

高分子電解質錯体固定化カタラーゼの酵素反応
特性と安定性に及ぼす固定化条件の影響

Influence of the immobilizing conditions on enzymatic activity
and stability of catalase immobilized by polyelectrolyte complex

著者

同志社大学大学院
工学研究科 工業化学専攻
2001年度 0556番
末浪浩二
(2003年2月)

指導教授

近藤和生
生物化学工学研究室

Abstract

Hydrogen peroxide which has many uses, such as sterilization, bleaching, disinfection, metal polish, and vinyl polymerization catalyst has recently replaced the bleach of a chlorine system from the problem of an abandonment residual substance. In a food industry, in order to prevent multiplication of the various germs generated when processing of fish, shellfishes and dairy products is performed, sterilization by hydrogen peroxide performed beforehand. Moreover, hydrogen peroxide is contained also in the waste fluid after performing metal surface processing at factories of paper, pulp, and fiber. Hydrogen peroxide will damage to an ecosystem, since it is a strong oxidizer. Therefore, the processing which disassembles hydrogen peroxide to harmless water and harmless oxygen is required.

In this study, catalase was immobilized by the polyelectrolyte complex forming method, using chitosan and alginic acid as the immobilizing agents. The influence of temperature, concentration, and pH on the heat stability and the enzyme reaction of the immobilized catalase was investigated. By immobilizing enzyme in a polyelectrolyte complex, the structure of enzyme becomes stable compared with free enzyme. Therefore, it was hard to receive the influence of the heat by which inactivation of catalase was mostly caused.

About heat stability, inactivation of enzyme was improved to 70 degrees or more compared to the free one. About pH stability, the fall of the reaction velocity by acidity side was controlled by the interaction of polyelectrolyte complex and catalase like heat stability.

目次

第 1 章 緒言	1
第 2 章 実験方法	3
2.1 試薬	3
2.2 高分子電解質錯体に固定化したカタラーゼの調製	4
2.2.1 高分子電解質錯体形成反応	4
2.2.2 漏出実験	4
2.2.3 固定化率の測定	6
2.3 カタラーゼによる過酸化水素分解反応	6
2.3.1 活性の測定	6
2.3.2 カタラーゼによる過酸化水素分解反応	7
2.4 安定性実験	8
2.4.1 熱安定性	8
2.4.2 pH 安定性	8
2.4.3 保存安定性	8
2.5 阻害剤の影響	8
2.6 高分子電解質錯体固定化カタラーゼの再利用実験	9
第 3 章 結果及び考察	10
3.1 カタラーゼについて	10
3.2 高分子電解質錯体について	11
3.3 カタラーゼによる過酸化水素分解反応	12
3.3.1 カタラーゼの反応モデル	12
3.3.2 カタラーゼによる過酸化水素分解反応	13
3.4 酵素の安定性	14
3.4.1 熱安定性	14
3.4.2 pH 安定性	15
3.4.3 保存安定性	15
3.5 阻害剤の影響	15
3.6 高分子電解質錯体固定化カタラーゼの再利用	18
第 4 章 結言	20

謝辞

参考文献

図

データシート

第1章 緒言

近年、殺菌、漂白、消毒、金属研磨、ビニル重合触媒など多くの用途を持つ過酸化水素は、廃棄残留物の問題から、塩素系の漂白剤に取って代わってきた。食品業界では、魚介類や乳製品の加工を行う際に発生する雑菌の増殖を防ぐために予め過酸化水素による殺菌が行われることがある¹⁾。また、工場などで金属表面処理を行った後の廃液や、紙、パルプ、繊維等の漂白後の廃水にも過酸化水素は含まれている。しかし、過酸化水素は強い酸化剤であるため、食品中に残存したり、廃液中に混入すると、生態系へ害を及ぼすことになる。そのため、過酸化水素を無害な水と酸素へ分解する処理が必要である。

カタラーゼやペルオキシターゼは、この過酸化水素を無害な水と酸素に分解する酵素であり、動物、植物および微生物の生体内に広く分布している。カタラーゼの過酸化水素分解反応では、基質である過酸化水素との接触でカタラーゼ分子内の活性部位の構造が変化を受けて失活することがある²⁾。また、高温では、熱によって変性が起こるため失活する。そこで、カタラーゼ分子内部の構造変化を防ぐ固定化方法を考える必要がある。また、酵素を均相系の反応に用いる場合、反応終了後に酵素を反応液から回収し再利用することは困難であるが、カタラーゼを固定化することによって、酵素の再利用が可能になり、さらに反応の連続化が期待できる。

酵素の固定化方法は、大きく分けて担体結合法、架橋法、包括法の3つに大別され、その中で包括法は、酵素に直接的に化学的影響を与えないために、酵素の細胞の変性・失活させる要因が少ないという特徴がある。

高分子電解質錯体(Polyelectrolyte Complex : PEC)は、相反する電荷を持った高分子同士の錯体形成反応を利用する固定化方法であり、有機溶媒や毒性を持つ物質を用いる必要がなく、生物学的に温和な条件下で反応が起こるといった利点がある。正に帯電した高分子と負に帯電した高分子の反応により、両者の界面に形成され、非常に簡単な手法で調製が可能のために、カプセル、ゲル³⁾、膜⁴⁾、ファイバー⁵⁾などの調製にも用いられている。また、不溶のポリマーでネットワーク構造が形成される包括法であり、その形成反応はポリマー鎖がクーロンの相互作用によって集合する穏やかな反応であり、水溶液中で容易に反応するために、酵素反応に用いる際に溶媒による酵素の不活性化は起こりにくい⁶⁾。酵素存在下で複合体を形成させることで、酵素がネットワーク中に取り込まれることが期待される。

PECの材料には、天然および人工の様々な材料が用いられているが、その中で天然材料であるキトサンとアルギン酸を用いた。キトサン((1-4)-2-amino-2-deoxy-β-D-glucan)は、セルロースと類似した化学構造を持っており、カニやエビの甲羅などから生産される地球上で最も豊富なバイオマス資源であるため、使用後の廃棄処分も容易である。また、多糖

類であるため、強度が高く、反応性に富むアミノ基や水酸基を有し、化学修飾による高機能化が容易である。さらに毒性が低く、高い生体適合性、生分解性などの特性を持ち合わせている⁷⁾。キトサンは水には溶解しないが、弱酸性溶液中には溶解し、陽イオン性の高分子電解質となる。

陰イオン性の高分子電解質であるアルギン酸ナトリウムは、昆布や若布など海藻に多く含まれ、自然界に多く存在する水溶性食物繊維である⁸⁾。また、その水溶液は非常に粘度が高く、増粘性、保水性、乳化安定性、凝集性、フィルム形成性、ゲル化性、耐熱性の向上などに利用される。アルギン酸ナトリウムを弱アルカリ性溶液中に溶解させると、陰イオン性の高分子電解質となる。キトサンと反応し、PECを形成することが可能である。

そこで本研究では、固定化方法としてキトサンとアルギン酸を用いて様々な条件で高分子電解質錯体形成法を用いてカタラーゼを固定化し、その固定化カタラーゼの熱安定性および酵素反応に及ぼす温度、濃度、pHの影響、阻害剤による影響を検討した。

第2章 実験方法

2.1 試薬

酵素

酵素として、カタラーゼを主成分としたアスクスーパー原液(三菱ガス化学株式会社)を用いた。

基質

基質として、過酸化水素(30%)(和光純薬工業株式会社、特級)を用いた。

リン酸緩衝液(pH7、0.05mol/dm³)

酵素反応における pH を調整するために、リン酸二水素カリウム(ナカライテスク、特級)、リン酸水素二ナトリウム・12水和物(ナカライテスク特級試薬)を、それぞれ 0.05mol/dm³ となるように蒸留水に溶解させ、pH7 となるように混合した。

チオ硫酸ナトリウム溶液

滴定溶液として、0.005N-チオ硫酸ナトリウム溶液(ナカライテスク)を用いた。

硫酸溶液

酵素反応を停止させるために、停止剤として濃硫酸(ナカライテスク)55ml を、蒸留水で 1000ml にメスアップし、1N の硫酸溶液を調製した。

ヨウ化カリウム溶液

ヨウ化カリウム(ナカライテスク、特級)を蒸留水で 10%(w/v)となるように希釈した。

モリブデン酸アンモニウム溶液

七モリブデン酸アンモニウム四水和物(ナカライテスク、特級)を、1%(w/v)となるように希釈した。

デンブン溶液

蒸留水 100ml にデンブン(ナカライテスク)0.5g を加熱溶解させた後、冷蔵保存した。

酢酸水溶液

酢酸を 0.15mol/dm³ となるように蒸留水に溶解させた。

キトサン水溶液

キトサン DAC-100(甲陽ケミカル)0.3g を酢酸水溶液 75ml に溶解させた。

アルギン酸ナトリウム水溶液

アルギン酸ナトリウム 300 ~ 400cP(和光純薬工業株式会社、特級)0.2 ~ 0.55g をリン酸緩衝液(pH7.2、0.1mol/dm³)25ml に加熱溶解させて冷ました。

クエン酸-リン酸緩衝液

pH 安定性実験における pH を調整するために、リン酸水素二ナトリウム・12 水和物(ナカライテスク、特級)とクエン酸一水和物(ナカライテスク、特級)を、それぞれ 0.05mol/dm³ となるように蒸留水に溶解させ、pH3 ~ 8 となるように混合した。

アジ化ナトリウム

酵素反応の阻害剤として、アジ化ナトリウム(ナカライテスク、特級)を用いた。

2-メルカプトエタノール

酵素反応の阻害剤として、2-メルカプトエタノール(ナカライテスク、特級)を用いた。

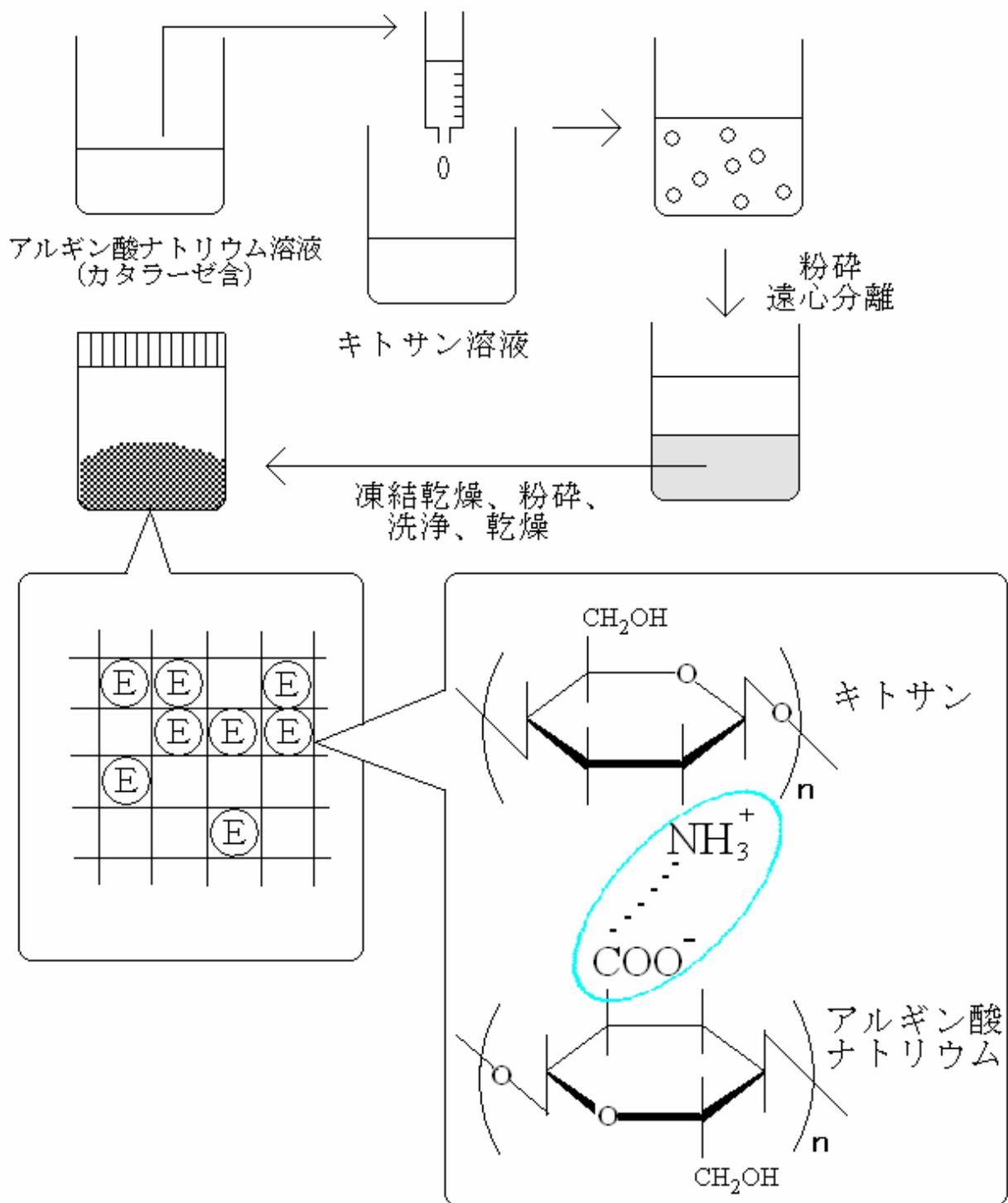
2.2 高分子電解質錯体に固定化したカタラーゼの調製

2.2.1 高分子電解質錯体形成反応

アルギン酸ナトリウム水溶液 25ml を 50ml ビーカーにとり、酵素溶液(原液)0.1ml を加え、攪拌した。それをキトサン水溶液 75ml 中にシリンジで滴下した。その後、混合物をホモジナイザーで 5 分刻みに、5000rpm、10000rpm、25000rpm の速度で攪拌し、生成した混合物を、遠心分離にかけて、上澄み液と沈殿物とに分離し、沈殿物を凍結乾燥させて粉碎し、緩衝液で 1 時間洗浄し、乾燥させたものを固定化酵素とした。調製方法をスキーム 1 に、調製条件を表 1 に示した。また、PEC を走査電子顕微鏡(HITACHI SEM-S2466N)により観察した。

2.2.2 漏出実験⁹⁾

酵素量の測定は紫外可視分光光度計を用いて行った。検量線の作成には、カタラーゼを加えないで調製した PEC を遠心分離にかけ、生じた上澄み液でカタラーゼを希釈したものをを用いた。2.1.1 の実験で緩衝液による洗浄を行わなかった固定化酵素 0.1g を量り取ってバイアル瓶に入れ、これにリン酸緩衝液(pH7、0.05mol/dm³)25ml を加えて振とうした。1 時間ごとに試料をろ過し、ろ液の吸光度を測定し、新しいリン酸緩衝液 25ml に入れ替えて振とうした。



スキーム1 高分子電解質錯体について

表 1 PEC の調製条件

PEC	キトサン[mol]	アルギン酸 Na[mol]	混合比 (/)
PEC	3.6×10^{-7}	1.86×10^{-7}	0.517
PEC	3.6×10^{-7}	2.33×10^{-7}	0.646
PEC	3.6×10^{-7}	2.79×10^{-7}	0.775
PEC	3.6×10^{-7}	3.26×10^{-7}	0.905
PEC	3.6×10^{-7}	3.72×10^{-7}	1.034
PEC	3.6×10^{-7}	4.19×10^{-7}	1.163
PEC	3.6×10^{-7}	4.65×10^{-7}	1.292
PEC	3.6×10^{-7}	5.12×10^{-7}	1.422

2.2.3 固定化率の測定

固定化酵素調製時に漏出した酵素量を調べるために、遠心分離の際に生じた上澄み液の吸光度を測定した。2.2.2 の実験で振とう 1 時間後におけるろ液の吸光度と、上澄み液の吸光度から、それぞれの溶液に含まれる酵素量を計算し、最初に加えた酵素量で割ることによって固定化率を決定した。

2.3 カタラーゼによる過酸化水素分解反応

2.3.1 活性の測定

0.1ml の酵素溶液(原液)をリン酸緩衝液(pH7、0.05mol/dm³)に溶解させ、100ml にメスアップしたものを 0.1%遊離カタラーゼ溶液とした。そして、リン酸緩衝液で調製した 10mol/m³ の過酸化水素溶液 100ml に 0.1%遊離カタラーゼ溶液を 1ml 添加し、25 °C において 10 分間反応させ、分解した過酸化水素残存濃度を測定し、活性とした。固定化酵素については固定化酵素を遊離カタラーゼ溶液と同僚の酵素が含まれるように量り取り、同様の方法により活性を求めた。

カタラーゼ活性による過酸化水素の分解量の測定は間接ヨウ素法により測定した。バイアル瓶に硫酸溶液 2ml、ヨウ化カリウム溶液 1ml、モリブデン酸アンモニウム溶液を 5~6 滴およびでんぷん溶液を 2~3 滴添加しておき、これに所定時間ごとに採取した試料を添加し、攪拌しながら 0.005mol/dm³ のチオ硫酸ナトリウム水溶液を滴下し、滴定値から過酸化水素濃度を求めた。反応の終点は 30 秒間無色が持続した点とした。

間接ヨウ素法

まず間接ヨウ素法についての原理を説明する。過酸化水素は、酸性条件下で酸化剤として働き、次の(1)式で表されるように反応が進む。



このような酸化剤を含む溶液に過剰のヨウ化カリウムを加えると、次の(2)式のような反応が起こり、褐色のヨウ素を遊離する。



(2)式の反応は、モリブデン酸アンモニウム溶液を加えることにより促進される。これにデンプン溶液を加えると、デンプンの螺旋構造にヨウ素が取り込まれ、ヨウ素-デンプン反応により紫色に呈色する。生成したヨウ素を既知濃度のチオ硫酸ナトリウム溶液で滴定すると、次の(3)式の反応が起こり、ヨウ素がヨウ化ナトリウムになり、反応溶液は無色となる。



(1)式～(3)式より、過酸化水素とヨウ素は 1:1 の量論比で反応し、ヨウ素とチオ硫酸ナトリウムは 1:2 の量論比で反応するので、過酸化水素とチオ硫酸ナトリウムは 1:2 の量論比で反応する事になる。

よって、(4)式より過酸化水素濃度が求められる。

$$2Cv = C'v' \Leftrightarrow C = \frac{C'v'}{2v} \quad (4)$$

C : 過酸化水素の濃度[mol/m³]

C' : チオ硫酸ナトリウム溶液の濃度[mol/m³]

v : 過酸化水素の採取量[ml]

v' : チオ硫酸ナトリウム溶液の滴下量[ml]

2.3.2 カタラーゼによる過酸化水素分解反応

0.1%遊離カタラーゼ溶液 1ml および固定化酵素を所定量計算して、リン酸緩衝液(pH7、0.05mol/dm³)で 5～500mol/m³ に調製した過酸化水素溶液 100ml に添加し、25℃において所定時間ごとの過酸化水素残存濃度を測定し、反応初速度を求めた。反応温度 30～50℃においても同様の実験を行った。そして、各基質濃度とそれに対する反応初速度との関係から、酵素反応の温度依存性について検討した。

2.4 安定性実験

2.4.1 熱安定性

遊離酵素については、リン酸緩衝液(pH7、 0.05mol/dm^3)で 1000 倍希釈した 0.1%酵素カタラーゼ溶液 20ml をバイアル瓶に採取して、35 から 80 までの各温度に設定した恒温槽で攪拌し、30 分毎に試料をバイアル瓶から試験管に採取した。それを氷水で急冷した後常温に戻し、 10mol/m^3 の過酸化水素溶液をバイアル瓶に 5ml に加えて、間接ヨウ素法を用いて活性を測定した。

固定化酵素については、固定化酵素を所定量計算し、リン酸緩衝液 (pH7、 0.05mol/dm^3)5ml の入った試験管に入れ、振とう器に入れて、30 分ごとに試験管を 1 つ取り出し、 10mol/m^3 の過酸化水素溶液 5ml を添加して、遊離酵素と同様に、間接ヨウ素法を用いて活性を測定した。

2.4.2 pH 安定性

遊離酵素については、pH3~8 までのそれぞれの pH に調整したリン酸-クエン酸緩衝液 (0.05mol/dm^3)で 1000 倍希釈した 0.1%カタラーゼ溶液を 1ml 量り取って、間接ヨウ素法を用いて活性を測定した。

固定化酵素については、pH3~8 までのそれぞれの pH に調整したリン酸-クエン酸緩衝液(0.05mol/dm^3)20ml の入ったそれぞれのバイアル瓶に、固定化酵素を所定量計算し、添加して振とう器で 5 時間振とうした後、固定化酵素をリン酸緩衝液(pH7、 0.05mol/dm^3)で洗浄した。そして、 10mol/m^3 の過酸化水素溶液 5ml の入ったビーカーに固定化酵素を添加し、間接ヨウ素法を用いて活性を測定した。

2.4.3 保存安定性

遊離酵素については、リン酸緩衝液(pH7、 0.05mol/dm^3)で 1000 倍希釈した 0.1%酵素カタラーゼ溶液 20ml をバイアル瓶に採取して、4 で保存し、所定時間毎に試料をバイアル瓶から採取した。それを常温に戻し、 10mol/m^3 の過酸化水素溶液をバイアル瓶に 5ml に加えて、間接ヨウ素法を用いて活性を測定した。

固定化酵素については、固定化酵素を所定量計算し、リン酸緩衝液 (pH7、 0.05mol/dm^3)20ml の入ったバイアル瓶に入れて 4 で保存し、所定時間毎に試料をバイアル瓶から採取した。それを常温に戻し、遊離酵素と同様に、間接ヨウ素法を用いて活性を測定した。

2.5 阻害剤の影響

アジ化ナトリウムまたは 2-メルカプトエタノールをその濃度が $2 \sim 100\text{mol/m}^3$ になるように過酸化水素溶液 20ml に添加し、0.1%遊離カタラーゼ溶液 1ml および固定化酵素を所

定量計算して添加し、25 において所定時間ごとの過酸化水素残存濃度を測定し、反応初速度を求めた。

2.6 高分子電解質錯体固定化カタラーゼの再利用実験

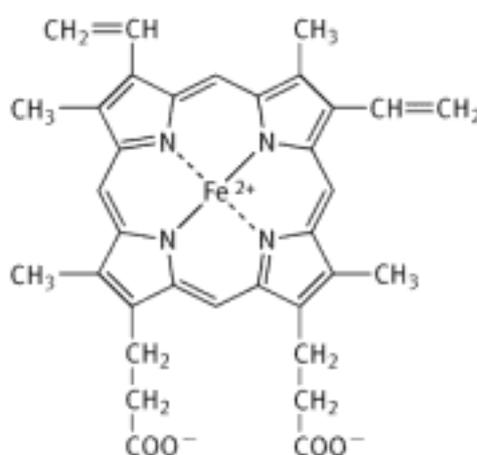
固定化酵素を 0.1g 量り取り、 20mol/m^3 または 200mol/m^3 の過酸化酸化水素溶液 100ml の入ったビーカーに添加し、分解した過酸化水素の量の変化を間接ヨウ素法を用いて測定した。そして固定化酵素を、過酸化水素溶液中からろ過することによって回収し、再びリン酸緩衝液(pH7、 0.05mol/dm^3)で洗浄し、ろ過した後、繰り返し反応実験を行った。実験終了後、再利用に用いた固定化酵素は、リン酸緩衝液(0.05mol/dm^3)中に入れて、次の実験時まで保存した。

第 3 章 結果及び考察

3.1 カタラーゼについて¹⁰⁾

カタラーゼは、過酸化水素を、水と酸素に分解する酵素であり、カタラーゼは、動物、植物、微生物の好機的細胞に広く分布し、動物では、肝、赤血球、腎にほとんどそのすべてが含まれる。各臓器のカタラーゼは分子種が異なり、また例えば肝カタラーゼだけについても多様性が認められる。肝や腎の細胞内では、主としてペルオキシソームと呼ばれる小顆粒中に、過酸化水素を発生するような反応を触媒する諸種の酸化酵素と共存している。

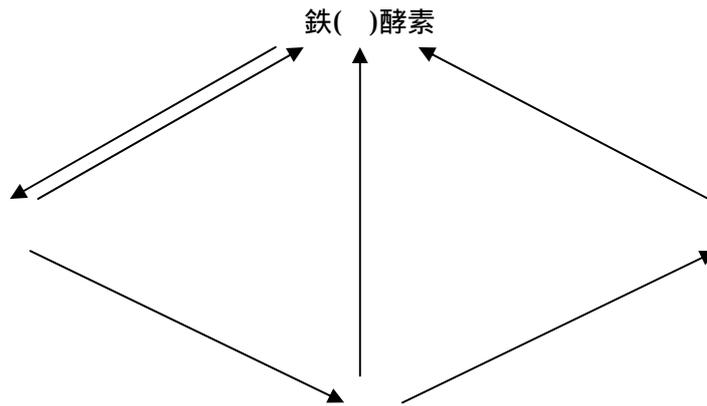
カタラーゼの構造¹¹⁾は Fe^{3+} 原子を中心として、4 個の窒素原子と 2 個のリガンドと結合して 6 配位八面体ポルフィリン環構造を形成している。これをヘム基と呼び、カタラーゼ 1 分子はこのヘム基を 4 個と結合している。活性中心は、このポルフィリン環の Fe^{2+} 原子である。ヘム基をスキーム 2 に示した。



スキーム 2 ヘム基

しかし、ヘム基の Fe^{2+} は自酸化性が強く、容易に酸化されて Fe^{3+} となり、カタラーゼ 1 分子にヘム基 4 個を有していることより、カタラーゼと過酸化水素との反応機構は次のように示される¹²⁾。





スキーム3 カタラーゼの反応

カタラーゼは過酸化水素と反応し、中間複合体 となり、 AH_2 と 1 電子酸化還元反応により、中間複合体 を経て元の酵素に戻る。中間複合体 の鉄錯体は、過酸化水素による酸化の影響を受け、ヘム基の Fe^{2+} は Fe^{3+} となることが、吸光度の変化より明らかにされている。この時発生した $OH\cdot$ は、活性を促進させている。

3.2 高分子電解質錯体について

高分子電解質錯体の膜は、陽イオン性の高分子電解質を含む溶液と陰イオン性の高分子電解質を含む溶液を混合すると界面で瞬時に生成する¹³⁾。本研究では、陽イオン性の高分子電解質を含む溶液としてキトサン水溶液を調製し、陰イオン性の高分子電解質を含む溶液としてアルギン酸ナトリウム水溶液を調製した。そして、アルギン酸ナトリウム水溶液をキトサン水溶液に滴下した。アルギン酸ナトリウム水溶液の粘度はキトサン溶液のそれに比べて高いので、滴下した際に滴の形状を保ち大きな粒子が生成した。その粒子は、ホモジナイザーによる攪拌によって破壊されて行くが、その都度、溶液と粒子が界面で新たな膜を形成する。この操作を繰り返す事によって、酵素が高分子電解質錯体内の膜や膜の内部に仕切られた微小空間に包括されるのだと考えられる。また、キトサンとアルギン酸はモル比で 1 対 1 で反応するので、PEC はキトサンとアルギン酸が過不足なく反応して出来た PEC であり、PEC ~ はキトサンが過剰であり、PEC ~ はアルギン酸が過剰であるため、それぞれ遊離 NH_3^+ 基、 COO^- 基が PEC の表面または内部に存在する。図 1 に PEC の SEM 写真を示した。PEC の表面にキトサンとアルギン酸の複合体が存在し、膜状になって何層か重なったような状態になっていることが観察された。

漏出実験の結果を図 2 に示した。図 2 より漏出率は振とう 1 時間で 25%まで急激に上昇した後、その後は振とう 5 時間後まで漏出率の変化はほとんど上昇は見られなかった。振とう 1 時間で急激に漏出率が上昇したのは、固定化酵素表面に付着していた酵素が漏出

したためだと考えられる。また、固定化酵素内部にある酵素は強く固定化されており、安定であると考えられる。PEC ~ の固定化率を表 2 に示す。

表 2 固定化率

PEC	固定化率[%]
PEC	56.6
PEC	58.4
PEC	56.8
PEC	56.3
PEC	57.7
PEC	53.2
PEC	55.4
PEC	54.6

表 2 より、固定化率は概ね 55%前後となった。

3.3 カタラーゼによる過酸化水素分解反応

3.3.1 カタラーゼの反応モデル

カタラーゼ E は過酸化水素 S と反応し、3 つの中間複合体を形成し、基質阻害が受ける次のモデルを仮定した。¹⁴⁾



これらの式により、定常状態を仮定すると、速度式は、次のように表される¹⁵⁾。

$$v = -\frac{dS}{dt} = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_m}{S} + \frac{S}{K_2}} \quad (11)$$

ここで、 V_{\max} 、 K_m 、 K_2 は、次式のように表される。

$$V_{\max} = 2k_{+3}E_0 \quad (12)$$

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{+3}}{k_{+1}} + \frac{k_{+3}}{k_{+4}} \quad (13)$$

$$K_2 = \frac{k_{-2}}{k_{+2}} \quad (14)$$

これらから一般的な酵素反応に比べ、基質濃度が高くなるにつれて、反応速度に極大値が表れ、それよりも基質濃度が高くなるにつれて、反応速度が減少する事がわかる。

また、阻害剤を含む場合の反応モデルは(7)～(10)式に加えて、次の(15)～(17)式が考えられる。



これらの式により、定常状態を仮定すると、速度式は、次のように表される。

$$v = -\frac{dS}{dt} = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_m}{S} + \frac{S}{K_2} + \frac{K_m'}{K_i} \cdot \frac{I}{S} + \frac{I}{K_i'} + \frac{K_m'}{K_d} \cdot \frac{1}{S}} \quad (18)$$

ここで、 K_m' 、 K_i 、 K_i' 、 K_d は、次式のように表される。

$$K_m' = \frac{k_{-1} + k_{+3}}{k_{+1}} \quad (19)$$

$$K_i = \frac{k_{-i}}{k_{+i}} \quad (20)$$

$$K_i' = \frac{k_{-i'}}{k_{+i'}} \quad (21)$$

$$K_d = \frac{k_{-d}}{k_{+d}} \quad (22)$$

3.3.2 カタラーゼによる過酸化水素分解反応

図3～図7に30～50における遊離酵素を用いた場合の過酸化水素分解反応の経時変化を示した。反応開始直後は、(7)式、(8)式の酵素と基質が複合体を形成する反応が起こり、

過酸化水素の分解量は急激に上昇した。その後、(9)式、(10)式の反応により過酸化水素が水と酸素に分解する反応が起こり、この反応は律速段階であり、過酸化水素の分解量は減少した。また、基質濃度が高い方が過酸化水素の分解量が多くなった。これは、基質濃度が高くなるにつれて、酵素の活性部位と基質とが接触しやすくなったためだと考えられる。しかし、基質濃度が 150mol/m^3 を超えると(9)式の反応がより右側に進み、過酸化水素の分解量は低下した。

図 8 ~ 図 47 に $30 \sim 50$ における PEC ~ の場合の過酸化水素分解反応の経時変化を示した。これらの図より、遊離酵素の場合に比べ固定化酵素の場合は反応開始直後の分解量の急激な上昇は見られなかった。これは酵素が固定化酵素に包括される事により、固定化酵素の内部で基質の拡散速度が遅くなったためだと考えられる。PEC は余分な残基がまわりの存在しないので反応初速度は最大になり、PEC と PEC が反応初速度が最も小さくなった。

図 3 ~ 図 7 から得られた遊離酵素の場合の基質濃度と反応初速度との関係を図 48 に示した。図 48 より、温度の上昇によって高基質濃度における反応速度が減少している。これは、温度の上昇により、反応速度よりも失活速度の方がより多く上昇したためだと考えられる。

図 8 ~ 図 47 から得られた固定化酵素の場合の基質濃度と反応初速度との関係を図 49 ~ 図 56 に示した。図 49 ~ 図 56 より、反応初速度の最大値は遊離酵素が基質濃度が 150mol/m^3 であるのに対し、PEC は基質濃度が $200 \sim 300\text{mol/dm}^3$ であり、 300mol/dm^3 以上の基質濃度においても反応初速度の急激な低下は見られなかった。これは、酵素を固定化する事によって、固定化酵素内部へ流入する基質の量が減少し、低基質濃度となった状態で酵素の活性部位と接触するため、基質による失活の影響を受けにくくなったと考えられる¹⁶⁾。

また、図 48 ~ 図 56 の結果より、表 3.1 ~ 3.3 に示す V_{\max} と K_m と K_2 の値を求めた。 V_{\max} は、遊離酵素に比べて固定化酵素の方が小さくなった。 V_{\max} は遊離酵素では 35 、PEC では $35 \sim 40$ で最大となった。遊離酵素に比べて PEC の V_{\max} の値は約 3 分の 1 になった。また、PEC ~ では PEC の V_{\max} の値が最も大きく、 K_2 は遊離酵素と PEC とともに温度が上昇するにつれて値が小さくなったことから、(9)式の反応は温度の上昇とともに右側へ進むことが分かった。

3.4 酵素の安定性

3.4.1 熱安定性

図 57 ~ 図 60 に熱安定性実験の結果を示した。遊離酵素では、 70 以上になると熱失活により変性を起こして¹⁷⁾、活性が急激に低下した。固定化酵素では、 70 においても活性の急激な低下が起こらず、 75 においても活性が保持されていた。これは、酵素を固定化することによって、高分子電解質錯体の網目構造に酵素が取り込まれ、タンパク質の構造

が堅固となり、熱による構造の変化が起こりにくくなったために熱安定性が増したと考えられる¹⁸⁾。PEC では遊離 NH₃⁺基が負に帯電しているカタラーゼと静電的相互作用により強く固定化されるために PEC や に比べて活性の低下は小さくなった。

3.4.2 pH 安定性

図 61 ~ 図 62 に pH 安定性実験の結果を示した。遊離酵素でも固定化酵素でもどちらの場合においても pH7 で活性が最大となり、pH7 が至適 pH であることが確められた¹⁹⁾。PEC は酸性側での活性の低下が抑えられた。これは、負に帯電しているカタラーゼと NH₃⁺基が静電的相互作用により強く固定化されるためであると考えられる¹⁹⁾。アルカリ性側では PEC の方が遊離酵素よりも失活の程度が大きくなった。

3.4.3 保存安定性

図 63 ~ 図 64 に保存安定性の実験結果を示した。30 日まで初期活性の 9 割の活性を保持し、90 日で 7 割まで活性が低下し、120 日で 6 割まで活性が低下した。活性保持率は、各 PEC によってほとんど差はなく、60 日で 4 割まで活性が低下する他の包括法(ポリアクリルアミド系、NIPAM/HEMA、 γ -カラギーナンなど)と比べて高いことが分かった²⁰⁾。

3.5 阻害剤の影響

図 65 ~ 図 68 に阻害剤濃度依存性のグラフを示した。図 65 ~ 図 68 より、アジ化ナトリウムの方が 2-メルカプトエタノールよりも過酸化水素分解反応に及ぼす阻害の影響が大きいことがわかる。アジ化ナトリウムは酵素の活性部位と結合し、活性のある酵素量を減少させて酵素反応を阻害し、反応速度を低下させる²¹⁾。そのため遊離酵素ではアジ化ナトリウムが酵素の活性部位まで到達するまでの時間が早く、反応初速度の低下が大きくなる。PEC の場合は、酵素が網目構造で覆われているので、アジ化ナトリウムが酵素の活性部位まで到達する時間が遅くなり、反応初速度の急激な低下を遊離酵素の場合と比べて小さくできたと考えられる。

一方、2-メルカプトエタノールは、酵素の活性部位を還元して失活させる²²⁾。そのため遊離酵素では 2-メルカプトエタノールが酵素の活性部位まで到達するまでの時間が早く、活性部位が還元されやすいので失活が速く起こり、反応初速度の低下が大きくなる。PEC の場合は、網目構造で覆われているので、アジ化ナトリウムの場合と同様の理由で遊離酵素の場合と比べて失活を小さくできたと考えられる。図 65 ~ 図 68 の結果より、K_i、K_i'、K_dの値を求め、表 4.1 および表 4.2 に示した。

表 3.1 動力学パラメータ(遊離酵素)

酵素	温度[°C]	V_{max} [mol/m ³ · s]	K_m [mol/m ³]	K_2 [mol/m ³]
遊離酵素	30	0.502	156	144
	35	0.673	183	123
	40	0.702	216	104
	45	0.340	105	95
	50	0.208	137	66

表 3.2 動力学パラメータ(PEC 系)

酵素	温度[°C]	V_{max} [mol/m ³ · s]	K_m [mol/m ³]	K_2 [mol/m ³]
PEC	30	0.205	188	333
	35	0.244	76	298
	40	0.273	278	225
	45	0.237	256	244
	50	0.186	144	156
PEC	30	0.219	192	325
	35	0.250	183	340
	40	0.232	98	230
	45	0.203	97	234
	50	0.206	126	178
PEC	30	0.222	156	401
	35	0.301	198	315
	40	0.276	242	258
	45	0.249	245	255
	50	0.237	110	205
PEC	30	0.242	203	307
	35	0.287	178	350
	40	0.263	82	274
	45	0.239	89	253
	50	0.194	112	199

表 3.3 動力学パラメータ(PEC ~)

酵素	温度[]	V_{max} [mol/m ³ · s]	K_m [mol/m ³]	K_2 [mol/m ³]
PEC	30	0.240	148	413
	35	0.318	186	333
	40	0.273	166	278
	45	0.221	145	245
	50	0.178	113	199
PEC	30	0.205	199	345
	35	0.256	145	339
	40	0.232	100	248
	45	0.205	56	253
	50	0.154	109	187
PEC	30	0.209	143	325
	35	0.225	164	277
	40	0.201	122	253
	45	0.198	136	250
	50	0.136	118	187
PEC	30	0.197	148	346
	35	0.230	142	308
	40	0.212	125	242
	45	0.179	153	235
	50	0.133	134	155

表 4.1 および表 4.2 より、アジ化ナトリウムの K_i に比べて 2-メルカプトエタノールの K_i' の方が大きくなったことから、2-メルカプトエタノールの阻害の方がアジ化ナトリウムの阻害に比べて小さいことがわかる。このことより、カタラーゼが酵素の活性部位と結合して阻害されるよりも酵素の活性部位を還元して失活させる反応が起こりにくいと考えられる。 K_d の値は K_i や K_i' の値と比較すると大きいので、(15)式による反応の失活は小さいことがわかる。基質阻害定数 K_2 と比べると K_i 、 K_i' とともに小さな値であるので阻害剤による影響は非常に大きいことがわかるが、固定化することにより、 K_i 、 K_i' とともに遊離酵素のそれと比べて大きな値になっているので阻害は緩和されていることがわかる。また、PEC 同

土では PEC が遊離 NH₃⁺基が負に帯電しているカタラーゼと静電的相互作用により強く固定化されるために最も阻害が緩和された。

表 4.1 アジ化ナトリウムの阻害パラメータ

酵素	基質濃度[mol/m ³]	K _i '[mol/m ³]	K _a [-]
遊離酵素	20	100	478
	200	106	453
PEC	20	158	754
	200	169	768
PEC	20	139	790
	200	135	805
PEC	20	154	739
	200	147	700

表 4.2 2-メルカプトエタノールの阻害パラメータ

酵素	基質濃度[mol/m ³]	K _i [mol/m ³]	K _a [-]
遊離酵素	20	40	584
	200	39	475
PEC	20	74	679
	200	68	603
PEC	20	59	632
	200	63	587
PEC	20	68	576
	200	70	675

3.6 高分子電解質錯体固定化カタラーゼの再利用

図 69 と図 70 に繰り返し実験の結果を示した。繰り返し回数が増えるにつれて、活性が低下していった。活性の低下の原因は、繰り返し 2 回目までは、固定化酵素表面に弱く結合していた酵素が過酸化水素による失活の影響を受け、それ以降は、固定化酵素に強く結合している酵素が失活の影響を受けにくいいため、なだらかに活性が減少して行ったと考えられる。また、固定化酵素を回収する際に伴う損失も活性が低下したという原因になっていると考えられる。基質濃度が低い時は 10 回の繰り返し反応を行った時点で、PEC 、

、ともに初期活性の約 80%の活性が保持されていたのに対し、基質濃度が高い時は基質阻害が起こり²³⁾、10 回の繰り返し反応を行った時点で PEC 、 、ともに初期活性の約 30%の活性が保持されていた。

第4章 結言

本研究では、高分子電解質錯体によるカタラーゼの固定化を行い、PECの熱安定性、pH安定性、保存安定性および酵素反応に及ぼす温度、濃度、阻害剤の影響を検討した。高分子電解質錯体に酵素を固定化することにより、遊離酵素に比べて酵素の構造が安定になる。そのため、カタラーゼの失活の大きな原因となる熱の影響を受けにくくなった。

PECの漏出実験の結果より、固定化されている酵素は5時間の振とうにおいても表面に付着していた酵素が漏出するが、その後の漏出することはほとんどなく、酵素がPECが形成している網目構造に強く固定化されていることが分かった。

酵素を固定化することによって、PEC内部の基質の拡散抵抗が増加する。よって、基質がPEC内部へ入り込む時に基質濃度が低くなり、反応速度は減少するものの、基質による失活は抑えられた。また、温度上昇に伴う失活速度の上昇も緩和された。熱安定性については、70℃以上での酵素の失活を抑制することができ、80℃でも60分～90分も活性を保持することができた。PECに関してはカタラーゼとの静電的相互作用により、より安定性を増すことが分かった。pH安定性については、熱安定性と同様にPECとカタラーゼとの静電的相互作用により酸性側での反応速度の低下が抑制された。保存安定性については、PECをリン酸緩衝液中で冷蔵保存を120日行っても6割も活性を保持していたことより、非常に高い保存安定性を示した。阻害剤による影響については、アジ化ナトリウムの方が2-メルカプトエタノールよりも阻害の影響が大きく、 K_i の値の方が K_i' よりも約2倍小さな値となったが、固定化することによって、 K_i および K_i' の値が約2倍も大きくなり、阻害による影響が小さくなった。繰り返し反応については、PECは不溶ポリマーの網目構造を形成しているため、緩衝液中で溶解しないので、回収が可能となり、繰り返し実験を行う事が可能となり、基質濃度が 20mol/dm^3 の場合、10回の繰り返し後約8割の活性を保持していたことから、高い操作安定性が示された。

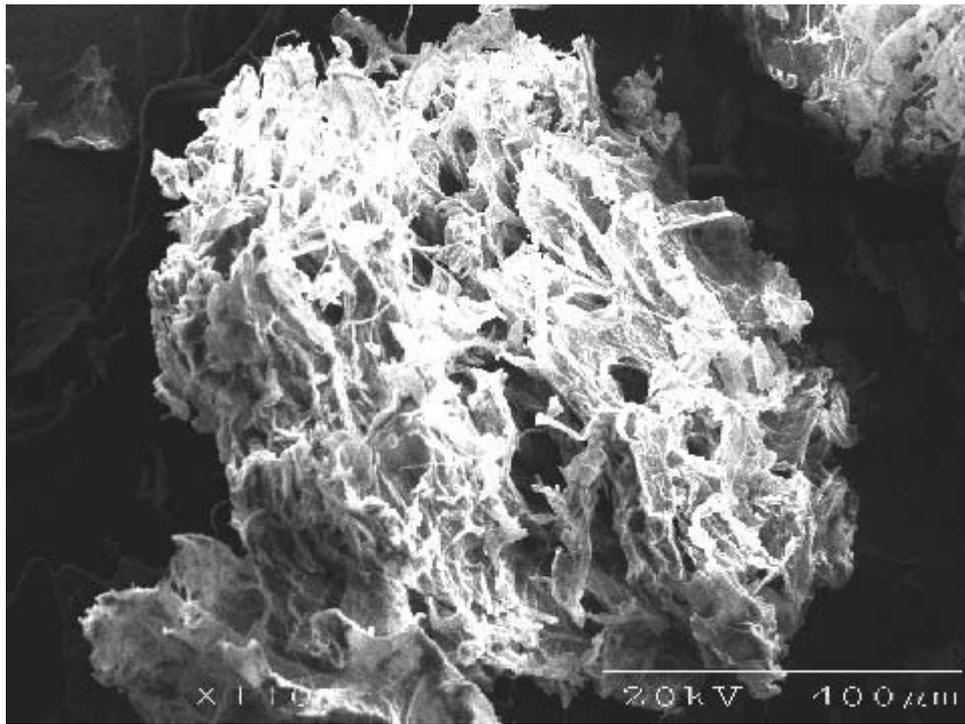
キトサンとアルギン酸を用いたPECには生分解性があり、使用後そのまま廃棄しても環境に非常に優しい。よって、PECで酵素を固定化することは、高濃度の基質や阻害剤が含まれる廃液中の過酸化水素を分解する際に非常に有効な手段であると同時に、環境への配慮と言った点でも非常に有効であると思われる。

謝辞

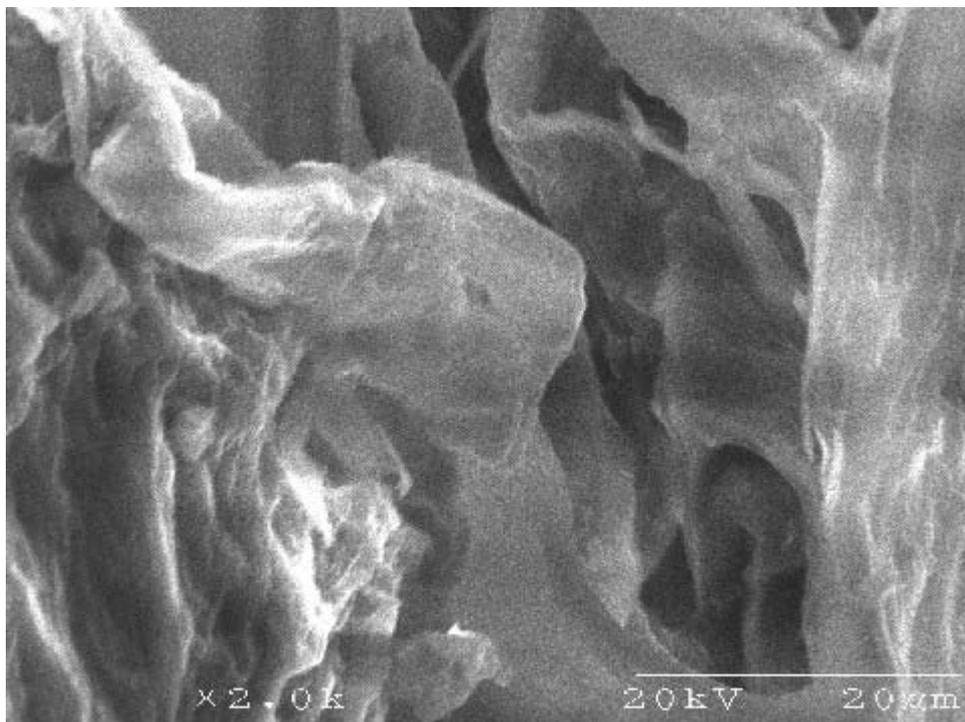
本研究を進めるにあたり、ご指導を頂きました同志社大学工学部近藤和生教授、松本道明教授に心より感謝致します。また、研究を行うにあたって有益な情報を提供して下さり、大変お世話になりました新垣達也先輩をはじめとする生物化学工学研究室の諸先輩方ならびに同期、後輩の皆様方に対しましても大変感謝いたします。

参考文献

- 1)Murataka.T,Makabe.H.,Yamakage.K.,;*J.Appl.Polym.Sci.*60 255-262 (1996)
- 2)Altomare,R.E.,Greenfield,P.F.;*Biotech.Bioeng.*16,1675-1680 (1974)
- 3)H.Dautzenberg,W.Jaeger, J.Kotz,;*Polyelectrolytes.*300-309 (1994)
- 4)Carlos Peniche,Waldo Arguelles-Monal,.;*Macromol.Symp.*168,103-116 (2001)
- 5)Hiroyuki Yamamoto,Yukiko Senoo,;*Macromol.Chem.Phys.*202,84-92 (2000)
- 6)T.Peng, Y.J. Yin,K.D. Yao,M.X.,Xu,M.A.Goosenm,;*Macromol.Chem.Phys.*C35,155-180 (1995)
- 7)L.Tsigos,A.Martinou,D.Kafezopoulos,V.Bouriotis,;*J.Appk.Polym.Sci.*74,1093-1107 (1999)
- 8)Artur Bartkowiak, David Hunkeler;*Chem.Mater.* 11,2486-2492 (1999)
- 9)菅原潔、福島正美：タンパク質の定量法 学会出版センター(1990)
- 10)今堀和友、山川民夫：生化学辞典 東京化学同人(1984)
- 11)Peter Jones and W.F.K.Wynne-Jones;*Appl.Biochem.Biotech.*31,110-117 (1991)
- 12)Patricia Ann Mabrouk,;*J.Am.Chem.Soc.*117,2141-2146 (1990)
- 13)新垣達也：同志社大学大学院工学研究科修士論文 (2002)
- 14)P.T.V.Vasudevan,R.H.Weiland,;*Biotech.Bioeng.*36,200-215 (1990)
- 15)山根恒夫：生物反応工学 産業図書 第二版 (1998)
- 16)吉田幸代：同志社大学大学院工学研究科修士論文 (2001)
- 17)谷本美香：同志社大学工学部物質化学工学科卒業論文 (2000)
- 18)福井三郎、千畑一郎、鈴木周一：酵素工学 東京化学同人 (1991)
- 19)Senay Akkus Cetinus,H.Nursevin Oztop;*Enzyme and M-bial Tech.*26,497-501 (1999)
- 20)Akertek,Tarhan;*Appl.Biochem.Biotech.*50, 535-540(1995)
- 21)Oliver M.Lardinois,Paul G.Rouxhet,;*Biochemica et Biophysica Acta.*1298,180-190 (1996)
- 22)Shinzo Kohjiya,Kazuyuki Maeda,and Shinzo Yamashita;*J.Appl.Polym.Sci.*43, 2219-2222 (1991)
- 23)Artur Bartkowiak, David Hunkeler;*Chem.Mater.* 12,206-212 (2000)



倍率 100 倍



倍率 2000 倍

図 1.PEC の SEM 写真

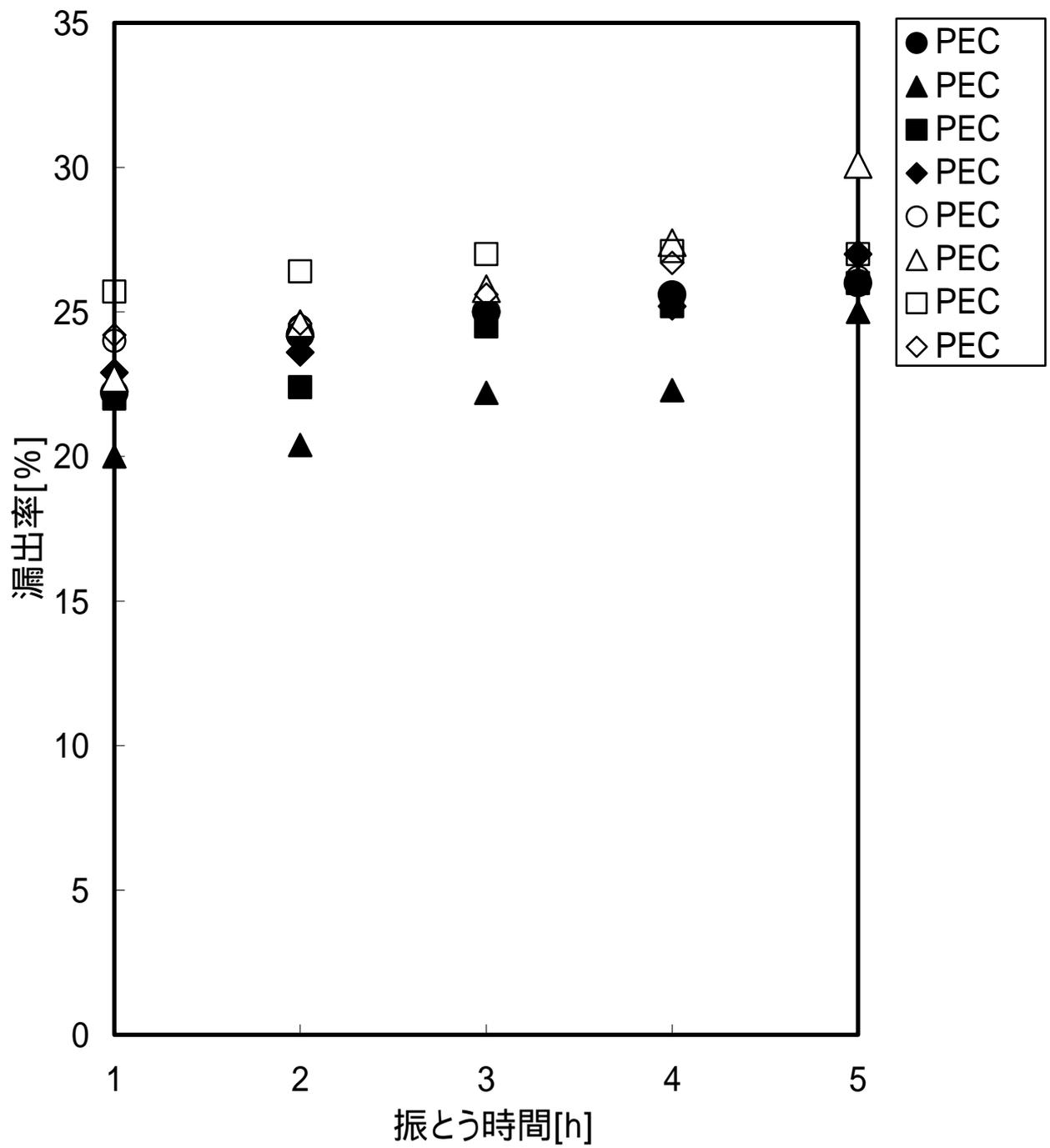


図 2.漏出実験

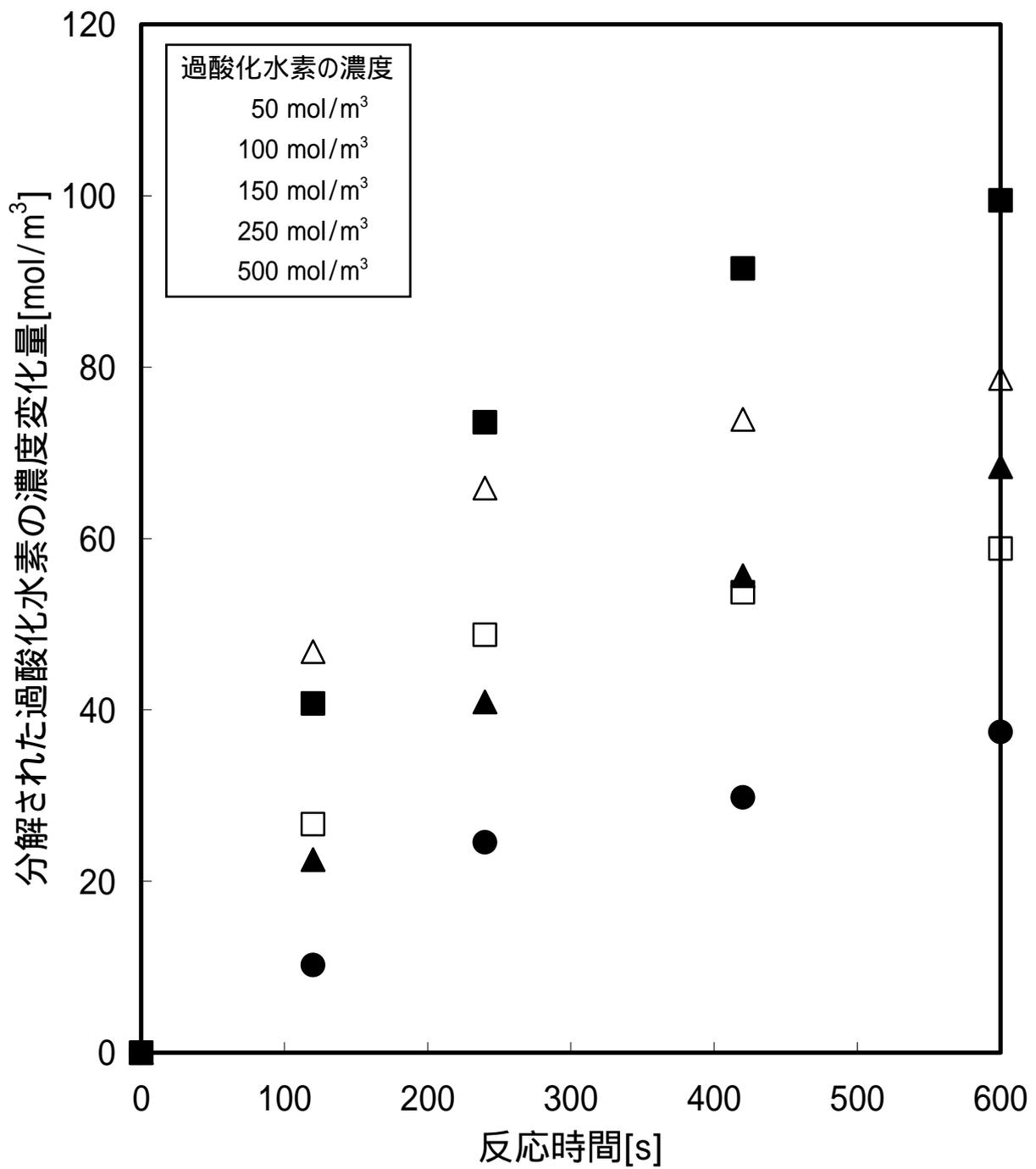


図 3. 過酸化水素分解反応の経時変化
(遊離酵素)(30)

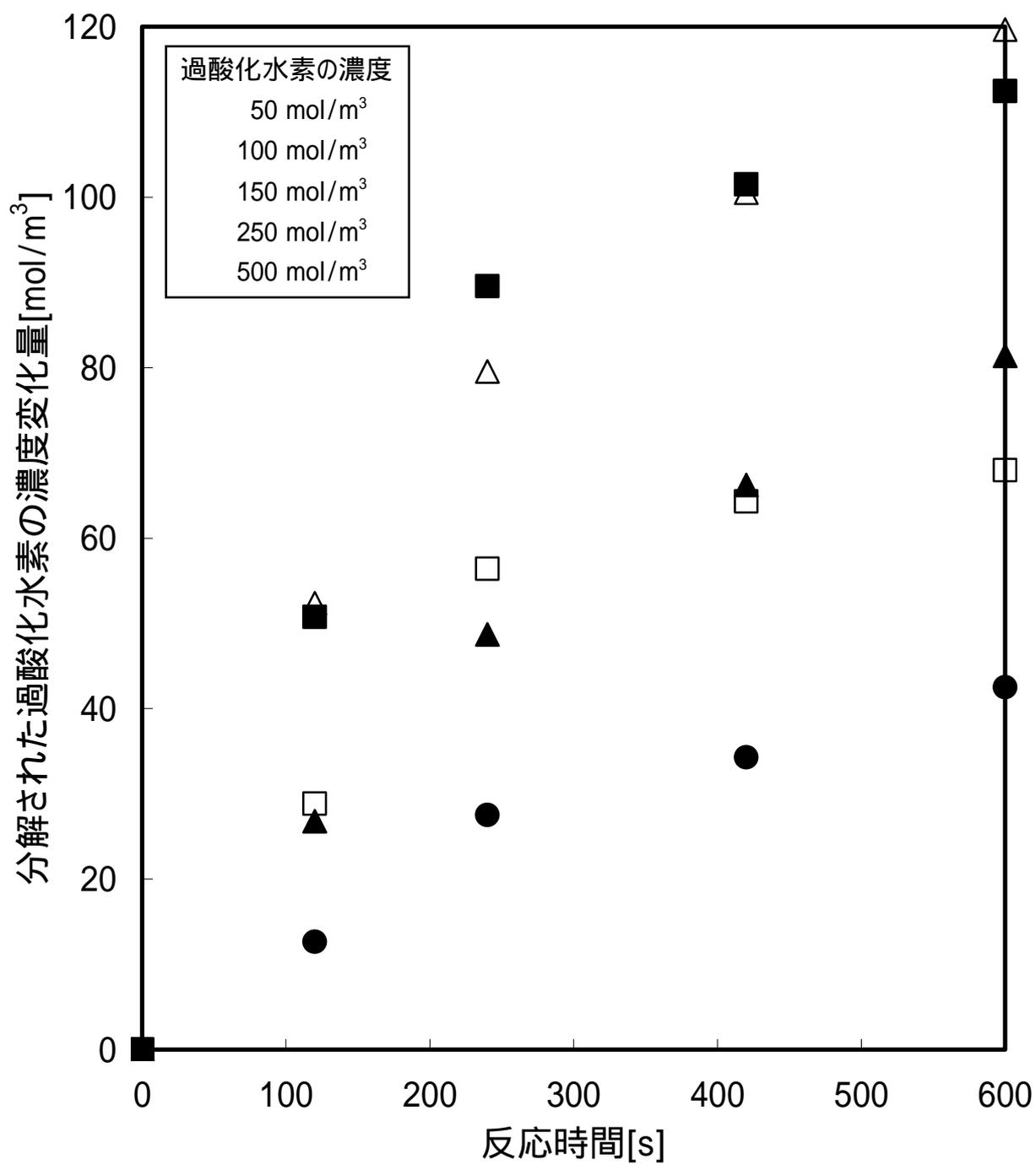


図 4. 過酸化水素分解反応の経時変化

(遊離酵素)(35)

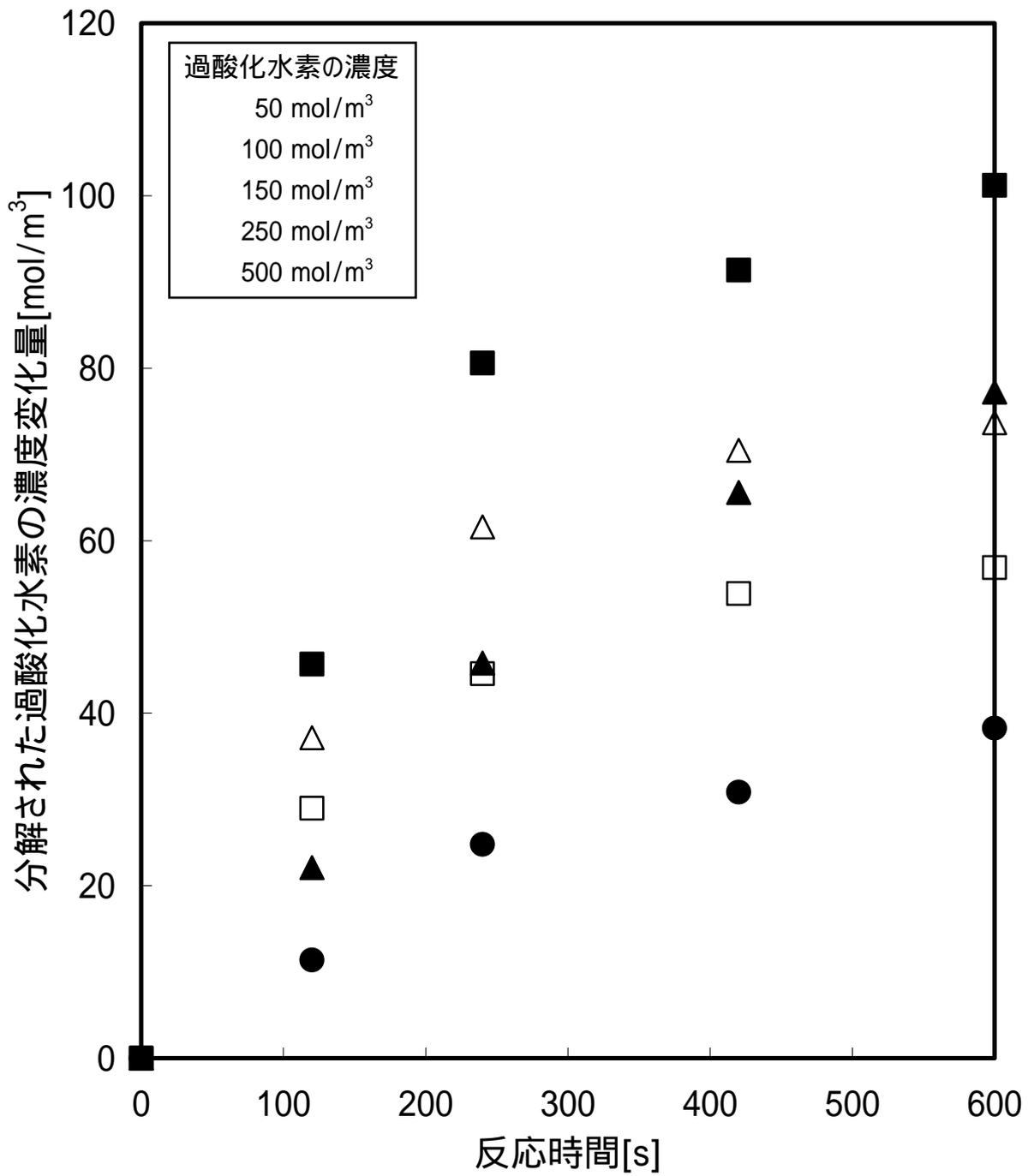


図 5. 過酸化水素分解反応の経時変化

(遊離酵素)(40)

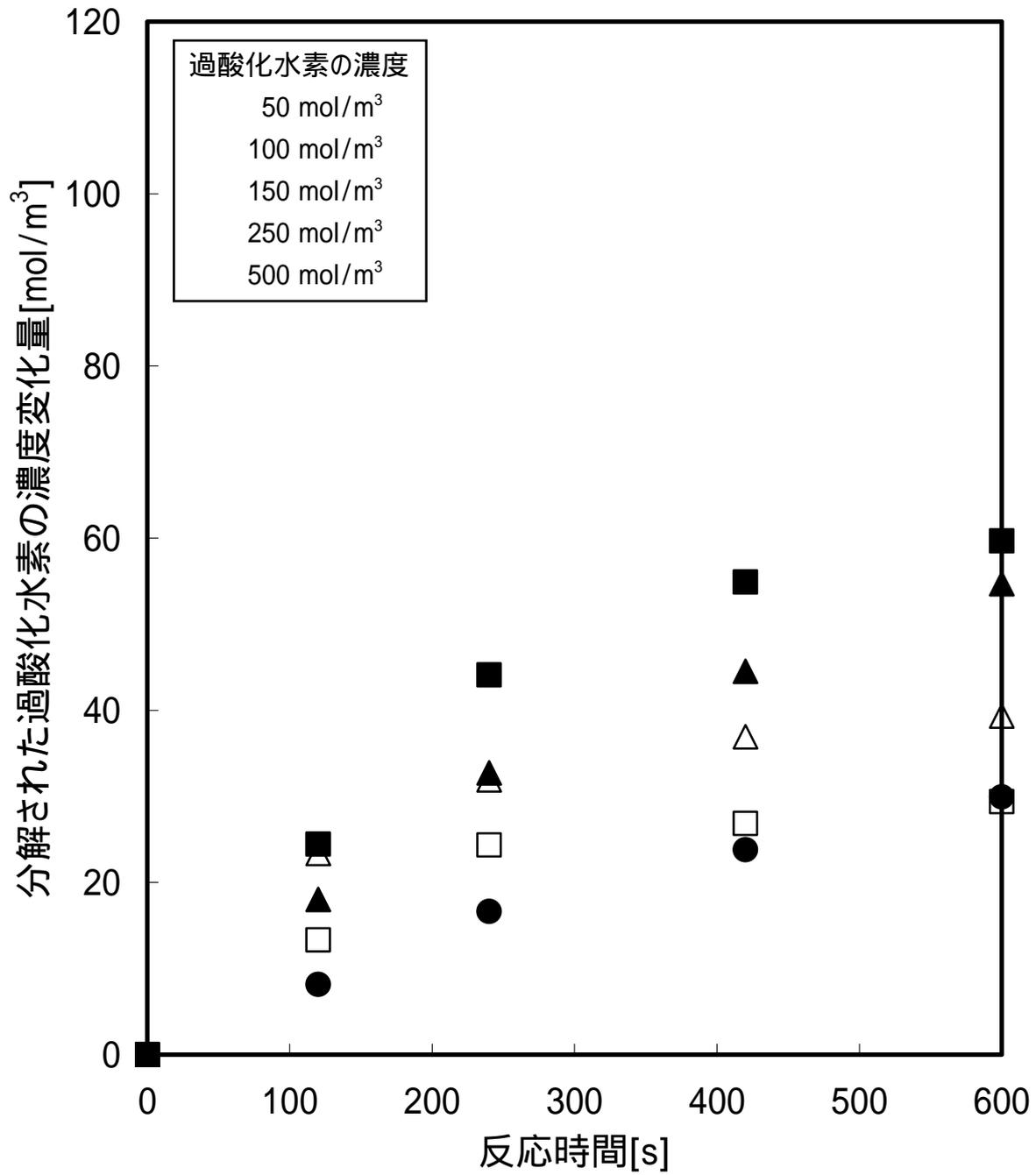


図 6. 過酸化水素分解反応の経時変化

(遊離酵素)(45)

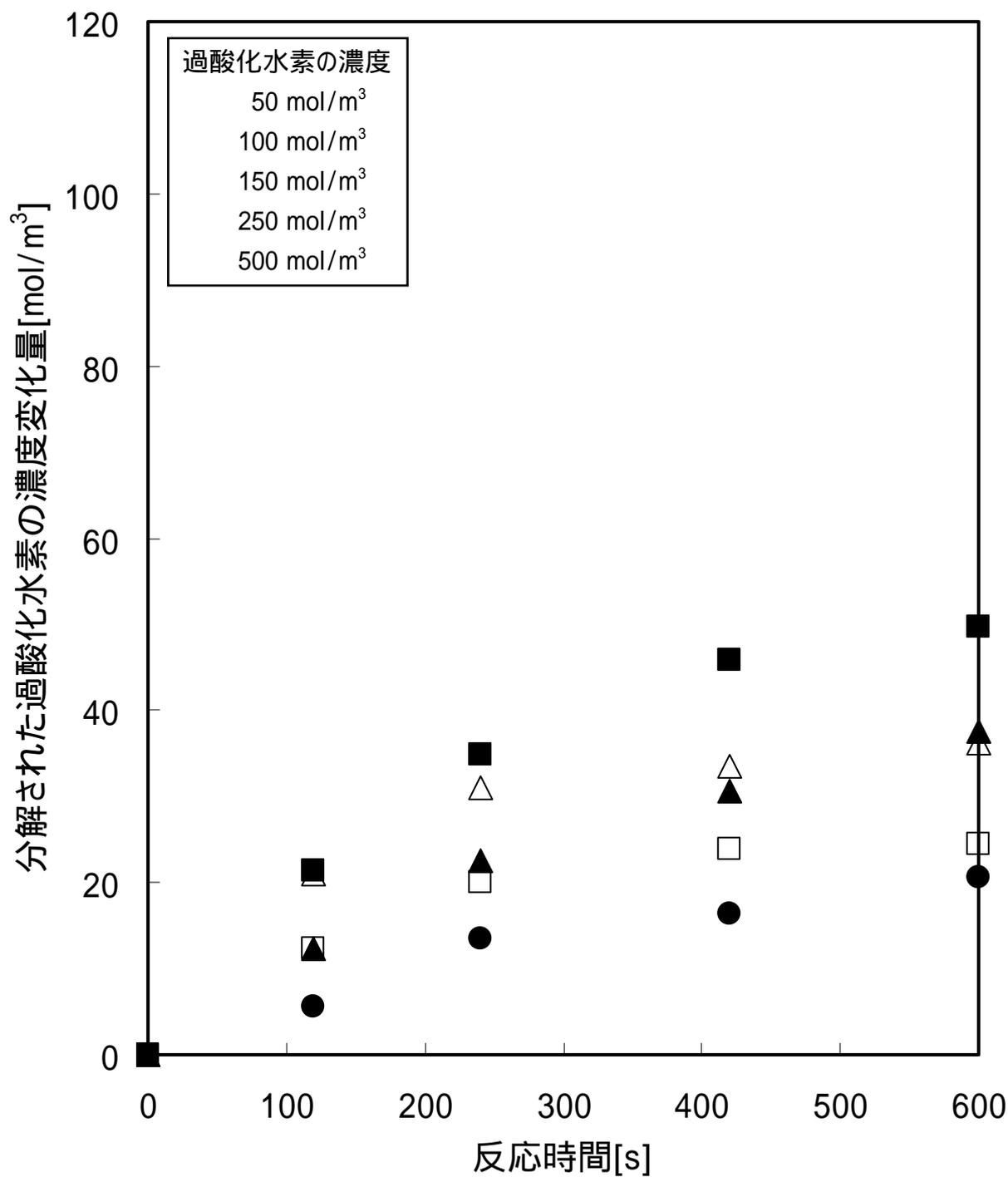


図 7. 過酸化水素分解反応の経時変化
(遊離酵素)(50)

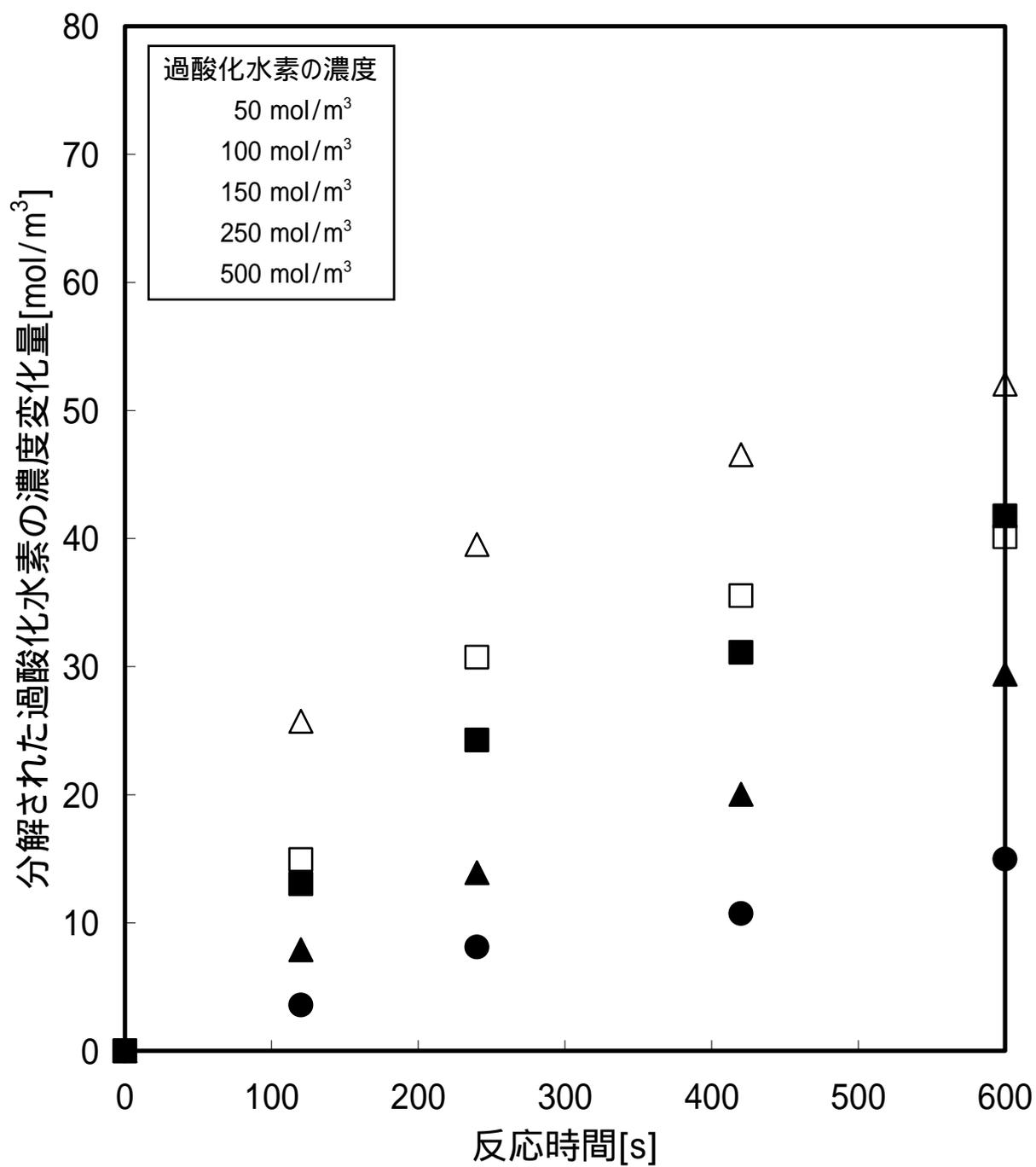


図 8. 過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC) (30)

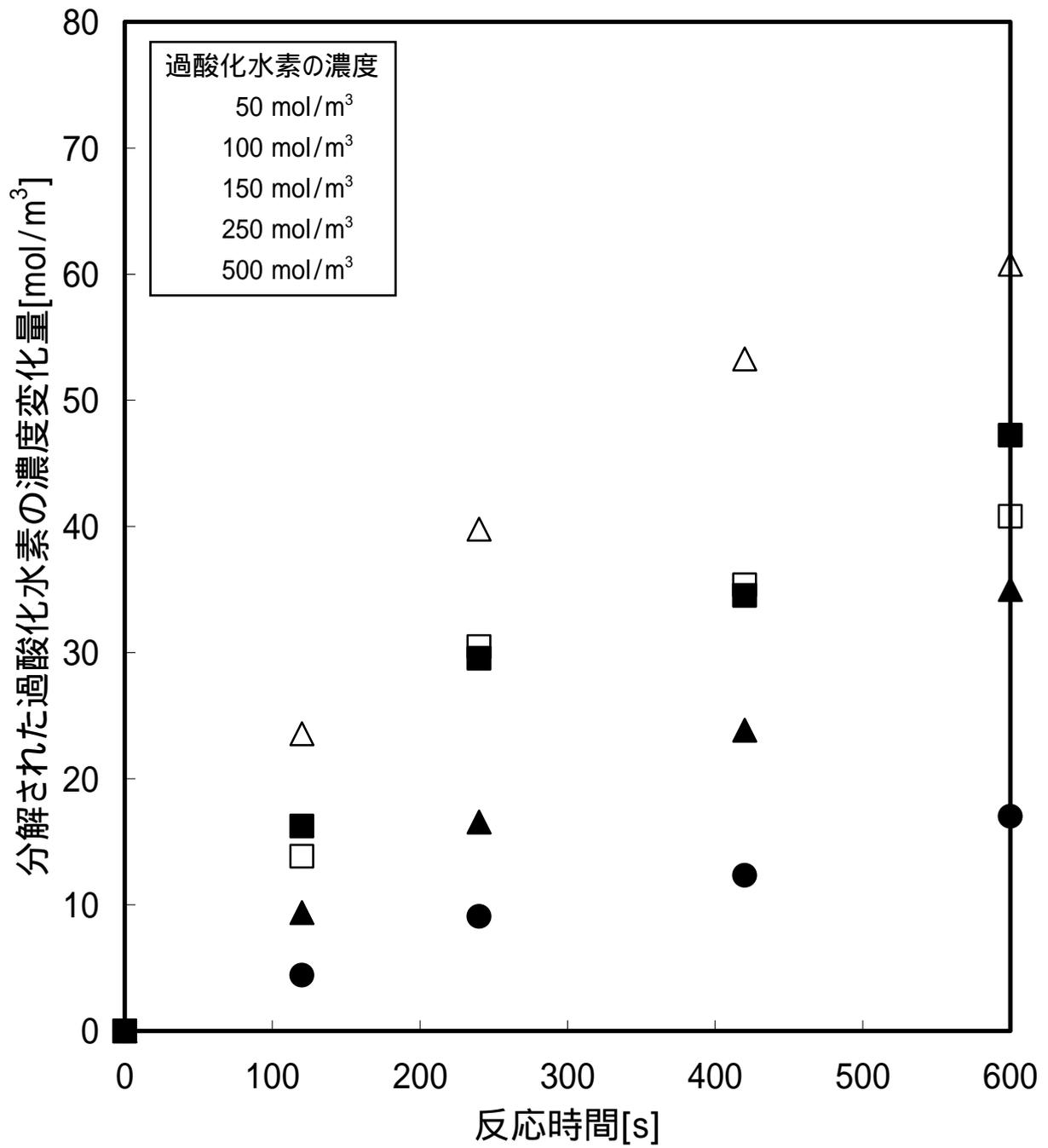


図 9.過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC)(35)

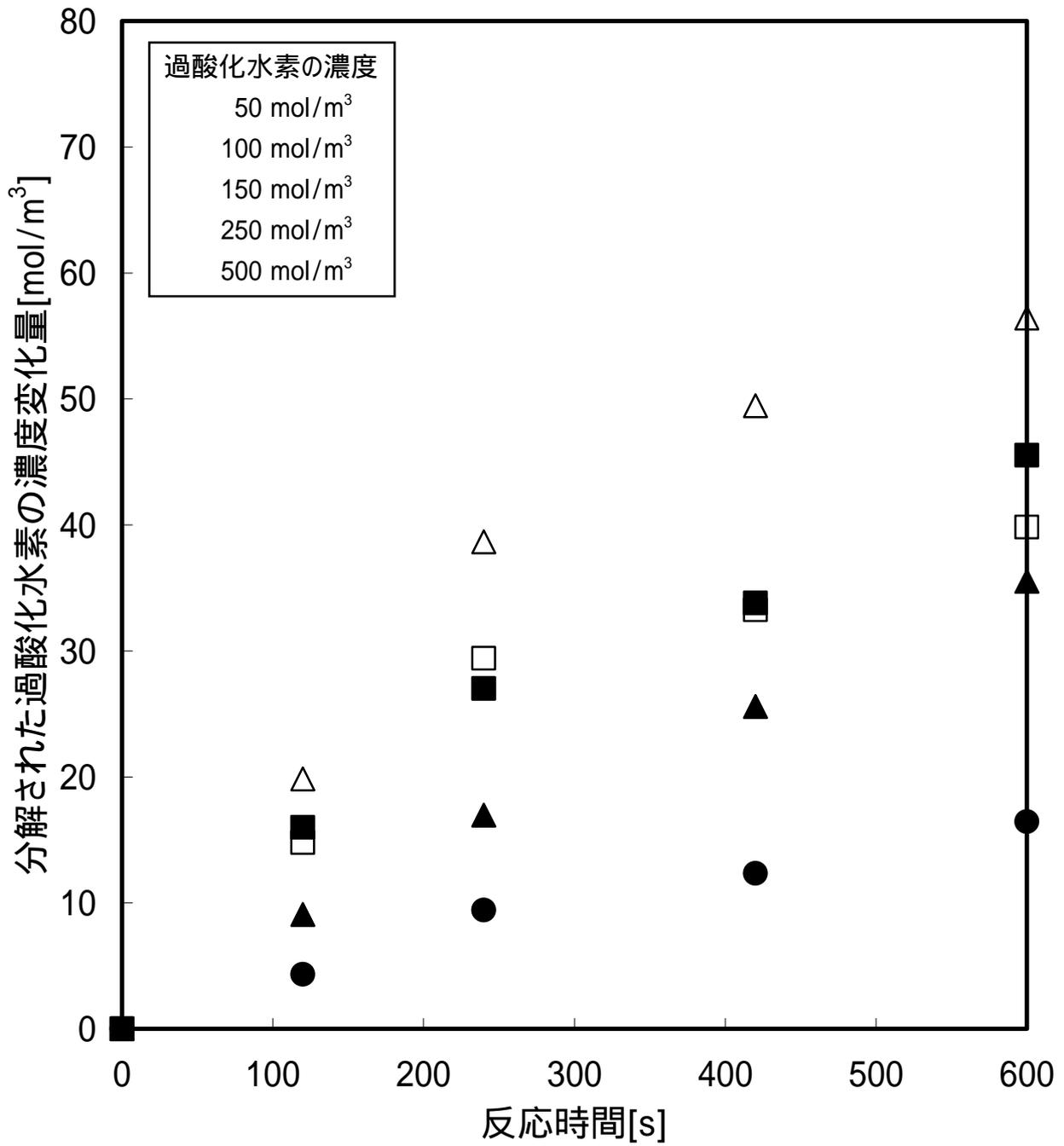


図 10. 過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC)(40)

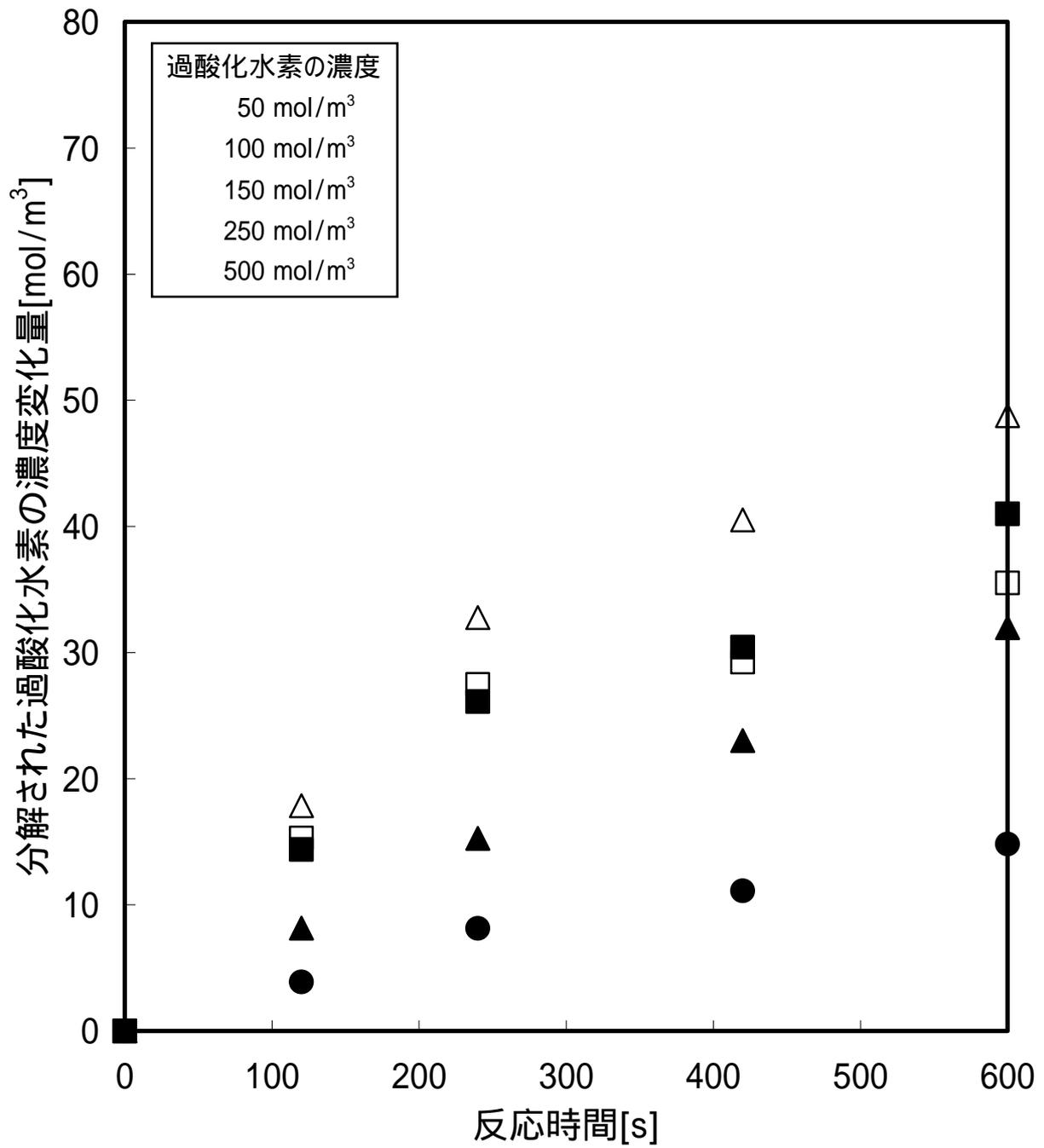


図 11. 過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC)(45)

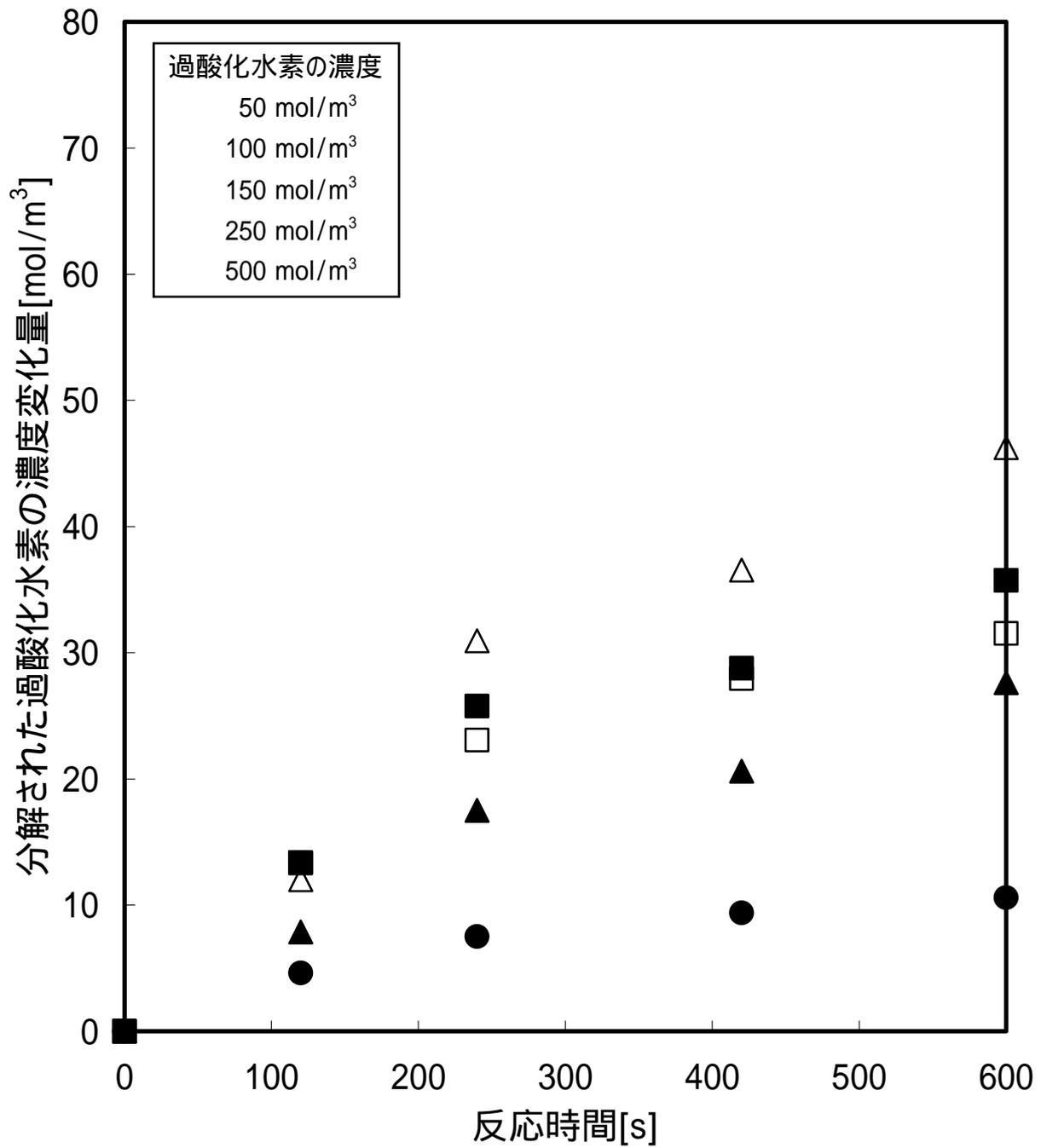


図 12. 過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC) (50)

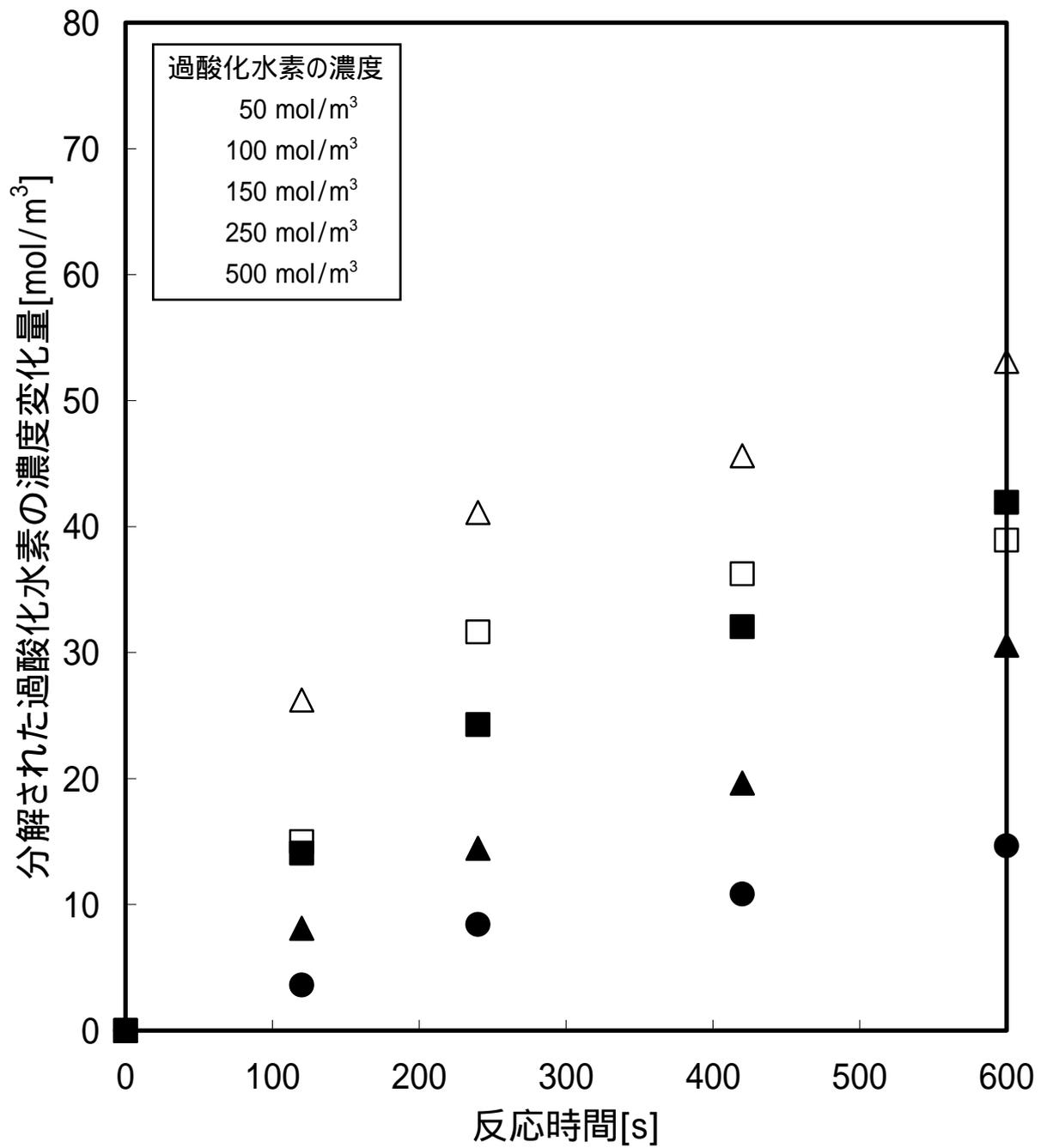


図 13. 過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC) (30)

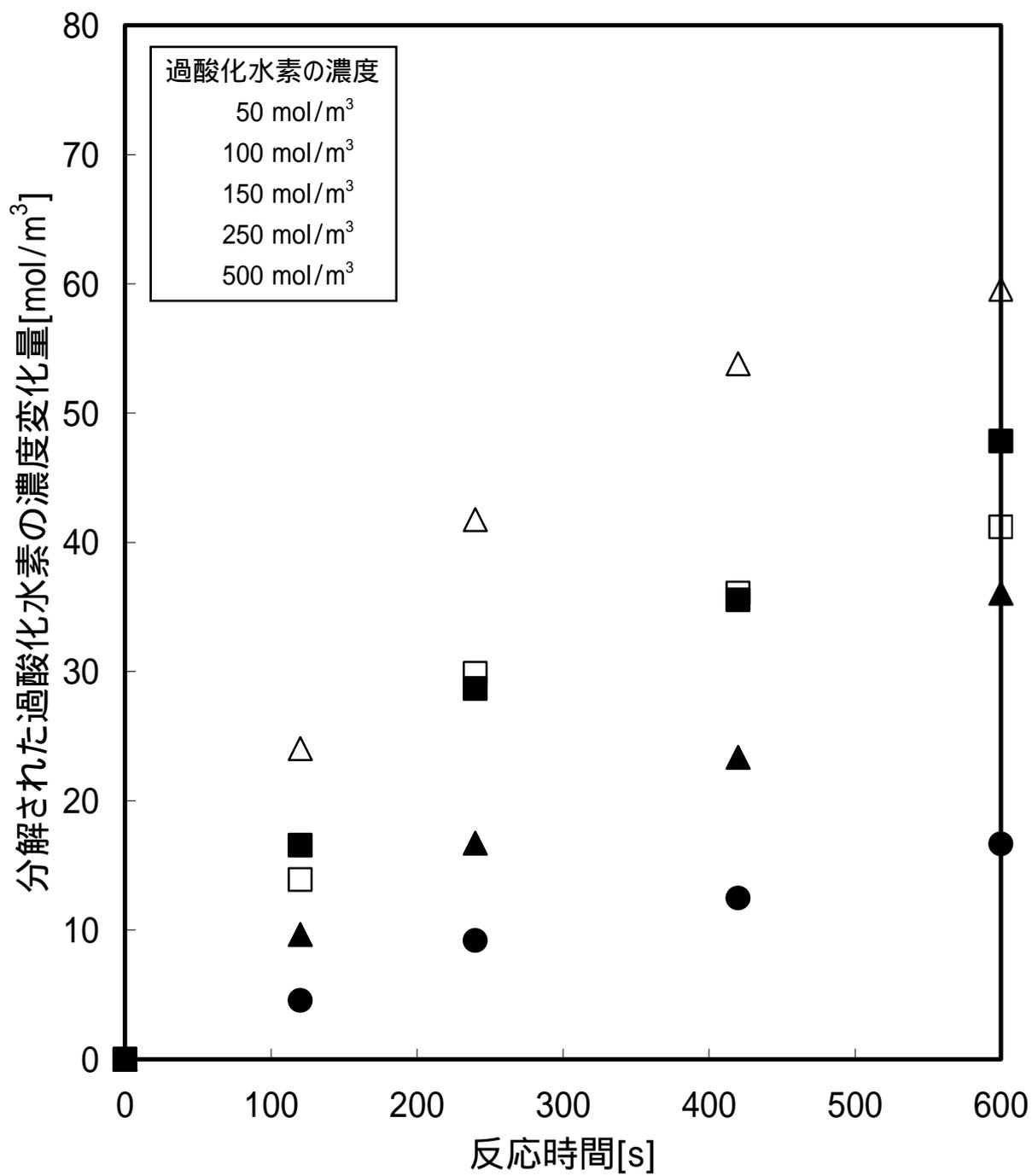


図 14. 過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC) (35)

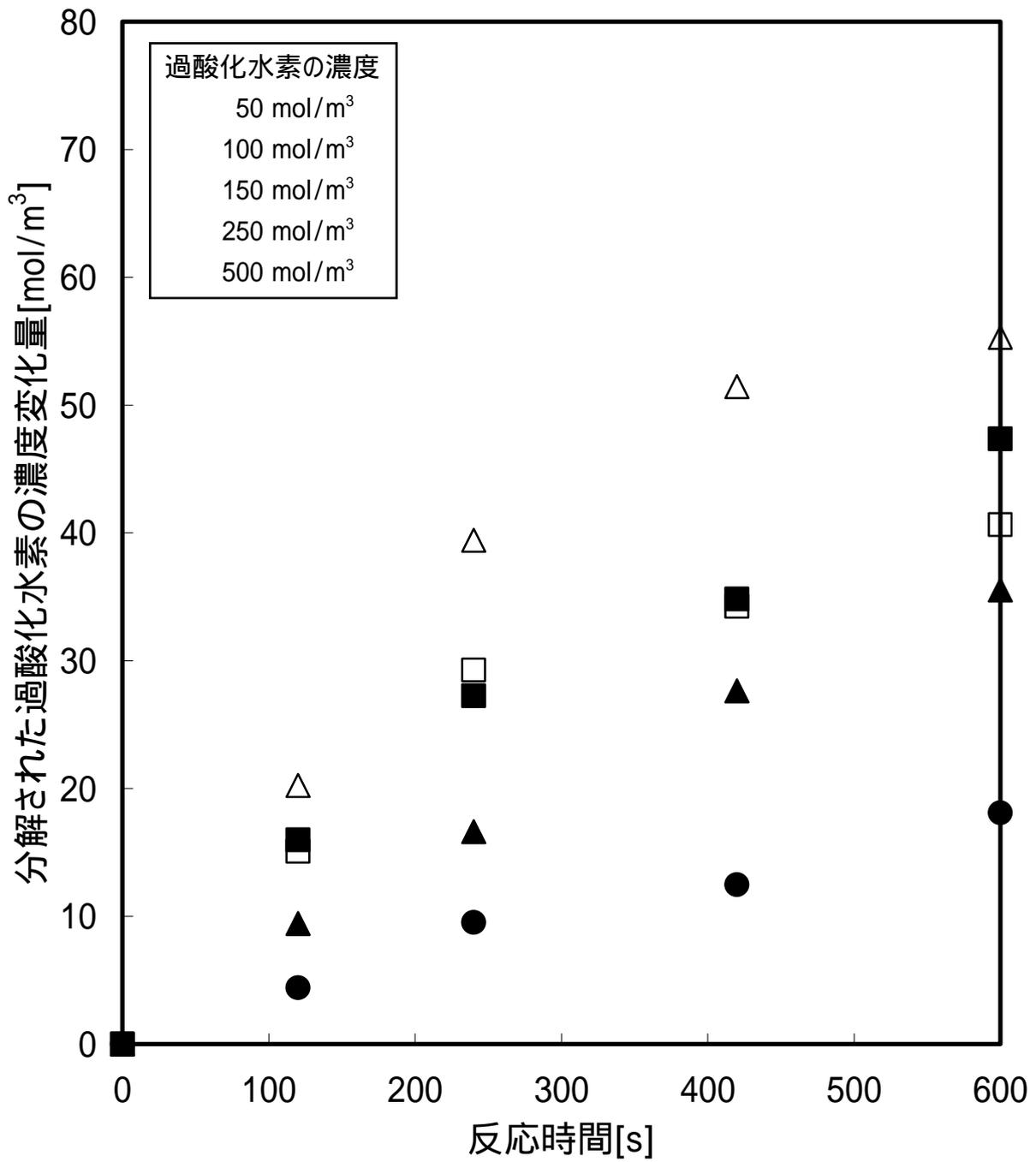


図 15.過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC)(40)

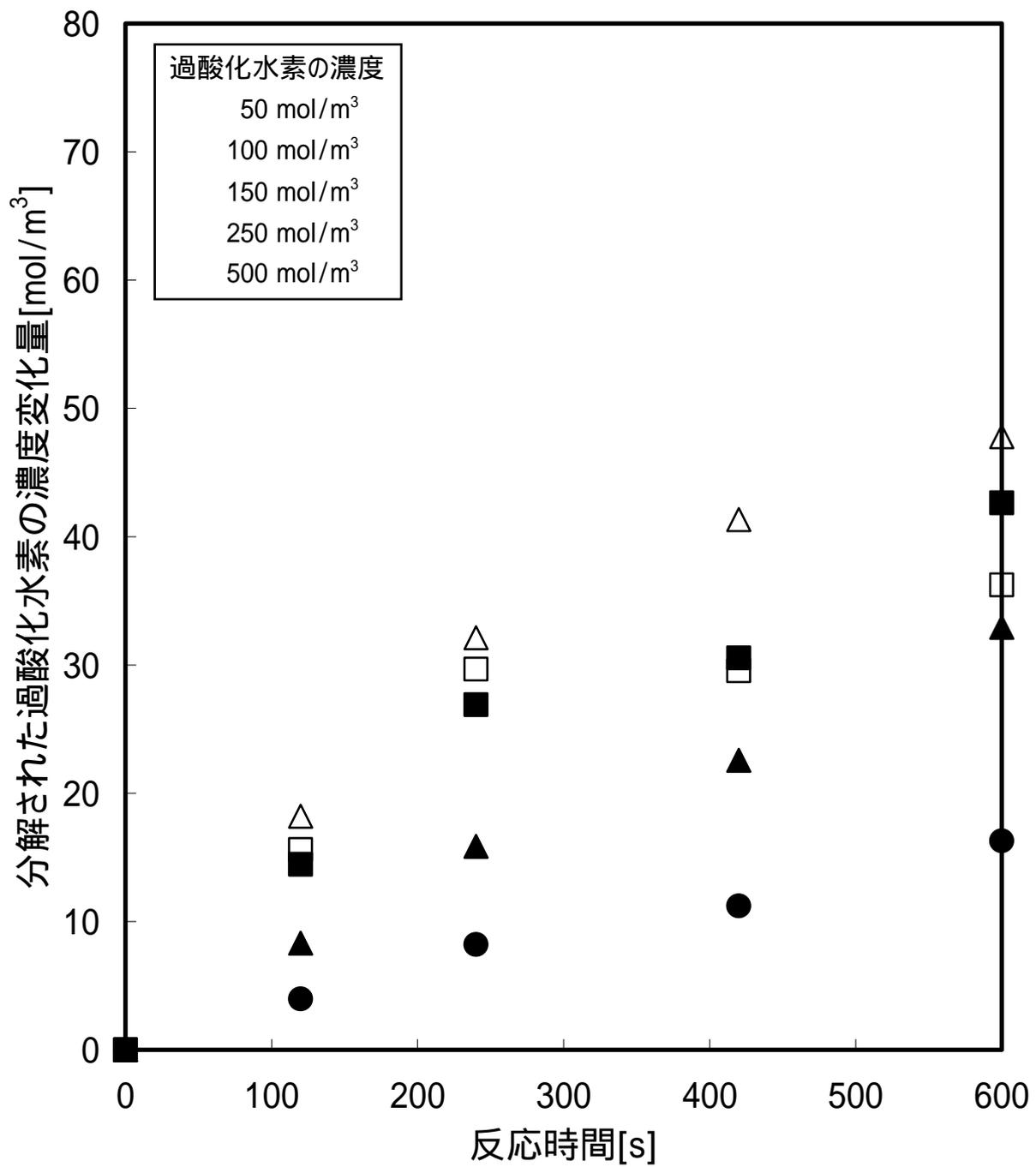


図 16.過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC)(45)

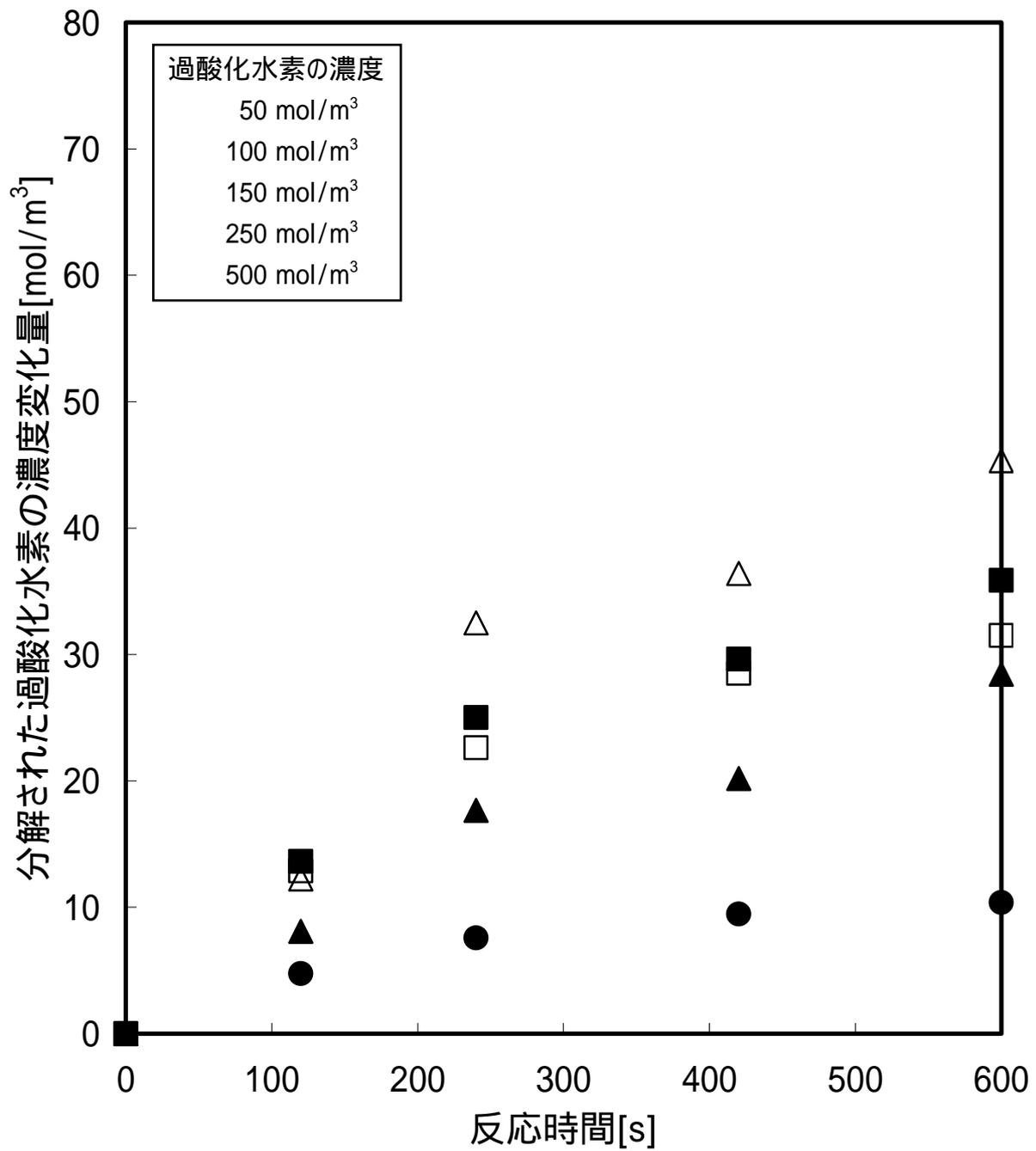


図 17. 過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC) (50)

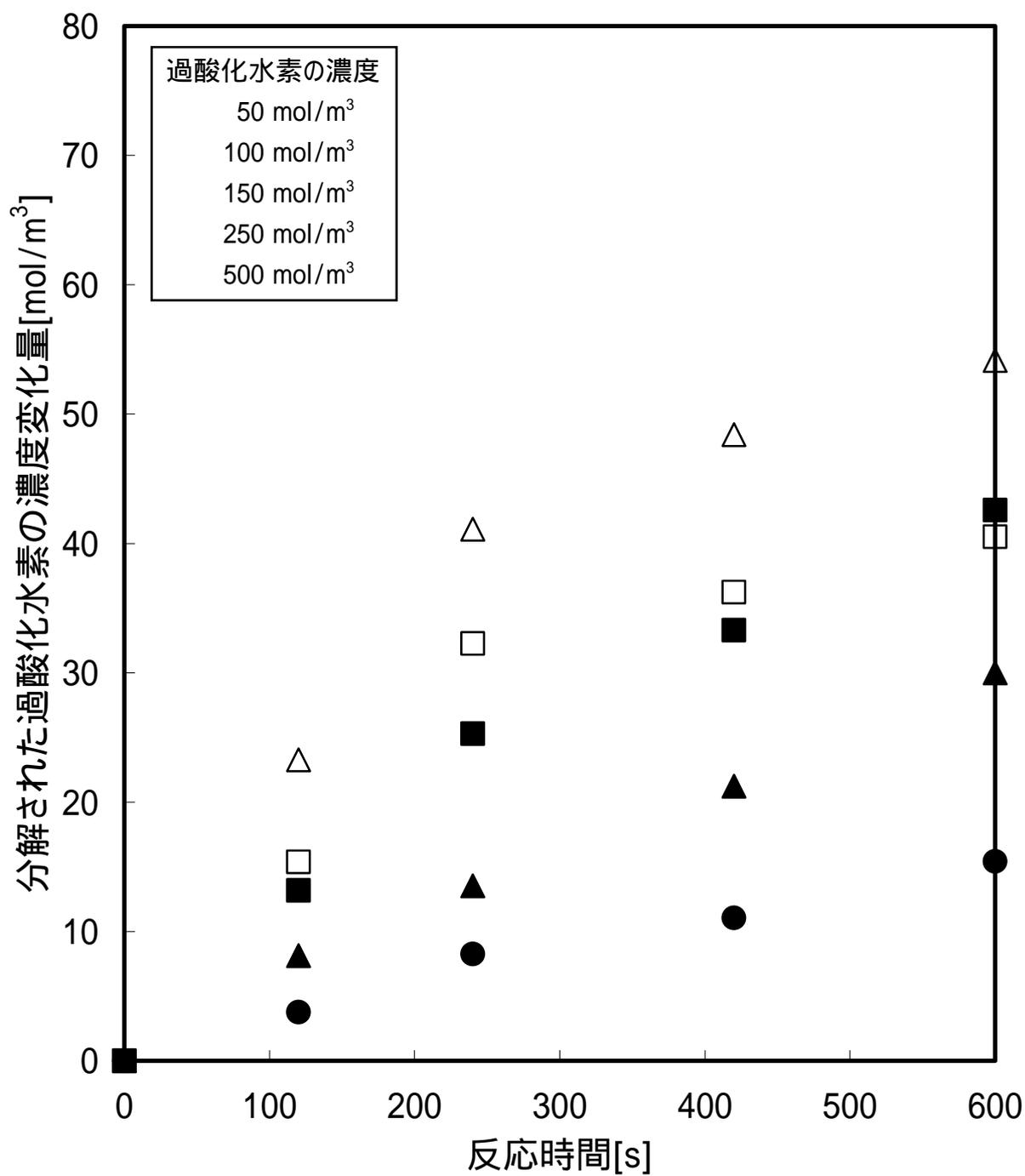


図 18. 過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC) (30)

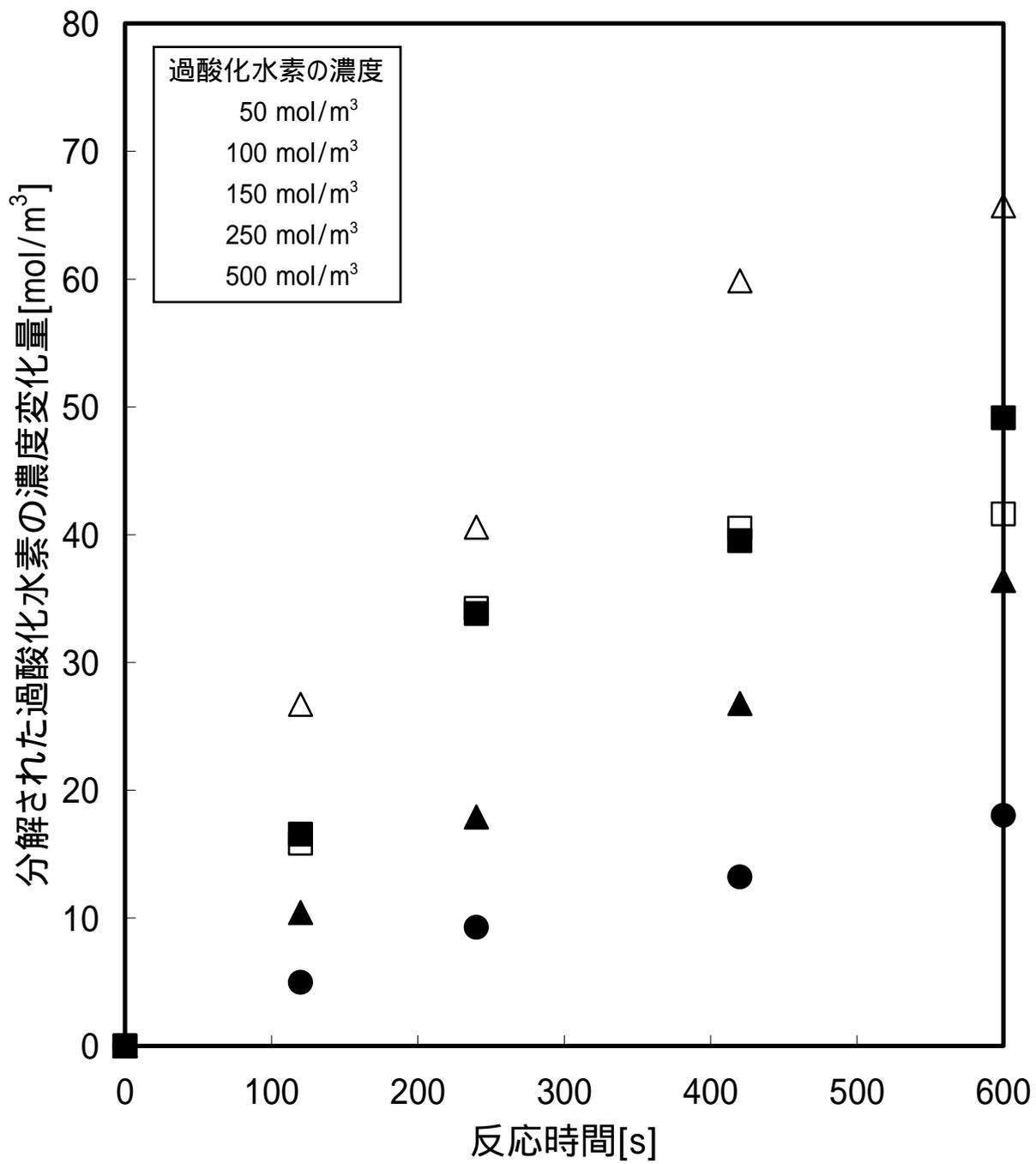


図 19.過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC)(35)

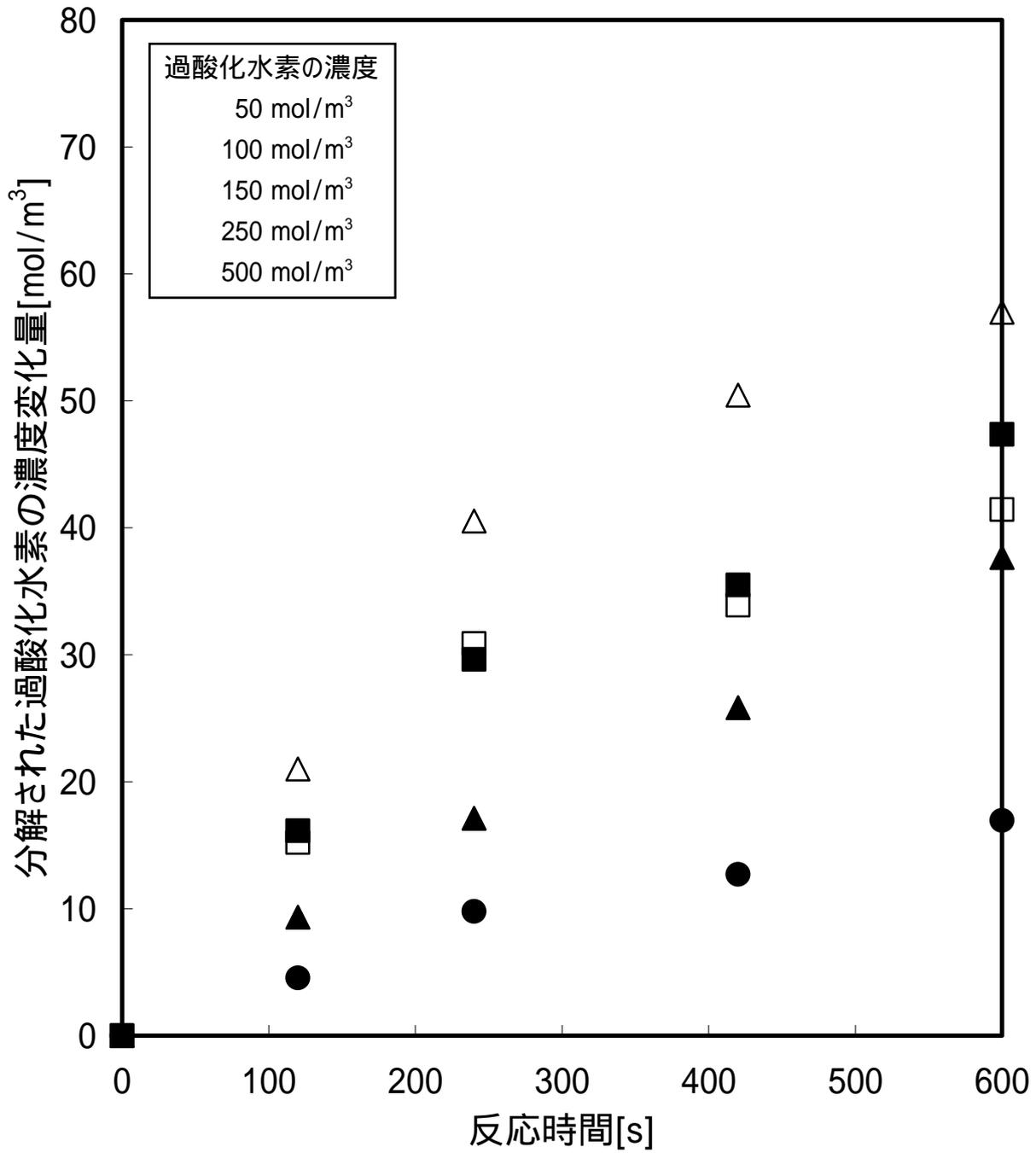


図 20. 過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC) (40)

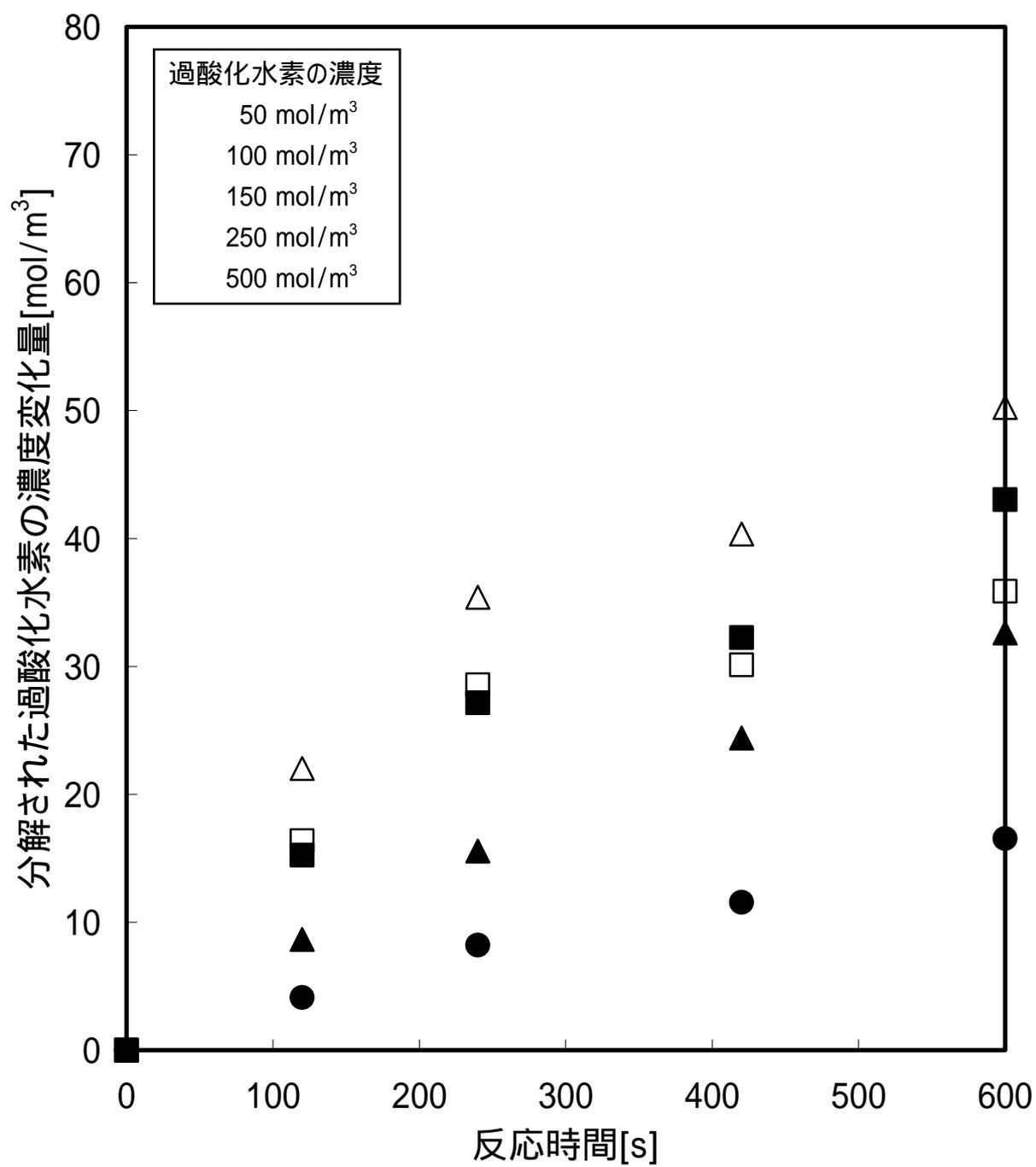


図 21.過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC)(45)

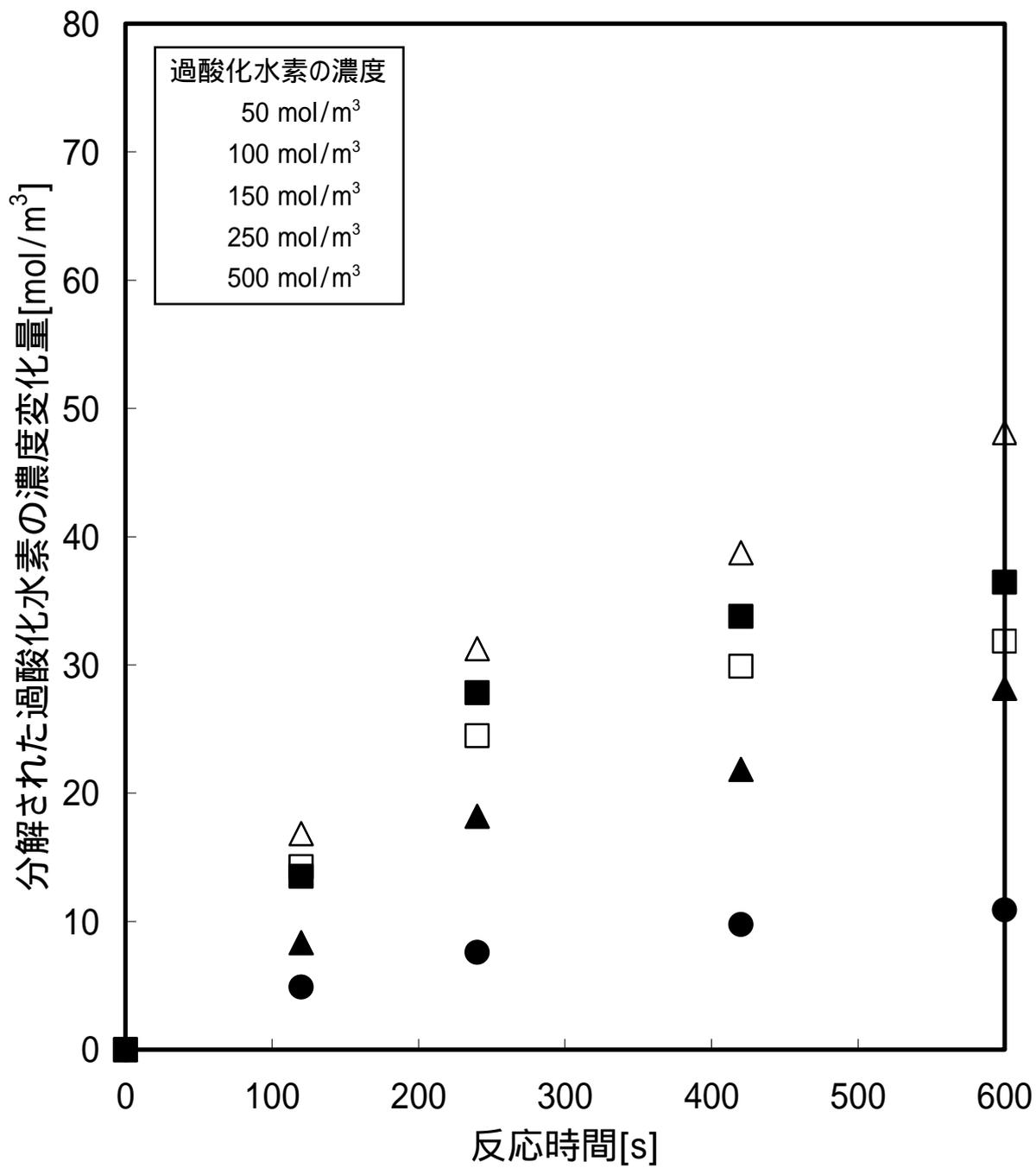


図 22. 過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC) (50)

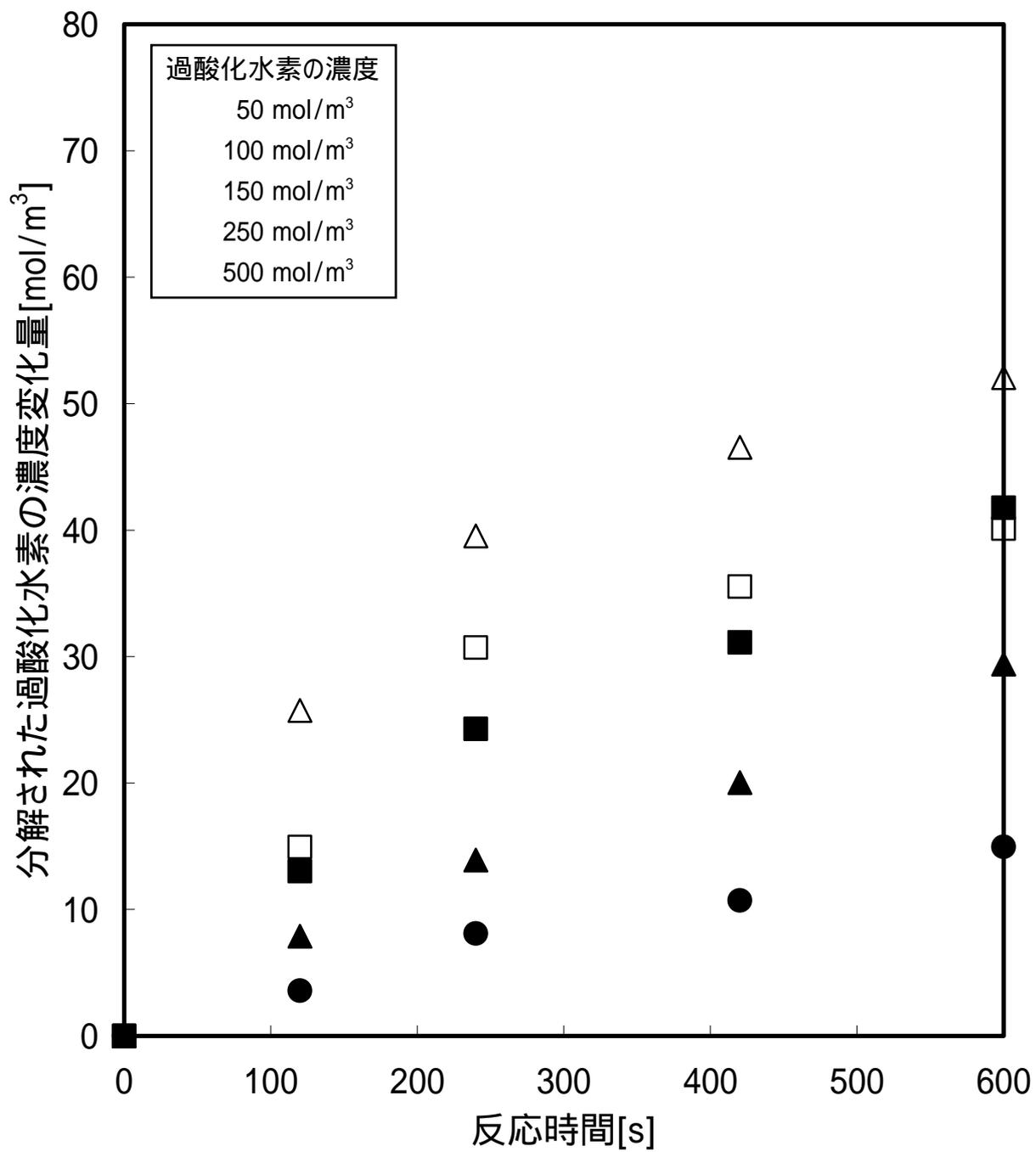


図 23. 過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC)(30)

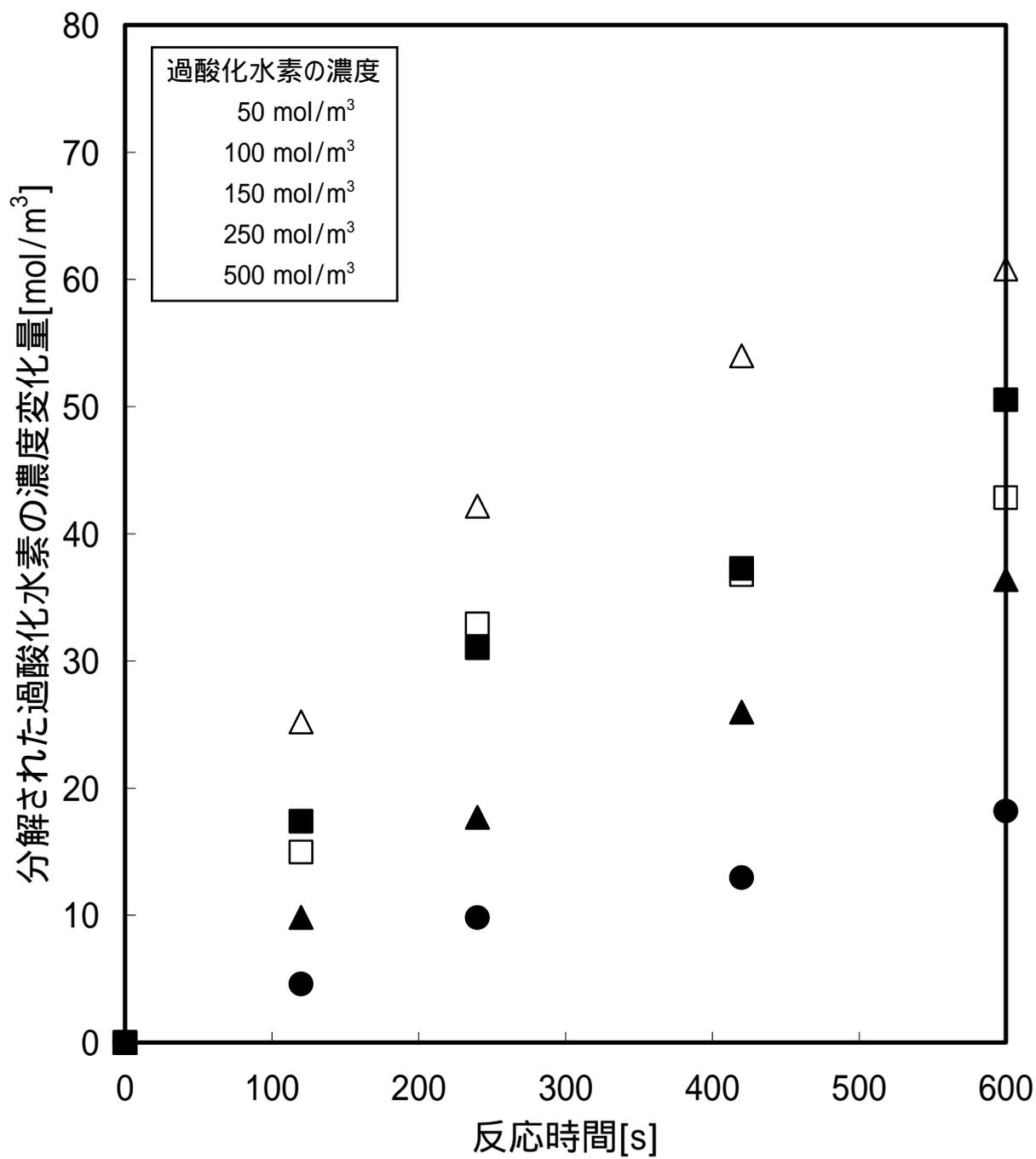


図 24.過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC)(35)

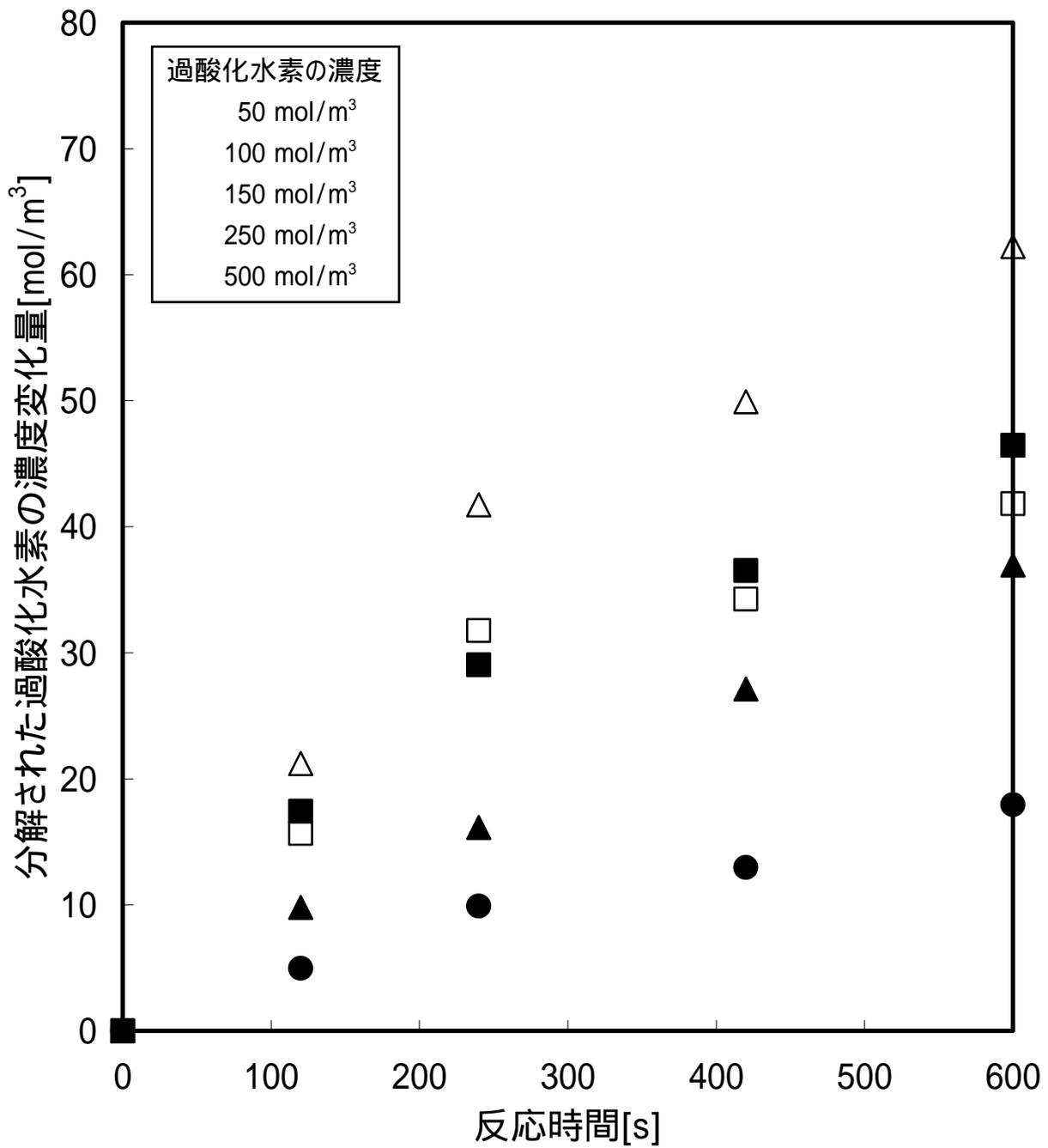


図 25. 過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC) (40)

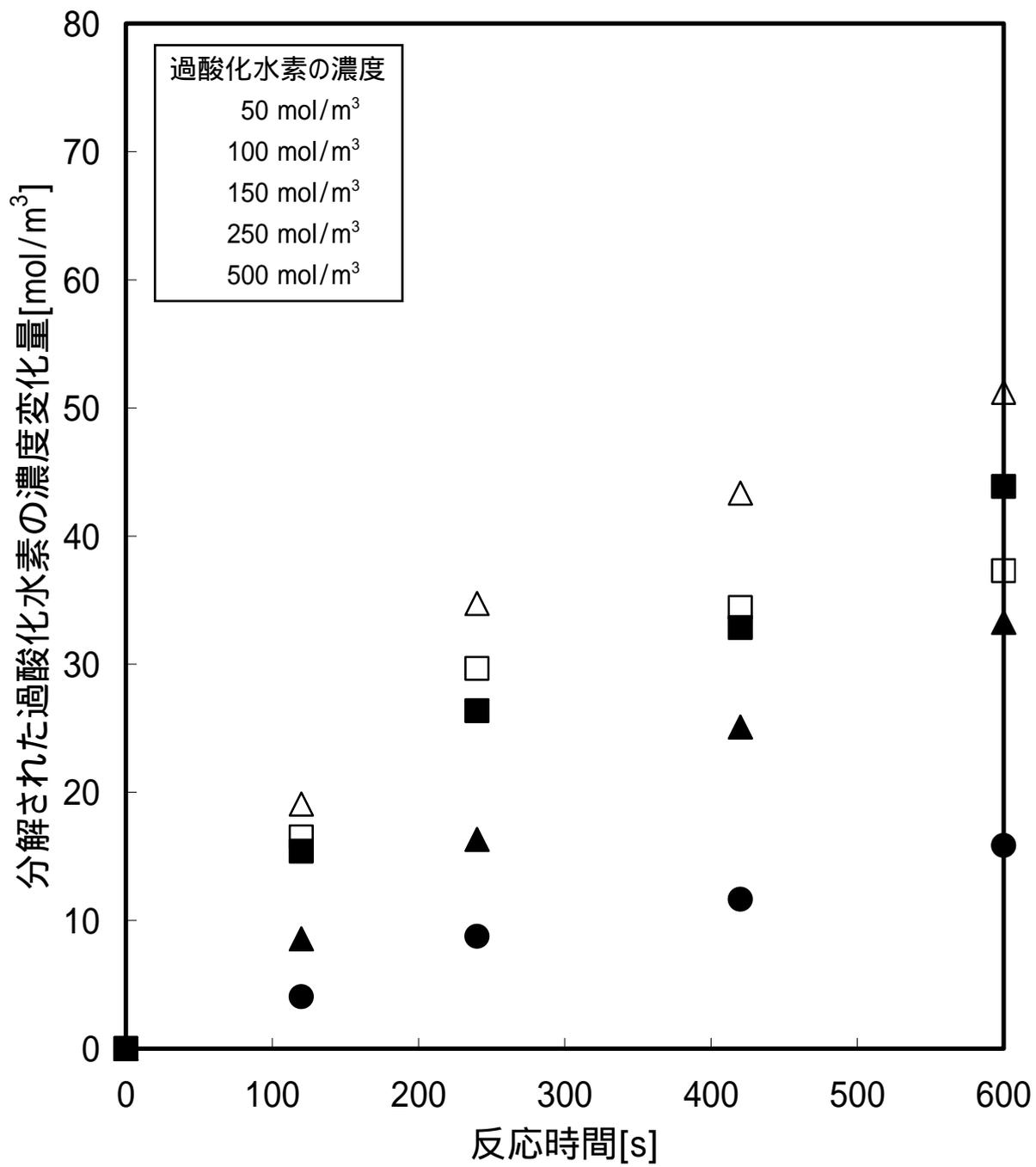


図 26. 過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC)(45)

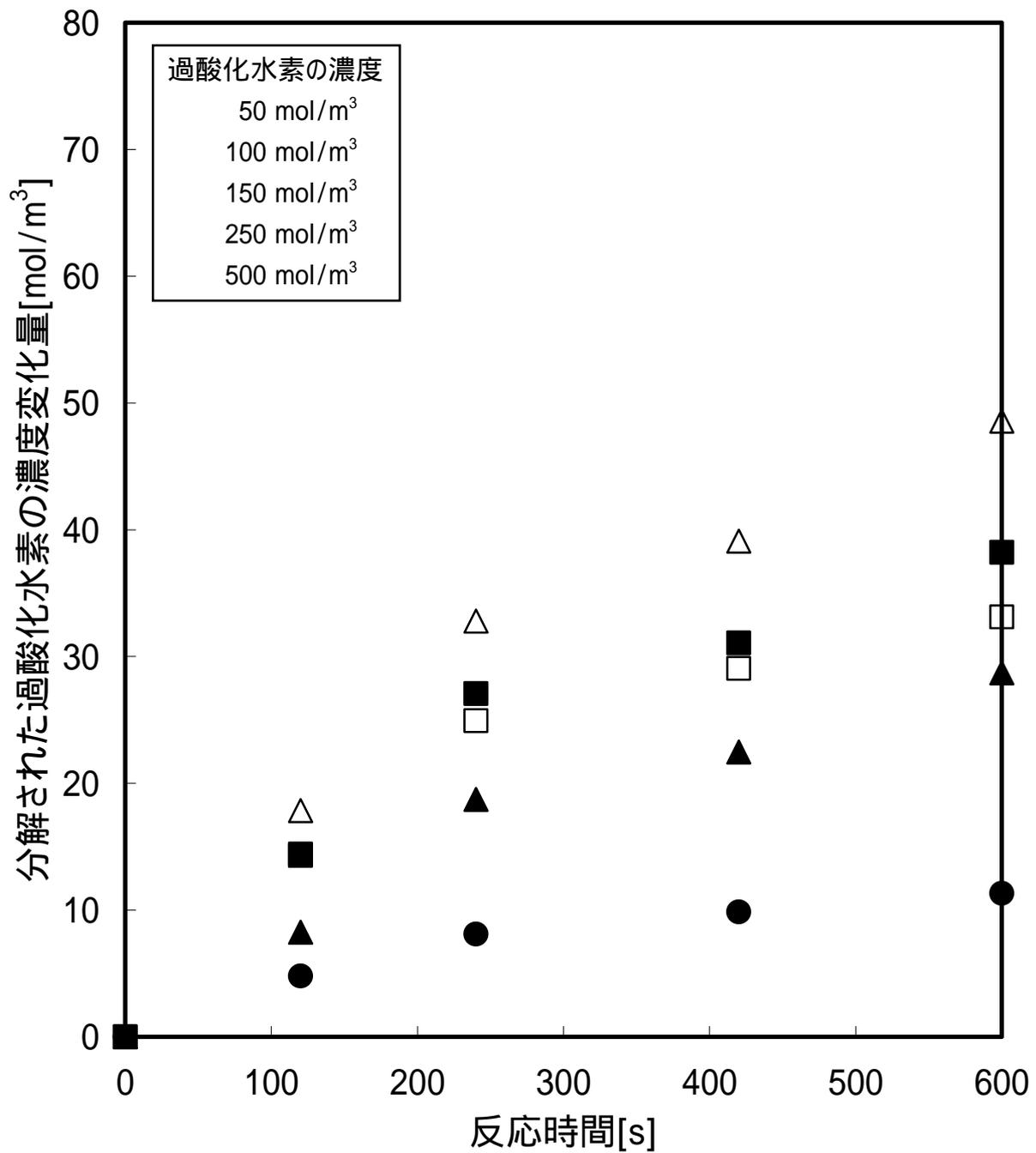


図 27. 過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC) (50)

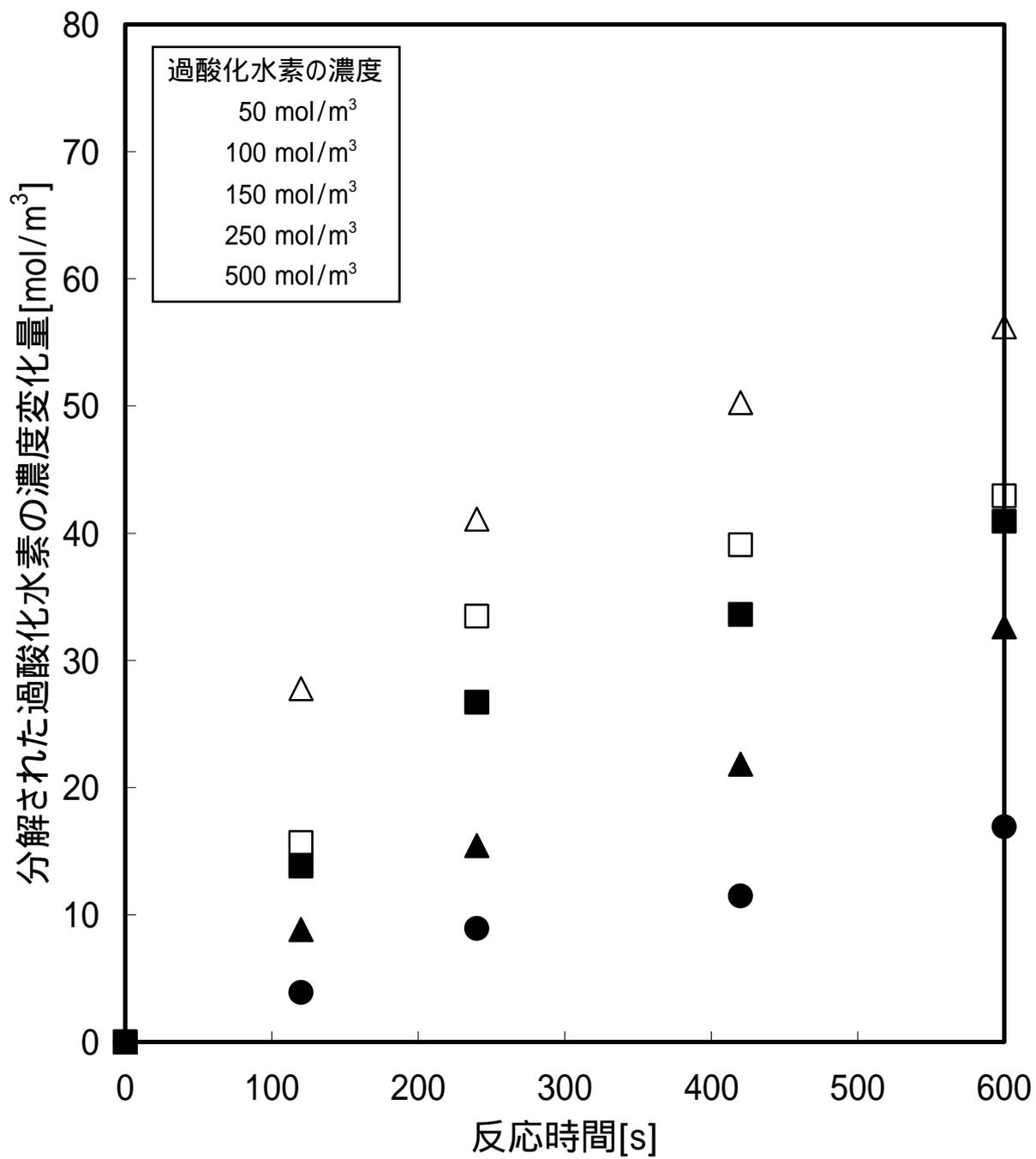


図 28. 過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC) (30)

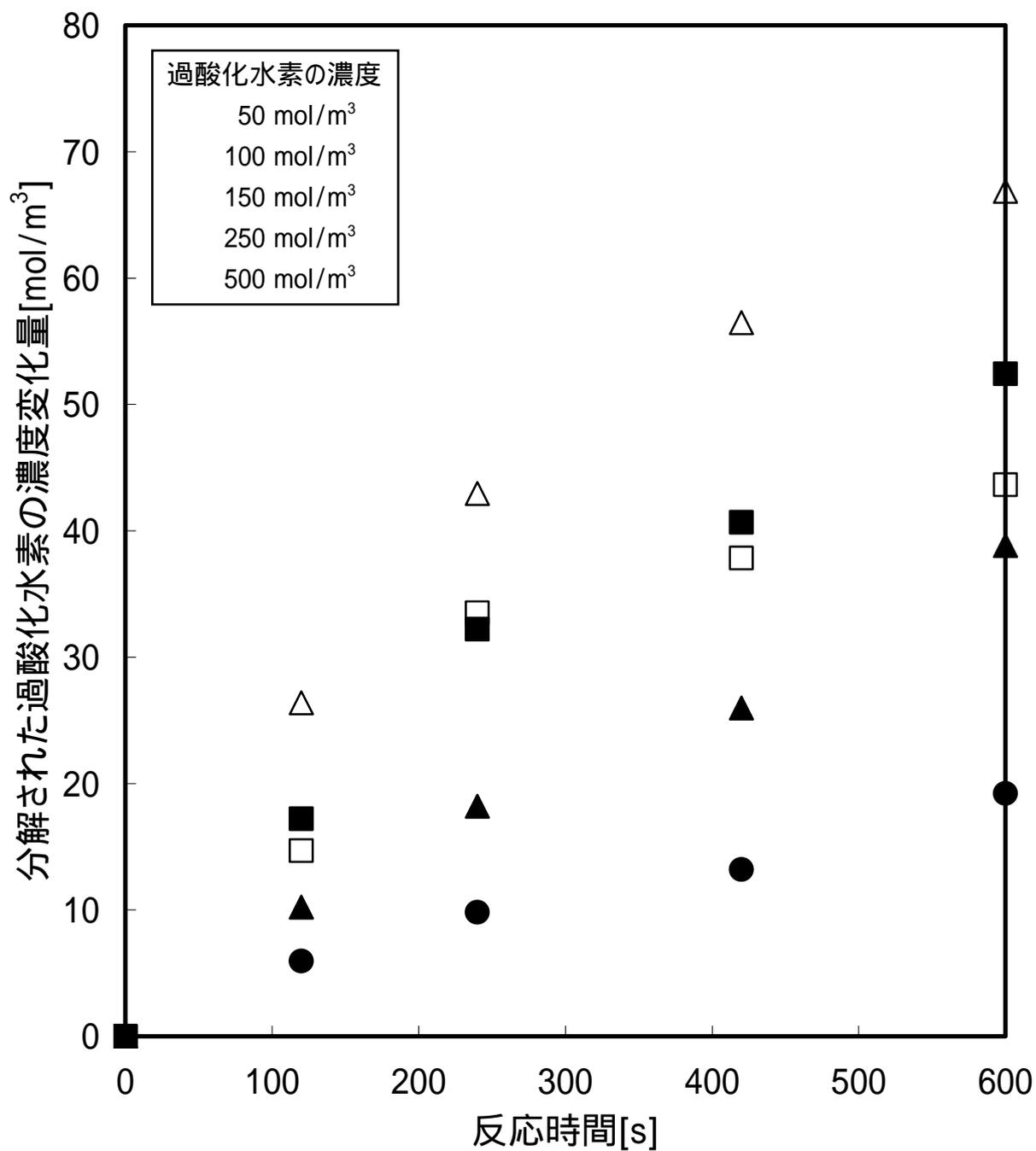


図 29. 過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC)(35)

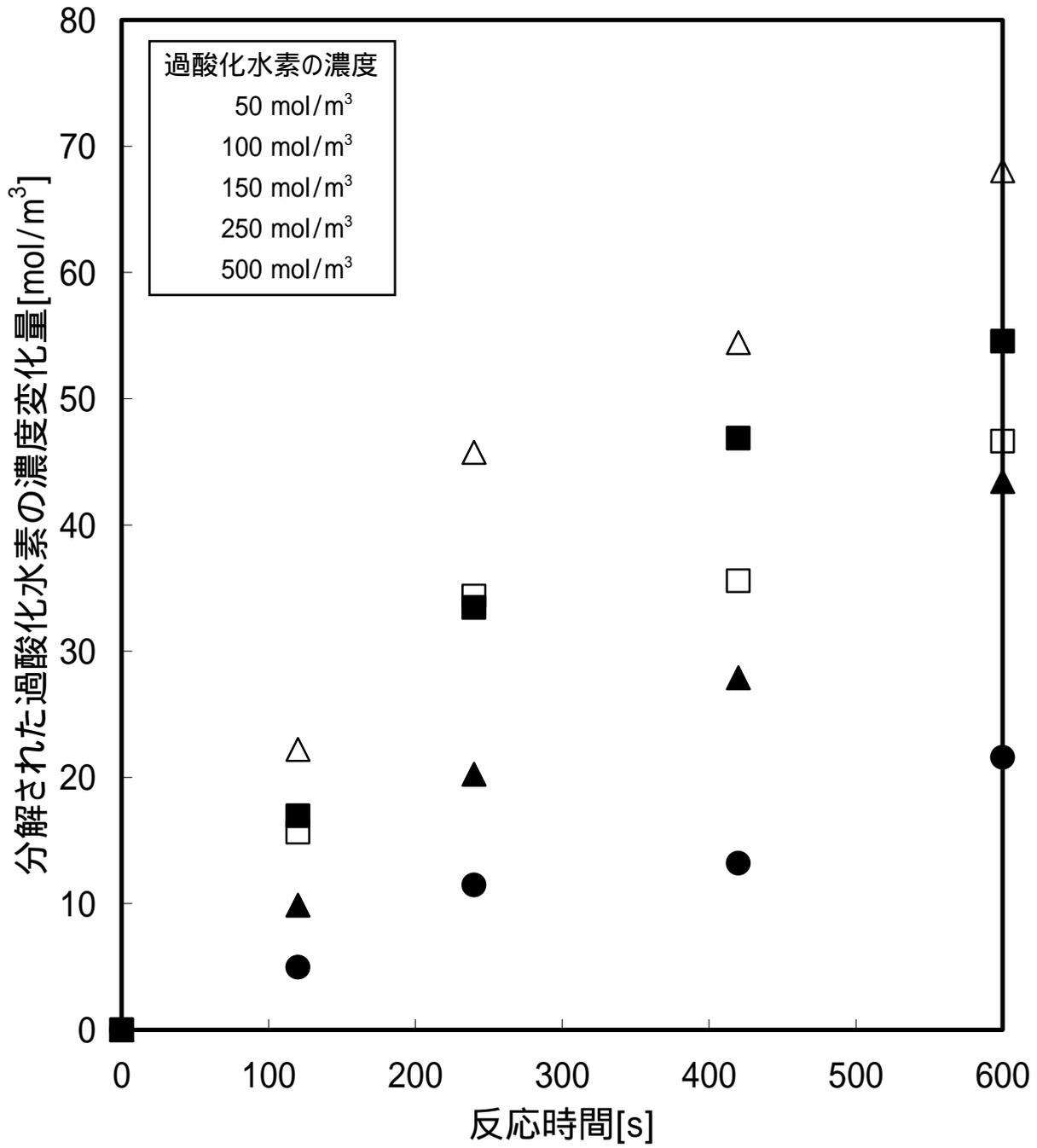


図 30. 過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC) (40)

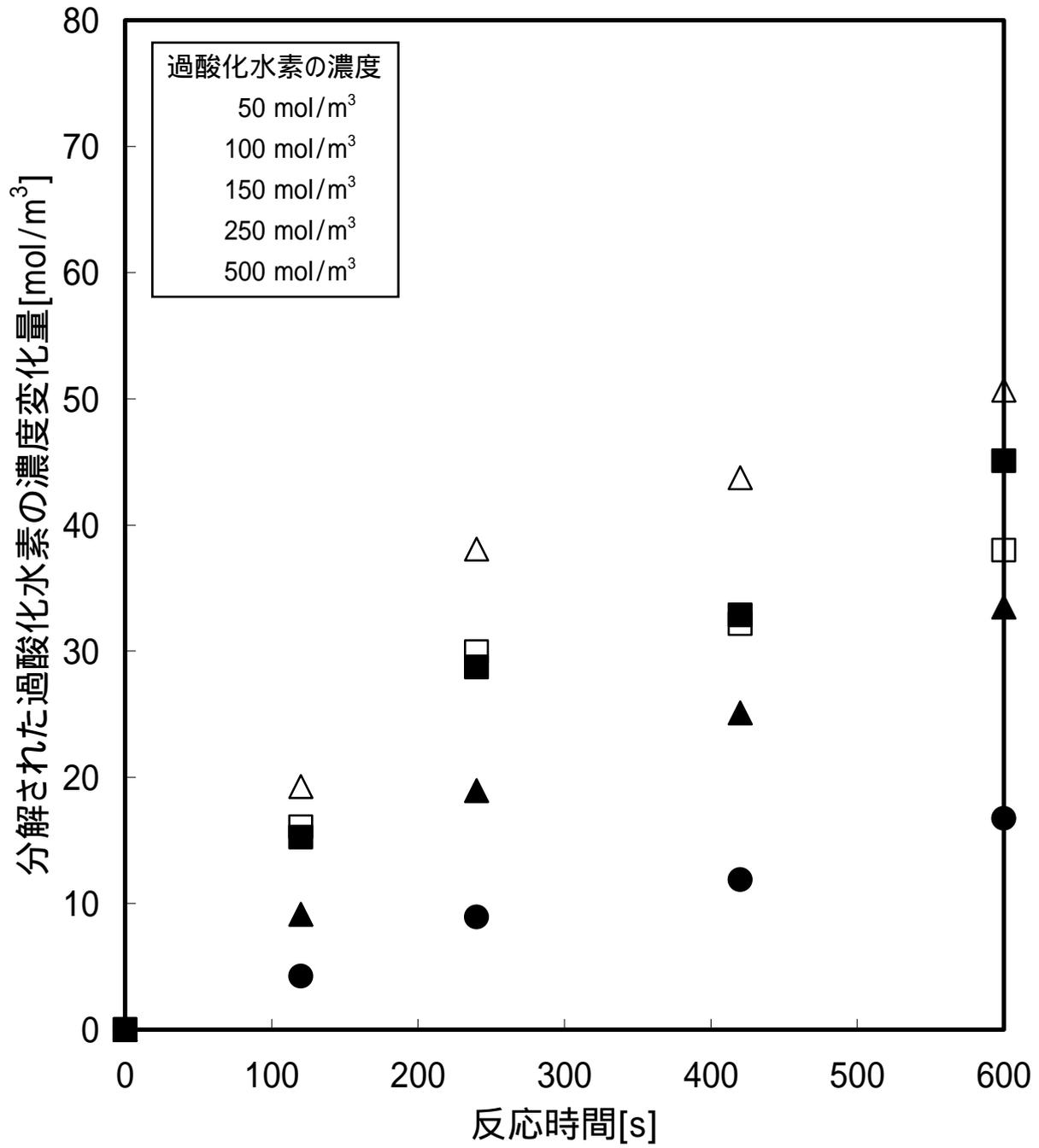


図 31.過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC)(45)

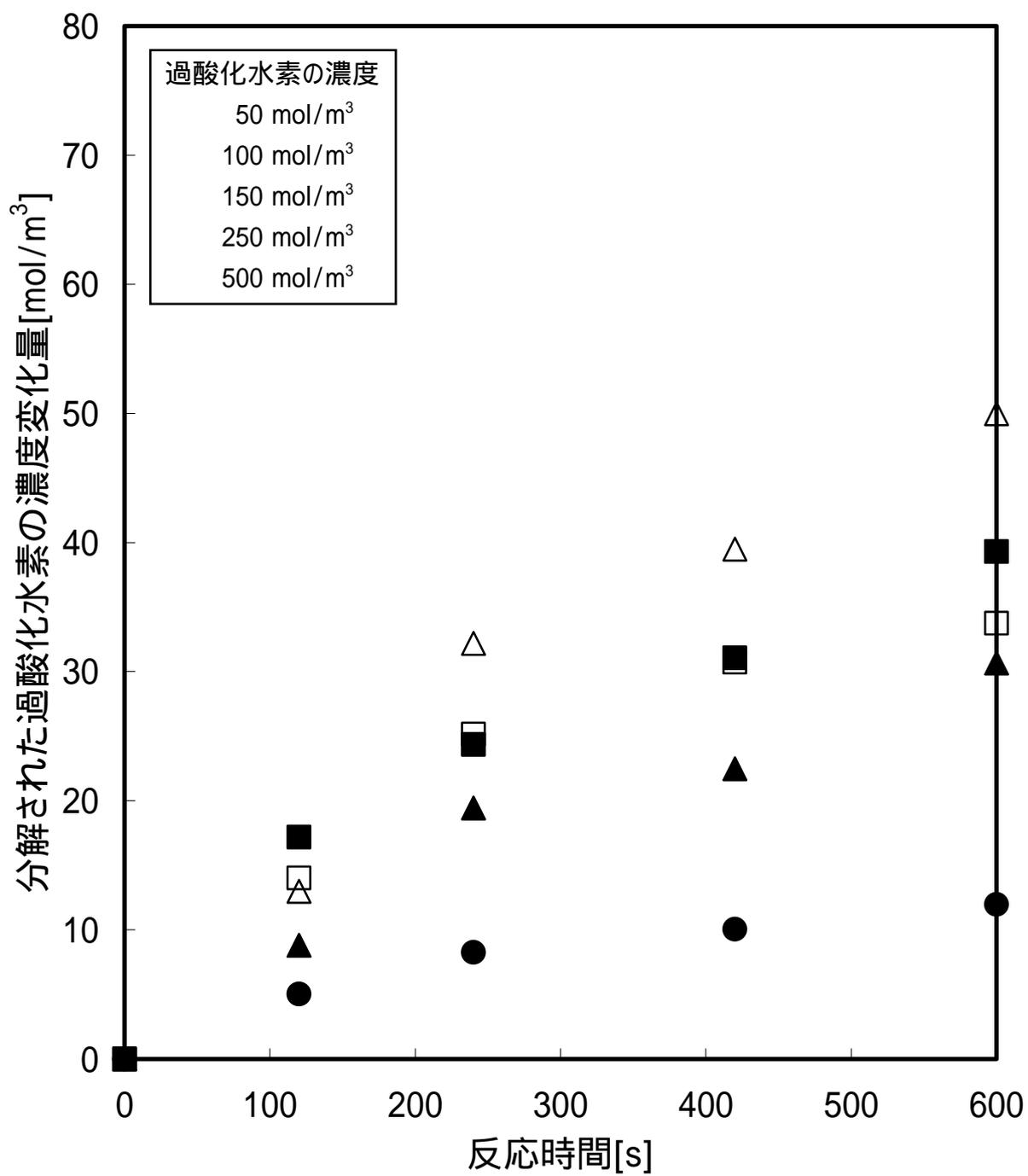


図 32.過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC) (50)

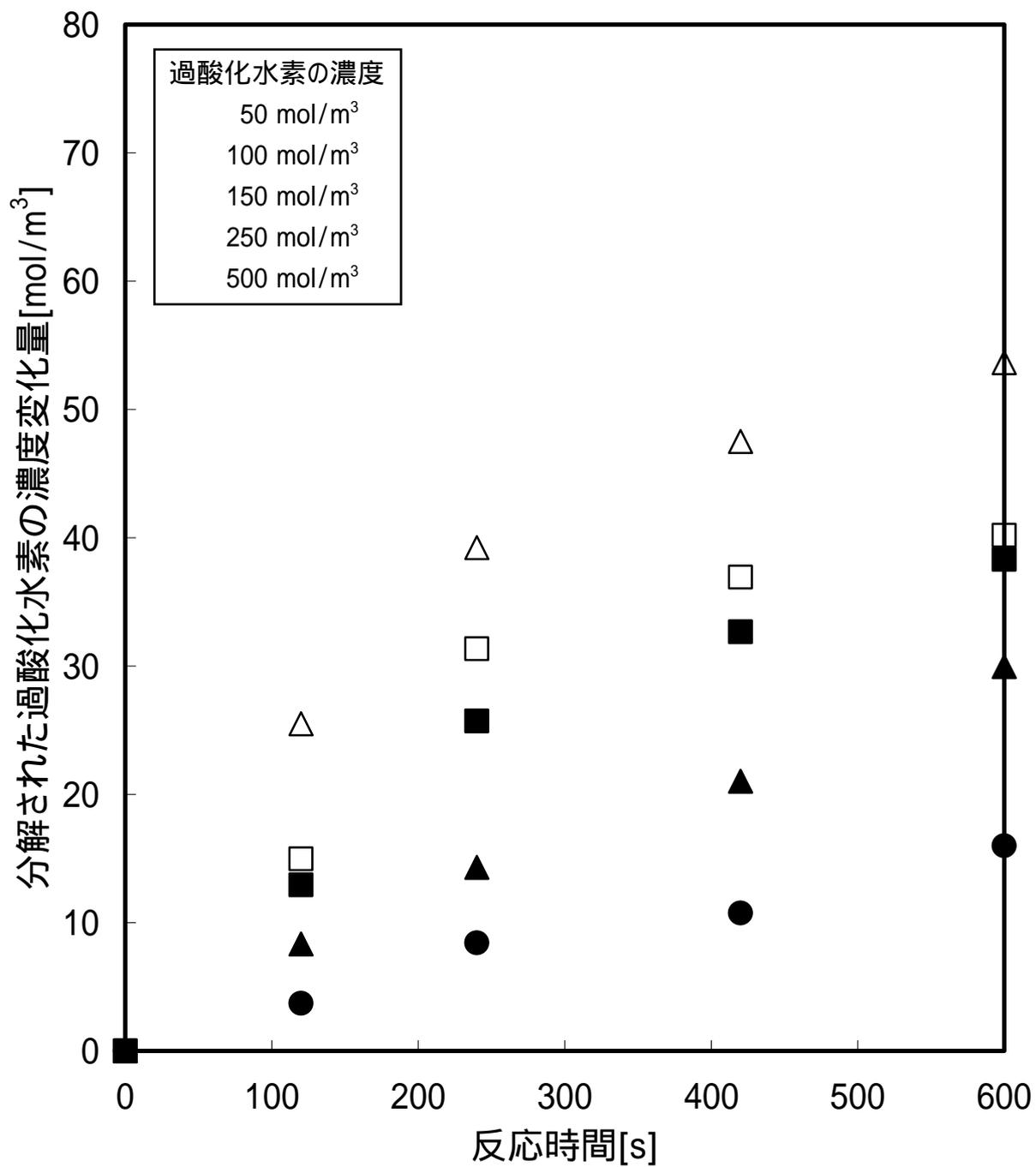


図 33. 過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC) (30)

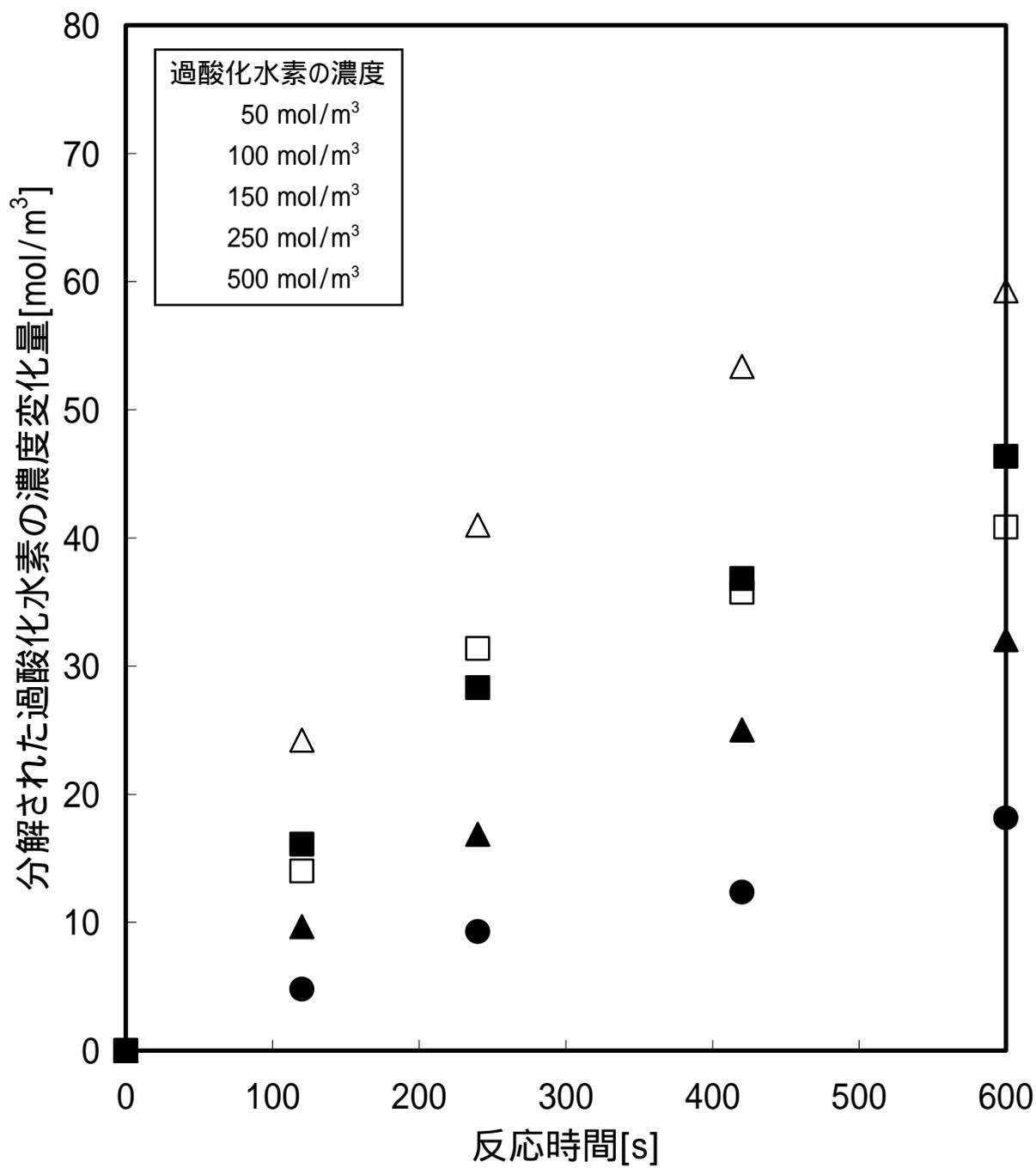


図 34.過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC)(35)

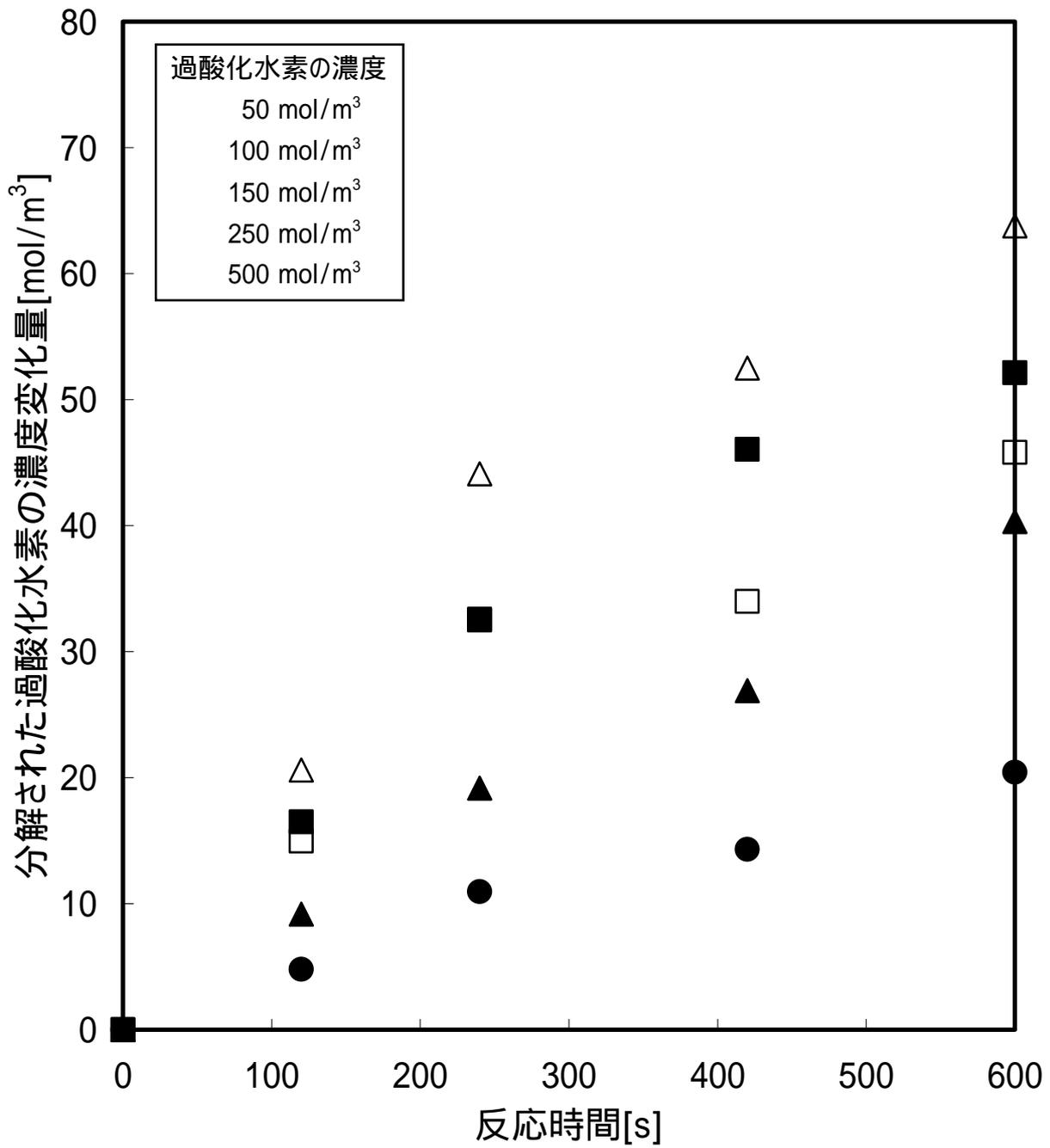


図 35.過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC)(40)

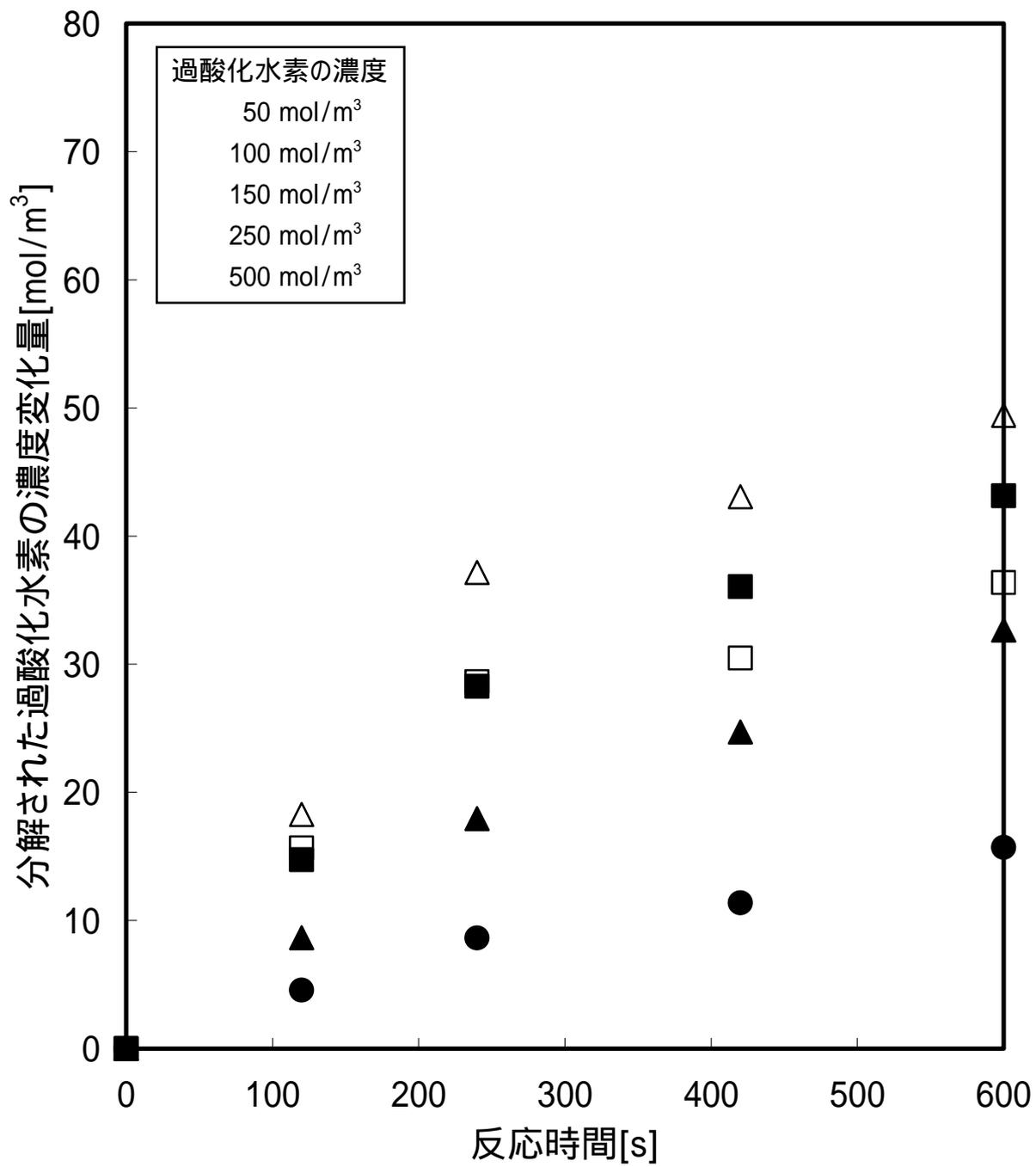


図 36. 過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC)(45)

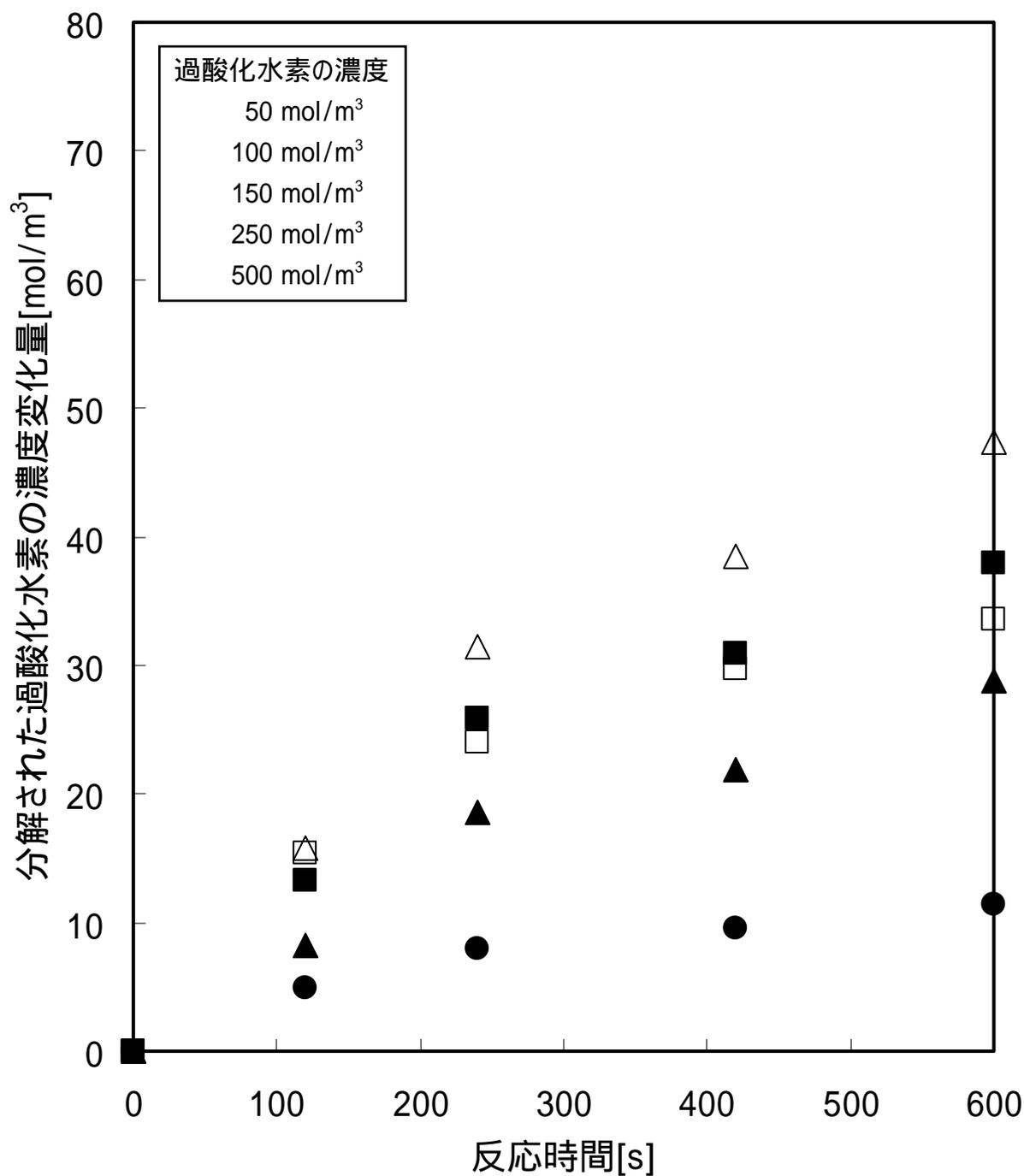


図 37. 過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC) (50)

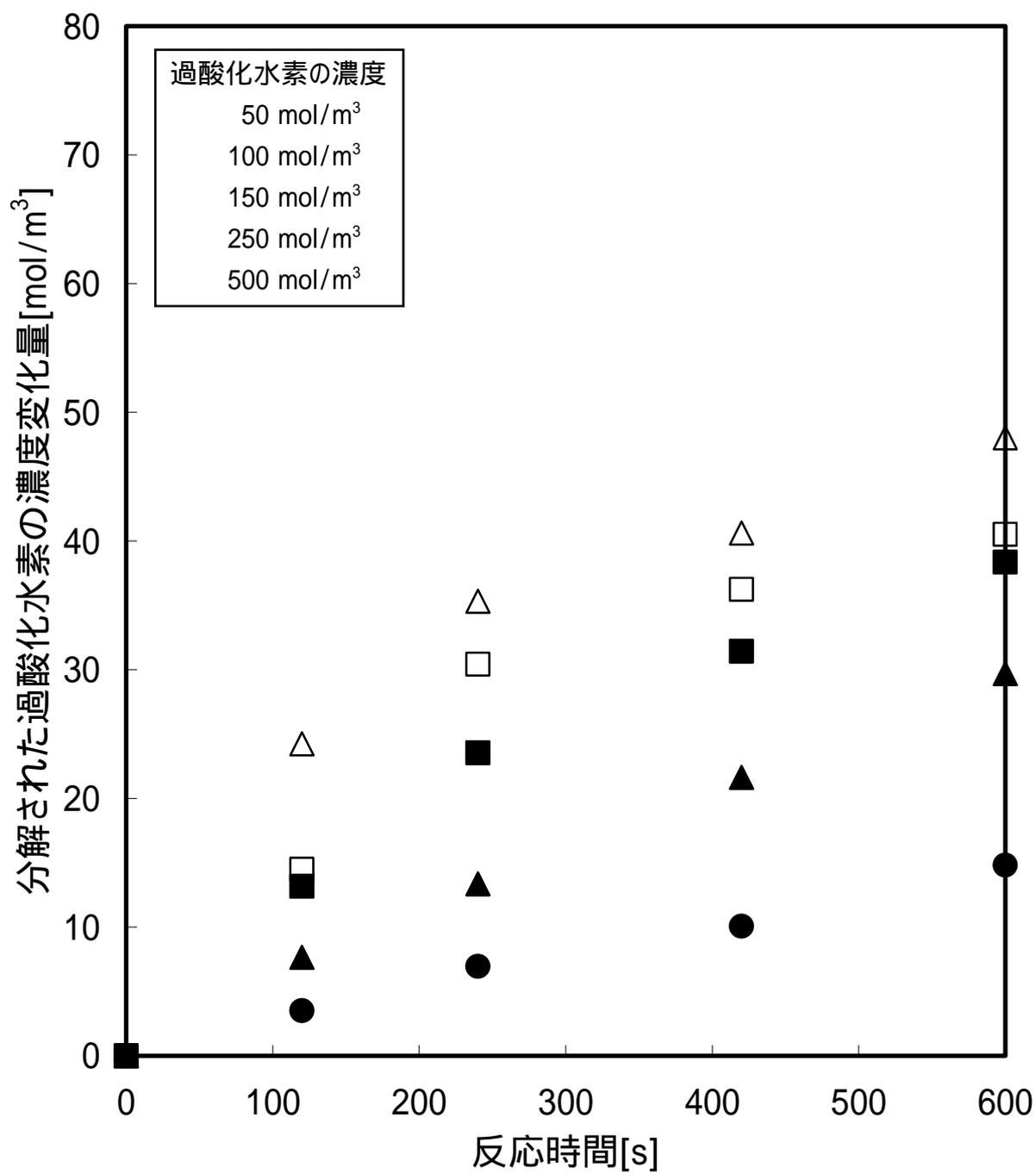


図 38. 過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC) (30)

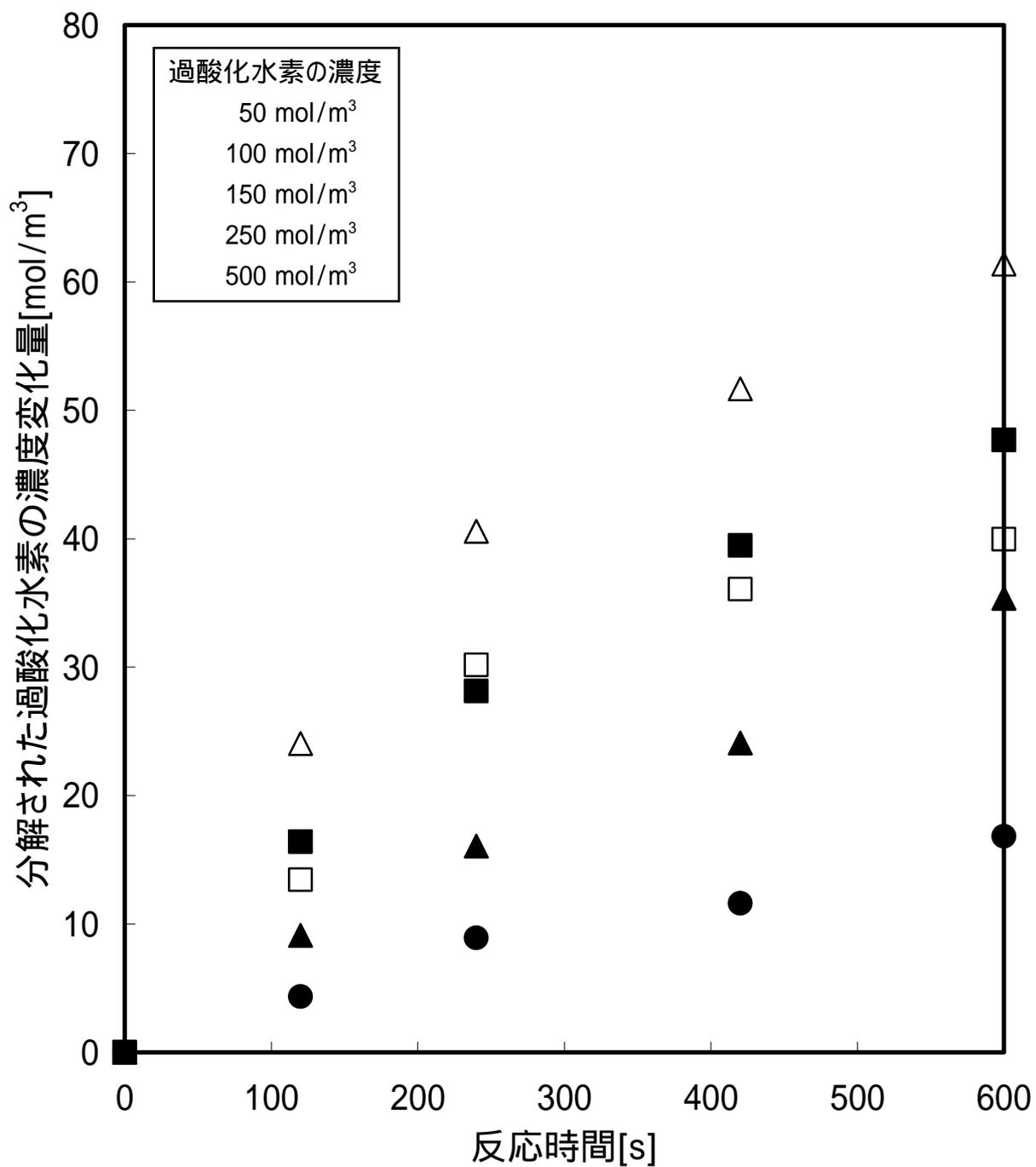


図 39. 過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC)(35)

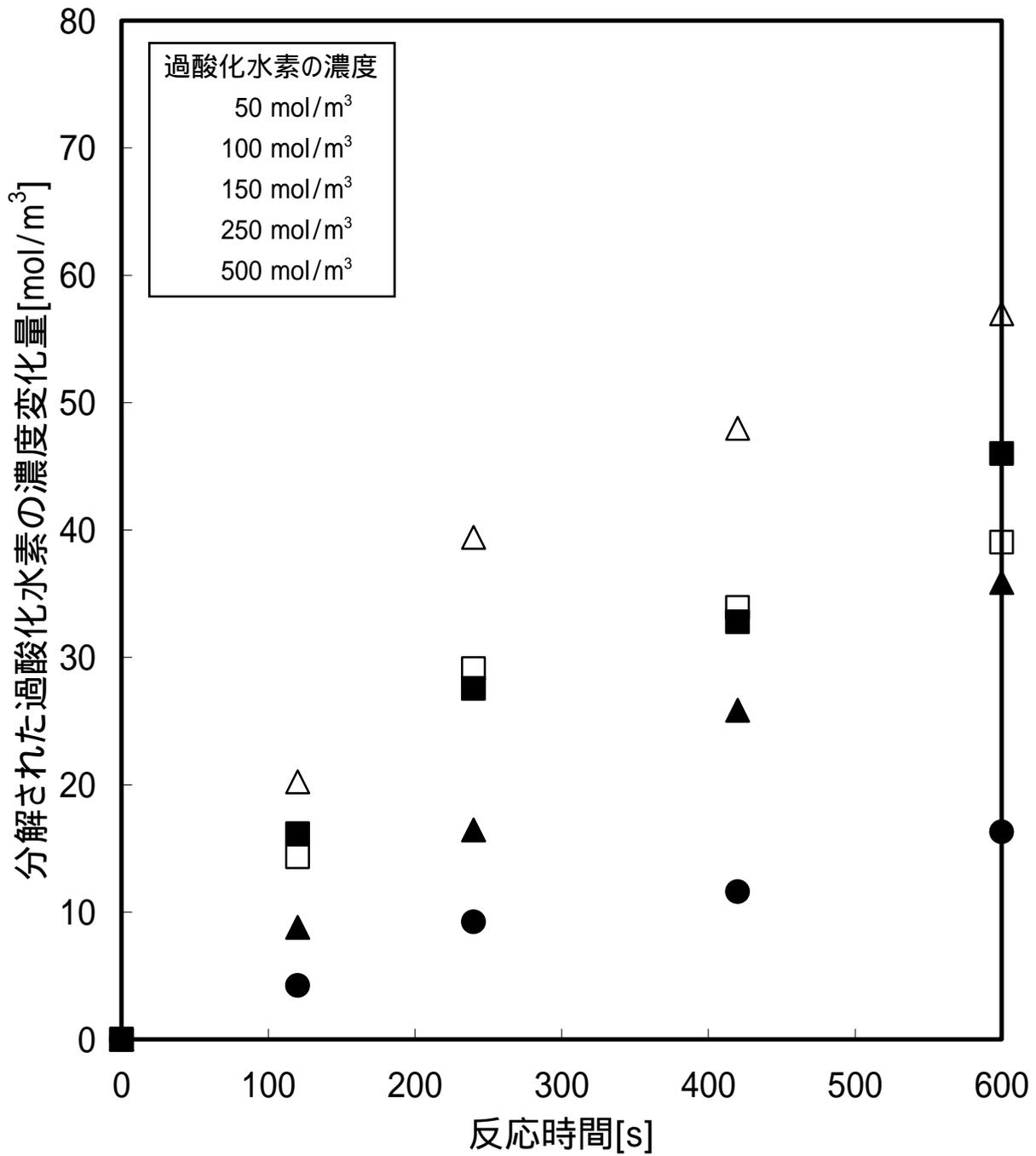


図 40. 過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC) (40)

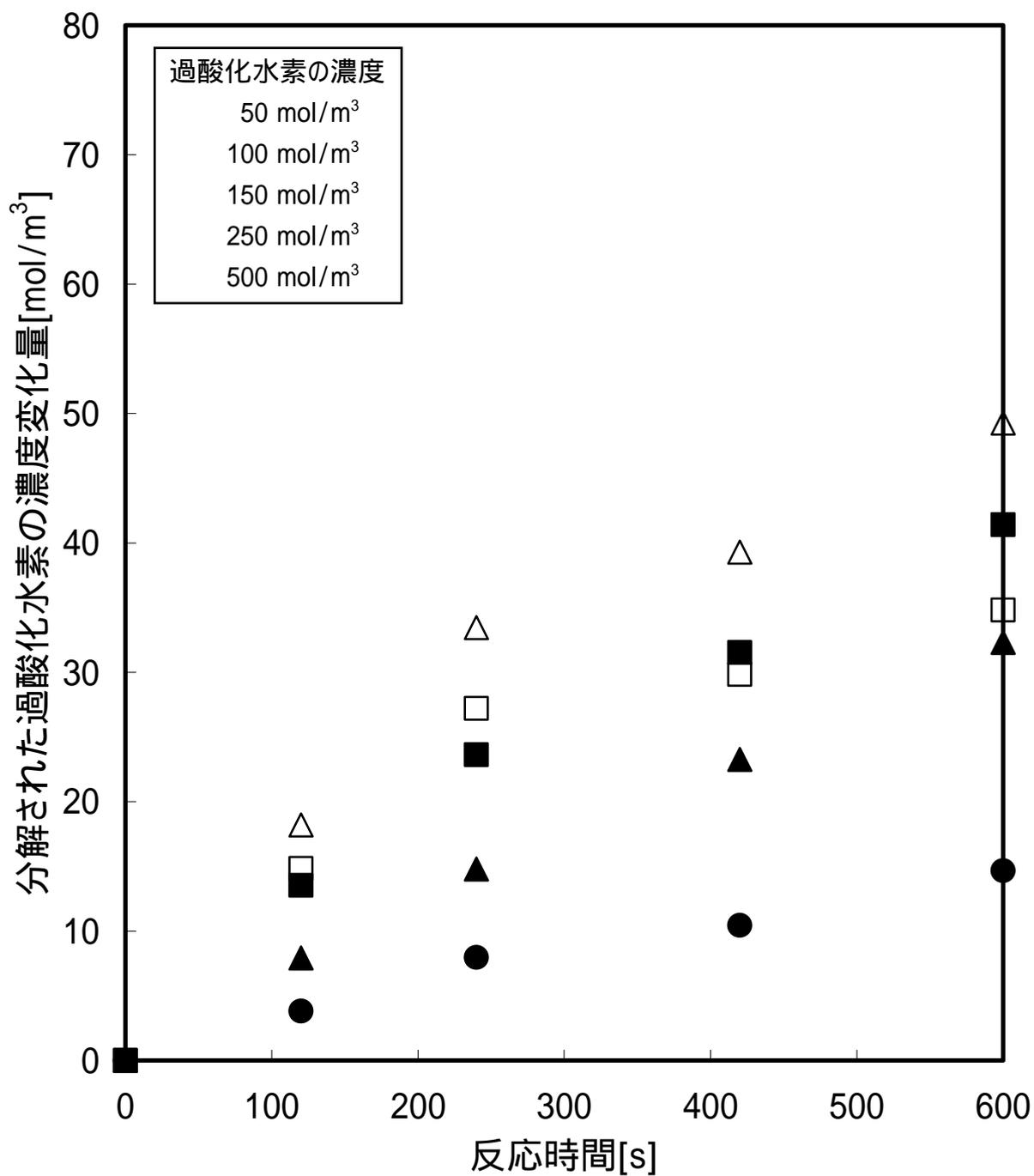


図 41.過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC)(45)

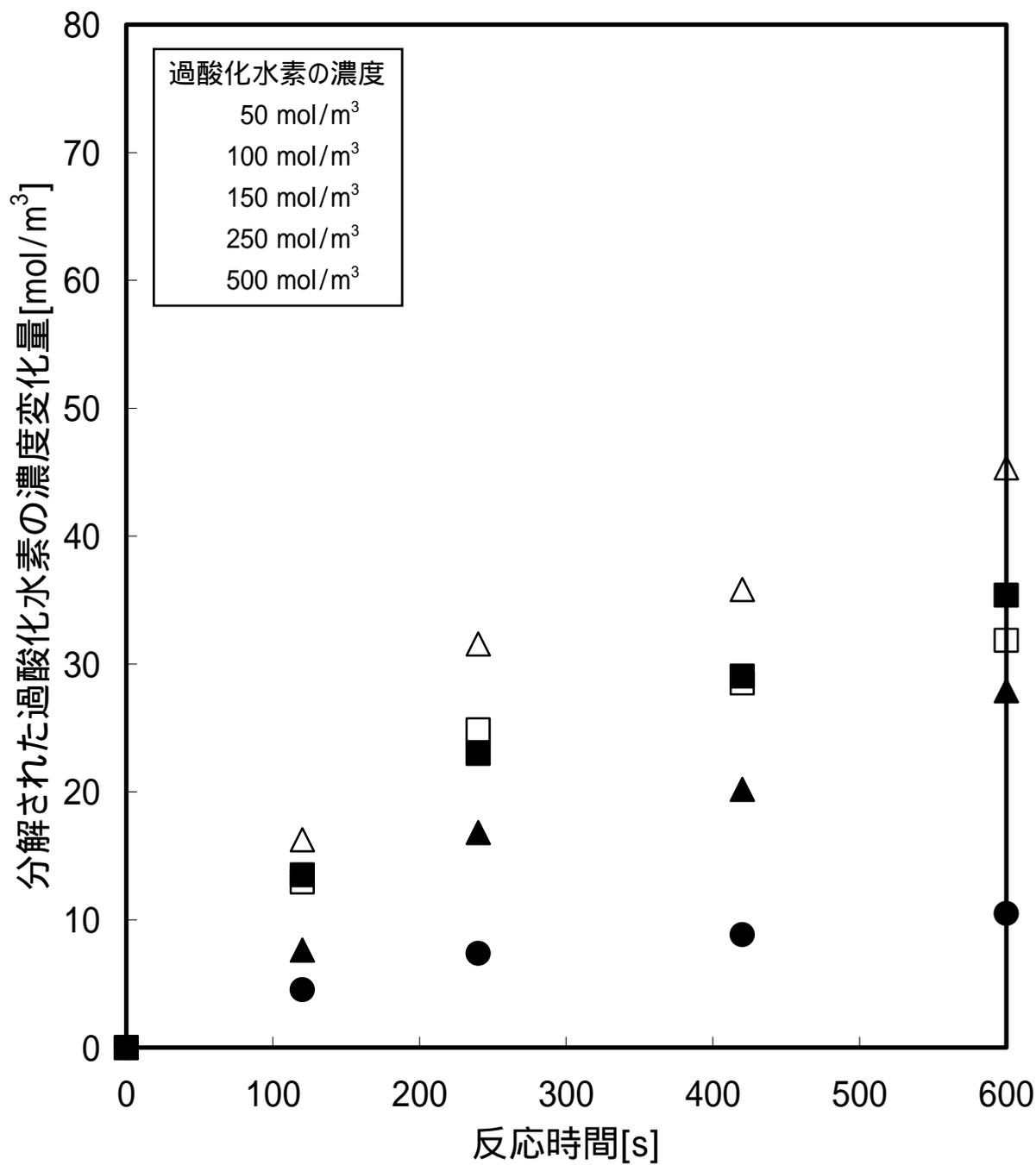


図 42.過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC) (50)

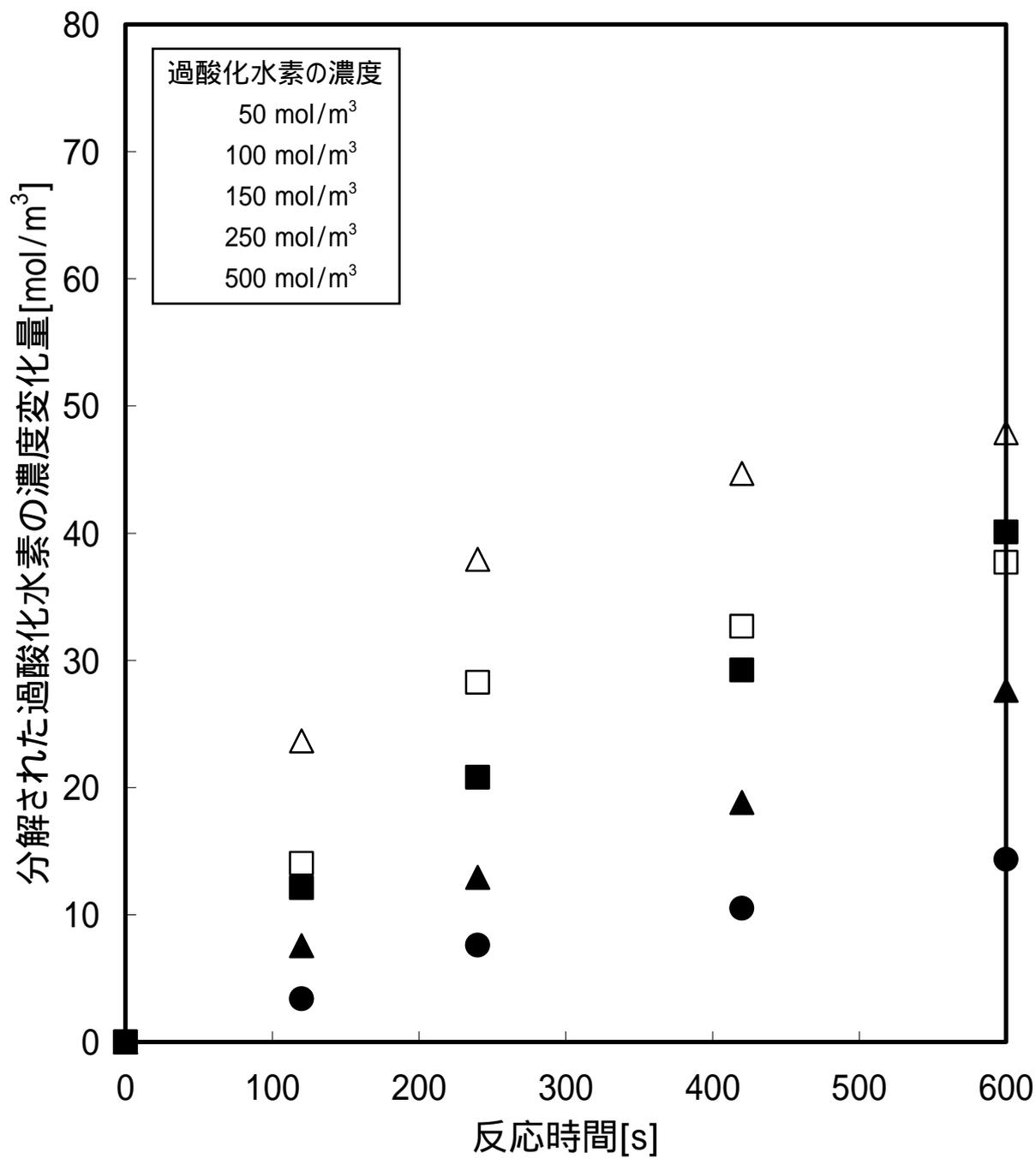


図 43. 過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC) (30)

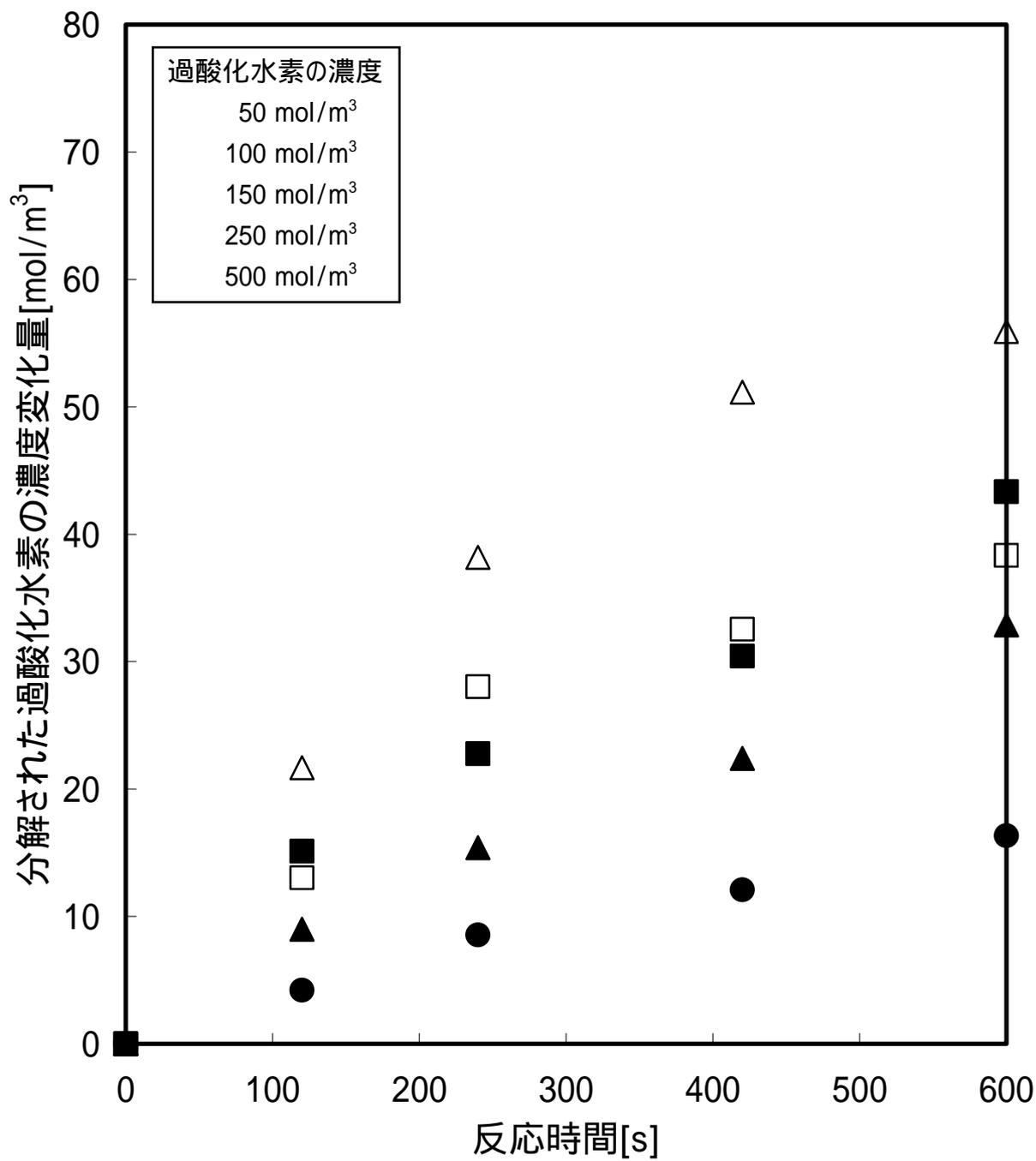


図 44. 過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC)(35)

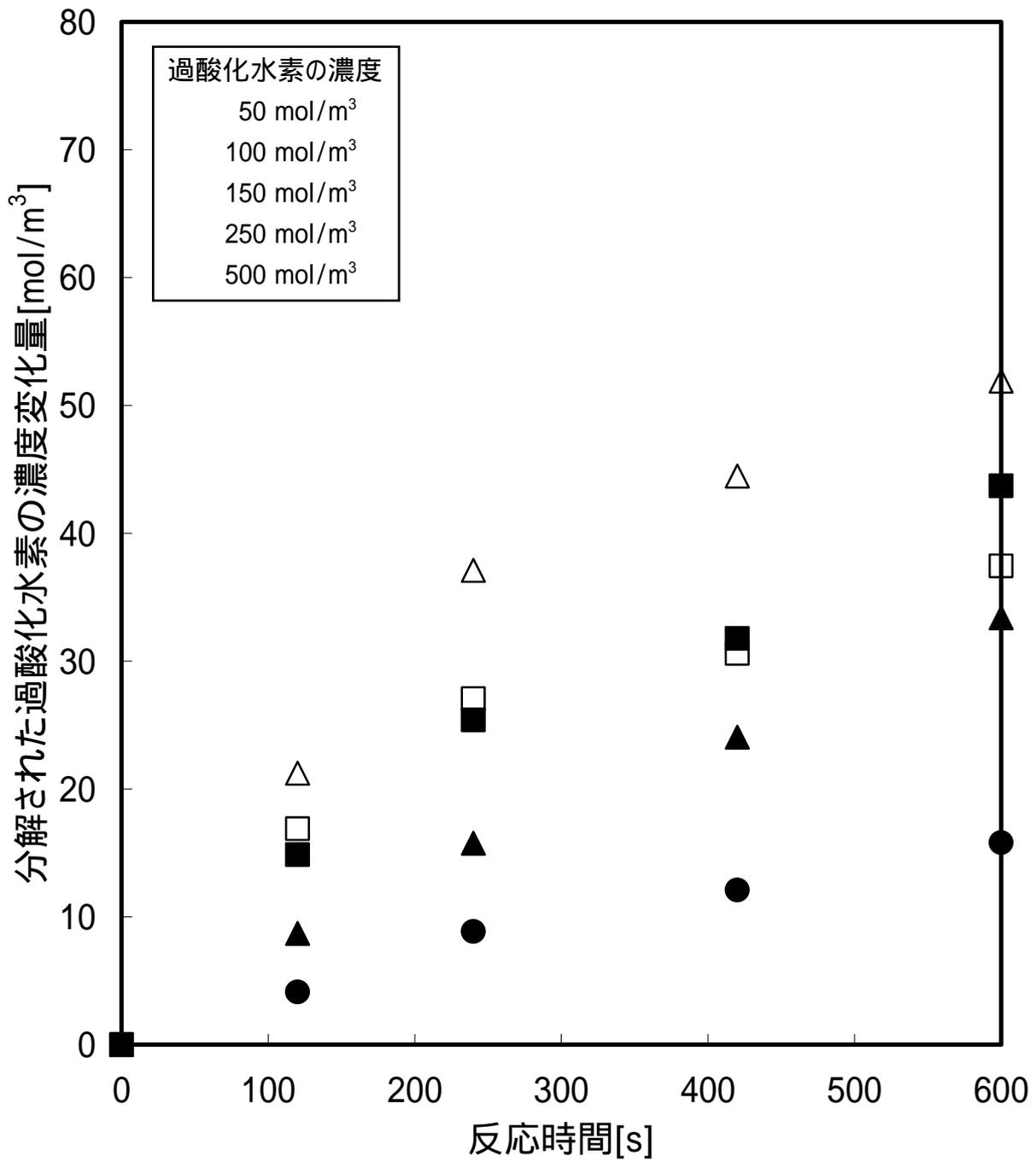


図 45. 過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC) (40)

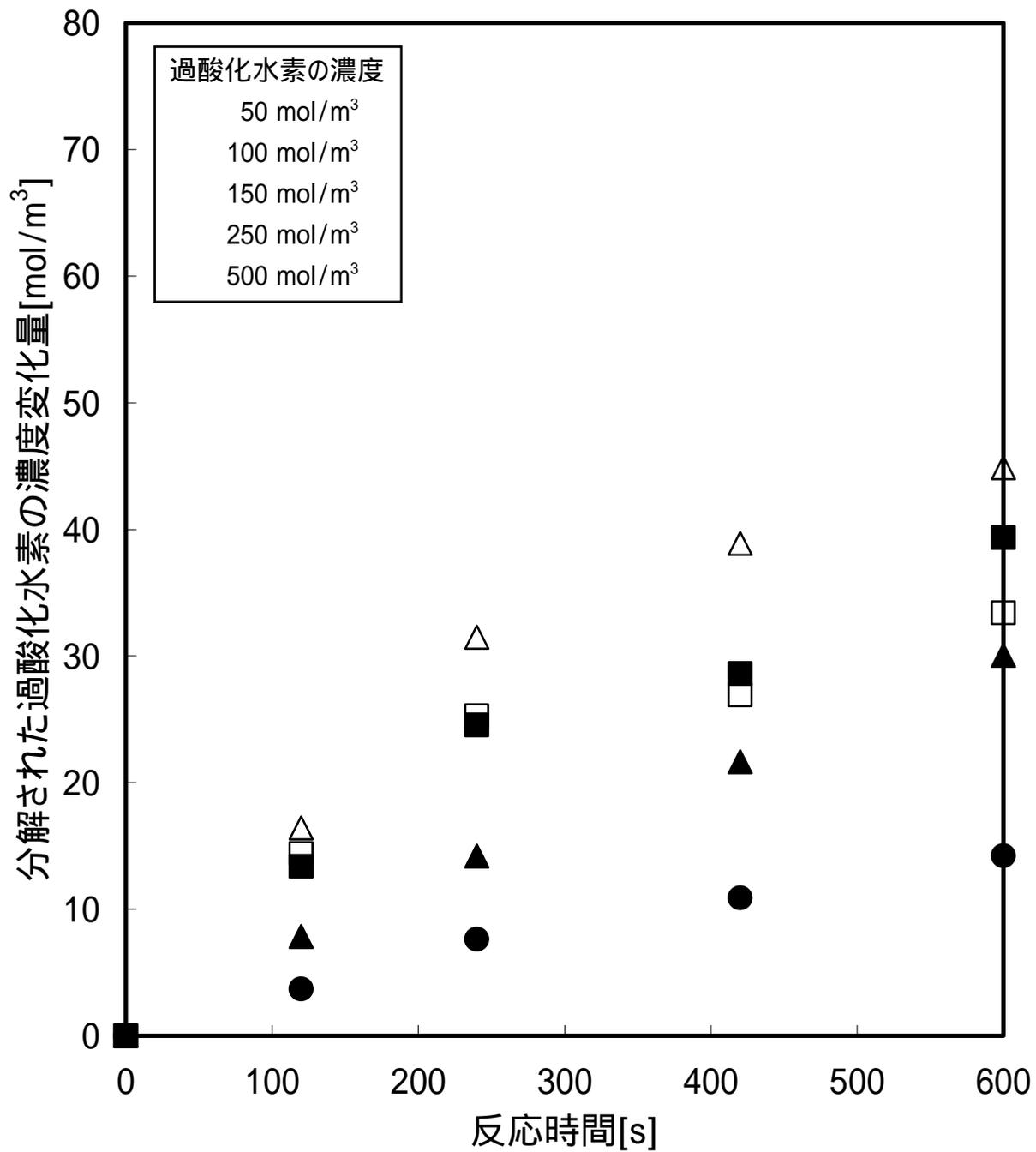


図 46. 過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC) (45)

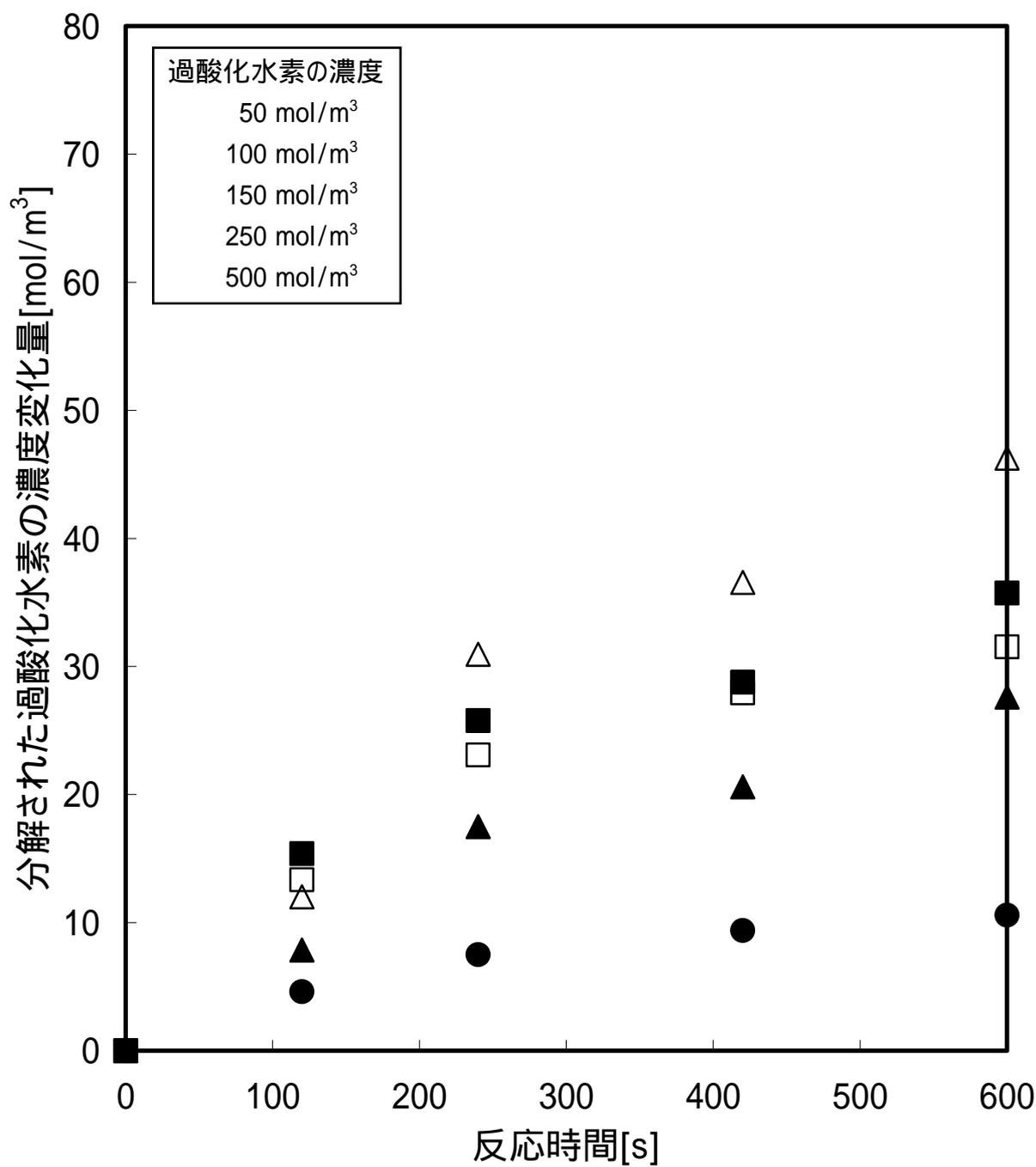


図 47.過酸化水素分解反応の経時変化

(PEC) (50)

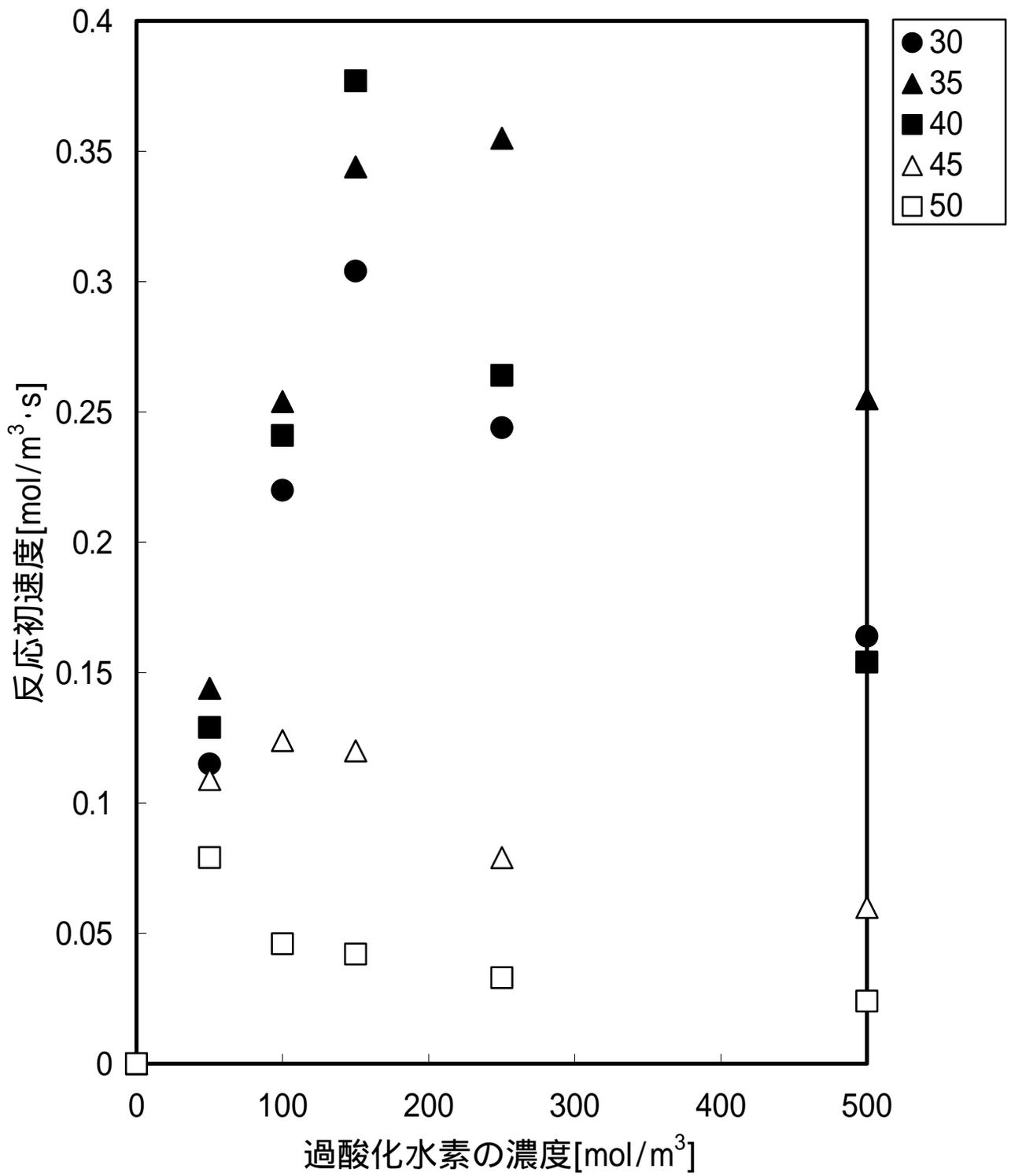


図 48. 過酸化水素濃度と反応初速度との関係
(遊離酵素)

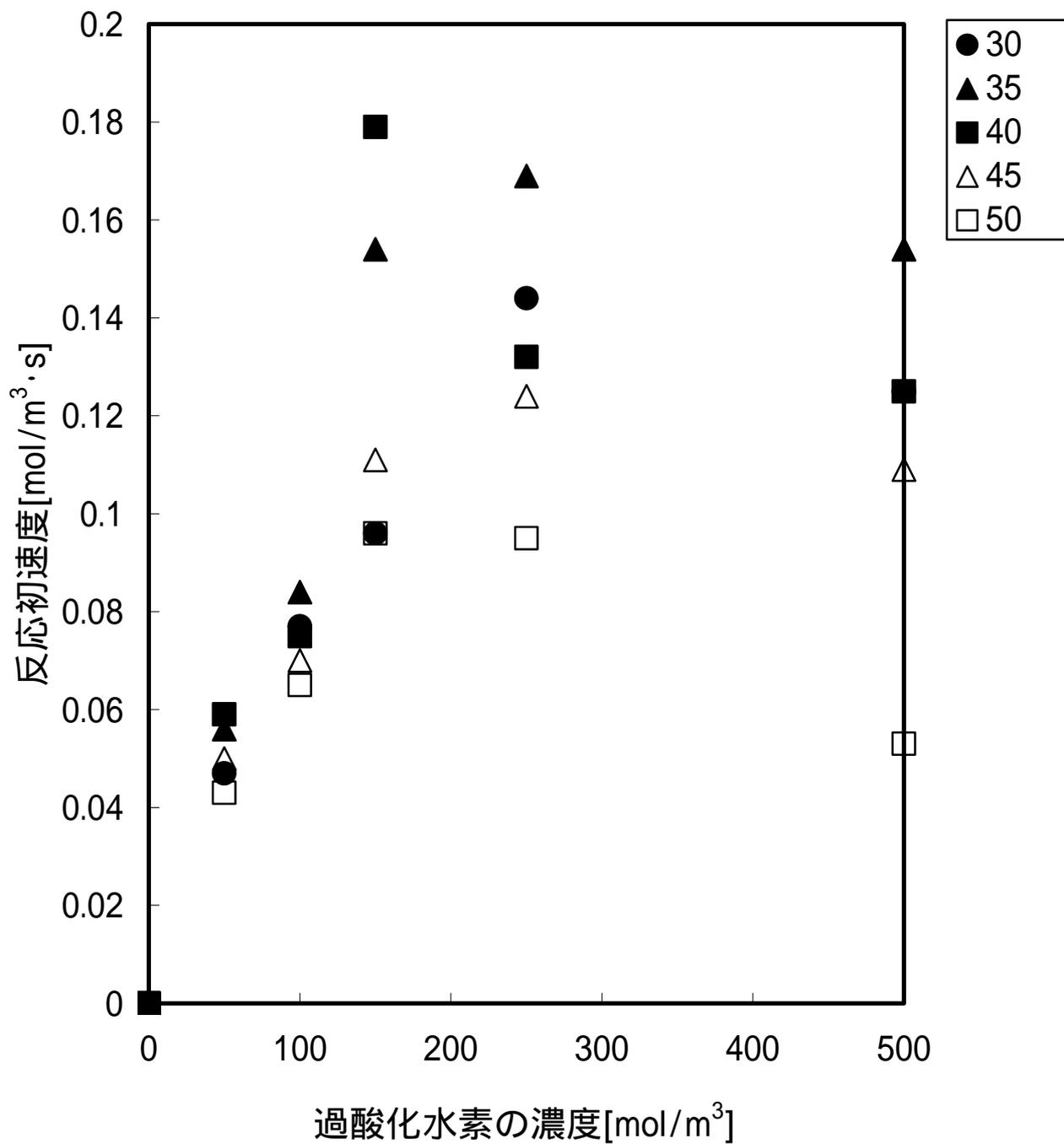


図 49.過酸化水素濃度と反応初速度との関係
(PEC)

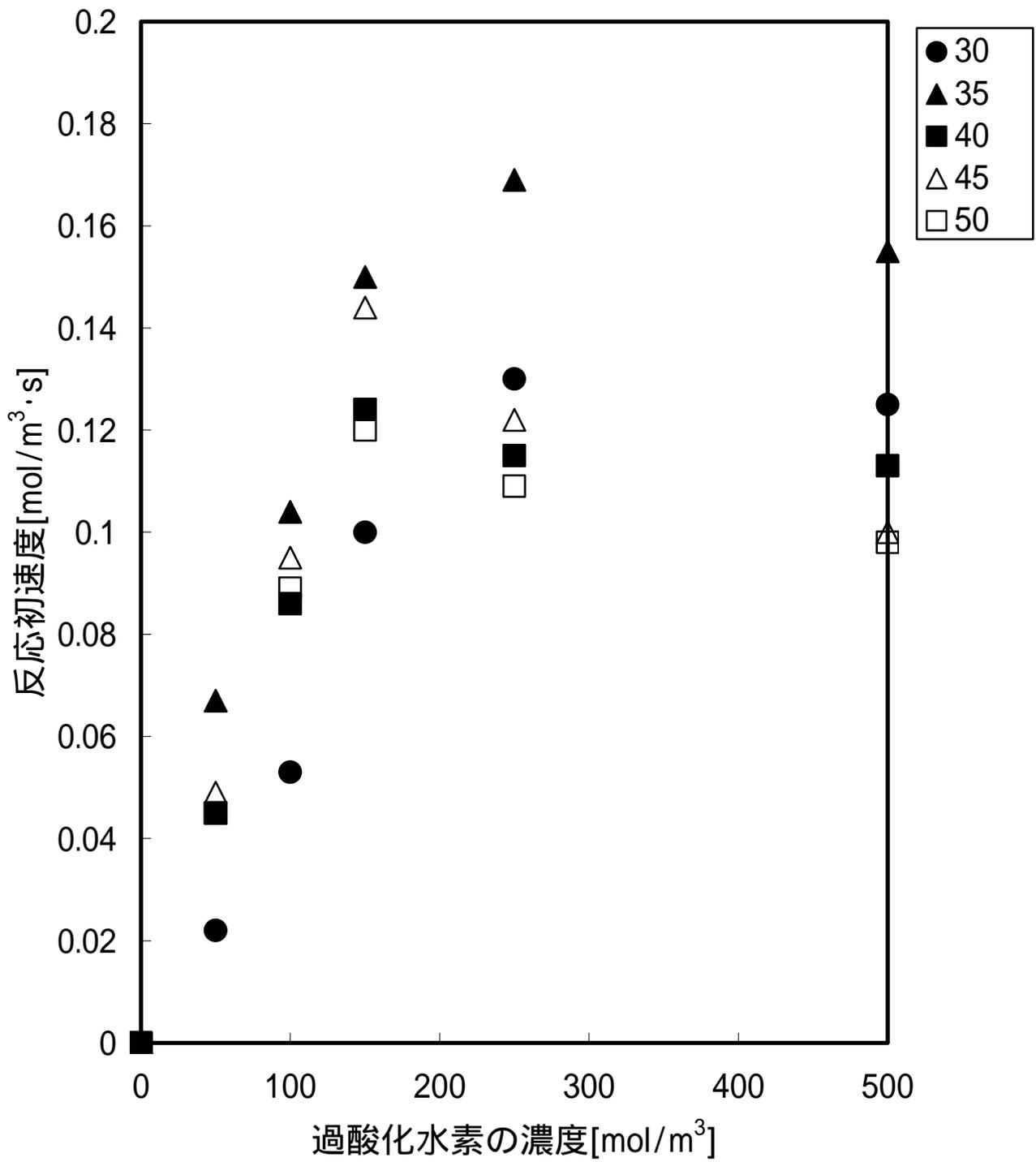


図 50.過酸化水素濃度と反応初速度との関係
(PEC)

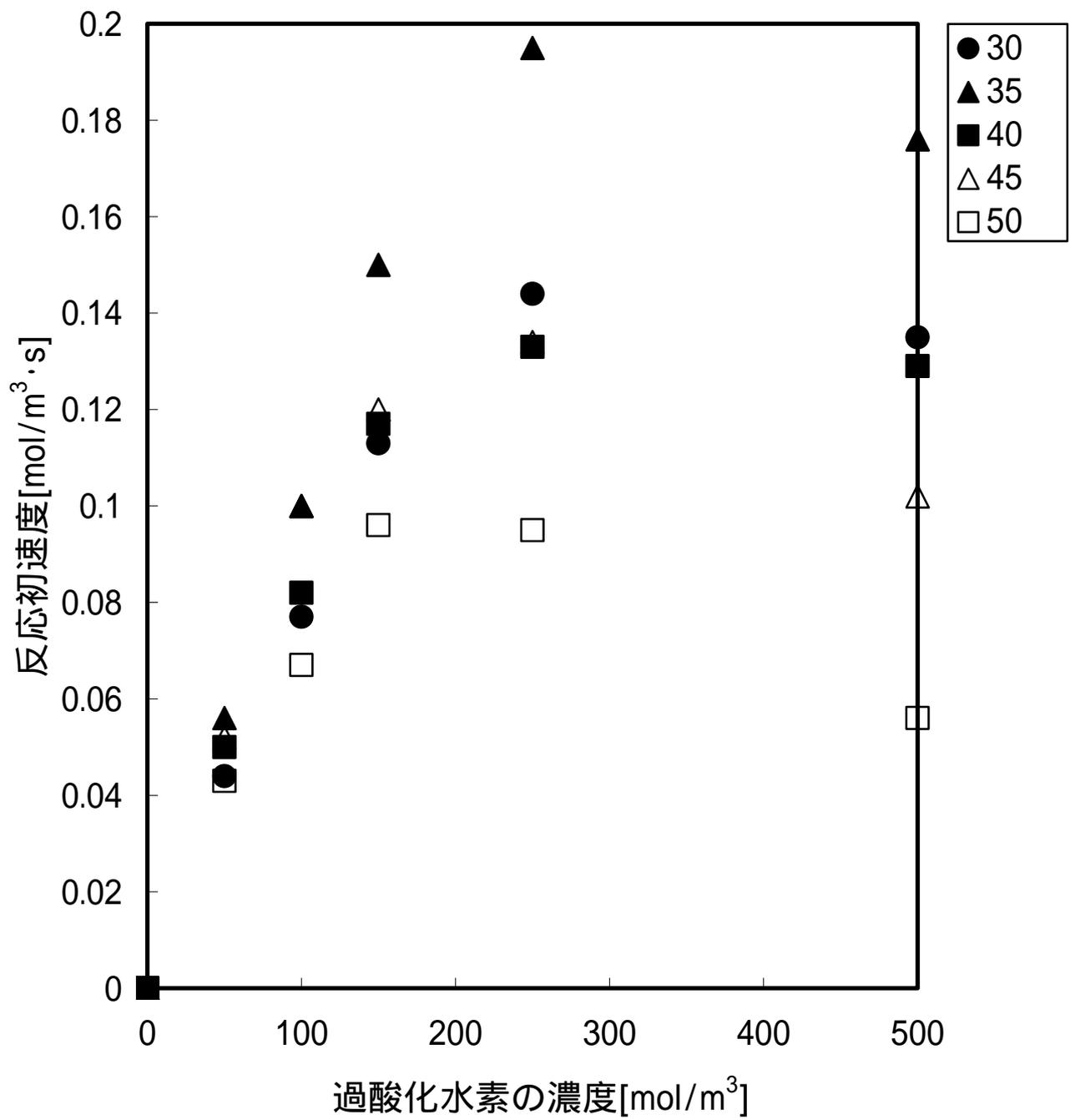


図 51. 過酸化水素濃度と反応初速度との関係
(PEC)

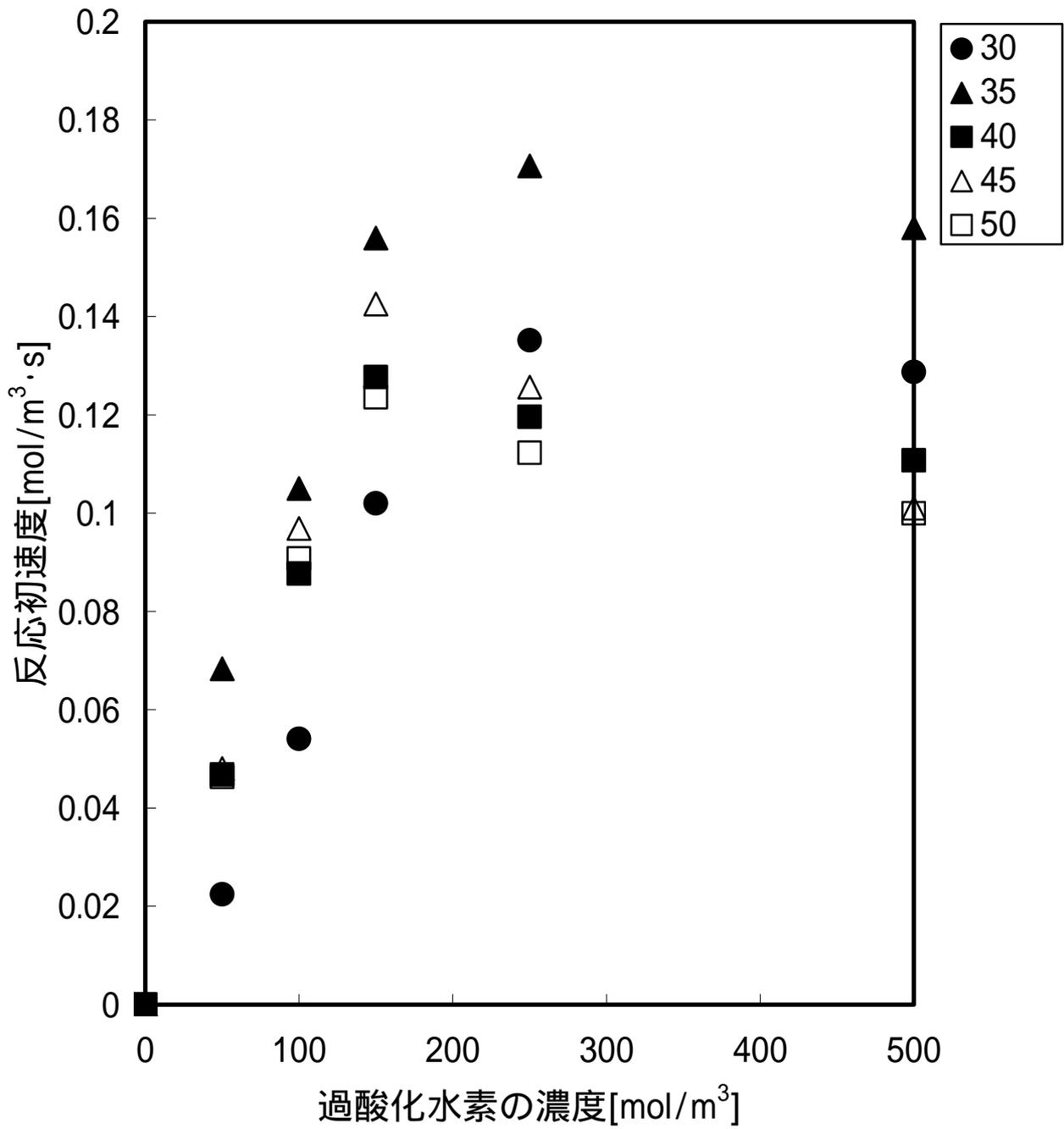


図 52. 過酸化水素濃度と反応初速度との関係
(PEC)

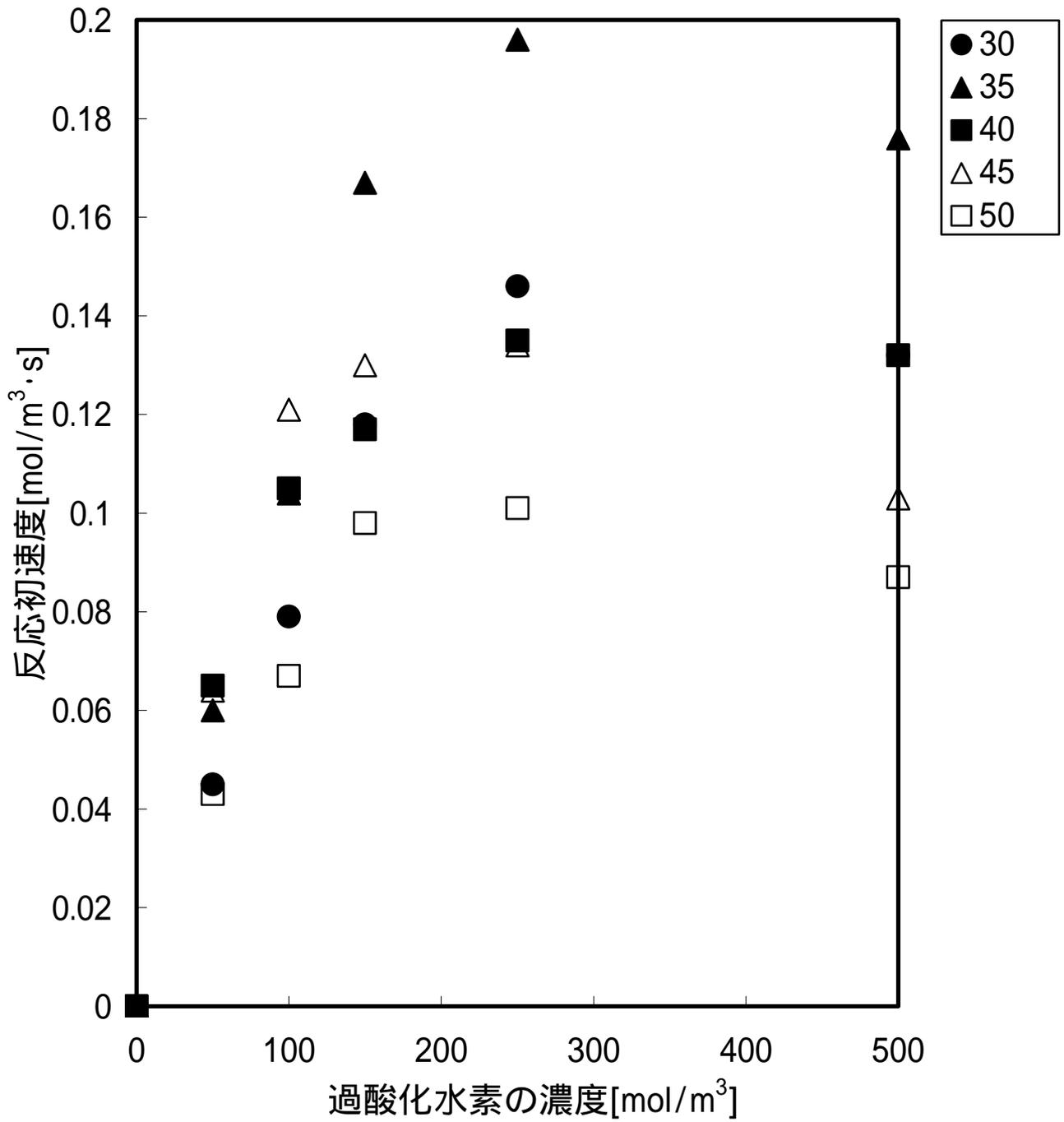


図 53.過酸化水素濃度と反応初速度との関係
(PEC)

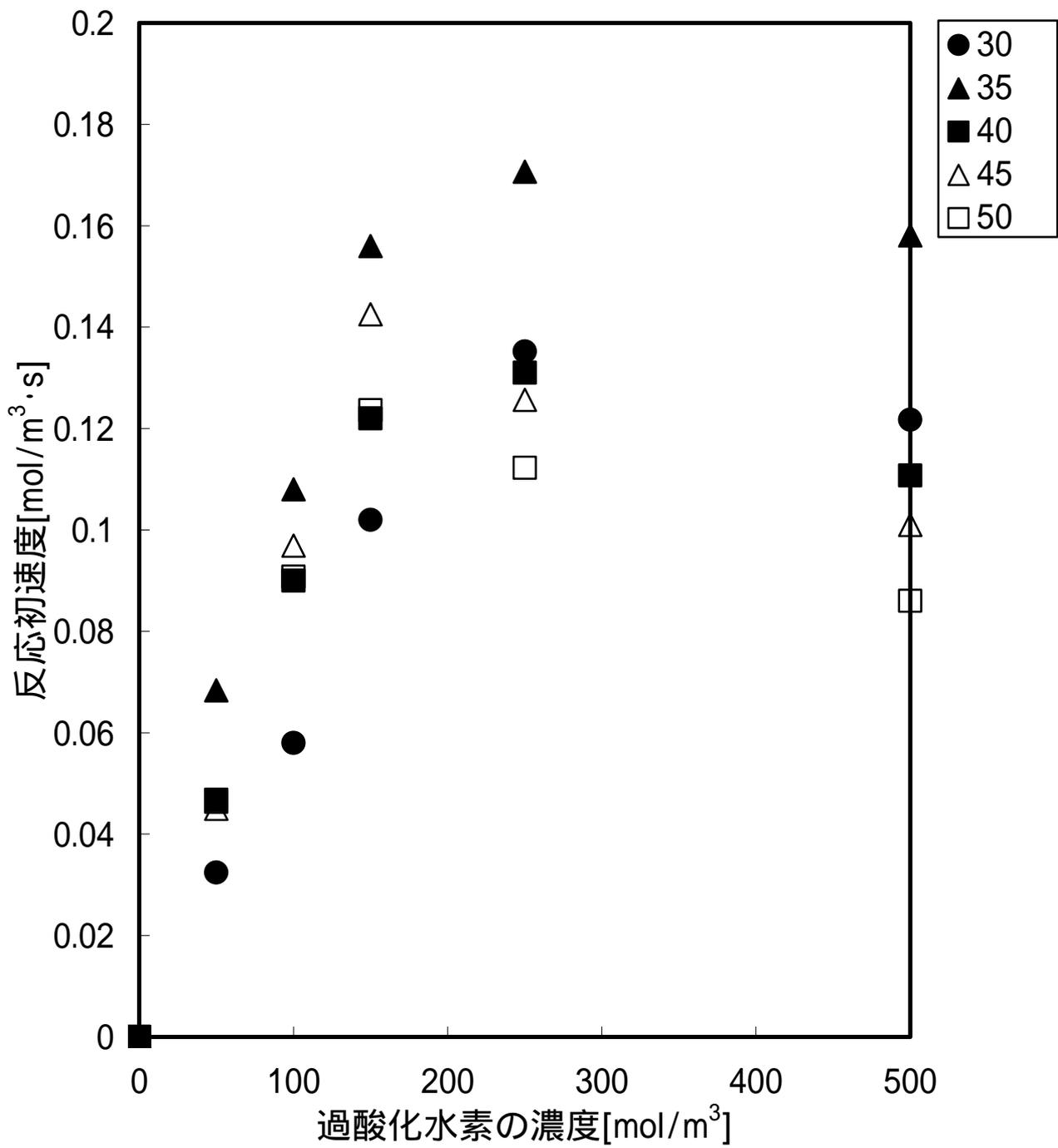


図 54.過酸化水素濃度と反応初速度との関係

(PEC)

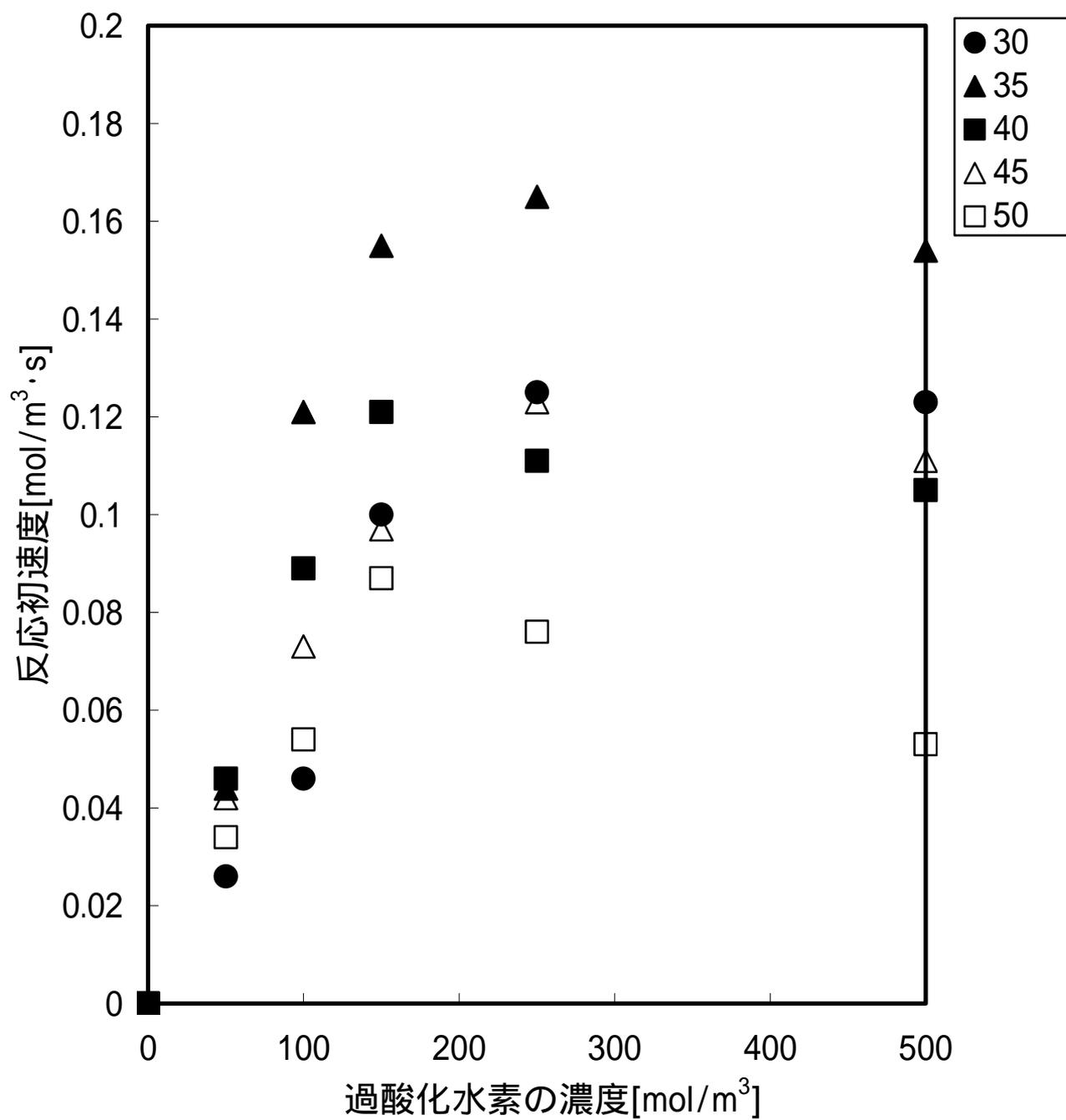


図 55.過酸化水素濃度と反応初速度との関係
(PEC)

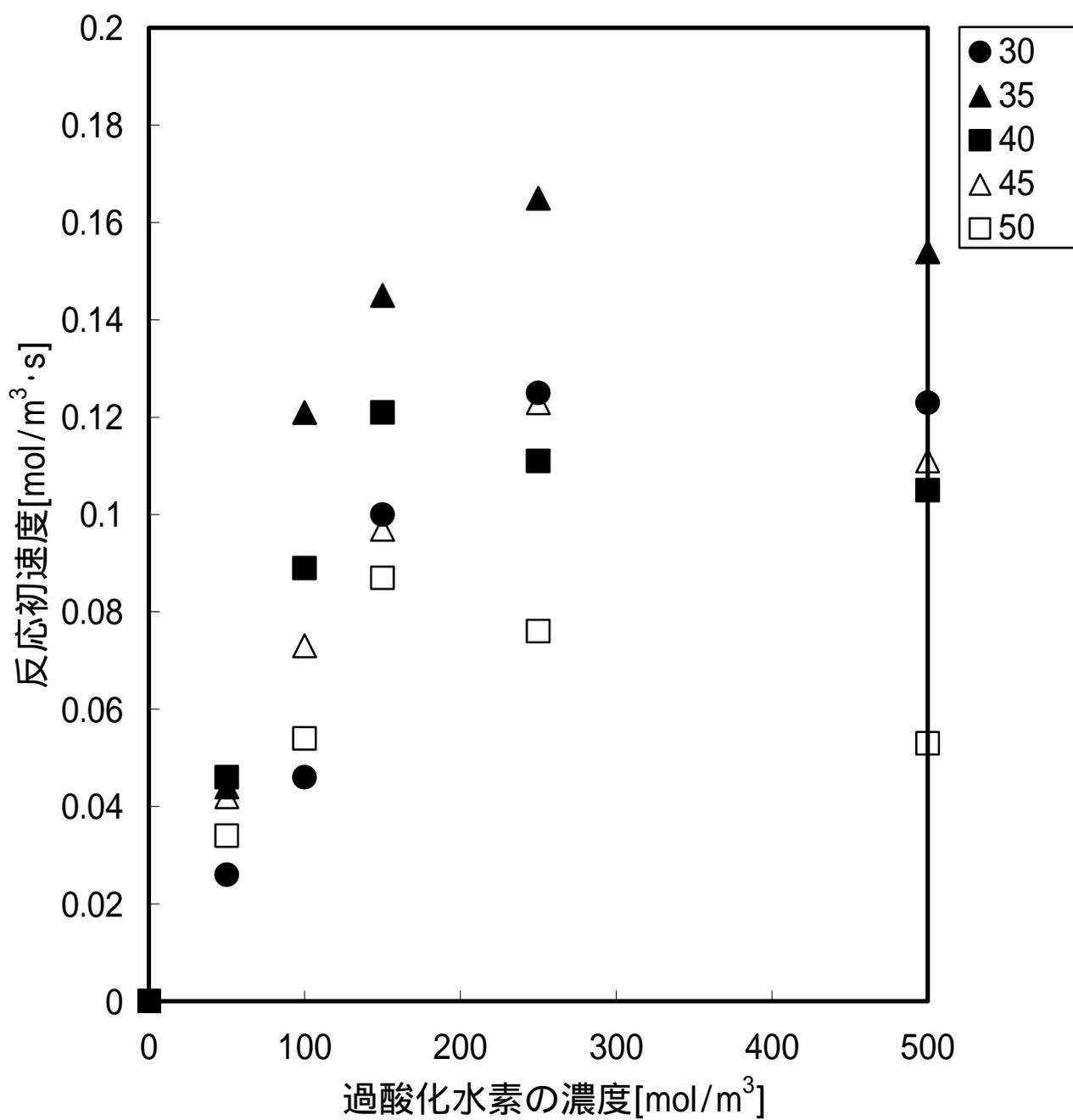


図 56. 過酸化水素濃度と反応初速度との関係
(PEC)

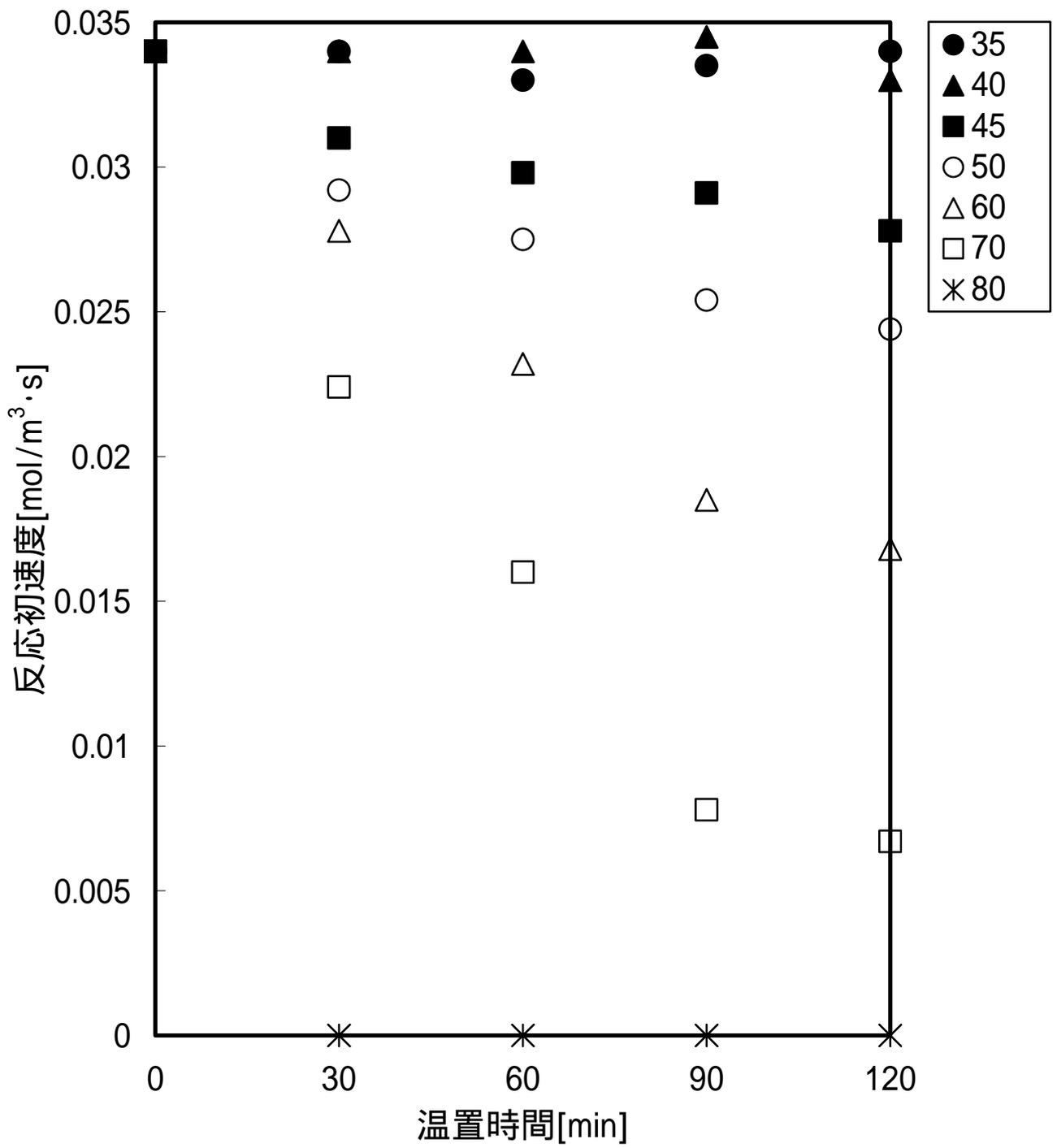


図 57.熱安定性
(遊離酵素)

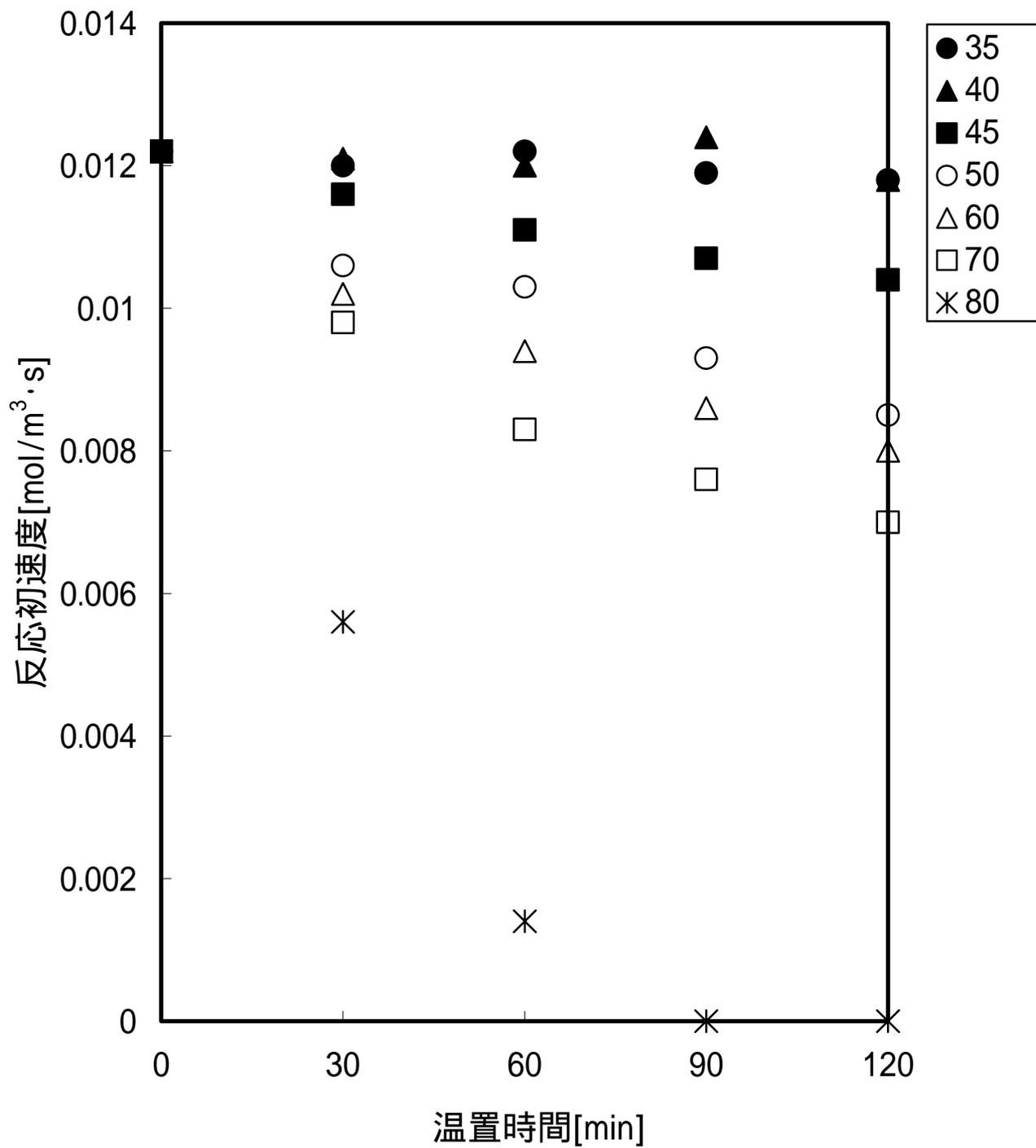


図 58.熱安定性
(PEC)

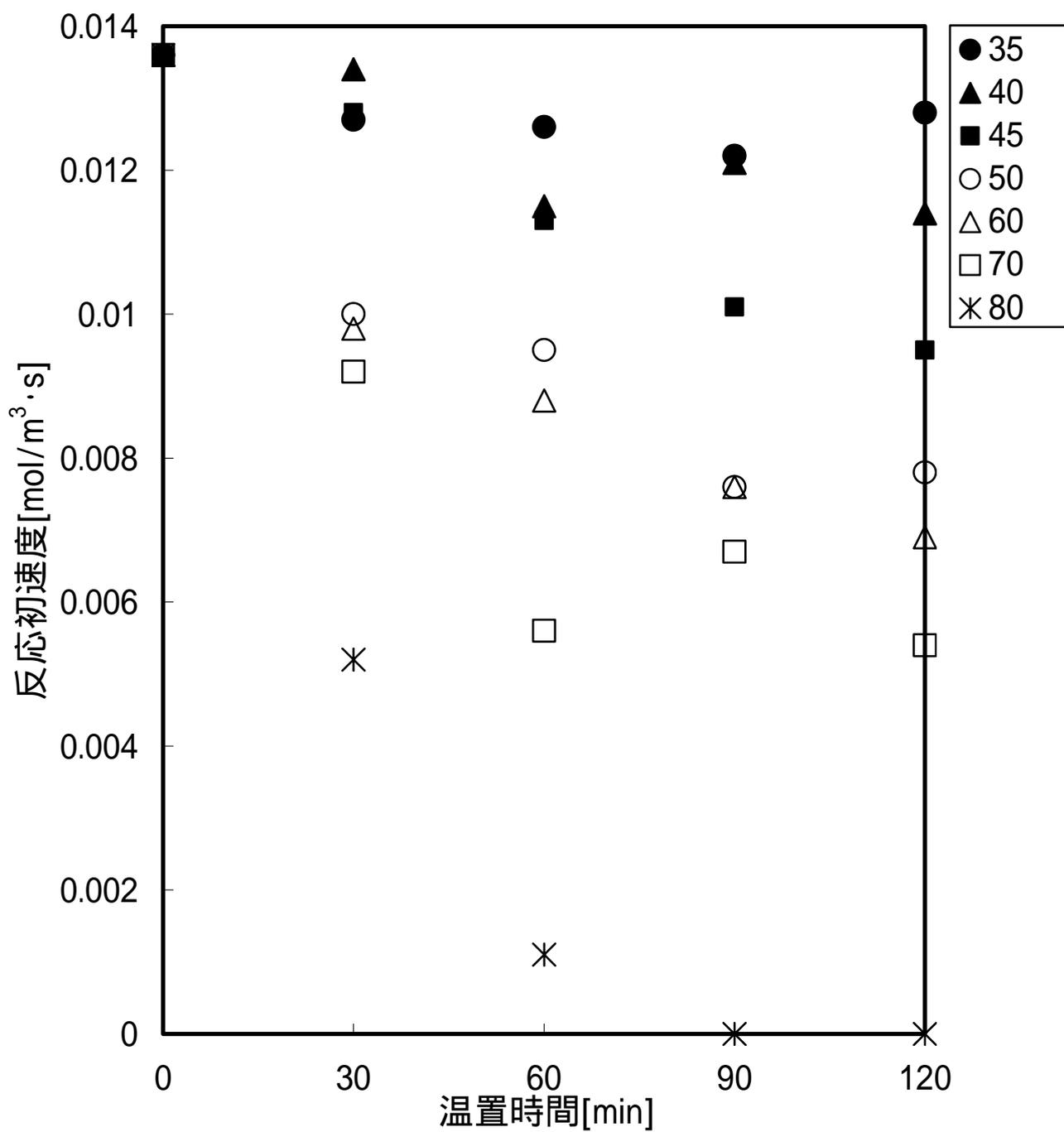


図 59.熱安定性
(PEC)

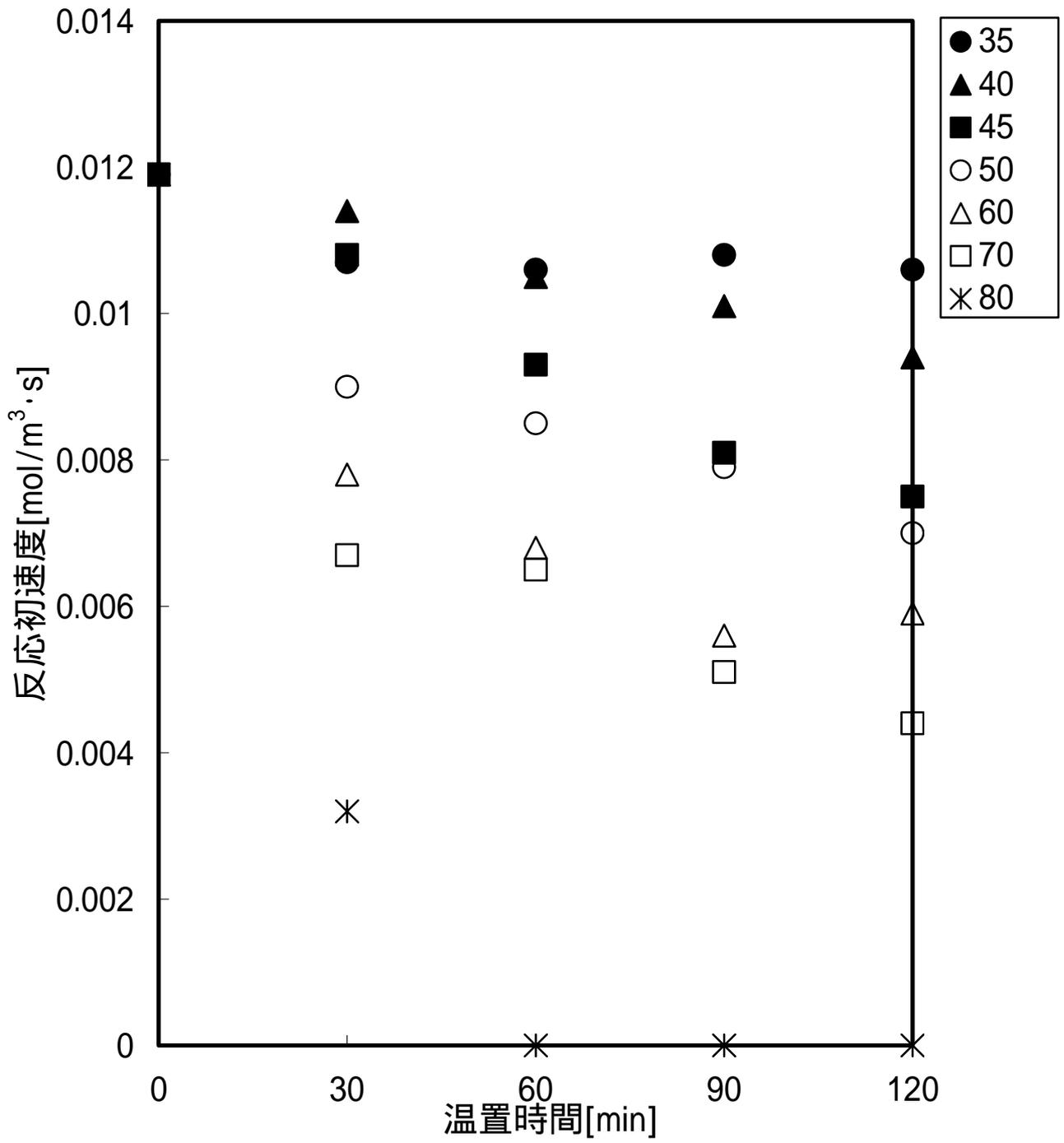


図 60.熱安定性
(PEC)

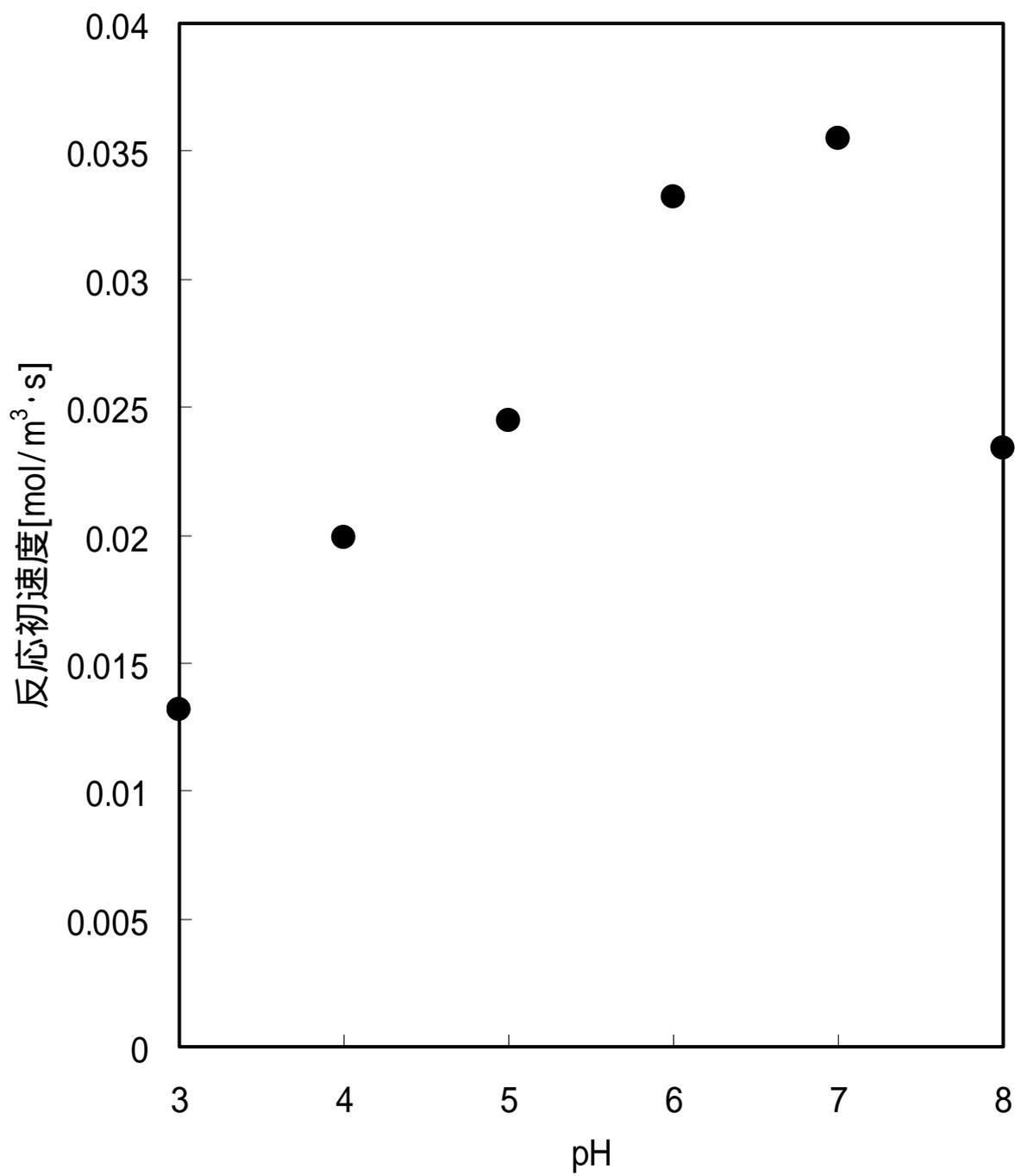


図 61.pH 安定性
(遊離酵素)

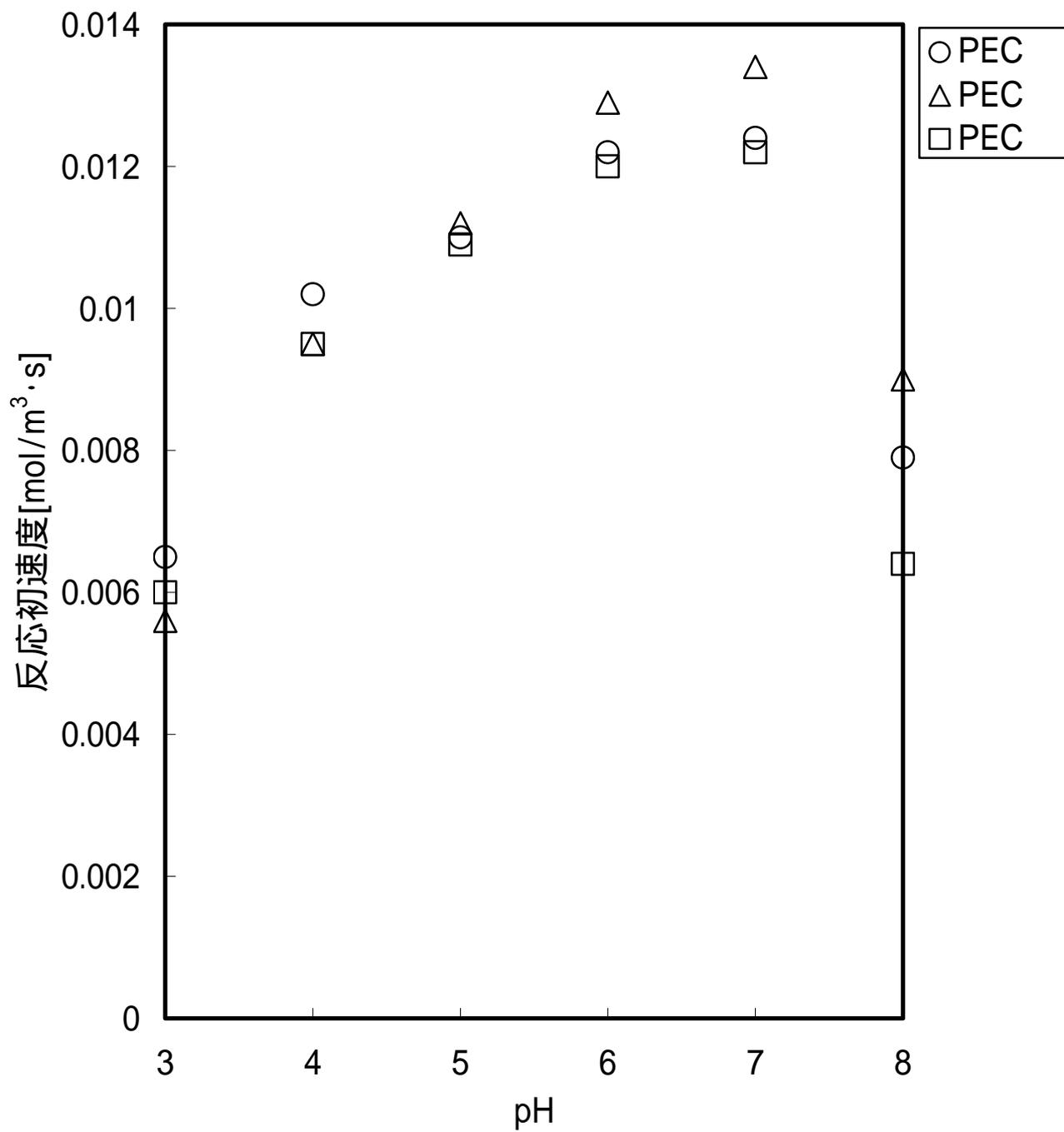


図 62.pH 安定性
(PEC)

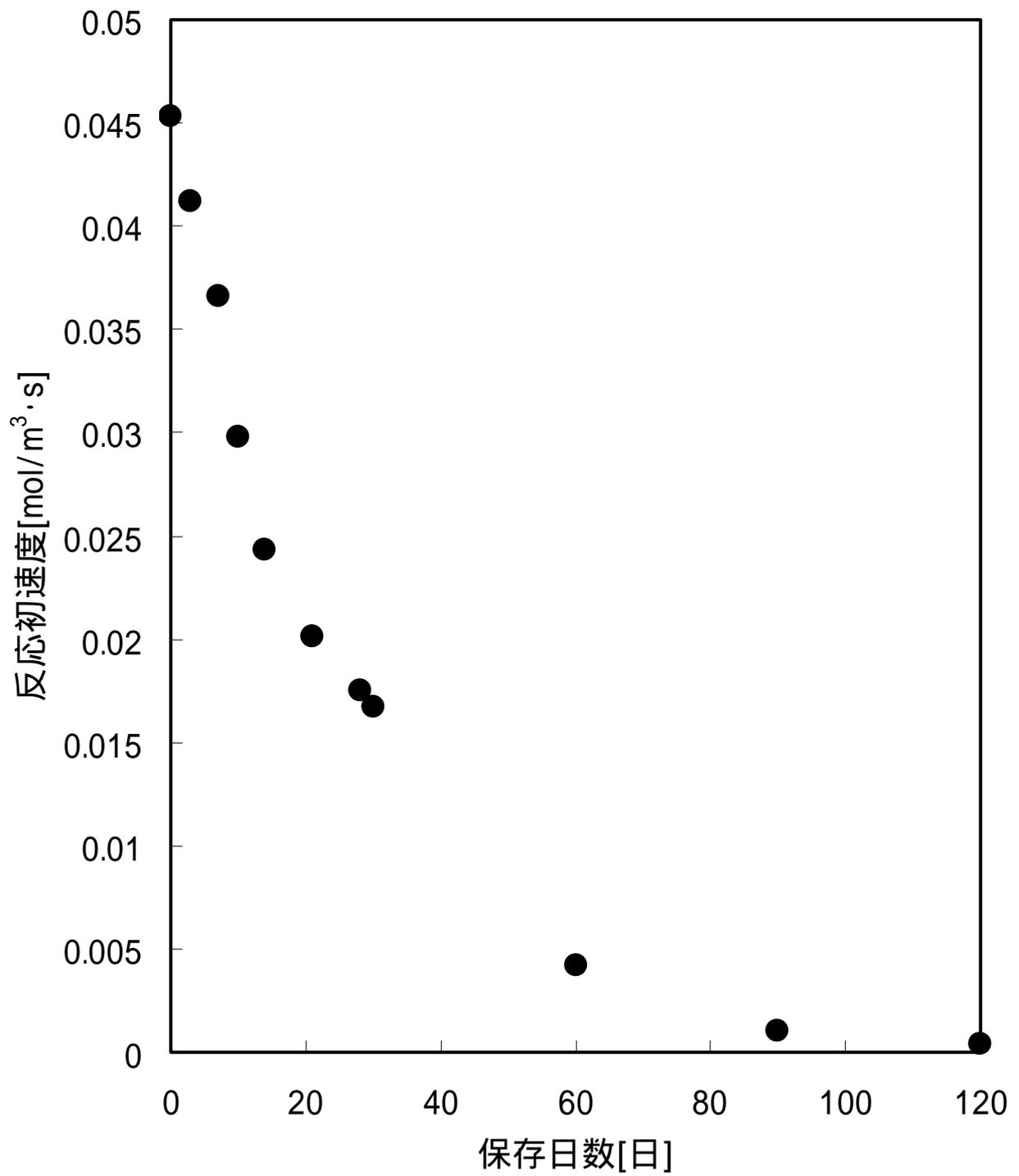


図 63.保存安定性
(遊離酵素)

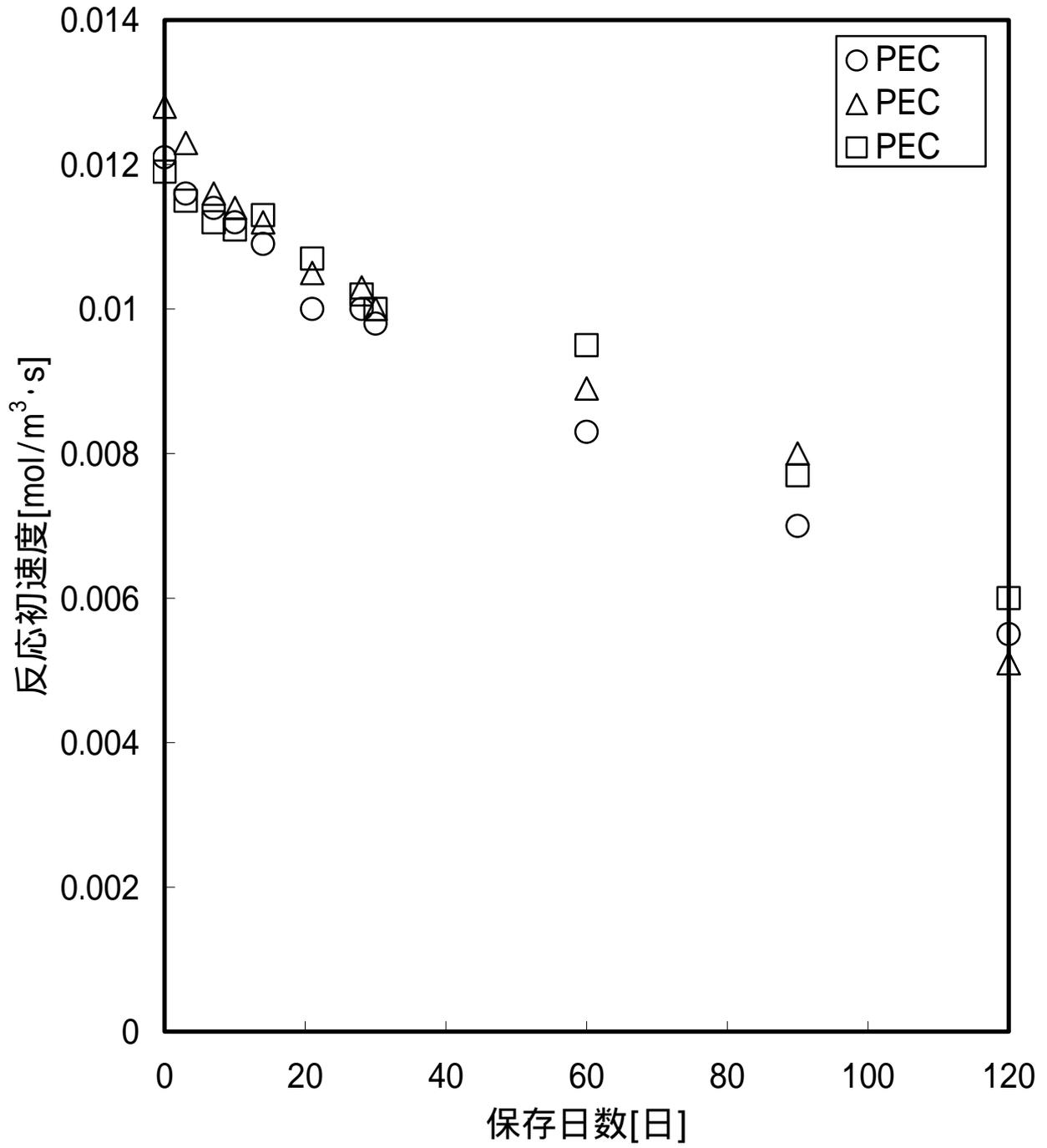


图 64.保存安定性
(PEC)

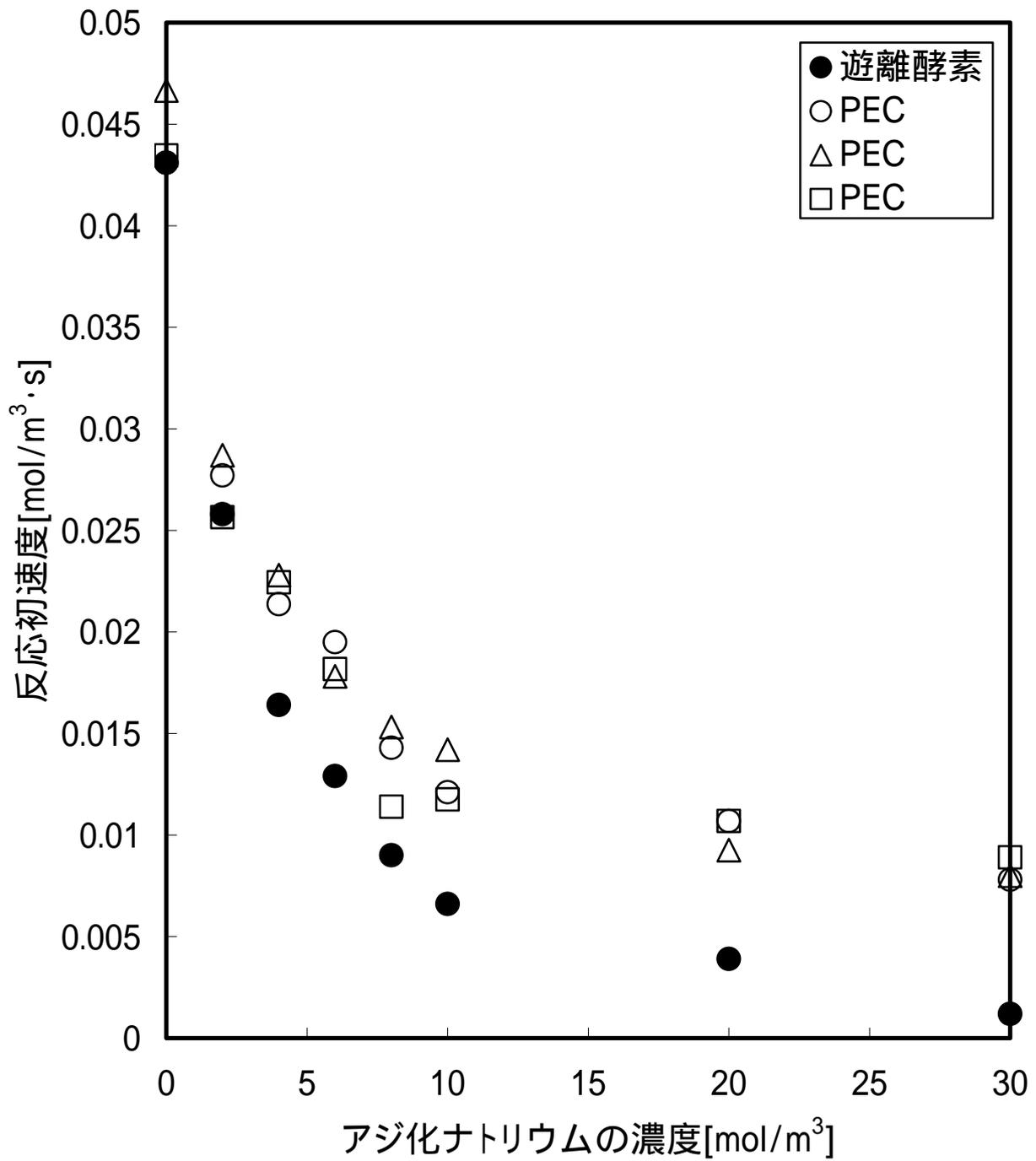


図 65. アジ化ナトリウムによる阻害の影響
(過酸化水素濃度=20mol/m³ · s)

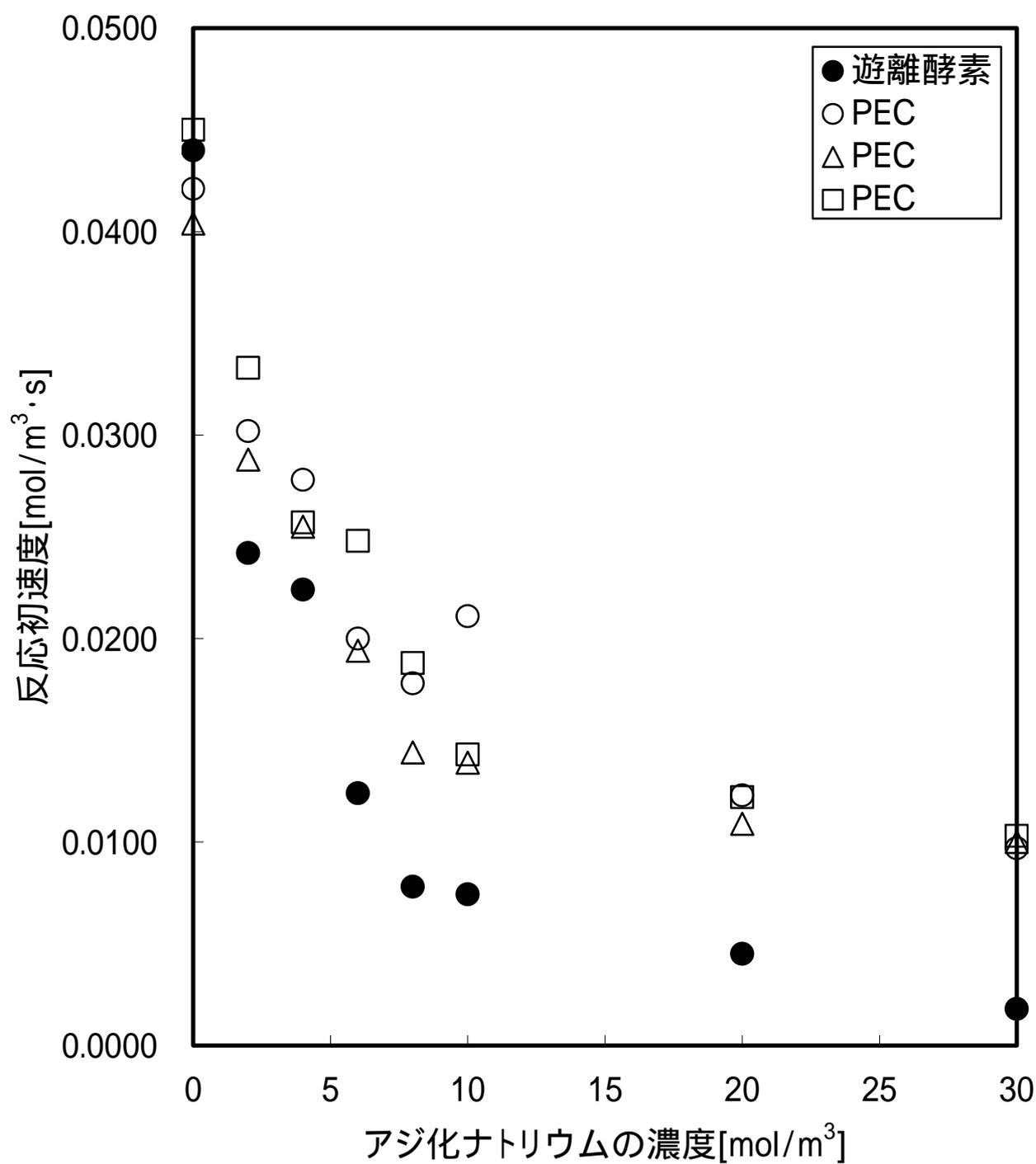


図 66. アジ化ナトリウムによる阻害の影響

(過酸化水素濃度=200mol/m³·s)

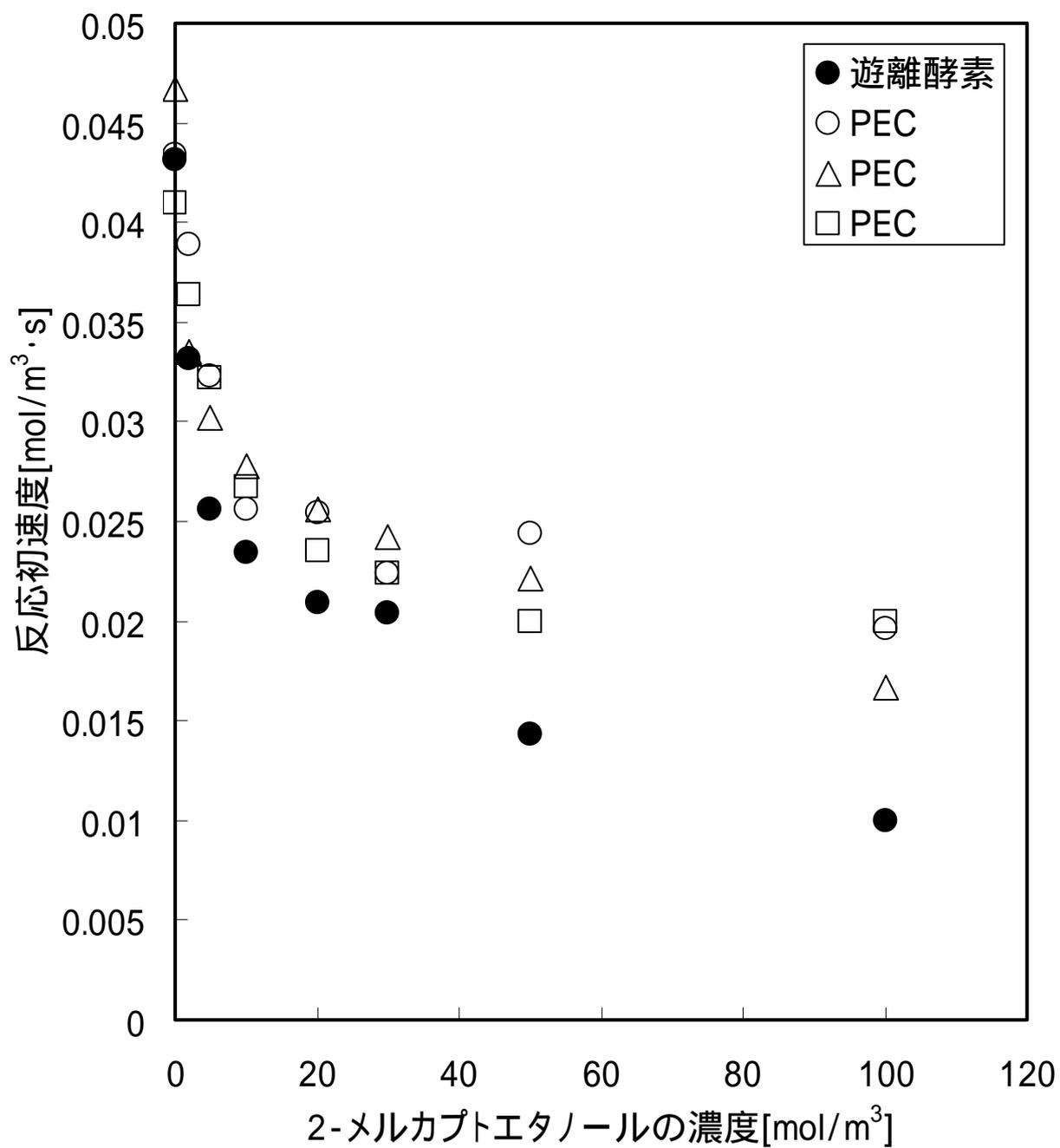


図 67. 2-メルカプトエタノールによる阻害の影響

(過酸化水素濃度= $20\text{mol/m}^3 \cdot \text{s}$)

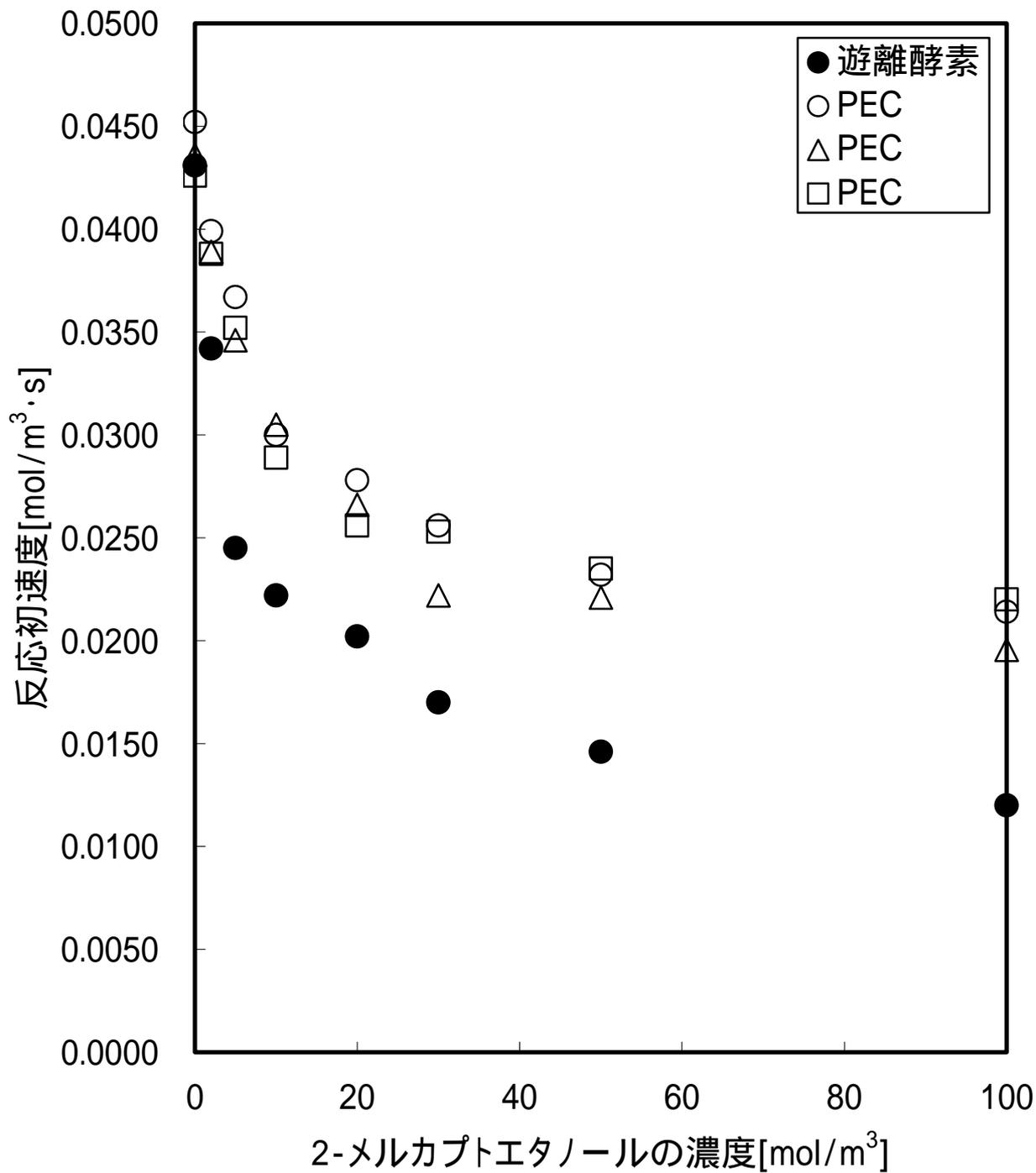


図 68. 2-メルカプトエタノールによる阻害の影響

(過酸化水素濃度=200mol/m³ · s)

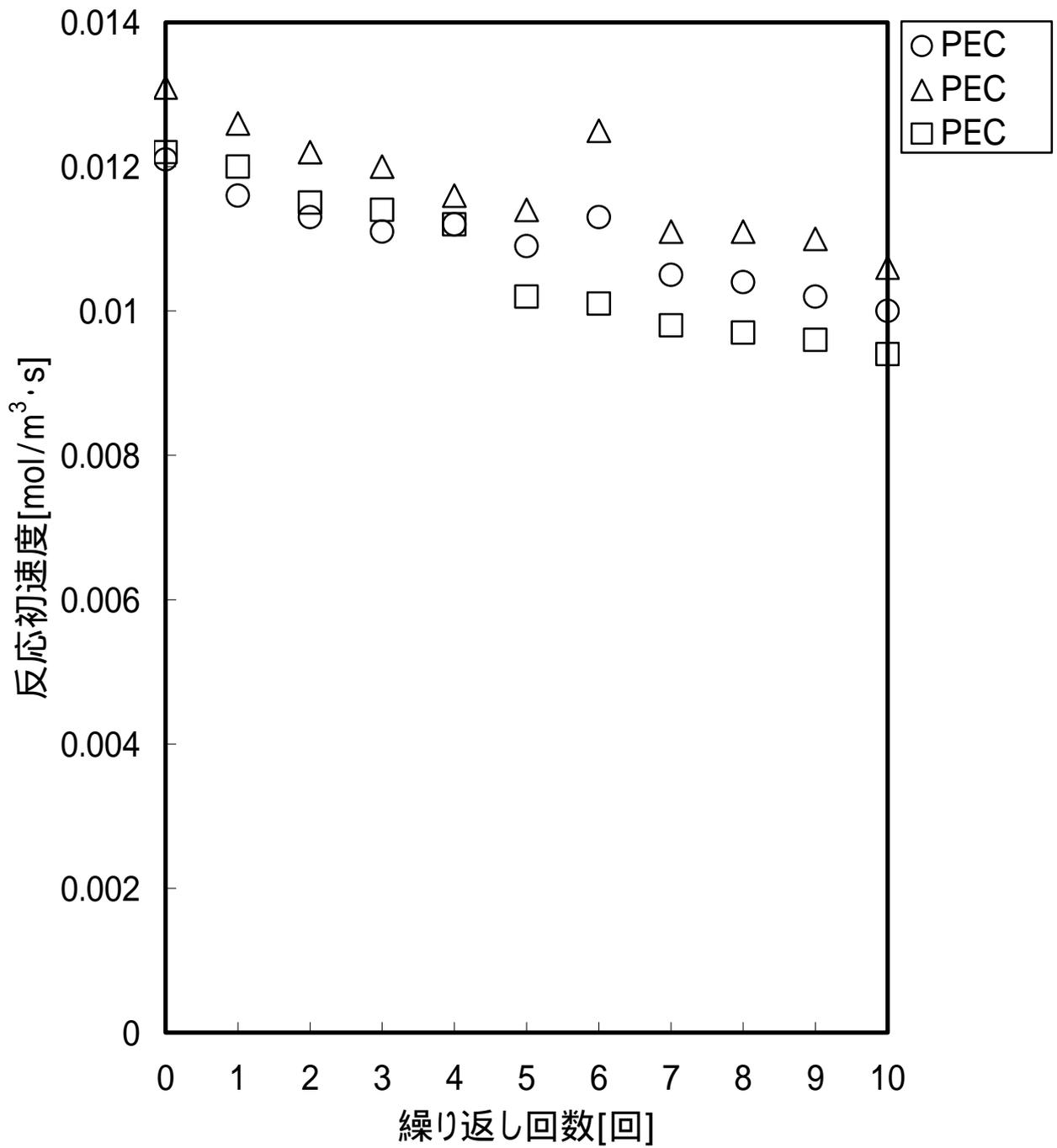


図 69.繰り返し実験

(過酸化水素濃度=20mol/m³·s)

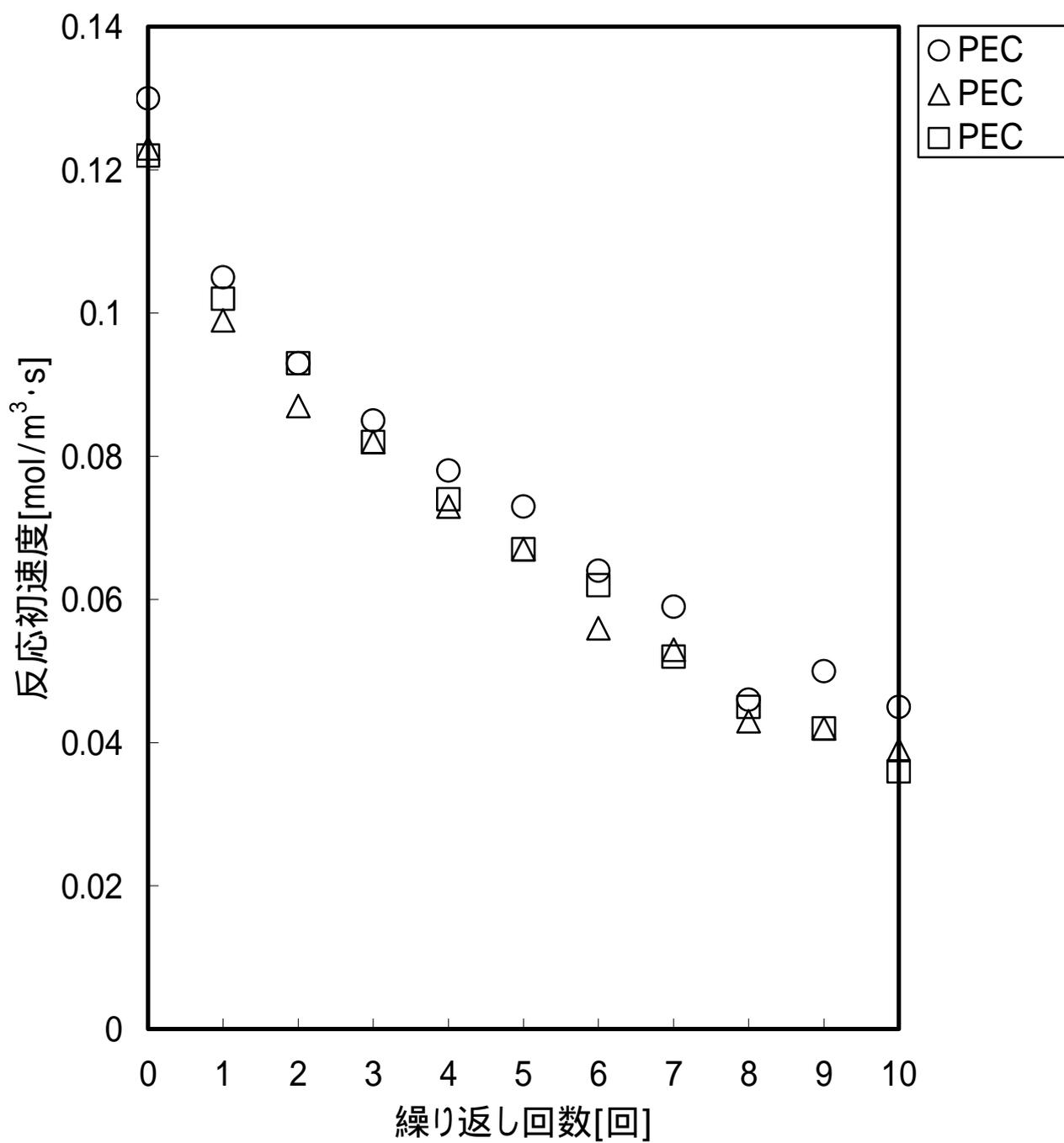


図 70.繰り返し実験

(過酸化水素濃度=200mol/m³ · s)

図2.漏出実験

PEC	時間[h]				
	1	2	3	4	5
PEC	22.2	24.2	25.0	25.6	26.0
PEC	20.0	20.4	22.2	22.3	25.0
PEC	22.0	22.4	24.5	25.3	25.9
PEC	22.9	23.6	25.1	25.2	27.1
PEC	24.1	24.5	25.1	25.6	26.2
PEC	22.7	24.6	25.8	27.4	30.1
PEC	25.7	26.4	27.0	27.1	27.0
PEC	24.2	24.6	25.6	26.7	27.0

図3.過酸化水素分解反応の経時変化(遊離酵素)(30)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	10.21	24.55	29.78	37.42
100	0	22.52	40.92	55.66	68.39
150	0	40.75	73.55	91.52	99.45
250	0	46.78	65.89	73.89	78.66
500	0	26.67	48.76	53.72	58.83

図4.過酸化水素分解反応の経時変化(遊離酵素)(35)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	12.64	27.54	34.28	42.52
100	0	26.79	48.69	66.23	81.38
150	0	50.75	89.55	101.52	112.45
250	0	52.38	79.56	100.52	119.64
500	0	28.86	56.42	64.31	67.98

図5.過酸化水素分解反応の経時変化(遊離酵素)(40)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	11.38	24.79	30.85	38.27
100	0	22.11	45.82	65.61	77.24
150	0	45.68	80.60	91.37	101.21
250	0	37.14	61.60	70.47	73.68
500	0	28.97	44.58	53.88	56.88

図6.過酸化水素分解反応の経時変化(遊離酵素)(45)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	8.16	16.64	23.82	29.94
100	0	18.02	32.74	44.53	54.71
150	0	24.45	44.13	54.91	59.67
250	0	23.39	31.95	36.95	39.33
500	0	13.34	24.38	26.86	29.42

図7.過酸化水素分解反応の経時変化(遊離酵素)(50)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	5.61	13.50	16.38	20.58
100	0	12.39	22.51	30.61	37.61
150	0	21.38	34.78	45.76	49.73
250	0	21.01	30.95	33.56	36.26
500	0	12.34	20.08	23.94	24.54

図8.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (30)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	3.57	8.10	10.72	14.97
100	0	7.88	13.91	20.04	29.41
150	0	13.04	24.27	31.12	41.77
250	0	25.73	39.53	46.55	52.06
500	0	14.94	30.72	35.53	40.12

図9.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (35)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	4.42	9.09	12.34	17.01
100	0	9.38	16.55	23.84	34.99
150	0	16.24	29.55	34.52	47.23
250	0	23.57	39.78	53.28	60.78
500	0	13.85	30.47	35.37	40.79

図10.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (40)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	4.32	9.42	12.34	16.46
100	0	9.07	16.95	25.59	35.53
150	0	15.99	27.01	33.81	45.54
250	0	19.83	38.65	49.46	56.42
500	0	14.78	29.41	33.25	39.84

図11.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (45)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	3.89	8.12	11.11	14.81
100	0	8.16	15.26	23.03	31.98
150	0	14.39	26.11	30.43	40.99
250	0	17.85	32.79	40.52	48.77
500	0	15.30	27.47	29.25	35.52

図12.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (50)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	4.61	7.50	9.38	10.58
100	0	7.86	17.51	20.61	27.61
150	0	13.38	25.78	28.76	35.73
250	0	12.01	30.95	36.56	46.26
500	0	13.34	23.08	27.94	31.54

図13.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (30)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	3.61	8.43	10.83	14.67
100	0	8.12	14.47	19.64	30.58
150	0	14.08	24.27	32.05	41.94
250	0	26.24	41.12	45.62	53.10
500	0	14.99	31.64	36.24	38.92

図14.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (35)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	4.56	9.18	12.46	16.67
100	0	9.66	16.72	23.37	36.04
150	0	16.56	28.66	35.55	47.82
250	0	24.04	41.77	53.81	59.57
500	0	13.91	29.86	36.08	41.20

図15.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (40)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	4.41	9.51	12.46	18.10
100	0	9.43	16.61	27.63	35.53
150	0	15.99	27.26	34.82	47.36
250	0	20.22	39.42	51.44	55.29
500	0	15.07	29.27	34.25	40.63

図16.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (45)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	3.97	8.20	11.22	16.29
100	0	8.32	15.87	22.57	32.94
150	0	14.45	26.90	30.55	42.63
250	0	18.20	32.13	41.33	47.80
500	0	15.61	29.67	29.54	36.23

図17.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (50)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	4.75	7.58	9.47	10.37
100	0	8.10	17.68	20.20	28.44
150	0	13.64	25.00	29.62	35.87
250	0	12.25	32.49	36.41	45.33
500	0	12.88	22.62	28.50	31.50

図18.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (30)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	3.75	8.26	11.04	15.42
100	0	8.12	13.52	21.24	30.00
150	0	13.17	25.28	33.29	42.57
250	0	23.27	41.11	48.41	54.14
500	0	15.38	32.25	36.24	40.52

図19.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (35)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	4.97	9.27	13.22	18.04
100	0	10.44	17.91	26.79	36.41
150	0	16.57	33.83	39.52	49.14
250	0	26.73	40.58	59.86	65.74
500	0	15.86	34.23	40.50	41.61

図20.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (40)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	4.54	9.80	12.71	16.95
100	0	9.34	17.12	25.84	37.66
150	0	16.15	29.64	35.50	47.36
250	0	21.02	40.53	50.46	56.98
500	0	15.22	30.88	33.91	41.43

図21.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (45)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	4.12	8.20	11.55	16.55
100	0	8.65	15.56	24.41	32.62
150	0	15.25	27.16	32.25	43.04
250	0	22.02	35.41	40.35	50.24
500	0	16.37	28.57	30.13	35.88

図22.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (50)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	4.89	7.58	9.75	10.90
100	0	8.33	18.21	21.85	28.17
150	0	13.51	27.84	33.77	36.44
250	0	16.85	31.25	38.75	48.11
500	0	14.27	24.46	29.90	31.85

図23.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (30)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	3.57	8.10	10.72	14.97
100	0	7.88	13.91	20.04	29.41
150	0	13.04	24.27	31.12	41.77
250	0	25.73	39.53	46.55	52.06
500	0	14.94	30.72	35.53	40.12

図24.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (35)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	4.60	9.82	12.96	18.20
100	0	9.85	17.71	25.99	36.39
150	0	17.38	31.03	37.28	50.54
250	0	25.22	42.17	54.00	60.82
500	0	14.96	32.90	36.79	42.83

図25.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (40)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	4.96	9.89	12.96	17.94
100	0	9.79	16.14	27.12	36.95
150	0	17.43	29.05	36.51	46.45
250	0	21.22	41.74	49.92	62.24
500	0	15.66	31.76	34.25	41.83

図26.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (45)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	4.05	8.77	11.66	15.85
100	0	8.57	16.33	25.10	33.26
150	0	15.39	26.37	32.86	43.86
250	0	19.09	34.75	43.35	51.21
500	0	16.52	29.67	34.42	37.30

図27.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (50)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	4.79	8.10	9.85	11.32
100	0	8.25	18.73	22.47	28.72
150	0	14.31	27.06	31.06	38.23
250	0	17.85	32.80	39.11	48.57
500	0	14.40	24.93	29.06	33.11

図28.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (30)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	3.90	8.91	11.47	16.91
100	0	8.83	15.44	21.84	32.64
150	0	13.82	26.70	33.61	40.95
250	0	27.79	41.12	50.27	56.23
500	0	15.68	33.48	39.08	42.93

図29.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (35)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	5.96	9.82	13.20	19.22
100	0	10.22	18.21	25.99	38.84
150	0	17.21	32.21	40.66	52.42
250	0	26.40	42.96	56.47	66.86
500	0	14.68	33.51	37.85	43.64

図30.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (40)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	4.96	11.47	13.20	21.59
100	0	9.88	20.25	27.89	43.44
150	0	16.95	33.45	46.86	54.55
250	0	22.21	45.74	54.43	68.06
500	0	15.66	34.35	35.58	46.62

図31.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (45)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	4.24	8.93	11.88	16.73
100	0	9.14	18.94	25.10	33.50
150	0	15.25	28.72	32.86	45.09
250	0	19.27	38.10	43.76	50.68
500	0	16.06	29.94	32.17	38.01

図32.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (50)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	5.02	8.25	10.04	11.96
100	0	8.80	19.43	22.47	30.65
150	0	17.18	24.35	31.06	39.30
250	0	12.97	32.18	39.48	49.96
500	0	14.00	25.16	30.73	33.74

図33.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (30)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	3.72	8.42	10.74	15.98
100	0	8.34	14.32	21.03	29.97
150	0	12.94	25.71	32.67	38.33
250	0	25.51	39.22	47.51	53.64
500	0	14.96	31.34	36.93	40.18

図34.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (35)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	4.79	9.28	12.36	18.16
100	0	9.66	16.88	25.03	32.06
150	0	16.11	28.32	36.82	46.37
250	0	24.23	40.99	53.37	59.29
500	0	14.01	31.37	35.76	40.85

図35.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (40)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	4.78	10.96	14.32	20.44
100	0	9.17	19.16	26.90	40.32
150	0	16.50	32.57	46.06	52.12
250	0	20.61	44.12	52.50	63.79
500	0	14.97	32.51	33.99	45.82

図36.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (45)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	4.56	8.63	11.37	15.70
100	0	8.66	17.94	24.71	32.67
150	0	14.73	28.28	36.04	43.14
250	0	18.26	37.15	43.07	49.42
500	0	15.67	28.65	30.49	36.37

図37.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (50)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	4.90	7.97	9.60	11.44
100	0	8.26	18.59	21.91	28.76
150	0	13.23	25.81	30.86	37.96
250	0	15.85	31.38	38.50	47.34
500	0	15.37	24.07	29.69	33.53

図38.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (30)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	3.50	6.94	10.08	14.82
100	0	7.65	13.36	21.64	29.70
150	0	13.17	23.54	31.43	38.35
250	0	24.24	35.32	40.62	48.02
500	0	14.49	30.41	36.24	40.52

図39.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (35)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	4.34	8.91	11.60	16.84
100	0	9.10	16.06	24.08	35.34
150	0	16.40	28.14	39.48	47.70
250	0	24.04	40.58	51.68	61.39
500	0	13.44	30.16	36.08	39.97

図40.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (40)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	4.24	9.23	11.60	16.29
100	0	8.79	16.45	25.84	35.89
150	0	16.15	27.55	32.79	46.00
250	0	20.22	39.42	47.98	56.98
500	0	14.33	29.12	33.91	39.04

図41.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (45)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	3.81	7.96	10.44	14.66
100	0	7.91	14.80	23.26	32.30
150	0	13.53	23.64	31.51	41.40
250	0	18.20	33.44	39.30	49.26
500	0	14.84	27.19	29.83	34.81

図42.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (50)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	4.52	7.35	8.82	10.48
100	0	7.62	16.81	20.20	27.89
150	0	13.51	23.00	29.05	35.37
250	0	16.25	31.56	35.82	45.33
500	0	12.93	24.85	28.50	31.85

図43.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (30)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	3.39	7.62	10.51	14.37
100	0	7.57	12.94	18.84	27.64
150	0	12.13	20.82	29.25	40.10
250	0	23.67	37.95	44.69	47.90
500	0	14.04	28.26	32.69	37.72

図44.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (35)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	4.20	8.54	12.09	16.33
100	0	9.00	15.40	22.41	32.89
150	0	15.10	22.78	30.45	43.34
250	0	21.69	38.19	51.14	55.92
500	0	13.02	28.03	32.54	38.34

図45.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (40)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	4.11	8.85	12.09	15.80
100	0	8.70	15.77	24.05	33.40
150	0	14.87	25.39	31.78	43.72
250	0	21.24	37.10	44.48	51.90
500	0	16.89	27.06	30.59	37.45

図46.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (45)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	3.70	7.63	10.88	14.22
100	0	7.83	14.19	21.65	30.06
150	0	13.38	24.55	28.60	39.35
250	0	16.42	31.47	38.90	44.87
500	0	14.38	25.27	26.91	33.39

図47.過酸化水素分解反応の経時変化(PEC) (50)

	反応時間[s]				
濃度[mol/m ³]	0	120	240	420	600
0	0	0	0	0	0
50	0	4.61	7.50	9.38	10.58
100	0	7.86	17.51	20.61	27.61
150	0	15.38	25.78	28.76	35.73
250	0	12.01	30.95	36.56	46.26
500	0	13.34	23.08	27.94	31.54

図48.過酸化水素濃度と反応初速度との関係(遊離酵素)

濃度[mol/m ³]	温度[]				
	30	35	40	45	50
0	0	0	0	0	0
50	0.115	0.144	0.129	0.109	0.079
100	0.220	0.254	0.241	0.124	0.046
150	0.304	0.344	0.377	0.120	0.042
250	0.244	0.355	0.264	0.079	0.033
500	0.164	0.255	0.154	0.060	0.024

図49.過酸化水素濃度と反応初速度との関係(PEC)

濃度[mol/m ³]	温度[]				
	30	35	40	45	50
0	0	0	0	0	0
50	0.047	0.056	0.059	0.050	0.043
100	0.077	0.084	0.075	0.070	0.065
150	0.096	0.154	0.179	0.111	0.096
250	0.144	0.169	0.132	0.124	0.095
500	0.125	0.154	0.125	0.109	0.053

図50.過酸化水素濃度と反応初速度との関係(PEC)

濃度[mol/m ³]	温度[]				
	30	35	40	45	50
0	0	0	0	0	0
50	0.022	0.067	0.045	0.049	0.045
100	0.053	0.104	0.086	0.095	0.089
150	0.100	0.150	0.124	0.144	0.120
250	0.130	0.169	0.115	0.122	0.109
500	0.125	0.155	0.113	0.100	0.098

図51.過酸化水素濃度と反応初速度との関係(PEC)

濃度[mol/m ³]	温度[]				
	30	35	40	45	50
0	0	0	0	0	0
50	0.044	0.056	0.050	0.052	0.043
100	0.077	0.100	0.082	0.100	0.067
150	0.113	0.150	0.117	0.120	0.096
250	0.134	0.195	0.133	0.134	0.095
500	0.144	0.176	0.129	0.102	0.056

図52.過酸化水素濃度と反応初速度との関係(PEC)

濃度[mol/m ³]	温度[]				
	30	35	40	45	50
0	0	0	0	0	0
50	0.022	0.068	0.047	0.048	0.046
100	0.054	0.105	0.088	0.097	0.091
150	0.102	0.156	0.128	0.143	0.124
250	0.135	0.171	0.120	0.126	0.112
500	0.129	0.158	0.111	0.101	0.100

図53.過酸化水素濃度と反応初速度との関係(PEC)

	温度[]				
濃度[mol/m ³]	30	35	40	45	50
0	0	0	0	0	0
50	0.045	0.060	0.065	0.064	0.043
100	0.079	0.104	0.105	0.121	0.067
150	0.118	0.167	0.117	0.130	0.098
250	0.146	0.196	0.135	0.134	0.101
500	0.132	0.176	0.132	0.103	0.087

図54.過酸化水素濃度と反応初速度との関係(PEC)

	温度[]				
濃度[mol/m ³]	30	35	40	45	50
0	0	0	0	0	0
50	0.032	0.068	0.047	0.045	0.046
100	0.058	0.108	0.090	0.097	0.091
150	0.102	0.156	0.122	0.143	0.124
250	0.135	0.171	0.131	0.126	0.112
500	0.122	0.158	0.111	0.101	0.086

図55.過酸化水素濃度と反応初速度との関係(PEC)

	温度[]				
濃度[mol/m ³]	30	35	40	45	50
0	0	0	0	0	0
50	0.035	0.045	0.039	0.032	0.034
100	0.066	0.090	0.071	0.093	0.053
150	0.101	0.126	0.131	0.101	0.078
250	0.124	0.152	0.121	0.099	0.076
500	0.127	0.143	0.105	0.087	0.045

図56.過酸化水素濃度と反応初速度との関係(PEC)

	温度[]				
濃度[mol/m ³]	30	35	40	45	50
0	0	0	0	0	0
50	0.026	0.044	0.046	0.042	0.034
100	0.046	0.121	0.089	0.073	0.054
150	0.100	0.145	0.121	0.097	0.087
250	0.125	0.165	0.111	0.123	0.076
500	0.123	0.154	0.105	0.111	0.053

図57.熱安定性(遊離酵素)

温度[]	温置時間[min]				
	0	30	60	90	120
35	0.0340	0.0340	0.0330	0.0335	0.0340
40	0.0340	0.0340	0.0340	0.0345	0.0330
45	0.0340	0.0310	0.0298	0.0291	0.0278
50	0.0340	0.0292	0.0275	0.0254	0.0244
60	0.0340	0.0278	0.0232	0.0185	0.0168
70	0.0340	0.0224	0.0160	0.0078	0.0067
80	0.0340	0	0	0	0

図58.熱安定性(PEC)

温度[]	温置時間[min]				
	0	30	60	90	120
35	0.0122	0.0120	0.0122	0.0119	0.0118
40	0.0122	0.0121	0.0120	0.0124	0.0118
45	0.0122	0.0116	0.0111	0.0107	0.0104
50	0.0122	0.0106	0.0103	0.0093	0.0085
60	0.0122	0.0102	0.0094	0.0086	0.0080
70	0.0122	0.0098	0.0083	0.0076	0.0070
80	0.0122	0.0056	0.0014	0	0

図59.熱安定性(PEC)

温度[]	温置時間[min]				
	0	30	60	90	120
35	0.0136	0.0127	0.0126	0.0122	0.0128
40	0.0136	0.0134	0.0115	0.0121	0.0114
45	0.0136	0.0128	0.0113	0.0101	0.0095
50	0.0136	0.0100	0.0095	0.0076	0.0078
60	0.0136	0.0098	0.0088	0.0076	0.0069
70	0.0136	0.0092	0.0056	0.0067	0.0054
80	0.0136	0.0052	0.0011	0	0

図60.熱安定性(PEC)

温度[]	温置時間[min]				
	0	30	60	90	120
35	0.0119	0.0107	0.0106	0.0108	0.0106
40	0.0119	0.0114	0.0105	0.0101	0.0094
45	0.0119	0.0108	0.0093	0.0081	0.0075
50	0.0119	0.0090	0.0085	0.0079	0.0070
60	0.0119	0.0078	0.0068	0.0056	0.0059
70	0.0119	0.0067	0.0065	0.0051	0.0044
80	0.0119	0.0032	0	0	0

図61,図62..pH安定性

pH	反応速度[mol/m ³ ·s]			
	遊離	PEC	PEC	PEC
3	0.0132	0.0065	0.0056	0.0060
4	0.0199	0.0102	0.0095	0.0095
5	0.0245	0.0110	0.0112	0.0109
6	0.0332	0.0122	0.0129	0.0120
7	0.0355	0.0124	0.0134	0.0122
8	0.0234	0.0079	0.0090	0.0064

図63,図64..保存安定性

時間	反応速度[mol/m ³ ·s]			
	遊離	PEC	PEC	PEC
0	0.0453	0.0121	0.0128	0.0119
3	0.0412	0.0116	0.0123	0.0115
7	0.0366	0.0114	0.0116	0.0112
10	0.0298	0.0112	0.0114	0.0111
14	0.0243	0.0109	0.0112	0.0113
21	0.0201	0.0100	0.0105	0.0107
28	0.0175	0.0100	0.0103	0.0102
30	0.0167	0.0098	0.0100	0.0100
60	0.0042	0.0083	0.0089	0.0095
90	0.0010	0.0070	0.0080	0.0077
120	0.0004	0.0055	0.0051	0.0060

図69.繰り返し実験(基質濃度=20mol/m³·s)

回数	反応速度[mol/m ³ ·s]		
	PEC	PEC	PEC
0	0.0121	0.0131	0.0122
1	0.0116	0.0126	0.0120
2	0.0113	0.0122	0.0115
3	0.0111	0.0120	0.0114
4	0.0112	0.0116	0.0112
5	0.0109	0.0114	0.0102
6	0.0113	0.0125	0.0101
7	0.0105	0.0111	0.0098
8	0.0104	0.0111	0.0097
9	0.0102	0.0110	0.0096
10	0.0100	0.0106	0.0094

図70.繰り返し実験(基質濃度=200mol/m³·s)

回数	反応速度[mol/m ³ ·s]		
	PEC	PEC	PEC
0	0.130	0.123	0.122
1	0.105	0.099	0.102
2	0.093	0.087	0.093
3	0.085	0.082	0.082
4	0.078	0.073	0.074
5	0.073	0.067	0.067
6	0.064	0.056	0.062
7	0.059	0.053	0.052
8	0.046	0.043	0.045
9	0.050	0.042	0.042
10	0.045	0.039	0.036

図65.アジ化ナトリウムの影響(過酸化水素濃度=20mol/m³·s)

濃度[mol/m ³ ·s]	遊離酵素	PEC	PEC	PEC
0	0.0431	0.0431	0.0467	0.0435
2	0.0258	0.0277	0.0287	0.0256
4	0.0164	0.0214	0.0228	0.0224
6	0.0129	0.0195	0.0178	0.0182
8	0.009	0.0143	0.0153	0.0114
10	0.0066	0.0121	0.0142	0.0118
20	0.0039	0.0107	0.0093	0.0107
30	0.0012	0.0078	0.0080	0.0089

図66.アジ化ナトリウムの影響(過酸化水素濃度=200mol/m³·s)

濃度[mol/m ³ ·s]	遊離酵素	PEC	PEC	PEC
0	0.0440	0.0421	0.0404	0.0450
2	0.0242	0.0302	0.0288	0.0333
4	0.0224	0.0278	0.0255	0.0257
6	0.0124	0.0200	0.0194	0.0248
8	0.0078	0.0178	0.0144	0.0188
10	0.0074	0.0211	0.0139	0.0143
20	0.0045	0.0123	0.0109	0.0122
30	0.0018	0.0097	0.0100	0.0103

図67. 2-メルカプトエタノールの影響(過酸化水素濃度=20mol/m³·s)

濃度[mol/m ³ ·s]	遊離酵素	PEC	PEC	PEC
0	0.0431	0.0434	0.0467	0.0410
2	0.0332	0.0389	0.0335	0.0364
5	0.0256	0.0323	0.0302	0.0322
10	0.0234	0.0256	0.0278	0.0267
20	0.0209	0.0254	0.0256	0.0235
30	0.0204	0.0224	0.0242	0.0224
50	0.0143	0.0244	0.0221	0.0200
100	0.01	0.0196	0.0167	0.0200

図68. 2-メルカプトエタノールの影響(過酸化水素濃度=200mol/m³·s)

濃度[mol/m ³ ·s]	遊離酵素	PEC	PEC	PEC
0	0.0431	0.0452	0.0436	0.0426
2	0.0342	0.0399	0.0389	0.0388
5	0.0245	0.0367	0.0346	0.0352
10	0.0222	0.0300	0.0305	0.0289
20	0.0202	0.0278	0.0266	0.0256
30	0.0170	0.0256	0.0222	0.0253
50	0.0146	0.0232	0.0221	0.0235
100	0.0120	0.0214	0.0196	0.0220