

# アミノエタノール基を有する酵素固定化担体を用いた非水媒体中のエステル合成

後藤 宗治・太田 亮介・川喜田 英孝<sup>1)</sup>・上江洲 一也<sup>2)</sup>

Esterification reaction in non-aqueous media by using immobilizing enzyme carrier with amino ethanol group

Muneharu Goto, Ryousuke Ota, Hidetaka Kawakita, and Kazuya Uezu

## Abstract

Various functional groups [hydroxyl (OH-fiber), diethyl amino (DEA-fiber) or amino ethanol (AE-fiber)] 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 AE-fiber was used, the lipase activity reached about 400 times compared with native lipase. It was found that hydroxyl group important roles for stability of immobilizing enzyme in non-aqueous media.

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

## 1. 緒言

酵素は、反応を常温常圧で進行させ、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が、酵素を非水環境下で使用できれば、油脂の改質やバイオディーゼル燃料の生産を選択的、省エネルギー的に行うことが可能となる。このよう非水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)</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相互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。(Fig. 1)しかしながらこのような修飾酵素は非水媒体に溶解してしまう。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。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(Fig. 2)。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。前報<sup>12)</sup>において、親水性ポリマーブラシを用いて酵素を固定化した場合、非水媒体中で通常の遊離酵素と比較して、高安定性と活性を示すことが明らかとなった。本実験では、親水性の官能基を有するポリマーブラシが非水環境下における酵素のエステル合成活性に及ぼす影響について検討した。

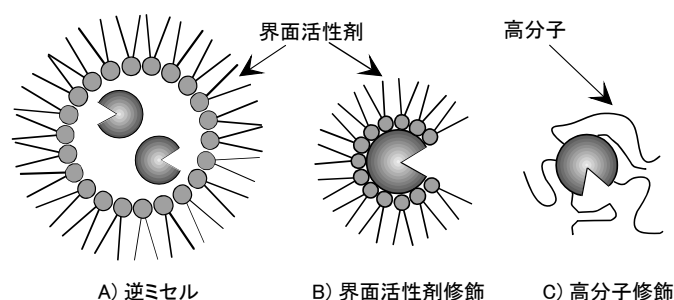


Fig.1 Schematic diagram of modifying methods of enzyme.

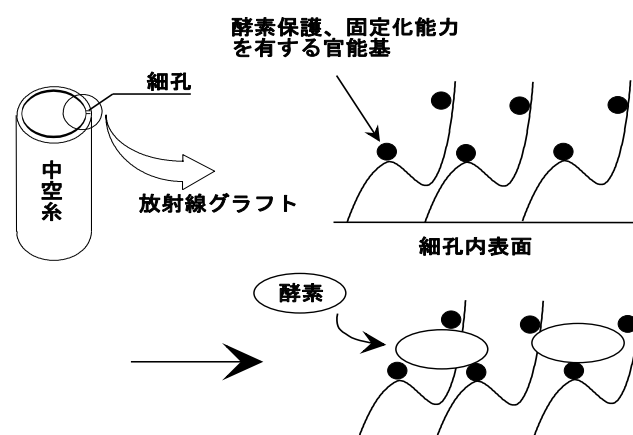


Fig.2 Schematic diagram of lipase immobilized onto the pores of hollow fiber.

1) 佐賀大学・理工学部

2) 北九州市立大学・国際環境工学部

## 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(GMA)、アミノエタノール(AE)、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 中空糸細孔内への親水性ポリマーブラシ導入

中空糸細孔内への親水性ポリマーブラシ導入のフローチャートをFig. 3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。本実験では、ポリマーブラシへの導入する親水性官能基として、水酸基、ジエチルアミノ基、アミノエタノール基の導入は、以下の方法で行った。

- 1) 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)。
- 2) GMA-fiberを40℃の50vol%DEAが溶解したエタノール溶液に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。
- 3) GMA-fiberを40℃の75vol%AEが溶解したエタノール溶液に8時間浸漬し、AE基を導入した中空糸(AE-fiber)を調製した。

上記で導入した官能基の導入率は、(2)式を用いて求めた。

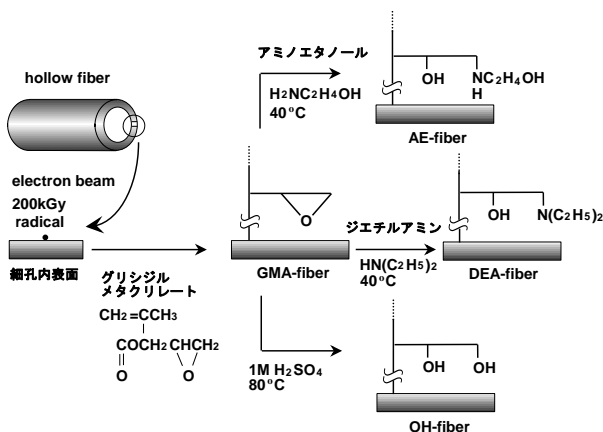


Fig.3 Schematic diagram of chemical modified hollow fiber preparation.

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

molar conversion (%) =

$$\frac{\text{moles of functional group after functional ization}}{\text{moles of epoxy group before functional ization}} \times 100 \quad (2)$$

### 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pH5.5~pH7.5の10mMリ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. 4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)式を用いて計算した。リパーゼを吸着させた各中空糸をリパーゼを固定化した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、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。また、pH3.5~5.5で固定化酵素を調製する場合は0.1Mクエン酸緩衝液を用いて固定化を行った。

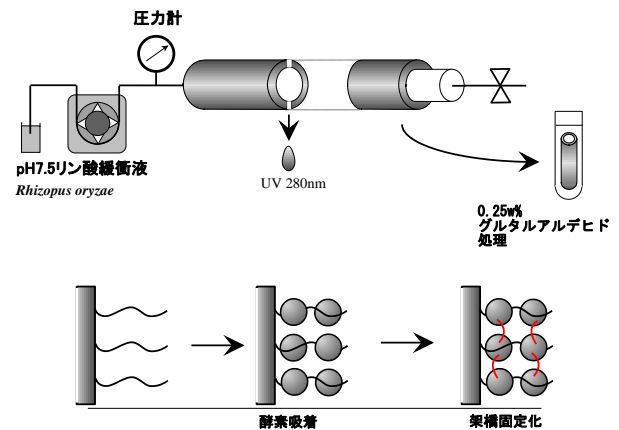


Fig.4 Experimental apparatus.

細孔内へのリパーゼ固定化量は(4)式を用いて計算した。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>12,15)</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。

amount of lipase adsorbed (kg/kg<sub>-fiber</sub>)

$$= \int_0^V \frac{(C_0 - C)}{W} dv \quad (3)$$

$$\begin{aligned} \text{amount of lipase immobilized (kg/kg - fiber)} = \\ \text{amount of lipase adsorbed (kg/kg - fiber)} \\ - \text{amount of lipase eluted (kg/kg - fiber)} \quad (4) \end{aligned}$$

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

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。 $a$ 、 $M_r$ 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。

また、連続反応を行う場合はFig. 4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。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。

$$SV (h^{-1}) = \frac{\text{flow rate of substrate solution (m}^3\text{/h)}}{\text{membrane volume excluding the lumen part (m}^3\text{)}} \quad (6)$$

$$\begin{aligned} \text{immobilized lipase activity (mol/(h kg}_{-}\text{lipase}))} = \\ \frac{\text{product concentration (mol/m}^3\text{)} \times \text{substrate flow rate (m}^3\text{/h)}}{\text{amount of immobilized lipase (kg)}} \quad (7) \end{aligned}$$

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。

## 2.5 固定化酵素の水分量測定

固定化酵素内の水分量は、固定化酵素を120℃で過熱し、蒸発してきた水蒸気を窒素ガスを用いてカールフィッシャーの適定セル内の溶媒に溶解させて、三菱化学株式会社製のカールフィッシャーCA-07を用いて行った。

## 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。グラフト率が同じ中空糸であるが、AE-fiberの非表面積が異なっている。このことよりポリマーブラシのエポキシ基を化学修飾することにより細孔内の状態が変化していることが推察される。

Table.1 The properties of the prepared hollow fiber.

	AE	DEA	OH
Molar conversion (%)	100	99	100
Degree of GMA grafting (%)	109	109	109
Specific surface area (m <sup>2</sup> /kg)	9.67X10 <sup>3</sup>	1.97X10 <sup>4</sup>	1.80X10 <sup>4</sup>

### 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リン酸緩衝液のpHがバッチ反応活性に及ぼす影響をFig. 5に示した。リン酸緩衝液の緩衝能力の範囲において、カチオン性の官能基を有するAE-fiberとDEA-fiberに固定化したリパーゼの活性はpHの低下につれて活性の上昇が確認された。一方、水酸基を有するOH-fiberに固定化したリパーゼの活性はどのpHにおいても同程度の活性であるが、pH6.5あたりに最大活性を示した。以上の結果より最も高い活性を示したAE-fiberに固定化した酵素の固定化時のpH5.5以下における酵素活性のpH依存性をクエン酸緩衝液を用いて測定した。結果をFig. 6に示す。使用する緩衝液の種類により酵素活性は若干影響を受けるが、pH5.5付近で最大活性を示すことが示された。

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。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、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。

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。

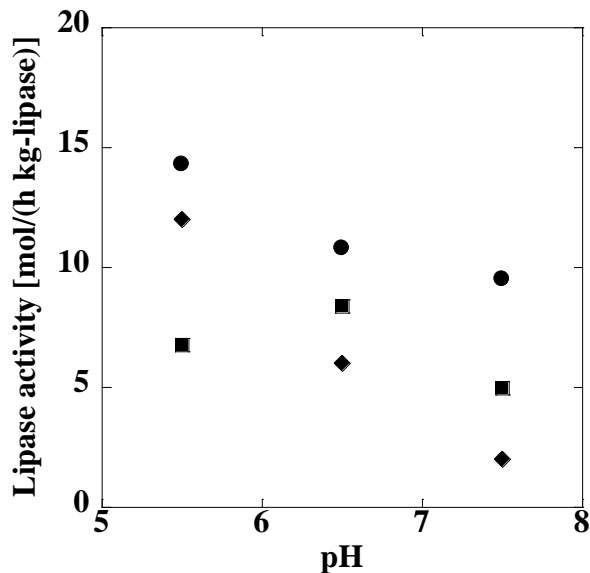


Fig.5 Relationship between the activities of lipases immobilized onto hollow fibers and immobilized pH.

した。リパーゼ固定化時の pH は中空糸細孔内のポリマーブラシの伸張状態を変化させ、水分の保持量を変化させた結果、活性に影響を及ぼしたものと考えられる。

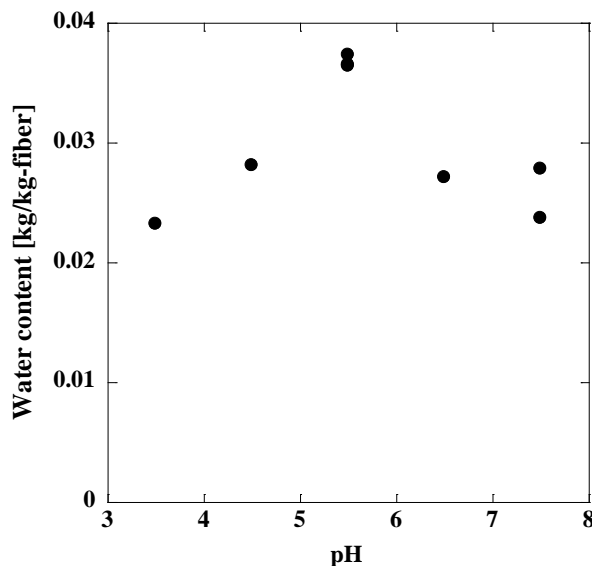


Fig.7 Effect immobilized pH on water content of lipase immobilized hollow fiber.

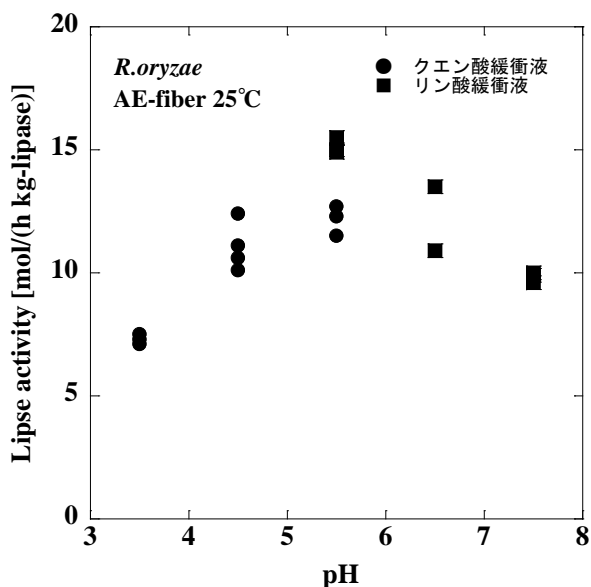


Fig.6 Effect of immobilized pH on the activities of lipase immobilized on AE-fiber.

### 3.3 リパーゼ固定化中空糸の水分量

酵素活性は水分量に対して最大値を有することが報告されている。単位固定化担体あたりが含む水分量とリパーゼ固定化時の pH の関係を Fig. 7 に示す。pH 5.5 において水分量が最大となった。3.2 における活性と pH の関係と同様の傾向を示

### 3.4 リパーゼ固定化中空糸の活性評価 (連続反応)

3.2 のバッチ反応の結果より、各固定化リパーゼが最も高い活性を示した pH で調製した固定化リパーゼを Fig. 4 に示す実験装置に取り付け、細孔内に反応溶液を流してエステル合成活性を測定した。空間速度が固定化リパーゼの活性に及ぼす影響を Fig. 8 に示した。空間速度の増加に伴いリパーゼの活性が増加し、空間速度 1600 h<sup>-1</sup> 以上においてバッチ反応時の活性と比較して DEA-fiber、OH-fiber、AE-fiber にリパーゼを固定化した場合、それぞれ約 3 倍、4.5 倍、5.6 倍となった。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。遊離リパーゼのバッチ活性と比較した場合はそれぞれ、約 140 倍、200 倍、400 倍となり、ポリマーブラシを介して酵素を固定化することにより非水媒体中で高い酵素活性を発現できることが示された。

上記の結果より官能基が非水媒体中のリパーゼ活性に及ぼす影響としては、OH-fiber と AE-fiber は水酸基を 2 つ、DEA-fiber は水酸基を 1 つ有しており (Fig. 3)、水酸基が多いほど高い酵素活性が発現する傾向が示された。

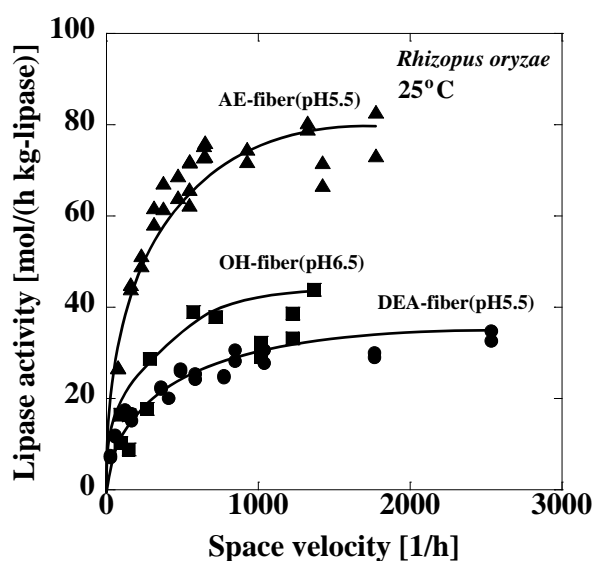


Fig.8 Effects of SV of substrate solution on immobilized lipase activity.

#### 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、ポリマーブラシを導入する官能基として親水基を多く有する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) 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. Ijio, Tetrahedron Letter, **29**, 5113 (1988)
- 7) M. Goto, C. Hatanaka, M. Goto, Biochemical Engineering Journal, **24**, 91 (2005)
- 8) T. Mori, S. Kishimoto, K. Ijio, 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. Kodera, 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)

(2010年10月9日 受理)