

JAERI-M

6189

低温放射線重合による α -amylase 固定の研究・II

(低濃度 α -amylaseの2-ヒドロキシエチルメタク
リレートによる固定)

1975年7月

吉田 勝・熊倉 稔・嘉悦 勲

日本原子力研究所
Japan Atomic Energy Research Institute

この報告書は、日本原子力研究所が JAERI-M レポートとして、不定期に刊行している研究報告書です。入手、複製などのお問い合わせは、日本原子力研究所技術情報部（茨城県那珂郡東海村）あて、お申しこしてください。

JAERI-M reports, issued irregularly, describe the results of research works carried out in JAERI. Inquiries about the availability of reports and their reproduction should be addressed to Division of Technical Information, Japan Atomic Energy Research Institute, Tokai-mura, Naka-gun, Ibaraki-ken, Japan.

低温放射線重合による α -amylase固定の研究・II
(低濃度 α -amylaseの2-ヒドロキシエチル
メタクリレートによる固定化)

日本原子力研究所高崎研究所開発試験場

吉田 勝, 熊倉 稔, 嘉悦 勲

(1975年7月3日受理)

液化型 α -amylaseを濃度, 50 - 250 μ gの範囲において, HEMA, 1me使用し, 低温放射線重合法による固定化を検討した。包括重合による固定化は $-196^{\circ}\text{C} \sim +40^{\circ}\text{C}$ の温度範囲で行なったが, 0°C 以上では酵素の活性低下が起ることが判明した。最適固定化温度は, $-78^{\circ}\text{C} \sim -24^{\circ}\text{C}$ であり, この範囲での重合手段は放射線による方法しかない。HEMAは放射線重合により, 上記温度範囲において速やかに100%近く重合するので固定化担体としては非常に有利である。HEMAの好適濃度は30%以下であり, この濃度以上になると酵素活性率は急激に低下する。さらに, 最適照射線量は 1×10^6 Rであるが, この場合, 照射線量が 5×10^6 R以上になると酵素活性率の低下が認められた。

HEMA重合体は重合完結と同時にすでに多孔質化したゲル構造を有するので酵素反応はそのままの状態, これに基質を導入することによっておこなうことができる。

得られた酵素固定化組成物の活性保存率は75 - 80%に達した。また, native酵素に比較し固定化物は耐熱性(20℃ほど)が高くなることが明らかになった。

Study on the Immobilization of α -amylase by Radiation-Induced Polymerization at Low-Temperature (II)
Immobilization of Low-Concentration α -amylase by the Polymerization with 2-hydroxyethylmethacrylate

Masaru YOSHIDA, Minoru KUMAKURA and Isao KAETSU
Pilot Scale Research Station, Takasaki, JAERI

(Received 3 July, 1975)

The immobilization α -amylase in low concentration (50-250 μ g) by radiation induced polymerization at low temperature, with HEMA has been studied. The immobilization was performed in the temperature range of -196°C to $+40^{\circ}\text{C}$. Activity of the immobilized enzyme decreases at temperatures above 0°C . The optimum temperatures for immobilization of α -amylase are -78°C - -24°C , where only the polymerization by irradiation is effective. HEMA is a suitable monomer as the immobilization carrier, because of its high polymerization rate of 100 % in the temperature range. The suitable concentration of HEMA is less than 30 %, and above this concentration the activity of enzyme decreases considerably. The optimum irradiation dose for immobilization is 1×10^6 R, and the activity of enzyme decreases at 5×10^6 R.

The polymerization composition is porous gel structure, so the enzymatic reaction can be carried out merely by introducing a substrate to the composition.

The activity attained in the immobilized enzyme is 75-80 % that of the native α -amylase. The immobilized enzyme is more heat-resistant than the native one.

目 次

1. 諸 言	1
2. 実験材料および実験方法	1
2.1 実験材料	1
2.2 酵素固定化方法	2
2.3 標準酵素反応条件および活性測定	2
3. 結果および考察	3
3.1 HEMAの低温放射線重合性	3
3.2 HEMAによる α -amylaseの固定化効果, 活性率に対する種々の因子の影響	4
〔I〕 各種 α -amylaseの固定化効果	4
〔II〕 HEMA濃度の影響	4
〔III〕 酵素濃度の影響	7
〔IV〕 照射温度の影響	7
〔V〕 照射線量の影響	7
〔VI〕 試料容量の影響	7
〔VII〕 酵素反応温度の影響	13
3.3 HEMAによる α -amylaseの固定化効果, pH安定性と耐熱性	13
4. ま と め	16

1. 諸 言

前報¹⁾で明らかなように、 α -amylase は低温領域において、放射線照射に対して非常に安定であることが判明した。そこで、低温において放射線重合性の大きい単量体である 2-ヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA) を使用して、 α -amylase の固定化を検討した。

担体として使用した HEMA は、低温領域において、 -50°C 付近に最大重合速度を有する。²⁾ HEMA による酵素固定化は酵素を高分子ゲル中に包み込む包括法の一つであり、著者らが開発した新しい固定化法である。

従来、放射線を利用した包括法として、担体にポリビニルアルコール³⁾、ポリアクリルアミド⁴⁾、ポリ-N-N-メチレンビスアクリルアミド⁴⁾などを用いる方法が行なわれてきたが、これらの担体は水に強く膨潤する性質を有するため酵素と水を含んだゲル状生成物を多孔質化するには乾燥などにより水を気化させる必要がある。さらに、基質との接触表面積を増すため粉碎する必要があり、工業的煩雑であるばかりか脱水や粉碎の際、酵素が失活したり離脱しやすい欠点がある。

本研究で用いた HEMA は単量体状態では水に溶解するが重合物は水に溶解しないので水相から重合体が酵素を包含しつつ析出してくる特徴がある。そして、その際に重合体中に十分なすき間を生じ、生成物は重合を完結した状態ですでに多孔質ゲル化しているという利点がある。

本報においては、このような包括法を用いた HEMA に対して低濃度溶液中の α -amylase の固定化効果について小規模なアンブルスケールで検討をおこなった。

2. 実験材料および実験方法

2.1 実験材料

実験に使用した α -amylase の性質を表 1 に示した。主に用いた酵素は不純物含有の少ない *Bacillus subtilis* から得た α -amylase (長瀬産業製精製細菌) で 10×10^4 DUN/g の酵素活性を有する。

親水性単量体、2-ヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA) は新中村化学(株)製(純度 96%)をを精製することなくそのまま実験に供した。

基質として用いた可溶性澱粉は純正化学(株)製で、基質溶液調製は 2g の可溶性澱粉を水、20 ml 中に添加し、10 分間煮沸して溶解せしめ、冷却後リン酸緩衝液を用いて最終 pH 6.9 になるようにした。一方、緩衝液調製法は前報に記述した通りである。¹⁾

HEMA 重合体の重合収率は未反応単量体および酵素をエーテルあるいは温水で抽出除去し、乾燥後重量法で求めた。

1. 諸 言

前報¹⁾で明らかなように、 α -amylase は低温領域において、放射線照射に対して非常に安定であることが判明した。そこで、低温において放射線重合性の大きい単量体である 2-ヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA) を使用して、 α -amylase の固定化を検討した。

担体として使用した HEMA は、低温領域において、 -50°C 付近に最大重合速度を有する。²⁾ HEMA による酵素固定化は酵素を高分子ゲル中に包み込む包括法の一つであり、著者らが開発した新しい固定化法である。

従来、放射線を利用した包括法として、担体にポリビニルアルコール³⁾、ポリアクリルアミド⁴⁾、ポリ-N-N-メチレンビスアクリルアミド⁴⁾などを用いる方法が行なわれてきたが、これらの担体は水に強く膨潤する性質を有するため酵素と水を含んだゲル状生成物を多孔質化するには乾燥などにより水を気化させる必要がある。さらに、基質との接触表面積を増すため粉碎する必要がある、工業的煩雑であるばかりか脱水や粉碎の際、酵素が失活したり離脱しやすい欠点がある。

本研究で用いた HEMA は単量体状態では水に溶解するが重合物は水に溶解しないので水相から重合体が酵素を包含しつつ析出してくる特徴がある。そして、その際に重合体中に十分なすき間を生じ、生成物は重合を完結した状態ですでに多孔質ゲル化しているという利点がある。

本報においては、このような包括法を用いた HEMA に対して低濃度溶液中の α -amylase の固定化効果について小規模なアンブルスケールで検討をおこなった。

2. 実験材料および実験方法

2.1 実験材料

実験に使用した α -amylase の性質を表 1 に示した。主に用いた酵素は不純物含有の少ない *Bacillus subtilis* から得た α -amylase (長瀬産業製精製細菌) で 10×10^4 DUN/g の酵素活性を有する。

親水性単量体、2-ヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA) は新中村化学(株)製(純度 96%)をを精製することなくそのまま実験に供した。

基質として用いた可溶性澱粉は純正化学(株)製で、基質溶液調製は 2g の可溶性澱粉を水、20 ml 中に添加し、10 分間煮沸して溶解せしめ、冷却後リン酸緩衝液を用いて最終 pH 6.9 になるようにした。一方、緩衝液調製法は前報に記述した通りである。¹⁾

HEMA 重合体の重合収率は未反応単量体および酵素をエーテルあるいは温水で抽出除去し、乾燥後重量法で求めた。

表 1. 実験に使用した α -amylase

No.	製造元	酵素源	酵素の性質	酵素活性 ²⁾
1	東京化成	Bacillus subtilis	from Fungi diluted with diatomaceous earth	
2	半井化学	Bacillus subtilis	Type III -A, (含 藻土)	500-1000 /mg
3	協和発酵	Bacillus subtilis	basic, (含 藻土)	10 ⁴ u/mg
4	天野製薬	Bacillus subtilis	澱粉賦形品 (A-D3)	30 u/mg
5	長瀬産業	Bacillus Subtilis	精製細菌, (凍結乾燥粉末)	10×10 ⁴ DUN/g
6	長瀬産業	Bacillus subtilis	結晶細菌, (精製細菌を3回再結)	150×10 ⁴ DUN/g
7	SIGMA	Bacillus subtilis	Type II -A, 4X-crystallized ¹⁾ Lyophilized powder	870 u/mg
8	生化学工業	Asperigillus oryzae	3X-crystallized	120 u/mg

1) 4回結晶化精製をおこなった。

2) units/mg (u/mg) および DUN/g (Dextrinogenic unit of Nagase) は酵素 1mg あるいは 1g に対して, 1% 澱粉液 10mℓ (100mg) の Blue value を 40℃ にて 1分間に 1% 低下させる酵素力を 1単位 (unit 又は DUN) として算出した値。

2.2 酵素固定化方法

α -amylase, 20mg を 0.02 M リン酸緩衝液 (pH 6.9), 70mℓ に溶解した。この酵素溶液から 0.7 mℓ 取り出し, 10mmφ ガラスアンプル中に添加, さらに HEMA, 0.3mℓ を加えた。この混合液は 30% HEMA 濃度の酵素固定液であり, 酵素量 200 μ g に相当する。その後, -24℃ の温度で ⁶⁰Co, γ -線を照射線量率, 1×10^6 R/hr で 1時間照射し固定化組成物を得た。

酵素濃度, HEMA 濃度を加えた場合についても, 上記条件を随時変化させて実験を行なった。照射温度は -196℃ から 40℃ の領域でおこなった。

上記, 固定化組成物は重合終了状態ですでに多孔質ゲル構造を有するので, 何ら処理操作をおこなうことなく酵素反応に供した。重合, その他の操作はすべて空気雰囲気下でおこなった。

2.3 標準酵素反応条件および活性測定

基質溶液は可溶性澱粉, 2g に水, 20mℓ を添加し, 10分間煮沸して溶解させ, その後, 0.02 M リン酸緩衝液で全量を 100mℓ とし調製した。その基質は 2% 可溶性澱粉溶液 (pH 6.9) である。HEMA によって固定化した酵素の標準酵素反応は基質 6mℓ と固定化組成物を 20mmφ ガラスアンプル中で, 振動をおこないながら 40℃ で 1時間おこなった。

澱粉は α -amylase によって加水分解され, マルトース, 限界デキストリン, グルコースを生成する。上記, 反応終了後, 反応液を 10倍量の水で希釈し, ジニトロサルチル酸法で生成したマルトース量を比色分析し, これをアミラーゼ活性とした。¹⁾ この反応操作を繰り返して固定化率

を測定した。すなわち、固定化率の尺度として「酵素活性率」は

$$\text{酵素活性率 (\%)} = \frac{\text{固定化酵素のアミラーゼ活性}}{\text{Native 酵素のアミラーゼ活性}} \times 100$$

を表わし、また「活性保存率」は上記標準酵素反応を5回おこなった後の酵素活性率を示すものである。

3. 結果および考察

3.1 HEMAの低温放射線重合性

α -amylase を固定化する場合、担体として使用するHEMAの放射線重合性について、それがリン酸緩衝液(pH6.9)との二成分系においてどのようになるかについて検討した。

図1の結果から次のことがわかる。HEMAの濃度の減少とともに重合速度は小さくなるが、いずれの濃度においても-78℃までの低温領域において比較的容易に高重合率に達する。嘉悦らは²⁾ HEMAの単独重合において、-50℃付近に重合速度の極大現象を認めているが、これは初速度の場合の研究であり、本報では実用上重要な高重合率の段階における重合速度を検討したものである。HEMA, 100%の場合、極大、極小が現われないのは高重合率であり、収率が頭打ちしているためである。また、-196℃でも収率があるのは後効果重合が混入したためと考えられる。しかしながら、HEMA濃度が小さくなるにつれて収率が頭打ちしていないため重合速度の極大、極小現象が認められる。これはHEMA 100%の場合と異なり純粋のガラス状態あるいは過冷却状態ではなく、水が結晶してHEMAの過冷却状態と混在する状態であるからガラス相重合の場合と同じ理由²⁾ (成長鎖二分子停止速度が高粘度のため減少し、さらに低温ではモノマーの成長反応速度が高粘度のため減少してみかけの重合速度の極大、極小を生ずるという理由)によって、このような極大、極小を説明できるかどうか疑わしい。図1において極大を生ずる温度はHEMAの単独重合で知られている-50℃²⁾からずれて、-24℃付近にシフトしている。

HEMAに水が含まれたためガラス転移点が変わり、極大重合速度の温度(嘉悦らにより T_v と呼ばれ、ガラス転移点より30~50℃高い温度といわれている²⁾)が変わったものとするれば、水はむしろHEMAのガラス転移点を低下させるはずであり、 T_v は-50℃より低くなるはずである。これは図1の結果と一致しない。この場合、極大、極小の生じた理由として考えられることは次のようなことである。HEMAと水より成る混合系の共融点温度が0℃~-24℃位とすると、この温度で水の結晶化が起り、それ以上ではほぼ均一な液相であったものが固-液共存相になる。従って、水の結晶化温度以下では酸素の重合禁止効果が均一液相の場合ほど有効でなくなってくる。あるいは、また水が結晶化するためモノマー濃度が実質的に増加することなどのため重合速度が上がることが考えられる。さらに、-50℃に近づく急速にHEMA相が高粘度となり著るしく後効果重合が混合しやすくなることも低温でみかけの収率を増加させ極大を生じさせる原因の一つかもしれない。

を測定した。すなわち、固定化率の尺度として「酵素活性率」は

$$\text{酵素活性率 (\%)} = \frac{\text{固定化酵素のアミラーゼ活性}}{\text{Native 酵素のアミラーゼ活性}} \times 100$$

を表わし、また「活性保存率」は上記標準酵素反応を5回おこなった後の酵素活性率を示すものである。

3. 結果および考察

3.1 HEMAの低温放射線重合性

α -amylase を固定化する場合、担体として使用するHEMAの放射線重合性について、それがリン酸緩衝液(pH6.9)との二成分系においてどのようになるかについて検討した。

図1の結果から次のことがわかる。HEMAの濃度の減少とともに重合速度は小さくなるが、いずれの濃度においても-78℃までの低温領域において比較的容易に高重合率に達する。嘉悦らは²⁾ HEMAの単独重合において、-50℃付近に重合速度の極大現象を認めているが、これは初速度の場合の研究であり、本報では実用上重要な高重合率の段階における重合速度を検討したものである。HEMA, 100%の場合、極大、極小が現われないのは高重合率であり、収率が頭打ちしているためである。また、-196℃でも収率があるのは後効果重合が混入したためと考えられる。しかしながら、HEMA濃度が小さくなるにつれて収率が頭打ちしていないため重合速度の極大、極小現象が認められる。これはHEMA 100%の場合と異なり純粹のガラス状態あるいは過冷却状態ではなく、水が結晶してHEMAの過冷却状態と混在する状態であるからガラス相重合の場合と同じ理由²⁾ (成長鎖二分子停止速度が高粘度のため減少し、さらに低温ではモノマーの成長反応速度が高粘度のため減少してみかけの重合速度の極大、極小を生ずるという理由)によって、このような極大、極小を説明できるかどうか疑わしい。図1において極大を生ずる温度はHEMAの単独重合で知られている-50℃²⁾からずれて、-24℃付近にシフトしている。

HEMAに水が含まれたためガラス転移点が変わり、極大重合速度の温度(嘉悦らにより T_v と呼ばれ、ガラス転移点より30~50℃高い温度といわれている²⁾)が変わったものとするれば、水はむしろHEMAのガラス転移点を低下させるはずであり、 T_v は-50℃より低くなるはずである。これは図1の結果と一致しない。この場合、極大、極小の生じた理由として考えられることは次のようなことである。HEMAと水より成る混合系の共融点温度が0℃~-24℃位とすると、この温度で水の結晶化が起り、それ以上ではほぼ均一な液相であったものが固-液共存相になる。従って、水の結晶化温度以下では酵素の重合禁止効果が均一液相の場合ほど有効でなくなってくる、あるいは、また水が結晶化するためモノマー濃度が実質的に増加することなどのため重合速度が上ってくることが考えられる。さらに、-50℃に近づく急速にHEMA相が高粘度となり著るしく後効果重合が混合しやすくなることも低温でみかけの収率を増加させ極大を生じさせる原因の一つかもしれない。

極小を酸素の効果で解釈すれば、HEMA濃度が小さくなるほど極小の切れこみが深くなる。即ち酸素の有無による禁止効果の差が大きくなる現象も理解できる。

図1から、実用的に有利な重合温度範囲を選択すれば $-196^{\circ}\text{C} \sim 0^{\circ}\text{C}$ が適当と思われる。

3.2 HEMAによる α -amylaseの固定化効果、活性率に対する種々の因子の影響

リン酸緩衝液存在下でのHEMAの重合性が明らかになったので次に固定化の研究を進めた。

(I) 各種 α -amylaseの固定化効果

種々の市販 α -amylaseの固定化は30%HEMA濃度においておこない、その固定効果を図2に示した。

不純物含有の少ない α -amylase(長瀬産業, SIGMAあるいは生化学工業製)の活性保存率は70~80%で固定効果が顕著にすぐれていることがわかる。澱粉含有率が α -amylase(天野製薬製)の活性率がすぐれているのは、前報¹⁾で明らかのように酵素が澱粉によって安定に保護されるためと考えられる。一方、藻土含有 α -amylase(東京化成, 半井化学, 協和 酵製)の場合、藻土が酵素活性を失なわせるため、¹⁾活性保存率は30~50%と低くなる。

また、*Asperigillus oryzae*(生化学工業製)と*Bacillus subtilis*(長瀬産業)は酵素起源を異にしているが、固定化効果には有意差は認められなかった。

これらの結果に基づいて、以後の実験は不純物含有の少ない長瀬産業製の*Bacillus subtilis*から得た精製 α -amylaseを主として使用した。

上記、 α -amylaseはリン酸緩衝液によく溶ける。HEMAは親水性単量体なのでリン酸緩衝液と任意の割合で混合するがその重合体はリン酸緩衝液と相溶性がなく重合と共に析出し、白色状多孔質重合体と与える。一方、 α -amylaseはHEMAに溶解しないが水に溶解し、本報における実験のように酵素量が200 μg オーダーでは、酵素-HEMA-緩衝液系は重合前の状態では均一無色透明な液体状を保っている。重合後の固定化組成物中の酵素-HEMA重合体間の相互作用、構造などは現在のところ明白でない。

(II) HEMA濃度の影響

酵素の固定化において、HEMAの最適濃度は図3a, 図3bの結果から明らかなように、 $0\% < [\text{HEMA}] \leq 30\%$ が最適であることが判明した。HEMA濃度が30%以上になると、活性保存率は急激に減少してくる。この原因はHEMA重合物は単量体に対しては相溶性であるので、HEMA濃度richでは水相からの析出状態が悪くなり、多孔性が減少し、結果的に、基質と接触する面積が少なくなるためと思われる。また、重合前の混合状態において、酵素とHEMA単量体が接触しその相互作用によって酵素の失活がおこる機会が増えることも考えられる。

酵素とHEMA単量体を室温で混合処理し、30時間後に活性測定したところ、活性低下は殆んど認められなかったが、 40°C で処理すると30時間後に活性は全く失われる。HEMA単量体が固定化組成物中に混在している場合、リン酸緩衝液中にそれを浸漬することにより、これを除くことができる。このように処理したものをガスクロ法で調べるとHEMA単量体のピークが認められなくなる。

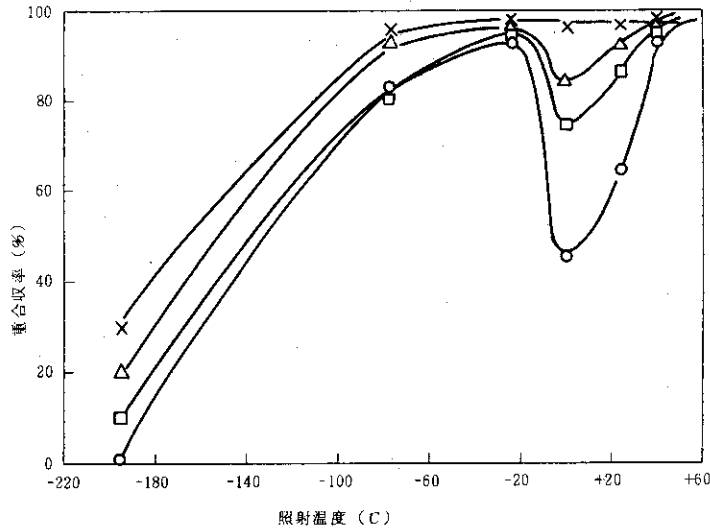


図1. 緩衝液存在下でのHEMAの放射線重合

照射条件: $1 \times 10^6 \text{ R/hr} \times 1 \text{ hr}$, at various temperature

HEMA濃度: (○) : 10%, (□) : 30%, (△) : 70% そして (×) : 100%

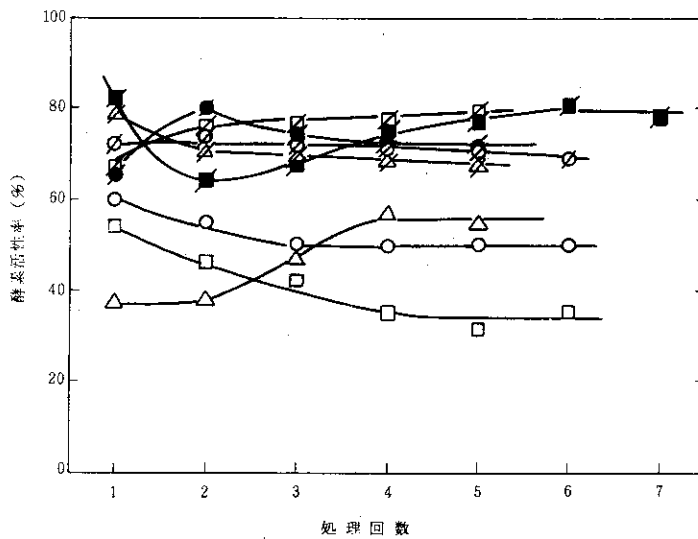


図2. 種々の α -amylaseの固定化

○ 固定化条件: 酵素 200 μg , 30% HEMA (in buffer soln.)

$1 \times 10^4 \text{ R/hr} \times 1 \text{ hr}$ at $-24 \text{ }^\circ\text{C}$

○ 酵素反応条件: 2%可溶性澱粉溶液 (100 $^\circ\text{C}$, 10分溶解), 6ml 40 $^\circ\text{C}$, 1hr

○ 酵素の種類 (α -amylase)

- | | |
|--|--------|
| (1) 東京化成; from fungi | -----○ |
| (2) 半井化学; Type III-A, 50-100 μg | -----□ |
| (3) 協和発酵; basic, 10^4 u/mg | -----△ |
| (4) 天野製薬; 澱粉賦形品 (A-D3), 30 μg | -----◇ |
| (5) 長瀬産業; 精製細菌, $10 \times 10^4 \text{ DUN/g}$ | -----◻ |
| (6) 長瀬産業; 細晶細菌, $150 \times 10^4 \text{ DUN/g}$ | -----△ |
| (7) SIGMA; Type II-A, 4X-crystallized, 870 μg | -----● |
| (8) 生化学工業; 3X-crystallized, 120 μg | -----■ |

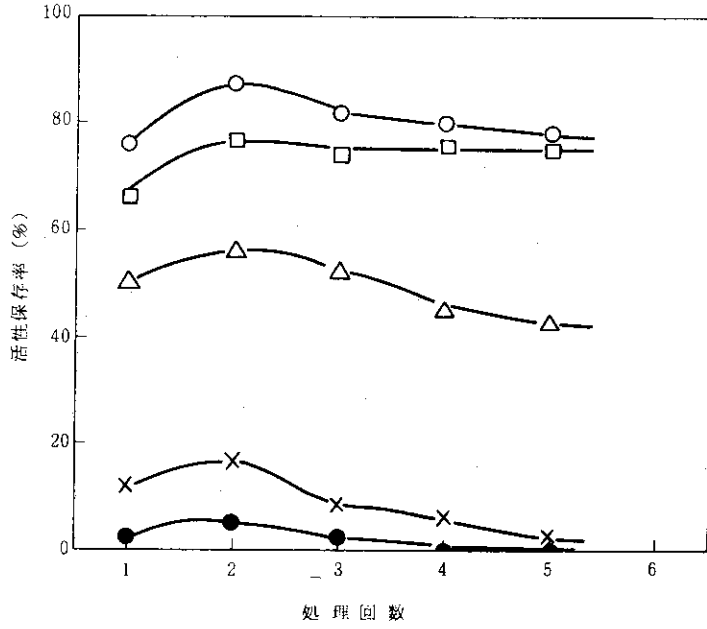


図 3a HEMAによる酵素固定化, HEMA濃度の影響

固定化条件 ; 長瀬精製 α -amylase, 200 μ g

10% (○), 30% (□), 50% (△)

70% (×) そして 100% (●) HEMA, in
buffer soln., 1ml

1×10^6 R/hr \times 1 hr at -24 C

酵素反応条件 ; 2%可溶性澱粉溶液 (100 C, 10分溶解), 6ml
40 C, 1hr

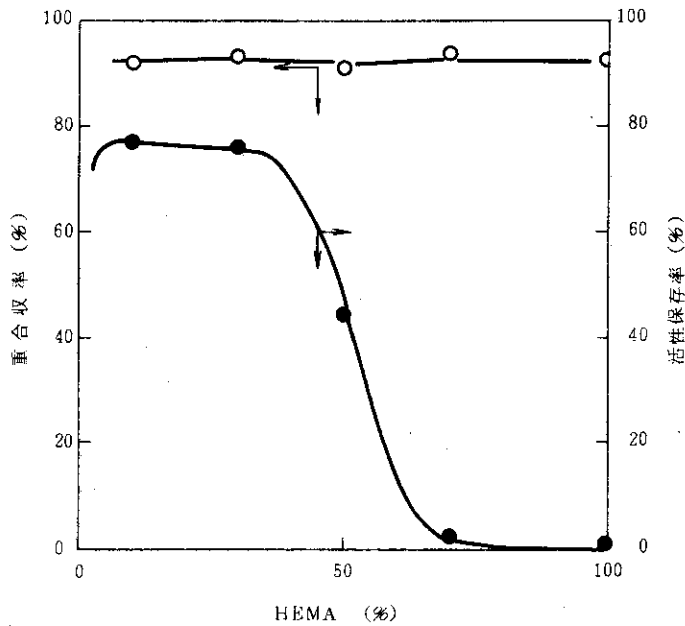


図 3b HEMAによる酵素固定化, HEMA濃度に対する
重合収率と活性保存率の関係

実験条件 ; 図 3a に同じ.

(III) 酵素濃度の影響

HEMAによる酵素固定化における酵素濃度の影響を図4aと図4bに示した。活性率は図4bで明らかなように、酵素量の増加に伴ない向上するが、酵素量が250 μ g以上になると一定になる。これは使用している α -amylaseが液化型酵素⁵⁾のため、30~40%の澱粉を加水分解するにすぎないことが原因している。図5でnative酵素の場合、マルトース生成量は酵素量が250 μ g以上において7mg/mlで殆んど一定となる。この値は、ちょうど30~40%の澱粉を加水分解したことを示すもので、固定化酵素の場合の実験結果と一致する。

また、固定化酵素の場合、固定化実験操作中に酵素は約50 μ g損失することが判明した。この値は、ちょうど30~40%の澱粉を加水分解したことを示すもので、固定化酵素の場合の実験結果と一致する。

また、固定化酵素の場合、固定化実験操作中に酵素は約50 μ g損失することが判明した。この結果、固定化において有効な最小酵素量で最大活性率を得るためには、250 μ gに上記の損失分をみこんで、300~350 μ g添加すればよいことが推論できる。

(IV) 照射温度の影響

図6a, 図6bに照射温度の影響を示した。HEMAの重合体は図6bで明らかなように-24 $^{\circ}$ C付近に極大重合速度を与える。一方、酵素の活性率は図6bから、-196 $^{\circ}$ C~-24 $^{\circ}$ Cの照射温度領域内では殆んど一定で70~80%に達するが0 $^{\circ}$ C以上になると急激に減少する傾向がある。 α -amylaseは放射線に対し非常に安定であるから、¹⁾これは酵素自身の放射線による影響によるものではない。0 $^{\circ}$ C以下における重合速度の極大、極小現象を先に系の相状態の変化にもとづいて解釈したが、0 $^{\circ}$ C以上における固定化効果の急激な減少はHEMA-緩衝液の結晶状態が原因していると思われる。すなわち、この温度以下で水は結晶化するが、このような結晶状態で重合させた方が酵素は固定化組成物中に安定な状態に保持されていることが考えられる。

しかしながら、詳細な系の構造と固定化効果の関係についての機構的な説明は未解決であり今後の大きな研究課題であろう。

(V) 照射線量の影響

照射線量率、 1×10^6 R/hrにおいて、固定化効果におよぼす照射時間の影響を図7a, 図7bに示した。酵素の活性率は照射時間の増加、すなわち照射線量の増加に伴ない向上し、 1×10^6 Rで極大に達する。しかしながら、照射線量が 1×10^7 R以上になると、活性率は減少する傾向を示す。これは水や重合体からの分析生成物が酵素活性を低下させていると考えられる。ちなみに、HEMAは 1×10^6 R照射すれば殆んど100%近く重合体に転換される。それ故、 1×10^7 Rの照射はHEMA重合体の主鎖切断などを誘発することは明白であり、このことは実験的にも分子量低下から確認されている。⁶⁾

(VI) 試料容量の影響

これまでのHEMAによる酵素固定化は、酵素量が200 μ gで30%HEMA濃度の場合、HEMA 0.3ml, リン酸緩衝液 0.7ml添加混合し、全容量1ml使用して行なっていた。そこで、下記のように酵素量、HEMA濃度(リン酸緩衝液に対する)は一定にしておき試料全容量を変化させ活性率の変化を調べた。結果的には酵素濃度の変化に相当する。その結果を図8a, 図8bに示した。

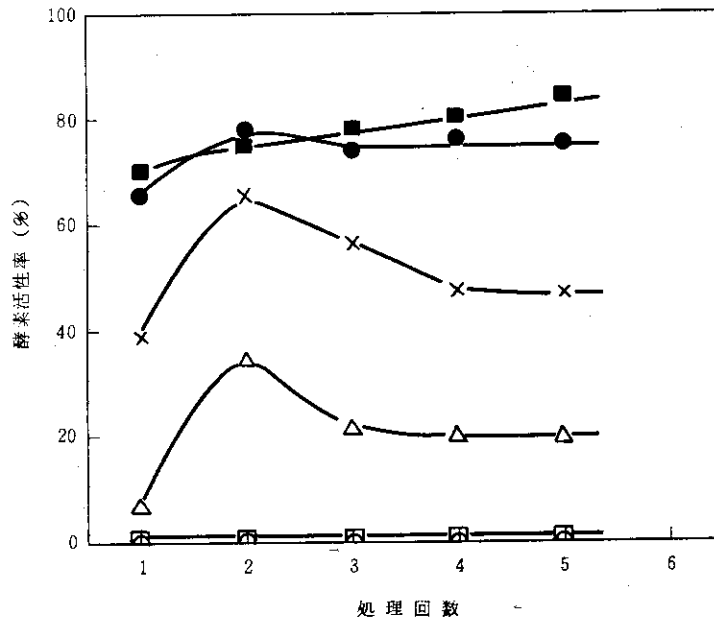


図 4 a HEMAによる酵素固定化, 酵素濃度の影響

固定化条件 : 長瀬精製 α -amylase, (○) : 未添加,
 (□) : 10 μ g, (△) : 50 μ g, (×) : 100 μ g
 (●) : 200 μ g, (■) : 250 μ g
 30% HEMA in buffer soln. 1ml
 1×10^6 R/hr \times 1 hr at -24 $^{\circ}$ C
 酵素反応条件 : 2%可溶性澱粉溶液 (100 $^{\circ}$ C, 10分溶解), 6ml
 40 $^{\circ}$ C, 1 hr

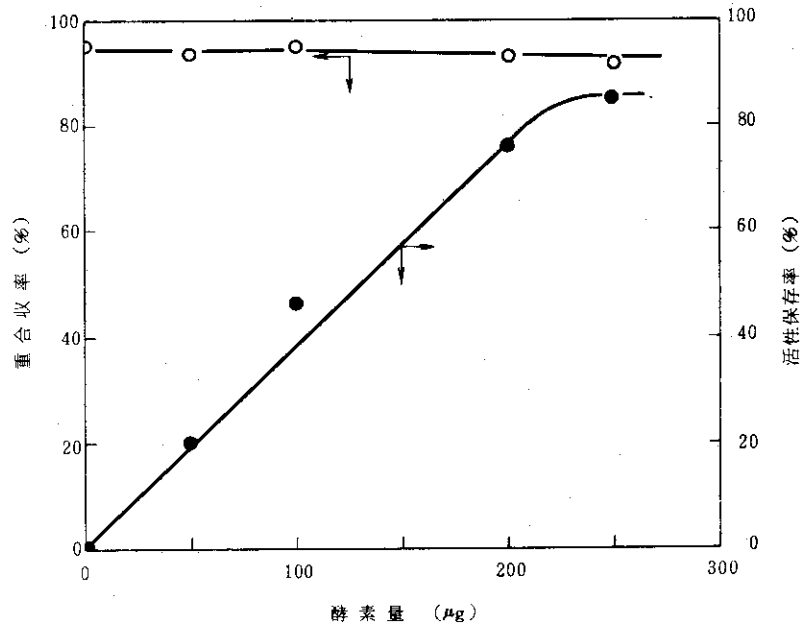


図 4 b HEMAによる酵素固定化, 酵素濃度に対する重合収率と活性保存率の関係

実験条件 : 図 4 a に同じ

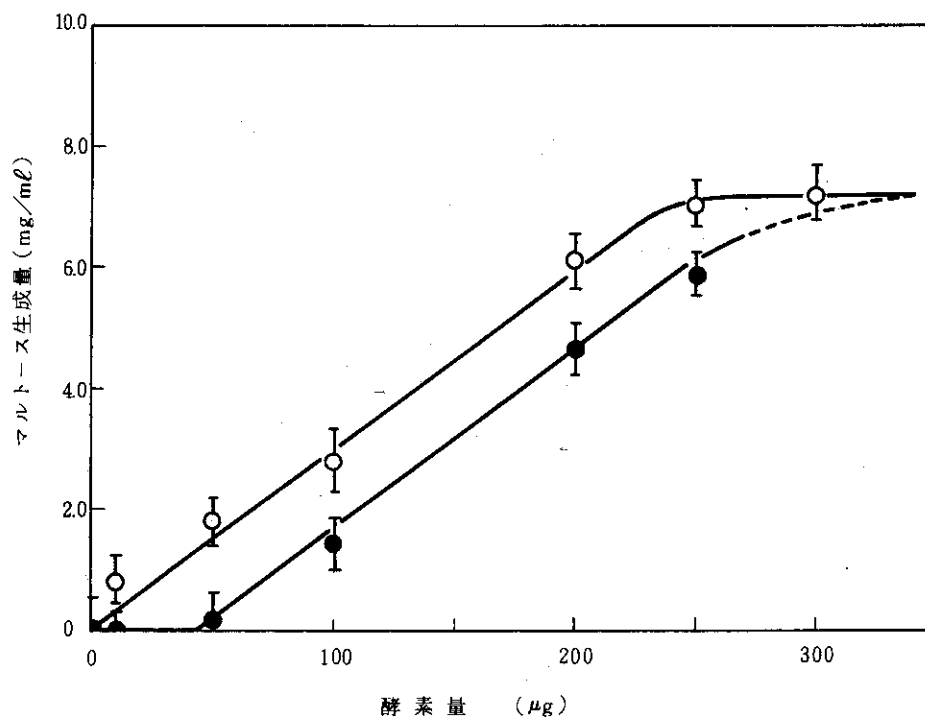


図5 酵素量とマルトース生成量の関係

基質：2%可溶性澱粉溶液(100℃, 10分溶解), 6ml
 酵素反応：各酵素量で可溶性澱粉を基質にして, 標準酵素反応条件にしたがって測定した。

(○)：酵素単独(長瀬産業, 精製α-アミラーゼ)

(●)：固定化酵素

30%HEMA, in buffer soln., 1ml
 $1 \times 10^6 R/hr \times 1hr$ at $-24^\circ C$

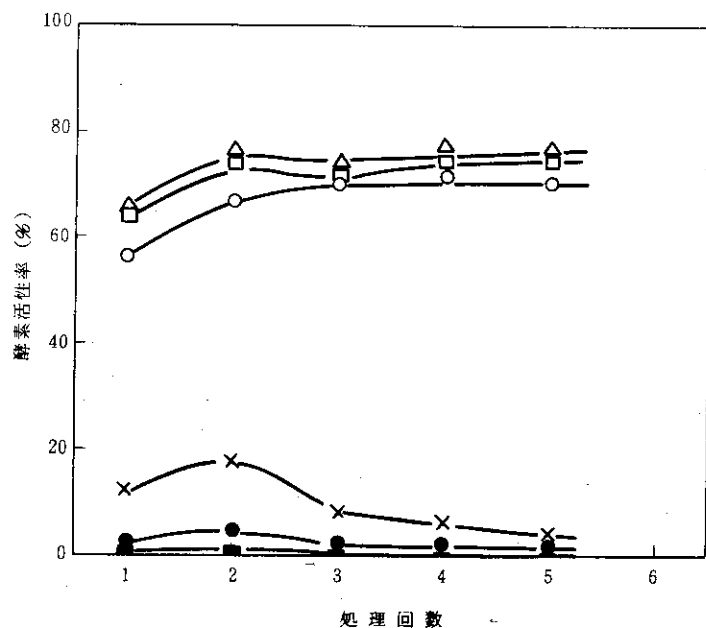


図 6a HEMAによる酵素固定化, 照射温度の影響

固定化条件 : 長瀬精製 α -amylase, 200 μ g
 30%HEMA in buffer soln. 1ml
 1×10^6 R/hr \times 1 hr at -196°C (○)
 -78°C (□), -24°C (△), 0°C (×)
 rt (●) そして 40°C (■)

酵素反応条件 : 2%可溶性澱粉溶液(100°C, 10分溶解) 6ml
 40°C, 1 hr

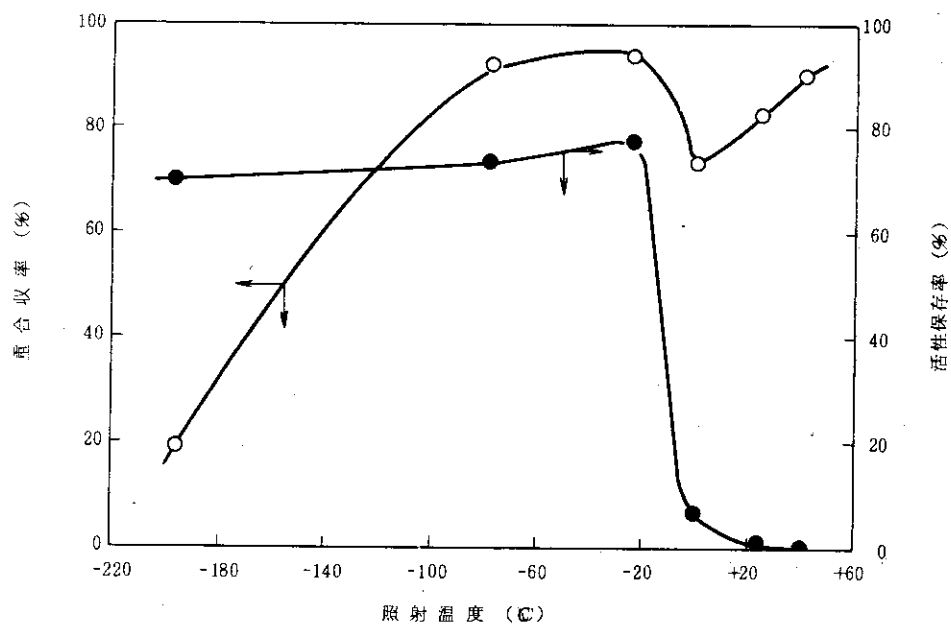


図 6b 照射温度に対する重合収率と活性保存率の関係

実験条件 : 図 6b に同じ

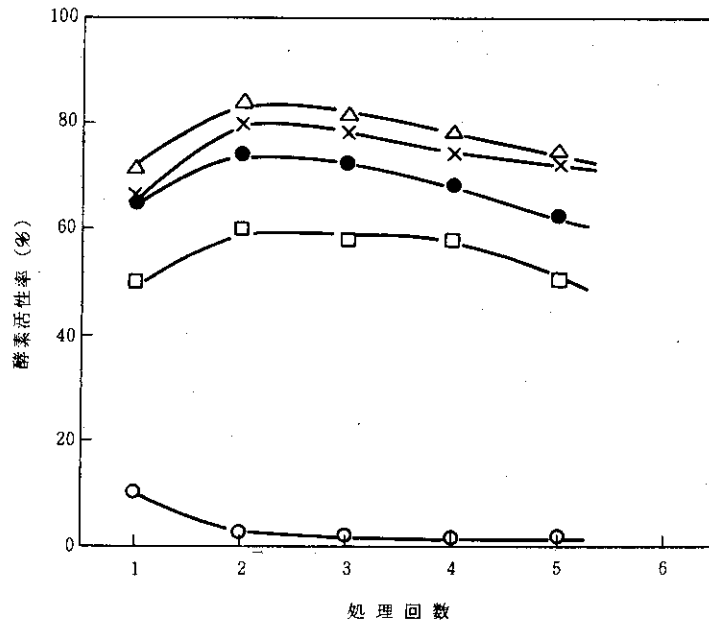


図7a 照射線量の影響

固定化条件：長瀬産業精製細菌 α -amylase, 200 μ g
 10%HEMA in buffer soln., 1ml
 照射温度, -78 $^{\circ}$ C
 1×10^5 R/hr \times 1 hr (○), 5 hrs (□), 10 hrs (△)
 50 hrs (×) そして 100 hrs (●)
 酵素反応条件：2%可溶性澱粉溶液 (100 $^{\circ}$ C, 10分溶解), 6ml
 40 $^{\circ}$ C, 1 hr

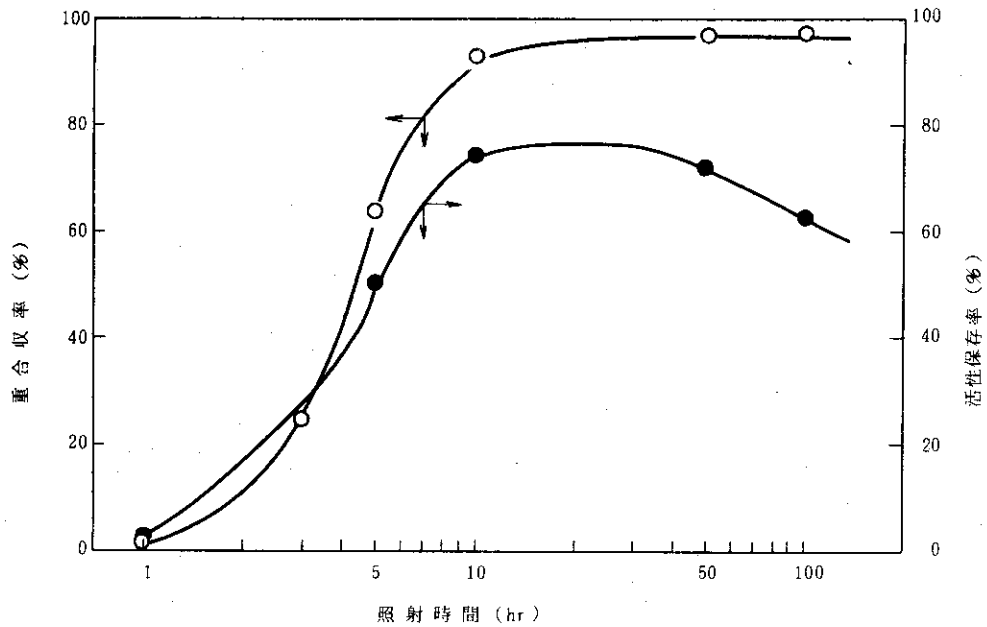


図7b 照射時間に対する重合収率と活性保存率の関係

実験条件：7a に同じ

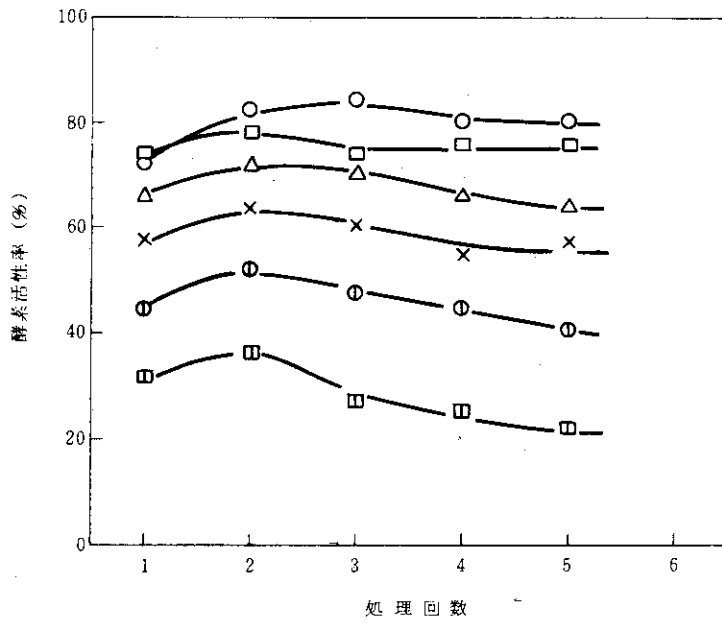


図8a 酵素固定化におけるHEMA-緩衝液量の影響

固定化条件：長瀬精製 α -amylase, 200 μ g
 30%HEMA, in buffer soln., 0.5ml (○)
 1ml (□), 2ml (△), 3ml (×)
 5ml (⊙),そして7ml (◻)
 1×10^6 R/hr \times 1hr, at -24°C
 酵素反応条件：2%可溶性澱粉溶液 (100 $^\circ\text{C}$, 10分溶解), 15ml
 40 $^\circ\text{C}$, 1hr

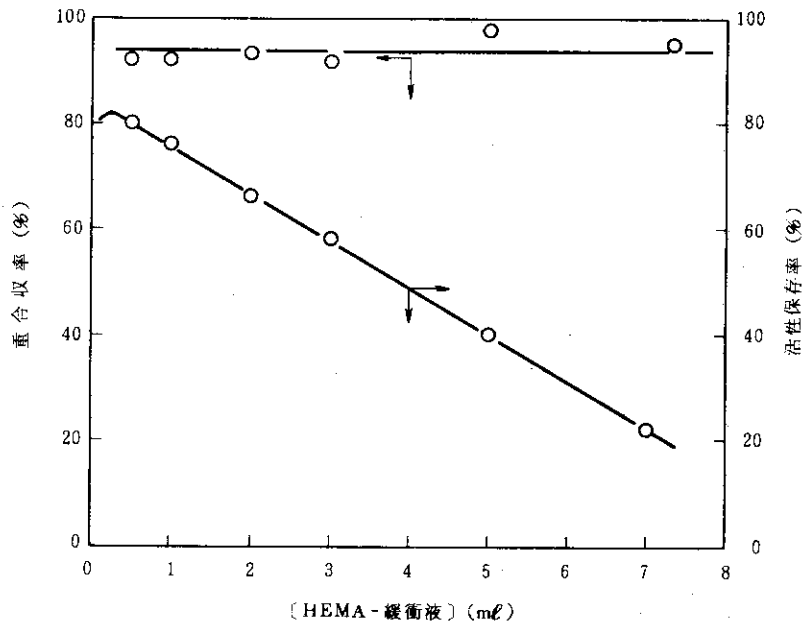


図8b HEMA-緩衝液量に対する重合収率と活性保存率の関係

実験条件：図8aに同じ

No	HEMA(ml)	緩衝液(ml)	固定化組成の全容量(ml)
1	0.15	0.35	0.5
2	0.30	0.70	1.0
3	0.60	1.40	2.0
4	0.90	2.10	3.0
5	1.50	3.50	5.0
6	2.10	4.90	7.0

活性率は図8bで明らかなように、HEMA-リン酸緩衝液の全容量の増加に伴ない減少してくることが判明した。試料容量が一定でリン酸緩衝液に対するHEMA濃度を増加すると活性が低下(図3bにおいて)したが、リン酸緩衝液に対するHEMA濃度一定で試料容量をふやすことによりHEMA量を増加させても、結果的に失活をおこすことが明らかである。

(VII) 酵素反応温度の影響

種々の反応温度で酵素反応をおこなった結果を図9に示す各温度において酵素単独で酵素反応をおこない、その時得られたアミラーゼ活性は各々100とし、固定化組成物の場合も同様な条件で反応をおこない、その時のアミラーゼ活性との比で酵素活性率をあらわした。反応温度が50℃までは処理回数の増加によって活性率は殆んど変化していない。これは反応中の酵素離脱あるいは失活などが非常に少ないことを意味している。特に50℃でのバラツキ範囲が40℃に比べわずかであること、および活性率は50℃で反応させた時の方が若干すぐれていることから、限界酵素反応温度は50℃と思われる。一方、50℃以上で酵素反応を行なうと、処理回数を増すごとに活性率は急激に減少してくる。これは酸素が反応温度が高いため失活をおこし、減少するものと思われる。

3.3 HEMAによる α -amylaseの固定化効果、pH安定性と耐熱性

酵素の固定によって活性が反復連続使用に対し保持される効果の他に酵素のpH安定性や耐熱性が固定化によって変化する効果も重要と考えられる。

固定化酵素のpH安定性を図10に示した。この結果から、酵素単独の場合に比較して、固定化酵素では多少酸性側あるいはアルカリ性側で安定になるだけで殆んど顕著な有意差は認められなかった。結果的に、固定化酵素のpH安定域は5.0~8.0である。

一方、固定化酵素の耐熱性は図11の結果から、酵素単独に比較して高温側で安定性が増大し耐熱性が改良されていることが判明した。

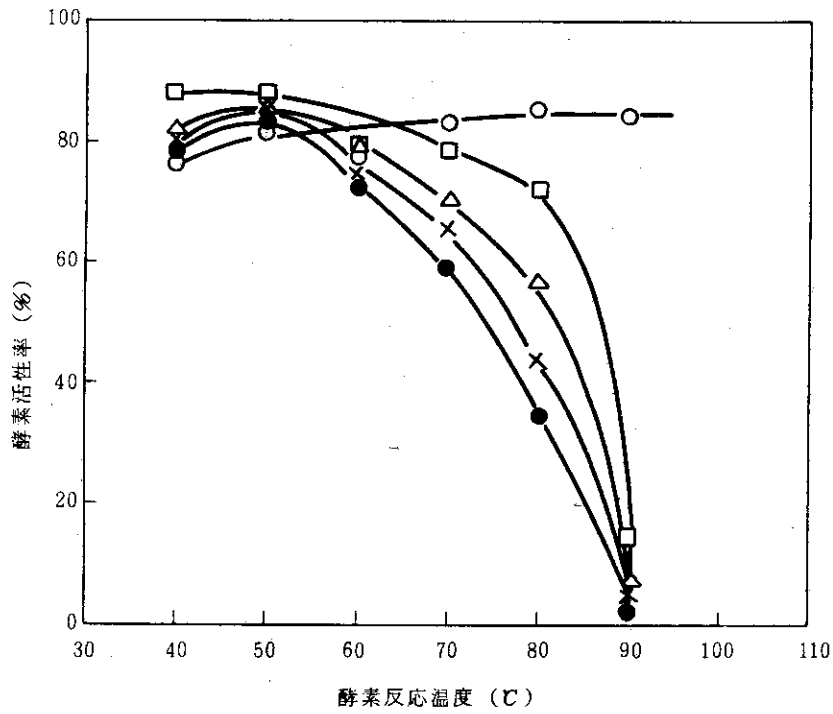


図9 酵素反応温度の影響

固定化条件：長瀬産業精製細菌 α -amylase, 200 μ g 10%
 HEMA in buffer soln., 1ml
 1×10^6 R/hr at -24°C

酵素反応条件：2%可溶性澱粉溶液(100°C, 10分溶解) 6ml
 40°C~90°C, 1hr

(○)；1回処理，(□)；2回処理，(△)；3回
 処理，(×)；4回処理，そして(●)；5回処理
 の各酵素活性率

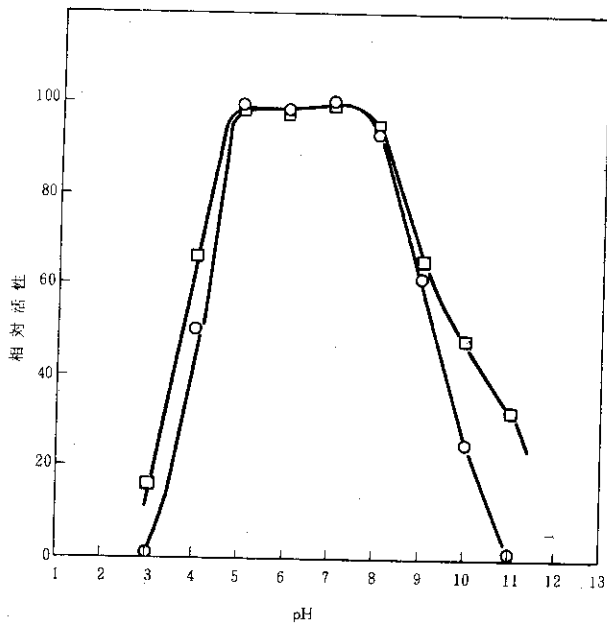


図10 酵素の pH 安定性

長瀬精製 α -amylase, 200 μ g に各種緩衝液 1ml を添加, 40°C で 1 hrs 処理した後, pH 6.9 に補正し全量を 5ml とした. それに 2% 可溶性澱粉溶液 (100°C, 10 分溶解), 10 ml を添加, 酵素反応 40°C, 1 hr おこなった.
pH 3~4 には McIlvaine 緩衝液, pH 5~8 には Sorensen 緩衝液, pH 9~11 には Menzel 緩衝液をそれぞれ使用した.

- (○): 酵素単独
- (□): 酵素固定化, 酵素 200 μ g, 30% HEMA in buffer soln., 1ml
 1×10^6 r/hr \times 1 hr at -24°C

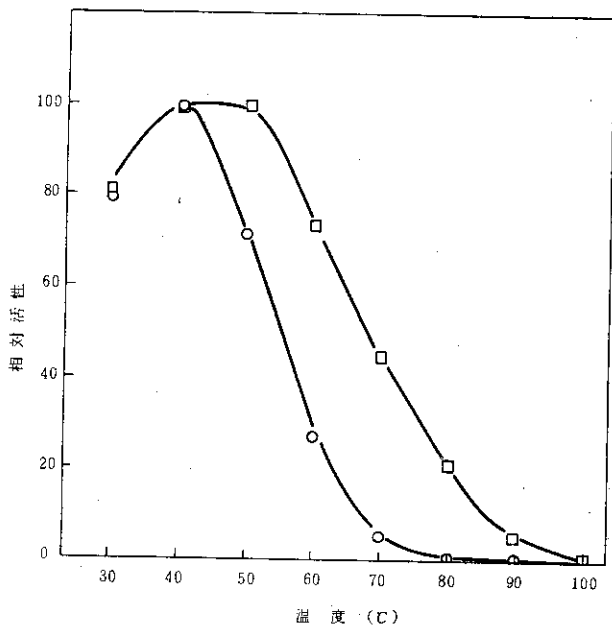


図11 酵素の耐熱性

長瀬精製 α -amylase, 200 μ g に水 1ml を添加し, 各温度に 1hr 保ち, その後 2% 可溶性澱粉溶液 (100°C, 10 分溶解) 10ml を基質にして酵素反応 40°C, 1 hr おこなった.

- (○): 酵素単独
- (□): 固定化, 酵素 200 μ g, 30% HEMA in buffer soln., 1ml
 1×10^6 R/hr \times 1 hr at -24°C

4. ま と め

液化型 α -amylase を HEMA を使用して、著者らが開発した新しい包括法である低温放射線重合により固定化した結果、次のようなことが判明した。

- (1) α -amylase は 0℃ 以下の温度において HEMA により有効に固定化される。そして固定化酵素の活性率は 75~80% に達し、酵素が HEMA 重合体中に効果的に包括されている。
- (2) 0℃ 以上の温度で固定化すると、固定化効果（活性率）は急激に低下する。最適固定化温度は -78℃~-24℃ であり、重合手段としては放射線による方法しかない。HEMA 放射線照射により、-78℃~-24℃ の低温でも容易に 100% 近く重合するので固定化担体としては非常に有利である。
- (3) 好適 HEMA 濃度は 30% 以下であり、これ以上になると固定化効果は急激に低下する。また、最適照射線量は 1×10^6 R で、照射線量が 5×10^6 R 以上になると固定化効果の低下が認められた。
- (4) HEMA 重合体は重合完結と同時にすでに多孔質ゲル化構造を有するので酵素反応はそのままの状態でおこなうことができる。この場合、限界酵素反応温度は 50℃ である。
- (5) HEMA 固定化組成物は native 酵素に比較し、耐熱性が +20℃ 増加する。

文 献

- 1) 吉田勝, 熊倉, 嘉悦勲: JAERI-M 6183 低温放射線重合法による α -amylase 固定の研究・I (α -amylase に対する放射線の照射効果)
- 2) I. Kaetsu, H. Okubo, A. Ito and K. Hayashi: J. Polymer Sci. A1(10) 2203 (1972)
- 3) H. Maeda, H. Suzuki and A. Yamauchi: Biotech. Bioeng. 15 827 (1973)
- 4) H. Maeda, A. Yamauchi and H. Suzuki: Biochimica et Biophysica Acta 315 18 (1973)
- 5) 福本寿一郎: 白質・核酸・酵素 4(1) 3 (1959)
- 6) 吉田勝, 熊倉, 嘉悦勲: 未発表データ