

高圧条件下で調製した固定化酵素の活性評価（その1）

— α -アミラーゼ活性 —

蒲生啓司・川田奈津子
(教育学部化学教室)

Evaluation of Activity of Enzyme Immobilized under High Pressure Conditions

— Activity of immobilized α -amylase —

Keiji GAMOH and Natsuko KAWADA
Laboratory of Chemistry, Faculty of Education

Abstract: Activity of the immobilized α -amylase prepared under high pressure conditions has been evaluated. α -Amylase was immobilized to silica gel and aminopropylsilica gel at 5000 kg/cm² for 20 hours. The evaluation of the amylase activity was performed by the iodometric method using soluble starch as the substrate. Some of the conditional factors for the iodometric method were examined to obtain the optimum absorbance by ourselves so that the linear response range in the low concentration of starch was observed at 0.1 ~ 1.0 mg/ml. The activity of the immobilized silica-amylase was relatively low and 100 mg of it corresponded to 0.5 μ g of native amylase. On the other hand, the activity of the immobilized aminopropylsilica-amylase was relatively high and 100 mg of it corresponded to 100 μ g of native amylase. These results preliminarily showed the high pressure method has the possibility for the preparation method of immobilized enzymes.

キーワード：固定化酵素，高圧条件， α -アミラーゼ，シリカゲル，アミノプロピルシリカ，酵素活性，ヨード-デンプン反応

緒 言

酵素は、ある特定の基質にのみ触媒作用を示す反応特異性を持っており、温和な条件下で反応し得ることから、物質変換機能として利用する合成化学の分野において、或いは特定分子の認識機能を利用する分析化学の分野において広く利用されてきた。酵素を用いる反応では、一般に試料に酵素を添加し、反応後基質又は生成物を精製又は定量するために、酵素溶液として大量に使い、また再利用できないという欠点があった。そうした中で、酵素をある種の担体（支持体又は基材）に固定化する技術が開発され、今日では固定化酵素として既に上市されるに至っている¹⁾。

酵素を固定化することは、繰り返し利用が可能となり、場合によっては酵素自身の安定性が増大するために、それが寿命の長い酵素として得られる可能性を有している。更に、固定化酵素を膜や充填基材として用いることにより、流れの中で物質変換や分析を可能にし得ることも特長の一つである。固定化酵素に関する研究分野は、固定化に用いる酵素の選択、基材の選択、及び固定化の方法に分けられる。固定化の方法については、既に多くの著書の中で述べられているように、大きく物理的固定化法と化学的固定化法とに分類される²⁾が、いずれも一律な方法はなく、基本的には酵素活性の高い反応を種々選択しているのが現状である。

ところで今日、圧力による化学反応促進効果が注目されており、特に(超)高圧条件下に於ては、これまでの手法では困難とされてきた極めてユニークな有機化学反応を実現してきた³⁾。端的に言えば、高圧をかけることによって、反応速度が大幅に増すことを利用している。化学結合の生成であれ、物理的吸着であれ、遷移状態での体積が反応試剤のそれよりも小さくなれば、活性化体積は負の値をとることになり、圧力をかければかけるほど反応速度が増すことになる。

著者等はこれまで、高圧条件下において調製した化学修飾充填剤の分離化学的研究の一環として、シリカ基材をタンパクで修飾した充填剤を調製し、その光学認識能について液体クロマトグラフに評価検討をしてきた。その結果、4000 kg/cm²程度の圧力下で調製したアミノプロピルシリカーBSA(牛血清アルブミン)は、これまで知られてきたエナンチオ選択性についてはそれを有することが確認され、光学分割用充填剤として十分機能し得ることを明らかにしてきた⁴⁾。即ち、高圧条件下での基材への物理吸着によって、変性をまぬがれないであろうタンパクが、依然として光学認識部位を保持していたことは、高圧下におけるタンパクの構造化学的な見地からも、非常に興味のある結果が得られたものと考えられる。高圧反応を用いる特長は、そのユニークな反応性につきるが、この種の光学活性充填剤のほとんどが、架橋剤をはじめとする種々の薬品を使う方法であることを考えれば、実験操作が極めて簡単であり、クリーンな方法であると考えられる。

本研究は、こうした高圧条件下における酵素の固定化について検討した結果についての内容である。酵素と基材との物理的吸着に伴う反応系に対して、高圧条件の適用が有利に働くであろうという知見をもとに、吸着量や吸着力が増加することは十分期待できると考えられる。場合によっては、基材の官能基と酵素分子との共有結合(例えば酸アミド結合等)が生成し得ることも考えられる。この際、高圧反応によってもたらされる正の効果として、酵素活性の増幅、或いは新たな酵素活性の出現等が考えられる。

ここでは、高圧条件下における酵素固定化の初めての試みとして、酵素に α -アミラーゼを選び、基材としてシリカ及びアミノプロピルシリカを選ぶことによって、固定化アミラーゼの調製、及びその評価検討を行なった。 α -アミラーゼについては述べるまでもなく、デンプン分子中の α -1,4結合を解裂して α 型グルコースやオリゴ糖を生成する酵素であり、グリコアミラーゼと共にアルコール発酵やデンプン糖化工業において今なお重要な役割を果たしている。通常のアミラーゼでは生デンプン(天然のデンプン粒)を直接糖化することが困難なため、今日では「生デンプン分解アミラーゼ」が利用されており⁵⁾、その性質や構造、及び活性発現に関する研究は、糖質工学として位置付けられ、活発な研究が行われている⁶⁾。本研究では、枯草菌由来の市販 α -アミラーゼ、及び可溶性デンプンを用いた。

なお α -アミラーゼ活性の測定には、ヨードデンプン反応を用いた。

実験方法

1. 測定機器及び薬品

吸光度の測定には、紫外可視分光光度計 (島津製作所製 UV-160) を用い、高圧反応は、高圧反応装置 (光高圧社製) を用いて、テフロン製の反応容器に灯油を圧力媒体として行った。シリカゲルは、Kieselgel 70~230 mesh (メルク製) 及び球状シリカ (粒子径 $5 \mu\text{m}$; 細孔 120 \AA , 信和化工製) を用い、アミノプロピルシリカは、同じく球状 (粒子径 $5 \mu\text{m}$, 信和化工製) を用いた。 α -アミラーゼは、枯草菌製 (和光純薬製) を用い、デンプンは可溶性デンプン (和光純薬製) を用いた。その他の試薬は、市販特級品を用いた。

2. 固定化アミラーゼの調製

シリカゲル、アミノプロピルシリカ、及び α -アミラーゼを秤量し、高圧反应用テフロン容器に入れた後、水またはリン酸緩衝液と共に十分にけん濁する。密封した後高圧反応装置内で 5000 kg/cm^2 で20時間の反応を行う。反応後内容を遠心分離して上清を廃棄し、水を加えて2回程遠心洗浄して得た残渣を回収して吸引ろ過する。再度水で洗浄した後乾燥し、評価に用いる。

3. 測定方法

基質となるデンプンは、精製水に溶解した水溶液として用いた。 α -アミラーゼは、適宜リン酸緩衝液に溶解した水溶液として用いた。 α -アミラーゼの活性測定法である、デンプンを基質とするヨード-デンプン反応は、その再現性の不安定さのために今日では余り使われていない方法であり、最近ではアミラーゼ活性測定のための人口基質が種々開発されている⁷⁾。しかしながら、反応に関与するパラメータを正確にコントロールしていけば、再現性は良く、本研究で行う活性判定には十分適用できることがわかった。

用いたデンプンの濃度は 1.0 mg/ml 、アミラーゼの濃度は $10 \mu\text{g/ml}$ とした。デンプン溶液をサンプル管に入れ、アミラーゼ溶液、又は固定化アミラーゼを加えてから $37 \sim 40 \text{ }^\circ\text{C}$ で一定時間反応させた後、ヨード溶液を滴下する。分光光度計により反応溶液の吸光度を測定し、デンプンの加水分解の割合を算出する。その際、ヨード-デンプン反応における最適化を図るための諸条件を検討した。これらの検討結果より、固定化されたアミラーゼの量を算出した。

なおここで用いたヨード溶液とは、ヨウ素 10 mg とヨウ化カリウム 30 mg を水 3 ml から調製したものである。

結果及び考察

1. ヨード-デンプン反応におけるヨード量の影響とデンプンの定量性

本実験の基本となるヨード-デンプン反応の典型的な吸光度変化を Fig. 1 に示した。(A)は、ヨード-デンプン反応に基づく紫外及び可視部の吸収スペクトルであり、 550 nm 付近に極大吸収をもつ。(B)は、デンプンが存在しない、即ち加水分解された時の吸収スペクトルである。

ヨード-デンプン反応におけるヨード量の影響とデンプンの定量性を観察するために、まずデンプン量を一定に保った時のヨード量の変化を調べた。その結果、添加したヨードの量とその時の吸光度の関係は Fig. 2 で示すように、ヨード量の増加に伴って吸光度が直線的に増加する関係になっていることがわかった。従ってヨード-デンプン反応時には、ヨード量として $100 \mu\text{l}$ 添加することにした。

次に添加ヨード量を100 μl とした時、反応するデンプンの量的変化を調べたところ、Fig.3のような結果になり、デンプンの濃度として0.1mg/ml~1.0mg/mlの濃度範囲で吸光度変化に直線性が得られた。

2. アミラーゼの活性測定における至適 pH の決定

アミラーゼ活性における至適 pH を調べる目的で、pH 4.5, 6.5, 及び8.5のリン酸緩衝液を用いて、40分経過後のデンプンの加水分解率を分光光度計で観察した。その結果 Fig.4 のようになり、3つの pHとも極端に大きな違いは見られなかったが、pH 6.5が他の2つより明らかに活性が高く、反応の再現性や色調の変化の安定性が高いことから、至適 pH を pH6.5とした。

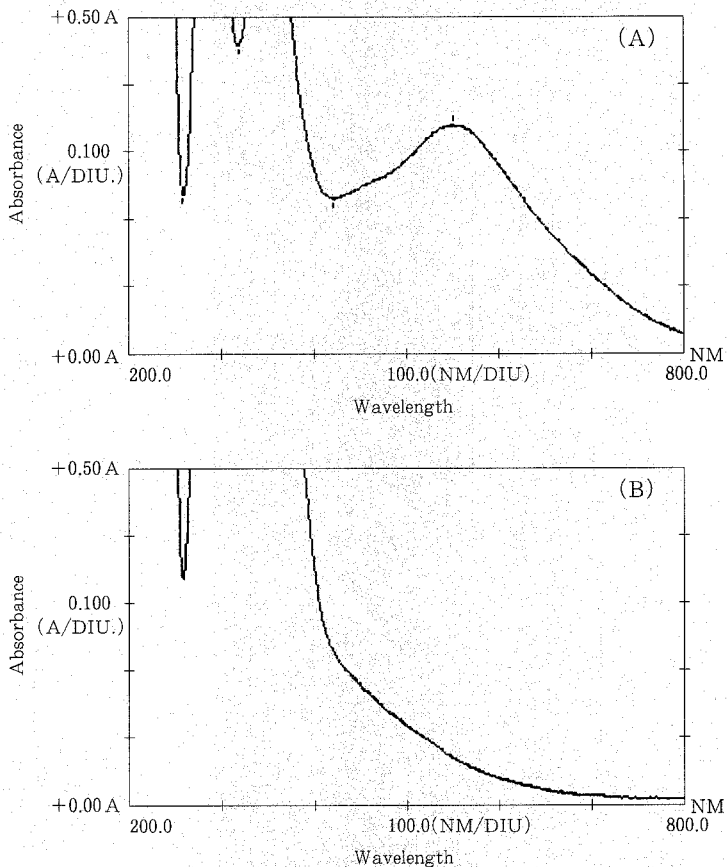


Fig. 1 Typical UV-VIS spectra of the iodometric reaction of starch (A) before hydrolysis and (B) after hydrolysis.

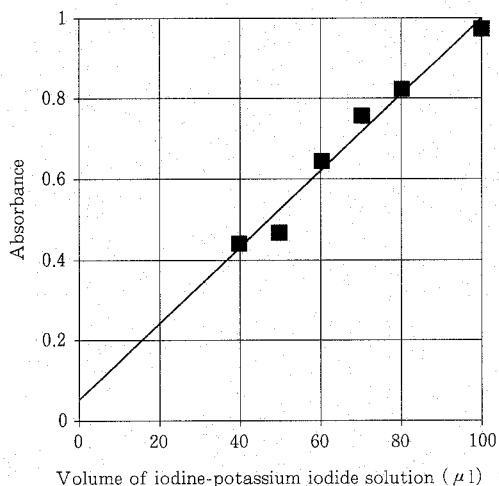


Fig. 2 Effect of the concentration of iodine solution on the iodometric reaction of starch.

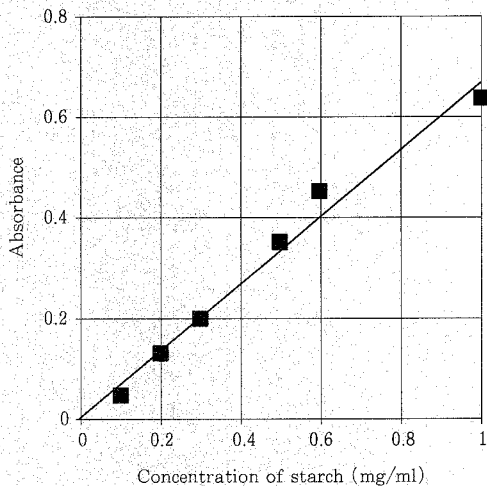


Fig. 3 The linearity of iodometric reaction at the low concentration of starch.

3. アミラーゼの活性評価

デンプンの濃度を1.0 mg/ml, アミラーゼの濃度を0.01 mg/mlとして, アミラーゼの量を10 μ l, 50 μ l, 100 μ l, 250 μ l (重量換算: 0.1 μ g, 0.5 μ g, 1.0 μ g, 2.5 μ g) と変化させた時の加水分解の変化を分光光度計で観察した. 吸光度の変化をFig. 5に示した. その結果, アミラーゼ250 μ l (2.5 μ g) でデンプン1.0 mgを100%加水分解することがわかった.

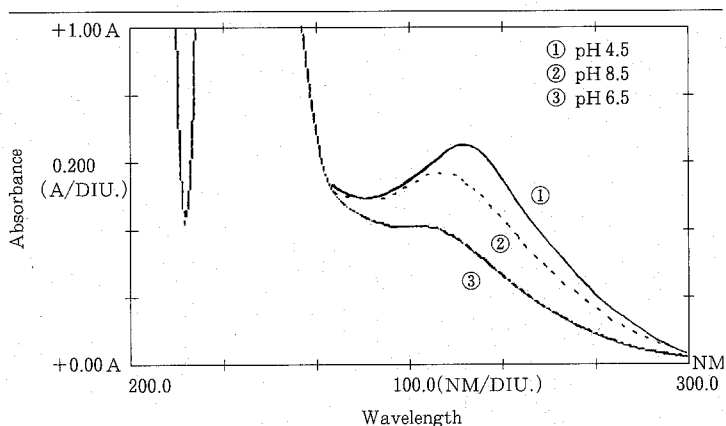


Fig. 4 The effect of pH of phosphate buffer on the activity of α -amylase.

4. シリカゲルにアミラーゼを固定化した時の活性評価

シリカゲルとしては, 市販の粒子径の異なる二種類 (シリカゲルA (70~230 mesh), シリカゲルB (5 μ m)) を選んだが, アミラーゼの吸着量としては, シリカゲルBの方が高いと判断できたことから, 以下シリカゲルBを用いた時の実験結果を取り上げた. シリカゲルB 0.5 g 及び α -アミラーゼ0.5 gを用いて固定化シリカゲル-アミラーゼを調製した. この際, デンプン1 mgを用いて固定化シリカゲル-アミラーゼと反応させ, ヨード-デンプン反応により生ずる吸光度を測定することで相対活性を算出した.

4-1) シリカゲルのブランク試験

初めにヨード-デンプン反応へのシリカゲルの影響を対照実験として行ったところ, シリカゲルによるデンプンの加水分解はまったく観察されなかった.

4-2) シリカゲル-アミラーゼによる反応の時間変化

固定化したシリカゲル-アミラーゼ100 mgを用いて, 活性の時間変化を反応時間10分から40分の間で調べた. その結果はFig. 6に示した. 10分, 20分では相対活性は同じであったが, 40分では活性は84%まで上がっていた. このことより加水分解は反応させてすぐにある程度進むが, ある一定の時間を経過しないと十分な活性を示さないと考えられ, この挙動はアミラーゼ本体を用いた反応に類似していると考えられる.

この結果よりシリカゲル-アミラーゼ100 mgは, アミラーゼ単体として0.5 μ gに相当すると考えられる.

4-3) シリカゲル-アミラーゼ活性の繰り返し再現性

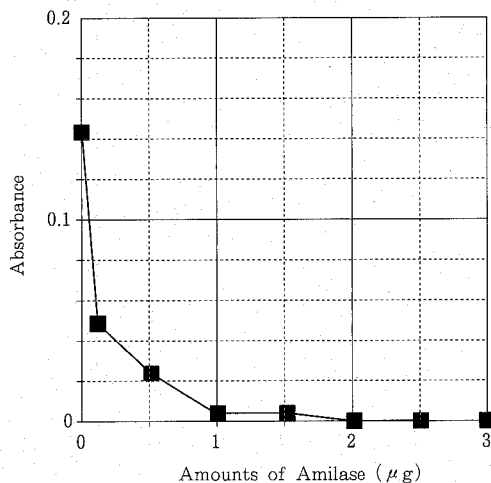


Fig. 5 The amounts of α -amylase for hydrolysis of starch.

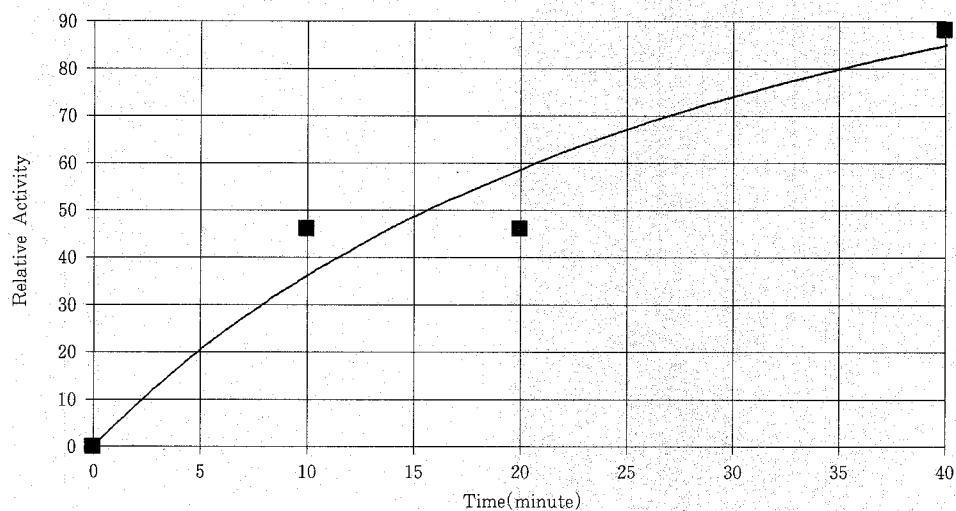


Fig. 6 The time-course for hydrolysis of starch by the immobilized silica-amylase prepared.

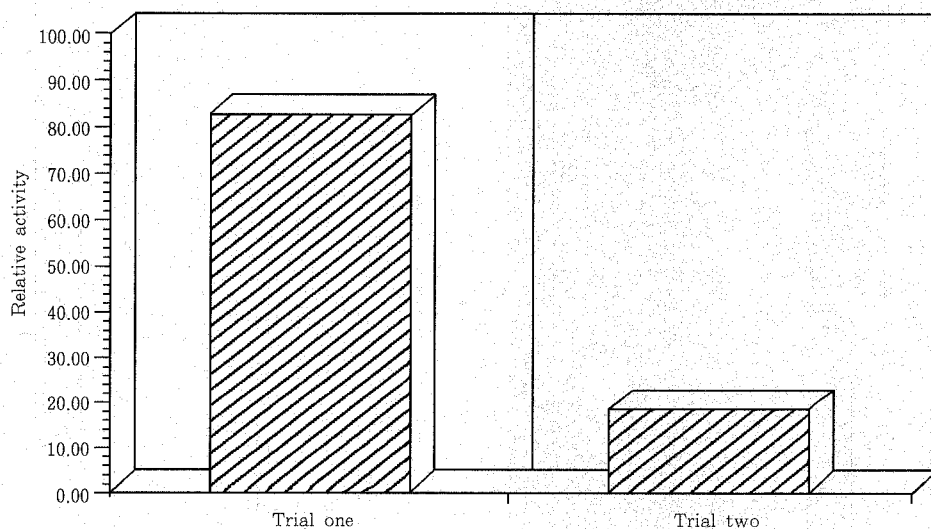


Fig. 7 Recyclic activity of the immobilized silica-amylase prepared.

本固定化アミラーゼ (100mg) をデンプン 1mg と反応させた後回収し、再度繰り返して 1mg のデンプンと反応させることで、アミラーゼ活性の繰り返し再現性を調べた。その結果 Fig. 7 のようになり、2 回目に使用した時には約 60% 程度活性が低下していることがわかった。

以上の結果として、ヨード-デンプン反応における吸光度の減少が観察されたことから、ここで調製した固定化シリカゲル-アミラーゼは微量ではあるがアミラーゼ活性を有することができる。

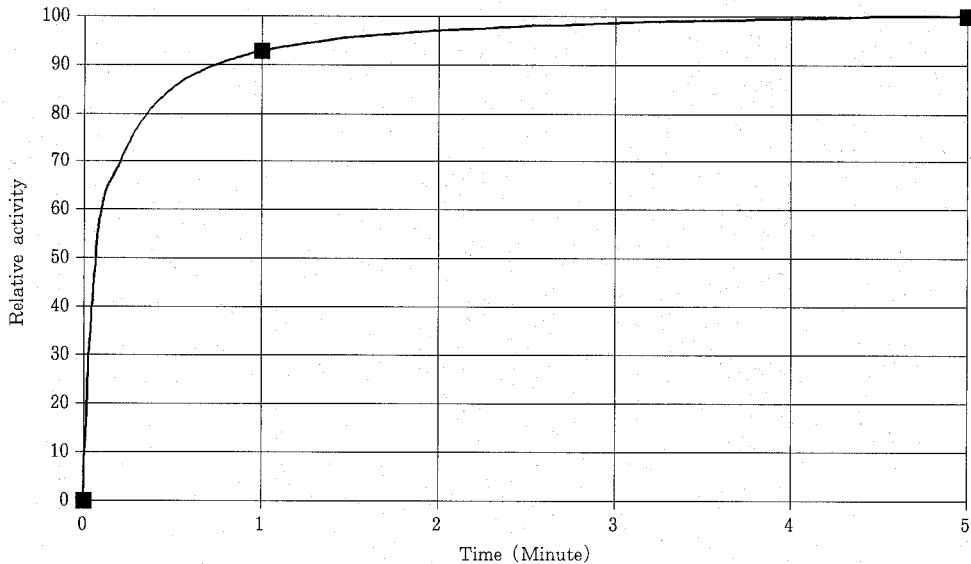


Fig. 8 The time-course for hydrolysis of starch by the immobilized amino-propylsilica-amylase prepared.

5. APS にアミラーゼを固定化した時の活性評価

APS (アミノプロピルシリカ) 0.5 g にアミラーゼ 0.5 g を高圧反応で吸着させることで固定化し、シリカゲル同様、APS に固定化したアミラーゼをデンプン 1 mg と反応させ、ヨード-デンプン反応により生ずる吸光度を測定することで相対活性を算出した。

5-1) APS のブランク試験

初めにヨード-デンプン反応への APS の影響を対照実験として行ったところ、APS によるデンプンの加水分解はまったく観察されなかった。

5-2) APS-アミラーゼによる反応の時間変化

APS-アミラーゼ 10 mg を用いて、活性の時間変化を反応時間 1 分と 5 分で調べてみた。同様にヨード-デンプン反応より吸光度を測定することで相対活性を算出した。その結果、Fig. 8 で示すように、5 分の段階で相対活性は 100 % であり、活性の高さを観察した。更に 1 分では活性は 100 % ではなかったものの、90 % 以上は加水分解されていることがわかった。このことより APS-アミラーゼ 10 mg を用いる加水分解は、デンプンと反応させた瞬時にほとんど進行することがわかった。

5-3) APS-アミラーゼの重量換算

APS-アミラーゼ 10 mg を用いて、活性の時間変化を反応時間 1 分、5 分で調べてみたが、この結果よりデンプン 1 mg は APS-アミラーゼ 10 mg によりほぼ 100 % 加水分解されることがわかった。ここで前実験より、デンプン 1 mg はアミラーゼ (0.01 mg/ml) の 250 μ l で 100 % 加水分解されることがわかっているため、APS-アミラーゼ 10 mg はアミラーゼ 2.5 μ g 以上に相当することが言える。

さらに詳細な検討をしていくために、この APS-アミラーゼ 10 mg を反応時間 1 分で約 90 % の活性があるアミラーゼの量との比較において調べたところ、デンプン 1 mg に対してアミラーゼ 10 μ g が約 90 % の活性があるということがわかった。この結果をもとにすると APS-アミラーゼ 10 mg はアミラーゼ 10 μ g に相当することがわかる。

この結果より、APS-アミラーゼはシリカゲル-アミラーゼの場合より約 200 倍活性が高い可能

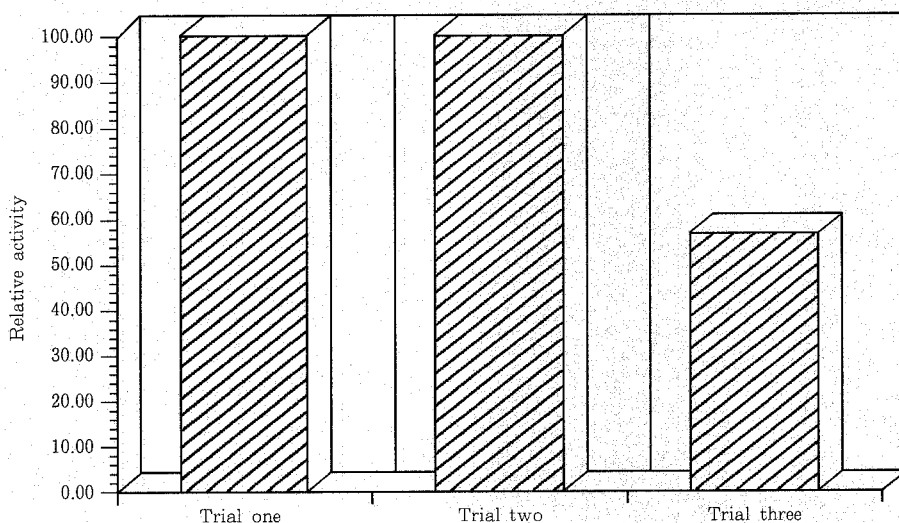


Fig. 9 Recyclic activity of the immobilized aminopropylsilica-amylose prepared.

性があることが判明した。

5-4) APS-アミラーゼの繰り返し再現性

ここでは APS-アミラーゼを 100mg 使用して反応させた後回収し、繰り返し 1 mg のデンプンと反応させることで活性の繰り返し再現性を調べた。結果は Fig. 9 のようになり、1, 2 回目とも 100% の活性であったが 3 回目では活性は 56% まで低下し、この点で繰り返し再現性の安定性の面から問題があると思われる。

結 言

本研究で得られた固定化アミラーゼについては、アミラーゼの正確な吸着量と共に、より正確な活性評価を必要とするが、比較的高い活性を有することが観察されたことは、極めて意義深い結果である。活性の繰り返し再現性という点では、予想していたほど高いものではなかったため、再度検討を加えてみなければならない。

この実験結果から、1) 今回用いた圧力値程度では、酵素の構造、すなわち活性中心は何の影響も受けていないのか、2) 圧力による変性は受けていても、活性中心に何の影響も受けていないのか、或いは 3) 圧力によってむしろ活性が上昇した可能性はないのか、等々の考察がなされてしかるべきであるが、現時点ではこれ以上のデータが得られていないので推論の域を脱し得ず、今後の実験結果を待たなければならない。

ある種の酵素が、高圧条件下において優れた活性を示すことが知られているが⁸⁾、あくまでも溶液状態での話であり、それらの酵素を固定化して用いられた例は報告されていない。本研究で試みた高圧条件下で固定化できる酵素が、溶液状態とまったく同じ挙動(又は活性)を示すとは考えられないが、この二つの実験結果にもし接点を得られるものならば、酵素活性と活性中心の構造解析の解明等も含めて、極めて興味ある研究に進展していくものと思われる。

また、緒言にも述べたデンプン粒に対する本固定化酵素の活性も評価する価値があるのではないかと考えている。

現在、他の酵素についても高圧条件下での固定化について検討中である。

本研究を行うにあたり、高圧反応装置のご協力をいただき、並びに有益なご助言を賜りました本学理学部助教授小槻日吉三博士に深謝致します。また、無機材料をご供与賜りました信和化工株式会社に深謝致します。

文 献

- 1) 千畑一郎編：固定化生体触媒，講談社サイエンティフィク（1986）。
- 2) C.M.Sturgen, J.F.Kennedy:Enzy. Microb. Technology (1983). T.M.Chang, Ed.:Biochemical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins, Vol.1, Plenum Press, N.Y. (1977).
- 3) 小槻日吉三：科学と工業, 68, 265 (1994).
- 4) 蒲生啓司・浜大吾郎・柳澤和道・小槻日吉三：分析化学, 44, 853 (1995).
- 5) 山本晋平：応用糖質科学, 41, 283 (1994).
- 6) 一島英治・小野寺一清編：新しい酵素研究法, pp.166-175, 東京化学同人 (1995).
- 7) S. Satomura, T. Iwata, Y. Sakata, K. Omichi and T. Ikenaka, Carbohydr. Res., 176, 107 (1988). S. Satomura, K. Omichi and T. Ikenaka, Carbohydr. Res., 180, 137 (1988).
- 8) N.Katagiri, T.Shiraishi, A.Toyota, H.Sato, C.Kaneko and T.Aikawa, Chem Pharm. Bull., 41, 1027 (1993). N.Katagiri, T.Shiraishi, A.Toyota, H.Sato and C.Kaneko, Nucleic Acids Symp. Ser., 29, 95 (1993).

平成8年(1996)9月30日受理

平成8年(1996)12月25日発行

