

JAERI-M

6190

低温放射線重合による $\alpha$ -amylase固定の研究・III

(高濃度 $\alpha$ -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 $\alpha$ -amylase 固定の研究・III  
(高濃度 $\alpha$ -amylase の 2-ヒドロキシエチル  
メタクリレートによる固定)

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)

単量体として, 主として HEMA を用い低温放射線重合により $\alpha$ -amylase を固定化する研究を酵素量 50~200 mg の高濃度領域において検討した。

酵素高濃度の場合の特徴は重合前の混合液の相分離が起りやすいことであり, 50% HEMA 濃度以上において著るしい相分離が起る。しかしながら, これを振盪によりサスペンション化して急冷凝固させ照射重合を行うことにより有効に固定化できることが判明した。0℃以下の温度ではこのような方法での固定化が可能であり, 0℃以上になると相分離がおこるため酵素を固定化することができなかった。

HEMA の重合性は 0℃を境として変化し, 0℃以下では重合速度が増加し, -24℃で最大となることが認められた。これは 0℃以下で水の結晶化が起り相状態が変化するためと考えられる。

本報で得られた高濃度酵素を用いた場合の活性保存率は 80~85% に達し, 前報<sup>3)</sup>の低濃度 $\alpha$ -amylase の場合よりも若干すぐれた値を示した。

Study on the Immobilization of  $\alpha$ -amylase by Radiation-Induced Polymerization at Low-Temperature (III)  
Immobilization High-Concentration  $\alpha$ -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 of  $\alpha$ -amylase in high concentration ( 50-200 mg ) by radiation induced polymerization at low temperature, with HEMA has been studied.

A feature of the high concentration  $\alpha$ -amylase system is phase separation of the mixed solution prior to polymerization, markedly at HEMA concentrations above 50%. Useful immobilization is possible, however, by irradiation of the suspended composition at  $-196^{\circ}\text{C}$ , which is obtained by shaking the phase-separated system. At temperatures below  $0^{\circ}\text{C}$ , the immobilization is possible, but not above this because of the phase separation.

The polymerizability of HEMA changes abruptly at  $0^{\circ}\text{C}$ . The largest polymerization rate is obtained at  $-24^{\circ}\text{C}$ , possibly due to phase change by crystallization of water of the buffer solution at  $0^{\circ}\text{C}$ .

Activity of the immobilized high-concentration  $\alpha$ -amylase is as high as 80-85% being somewhat higher than that in the low-concentration case.

## 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 酵素の固定化条件 .....	2
2.3 標準酵素反応条件 .....	3
3. 結果および考察 .....	3
3.1 酵素濃度の影響 .....	3
3.2 HEMA濃度の影響 .....	5
3.3 照射温度の影響 .....	5
3.4 照射線量の影響 .....	8
3.5 種々のmethacryl-あるいはacryl-esterによる固定化 .....	8
4. まとめ .....	13

## 1. 諸 言

$\alpha$ -amylase は澱粉分解酵素で澱粉中の  $\alpha$ -1,4-グルコシド結合をランダムに加水分解し、急速にマルトース、グルコースなどのオリゴ糖を生成する。

この酵素の高分子量重合体による固定化については、ポリアクリルアミド<sup>1)</sup>、カルボキシメチルセルロースあるいはポリ-p-アミノスチレン<sup>2)</sup>などを用いる方法が報告されているが、これらは活性率が低いうえに反応中に酵素の離脱、失活などが起る欠点がある。また、方法的に操作が煩雑で工程が多い欠点も有する。

これを改良するため、著者らは2-ヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA) のような親水性単量体を用いて、低温放射性重合により  $\alpha$ -amylase の固定化をおこない活性率のすぐれた、そして酵素反応中に酵素の離脱、失活の伴わない固定化方法を見出している<sup>3)</sup>。この方法は重合と同時に重合物が酵素分子を抱きこんで多孔質構造を作りながら析出してくる極めて簡便な固定方法である。HEMAを用い、酵素量を50~250  $\mu$ g、単量体量を1 mlとした場合の固定化の研究結果については前報<sup>3)</sup>でまとめた。

本報告は前報に比較して、 $\alpha$ -amylase を高濃度にした場合、すなわち酵素量が50~200 mg、単量体量が5 mlの場合について検討した。酵素が低濃度と高濃度の場合を比較すると、その相違点として、酵素濃度が高い時には相分離現象が起ることが挙げられる。すなわち、相分離現象は酵素が高濃度の場合においてHEMA濃度がリン酸緩衝液 (pH 6.9) に対し50%以上になった時、HEMA相と酵素を含む緩衝液相とが分離することで、前報のような低濃度の場合には観察されなかった。酵素が高濃度でHEMA濃度が50%以上の場合、照射温度が0℃以上では酵素を含む緩衝液層とHEMA相とに相分離した状態で重合が進むため酵素を有効に固定化した組成物を合成することはできない。しかしながら、0℃以下では、相分離した混合液を強く振盪して懸濁分散させた後、急冷して凝固させれば酵素を重合体中に有効に包括した固定化組織物を得ることは可能である。HEMA濃度が30%以下の場合にはこのような相分離現象は起らず、そのまま重合して有効に固定化することができた。

本報では  $\alpha$ -amylase を高濃度に添加した時のHEMAの重合性をしらべ、重合条件と固定化効果の相関性について考察した。また、HEMA以外のmethacryl-もしくはacryl-ester単量体についても、固定化効果を検討した。

## 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  $\alpha$ -amylase は Bacillus subtilis の培養によって得た酵素 (長瀬産業製液化型精製細菌) で  $10 \times 10^4$  DUN/g の活性を有する。

親水性単量体である2-ヒドロキシエチルメタクリレート (HEMAと略す) は新中村化学(株)製をそのまま実験に使用した。その他は表1に示した。

## 1. 諸 言

$\alpha$ -amylase は澱粉分解酵素で澱粉中の  $\alpha$ -1,4-グルコシド結合をランダムに加水分解し、急速にマルトース、グルコースなどのオリゴ糖を生成する。

この酵素の高分子量重合体による固定化については、ポリアクリルアミド<sup>1)</sup>、カルボキシメチルセルロースあるいはポリ-p-アミノスチレン<sup>2)</sup>などを用いる方法が報告されているが、これらは活性率が低いうえに反応中に酵素の離脱、失活などが起る欠点がある。また、方法的に操作が煩雑で工程が多い欠点も有する。

これを改良するため、著者らは2-ヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA) のような親水性単量体を用いて、低温放射重合により  $\alpha$ -amylase の固定化をおこない活性率のすぐれた、そして酵素反応中に酵素の離脱、失活の伴わない固定化方法を見出している<sup>3)</sup>。この方法は重合と同時に重合物が酵素分子を抱きこんで多孔質構造を作りながら析出してくる極めて簡便な固定方法である。HEMAを用い、酵素量を50~250  $\mu$ g、単量体量を1 mlとした場合の固定化の研究結果については前報<sup>3)</sup>でまとめた。

本報告は前報に比較して、 $\alpha$ -amylase を高濃度にした場合、すなわち酵素量が50~200  $\mu$ g、単量体量が5 mlの場合について検討した。酵素が低濃度と高濃度の場合を比較すると、その相違点として、酵素濃度が高い時には相分離現象が起ることが挙げられる。すなわち、相分離現象は酵素が高濃度の場合においてHEMA濃度がリン酸緩衝液 (pH 6.9) に対し50%以上になった時、HEMA相と酵素を含む緩衝液相とが分離することで、前報のような低濃度の場合には観察されなかった。酵素が高濃度でHEMA濃度が50%以上の場合、照射温度が0℃以上では酵素を含む緩衝液層とHEMA相とに相分離した状態で重合が進むため酵素を有効に固定化した組成物を合成することはできない。しかしながら、0℃以下では、相分離した混合液を強く振盪して懸濁分散させた後、急冷して凝固させれば酵素を重合体中に有効に包括した固定化組織物を得ることは可能である。HEMA濃度が30%以下の場合にはこのような相分離現象は起らず、そのまま重合して有効に固定化することができた。

本報では  $\alpha$ -amylase を高濃度に添加した時のHEMAの重合性をしらべ、重合条件と固定化効果の相関性について考察した。また、HEMA以外のmethacryl-もしくはacryl-ester単量体についても、固定化効果を検討した。

## 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  $\alpha$ -amylase は Bacillus subtilis の培養によって得た酵素 (長瀬産業製液化型精製細菌) で  $10 \times 10^4$  DUN/g の活性を有する。

親水性単量体である2-ヒドロキシエチルメタクリレート (HEMAと略す) は新中村化学(株)製をそのまま実験に使用した。その他は表1に示した。

表1 実験に使用した Acryl-Methacryl 単量体

No.	略記号	化学名	構造式	b.p.(°C)	製造元
1	HEMA	2-Hydroxyethylmethacrylate	$\text{CH}_2=\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{C}-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$		新中村化学
2	HEA	$\beta$ -Hydroxyethylacrylate	$\text{CH}_2=\text{CH}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	83-84/6mmHg	キシダ化学
3	A-TMPT	Trimethylolpropane-triacrylate	$(\text{CH}_2=\text{CH}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{OCH}_2)_3-\text{C}_2\text{H}_5$		新中村化学
4	TMPT	Trimethylolpropane-trimethacrylate	$(\text{CH}_2=\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{OCH}_2)_3-\text{C}_2\text{H}_5$		"
5	H2G		$\text{CH}_2=\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2-\text{OH}$		合成
6	A2G	Diethyleneglycol-diacrylate	$\text{CH}_2=\text{CH}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2-\text{O}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{CH}=\text{CH}_2$		新中村化学
7	2G	Diethyleneglycol-dimethacrylate	$\text{CH}_2=\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2-\text{O}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\overset{\text{CH}_3}{\text{C}}=\text{CH}_2$		"
8	HDMM	Hexanediolmono-methacrylate	$\text{CH}_2=\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{O}(\text{CH}_2)_6-\text{OH}$		"

基質溶液の調整は関東化学(株)製バレイショ澱粉, 1gをリン酸緩衝液(pH 6.9), 100mlと単に混ぜ合せて作り, これを酵素反応に供した。この場合, リン酸緩衝液中に溶解する澱粉は極くわずかであり, 酵素反応は未溶解部分を浮別して溶液部分を用いておこなった。上記の澱粉濃度は低濃度のため酵素反応速度が非常に遅いので, 本報のような酵素高濃度における研究に適當であることが判明した澱粉濃度は精確ではないが, およそ0.05%である。この場合, 溶解操作は室温でおこなったので, 低分子量鎖の澱粉しか溶けていないと思われる。

リン酸緩衝液はSørensen 緩衝液<sup>4)</sup>で $\text{KH}_2\text{PO}_4-\text{Na}_2\text{HPO}_4$ を適當に調合し, pH 6.9になるように調整した。

## 2.2 酵素の固定化条件

$\alpha$ -amylase, 150mgをリン酸緩衝液 3.5mlに溶解後, 20mm $\phi$ ガラスアンプルに注入し, さらにこれにHEMA 15mlを加えた。この混合液は30%HEMA濃度に相当する。その後, 空気存在下,  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -線を線量率  $1 \times 10^6 \text{ R/hr}$  で1時間,  $-24^\circ\text{C}$ で照射して重合をおこない固定化組成物を調製した。酵素反応はこの固定化組成物を何ら処理することなく, そのまま使用した。

種々の酵素濃度, HEMA濃度の調整は上記条件を随時変化させて行った。照射温度は $-196^\circ\text{C}$ (液体窒素),  $-78^\circ\text{C}$ (ドライアイス-アセトン),  $-24^\circ\text{C}$ (四塩化炭素を寒剤),  $0^\circ\text{C}$ (水),  $20^\circ\text{C}$ ,  $40^\circ\text{C}$ (恒温槽)などの温度で重合を行った。



一方、HEMA以外のmethacryl-もしくはacryl-ester単量体による固定化は上記、HEMAによる固定化条件をそのまま適用した。この場合、A-TMPT、TMPT、A2G、2G、H2GそしてHDMMは単量体自体それほど親水性をもっていないので、酵素を含むリン酸緩衝液と上記単量体とは混合せず二相に分離する。この状態で重合をおこなっても固定化されないで、適当な方法でこの相分離した液を懸濁分散させ、 $-196^{\circ}\text{C}$ で急冷凝固後、固定化条件温度である $-24^{\circ}\text{C}$ に3時間放置し、その後、照射重合をおこない固定化組成物を合成した。

HEAは親水成単量体なので、HEMAの固定化条件をそのまま適用した。

### 2.3 標準酵素反応条件

標準酵素反応は固定化酵素を50ml容量の活栓付き三角フラスコに入れ、それに基質30mlを添加、 $40^{\circ}\text{C}$ で1時間反応をおこなった。反応終了後、ジニトロサルチル酸法<sup>3)</sup>でマルトース量を比色定量しアミラーゼ活性とした。この操作を繰り返すことにより固定化酵素の活性保存率<sup>3)</sup>を求めた。

## 3. 結果および考察

### 3.1 酵素濃度の影響

酵素濃度と重合収率もしくは活性保存率の関係を図1a、図1bに示した。 $\alpha$ -amylaseとリン酸緩衝液ともよく混合するが、三者の混合液において酵素量200mg以上では酵素の一部が析出し、しかも混合液が二相に分離してくる。上層部は若干の酵素を含むHEMA rich組成で、下相部は酵素richな緩衝液相である。この原因を明らかにするため、種々検討したところ次のことがわかった。

- イ) 1Mリン酸緩衝液とHEMAを混合したところ、酵素が存在しなくても相分離した。本研究は0.02Mリン酸緩衝液を使用しているが、この濃度では相分離しない。
- ロ) リン酸緩衝液を使用せず、単に蒸留水とHEMAを混合し、それに酵素300mg添加したが相分離は認められなかった。
- ハ) イ)でリン酸緩衝液濃度が低くても酵素量が増加すれば相分離する。また、HEMA濃度が増加するとリン酸緩衝液濃度あるいは酵素量が少なくとも相分離がおきてくる(3.2項で記述)

これらの結果から、相分離の原因はリン酸緩衝液中の塩によるものでありHEMA濃度、酵素量を変化させた時にあらわれることが判明した。酵素固定化時、このリン酸緩衝液でpH調整(pH 6.9)しておかないと、酵素は水溶液中で安定性を失い非常に失活しやすくなる。ここで問題になることは、相分離状態の組成系は $0^{\circ}\text{C}$ 以上の温度で固定化すると殆んど酵素は固定化されないことであるが、この点については3.3)項で詳述する。

HEMAの重合率は図1bで明らかのように、線量が $1 \times 10^6 \text{ R}$ 、照射温度が $-24^{\circ}\text{C}$ で、酵素量に関係なく殆んど100%近くまで達する。一方、活性率は酵素量の増加に伴ない直線的に向

一方、HEMA以外のmethacryl-もしくはacryl-ester単量体による固定化は上記、HEMAによる固定化条件をそのまま適用した。この場合、A-TMPT、TMPT、A2G、2G、H2GそしてHDMMは単量体自体それほど親水性をもっていないので、酵素を含むリン酸緩衝液と上記単量体とは混合せず二相に分離する。この状態で重合をおこなっても固定化されないで、適当な方法でこの相分離した液を懸濁分散させ、 $-196^{\circ}\text{C}$ で急冷凝固後、固定化条件温度である $-24^{\circ}\text{C}$ に3時間放置し、その後、照射重合をおこない固定化組成物を合成した。

HEAは親水成単量体なので、HEMAの固定化条件をそのまま適用した。

### 2.3 標準酵素反応条件

標準酵素反応は固定化酵素を50ml容量の活栓付き三角フラスコに入れ、それに基質30mlを添加、 $40^{\circ}\text{C}$ で1時間反応をおこなった。反応終了後、ジニトロサルチル酸法<sup>3)</sup>でマルトース量を比色定量しアミラーゼ活性とした。この操作を繰り返すことにより固定化酵素の活性保存率<sup>3)</sup>を求めた。

## 3. 結果および考察

### 3.1 酵素濃度の影響

酵素濃度と重合収率もしくは活性保存率の関係を図1a、図1bに示した。 $\alpha$ -amylaseとリン酸緩衝液ともよく混合するが、三者の混合液において酵素量200mg以上では酵素の一部が析出し、しかも混合液が二相に分離してくる。上層部は若干の酵素を含むHEMA rich組成で、下相部は酵素richな緩衝液相である。この原因を明らかにするため、種々検討したところ次のことがわかった。

- イ) 1Mリン酸緩衝液とHEMAを混合したところ、酵素が存在しなくても相分離した。本研究は0.02Mリン酸緩衝液を使用しているが、この濃度では相分離しない。
- ロ) リン酸緩衝液を使用せず、単に蒸留水とHEMAを混合し、それに酵素300mg添加したが相分離は認められなかった。
- ハ) イ)でリン酸緩衝液濃度が低くても酵素量が増加すれば相分離する。また、HEMA濃度が増加するとリン酸緩衝液濃度あるいは酵素量が少なくとも相分離がおきてくる(3.2項で記述)

これらの結果から、相分離の原因はリン酸緩衝液中の塩によるものでありHEMA濃度、酵素量を変化させた時にあらわれることが判明した。酵素固定化時、このリン酸緩衝液でpH調整(pH 6.9)しておかないと、酵素は水溶液中で安定性を失い非常に失活しやすくなる。ここで問題になることは、相分離状態の組成系は $0^{\circ}\text{C}$ 以上の温度で固定化すると殆んど酵素は固定化されないことであるが、この点については3.3)項で詳述する。

HEMAの重合率は図1bで明らかのように、線量が $1 \times 10^6 \text{ R}$ 、照射温度が $-24^{\circ}\text{C}$ で、酵素量に関係なく殆んど100%近くまで達する。一方、活性率は酵素量の増加に伴ない直線的に向

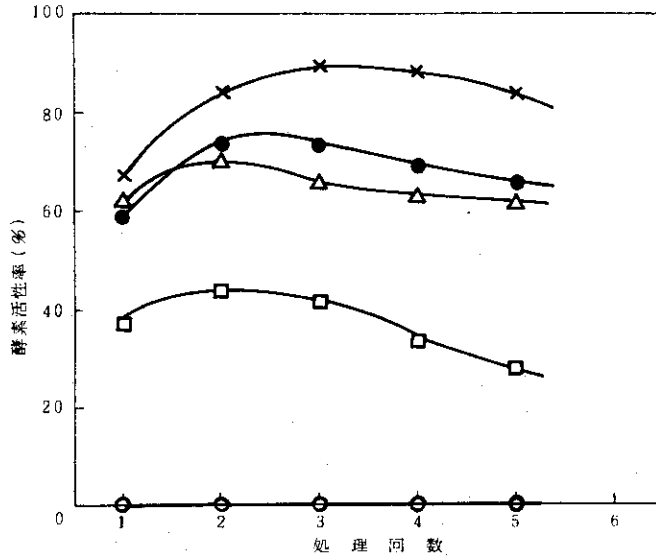


図1a 固定化における酵素濃度の影響

固定化条件；長瀬産業精製  $\alpha$ -amylase, (○)；0 mg, (□)；50 mg  
 (△)；100 mg, (×)；150 mg, そして(●)；200 mg  
 30% HEMA in buffer soln., 5 mL  
 $1 \times 10^6$  R/hr at  $-24^\circ\text{C}$   
 酵素反応条件；澱粉溶液, 30 ml  
 $40^\circ\text{C}$ , 1 hr

固定化液の状態

	酵素量	酵素 + buffer	酵素 + buffer + HEMA
1	0 mg	無色透明	均一混合無色透明
2	50	均一混合無色透明	"
3	100	"	"
4	150	"	"
5	200	"	相分離, 乳濁化, 不透明

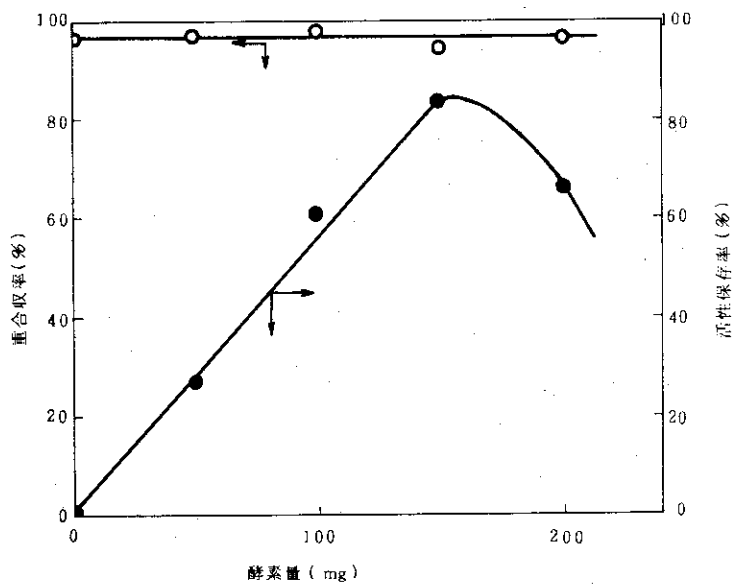


図1b 酵素濃度に対する重合収率と活性保存率

実験条件：図1aに同じ

上し、酵素量 150 mg のところで最大値を与え、その値は 85% にまで達する。酵素量が 200 mg になると、活性率は低下してくるが、これは酵素濃度が過剰になるため若干の相分離が起り、相分離した部分を分散状態で冷却固化して固定化したことによる包括の不均一性によるものと考えられる。

### 3.2 HEMA 濃度の影響

酵素を含むリン酸緩衝液は均一混合し透明溶液であるが、これに HEMA を添加すると、50% HEMA 濃度以上のところで相分離現象が認められる。100% HEMA 濃度では、酵素は HEMA に溶解せず分散した状態しかならない。相分離した混合物を固定化する場合、機械的操作により両層を懸濁分散させ、その状態で  $-196^{\circ}\text{C}$  の温度において急冷凝固して、その後、 $-78^{\circ}\text{C}$  で照射重合をおこない固定化した。図 2a、図 2b に結果を示したが、図 2b によれば重合収率は、10~70% HEMA 濃度で 70%、100% HEMA 濃度になると 20% である。

前報で行った実験結果によれば酵素が存在しなければ、HEMA の重合収率はいずれの濃度においても、80% 以上に達していなければならない。<sup>3)</sup> 酵素は HEMA の重合を抑制しており、特に HEMA 濃度が 100% の場合、その抑制作用は顕著である。しかしながら、図 1a によれば、 $-24^{\circ}\text{C}$  で照射重合をおこなった場合にはこの抑制作用は認められていない。酵素存在下において、 $-78^{\circ}\text{C}$  で重合の抑制が起る原因は酵素もしくは酵素に付着した不純物の化学的作用によるものか、あるいは酵素が存在することによって起る相状態の変化による物理的な作用（例えば HEMA の一部が結晶化すればその部分は重合しなくなる）によるものかは明らかでない。

酵素の活性保存率は図 2b から、照射温度  $-78^{\circ}\text{C}$  では 50% HEMA 濃度の時、最大になり 65% に達した。しかしながら、この値は、 $-24^{\circ}\text{C}$  における活性保存率、80% に比べると低い。これは重合収率の低さが原因しているのは明らかである。

### 3.3 照射温度の影響

図 2a の条件下において HEMA 濃度の変化につれて、固定化組成液が二相に相分離することが見いだされた。すなわち、HEMA (上相部) とリン酸緩衝液 (下相部) の二相に分離し、特に酵素は HEMA に溶解しないため殆んどがリン酸緩衝液中に溶けこんでいる。照射温度が  $0^{\circ}\text{C}$  以下においては、両層を強制混合により懸濁化させ急冷凝固後、照射温度にもどして重合をおこなえば固定化組成物が得られる。しかしながら、 $0^{\circ}\text{C}$  以上における照射では二相が分離した状態で重合が進行するため、上相部の HEMA 相しか重合せず酵素は固定化されないまま残り残されてしまう。この点を現象的に解明するため、相分離しない組成系 (30% HEMA 濃度)、相分離する組成系 (50% HEMA 濃度) について、それぞれ照射温度の影響を調べた。

図 3a、図 3b は 30% HEMA 濃度における照射温度の影響をみたものであるが、この固定化組成液は均一混合している。HEMA の重合は照射温度  $-24^{\circ}\text{C}$  で最大重合速度を与えた。HEMA 単独の場合の最大重合速度は嘉悦ら<sup>2)</sup> の報告に従えば  $-50^{\circ}\text{C}$  のところであり、本研究系のようにリン酸緩衝液の存在によってこの値は高温側にシフトする。これは水の結晶化による相状態、単量体の変化などによるものと考えられる。一方、酵素の活性保存率は図 3b から、照射温度が  $0^{\circ}\text{C}$  以上になると低下してくる。この理由は  $\alpha$ -amylase が照射に対して安定である<sup>6)</sup>

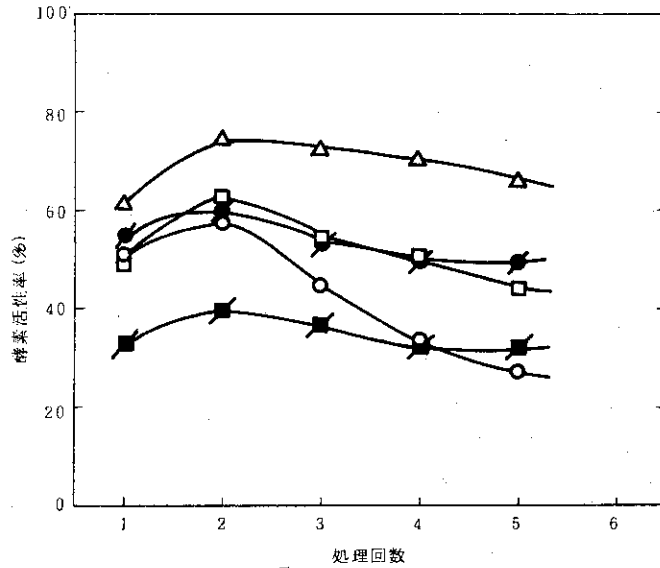


図 2 a 酵素固定化における HEMA 濃度の影響

- 固定化条件: 長瀬産業精製細菌  $\alpha$ -amylase, 150mg  
10, 30, 50, 70 そして 100% HEMA in buffer, 5ml  
 $1 \times 10^6 R/hr \times 1hr$  at  $-78^\circ C$
- 酵素反応条件: 澱粉溶液, 30ml  
 $40^\circ C, 1hr$

HEMA 濃度	記号	酵素-buffer soln-HEMA 混合液の状態
10%	○	均一混合, 透明溶液
30	□	"
50	△	相分離, 不透明 (上相: HEMA, 下相: 酵素 buffer)
70	●	"
100	■	酵素分散状態, 不透明

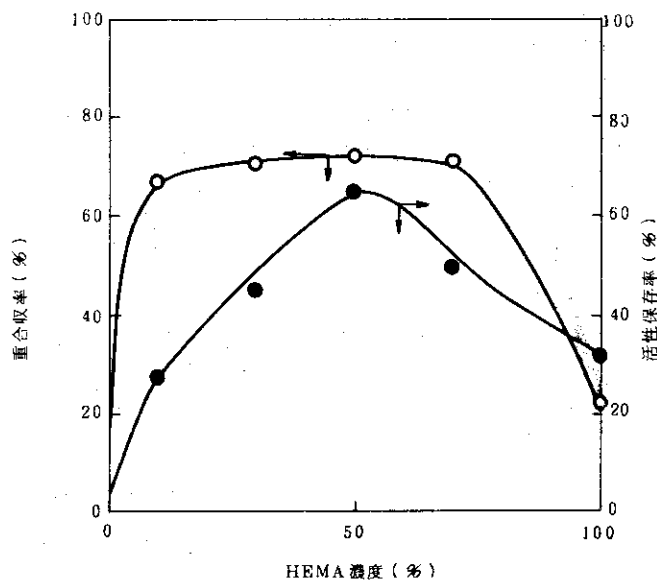


図 2 b HEMA 濃度に対する重合収率と活性保存率

実験条件: 図 2 a と同じ

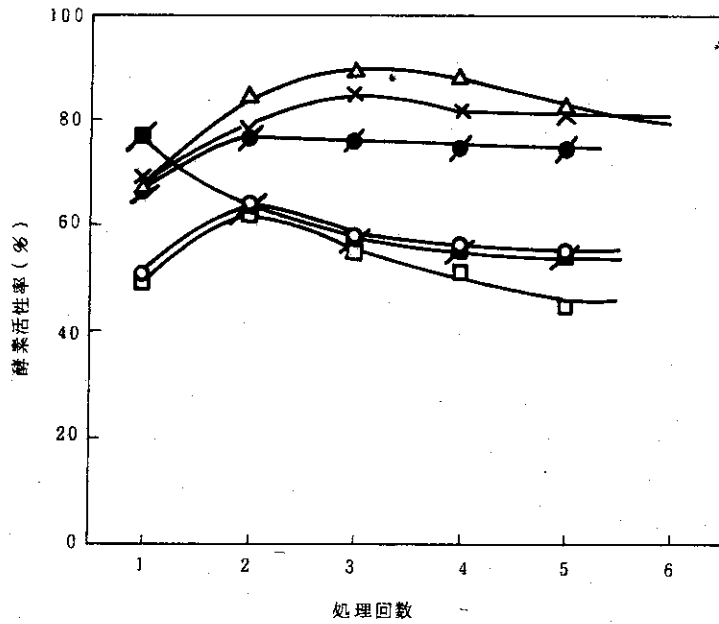


図 3 a 30%HEMA 濃度での酵素固定化, 照射温度の影響

- 固定条件: 長瀬産業精製細菌  $\alpha$ -amylase, 150mg  
30%HEMA in buffer soln, 5ml  
 $1 \times 10^6$ R/hr  $\times$  1hr at  $-196^\circ\text{C}$  (○),  $-78^\circ\text{C}$  (□),  
 $-24^\circ\text{C}$  (△),  $0^\circ\text{C}$  (×), rt (●)そして  $40^\circ\text{C}$  (■)
- 酵素反応条件: 澱粉溶液, 30ml  
 $40^\circ\text{C}$ , 1hr
- 酵素 - buffer soln - HEMA 混合液の状態  
混合液は均一透明で相分離しない。

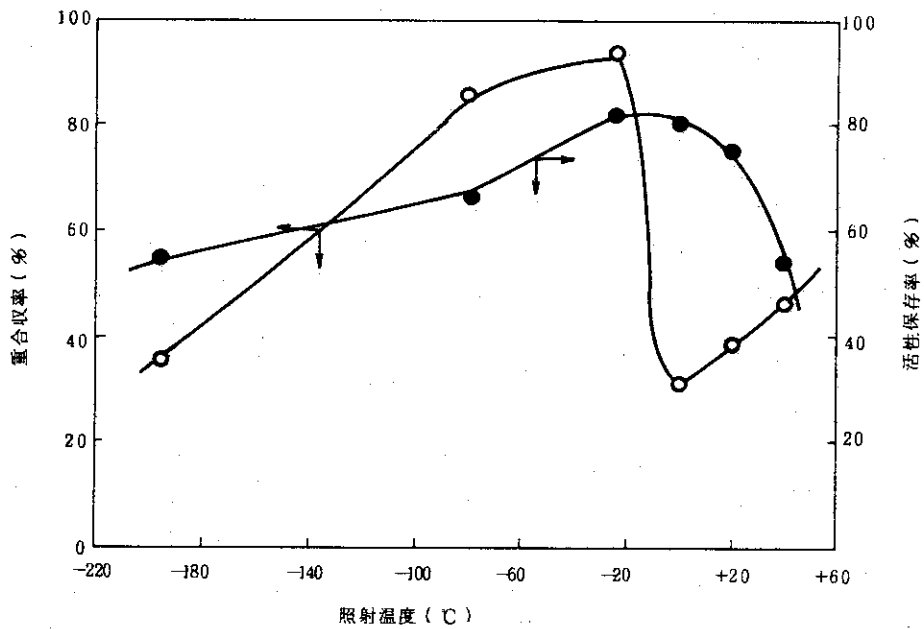


図 3 b 30%HEMA 濃度での酵素固定化, 照射温度に対する重合収率と活性保存率

実験条件 : 図 3 a に同じ

ことを考えると0℃以下で水が結晶化して相変化が起り酵素が包括されやすい形になって重合が起るためと考えられる。最大活性保存率は83%であり、重合速度の最も大きいところ(照射温度-24℃)で得られた。

50%HEMA濃度における相分離組成系の結果は図4a, 図4bに示した。HEMAの重合挙動は30%HEMA濃度(図3b)の場合と同一傾向を示した。酵素を含まないHEMA-リン酸緩衝液系においても、同様な重合挙動<sup>3)</sup>が観察されている。このように、0℃以上の領域と0℃以下の領域とに分かれているが、これは0℃を境にして水の結晶化による相状態の変化が起り、均一水溶液系に近い重合から、水の結晶と相分離したHEMA richに近い重合へと重合系の状態が変わるためと考えられる。50%HEMA濃度の場合、酵素の活性保存率は図4bから、照射温度が0℃以上になると急激に減少し20%以下になる。これは50%HEMA濃度の場合、重合前の混合液は相分離しており、0℃以上では相分離状態のまま重合が進行するので結果として得られる重合物の中には酵素が殆んど含有されていないことが原因である。酵素の殆んどは下相のリン酸緩衝液層に溶けているが、この下相部分は全く重合しない。それ故、高濃度酵素の固定には相分離している混合液を強振盪により懸濁化させた状態で凝固させ、その状態を保持する0℃以下の低温領域において照射をおこなう必要がある。

### 3.4 照射線量の影響

図5a, 図5bは30%HEMA濃度、-24℃の照射温度で照射線量率 $1 \times 10^6$  R/hrにおける照射線量の影響をみたものである。HEMAの重合収率は照射時間の増加に伴ない増加し、 $1 \times 10^6$  R以上で飽和に達した。一方、活性保存率は重合が飽和に達した時点で最大値を与え、照射線量が $5 \times 10^6$  R以上になると低下してくる。酵素自体は耐放射線性があることから<sup>6)</sup>この低下は重合が $1 \times 10^6$  R照射した時点ですでに飽和に達しているにもかかわらず過剰の照射をおこなったため、ポリマーが分解し、その分解生成物などによって酵素失活が誘発されていることが考えられる。

### 3.5 種々のmethacryl-あるいはacryl-esterによる固定化

HEMA以外のmethacryl-あるいはacryl-esterを使用して、HEMAによる固定化と同様の条件で固定化効果を検討した結果を図6, 表2に示す。

重合収率はいずれの単量体もHEMAの94.5%より低く、H2G 73.4%, HEA 66.1% その他の場合は50%以下であり、また活性保存率はいずれの場合も低かった。しかしながら、図6で明らかなように、例えばA2Gの場合は、1回処理後の酵素活性率が95%もあり、重合条件を探索すれば活性保存率のすぐれた組成物が得られる可能性がある。

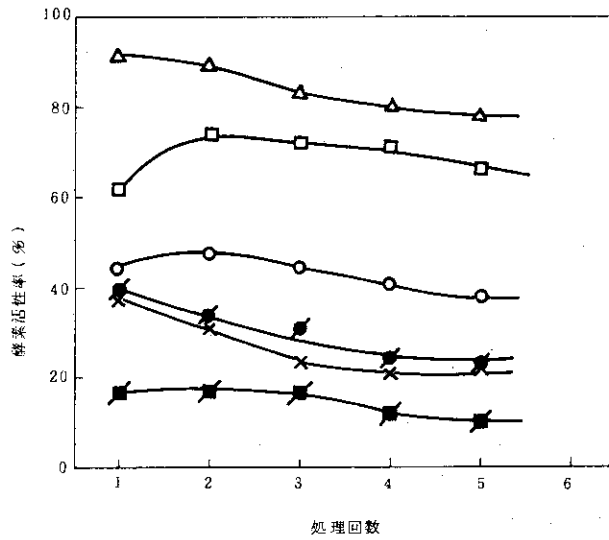


図 4 a 50% HEMA 濃度での酵素固定化, 照射温度の影響

- 固定化条件: 長瀬産業精製細菌  $\alpha$ -amylase, 150mg  
50% HEMA in buffer soln, 5ml  
 $1 \times 10^6$ R/hr  $\times$  1hr at  $-196^\circ\text{C}$  (○),  $-78^\circ\text{C}$  (□),  
 $-24^\circ\text{C}$  (△),  $0^\circ\text{C}$  (×), rt (●), そして  $40^\circ\text{C}$  (■)
- 酵素反応条件: 澱粉溶液, 30ml
- 酵素 - buffer soln - HEMA 混合液の状態

酵素と buffer soln は均一混合するが, HEMA を添加すると, 左図の様に混合液は相分離した。



- 1)  $-196^\circ\text{C}$ ,  $-78^\circ\text{C}$ ,  $-24^\circ\text{C}$  の場合  
A, B 両相を混合した後, 各温度で凝固させ, 照射重合をおこなった。得られたポリマーは相分離していない。
- 2)  $0^\circ\text{C}$ , rt,  $40^\circ\text{C}$  の場合  
これらの温度では, 混合液の凝固はできないので, 相分離した状態で照射重合した。その結果, A 相 (半透状ポリマー) 重合, B 相 (乳濁液) は全く重合しなかった。

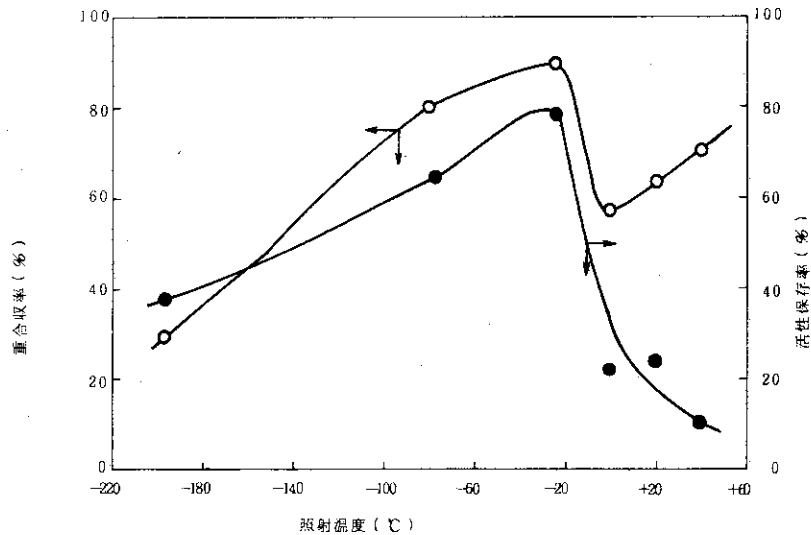


図 4 b 50% HEMA 濃度での酵素固定化, 照射温度に対する重合収率と活性保存率

実験条件 : 図 4 a に同じ



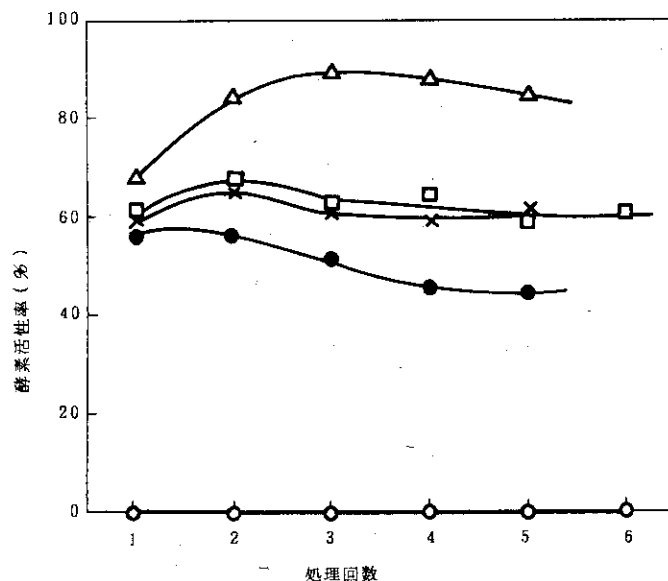


図5 a HEMAによる酵素固定化, 照射時間の影響

固定条件: 長瀬産業精製細菌  $\alpha$ -amylase, 150 mg  
 30% HEMA, in buffer soln, 5ml  
 照射温度  $-24^{\circ}\text{C}$   
 $1 \times 10^5 \text{ R/hr} \times 1 \text{ hr}$  (○), 5hrs (□), 10 hrs (△)  
 40 hrs (×) そして 80hrs (●)  
 酵素反応条件: 澱粉溶液, 30ml  
 $40^{\circ}\text{C}$ , 1 hr

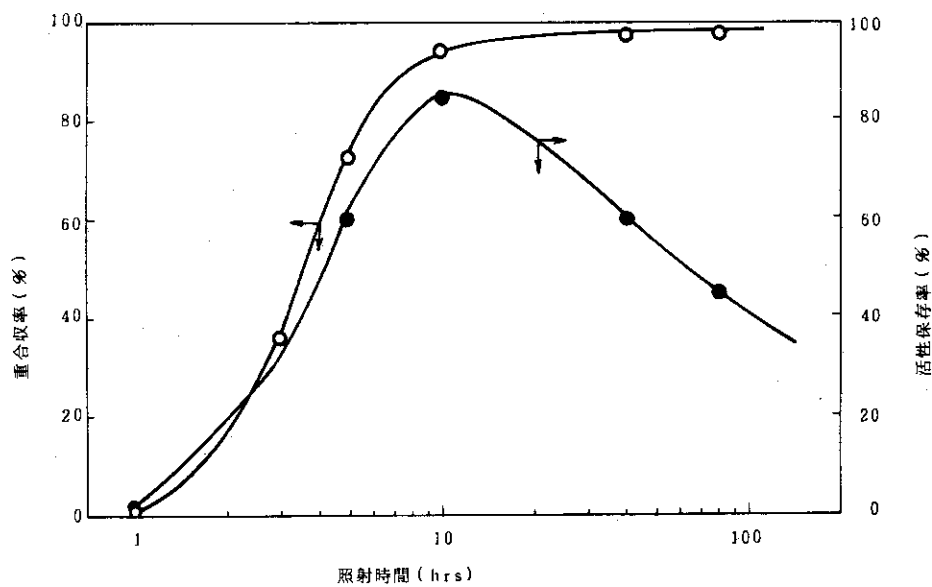


図5 b 照射線量に対する重合収率と活性保存率

実験条件: 図5 a に同じ

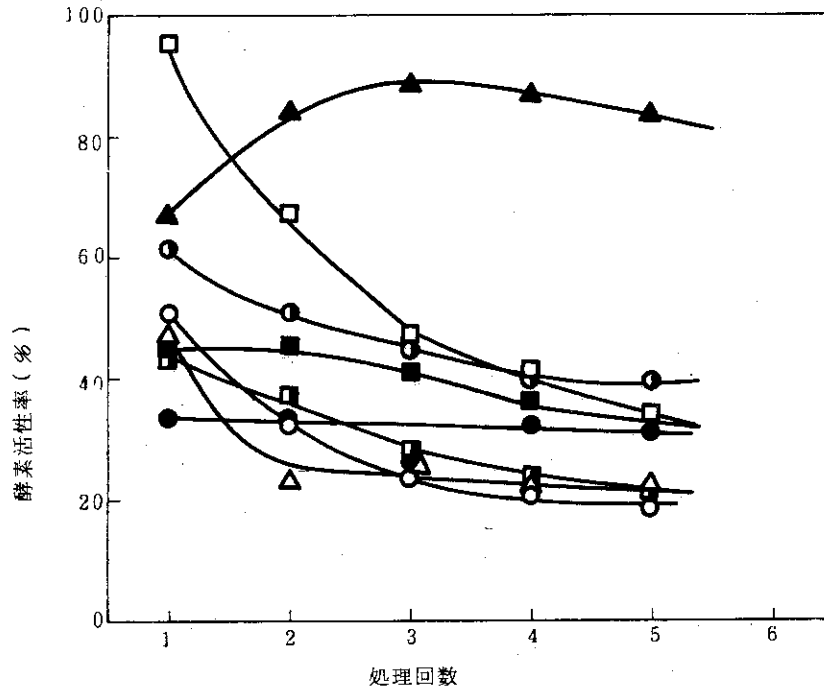


図6 種々のmethacry-及びacryl-ester単量体による酵素固定化

固定化条件：長瀬産業精製 $\alpha$ -amylase, 150mg  
 30%単量体濃度, in buffer soln, 5ml  
 $1 \times 10^6$  R/hr  $\times$  1 hr at  $-24^\circ\text{C}$

酵素反応条件：澱粉溶液, 30ml  
 $40^\circ\text{C}$ , 1 hr

単量体： A-TMPT(○), TMPT(●)  
 A2G(□), 2G(■)  
 HEA(△), HEMA(▲)  
 H2G(○)  
 HDMM(■)

表2 種々のメタアクリルエステル及びアクリルエステル単量体による酵素固定化

固定化条件；長瀬産業精製  $\alpha$ -amylase, 150 mg  
 300%単量体濃度, in buffer soln., 5mℓ  
 $1 \times 10^6$  R/hr  $\times$  1hr at  $-24^\circ\text{C}$   
 酵素反応条件；澱粉溶液, 30 mℓ  
 $40^\circ\text{C}$ , 1hr

No	メタアクリル及びアクリル単量体		単量体添加後の固定化液の状態 <sup>1)</sup>	重合収率(%)	活性保存率(%) <sup>2)</sup>
	略記号	構造式			
1	A-TMPT	$(\text{CH}_2=\text{CH}-\overset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{O}-\text{CH}_2)_3-\text{C}_2\text{H}_5$	相分離, <sup>3)</sup> 単量体下相	18.6	18.7
2	TMPT	$(\text{CH}_2=\overset{\text{CH}_3}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\overset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{O}-\text{CH}_2)_3-\text{C}_2\text{H}_5$	相分離, <sup>3)</sup> 単量体上相	21.3	32.2
3	A 2G	$\text{CH}_2=\text{CH}-\overset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{O}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2-\text{O}-\overset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{CH}=\text{CH}_2$	相分離, <sup>3)</sup> 単量体上相	36.4	33.9
4	2G	$\text{CH}_2=\overset{\text{CH}_3}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\overset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{O}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2-\text{O}-\overset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\overset{\text{CH}_3}{\underset{\parallel}{\text{C}}}=\text{CH}_2$	上 同 じ	33.2	33.9
5	HEA	$\text{CH}_2=\text{CH}-\overset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	均一混合, 透明	66.1	23.8
6	HEMA	$\text{CH}_2=\overset{\text{CH}_3}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\overset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	上 同 じ	94.5	83.4
7	H 2G	$\text{CH}_2=\overset{\text{CH}_3}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\overset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{O}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2-\text{OH}$	相分離, <sup>3)</sup> 単量体下相	73.4	39.0
8	HDMM	$\text{CH}_2=\overset{\text{CH}_3}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\overset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{O}-(\text{CH}_2)_6-\text{OH}$	相分離, <sup>3)</sup> 単量体上相	46.0	22.0

- 1) 酵素はあらかじめ buffer soln. に溶かしておき, その混合液に単量体を添加した。
- 2) 5回処理後(40℃, 1hrの酵素反応を5回おこなった)の値。
- 3) 相分離した系を重合させる場合, まず相分離した混合液を超音波装置を用いて懸濁化した。それを急冷固化( $-196^\circ\text{C}$ )させ, その後 $-24^\circ\text{C}$ に保持し照射重合をおこなった。

## 4. まとめ

HEMA単量体を使用して、低温放射線重合による $\alpha$ -amylaseの固定化の研究で、本報では酵素量50~200mgの高濃度領域(単量体水溶液量5ml)における重合条件と固定化効果の関係について検討し、次のようなことを明らかにした。

- (1) 高濃度の酵素を含むリン酸緩衝液にHEMAを添加したところ、HEMA濃度が50%以上になると酵素を含むリン酸緩衝液相(上相)に相分離した。この原因は緩衝液中のリン酸塩による。
- (2) 50%HEMA濃度以上で酵素を固定化する場合、混合液を振盪して懸濁化し、これを急冷凝固させたまま、照射重合させることにより固定化されることが判明した。
- (3) HEMAの重合性は0℃を境にして変化し、0℃以下で重合速度が増加する。これは水が結晶化するための相状態の変化によるものと考えられる。
- (4) 照射温度が0℃以上では固定化効果は著しく低下するが、これは50%HEMA濃度以上になると特に顕著である。これは0℃以上では、相分離した重合前の懸濁状態を保つことができないためであり、照射温度を0℃以下に保つことが有効な固定化のために必要である。
- (5) -78℃におけるHEMAの重合は酵素の存在によって抑圧されることが判明した。この抑制作用はHEMA濃度が100%の時、最も顕著にあらわれる。
- (6) 酵素の高濃度領域において固定化を行った場合、最高の活性保存率は85%にまで達することが判明した。しかしながら、酵素量が150mg以上になると活性保存率はそれ以上増加せず、逆に低下してくることが認められた。

## 文 献

- 1) J. Wan : Science 142 678 (1963)
- 2) T. Fukushi, T. Isemura : J. Biochem. 64(3) 283 (1968)
- 3) 吉田 勝・熊倉 稔・嘉悦 勲 : JAER-M 6189 低温放射線重合による $\alpha$ -amylase 固定の研究・II (低濃度 $\alpha$ -amylaseの2-ヒドロキシエチルメタクリレートによる固定)
- 4) 実験化学講座 24 「生物化学II」 p206 : 日本化学会編 (1959)
- 5) I. Kaetsu, H. Okubo, A. Ito and K. Hayashi : J. Polymer Sci. A1(10) 2203 (1972)
- 6) 吉田 勝・熊倉 稔・嘉悦 勲 : JAERI-M 6183 低温放射線重合による $\alpha$ -amylase 固定の研究・I ( $\alpha$ -amylaseに対する放射線の照射効果)