

酵素の固定化および固定化した酵素の再利用適性

Study on Stability of Immobilized Enzyme in Repeated-use



AT 研究所
第2研究部
宮田直紀
Naonori
Miyata



AT 研究所
(現知的財産室)
藤島礼佳
Ayaka
Fujishima

Summary

Enzymatic reaction can provide many useful catalytic properties such as substrate selectivity, functional group selectivity, stereospecificity, stereoselectivity, regioselectivity, enhanced activity at low temperature (often at about room temperature) and so on¹⁾. Enzyme can also sometimes catalyze complex multi-stage reactions integrating into one step, for example ethanol production from cellulosic biomass by using arming yeast²⁾. Such useful catalytic enzyme, however, is usually considerably expensive. Therefore, it is significant for the enzyme to easily be separated from reaction products for repeated-use. Immobilizing the enzyme in supporting carriers is a typical method for the easy separation. Though, entrapment of the enzyme in various polymers is one of useful techniques for immobilization, part of the enzyme in the supporting carriers can leak out in some cases. In this study, we tried to use the enzyme repeatedly keeping the high reaction activity by entrapping in a polymer containing isocyanate function groups.

要 旨

酵素を用いた化学反応は基質特異性、反応選択性、立体特異性、立体選択性、位置選択性および最適反応温度が室温に近いなどの多くの特長を有する¹⁾。また、セルラーゼアーミング酵母²⁾を用いたセルロース系バイオマスからのエタノール生産の例のように複雑な多段階反応が可能なケースもあり、活用すべき利点は多い。しかし、酵素自身が高価な場合が多く、工業生産への応用を目指す場合は、酵素と生産物を容易に分離して、酵素を繰り返し使用できることが極めて重要となる。代表的な分離手法として担体を用いた酵素の固定化が挙げられる。樹脂を用いた包括固定化もその一つであるが、固定化対象である酵素の種類によっては固定化後も酵素の一部が担体外に漏出するという問題があった。本研究でイソシアネート基を有するポリマー中に酵素を固定化することで、高い酵素活性を維持しながら容易に生成物と酵素とを分離できることがわかった。この技術を応用することで、酵素の効率的な再利用が可能になったので報告する。

1. 緒言

一般的に、酵素は特定の構造を有する化合物（基質）に対して特異的に作用し、立体選択的、位置選択的およびエナンチオ選択的に特定の反応のみの触媒として作用する性質があるため、酵素反応は副生成物が少なく生成物の純度が高いので、精製コストを抑えることが可能である。また、多くの場合は常温、常圧、中性付近の温和な反応条件下でも高い触媒活性を示すため、加熱や加圧などに要するエネルギーを大幅に低減でき工業上の大きな利点も有する。

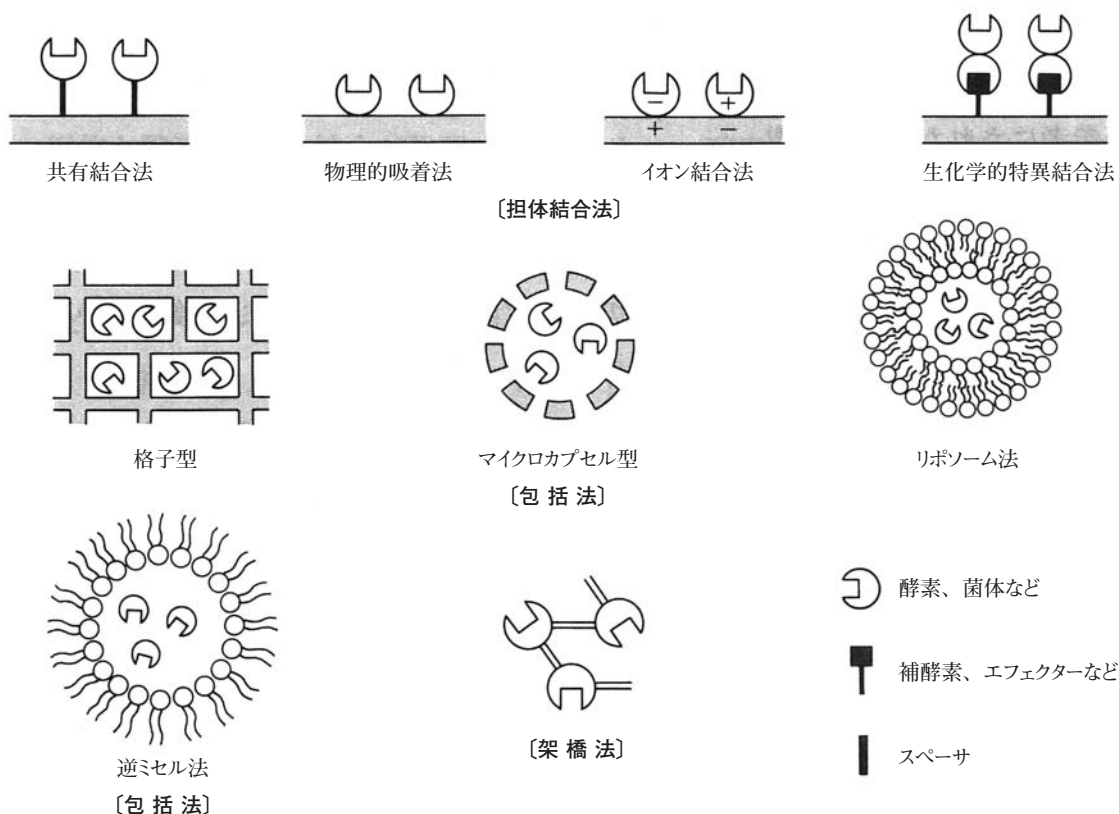
しかし、酵素は複雑な構造を持つタンパク質であるため、有機溶媒、酸、アルカリや熱などの外的因子によって不可逆的な構造変化を受けると不活性化状態となる（失活する）。通常、効率的に化学反応を進めようとする場合、酵素の置かれる環境は本来その酵素が存在している生体内とは大きく異なることが多い。その様な環境下では酵素は不安定で³⁾、触媒活性も低下する。従って、酵素は本来その酵素が存在する環境に近い、限られた条件下でしか用いることができない場合がある⁴⁾。

更に、工業化の大きな課題となるのが酵素の価格である。近年、遺伝子工学の発展に伴って、本来は生産効率の極めて低い酵素も安価・安全で生育が早い大腸菌や酵母などの有用微生物を用いて大量かつ効率的に得られるようになってきた。しかし、依然として精製段階では多くの費用がかかり、

結果的に目的生成物が高価格になることは否定できない。このため、目的生成物の生産コストを低く抑えるためには何らかの方法で使用後の酵素と生成物とを分離し、酵素を再利用することが求められる。両者の分離だけであれば限外濾過膜を用いれば可能であり、実際に安定性の高い酵素の回収・再利用では上記の濾過で対応しているケースもある。しかし既に述べた失活の問題は濾過では解決することができないため、酵素の種類によっては失活そのものを抑制する手法が必要である。

担体を用いた酵素の固定化は上記の失活と分離の困難さという二つの欠点を解決するための有効な手法であり、**図1**⁴⁾に示したように、担体結合法、包括法や架橋法など数多くの固定化方法が提案されている。個々の固定化方法はそれぞれ長短所を持っている。例えば、担体結合法では酵素を比較的漏れなく固定化できる反面、固定化操作が煩雑であるという問題点がある。包括法では簡便に固定化できる反面、酵素によっては一度担体に保持されたものが再度漏出する場合がある。

本研究ではプレポリマーを用いた包括法を検討した。包括法の短所である酵素の漏出を抑制する目的でプレポリマーに官能基（イソシアネート基）を導入した水硬性樹脂によって、簡便かつ酵素の漏出の少ない固定化方法を確立した。



(田中渥夫：“酵素工学概論”より転載)

図1 種々の酵素固定化方法

2. 実験

2.1 ラジカル硬化包括法

イソシアネート基導入の比較実験として、炭素-炭素二重結合以外の官能基を持たない一般的なラジカル硬化性樹脂を用いて酵素の固定化を行った。酵素を固定化した試料はラジカル硬化性樹脂の水溶液 60 g に対しアミノ酸加水分解酵素 1 g (比活性 12300 U/mg, 1Uは30分間に1 μmolの基質を加水分解する活性単位) を添加し、高圧水銀灯で紫外線を照射して硬化させた後、剃刀で切断して厚さ約 2 mmのシート状の含水ゲル担体として調製した。

2.2 水硬性樹脂による酵素の固定化

水硬性樹脂により酵素を固定化した試料は、図2に示した分子構造の水硬性樹脂 (水と混合することで自己架橋により硬化する性質を持つ樹脂) の水溶液 60 g に対しアミノ酸加水分解酵素 1 g を添加し、室温で 45 分間放置して硬化させ、剃刀で切断して厚さ約 2 mmのシート状の含水ゲル担体として調製した。

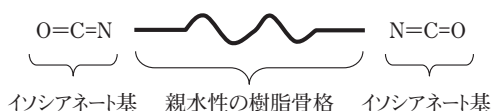


図2 水硬性樹脂の構造

2.3 酵素固定化率の測定

調製した担体 5 g を 25 ml の蒸留水と共にフラスコへ入れて、30 °C で 24 時間振盪させた。経時でサンプリングを行い、BCA法 (ピシニコニン酸と銅の錯体がタンパク質と結合する際に吸光度が変化する特性を利用したタンパク質の定量方法、Thermo Fisher Scientific社製「BCA™ Protein Assay Kit」を使用) によってサンプル中の酵素濃度を測定し、測定結果から下記の計算式を用いて酵素固定化率を

求めた。

$$\text{酵素固定化率 (wt\%)} = \left(1 - \frac{0.01 \times \text{サンプルの酵素濃度 (wt\%)} \times 25 \text{ (g)}}{\text{担体中の酵素量 (g)}} \right) \times 100$$

2.4 水硬性樹脂によるインペルターゼの固定化

水硬性樹脂によりインペルターゼを固定化した試料は水硬性樹脂の水溶液 18 g に対しインペルターゼ (正式名: β-Fructofranosidase, EC3.2.1.26) 溶液 1.78 ml (比活性 4 U/ml, 1UはpH 4.0・反応温度 20 °C の条件下で 30 分間に 1 g のスクロースを加水分解する活性単位) を添加し、室温で 45 分間放置して硬化させた後、剃刀で切断して厚さ約 2 mmのシート状の含水ゲル担体として調製した。

2.5 水硬性樹脂で固定化したインペルターゼを用いた繰り返し反応実験

インペルターゼは 2 糖のスクロースを単糖であるグルコースとフルクトースに加水分解する酵素⁵⁾であり、転化糖の製造等の食品工業用途に広く用いられている。本検討では、この反応を利用してインペルターゼの活性を評価した。具体的には、フラスコに 4 g の水硬性樹脂で固定化したインペルターゼ (インペルターゼとして 1.4 U 含有) と 25 ml の 20 wt % スクロース水溶液とを入れ、インペルターゼの安定化剤として 0.1 mol/l の 1,4-ジチオスレイトール (DTT) を添加した後、30 °C で 24 時間振盪させ、和光純薬製「グルコースCII-テストワコー」(グルコースオキシダーゼによる発色を用いたグルコース定量キット) で測定した溶液中のグルコース濃度より反応率を求めた。反応に使用した水硬性樹脂で固定化したインペルターゼは目開き約 2 mm のステンレス製金網のザルを用いて反応溶液から分離・回収した後、25 ml の蒸留水に浸漬して 5 °C で約 12 時間静置洗浄してから次の反応に用いた (図3)。

インペルターゼによるスクロースの加水分解反応

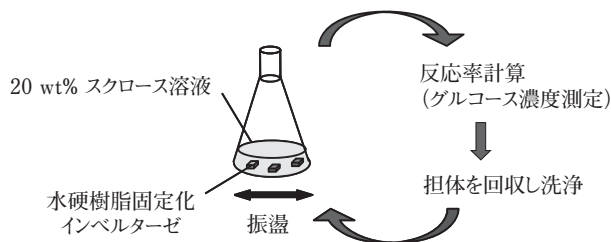
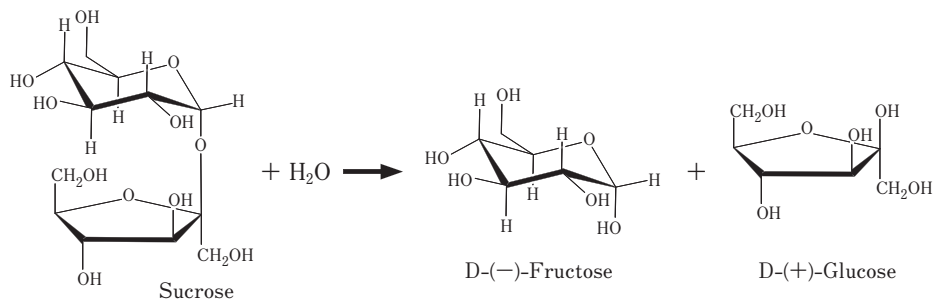


図3 繰り返し反応の手順

2.6 過酷な条件下での繰り返し反応実験

固定化するインペルターゼ量を担体4g当たり0.14U、反応温度を55℃としたこと以外は2.5と同様にして水硬性樹脂で固定化したインペルターゼを用いた繰り返し反応を行った。

3. 結果および考察

3.1 包括法で固定化した酵素の固定化率

包括法で固定化した酵素を蒸留水中で振盪させ固定化率の経時変化を測定した。ラジカル硬化性樹脂を固定化に用いた場合の結果を図4に示した。今回用いたアミノ酸加水分解酵素では、固定化率は振盪時間とともに減少し、24時間後には53%まで減少した。包括法で用いたラジカル硬化性樹脂は酵素と反応する官能基を持たないため、酵素の分子サイズが小さい、酵素と樹脂との親和性が低い等の理由で固定化後に酵素の一部が漏出したと思われる。

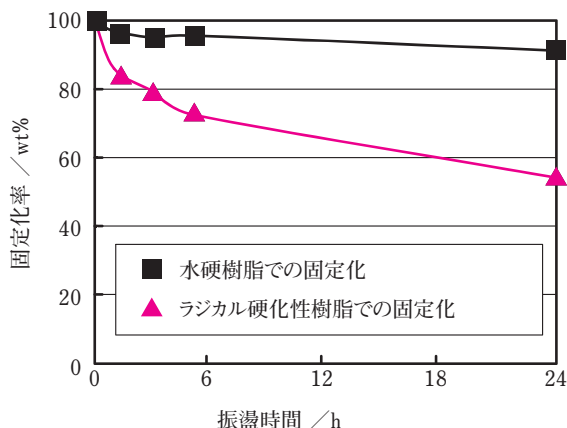


図4 各種包括法で固定化した酵素の固定化率の経時変化

3.2 水硬性樹脂で固定化した酵素の固定化率

酵素の固定化率を高めるために末端にイソシアネート基を有する水硬性樹脂を用いて加水分解酵素の固定化を行った。固定化に水硬性樹脂を用いた場合の結果を図4に示した。ラジカル硬化性樹脂を使用して包括法で固定化した結果とは異なり、24時間振盪後でも90%以上の高い固定化率を維持した。これは酵素の表面に存在する水酸基やアミノ基などの一部と水硬性樹脂のイソシアネート基が共有結合を形成したためと思われる。今後、酵素の表面とイソシアネート基との結合形態等の解析が必要である。

3.3 水硬性樹脂で固定化したインペルターゼを用いた繰り返し反応実験

水硬性樹脂で固定化した酵素は繰り返し使用に十分耐えうるものと判断できたため、インペルターゼを水硬性樹脂で固定化し、繰り返し反応実験を行った。

この酵素を水硬性樹脂で固定化(固定化インペルターゼ

として4g、インペルターゼ活性として1.4U)し、繰り返し反応に用いた結果を図5に示した。この結果より、水硬性樹脂で固定化したインペルターゼは11回目の反応でも反応時間24時間での反応率は80%以上であり、未固定のインペルターゼと同等レベルの反応性を長期にわたり維持できることがわかる。

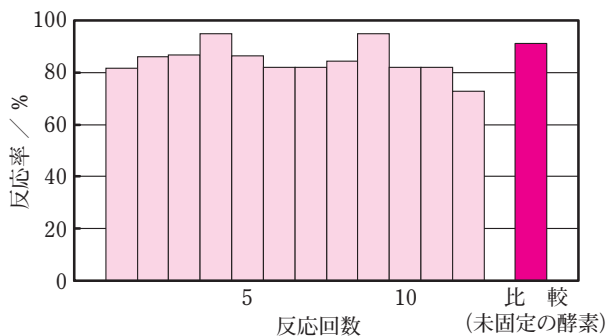


図5 水硬性樹脂で固定化したインペルターゼの繰り返し反応回数と触媒活性の関係

3.4 過酷な条件下での繰り返し反応実験

工業化を考えると、反応速度的に有利な高温での反応に酵素を利用することが好ましい。一度に用いる酵素の量は少ない方がコスト的に有利である。このことを踏まえ、少量の酵素を固定化して高温で反応を行った場合の安定性について確認した。固定化していないインペルターゼの至適温度は55℃⁵⁾、安定な温度の上限は60℃程度であるため、安定温度上限近くの55℃の条件下で、0.14U(固定化インペルターゼとして4g)の水硬性樹脂で固定化したインペルターゼを用いて繰り返し反応を行った結果を図6に示した。このような過酷な条件にも拘らず、前述の1.4Uのインペルターゼを用いた30℃での実験結果(図5)と比較してもほとんど反応率の低下は見られず、10回以上の繰り返し使用に十分耐えられることがわかった。

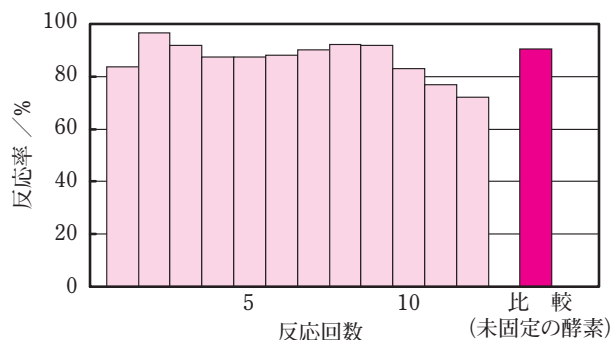


図6 過酷な条件下での繰り返し反応回数と触媒活性の関係

4. 結論

水硬性樹脂で固定化した酵素は固定化後の漏出による酵素のロスが極めて少ない。更に、過酷な条件下での反応

も含め、繰り返し使用時の安定性にも優れることがわかった。本研究の固定化方法を用いることによって、酵素漏出を大幅に抑制できることが明らかになった。今後は、インペルターゼ以外の酵素についても本技術の適用性を幅広く検討し、本方法の最も大きな特長である「極めて少ない工程で簡便に固定化が可能」という点を活かして工業化に繋げていきたい。

参考文献

- 1) 太田博道：ぶんせき、[1]、2-10 (2005)
- 2) 今中忠行(監修)：“酵素開発・利用の最新技術”、p.225、シーエムシー (2006)
- 3) 大野雅二：“酵素機能と精密有機合成”、p.4、シーエムシー (1984)
- 4) 田中渥夫、松野隆一：“酵素工学概論”、p.3, 21、コロナ社 (1995)
- 5) 八木達彦(編)：“酵素ハンドブック 第3版”、p.583、朝倉書店(2008)