

# 酵素積層固定化担体を用いた非水媒体中における連続エステル合成反応

後藤 宗治・松島 裕起・山下 未央・川喜田 英孝<sup>1)</sup>・上江洲 一也<sup>2)</sup>

Properties of Carrier with abilities of enzyme protection form organic solvent and enzyme immobilization

Muneharu Goto, Yuki Matsushima, Mio Yamashita, Hidetaka Kawakita, and Kazuya Uezu

## Abstract

To immobilize lipase for enzymatic reactions in organic solvent, various functional [epoxy (GMA-fiber), hydroxyl (OH-fiber) or diethyl amino (DEA-fiber)] groups 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 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 activity of immobilized lipase on GMA-fibers, DEA-fibers and OH-fibers were 3.9 mol/(h kg-lipase), 2.5 mol/(h kg-lipase), and 6.2 mol/(h kg-lipase), respectively in batch reaction (35°C). Immobilized lipase on DEA-fibers or OH-fibers was reused 4 times, after it was used in the batch reactor for 24 hours. It was found that lipase activity showed no signs of denaturation. However, when native lipase was used, lipase activity remarkably decreased after reusing. The effect of polymer brush on enzyme stabilization in non-aqueous media was confirmed. DEA-fiber could absorb lipase multi layered. The continuous reaction was carried out by penetration of reaction mixture through micro pore of DEA-fiber immobilized lipase 11 layer. The lipase activity of DEA-fiber at continuous reaction increased with increasing of space velocity and reached 35mol/(h kg-lipase). This value is about 3 times of lipase activity at batch reaction (12.4mol/(h kg-lipase)).

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

## 1. 緒言

酵素を用いれば、反応が常温常圧で進行し、反応が特異的であるために目的物質を選択的、省エネルギー的に生産できる。特に、酵素を非水媒体中で使用することが出来ればバイオディーゼル燃料や油脂の改質といった有用物質の高効率な生産が可能となる。しかしながら、一般に酵素は非水媒体中では酵素はその活性を十分に発揮できず、このような環境下において酵素を有効利用する手法が多く研究されている。特に良く知られている手法としては、酵素の多孔性マイクロカプセル中への固定化<sup>1)</sup>、シリカゲル表面への多層吸着固定化<sup>2)</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>3)</sup>、逆ミセルのウォータープール内への固定化<sup>4,5)</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>6-8)</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>9-11)</sup>がある。特に逆ミセル法、界面活性剤修飾法、高分子修飾法は従来の酵素分散法と比較して非水媒体中で高い活性を示すが、反応溶媒に溶解してしまう。もし、反応系より修飾酵素の回収ができれば、さらに効率の良い有用物質の生産が可能となる。前報<sup>12)</sup>において筆者らは中空糸細孔内にカチオン性官能基を有する高分子鎖（ポリマーブラシ）を導入し、このポリマーブラシを介して酵素を固定化することにより酵素修飾と固定化を同時に行うことが可能な担体について報告した（Fig. 1）。このような固定化

担体を用いれば、酵素修飾、修飾酵素の固定化といった手順を一度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、本研究で用いる中空糸細孔内に基質溶液を透過させることにより、酵素近傍への基質の物質移動速度が促進され通常の固定化酵素と比較してさらに効率の良い目的物質の生産が期待できる。

このような固定化担体を用いて酵素を固定化する場合、ポリマーブラシの長さや導入する官能基の種類は酵素活性に対して重要な役割を果たす。本実験では、ポリマーブラシが微水環境下におけるエステル合成活性に及ぼす影響について検討した。

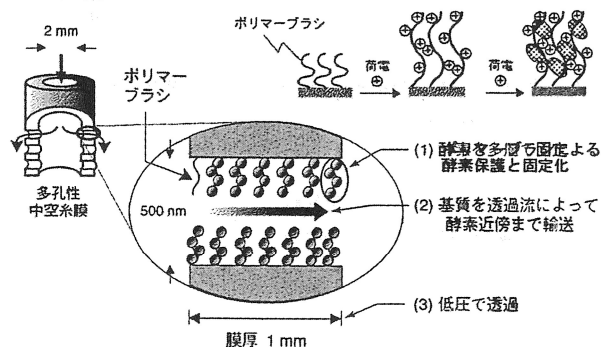


Fig.1 Schematic diagram of lipase immobilized onto the pores of hollow fiber.

## 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

1) 佐賀大学・理工学部

2) 北九州市立大学・国際環境工部

径360nm)は旭化成(株)より提供を受けた。*Rhizopus oryzae* 起源のリパーゼは和晃製薬(株)から購入した。グリシジルメタクリレート(GMA)とジエチルアミン(DEA)は東京化製(株)より購入した。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 中空糸へのカチオン性ポリマーブラシ導入

中空糸細孔内へのポリマーブラシ導入のフローチャートをFig. 2に示す。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)。(1)式でGMAの重合率(DG)を定義し、今回の実験ではDG=109の膜を調製した。得られたGMA-fiberを1M硫酸水溶液で80℃、24時間処理を行い、GMAのエポキシ基を開環させ水酸基を導入した(OH-fiber)。また50vol%DEAを溶解させた40℃のエタノール溶液に8時間浸漬し、カチオン性ポリマーブラシが導入された中空糸(DEA-fiber)を調製した。官能基(OH、DEA)の導入率は、(2)式を用いて求めた。

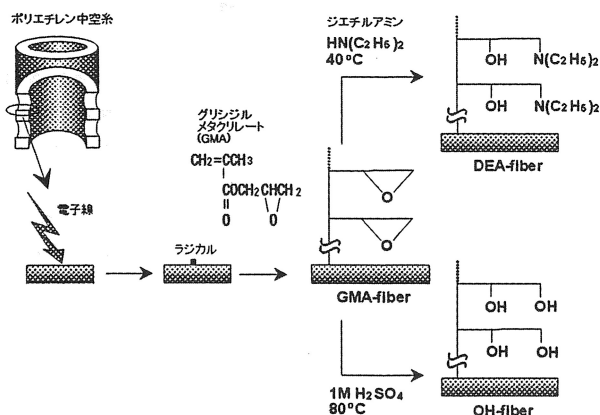


Fig.2 Schematic diagram of chemical modified hollow fiber preparation.

$$dg(\%) = \frac{\text{mass of GMA grafted (kg)}}{\text{mass of trunk polymer (kg)}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{molar conversion}(\%) = \frac{\text{moles of functional groups after functionalization}}{\text{moles of epoxy group before functionalization}} \times 100 \quad (2)$$

## 2.3 化学修飾中空糸 (GMA-fiber、OH-fiber、DEA-fiber) の細孔径測定

細孔内に導入されたポリマーブラシの形状は、細孔内を流れる液体の流束に影響を及ぼす。Fig. 3に示す透過装置

に各化学修飾した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25℃の純水を透過圧力0.05Mpaで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純水の液量を測定し、(3)式を用いて透過流束Fを計算した。さらに細孔が一定の径を有する円筒形であると仮定し、Hagen-Poiseuille式<sup>13,14)</sup>を用いて各中空糸細孔径を評価した。

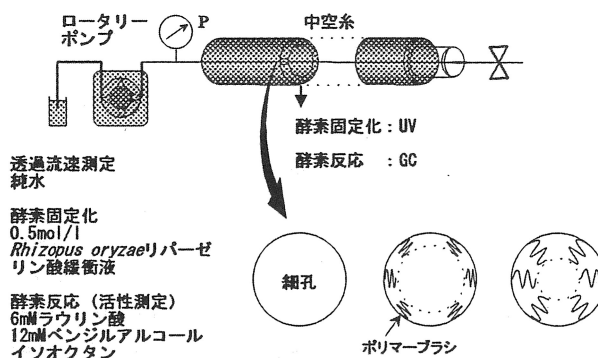


Fig.3 Experimental apparatus.

$$F(\text{m/h}) = \frac{\text{water permeation rate (m}^2/\text{h)}}{\text{inside surface area of the hollow fiber (m}^2\text{)}} \quad (3)$$

$$F(\text{m/h}) = \frac{n \pi r^4}{8 \mu L} \Delta P \quad (4)$$

ここでnは中空糸内側の膜面積1m<sup>2</sup>あたりの細孔数、aは中空糸内側の面積(m<sup>2</sup>)、Lは膜厚(m)、rは細孔径(m)、ΔPは透過圧力(Pa)、μは流体の粘度(Pa・s)を表す。細孔内のポリマーブラシが伸張していれば、細孔径が減少し透過流束が小さくなる。

## 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pH5.5~pH7.5の10mMリン酸緩衝液に溶解させ、0.5mol/lの酵素溶液を調製した。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(5)式を用いて計算した。リパーゼを吸着させた各中空糸を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、0.5M NaCl水溶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。細孔内へのリパーゼ固定化量は(6)式を用いて計算した。

$$\text{amount of lipase adsorbed (kg/kg-fiber)} = \int_0^V \frac{(C_0 - C)}{W} dv \quad (5)$$

$$\begin{aligned} \text{amount of lipase immobilized (kg/kg-fiber)} = \\ \text{amount of lipase adsorbed (kg/kg-fiber)} - \\ \text{amount of lipase elutes (kg/kg-fiber)} \end{aligned} \quad (6)$$

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 ( $\text{kg/m}^3$ )、 $V$ 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>12,15)</sup>、リパーゼの多層吸着の影響を避けるために、(7)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。

$$q_t = \frac{a_v (M_r / 1000)}{a N_a} \quad (7)$$

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。 $a$ 、 $M_r$ 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、分子量は電気遊動より求め、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。

## 2.5 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により評価した。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、この溶液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反応を開始した。反応は35℃、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。

また、連続反応を行う場合はFig. 3に示す透過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。このときのリパーゼ活性は(8)式を用いて計算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(9)式を用いて計算した。

基質であるラウリン酸、生成物である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。

$$\begin{aligned} \text{immobilized lipase activity (mol/(h kg-lipase))} = \\ \frac{\text{concentration of product (mol/m}^3) \times \text{flow rate of substrate solution (m}^3/\text{h)}}{\text{amount of immobilized lipase (kg)}} \end{aligned} \quad (8)$$

$$\text{space velocity (h}^{-1}) = \frac{\text{flow rate of substrate solution (m}^3/\text{h)}}{\text{membrane volume (m}^3)} \quad (9)$$

## 2.6 リパーゼ固定化中空糸の水分量測定

2.4で調製し、真空乾燥したリパーゼ固定化中空糸の水分を気化装置を備えたカールフィッシャー水分滴定装置 (MITSUBISHI Chemical Corp CA-07) で測定した。リパーゼ固定化中空糸内の水分を120℃で気化させ、乾燥窒素を用いて滴定容器内のメタノール中へ溶解させた後、カールフィッシャー試薬 (MITSUBISHI AQUAMICRON CXU) を用いて水分を滴定した。

## 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の特性をTable. 1に示す。グラフ率が同じ中空糸であるため細孔内に導入した高分子鎖の長さは等しいが、化学修飾することにより純水の膜透過流束がGMA-fiber、OH-fiber、DEA-fiberの順で減少していた。化学修飾前のポリエチレン中空糸の透過流束は $3.25 \times 10^{-4} \text{ m/s}$ であり、このことより、細孔径が上記の順で減少、つまりポリマーブラシがGMA-fiber、OH-fiber、DEA-fiberの順で伸張していることが示された。DEAポリマーブラシはDEA基の静電的反発によりポリマーブラシが最も伸張し、GMAポリマーブラシは疎水性であるため、水中ではほとんど伸張せず、OHポリマーブラシは親水性であるためDEAポリマーブラシとGMAポリマーブラシの中間の伸張を示したものと考えられる。

Table.1 The properties of the perpertrated hollow fiber.

	DEA	OH	GMA
Pure water flux (m/s)	$1.04 \times 10^{-4}$	$1.80 \times 10^{-4}$	$2.57 \times 10^{-4}$
Water content (kg/kg-lipase)	1.08	0.553	0.195
Amount of lipase immobilized (kg/kg-fiber)	$4.19 \times 10^{-2}$	$4.38 \times 10^{-2}$	$6.25 \times 10^{-2}$

The pure water flux through the trunk polymer (polyethylene hollow-fibers) was  $3.25 \times 10^{-4} \text{ m/s}$ .

各化学修飾中空糸へリパーゼを一層固定化した場合の酵素1kgあたりの水分量も、ポリマーブラシの伸張に伴って増加の傾向を示した。ポリマーブラシが伸張することにより、酵素固定化の際にポリマーブラシ間に水が保持されたものと考えられる。また、DEA-fiberは最高で $5.20 \times$

10<sup>-1</sup>kg/kg-fiberのリパーゼが固定化できた。これはリパーゼの吸着占有面積とDEA-fiberの比表面積から計算される単層吸着量の11倍に相当する。これらのことからDEA-fiberのポリマーブラシは伸張していることが示唆された。(Fig. 1)

### 3.2 リパーゼ固定化中空糸の活性評価

バッチ反応の再利用における各リパーゼ固定化中空糸の活性の経時変化をFig. 4に示した。GMA-fiberにリパーゼを固定化した場合は、再利用を繰り返すにつれて活性が減少した。一方、OH-fiberやDEA-fiberにリパーゼを固定化した場合は、3回以上の再利用において安定な活性を示した。また、いずれのリパーゼ固定化中空糸の場合も、24時間後（平衡時）における反応率は98%以上であった。遊離リパーゼおよびリパーゼを固定化していない中空糸を用いて比較実験を行ったところ、活性の低下が著しく、遊離リパーゼの活性は2回目の再利用では全く活性を示さなかった。

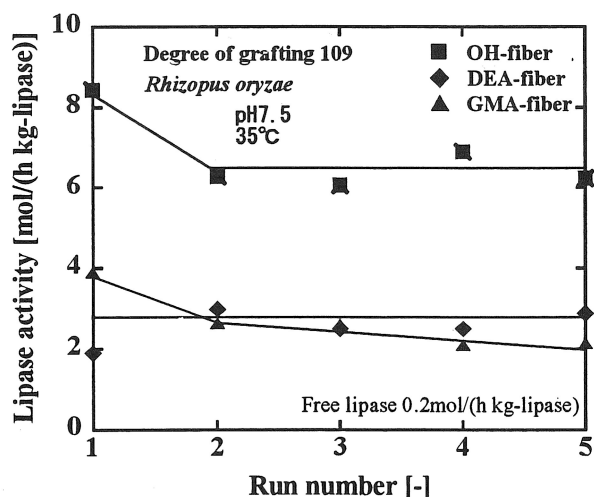


Fig4. Relationship between the activities of lipases immobilized onto hollow fibers and the number of uses.

上記の結果の理由として、以下のことが考えられる。3.1の結果よりDEA-fiberとOH-fiberのポリマーブラシはリパーゼを固定化及び被覆するのに十分に伸張しており、リパーゼが活性を示すのに十分な水、または、リパーゼの反応場である油-水界面を形成するのに十分な水を保持しているものと考えられる。また、DEA-fiberとOH-fiberにリパーゼを固定化した場合、DEA-fiberに固定化したリパーゼが低い活性を示すのは、リパーゼ表面のアミノ酸残基とDEA-fiberのカチオン性の官能基による静電的な相互作用が大き過ぎてリパーゼの立体構造が崩れたために活性が低下したものと考えられる。同様な酵素活性に対する被覆効果が界面活性剤修飾酵素でも報告されている。<sup>10)</sup>

一方、GMA-fiberのポリマーブラシはほとんど伸張して

いないため、リパーゼが活性を示すのに十分な水、または、リパーゼの反応場である油-水界面を形成するのに十分な水を保持できず低い活性を示したと考えられる。(Fig. 5)

上記結果より、OH-fiberにリパーゼを固定化した場合が最も高いエステル合成活性を示したが、DEA-fiberにリパーゼを固定化した場合もOH-fiberより活性は低いが、OH-fiberと同様な安定性を示した。またDEA-fiberはリパーゼを多層固定化できるためにリパーゼを多層固定化した場合は単位膜あたりの酵素活性が増大し、反応装置全体の生産能力の増大が期待できる。そこでDEA-fiberにリパーゼを多層固定化し、Fig. 3に示す実験装置を用いて細孔内に反応溶液を流してエステル合成を行った場合の空間速度がリパーゼ積層固定化DEA-fiberの活性に及ぼす影響について検討した。またその際、リパーゼ固定化pHが活性に及ぼす影響をバッチ実験で確認したところpH5.5のリン酸水溶液でリパーゼを固定化した場合が最も高い活性を示したので以後の実験ではpH5.5で調製したリパーゼ固定化DEA-fiberを用いた。

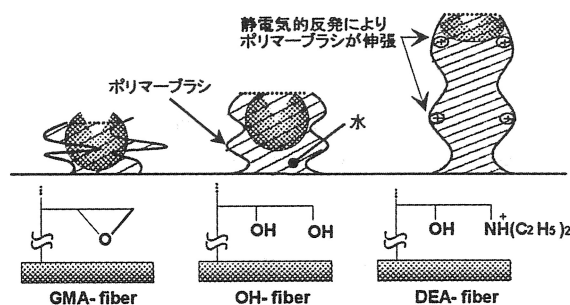


Fig5. Schematic illustration of lipase immobilized onto micropore surface of GMA-fiber, OH-fiber and DEA-fiber.

### 3.2 リパーゼ積層固定化DEA-fiberを用いた連続エステル合成反応

空間速度がリパーゼ積層固定化DEA-fiberの活性に及ぼす影響をFig. 6に示した。積層数とは、リパーゼの吸着占有面積とDEA-fiberの比表面積から計算される単層吸着量でリパーゼ固定化量を割った値であり、ポリマーブラシに理論上ついているリパーゼの個数である。図中の値はそれぞれの同温度におけるバッチ反応の活性である。いずれのリパーゼ積層固定化DEA-fiberも空間速度の増加に伴いリパーゼの活性が増加し、バッチ反応の場合と比較して約3倍の活性が得られた。特に、リパーゼを一層固定化した場合が単位リパーゼあたりの活性がバッチ、連続透過反応に伴い一番高く、バッチ反応の場合12.4mol/(h kg-lipase)、連続透過反応の場合、最大35mol/(h kg-lipase)になった。中空糸細孔内に基質溶液を強制的に透過させることにより、リパーゼへの基質の物質移動が促進されて反応速度が上昇し、より効率よく反応を進行できることが示された。しかしながら、単位リパーゼあたりの活性は積層数の増加



と伴に減少した。

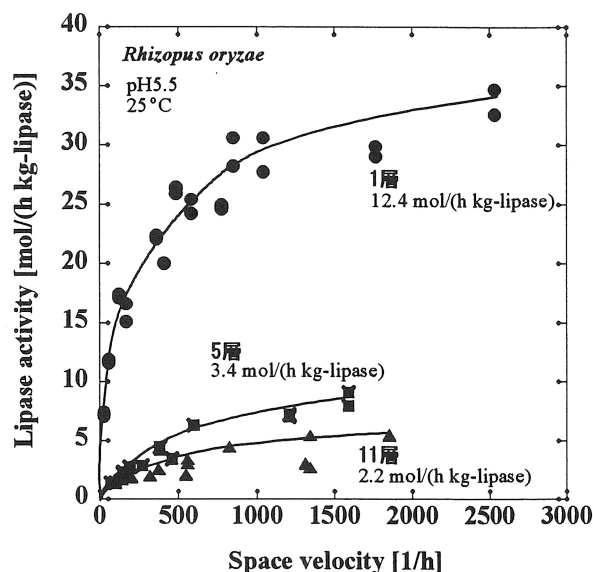


Fig. 6 Effects of SV of substrate solution on immobilized lipase activity.

Fig. 7に空間速度がリパーゼ積層固定化DEA-fiberの単位膜あたりの活性に及ぼす影響を示した。単位膜あたりの活性は積層数の増加に伴い活性が増加している。積層数の増加に伴い単位リパーゼあたりの活性が低下する理由として二層目以降は基質がポリマーブラシ内を移動し酵素に到達する物質抵抗が増大するために二層目以降のリパーゼ活性が見掛け上低下すると考えられる。

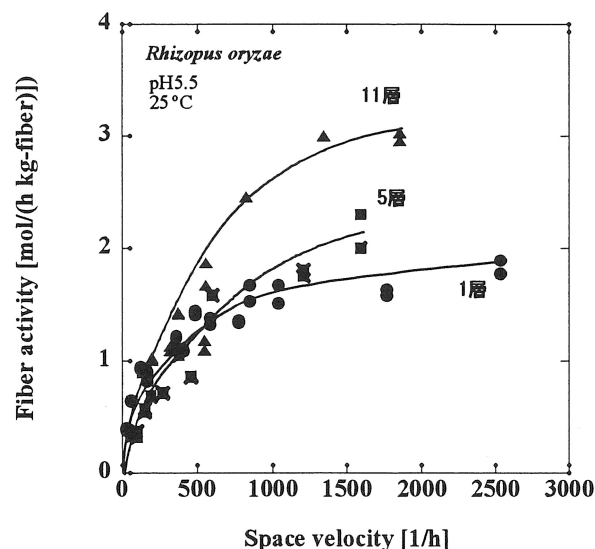


Fig. 7 Effects of SV of substrate solution on immobilized fiber activity.

#### 4 結言

本実験において、微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カチオン性のジエチルアミノ基、親水性の水酸基、疎水性のエポキシ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、DEA-fiberとOH-fiberに固定化したリパーゼはバッチ反応において安定な活性を示し、3回以上の繰り返し利用においても、活性が低下しなかった。特にOH-fiberに固定化したリパーゼは、遊離リパーゼと比較して活性が上昇し、中空糸細孔内へグラフト重合したポリマーブラシによる酵素保護効果と固定化が確認された。上記中空糸の細孔内におけるポリマーブラシの状態と水分量を測定したところ、上記の高活性の理由として、細孔内で伸張したポリマーブラシがリパーゼを被覆し、リパーゼが活性を示すのに十分な水、または、リパーゼの反応場である油-水界面を形成するのに十分な水を保持していることが示された。

多層リパーゼを固定可能なDEA-fiberにリパーゼを多層固定化した場合、単位膜あたりの活性が積層数の増加に伴い増加し、リパーゼ積層の効果が確認された。また、リパーゼ固定化DEA-fiberの中空糸細孔内へ基質を強制的に透過させた場合、空間速度の増大に伴い活性が増加し、11層固定化の活性が最大で35mol/(h kg-lipase)となった。これはバッチ反応の活性の12.4mol/(h kg-lipase)の約3倍であり、中空糸細孔内へ基質を強制的に透過させることにより基質の酵素への物質移動が促進され、生産性の増大が期待出来ることが示された。

#### 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) S. Hama, S. Tamalampudi, T. Fukumizu, K. Miura, H. Yamaji, H. Fukuda, Journal of Bioscience and Bioengineering, **101**, 328 (2006)
- 4) G. Hedstrom, M. Backlund, J. P. Biotechnol. Bioeng, **42**, 618 (1993).
- 5) C. M. L. Carvalho, M. R. Aires-Barros, J. M. S. Cabral, Biotechnol. Bioeng, **72**, 127 (2000)
- 6) Y. Okahata, Y. Fujimoto and K. Ijro, Tetrahedron Letter, **29**, 5113 (1988)
- 7) M. Goto, C. Hatanaka, M. Goto, Biochemical Engineering Journal, **24**, 91 (2005)
- 8) T. Mori, S. Kishimoto, K. Ijro, A. Kobayashi, Y. Okahata, Biotechnol. Bioeng, **76**, 157 (2001)
- 9) S. Kikkawa, K. Takahashi, T. Katada, Y. Inada, Biochem. Int, **19**, 1125 (1989)
- 10) K. Sakurai, K. Kashimoto, Y. Koder, Y. Inada, Biotechnol. Lett, **12**, 685 (1990)

- 11) H. Sakakibara, T. Tamura, T. Suzuki, T. Hisano, S. Abe, K. Murata, J. Pharm. Sci, **91**, 1191 (2002)
- 12) M. Goto, H. Kawakita, K. Uezu, S. Tsuneda, K. Saito, M. Goto, M. Tamada, T. Sugou, J. Am. Oil Chem. Soc, **83**, 209 (2006)
- 13) G. Hagen, Pogg. Ann. d. Physik. u, Chem, **46**, 423 (1839)
- 14) J. L. M. Poiseuille, Crit. Rev. Acad. Sci, Paris **11**, 961 (1840)
- 15) M. Tamada, T. Sugo. W. Lee, Biotechnol. Prog, **19**, 396 (2003)
- 16) M. Goto, H. Kameyama, M. Goto, M. Miyata, and F. Nakashio, J. Chem. Eng Jpn, **26**, 109 (1993)
- 17) K. Saito, K. Saito, K. Sugita, M. Tamada, T. Sugo, J. Chromatogr A, **954**, 277 (2002)

(2008年10月10日 受理)