

界面活性剤被覆ペルオキシダーゼの調製と有機溶媒中における活性

京都大学工学研究科 正員 越川博元 三次保匡
学生員 大河内由美子 フェロー 寺島泰

1. はじめに

近年、科学技術の進歩に伴ってさまざまな化学物質が広く利用され、多くの製品を生みだし、日常生活の利便性に大きく貢献してきた。同時に環境中に放出される化学物質の種類や量が増加傾向にあり、これらの中には分解・処理が困難である農薬や環境ホルモン物質など、生態系および生体への何らかの悪影響を与えるものが多い。

これらに対して物理化学的、あるいは生物学的処理の研究が進められているが、問題となる物質の多くは水に難溶かあるいは不溶であることが多く、水相での分解や処理は困難であることが多い。逆にこれらの化学物質は有機溶媒には溶解しやすいが、有機溶媒中では微生物は死滅してしまい、酵素は変性してしまうため、その機能・活性を失ってしまうというジレンマがある。一方、有機合成の分野で疎水性基質の利用という観点から、1988年岡畑と居城¹⁾により酵素を界面活性剤で被覆した界面活性剤被覆酵素が提案され、有機溶媒中での酵素活性を発現するための新たな手法が報告されている。

このような観点から、本研究では酵素としてペルオキシダーゼを選択し、ペルオキシダーゼを界面活性剤で被覆した界面活性剤被覆ペルオキシダーゼによる難・非水溶性難分解性物質の分解について検討することを目的とした。本報では被覆ペルオキシダーゼの調製条件およびその基本的特性について報告する。

2. 実験方法

1) 界面活性剤被覆ペルオキシダーゼの調製

界面活性剤には span60 (和研薬) を使用した。0.1g の span60 をイソオクタン 22.5ml 中に溶解し、これに予めペルオキシダーゼ (TOYOBO) 2.5mg を溶解した 50mM リン酸緩衝液 (pH7.5) 2.5ml を添加した。さらに、十分に分散させることを目的として超音波ホモジナイザを用いて超音波を照射することにより、ペルオキシダーゼが溶解している水相が span60 で覆われた逆ミセルを形成させた。しばらく室温で放置することにより逆ミセルを沈降させ、注意深く上澄みを取り除いて逆ミセルを採取した。これを予備凍結したのち、凍結乾燥機を用いて約4時間乾燥させることにより界面活性剤被覆ペルオキシダーゼを調製した。その模式図を図1に示した。

2) 界面活性剤被覆ペルオキシダーゼの活性

ペルオキシダーゼは過酸化水素を基質としてラジカルを発生させる反応を触媒する。このとき α -フェニレンジアミンは、生じたラジカルにより酸化されて赤色を呈する。活性は、吸光度計 (SHIMADZU 社製 UV-2500PC) を用いて、この酸化された α -フェニレンジアミンの増加を波長 490nm における吸光度の変化から測定した。1分間に $1\mu\text{mol}$ の α -フェニレンジアミンを酸化するのに必要なラジカルを生じるペルオキシダーゼ量を1ユニット (U) とし、界面活性剤被覆ペルオキシダーゼ 1mg あたりのユニット数を比活性 (Specific Activity, U/mg) と定義した。なお、酸化された α -フェニレンジアミンのモル吸光係数は $2 \times 10^3 (1/\text{mol} \cdot \text{cm})$ である²⁾。反応はベンゼン中でおこない、 α -フェニレンジアミンを 100mM、ベンゼン飽和過酸化水素³⁾を 0.5mM とした。過酸化水素を含まない系を対照実験とした。反応温度は特に断らない限り、室温 (20) とした。

3) ベンゼン中におけるペルオキシダーゼ活性に対する界面活性剤の被覆効果

反応開始から5分間の波長 490nm における吸光度の変化を追跡した。非被覆ペルオキシダーゼについても同様の手順でベンゼン中における吸光度の変化を測定した。なお、被覆ペルオキシダーゼおよび非被覆ペルオキシダーゼのいずれの場合においても、反応の全量は 1.2ml 中とし、ペルオキシダーゼとしての量が 0.015mg になるように設定し、触媒としてのペルオキシダーゼ量を統一した。

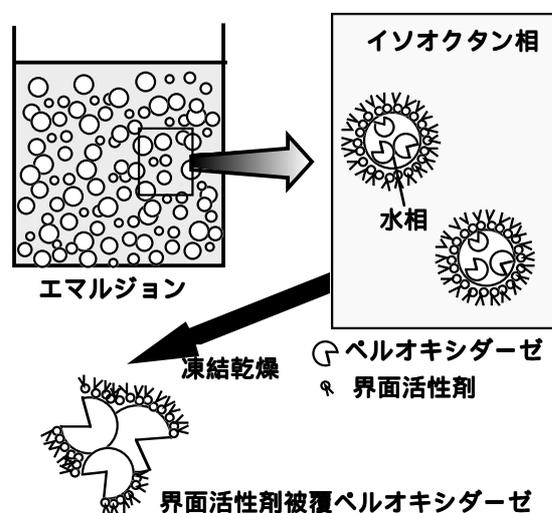


図1 界面活性剤被覆ペルオキシダーゼ

キーワード：ペルオキシダーゼ、界面活性剤、被覆酵素、非水溶性

〒606-8501 京都市左京区吉田本町 京都大学大学院工学研究科環境工学専攻 Tel&Fax：075-753-5171

4)界面活性剤被覆ペルオキシダーゼの調製時に用いる酵素溶液pHの活性に対する影響

酵素のアミノ基・カルボキシル基をはじめとして、その他の解離基のイオン化状態はpHにより変化する。活性部位の解離基の状態は活性に影響し、他の解離基も酵素タンパク質の三次元構造、すなわちコンフォメーションに影響する。酵素溶液のpHに応じて酵素はそのコンフォメーションが変化するが、その状態で凍結乾燥され、さらに有機溶媒中においてそのコンフォメーションは剛直になるため、調製時に用いる酵素溶液のpHは界面活性剤被覆酵素の活性に大きな影響を与えることが予想される。そこで、ペルオキシダーゼ溶液のpHが界面活性剤被覆ペルオキシダーゼの活性に与える影響について検討した。

ペルオキシダーゼ溶液のpHは3,4,5,6,7,8,9,10とし、それぞれのペルオキシダーゼ溶液から界面活性剤被覆ペルオキシダーゼを調製してその活性を測定した。なお、ペルオキシダーゼを溶解する際に用いる緩衝液については、濃度を50mMとし、pH3,4,5はクエン酸緩衝液、pH6,7,8はリン酸緩衝液、pH9,10はホウ酸緩衝液とした。

5)活性に対する界面活性剤とペルオキシダーゼの量比の影響

界面活性剤被覆ペルオキシダーゼの調製過程で、界面活性剤の量が少ないとペルオキシダーゼを十分に被覆することができない、逆に多すぎる場合には必要以上にペルオキシダーゼを被覆することにより、結果として活性の低下を招くことが懸念される。ここでは最大活性を与える界面活性剤とペルオキシダーゼの量比をもとめることを目的とした。ペルオキシダーゼ量は2.5mgとして一定に設定し、span60を20,50,80,100,120,150,200mgと変化させて界面活性剤被覆ペルオキシダーゼを調製した。これら7種類の界面活性剤被覆ペルオキシダーゼのベンゼン中における活性を測定し、比較した。なお、ここでは比活性をペルオキシダーゼ1mgあたりのユニット数(U/mg-ペルオキシダーゼ)とした。

3. 実験結果と考察

得られた結果をそれぞれ、図2から4に示した。図3,4では最大活性を100とした相対活性を示した。図2ではspan60で被覆しなかったペルオキシダーゼはベンゼン中で失活したにも関わらず、被覆ペルオキシダーゼの場合では反応開始直後から急速に吸光度が増加しており、被覆によってベンゼン中においてもペルオキシダーゼはその活性を保持していた。図3から被覆ペルオキシダーゼの活性には、調製段階におけるペルオキシダーゼ水溶液のpHが大きく影響することがわかった。また図4から、被覆に用いるspan60とペルオキシダーゼの量比についても最適比があることが示唆され、本研究の範囲では1mgのペルオキシダーゼに対してspan60が40mgとなるように調製することで、最大活性が得られることが分かった。現在、反応温度・保存温度などへの被覆によるペルオキシダーゼの保護効果、アセトニトリル等の溶媒中での反応や分解実験を試みている。

4. 参考文献

- 1) Okahata, Y., Ijiro, K., A Lipid-coated Lipase as a New Catalyst for Triglyceride Synthesis in Organic Solvents, Chem. Soc., Chem. Commun., 1392, 1988
- 2) Yoshimoto, T. *et al.*, Polyethylene glycol derivative-modified cholesterol oxidase soluble and active in benzene, Biochem. Biophys. Research Communications, 876-882, 148, 1987
- 3) Mabrouk, P., The Use of Nonaqueous Media to Probe Bio-chemically Significant Enzyme Intermediates, J. Am. Chem. Soc., 117, 2141, 1995

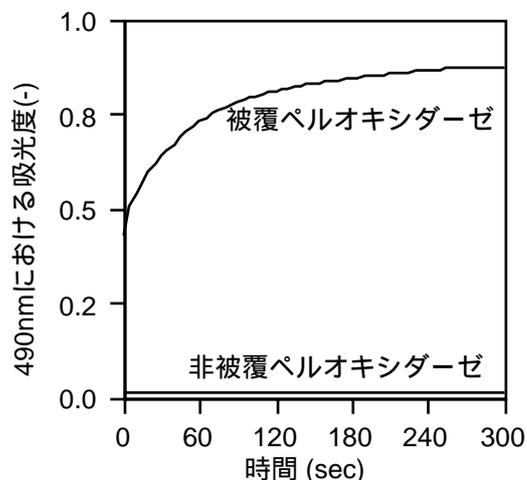


図2 界面活性剤の活性に対する被覆効果

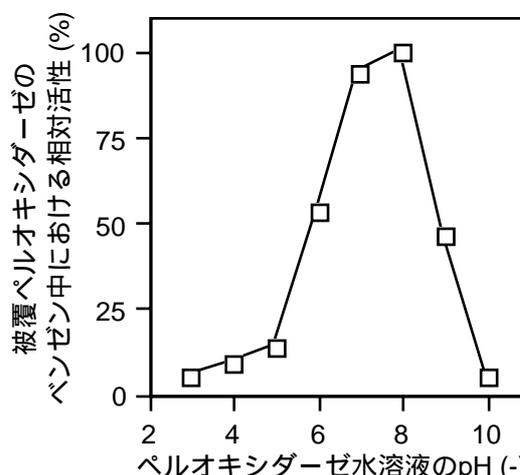


図3 被覆ペルオキシダーゼの活性に対するペルオキシダーゼ水溶液のpHの影響

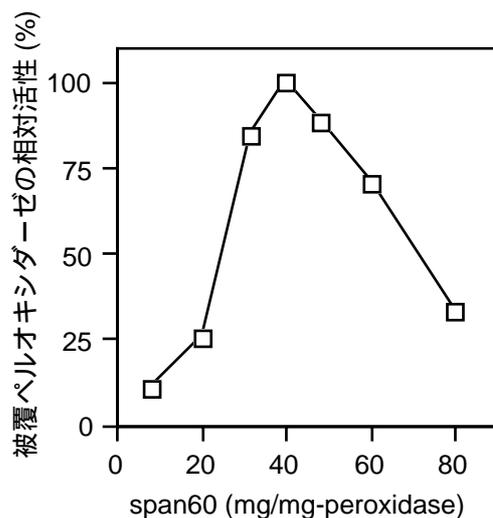


図4 span60とペルオキシダーゼの量比が及ぼす活性への影響