

論文の内容の要旨

氏名：納 谷 昌 和

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題名：疎水性担体に固定化した Lipase による脂質の改質反応における溶媒の機能と活性の高度化プロセス

1. 緒論

バイオ系の有用化合物の工業的な生産にとって酵素はその生産反応の基幹となる生体触媒である。しかしながら、脂質を基質とする疎水性酵素反応の例は限られている。これは、疎水性反応に相応しい担体の開発と溶媒の機能に関する知見が親水性基質の酵素反応に比べて乏しく、固定化酵素の繰り返し利用の実証実験の結果も十分とは言えないためであり、固定化 Lipase に関する研究は、現在もなお多く継続的に発表されている。脂質・リン脂質等の疎水性基質を出発成分とする生体関連の機能性物質（食品・医薬品など）は利用が拡大しており、この分野に酵素反応を本格的に導入するには酵素担体と溶媒の機能に関する知見を体系的にまとめると共に、固定化酵素の繰り返し利用においても高レベルに活性を発現しなければならない。また、反応系全体の安全性や環境負荷にも配慮した反応システムの構築を目指す必要がある。

本研究の目的は、酵素(Lipase)を疎水性担体に固定化し、疎水性溶媒において脂質の改質反応(加水分解)を行い、各溶媒における活性を高度に発現するプロセスの条件を求めることである。疎水性溶媒中において安定性に優れた担体の選定と酵素固定化の実現、反応速度パラメーターの決定、固定化酵素の反復利用の実証を通じて、担体と溶媒の機能的役割を明らかにし、食品・医薬品・化粧品等に用いられる生成物に向けて安全性にも優れた高度化された固定化酵素プロセスを提案する。本研究では、①疎水性担体に固定化された Lipase の速度論解析を行うこと、②反復利用の活性発現を Lipase の起源別に実証すること、③超臨界二酸化炭素中における反応活性の実証と④リアクター設計に向けた速度論解析を研究位置付けのポイントとしている。

2. 酵素固定化担体の基本物性

本研究ではポリプロピレン製の疎水性多孔質固体(Accurel (MP-100))を選定した。疎水性溶媒下における優れた耐性(強度)と素材自身の疎水性、十分な多孔質物性に着目した。Accurel は、SEM 観察により、1~3 μm の細孔が確認できた。さらに、水銀圧入法による細孔径分布の測定結果から、Accurel 粒子は表面開口部が 1 μm オーダーの基質や酵素にとって十分な拡散性が期待できる細孔開口部を有し、細孔内部に進むにしたがって 0.1 μm オーダーの微細孔に分岐している多段階層構造が明らかとなった。従来の固定化酵素の研究では、ゲル並びに各種担体の微細孔の構造が *a priori* に与えられ、酵素にとって最適な空間のサイズや表面疎水性等の物性は後付けの考察に留まる傾向がみられた。本研究で選定した Accurel は、開口部は広く、細孔内部で分岐する二階層構造を有し、物質の拡散過程の制約を回避する因子として有効である。

担体の物理的な細孔構造と共に、粒子径も担体の機能的役割支配する因子である。本研究では担体を粉碎し、3種類の粒子群を調製した(平均直径：0.67 mm、1.01 mm、3.00 mm)。粒子の微細化によ

て内部の細孔構造が露出するため、微細化されるに伴って小さな開口部が密集化する傾向がある。微細化によって、拡散過程の改善と共に、粒子の表面開口部の閉塞予防や粒子自身の機械的強度の維持などを勘案して実用化する必要がある。

3. Lipase の固定化

3. 1 実験方法

Accurel 担体に Lipase を直接固定化することは困難であったため、担体への Lipase の吸着を行い、次いでグルタルアルデヒドによる架橋による固定化を試みた。すなわち、固定化に向けた前処理として第1は担体の形状因子として粒子径、第2は化学処理である。本研究では、起源の異なる4種の Lipase (*Rhizopus arrhizus*, *Wheat germ*, *Candida cylindracea*, *Candida rugosa*)を使用した。*R. arrhizus* 由来の Lipase は、1,3 位特異性であり、他3種は1,2,3 位特異性である。起源が異なると特異性ばかりでなく、分子構造や疎水性も異なる。

3. 2 結果および考察

第1の前処理の効果として、粒子径が微細になるほど粒子単位質量当たりの吸着量が増大した。これは、粒子単位質量当たりの外表面積の増大の影響と考えられるが、外表面積の増大は0.67 mmの粒子と3 mmの粒子で5倍も異なるにもかかわらず、吸着量の増加は1.25倍であった。これは Accurel の内部に大多数の酵素が吸着されているため、相対的に外表面積増分の寄与が小さかったためと考えられる。なお、架橋操作後の固定化収率は極めて高く(98%)、吸着量はそのまま固定化量とみなすことができる。

なお、Accurel への吸着量は、酵素の疎水性尺度(Kyte & Doolittle(1982))と明らかな相関が見られた。親水性の高い Lipase ほど吸着量が多いのは、前処理のエタノールによる Accurel 粒子の前処理の効果と考えられる。

4. 有機溶媒中での固定化 Lipase による加水分解反応

4. 1 実験方法

固定化 Lipase の実験に先立って、自由溶液系(W/O microemulsion)の実験を行った。基質(トリオレイン)と両親媒性成分(シュガーエステル)を含む有機相(イソオクタン)に可溶化し、生成物であるオレイン酸濃度を Lowry-Thinsley 法によって求め、脂肪酸生成量により酵素の基本活性を評価した。なお、水分は W/O microemulsion の微小(サブミクロンレベル)な分散水相に存在し、この微小な分散水相内に酵素が可溶化され、微小水相の界面において加水分解反応が生じている。また、固定化 Lipase 系では、*C. rugosa* にて反応活性に対する担体粒子径の影響を評価し、代表径3 mmの粒子によって *C. rugosa* に加えて *R. arrhizus* についても活性を比較した。さらに、反応後に Accurel 担体を回収し、*R. arrhizus* にて10回の反復実験を行い、固定化酵素の反応活性の評価と維持を実証した。

4. 2 結果および考察

自由溶液系の実験より、最大反応速度、Michaelis-Menten 定数を求めた。固定化 Lipase によるトリオレインの加水分解反応は遅れ時間なく迅速に開始された。本研究での固定化手法では、Accurel の細孔に閉塞は無く、基質が容易に担体内部を拡散していることが証明され、反応速度の支配因子は拡散律速条件下ではない。そこで、粒子径が異なる固定化 *C. rugosa* の結果から、律速段階の評価指標(Thiele modulus)を用いて、反応の律速機構について考察した。Accurel 担体の粒子径を制御することで、Thiele modulus 値(ϕ)が $\phi < 3$ を実現でき、拡散律速を回避できる可能性を実証した。理論計算上の有効係数(η_{th})は、Accurel の粒子径が細くなるほど増大し、*C. rugosa* については、少なくとも 60%以上の活性を発現する粒子径を明らかにした。

代表粒子 3 mm の Accurel を用いて、*R. arrhizus* と *C. rugosa* の活性を比較したところ、*R. arrhizus* の活性が上回り、酵素活性(収率基準)は 50%に達し、10 回の繰り返し実験において、脂肪酸の生成量が自由溶媒系の 50%の活性を減衰することなく高度に発現した。なお、この値は、理論上求められた有効係数の計算値(0.4)を上回っている。

5. 超臨界二酸化炭素中での固定化 Lipase による加水分解反応

5. 1 実験方法

固定化 Lipase の活性は本研究の範囲では比較的高度に発現することを確認した。工業プロセスとして応用する際には、溶媒の機能と安全性に留意する必要がある、本研究では超臨界二酸化炭素を溶媒として注目し、固定化 Lipase の加水分解反応プロセスを設計した。超臨界二酸化炭素中の反応においても、供給する基質中に W/O microemulsion として、酵素を含む微小水相として水分を供給している。本研究では、3 mm 径の粒子でも高活性を発現した *R. arrhizus* 由来の Lipase に注目し、二酸化炭素の臨界点に留意した温度(313-328 K)・圧力(5-20 MPa)の条件下で、酵素活性を評価した。

5. 2 結果および考察

起源の異なる 4 種の固定化 Lipase による超臨界二酸化炭素(10MPa, 313K)を溶媒とした脂質の加水分解を行ったところ、*R. arrhizus* 由来の Lipase は、*C. cylindracea*、*C. rugosa*、*W. germ* 由来と比較して、初期反応速度、反応生成物量ともに約 2 倍の活性を発現した。なお、亜臨界状態(5 MPa, 313 K)よりも、超臨界状態で反応を実行した方が高活性であった。

固定化酵素の反復利用(5 回)において、*R. arrhizus* 由来の Lipase は 5 回の反復後の活性は初回の 60% になった。他の 3 種の Lipase は 5 回反復後の活性は 80%以上であった。*R. arrhizus* 由来の Lipase は初回の活性が他の Lipase と比較して約 2 倍あるので依然として高活性の固定化 Lipase と言える。反復利用によって、基質や反応生成物による担体細孔の閉塞が生じている場合も考えられるので、今後は高活性を安定に維持する固定化方法や活性の回復手法について検討を進める必要がある。また、超臨界二酸化炭素中での酵素反応の速度論的解析により、 V_{max} と K_m を決定した。超臨界流体の一般的な拡散係数から求めた超臨界二酸化炭素系での Thiele modulus 値(ϕ)は、0.37 であり、反応律速条件とされる $\phi < 0.3$ に漸近しており、高い有効係数(0.8 以上)が期待でき、固定化酵素の活性が高度に維持されると言える。

6. 総括

- ①固定化 Lipase の担体として Accurel (MP100) を選択し、粒子の基本性状とともに、起源の異なる 4 種の Lipase を担体に吸着させ、グルタルアルデヒドによる架橋固定化を行った。
- ②担体への固定化量は Lipase の親水性が高いほど多い傾向が認められた。担体をエチルアルコールで前処理することによる効果と考えられる。4 種の Lipase とも、吸着量の 98% 以上の優れた固定化収率を達成した。
- ③W/O micro-emulsion 系での酵素反応で酵素活性の基本評価を行い、粒子径を変化させた固定化により、拡散過程の制約を回避できる可能性を示した。固定化 *R. arrhizus* の活性は 10 回の固定化酵素の反復利用においても活性の低下は見られず、50% の活性を高度に発現した。
- ④超臨界二酸化炭素を反応溶媒とする活性評価では、*R. arrhizus* 由来の Lipase の活性が優れており、5 回の反復利用において 60% の活性が継続的に発現した。また、基質の高濃度域においても、基質濃度に比例した活性が認められたことから、基質の高濃度域における大量生産の可能性が認められた。固定化 Lipase の速度パラメーターより、バイオリクターシステムの構築の指標を得た。

これら一連の成果を通じて、疎水性担体に高収率に Lipase を固定化し、有機溶媒と超臨界二酸化炭素において脂質の加水分解反応を実行し、速度論的視点から溶媒の機能と工業的プロセスにおける活性発現に向けた有用な知見を得た。