

APPLICATION NOTE

樹脂への酵素固定方法

合成吸着剤及び陰イオン交換樹脂への酵素固定について

本ガイドは、合成吸着剤及び陰イオン交換樹脂に酵素を固定する標準的な手順について説明します。

合成樹脂(粒径:約 0.3-1.2mm)に固定した酵素は、酵素反応後の製造物との分離操作や、酵素の再利用が容易であることが最大の特徴です。



1. 合成吸着剤への酵素固定

疎水性の合成吸着剤の表面に、物理的吸着により酵素を固定する方法である。比較的穏やかな条件下で、酵素の構造変化や活性部分の分解を最小限に抑えながら固定することができる。特に有機溶媒あるいはオイル・油分などの疎水性溶媒で用いる酵素の固定に適している。固定反応を促進させるための試薬等が不要であることが、合成吸着剤への酵素固定の最大の利点である。合成吸着剤の粒径範囲は300-1,200 μm に調整されており、比較的早いカラム流速での試験に適用できる。

固定化手順(吸着固定用樹脂)

● 試薬

- 合成吸着剤(以下:樹脂)
- 酵素(溶液あるいは固体・紛体)
- 固定用の緩衝溶液: 酵素活性を安定的に維持できる緩衝溶液。効率的に酵素固定を進行させるためには、約 0.01-0.05M 程度の低濃度緩衝溶液を用いるのが望ましい。

● 手順

- 1) 樹脂の前洗浄: 樹脂を固定用の緩衝溶液で洗浄する。目安として、1gの樹脂に対して4mLの緩衝溶液を用いる。2~4回繰り返し洗浄した後、洗浄液から樹脂を分ける。
- 2) 酵素溶液の準備: 酵素を固定用の緩衝溶液に溶解させる。1)の湿潤樹脂 1g あたり 50-100mgの酵素タンパクを固定する濃度が目安となる(タンパク質濃度は適切な定量法を用いて測定する)。固定操作では 1gの樹脂に対して 4mLの酵素溶液を反応させるため、樹脂 1g に対して、タンパク質の濃度 12.5-25g/Lの酵素溶液 4mL 用意する。
- 3) 酵素固定: 酵素溶液を固定反应用容器に移し、樹脂を投入する。スラリー状の溶液を 24時間穏やかに混合する(注: マグネチックスターラーは樹脂を破損させるので使用不可)。混合操作時の温度は、酵素の安定条件にも依存するが、20-30°Cの範囲に調整することが望ましい。
- 4) ろ過とリンス: 3)の溶液をろ過して、ろ液中に残ったタンパク質濃度を測定して、樹脂に固定されたタンパク質量を計算して固定率を求める。樹脂をリンス用緩衝溶液で2~4回洗浄する。リンス後の樹脂をろ過により分離する。
- 5) キャラクタリゼーション(固定化樹脂の特性評価): 固定化後の樹脂の水分含有率・活性度などを測定。
- 6) 保存: 固定後の樹脂は適当な容器に密封し、2-8°Cで冷蔵保存する。(注意: 氷結による樹脂の破砕を防ぐため、冷凍保管は避ける。)

2. 陰イオン交換樹脂への酵素固定

強塩基及び弱塩基陰イオン交換基を備えた樹脂は、酵素を特定の pH に平衡化処理するとイオン相互作用により固定できる。陰イオン交換樹脂の粒径範囲は 300-1,200 μm に調整されており、比較的早いカラム流速での試験に適用できる。陰イオン交換樹脂による固定は酵素の緩衝液を最適化することで、活性を失うことなく簡単な操作で固定でき、また適当な薬剤による再生処理をすることにより、失活した固定酵素を脱離させて、樹脂を再利用することも可能である。酵素緩衝液の pH は、酵素の等電点を考慮して最適な状態にする必要がある。例えば等電点 3.8 の酵素は、pH3.8 よりやや高い緩衝液においては負電荷を帯びるため、正電荷を帯びた陰イオン交換基と強固に結合する。

固定化手順(陰イオン交換樹脂)

- 試薬

- 陰イオン交換樹脂(以下:樹脂)
- 酵素(溶液あるいは固体・紛体)
- 緩衝溶液: 酵素の等電点と溶液の pH を考慮する。固定させる酵素は負に帯電させる必要があり、酵素の等電点より pH 値が 1-2 高い緩衝溶液を用いる。効率的に酵素固定を進行させるため、約 0.01-0.05M の緩衝溶液を用いるのが望ましい。

- 手順

- 1) 樹脂の平衡化処理: 樹脂を低濃度緩衝溶液(0.01-0.02M)で数回洗浄する。樹脂を入れた緩衝溶液の上澄みの pH が酵素の等電点より 1-2 高い値にならない場合は、1M HCl 溶液(場合により 1M NaOH 溶液)を数滴ずつ滴下して調整する。このまま pH が2時間以上安定することを確認したら、樹脂をろ過して脱水する。
- 2) 酵素溶液の準備: 酵素を固定用の緩衝溶液に溶解させる。1)の湿潤樹脂 1g に対して 4mL の酵素溶液を反応させる。酵素溶液の pH も1)で平衡化した値に合わせる。
- 3) 酵素固定: 酵素溶液を固定反应用容器に移し、樹脂を投入する。溶液を穏やかに混合する。混合操作は 24 時間以内に停止する(注: マグネチックスターラーは樹脂を破損させるので使用不可)。
- 4) ろ過とリンス: 3)の溶液をろ過して、ろ液中に残ったタンパク質濃度を測定して、樹脂に固定されたタンパク質量を計算して固定率を求める。樹脂を4倍量の脱塩水で2~4回洗浄する。
- 5) キャラクターゼーション(固定化樹脂の特性評価): 固定化後の樹脂の水分含有率や酵素活性を測定。
- 6) 保存: 固定後の樹脂は適当な容器に密封し、2-8°Cで冷蔵保存する。(注意: 氷結による樹脂の破碎を防ぐため、冷凍保管は避ける。)

問合せ先:

ピュロライト株式会社

(東京オフィス) 〒103-0027 東京都中央区日本橋 2-1-20 Dear 日本橋タワー8F

Tel : 03-3231-7611 Fax : 03-3231-7613

(京都ラボ) 〒600-8813 京都市下京区中堂寺南町 134 京都リサーチパークKISTIC 303 号室

Tel : 075-874-5127 Fax : 075-874-5128

日本語ホームページ: www.purolite.co.jp