

## 第3章 有機溶媒／水系における酵素の安定性の向上

### 3-1 実験

#### 3-1-1 使用試薬

##### ・ 酵素

$\alpha$ -キモトリプシン ( $\alpha$ -CT)

スブチリシン BPN' (STB)

スブチリシン Carlsberg (STC) (EC 3.4.21.62, Type VIII)

pH 7.5, 37 °Cの条件下でカゼインの加水分解において 11.6 unit の活性を持つ.

以上 Sigma Chemical Company より購入.

##### ・ アミノ酸

*N*-アセチル-L-チロシンエチルエステル (ATEE)一水和物 分子量 269.3

酵素反応の基質として使用した. Sigma Chemical Company より購入.

*N*-アセチル-L-チロシン (AT) 分子量 223.23

HPLC の検量線作成のため使用した. Sigma Chemical Company より購入.

*N*-アセチル-L-チロシンメチルエステル (ATME)一水和物 分子量 255.3

基質, HPLC の検量線作成のため使用した. 後に述べる方法で合成した.

##### ・ 有機溶媒 (試薬特級をモレキュラーシーブズを用いて脱水した後に使用)

アセトニトリル 分子量 41.05

1,4-ジオキサン 分子量 88.10

メタノール 分子量 32.04

・ 添加剤および共凍結乾燥剤

ホルムアミド 分子量 45.04

*N*-メチルホルムアミド (MF) 分子量 59.07

東京化成工業株式会社より購入

*N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF) 分子量 73.10

アセトアミド 分子量 59.07

ジメチルスルホキシド (DMSO) 分子量 78.14

アセトン 分子量 58.08

2,2,2-トリフルオロエタノール (TFE) 分子量 100.04

東京化成工業株式会社より購入

エチレングルコール (EG) 分子量 62.07

エチレングリコール (EG) モノメチルエーテル 分子量 76.10

$\alpha$ -シクロデキストリン ( $\alpha$ -CyD) 分子量 972.85

$\beta$ -シクロデキストリン ( $\beta$ -CyD) 分子量 1135.00

$\gamma$ -シクロデキストリン ( $\gamma$ -CyD) 分子量 1297.14

2,6-ジ-*O*-メチル- $\beta$ -シクロデキストリン (Di-Me- $\beta$ -CyD)

分子量 1331.37

2,3,6-トリ-*O*-メチル- $\beta$ -シクロデキストリン (Tri-Me- $\beta$ -CyD)

分子量 1429.54

ヒドロキシプロピル- $\alpha$ -シクロデキストリン モル置換率 0.6

(HP- $\alpha$ -CyD(0.6)) 分子量~1180

モル置換率とはグルコース 1 単位当たりの置換されている水酸基の数である。

Aldrich より購入

ヒドロキシプロピル- $\beta$ -シクロデキストリン モル置換率 0.6

(HP- $\beta$ -CyD(0.6)) 分子量~1380 Aldrich より購入

ヒドロキシプロピル- $\beta$ -シクロデキストリン モル置換率 1.0

(HP- $\beta$ -CyD(1.0)) 分子量~1540 Aldrich より購入

ヒドロキシプロピル- $\gamma$ -シクロデキストリン モル置換率 0.6

(HP- $\gamma$ -CyD(0.6)) 分子量~1580 Aldrich より購入

D(+)-グルコース (ブドウ糖) 分子量 180.16

マルトース (麦芽糖) 一水和物 分子量 360.32

デキストリン

デンプン トウモロコシ製

D(+)-ガラクトース 分子量 180.16

D(-)-フルクトース (果糖) 分子量 180.16

スクロース (サッカロース) 分子量 342.30

ラクトース (乳糖) 一水和物 分子量 360.32

D(+)-マンノース 分子量 180.16

D(-)-マンニトール (マンニット) 分子量 182.17

キシリトール 分子量 152.15

D-ソルビトール (ソルビット) 分子量 182.17

*myo*-イノシトール 分子量 180.16

・ その他の試薬

アセトアニリド 分子量 135.17

HPLC での定量の際の内部標準物質として用いた。

塩化カリウム 式量 74.55

ホウ酸 式量 61.83

炭酸ナトリウム (無水) 式量 105.99

ホウ酸緩衝液の調製に用いた。

4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸 (HEPES)

分子量 238.31

水酸化ナトリウム 式量 40.00

HEPES 緩衝液の調製に用いた。

塩化チオニル 分子量 118.97

ATME の合成に用いた。

以上、特に記述のないものは和光純薬工業株式会社より購入

### 3-1-2 使用機器

#### 高速液体クロマトグラフ (HPLC)

送液ユニット LC-6A	(株) 島津製作所
紫外分光光度計検出器 SPD-6A	(株) 島津製作所
クロマトパック C-R6A	(株) 島津製作所
カラム Shim-Pack CLC-ODS (150 mm × 6 mm φ)	(株) 島津製作所
充填剤：オクタデシル基を化学結合した全多孔性球状シリカゲル (直径 5 μ m, 細孔径 100 Å)	
脱気装置 DGU-4A	(株) 島津製作所

分光蛍光光度計 RF-5000	(株) 島津製作所
恒温循環装置 EL-8 COOLNIT BATH	TAITEC
スターラー CUV-O-STIR	HELLMA

レシプロ式恒温槽 INCUBATION PERSONAL (株) 大洋科学工業

30 °C に保温し, 毎分 120 回, 振幅 3 cm で振蕩する.

ガラス電極式水素イオン濃度計  
METTLER TOLEDO 320 pH Meter      メトラー・トレド社

凍結乾燥機 EYELA FDU-506	東京理化器械株式会社
ドライチャンバー DRC-2	東京理化器械株式会社
直結型油回転真空ポンプ GLD-050	真空機工株式会社
オイルミストトラップ OMT-050	東京理化器械株式会社

## 3-2 添加剤を用いた有機溶媒／水系における酵素の安定化

### 3-2-1 実験方法

#### 3-2-1-1 HEPES 緩衝液の調製

- ① HEPES 4.768 g を純水に溶かし 200 ml の溶液 (0.1 M) を作る.
- ② 水酸化ナトリウム 0.4 g を純水に溶かし 100 ml の溶液 (0.1 M) を作る.
- ③ ①,②の溶液を混合, 攪拌した後に pH メーターで調製する. 今回は pH 8.09 の溶液を実験に用いた.

なお, ホウ酸緩衝液の調製は 2 章と同様に行った.

#### 3-2-1-2 *N*-アセチル-L-チロシンメチルエステル (ATME) の合成

- ① 100 ml ナスフラスコにメタノール 15 ml を加え, 氷+塩化ナトリウムの寒剤で -10 °C に冷却する. 攪拌しながら塩化チオニル 3.9 ml をパスツールピペットで徐々に加える.
- ② 10 分ほど攪拌した後 *N*-アセチル-L-チロシン (AT) を 3.36 g 加え, 室温で約 15 時間攪拌する.
- ③ 減圧濃縮したのち水を加えて結晶を析出させる. このときあまり濃縮しすぎないようにする.
- ④ 結晶をガラスフィルターで濾過し, 冷エーテルで洗浄する.
- ⑤ 一晩, 真空乾燥する.
- ⑥ ナスフラスコ中で加温 (60 °C) しながらメタノールを加えて溶解させ過飽和溶液を得る.
- ⑦ 冷却して結晶が生成した後に上澄みを取り除く. 収率が低い場合には上澄み液を加温しながら減圧濃縮し, 冷却し再結晶を行う.
- ⑧ 得られた結晶を一晩真空乾燥し, 薄いクリーム色をした粉末を得る.

IR 測定, 元素分析の結果, 得られた物質は ATME 一水和物 (分子量 255.3) と思われる.

### 3-2-1-3 添加剤を用いた際の酵素活性の測定

・アミド類を添加した際の $\alpha$ -CTの加水分解活性の経時変化の測定

- ① 30 ml スクリューバイアルに添加剤を 200  $\mu$ l はかり取り，そこへ濃度 1 mg / 10 ml に調製しておいた酵素溶液（有機溶媒-ホウ酸緩衝液 pH 8.0, 0.1 M）を 6 ml 加える．この時点が保存時間 0 分になる．測定する保存時間に応じて同じ溶液を複数本用意した．
- ② ATEE 269 mg, アセトアニリド 250 mg を含水有機溶媒 40 ml に溶かし，基質溶液を作る．この溶液で基質の非酵素的加水分解物の定量をする．
- ③ 所定の時間が経過した後，①の酵素溶液に②の基質溶液を 4 ml 加え，全量 10 ml で反応を開始させる．このときの酵素濃度は 0.6 mg / 10 ml である．
- ④ 適宜 HPLC で生成物を定量した．HPLC の条件は 2 章と同じである．

・糖類などを用いたアセトニトリル-緩衝液 10 %系での添加剤効果の測定

- ①  $\alpha$ -CT 7.5 mg を緩衝液 3 ml に溶かし酵素溶液を作る．
- ② ATEE 26.9 mg / ml, アセトアニリド 25.0 mg / ml になるようにアセトニトリル-緩衝液 10 %の基質溶液を作る．
- ③ 所定量の添加剤を入れた 30 ml スクリューバイアルに①の酵素溶液を 1 ml 加え，添加剤が完全に溶解するまで超音波をかける．どうしても添加剤が溶けない（デンプンなど）場合はそのまま用いた．これを 2 本作る．
- ④ ③の溶液にそれぞれアセトニトリル 9 ml を加えアセトニトリル-緩衝液 10 % の溶液にし，2 本とも 30  $^{\circ}$ C で保温する．この時点が保存 0 分になる．
- ⑤ ④で作ったうちの 1 本に 5 分後に②の基質溶液を 1 ml 加えて反応を開始させ，適宜 HPLC で生成物を定量する．残りもう 1 本は 6 時間保温した後反応を開始させる．
- ⑥ HPLC で定量した結果から酵素の加水分解活性の安定性を評価した．

尚，DMSO を用いたデンプンの分子内水素結合の切断の効果を調べた実験では以下の操作を行った．

- ⑦ デンプン 50 mg に DMSO 5 ml を加え 30 °C で 40 時間振蕩する。透明でやや粘性のある液体が得られる。
- ⑧ 上記③の酵素溶液 1 ml に⑦のデンプン溶液 1 ml を加え、さらにアセトニトリルを 8 ml 加え、保存を開始する。
- 緩衝液 1 : DMSO 1 : アセトニトリル 8 の溶媒組成になる。その後の操作は上記⑤と同じである。

エステル交換反応を行う場合は手順②で ATEE の代わりに ATME 25.5 mg / ml のエタノール溶液を作り、5 分後、6 時間後に 1 ml を保温していた酵素溶液に加え反応を開始させた。

### 3-2-2 溶媒組成によるアミド類を添加した際の効果の変化

有機溶媒を用いた反応系において酵素を有効に活用するためには、有機溶媒による変性を防ぐことが要求される。酵素の変性を防ぐために様々な手法が用いられているが、その中でも簡便なのが溶媒に添加剤を加えることである。この手法の特徴としては、酵素には手を加えない（遺伝子レベル、化学修飾など）ために、酵素自体が不活性化なものに変質する恐れのないこと、添加剤の種類を変化させることで様々な効果のバリエーションが期待できることがある。

よく用いられている添加剤としてはアミド類、polyol 類、糖類などがあり、水素結合能力が酵素活性の維持に大きな影響を及ぼしていると考えられている。これは、高濃度の有機溶媒中では水が不足するために、活性発現のために必要な酵素の立体構造の柔軟性が失われるのを、添加剤が補うからであるとされている。しかし、添加剤が酵素の立体構造自体にどう作用しているのか、また、添加剤の効果がどのくらいの時間持続するのかについては十分な研究がなされていない。本研究においては、添加剤としての有効性が報告されている<sup>94)</sup>ホルムアミドと、水素結合能力の影響を比較するための DMF を用いてアセトニトリル-緩衝液系における  $\alpha$ -CT の立体構造変化に及ぼす影響を探った。

Fig.3-1 にアセトニトリル-緩衝液 90 % 系での加水分解活性、蛍光波長の変化を示す。これまでの結果から、 $\alpha$ -CT では蛍光波長の長波長へのシフトは立体構造変化を示唆するものであることがわかっており、この場合でもそれが当て

はまる。無添加時とホルムアミド添加時はほとんど差が見られず、添加効果が全くないことがわかる。これは緩衝液が多い(90%)系であるためにホルムアミドが系中に拡散し、 $\alpha$ -CTに影響を与えないためと考えられる。実際、ホルムアミドの添加効果は水系では認められていない<sup>94)</sup>。DMFを添加した場合は蛍光波長のシフトが加速される結果となった。DMFは大量に加えた際には $\alpha$ -CTの立体構造をほぼ完全に破壊してしまうと考えられる<sup>11)</sup>ため、少量であっても $\alpha$ -CTの立体構造を破壊する効果が現れたものと思われる。

Fig.3-2 にアセトニトリル-緩衝液 50% 系での結果を示す。この系では Fig.2-1 に示したように $\alpha$ -CTは失活している。酵素活性を保護する添加剤を加えても活性は現れなかった。このことから、ホルムアミドにはこの系において変性してしまった $\alpha$ -CTの立体構造を回復させるような力は無いことがわかる。また、DMFを添加してもなんら変化が生じないことから、この状態での $\alpha$ -CTは完全に変性しきった状態であることが予想される。最近の報告<sup>144)</sup>では、アセトニトリル-リン酸緩衝液 (pH 7.8, 25mM) 50% の系中で、 $\alpha$ -CTは10分ほどで自己分解していることが SDS-PAGE により確認されている。今回の実験においても自己分解している可能性は大いにある。

Fig.3-3 にアセトニトリル-緩衝液 10% 系での結果を示す。この系においてようやくホルムアミドの添加効果が見られ、蛍光波長の長波長へのシフト、加水分解活性の低下が抑制された。有機溶媒中ではホルムアミドにも水と同じように疎水性相互作用が働くため分子が集合しやすく<sup>116)</sup>、酵素表面には親水性基があることもあって、 $\alpha$ -CTの周辺に集まったものと考えられる。その結果、水をはぎ取る効果の高いアセトニトリルが直接 $\alpha$ -CTに接触することを防いでいると推測される。DMFでは若干波長のシフトが抑えられたものの、活性維持効果は見られなかった。やはり、水素結合可能な窒素上の水素を置換したために、 $\alpha$ -CT周辺に集まったとしても立体構造、あるいはその柔軟性を維持する効果が無いと思われる。



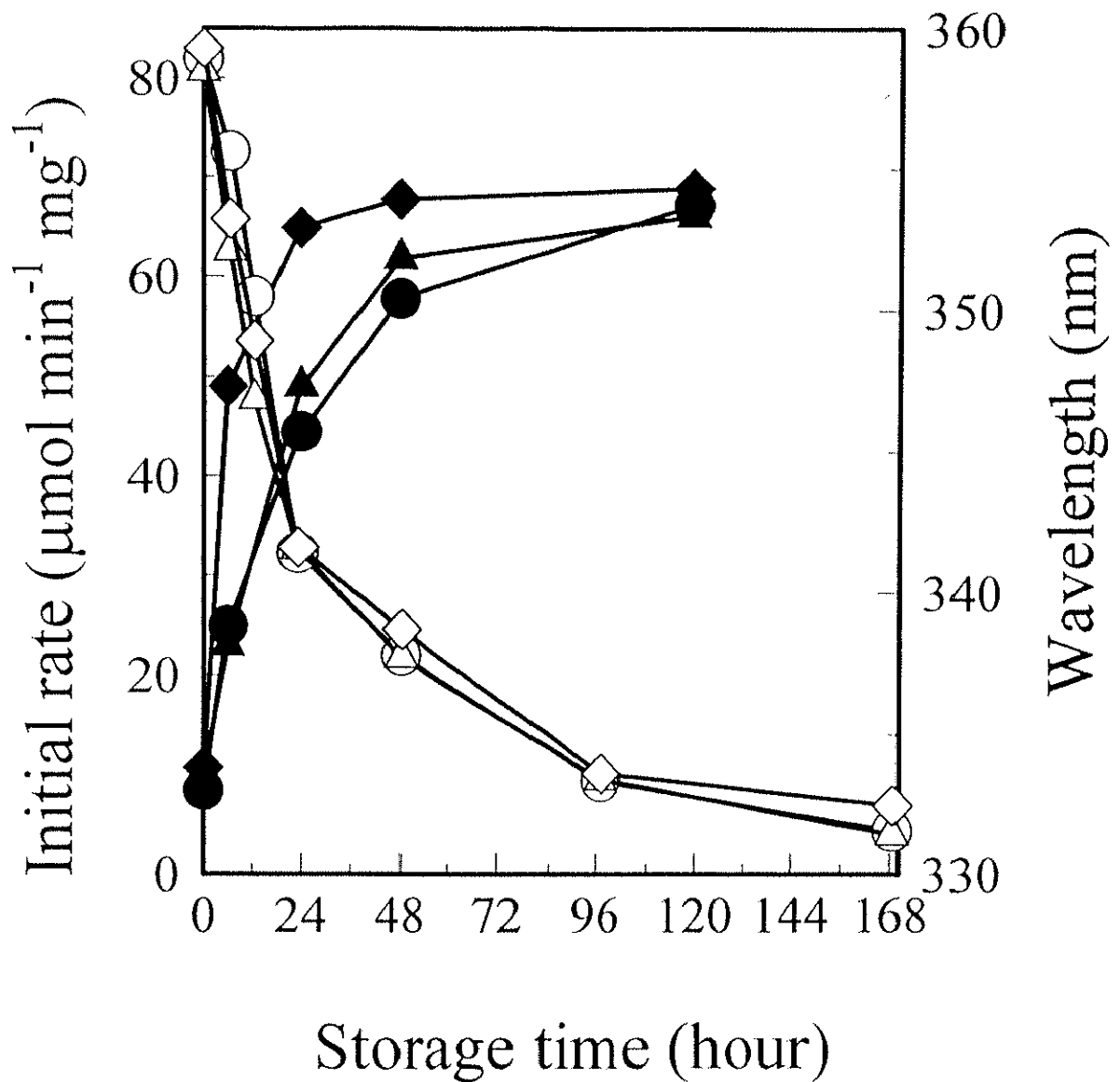


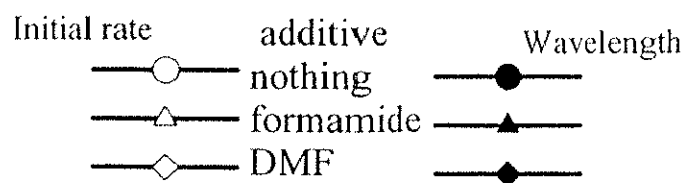
Fig.3-1

アミド類を添加した際の $\alpha$ -CTの加水分解活性と  
蛍光波長の経時変化

アセトニトリル-ホウ酸緩衝液 (90%)

(pH 8.0, 0.1 M)

$\alpha$ -CT 0.6 mg / 10 ml



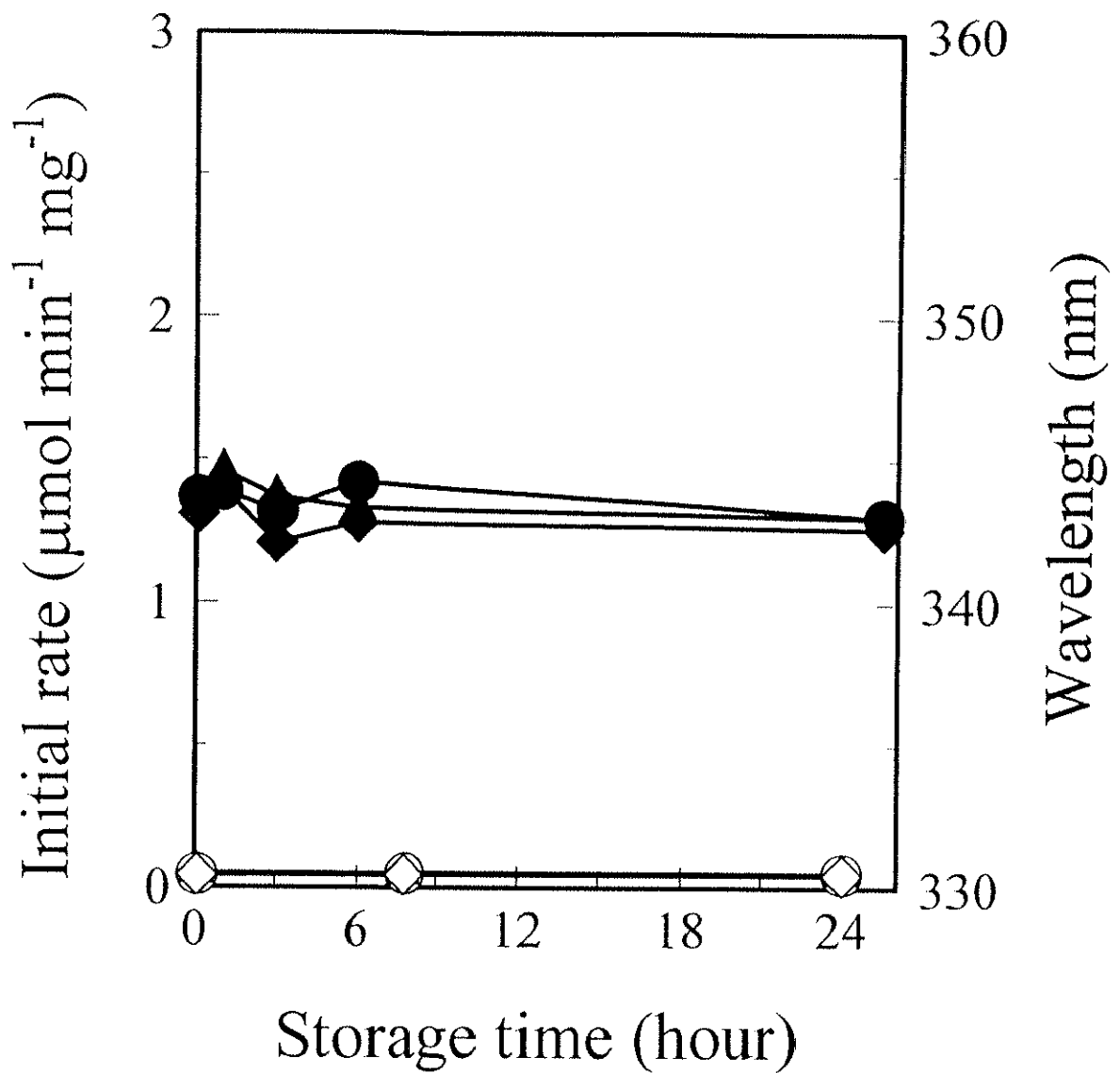


Fig.3-2

アミド類を添加した際の  $\alpha$ -CT の加水分解活性と  
 蛍光波長の経時変化

アセトニトリル-ホウ酸緩衝液 (50%)

(pH 8.0, 0.1 M)

$\alpha$ -CT 0.6 mg / 10 ml

Initial rate	additive	Wavelength
—○—	nothing	—●—
—△—	formamide	—▲—
—◇—	DMF	—◆—

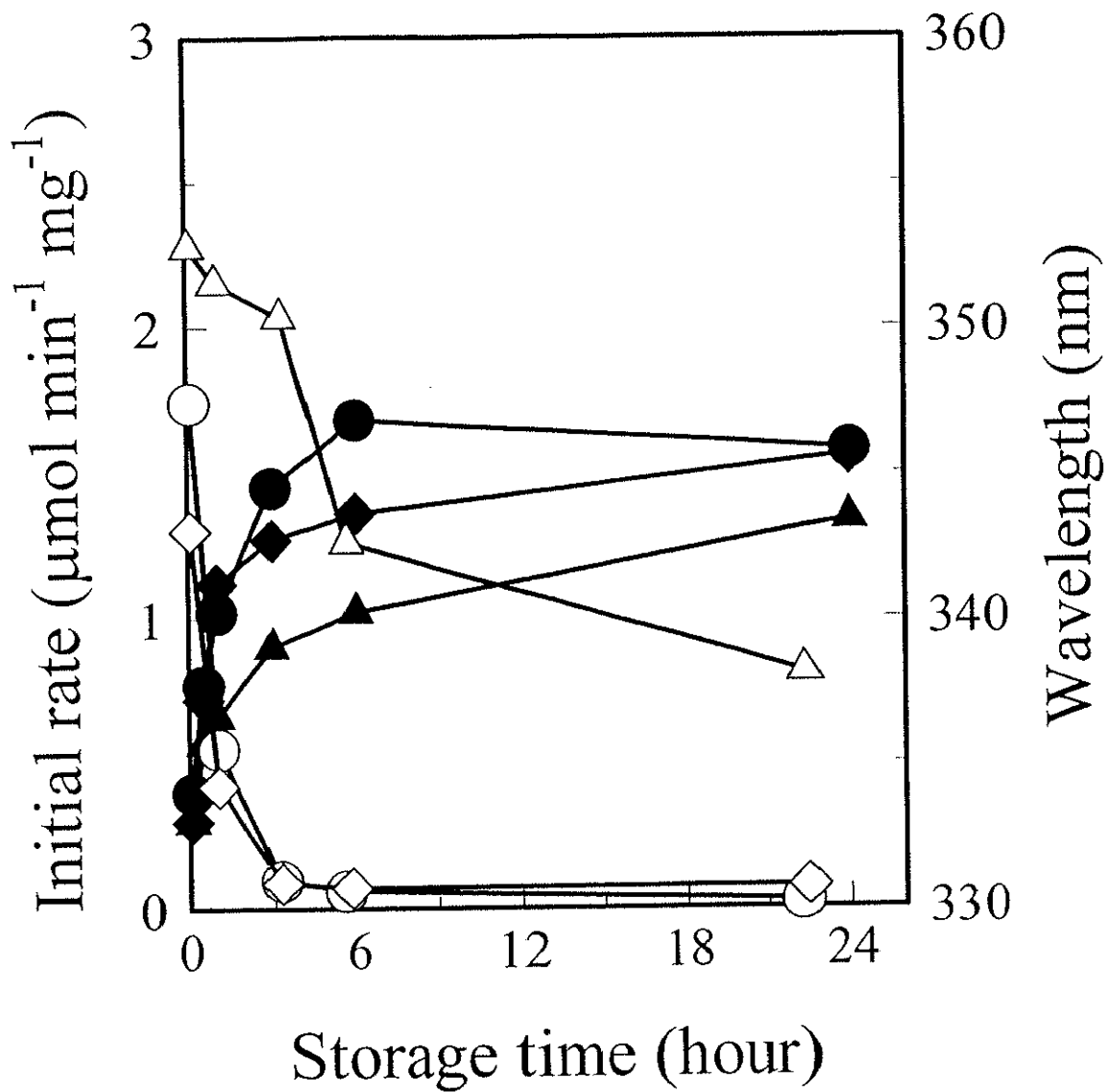


Fig.3-3

アミド類を添加した際の  $\alpha$ -CT の加水分解活性と  
蛍光波長の経時変化

アセトニトリル-ホウ酸緩衝液 (10%)

(pH 8.0, 0.1 M)

$\alpha$ -CT 0.6 mg / 10 ml

Initial rate	additive	Wavelength
—○—	nothing	—●—
—△—	formamide	—▲—
—◇—	DMF	—◆—

Fig.3-4 ~ Fig.3-6に1,4-ジオキサソール緩衝液系での結果を示す。1,4-ジオキサソールはアセトニトリルに比べて低濃度では $\alpha$ -CTに与える影響は小さい(Fig.3-4)。しかし高濃度になると $\alpha$ -CTの変性を招き完全に失活する。1,4-ジオキサソール緩衝液10%系では、ホルムアミドの添加によって6時間程度の立体構造維持効果があることが蛍光波長シフトから予想されるが、活性はほとんどなかった。高濃度の1,4-ジオキサソール中ではホルムアミドの添加効果はごく小さいものといえる。

以上の結果から、アセトニトリル緩衝液中においては高濃度のアセトニトリル中での $\alpha$ -CTの活性保持にはホルムアミドが効果があり、その効果は $\alpha$ -CTの立体構造変化を抑制することで生じることがわかった。したがって、添加剤の選択としては、酵素周辺に集まりやすい(水素結合能力がある、水溶性が高い)ことが重要になると考えられる。また、反応系に用いる有機溶媒によって効果が生じないこともあるため、反応系に適した添加剤を選択する必要も生じてくる。しかし先に述べたように、この手法では添加剤の変更自体は容易なことから、酵素自体を変化させるタンパク質工学を用いるよりも即応能力があると期待される。

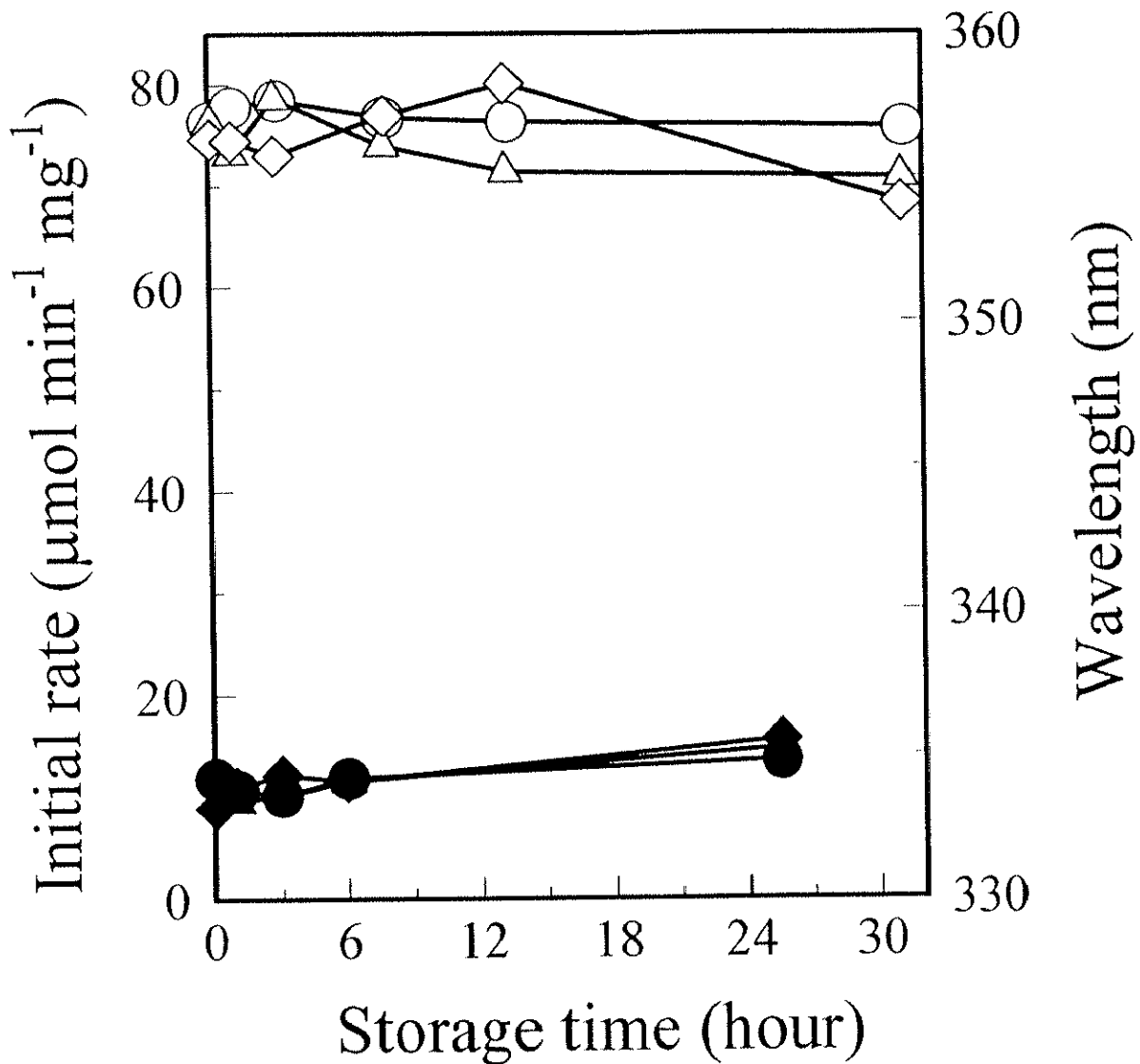


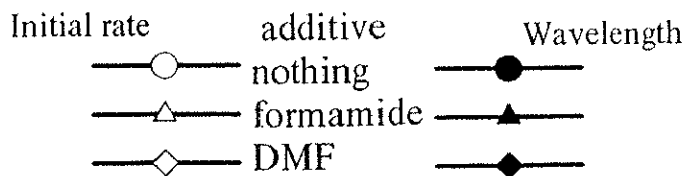
Fig.3-4

アミド類を添加した際の  $\alpha$ -CT の加水分解活性と  
 蛍光波長の経時変化

1,4-ジオキサン-ホウ酸緩衝液 (90%)

(pH 8.0, 0.1 M)

$\alpha$ -CT 0.6 mg / 10 ml



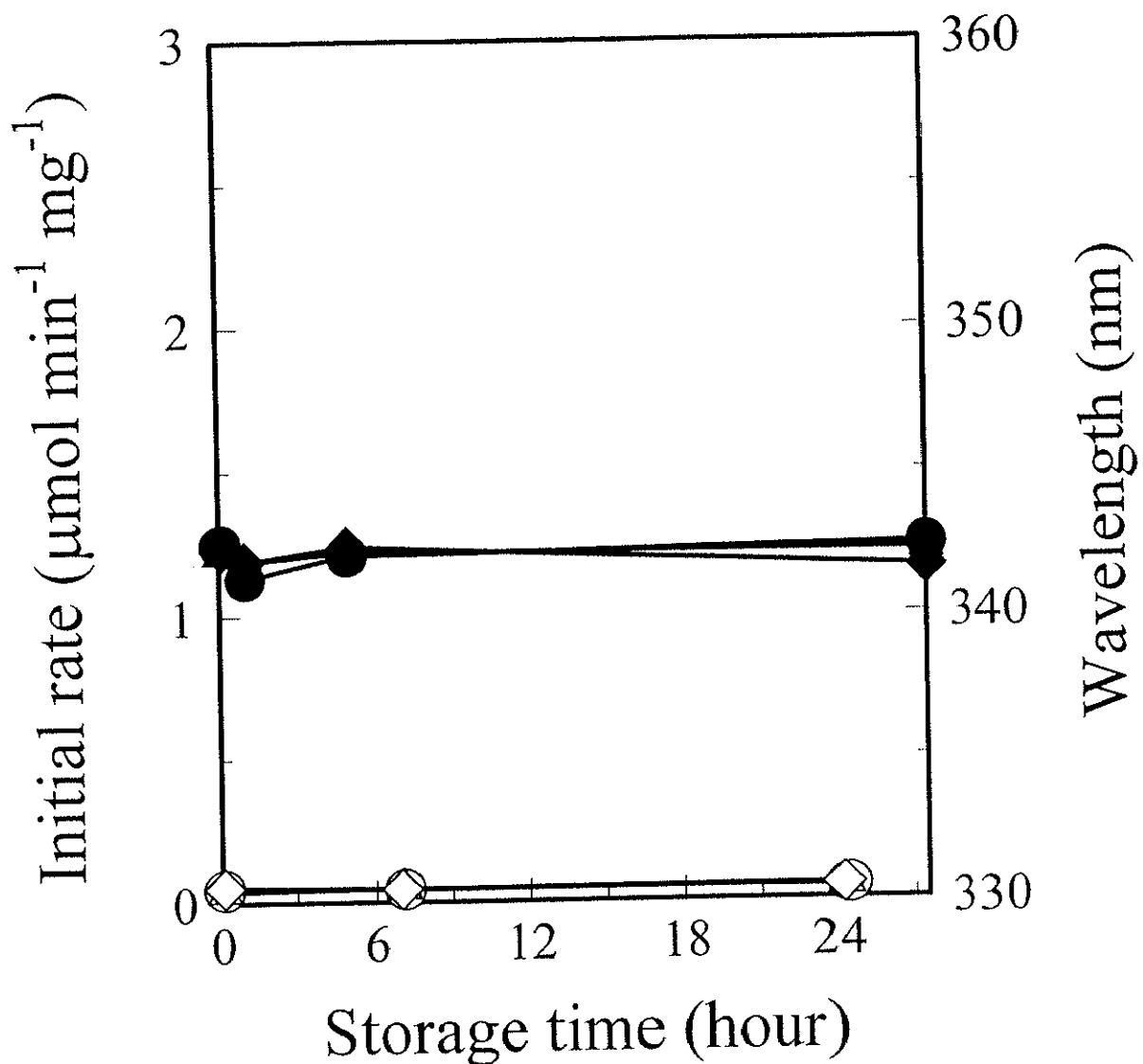


Fig.3-5

アミド類を添加した際のα-CTの加水分解活性と  
蛍光波長の経時変化

1,4-ジオキサン-ホウ酸緩衝液 (50%)

(pH 8.0, 0.1 M)

α-CT 0.6 mg / 10 ml

Initial rate	additive	Wavelength
—○—	nothing	—●—
—△—	formamide	—▲—
—◇—	DMF	—◆—

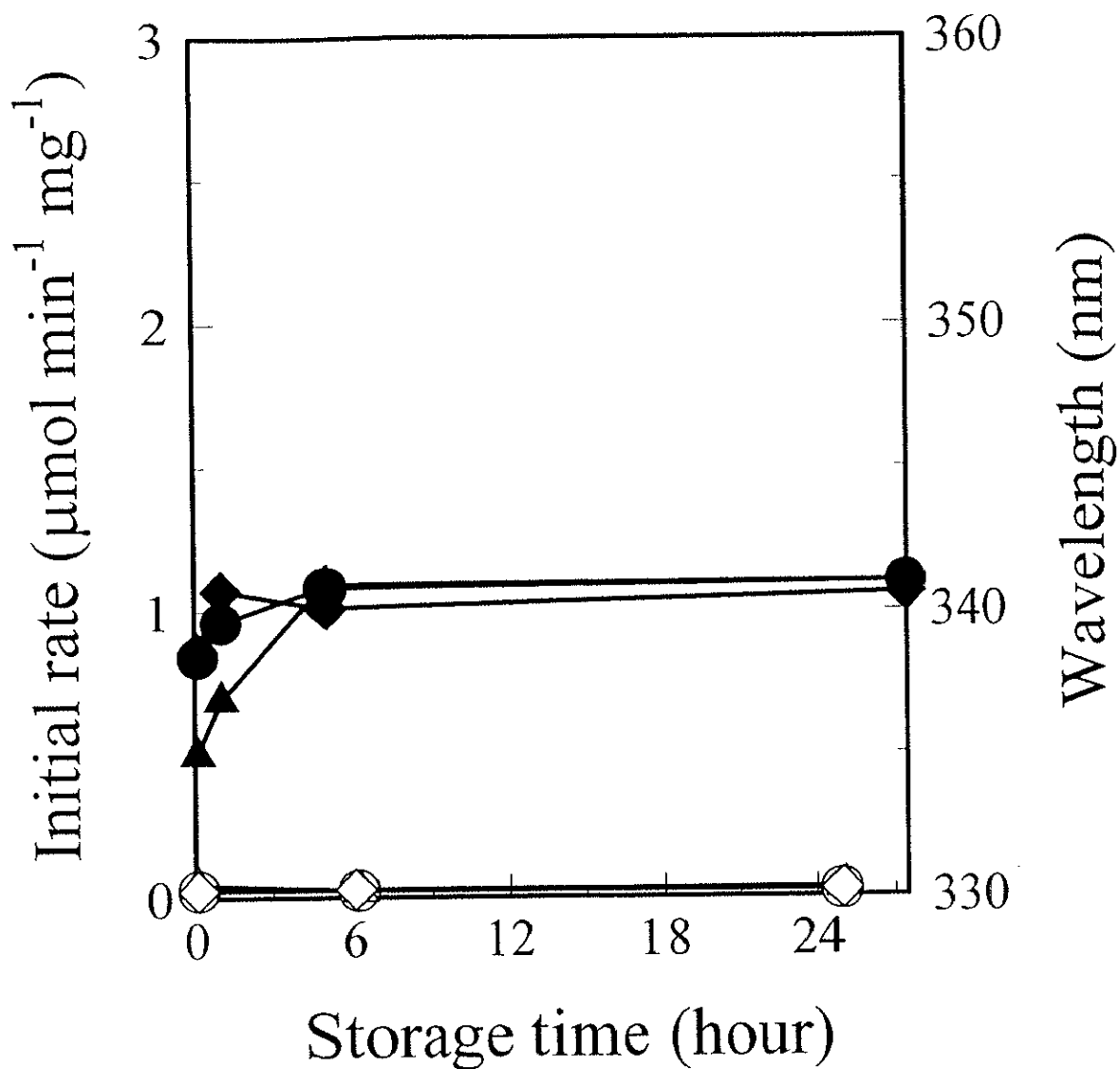


Fig.3-6

アミド類を添加した際の  $\alpha$ -CT の加水分解活性と  
蛍光波長の経時変化

1,4-ジオキサン-ホウ酸緩衝液 (10%)

(pH 8.0, 0.1 M)

$\alpha$ -CT 0.6 mg / 10 ml

Initial rate	additive	Wavelength
—○—	nothing	—●—
—△—	formamide	—▲—
—◇—	DMF	—◆—

### 3-2-3 アセトニトリル-緩衝液 10 %系での添加剤効果

#### 3-2-3-1 糖類を添加した際の効果

アミド類と同じく添加効果があるとされる糖類，糖アルコールを添加剤として用いた。これらの添加効果も酵素に水素結合することで柔軟性を保つためと考えられているが，水溶液中においては酵素の変性状態を不安定化させるために効果が現れるという報告<sup>117)</sup>もある。この際は水の表面張力を変化させるのが原因らしい。また，熱安定性が向上するのは酵素の疎水性相互作用を強めるのとともに，周囲の水の構造を変化させるためとする報告<sup>118)</sup>もある。今回はアセトニトリル-緩衝液 10 %系で用いたために用いた糖類はすべて懸濁あるいは粘性液体状になった。

Fig.3-7 に糖類を添加した際の酵素の保存安定性を示す。保存安定性は保存 5 分後の加水分解活性と保存 6 時間後の活性とを比較することで評価した。添加剤がない場合の 5 分後の活性を 1 とした比活性で表示した。

##### ・グルコース

グルコースを用いた場合は添加効果は低かった。酵素水溶液に加えた際には完全に溶けるが，その溶液にアセトニトリルを加えると粘性の高い液状になり容器にこびり付く状態になった。50 mM 加えた際は活性が大幅に低下した。これは， $\alpha$ -CT が粘性液体中に取り込まれているために，アセトニトリル中にある基質が接近できない状態にあると思われる。

##### ・マルトース

2 分子のグルコースが  $\alpha$  1  $\rightarrow$  4 結合した二糖である。グルコースと同じく反応系中では粘性の高い液状になる。添加効果は安定性向上の面では多少見られた。

##### ・デキストリン

デキストリンはデンプンを酵素，または酸で加水分解して得られるマルトースからそれ以上の長さの鎖長を持つグルコース重合体の混合物である。水，アセトニトリルへの溶解性は低いために，反応系中ではやや大きめの粒子状であった。デキストリンを 10 mg 用いた際の活性向上効果は，今回用いた全添加剤のうち最高で約 3.5 倍の活性向上効果があった。これは添加剤効果以外



の固定化担体としての働きも大きいと考えられる。50 mg 加えた際は活性向上効果は低下したが、安定性向上の面は変化がなかった。α-CTの周りにより多くのデキストリン分子がまとわりつくことで基質の接近を妨げ活性が低下するが、アセトニトリルによる立体構造の変化からは保護しているためと考えられる。分子量には幅があるためにグラム単位で用いた。

#### ・デンプン

デンプンはグルコースを構成単位とする多糖類であるが、今回用いたデンプンは水に溶けないために酵素水溶液中および反応系中では細かい粒子状であった。添加効果は高く 50 mg 添加時には活性が約 2.4 倍に向上した。デキストリンと同じく反応系では添加剤効果というよりも固定化担体として働いている可能性が高い。はっきりした分子量はわからないためにグラム単位で用いた。

デンプン中のアミロース成分は通常らせん状の構造を取り、分子内で水素結合をしている。酵素への添加効果は酵素との水素結合能力に左右されるので、この状態では効果が薄いと思われる。また、分子内で水素結合することで水への溶解度が低くなっているが、熱を加えることで結合が切れ、水に溶解するようになる。また、DMSOを加えると分解することなく分子内水素結合が切れ溶解する<sup>119)</sup>。そこで、デンプンを DMSO の溶解させた後に酵素溶液に加え効果を調べた。Fig.3-8 に結果を示す。DMSO が 1 ml 含まれるために活性はかなり低下したが、DMSO のみの場合と比べると保存安定性は向上した。反応系中では懸濁状態になるために担体としての効果はぬぐい去れなかったが、水素結合を切断する性質の強い DMSO を加えても α-CT の活性が保持できたことから、水素結合することでより強固に酵素の立体構造を保護しているとも考えられる。

#### ・ガラクトース

グルコースとは 4 位の炭素の周りの立体配置が異なるエピマーであるが、添加効果も異なったものとなった。活性向上効果は薄かったが、α-CT の安定性の向上の面から見るとよい添加剤といえる。添加剤の立体構造が大きく影響していると思われるが、どのような機構によるものかは不明である。

#### ・フルクトース

他の単糖と同じく反応系中では粘性の高い液状になった。安定性が向上するが、活性は落ちるため添加効果は低い。

- ・ラクトース, スクロース

反応系中では粘性の液状になった。添加効果は同じ状態になる糖類と同様低かった。

- ・イノシトール

水酸基を6つ持つイノシトールは他の糖類よりも効果が上がるのではないかと予想されたが、活性向上効果は低かった。しかし、安定性に対する効果は大きく、6時間後における残存活性ではかなり良い結果が得られた。反応系中では白色の沈殿物になった。

- ・キシリトール, ソルビトール

効果は薄い。ソルビトールは固定化担体とともにエステル交換反応に用いた文献<sup>9,5)</sup>では効果があったが、今回の反応系では効果はなかった。系中では粘性の液状になった。

- ・シクロデキストリン類

グルコースが $\alpha$  1 $\rightarrow$ 4結合で環状になったもの。グルコース単位が6つで環を形成するものを $\alpha$ -シクロデキストリン( $\alpha$ -CyD), 7つが $\beta$ -CyD, 8つが $\gamma$ -CyDである。添加効果は小さかった。 $\gamma$ -CyDは系中でやや大きな、粘性をもつ塊状の沈殿になったが、他は細かい粒子状になった。

以上の結果からは、水酸基の数と添加効果との間には関連性は見られなかった。反応系の状態によって効果が異なるようにも見受けられるため、添加剤としての効果と、固定化担体としての効果が混在したものとなっている可能性が考えられる。無水DMF中でスプチリシンを用いた反応では糖のエステル化反応が起こったとの論文<sup>13)</sup>があるが、今回の反応系では糖のエステル化は検出されなかった。

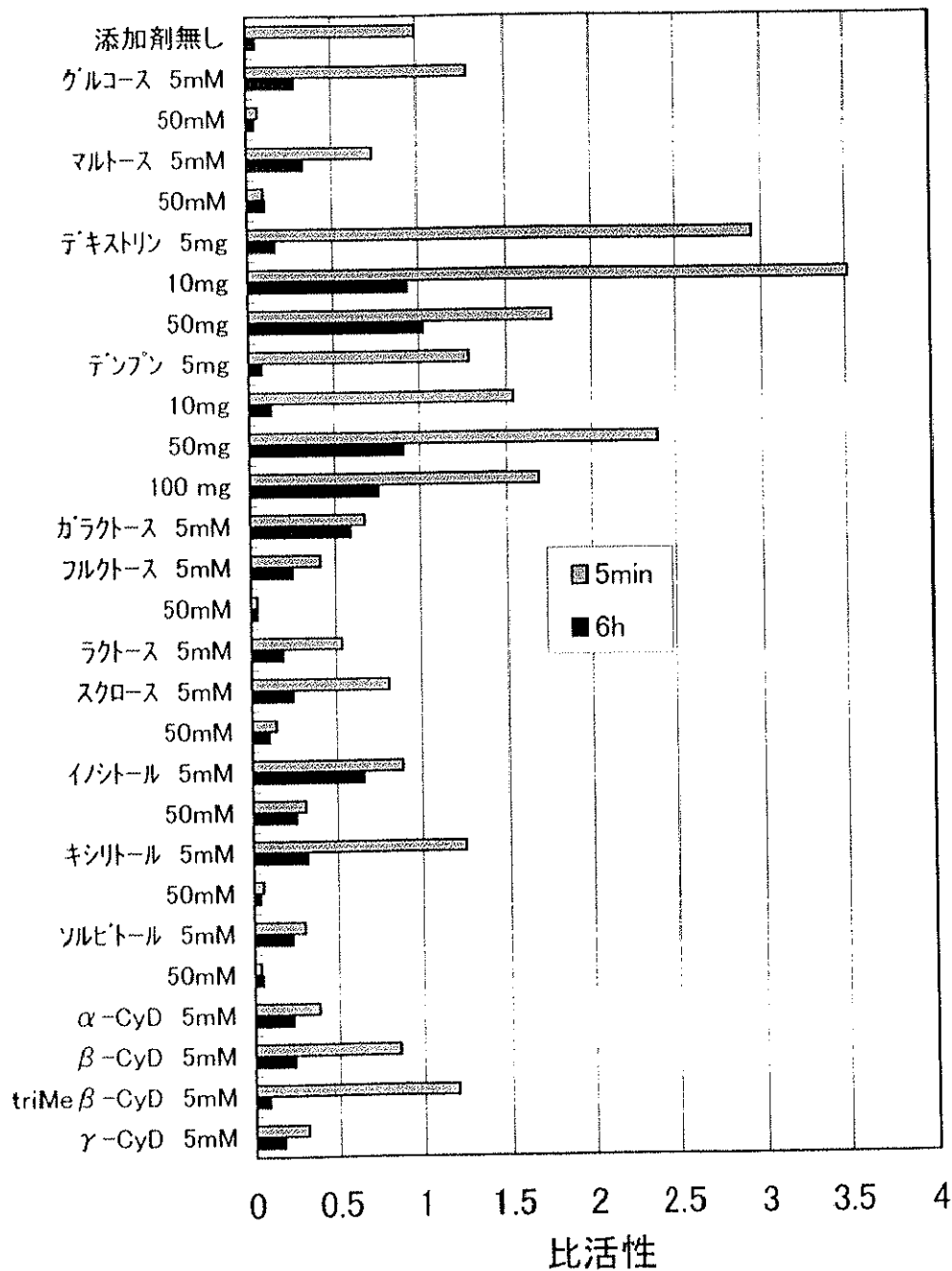


Fig.3-7

糖類を添加した際の効果

アセトニトリル-ホウ酸緩衝液 10%

(pH 8.0, 0.1 M)

$\alpha$ -CT 2.5 mg / 10 ml

CyD: シクロデキストリン

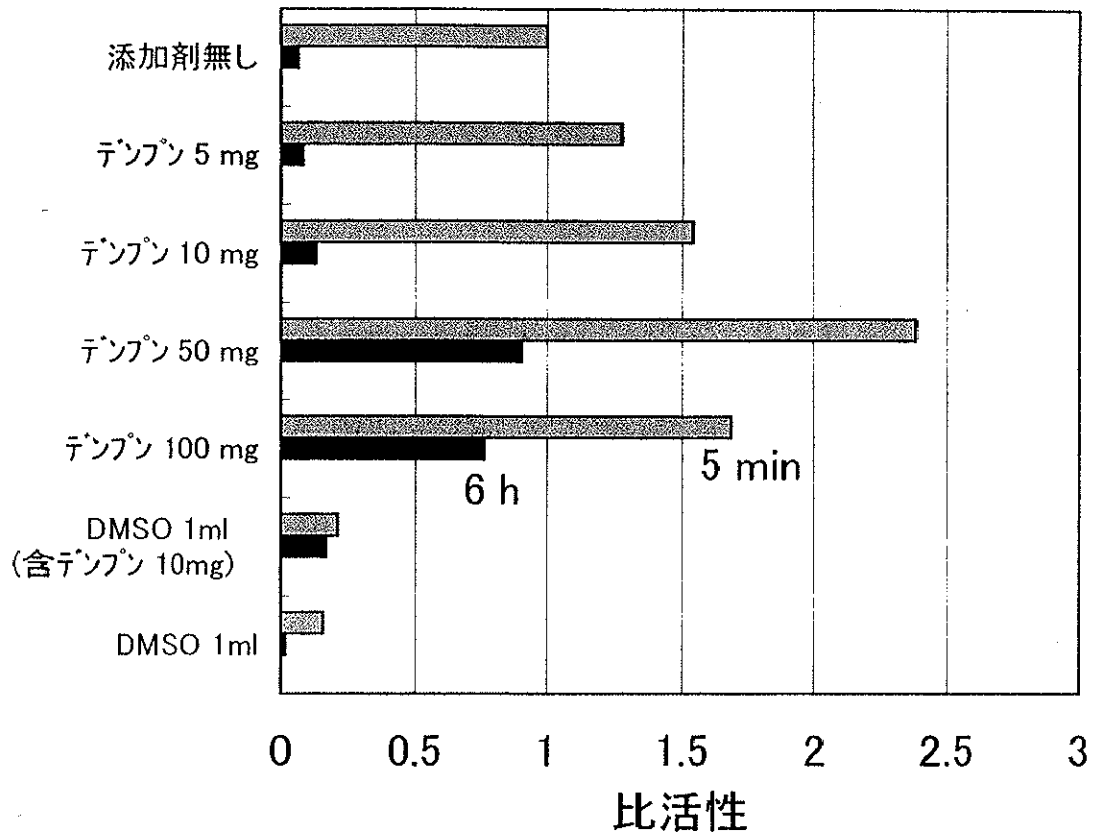


Fig.3-8

酵素活性に対するデンプンの効果

アセトニトリル-ホウ酸緩衝液 10 %

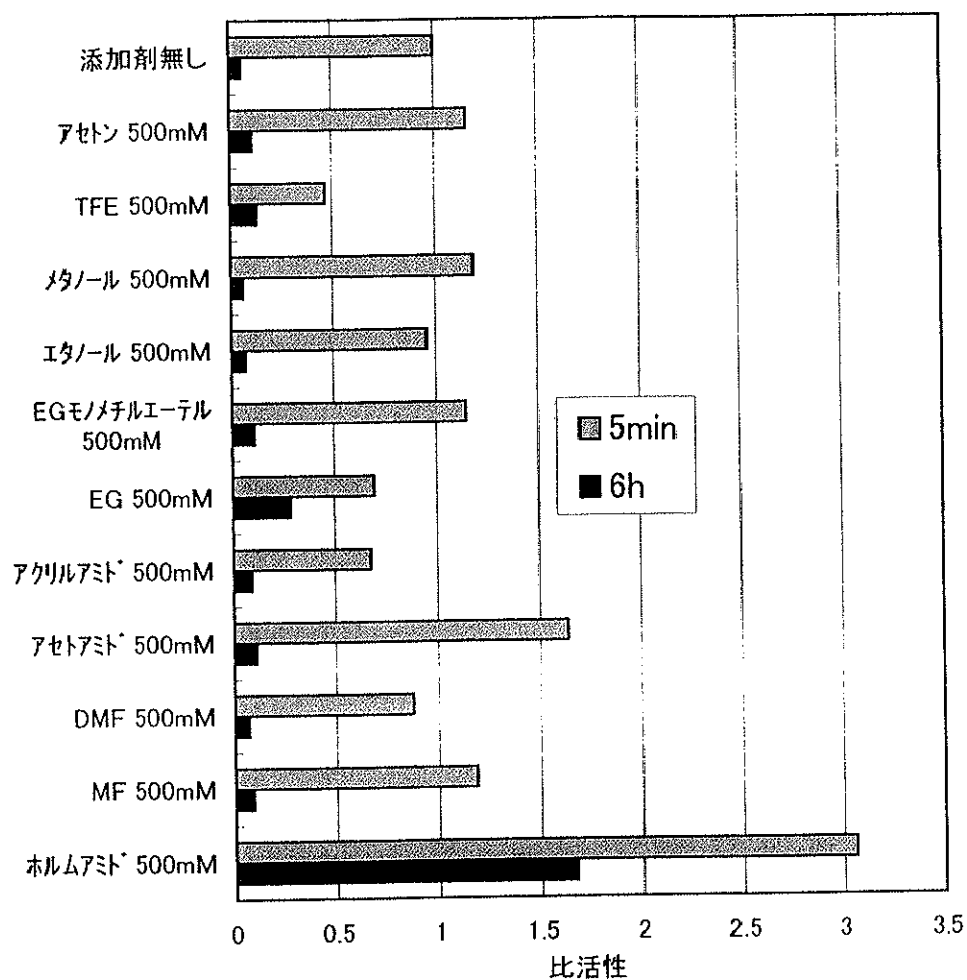
(pH 8.0, 0.1 M)

$\alpha$ -CT 2.5 mg / 10 ml

DMSO を加えた際は アセトニトリル 80 %, DMSO 10 %, ホウ酸緩衝液 10 %

### 3-2-3-2 その他の物質を添加した際の効果

Fig.3-9 に糖類以外での結果を示す。メタノールを用いた際の活性はエステル交換 (ATEE → ATME) も含めた総活性を用いた。添加剤によって効果に差はあるが、明らかに効果が認められたのはホルムアミドのみだった。含水有機溶媒の有機溶媒相として用いる場合には、ホルムアミドはエチレングリコール、メタノール、エタノールよりも  $\alpha$ -CT の活性に悪影響を及ぼし<sup>120)</sup>、ランダムコイルの状態に変性させる<sup>145)</sup>。しかし、逆に考えればそれだけ酵素と相互作用しているともとることができ、少量添加した際にも効果が生じる結果となるのかもしれない。Fig.3-10 に残存活性の割合 (保存安定性) の順に並べた結果を示す。ガラクトース、イノシトール、ホルムアミド、デンプン、デキストリンはアセトニトリル中での  $\alpha$ -CT を活性が高い状態で維持できると言える。



**Fig.3-9**

**糖類以外の物質を添加した際の効果**

アセトニトリル-ホウ酸緩衝液 10 %  
(pH 8.0, 0.1 M)

$\alpha$ -CT 2.5 mg / 10 ml

EG : エチレングリコール, MF : N-メチルホルムアミド

TFE : 2,2,2-トリフルオロエタノール

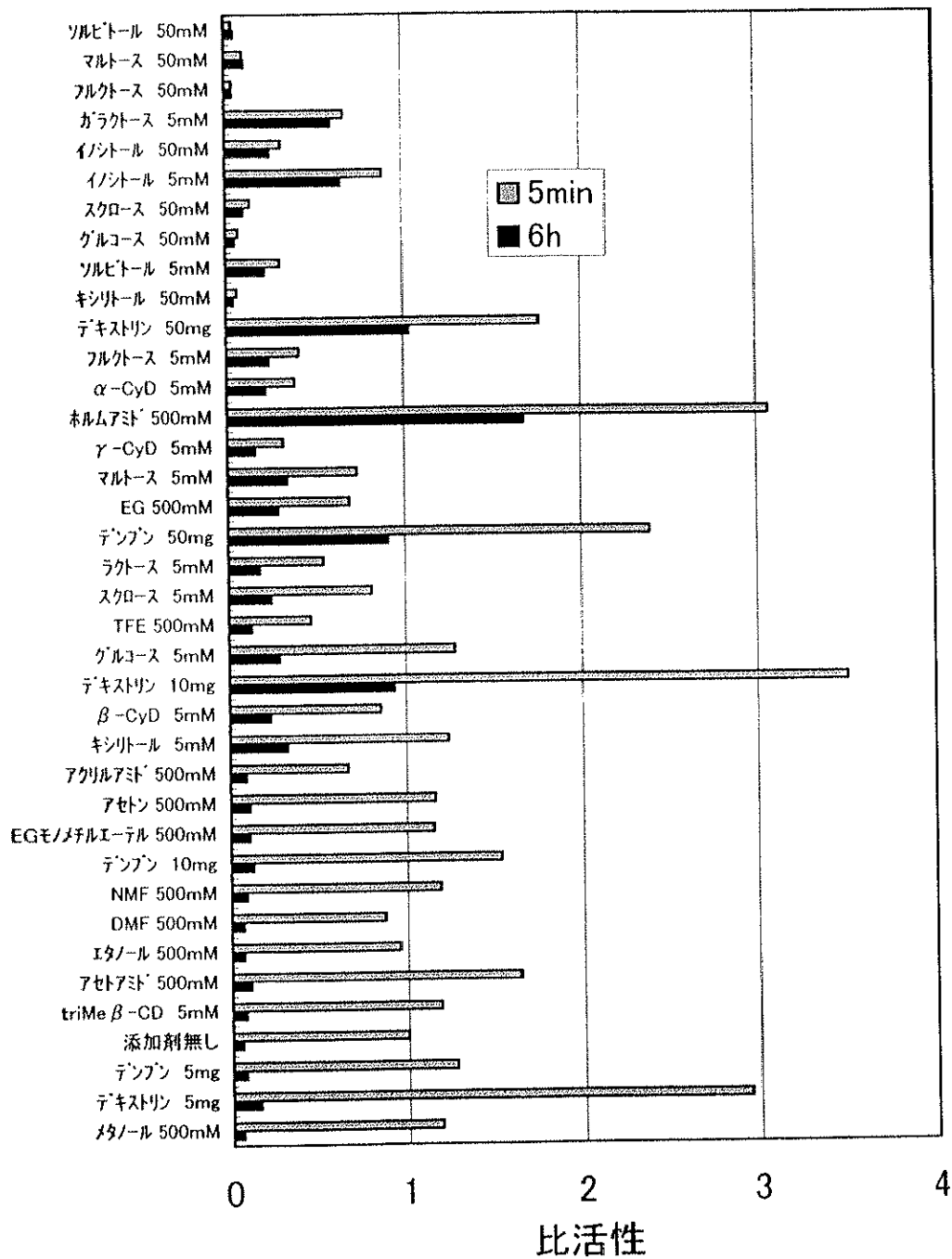


Fig.3-10

添加剤効果 (保存安定性順)

アセトニトリル-ホウ酸緩衝液 10%

(pH 8.0, 0.1 M)

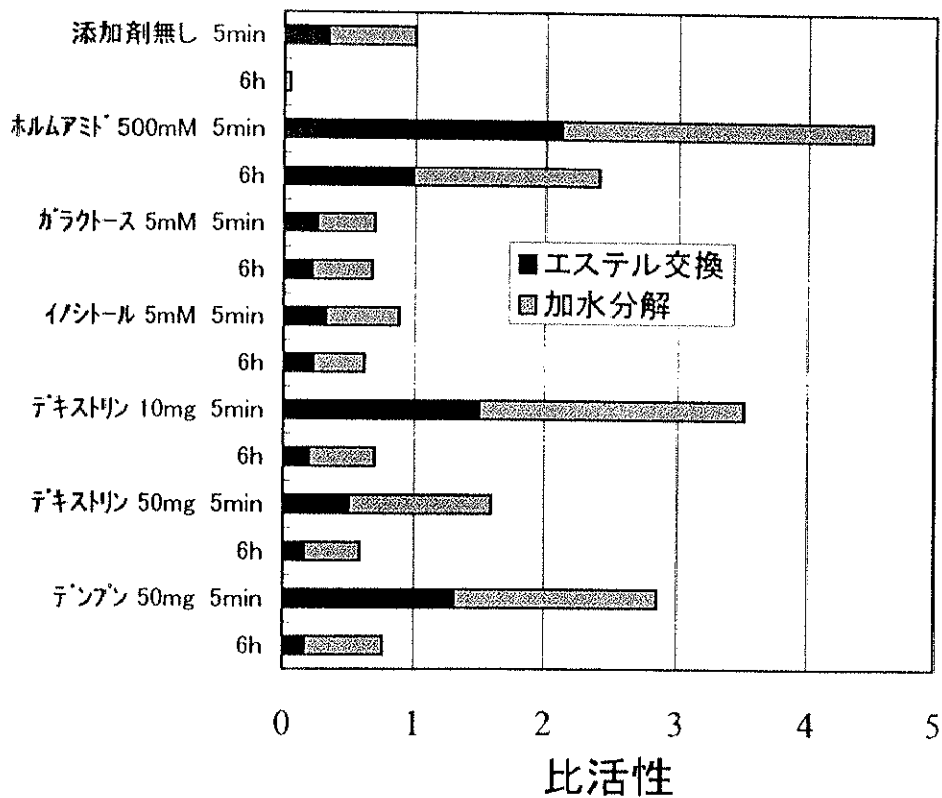
α-CT 2.5 mg / 10 ml

### 3-2-3-3 エステル交換反応における添加剤効果

加水分解反応において効果の高かった添加剤を ATME → ATEE のエステル交換反応に用いた。結果を Fig.3-11 に示す。

添加効果は加水分解反応の場合と同様に高いものであった。緩衝液が 10 % 含まれているために加水分解反応も生じているが、添加剤によるエステル交換反応と加水分解反応との比率はほとんど変化がなかった。このことから、これらの添加剤は  $\alpha$ -CT の活性部位や基質に特別に作用するのではなく、 $\alpha$ -CT 全体の立体構造に作用していることが推測される。





**Fig.3-11**

エステル交換反応における添加剤の効果  
(ATME → ATEE)

アセトニトリル-ホウ酸緩衝液 10%

(pH 8.0, 0.1 M)

$\alpha$ -CT 2.5 mg / 10 ml

反応時の組成 : アセトニトリル 9 ml

緩衝液 1 ml

エタノール 1 ml

#### 3-2-3-4 HEPES 緩衝液を用いた際の効果

ホウ酸緩衝液を用いた際には緩衝液の成分が析出してくるために分光測定が困難になる。また、緩衝剤が固定化担体として作用する可能性も皆無とは言えない。そこで緩衝液を HEPES 緩衝液に変えたところ、アセトニトリル-緩衝液 10 % 系において緩衝液の成分が析出することはなかった。添加剤を用いた加水分解反応の測定結果を Fig.3-12 に示す。

緩衝液成分の析出はなかったが、酵素、添加剤はホウ酸緩衝液の時と同様に懸濁状態になった。分光測定はやはり困難であると思われる。しかし、HEPES 緩衝液を用いた場合の方が全体に活性が向上した。特に添加剤のない場合の活性向上が目を引く。析出しないために緩衝能力が高まったと考えられる他に HEPES 自体が一種の添加剤として働くという解釈もできるだろう。

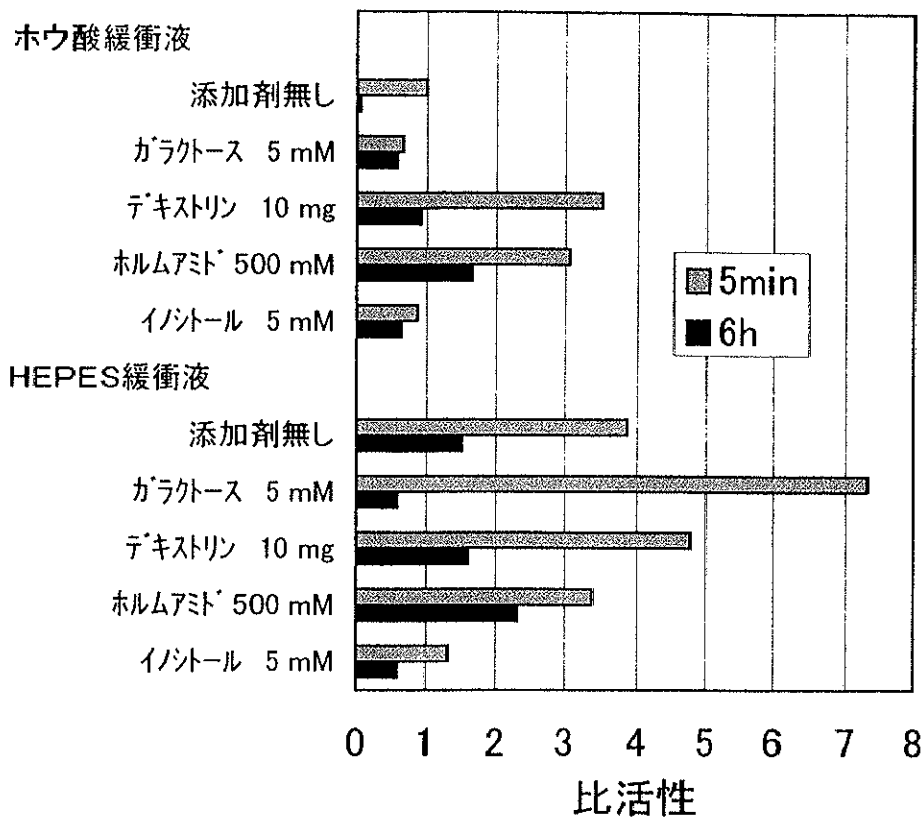


Fig.3-12

HEPES 緩衝液を用いた際の添加剤効果

アセトニトリル - HEPES 緩衝液 10 %

(pH 8.09, 0.1 M)

$\alpha$ -CT 2.5 mg / 10 ml

### 3-3 共凍結乾燥による有機溶媒／水系での酵素の安定化

#### 3-3-1 実験方法

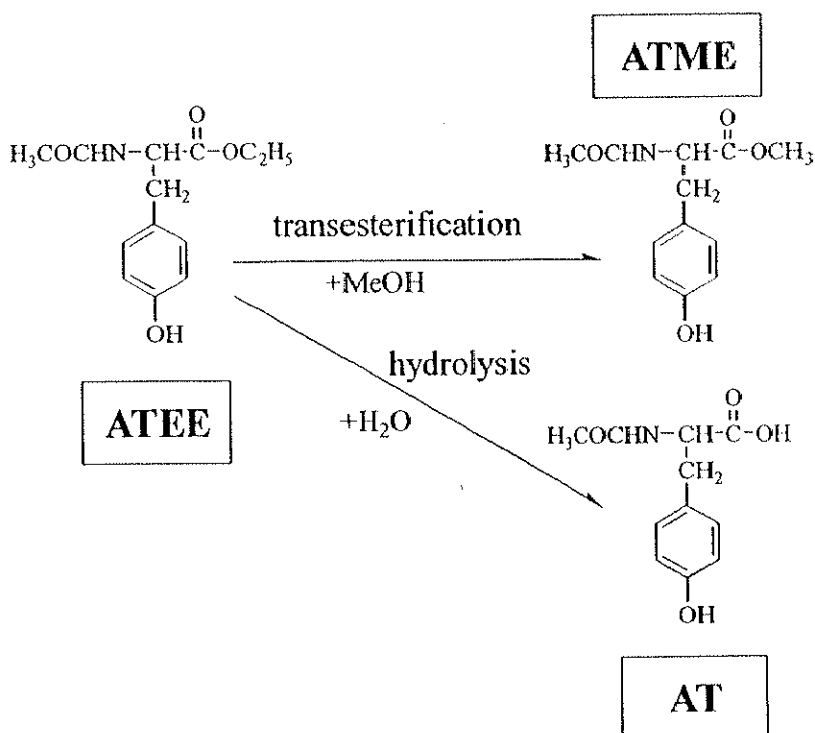
##### 3-3-1-1 凍結乾燥酵素の調製

- ① 200 ml 三角フラスコ中で酵素 30 mg を純水 60 ml に溶解させる。
- ② 100 ml メスフラスコを用いて糖類 500 mg を 100 ml に調製する。
- ③ 50 ml スクリューバイアルに①の溶液を 5 ml (酵素 2.5 mg) , ②の溶液を共凍結乾燥する糖類の量 (0 ~ 75mg) に応じて適量, さらに純水を加え, 全量 20 ml にする。
- ④ ③の溶液を液体窒素に浸し, まんべんなく回転させながら, 壁面に薄い氷ができるようにして凍結させる。
- ⑤ 凍結したスクリューバイアルを凍結乾燥機に入れ, 2 日間凍結乾燥する。気圧は約 15 Pa であった。
- ⑥ 凍結乾燥した綿状, 粒子状の調製物は使用するまで冷凍庫で保管した。

以前行った方法<sup>141)</sup>では CyD が完全に溶けない場合があり, 複合体が不均一になる恐れがあるため, 今回は CyD が完全に溶ける状態から凍結乾燥した。

##### 3-2-1-2 共凍結乾燥酵素を用いたエステル交換反応の測定

- ① 凍結乾燥した調製物にあらかじめ混合しておいたアセトニトリル-水 3 % 溶液を 10 ml くわえ, 保存時間 0 分とする。この際に今までのように純水から先に分割して加えると, 共凍結乾燥してできた複合体が解除され, 活性が低下する恐れがある<sup>142)</sup>。その点はモレキュラーインプリンティング<sup>103)</sup>と似ている。
- ② 30 °C で 5 分間保温した後, ATEE (26.9 mg / ml) , アセトアニリド (25.0 mg / ml) に調製したメタノール溶液を 1 ml 加え, 反応を開始する。反応は Scheme 3 のようにエステル交換と加水分解の両方が起こる。
- ③ 適宜 HPLC で生成物を定量する。HPLC の条件は 2 章と同じである。



Scheme 3

### 3-3-2 シクロデキストリンを用いた際の効果

#### 3-3-2-1 シクロデキストリン<sup>(21~23)</sup>

シクロデキストリン(CyD)はデンプンから CyD 合成酵素の作用により生成する、グルコースが 6 個以上  $\alpha$  1  $\rightarrow$  4 結合で環状に結合した環状オリゴ糖であり、1981 年に Villiers により初めて発見された天然物ホスト化合物である。CyD の安全性は高く、食品、医薬品、化粧品など様々な分野で商品化されている。

CyD にはグルコース単位が 6 個の  $\alpha$ -CyD、7 個の  $\beta$ -CyD、8 個の  $\gamma$ -CyD があり、それぞれベンゼン 1 分子、ナフタレン 1 分子、ナフタレン 2 分子を包接する大きさの疎水性の空洞を有している。CyD の物性を Table 3-1 に、構造を Fig.3-13 に示す。

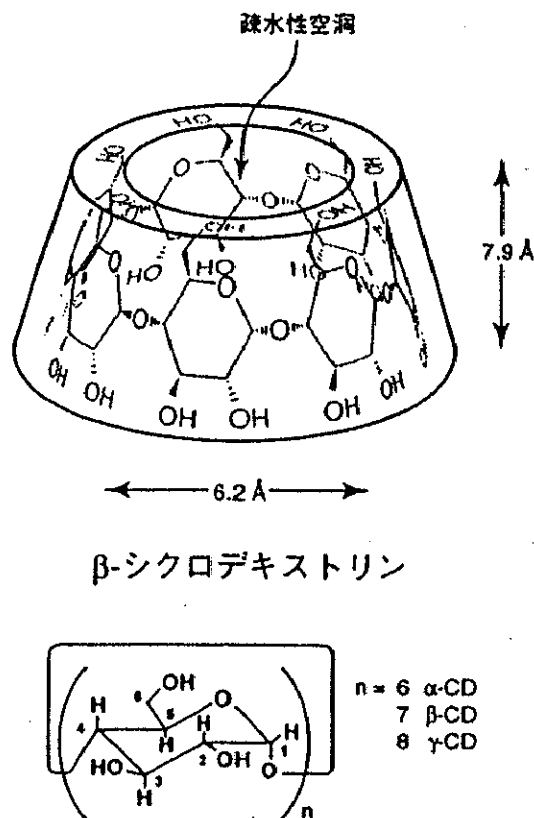


Fig.3-13 シクロデキストリンの構造<sup>121)</sup>

Table 3-1 シクロデキストリンの物性<sup>121)</sup>

	グルコース 残基の数	分子量	内 径	高 さ	水溶性
α-CD	6	973	4.9 Å	7.9 Å	14.5 (g/100ml)
β-CD	7	1135	6.2	7.9	1.85
γ-CD	8	1297	7.9	7.9	23.2

CyDはその疎水性の空洞に物質を取り込むことで様々な効果を生む。疎水性の物質を有機溶媒を用いずに水に可溶化する<sup>124)</sup>、酵素反応の際、基質を包接して反応を制御する<sup>125~127)</sup>、不安定な物質を安定化する<sup>128)</sup>といったものがある。さらにCyDを修飾することで人工酵素としての利用もなされている<sup>129)</sup>。また、凍結乾燥時のタンパク質の保護剤として他の糖類<sup>132, 133)</sup>と同じく効果が確認されている<sup>130)</sup>。本研究においては、有機溶媒中での酵素の安定性向上のためにCyDを添加剤として用いた。その際に酵素との複合体をより確実に形成させるため共凍結乾燥を行った。よって、CyDの凍結乾燥保護剤としての能力も利用したことになる。

### 3-3-2-2 共凍結乾燥の効果

添加剤として用いる CyD と酵素とを同一の水溶液から共凍結乾燥することにより複合体を形成させた。共凍結乾燥の効果を図.3-14 (48 時間後の収率) , 図.3-15 (エステル交換反応初速度) に示す。購入したままの  $\alpha$ -CT のみを反応系であるアセトニトリル-純水 3 % 系で用いても反応は進行しなかった。また、HP- $\beta$ -CyD をただ加えただけでは効果はなかった。 $\alpha$ -CT を凍結乾燥して用いるとエステル交換活性が現れた。これは稀薄溶液から  $\alpha$ -CT を凍結乾燥することで結晶状だったものが綿状になり、有機溶媒を加えた際の分散がよくなったためと考えられる。凍結乾燥した  $\alpha$ -CT に別に凍結乾燥した HP- $\beta$ -CyD 50 mg を加えても効果は上がらなかった。しかし、同一の水溶液から  $\alpha$ -CT と HP- $\beta$ -CyD 50 mg を共凍結乾燥して用いると収率、初速度ともに飛躍的に向上した。共凍結乾燥して初めて CyD の効果が現れることから、この操作によって酵素-CyD 複合体が形成されたと考えられる。

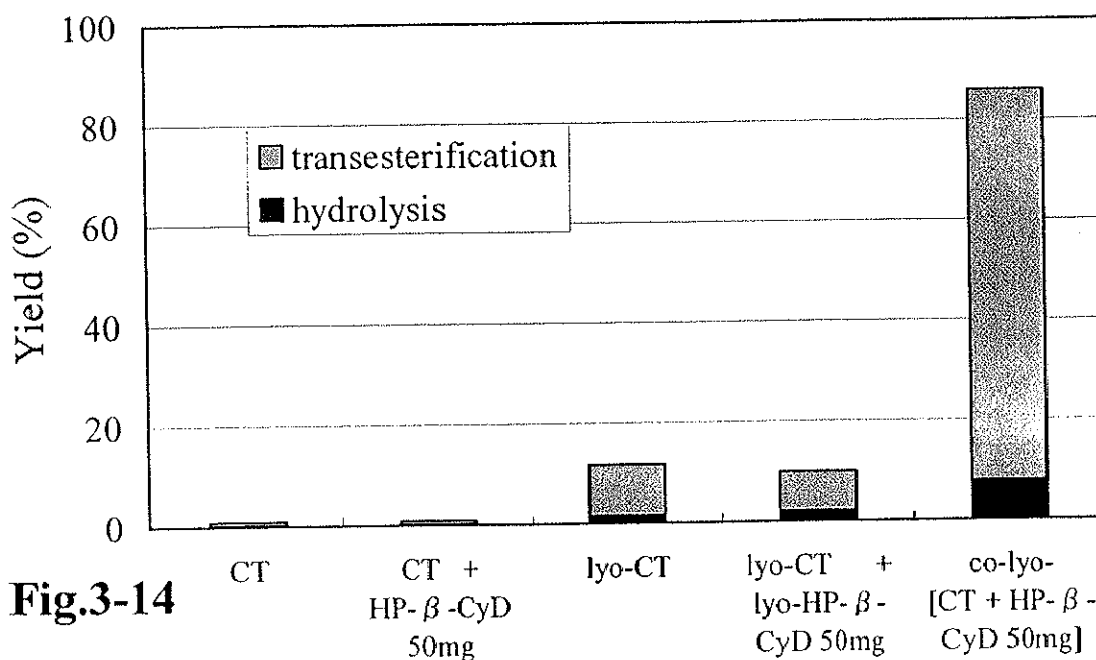


Fig.3-14

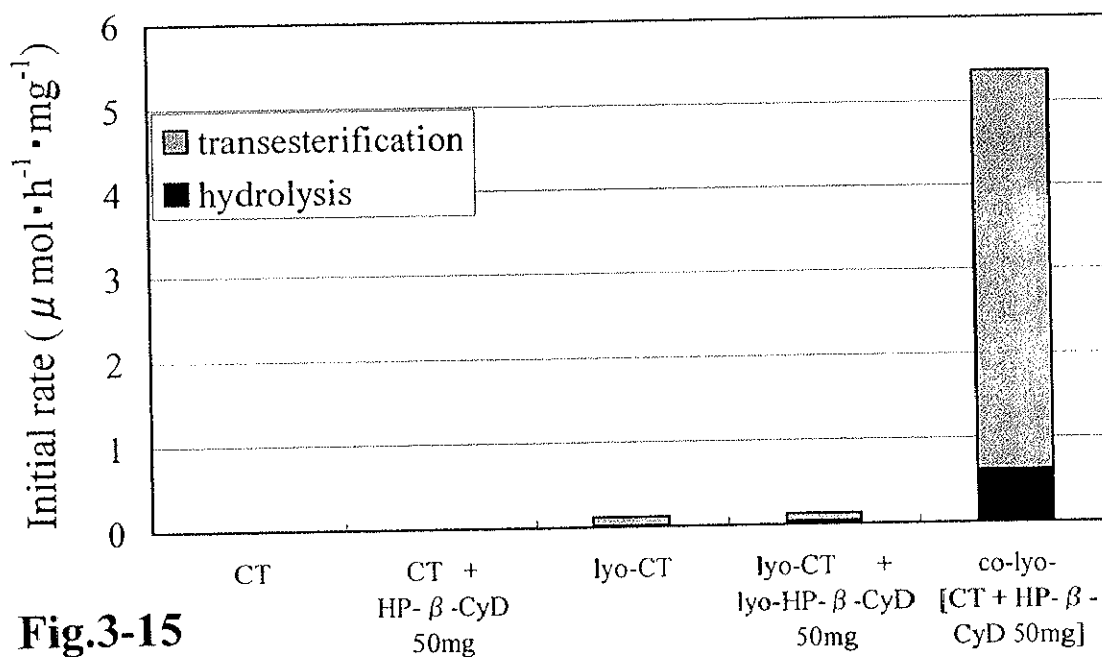


Fig.3-15

### 共凍結乾燥の効果

lyo : 凍結乾燥, co-lyo : 共凍結乾燥

酵素 : α-CT



### 3-3-2-3 シクロデキストリンのサイズの違いによる効果

CyD はグルコース単位の数により性質が異なり、包接する物質の大きさも違ってくる。水溶液中での研究ではタンパク質のフォールディングを助けるシャペロンとしての機能もあることが報告されている<sup>134, 135)</sup>。この機能は、タンパク質中に埋もれていることが多い Trp 残基などの疎水性アミノ酸残基が構造変化で表面に露出した際に CyD が空洞に取り込むことで、分子間での疎水的相互作用による不適切な会合を防止するためと考えられている。そのため  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ -CyD のサイズにより違いが生じるのではないかと考えた。環構造による効果があるのかについてはグルコースと比較することで検討した。

結果を Fig.3-16, 17 に示す。すべて 50 mg 加えた際の結果である。グルコースは添加効果がなかったのに対して、CyD はすべて効果が見られた。グルコースは凍結乾燥時の結晶性が高いために保護効果が小さく、反対にアモルファス状態になる CyD は効果が高いとされている<sup>136~138)</sup>。

置換基を導入していない CyD では、サイズの順ではなく水溶性の高い順に効果が高くなった。これは凍結乾燥時に析出しにくいため、より確実に複合体が形成しやすくなるのと、有機溶媒中で用いた際に複合体周辺に酵素に必要な水を集める能力が高くなるためと考えられる。ヒドロキシプロピル基を導入すると反応初速度はどれも向上し、似通ったものになった。凍結乾燥時の保護効果を高めるにはアモルファス状態になることの他に、凍結乾燥によって奪われる水の代わりをして酵素の構造変化を防ぐために、固体酵素と水素結合をする物質であることが要求される<sup>136, 138)</sup>。CyD に置換基を導入しない場合は C-2, C-3 についている水酸基は分子内で水素結合をしている。しかし、この水酸基にヒドロキシプロピル基を導入することで分子内水素結合がなくなり、他の分子と水素結合するようになるために保護効果が向上すると考えることができる。また、 $\beta$ -CyD に収率の向上が最も見られたのは、有機溶媒中で酵素が変性した際に Trp 残基が溶媒にさらされるようになるが(第2章)、ナフタレン分子が丁度入る大きさの空洞をもつ  $\beta$ -CyD が Trp 残基あるいは他の芳香族アミノ酸残基を取り込み、酵素の不適切な会合体形成を抑制したのではないかと想像される。 $\alpha$ -CyD の場合は Phe, Tyr 残基は入るが Trp 残基は取り込みにくく、 $\gamma$ -CyD は空洞が大きすぎる。このため  $\beta$ 、 $\alpha$ 、 $\gamma$  の順で収率が高くなったのではないかとと思われる。

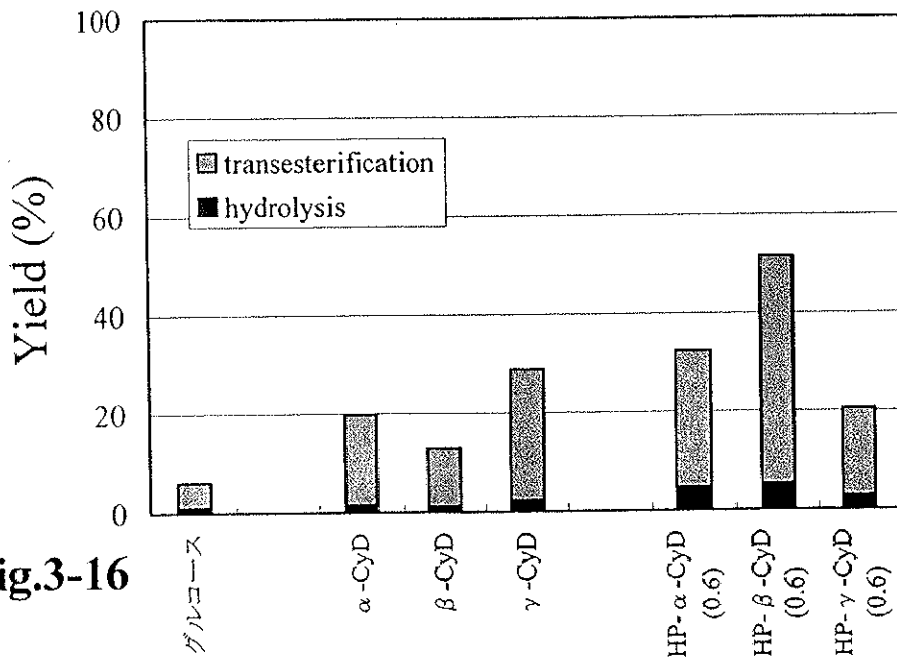


Fig.3-16

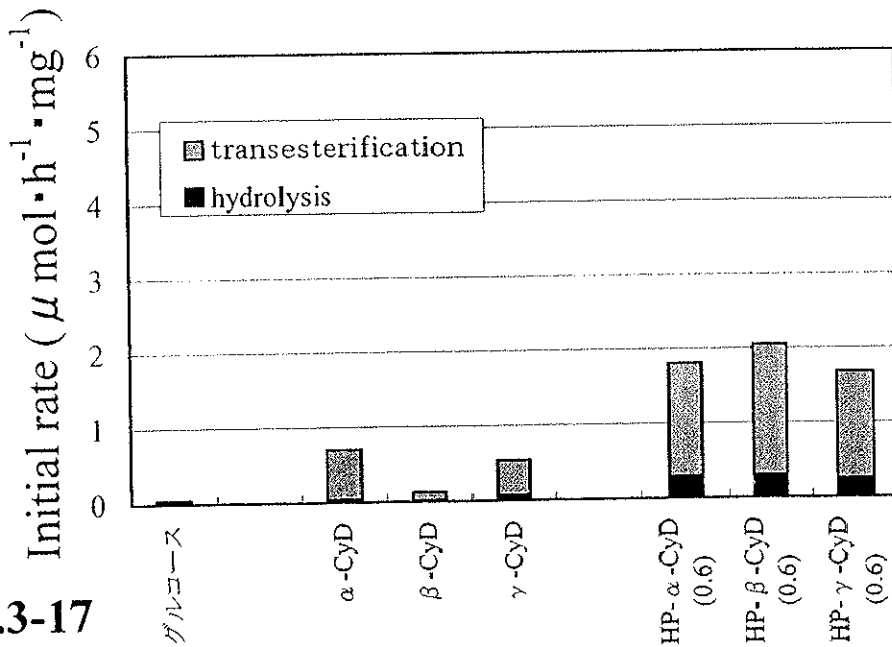


Fig.3-17

### シクロデキストリンのサイズの違いの影響

グルコース : 50 mg, CyD : 50 mg

酵素 : α-CT

#### 3-3-2-4 置換基の違いによる効果

$\beta$ -CyD に関して、導入する置換基の違いが、酵素の安定性向上にどのように影響するかを調べた。すべて 50 mg 加えた際の結果である (Fig.3-18, 19)。置換基を導入していない  $\beta$ -CyD は水溶性が非常に低い。これは水分子が吸着する際のエントロピー変化が  $\alpha$ -CyD,  $\gamma$ -CyD と異なるためである<sup>139)</sup>。溶解性を向上させるためには置換基を導入するが、Di-Me- $\beta$ -CyD よりも HP- $\beta$ -CyD の方が水溶性が高い<sup>140)</sup>。水溶性が高くなるほど効果が上がった。凍結乾燥時の保護効果が水素結合に影響されると、含水アセトニトリル中の水分を複合体に集める効果が高いためと思われる。実際、反応溶液の状態は  $\beta$ -CyD はサラサラした粒子状、Di-Me, Tri-Me, HP (0.6) は粘り気のある白色の塊状、HP (1.0) は粘り気のあるほぼ透明な膜状になり、HP (1.0) 置換が最も吸水性が高いように見えた。

#### 3-3-2-5 保存安定性に及ぼすシクロデキストリンの効果

酵素-CyD 複合体を用いることで活性が向上し、収率も上がった。この効果が持続性のものかどうかを確認するために酵素-CyD 複合体を溶媒中で保存して 5 分後と 6 時間後の活性、収率を比較した。結果を Fig.3-20, 21 に示す。

凍結乾燥した酵素のみでも保存安定性は向上したが、HP- $\beta$ -CyD と共凍結乾燥した場合には活性が向上した状態のまま維持できていることがわかった。比較のために純水を 10 % 加えた場合の、凍結乾燥していない  $\alpha$ -CT の活性変化を示したが、この場合は 6 時間後には失活したことから、今回用いた複合体の有用性が確かめられた。CyD と共凍結乾燥させた酵素は系中で粘性を持つ沈殿となるので、アセトニトリル相を取り除いて再び基質を含む溶液を加えれば、再使用が可能なだけの活性を保持していると考えられる。

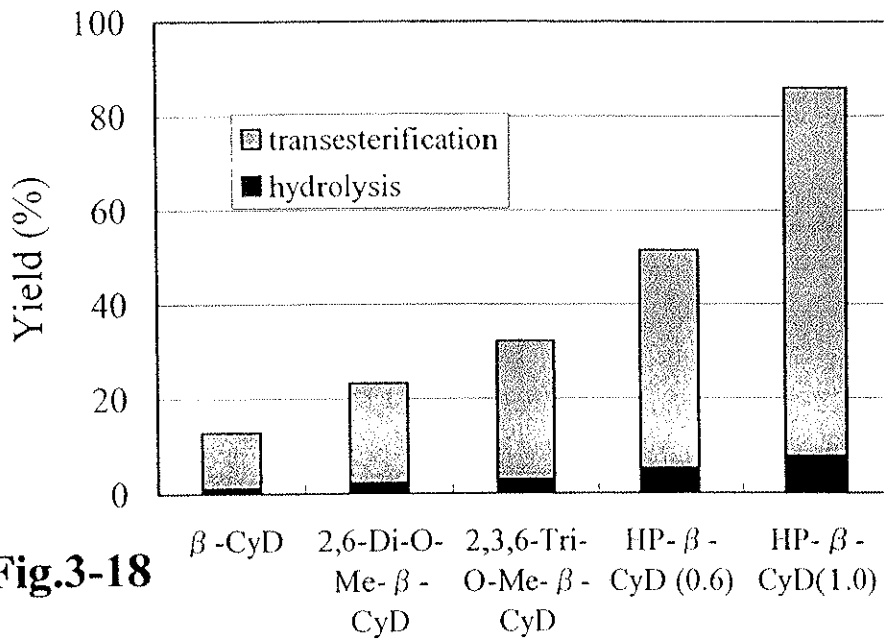


Fig.3-18

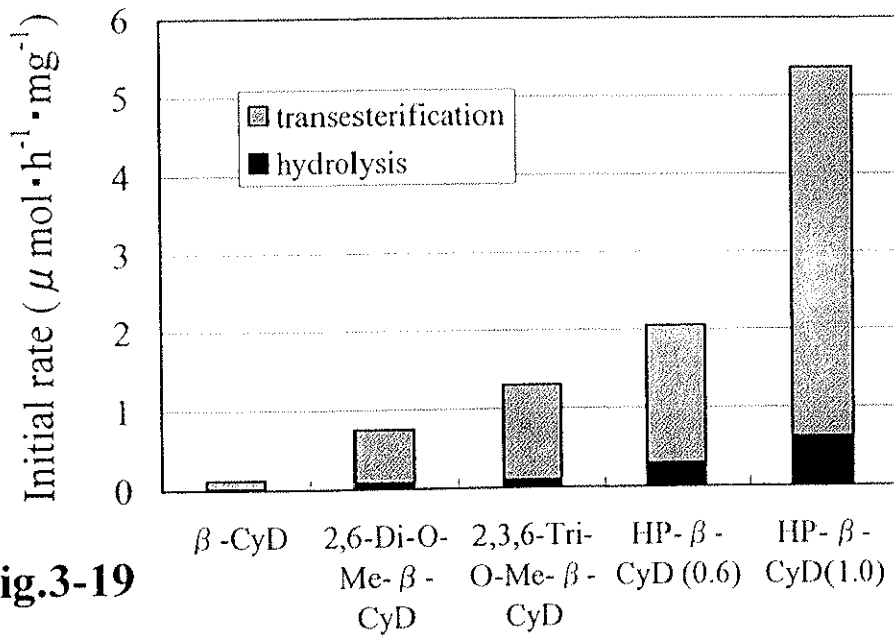
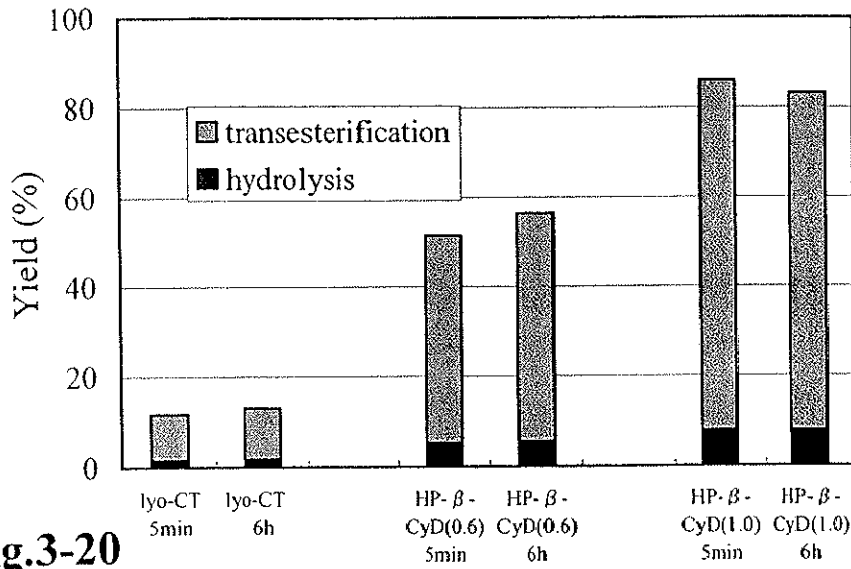


Fig.3-19

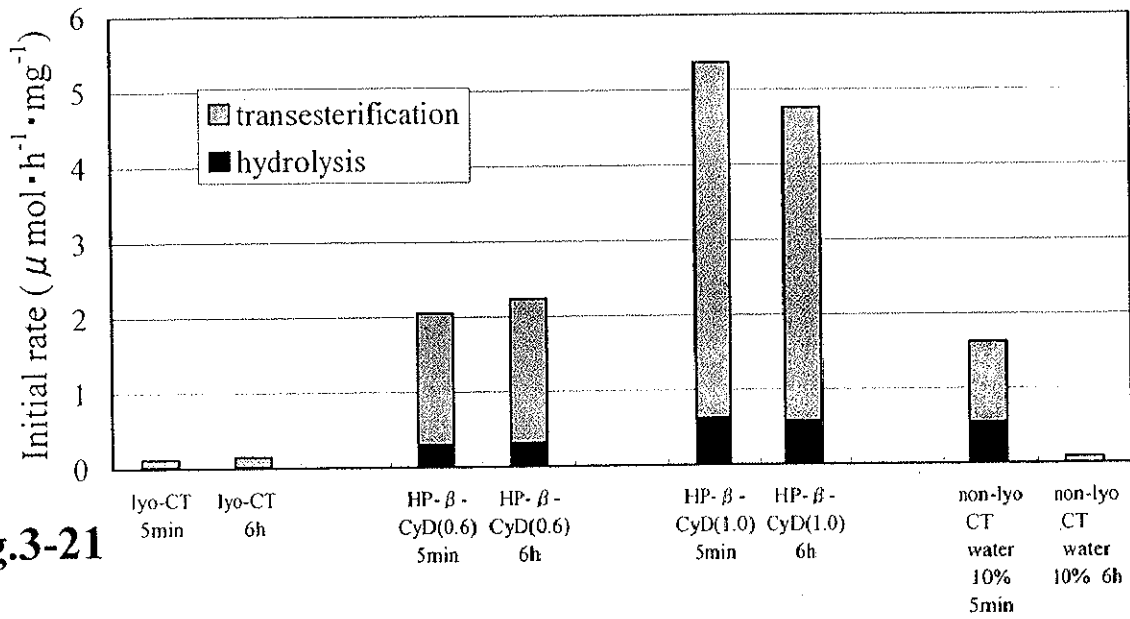
### 置換基の影響

CyD : 50 mg

酵素 :  $\alpha$ -CT



**Fig.3-20**



**Fig.3-21**

### 保存安定性に与える効果

CyD : 50 mg

酵素 : α-CT

### 3-3-2-6 他の酵素との複合体におけるシクロデキストリンの効果

$\alpha$ -CT との共凍結乾燥による複合体形成において最も効果があった HP- $\beta$ -CyD(1.0)を用いて STB または STC との複合体を調製し、反応に用いた。結果を Fig.3-22, 23 に示す。

$\alpha$ -CT では効果があった HP- $\beta$ -CyD(1.0)複合体だが、STB, STC との複合体は全く効果が現れず、かえって活性が低下しかねなかった。単純に酵素表面にとりつき、アセトニトリルからの影響を防ぎ、水分を保持するのであればどの酵素にも効果があるはずだが、そうではなかった。これは $\alpha$ -CT と STB, STC の基質結合部位の構造の違いによるものではないかと考えられる。 $\alpha$ -CT の場合は基質結合部位は  $10 \sim 12 \times 5,5 \sim 6,5 \times 3,5 \sim 4,5$  Å の大きさの幅の狭い、深いポケットであるために  $\beta$ -CyD (内径 6.2 Å, 高さ 7.9 Å) は入り込むことができない。ところが、STB, STC の基質結合部位は単なる酵素表面のくぼみにすぎないために、 $\beta$ -CyD がふさいでしまう可能性は高い。そのために活性が向上しないのではないかとと思われる。

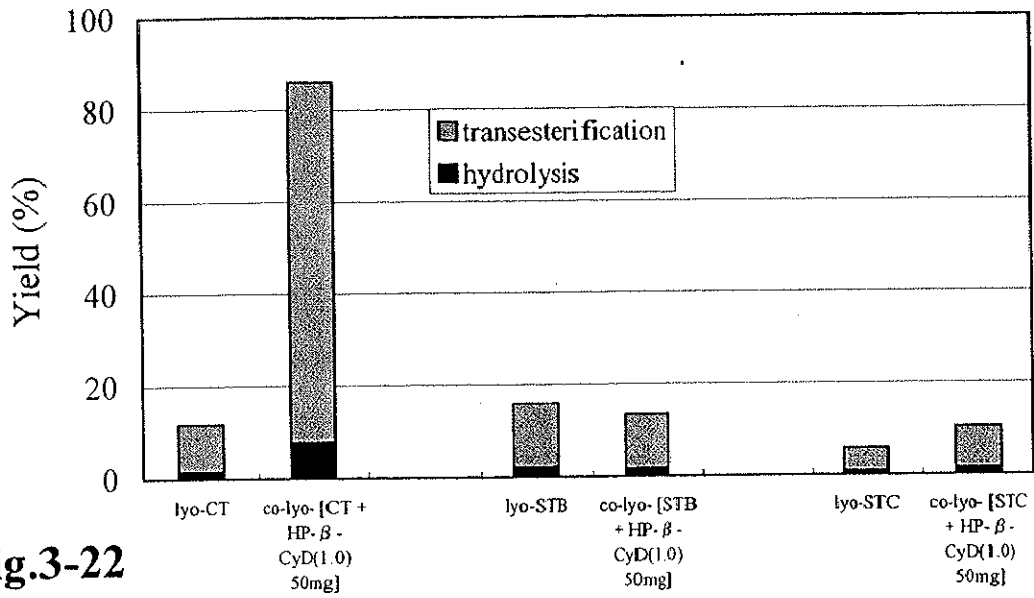


Fig.3-22

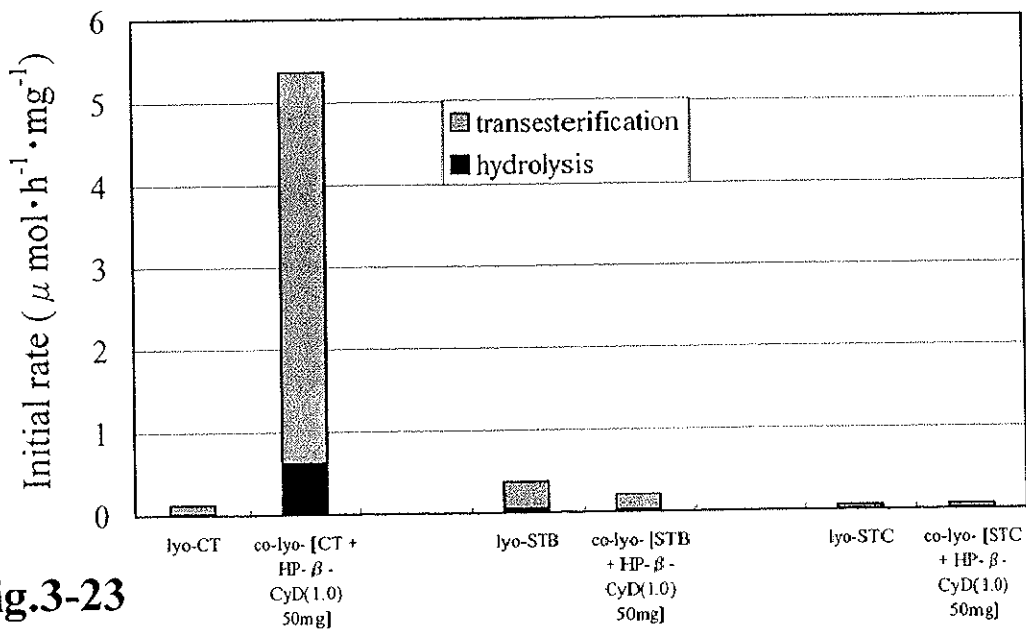


Fig.3-23

### 酵素の種類による共凍結乾燥効果の変化

lyo: 凍結乾燥, co-lyo: 共凍結乾燥

### 3-3-2-7 共凍結乾燥剤の量を変化させた場合の効果

#### ・ グルコース - $\alpha$ -CT 複合体 (Fig.3-24, 25)

加える量を変化させても効果はなかった。凍結乾燥の際の保護剤としてはさらに多くのグルコースを用いる必要があるが、有機溶媒中での使用ではそれが有利に働くかは不明である。結晶性の低いスクロース、トレハロースなどを用いるのがよいかもしれない。

#### ・ $\alpha$ -CyD - $\alpha$ -CT 複合体 (Fig.3-26, 27)

$\alpha$  -CyD は計算上、約 14 mg で  $\alpha$  -CT の周囲を単分子層で覆うことができる。結果からはそれ以上加えた場合でも効果が上がらないことから、単分子層で覆うことができれば充分である可能性も考えられる。

#### ・ HP- $\alpha$ -CyD (0.6) - $\alpha$ -CT 複合体 (Fig.3-28, 29)

この場合は約 17 mg で単分子層を形成できるが、それ以上加えると効果はさらに上がっている。水溶性の高い物質のため、多く用いた方が系中の水を集めるのには適しているのではないかと思われる。



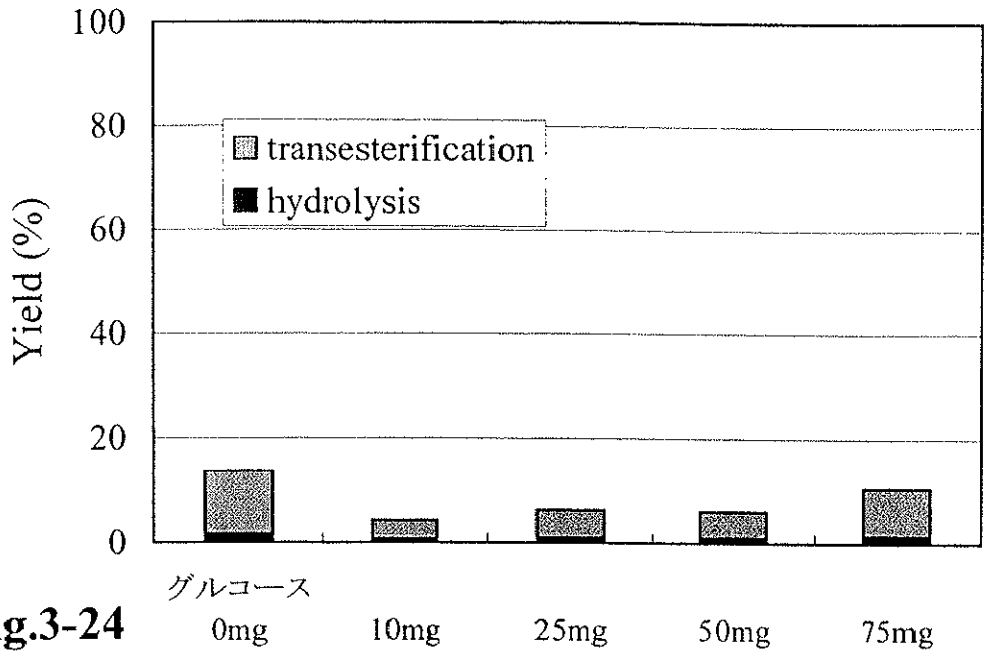


Fig.3-24

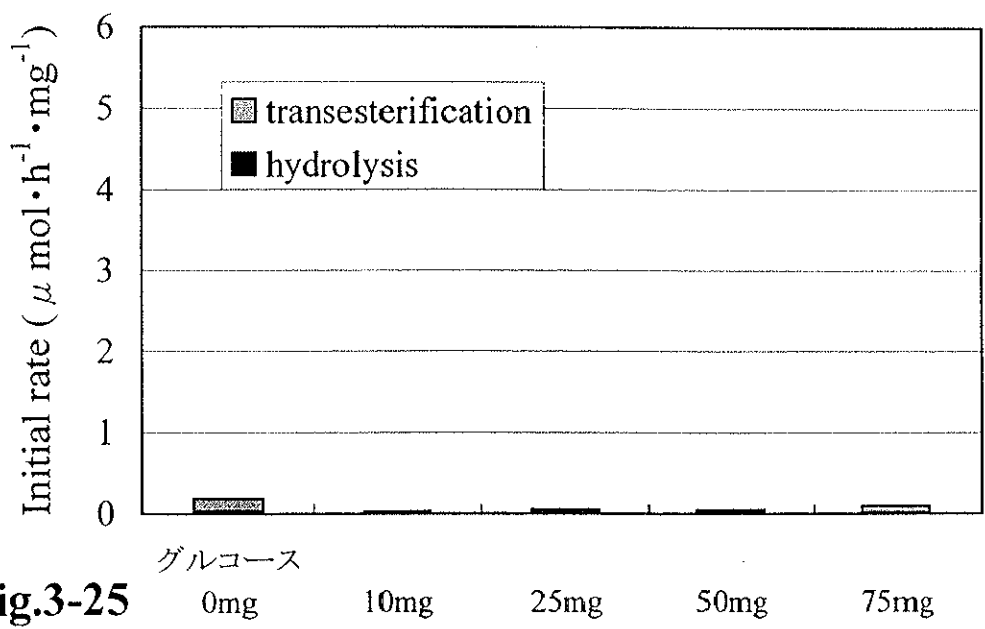


Fig.3-25

添加量による効果の違い  
(グルコース)

酵素 :  $\alpha$ -CT

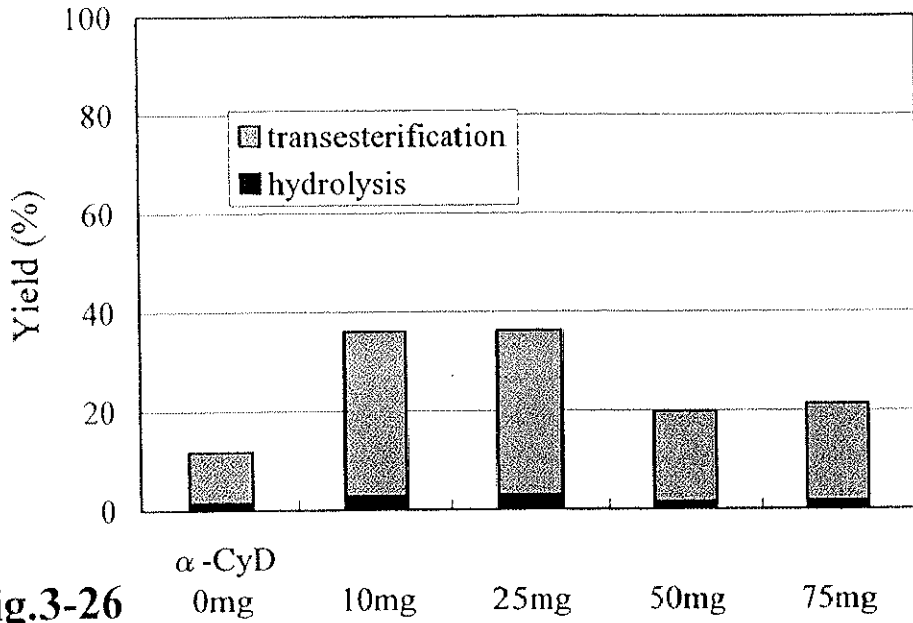


Fig.3-26

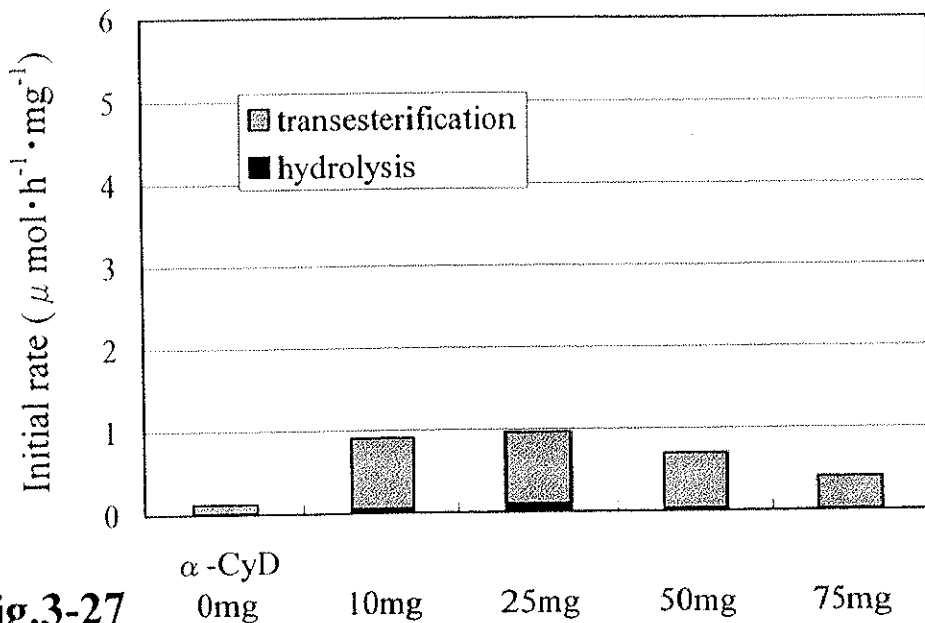


Fig.3-27

添加量による効果の違い  
( $\alpha$ -CyD)

酵素 :  $\alpha$ -CT

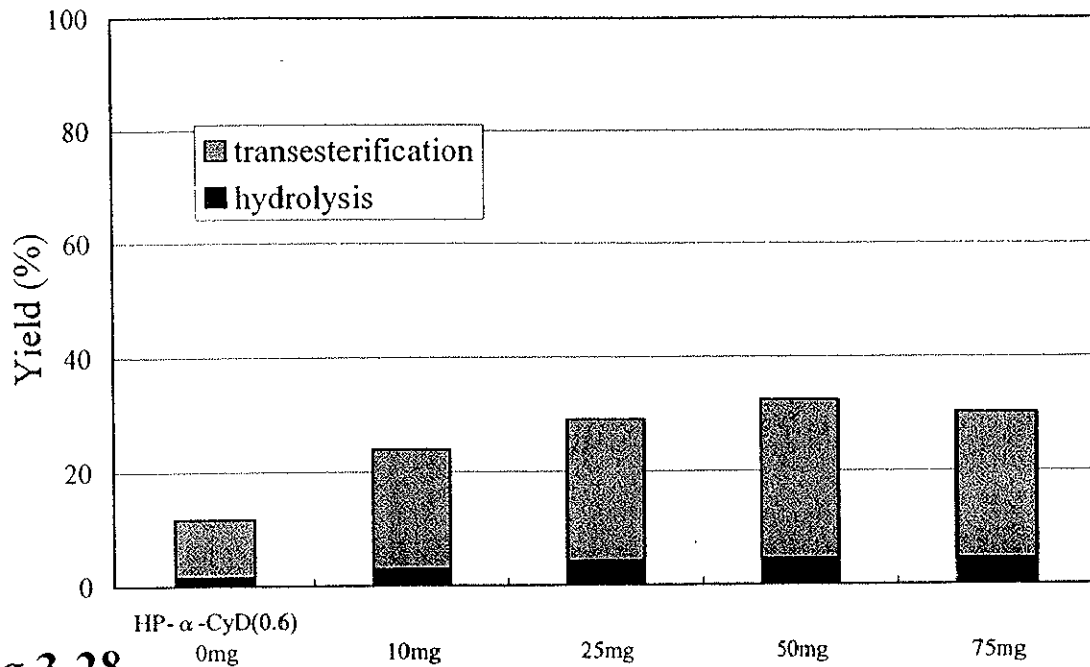


Fig.3-28

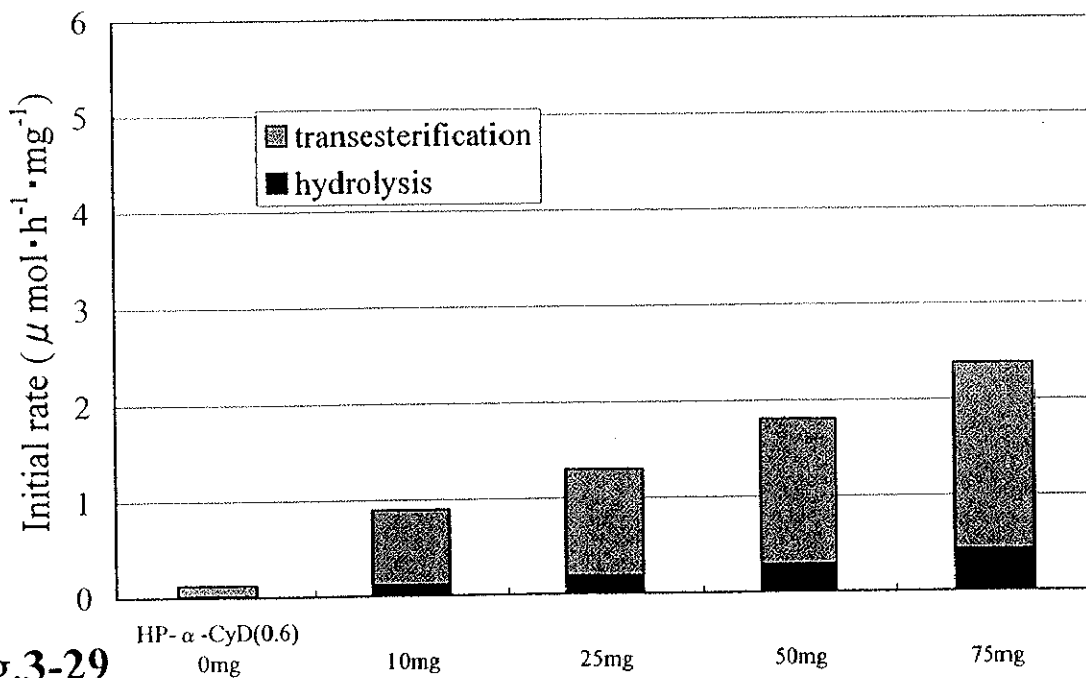


Fig.3-29

添加量による効果の違い  
(HP-α-CyD(0.6))

酵素: α-CT

・  $\beta$ -CyD -  $\alpha$ -CT 複合体 (Fig.3-30, 31)

単分子層で覆うには約 12 mg が必要。  $\alpha$ -CyD と同じく単分子層を形成できれば十分な可能性がある。

・ Di-Me-  $\beta$ -CyD -  $\alpha$ -CT 複合体 (Fig.3-32, 33)

単分子層で覆うには約 15 mg が必要。 それ以上の量を加えても効果はないため、かえって基質の移動を妨げている可能性も考えられる。

・ Tri-Me-  $\beta$ -CyD -  $\alpha$ -CT 複合体 (Fig.3-34, 35)

単分子層には約 16 mg が必要。 この場合もそれ以上加えても効果は上がらなかった。

・ HP-  $\beta$ -CyD(0.6) -  $\alpha$ -CT 複合体 (Fig.3-36, 37)

単分子層は約 15 mg で形成できるが、それ以上に加えるとさらに効果が増した。 系中の水を集める効果が続くと考えられる。

・ HP-  $\beta$ -CyD(1.0) -  $\alpha$ -CT 複合体 (Fig.3-38, 39)

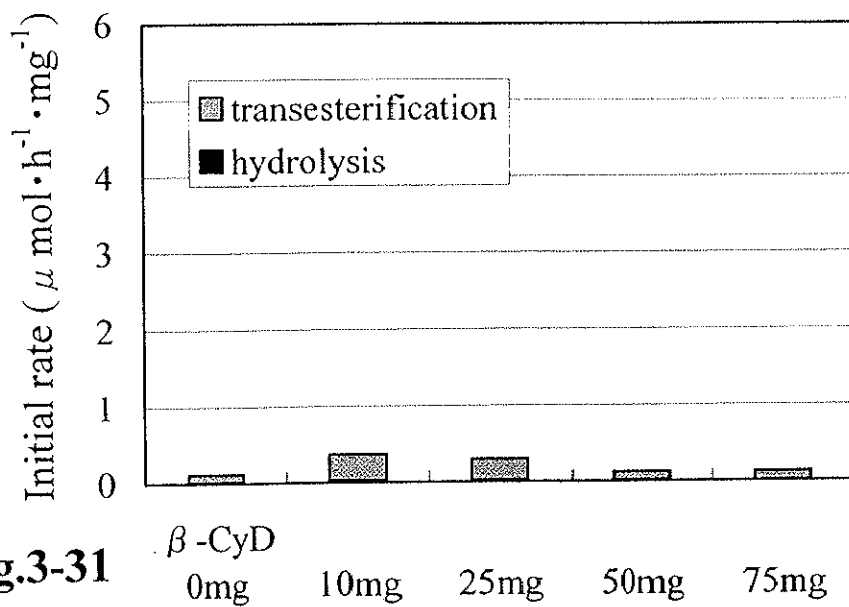
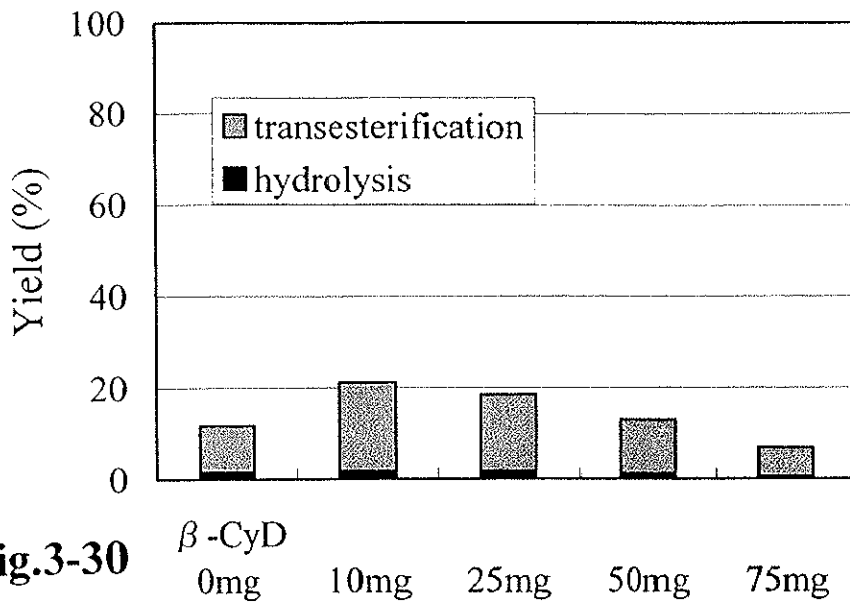
単分子層は約 17 mg で形成できるが、非常に水溶性が高いために少量でも十分に系中の水を捕集することができる。 今回用いた CyD 類の中では最も効果が見られた。 他の水溶性の高い CyD 類も効果が期待できる。

・ HP-  $\beta$ -CyD(0.6) -  $\alpha$ -CT 複合体の 6 時間後の活性 (Fig.3-40, 41)

5 分後に測定した活性からの目立った低下は見られなかった。

・ HP-  $\beta$ -CyD(1.0) -  $\alpha$ -CT 複合体の 6 時間後の活性 (Fig.3-42, 43)

5 分後に測定した活性からの目立った低下は見られなかった。 活性向上効果も、安定性の向上効果もあることから、再利用にも耐えうる複合体と考えられる。



添加量による効果の違い  
( $\beta$ -CyD)

酵素 :  $\alpha$ -CT

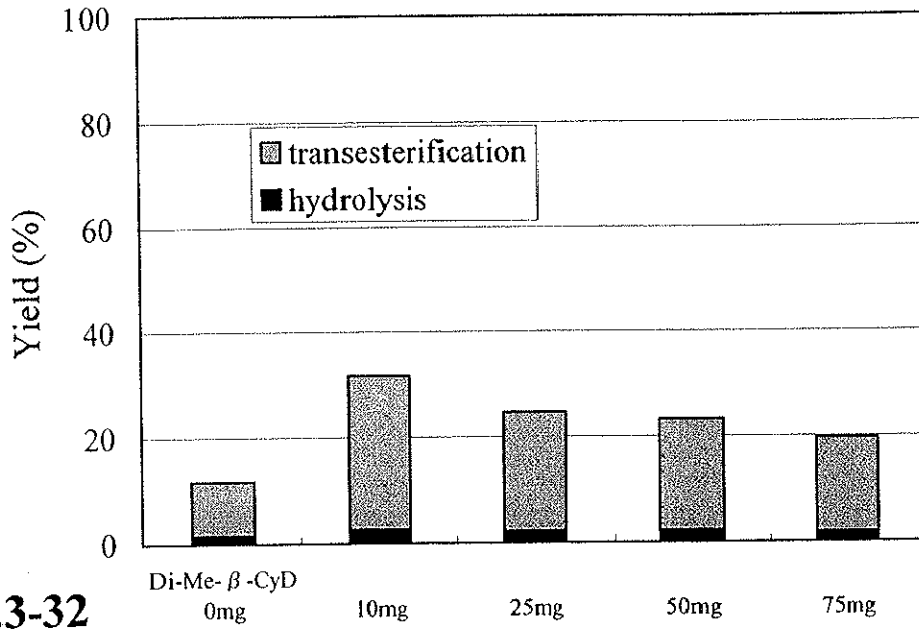


Fig.3-32

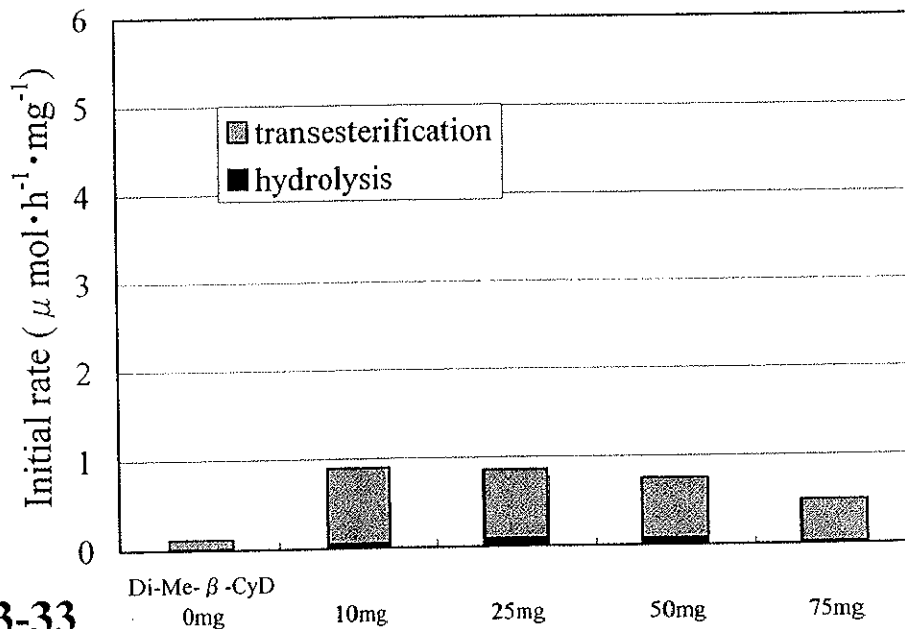


Fig.3-33

添加量による効果の違い  
 (Di-Me-β-CyD)

酵素 : α-CT

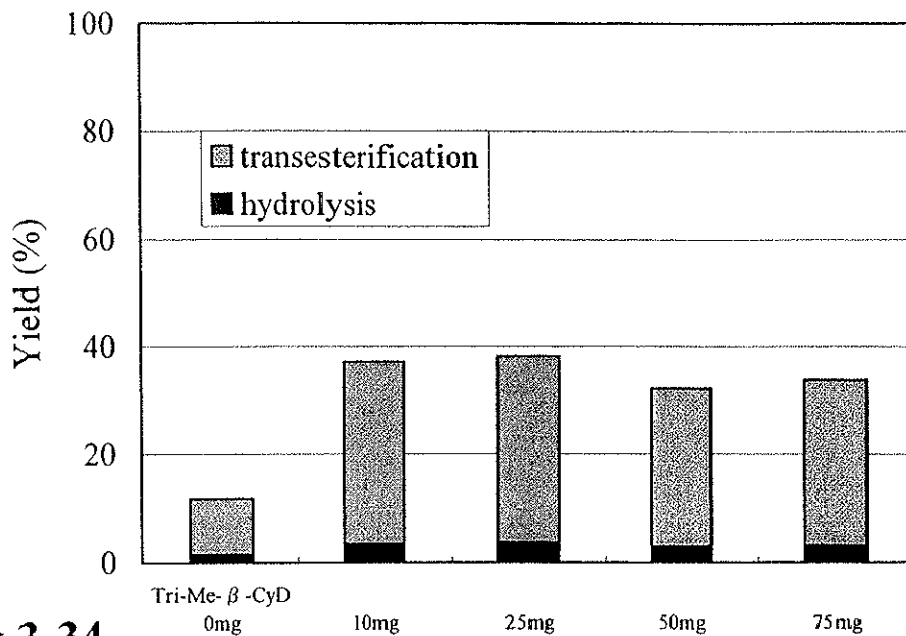


Fig.3-34

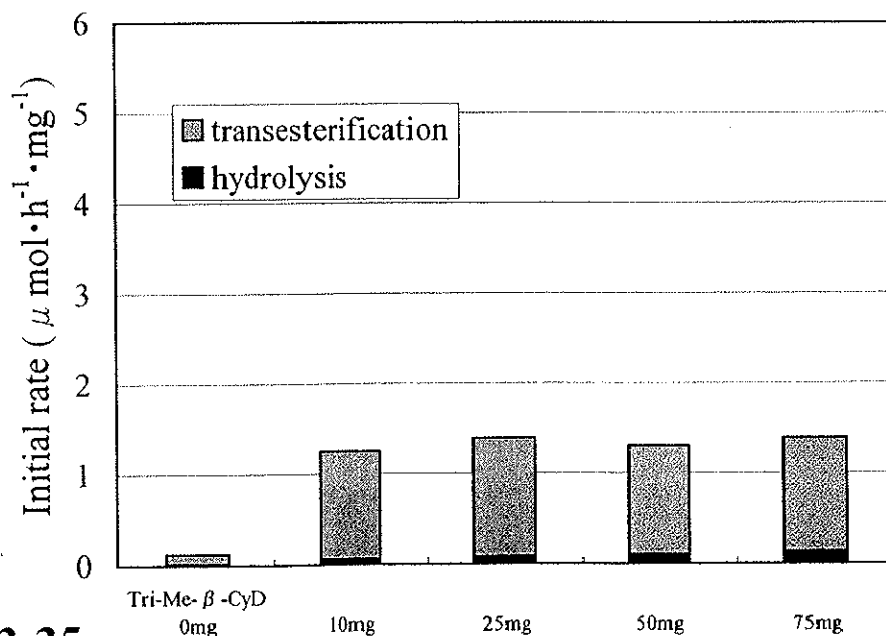


Fig.3-35

添加量による効果の違い  
(Tri-Me-β-CyD)

酵素 : α-CT

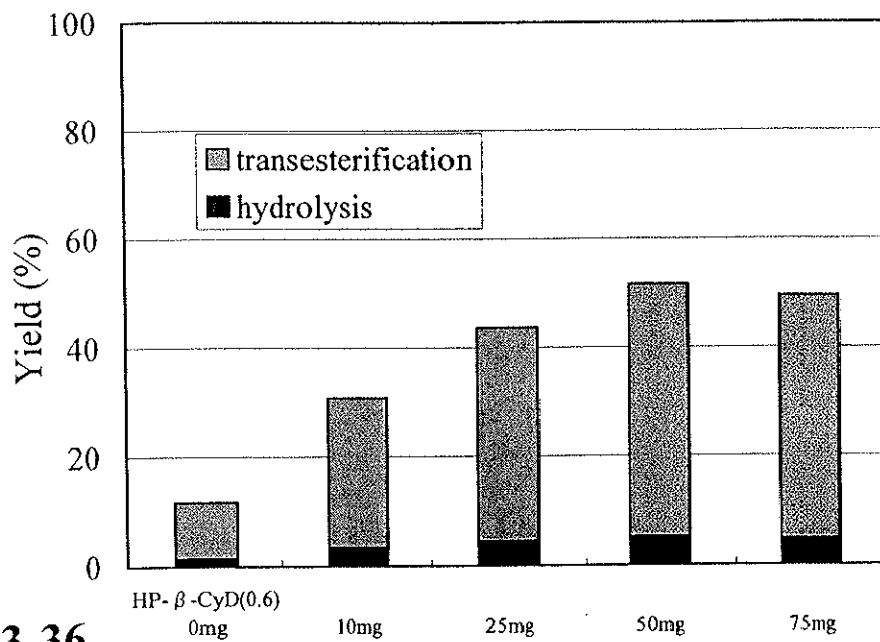


Fig.3-36

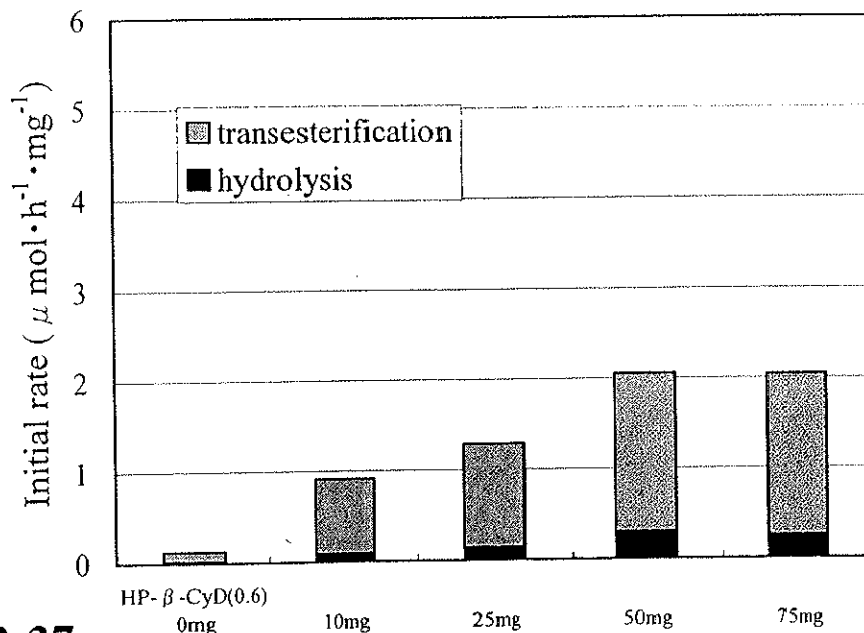


Fig.3-37

添加量による効果の違い  
(HP-β-CyD(0.6))

酵素: α-CT



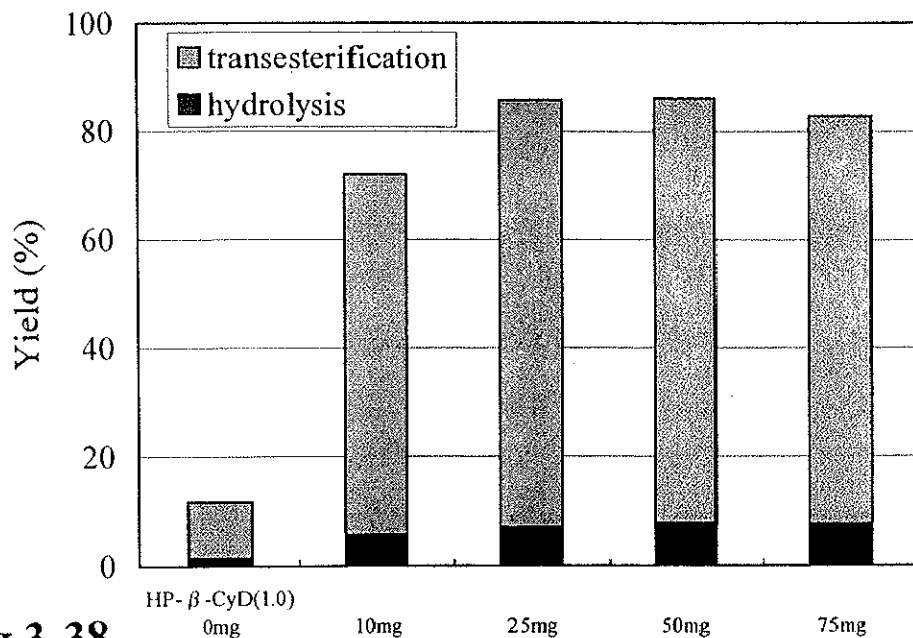


Fig.3-38

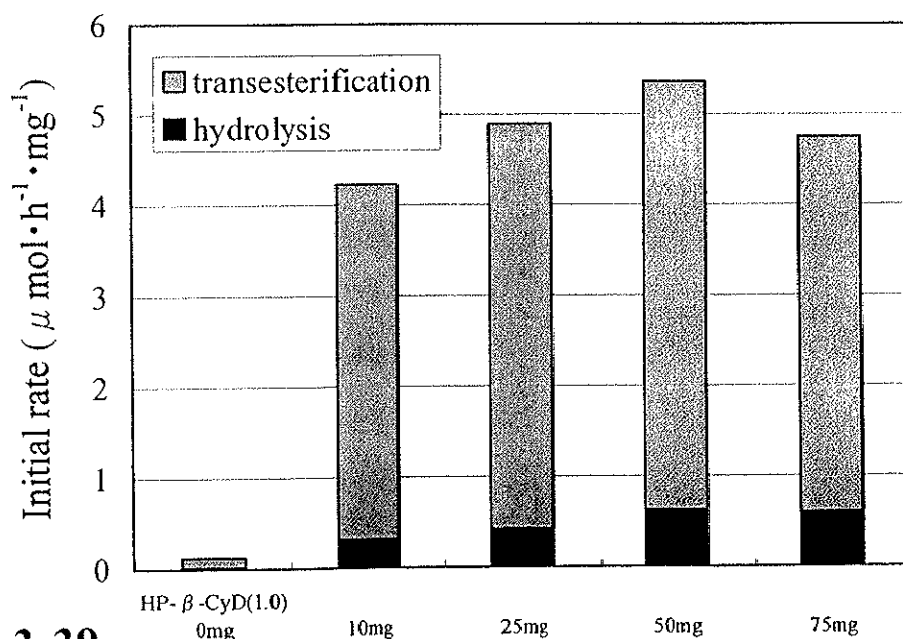


Fig.3-39

添加量による効果の違い  
(HP-β-CyD(1.0))

酵素：α-CT

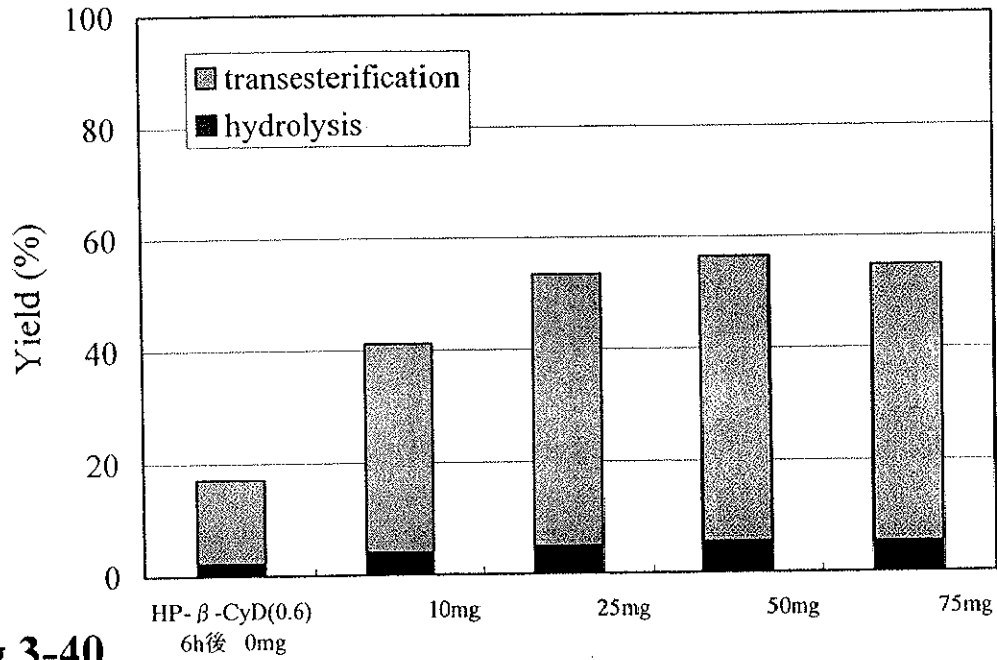


Fig.3-40

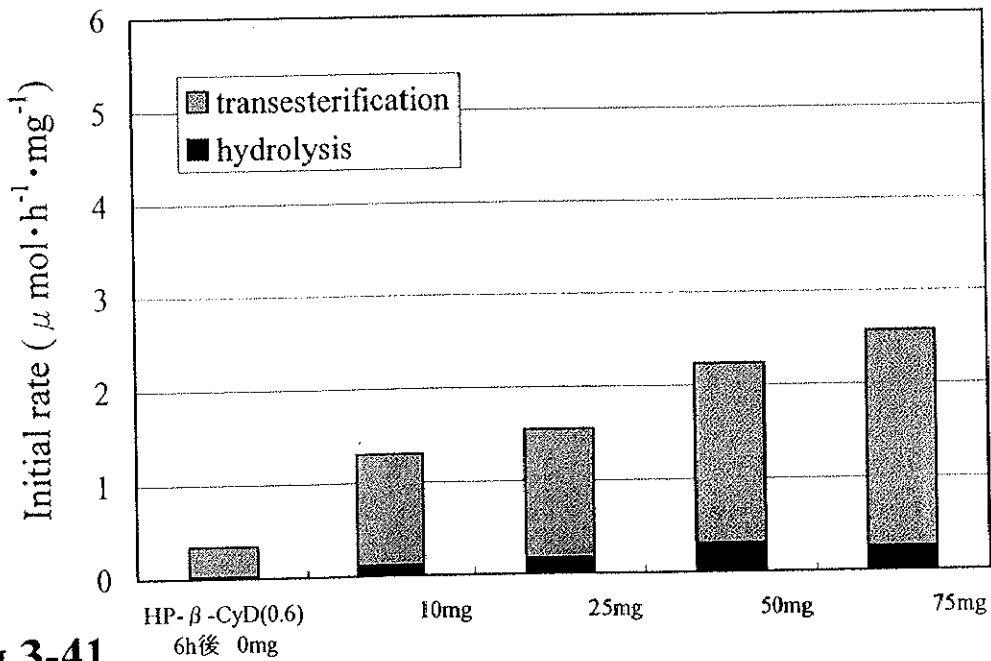
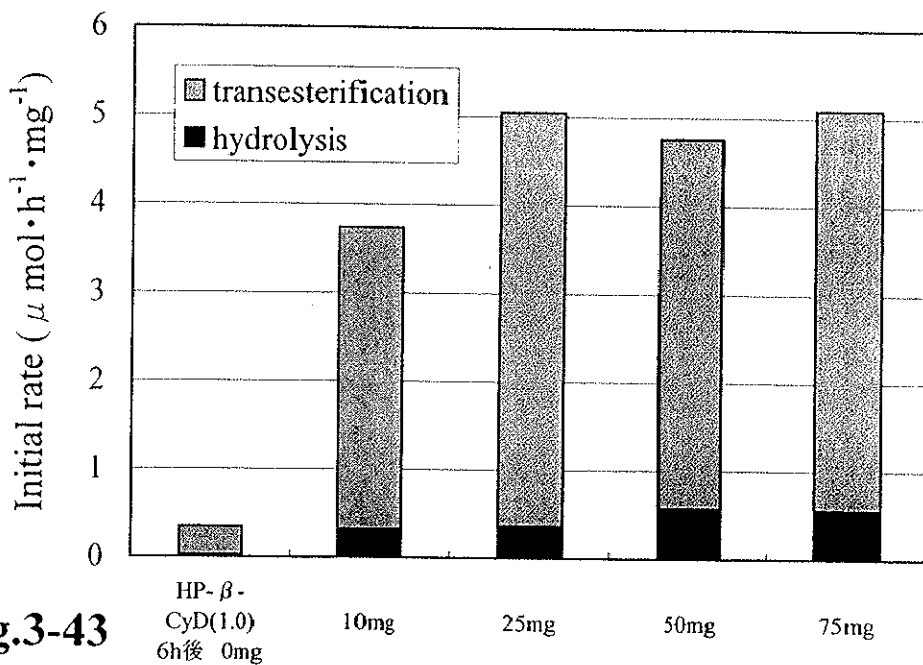
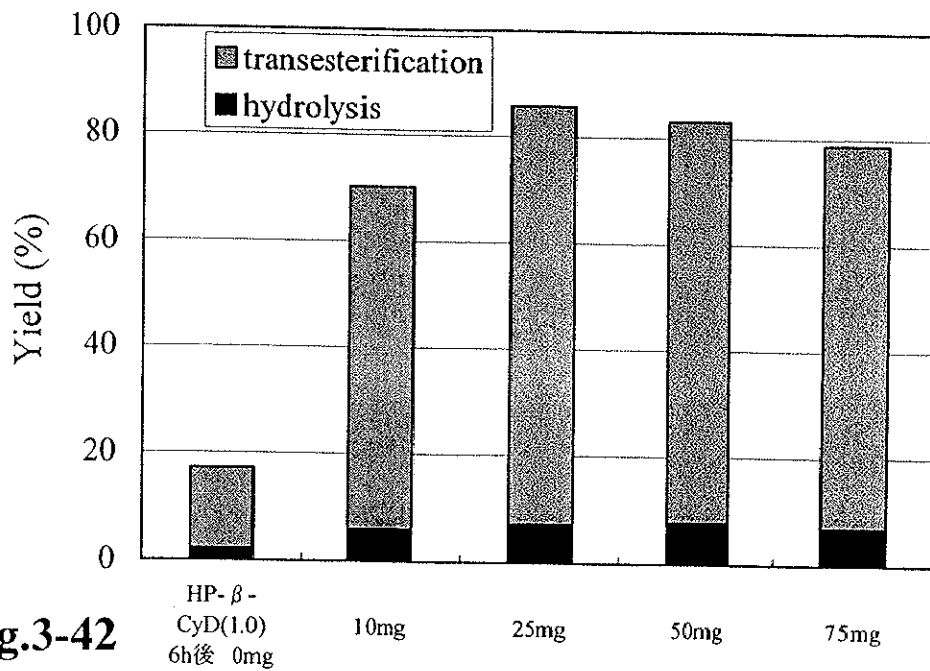


Fig.3-41

添加量による効果の違い  
(HP-β-CyD(0.6), 6時間保存後)

酵素: α-CT



添加量による効果の違い  
 (HP-β-CyD(1.0), 6時間保存後)

酵素 : α-CT

・  $\gamma$ -CyD -  $\alpha$ -CT 複合体 (Fig.3-44, 45)

約 9 mg で単分子層を形成できる。それ以上加えた際には効果がそれ程向上しないことより、単分子層を形成できるだけの量があれば十分と考えられる。

・ HP-  $\gamma$ -CyD(0.6) -  $\alpha$ -CT 複合体 (Fig.3-46, 47)

単分子層を形成するには約 11 mg が必要である。それ以上加えた際には活性は変化しなかったが、収率は低下した。

・ HP-  $\beta$ -CyD(1.0) - STB 複合体 (Fig.3-48, 49)

$\alpha$ -CT との複合体では効果が最も高かった HP-  $\beta$ -CyD(1.0) だが、STB との複合体では効果が上がらなかった。先に述べたように基質結合部位をふさぐ形で酵素周辺に存在している可能性が考えられる。

・ HP-  $\beta$ -CyD(1.0) - STC 複合体 (Fig.3-50, 51)

STB との複合体と同様にあまり効果は見られなかったが、収率はやや向上した。STC は STB と立体構造が類似しているため、同じように基質結合部位に CyD がはまりこみ活性が上がらないのではないかと考えられる。

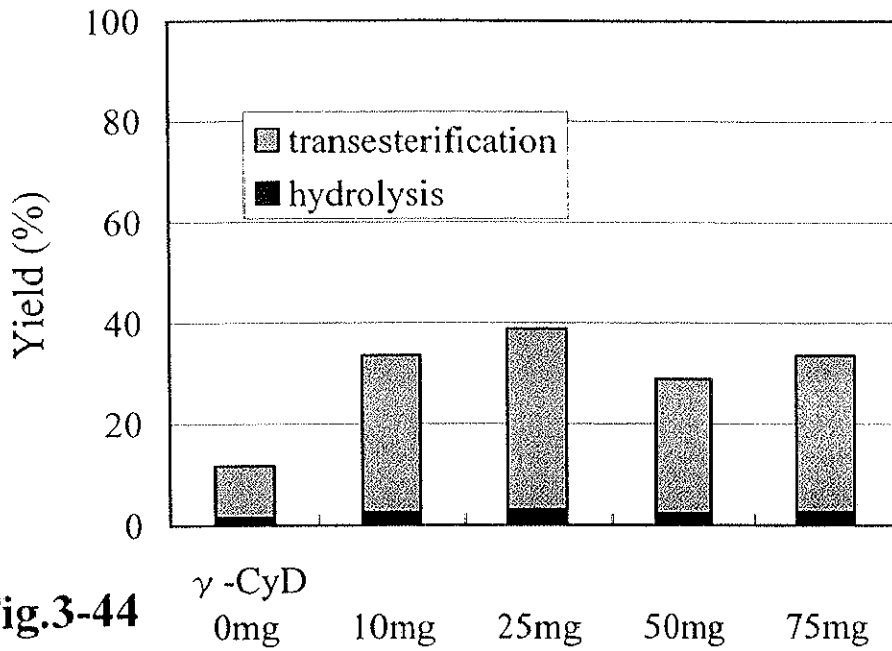


Fig.3-44

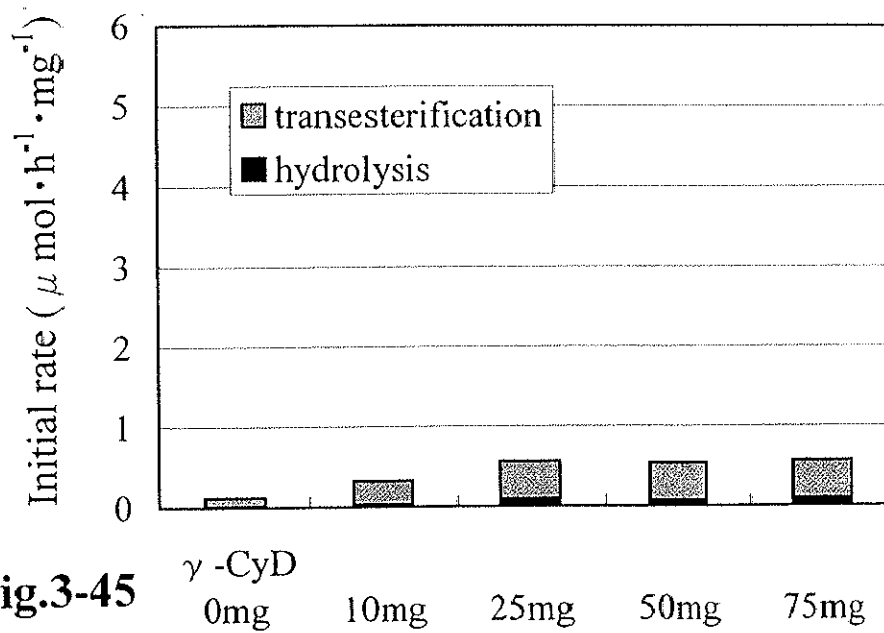


Fig.3-45

添加量による効果の違い  
( $\gamma$ -CyD)

酵素:  $\alpha$ -CT

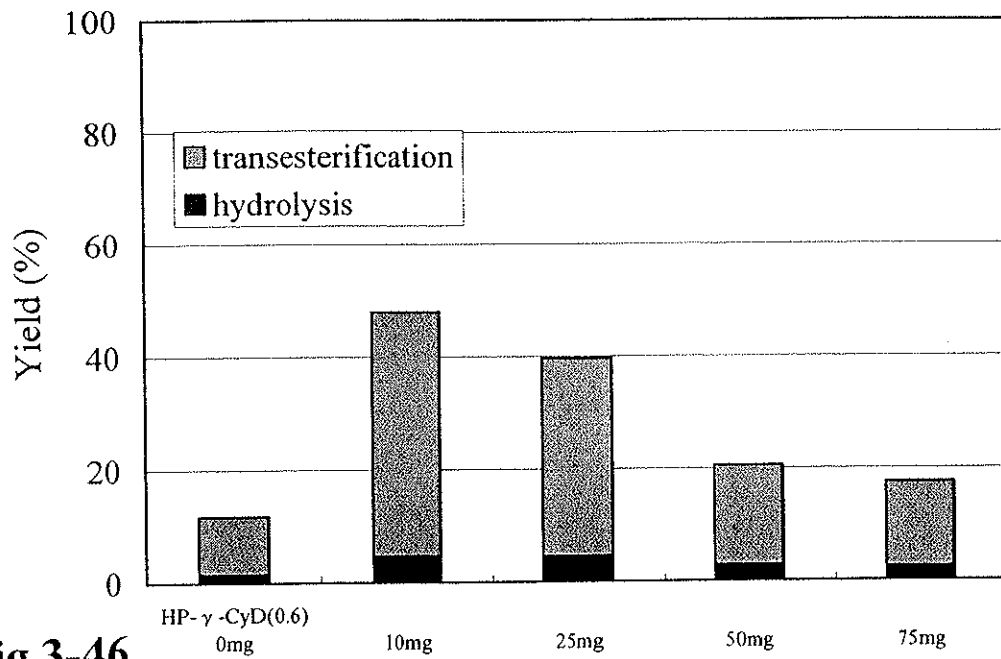


Fig.3-46

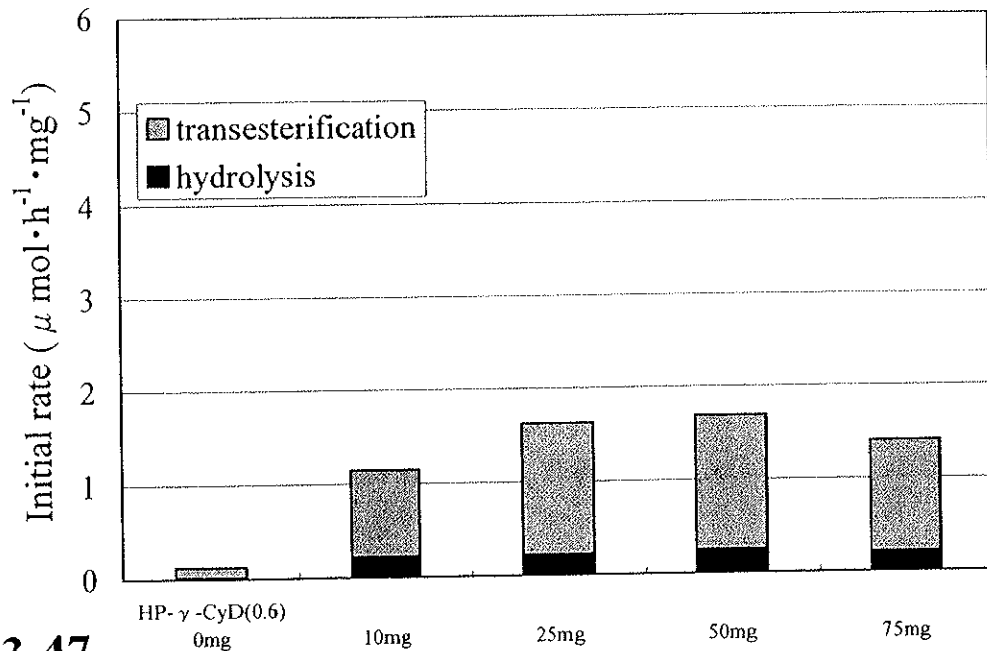


Fig.3-47

添加量による効果の違い  
(HP- $\gamma$ -CyD(0.6))

酵素 :  $\alpha$ -CT

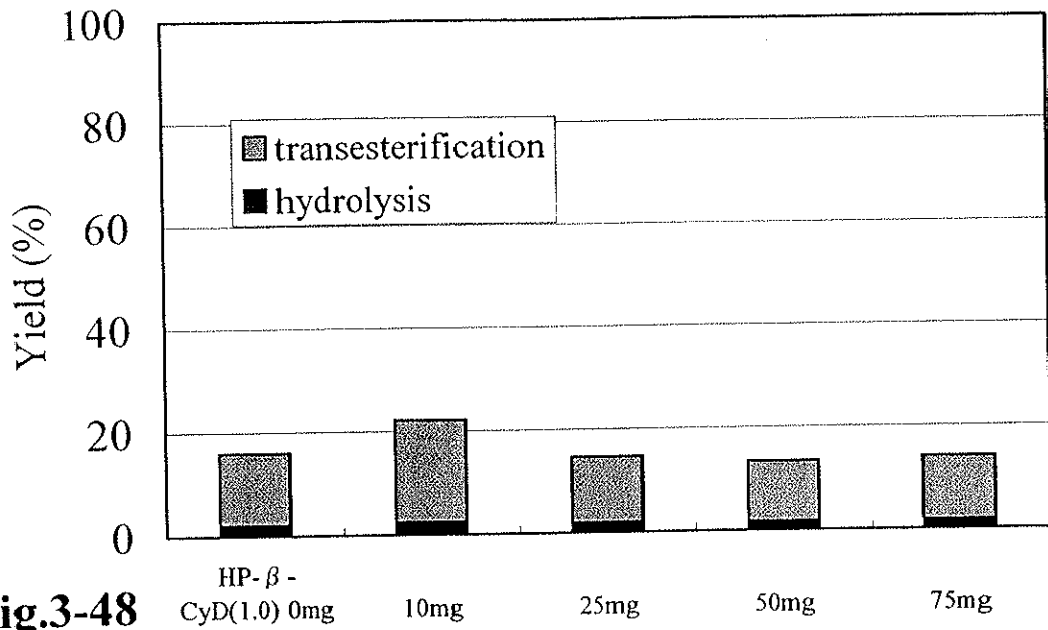


Fig.3-48

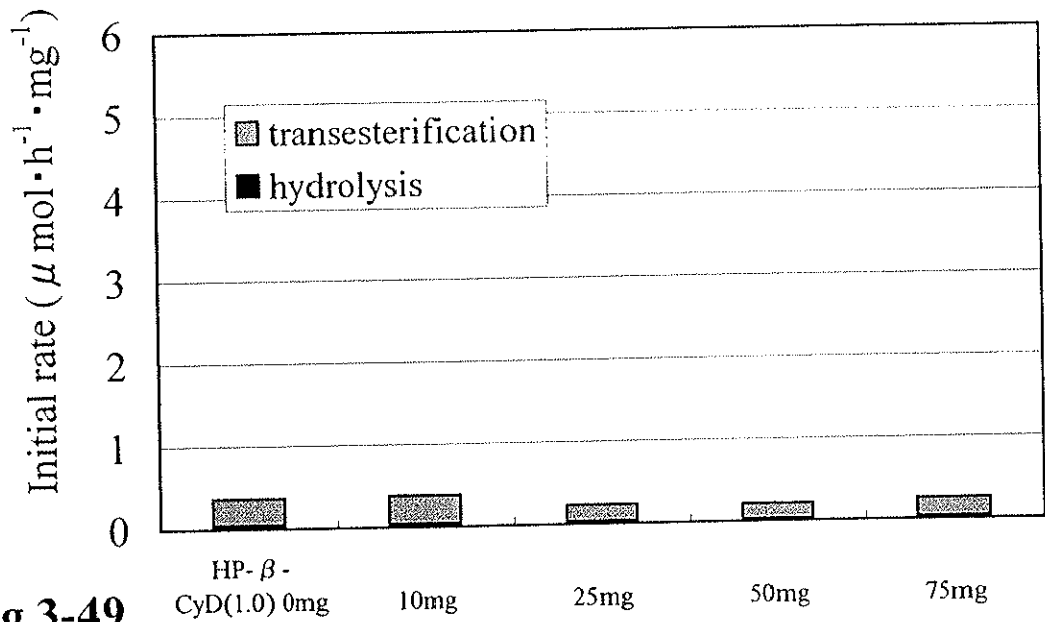


Fig.3-49

添加量による効果の違い  
 (HP-β-CyD(1.0))  
 酵素：STB

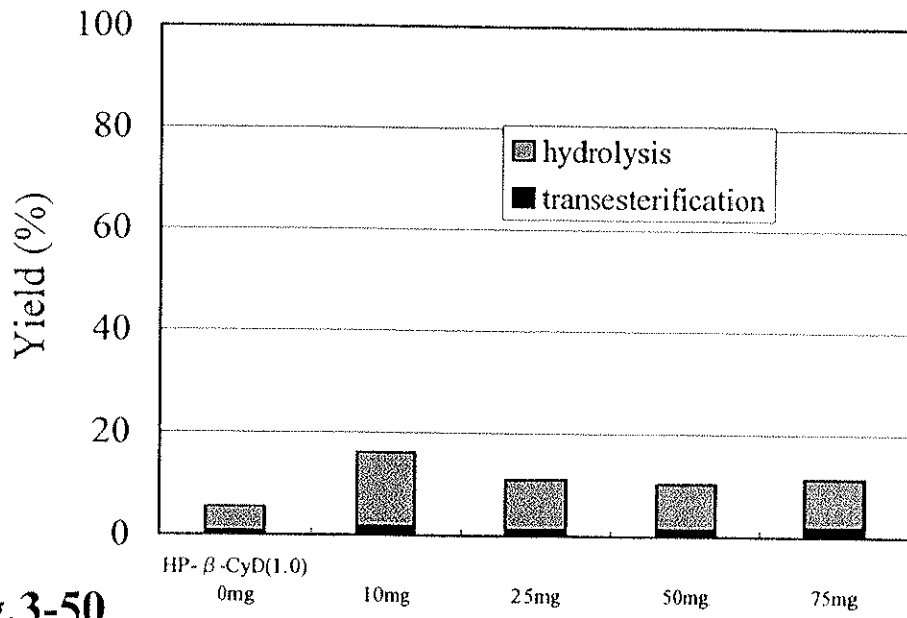


Fig.3-50

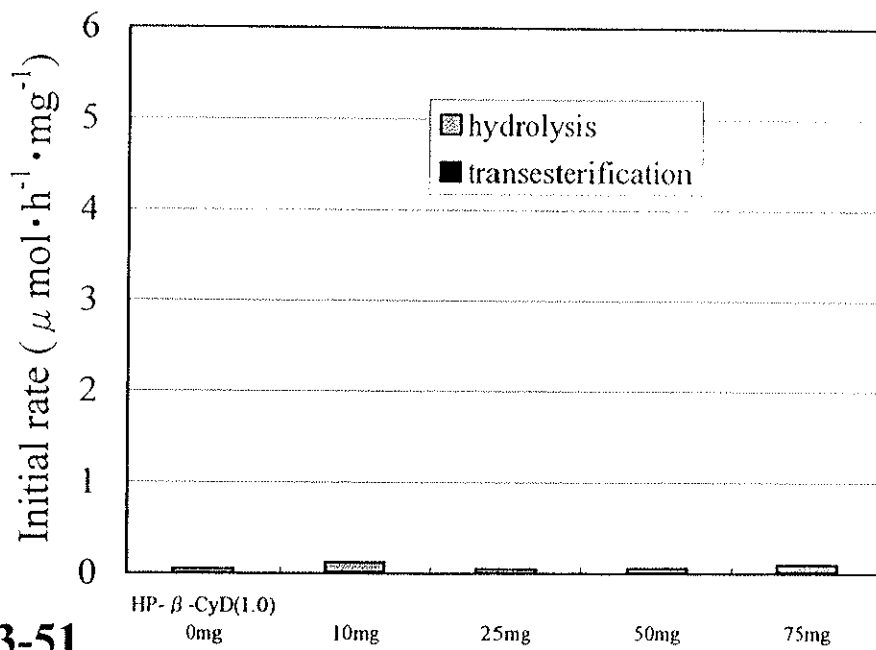


Fig.3-51

添加量による効果の違い  
(HP-β-CyD(1.0))  
酵素：STC



### 3-3-2-8 複合体の外観写真

酵素 - CyD 複合体は共凍結乾燥後は綿状になるが、実際の外観を写真で示す。

- ・凍結乾燥による  $\alpha$ -CT の変化 (Fig.3-52, 53)

Sigma より購入した  $\alpha$ -CT は結晶状の粉末である (Fig.3-52A)。これに 3% 含水アセトニトリルを加えると Fig.3-47A のようにそのままの状態に沈殿する。これに対し、凍結乾燥した  $\alpha$ -CT は Fig.3-52B のように綿状になり、含水アセトニトリルを加えると Fig.3-53B のように懸濁状態になり、系中に分散する。この差が凍結乾燥による  $\alpha$ -CT の活性向上につながっていると思われる。

- ・HP-  $\beta$ -CyD (1.0) を加えた共凍結乾燥の状態 (Fig.3-54, 55)

HP-  $\beta$ -CyD (1.0) を加えて共凍結乾燥させると綿状の調製物が非常に嵩高くなった (Fig.3-54)。嵩は加える HP-  $\beta$ -CyD の量に比例するために、多く加えた場合の方が  $\alpha$ -CT がより分散した状態になっていると考えられる。3% 含水アセトニトリルを加えると系中の水分を吸収し、半透明な膜状になり容器底面にこびり付いた (Fig.3-55)。この状態では  $\alpha$ -CT は溶液よりも水の多い環境にあると推測されるので、活性が向上するものと思われる。

- ・グルコースと共凍結乾燥した際の状態 (Fig.3-56, 57)。

グルコースは共凍結乾燥し、複合体を形成させてもほとんど効果がなかったが、これはグルコースが凍結乾燥の際に結晶化する傾向が強く、この様な状態では、酵素は水溶性の非共有結合した会合体をつくり失活していると考えられている<sup>137)</sup>。実際に Fig.3-56 で見られるようにグルコースを CyD と同じように 50 mg 加えて共凍結乾燥しても嵩高い調製物にはならなかった。 $\alpha$ -CT はこの時点で変性している可能性がある。さらに、含水アセトニトリルを加えても均一に分散しないため複合体表面積が小さく、このことも活性が上がらない原因の一つではないかと思われる (Fig.3-57)。



Fig.3-52 凍結乾燥による $\alpha$ -CTの状態の変化



Fig.3-53 凍結乾燥による $\alpha$ -CTの状態の変化  
(溶解時)

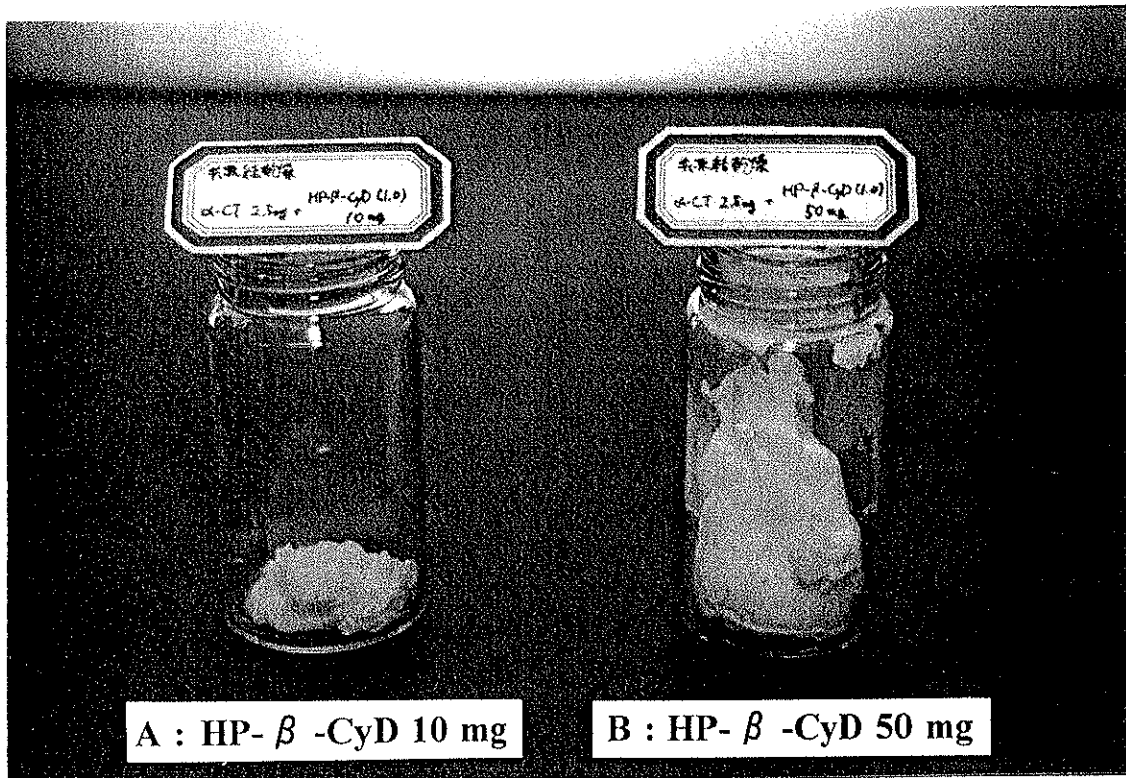


Fig.3-54 添加量を変えた際の状態の変化

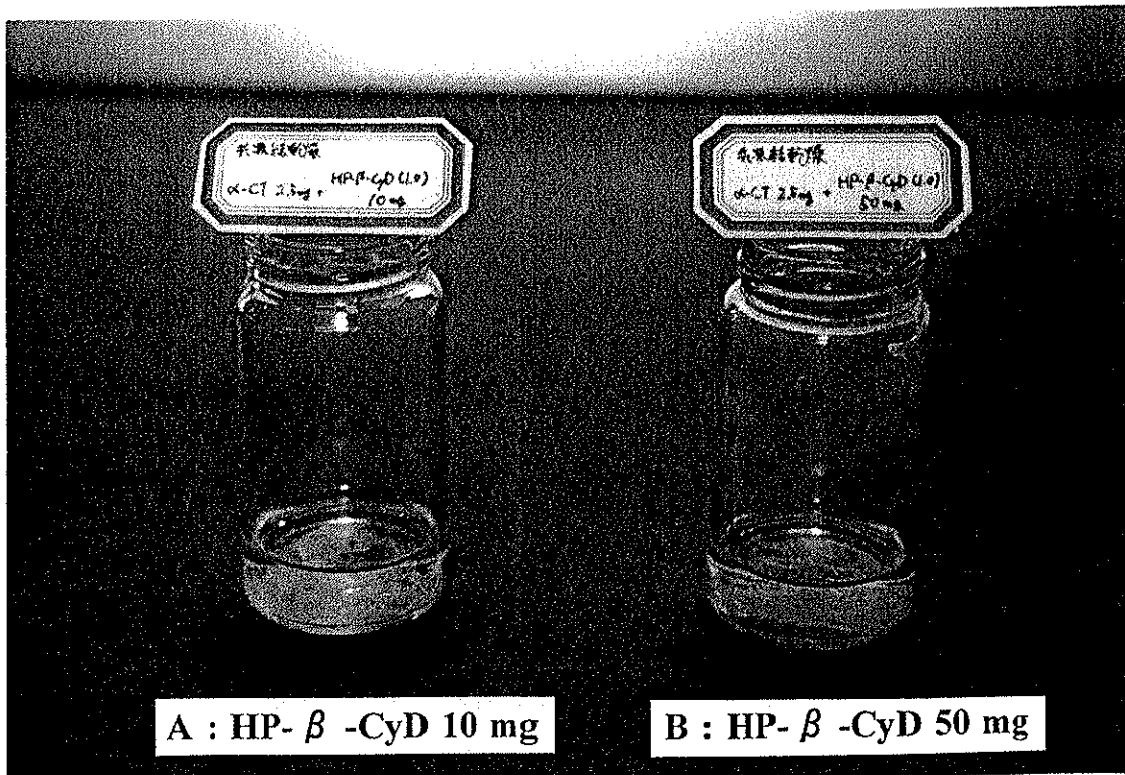


Fig.3-55 添加量を変えた際の状態の変化  
(溶解時)

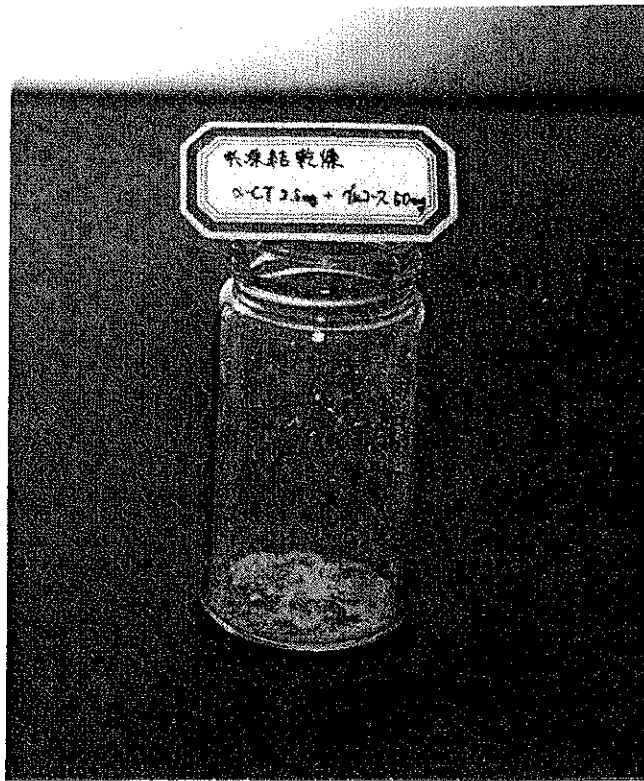


Fig.3-56 グルコース 50 mg を用いた際の状態

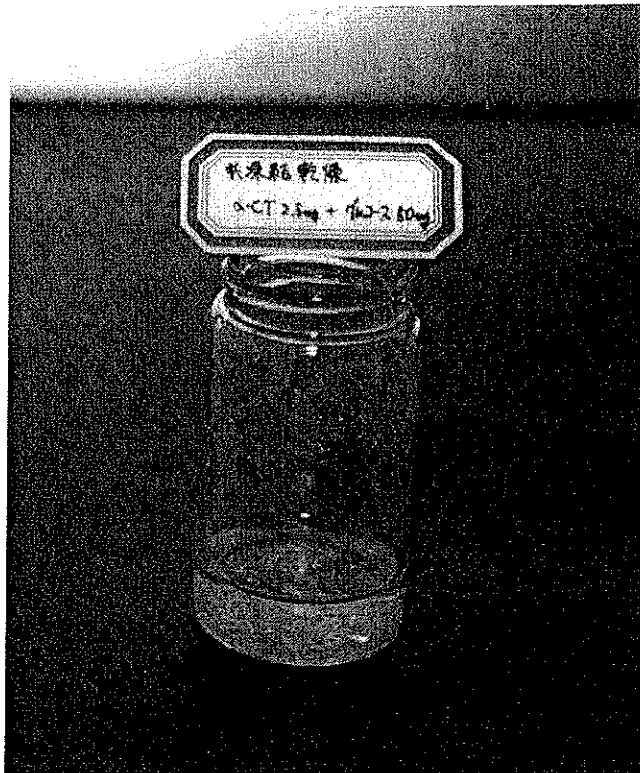


Fig.3-57 グルコース 50 mg を用いた際の状態  
(溶解時)

### 3-4 まとめ

添加剤を用いることで酵素の活性の向上、有機溶媒中での安定化を図ったところ、以下のようなことがいえる。

1. ホルムアミドを反応系に添加する場合には有機溶媒が高濃度の組成でのみ効果が現れた。反応系中に拡散せず、酵素周辺に集まるためではないかと思われる。また、効果は長時間持続することがわかった。
2. シクロデキストリンと酵素を共凍結乾燥することで複合体を作成した。この複合体を反応に用いたところ、通常では活性のない高濃度の有機溶媒中においても高い活性を示した。さらに、この効果は持続性があるため、酵素の安定性も飛躍的に向上したと考えられる。
3. シクロデキストリンは水溶性が高いものほど効果が高く、似たような水溶性の場合は $\beta$ -シクロデキストリンが効果が高かった。酵素表面に露出した芳香族アミノ酸残基を取り込むのに都合の良い空洞を有するために、酵素の不適切な会合を防ぐ効果があると考えられる。
4. グルコースは凍結乾燥時の結晶性の高さから不適當だった。凍結乾燥時の保護効果はアモルファス状態になることで高まるため、シクロデキストリンは有機溶媒中での酵素の安定性向上効果の他に、凍結乾燥時の保護剤としての働きもあると考えられる。

置換基を導入して水溶性を高めたシクロデキストリンは、有機溶媒中での酵素の活性、安定性の向上に非常に効果的に働き、また溶媒を入れ替えることにより複合体の再利用も可能と考えられるため、利用価値が高いと思われる。