

## 中空糸細孔をマイクロリアクターとして利用したエステル合成反応

後藤 宗治・近藤 遥菜・大河平 紀司<sup>1)</sup>・川喜田 英孝<sup>2)</sup>・上江洲 一也<sup>3)</sup>

Usage hollow fiber micro pore as micro reactor for esterification reaction in organic media

Muneharu Goto, Kondo Haruna, Okobira Tadashi, Hidetaka Kawakita, and Kazuya Uezu

### Abstract

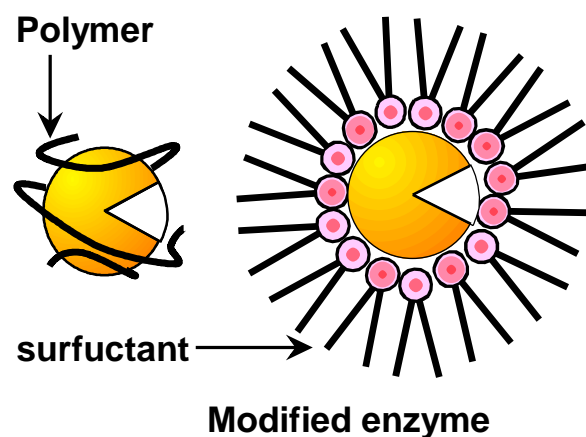
Various functional groups with alkyl group were introduced onto porous hollow-fiber membranes by radiation-induced graft polymerization of glycidyl methacrylate (GMA) and chemical modification. Lipase from *Rhizopus oryzae* was immobilized on the prepared hollow fiber through polymer brushes by permeation of a lipase. The activities of the immobilized lipase were measured by esterification reactions between lauric acid and benzyl alcohol in isoctane. The effect of immobilizing pH on enzymatic activity in organic solvent was investigated. The continuous reaction was carried out by penetration of reaction mixture through micro pore of hollow-fiber immobilized lipase. The lipase activity at continuous reaction increased with increasing of space velocity. It was found that the maximum enzymatic activity was different for immobilizing pH. The maximum activity was got at pH5.5 and maximum activity increased in increasing hydrophilicity of polymer brush.

Keywords : Esterification, Hollow Fiber, Immobilization, Lipase, Polymer brush

### 1. 緒言

酵素を用いた反応は常温常圧で進行し、反応が特異的であるために目的物質を効率良く生産することが可能である。酵素は通常、水の存在下で、安定で高い活性を示す。酵素を非水環境下で使用できれば、バイオディーゼルの燃料、香料、油脂の改質等の水が存在しない方が効率よく反応するエステル合成反応、エステル交換反応を選択的、省エネルギー的に行うことが可能となる。通常、酵素は水の存在が制限される非水媒体中では十分な活性を示すことが出来ない。このような環境下において酵素を有効利用する手法としては、酵素の多孔性マイクロカプセル中への固定化<sup>1)・2)</sup>、多層吸着への固定化<sup>3)・4)</sup>、酵素を含む生細胞の多孔性ポリウレタン樹脂内への固定化<sup>5)</sup>、逆ミセルのウォータープール内への固定化<sup>6)・7)</sup>、界面活性剤の親水部と酵素表面のアミノ酸残基の静電的作用または水素結合によって酵素表面を界面活性剤で被覆する界面活性剤修飾法<sup>8)・10)</sup>、酵素表面のアミノ酸残基とポリエチレングリコールのような高分子を化学結合させて酵素表面を修飾する高分子修飾法<sup>11)・13)</sup>が報告されている。(Fig. 1)しかしながらこのような修飾酵素の固定化に関する報告例は少ない。修飾酵素を固定化できれば、反応系より修飾酵素の回収が容易となり、さらに効率の良い有用物質の生産が可能となる。そこで筆者らは、中空糸細孔内に修飾酵素と類似の構造を有する酵素固定化部位(ポリマーブラシ)をグラフト重合により導入した酵素固定化担体について研究を行って来た<sup>14)</sup>(Fig. 2)。中空糸細孔の面積は中空糸の表面積に比較し

て大きな面積を有するので、酵素を大量に固定化でき、さらに、酵素の修飾と固定化を同時に行うことができるため酵素を効率よく固定化できる。さらに反応器の直径に相当する細孔径が極めて小さいために、通常の実験器と比較して酵素と基質が接触する機会の分散が小さくなることから反応の制御ができ、マイクロリアクターとしても期待できる。筆者らは親水性ポリマーブラシを用いて酵素を固定化した場合、高安定性と活性を示すことが明らかにした<sup>15)</sup>。また前報<sup>16)・17)</sup>においてアミノ系のアルキル基を有する官能基をポリマーブラシに導入した酵素固定化担体にリパーゼを固定化した場合、導入した官能が酵素活性に及ぼす影響について検討した。その結果、酵素を固定化するpHはいずれの官能基を有する固定化担体を用いてもpH5.5であり、その活性は導入した官能基の親水性疎水性バランスHLBに依存することが示された。本研究はこれらの結果より、前報よりHLBが高い官能基をポリマーブラシに導入した酵素固定化担体(中空糸)を調製し、より高活性な酵素固定化マイクロリアクター



の調製について検討した。

Fig.1 修飾酵素の概念図

- 1) 有明工業高等専門学校・物質工学科
- 2) 佐賀大学・理工学部
- 3) 北九州市立大学・国際環境工学科

## 2. 実験

### 2.1 試薬

ポリエチレン製の中空糸(内径1.9mm、外径3.1mm、細孔径360nm)は旭化成(株)より提供を受けた。*Rhizopus oryzae*起源のリパーゼは天野製薬(株)から提供を受けた。グリシジルメタクリレートは東京化製(株)より購入した。モノプロピルアミン(MPA)、ジプロピルアミン(DPA)、ジエチルアミン(DEA)、モノエチルアミン(MEA)アミノエタノール(AE)、モノメチルアミノエタノール(MAE)、アンモニア(NH)、アミノプロパンジオール(APD)、モノメチルアミン(MMA)40%水溶液および、基質であるラウリン酸とベンジルアルコール、反応溶媒であるイソオクタンは和光純薬工業(株)より購入した。全ての試薬は精製することなくそのまま使用した。

### 2.2 中空糸細孔内へのポリマーブラシ導入

中空糸細孔内への各官能基を有するポリマーブラシ導入は、中空糸細孔内へのグリシジルメタクリレートの導入、その後のエポキシ基の開環による官能基の導入の2段階に分けて行った。GMAの導入は以下のとおりである。

中空糸に200kGyの放射線を照射し(Radiation Dynamics社製、Dynamitron model IEA 3000-25-2)中空糸にラジカルを発生させた。この中空糸を10vol%のGMAが溶解した40℃エタノール溶液に浸漬し、GMAを中空糸へグラフト重合させた(GMA-fiber)。GMAの重合率(DG)は(1)式で定義され、今回の実験ではDG=109の膜を調製した。

$$DG = \frac{\text{膜に付加したGMAの質量(kg)}}{\text{ポリエチレン膜質量(kg)}} \quad (1)$$

モノプロピルアミン(MPA)、ジプロピルアミン(DPA)、ジエチルアミン(DEA)、モノエチルアミン(MEA)アミノエタノール(AE)、モノメチルアミノエタノール(MAE)、アンモニア(NH)の導入は前報<sup>17)</sup>と同様に行った。アミノプロパンジオール(APD)、ヒドロキシルアミン(HYA)のエキシ基への導入方法を以下に示す。

#### 1) APD-fiber

アミノプロパンジオールが5g溶解したエタノール20ml溶液にGMA-fiberを浸漬し、60℃、24時間処理を行い官能基を導入した。

#### 2) MMA-fibe

GMA-fiberは疎水性であるため40%モノメチルアミン水溶液を細孔内へ導入しやすくするために以下の操作を行った。エタノール溶液にGMA-fiberを浸漬し超音波を10分照射した後、40%モノメチルアミン水溶液にGMA-fiberを浸漬し超音波照射を10分を行い、細孔内へアンモニア溶液を浸透させた。その後、40℃、24時間処理を行い官能基を導入した。

上記で導入した官能基の導入率は、(2)式を用いて求めた。

官能基導入率 =

$$\frac{\text{反応後GMAのエポキシ基に付加した官能基の物質質量}}{\text{グラフト率より計算されるエポキシ基の物質質量}} \quad (2)$$

### 2.3 化学修飾中空糸へのリパーゼ固定化

*Rhizopus oryzae*起源のリパーゼをpH3.5~pH7.5の10mMクエン酸緩衝液に溶解させ、0.5mol/lのリパーゼ溶液を調製した。Fig.2に示す透過装置に各中空糸の一端を閉じて接続し、ロータリーポンプを用いてリパーゼ溶液を中空糸内側より供給した。細孔を通じて中空糸内側から外側へ流出してきたリパーゼ溶液の液量と濃度を280nmにおける吸光度より測定した。リパーゼ吸着後リン酸緩衝液を細孔内に透過させ細孔内を洗浄した。リパーゼ吸着量は(3)式を用いて計算し、各膜への固定化量が一定になるように調整した。リパーゼを吸着させた各中空糸を固定化時に用いた緩衝液と同じpHの0.25vol%グルタルアルデヒド溶液に30℃、24時間、浸漬しリパーゼを架橋固定化した。その後、リパーゼを固定化した時と同じpHの緩衝液を細孔内へ透過させ未架橋のリパーゼを脱離させた後、真空乾燥し、リパーゼ固定化中空糸を得た。脱離量は(4)式を用いて計算した。

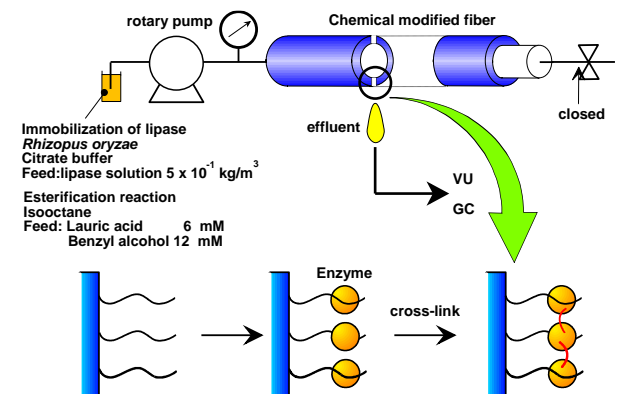


Fig.2 酵素固定化

$$\text{酵素吸着量(kg/kg}_{-}\text{fiber)} = \sum \frac{(C_0 - C)V}{W} \quad (3)$$

$$\text{酵素脱離量(kg/kg}_{-}\text{fiber)} = \sum \frac{CV}{W} \quad (4)$$

細孔内へのリパーゼ固定化量は酵素吸着量より酵素脱離量を引いて求めた。ここで $C_0$ と $C$ はそれぞれリパーゼの初濃度、透過液濃度(kg/m<sup>3</sup>)、 $V$ は透過液量(m<sup>3</sup>)、 $W$ は各中空糸質量(kg)である。

また、カチオン性のポリマーブラシを導入した中空糸には酵素が多層吸着することが報告されているので<sup>17)</sup>、リパーゼの多層吸着の影響を避けるために、(5)式を用いてリパーゼが一層固定化された場合の吸着量 $q_1$ を計算し、その値になるようリパーゼ固定化量を調節した。

$$q_t = \frac{a_v (M_t / 1000)}{a N_A} \quad (5)$$

ここで、 $a_v$ は各中空糸の比表面積でありBET法にて測定したところ19700m<sup>2</sup>/kg-fiberであった。 $a$ 、 $M_t$ はそれぞれリパーゼ1分子の吸着占有面積(7.85×10<sup>-17</sup> m<sup>2</sup>)、リパーゼの分子量(31340)である。 $N_A$ はアボガドロ数であり、分子量は電気泳動より求め、吸着面積は分子量より推算した分子直径を用いて求めた。

### 2.4 エステル合成活性の測定

リパーゼ活性は有機溶媒中におけるラウリン酸とベンジルアルコールのエステル合成反応で評価した。ラウリン酸6mM、ベンジルアルコール12mMを含むイソオクタン溶液を調製し、Fig. 2に示す装置にリパーゼ固定化中空糸の一端を閉じて接続し、ロータリーポンプを用いて、反応溶液を酵素固定化膜の内側から外側へ透過させて25℃で反応を行った。反応速度(酵素活性)は空間速度に依存し、空間速度の増加と共にするため、空間速度に活性が影響を受けない条件、すなわち、最大活性を酵素活性として評価した。本反応は中空糸細孔をマイクロリアクターとして利用するため、空間速度は反応溶液を中空糸膜体積で除した(6)式を用いて計算し、リパーゼ活性は(7)式を用いて計算した。

ラウリン酸、ラウリン酸ベンジルの分析はFIDを検出器としたガスクロマトグラフィー(HP5890)で15mキャピラリーカラム(J&W Scientific DB-1)を用いた昇温プログラム(70~200℃、昇温速度20℃/min)で測定した。検出器温度は350℃、キャリアーガス(ヘリウム)、空気、水素の流量は、それぞれ16ml/min、360ml/min、30ml/minである。

$$SV(1/h) = \frac{\text{基質溶液流速}(m^3/h)}{\text{膜体積}(m^3)} \quad (6)$$

$$\begin{aligned} &\text{酵素活性}(mol/(h \cdot kg - lipase)) \\ &= \frac{\text{基質溶液流速}(m^3/h) \times \text{生成物濃度}(mol/m^3)}{\text{酵素固定化量}(kg - lipase)} \quad (7) \end{aligned}$$

## 3. 結果及び考察

### 3.1 化学修飾中空糸の特性

調製した化学修飾中空糸への官能基導入率は全てが100%に達していた。また、酵素固定化量は4.5×10<sup>-2</sup>kg/kg-fiberになるように調整した。

### 3.2 リパーゼ固定化中空糸の活性評価

MPA-fiberにリパーゼを固定化した場合のリパーゼ固定化時のpH変化における酵素活性が細孔内空間時間に及ぼす影響をFig. 3に示す。空間時間の増加に伴い生成物の生成速度が増加し、いずれのpHで固定化した場合も細孔内に反応溶液を透過させることにより、細孔内へ固定化された酵素への物質移動が促進されることが示された。

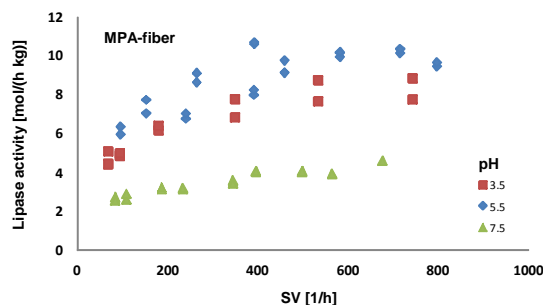


Fig. 3 酵素固定化pHが酵素活性に及ぼす影響

酵素活性の最大値は固定化酵素調製時のpHに影響を受け、pH5.5で酵素を固定化した場合他の官能基を導入したいずれの中空糸の場合もpH5.5で酵素を固定化時が最も高い活性を示した。各修飾膜にpH5.5で固定化した場合の連続反応における最大活性をTable. 1に示す

Table. 1 アルキル基を有する中空糸にpH5.5で固定化した連続反応における最大酵素活性の比較

Activity mol/(h kg-lipase)	
アミノプロパンジオール : APD	75.0
モノメチルアミン : MMA	70.0
アンモニア : NH	60.0
アミノエタノール : AE	60.0
モノメチルアミノエタノール : MAE	25.0
モノエチルアミン : MEA	23.0
ジエチルアミン : DEA	35.0
モノプロピルアミン : MPA	12.0
ジプロピルアミン : DPA	10.0

エステル合成反応は非水媒体中で行っているにもかかわらず、pH依存性があることからポリマーブラシとグルタルアルデヒドにより酵素固定化時の酵素の立体構造を強固に保持しているものと予想される。また、遊離リパーゼの活性を測定したところ、遊離リパーゼの活性は0.2mol/(h kg-lipase)と上記のいずれの固定化リパーゼよりも活性が低かった。

上記の結果よりリパーゼを被覆固定化するポリマーブラシの官能基はリパーゼ固定化の環境に大きな影響を及ぼし、リパーゼ活性を変化させることが明らかになった。

また、官能基を用いてリパーゼを固定化しても遊離酵素より高い活性を示した。

本固定化酵素はFig. 1に示す界面活性剤修飾酵素と同様に酵素の周辺が疎水性の炭素鎖と親水部のイオン性官能基で囲まれた環境にあると推察される。前報<sup>17)</sup>において界面活性剤の性質を示すパラメーターとして親水部の分子量を界面

活性剤の分子量で割った親水性疎水性バランス値 (HLB) を今回のポリマーブラシにも適用し、ポリマーブラシの繰り返し単位分子量に対する導入した親水部分の分子量で割った値をポリマーブラシのHLB値としてHLBと各固定化酵素の最大活性に正の関係があることが示された。今回の実験では、HLBが大きい官能基であるMMA、APDをポリマーブラシに導入し、リパーゼを固定化し、その活性を測定したところ、前報と同様に結果を示した。これらのことより親水性の高い官能基を用いて酵素を固定化することにより高い活性を維持したまま酵素を固定化できることが明らかになった。今回の実験で高い酵素活性を示したリパーゼ固定化 pHにおける最大酵素活性とHLBの関係をFig. 4に示す。

$$HLB = \frac{\text{モノマー中の親水部の分子量}}{\text{モノマーの分子量}} \times 20 \quad (8)$$

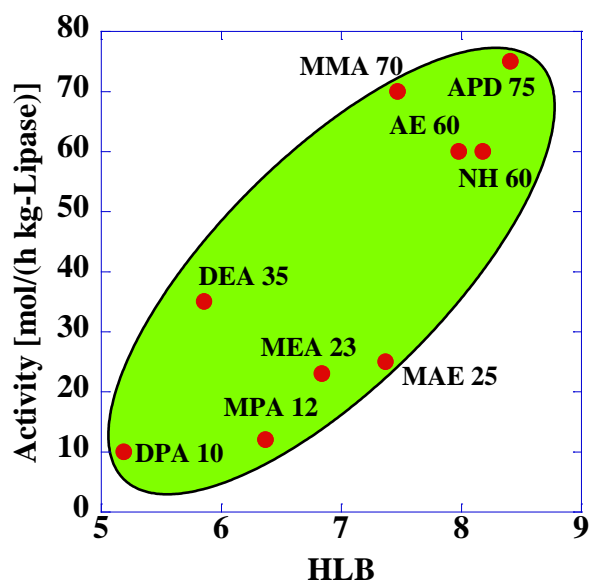


Fig. 4 HLBが酵素活性に及ぼす影響

#### 4 結言

本実験において、非水環境下における酵素保護機能と酵素固定化機能を有する担体の開発を目的として、ポリエチレン製中空糸の細孔内へ親水性の官能基を有するポリマーブラシを導入した中空糸を調製した。この中空糸に *Rhizopus oryza* 起源のリパーゼをポリマーブラシを介して固定化したところ、遊離リパーゼと比較して非水媒体中の酵素活性と安定性が増大した。また、ポリマーブラシを導入する官能基の親水性が高いほど高いリパーゼ活性を示す傾向にあった。

#### 参考文献

- 1) H. Sawae, A. Sakoguchi, F. Nakashio, M. Goto, J. Chem. Eng. Jpn, **38**, 54 (2005)
- 2) E. Y. Park, M. Saito, S. Kojima, Enzyme and Microbial Technology, **39**, 889 (2006)
- 3) M. Fujiwara, K. Shiokawa, K. Yotsuya, K. Matsumoto, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **109**, 94 (2014)
- 4) S. Hama, S. Tamalampudi, T. Fukumizu, K. Miura, H. Yamaji, H. Fukuda, Journal of Bioscience and Bioengineering, **101**, 328 (2006)
- 5) C. Hou, H. Zhu, D. Wu, Y. Li, K. Hou, Y. Jiang, Y. Li, Process Biochemistry, **49**, 244 (2014)
- 6) Y. Yamada, R. Kuboi, I. Komasa, Biotechnol. Prog, **9**, 468 (1993).
- 7) M. Hossain, Y. Hayashi, N. Shimizu, N. Kawanishi, Journal of Chemi Tech Biotechnol, **78**, 860 (2003)
- 8) Y. Okahata, Y. Fujimoto and K. Ijiro, Tetrahedron Letter, **29**, 5113 (1988)
- 9) M. Goto, C. Hatanaka, M. Goto, Biochemical Engineering Journal, **24**, 91 (2005)
- 10) T. Mori, S. Kishimoto, K. Ijiro, A. Kobayashi, Y. Okahata, Biotechnol. Bioeng, **76**, 157 (2001)
- 11) S. Kikkawa, K. Takahashi, T. Katada, Y. Inada, Biochem. Int, **19**, 1125 (1989)
- 12) K. Sakurai, K. Kashimoto, Y. Kodaera, Y. Inada, Biotechnol. Lett, **12**, 685 (1990)
- 13) H. Sakakibara, T. Tamura, T. Suzuki, T. Hisano, S. Abe, K. Murata, J. Pharm. Sci, **91**, 1191 (2002)
- 14) M. Goto, H. Kawakita, K. Uezu, S. Tsuneda, K. Saito, M. Goto, M. Tamada, T. Sugou, J. Am. Oil Chem. Soc, **83**, 209 (2006)
- 15) T. Okobira, A. Matsuo, H. Matsumoto, T. Tanaka, K. Kai, C. Minari, M. Goto, H. Kawakita, and K. Uezu, J. Bioscience and Bioengineering, **120**, 257 (2015)
- 16) M. Goto, M. Oka, T. Kounoike, H. Kawakita, K. Uezu, 北九州工業高等専門学校研究報告, **48**, 65 (2015)
- 17) M. Goto, M. Oka, T. Kounoike, H. Kawakita, K. Uezu, 北九州工業高等専門学校研究報告, **49**, 61 (2016)
- 18) M. Tamada, T. Sugo, W. Lee, Biotechnol. Prog, **19**, 396 (2003)

(2018年11月 5日 受理)