

# ヒドロキシルアミン導入高分子による中空糸細孔への 酵素固定化とマイクロリアクターへの応用

後藤宗治・近藤遥菜・中村彩夢・渡部佳菜  
竹森友紘・大河平紀司<sup>1)</sup>・川喜田英孝<sup>2)</sup>

Esterification reaction in organic media by using enzyme immobilized microreactor

Muneharu Goto, Haruna Kondo, Ayu Nakamura, Kana Watabe, Tomohiro Takemori, Tadashi Okobira,  
and Hidetaka Kawakita

## Abstract

Various functional groups with an aromatic 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 isooctane. 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 obtained at pH7.5 and maximum activity increased in introduced functional group on polymer brush.

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

## 1. 緒言

酵素は生体内反応を触媒するタンパク質である。酵素は常温常圧といった温和な条件下で反応が進行し、基質特異性を有するために一般の無機触媒を用いた反応と比較して副反応が無く目的物質を効率良く生産することが出来る。このような反応は、麹菌や乳酸菌による酒造、ヨーグルト、チーズの製造に古くから利用されてきた。

しかしながら、本来、酵素は、水が大量に存在する生体内で作用するため、酵素を生体外ではその活性が著しく低下する。酵素を水の無い環境（有機溶媒中）で利用することが出来れば、エステル合成、エステル交換反応を有利に行うことか可能となり、香料、ステロイド、油脂の改質、バイオディーゼル燃料の生産等に利用可能となる。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>、磁性体粒子や多孔性ポリウレタンのような担体への固定化<sup>3-5)</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、通常の反応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>。本研究は従来検討した官能基より高親水性を有する直鎖の炭素系のアミン類を導入したポリマーブラシを用いて酵素を中空糸細孔内に固定化したマイクロリアクターを作成し、有機溶媒中でのエステル合成反応活性の比較を行った。

## 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。40%ヒドロキシルアミン水溶液は東京化成(株)より購入した。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。

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

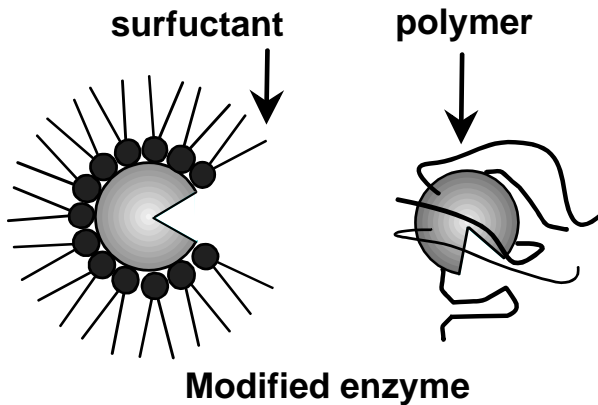


Fig. 1 修飾酵素の概念図

## 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 (GMA) 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°C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=123の膜を調製した。

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

## 2.3 ポリマーブラシへのヒドロキシアミンの導入

メタノール20ml溶液を入れた50mlスクリーキャップ付き試験管にGMA-fiberを浸漬し、10分間超音波照射を行い、疎水性中空糸細孔内へメタノールを浸透させた。その後、40%ヒドロキシルアミン水溶液に浸漬し、10分間超音波照射を行い、中空糸細孔内へヒドロキシルアミン水溶液を浸透させた。40°Cの恒温水槽に上記試験管を漬け、48時間処理を行いGMAのエポキシ基の開環反応によりヒドロキシルアミンを導入した (HYA-fiber)。導入した官能基の導入率は、(2)式を用いて求めた。中空糸への官能基導入のフローチャートをFig. 2に示す。

官能基導入率 =

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

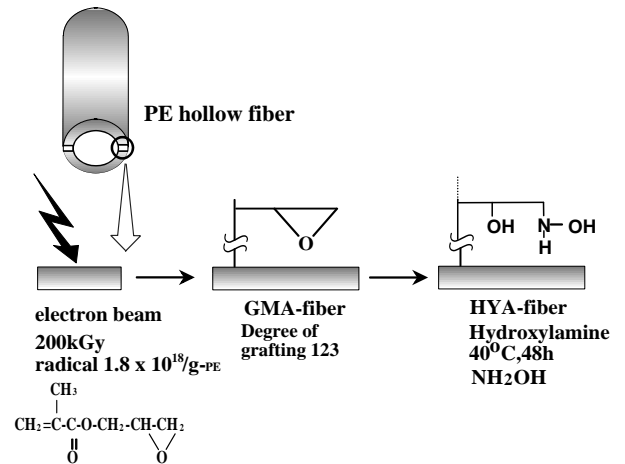


Fig. 2 官能基導入フローチャート

## 2.4 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~pH8.5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. 3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。リパーゼ吸着後クエ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°C、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。

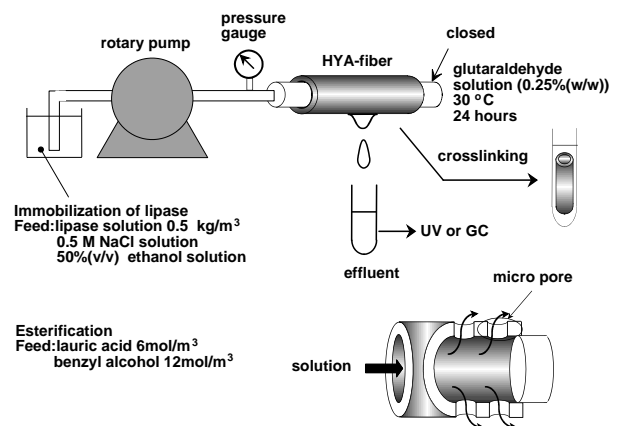


Fig. 3 酵素固定化

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

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

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( $\text{kg}/\text{m}^3$ )、 $V$ は透過液量( $\text{m}^3$ )、 $W$ は各中空糸質量( $\text{kg}$ )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>15,16</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 $q_t$ 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。

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

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 $19700\text{m}^2/\text{kg-fiber}$ 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( $7.85 \times 10^{-17}\text{m}^2$ )、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. 3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°C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増加するため、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流量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。

また、上記反応溶液10mlを入れた50mlサンプル管にリパーゼ固定化中空糸を添加することによりバッチ反応を開始した。反応は25°C、攪拌速度200rpmにて行った。比較として同様の実験条件で、リパーゼ固定化中空糸の代わりに遊離リパーゼを用いて反応を行い活性の比較を行った。活性は、単位リパーゼ(1kg)あたりのラウリン酸ベンジルの生成初速度で評価した。リパーゼ固定化中空糸の安定性を測定する場合は、24時間反応後(平衡後)、リパーゼ固定化中空糸を反応溶液より回収し、イソオクタンで3回洗浄後に新しい反応溶液を加え、上記と同様の条件で反応を行った。酵素活性は、生成物濃度の増加が直線とみなせる範囲の酵素1kgあたりの生成物の生成速度とした。

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°C、昇温速度20°C/min)で測定した。検出器温度は350°C、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。

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

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

## 3. 結果及び考察

### 3.1 化学修飾中空糸の特性

HYAの中空糸への官能基導入率は60%程度であった。また、酵素固定化量は $4.5 \times 10^{-2}\text{kg}/\text{kg-fiber}$ であった。

### 3.2 リパーゼ固定化中空糸の活性評価

HYA-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. 4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。また、遊離リパーゼのバッチ実験により求めたイソオクタン中での酵素活性は $0.2\text{mol}/(\text{h kg-lipase})$ であり、ポリマーブラシを介して酵素を固定化することによる酵素の被覆効果も確認できた。

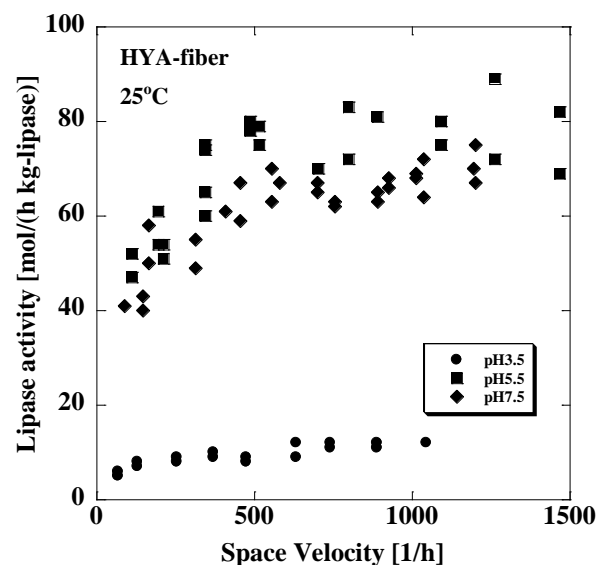


Fig. 4 酵素固定化pHが酵素活性に及ぼす影響

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、pH 5.5 で固定化した場合に最大活性を示した。他の修飾膜に酵素を固定化した場合も同様の傾向を示したがその最大活性は異なっていた<sup>17)</sup>。各修飾膜に pH 5.5 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 pH 5.5 で中空糸に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)		
ヒドロキシルアミン	HYA	80
アミノプロパンジオール	APD	75
モノメチルアミン	MMA	70
アンモニア	NH	60
アミノエタノール	AE	60
ジエチルアミン	DEA	35
モノメチルエタノールアミン	MAE	25
モノエチルアミン	MEA	22
モノプロピルアミン	MPA	11
ジプロピルアミン	DPA	10

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、pH 5.5 で酵素を固定化した場合に最大活性を示すことが明らかとなったが、その値は酵素固定化に用いた官能基の種類により異なっていた。

界面活性剤修飾酵素の研究において、浸水部の種類が酵素活性に影響を及ぼすことが報告されている<sup>9)</sup>。界面活性剤の親水性の程度を示す親水親油バランス (HLB) があり、その計算方法は複数あるが、本実験ではグリフィンにより報告された計算方法<sup>18)</sup>を高分子のモノマー部分に適用した。グリフィン法による HLB の計算方法は親水性部分の分子量の合計を分子量で割った値に 20 をかけた値である。

Fig. 5 に pH 5.5 で HYA-fiber に酵素を固定化した場合の連続反応における最大活性と HLB の関係を示す。HLB に対して正の相関性を示し、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発現できることが示された。

### 3.3 繰り返し利用による活性評価

HYA-fiber に pH 5.5 でリパーゼを固定化した場合の酵素活性の繰り返し利用回数における活性変化をバッチ反応を用いて行った場合の結果を Fig. 6 に示す。繰り返し利用によ

る酵素活性の低下は測定されず、繰り返し利用による酵素の変性も脱離も起きていないことが示された。他の固定化酵素も活性は異なるが同様の結果となった。

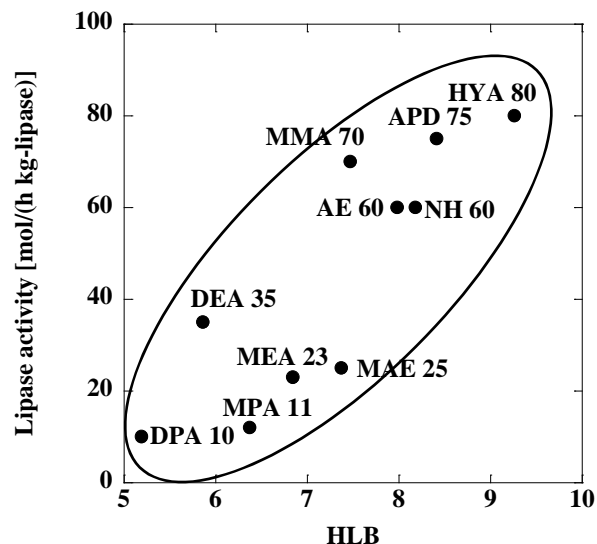


Fig. 5 HLB と最大酵素活性の関係

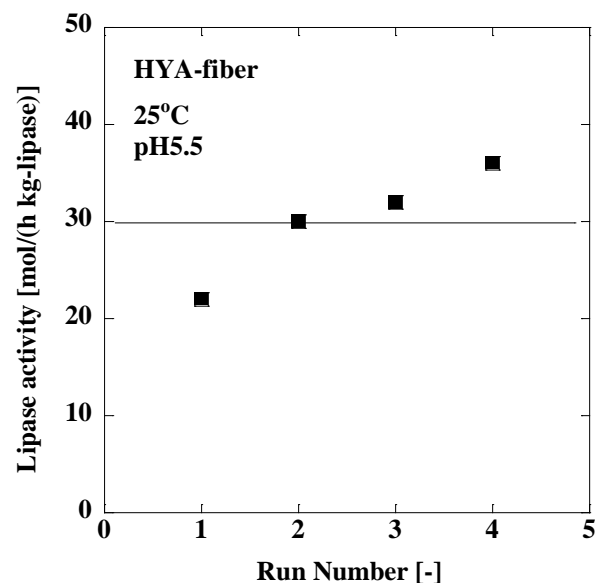


Fig. 6 繰り返し利用による酵素活性の変化

## 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。有機溶媒中の反応ではあるが酵素活性は酵素を固定化した pH の影響を受け、その最

適pHはどの官能基を用いてもpH5.5であった。さらにポリマーブラシに導入する官能基の種類が酵素活性に影響を及ぼすことが示された。連続反応の最大活性を親水親油バランスで整理したところ正の相関性を示し親水性の高い官能基を用いて固定化すると高い酵素活性を発現できることが示された。

#### 参考文献

- 1) H. Sawae, A. Sakoguchi, F. Nakashio, M. Goto, Journal. Chemical. Engineering of Japan, **38**, 54 (2005)
- 2) E. Y. Park, M. Saito, S. Kojima, Enzyme and Microbial Technology, **39**, 889 (2006)
- 3) Machado.N.B. Miguez, J.P. Bolina, I.C.A. Salviano, A.B. Gomes, R.A.B. Tavano, O.L. Luiz. H.H. Tardioli, P.W. Cren, É.C. Mendes, A.A. Microbial Technology. **128**, 9 (2019)
- 4) Ozyilmaz, G. Yağız, E. Turkish Journal of Biochemistry. **3**, 339 (2017)
- 5) C. Hou, H. Zhu, D. Wu, Y. Li, K. Hou, Y. Jiang, Y. Li, Process Biochemistry, **49**, 244 (2014)
- 6) Orlich,B. Schomacker,R.. Adv Biochem Eng Biotechnol.**75**, 185 (2002)
- 7) Gonçalves,K.M. Junior,I.I. Papadimitriou,V. Zoumpantioti,M. Leal,I.C.R. De Souza,R.O.M.A. Cordeiro,Y. Xenakis,A. Langmuir. **32**, 6746 (2016)
- 8) Maruyama,T. Umezaki,S. Nakajima,M. Seki,M. European Journal of Lipid Sci and Technology. **104**, 255 (2002)
- 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) Koops BC. Verheij HM. Slotboom AJ. Egmond MR. Microbial Technology. **25**, 622 (1999)
- 12) Overbeeke,P.L.A. Koops,B.C. Verheij,H.M. Slotboom,A.J. Egmond,M.R. Jongejan,J.A. Heijnen,J.J. Biocatalysis and Biotransformation. **18**, (2000)
- 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) M. Tamada, T. Sugo. W. Lee, Biotechnol. Prog, **19**, 396 (2003)
- 16) 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)
- 17) 後藤宗治,大久保萌之,酒田春花,大河平紀司,川喜田英孝,上江洲一也 北九州工業高等専門学校研究報告, **53**, 61 (2020)
- 18) W.C.Griffin J. Soc. Cosmet. Chem. **1**. 311 (1949)

(2021年11月 1日 受理)