

## 9231 塩刺激に应答する可溶不溶可逆機能性生体触媒の開発とその応用

助成研究者:谷口 正之(新潟大学 工学部)

## 研究目的

pHおよび温度応答性高分子に酵素蛋白質を固定化した可溶・不溶可逆酵素を我々は既に調製している。しかし、開発した可溶・不溶可逆固定化酵素は可溶状態で固体基質に効率よく作用した後、不溶化することによって回収再利用できるが、pHまたは温度の繰り返し上下による失活、循環利用における塩の蓄積による見かけの活性低下など温度またはpH変化に伴う不可避な問題があった。

そこで、本研究では1) 刺激(濃度と種類)に対して可逆的に应答する機能性高分子の調製とその性質について、2) 調製した刺激応答性高分子に酵素蛋白質を固定化し、両者の特性を最大限に発揮できる新規な触媒機能を有する酵素の開発とその性能について、および3) 塩に可逆的に应答する可溶・不溶可逆酵素をバイオマスの有用物質への変換反応に応用することについて、それぞれ検討した。

## 研究方法

刺激応答性高分子の調製 刺激応答性高分子はN-isopropyl acrylamide(NIPAM)とglycidyl methacrylate(GMA)を重合することによって調製した。

刺激応答性生体触媒の調製 バイオマスの有用物質への変換反応に応用することを目的として、本研究では生体触媒としてグルコアミラーゼ製剤であるダビアーゼ(ダイキン工業)を選択した。固定化は、ダビアーゼと高分子溶液をアルカリ性の緩衝液中で混合することにより行った。

食塩の濃度変化を利用した繰り返し反応 食塩の濃度変化を利用して固定化ダビアーゼを繰り返し用いながら可溶性デンプンを加水分解した。

## 研究結果および考察

GMAとNIPAMを共重合することにより、食塩濃度の変化あるいは温度変化によって可逆的に相変化する高分子を調製できた。この高分子に生デンプン分解酵素ダビアーゼを固定化した結果、食塩濃度の変化によって溶解性を可逆的に調節できる可溶・不溶可逆アミラーゼを調製できた。調製した固定化アミラーゼは、可溶状態で可溶性デンプンに効率よく作用し、かつ食塩濃度あるいは温度を上げることによって不溶化でき、糖液と分離できた。したがって、固定化アミラーゼは可溶状態で効率よく可溶性デンプンに作用した後に食塩濃度を上げることによって回収でき、可溶性デンプンの加水分解に繰り返し利用できた。また、この固定化アミラーゼは同一の食塩濃度において温度を上げることによって不溶化し回収でき、可溶性デンプンの加水分解に繰り返し利用できた。



## 9231 塩刺激に応答する可溶不溶可逆機能性生体触媒の開発とその応用

助成研究者: 谷口 正之(新潟大学 工学部)

## 1. 研究目的

温度、圧力、電場、pHなどの刺激に応答する高分子に関する研究は、特定物質の選択的透過を目的とした膜分離の分野や各種のセンサーの開発を目的とした材料工学の分野において盛んに行われている。しかし、塩類の刺激に応答する高分子の開発と応用に関する研究は非常に少ない。まして塩刺激応答性高分子を酵素の簡易な分離回収、酵素反応の効率化、生化学物質の分離などに応用した研究例はないと考えられる。生体触媒固定化用の可溶・不溶可逆担体として利用できる生体高分子は、カルシウムイオンの有無より溶解性が変化する $\alpha$ s1-カゼインやpHに応答するアルギン酸が報告されているが、その耐久性は乏しい。一方、合成高分子としては、細胞膜のモデルとしてのポリメタクリル酸とポリ-4-ビニル-N-エチルピリジンの電解質複合体や可逆的な溶解性が乏しいアクロレイン-アクリル酸共重合体などが報告されているが、いずれも生体触媒固定化用の可溶・不溶可逆担体として適用できる安定した性質を備えた高分子ではない。

我々は既にpHおよび温度応答性高分子に酵素蛋白質を固定化した触媒機能を有する複合材料を調製している。<sup>1~12)</sup>しかし、開発した可溶・不溶可逆固定化酵素は可溶状態で固体基質に効率よく作用した後、不溶化することによって回収再利用できるが、pHまたは温度の繰り返し上下による失活、循環利用における塩の蓄積による見かけの活性低下など温度またはpH変化に伴う不可避な問題があった。<sup>6,9)</sup>そこで、本研究では1)刺激(濃度と種類)に対して可逆的に応答する機能性高分子の調製とその性質について、2)調製した刺激応答性高分子に酵素蛋白質を固定化し、両者の特性を最大限に発揮できる新規な触媒機能を有する酵素の開発とその性能について、および3)塩に可逆的に応答する可溶・不溶可逆酵素をバイオマスの有用物質への変換反応に応用することについて検討した。

## 2. 研究方法

## 2. 1 刺激応答性高分子の調製

刺激応答性高分子は次のようにして調製した。ヘキサンのより重合禁止剤を除いたN-isopropyl acrylamide(NIPAM)とglycidyl methacrylate(GMA)をセパラブルフラスコにいれ、所定の温度に設定した後、窒素ガスを通気することにより脱気を行った。その後、亜硫酸水素ナトリウムと過硫酸アンモニウムを重合開始剤として添加し、所定時間攪拌する

ことにより重合を行った。次に、生成した高分子を回収するために食塩濃度が1%となるように食塩を反応液に添加し、白濁した高分子を40℃で遠心分離を行うことにより沈澱として回収した。この沈澱物を刺激応答性高分子として使用した。

## 2. 2 刺激応答性生体触媒の調製

バイオマスの有用物質への変換反応に応用することを目的として、本研究ではグルコアミラーゼ製剤であるダビアーゼ（ダイキン工業）を選択し、塩応答性酵素を調製することを試みた。ダビアーゼは次のようにして塩刺激応答性高分子に固定化した。ダビアーゼを0.1Mリン酸緩衝液（pH 8-9）または0.2Mホウ酸緩衝液（pH 10-11）に溶解し、適切な濃度に調節した。この酵素溶液を塩応答性高分子を含む緩衝液に混合した。25℃で48時間攪拌した後、生成した固定化酵素を回収するために食塩濃度が1%となるように食塩を反応液に添加した。白濁した固定化酵素を40℃で遠心分離を行うことにより沈澱として回収し、この沈澱物を刺激応答性ダビアーゼとして使用した。

## 2. 3 酵素活性の測定

遊離および固定化したダビアーゼの活性は、マルトース、デキストリン、可溶性デンプンおよび生デンプンを基質として測定した。反応は0.1M酢酸緩衝液（pH 5）を用いて、30℃で30分間または1時間行った。

## 2. 4 機能性生体触媒の繰り返し利用

### 食塩の濃度変化を利用した繰り返し方法

食塩の濃度変化を利用して機能性生体触媒を繰り返し使いながら可溶性デンプンを次のようにして加水分解した。まず、加水分解反応を30℃、食塩を含まない緩衝液中で行った。反応終了後、反応液に食塩濃度が4%となるように食塩を含む緩衝液を添加し、固定化酵素を完全に不溶化した。その後、反応液を30℃で遠心分離し、グルコースを含む上澄液と不溶化した固定化酵素と分離した。沈澱を回収し再溶解した後、食塩を含まない新鮮な基質液を添加し、次の反応を開始した。この反応操作を20回繰り返した。

### 温度変化を利用した繰り返し方法

温度変化を利用して機能性生体触媒を繰り返し使いながら可溶性デンプンを次のようにして加水分解した。まず加水分解反応を30℃、1%食塩を含む緩衝液中で行った。反応終了後、反応液の温度を38℃にして固定化酵素を完全に不溶化した。その後、反応液を38℃で遠心分離し、グルコースを含む上澄液と不溶化した固定化酵素と分離した。沈澱を回収し再溶解した後、1%の食塩を含む新鮮な基質液を添加し、次の反応を開始した。この反応操作を20回繰り返した。

## 2. 5 分析方法

塩および温度に対する高分子あるいは固定化酵素の溶解性の変化はそれらの懸濁液の濁りを470nmにおける吸光度を測定することにより求めた。高分子溶液の濃度は、その溶液を90℃で24時間乾燥することにより求めた。蛋白質の濃度は、Lowryら方法を用いて測定した。グルコース濃度はGlucose-C-Tcsl（和光純薬工業）を用いる酵素法により測定した。

## 3. 研究結果および考察

### 3. 1 刺激応答性高分子の調製と性質

図1は本研究で調製した塩応答性高分子の構造を示す。左は N-isopropyl acrylamide（以下NIPAM）と Glycidyl methacrylate（以下GMA）を共重合することにより調製した。ここで、刺激応答に関与しているのはNIPAMの方と考えられる。また、塩応答性高分子への酵素の固定化は、GMAのエポキシ基と酵素のアミノ基を共有結合させることにより、上述した方法によって行った。

まず、刺激応答性高分子の調製条件について検討した。GMAとNIPAMのモノマー重量比を1対14として重合するときの温度の影響を調べた。高分子の収率は反応液中の高分子量を乾燥重量として測定することにより求めた。重合温度を20、45、65℃と高くするほど高分子が速く生成し、収率も高くなった。しかし、85℃で重合を行った場合、収率は約60%であり、65℃で重合した場合に比べてかなり低くなった。これは重合温度が高いとラジカルが多く発生するために、低重合度の高分子が生成したためと考えられる。したがって、重合温度は収率が最も高かった65℃に設定した。次に、NIPAMとGMAのモノマー比を変えて重合するときの時間の影響を検討した。いずれのモノマー比においても重合開始後、直ちに高分子は生成し、重合開始30分目に収率は75から90%となり、その後ほとんど増加しなかった。そこで、重合時間は収率が完全に一定となっている1時間とした。

### 3. 2 刺激応答性高分子の性質

図2はGMAとNIPAMのモノマー重量比を1対14として、65℃で1時間、重合して調製した高分子の溶液と NIPAMを単独で重合した高分子の溶液の温度に対する溶解性の変化を示す。白いひし形で示すNIPAMを単独で重合した高分子液は32℃まで透明であったが、温度の上昇と共に白濁し約46℃で濁度は最大値を示した。また、GMAの割合が高くなるにつれて温度応答の曲線は低温側へ移動し、可溶状態から不溶状態に変化する温度の幅が狭くなった（データ省略）。GMAとNIPAMの割合を1対9にした場合、温度をいくら下げても懸濁液は完全に透明とはならなかった（データ省略）。したがって、GMAとNIPAMの比が1対14の条件で重合した高分子は、溶解性が変化する温度の幅が狭く、酵素がより多く固定化されると考えられる。そこで、このモノマー比で重合した高分子をダビアーゼ固定化用の担体として

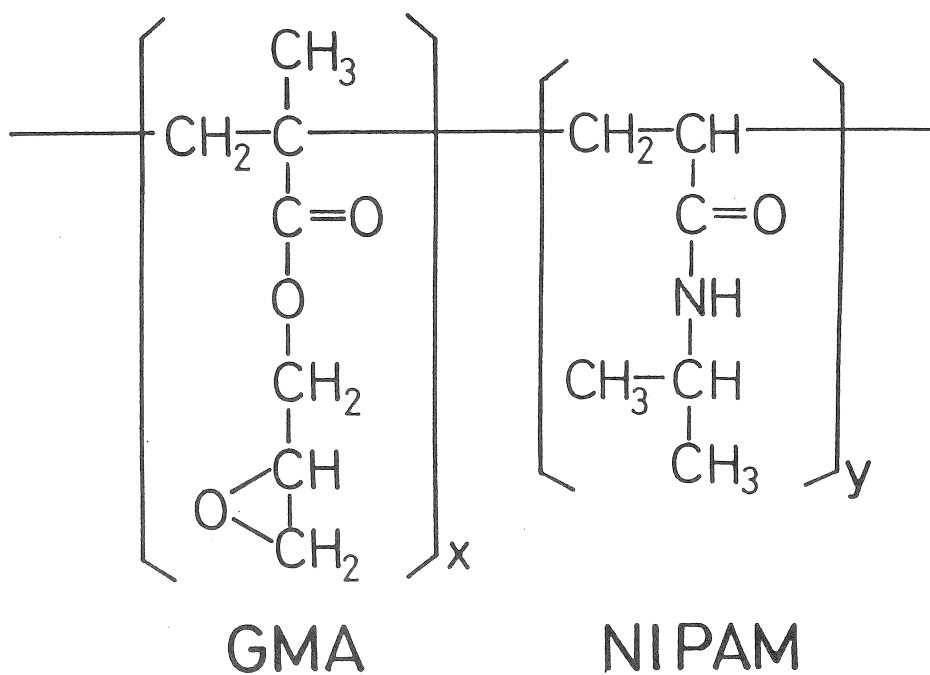


Fig. 1 Chemical structure of GMA-NIPAM.

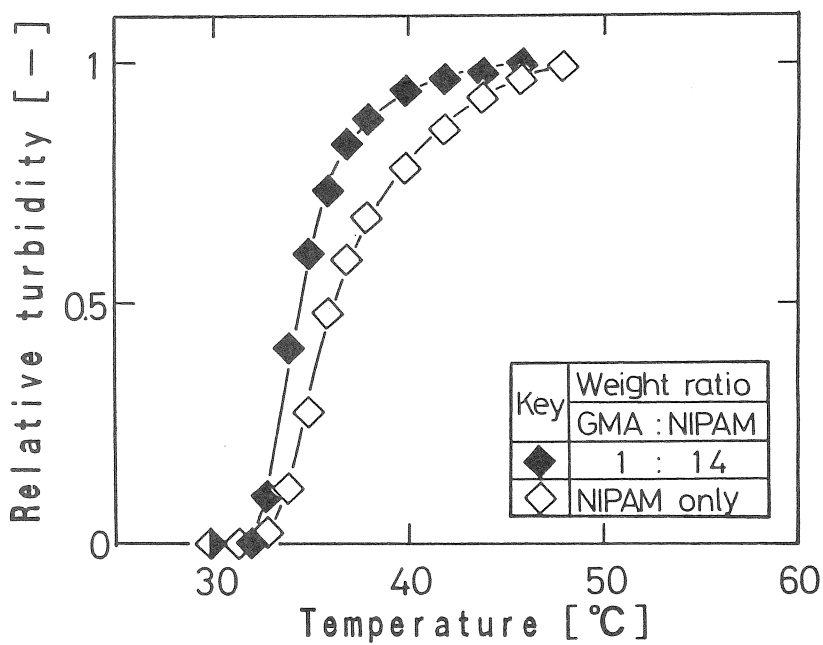


Fig. 2 Response of solubility of GMA-NIPAM to change in temperature.

使用した。

### 3. 3 機能性生体触媒の調製

次に調製した温度応答性高分子に生デンプン分解酵素ダビアーゼを固定化する条件について検討した。図3は刺激応答性高分子にダビアーゼを固定化した時のpHの影響を示す。固定化はそれぞれのpHで48時間、25℃において行った。高分子当たり結合する酵素蛋白質量と全活性は固定化pHが10.5まで増加したが、結合した酵素蛋白質当たりの比活性はpHにかかわらず約8.5U/mg-proteinと一定であった。しかし、pHを11として固定化した場合、酵素結合量、全活性、および比活性とも低下した。結局、固定化のときのpHを10.5とした場合、高分子当たりの酵素活性は最大となった。

次に、高分子当たりに添加するダビアーゼ量の影響を検討した(データ省略)。固定化のpHは10.5で行った。添加酵素量を多くしても結合した酵素量当たりの比活性は約8.5 U/mg-proteinでほぼ一定であった。しかし、高分子当たり結合する酵素蛋白質量と全活性は、酵素添加量の増加と共に増加し、高分子1グラム当たり1グラムの酵素を添加した場合、最大となった。したがって、酵素の固定化は高分子1グラム当たり1グラムの酵素を添加して行った。

### 3. 4 機能性生体触媒の性質

表1は遊離のダビアーゼと刺激応答性高分子に固定化したダビアーゼの基質特異性を比較した結果を示す。比較のために水に不溶な担体にダビアーゼを固定化した結果、すなわち、CM-Toyopearlに固定化したダビアーゼの結果も合わせて示す。可溶性基質であるマルトース、デキストリンおよび可溶性デンプン、不溶性基質である生デンプンに対する活性について比較した。水溶性の基質の場合、刺激応答性高分子に固定化した酵素の活性は、

Table 1. Substrate specificity of D-GN

Dabiase preparation	Specific activity [ $\times 10^6$ (U/kg-protein)]			
	Maltose	Dextrin	Soluble starch	Raw starch
NE	2.91 (100) <sup>1)</sup>	9.65 (100)	9.71 (100)	2.68 (100)
D-GN <sup>2)</sup>	2.79 (96)	9.06 (94)	8.78 (90)	0.73 (27)
D-CMT <sup>3)</sup>	2.03 (70)	5.56 (58)	4.48 (46)	0.69 (26)

1) Relative activity when the activity of the native enzyme (NE) was expressed as 100%.

2) Dabiase immobilized on GMA-NIPAM.

3) Dabiase immobilized on CM-toyopearl.

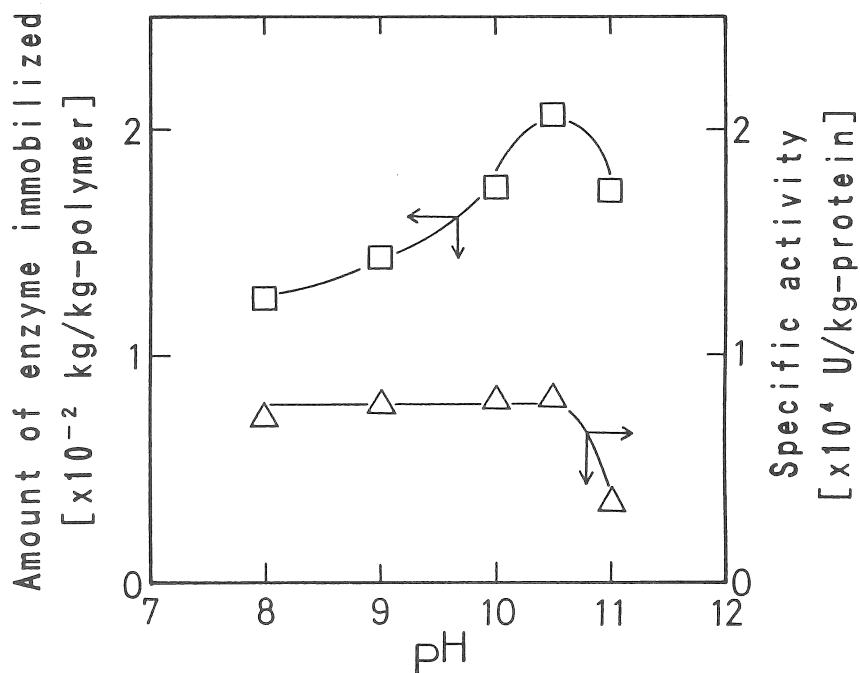


Fig. 3 Effect of pH for immobilization on the activity of D-GN.

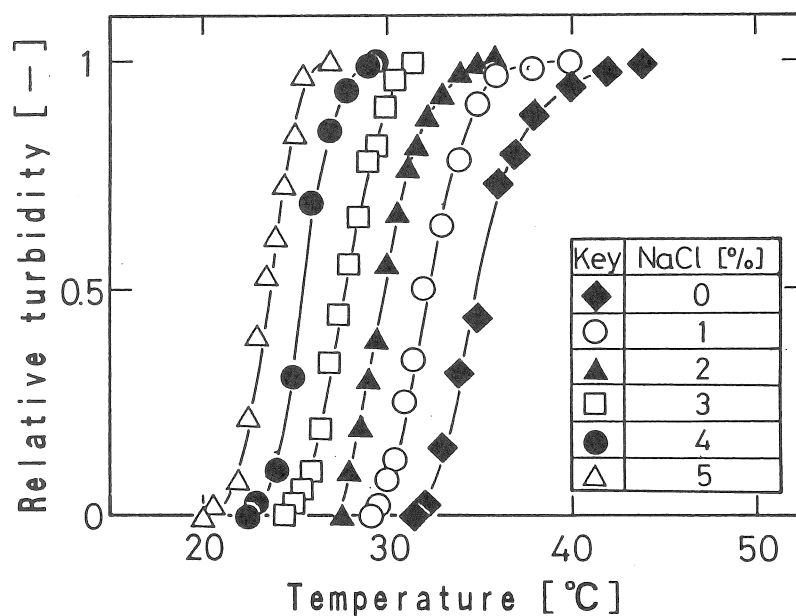


Fig. 4 Response of D-GN solubility to change in NaCl concentration and effect of temperature on its solubility response.



遊離酵素と同様に高く、高分子基質である可溶性デンプンを用いた場合、水に不溶な担体に固定化した酵素の活性は遊離酵素の活性の46%であるのに対して本固定化酵素は90%であった。しかし、固体基質である生デンプンに対する本固定化酵素の活性は、水に不溶な担体に固定化した酵素の活性とほぼ同じく遊離酵素の活性の27%であった。したがって、本固定化酵素は、可溶性の高分子基質に対して有効にはたらく固定化酵素であることがわかった。

図4は固定化ダビアーゼの刺激に対する応答性を調べた結果を示す。図2において示した高分子溶液の溶解性の応答と比較して、ダビアーゼを固定化することにより溶解性の応答は、やや鈍くなった。しかし、応答する温度範囲は32℃から44℃で高分子の溶解性の応答とほとんど変化しないことがわかった。また、固定化酵素の温度応答に対する食塩濃度の影響を検討した。食塩濃度が高くなるにつれて温度に対する応答が鋭くなり、応答する温度範囲が低温側に移動した。食塩濃度が1%増加するにつれて溶解性が変化する温度が約2.3℃ずつ低下した。この結果より、本固定化酵素を30℃の加水分解反応に繰り返し利用するためには2通りの方法が考えられる。1つは食塩の濃度変化による繰り返し方法、もう1つは温度変化による繰り返し方法である。

### 3. 5 繰り返し加水分解

図5は塩刺激に対する応答を利用して固定化ダビアーゼを繰り返し用いて0.5%の可溶性デンプンを加水分解した結果を示す。1回の反応終了ごとに食塩濃度を4%にして酵素を不溶化して回収し、次の反応に用いた。反応を繰り返すごとに相対活性は徐々に低下したが、20回目まで繰り返した後でも1回目の活性の50%以上存在していた。また、20回加水分解反応を繰り返した後の固定化酵素の蛋白質当たりの比活性は、繰り返し反応を行う前の比活性8.5 U/mg-proteinの90%以上であり、酵素の比活性の低下はほとんど認められなかった。しかし、30回目の反応終了時の高分子濃度を1回目と比較した場合、酵素活性と同様に約50%低下していた。したがって、繰り返し加水分解に伴う相対活性の低下は、繰り返し操作において固定化酵素が完全に回収できなかったことが主な原因と考えられる。

図6は温度刺激に対する応答を利用して固定化ダビアーゼを繰り返し用いて0.5%の可溶性デンプンを加水分解した結果を示す。1回の反応終了ごとに温度を30℃から38℃に上げて固定化酵素を不溶化して回収し、次の反応に用いた。加水分解を繰り返すごとに相対活性は徐々に低下したが、20回繰り返した後でも1回目の活性の約50%以上存在していた。また、20回加水分解反応を繰り返した後の酵素比活性は、図5の結果と同様に、繰り返し反応を行う前の90%以上であり、酵素の比活性の低下はほとんど認められなかった。塩刺激に対する応答を利用して繰り返し反応を行った場合と同様に、繰り返し加水分解に伴う相対活性の低下は、繰り返し操作中の固定化酵素の不完全な回収が主な原因と考える。

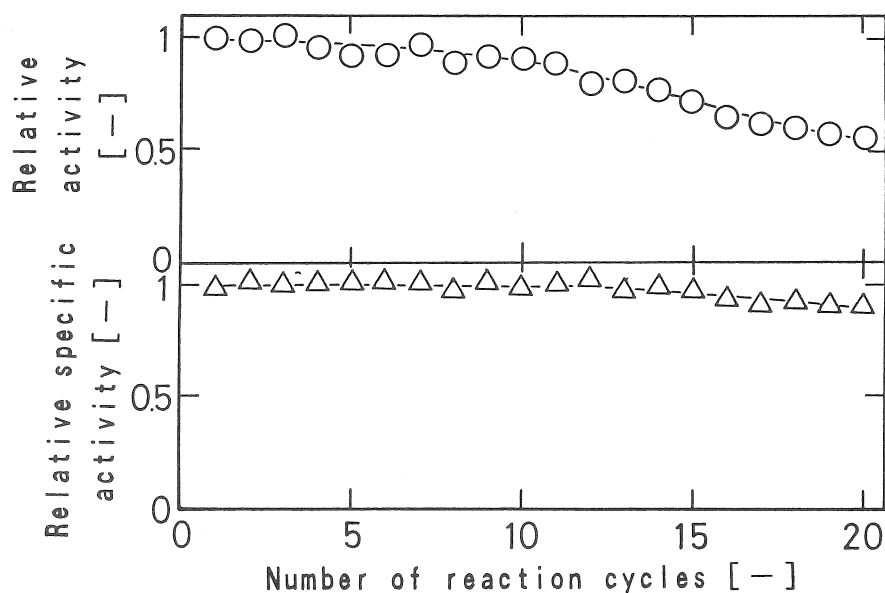


Fig. 5 Repeated hydrolysis of soluble starch with D-GN. D-GN was batchwise insolubilized at 30°C by adding 8% NaCl solution to the reaction medium.

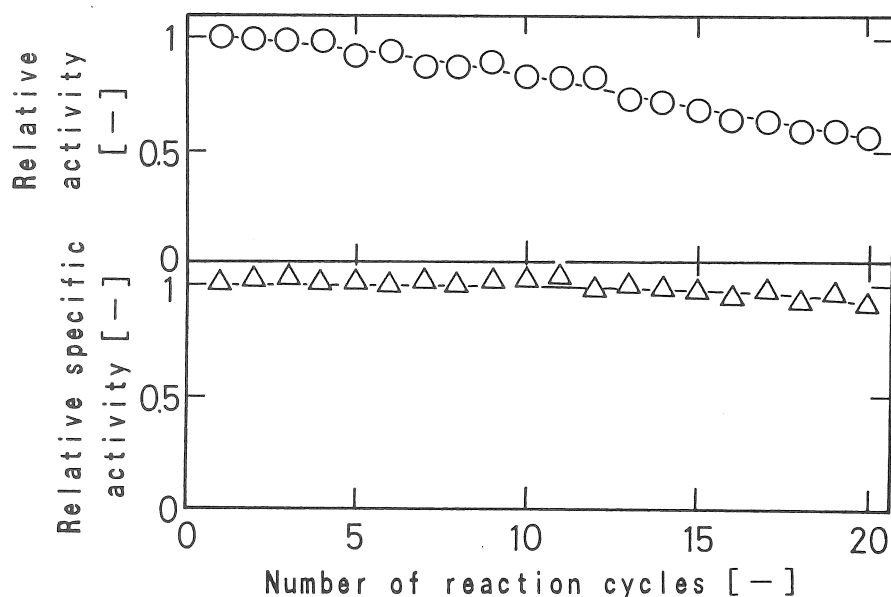


Fig. 6 Repeated hydrolysis of soluble starch with D-GN. D-GN was batchwise insolubilized by elevating the temperature of the reaction medium with 1% NaCl from 30°C to 38°C.

#### 4. 今後の課題

NIPAMとGMAを共重合することにより刺激応答性高分子を調製することができた。本高分子を担体として用いてデンプン分解酵素を固定化することにより、食塩濃度の変化で溶解性が調整できる塩刺激応答性固定化酵素を調製できた。さらに、本固定化酵素を食塩濃度の変化、あるいは温度変化を利用して繰り返し用いることにより可溶性デンプンを加水分解できた。

しかし、酵素を固定化するために調製したNIPAM-GMA共重合体は、pH応答性高分子に比べて、1) 刺激に対する応答速度、2) 操作安定性、3) 共重合体当たりの酵素蛋白質の結含量などの面で劣っていた。また、NIPAM-GMAに固定化した酵素の活性は、可溶性デンプンを基質としたとき比較的高かったが、生デンプンに対する活性は低かった。そこで、今後はこちらの点をさらに検討し、より高性能な塩刺激応答性酵素を調製し、利用したいと考えている。

#### 5. 参考文献

- 1) K.Hoshino, M.Taniguchi, Y.Netsu, and M.Fujii : J. Chem. Eng. Japan, 22, 54-59 (1989).
- 2) M.Taniguchi, K.Hoshino, Y.Netsu, and M.Fujii : J. Chem. Eng. Japan, 22, 313-314 (1989).
- 3) K.Hoshino, M.Taniguchi, Y.Netsu, and M.Fujii : Agric. Biol. Chem., 53, 1961-1967 (1989).
- 4) M.Taniguchi, M.Kobayashi, K.Natsui, and M. Fujii : J. Ferment. Bioeng., 68, 32-36 (1989).
- 5) M.Taniguchi, M.Kobayashi, and M.Fujii : Biotechnol. Bioeng., 34, 1092-1097 (1989).
- 6) K.Hoshino, M.Taniguchi, H.Marumoto, and M.Fujii : J. Ferment. Bioeng., 69, 228-233 (1990).
- 7) M.Taniguchi, S.Tanahashi, and M.Fujii : J. Ferment. Bioeng., 69, 362-364 (1990).
- 8) M.Taniguchi, S.Tanahashi, and M.Fujii : Appl. Microbiol. Biotechnol., 33, 629-632 (1990).
- 9) K.Hoshino, M.Taniguchi, H.Marumoto, K.Shimuzu, and M.Fujii : Agric. Biol. Chem., 55, 479-485 (1991).
- 10) M.Fujii and M.Taniguchi : Trends in Biotechnol., 9, 191-196 (1991).

- 11) M. Taniguchi, K. Hoshino, K. Watanabe, K. Sugai, and M. Fujii : Biotechnol. Bioeng., 39, 287-292 (1992).
- 12) K. Hoshino, M. Taniguchi, M. Katagiri, and M. Fujii : J. Chem. Eng. Japan, 25, 569-574 (1992).

Preparation of a Salt-Responsively Soluble-Insoluble Enzyme and  
Its Application to Hydrolysis of Biomass

Masayuki Taniguchi

Department of Material and Chemical Engineering,  
Faculty of Engineering,  
Niigata University

S u m m a r y

A copolymer of glycidyl methacrylate (GMA) and N-isopropylacrylamide (NIPAM) forms a salt-responsively soluble-insoluble polymer (GMA-NIPAN), whose solubility changes with the NaCl concentration of the solution. An amylase (Dabiase) was immobilized on GMA-NIPAN (D-GN) for saccharification of soluble starch was 90% that of native Dabiase and higher than that of conventional solid immobilized enzymes. D-GN was soluble below 32°C but insoluble above 44°C. When NaCl was added to a buffer solution (pH 5.0) with D-GN, the solubility response of D-GN to a change in temperature was more sensitive than that in the buffer solution without NaCl. In addition, the temperature causing half of the maximum turbidity decreased by about 2.3°C whenever the NaCl concentration of the buffer solution was increased by 1%. D-GN was used successively for repeated hydrolysis of soluble starch, in which D-GN was insolubilized not only by adjusting the NaCl concentration of reaction mixture to 4% at 30°C, but also elevating the temperature of reaction mixture with 1% NaCl from 30°C to 38°C, following by its batchwise recovery from a reaction product by centrifugation.