都江東区塩浜)

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

は固定化に用いた酵素量を意味する。活性測定などには、通常酵素モノマー混合液 5 ml から得られた固定化酵素 F-x の 1/200~1/50 を秤量し供試した。なお、特に断らない限り、粒状固定化酵素の直径はほぼ 0.5~1 mm のものを作成し実験に供した。

3. 活性測定方法

固定化していない native 酵素の場合は、酵素液 1 ml, 蒸留水 6 ml, クエン酸-リン酸緩衝液 1 ml (pH 4.7) に基質 (5% 可溶性澱粉, merck, zulkowsky), 2 ml を加え, 40°C で 20 分反応させ, 生じたグルコース量をグルコースオキシダーゼ法又は Willstätter-Shudel 法により測定して酵素活性を比較した。グルコースオキシダーゼを用いる時には, 反応終了後反応液の 1 部 (1~2 ml) を取り 5 分間煮沸した。

固定化グルコamilラーゼの場合も, native 酵素とはほぼ同様にして活性測定を行った。ただし, native 酵素の代りに固定化酵素を, 又蒸留水は 7 ml, 緩衝液は pH 4.2 を用いた。

結果および考察

1. 至適反応 pH

固定化された酵素は自己を取り囲む環境の荷電状態が変化するため, 活性発現に適した溶液の水素イオン濃度がしばしば異なったものとなる。しかしポリアクリルアミドのような中性の担体中に包埋された場合は, 至適反応 pH の変動はない⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾ のが普通である。本法による固定化では, 重合素材にアクリルアミドの他にもアクリル酸塩を用いているため, 固定化した酵素の至適 pH 域が変動する可能性があり, それを検討する検討する目的で以下の実験を試みた。

グルコamilラーゼを固定 (F-50) して, その 1/50 量を秤量し, pH 2.5~pH 7.0 までのクエン酸-リン酸緩衝液中で反応させた。又, native 酵素は 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の酵素液 1 ml を用いて同様に反応させた。反応後生成グルコース量をグルコースオキシダーゼ法により測定した。その結果, 図 1 に示したように native 酵素では pH 4.7 付近に又固定化グルコamilラーゼでは pH 4.2 付近に至適反応 pH があるものと思われた。この結果, 以後の酵素反応においては native 酵素は pH 4.7 を固定化酵素は pH 4.2 を用いた。このように固定化処理により至適反応 pH が酸性側に約 0.5 だけ移動する現象は本実験と同じモノマー組成で, インペルターゼを固定化した場合⁽¹¹⁾の結果とよく一致する。放射線重合して生じたポリマーは物合素材に由来する Na^+ や Ca^{2+} を含むため,

それ自体正に帯電しており, このため見かけ上至適反応 pH がより酸性側にずれたと思われる。

2. pH 耐性

酵素の pH 耐性を検討した。既ち native および固定化グルコamilラーゼの至適反応 pH はそれぞれ 4.7 および 4.2 であることがわかったが長時間各 pH 値の緩衝液中に放置した後の残存活性を求めることにより, 酵素の各 pH に対する耐性を知り酵素を長期間連続使用する際の至適 pH 値を選定することができる。

固定化酵素 (F-50 の 1/50 量) および native 酵素 (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を 1 ml) にそれぞれ 9 又は 8 ml の各緩衝液 (最終濃度 $M/25$) を加え 30°C で 16 時間放置した後, 5% 澱粉液 2 ml を加え 40°C で 20 分間反応させ生成グルコース量を Willstätter-Shudel 法により測定した。

その結果図 2 に示したように native 酵素ではほぼ 4.5~5.5 で固定化酵素では 4.0~4.5 で最も高い活性

Fig. 1. pH activity profile of glucoamylase
—▼— immobilized (1/50 of F-50) and —△— native (500 μg) glucoamylase were reacted at 40°C for 20 min. in each pH's solution (Citrate-Phosphate buffer)

Fig. 2. Tolerance of glucoamylase activity in the different pH solution
—▼— immobilized (1/50 of F-50) and —△— native (500 μg) glucoamylase were preincubated in each pH's solution (Citrate-Phosphate buffer) at 30°C for 16 hrs and the residual enzymic activities were assayed.

を示した。これは先の至適反応 pH 値とも矛盾せず、固定化酵素を長期間使用する際も pH 4.2 付近でよいことがわかる。

3. 反応曲線

native および固定化グルコアミラーゼを 40°C で反応させ生成グルコース量の経時変化を調べた。native 酵素は、25, 50 および 100 μg を用い、又固定化酵素は、F-5, F-10 を作成しそれぞれ全体重の 1/50 を秤量して反応に供した。

その結果を図 3 に示した。固定化酵素の活性は酵素濃度、他粒径の大小によっても変動するが、ここでは直径 0.5~1 mm 程度のものを用いており、よい直線性が得られた。

4. 粒径と保持活性

粒状固定化酵素では粒径の小さいもの程表面積は大きくなり、もし固定化酵素標品の表面あるいは表面近くでのみ酵素反応が起るなら粒径の小なるもの程その酵素活性は高い値をとると思われる。

酵素 25 mg を含んだ酵素-モノマー混合液 5 ml を放射線重合させ、様々な粒径を持った粒状グルコアミラーゼを作成した（すなわち、F-25）。粒径の大きなもの（直径 8~12 mm）では酵素-モノマー混合液を大豆油中に滴下し、直ちにドライアイスアセトン中で冷却して凍結させた後放射線重合させた。又粒径の極端に小さいもの（直径 0.02~0.05 mm）の場合には、酵素-モノマー混合液 5 ml に乳化剤（tween 40）を数滴添加後、トル

Fig. 3. Reaction curves of glucoamylase
1 ml of native glucoamylase (—○— 100 μg , —△— 50 μg and —□— 25 μg) was mixed with 1 ml 0.4 M Citrate-Phosphate buffer (pH. 4.7), 6 ml of distilled water and 2 ml of 5% soluble starch (Merck, Zulkovsky). Immobilized glucoamylase (—●— 1/50 of F-10 and —▲— 1/50 of F-5) was mixed with 1 ml of 0.4 M Citrate-Phosphate buffer (pH. 4.2), 7 ml of distilled water and 2 ml of 5% soluble starch. Reaction temperature was 40°C.

Fig. 4. Effect of bead diameter on the retained activities of bead shaped immobilized glucoamylase

Immobilized glucoamylase (F-25) having various diameter were prepared and 1/50 to 1/25 of them were weighed and subjected to the enzymic reaction at 40°C for 20 min.

—■— relative activity, —●— relative surface area

エン 60 ml 中で激しく攪拌して急冷し凍結させ、直ちに放射線を照射した。粒径が 0.5~4 mm 程度のもの場合には針先の大きさの異なる注射器を用い、ドライアイスアセトン寒剤中で冷却した石油エーテル中に酵素モノマー混合液を滴下して調整した。

得られた固定化酵素はそれぞれくり返し水洗後全体重の 1/50 ずつを秤量し活性測定に用いた。又比較のために native 酵素 (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を用いほぼ同様に活性測定を行った。その結果図 4 からわかるように粒径の小なるもの程、保持活性は高くなるが、その高くなる比率はインペルターゼの場合¹¹⁾と同じく表面積の増加率とは平行しないことから単に粒の外表面でのみ酵素反応が起るのではないと思われた。

なお、保持活性は次式により求めた。すなわち

$$\frac{\text{固定化酵素標品の活性} \times 100}{\text{固定化に用いた native 酵素の活性}}$$

5. 至適反応温度

固定化処理により至適反応温度の変化することはよく知られている。多くの場合、酵素は共有結合法などで固定化されることにより、周囲の担体から制約を受け unfolding 等の熱変性を阻止されるため、熱安定性が向上し見かけの至適反応温度も上昇する。本法による固定化では酵素と担体の間に化学的な結合を期待しがたいが、固定化に伴う至適反応温度の変動を検討した。

固定化酵素 (F-10 の 1/100 量) および native 酵素 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を 30, 40, 50, 55, 60 および 65°C にあらかじめ加温調整しておいた反応液（前記酵素の活性測

定方法において酵素だけを除いた反応溶液)中に添加し、10 分間反応させた後、生成グルコース量をグルコースオキシダーゼ法により求めた。

その結果図5に示したように、至適反応温度にほとんど差は見られず、どちらの場合も 55°C 附近にあって、それ以上の高温では両酵素共すみやかに活性を失った。

6. 熱安定性

前述の結果、設定した反応条件内では至適反応温度に変化はなかったが、次に酵素をあらかじめ 50°C 又は 60°C に加温処理し、酵素の熱安定性を検討した。加温処理は固定化酵素 (F-10 の 1/50 量) および native 酵素 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を 1 ml) をそれぞれ所定の温度に加温し

Fig. 5. Temperature activity profile of glucoamylase

—▼— immobilized (1/100 of F-10) and —△— native (100 μg) glucoamylase were reacted at each temperature for 10 min.

Fig. 6. Heat stability of glucoamylase

—▼— immobilized (1/50 of F-10) and —△— native (50 μg) glucoamylase were preincubated at 50°C or 60°C for 0 to 30 min. After cooling the residual enzymic activities were assayed.

ておいた pH 4.2 および pH 4.7 の緩衝液中 (8 ml) に添加し、そのまま 5~30 分加温して直ちに急冷後 5% 基質 1 ml を加えて残存活性を測定した。

その結果、図6に示したように固定化処理による熱安定性の変動はほとんど認められず 60°C では勿論 50°C においても処理時間と共に同様に活性近下の起ることが観察された。

THOMAS ら¹²⁾ は bovin albumin のような蛋白をグルタルデヒドで低温下に重合させその中に酵素を包埋することにより安定な固定化酵素を得ている。このことから酵素-モノマー混合液を低温下に放射線重合させる際あらかじめ各種蛋白 (egg albumin, bovin albumin, 大豆蛋白, ミルクカゼイン) を添加しておき、得られた固定化酵素の熱安定性を検討したが、いずれの場合も蛋白無添加の場合と比較して有意な差は認められなかった。

7. 貯蔵安定性

固定化グルコアミラーゼ (F-50) を作成し、その 1/50 を秤量して 10 ml 容フタ付試験管に取り分けた。それを2つに分け一方はフタをせずそのまま 5°C 又は 30°C に乾燥状態で保存した。他の一方は蒸溜水 5 ml とトルエンを 2,3 滴加え、フタをして 5°C 又は 30°C に保存した。native 酵素は 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 水溶液を用意し、トルエンを少量加え 5°C に保存した。これらの試料を経時的に取り出し固定化酵素はくり返し水洗後、native 酵素は 1 ml を取りそのまま活性測定に供した。

その結果、図7に示したように固定化酵素は 5°C に貯蔵した時、はじめの3日間で元の 87~91% 程度に活性は低下したが、その後は蒸溜水中でも乾燥状態下でもほとんど大きな活性低下はなかった。一方 native 酵素は 5°C に貯蔵中にほとんど活性低下は認められなかった。30°C に貯蔵した場合は 5°C の場合よりも当然失活速度は早くなるが、32 日後に元の 65~70% 前後の活性を保持していた。又、固定化酵素を同じ温度に貯蔵した場

Fig. 7. Storage stability of glucoamylase

Immobilized enzymes (1/50 of F-50) were stored in distilled water (—▲— at 5°C, —○— at 30°C) or in a dry state (—△— at 5°C, —○— at 30°C). Native enzyme (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was stored in distilled water (—■— at 5°C)

合、蒸留水中よりも乾燥状態で保存する方がより安定であった。図7の残存酵素活性値を外挿することにより30°Cに貯蔵した場合に活性が元の半になるまでの期間を求めるとほぼ63日に相当した。

8. Km 値

グルコミラーゼのように基質が大分子量である場合、これを固定化した時、基質が拡散して酵素と接触し反応するまでに抵抗が大きいと予想される。

事実 KAY ら¹³⁾ や AXEN¹⁴⁾ らはキモトリプシンを固定した際、これをひきつづし、表面積を大きくするに従って見かけ上 Km 値が減少することを明らかにしている。固定化グルコミラーゼの例では、前田¹⁵⁾ らは CMC セルロースを担体として共有結果させた時、基質の分子量が8000以下であれば十分に酵素作用を示したが、8000以上になるともはや加水分解能を示さなかったとしている。

ここでは、基質の分子量をかえた時 native 酵素と固定化酵素間で Km 値にどのような変動があるかを知る目的で、基質に maltose (日本理化製) および可溶性澱粉 (Merck, soluble starch for analysis) を用いた。固定化グルコミラーゼ (F-69 1/50 量に蒸留水 1 ml) および native 酵素 (50 µg/ml を 1 ml) に基質として maltose (最終濃度 $0.36 \times 10^{-4} M \sim 21.4 \times 10^{-4} M$) 又は可溶性澱粉 (最終濃度 0.01~2%) を添加し、その他は前述の活性測定法に順じて 40°C 10 分間の反応を行い、生成グルコース量をグルコースオキシダーゼ法により測

Fig. 8. Lineweaver-burk plot of glucoamylase. Immobilized (1/50 of F-6) and native (50 µg) glucoamylase were reacted at 40°C for 10 min. Substrate was maltose.

定した。maltose を基質とした場合について、その結果を図8に示した。これから Km 値を求めると、Km 値は固定化前で $1.0 \times 10^{-3} M$ 、固定化後は 2.6×10^{-3} と 2.6 倍に増大した。一方、同様に可溶性澱粉を基質にした場合についてみると固定化前で 0.017%，固定化後は 0.125% と約 7.3 倍に増大している。このように本固定化酵素についても巨大分子量基質に対する酵素の親和性は、低分子基質に対するよりもかなり低下することが示され、巨大分子基質では拡散抵抗の影響をうけやすいことが推定される。

9. 固定化酵素カラム

粒状固定化グルコミラーゼの諸性質は以上述べた通りであるが、次にこの固定化グルコミラーゼをカラムに充填し、酵素カラムとしての使用を試みた。

基質の澱粉液は小巻¹⁶⁾の方法によりあらかじめ液化 (分解率 21.3%) しておき、これを希釈して 5.5% 液 (pH 4.2, 酢酸緩衝液中) を用意した。固定化酵素は F-50 を作成し、カラム (直径 14 mm, 高さ 56 mm, 容積 8.6 ml) に充填した。

まず反応温度 50°C で流速をかえて基質を流した時の分解率を見ると、図9に示したように SV 1.2 以下で 100%，SV 2.3 で 94% の分解率を得た。(固定化酵素の容積量と等しい容積量の基質を1時間当りに流す流速を SV1 とした。)

次にあらかじめ液化 (分解率 21.2%) しておいた 5.5% 澱粉液 (pH 4.2, 酢酸緩衝液) を流速 SV 1.4 で前記酵素カラムに連続して流し、経時的に基質の分解率を測定した。その結果、図10に示したようにほぼ60時間までは基質の分解率 90% 以上を維持したが、その後酵素活性は急激に低下し、120 時間で 50% にまでなった。こ

Fig. 9. Effect of flow rate on the hydrolysis of starch by bead shaped immobilized glucoamylase column

Column; 14 mm diameter, 56 mm height, volume 8.6cc. Immobilized enzyme; F-50. Substrate; 5.5% starch. (pH 4.2). Flow rate; S.V. 1.0=8.6 ml/hr. Reaction temperature; 50°C.

Fig. 10. Continuous hydrolysis of starch by bead shaped immobilized Glucoamylase

Column; 14 mm diameter, 56 mm height, volume 8.6 cc. Immobilized glucoamylase; F-50. Substrate; 5.5% starch. (pH. 4.2). Flow rate; 12 ml/hr. (S.V. 1.36). Reaction temperature 50°C.

のような活性低下の原因として、基質中の難分解物が固定化酵素表面を被覆したあるいは固定した酵素が脱離したなども考えられるが、グルコアミラーゼは基質濃度が希釈な時は比較的熱失活しやすいことから、熱変性による失活がその主なる原因と考えられる。事実、前述の耐熱性試験の結果からも、50°C 30 分の加熱だけで本酵素は、固定化処理したものもしないものも約 15% の活性低下を示している。今後は耐熱性を高めるような固定化方法を検討する、反応温度を下げる、基質濃度を高くする、あるいは耐熱性グルコアミラーゼを使用するなどの方法を検討する必要があるだろう。

要 約

グルコアミラーゼを粒状に固定化し、その基礎的諸性を調べると共に本酵素をカラムに充填して、連続使用を試みた。

(1) 至適反応 pH は、native 酵素で 4.7、固定化酵素で 4.2 あった。

(2) 固定化酵素の保持活性は、粒径の小さいもの程高く、基質に可溶性澱粉を用いたとき直径 1 mm 程度のもので 67.5% であった。

(3) 至適反応温度および熱安定性は固定化処理による

変動はなかった。

(4) 固定化処理により Km 値は maltose 基質の時 2.6 倍に、可溶性澱粉基質の時に 7.3 倍になった。

(5) 粒状固定化グルコアミラーゼをカラムに充填して連続使用した。その結果基質 (5.5% 澱粉液) の流速を SV 2.3 にした時、分解率は 94% であった。また流速を SV 1.36 に固定した時、ほぼ 60 時間まで分解率 90% を維持した。

文 献

- 1) KASUMI, T., KAWASHIMA, K. and TSUMURA, N.: *J. Ferment. Technol.*, **52**, 321 (1974).
- 2) STRANDBERG, G. W. and SMILEY, K. L.: *J. Ferment. Technol.*, **14**, 509 (1972).
- 3) MESSING, R. A. and FILBERT, A. M.: *J. Agric. Food Chem.*, **23**, 920 (1975).
- 4) WILSON, R. J. H. and LILLY, M. D.: *Biotechnol. Bioeng.*, **11**, 349 (1969).
- 5) SMILEY, K. L.: *Biotechnol. Bioeng.*, **13**, 309 (1971).
- 6) O'NEIL, S. P., DUNNILL, P. and LILLY, M. D.: *Biotechnol. Bioeng.*, **13**, 337 (1971).
- 7) WEETALL, H. H., HAVEWALA, N. B., GARFINKLL, H. M., BUEHL, W. M. and BAUM, G.: *Biotechnol. Bioeng.*, **14**, 169 (1974).
- 8) KAWASHIMA, K. and UMEDA, K.: *Agr. Biol. Chem.*, 投稿中
- 9) BERNFELD, P. and BIEBER, R. E.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **131**, 587 (1969).
- 10) KAWASHIMA, K. and UMEDA, K.: *Biotechnol. Bioeng.*, **16**, 609 (1974).
- 11) KAWASHIMA, K. and UMEDA, K.: *Agr. Biol. Chem.*, 投稿中
- 12) THOMAS, D., BROUN, G., GELLF, G., DOMURADO, D., BERJONNEAU, A. M., and GUILLON, C.: *Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 359 (1973).
- 13) KAY, G. and LILLY, M. D.: *Biochem. Biophys. Acta.*, **198**, 276 (1970).
- 14) AXEN, R., MYRIN, P. A.: and JANSON, J. C.: *Biopolymers.*, **9**, 401 (1970).
- 15) 前田英勝・鈴木英雄: 日農化誌, **14**, 547 (1970).
- 16) 小巻利章: 澱粉の工業学的酵素液化法に関する研究, 長瀬産業株式会社尼崎工場刊, 1968. 7.

(昭和 51 年 2 月 21 日受理)