

JAERI-M

6 1 9 1

低温放射線重合による $\alpha$ -amylase 固定の研究・IV

(種々の吸着剤と2-ヒドロキシエチルメタクリレート  
混合系での $\alpha$ -amylaseの固定)

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・Ⅳ  
(種々の吸着剤と 2-ヒドロキシエチルメタクリレート  
混合系での  $\alpha$ -amylase の固定)

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)

種々の吸着剤存在下で, HEMA の低温放射線重合により  $\alpha$ -amylase の固定化をおこない次のようなことを明らかにした。HEMA のみによる固定化組成物は, 反復して酵素反応を行なうと, 回数の少い段階で酵素の離脱によると思われる活性率の低下が認められたが, 吸着剤-HEMA 混合系の固定化物では酵素の離脱が全くないことが判明した。吸着剤としては, 硫酸カルシウムを主成分とするドライライト, 酢酸カルシウム, 酢酸ナトリウム, 炭酸カルシウムなどの無機塩の無水物が特に効果的であった。そして,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Na}^{+}$  などの無機イオンの存在によって固定化組成物の耐熱性は著るしく向上した。

酵素量 200  $\mu\text{g}$ , 30% HEMA in buffer soln, 1ml そしてドライライト吸着剤 0.3 g 存在下において, 照射線量  $1 \times 10^6$  R, 照射温度  $-24^\circ\text{C}$  で固定化する時, 最もすぐれた固定化組成物が得られ, その活性保存率は 93% に達した。

Study on the Immobilization of  $\alpha$ -amylase by Radiation-Induced Polymerization at Low-Temperature ( IV )  
Immobilization of  $\alpha$ -amylase by the Polymerization with 2-hydroxyethylmethacrylate in the Presence of an Adsorbent

Masaru YOSHIDA, Minoru KUMAKURA and Isao KAETSU

Pilot Scale Research Station, Takasaki, JAERI

( Received 3 July, 1975 )

The immobilization of  $\alpha$ -amylase by radiation-induced polymerization at low-temperature in the presence of an adsorbent has been studied. In the previous method, part of the enzyme escapes from the immobilized composition of HEMA polymer with a few enzyme reactions. This is prevented, however, by the present method in which the adsorbent-HEMA- $\alpha$ -amylase mixtures is immobilized by the polymerization with HEMA. Anhydride of an inorganic salt such as calcium carbonate, sodium acetate, calcium acetate, or DRIERETE (composed mainly of calcium sulfate ) is especially useful as the adsorbent. Use of an inorganic ion such as  $\text{Ca}^{++}$  or  $\text{Na}^+$  improves remarkably heat-stability of the immobilized composition.

The most effective composition for immobilization is 200  $\mu\text{g}$  of  $\alpha$ -amylase, 1 ml of 30% HEMA solution ( in 0.02M phosphate buffer solution, pH 6.9 ) and 0.3g of DRIERETE. frozen and irradiated with  $\gamma$ -rays of Co-60 to a total dose  $1 \times 10^6$  R at  $-24^\circ\text{C}$ , the immobilized enzyme has the activity about 93% that of 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 酵素の固定化条件 .....	1
2.3 標準酵素反応条件 .....	2
3. 結果および考察 .....	3
3.1 種々の吸着剤による固定化 .....	3
3.2 吸着剤とHEMA共存下での固定化 .....	4
3.3 吸着剤添加濃度の影響 .....	4
3.4 ドライライト吸着剤存在下でのHEMAによる固定化 .....	8
3.4.1 照射温度の影響 .....	9
3.4.2 酵素濃度の影響 .....	9
3.4.3 線量の影響 .....	9
3.4.4 pH安定性と耐熱性 .....	9
4. まとめ .....	13

## 1. 諸言

澱粉からマルトース、グルコースなどを製造するプロセスにおいて、酵素の節約とプロセスの連続化を目的として固定化酵素を利用することが種々検討されている。

著者らは一連の研究において、澱粉を分解してマルトース、グルコース、及び限界デキストリンを生成する酵素である。 $\alpha$ -amylase について、放射線がそれに与える特異な効果<sup>1)</sup>を明らかにするとともに、HEMA<sup>2, 3)</sup>を用いて低温放射線重合法により $\alpha$ -amylase の固定化を研究してきた。この方法によって得られた固定化組成物の活性保存率は最高80~85%であり固定化が非常に優れていることが判明した。しかしながら、反復して酵素反応を行わせる場合反応回数の少い段階で、活性率が低下する現象があり、また固定化条件によっては低い活性率しか得られない場合もあって、いずれも酵素の一部が離脱するものと考えられる。

このような、酵素の離脱をなくするため、種々検討を行ったところ酵素を含むリン酸緩衝液を、あらかじめ、シリカゲル、無水硫酸カルシウムなどの吸着剤に吸着させた後、上記固定化単量体によって重合包括すると、活性保存率のすぐれた、そして酵素離脱を伴ない固定化組成物を得ることができる。本報ではこれらの結果について報告する。

## 2. 実験材料および実験方法

### 2.1 実験材料

実験に使用した液化型 $\alpha$ -amylaseはBacillus subtilisから得たもので不純物含有の少ない精製細菌(長瀬産業製)で $10 \times 10^4$  DUN/gの活性を有する。

実験に使用した吸着剤の性質を表1に示した。一方、低温重合性単量体は2-ヒドロキシエチルメタクリレートを、基質には2%可溶性澱粉溶液(pH 6.9)を使用した。実験はすべて前報<sup>2)</sup>と同一条件でおこなった。

緩衝液の調製<sup>4)</sup>はpH 2.5~5.0までMcIlvaine緩衝液、pH 6.0~8.0までSorensen緩衝液、pH 9.0~11.0までMenzel緩衝液を使用した。

得られた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後、乾燥し重量法により求めた。

### 2.2 酵素の固定化条件

HEMA単独による $\alpha$ -amylaseの低温放射線重合による固定化は前報<sup>2)</sup>と同一条件でおこなった。

表1に示したような種々の吸着剤存在下でHEMAによる酵素固定化組成物の調製は次のようにして行なった。例えば、シリカゲルを吸着剤とする場合、まず酵素溶液(pH 6.9)、200  $\mu$ g/0.5 mlを調製し、これを10 mm  $\phi$  ガラスアンプル中に注入する。これに粉末状シリカゲル0.3 gを添加し酵素を含む緩衝液をシリカゲルに吸着させ、さらにHEMA 0.5 mlを加えた。これ

## 1. 諸言

澱粉からマルトース、グルコースなどを製造するプロセスにおいて、酵素の節約とプロセスの連続化を目的として固定化酵素を利用することが種々検討されている。

著者らは一連の研究において、澱粉を分解してマルトース、グルコース、及び限界デキストリンを生成する酵素である。 $\alpha$ -amylase について、放射線がそれに与える特異な効果<sup>1)</sup>を明らかにするとともに、HEMA<sup>2, 3)</sup>を用いて低温放射線重合法により $\alpha$ -amylase の固定化を研究してきた。この方法によって得られた固定化組成物の活性保存率は最高80~85%であり固定化が非常に優れていることが判明した。しかしながら、反復して酵素反応を行わせる場合反応回数の少い段階で、活性率が低下する現象があり、また固定化条件によっては低い活性率しか得られない場合もあって、いずれも酵素の一部が離脱するものと考えられる。

このような、酵素の離脱をなくするため、種々検討を行ったところ酵素を含むリン酸緩衝液を、あらかじめ、シリカゲル、無水硫酸カルシウムなどの吸着剤に吸着させた後、上記固定化単量体によって重合包括すると、活性保存率のすぐれた、そして酵素離脱を伴ない固定化組成物を得ることができる。本報ではこれらの結果について報告する。

## 2. 実験材料および実験方法

### 2.1 実験材料

実験に使用した液化型 $\alpha$ -amylaseはBacillus subtilisから得たもので不純物含有の少ない精製細菌(長瀬産業製)で $10 \times 10^4$  DUN/gの活性を有する。

実験に使用した吸着剤の性質を表1に示した。一方、低温重合性単量体は2-ヒドロキシエチルメタクリレートを、基質には2%可溶性澱粉溶液(pH 6.9)を使用した。実験はすべて前報<sup>2)</sup>と同一条件でおこなった。

緩衝液の調製<sup>4)</sup>はpH 2.5~5.0までMcIlvaine緩衝液、pH 6.0~8.0までSorensen緩衝液、pH 9.0~11.0までMenzel緩衝液を使用した。

得られた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後、乾燥し重量法により求めた。

### 2.2 酵素の固定化条件

HEMA単独による $\alpha$ -amylaseの低温放射線重合による固定化は前報<sup>2)</sup>と同一条件でおこなった。

表1に示したような種々の吸着剤存在下でHEMAによる酵素固定化組成物の調製は次のようにして行なった。例えば、シリカゲルを吸着剤とする場合、まず酵素溶液(pH 6.9)、200  $\mu$ g/0.5 mlを調製し、これを10 mm  $\phi$ ガラスアンプル中に注入する。これに粉末状シリカゲル0.3 gを添加し酵素を含む緩衝液をシリカゲルに吸着させ、さらにHEMA 0.5 mlを加えた。これ

表1 実験に使用した吸着剤

No.	吸着剤	形状	製造元
1.	シリカゲル	60-80 mesh 粉末	キシダ化学
2.	モレキュラーシーブス4A	Type 1/16	西尾工業
3.	活性炭	粉末状	関東化学
4.	カオリン	白陶土, 粉末状	純製薬品工業
5.	塩化カルシウム	粒状	キシダ化学
6.	ドライライト	CaSO <sub>4</sub> (無水), 粉末状	W.A. HAMOND DRIERITE Co.
7.	炭酸カルシウム	沈降性,	和光純薬工業
8.	硫酸マグネシウム	無水物, 粉末状	関東化学
9.	硫酸ナトリウム	無水物, 粉末状	キシダ化学
10.	酢酸ナトリウム	無水物, 粉末状	関東化学
11.	酢酸カルシウム	無水物, 粉末状	和光純薬工業
12.	繊維素グルコール酸ナトリウム (CMC)	Sodium carboxymethyl cellulose	関東化学
13.	ガラスビーズ	粒状	
14.	ゼラチン	粒状, Gelatin	キシダ化学
15.	寒天末	Agar	キシダ化学

ゼラチン, 寒天末以外は使用前に130℃, 24hrs乾燥をおこなった。

は50% HEMA 濃度の固定化組成液に相当する。その後, 線量率  $1 \times 10^6$  R/hr で1時間, -24℃ 空気雰囲気下で照射し固定化組成物を調製した。

吸着剤の種類, 吸着剤濃度を変える場合, 酵素量, HEMA 濃度あるいは照射条件を変える場合は上記操作条件をそのつど変えて行った。

### 2.3 標準酵素反応条件

標準酵素反応は基質に2%可溶性澱粉溶液, 6mlを使用し40℃で1時間行なった<sup>1), 2)</sup>。澱粉は $\alpha$ -amylase によって加水分解され, マルトース, グルコース, 限界デキストリンを生成するが, 著者らはマルトース量を測定しそれをアミラーゼ活性とした。

固定化の尺度として表わされる「酵素活性率」は

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

で表され, 各々標準酵素反応をおこないアミラーゼ活性を求めたものである。一方, 「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。

吸着剤を含む HEMA 担体による固定化組成物で特徴的なことは重合終了と同時に多孔質ゲル構造をもった水不溶性組成物が得られるので, 後処理することなく酵素反応に供することができる点である。



### 3. 結果および考察

#### 3.1 種々の吸着剤による固定化

HEMA の低温放射線重合によって包括固定化された  $\alpha$ -amylase は活性保存率が 80 ~ 85% とすぐれた固定化率を示すが、ある反応条件（例えば HEMA 濃度の高い場合）では低い活性率しか得られなかったり、また一般に反復酵素反応に使用する場合、反応回数の少い段階では、回数とともに活性率がもとの酵素より低下する。このことは、HEMA 単独による包括固定化法では、包括されていない酵素の部分が存在することを示唆している。

この酵素の離脱を抑制し、反応回数の少い高活性率のうちに活性率を一定に保たせることを目標として種々の検討をおこなったところ、HEMA に架橋構造を有する単量体を添加する方法<sup>5)</sup> および吸着剤に酵素を吸着させ、それを HEMA で包括する方法が効果的であることが判明した。

吸着剤を使用した理由は、酵素水溶液を吸着剤に吸着させた場合、その状態で長時間放置（40℃~50℃）しておいても酵素活性が全く変化せず一定に保たれ、また、耐熱性、耐久性が著るしく向上するという大きな利点が判明したからである。すなわち、図 1 に吸着剤としてドライライト（硫酸カルシウム主成分）を使用した時の経時変化の影響を示したが、酵素活性はドライライトが存在した場合、殆んど活性低下が観察されなかった。同様な現象は酢酸カルシウ

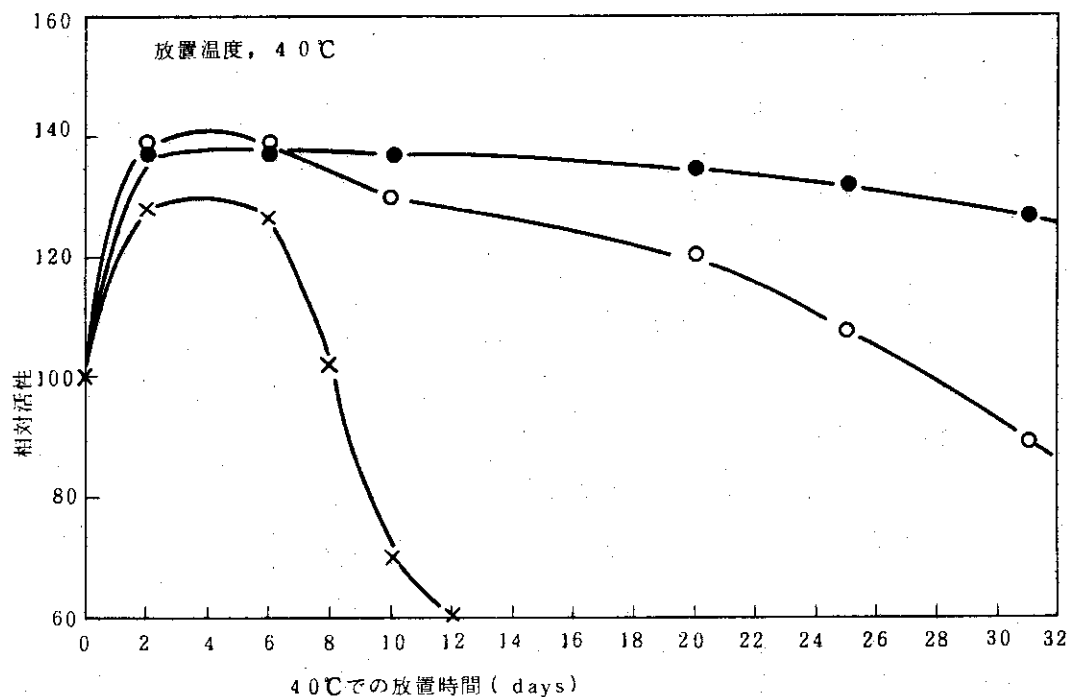


図 1 ドライライト存在下における  $\alpha$ -amylase の経時的安定性

長瀬産業精製  $\alpha$ -amylase, 200  $\mu$ g/ml, buffer soln.

ドライライト, 100mg/ml, buffer soln.

×: ドライライト未添加, 未照射

○: ドライライト未添加,  $1 \times 10^6$  R/hr  $\times$  1 hr at -78°C

●: ドライライト添加,  $1 \times 10^6$  R/hr  $\times$  1 hr at -78°C

酵素反応, 2%可溶性澱粉溶液

40°C, 1 hr

ム、酢酸ナトリウム、硫酸ナトリウム、炭酸カルシウムなどの無機塩の無水物化合物に特に顕著に認められた。これは、Fukushiら<sup>6)</sup>が報告しているように、無機塩の無機イオン、 $\text{Ca}^{++}$ 、 $\text{Na}^{+}$ などが酵素保護作用に働くことも原因している。

図2 a, 図2 b は種々の吸着剤に単に物理的吸着させた状態での酵素活性率を示したものである。酵素活性率は処理回数の増加に伴ない、いずれの吸着剤においても低下する。しかしながら、硫酸カルシウムを主成分とするドライライトは、図2 b で明らかなように処理回数による低下速度は著しく遅い傾向を示した。この原因は不明であるが、ドライライトは他の吸着剤に比べ $\alpha$ -amylase に対する吸着作用が特にすぐれていると考えられる。一方、塩化カルシウム、繊維素グルコール酸ナトリウム (CMC) は、一回処理時の酵素活性率が他の吸着剤と比較してかなり低い値を示すことがわかった (図2 a)。これは、上記吸着剤によって酵素活性が抑制されていることを示唆する。その他の吸着剤ではこのような現象があらわれなかった。

### 3.2 吸着剤とHEMA共存下での固定化

種々の吸着剤に酵素を吸着後、それをHEMA で固定化することを試み、その結果を図3 a, 図3 b に示した。HEMA 単独固定化の場合の酵素活性率は処理回数が少ないうちは処理回数の増加に伴ない除々に低下するが、吸着剤共存下では固定化組成物からの酵素の離脱は殆ど観察されない。

表2にHEMA 単独、吸着剤単独および両者共存下における活性保存率を示した。酵素の活性保存率は、HEMA単独の場合44.1%、吸着剤単独の場合もドライライトを除けば殆んどが10%前後でしかない。しかしながら、これらを両者の共存下で固定化すると、相乗的な固定化効果が認められ、シリカゲル (72.1%)、炭酸カルシウム (86.4%)、酢酸カルシウム (81.4%)、ゼラチン (79.7%) および繊維素グルコール酸ナトリウム (84.7%) などが特にその効果が顕著であった。一方、ドライライト存在下においては、90%の固定化率が得られた。このことは、ドライライト吸着剤とHEMA 間で、固定化に適した状態が形成されていることを示唆するものであるが、それが物理的作用によるものか、化学的作用によるものか、あるいは両方が組み合ったものであるのか現在のところ必ずしも明らかでない。

吸着剤として塩化カルシウムを使用した場合、活性保存率は20%と非常に低い値を示すが、これは図2 a で明らかなように、酵素が塩化カルシウムによって失活することが主原因と考えられる。

### 3.3 吸着剤添加濃度の影響

図4は吸着剤の最適濃度を調べるために行った実験結果である。吸着剤-HEMA による相乗効果が認められたドライライト、酢酸カルシウム、ゼラチン、シリカゲルなどについて検討したところ、ドライライトとシリカゲルは0.3~0.5 gの領域に最適濃度が認められた。しかしながら、酢酸カルシウムとゼラチンは吸着剤を0.5 g 添加しても、活性保存率がまだ若干向上する傾向を示した。この場合、吸着剤を0.5 g 以上添加すると、固定化組成液が1 mlなので吸着剤との混合状態が不完全となり、そのため実験の再現性が悪くなった。

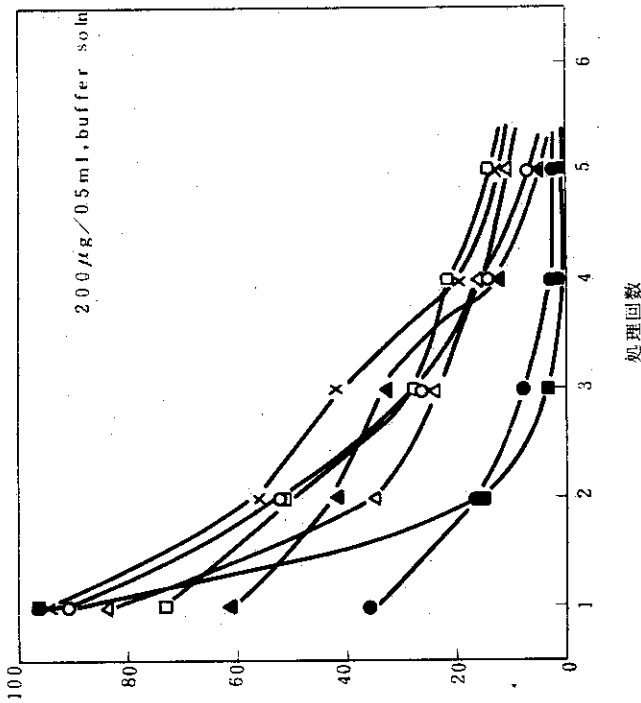


図 2 a 種々の吸着剤による酵素固定化

固定化条件：長瀬産業精製  $\alpha$ -amylase, 200 $\mu$ g  
吸着剤 0.3 g

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, 1hr

- 吸着剤
- ：シリカゲル
  - ：モレキュラーシーブス4A
  - △：活性炭
  - ×：カオリン
  - ：塩化カルシウム
  - ：ガラスビーズ
  - ▲：繊維素ゲリコールナトリウム(OMC)

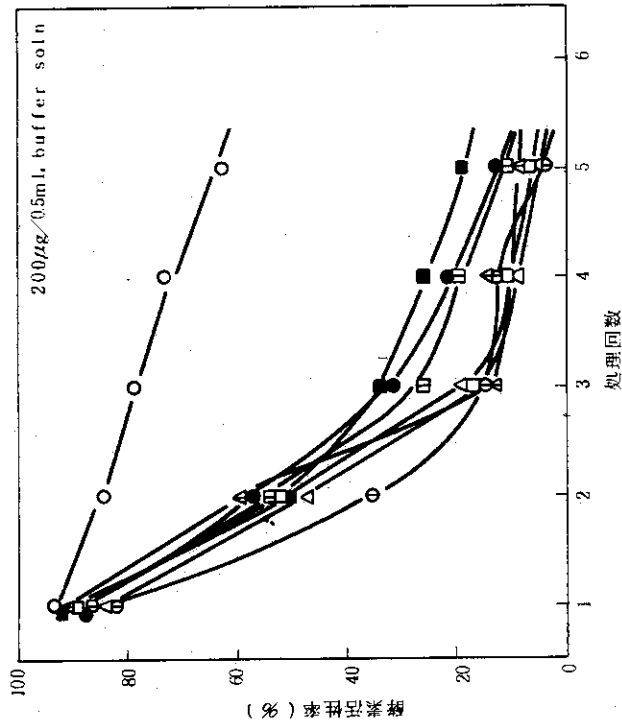


図 2 b 種々の吸着剤による酵素固定化

固定化条件：長瀬産業精製  $\alpha$ -amylase, 200 $\mu$ g  
吸着剤 0.3 g

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, 1hr

- 吸着剤
- ：ドライライト (CaSO<sub>4</sub>)
  - ：炭酸カルシウム
  - △：硫酸マグネシウム
  - ：硫酸ナトリウム
  - ：酢酸ナトリウム
  - ▲：ゼラチン
  - ：寒天

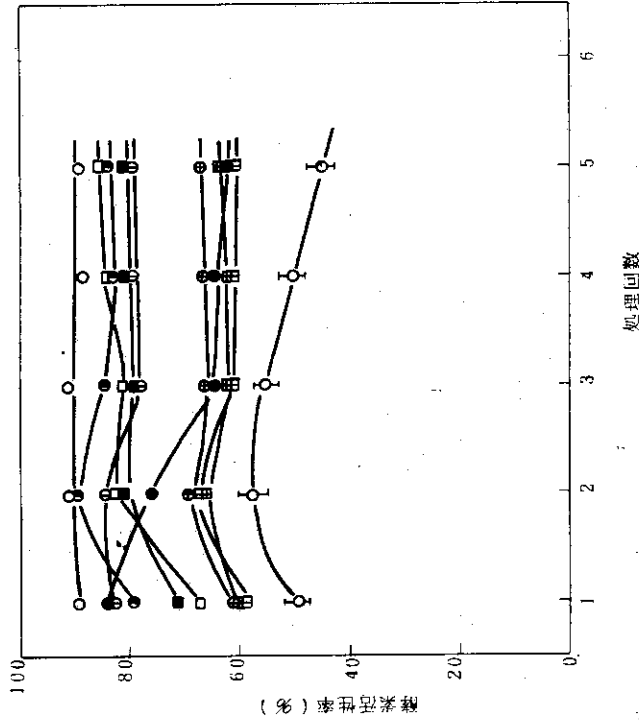


図 3 a 種々の吸着剤存在下での HEMA による酵素固定化

固定化条件：長瀬産業精製  $\alpha$ -amylase, 200 $\mu$ g  
5.0% HEMA in buffer soln, 1ml  
吸着剤：添加量 0.3 g

- ：シリカゲル
- △：活性炭
- ：塩化カルシウム
- ◇：モレキュラーシーブス 4A
- ×：カリオン (白陶土)
- ：ガラスビーズ
- ：未添加

$1 \times 10^6$  R/hr  $\times$  1hr at  $-24^\circ\text{C}$

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

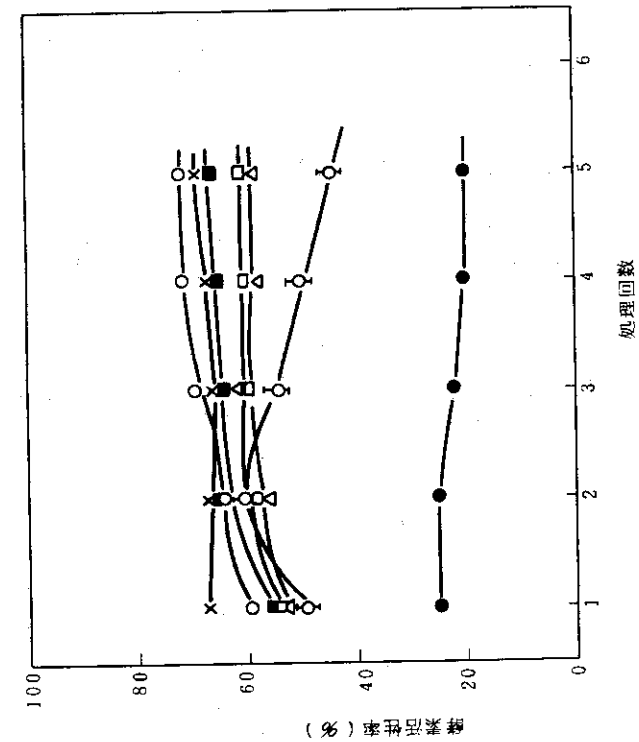


図 3 b 種々の吸着剤存在下での HEMA による酵素固定化

固定化条件：長瀬産業精製  $\alpha$ -amylase, 200 $\mu$ g  
5.0% HEMA in buffer soln, 1ml  
吸着剤：添加量 0.3 g

- ：ドライイト ( $\text{CaSO}_4$ )
- ：硫酸マグネシウム
- ：酢酸ナトリウム
- ：セラチン
- ：繊維素グルココロル酸ナトリウム (CMC)
- ◇：炭酸カルシウム
- 田：硫酸ナトリウム
- ：酢酸カルシウム
- 田：寒天末
- ：未添加

$1 \times 10^6$  R/hr  $\times$  1hr at  $-24^\circ\text{C}$

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

表2 吸着剤存在下でのHEMAによる酵素固定化

固定化条件： 長瀬産業精製 $\alpha$ -amylase, 200 $\mu$ g

## (1) 吸着剤単独固定化

酵素200 $\mu$ g/buffer soln, 1mlを調製し, 乾燥(120 $^{\circ}$ C, 24hrs)した吸着剤, 0.3gに吸着させた。

## (2) 吸着剤-HEMA共存下での固定化

酵素200 $\mu$ g, 吸着剤0.3gそして50%HEMA in buffer solnを混合, その後 $1 \times 10^6$ R/hr $\times$ 1hr at -24 $^{\circ}$ C照射。酵素反応条件： 2%可溶性澱粉溶液(溶解100 $^{\circ}$ C, 10分), 6ml 40 $^{\circ}$ C, 1hr

活性保存率は酵素反応(5回処理)後の値。

No. / 固定化	吸着剤	吸着剤-HEMA共存		吸着剤単独
		重合収率(%)	活性保存率(%)	活性保存率(%)
1	シリカゲル	89.9	72.1	7.0
2	モレキュラーシーブス4A	94.0	62.4	14.0
3	活性炭	93.4	59.8	10.5
4	カオリン(白陶土)	89.9	69.5	12.2
5	塩化カルシウム	72.5	20.3	3.5
6	ガラスビーズ	94.4	67.8	1.7
7	ドライライト(CaSO <sub>4</sub> )	98.4	89.8	62.1
8	炭酸カルシウム	94.1	86.4	7.0
9	硫酸マグネシウム	88.2	67.8	7.0
10	硫酸ナトリウム	78.9	64.4	5.2
11	酢酸ナトリウム	75.9	62.7	10.5
12	酢酸カルシウム	87.3	81.4	5.2
13	ゼラチン	91.3	79.7	10.5
14	寒天末	97.3	61.0	19.3
15	繊維素グルコール酸ナトリウム(CMC)	96.6	84.7	5.2
16	未添加	94.5	44.1	—

これらの吸着剤の中で最も効果的なのは硫酸カルシウムを主成分とするドライライトであり、0.3 g 添加した時最大固定化率を与え、90%の値を示した。

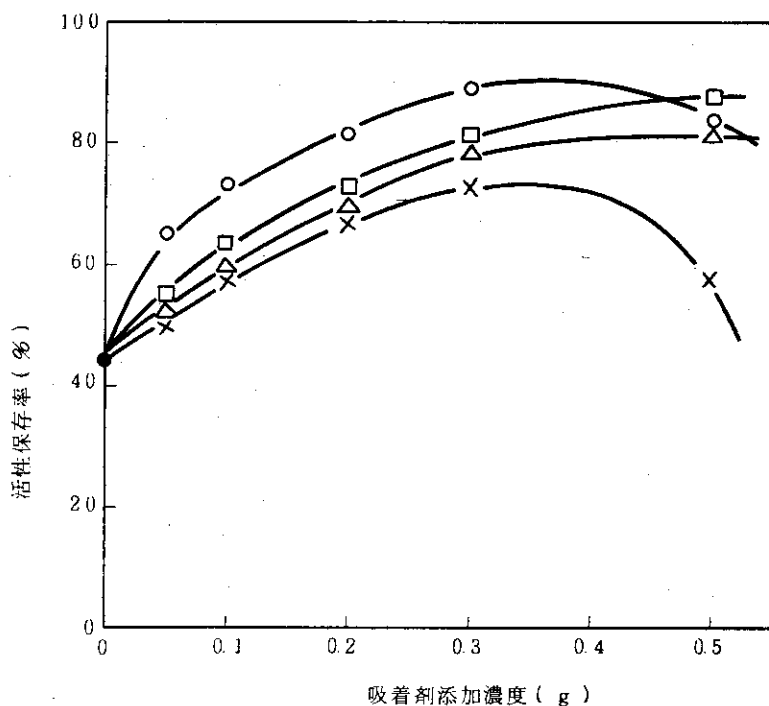


図4 HEMAによる酵素固定化における吸着剤濃度の影響

固定化条件：長瀬産業精製 $\alpha$ -amylase, 200 $\mu$ g  
 50%HEMA, in buffer soln, 1ml  
 $1 \times 10^6$  R/hr  $\times$  1hr at  $-24^\circ\text{C}$

吸着剤 ○：ドライライト □：酢酸カルシウム  
 △：ゼラチン ×：シリカゲル

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

### 3.4 ドライライト吸着剤存在下でのHEMAによる固定化

ドライライト吸着剤が存在した場合、処理回数とともに酵素の離脱もしくは失活が殆どなくなり、さらに活性保存率が一種の相乗作用によって著るしく向上することが明らかになった。そこで、ドライライト吸着剤存在下での固定化効果におよぼす種々の要因について検討をおこなった。

### 3.4.1 照射温度の影響

HEMA 単独系で酵素を固定化した場合<sup>2)</sup>, HEMA 濃度に対する活性保存率 (すなわち固定化率) は HEMA 濃度が 50% 以下の場合, 70~80% の得が得られる。しかしながら, 50% HEMA 濃度以上になると活性保存率は急激に低下し 50% 以下の値しか示さない。

そこで, ドライライト吸着剤添加効果は固定化率の高い 30% HEMA 濃度と, 活性低下の激しい 50% HEMA 濃度とについておこない, その結果を図 5a, 図 5b に示した。

50% HEMA 濃度 (図 5a) の場合, 照射温度  $-196^{\circ}\text{C} \sim -24^{\circ}\text{C}$  において顕著な活性保存率の向上が認められ,  $-24^{\circ}\text{C}$  の時, 最大値 90% に達した。しかしながら, 照射温度が  $0^{\circ}\text{C}$  以上になると, 活性保存率は急激に低下するがドライライトが存在すると, その低下傾向は緩和される。

同様な傾向は 30% HEMA 濃度 (図 5b) においても観察されるが, この場合, 活性保存率は  $-24^{\circ}\text{C}$  の時に最大値を示し, その値は 93% に達した。一方,  $0^{\circ}\text{C}$  における活性保存率の急激な低下は HEMA の重合性に起因していると思われる<sup>2)</sup>。すなわち, およそ  $0^{\circ}\text{C}$  を境として系は  $0^{\circ}\text{C}$  以下の水の結晶化によって起る固-液共存相における重合と,  $0^{\circ}\text{C}$  以上における完全な液相重合とに分かれる。液相重合においては, 酵素は HEMA の単量体分子と均一に混合接触しているので失活しやすいものと考えられる。また,  $0^{\circ}\text{C}$  以上では酵素自体の照射による失活も顕著に誘発されることも認められている。 $0^{\circ}\text{C}$  以下においては不均一な固-液共存相の構造が酵素を包括するのに最も適した状態を形成していることが考えられる。

### 3.4.2 酵素濃度の影響

酵素濃度の影響は図 6 に示したが, ドライライトの存在によって活性率が HEMA 単独の場合に比べ 5~10% 増加し, 250 $\mu\text{g}$  酵素量の時, その値は 97% に達した。この場合の固定化組成物の酵素活性率は, 標準酵素反応 10 回処理後で 96.9%, 30 回処理後で 96.9% そして 50 回処理後であっても 96.4% の活性率を示し, ドライライトの存在により酵素の包括が極めて完全かつ効果的であることが判明した。

### 3.4.3 照射線量の影響

図 7 で明らかなように, ドライライトが存在した場合, 照射線量が  $1 \times 10^6 \text{ R}$  以上においても HEMA 単独系に認められたような活性保存率の低下はなく 90~95% で一定値を示した。これはドライライトの保護作用によると考えられる。

### 3.4.4 pH 安定性と耐熱性

吸着剤存在下において固定化した組成物の pH 安定性を固定化しない酵素および吸着剤なしに固定化したものとの比較において, その結果を図 8 に示したが, ドライライトの存在によって酸性側あるいはアルカリ性側で若干安定となり活性領域の拡大が認められた。その pH 安定領域は pH 5.0~8.0 である。

一方, 固定化組成物の耐熱性について, 図 9 に示したがこの結果よりドライライト存在下で固定化した組成物の耐熱性は吸着剤なしに固定化したものに比べ若干改良されることが判明した。

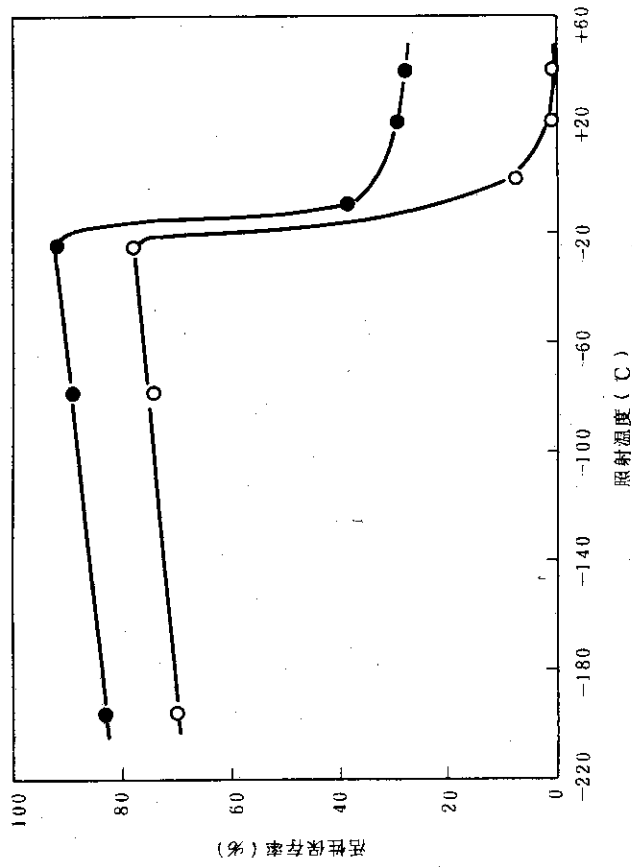


図5b 3.0%HEMA濃度下での照射温度と活性保存率の関係

固定化条件：長瀬産業精製 $\alpha$ -amylase, 200 $\mu$ g  
 3.0%HEMA, in buffer soln, 1ml  
 ドライライイト, 0.3g  
 $1 \times 10^6$  R/hr  $\times$  1hr at various temperature

○ : ドライライイト吸着剤未添加  
 ● : ドライライイト吸着剤添加

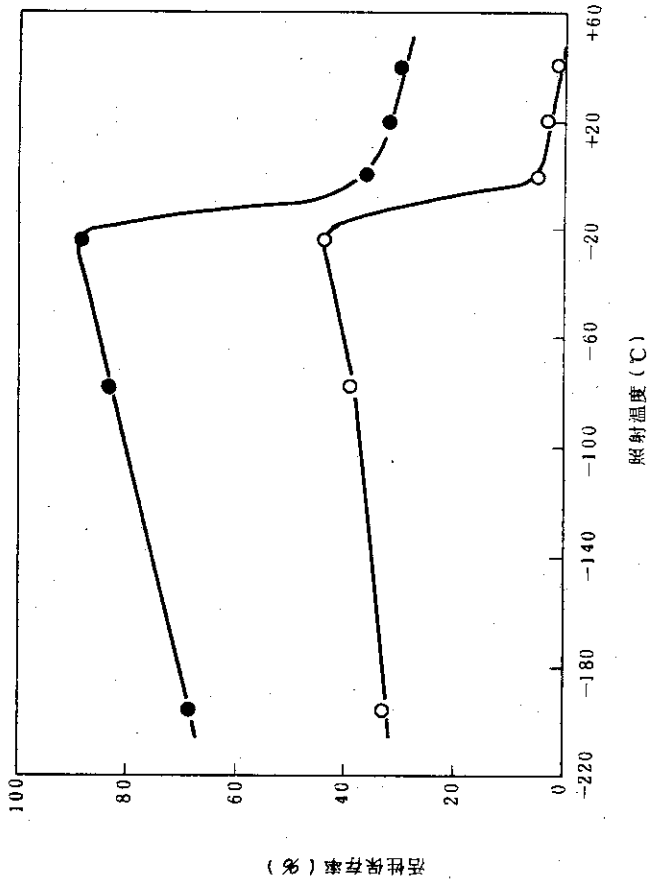


図5a 5.0%HEMA濃度下での照射温度と活性保存率の関係

固定化条件：長瀬産業精製 $\alpha$ -amylase, 200 $\mu$ g  
 5.0%HEMA, in buffer soln, 1ml  
 ドライライイト, 0.3g  
 $1 \times 10^6$  R/hr  $\times$  1hr at various temperature

○ : ドライライイト吸着剤未添加  
 ● : ドライライイト吸着剤添加



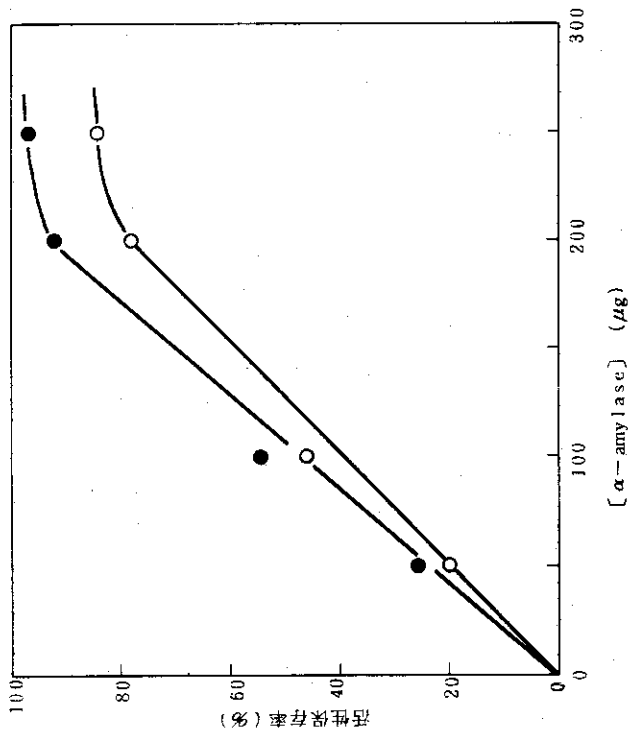


図6 酵素濃度の影響

固定化条件: 長瀬産業精製 α-amylase  
 30% HEMA in buffer soln, 1ml  
 ドライライイト: 0.3 g  
 $1 \times 10^6$  R/hr  $\times$  1hr at  $-24^\circ\text{C}$

○: HEMA 固定化物  
 ●: ドライライイト存在下 HEMA 固定化物

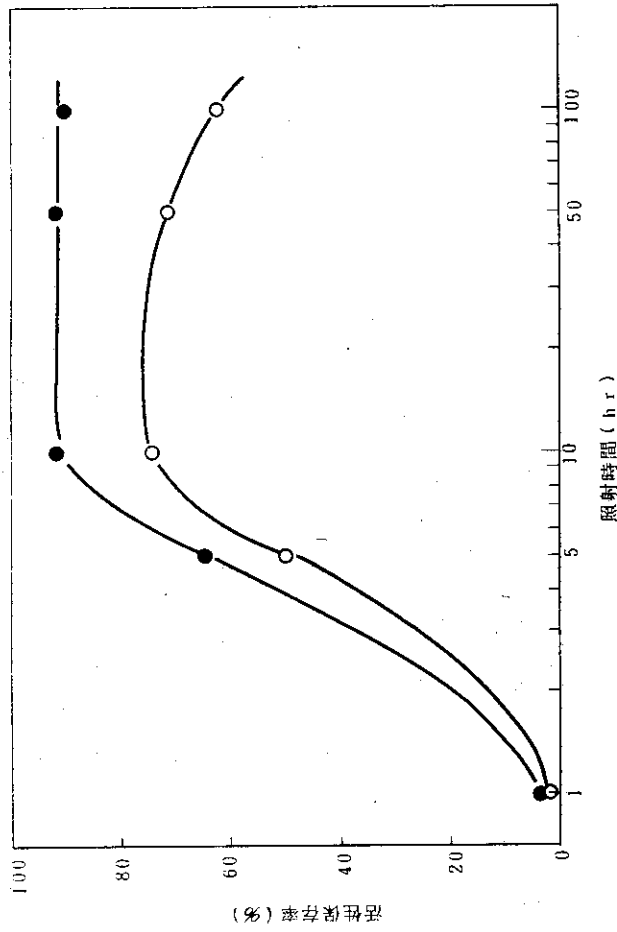


図7 照射線量の影響

固定化条件: 長瀬産業精製 α-amylase, 2.00 μg  
 30% HEMA in buffer soln, 1ml  
 ドライライイト: 0.3 g  
 $1 \times 10^6$  R/hr,  $-24^\circ\text{C}$

○: HEMA 固定化物  
 ●: ドライライイト存在下 HEMA 固定化物

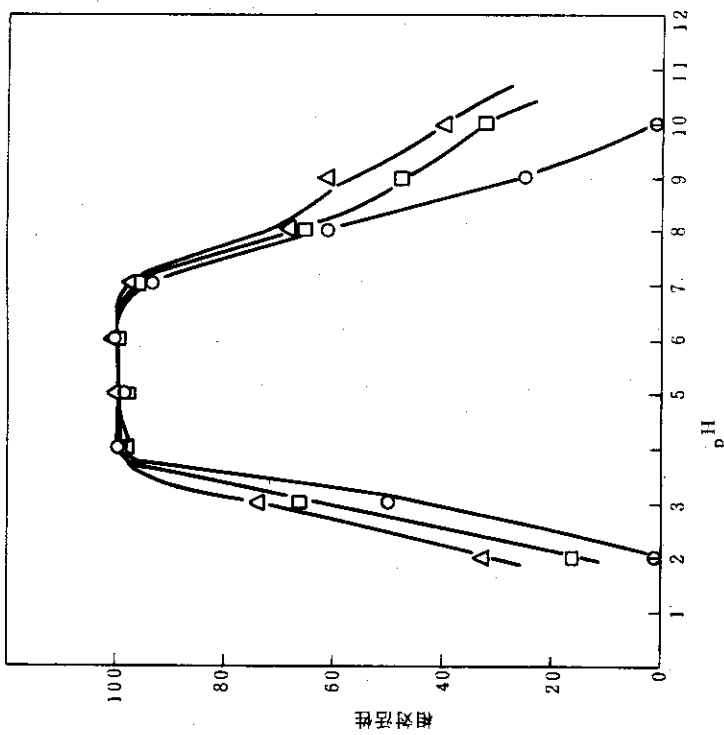


図8 酵素のpH安定性

長瀬産業精製 $\alpha$ -amylase, 200 $\mu$ gに各種緩衝液1mlを添加, 40 $^{\circ}$ Cで1hrs処理した後, pH6.9に補正し全量を5mlとした。それ比2%可溶性澱粉溶液(100 $^{\circ}$ C, 10分溶解), 10mlを添加, 酵素反応40 $^{\circ}$ C, 1hrおこなった。pH3~4には, McIlvaine緩衝液, pH5~8にはSörensen緩衝液, pH9~11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 $\mu$ g, 30%HEMA in buffer soln, 1ml  $1 \times 10^6$  R/hr  $\times$  1 hr at -24 $^{\circ}$ C
- △: 固定化 酵素200 $\mu$ g, 吸着剤としてFライライト 0.3g 30%HEMA in buffer soln, 1ml  $1 \times 10^6$  R/hr  $\times$  1 hr at -24 $^{\circ}$ C

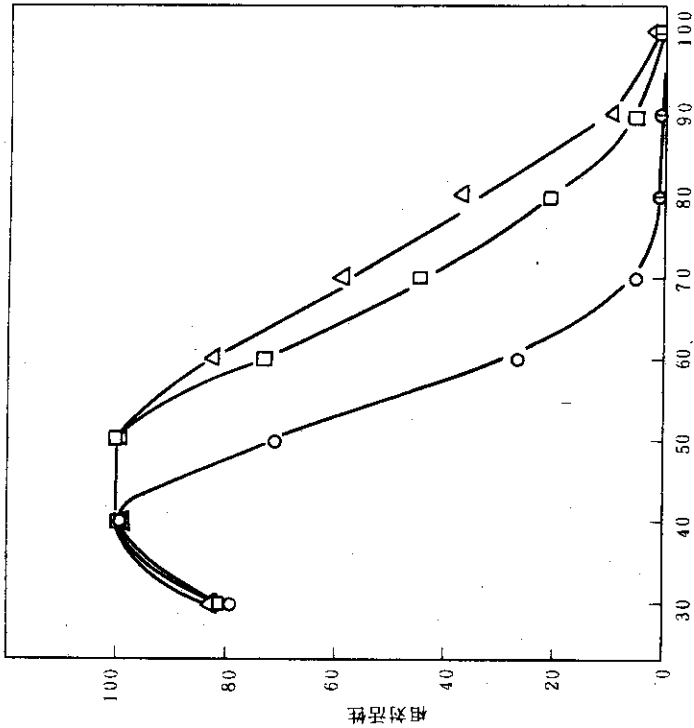


図9 酵素の耐熱性

長瀬産業精製 $\alpha$ -amylase, 200 $\mu$ 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 $^{\circ}$ C, 10分溶解)10mlを基質にして酵素反応40 $^{\circ}$ C, 1hrおこなった。

- : 酵素単独
- : 固定化, 酵素200 $\mu$ g, 30%HEMA in buffer soln, 1ml  $1 \times 10^6$  R/hr  $\times$  1 hr at -24 $^{\circ}$ C
- △: 固定化, 酵素200 $\mu$ g, 吸着剤としてFライライト 0.3g, 30% HEMA in buffer soln 1ml  $1 \times 10^6$  R/hr  $\times$  1 hr at -24 $^{\circ}$ C

## 4. まとめ

種々の吸着剤存在下において、HEMAの低温放射線重合による $\alpha$ -amylaseの固定化を検討し次のようなことを明らかにした。

- (1) 吸着剤存在下で固定化した組成物は、酵素反応の初期段階で認められたような酵素の離脱が全くなくなり、長時間の連続反応に耐え得ることが判明した。また、従来活性率の低かったHEMA高濃度の場合にも高い活性率で固定化できることが判った。
- (2) 吸着剤としては、硫酸カルシウムを主成分とするドライライト、酢酸カルシウム、酢酸ナトリウム、炭酸カルシウムなどの無機塩の無水物化合物が特に効果的であり、また $\text{Ca}^{++}$ 、 $\text{Na}^{+}$ などの無機イオンによって耐熱性、耐久性も向上した。
- (3) 酵素量200 $\mu\text{g}$ 、30%HEMA in buffer soln, 1mlそしてドライライト0.3g存在下における固定化組成系の最適条件は照射線量 $1 \times 10^6$  R, 照射温度 $-24^\circ\text{C}$ で、得られた固定化組成物の活性保存率は93%、HEMAの重合収率98.9%であった。
- (4) 吸着剤の共存によって、pH安定性、耐熱性は共にnative酵素およびHEMA単独固定化組成物より改良されていることが判明した。

- 1) 吉田 勝, 熊倉 稔, 嘉悦 勲 : JAERI-M6183  
低温放射線重合による $\alpha$ -amylase固定の研究・I  
( $\alpha$ -amylaseに対する放射線効果)
- 2) 吉田 勝, 熊倉 稔, 嘉悦 勲 : JAERI-M6189  
低温放射線重合による $\alpha$ -amylase固定の研究・II  
(低濃度 $\alpha$ -amylaseのHEMAによる固定)
- 3) 吉田 勝, 熊倉 稔, 嘉悦 勲 : JAERI-M6190  
低温放射線重合による $\alpha$ -amylase固定の研究・III  
(高濃度 $\alpha$ -amylaseのHEMAによる固定化)
- 4) 実験化学講座24「生物化学II」p206 日本化学会編(1959)
- 5) 吉田 勝, 熊倉 稔, 嘉悦 勲 : 未発表データ
- 6) T. Fukushi, T. Isemura : J. Biochem, 64 (3) 283 (1968)