

9421 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)

共同研究者：星野 一宏(富山大学 工学部)

1. 研究目的

本研究では、これまでに調製した可溶不溶可逆固定化酵素の新しい応用法として、塩や温度刺激を利用して固定化酵素の溶解性を調節することによって、酵素活性の発現をオンオフ制御する方法の開発を目的とする。そこで、まず塩化物やナトリウム塩の種類と濃度に対する本固定化酵素の溶解性の応答について検討した。また、食塩濃度の調節によって本固定化酵素の溶解性を制御する方法および食塩の有無によって酵素の活性を繰り返しオンオフ制御する方法の開発について検討した。

2. 研究方法

2.1 回分反応における活性制御

可溶不溶可逆ダビアーゼ(D-NM)を用いて、生デンプンを30℃において加水分解した。その反応途中で食塩を添加して加水分解反応を継続した。食塩を添加しない加水分解反応におけるグルコース生成量を基準として、各種濃度の食塩を添加した反応におけるグルコース生成量を比較して、活性調節の程度について検討した。

2.2 繰り返し回分反応における活性制御

D-NMを繰り返し用いながら、生デンプンを30℃において加水分解した。各反応の途中で50 g/Lとなるように食塩を添加して加水分解反応を継続した。反応終了後、4℃においてD-NMを溶解した後、遠心分離を行い未反応の生デンプンを除去した。生成物とD-NMを含む上澄液を透析し、D-NMとグルコースおよび食塩を分離した。D-NMを含む透析内液を次の反応に用いた。この反応操作を繰り返した。

3. 研究結果および考察

D-MNを用いて生デンプンの加水分解を開始した後、反応3時間目に所定の濃度になるように食塩を添加して加水分解反応を継続した。添加する食塩濃度が増加するにつれて、グルコースの生成量は徐々に低下した。40g/L以上の食塩を添加することによって、反応をほぼ完全に停止できた。

食塩を添加することによって活性発現を繰り返し調節することを試みた。反応の途中で食塩を添加することによって反応をいったん停止した後、食塩を除くことによって反応を再び始める操作を繰り返した。食塩の添加と除去を繰り返して活性のオンオフ制御を行っても、食塩非存在下におけるD-MNの活性は低下しなかった。

9421 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)

共同研究者：星野 一宏 (富山大学 工学部)

1. 研究目的

pH応答性高分子に数種類の酵素蛋白質を固定化して可溶不溶可逆生体触媒を調製し、それらを既にいくつかの反応に利用してきた。^{1~6)} これらの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、固体基質反応において酵素の利用効率を高めることができた。^{1~6)} また、温度応答性高分子であるN-isopropyl acrylamide(NIPAM)にglycidyl methacrylate(GMA)またはmethacrylic acid(MAA)を共重合させることによって、可溶不溶可逆高分子を調製できることを既に報告した。^{7, 8)} また、これらの高分子にいくつかの酵素蛋白質を共有結合させることによって、可溶状態で固体基質に効率よく作用した後、温度や塩濃度の刺激によって不溶化して回収再利用できる可溶不溶可逆固定化酵素を調製できることも既に報告した。^{7, 8)}

本研究では、これまでに調製した可溶不溶可逆固定化酵素の新しい応用法として、塩や温度刺激を利用して固定化酵素の溶解性を調節することによって、酵素活性の発現をオンオフ制御する方法を開発することを目的とする。そこで、まず塩化物やナトリウム塩の種類と濃度に対する刺激応答性高分子の溶解性の応答について検討した。また、食塩濃度の調節によって可溶不溶可逆固定化酵素の溶解性を制御する方法および食塩の存在の有無によって可溶不溶可逆固定化酵素の活性を繰り返しオンオフ制御する方法の開発について検討した。

2. 研究方法

2. 1 機能性生体触媒の調製

N-isopropyl acrylamide(NIPAM)と組み合わせるモノマーとしてglycidyl methacrylate(GMA)またはmethacrylic acid(MAA)を選択した。刺激応答性高分子は、既に報告した方法によって調製した。^{7, 8)} 刺激応答性高分子の調製においては、生成する高分子の性質と収率に対するNIPAMとGMAまたはMAAの混合比、重合温度、重合時間などの重合条件の影響について検討した。

グルコアミラーゼ製剤であるダビアーゼ (ダイキン工業)^{9, 10)} を選択し、GMA

NIPAMおよびMAA-NIPAM重合体に、既に報告した方法^{7, 8)}によって、それぞれ固定化した。

2. 2 機能性生体触媒の溶解性

刺激応答性高分子（GMA-NIPAM共重合体とMAA-NIPAM共重合体）および刺激応答性生体触媒（D-GN:GMA-NIPAM共重合体に固定化したダビアーゼ、D-MN:MAA-NIPAM共重合体に固定化したダビアーゼ）の温度および各種塩に対する溶解性の応答は、470nmにおける吸光度の変化を測定することによって求めた。

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、可溶性デンプンおよび生デンプン（コーンスターチ）を基質として測定した。反応は0.1M酢酸緩衝液（pH4.5）を用いて、30℃で30分間行った。

2. 4 機能性生体触媒の活性制御

（1）回分反応における活性制御

可溶不溶可逆ダビアーゼ（D-NM）を用いて、生デンプンを30℃において加水分解した。その反応途中に50 g/Lとなるように食塩を添加して加水分解反応を継続した。食塩を添加しない加水分解反応におけるグルコース生成量を基準として、各種濃度の食塩を添加した反応におけるグルコース生成量を比較して、活性調節の程度について検討した。

（2）繰り返し回分反応における活性制御

D-NMを繰り返し用いながら、生デンプンを30℃において加水分解した。各反応の途中に50 g/Lとなるように食塩を添加して加水分解反応を継続した。反応終了後、4℃においてD-NMを溶解した後、遠心分離を行い未反応の生デンプンを除去した。生成物とD-NMを含む上澄液をセロハンチューブを用いて透析し、D-NMとグルコースおよび食塩を分離した。D-NMを含む透析内液を次の反応に用いた。この反応操作を繰り返した。

2. 5 分析方法

刺激応答性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らの方法を用いて測定した。グルコース濃度は酵素法（和光純薬工業）により測定した。

3. 研究結果および考察

3. 1 刺激応答性生体触媒の溶解性

既に報告したように、GMA-NIPAM 共重合体にダビアーゼを固定化しても、その食塩および温度に対する溶解性の応答は、ほとんど変化しなかった。⁷⁾ Figure 1はGMA-NIPAM 共重合体に固定化したダビアーゼ (D-GN) の温度刺激に対する溶解性の応答性を示す。すなわち、各種ナトリウム塩または塩化物が共存するときの温度変化に対するD-GNの溶解性の応答を示す。食塩や硝酸ナトリウムが共存する場合には、32℃から42℃の温度範囲で溶解性が変化した。炭酸ナトリウムや硫酸ナトリウムが共存する場合には、応答する温度範囲は18℃から26℃であった。食塩や硝酸ナトリウムが共存する場合に比べて、応答範囲が低温側へ移動したのはナトリウムイオンの濃度に関係していると考えられる。一方、ナトリウム塩の場合と同様に、食塩を含めて7種類の塩化物について検討した結果、温度応答の範囲および応答性は塩化物の種類によらずほとんど変化しなかった。Figure 2はMAA-NIPAM共重合体に固定化したダビアーゼ (D-MN) の温度刺激に対する溶解性の応答性を示す。すなわち、D-GNの場合と同じように、各種ナトリウム塩または塩化物が共存するときの温度変化に対するD-MNの溶解性の応答を示す。D-GNの場合に比較して、温度に対する応答は鋭く、狭い温度範囲で溶解性を調節できた。しかし、各種塩が共存するときのD-GNとD-MNの刺激応答のメカニズムに関しては、今後詳細に検討する必要がある。

次に、食塩濃度に対するD-GNとD-MNの溶解性の応答について検討した。Figure 3は同一温度において食塩濃度を変化させたときのD-GNとD-MNの溶解性の変化を示す。同一温度において食塩濃度を高くするにつれてD-GNとD-MNは不溶化し、相対濁度は増加した。応答する食塩濃度の範囲は温度が高くなるにつれて低温側に移動した。D-GNは食塩濃度の変化に対していずれの温度においても鈍い応答を示した。一方、D-MNはD-GNと同じような傾向を示したが、食塩濃度の変化に対する応答は鋭くなった。例えば、32℃において食塩濃度を5 g/Lから10 g/Lに高めることによって、D-MNをほぼ不溶化できた。

したがって、D-MNの溶解性は、D-GNの溶解性に比べて、温度ばかりでなく食塩濃度の変化に対しても鋭く応答した。以下の活性発現の制御に関するデンブンの加水分解反応実験においては、応答性の優れているD-MNを用いた。

3. 2 刺激応答性生体触媒の活性

Figure 4は、遊離および固定化酵素 (D-MN) の活性に対する食塩濃度の影響を示す。可溶性デンブunおよび生デンブunを基質として30分間反応した後、生成するグルコース量を測定して活性を求めた。可溶性デンブunを基質としたときには、遊離 (F) および固定化酵素 (I) の活性は、食塩濃度の増加につれてほぼ同じように

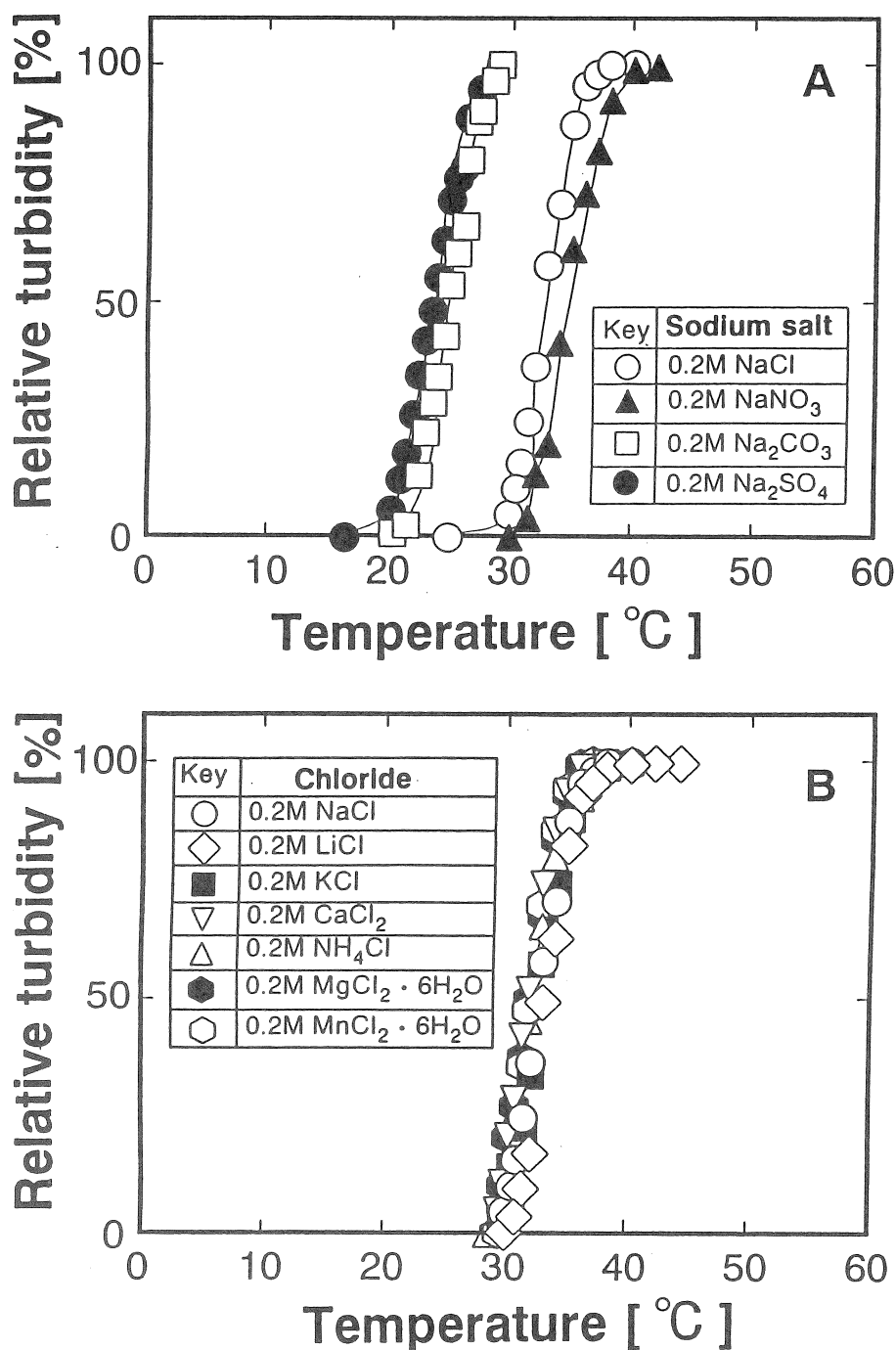


Fig. 1 Response of D-GN solubility to the change in temperatures and effect of addition of different salts on its solubility response.
A:sodium salts, B:chlorides.

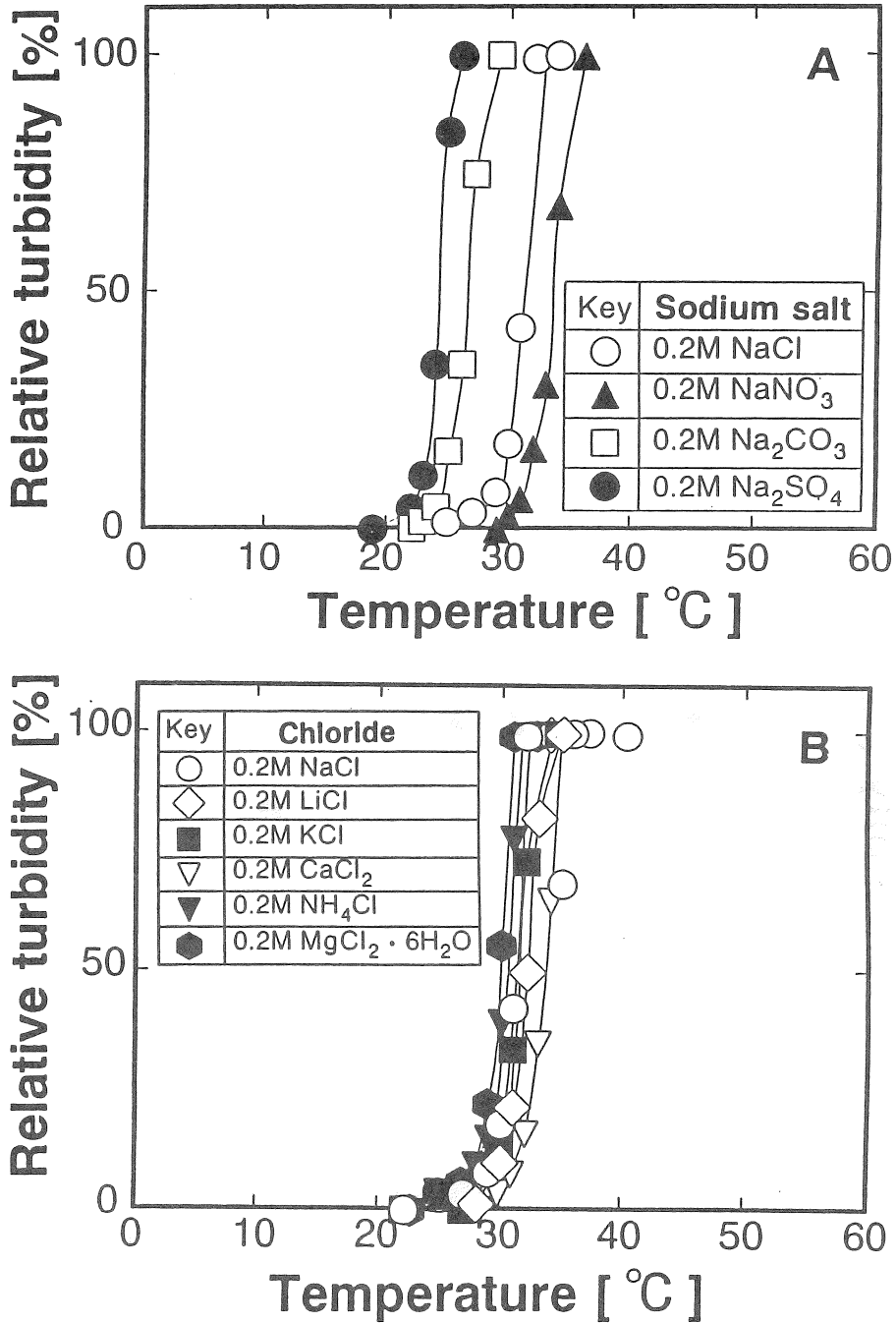


Fig. 2 Response of D-MN solubility to the change in temperatures and effect of addition of different salts on its solubility response.
A:sodium salts, B:chlorides.

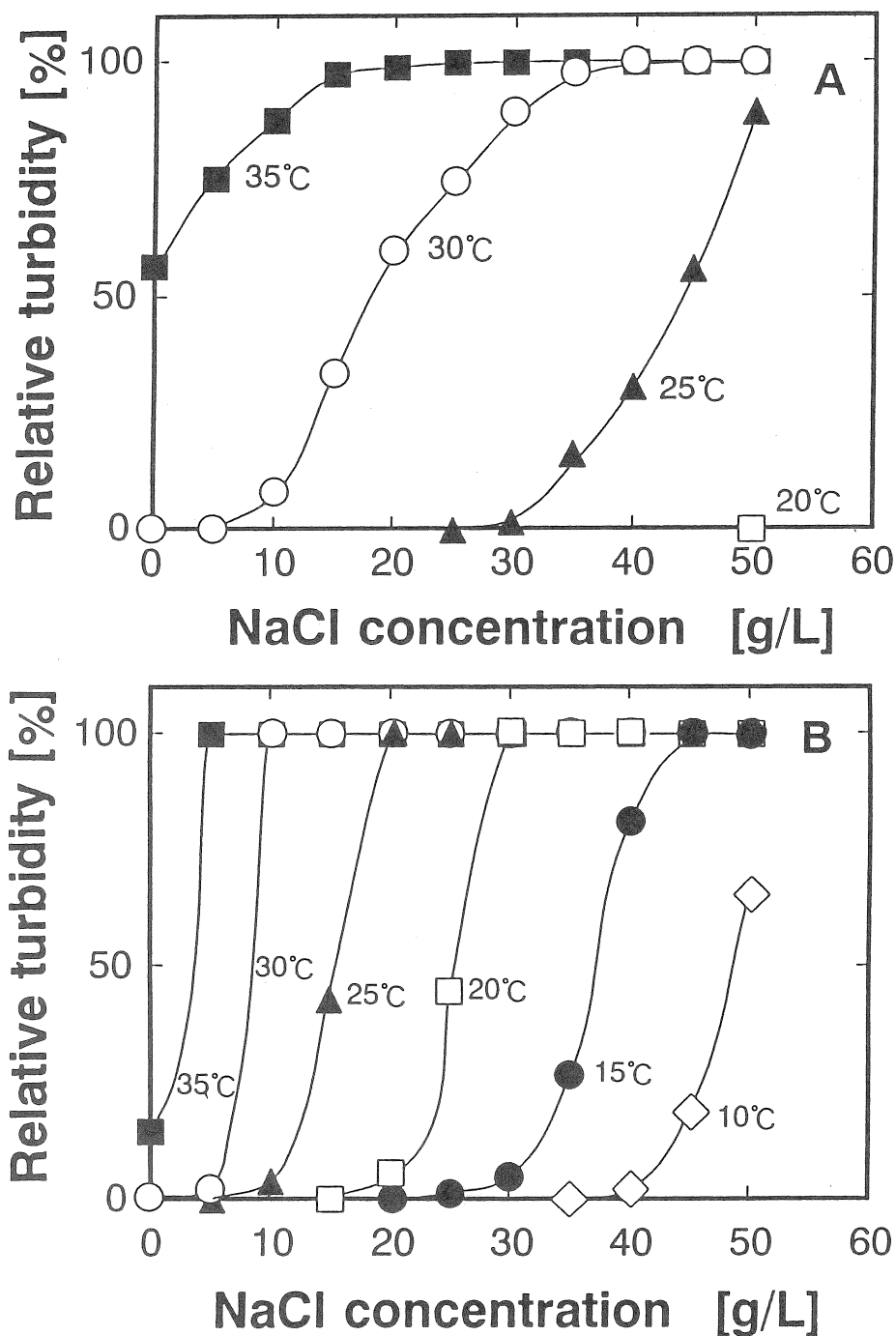


Fig. 3 Response of solubility of immobilized enzymes to the change in NaCl concentrations and effect of addition of temperatures on their solubility response.
A:D-GN, B:D-MN.

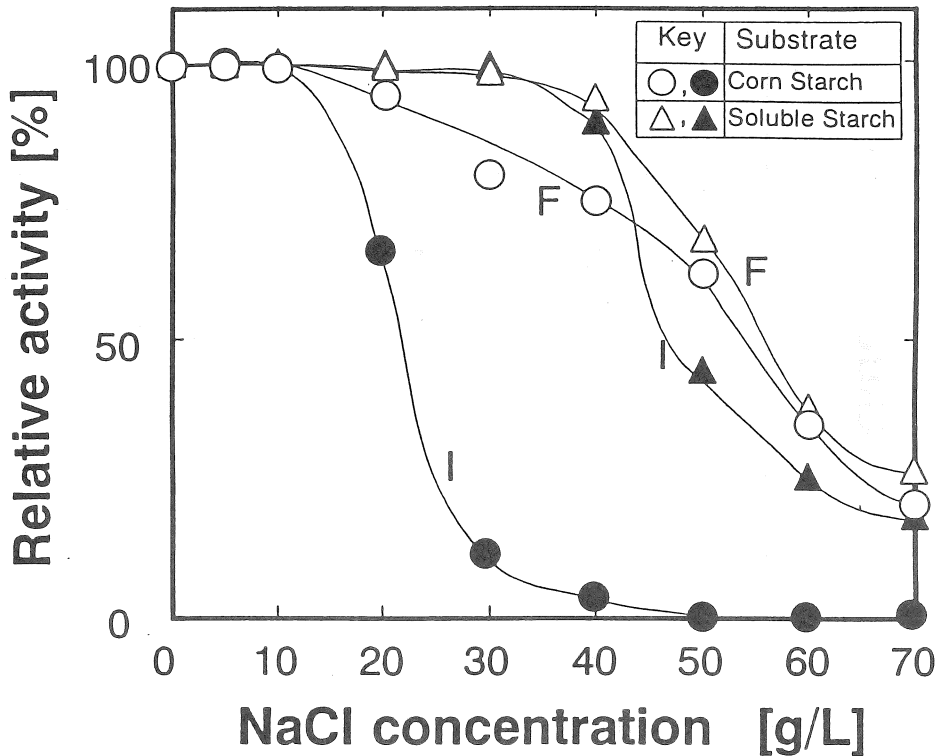


Fig. 4 Effect of NaCl concentration on activity of free and immobilized enzymes.

F: free Dabiase,

I: Dabiase immobilized on MAA-NIPAM.

低下した。一方、生デンプンを基質としたときには、固定化酵素は遊離の酵素に比べて食塩濃度の影響を受けやすく、低い食塩濃度において活性が著しく低下した。例えば、40 g/Lの食塩が存在するときには、遊離酵素の活性は、食塩非存在のときの活性の約75%であったが、D-MNの活性は約4%しか残存していなかった。また、50 g/Lの食塩が存在するときには、遊離酵素の活性は、食塩非存在のときの活性の約62%であったが、D-MNの活性は認められなかった。

以上の結果より、可溶性デンプンを基質としたときには、不溶化したD-MNを用いても加水分解反応は遊離の酵素とほぼ同じように進行するが、生デンプンを基質とした場合には、不溶化した酵素の活性は、食塩濃度に依存して徐々に低下することがわかった。

3. 3 刺激応答性生体触媒の活性制御

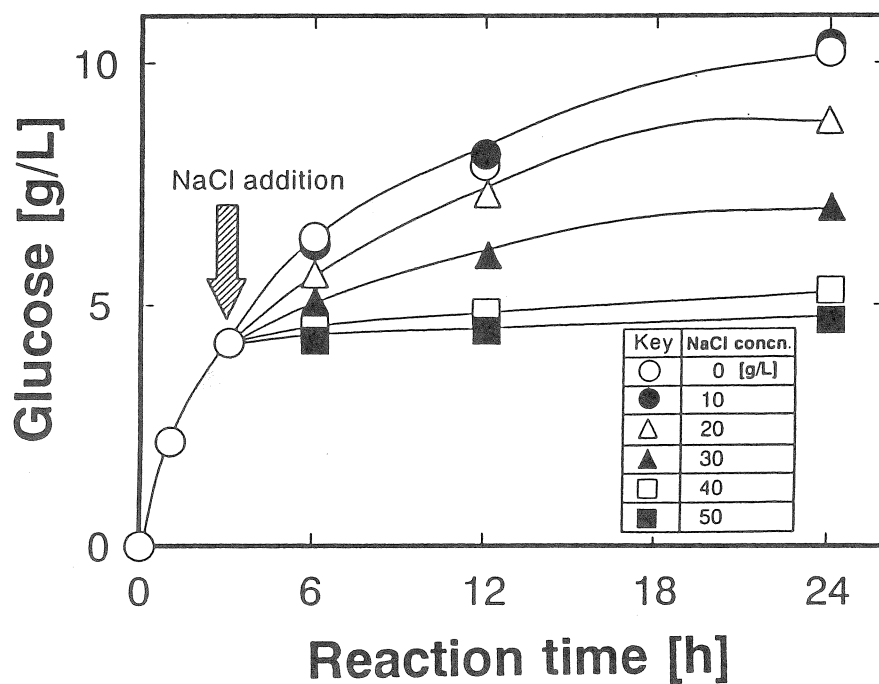


Fig. 5 Regulation of activity of D-MN by NaCl addition.

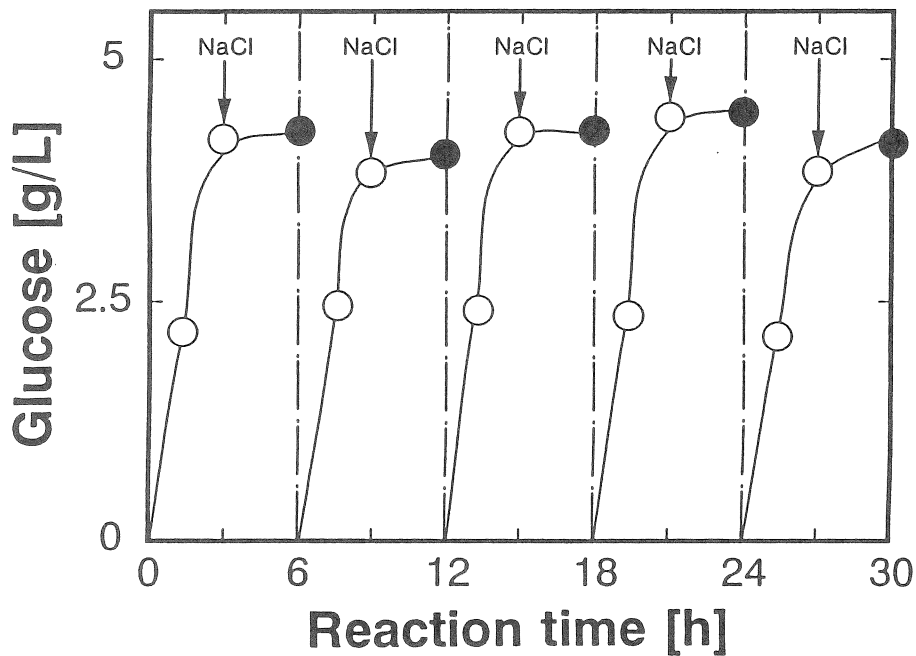


Fig. 6 Repeated regulation of activity of D-MN by NaCl addition.

これまでの結果を踏まえて、反応の途中に食塩を添加することによって、D-MNの活性発現を抑制することを試みた。ある濃度の食塩が存在するか、しないかによって、D-MNの活性発現を制御できれば、反応速度を食塩濃度によって任意に調節できることになるばかりでなく、反応の進行の程度から間接的に食塩濃度を推定することが可能になると考えられる。

Figure 5は、D-MN を用いて生デンプンを加水分解した結果を示す。矢印で示す反応3時間目に所定の濃度になるように食塩を添加して加水分解反応を継続した。添加する食塩濃度が増加するにつれて、グルコースの生成は徐々に抑えられた。40 g/L 以上の食塩を添加することによって、反応をほぼ完全に停止できた。遊離酵素の活性は、Figure 4 に示したように、40および50g/Lの食塩が存在しているときにもそれぞれ約75%および62%残存していることから、食塩の添加によって固定化酵素が不溶化し、活性の発現を抑制できたと考えられる。この結果は、固定化酵素の活性は遊離酵素に比べて食塩濃度の影響を受けやすいというFigure 4 に示した結果と一致する。

次に、食塩を添加することによって活性発現を繰り返し調節することを試みた。活性を抑制した後、食塩を除去することによって再び活性を発現させることができれば、食塩の存在の有無によって酵素活性をオンオフ制御できることになる。

Figure 6は、生デンプンの加水分解反応において、食塩の存在の有無によってD-MNの活性を繰り返しオンオフ制御した結果を示す。反応の途中に食塩を添加することによって反応をいったん停止した後、食塩を除くことによって反応を再び始める操作を繰り返した。すなわち、反応終了時に温度を4℃まで下げてD-MNを可溶化した後、遠心分離して未分解の生デンプンを除去した。その後、上澄液を透析することによって食塩および生成物であるグルコースを除去した。可溶化しているD-MNを含む透析内液を回収し、次の反応に利用した。Figure 6 からわかるように、食塩の添加と除去を繰り返して活性のオンオフ制御を行っても、食塩非存在下におけるD-MNの活性は低下しなかった。

4. 結 論

GMAまたはMAAをNIPAMと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。これらの高分子を担体として生デンプン分解酵素であるダビアーゼを固定化することにより、食塩および温度変化によって溶解性が調節できる刺激応答性固定化酵素を調製できた。また、生デンプンを基質とした加水分解反応において、食塩を添加することによって本固定化酵素の活性を抑制することができた。さらに、食塩を添加することによって活性を抑制した後、食塩を除去することによって再び

活性を発現させる反応操作を繰り返した結果、食塩の存在の有無によって酵素活性をオンオフ制御できることがわかった。

参考文献

- 1) K. Hoshino, M. Taniguchi, Y. Netsu, and M. Fujii : *J. Chem. Eng. Japan*, **22**, 54 (1989).
- 2) K. Hoshino, M. Taniguchi, Y. Netsu, and M. Fujii : *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1961 (1989).
- 3) M. Taniguchi, M. Kobayashi, and M. Fujii : *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 1092 (1989).
- 4) M. Taniguchi, S. Tanahashi, and M. Fujii : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **33**, 629 (1990).
- 5) M. Taniguchi, K. Hoshino, K. Watanabe, K. Sugai, and M. Fujii : *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 287 (1992).
- 6) K. Hoshino, T. Sasakura, K. Sugai, M. Taniguchi, and M. Fujii : *J. Chem. Eng. Japan*, **27**, 260 (1994).
- 7) K. Hoshino, M. Taniguchi, M. Katagiri, and M. Fujii : *J. Chem. Eng. Japan*, **25**, 569 (1992).
- 8) K. Hoshino, M. Katagiri, M. Taniguchi, T. Sasakura, and M. Fujii : *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 407 (1994).
- 9) F. W. Bergmann, J. Abe, and S. Hizukuri : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **27**, 443 (1988).
- 10) J. Abe, W. F. Bergmann, K. Obata, and S. Hizukuri : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **27**, 447 (1988).

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

Masayuki Taniguchi¹ and Kazuhiro Hoshino²

¹ *Department of Chemistry and Chemical Engineering, Niigata University.*

² *Department of Chemical and Biochemical Engineering, Toyama University.*

Summary

A copolymer of methacrylic acid (MAA) and N-isopropyl acrylamide (NIPAM) was used as a novel reversibly soluble-insoluble support whose solubility changes depending on the NaCl concentration of the solution at a constant temperature. Amylase (Dabiase K-27) immobilized covalently on the salt-responsive polymer showed good response of solubility: The immobilized enzyme (D-MN) was in a soluble state below 0.5% NaCl, but in insoluble form above 1.0% NaCl at 30 °C. D-MN in a soluble state has a high specific activity for hydrolysis of uncooked starch. When more than 2.0% NaCl was added to a buffer solution (pH 4.5) with D-MN at 30 °C, the activity of D-MN for uncooked starch was lower than that in the buffer solution without NaCl. As the NaCl concentration of the buffer solution became high, the activity of D-MN decreased gradually. The activity of D-MN was repressed completely by adding NaCl to the buffer solution at 5%.

On the basis of these results, we tried to regulate the activity of D-MN by changes of NaCl concentration during hydrolysis reaction of uncooked starch. At 3 hr of a reaction time, by adding NaCl to a reaction medium at 5%, the hydrolysis was stopped. After removing NaCl from the reaction medium by dialysis, D-MN could be used successively for repeated hydrolysis reactions of uncooked starches, in which D-MN was insolubilized by adjusting the NaCl concentration of a reaction mixture at 30 °C from 0% to 5%.