

固定化修飾酵素を用いた有機溶媒中のエステル合成反応

後藤 宗治・金子 英樹・白石 悟智・川喜田 英孝¹⁾・上江洲 一也²⁾

Enhancement of Esterification Reaction in Organic Solvent by immobilized enzyme with modifying of enzyme

Muneharu Goto, Hideki Kaneko Tsutomu Shiraisi, Hidetaka Kawakita, and Kazuya Uezu

Abstract

Various functional groups with aromatic group were introduced onto porous hollow-fiber membranes by radiation-induced graft polymerization of glycidyl methacrylate and chemical modification. Lipase from *Rhizopus oryzae* was immobilized on prepared hollow fiber through polymer brushes by permeation of lipase. The activities of 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. It was found that the maximum enzymatic activity was different for immobilizing pH. 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. When aminophenol introduced fiber was used, the lipase activity reached about 225 times compared with native lipase. It was found that hydrophilicity important roles for stability of immobilizing enzyme in non-aqueous media.

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^{1), 2)}、多層吸着への固定化^{3), 4)}、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⁵⁾、逆ミセルのウォータープール内への固定化^{6), 7)}、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⁸⁻¹⁰⁾、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¹¹⁻¹³⁾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¹⁴⁾ (Fig. 2)。このような固定化担体を用いれば、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。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¹⁵⁾。また前報¹⁶⁾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 pH 5.5 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。本実験はアミノ系のベンゼン環を有する可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、酵素を固定化した場合の官能基が酵素活性に及ぼす影響を検討した。

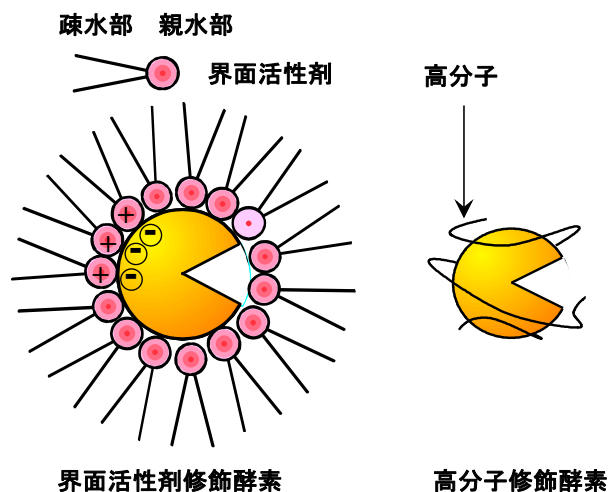


Fig. 1 修飾酵素概念図

2. 実験

2.1 試薬

1) 佐賀大学・理工学部

2) 北九州市立大学・国際環境工学部

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。アニリン(AN)、メチルアニリン(MA)、アミノフェノール(AP)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。

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

アニリン(AN)、メチルアニリン(DEA)、アミノフェノール(AP)をポリマーブラシのエポキシ基へ導入した。導入方法を以下に示す。

1) AN-fiber、MA-fiber

アニリン、又はメチルアニリン溶液にGMA-fiberを浸漬し、超音波照射を10分を行い、細孔内へ溶液を浸透させた。その後、60℃、24時間処理を行い、官能基を導入した。

2) AP-fiber

アミノフェノール濃度0.46mol/lになるように調製したエタノール溶液にGMA-fiberを浸漬し、超音波照射を10分を行い、細孔内へ溶液を浸透させた。その後、60℃、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. 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。

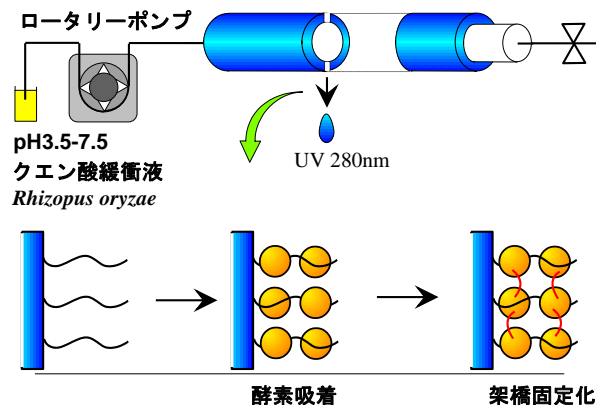


Fig. 3 酵素固定化および反応装置

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

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

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、透過濃度(kg/m³)、 V は透過液量(m³)、 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^{14,19)}、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19700m²/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(7.85×10⁻¹⁷ m²)、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℃で反応を行った。空間速度に対する活性の影響を測定した。空間速度は反応溶液が中空糸細孔内を透過するため膜体積を基準とした(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。

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

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

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℃、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。

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。

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の導入率を**Table. 1**に示す。官能基導入率はAP-fiber以外は24時間で官能基導入率が100%に達したのに対しAP-fiberは70%であった。また、酵素固定化量は 4.5×10^{-2} kg/kg-fiberになるように調整した。

Table1 膜へのGMA及び官能基導入率

	グラフト率(%)	官能基導入率(-)
AN	109	1.00
MA	109	1.00
AP	109	0.70

3.2 リパーゼ固定化中空糸の活性評価（バッチ反応）

各固定化リパーゼを調製する際のクエン酸緩衝液のpHがバッチ反応活性に及ぼす影響を**Table. 2**に示した。クエン酸緩衝液の緩衝能力の範囲において、pH7.5で固定化した場合が高い活性を示した。前報¹⁶⁾においてアルキル鎖を有するアミン系の官能基をポリマーブラシに導入した中空糸にリパーゼを固定化した場合は、その酵素活性はアルキル鎖の種類により異なっていたが、最大活性を示す酵素固定化pHはpH5.5であった。以上のことから酵素固定化に利用するポリマーブラシへ導入する官能基が酵素活性だけでなく特性にも影響を及ぼすことが示された。また、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。各測定点は3回以上繰り返し使用した値の平均値であるが、繰り返し使用による活性の低下認められず、24時間後（平衡時）における反応率は98%以上であった。以上の結果より本研究における酵素固定化担体に固定化した酵素は脱離や失活が無く、高い安定性を有することが示された。また、遊離リパーゼを用いて比較実験を行ったところ、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。また、遊離リパーゼの繰り返し使用による活性の低下も著しく、遊離リパーゼの活性は2回目の再利用ではほとんど活性を示さなかった。

Table2 固定化酵素活性の比較（バッチ反応）

	pH3.5	pH5.5	pH7.5
	mol/(h kg-lipase)		
AN	1.5	7.1	14.0
MA	2.5	3.4	6.5
AP	10.6	12.1	22.5

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。

3.3 リパーゼ固定化中空糸の活性評価（連続反応）

AN-fiberにリパーゼを固定化した場合、固定化した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。

各固定化リパーゼを調製する際のクエン酸緩衝液のpHが連続透過反応の最大活性に及ぼす影響を**Table. 3**に示した。クエン酸緩衝液の緩衝能力の範囲において、バッチ反応時の

活性と同様の傾向を示し、どの官能基を用いてリパーゼを固定化してもバッチ反応時より高い活性を示した。特に、アミノエタノールを導入したポリマーブラシにリパーゼを固定化し、中空糸細孔内へ反応液透過させた場合、遊離リパーゼと比較してその活性が0.2mol/(h kg-lipase)から45mol/(h kg-lipase)へと225倍になった。

Table3 固定化酵素活性の比較 (連続反応)

	pH3.5 mol/(h kg-lipase)	pH5.5 mol/(h kg-lipase)	pH7.5 mol/(h kg-lipase)
AN	2.1	15.0	24.5
MA	1.0	6.0	12.0
AP	25.0	35.0	45.0

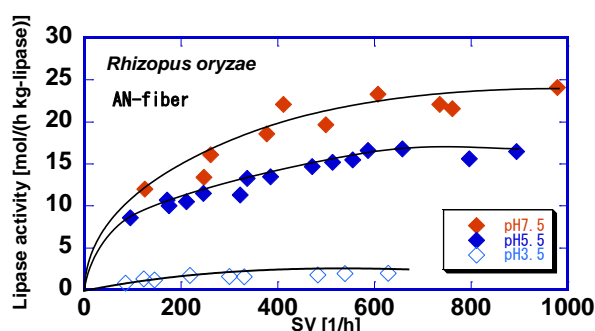


Fig. 4 空間速度 (SV) が酵素活性に及ぼす影響

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。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(8)式に示す親水性疎水性バランス値 (HLB) がある。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が各固定化酵素の酵素活性に及ぼす影響について検討した。

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

今回の実験で高い酵素活性を示したリパーゼ固定化 pH7.5 で調製した固定化リパーゼの連続反応活性の最大値とHLBの関係をFig. 5に示す。HLBが高いポリマーブラシにリパーゼを固定化した方が有機溶媒中で高い活性を発現する傾向があることが示された。この結果は前報¹⁶⁾で報告したアルキル基を有するアミン系の官能基をポリマーブラシに導入した中空糸にリパーゼを固定化した場合と同様の結果となった。

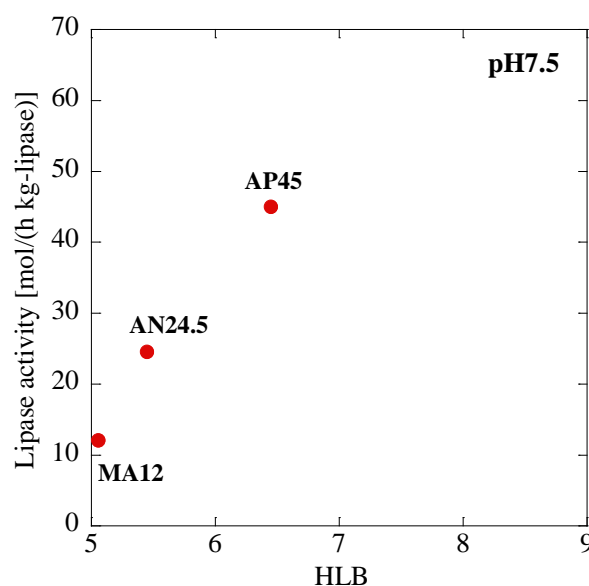


Fig. 5 HLBが酵素活性に及ぼす影響

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 oryzae* 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、ポリマーブラシに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。

中空糸細孔内へ基質を連続的に供給した管型連続反応器を用いた場合、空間速度の増加につれて基質の細孔内に固定化されたリパーゼへの物質移動が促進され、バッチ反応時の活性と比較して反応速度の増大が確認された。

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) G. Hedstrom, M. Backlund, J. P. Biotechnol. Bioeng, **42**, 618 (1993).

- 7) C. M. L. Carvalho, M. R. Aires-Barros, J. M. S. Cabral, *Biotechnol. Bioeng.*, **72**, 127 (2000)
- 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) G. Hagen, *Pogg. Ann. d. Physik. u. Chem.*, **46**, 423 (1839)
- 18) J. L. M. Poiseuille, *Crit. Rev. Acad. Sci, Paris* **11**, 961 (1840)
- 19) M. Tamada, T. Sugo. W. Lee, *Biotechnol. Prog.*, **19**, 396 (2003)

（2015年11月9日 受理）