

シンポジウム(不溶化酵素)

436

不溶化複数酵素系における粒子内拡散の影響

(阪大・薬) ○宮本和久, 藤井とも子, 岡崎光雄, 三浦喜温

1. 目的 不溶化酵素の応用範囲を拡大するためには複数酵素系の不溶化が今後の課題であると考えられるが, この分野の研究は比較的少ないのが現状である。複数の酵素を不溶化する方式は, 一つの担体にすべての酵素を結合または包括する場合 (Compounded System, C-System と略記する) とそれぞれの酵素を別々の担体に不溶化し反応時に混合して使用する場合 (Mixed System, M-System) とに大別される。一方, 多孔性あるいはゲル構造を有する担体を用いると粒子内拡散が総括の活性に影響を及ぼすことが多い。ここでは C-System および M-System の反応成績に粒子内拡散がどのような影響を与えるかを検討した。

二酵素系の不溶化については, hexokinase (HK) と glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH) を用いて C-System の利点を指摘した Mosbach ら¹⁾ の報告があり, Goldman ら²⁾ は膜表面に結合した二酵素反応をモデルとして境膜拡散の影響を解析している。

2. 方法 酵素として glucoamylase (生化工学工業, Fine Grade), HK (Boehringer, 140 U/mg) および G-6-PDH (Boehringer, 140 U/mg) を用いた。イオン結合法不溶化 glucoamylase は Amberlite 樹脂 (CG-50 Type I, II および III) を懸濁した酢酸緩衝液に酵素溶液を加え, 40℃・24 時間の吸着操作を行なって調製した。ポリアクリルアミド不溶化酵素の調製は Hicks ら³⁾ の方法に準拠した。glucoamylase の活性は maltose を基質として反応を行ない生成した glucose を Glucostat 法で追跡することによって求めた。HK と G-6-PDH とは触媒される反応は, 最終生成物である gluconolactone-6-phosphate の生成とカップリングする NADPH の生成を 340 mμ の吸収変化で追跡する方法によった。

3. 結果 不溶化酵素系における粒子内拡散 Amberlite 樹脂を用いて調製した不溶化 glucoamylase は担体の粒径によって異なる活性を示した。maltose の加水分解反応について, 粒径とみかけの活性化エネルギー (E_{app}) との関係を求めたところ, 粒径が大きくなるにしたがって E_{app} が低下した。さらに, 粒径の大きい担体の場合でも酵素を担体の表面近傍にのみ結合させる (吸着時間を1時間に短縮した) と, 比活性は粒子が十分に小さいときのレベルまで回復した。このような現象はすべて本系における粒子内拡散の関与を示すものである。ポリアクリルアミド法不溶化酵素の場合においても, 調製した酵素ゲルを破砕・篩分して用いると粒径による活性の差が認められた。

不溶化二酵素系の反応 二酵素反応の例として HK および G-6-PDH をポリアクリルアミド法で不溶化し, NADPH 生成の時間経過を追跡したところ Fig. 1 に示すような結果が得られた。C-System および M-System について各反応過程の活性が等しくなるように調製したにもかかわらず M-System における NADPH の生成に lag が認められ, かつその後の反応速度も明らかに小さい。この現象が前項で示した粒子内拡散の影響として説明し得るかを検討するため, 定常状態における両者の挙動を解析した。

二酵素反応系の解析 $A \xrightarrow{k_1} B \xrightarrow{k_2} C$ なる逐次反応を触媒する二種の酵素が球形の担体内に均一に不溶化されているものとする。反応はいずれも1次であり, 完全混合槽を用いて

連続反応を行なう場合を考える。境膜拡散の無視し得る条件下で定常状態における成分 A, B, C についての物質収支式を解くと、各成分の出口濃度 C_{AS} , C_{BS} , C_{CS} が得られる。最終生成物 (C_{CS}) について示すと、

$$\langle \text{C-System} \rangle \quad \frac{C_{CS}}{C_{A0}} = \frac{P}{m_1^2 - m_2^2} \left\{ \frac{m_1^2 (m_2 \coth m_2 - 1)}{1 + P(m_2 \coth m_2 - 1)} - \frac{m_2^2 (m_1 \coth m_1 - 1)}{1 + P(m_1 \coth m_1 - 1)} \right\} \quad (1)$$

$$\langle \text{M-System} \rangle \quad \frac{C_{CS}}{C_{A0}} = \frac{P^2 (m_1 \coth m_1 - 1) (m_2 \coth m_2 - 1)}{\{1 + P(m_1 \coth m_1 - 1)\} \{1 + P(m_2 \coth m_2 - 1)\}} \quad (2)$$

ただし、 $m_1 = R\sqrt{k_1/D_e}$, $m_2 = R\sqrt{k_2/D_e}$,
 $P = (C_{De} \cdot A \cdot \tau) / (V \cdot R)$ および $\tau = V/F$
 である。

平均滞留時間 (τ) を変数として計算した例を Fig. 2 に示した。同一の操作条件では C-System の方が常に高い C_{CS} を与えることが判る。また粒子内拡散の関与の程度 (ここでは粒子の半径をパラメーターとした) が大であるほど C_{CS} の差は著しい。このように逐次反応の最終生成物に注目する場合に C-System が望ましい訳であるが、pH、温度などの至適条件を異にする酵素系に対してはこれらの諸因子をも含めて最適化を図ることが必要である。

なお連続反応実験の結果についても併せて報告する予定である。

<記号>

A: 不溶化酵素粒子の全表面積
 C_{A0} : 入口基質濃度
 D_e : 粒子内での有効拡散係数
 F : 基質溶液の体積流速
 R : 粒子の半径
 V : 反応器の実容積

<文献>

- 1) K. Mosbach and B. Mattiasson, *Acta Chem. Scand.*, **24**, 2093 (1970).
- 2) R. Goldman and E. Katchalski, *J. theor. Biol.*, **32**, 243 (1971).
- 3) G. P. Hicks and S. J. Updike, *Anal. Chem.*, **38**, 726 (1966).

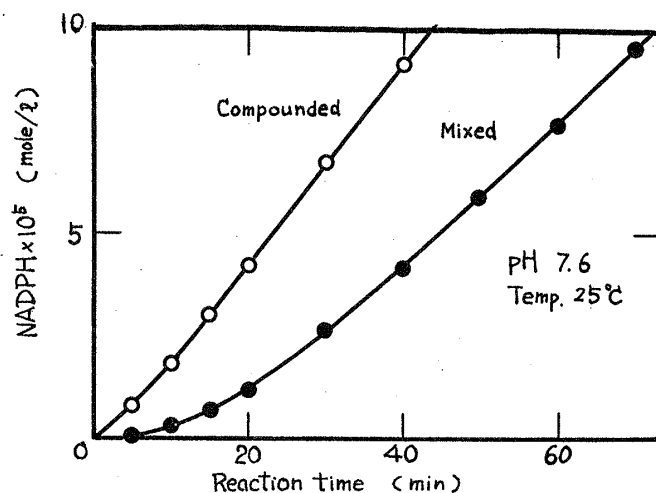


Fig. 1

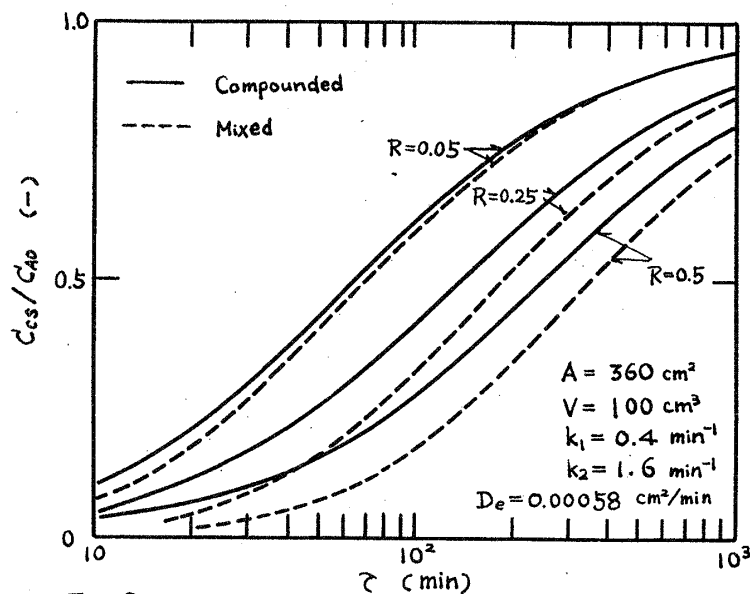


Fig. 2