界面活性剤被覆ペルオキシダーゼへの固定化法の適用とその活性

京都大学大学院工学研究科　正員　○越川博元　永山博秋
国立環境研究所　正員　大河内由美子　大阪産業大学　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（以下、被覆ペルオキシダーゼと表記）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ている。本報では被覆ペルオキシダーゼに固定化法を適用し、その基本的特性について報告する。

２．実験方法

1)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、充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。

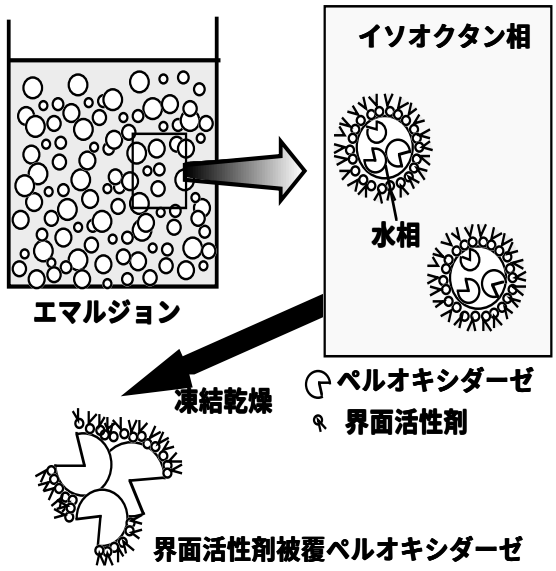

図1　被覆ペルオキシダーゼの調製方法

2)被覆ペルオキシダーゼの固定化

ポリエチレングリコール(PEG)を使用して、被覆ペルオキシダーゼを以下の手順で固定化した。すなわち、1mLのイソオクタンに1mg/mLとなるよう溶解した被覆ペルオキシダーゼを10%PEG50mMリン酸緩衝液(pH7.5)5mLに添加し、超音波を照射して十分に懸濁してエマルションとしミセルを形成させた。さらに、span60を溶解して10mMとしたイソオクタン35mLを別途用意し、得られたエマルションをこれに添加・懸濁した後、凍結乾燥して得られたものを固定化被覆ペルオキシダーゼとした。図2にその模式図を示す。

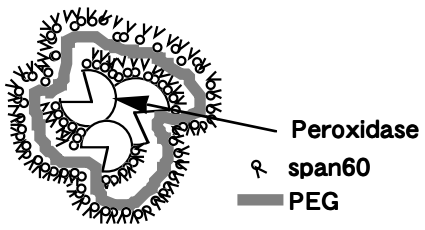

図2　固定化被覆ペルオキシダーゼ

3)被覆ペルオキシダーゼの活性の定義と測定方法

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o-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o-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

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、固定化
〒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

1μmolのo−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、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−complex）と定義した。なお、酸化されたo−フェニレンジアミンのモル吸光係数は2×10^3(1/mol･cm)である[2]。また、固定化被覆ペルオキシダーゼの比活性は固定化に供した被覆ペルオキシダーゼ1mgあたりのユニット数で表記することとした。反応温度は特に断らない限り、室温（20℃）とした。

4)アセトニトリル中における被覆ペルオキシダーゼ活性

反応開始から10分間の波長490nmにおける吸光度の変化を追跡した。反応の全量は1.2mlとし、被覆ペルオキシダーゼ量を変化させた。基質となる過酸化水素は過酸化水素水として供給し、その濃度は10mMとした。

5)固定化被覆ペルオキシダーゼの活性

固定化被覆ペルオキシダーゼの活性を測定するため、その濃度を変えて波長490nmにおける吸光度の変化を測定した。過酸化水素は過酸化水素水として10mMとし、アセトニトリル中で反応させた。またo−フェニレンジアミンの最終濃度は100mM、固定化に供したPEGは平均分子量6,000のものを使用した。

6)被覆ペルオキシダーゼの活性に対する固定化の影響

一般に微生物や酵素を固定化するとその調製過程で活性の一部が失われる。固定化被覆ペルオキシダーゼの調製においても同様に、固定化に供する被覆ペルオキシダーゼの活性の一部が失われることが予想される。また、PEGにも平均分子量によりいくつか種類があるため、その選択によっては固定化の操作による活性の消失に影響することも考えられる。そこで平均分子量が6,000および20,000のPEGを使用して固定化をおこない、その残存活性を測定することとした。比活性は固定化被覆ペルオキシダーゼについては固定化に供した被覆ペルオキシダーゼ1mgあたりのユニット数(U/mg−complex)として計算し、固定化前の被覆ペルオキシダーゼの活性に対する残存活性として比較することとした。

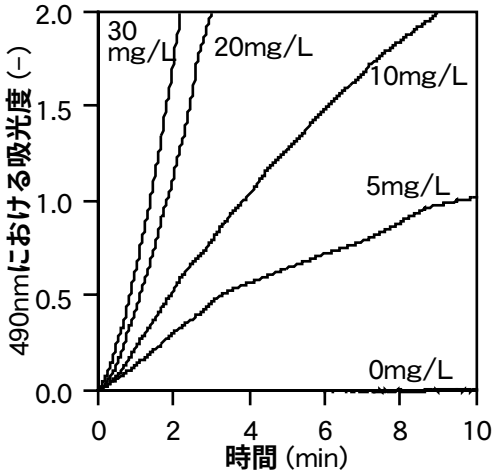

図3　被覆ペルオキシダーゼの活性

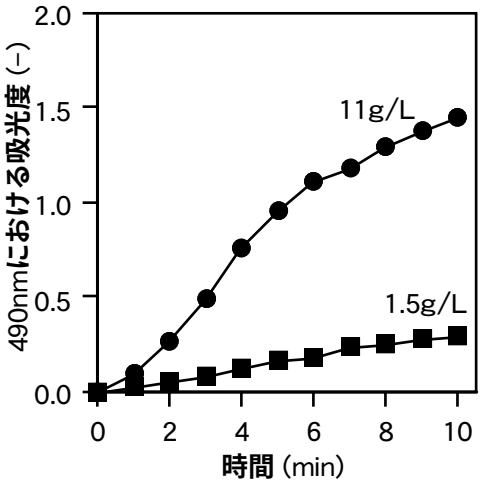

図4　固定化被覆ペルオキシダーゼの活性

3．実験結果と考察

得られた結果をそれぞれ、図3, 4および表1に示した。図3より調製した被覆ペルオキシダーゼは極性を有するアセトニトリル中でも活性を示し、基質となる過酸化水素が十分に存在するためベンゼン中よりもよい活性を示した[4]。また平均分子量6,000のPEGで固定化をおこなった場合、活性を示すが図4のように濃度の単位がおおよそ1000倍となり見かけの活性が低いことが分かる。これは表1に示した残存活性でも再現されているが、平均分子量20,000のPEGでは残存活性が比較的高いことから、PEGの選択が重要であることが分かった。

表1　被覆ペルオキシダーゼの活性に対する固定化の影響

	固定化前	固定化後	
		#6,000	#20,000
比活性 (U/mg−complex)	15.2	1.47	9.06
残存活性 (%)	100	9.7	59.6

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. Biophy. Research Communications, 876-882, 148, 1987

3)P.Mabrouk:The Use of Nonaqueous Media To Probe Bio- chemically Significant Enzyme Intermediates, J. Am. Chem. Soc, 117,2141,1995

4)越川博元、三次保匡、大河内由美子、寺島泰：土木学会第55回年次学術講演会、VII-004