

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

日本大学大学院 生物資源科学研究科 生物資源利用科学専攻

博士後期課程

納谷昌和

2014

## 第1章 疎水性基質の酵素反応に関する既往の研究と本研究の目的

1-1	緒言	1
1-2	疎水性酵素反応の有用性と工業的利用	1
1-3	Lipase の種類と機能	2
1-4	反応機構と研究例	6
1-5	酵素固定化担体と固定手法の展開	7
1-6	超臨界二酸化炭素の生体触媒反応への応用	12
1-7	本研究の目的	14
1-8	本論文の構成	15

## 第2章 疎水性高分子による多孔質担体の細孔空間と表面特性

2-1	固体多孔質担体の有用性と疎水性反応への応用	17
2-2	本章の目的	17
2-3	検討担体	18
2-3-1	Silica gel	
2-3-2	Zeolite	
2-3-3	Accurel MP-100	
2-4	担体の疎水性評価	23
2-4-1	蛍光色素による表面疎水性の評価	
2-4-2	接触角からの評価	
2-5	走査型電子顕微鏡(SEM)による細孔構造の観察	26
2-5-1	電子顕微鏡	
2-5-2	解析方法	
2-5-3	観察結果・考察	
2-6	水銀ポロシメーターによる細孔空間の詳細構造	29
2-7	走査型プローブ顕微鏡(SPM)による表面構造の観察	35
2-7-1	SPM による表面構造の解析	
2-7-2	SPM による解析結果	

2-8 本章の結論	38
-----------	----

### 第3章 Lipase の高分子多孔質担体への吸着特性と架橋法による酵素の固定化

3-1 多孔質高分子を担体とした固定化 Lipase の調整	39
3-2 酵素の固定化法	39
3-3 本章の目的	41
3-4 吸着実験系および解析方法	41
3-4-1 試薬の調製	
3-4-2 Accurel への Lipase 吸着	
3-4-3 Silica, Zeolite への Lipase 吸着	
3-5 吸着実験結果および考察	45
3-5-1 Silica, Zeolite への Lipase 吸着	
3-5-2 前処理としてのエタノールの影響	
3-5-3 前処理としての Accurel の粒子径の影響	
3-5-4 起源の異なる Lipase の吸着	
3-6 Lipase の起源と吸着特性	50
3-7 固定化実験系および解析方法	54
3-7-1 グルタルアルデヒド処理による固定化 Lipase の調製	
3-7-2 固定化収率に対する吸着操作に用いた pH の影響	
3-7-3 固定化収率に対する粒子径の影響	
3-7-4 固定化収率に対する Lipase の起源の影響	
3-8 本章の結論	58

### 第4章 固定化 Lipase の形状因子と細孔空間の機能的役割に注目した反応活性の速度論

4-1 疎水性反応の媒体	60
4-2 固定化酵素の反応活性に対する有機溶媒の影響	62
4-3 各種固定化酵素の反応活性に関する既往の研究	63
4-4 本章の目的	64
4-5 W/O マイクロエマルション系における Lipase による脂質の改質反応の速度論実験および解析方法	64
4-5-1 生成物の定量法(Lowry-Tinsley 法)	
4-5-2 試薬の調製	

4-5-3	Lipase によるトリオレインの加水分解反応	
4-5-4	実験結果および考察	
4-6	有機溶媒中で Accurel に固定化された Lipase による脂質加水分解実験	79
4-6-1	固定化 Lipase によるトリオレインの加水分解反応	
4-6-2	実験結果および考察	
4-7	担体の形状因子に注目した反応活性	84
4-8	速度論的解析に基づく高分子多孔質担体の形状因子と細孔空間の機能的役割	89
4-9	繰り返し利用の実証	94
4-10	本章の結論	95

## 第5章 超臨界二酸化炭素を溶媒として使用した固定化 Lipase による脂質加水分解における反応活性と速度論

5-1	固定化酵素の反応活性に対する反応媒体の影響	97
5-2	超臨界二酸化炭素に対する酵素分子と酵素活性に関する 既往の研究	97
5-3	本章の目的	98
5-4	超臨界二酸化炭素中での固定化 Lipase による脂質加水分解実験	98
5-4-1	生成物の定量法(ガスクロマトグラフィー法)	
5-4-2	超臨界二酸化炭素中での固定化 Lipase によるトリオレインの加水分解反応	
5-5	速度論的解析に基づく超臨界流体溶媒の機能性	101
5-6	温度・圧力の影響	106
5-7	連続的プロセスを目指した反復利用試験	108
5-8	リアクターの直列多段化による反応転化率のシミュレーション	109
5-9	本章の結論	113

## 第6章 本研究の総括とオリジナリティー

6-1	本論文の要旨	114
6-2	本研究の総括	116
6-3	本研究のオリジナリティーと学術的価値	117
6-4	本研究の課題と今後の展望	118

参考文献	120
本論文に関する研究業績	124

## 第1章 疎水性基質の酵素反応に関する既往の研究と本研究の目的

### 1-1 緒言

酵素はもとより生体内の化学反応の触媒として存在するタンパク質であり、酵素は分子として単に生体内に存在するのではなく、細胞組織の一部にその役割に応じて存在している。一般に生体内は親水的であることを考慮すると、多くの酵素分子は、親水的な環境に存在し、関与する反応もまた多くは親水的基質に依っている。一方疎水性物質（脂質など）を基質とする酵素反応も存在する。Lipase は脂質の加水分解、エステル交換、エステル合成など脂質の改質反応全般にわたり中心的役割を果たしている。脂質を基質とする疎水性酵素反応の実用例は限られている。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る。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。

### 1-2 疎水性酵素反応の有用性と工業的利用

酵素の工業的利用に際しては、酵素を担体に固定化した固定化酵素が従来から多く研究報告されており、実用化も進んでいる。しかしながら、Lipase は、三大消化酵素の一つとして重視されるにもかかわらず、その基質である油脂が水に不溶であり、酵素反応が不均一系で行われるために、その研究はアミラーゼやプロテアーゼのように親水性基質を扱う酵素に比べて立ち遅れた面は否めない。応用面でも古くは、消化剤の他にはほとんど見るべきものがなかった時代もあった。

現在では、Lipase を用いた脂質の加水分解反応による高級脂肪酸の生産、エステ

ル交換やエステル合成法による脂質の改質，あるいはモノ・ジグリセリド等の食品工業において有用な物質の生産に関する研究が盛んに行われている．また，反応系も多岐にわたっており，1990年に Wang らによって emulsion 法，1985年に Hoq らによって膜型反応器，1986年に Han らによって W/O microemulsion 法等の様々な反応系について検討されている．

種々の生化学反応を化学工業の場で応用するために人工的に設計された反応器（バイオリクター）は現在では実用化の指針も成熟しつつあり，一般的に活用されている．その利点としては，生化学反応が生物の生存し得る温和な条件（常温・常圧・中性付近）で進行することから，従来の化学工業のプロセスに比べて，エネルギーの節減をはじめ，反応工程の簡易化と，それに伴う製品の高品質化，さらには有害な化学触媒や産業廃棄物のもたらす公害の防止などが挙げられる．特に Lipase の場合は，従来の化学工業のプロセスでは不可能であった不飽和脂質関連の有用物質の生産，例えば，ポリエン酸の生産や，それらのエステル化やエステル交換による生理活性物質の生産もバイオリクターを利用すれば可能となる．

食品工業においてオレイン酸のような高級脂肪酸はその生理活性が注目されている有用な物質の1つである．マーガリン・食品乳化剤の原料となるトリグリセリドの部分的に加水分解されたジオレインやモノオレインは食品科学の分野でも付加価値が高い．現在の精製法は高温・高圧を用いた非常にエネルギーコストの高い手法を用いている．

### 1-3 Lipase の機能と種類

#### <Lipase の機能>

Lipase の機能の一つとして，加水分解反応に利用した場合，食品用フレーバーの製造などを挙げることができる．トリグリセリドを Lipase で加水分解して遊離する脂肪酸が，その種類により異なるフレーバーを示すことがその理由である．例えば牛乳のトリグリセリドを Lipase で加水分解して生成する脂肪酸のうちで，短鎖脂肪酸はチーズ香，それより長い脂肪酸はミルク香を，さらに長い脂肪酸はバター香を示すといわれており，フレーバー増強用の食品添加物として，乳製品，菓子，アイスクリーム，業務用チーズなどに広く使用されている．また，食品中に含まれる

油脂の除去の目的でも使用される。例えば卵白中に混在する卵黄由来の油脂を Lipase で分解して除去を行う。

合成用酵素として用いられる Lipase は、エステル結合に作用する酵素としてエステル合成・交換反応に使用される。合成反応の代表的な用途に油脂改質がある。ジグリセリドを多く含む油脂に Lipase を用いることにより脂肪酸をトリグリセリドに変換することにより、品質の向上が図ることができる。また、転移反応としては、油脂の脂肪酸を他の脂肪酸に置き換えることにより、油脂の付加価値の向上を図ることができる。脂肪酸とアルコールとをエステル合成して、各種の香料の製造もできる。Lipase の優れた不斉認識能はキラル合成の用途にも用いられている。キラル合成用を使用するためには有機溶媒中で安定であることが重要であるが、一般に Lipase 類は、酵素表面に脂溶性のアミノ酸が多く、有機溶媒中でも立体構造を維持しており、分子構造の安定性が高いといわれている。

Lipase の活性中心を構成するアミノ酸残基は、セリン、アスパラギン酸、ヒスチジンであり、セリンプロテアーゼの活性中心と類似している。活性中心を覆うように  $\beta$ -シートの「ふた構造(lid)」があることが特徴である。「ふた構造」に覆われているときは不活性型であり、疎水的になると「ふた構造」が開化し活性型になる。

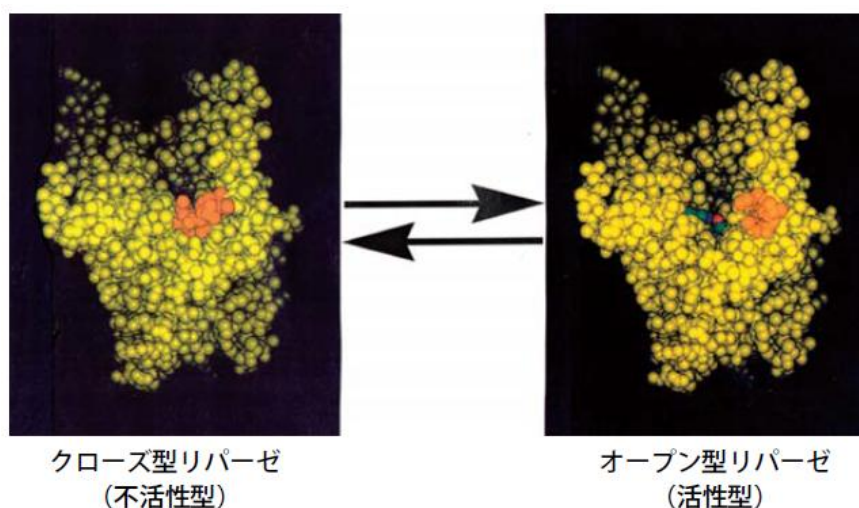


Fig.1-1 *Rhizomucor miehei* lipase の立体構造変化 (リパーゼの機能と食品への応用, 「食糧-その科学と技術」 No.45, 農業・食品産業技術総合研究機構 (2007))

先に述べたように、Lipase は脂肪酸とグリセリンからなるトリグリセリドを基質として、加水分解、合成、または交換反応を行う。Lipase は基質であるトリグリセリドの多様性から、反応特異性が異なる数多くの種類が知られている。



Lipase がトリグリセリドに作用して脂肪酸を遊離する時に、どの位置のトリグリセリドを加水分解するのかは Lipase の種類により異なり、これを位置特異性という。α 位及び α' 位に作用、β 位に作用そして α 位、α' 位、β 位ともに作用する 3 種類がある。ちなみに、トリグリセリドの脂肪酸結合の中央の位置を β 位 (2 位) といい、外側の位置を α 位 (1 位) 及び α' 位 (3 位) という。トリグリセリドに結合している脂肪酸の鎖長 (炭素数) は 2~24 前後と幅が広い。短鎖の脂肪酸結合、あるいは中鎖の脂肪酸結合及び長鎖の脂肪酸結合を良く加水分解する Lipase に大きく分類できるが、必ずしも明確に区別されていないようである。

### < Lipase の起源 >

酵素の資源を生物に求めるとき、一般に微生物が最も優れている。その理由として 4 点が挙げられる。①微生物起源の酵素の特性が多様であるため、応用に合致した酵素を見つけやすい。②短時間に酵素の生産が可能である。③生産性の優れた菌株を自然界から見出したり、育種したりすることができる。④動物・植物細胞に比べ安価な培地原料で酵素を生産できる。特に③については、現在もなお多大な努力が払われている。

一方、動植物起源の Lipase としては、ブタ脾臓 Lipase と油脂を多量に含む種子が発芽するときに生産する Lipase とが考えられる。前者は、既にパンクレアチンとして消化酵素剤に利用されている。

本研究では、微生物を起源とする *Candida rugosa* 由来の Lipase, *Rhizopus arrhizus* 由来の Lipase, *Candida cylindracea* 由来の Lipase, 植物を起源とする wheat germ 由来の Lipase を主に用いて、固定化酵素反応を行い、反応活性が異なる Lipase を固定化酵素として用いた際に現れる起源による差異についても検討を加えた。

#### (a) *Candida rugosa*, *Candida cylindracea*

カンジダ (*Candida*) とは、酵母の姿の菌類の属名である。無色の不完全酵母に対してこの名が与えられる。出芽酵母など、多くのものが子囊菌類に属するが、担子菌系の酵母も発見されている。これらの判断はその酵母の有性生殖の姿 (テレオモルフ) を観察しなければわからない。しかし、それが発見されないものもある。そのような場合、菌類の分類においてはそれをアナモルフ菌 (不完全菌) と位置づ

け、それに学名を与えることが認められている。そこで、酵母の場合もそれにならい、不完全酵母という。かつてはこれに分類単位としての位置を与え、不完全菌門不完全酵母綱と呼んだが、現在はこのような扱いは行わない。

その中で、*Candida* は最も普通にみられる不完全酵母を含むものである。出芽によって増殖する酵母であり、多くの種がある。*Candida rugosa*, *Candida cylindracea* から精製される Lipase は、トリグリセリドの加水分解においては位置特異的な反応活性は認められず、1 位から 3 位まで同等に反応されることが知られている。

### (b) *Rhizopus arrhizus*

クモノスカビは、菌界・接合菌門・接合菌綱・ケカビ目・ケカビ科（あるいはユミケカビ科）に属するカビ (*Rhizopus*) の和名である。基質表面を這う菌糸の様子が多核体の菌糸からなり、基質中に菌糸を伸ばすが、基質表面から気中へと匍匐菌糸を伸ばすのが特徴である。匍匐菌糸は基質の上を這い、基質に付くとそこから菌糸を伸ばす。そのため、ケカビに比べると、コロニーの成長が著しく早い。基質の表面に広がる気中菌糸は、その表面に水滴が付き、クモの巣のように見える。

クモノスカビは、湿った有機物表面に出現する、ごく普通のカビである。空中雑菌として出現することも多い。形態はケカビに似ている。菌糸体は多核体の菌糸からなり、基質中に菌糸を伸ばすが、基質表面から気中へと匍匐菌糸を伸ばすのが特徴である。匍匐菌糸は基質の上を這い、基質に付くとそこから菌糸を伸ばす。そのため、ケカビに比べると、コロニーの成長が著しく早い。基質の表面に広がる気中菌糸は、その表面に水滴が付き、クモの巣のように見える。

クモノスカビは、基本的には腐生であるが、弱い寄生菌として、植物の病原体になる場合がある。食物の上に出現することも多い。モモ(桃)などの柔らかい果実について、その腐敗を早めることもある。極めて成長が早いので、微生物の培養時にコンタミネーション成分としてこれが侵入すると、一夜にして全てを覆いつくす。胞子もよく飛ぶので嫌悪されることが多い。他方、コウジカビを使う日本以外のアジア全域において、紹興酒などの酒の醸造で麴に用いられたり、インドネシアでは茹でた大豆に生やしてテンペ(Tempeh)という食品にする例がある。トリグリセリドの加水分解において、1 位と 3 位に位置特異的な反応活性が知られている。

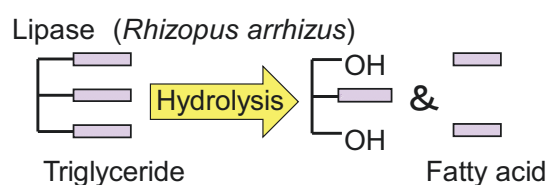
### (c) wheat germ

小麦胚芽(wheat germ)とは、小麦の粒を構成する胚芽部分を指す。胚芽とは、植物の種子に含まれており、成長すると芽になる部分のことである。小麦粒は外皮、胚乳、胚芽の 3 つの部分で構成されており、粒の約 83%を占める胚乳（はいにゅう）は、小麦粉に加工されている。そして、小麦粒の約 15%を占める部分が外皮で

ある。製粉工程の中で胚乳と分けられ、家畜の飼料などに利用される。そして、小麦粒の約 2%を占める部分が小麦胚芽である。小麦胚芽には、脂質、たんぱく質、ミネラル、ビタミンなどさまざまな栄養素が豊富に含まれている。トリグリセリドの加水分解においては位置特異的な反応活性は認められず、1位から3位まで同等に反応されることが知られている。

本研究で取り上げた4種の起源のLipaseの位置特異性についてFig.1-2にまとめた。

### *Rhizopus arrhizas* : 1,3位 特異性



### *Candida rugosa* *Candida cylindracea* *Wheat germ* } 1,2,3位 特異性

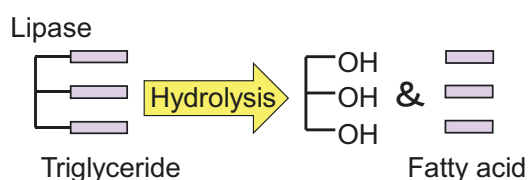


Fig.1-2 4種のLipaseの位置特異性

## 1-4 Lipaseの反応機構と既往の研究

### <反応機構>

これまでのLipaseの反応機構の解析から、Lipaseはトリアシルグリセロール(油脂)の加水分解やエステル交換反応などを触媒する酵素であると定義されている。疎水性溶媒を用いることでエステル合成反応も実行できるので、工業的に応用範囲が広い酵素である。

Lipase反応特性として多彩な基質特異性を挙げる事ができる。本来、Lipase

は、トリアシルグリセロールをグリセロールと脂肪酸に加水分解したり、この逆のエステル化を触媒したりする。しかし、実際には、Lipase は、トリアシルグリセロールや脂肪酸だけでなく、エステル結合やカルボキシル基、水酸基を有する物質を基質とすることができる。Lipase の多彩な特性を利用して、油脂の改質以外にも、殺虫剤（ピレスロイド）の光学活性アルコールの生産、テルペンアルコールエステルの合成、コレステロールエステルの合成などの有用物質が工業レベルで生産されている。

### 1-5 酵素固定化担体と固定手法の展開

固定化酵素(Immobilized enzyme)の歴史は古く、1916年に骨炭の微粉末に吸着した酵素が触媒活性を示すことが報告されている。1950年以降にこれを工業的に利用する試みが始められた。1950年代はわずか10報足らずであったが、1960年代になると、Katchalski-Katzirを中心とするワイズマン研究所一派によるはじめとして、多くの研究が報告されるようになった。1969年には実際に固定化アミノアシラーゼを用いるDL-アミノ酸の光学分割の連続酵素反応の工業化に成功した。これは固定化酵素の最初の工業的応用である。

主として脂質の改質に関する固定化Lipaseに関する研究例をTable. 1-1にまとめた。Lipaseの起源としては、*Candida*と*Rhizopus*は、安定に活性が発現するため、基礎研究に適していることから、*Candida*と*Rhizopus*が多く用いられている。疎水性の固体担体としては、1997年以降Accurel EPが用いられ、疎水性基質に相応しい疎水性固体担体の端緒である(Al-Duri and Y.P.Yong (1997))。それまでは、Gelや活性炭等の親水性担体を担体として用いていた。また、担体によって選択されている固定化法は様々であり、担体に対して最適な固定化法を体系的に決定することが依然として課題である。有機溶媒の面をみると、イソオクタンやアルコールの利用の事例が多い。イソオクタンは、W/O microemulsion系におけるLipaseの反応において高活性を与える有機溶媒として2000年代以前からよく知られている。多岐にわたる反応系が研究対象となっており、Lipaseの反応生産物は多様性に富み、研究・実用化を広範囲に期待できる。

Table.1-1 脂質の改質に関する固定化 Lipase に関する既往の研究

Author	Year	Enzyme	Carrier	Immobilization	Substrate	Solvent	Reaction
Ahn, K.W. et al.	2011	<i>Pseudomonas cepacia</i> lipase <i>Pseudomonas fluorescens</i> lipase	Mesoporous silica	Stirred	Soybean oil	Methanol	Methanolysis
Al-Duri, Y.P.Yong	1997	<i>Pseudomonas</i> lipase <i>Humicola</i> lipase	Polypropylene Accurel EP-100	Adsorption	Oleic acid Octanol	Solvent free (as same as substrate)	Esterification
Cao, L. et al.	1999	<i>Candida antarctica</i> lipase	Polypropylene Silica gel PEG	Adsorption Crosslinking	Olive oil	<i>t</i> -butanol	Esterification Hydrolysis
Dizge, N. et al.	2009	<i>Thermomyces lanuginosus</i> lipase	Microporous polymeric matrix		Soybean oil	Methanol	Transesterification batch reaction
Huang, D. et al.	2012	<i>Rhizomucor miehei</i> lipase			Soybean oil	Isooctane	Transesterification
Khare, S.K. and Nakajima, M.	2000	<i>Rhizopus japonicus</i> lipase	Celite	Adsorption	Tripalmitin Stearic acid Soybean oil Docosahexaenoic acid <i>p</i> -nitrophenyl palmitate	Hexane	Transesterification Hydrolysis
Kiatimkul, P.-P. et al.	2006	<i>Candida rugosa</i> lipase <i>Burkholderia cepacia</i> lipase <i>Pseudomonas</i> sp. lipase <i>Penicillium roquefortii</i> lipase <i>Penicillium camembertii</i> lipase <i>Aspergillus niger</i> lipase <i>Mucor javanicus</i> lipase <i>Rhizomucor miehei</i> lipase			Soybean oil Epoxidized soybean oil		Hydrolysis
Li, S.-F. and Wu, W.-T.	2009	<i>Candida rugosa</i> lipase	Polyacrylonitrile nanofibrous membranes	Shaking	Soybean oil		Hydrolysis batch reaction
Li, S.-F. et al.	2011	<i>Pseudomonas cepacia</i> lipase	Polyacrylonitrile nanofibrous membranes	Shaking	Soybean oil		Transesterification Hydrolysis
Naoo, K. et al.	2001	<i>Rhizopus delemar</i> lipase	W/O microemulsion		Oleic acid Octyl alcohol	Hexane	Esterification
Naya, M. and Imai, M.	2012	<i>Candida rugosa</i> lipase	Hydrophobic porous carrier Polypropylene Accurel® MP 100	Crosslinking glutaraldehyde	Triolein	Isooctane	Hydrolysis
Nouredini, H. et al.	2005	<i>Pseudomonas cepacia</i> lipase <i>Penicillium roquefortii</i> lipase <i>Pseudomonas</i> sp. lipase <i>Mucor</i> sp. lipase <i>Aspergillus niger</i> lipase <i>Rhizopus oryzae</i> lipase <i>Penicillium camembertii</i> lipase <i>Rhizopus niveus</i> lipase <i>Candida rugosa</i> lipase	Hydrophobic sol-gel support	Sol-gel method	Soybean oil	Methanol Ethanol	Transesterification
Ozmen, E.Y. and Yilmaz, M.	2009	<i>Candida rugosa</i> lipase	$\beta$ -cyclodextrin-based polymer	Crosslinking	Soybean oil		Hydrolysis batch reaction
Rodrigues, R.C. and Záchia Ayub, M.A.	2011	<i>Thermomyces lanuginosa</i> lipase <i>Rhizomucor miehei</i> lipase	Lewati®	Multipoint-covalently immobilized	Soybean oil	Methanol	Transesterification Hydrolysis batch reaction
Ting, W.-J. et al.	2008	<i>Candida rugosa</i> lipase	Chitosan beads	Crosslinking glutaraldehyde	Soybean oil		Hydrolysis
Uehara, A. et al.	2008	<i>Rhizopus delemar</i> lipase	W/O microemulsion		Triolein	Isooctane	Hydrolysis
Virto, M.D. et al.	1994	<i>Candida rugosa</i> lipase	Polypropylene Accurel EP-100 (1.0-0.2 mm)	Adsorption	Beef tallow Pork lard Olive oil	Isooctane n-Heptane n-pentane Isopropanol Ethyl ether	Hydrolysis
Wang, W. et al.	2011	<i>Rhizomucor miehei</i> lipase <i>Thermomyces lanuginosa</i> lipase <i>Candida antarctica</i> lipase	Tree commercial immobilized lipase Lipozyme RM IM Lipozyme TL IM Novozym 435		Soybean oil	<i>t</i> -butanol	Glycerolysis
Watanabe, Y. et al.	2002	<i>Candida antarctica</i> lipase			Soybean oil triacylglycerols	Chloroform/methanol	Methanolysis batch reaction
Xie, W. and Ma, N.	2010	<i>Thermomyces lanuginosa</i> lipase	Magnetic Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> nano-particles	Mix	Soybean oil	Methanol	Transesterification batch reaction
Xie, W. and Wang, J.	2012	<i>Candida rugosa</i> lipase	Magnetic chitosan microspheres	Crosslinking glutaraldehyde	Soybean oil	Methanol	Transesterification batch reaction
Zhou, G. et al.	2009	<i>Candida rugosa</i> lipase	Mesoporous rod-like silica Mesoporous vesicle-like silica	Physical adsorption	Butyryn	Water Phosphate buffer saline	Hydrolysis batch reaction

固定化担体の開発とともに、担体に酵素を固定化する手法についても種々考察されている。酵素の固定化法は、①担体結合法(carrier binding method)、②包括法(entrapment method)、③架橋法(crosslinking method)の三種類に大別される。Table1-2 にその特徴と原理をまとめた。

Table.1-2 固定化酵素の調製方法の特徴とその原理

性質	固定化方法							
	担体結合法			架橋法	包括法			
	共有結合法	物理的吸着法	イオン結合法		ポリマー法	マイクロカプセル法	リポソーム法	逆ミセル法
調製の難易	難	易	易	難	易	難	難	易
調製時の酵素失活の可能性	大 (90%が失活)	小	小	大	小	大	小	小
結合力	強	弱	弱	強	強	強	中間	弱
担体の再生	不可(可*)	可	可	—	不可	不可	不可	可
固定化対象の範囲	狭～中間	中間	中間	中間	広	広	広	広
固定化の価格	高	低	低	低	中間	中間	中間	低

\* :ジスルフィド結合の場合は可

福井三郎(編著)「生体触媒としての微生物」P101 共立出版 (1979)  
 千畑一郎 「基礎醗酵工学講習会 応用酵素学」P23 表1 (1978) を参考にして改めて著者が作成した。

### ① 担体結合法

酵素を水不溶性の担体に結合させる担体結合法の原理として、共有結合法、物理吸着法、イオン結合法の3つに分類することができる。

共有結合法は、高濃度の基質溶液でも強く結合を保つことができ、固定化率の高い耐久性に優れた固定化酵素を調製できる手法である。しかし、酵素の変性も生じやすいことが課題である。物理吸着法は、原理が簡潔であり、酵素の変性が生じにくい点で優れた手法である。しかし、担体との結合力が弱く、酵素を長期的に保持することが困難であり、保持率を高めることが課題である。イオン結合法も、原理が簡便であり、酵素の変性が生じにくい優れた手法である。しかし、共有結合法に比べて緩衝液の種類や pH に影響を受けやすく、担体との結合力が弱く、こちらも酵素を安定的に長期保持するための解決策が必要である。

### ② 架橋法

架橋法は、化学結合によって酵素を担体に固定化する方法である。この方法は2個もしくはそれ以上の官能基を有する試薬 (bifunctional reagent あるいは multifunctional reagent) を用いて酵素と酵素を架橋 (cross linkage)、または酵素と担

体を架橋する固定化方法である。この架橋法によって固定化される酵素の例を Table.1-3 に示す。

架橋試薬としては、 Schiff 塩基(Fig.1-3)を作るグルタルアルデヒド、ペプチド結合するイソシアナート誘導体、ジアゾカップリングするビスジアゾベンジジン、あるいは N,N'-ポリメチレンビスヨードアセトアミド、N,N'-エチレンビスマレインイミドなどが使われる。この反応に関する酵素タンパク質中の官能基としては、N 末端の  $\alpha$ -アミノ基、リジンの  $\epsilon$ -アミノ基、チロシンのフェノール基、あるいはシステインのスルフヒドリル基、ヒスチジンのイミダゾール基などがある。

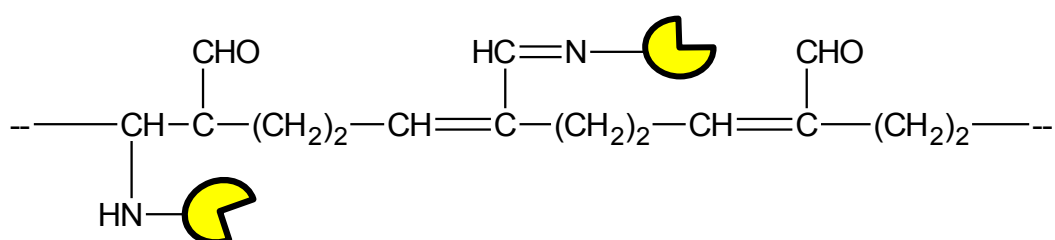


Fig.1-3 The mechanism of lipase and glutaraldehyde crosslinking

化学的手段で架橋された酵素と酵素は反応途上で活性中心近傍のアミノ酸残基が影響を受けることが多いので、得られた固定化酵素の活性は比較的低い場合が多く、長年の課題である。活性を保持させるためには、別の手法によって一度担体に結合させてから架橋する方法が考えられる。つまり、他の固定化法と複合させることで、活性の低下が防止できると期待できる。

また、酵素と担体の架橋の場合には、担体と強く結合しているので長期の反復利用に耐えることが期待できる。しかし、担体にアミノ基等の官能基を修飾させる必要がある。

Table.1-3 架橋法による酵素の固定化

架 橋 剤	酵 素
グルタルアルデヒド	グルコースオキシダーゼ チロシナーゼ カタラーゼ ペルオキシターゼ リボヌクレアーゼ カルボキシペプチターゼA アルカリ性ホスファターゼ リゾチーム トリプシン $\alpha$ -キモトリプシン パパイン スブチリシン アミノアシラーゼ
ビスジアゾベンジジン	パパイン
ヘキサメチレンジイソシアナート	リボヌクレアーゼ $\alpha$ -アミラーゼ トリプシン $\alpha$ -キモトリプシン
トルエンジイソシアナート	アミノアシラーゼ
ヘキサメチレンジイソチオシアナート	$\alpha$ -キモトリプシン
N,N'-エチレンビスマレイニミド	$\alpha$ -アミラーゼ
N,N'-ポリメチレンビスヨードアセトアミド	アルドラーゼ

### ③ 包括法

包括法は、ゲルの微細な格子の中に酵素を囲む格子型と、ポリマーによる膜によって酵素を被覆するマイクロカプセル型に分けることができる。これらの方法は、担体結合法あるいは架橋法と異なり、酵素と担体は結合していないため、多量の酵素固定化に応用できる可能性があり、酵素分子の分子構造がよく保存されている点で高活性が期待できる手法である。ただし、担体自身が構造体として脆弱であるので、担体の劣化(膨潤、変形、圧密など)による固定化酵素の失活が生じやすい点が課題である。



## 1-6 超臨界二酸化炭素の酵素への利用

一般的に酵素反応は、生体内の化学反応であるので水相中で進行する化学反応と考えることができる。超臨界流体を溶媒として用いる酵素反応は自然界には元来存在しない。酵素は分子量 10000 以上の比較的大きな分子量であることを考慮すると、超臨界流体中において酵素は不溶となり、不均一系の反応と考えられる。ただし、超臨界流体の高拡散性のために基質の拡散は迅速であることが期待できるので、高速反応の可能性がある。

超臨界流体は、Fig.1-4 に示すように、温度と圧力が臨界点を越えた非凝縮性流体と定義される。気体－液体－固体と同様に温度－圧力条件により物性が決定される物質の相状態の一つである。物質の相状態は、物質の分子間引力と、熱運動による拡散のバランスで決まる。凝集力は分子間距離によって変化するので、密度の高い固体や液体では大きく、気相では高圧条件になるほど大きくなる。一方、熱運動による拡散性は温度上昇とともに増大する。

超臨界流体は、臨界点を越えているため分子の熱運動が激しく、理想気体に近い希薄な密度から、液体に近い高密度まで連続的に変化させることが可能である。このことは、密度を媒介変数として、溶解度、平衡物性、拡散係数など、物質移動を支配する溶媒特性の制御が可能であることを示唆している。反応や分離、材料調製の溶媒として利用した場合には、液体相当の高い溶解度と気体相当の大きな拡散係数が期待され、近年幅広く研究されている。

すべての物質に超臨界領域が存在するが、学術的にも産業的にも水と二酸化炭素は残留毒性がない点で注目されている。二酸化炭素は、地球上の生命を含めたすべての物質の生成に何らかの関与をしており、生体の生理活性に残留毒性の懸念がなく、環境負荷が少ないことが期待されている背景と捉えることができる。ただし、水の臨界温度が二酸化炭素のそれ(31°C)に比較して、374°Cとかなり高温であるため、対象物質の熱的変性をきたすことへの懸念と、実験装置や操作の安全性の備えがより厳格となり、その普及に制約が多い。したがって、二酸化炭素が環境負荷の小さい技術基盤の創成のため、その適用分野・適用事例が拡大している。

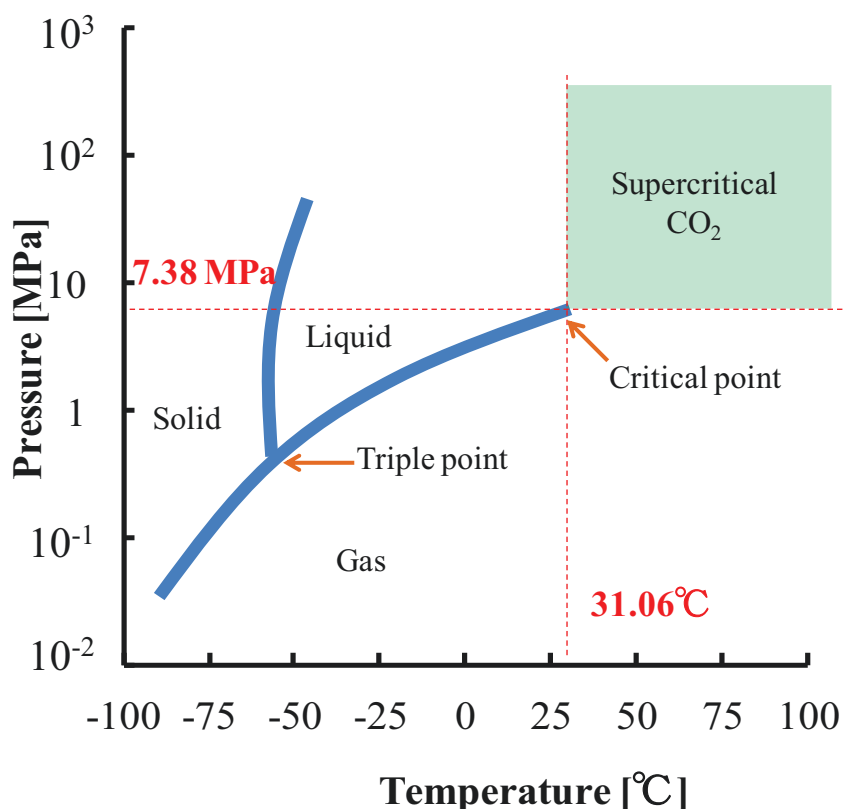


Fig.1-4 二酸化炭素の相変化に対する温度・圧力の影響

過去 10 年間の超臨界二酸化炭素中における主な研究例をまとめたものが、Table.1-4 である。

Table.1-4 二酸化炭素溶媒における酵素反応の既往の研究

Novak, Z. et al.	2003	<i>Candida rugosa</i> lipase Lipase (porcine pancreas)	Supercritical carbon dioxide Propane	Esterification
Lozano, P. et al.	2004	<i>Candida antarctica</i> lipase B	Supercritical carbon dioxide	Ester synthesis
Nagesha, G.K. et al.	2004	<i>Candida rugosa</i> lipase <i>Mucor miehei</i> lipase	Supercritical carbon dioxide	Hydrolysis Esterification
Romero, M.D. et al.	2005	<i>Candida antarctica</i> lipase <i>Rhizomucor miehei</i> lipase	Supercritical carbon dioxide Hexane	Synthesis
Blattner, C. et al.	2006	<i>Candida antarctica</i> lipase <i>Mucor miehei</i> lipase	Supercritical carbon dioxide Isooctane	Esterification
Jackson, M.A. et al.	2006	<i>Candida antarctica</i> lipase	Supercritical carbon dioxide	Esterification
Laudani, C.G. et al.	2007	<i>Rhizomucor miehei</i> lipase	Dense carbon dioxide	Esterification
Lozano, P. et al.	2007	<i>Candida antarctica</i> lipase B	Ionic liquid/hexane Ionic liquid/supercritical carbon dioxide	Synthesis
Knez, Z. et al.	2012	<i>Candida antarctica</i> lipase B	Supercritical carbon dioxide	Esterification
Lisboa, P. et al.	2014	<i>Thermomyces lanuginosus</i> lipase	Supercritical carbon dioxide	Transesterification

超臨界二酸化炭素中での酵素反応の研究は、酵素反応の発現の有無に留まる傾向があり、速度論的な解析は未開拓である。実際に工業生産等へのアプローチを行うためには、速度論に注目した酵素反応のデータベースの充実が重要である。

酵素の起源として *Candida* 由来の Lipase が多く用いられている。この背景として *Candida* 種は比較的到高活性であり、トリグリセリドの 1,2,3 位すべてに作用するため、位置特異性に特段の配慮を必要とする必要がないことから基礎研究を進めるために向いている。ただし、1 件の発表で 4 種以上の起源の Lipase を同時に扱った研究例はないようである。Lipase の分子量、疎水性は起源によって大いに異なることを考慮すると、同一条件で起源横断的に研究を展開することで、新しい知見が蓄積されることが期待でき、本研究の主たる動機の一つとして挙げることができる。

## 1-7 本研究の目的と背景

本研究の目的は、起源の異なる 4 種の Lipase (*Candida rugosa*, *Candida cylindracea*, *Rhizopus arrhizus*, wheat germ) を疎水性の多孔質固体担体に固定化し、有機溶媒と超臨界二酸化炭素溶媒において脂質の改質反応(加水分解)を行い、各種溶媒中における固定化 Lipase の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。疎水性溶媒に対する優れた耐性を有する担体による安定な酵素固定化の実現、反応速度パラメーターの決定をするとともに、固定化酵素の反復利用を実証することである。これら一連の検討項目によって、担体と溶媒の機能的役割を明らかにし、安全性に優れた溶媒による食品・化粧品・医薬品等に用いられる生成物の生産に向けて、高活性を長期に発現する高度化されたプロセスを提案する。特に、①固定化 Lipase の保持率・活性ともに高い固定化方法を確立すること、②起源の異なる Lipase の固定化活性の情報を明らかにすること、③固定化 Lipase の反復利用における活性の発現と高活性の維持を実証すること、④超臨界二酸化炭素中における反応活性の実証と速度論解析に基づくリアクター設計の指針を得ることが本研究を位置付ける上で重要なポイントである。

## 1-8 本研究の構成

本論文は、下記のように構成されており、その体系を Fig.1-5 に示した。

第 1 章では、Lipase を代表とした酵素反応の有用性とその現状に関して述べた。また、固定化酵素に関する既往の研究を概観し、本研究の目的を述べた。

第 2 章では、疎水性基質を利用する場合に最適な担体の物理化学的な物性解明（疎水性評価・細孔体積・細孔構造）と、反応活性の向上にむけた操作論に注目した。ポリプロピレン多孔質担体 Accurel の蛍光顕微鏡による担体の表面疎水性の確認、電子顕微鏡による細孔構造の観察、水銀ポロシメーターによる細孔径分布測定、走査型プローブ顕微鏡(SPM)を用いた表面解析を行った。

第 3 章では、担体に Lipase を物理的に吸着させ、次いでグルタルアルデヒドによる架橋固定化を行う一連の固定化操作に関する基礎的な知見をまとめた。Lipase の吸着・固定化における Lipase の起源が異なることの影響とエタノールによる前処理の効果を検討した。

第 4 章では、有機溶媒を反応場とし、生体適合性に優れた Sugar-ester を両親媒性分子として W/O microemulsion を調製し、脂質の加水分解反応の反応速度論に着目して、考察を展開した。固定化 Lipase を用いた脂質加水分解反応の速度論的展開により、反応機構の解析と担体の粒子径と担体構造の影響を考察した。

第 5 章では、超臨界二酸化炭素を反応場として、有機溶媒系で活性発現の実証を得た固定化 Lipase を使用し、反応に適した条件（温度・圧力）を求めた。また、起源の異なる Lipase での反応により、反応系に適する酵素を選定し、反応生成物の生産量から、繰り返し利用における耐久性と生産性を求めた。さらに、反応速度論的展開によって反応収率のシミュレーションを行った。

第 6 章では、本研究の総括とオリジナリティーを述べるとともに、疎水性基質に対する固定化酵素反応システムの今後の課題と展望について述べた。

## 固定化Lipaseによる脂質の改質反応

### 1. 本研究の背景と目的

- ・背景
- ・目的
- ・既往の研究と最新の動向

### 疎水性担体を使用した固定化Lipaseによる脂質の加水分解

#### 2. 酵素固定化担体の基本物性

- ・SEM解析
- ・細孔径分布測定
- ・表面疎水性解析
- ・粒子径・細孔径のコントロール

#### 3. Lipaseの選定と固定化

- ・吸着操作と固定化手法
- ・固定化収率の推算
- ・酵素の起源による固定化量の違い

#### 4. 有機溶媒中での反応

- ・W/Oマイクロエマルジョン(自由溶媒系)の調製
- ・W/Oマイクロエマルジョン系でのリパーゼの速度論的解析  
(自由溶媒系の速度パラメーターの決定)
- ・固定化酵素の反応活性の速度解析
- ・固定化酵素の反復利用における酵素活性の維持

#### 5. 超臨界二酸化炭素中での反応

- ・有機溶媒中と比較
- ・最適な条件(温度・圧力)の決定
- ・繰り返し利用における安定的な活性維持→連続化へ

#### 6. 研究のオリジナリティーと今後の展望 (溶媒の機能と活性の高度化プロセス)

・健康機能性を有する食品や化粧品、安全な動物性油脂・植物性油脂の改質プロセス

動脈硬化  
心臓病  
生活習慣病の改善

(M.Naya and M.Imai, Soybean-Bio-Active Compounds, InTech Pub., Pp. 429-452, (2012))

・多段連続反応のデザイン  
超臨界二酸化炭素の使用  
多段化プロセスへのアプローチ

Fig.1-5 本論文の体系図

## 第2章 疎水性高分子による多孔質担体の細孔空間と表面特性

### 2-1 固体多孔質担体の有用性と疎水性反応への応用

固体多孔質担体は、酵素の固定化担体として多くの有用性を持っている。ミクロ孔の寄与によって表面積が増大し、それにもなって吸着量が増大するとともに、吸着による分子ふるい効果も期待できる。また、ゲルや膜の担体にはない、高い機械的強度と耐熱・耐圧性を有している。これらの特徴は、担体への酵素の吸着・固定化反応のみならず、有機溶媒や高温・高压流体中での酵素反応においても、有効であることが期待できる。固体多孔質担体を用いた固定化 Lipase の機能の研究を Table.2-1 にまとめた。

ホスト基材としての多孔質担体の素材は多岐にわたり、細孔構造も一概には言えない。ゲスト分子としての吸着物質も種類や分子構造、疎水性など多彩な物性を有している。この両者の相互作用によって、ある種の吸着物質は細孔内に自由に出入りできるが、ある種類の吸着物質は細孔入口付近に到達しても細孔内に侵入することができずに細孔入口付近で停滞してしまう。このような挙動の違いは、細孔と物質分子の幾何学的な大きさだけでなく、極性などの物理化学的因子が関与する。吸着挙動の解析や吸着現象の利用に際しては、このような分子ふるい効果を十分に考慮する必要がある。

多孔質担体の細孔の構造は、担体の組成や製造方法によって変わり、各種顕微鏡による観察・細孔径分布の物理的性状とともに、担体の表面極性基などによる化学的な性状を含めて、特徴のある吸着現象が発現している。

### 2-2 本章の目的

本章の目的は、酵素固定化担体としてシリカ粒子、Zeolite、並びに本研究の主たる担体であるポリプロピレン製多孔質担体(Accurel 粒子)の比較検討を行うことである。また、細孔表面の特性として蛍光顕微鏡による担体の疎水性評価、細孔構造の評価として走査型電子顕微鏡(SEM)による細孔構造の観察、水銀ポロシメーターによる細孔径分布測定、走査型プローブ顕微鏡(SPM)を用いた表面解析を行うことである。

Table.2-1 Lipid modification by immobilized lipase in hydrophobic solvent

Author	Year	Enzyme	Carrier	Particle, immobilization	Substrate	Solvent	Reaction
Ahn, K.W. et al.	2011	Lipase ( <i>Pseudomonas cepacia</i> ) Lipase ( <i>Pseudomonas fluorescens</i> )	Mesoporous silica	Stirred	Soybean oil	Methanol	Methanolysis
Al-Duri, Y.P.Yong	1997	Lipase ( <i>Pseudomonas</i> )	Polypropylene Accurel EP-100	2.5-0.7 mm adsorption	Oleic acid	Solvent free (as same as substrate)	Esterification
Cao, L. et al.	1999	Lipase ( <i>Humicola</i> ) Lipase ( <i>Candida antarctica</i> )	Polypropylene Silica gel PEG	adsorption cross-linked	Octanol Olive oil	t-butanol	Esterification
Grilisen, T. et al.	1997	Lipase ( <i>Candida rugosa</i> ) Lipase ( <i>Pseudomonas fluorescens</i> ) Lipase ( <i>Humicola lanuginosa</i> )	Polypropylene EP-100	adsorption	<i>p</i> -nitrophenyl propionate	Methanol Phosphate buffer	Hydrolysis
Khare, S.K., Nakajima, M.	2000	Lipase ( <i>Rhizopus japonicus</i> )	Cellite	Adsorption	Tripalmitin Stearic acid Soybean oil Docosahexaenoic acid <i>p</i> -nitrophenyl palmitate	Hexane	Transesterification Hydrolysis
Montero, S. et al.	1993	Lipase ( <i>Candida rugosa</i> )	Polypropylene Accurel EP-100	0.4-0.2 mm cross-linked	Olive oil	Phosphate buffer BSA additive	Hydrolysis
Palomo, M.J. et al.	2002	Lipase ( <i>Candida rugosa</i> )	Sepabeads FP-EA Sepabeads FP-EP	adsorption	( <i>R,S</i> )-2-phenyl-2-butyrolacetic acid ( <i>R,S</i> )-mandelic acid methyl ester	Sodium phosphate buffer	Hydrolysis
Persson, M. et al.	2002	Lipase ( <i>Candida rugosa</i> ) Lipase ( <i>Humicola lanuginosa</i> ) Lipase ( <i>Rhizomucor miehei</i> ) Lipase ( <i>Pseudomonas cepacia</i> ) Lipase ( <i>Thermomyces lanuginosa</i> ) Lipase ( <i>Rhizomucor miehei</i> )	Polypropylene EP-100	0.4-0.2 mm adsorption	Hexane 1-phenylethanol	Isocetane	Transesterification
Rodrigues, R.C., Záchia Ayub, M.A.	2011	Lipase ( <i>Thermomyces lanuginosa</i> ) Lipase ( <i>Rhizomucor miehei</i> )	Lewatit®	Multipoint-covalently immobilized	Soybean oil	Methanol	Transesterification Hydrolysis batch reaction
Sabbani, S. et al.	2006	Lipase ( <i>Candida rugosa</i> )	Polypropylene Accurel EP-100 Accurel MP-1000 Accurel MP-1001	1.5-0.2 mm adsorption	2-Methylhexanoic acid	Isocetane	Enantioselective esterification
Salis, A. et al.	2003	Lipase ( <i>Mucor javanicus</i> )	Polypropylene Accurel MP-1004	0.84-0.125 mm	Glycerol tricaprylate 1-butanol	Ethanol Phosphate buffer Hexane	Transesterification Esterification Hydrolysis Esterification
Salis, A. et al.	2003	Lipase ( <i>Candida antarctica</i> ) Lipase ( <i>Thermomyces lanuginosa</i> )	Polypropylene EP-100	0.4-0.2 mm adsorption	Tributyrin 1-phenylethanol Decanoic acid	Hexane	Hydrolysis Esterification
Virto, D.M. et al.	1994	Lipase ( <i>Candida rugosa</i> )	Polypropylene Accurel EP-100	1.0-0.2 mm adsorption	Beef tallow Pork lard Olive oil	Isocetane n-Heptane n-pentane Isopropanol Ethyl ether	Hydrolysis
Zhou, G. et al.	2009	Lipase ( <i>Candida rugosa</i> )	Mesoporous rod-like silica Mesoporous vesicle-like silica	Physical adsorption	Butyrin	Water Phosphate buffer saline Isocetane	Hydrolysis batch reaction Hydrolysis
Naya, M., M. Imai	2011	Lipase ( <i>Candida rugosa</i> )	Polypropylene Accurel MP-100	3.0-0.5 mm cross-linked	Triolein	Isocetane	Hydrolysis

## 2-3 検討担体

本研究では、Accurel, Silica gel, Zeolite を酵素固定化担体として比較検討した。担体の詳細な物性測定（細孔空間・表面解析）は、本研究で主たる担体として用いる Accurel に集中して展開する。

### 2-3-1 Silica gel

Silica gel とは、水ガラスのアルカリを水和し、ゲル化した後、乾燥して調製されるケイ酸のゲルのことである。一般的には、数 nm の孔による多孔質素材であり、脱水剤・乾燥剤・吸着剤として用いられる。親水性の担体であり疎水性基質との親和性は期待できないが、酵素の固定化担体として、多孔質であること、調製のしやすさと高い機械的強度に期待することができる。

#### <調製手順>

- ① 水ガラス(ケイ酸ナトリウム溶液(Assay:52.0-57.0%))をビーカーに 10g 量り取った。
- ② 純水 20mL をメスシリンダーで量りとり、水ガラスに加え、混合・溶解した。
- ③ 6M HCl を用意し、スターラーにて攪拌する。その中に、②の水ガラス水溶液を液滴として滴下し、ゲル化させた。
- ④ ゲル粒子を回収し、洗浄液が中性になるまで純水で洗浄した後、デシケーター中で室温にて乾燥した。

### 2-3-2 Zeolite

粘土鉱物の一種として、1756年に初めて Cronstedt によって発見され、規則的な細孔を有する固体の骨格からなるアルカリまたはアルカリ土類金属を含む含水アルミノケイ酸塩である。多孔質で、細孔の直径が通常 0.2~1.0 nm 程度であるため、その細孔径よりも大きな分子は進入することはできない。Zeolite はその骨格構造に由来する細孔による分子ふるい効果に加え、固体酸性、イオン交換能、触媒能、吸着能などの特性をもっており、これらの物性が学問的な研究の対象となるのと同様



に、その機能を活かして工業触媒、吸着剤、乾燥剤、イオン交換剤、さらには排水処理、肥料、および、飼料添加物など実に幅広く利用されている。酵素の吸着担体として、多孔質であること、ハンドリングの良い粒子径であることに期待した。

本研究では、Zeolite（合成 Zeolite, F-9, 球状, 1.40-2.36mm（製造元：東ソー株式会社））を用いて、酵素の吸着実験の検討を行った。

### 2-3-3 Accurel MP-100

Accurel MP100 は、Membrana GmbH (Obernburg, Germany)から、殺菌薬・酸化防止剤・香気成分等の担持担体として当初製造され、市場に流通しているポリプロピレン製の高分子多孔質担体である。Lipase の担体として研究された実績があるが、速度論的な活性評価が未開拓であった(Koller, G. et al. (2001))。

ポリプロピレンの他の用途として、家電部品、包装フィルム、食品容器、キャップ・トレイ、繊維、医療器具、日用品、ごみ容器等で、使われている。高い強度と耐熱・耐圧性を有しており、後に述べる 2-4 に記しているように疎水性担体であり、本研究の基質との親和性に期待できる。

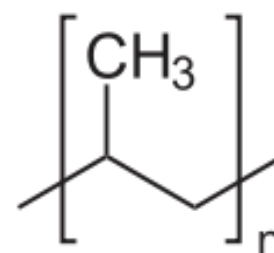


Fig.2-1 Chemical structure of the polypropylene



Fig.2-2 Photographs of original Accurel. The true shape of the original Accurel was similar to a half cylinder.

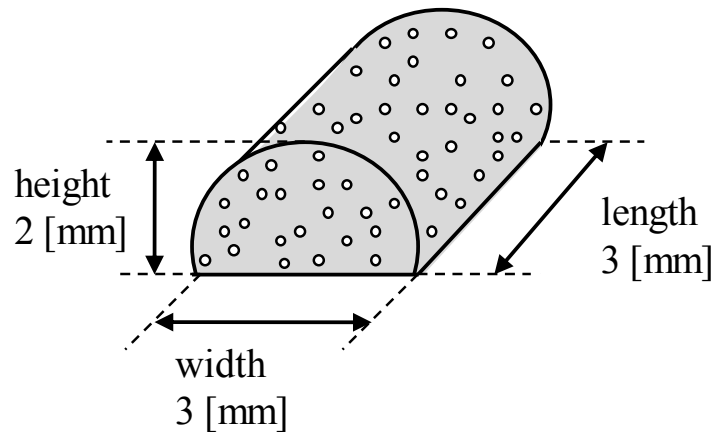


Fig.2-3 Schematic illustration of original Accurel MP100

上記の写真とモデル図のように、Accurel は 3mm 径のペレット状の担体であり、半円柱の外観をした多孔質固体である。Table2-2 は、Accurel の提供元である Membrana 社の担体情報と、ピクノメーターを用いた著者による実測値である。ピクノメーターの実験手法に関しては、以下に示す。なお、ピクノメーターの溶媒の一つとして用いたエタノールは、次の 3 章で酵素の吸着工程の前処理に使われており、かつ Accurel を浸漬させたときに Accurel がエタノール中で完全に沈降することから、エタノールは Accurel 細孔内に十分に浸潤すると考えられるので、真密度を測定する際の溶媒として用いた。

<ピクノメーターによる Accurel の密度測定>

- ①ピクノメーターの空重量( $W_e$ [g])を測定した。
- ②ピクノメーターに溶媒（水，エタノール）のみを 298K 下で充填し，重量( $W_s$ [g])を測定した。
- ③10 粒の Accurel ( $X$ [g])をピクノメーターに入れ，298K 下で溶媒で満たし，重量( $W_A$ [g])を測定した。
- ④各溶媒の 298K での液密度( $\rho_f$ )を用いて，以下の計算式によって，Accurel の密度( $\rho_A$ )を求めた。

ピクノメーターの空体積を  $V_0$  とすれば,

$$V_0 = \frac{W_s - W_e}{\rho_f} \quad (2-1)$$

ピクノメーターに Accurel 粒子 (10 粒) を入れた際の溶媒体積  $V_1$

$$V_1 = \frac{(W_A - X) - W_e}{\rho_f} \quad (2-2)$$

$$(\rho_s \text{ or } \rho_a) = \frac{X}{(V_0 - V_1)} \quad (2-3)$$

$V_0 - V_1$  は Accurel 粒子 (10 粒) の体積となるので, Accurel 粒子の密度  $\rho_s$  または  $\rho_a$  は,  $X$  を  $(V_0 - V_1)$  で除すことによって得られる. ここで, 溶媒として水を用いた場合, 細孔内に水が浸入できないと考えられるので(2-3)式は Accurel のみかけの密度  $\rho_a$  を与え, 溶媒としてエタノールを用いる場合には, 細孔内に十分にエタノールが浸潤できると考えられるので, (2-3)式は Accurel の真密度  $\rho_s$  を与える.

Table 2-2 Accurel 粒子の多孔質物性

Properties	Membrana GmbH	Naya et al. (This work)
Melting temp. [°C]	156 DSC	—
Skeletal density $\rho_s$ [kg/m <sup>3</sup> ]	ND	802 picnometer (immersed in ethanol)
Apparent density $\rho_a$ [kg/m <sup>3</sup> ]	130 DIN 53466	199 picnometer (immersed in water)
Void fraction $\varepsilon$ [-]	0.78 Internal method	0.75
Apparent volume of 1 Accurel [m <sup>3</sup> ]		$1.8 \times 10^{-8}$

\*Data were donated by Membrana GmbH (Obernburg, Germany, 2007) 黒字は提供された値. 青字は納谷の実測値. 赤字は納谷の計算値

なお, エタノールならびにイソオクタン中に Accurel 粒子を浸漬しても膨潤等の形状変化はみられず, 機械的強度にも特に変化がなく, 溶媒耐性は十分と判断した.

## 2-4 担体の疎水性評価

### 2-4-1 蛍光色素による表面疎水性の評価

蛍光プローブを固体表面に吸着させ、蛍光顕微鏡で観察することで、固体表面の親疎水性を評価することができる。本研究では、疎水性の蛍光プローブである Nile red を用いて Accurel 担体表面の疎水性を明らかにした。

#### Nile red

疎水性蛍光プローブであり、親水性条件下ではほとんど蛍光を発しないが、疎水性条件下では強い蛍光を発す(P.Greenspan and S.D.Fowler(1985)). 励起波長: 560nm.  
 $C_{20}H_{18}N_2O_2=318.37$

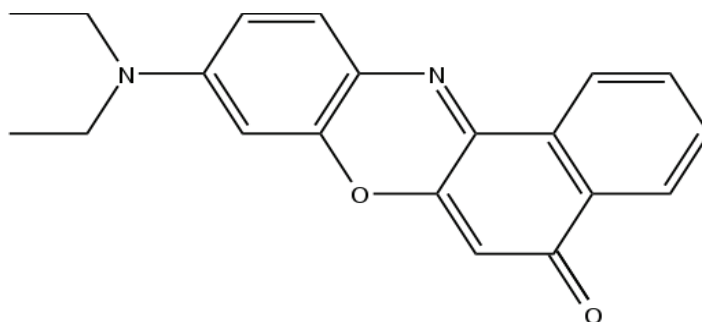


Fig.2-4 Chemical structure of the hydrophobic dye Nile Red (9-diethylamino-5H-benzo-phenoxazine-5-one); MW=318.37.

#### 解析方法

##### <試薬>

- ・エタノール (純度 99.7%, 和光純薬工業株式会社)
- ・Nile red (SIGMA-ALDRICH)

##### <器具>

- ・シャーレ
- ・HS オールインワン蛍光顕微鏡 (KEYENCE BZ-9000)

<手順>

疎水性蛍光プローブである Nile red をエタノール(99.5%)に 100 $\mu$ M の濃度で溶解・遮光し, 277K で保存した.

この Nile red 溶液に Accurel を 298K のもと約 1h 静置・浸漬し, HS オールインワン蛍光顕微鏡 (KEYENCE BZ-9000) で観察した.

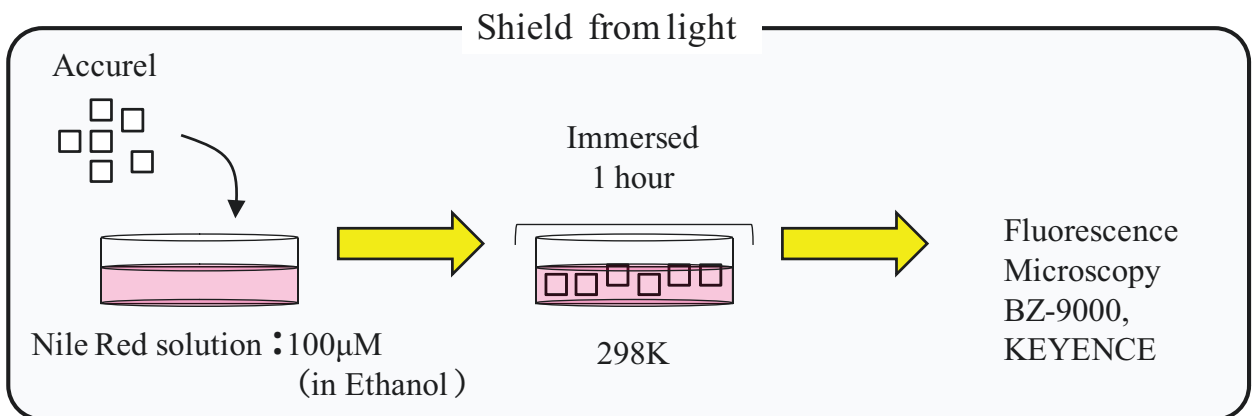


Fig.2-5 Method of adsorption of fluorescence component (Nile Red)

HS オールインワン蛍光顕微鏡を用いて, 位相差と蛍光発色法で観察した. HS オールインワン蛍光顕微鏡の観察により, Accurel の表面全体が蛍光発色していることが確認できた. これは, Accurel 担体表面に疎水性の蛍光プローブである Nile red が吸着し, Accurel の高分子骨格が疎水性であることを定性的に示している.

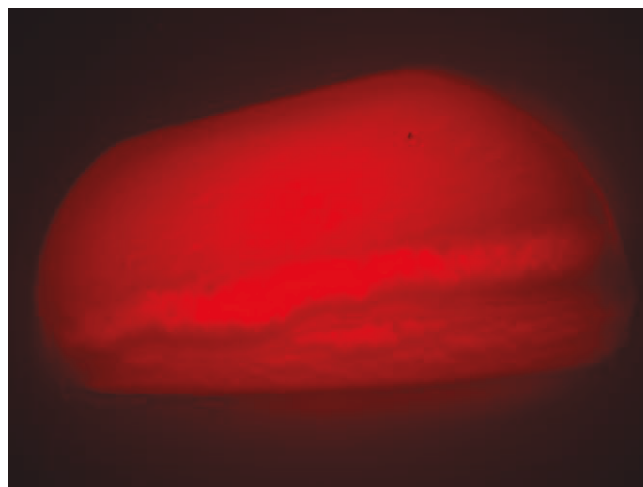


Fig.2-6 Fluorescence microscopic view of original Accurel ( $\times 40$ ).

## 2-4-2 接触角からの評価

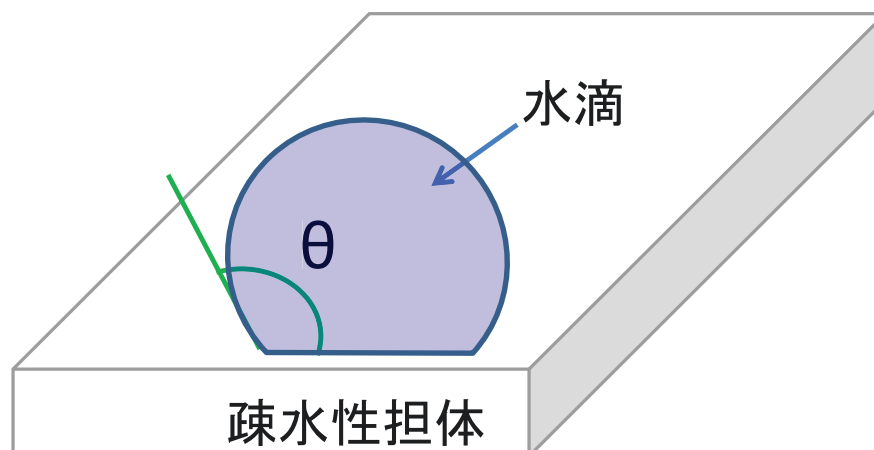


Fig.2-7 Schematic image of contact angle

固体表面上に液体が接している状況で、液体の縁の表面に引いた接線と固体表面と成す角度を接触角と呼ぶ。接触角が小さいと親水性とみなし、大きいと疎水性とみなされるが、その境界となる角度は必ずしも明確に定義されていない。表面の濡れやすさ・濡れにくさは接触角（または濡れ角）によって便宜的に評価することができる。濡れにくい固体表面に、液体が付着したときの接触角は大きく、濡れやすい液体が付着したときの接触角は小さくなる。テフロンなど撥水性のある物質の表面では接触角は  $180^\circ$  に近くなり、液滴はほぼ球形になる。

Accurel は平滑な平板担体ではなく、表面に細孔開口部が密集しており、接触角を測定することが技術的に不可能である。文献の調査からポリプロピレンの接触角を求め、疎水性を評価した。Fasce, L.A. et al. (2008), Oromiehie, A.R. et al. (2014), Nini Ma (2008)によれば、ポリプロピレン (PP) の接触角  $\theta$  は  $80\sim 108^\circ$  であった。このように大きい接触角は Accurel の素材であるポリプロピレンが疎水性を有していることを示しており、一般的に疎水性の高い素材として知られているポリテトラフルオロエチレン (PTFE) の接触角  $\theta = 109.2^\circ$  に匹敵する値であり、Accurel の疎水性の高さを認識することができる。

一方、ポリプロピレンは、表面をアルコールで処理することによって、表面疎水性を緩和することができることを Oromiehie, A.R. et al. (2014)が報告している。これは疎水性表面にアルコール分子が吸着し、極性基が付与されることにより、一時的であっても親水的に修飾される可能性を示している。タンパク質の担持担体として

用いるとき、目的物質に合わせて表面の物性を変化させられることは、固定化酵素の調製の上で重要である。実際に、後の第3章でアルコール処理による効果を論じる(Fig.3-5 参照)。なお、第3章(3-6)においてエタノールにより前処理した Accurel 担体への固定化量と Lipase の疎水性評価の相関を記述した(Fig.3-15 参照)。

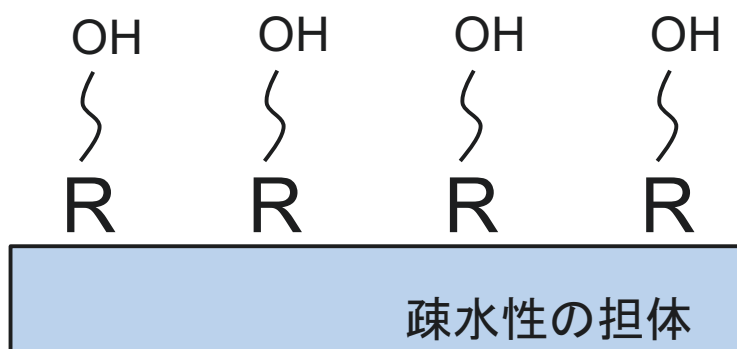


Fig.2-8 アルコール分子の吸着による疎水性担体の表面物理修飾の概念

## 2-5 走査型電子顕微鏡(SEM)による細孔構造の観察

### 2-5-1 電子顕微鏡

光学顕微鏡は、観察したい対象に光（可視光線）をあててレンズの作用で拡大するのに対し、電子顕微鏡では光の代わりに電子線をあて、電子線の反射強度または透過強度から、拡大画像を得る顕微鏡のことである。光学顕微鏡の分解能（2つの地点が「2つの点」として認識して観察される最短の距離）の限界は、可視光線の波長によって理論的に 100 nm 程度に制限されるが、電子顕微鏡では、電子線の持つ波長が可視光線よりはるかに短いので、理論的には分解能は 0.1 nm 程度にもなる。

走査型電子顕微鏡は、対象物に電子線を当てる位置を少しずつずらして走査(scan)しながら顕微鏡像が形づくられることから、電子は検出器に集められ、コンピュータを用いて2次元の像が表示される。対象の表面の形状や凹凸の様子、比較的表面に近い部分の内部構造を観察するのに優れている。観察対象が導電性のないものの場合、電子線をあて続けると表面が帯電してしまい、反射する電子のパターンが乱れるため、観察対象の表面をあらかじめ導電性を持つ物質(金・白金など)

で薄くコーティングしておくことが行われる。ただし、この操作によって、表面コーティングの影響を受ける。また、湿潤状態の対象物を観察することは原則としてできない。

## 2-5-2 解析方法

### <試料>

- ・ Accurel (original:2mm)
- ・ 微細化 Accurel ( $840 < d < 1180[\mu\text{m}]$ )
- ・ 微細化 Accurel ( $500 < d < 840[\mu\text{m}]$ )
- ・ Silica gel (2-2-2 で調製したもの)

### <器具>

- ・ カーボンテープ
- ・ 台座
- ・ HITACHI E-1010 ION SPUTTER
- ・ 走査型電子顕微鏡 (HITACHI Miniscope TM-1000)

### <手順>

- ① 試料をカーボンテープで台座に固定した。
- ② 台座を HITACHI E-1010 ION SPUTTER によって真空にし、白金イオンで表面を 120[sec]コーティング処理した。
- ③ 処理後の台座を走査型電子顕微鏡 (HITACHI Miniscope TM-1000) によって観察した。

## 2-5-3 観察結果・考察

### <Accurel>

Original の Accurel 粒子を SEM によって観察したのが、Fig.2-9・Fig.2-10 である。Accurel の表面に見かけの開口部直径が 1-3 $\mu\text{m}$  レベルの細孔が存在している。また、



その微細化した Accurel 粒子の結果が Fig.2-11 (Accurel particle ( $840 < d < 1180[\mu\text{m}]$ )) と Fig.2-12 ( $(500 < d < 840[\mu\text{m}])$ )である。これらを比較すると、Accurel 粒子が微細になるほど細孔開口部の数密度が高まっているように見える。これは、後に Fig.2-19 で述べるように Accurel 粒子の深奥部に進むにしたがって細孔が分岐しているため、微細化によってより多くの細孔開口部が表面に露出したためと考えられる。

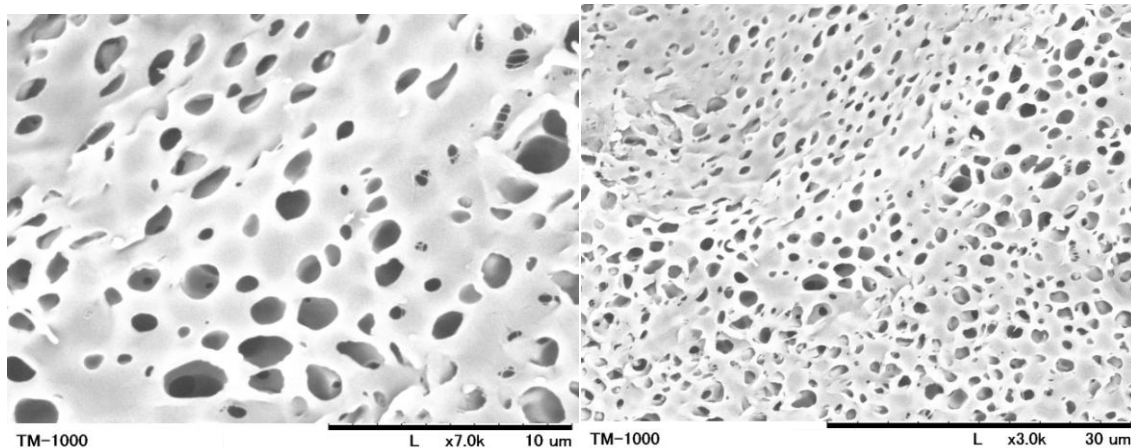


Fig.2-9 SEM image of original surface of Accurel (Original).  
The scale expresses 10 $\mu\text{m}$ .

Fig.2-10 SEM image of original surface of Accurel.  
The scale expresses 30 $\mu\text{m}$ .

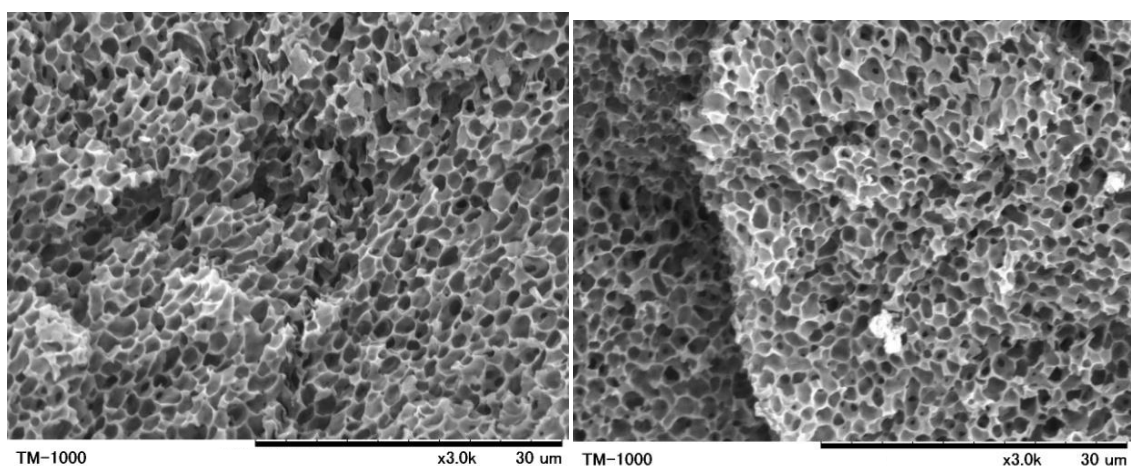


Fig.2-11 SEM image of Accurel particle ( $840 < d < 1180[\mu\text{m}]$ ).  
The scale expresses 30 $\mu\text{m}$ .

Fig.2-12 SEM image of Accurel particle ( $500 < d < 840[\mu\text{m}]$ ).  
The scale expresses 30 $\mu\text{m}$ .

### <Silica gel>

Silica gel の SEM 観察の結果が、Fig.2-13 と Fig.2-14 であり、細孔を視覚的に確認することができなかった。多孔質であったとしても、SEM で確認できないほど細孔が微小なため、酵素の吸着に必要な面積は、単に外表面積しか利用できないと考えられる。Fig.2-13 と Fig.2-14 は、著者が調製したものであるが、市販の Silica gel であっても、一般的に細孔は数 nm のレベルであり、酵素の固定化担体として用いるには細孔開口部が小さすぎると思われる。

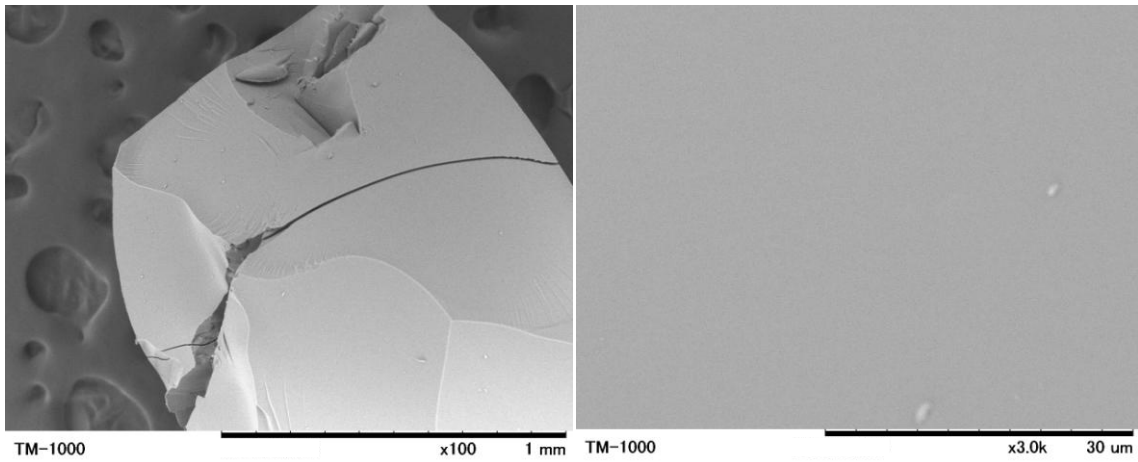


Fig.2-13 SEM image of Silica gel particle.  
The scale expresses 1mm.

Fig.2-14 SEM image of Silica gel.  
The scale expresses 30μm.

### 2-6 水銀ポロシメーターによる細孔空間の詳細構造

試料は、測定前に室温にて、デシケーター内で乾燥させた。

水銀ポロシメーターは、AutoPore III (SHIMAZU 社) を用い、試料セルを Fig.2-15 に示した。

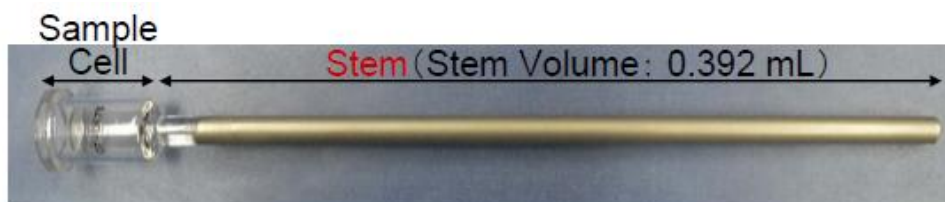


Fig.2-15 Sample cell of mercury prosimeter

Fig.2-15 に示すように，細孔を円筒状の均一の細孔とし，細孔内への水銀を圧入するために必要なエネルギーを考えると，(2-1) 式が得られる．

$$W_1 = \pi \cdot D \cdot L \cdot \gamma \quad (2-4)$$

$r$  : 円筒状細孔の直径[m]

$L$  : 円筒状細孔内に入る水銀の長さ[m]

$W_1$  : 細孔へ水銀を入れるために  
必要なエネルギー[J]

$\gamma$  : 水銀の表面張力[N/m]

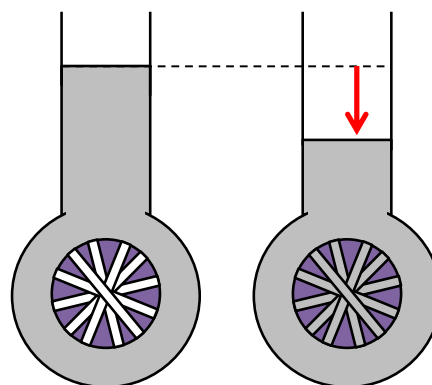


Fig.2-16 Schematic model of mercury porosimeter to measure pore volume in a carrier

Fig.2-17 に示すように，担体と水銀が濡れないと考える場合，水銀の接触角 ( $\theta$ ) は  $90^\circ < \theta < 180^\circ$  となるので，(2-5) 式が得られる．

$$W_1 = \pi \cdot D \cdot L \cdot \gamma \cdot \cos \theta \quad (2-5)$$

一方，細孔体積 ( $V=2\pi rL$ ) に水銀を外圧  $P$  で押し込むエネルギー ( $W_2$ ) は，(2-6) 式で表せる．

$$\begin{aligned} W_2 &= P\Delta V \\ &= \frac{P\pi \cdot D^2 \cdot L}{4} \quad (2-6) \end{aligned}$$

(2-5) 式と (2-6) 式 ( $W_1=W_2$ ) より，(2-7) 式の関係が成り立つ．

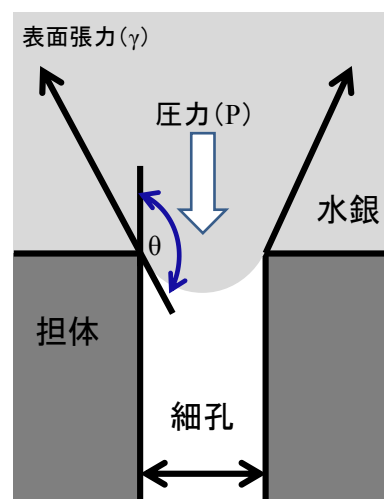


Fig.2-17 Schematic illustration of pore size measurement

$$\pi \cdot D \cdot L \cdot \gamma \cdot \cos \theta = \frac{P \pi \cdot D^2 \cdot L}{4}$$

$$\gamma \cdot \cos \theta = \frac{P \cdot D}{4} \quad (2-7) \text{ 式}$$

ここで、細孔径の直径を D に注目すると、(2-8) 式が得られる。

$$D = \frac{4\gamma \cdot \cos \theta}{P} \quad (2-8) \text{ 式}$$

(2-8) 式より、接触角 ( $\theta$ ) と表面張力 ( $\gamma$ ) を定数とすれば、圧力 (P) と水銀の封入し得る細孔直径 (D) は反比例の関係を示すことが明らかである。

Accurel の体積基準の細孔径を求めた結果を Fig.2-18 に示す。Accurel 粒子には、0.1-0.5 $\mu\text{m}$  径のピークと共に、1.0  $\mu\text{m}$  径の細孔の存在を示唆する結果を得た。微細孔の占める体積 (たて軸の値) が大きいことから、微細孔が粒子内部で分岐を重ねて大きな空間構造を形成していることが推察できる。

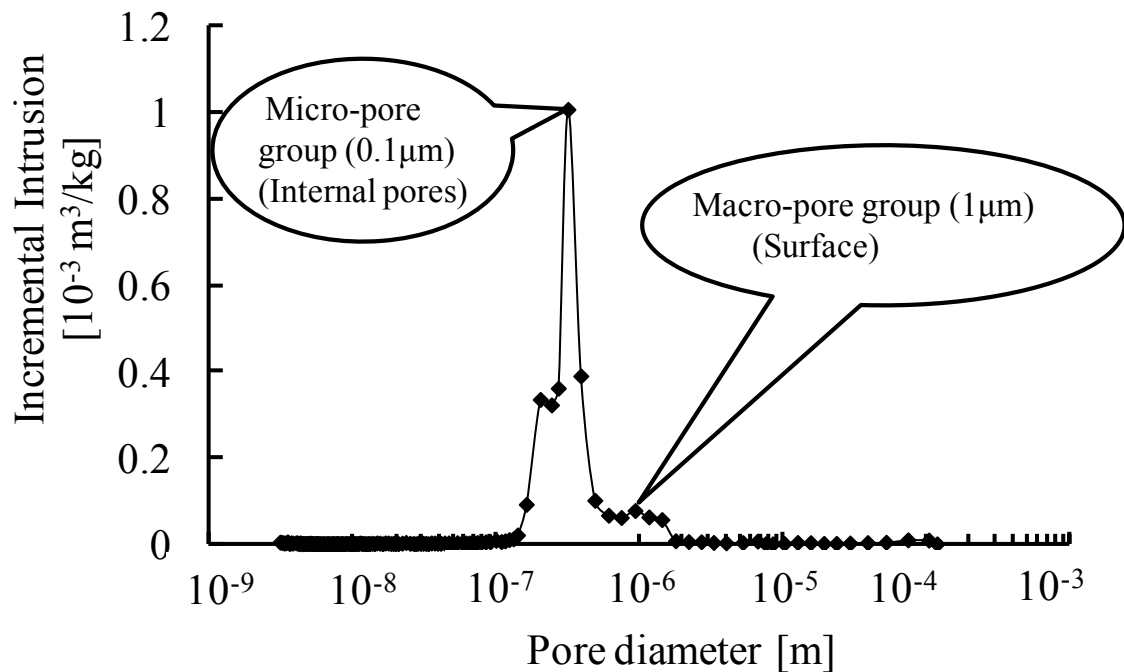


Fig.2-18 Pore size distribution of Original Accurel particles.

Fig.2-18 の結果から推察される Accurel 粒子断面の細孔構造を模式的に示したものが Fig.2-19 である。Accurel 粒子は二段の階層構造を有し、表面開口部がやや広く、深奥部に進むにしたがって、微細に分岐していく特徴的な細孔空間を有することが推察できる。表面開口部が広がっていることは大きな分子である酵素の吸着固定化に有利と考えられる。また、疎水性の基質や生成物の拡散が容易となり、開口部の閉塞も生じにくいことが予想され、長期にわたる使用に耐え得る可能性が期待できる。

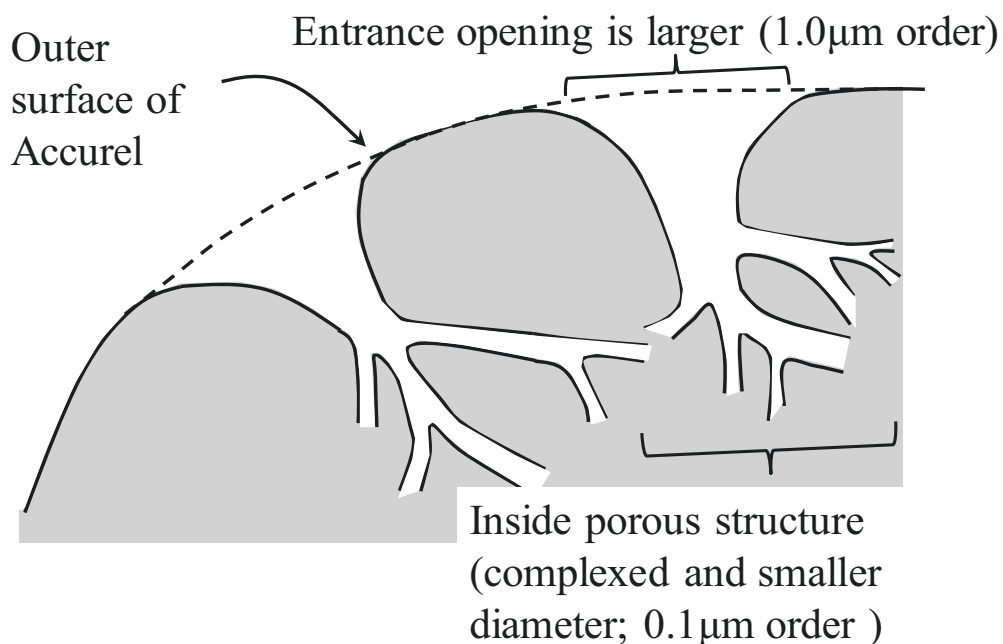


Fig.2-19 Schematic illustration of pore structure inside original Accurel particles. The opening on the outer surface was larger than that inside the Accurel particles.

また、微細化を行った Accurel 粒子 (840~1180µm) についても、細孔径分布を測定した(Fig.2-20)。微細化によって、表面開口部が露出し、Original な Accurel 粒子よりも 1.0µm オーダー以上の細孔が占める体積割合が相対的に増加した。これは、Accurel 粒子の内部に存在する細孔が微細化工程によって外表面に露出したためと考えられる。

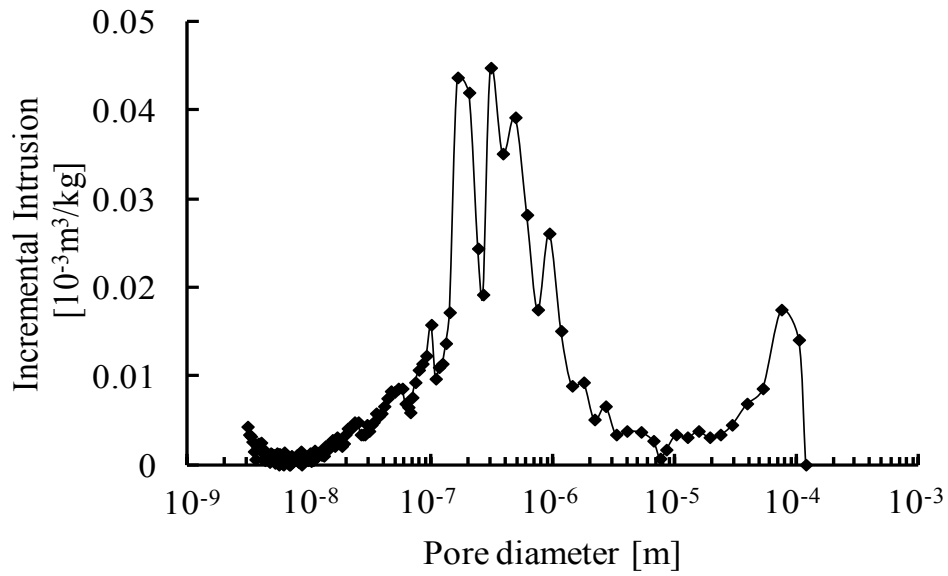


Fig.2-20 Pore size distribution of 840 to 1180 $\mu$ m crushed particles.

Accurel 粒子の一層の微細化 (500~840 $\mu$ m) を進めた場合の細孔径分布を Fig.2-21 に示した. 粒子内部の細孔構造が外表面に露出する傾向が一層顕著になり, 微細化の割合が相対的に低下し, 100 $\mu$ m レベルの孔の存在割合が増大している.

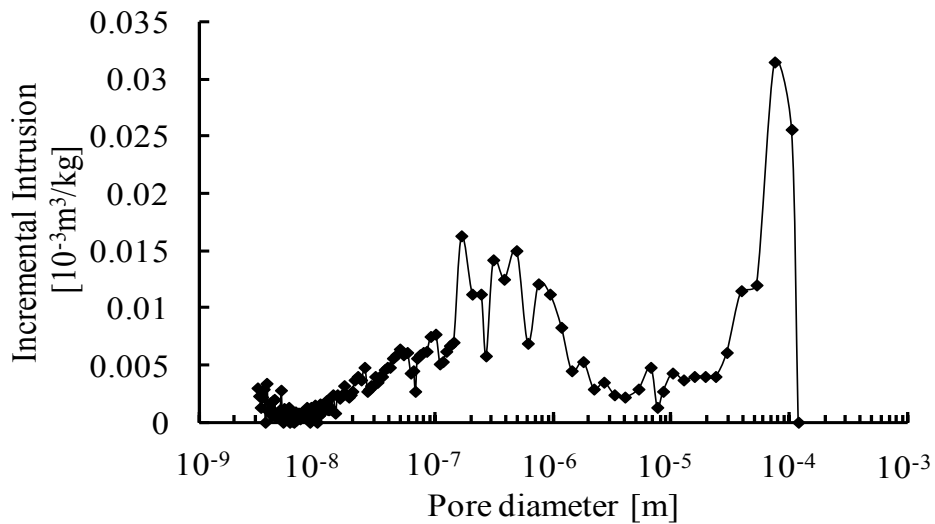


Fig.2-21 Pore size distribution of 500 to 840 $\mu$ m crushed particles.

## 2-7 走査型プローブ顕微鏡(SPM)による表面構造の観察

走査型プローブ顕微鏡(Scanning Probe Microscope; SPM)は、先端を尖らせた探針を用いて、物質の表面を走査して表面状態を拡大観察する顕微鏡である。微少な電流(トンネル電流)を利用する走査型トンネル顕微鏡(STM)と、原子間力を利用する原子間力顕微鏡(AFM)等の種類がある。

光の波長に依存する光学顕微鏡に比べて空間分解能が非常に高く、超高真空中では、AFMやSTMは原子以下のレベルの表面凹凸を観察できる。測定モードとして、以下の二点を挙げることができる。

### 1) ノンコンタクトモード(Non-contact Mode)

圧電素子によってカンチレバーを上下に振動させながら試料表面のごく近傍(数nm程度)まで近づけ、両者の間に働く原子間相互作用による力を検出し、一定の力を保って走査する。探針と試料の間の力に応じて振動の振幅、位相、周波数が変化する。これらが一定になるようにカンチレバー、もしくは試料を上下させながら測定を行なう。原則的に探針を対象物に接触させずに測定を行なうため、試料を傷つける心配がない。また光楯子方式よりも単純なので真空での測定にも適しており、ヤング率の高い(=硬い)プローブを用いることで非常に高い空間分解能を実現できる。

### 2) インターミitttentコンタクトモード(inter mittent contact mode)

DFM (dynamic force microscope)とも呼ばれる。ノンコンタクトモード同様に振動させた探針が試料表面を跳ねるように上下に動き、表面状態を測定する。生体試料や、表面に物質が弱く吸着されている場合などの破壊されやすい試料に対しても使用可能で、分解能も高く精密な測定が必要な際によく使われる手法である。液中でも使用できる。一般的に液中と空気中におけるDFMでは使用されるプローブの材質が異なる。湿潤状態の試料にも適用できるので生物・生態系由来のサンプル表面の形状探査に適している。

本研究では、上記の2種の測定法の特徴を考慮して、DFM法を用いた。



## 2-7-1 SPM による表面構造の解析

### <試料>

- ・ Accurel 粒子 (original)

### <器具>

- ・ ピンセット
- ・ カンチレバー
- ・ プロブ顕微鏡 (NanoNavi/S-image)
- ・ シャーレ
- ・ 20 $\mu$ l スキャナー

### <手順>

- ① N<sub>2</sub> ガスボンベを開栓し、ガス圧を確認した。固定ネジを緩めて光ヘッド部を後方へ移動した。マイクロメータが定位置にあることを確認した。スキャナーをセットした。
- ② サンプル台をのせ、中央に試料を置いた。DFM 用カンチレバーを AFM 用カンチレバーホルダーにセットした。
- ③ パソコンの測定メニューで試料を下げておく。
- ④ 光学金属顕微鏡を試料の上方にセット。USB カメラ像を見ながらカンチレバーに焦点をあわせ、虚像と実像を見極めた後、試料と近づけた。光学金属顕微鏡を移動し、防音カバーを閉めた。
- ⑤ Q カーブを測定した。
- ⑥ 測定位置をオートアプローチ (振幅減衰率を自動調整する) で決定した。
- ⑦ 測定条件 (振幅減衰率, I ゲイン, P ゲイン, A ゲイン, S ゲイン) を設定し、測定を開始した。

## 2-7-2 SPM による解析結果

SPM による Accurel の表面構造の解析を行った結果を Fig.2-22 に示す。Accurel の表面における細孔は SPM からの信号では凹部となって 3 次元的に認識されてい

る。開口部の形状はむしろ SEM の方が明瞭であるが、Accurel 表面の平滑度が可視化されている点で有益である。

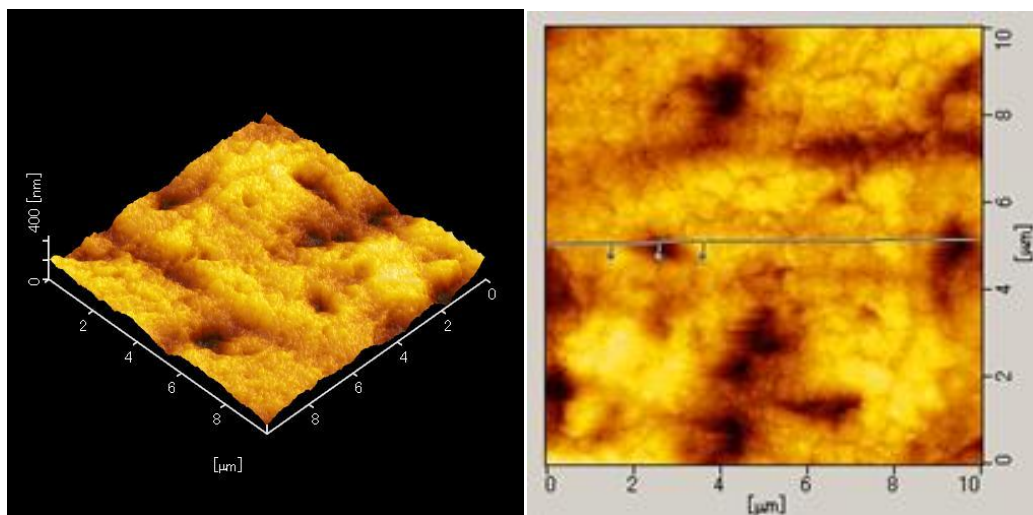


Fig.2-22 Outer surface image of Accurel by scanning probe microscopy



Fig.2-23 Cross-sectional outer surface of Accurel by scanning probe microscope

Fig.2-22 の平面図中央の任意の二点間の距離を断面方法で走査解析したものが Fig.2-23 である。表面に存在する黒い点群は、その走査断面において凹部として認識されている部位であるが、実際は細孔開口部と考えられる。V 字谷状に凹部が認識されているのはカンチレバー先端部の鋭角部が Accurel 表面の細孔開口部の縁に当たっているためと考えられる。探針先端の形状をより微細に変更することでより細孔開口部の実態が明らかになると思われる。なお、断面図での V 字谷状の開口部の距離は、2102.21nm となっており、これは 2-4 で述べた SEM による観察結果とよく一致している。

## 2-8 本章の結論

本章では、ポリプロピレン多孔質担体(Accurel)の蛍光顕微鏡による担体の表面疎水性の確認、電子顕微鏡による細孔構造の観察、水銀ポロシメーターによる細孔径分布測定、走査型プローブ顕微鏡(SPM)を用いた表面解析を行った。その結果

- ① ポリプロピレン多孔質担体(Accurel)表面上で、蛍光プローブ(Nile red)の吸着を行い、蛍光顕微鏡による観察の結果、Accurel の粒子表面が高い疎水性であることを確認した(Fig.2-6).
- ② 電子顕微鏡による観察結果によって、ポリプロピレン多孔質担体(Accurel)表面に細孔の存在(1-3 $\mu\text{m}$ )が明らかとなった。また、微細化された担体では、内部の微細孔が表面に露出し、表面細孔の数密度が増大した (Fig.2-8～Fig.2-11).
- ③ 水銀ポロシメーターによる Accurel の体積基準の細孔径分布を測定した。その結果、0.1 $\mu\text{m}$  オーダーと 1.0 $\mu\text{m}$  オーダーの 2 グループの二段階の微細孔群の存在が示唆された(Fig.2-17).  
この構造を模式的に考えると、Accurel は開口部が広がっており、深奥部に進むにしたがってさらに微細に分岐する構造を考えることができる (Fig.2-18)。このような特徴は細孔空間により多くの酵素を吸着・固定化できることが期待できる。
- ④ SPM 観察による Accurel の表面構造の解析を行った結果、Accurel の表面の凹凸と、細孔開口部の存在を確認した(Fig.2-22, Fig.2-23).

## 第3章 起源の異なる Lipase の高分子多孔質担体への吸着特性と架橋法による

### 酵素の固定化

#### 3-1 多孔質高分子を担体とした固定化 Lipase の調製

酵素を不溶性の担体に結合させる担体結合法は、固定化酵素の製法の中では最も古くから行われているものであって、その報告例も最も多い。この方法によって、酵素を固定化する場合には、結合方法とともに担体の選択にも十分な注意を払う必要がある。すなわち、使用する担体によって酵素の結合量が大きく変化し、酵素活性や基質特異性にも変化を与えることがある。したがって、担体を選ぶ場合には、固定化する酵素自身の性質とともに、担体については、①粒子の大きさ、②3次元構造による表面積の広さ、③親水性部位と疎水性部位の割合、④化学組成などを十分検討する必要がある。一般的には、担体の親水性部位を多くし、表面積を広くすれば、担体当たりの酵素の保持量が増大し、活性の高い固定化酵素が得られる。

#### 3-2 Lipase の固定化法

酵素を担体に物理吸着させたあと、アルデヒド等によって架橋させる複合法は、以前から研究されており、固定化酵素の調製において、酵素の失活の少なさと長期的な保持率の面でも注目されている。しかしながら、酵素の起源は多彩であり、その最適な担体と酵素の組み合わせや反応条件は個別に求めなければならない。

グルタルアルデヒド(GA)は、 $\text{HOC}(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$  の構造を有する二官能性試薬である。GA の有する化学的な性質は、GA の化学的性質やアミノ化合物、タンパク質との反応性を中心に解明されている。一般に、GA は一級アミノ基に対して極めて高い反応性を示す。そのため、タンパク質の主に  $\epsilon$ -アミノ基と反応することで、タンパク質を分子内あるいは分子間で架橋する。GA の多くの利用は、このタンパク質との高い反応性を利用したものである。アルデヒド基とアミノ基の典型的な反応は、シッフ塩基の生成である。シッフ塩基は通常、酸加水分解に対して不安定である。GA とアミノ基との間の反応物は酸加水分解に対して安定である。1つのアミノ基と結合するのに GA のアルデヒド基は3~5個必要である。Hardy et al.(1976) は、 $\text{N}^a$ -アセチルリジンと GA の反応物に、ピリジニウム塩が存在していることを明らかにした。GA はアミノ基との反応性が際立って高いが、システインの SH 基

とも反応する。しかし、その反応の機構も単純ではなく、反応系の中にアミノ基が存在することが必要である。したがって、アミノ基のない SH 化合物は GA と反応しない。

したがって、GA とタンパク質の反応ではリジン残基の ε-アミノ基が主要な反応部位となる。反応は多段階反応で、シッフ塩基の形成がきっかけとなり、アルドール縮合、酵素酸化反応を経由したピリジニウム塩の形成を経て、高分子化していくものと考えられる。また、アミノ基との反応において、GA に匹敵する急速な酵素消費を示すアルデヒドは他には認められていないようである(Gupta et al (2013))。

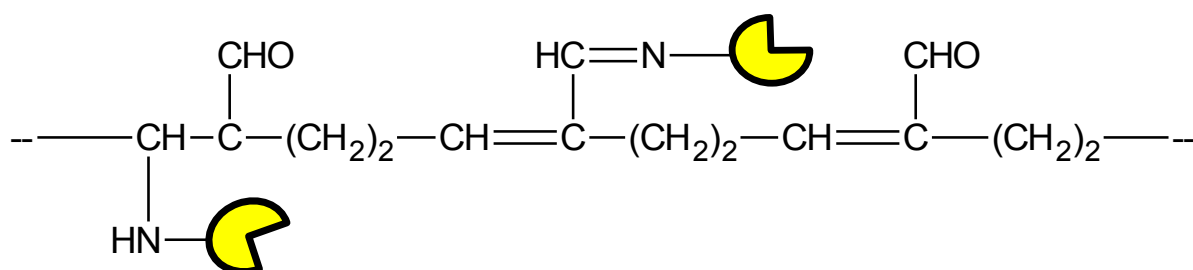


Fig.3-1 The mechanism of lipase and glutaraldehyde crosslinking

Montero et al. (1993) は、架橋グルタルアルデヒド (GA) によって架橋固定化された Lipase (*Candida rugosa*) が、より高い反応活性を示すことを指摘した。彼らの研究によれば、Accurel EP-100 を使用して 0.5%(v/v)の GA を用いた場合、固定化した Lipase (*Candida rugosa*) の活性は非固定化 Lipase の活性から 80%低下した。得られた架橋 Lipase は、5 時間の反復活性において初回の活性の 22%を保持した。GA を用いた固定化担体の調製は、Lipase の活性を安定させている。GA 処理による安定化は、担体と酵素の種類によって異なるようである。本研究は上記の背景に基づき、4 種の Lipase を取り上げて、GA による固定化の安定性について個別に検討を加え、工業的応用に向けたデータベースの構築に寄与するものである。

### 3-3 本章の目的

本章の目的は、固定化 Lipase の調製に向けて疎水性物質の代表として多孔質担体 Accurel, 親水性物質代表として Silica gel と多孔質 Zeolite を用いて, Lipase を物理吸着させ, その際の, 前処理の影響, 担体粒子径の影響, 起源の異なる Lipase の吸着量の比較を行い, 本実験系に相応しい担体の選択とその吸着特性を明らかにすることである. 本研究では, 吸着後にグルタルアルデヒドによる架橋固定を中心にその安定性と酵素の起源別に検討を加える. 酵素失活の可能性の小さい物理吸着法と酵素の結合力の強い架橋固定法を複合的に用いることで, 酵素の活性を高度に維持した固定化酵素の調製が見込まれる. 固定化後の収率と Lipase の起源による固定化量の差異についても考察する.

### 3-4 吸着実験系および解析方法

#### 3-4-1 試薬の調製

##### <試薬>

- ・塩化カルシウム (純度 95.0%, 和光純薬工業株式会社)
- ・酢酸 (純度 99.0%, 和光一級, 和光純薬工業株式会社)
- ・酢酸ナトリウム (純度 98.0%, 和光一級, 和光純薬工業株式会社)
- ・ピリジン (純度 95.0%, 和光純薬工業株式会社)
- ・酢酸銅 (II) 一水和物  
(純度 99.0%, 試薬特級, 和光純薬工業株式会社)

##### <器具>

- ・マグネティックスターラー
- ・pH メーター

##### 酢酸緩衝溶液

200 [mM] 酢酸-200 [mM] 酢酸ナトリウム水溶液  
賦活剤 10 [mM] 塩化カルシウム

<手順>

- ① 200 mM 酢酸水溶液 10 ml, 200 mM 酢酸ナトリウム水溶液 50 ml を調製した.
- ② 303 K に設定した恒温槽中で加温しながら, 酢酸ナトリウム水溶液をマグネティックスターラーで攪拌した.
- ③ pH メーターで pH を監視しつつ, pH6.5 となるように攪拌しながら酢酸ナトリウム水溶液に酢酸水溶液を添加した.
- ④ ③で調製した緩衝溶液を溶媒として, 10 mM 塩化カルシウム溶液 50 ml に調製した.

### 3-4-2 Accurel への Lipase 吸着

<試薬>

- Lipase (*Rhizopus arrhizus* 由来, SIGMA-ALDRICH)  
(*Candida rugosa* 由来, SIGMA-ALDRICH)
- Accurel MP100 (MEMBRANA GmbH)
- Protein Quantification Kit-Rapid (同人化学研究所)
- エタノール (純度 99.7%, 和光純薬工業株式会社)
- 酢酸—酢酸ナトリウム緩衝溶液(pH 6.5)

<器具>

- 振盪機
- 遠心分離機 (KUBOTA SIGMA 2-16)
- 紫外可視分光光度計 (SHIMADZU UV mini 1240)
- デシケーター
- バイアル瓶 (100 mL 用)

<手順>

- ① Accurel を所定量秤量し, 99.5%エタノールに常温下(298 K)で2時間浸漬させた.
- ② Lipase を秤量し, pH 6.5 に調整した酢酸—酢酸ナトリウム緩衝液に溶解させた. 約30分間攪拌しLipase を溶解させた後,  $3000 \text{ min}^{-1}$  で3分間遠心分離を行った. 得られた上澄みをLipase 水溶液とした.
- ③ Lipase 水溶液に前処理を施した Accurel を添加し, 常温(298 K)下で, 約30時間振盪し, 吸着させた.
- ④ 水相中のLipase 濃度を分光光度分析 (280nm, UV mini 1240, Shimadzu) により測定し, 担体への吸着量は溶液中のLipase 濃度の変化量より, その物質収支から算出した.
- ⑤ 2日間にわたり常温のデシケーター内でゆっくり乾燥させ, 吸着Lipase を吸着させた Accurel 担体を得た.

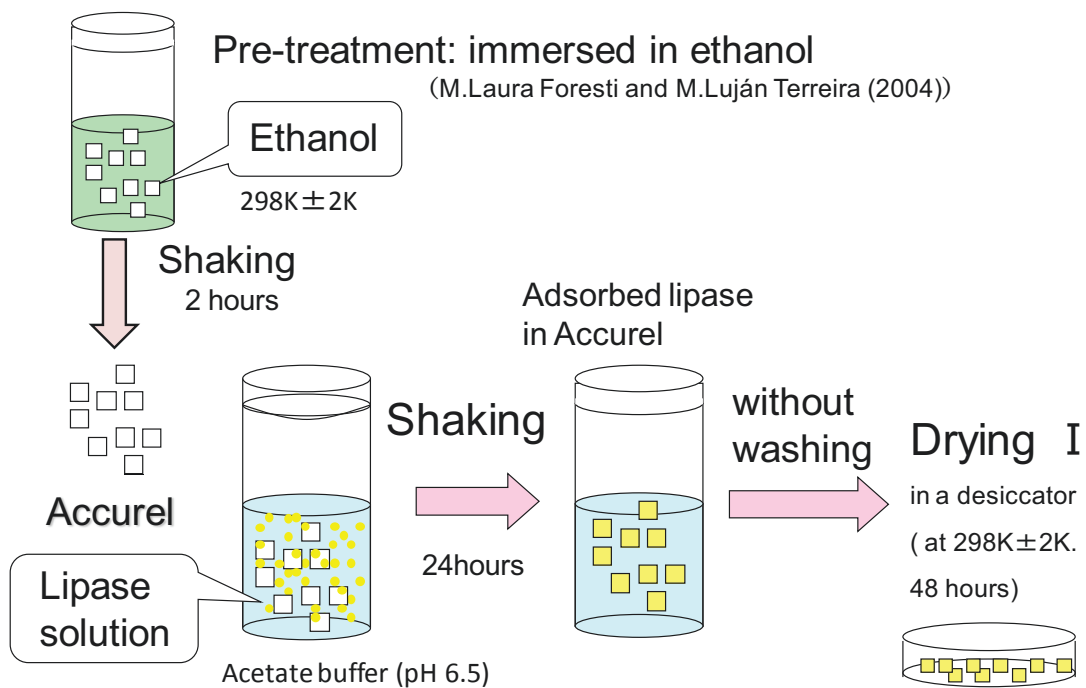


Fig.3-2 The method of lipase adsorption on Accurel



### 3-4-3 Silica, Zeolite への Lipase 吸着

#### <試薬>

- Lipase (*Candida rugosa* 由来, SIGMA-ALDRICH)
- Accurel MP100 (MEMBRANA GmbH)
- Silica gel (2-2-2 で調製したもの)
- Zeolite (合成 Zeolite, F-9, 球状, 1.40-2.36mm, 和光純薬工業株式会社)
- エタノール (純度 99.7%, 和光純薬工業株式会社)
- 酢酸—酢酸ナトリウム緩衝溶液(pH 6.5)

#### <器具>

- 振盪機
- 遠心分離機 (KUBOTA SIGMA 2-16)
- 紫外可視分光光度計 (SHIMADZU UV mini 1240)
- デシケーター
- バイアル瓶 (100 mL 用)

#### <吸着手順>

- ① 担体を所定量秤量し, 99.5%エタノールに 2 時間浸漬させた.
- ② Lipase を所定量秤量し, pH 6.5 に調整した酢酸—酢酸ナトリウム緩衝液に溶解させた. 約 30 分間攪拌し, Lipase を溶解させた後,  $3000 \text{ min}^{-1}$  で 3 分間遠心分離を行った. 得られた上澄みを Lipase 水溶液とした.
- ③ Lipase 水溶液に前処理を施した担体を添加し, 常温(298 K)下で, 約 30 時間の振盪し, 吸着させた.
- ④ 水相中の Lipase 濃度を分光光度分析 (280nm, UV mini 1240, Shimadzu) により測定し, 担体への吸着量は溶液中の Lipase 濃度の変化量より, その物質収支より算出した.
- ⑤ 2 日間にわたり常温の, デシケーター内でゆっくり乾燥させ, Lipase を吸着させた担体を得た.

### 3-5 吸着実験結果および考察

吸着特性の予備実験として吸着量に対する pH の影響を求めた。その結果を Fig.3-3 に示す。pH 6.5 で吸着量の極大値がみられた。Lipase の等電点 (pI) はその起源によって異なるが、*R. arrhizus* lipase の場合、pI は 5.0 とされている。等電点より塩基性側の条件となる pH 6.5 では負荷電していると考えられる。担体表面の荷電状態について本研究では測定していない。今後、静電的引力に関する検討が必要である。

なお、本論文の第 4 章 4-5-4 に述べるように *R. arrhizus* lipase 反応活性は pH 6.5 で最大値を呈した。この点も考慮して、本研究では、*R. arrhizus* lipase の酵素反応の pH 条件を pH 6.5 と設定した。なお、反応系においても固定化の安定性を考慮して pH 6.5 と設定した。

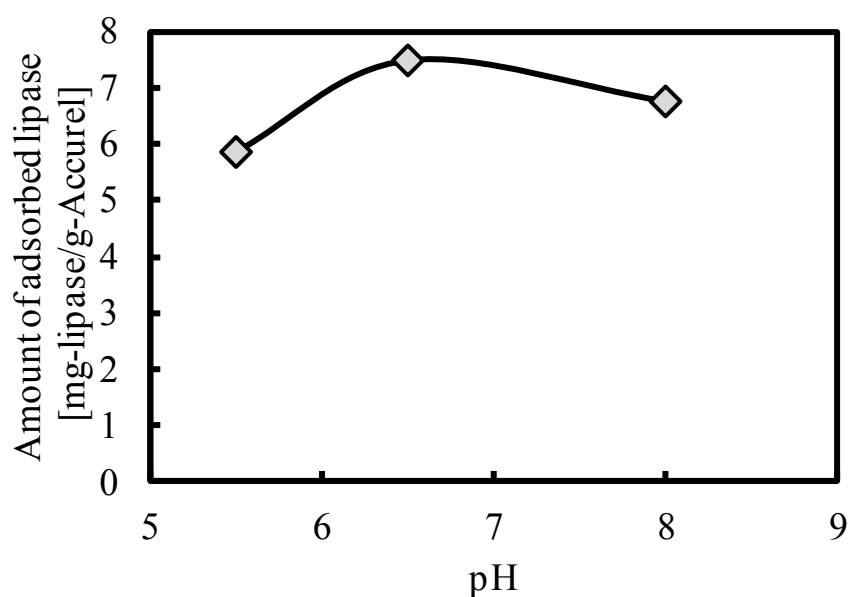


Fig.3-3 Effect of pH in lipase (*Rhizopus arrhizus*) adsorption to Accurel surface in acetate buffer solution.

### 3-5-1 Silica, Zeolite への Lipase の吸着量

著者により調製された Silica と Zeolite を用いて Lipase (*Candida rugosa*) の吸着実験を行った(Fig.3-4). Silica への吸着量は, 担体の単位質量あたり Accurel 担体を用いた場合の 50%に留まった. 第 2 章で示したように Silica 粒子の表面を SEM 観察した結果から細孔が確認できず, 単調な平滑表面のみ観察されたので, 吸着は表面のみに生じているものと考えられる. また, 第 4 章で示すように有機溶媒中での脂質の加水分解反応においても, Silica 粒子を固定化担体として用いた場合, 生成脂肪酸量は非常に低濃度であり, 担体として実質的に機能していないと判断できる.

Zeolite は, 粒子径が小さく(1.40-2.36 mm), 液相に分散後, 回収が困難でハンドリング上の問題が認められた. Zeolite では, 酵素の大きさ(Lipase は一般的に 4.75 nm)に対してその細孔径(0.9 nm)が小さすぎるため, 吸着量は Accurel 粒子の単位質量の約 35%に留まった.

比較検討の結果, 担体粒子として Accurel が優れていると判断した.

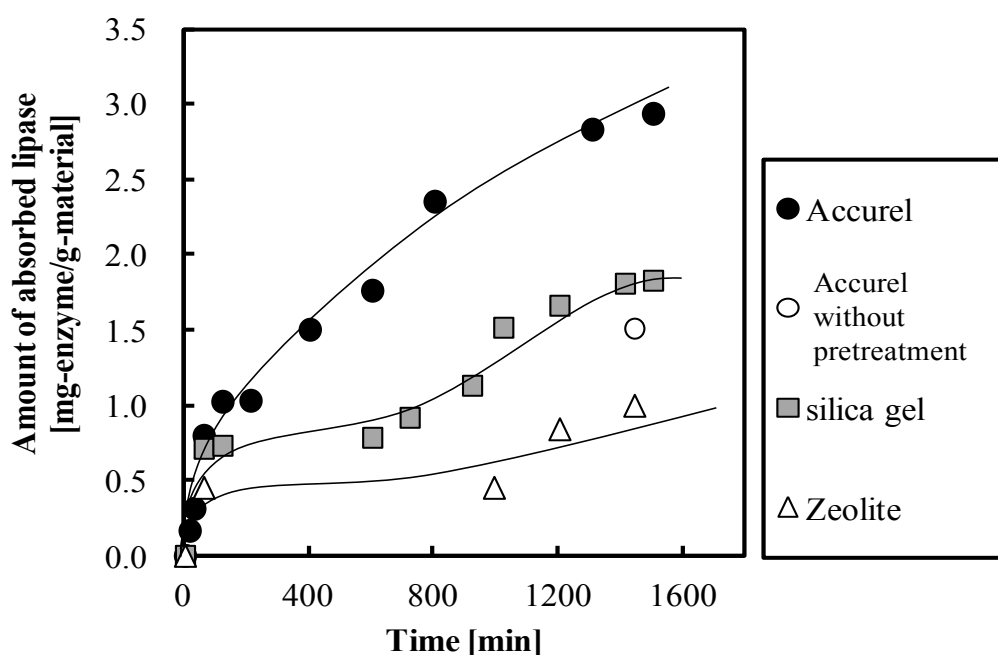


Fig.3-4 The amount of adsorbed lipase by carriers (Silica, Accurel, Zeolite)

### 3-5-2 前処理としてのエタノールの影響

3-4-2 で述べたエタノールによる Accurel 粒子の前処理は, Lipase の物理吸着を促進する意味で重要である. Fig.3-5 は, *Candida rugosa* lipase についてエタノールの前処理の影響について示している. エタノールの前処理を施した後に明らかに Lipase の吸着量が高まっている. M.Laura Foresti と M.Luján Terreira (2004)の研究でも, ポリプロピレン粒子に Lipase を吸着させる際に, エタノール中に担体を浸漬させることで酵素の吸着量を増大させている.

すでに本論文の 2-4-2 において記述したように, エタノールのアルキル基がポリプロピレン表面に吸着し, 分子末端の水酸基が固体表面の外側に向いて吸着することにより, 固体表面に極性基(-OH 基)が増すため, 親水的に修飾されると考えられる(Fig.2-8 参照). これにより, 酵素の分子鎖(molecular globule)外側に比較的多く存在する親水性アミノ基との吸着親和性が向上し, 吸着量の増大をもたらしたと考えることができる.

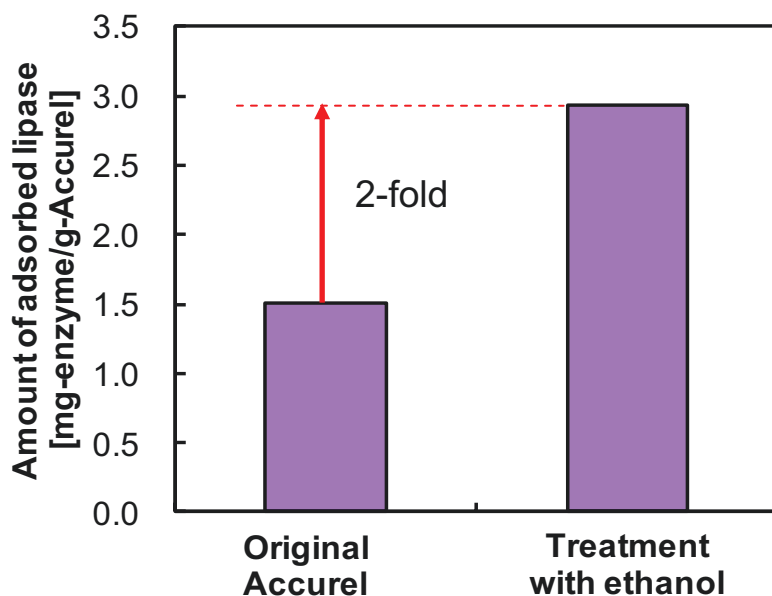


Fig.3-5 Effect of pre-treatment by ethanol on adsorption of lipase (*Candida rugosa*)

### 3-5-3 前処理としての Accurel の粒子径の影響

酵素の吸着量に対する担体の粒子径サイズの影響を検討した. Fig.3-6 に示したように, Accurel 粒子を微細化することによって粒子単位質量あたりの外面積の総和は増大した. 一方, Fig.3-7 に示すように, Accurel の粒子径が微細になるにしたがって吸着量は増大したが, 表面積の増分ほど吸着量は増大していない. このことは, 外面積の増大による吸着量の増大は存在するものの, Accurel 担体の内部に広がっている細孔の表面積における吸着量が支配的であることを示唆している. ただし, 粒子径を小さくすることは, 酵素の吸着量の増大ばかりでなく, 担体内への拡散抵抗の減少も期待できるので, 固定化酵素の反応速度を向上させる因子として重要である. なお, 粒子径の変化にともなう反応活性の変化については, 担体表面積の変化とともに本論文 4-7 で記述している(Fig.4-21~4-22 参照).

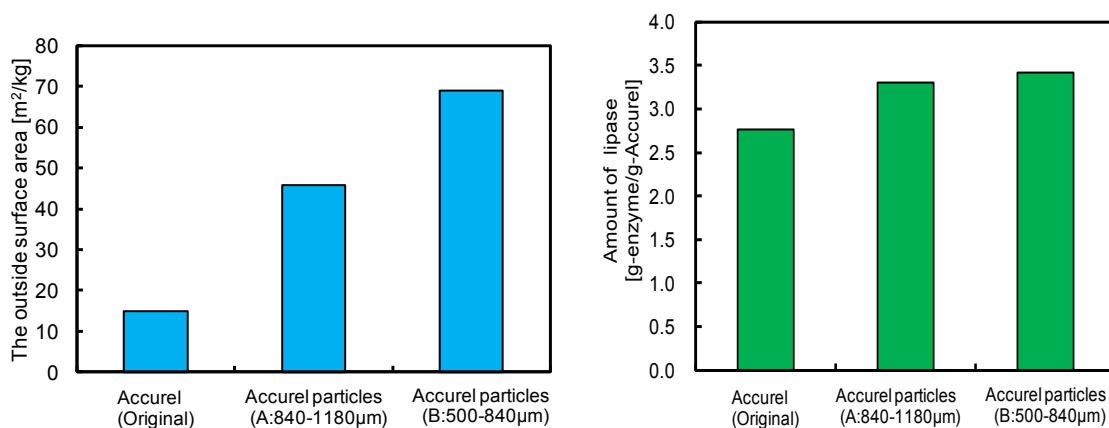


Fig.3-6 The outside surface area of Accurel particles

Fig.3-7 The adsorbed amount of lipase (*Candida rugosa*) by using different size of Accurel particles

### 3-5-4 起源の異なる Lipase の吸着

Accurel 表面への Lipase (*Rhizopus arrhizus*) の吸着の経時変化を示したものが Fig.3-8 である. 約 24 時間の振盪攪拌によってほぼ吸着平衡に達していることがわかる.

4種の起源の異なる Lipase (*R. arrhizus*, *C. rugosa*, *C. cylindracea*, wheat germ) を用いて、24 時間後の Accurel への吸着量の比較を行った結果が、Fig.3-9 である。このように、同じ担体を用いても Lipase の起源によって、吸着量がかなり異なる。本研究では、この理由について、後の 3-6 で述べるように、酵素自身の疎水性と相関をとって考察した。

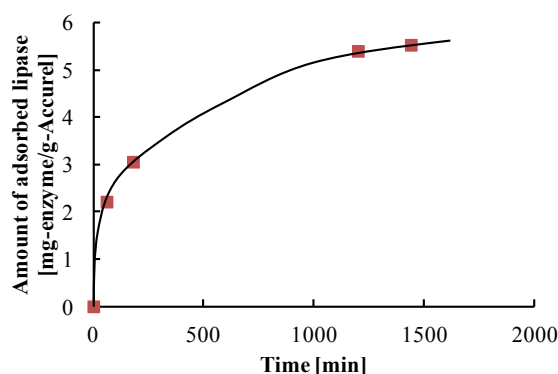


Fig.3-8 Amount of adsorbed lipase (*Rhizopus arrhizus*) per unit mass of Accurel.

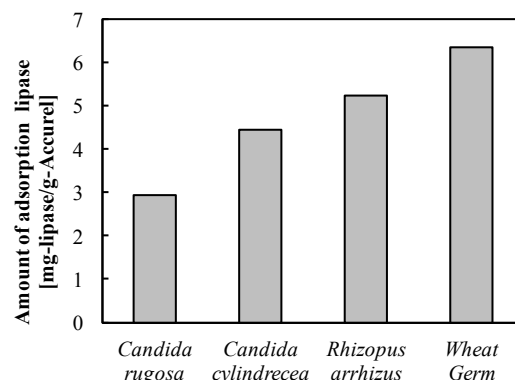


Fig.3-9 Amount of adsorbed lipase at 24h was depended on lipase species (Original Accurel)

位置特異性の異なる *R. arrhizus* lipase と *Candida rugosa* lipase を取り上げ、吸着平衡濃度を比較した (Fig.3-10).

Fig.3-10 の結果に基づき、Fig.3-11 は、Langmuir 吸着等温度式に基づいて解析した結果である。直線関係が得られたことから単分子層吸着が推定される。最大吸着量  $Q_{max}$ [g-enzyme/g-carrier]は、*R. arrhizus* で  $8.33 \times 10^{-3}$ 、*C. rugosa* で  $4.76 \times 10^{-3}$  あった。*R. arrhizus* lipase の方が *C. rugosa* lipase より Accurel に対する吸着親和性が高いと言える。

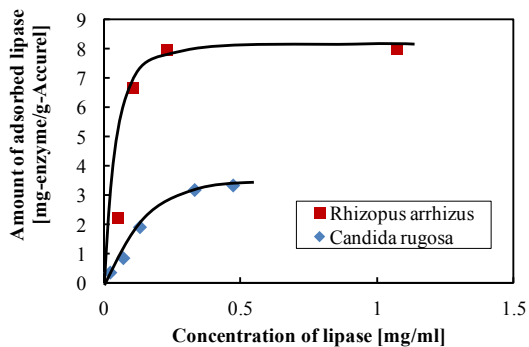


Fig.3-10 The change of the amount of adsorbed lipase

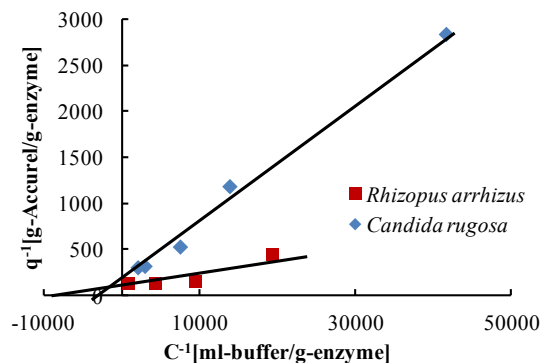


Fig.3-11 Characterizations of lipase (*Rhizopus arrhizus* · *Candida rugosa*) adsorption

### 3-6 Lipase の起源と物性

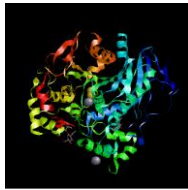
起源の異なる Lipase によって、吸着量に差異が生じる要因として、酵素の疎水性に着目した。Kyte & Doolittle (1982)並びに Engelman (1986)らは、膜貫通モデルからタンパク質のアミノ酸配列の疎水性を測定し、アミノ酸配列に現れるアミノ酸の疎水性を定めた(Table 3-1)。(Kyte, J. and Doolittle, R. (1982) *J. Mol. Biol.* 157: 105-132)。この指標によれば、正值が大きくなるほど疎水的、負値になるほど親水的な性質を示している。

Table 3-1. アミノ酸の疎水性指標 (A 列:J.Kyte & Doolittle; B 列:D.A. Engelman, T.A.Steitz, A.Goldman の指標 )

アミノ酸	Phe	Met	Ile	Leu	Val	Cys	Trp	Ala	Thr	Gly	Ser	Pro	Tyr	His	Gln	Asn	Glu	Lys	Asp	Arg
A	2.8	1.9	4.5	3.8	4.2	2.5	-0.9	1.8	-0.7	-0.4	-0.8	-1.6	-1.3	-3.2	-3.5	-3.5	-3.5	-3.9	-3.5	-4.5
B	3.7	3.4	3.1	2.8	2.6	2.0	1.9	1.6	1.2	1.0	0.6	-0.2	-0.7	-3.0	-4.1	-4.8	-8.2	-8.8	-9.2	-12.3

Protein Date Bank より本研究で取り上げた 4 種の Lipase のアミノ酸塩基配列を Fig.3-12 に示す。

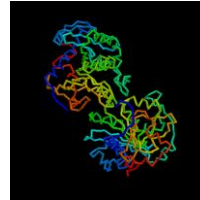
*Candida rugosa* Lipase(1lpn)



MELALALSLIASVAAAPTATLANGDITITGLNAINIEAFLGI  
PFAEPPVGNLRFKDPVPYS  
GSLDGGQKFTSYGSPSCMQQNEPGTYEENLPAKALDLMV  
QSKVFEAVSPSEDECLTINVVRP  
PGTKAGANLPVMLWIFGGGFVGGTSTFPPAQMITKSI  
AMGKPIIHVSVNRYRVSWSGFLA  
GDEIKAEGSANAGLKDQRLGMQWVADNIAAFGGDPT  
KVITIFGESAGSMSVCHLWNGD  
DNTYKGPLFRAGIMOSGAMVPSDAVDGIYGNIEFDLL  
ASNAGCGSASDKLACLRGVSST  
LEDATNNTPGFLAYSSLRLSYLPRPDGVNITDDMYALVRE  
GKYANIPVIIGDQNDQETFF  
GTSLSLVTTDAQAREYFKQSFVHASDAEIDLMTAYPGD  
ITQGGSPFDITGLNALTPOFKR  
ISAVLGDGLGTLARRYFLNHYTGTKYFSLKQLSGLPLVG  
TFHSDIVFDYLLGSGSL  
IYNNAFIAFATDLDPNATGLLVKWEYPTSSSQSNNLM  
MINALGLYTGKDNFRTAGYDAL  
FSNPPSFFV

(a)

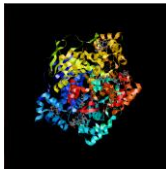
*Rhizopus arrhizus* Lipase(1tic)



SDGGKVAATAAQIEFTKYAGIAATAYCRSVVPGN  
KWDVCQQKVVDPDKIITFTSLL  
SDTNGVYLRSDKQKTYLVRGTSFRSAITDIVFNFS  
DYKPKVGAKVHAGFLSSYEQVV  
NDYFVYVQLQTAHTYKVIIVTGHSLGGAQALLAG  
MDLYQREPLSPKNSLIFTVGGPRV  
GNPTFAYVVESTGIPFQRTVHKRDIIVPHVPPQSGFGL  
HPGVESWIKSGTSNVQICTSEIE  
TKDCSNSIVPFTSLDLHLSYDINEGSC  
SDGGKVAATAAQIEFTKYAGIAATAYCRSVVPGN  
KWDVCQQKVVDPDKIITFTSLL  
SDTNGVYLRSDKQKTYLVRGTSFRSAITDIVFNFS  
DYKPKVGAKVHAGFLSSYEQVV  
NDYFVYVQLQTAHTYKVIIVTGHSLGGAQALLAG  
MDLYQREPLSPKNSLIFTVGGPRV  
GNPTFAYVVESTGIPFQRTVHKRDIIVPHVPPQSGFGL  
HPGVESWIKSGTSNVQICTSEIE  
TKDCSNSIVPFTSLDLHLSYDINEGSC

(c)

*Candida cylindracea* Lipase (1llf)



APTAKLANGDITITGLNAINIEAFLGIPFAEPPVGNLRFKDPVPYSGSLNGQK  
TSYGSPSCMQQNEPGTFFENLGTALDLMQSKVFAVLPQSEDECLTINVVR  
PFGTAGANLPVMLWIFGGGFISPTFPPAQMITKSI  
YRVASWGLAGDDIKAECSGNALQDRLGMQWVADNIAAFGGDPSKVT  
IFGESAGMSVLCHLWNGDNTYKGPLFRAGIMOSGAMVPSDPVDGTY  
GNEIYDLFVSSAGCGSASDKLACLRSSASDITLDATNNTPGFLAYSSLRLSYL  
RPDGNITDDMYKLVDRGKYASVPIIGDQNDQETIFGLSLNVTNAQAR  
AYFKQSFHASDAEIDLMAAYPQDITQSGPFDITGFNATPQFKRISAVLGLD  
AFIHARRYFLNHFQGGTKYFSLKQLSGLPIMGTFHNDIVWQDYLLGSGSV  
IYNNAFIAFATDLDPNATGLLVKWEYPTSSSQSNNLMINALGLYTGKDN  
FRTAGYDALMTPSSFFVAPTAKLANGDITITGLNAINIEAFLGIPFAEPPVGNL  
RFKDPVPYSGSLNGQKFTSYGSPSCMQQNEPGTFFENLGTALDLMQSKV  
QAVLPQSEDECLTINVVRPPTKAGANLPVMLWIFGGGFIEGSPITFPPAQM  
VTKSVLMGKPIIHVAVNRYRVSWSGFLAGDDIKAECSGNALQDRLGMQ  
WVADNIAAFGGDPSKVTIFGESAGMSVLCHLWNGDNTYKGPLFRAGI  
MOSGAMVPSDPVDGTYGNEIYDLFVSSAGCGSASDKLACLRSSASDITLDA  
TNNTPGFLAYSSLRLSYLPRPDGNITDDMYKLVDRGKYASVPIIGDQNDQ  
ETIFGLSLNVTNAQARAYFKQSFHASDAEIDLMAAYPQDITQSGPFDITG  
IFNATPQFKRISAVLGLDAFIHARRYFLNHFQGGTKYFSLKQLSGLPIMGTF  
HANDIVWQDYLLGSGSVIYNNAFIAFATDLDPNATGLLVNWPKYTSSSQS  
NNLMINALGLYTGKDNFRTAGYDALMTPSSFFV

(b)

*Wheat germ* Lipase (3ngm)



AVSVSTTDFGNFKFYQHGAAYCNSEAPAGAKVTCGNGCPTVQSNGATVASFSGK  
TGIGGYATDPTKKEIVSFRGSINRNLWTLDFDQDCSLTSGCGVHSGFQNAWNEI  
SAATAAWAKARKANPSFKVSVHSLGGAVATLAGANLRIGGTPLDIYTYSPRVGNT  
QLAAVYSKQJGGERFTNAKDPVRLPFLPFYRHTSPEYWLSSGGDKIDYINDVK  
VCEGAANLQCNQGTGLDIDAHLYHQATDCSAGSISWRYSKAKRESISERATMTD  
AELEKLNYSYEMDEKEYIKTHASRSASVSTDFGFKFYQHGAAYCNSEAPAGAK  
VTCGNGCPTVQSNGATVASFSGKTGIGGYATDPTKKEIVSFRGSINRNLWTLDF  
FDQDCSLTSGCGVHSGFQNAWNEISAATAAWAKARKANPSFKVSVHSLGGAWA  
TLGAGANLRIGGTPLDIYTYSPRVGNTQLAAVYSKQJGGERFTNAKDPVRLPFLPF  
YRHTSPEYWLSSGGDKIDYINDVKVCEGAANLQCNQGTGLDIDAHLYHQATDC  
SAGSISWRYSKAKRESISERATMTDAELEKLNYSYEMDEKEYIKTHASRSASVST  
DFGFKFYQHGAAYCNSEAPAGAKVTCGNGCPTVQSNGATVASFSGKTGIGGYVA  
TDPTKKEIVSFRGSINRNLWTLDFDQDCSLTSGCGVHSGFQNAWNEISAATAAW  
AKARKANPSFKVSVHSLGGAVATLAGANLRIGGTPLDIYTYSPRVGNTQLAAVYSN  
QAGGERFTNAKDPVRLPFLPFYRHTSPEYWLSSGGDKIDYINDVKVCEGAANL  
QCNQGTGLDIDAHLYHQATDCSAGSISWRYSKAKRESISERATMTDAELEKLN  
YSYEMDEKEYIKTHASRSASVSTDFGFKFYQHGAAYCNSEAPAGAKVTCGNGC  
PTVQSNGATVASFSGKTGIGGYATDPTKKEIVSFRGSINRNLWTLDFDQDCSL  
TSGCGVHSGFQNAWNEISAATAAWAKARKANPSFKVSVHSLGGAVATLAGANLRI  
GGTPLDIYTYSPRVGNTQLAAVYSKQJGGERFTNAKDPVRLPFLPFYRHTSPEY  
WLSSGGDKIDYINDVKVCEGAANLQCNQGTGLDIDAHLYHQATDCSAGSISW  
RYSKAKRESISERATMTDAELEKLNYSYEMDEKEYIKTHASRS

(d)

Fig.3-12 Primary amino acid sequence of lipase by (a) *Candida rugosa*, (b) *Candida cylindracea*, (c) *Rhizopus arrhizus*, (d) wheat germ

酵素の一次構造のアミノ酸配列に沿って、疎水性指標(Table 3-1)をグラフ化したものが Hydropathy plot と呼ばれ、Fig.3-13 にその結果を示す。Fig.3-13 中の赤いラインを超えるアミノ酸は、細胞膜を貫通できる疎水性を有するアミノ酸である。



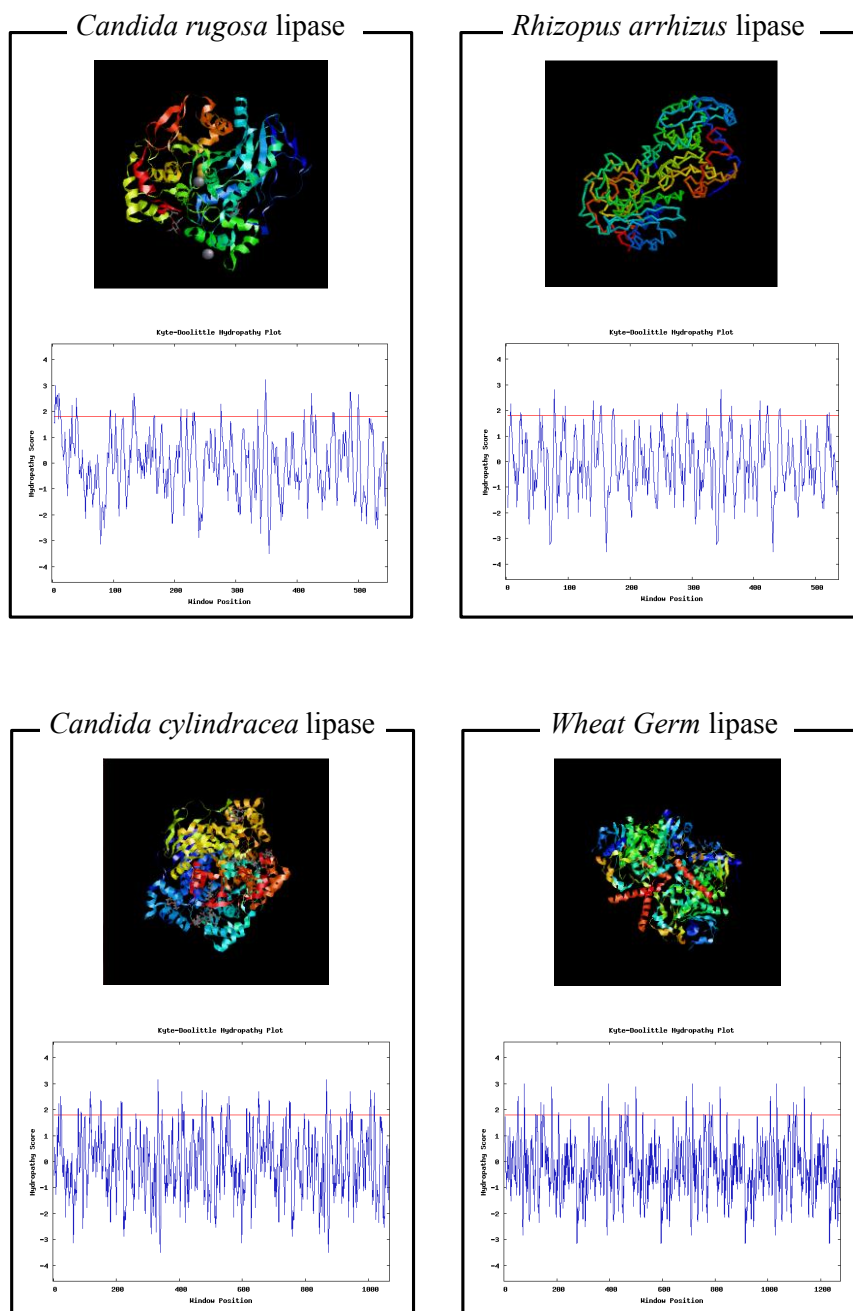
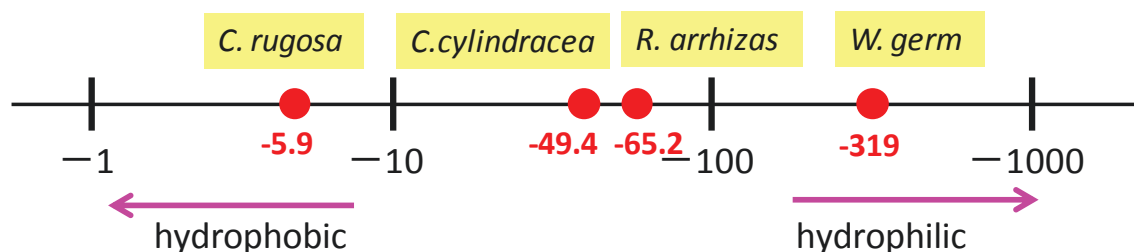


Fig.3-13 Hydropathy plot of tested lipases

さらに、酵素の1次構造の疎水性の値を積算した。Hydropathy Scoreは *Candida rugosa* lipase で-5.9, *Candida cylindracea* lipase で-49.4, *Rhizopus arrhizus* lipase で-65.2, wheat germ lipase で-319.2であった(Fig.3-14)。4種とも積算値が負の値になり、分子全体としては親水性のアミノ酸が優越しているが、*Candida rugosa* と wheat germ で

は 50 倍の差があり，同じ Lipase でもアミノ酸の疎水性は大いに異なる．各 Lipase のアミノ酸の数は異なり，分子量も相当異なるので，解離性アミノ酸の存在を考慮すると，お互いの静電的性質也大いに異なり，固定化収率に影響していると考えられる．



\*Based on hydrophobic scale by Kyte and Doolittle's evaluation. (Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982). Journal of Molecular Biology, 157, 105-132)

Fig.3-14 Hydrophobicity scale of lipase by 4 origin (Kyte&Doolittle による疎水性評価指標を用いた著者の計算結果)

各 Lipase のアミノ酸の Hydrophobicity scale の積算値と吸着量の相関を Fig.3-15 に示す．Lipase の親水性が増大するほど，吸着量が対数比例した．Accurel 自身の素材は疎水性であるが，Fig3-15 のように親水性の高い Lipase が多数分子吸着し，かつ，固定化されていることから，Fig.2-8(第 2 章 2-4)に例示したようにエタノールによる前処理の効果が現れたものと推定することができる．

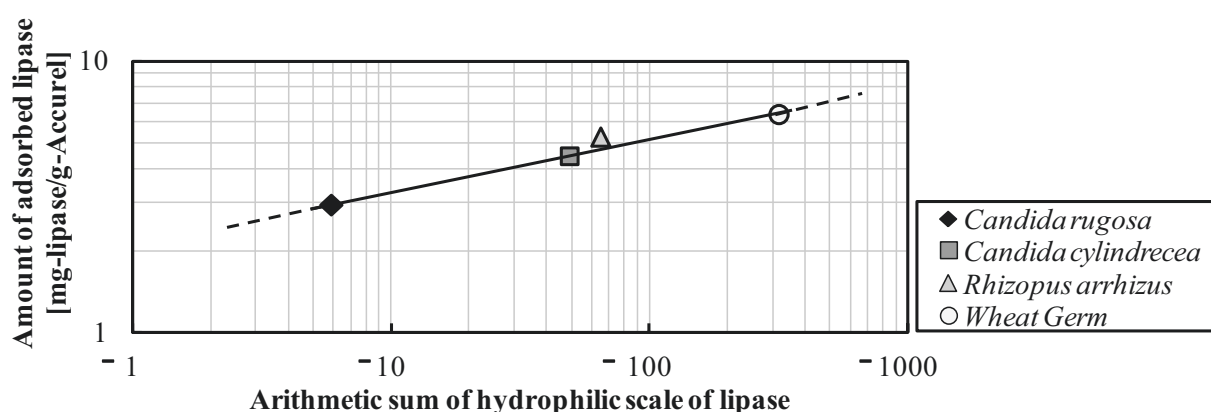


Fig.3-15 Correlation between adsorbed amount of lipase and hydrophilic character of lipases. Arithmetic sum of hydrophobicity scales of each lipase was calculated by authors based on reported previous paper (Kyte & Doolittle (1982))

### 3-7 固定化実験系および解析方法

#### 3-7-1 グルタルアルデヒド処理による固定化 Lipase の調製

##### <試薬>

- ・ Lipase (*Rhizopus arrhizus* 由来, SIGMA-ALDRICH)
- ・ Accurel MP100 (MEMBRANA GmbH)
- ・ Protein Quantification Kit-Rapid (同人化学研究所)
- ・ グルタルアルデヒド (純度 24.0~26.0%, 和光純薬工業株式会社)

##### <器具>

- ・ 振盪機
- ・ 紫外可視分光光度計 (SHIMADZU UV mini 1240)
- ・ デシケーター
- ・ バイアル瓶 (100 mL 用)

##### <手順>

- ① Lipase を吸着した Accurel 担体をデシケーター内で 2 日間室温で乾燥させた。
- ② 1.5–6%となるようにグルタルアルデヒド (GA) を所定の pH に調製した酢酸緩衝液に溶解させた。これを GA 水溶液とした。
- ③ Lipase を吸着させた Accurel 担体を GA 水溶液に浸漬させ、60 分間の振盪操作により固定化させた。Protein Quantification Kit-Rapid を用いて、GA 水溶液内に脱離した Lipase 量を定量した。
- ④ GA による固定化操作の後、担体表面の GA を蒸留水で洗浄して除去し、2 日間、デシケーター内で室温条件下でゆっくり乾燥させた。これを固定化 Lipase とした。

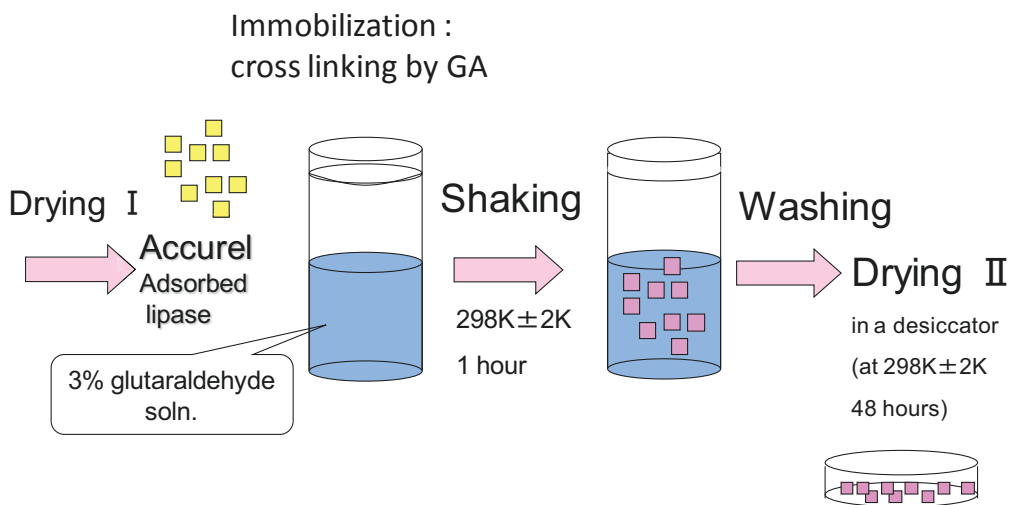


Fig.3-16 Experimental procedure of the immobilization of lipase on Accurel

固定化操作に用いる GA 濃度の検討として、GA 濃度 1.5–6% で架橋固定化した固定化 Lipase (*R. arrhizus*) をイソオクタン中にて攪拌し、脱離した酵素量より担体に残留する Lipase 量を求め、その経時変化が Fig.3-17 である。本研究の測定時間は脂質の加水分解反応の 5 回分に相当する 300 分間である。300 分後に担体内に残留した固定化酵素量と GA 濃度の相関が Fig.3-18 である。3% の GA を固定化操作に用いた場合は、300 分後において約 90% が脱離することなく担体内に固定化されていた。これより、本研究では、3% の GA 処理による固定化酵素を使用することとした。

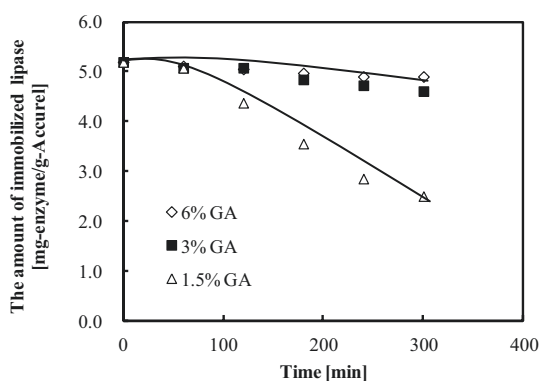


Fig.3-17 Time course of the immobilized amount of lipase (*R. arrhizus*) immersed in iso-octane.

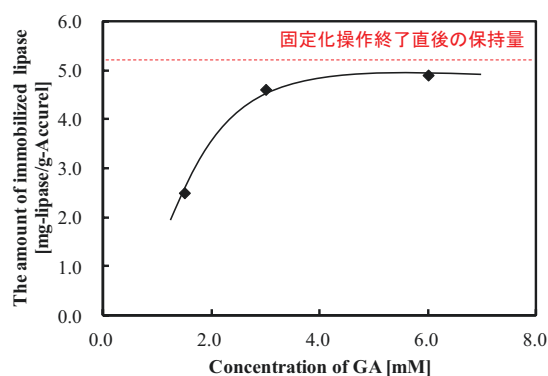


Fig.3-18 Effect of GA concentration on the immobilized amount of lipase (*R. arrhizus*) immersed after 300 [min] in iso-octane

### 3-7-2 固定化収率に対する吸着操作に用いた pH の影響

Fig.3-19 の縦軸は、固定化操作中に GA 水溶液内に脱離した *R. arrhizus* Lipase 量を測定し、吸着量からこれを差し引いて求めた実質的な固定化量である。

いずれの pH 条件によらず、吸着した Lipase が GA(3%)による固定化操作によって 98%以上の収率を達成し、安定した固定化が実現している。

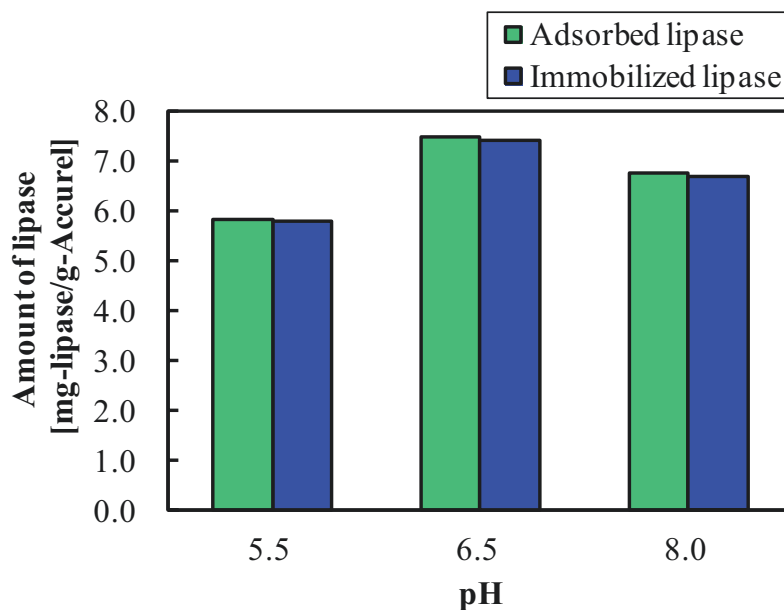


Fig.3-19 Comparison of adsorbed lipase (*Rhizopus arrhizus*) and immobilized lipase per unit mass of Accurel. The immobilized yield remained high level (over 98%) on every tested pH in adsorption.

### 3-7-3 固定化収率に対する粒子径の影響

Accurel 粒子のサイズと固定化収率の関係を Fig.3-20 に示した。いずれの粒子径でも、98%以上の高い初期固定化収率を達成した。本研究での吸着と架橋による複合固定化法が、担体の比表面積によらず、安定的な固定化方法であることを示している。

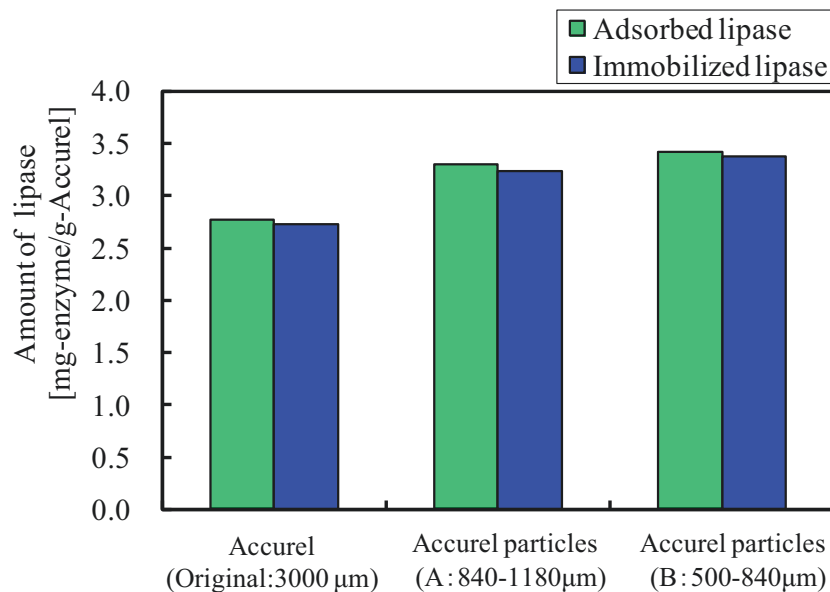


Fig.3-20 Comparison of adsorbed lipase (*Candida rugosa*) and immobilized lipase per unit mass of Accurel. The immobilized yield remained high (over 98%) in tested particle size of carrier (Accurel)

#### 3-7-4 固定化収率に対する Lipase の起源の影響

起源の異なる Lipase の吸着と固定化量を Fig.3-21 に示した。本研究では 4 種 (*Rhizopus arrhizus*, *Candida rugosa*, *Candida cylindracea*, wheat germ)を比較検討した。吸着量は、担体と同じであっても、Lipase の起源によって大きく異なる。例えば、*Candida rugosa* と wheat germ の吸着量では、約 2 倍の差が生じた。

吸着量と固定化量を比較すると、いずれの起源の Lipase でも高い固定化収率 (約 98%) を達成した。

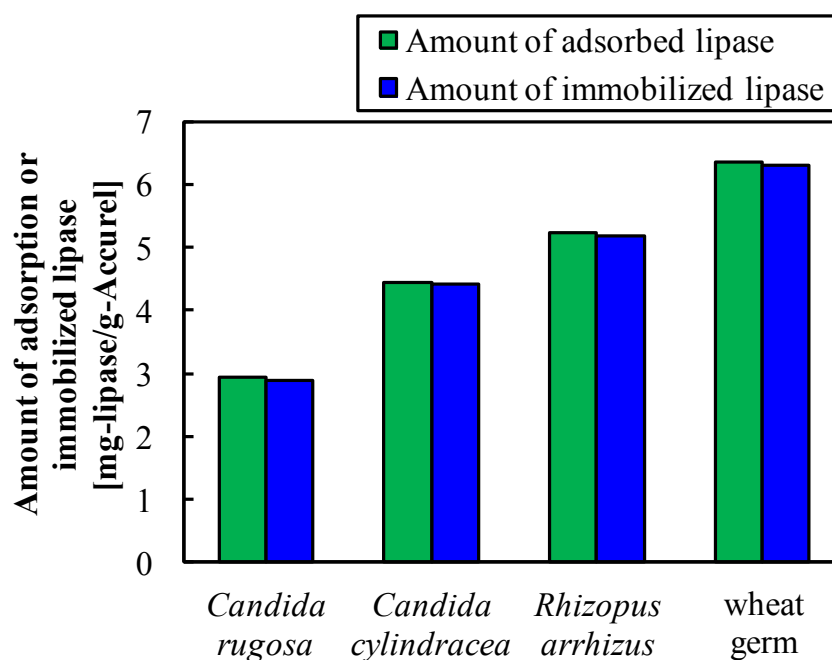


Fig.3-21 Comparison of adsorbed and immobilized lipase per unit mass of Accurel. The immobilized yield remained high (over 98%) in tested lipase species.

### 3-8 本章の結論

本章では、担体に Lipase を物理的に吸着させ、次いでグルタルアルデヒド(GA)による架橋固定化を行う一連の固定化操作に関する基礎的な知見をまとめた。その結果、

- ① silica gel, Zeolite, Accurel の3種の素材を Lipase の固定化担体として試み、その吸着量を比較検討した結果、Accurel を使用した場合に最も高い吸着量を得た(Fig.3-4)。これより本研究の担体として Accurel を選択した。
- ② Accurel をエタノールに浸漬する簡便な物理的修飾を施すことで、担体質量あたりの Lipase の吸着量が増大した。これは、エタノールが担体表面に吸着し、極性基(-OH 基)が固体表面に存在することによって担体の表面が親水化したことによる効果と考えられる(Fig.3-5)。また、④に述べるように酵素分子の疎

水性と吸着量の相関においてもエタノール前処理の効果が認められる。

- ③ Lipase の吸着特性を検討した結果, Accurel と Lipase の親和性が高いのは, *Candida rugosa* lipase と比較して *Rhizopus arrhizus* lipase の方であることが明らかとなった(Fig.3-9–Fig.3-11).
- ④ Kyte, J. and Doolittle, R. による Hydropathy scale を用い, 酵素の疎水性と担体との親和性を評価した. 本研究ではエタノールにより前処理を施した疎水性の多孔質担体に4種のLipaseを効果的に固定化することに成功した(Fig.3-15).
- ⑤ 初期固定化収率は, いずれの Lipase 種でも高い固定化収率 (約 98%) を達成した(Fig.3-16). 固定化量は, 300 分の有機溶媒中での攪拌後も 90%以上担体内に留まり, 効果的な固定化法であることを実証した(Fig.3-17–Fig.3-18).



## 第4章 固定化 Lipase の形状因子と細孔空間の機能的役割に注目した反応活性の速度論

### 4-1 疎水性反応の媒体と基質

#### <反応媒体>

Lipase の機能として、トリアシルグリセロール（油脂）の加水分解を挙げることができる。その起源により、トリアシルグリセロールにエステル結合をしたアシル基（脂肪酸）の位置や種類に対する特異性が異なり、反応特性を把握することは利用する上で重要である。しかしながら、基質が水に不溶性であり、反応が有機相－水相の不均一系で行われているために、実験結果の解析は油水分散系の特性も十分に考慮して進める必要がある。

疎水性基質を扱うためには、反応の媒体として有機溶媒に代表される疎水性媒体を必然的に用いなければならない。有機溶媒中の酵素反応は、(1)水に溶解できる有機溶媒を少量成分として含む水溶液中での酵素反応、(2)有機溶媒と水の二相系での酵素反応、(3)逆ミセル系での酵素反応、(4)水を含まない有機溶媒中での不均一系酵素反応に大別することができる。特に(3)は W/O microemulsion 系を用いることにより、疎水性基質を用いる酵素にとって有効な反応媒体として知られている。基質濃度が高く、かつ、有機溶媒による酵素の失活が抑制される点で優れている。

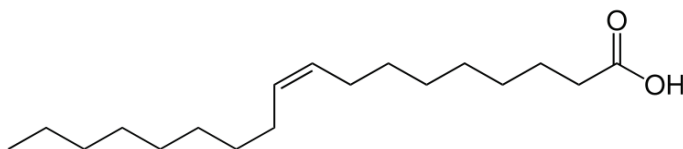
Microemulsion は界面活性剤の自己組織化により形成される、ミセル中に連続相とはなじみにくい流体を分散可溶化した熱力学的に安定な分散相である。一般に1つの物質の小さな粒子（直径  $1\mu\text{m}$  以下）が他の物質中に分散したものをコロイドといい、特に、液相を遷移相とし、固体を分散相としたものをサスペンション、別の液相がサブミクロンレベルで分散したものを microemulsion という。医薬品、農薬、化粧品、食品、洗剤、潤滑剤、塗料、インク等の幅広い産業分野に応用されている。両親媒性分子(amphiphile)は、疎水性部分（疎水基）と親水性部分（親水基）を分子中に持ち合わせている。この特異的な分子構造によって、水/油あるいは水/空気のような互いに混じり合わない物質が相互に接する界面に強く吸着し、界面に存在する分子間力の壁を著しく低下させることにより、均一相の形成を強く促すことができる。両親媒性分子は界面で吸着するとともに、溶媒本体内でミセルと呼ばれる分子自身の自己会合体を形成する。

### <基質>

本研究では、脂質の加水分解を研究対象としており、Lipase によってトリオレイン（トリグリセリド）が加水分解され、生成するオレイン酸（脂肪酸）を定量することにより、酵素の活性を評価した。脂質は、食用として、また燃料として重用され、広く利用されている。搾油・精製技術は多くの改良が行われてきたが、特に脂肪酸の化学的修飾と工業的技術の成功により、新規の油脂製品の開発によって今日の油脂工業の隆盛を見るに至っている。油脂には人間の健康維持に欠かすことのできない脂肪酸（必須脂肪酸）が多く、機能性油脂とも呼ばれている。

### <オレイン酸>

オレイン酸は、本研究の主な反応生成物として、酵素活性の評価に用いている。一般に動植物油に幅広く含まれるが、主にオリーブ油(Siang, Gan Hui. et al. (2010)), 高オレインひまわり油(Belinghi, Claudia. et al. (2015)), 椿油(Wang and Cao (2011))に含まれている。不飽和脂肪酸であるが、空気や熱に対して比較的安定で、酸化されにくい性質を持っている。分析のしやすい反応指標物質でありながら、その健康増進機能は多く、食品分野だけでなく、化粧品や医薬品分野でも期待される機能性物質である。代表的な健康増進機能として、下記の例を挙げることができる。



オレイン酸  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$

分子量：282.46 g/mol

Fig.4-1 chemical structure of oleic acid

a) 過酸化脂質の発生が少ない。

DNA の損傷が少なくなり、発ガンを抑制する。

動脈硬化を予防（心疾患・高血圧・糖尿病などの生活習慣病の予防と改善）。血小板の凝集を防ぎ、脳梗塞や心筋梗塞になる危険率を下げる(Gemma Vilahur and Lina Badimon (2013))。

b) LDL (悪玉コレステロール) を低減する.

悪玉コレステロールは減らすが, 善玉コレステロールは減らさないという実験報告がある.

c) 胃酸の分泌を抑える.

胃酸過多や胃潰瘍を予防する.

e) 便秘を予防する.

乳化作用で排泄物を軟化し, 腸の運動を良くする.

f) 肌の健康を維持する.

オレイン酸は皮脂の構成成分. 不足すると, 「くすみ」や肌荒れを誘発する.

#### 4-2 固定化酵素の反応活性に対する有機溶媒の影響

一般に酵素は水溶液中で種々の生化学反応の触媒として機能するが, タンパク質分子であるため, 有機溶媒の存在下では容易に変性・失活し, 不可逆的にその触媒機能を喪失することが多い. しかし, 有機溶媒存在下の酵素反応は, (1)難水溶性基質の溶解度が向上し, 反応速度が増大する, (2)加水分解酵素では逆反応の脂質の合成反応の触媒としても機能する, (3)微生物は有機溶媒中で増殖できない場合が多いので, これによる汚染を低減できる等の特徴を有している. そこで, 1980年代に有機溶媒存在下で機能する有機溶媒に耐性のある酵素の開発が着手された. 有機溶媒耐性酵素は, 水溶液中だけでなく有機溶媒が存在する反応系においても高い活性と安定性を有し, 水溶媒系, 有機溶媒系, 有機溶媒を含む水溶媒系, 基質濃度が高く基質自体が溶媒となっている反応系, および無溶媒系での反応に用いることができる. 有機溶媒存在下における酵素の可溶化および活性の安定化の手法として二つのカテゴリーを挙げることができる.

##### <懸濁酵素系 (自由溶媒系) >

有機溶媒の濃度が高く, 反応溶液 (W/O microemulsion, または自由溶媒系と呼ばれる) では, 酵素分子の極く近傍に水分子を存在させ, これをサブミクロンレベルの水相を分散相として有機溶媒中に酵素を存在させることになる. この場合, 全ての酵素が溶媒に接しているわけではないので, 酵素の不可逆的な変性はできるだけ避けることができる. 酵素分子のうち, 油水界面に存在したものは, 直接触媒作

用を発現することも考えられるが、微小水相に分配した基質と酵素が反応の主体と考えることが妥当である。

#### <固定化酵素系>

酵素を担体に固定化すると、反復利用が可能になるため、水相中で実行される酵素反応でも幅広く利用されている。様々な方法により酵素を担体に固定化する手法が開発されており、固定化により酵素の回収が容易になり、酵素の繰り返し利用が可能になる。さらに、流通反応器等の各種反応器による物質生産での有効利用も可能になる。しかしながら、固定化操作による酵素の失活や酵素担体内の拡散過程の低下による見かけの反応速度の低下は避けられない。

### 4-3 各種固定化酵素の反応活性に関する既往の研究

合成高分子は、一般に適当な機械的強度をもち、賦形性にも優れているため、疎水性の強い反応系に向けた酵素固定化の担体として有効である。既往の研究例として、*G. candidum* Lipase を、活性炭に吸着させた後、疎水性の光架橋性樹脂で被覆して固定化した研究例がある(Kimura et al. (1983))。この方法による固定化率は90%であったが、オリーブ油に対する活性の発現は自由溶媒系の約3.5%と低かった。この理由については、疎水性担体で包括固定する場合、水に不溶の基質と、包括されたLipase分子との接触が十分でなく、さらに反応生成物も疎水性のため、担体に吸着され、基質と酵素との接触を妨げるためと考えられる。

グルタルアルデヒドで架橋したアミンポリマー（ビーズ）を用いて、*G. candidum* Lipase を固定化すると、固定化率85-99%、活性発現率30-50%の良好な結果が得られた(富永ら(1987))。この固定化により、pHや温度によるこのLipaseの活性は安定しており、応用面での可能性が拡大された(Sugihara et al. (1988))。また、45°Cでの牛脂の分解活性や溶媒（イソオクタン）に対する耐性もやや増大した。さらに、エステル合成への利用でも、このLipaseは元来、オレイン酸とグリセロールからの合成において、オレイン酸による阻害を受け、この除去のために反応系にアルブミンやカゼインなどのタンパク質の添加、あるいは、緩衝液を加えてpHを中性付近に保つ必要があるが、固定化により、それらの添加は不要となった。

カカオ代用脂の製造について Macrae (1983)は、*Rhizopus delemar* や *Asp.niger* のLipase をケイソウ土、ヒドロキシアパタイトやアルミナなどの無機質に固定化し不

溶性の酵素粒子として、パーム油のエステル交換などに用いた。使用後の酵素粒子は、洗浄により油脂と分離し、乾燥後、再利用され、エステル交換反応に 10 回の反復使用が可能であると述べている。また、同じ目的に田中ら(1983)は、*R. delemar lipase* をセライトに固定化して用いた。セライトが、反応系の *n*-ヘキサンに不溶であり、親水性で有機相の吸収は少ない点で、Lipase の固定化に有効であるとしている。

#### 4-4 本章の目的

本章の目的は、生体適合性物質としてシュガーエステルを両親媒性分子とし、微小水相を有機相中に分散させた W/O microemulsion を調製し、固定化 Lipase による脂質の改質反応の反応活性を評価し、酵素反応を速度論的に解析することである。特に、本章では、固定化系の担体の形状因子（粒子径）と起源の異なる Lipase の固定化に注目するとともに、固定化 Lipase の反復利用の実証実験を行い、長寿命のバイオリアクター設計への指針を得る。

#### 4-5 W/O microemulsion 系における Lipase による脂質の改質反応の速度論実験および解析方法

##### 初期反応速度

反応の初期反応速度(initial reaction rate) $V_i$  は、基質濃度(substrate)の減少または生成物(product)濃度の増大として定義される。初期反応速度は基質と生成物の濃度をそれぞれ  $[C_s]$ ,  $[C_p]$  で表すと、1 モルの基質から  $n$  モルの反応生成物が生じる系 ( $S \rightarrow nP$ ) では、

$$V_i = -\left. \frac{d[C_s]}{dt} \right|_{t=0} = \frac{1}{n} \left. \frac{d[C_p]}{dt} \right|_{t=0} \quad (4-1)$$

で定義される。基質または生成物の濃度の経時変化(time course)の接線の勾配より基質濃度  $[C_s]$  の場合は減少勾配、生成物濃度  $[C_p]$  の場合は増加勾配から求められる。

不可逆反応の場合は、通常、反応率が 5~10%程度以内の濃度勾配から初期反応速度を算出することができる。

生成物阻害が強い場合は、反応の比較的初期段階から、濃度変化が直線から外れることがあるので注意が必要である。

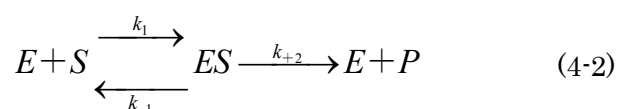
### Michaelis-Menten 式

通常の一基質による酵素反応では、多くの場合、初期反応速度と基質濃度の関係は飽和曲線の形をとる。1902年に Henri および 1925年に Michaelis と Menten は、このような挙動を説明するための数学的モデルを提案した。さらに、これを 1925年に Briggs と Haldane が一般化した。これらのモデルにおける基本的な考えは、基質(S)は、まず酵素(E)と共有結合によらない酵素-基質複合体(ES 複合体; ES complex)という反応中間体を形成することである。

- ①基質分子は、酵素分子鎖内の特定の活性サイトに結合する。
- ②反応中間体は酵素の触媒作用により、生成物(P)を生成する。
- ③生成した生成物は酵素分子から離脱する。
- ④生成物を離脱した酵素は再び反応に触媒作用を発現する。

すなわち、触媒である酵素分子の量は消費されず、その分子構造も反応の前後において変化しない。

この考え方を式に表すと(4-2)式となる。



本モデルは簡明であるが、多くの酵素反応速度の基質濃度依存性を説明することができる。基質が2種類以上の場合や、反応が何段階にもわたる場合でも、このモデルが基礎になっている。

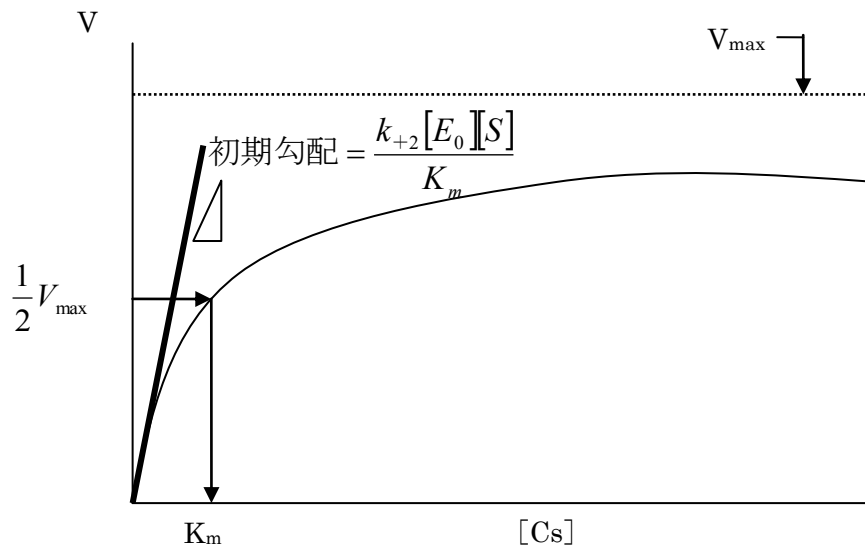


Fig.4-2 Michaelis-Menten の反応機構による基質濃度と反応速度

酵素が触媒として機能している化学反応の反応機構に対する速度式は、迅速平衡法(method on rapid equilibrium), あるいは定常状態法(method on steady state)により導かれる。迅速平衡法は Michaelis と Menten らが考えた方法であり、定常状態法は Briggs と Haldane が提唱した方法である。いずれの方法においても、以下の点を前提とする。

- ①基質濃度は酵素濃度と比較して大過剰に存在すること。
- ②酵素分子中の基質結合部位（活性部位）は1つである。

迅速平衡法では、E と S から ES 複合体が生成する生成反応の速度過程は、反応開始後極めて速やかに平衡状態に達すると仮定する。すなわち、各成分の濃度をそれぞれ [E], [S], [ES] とすると、平衡状態では ES 複合体が生成する正反応と ES 複合体が E と S に解離する逆反応の速度が等しいので(4-3)式が成り立つ。

$$k_{+1}[E][S] = k_{-1}[ES] \quad (4-3)$$

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{+1}}{k_{-1}} = K_{ES} \quad (4-4)$$

ここで  $K_{ES}$  は ES 複合体の解離定数(dissociation constant)であり、化学反応における平衡定数の逆数である。解離定数は ES 複合体の E と S への解離のしやすさ（結合の困難さ）の程度を示すと理解することができる。

一方、定常状態法では [S] が一定の条件で ES 複合体の濃度が反応開始後極めて速やかに定常状態に達すると仮定する。すなわち、ES 複合体濃度の時間的变化は 0 となる。

$$\frac{d[ES]}{dT} = k_{+1}[E][S] - (k_{-1} + k_{+2})[ES] = 0 \quad (4-5)$$

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} = K'_{ES} \quad (4-6)$$

(4-4)式と(4-6)式を比較すると、 $k_{-1} \gg k_{+2}$  のとき、 $K'_{ES}$  は  $K_{ES}$  に一致する。

生成物の生成速度  $V$  は、ES の濃度に比例するので、

$$V = k_{+2}[ES] \quad (4-7)$$

ここで、 $k_{+2}$  は反応生成物の生成速度定数である。反応液中に存在する酵素の全濃度  $[E_0]$  は一定であるので、

$$[E_0] = [E] + [ES] \quad (4-8)$$

(4-4)式あるいは(4-6)、(4-8)式から [ES] は次式で表させる。

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{K_m + [S]} \quad (4-9)$$

ここで、 $K_m$  は迅速平衡法の場合は  $K_{ES}$  に、定常状態法では  $K'_{ES}$  に相当する。(4-9)式を(4-7)式に代入すると、

$$v = \frac{k_{+2}[E_0][S]}{K_m + [S]} = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (4-10)$$

$$V_{\max} = k_{+2}[E_0] \quad (4-11)$$

$V_{\max}$  を最大速度(maximum reaction rate)と呼ばれ、 $K_m$  とともに酵素反応の速度パラメーターとして重視されている。

なお、(4-10)式は、通常 Michaelis-Menten の反応速度式、 $K_m$  値はミカエリス定数(Michaelis constant)と呼ばれており、酵素反応の速度式として幅広く用いられている。

Michaelis-Menten 式から導出される酵素反応の特徴は以下の 4 点にまとめることができる。

- ① 基質濃度 [S] が一定の条件では、反応速度  $V$  は酵素濃度  $[E_0]$  に比例する。



- ②  $K_m$  と比較して基質濃度が低い範囲では反応速度  $V$  は基質濃度  $[S]$  の 1 次に比例する.
- ③  $K_m$  と比較して基質濃度  $[S]$  が十分高い条件では,  $V$  は基質濃度への依存度が非常に小さくなり, 一定値  $V_{max}$  に漸近する全ての酵素分子が基とが結合している状態である.
- ④  $K_m$  値は  $V_{max}$  の 1/2 の値に対応する基質濃度の値である.

#### 動力学定数の算出

Michaelis-Menten 式の中に含まれるパラメーター( $K_m$  と  $V_{max}$ )を, 動力学定数あるいは速度論的パラメーター(kinetic constant)という. これらの値は, 酵素・基質の種類だけではなく, 反応条件によっても異なる. 本研究のように油水分散相や超臨界流体中の動力学定数は溶媒の状態を強く受けると考えられ, 反応の本質的な議論に適用するには自ずと限界がある. しかしながら, 反応の速度論を議論する入口としては有用であり, 実測値に基づき下記の手法で求めることができる.

動力学定数はそれぞれの条件下における初期反応速度の基質濃度依存性の実験結果から算出できる. (4-10)式で表される Michaelis-Menten 式は次のように変形できる.

$$\text{Lineweaver - Burk plot} : \frac{1}{r} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (4-12)$$

$$\text{Hofstee plot} : \frac{[S]}{r} = \frac{1}{V_{max}} \cdot \frac{1}{V_{max}} [S] + \frac{K_m}{V_{max}} \quad (4-13)$$

$$\text{Eadie plot} : r = -K_m \cdot \frac{r}{[S]} + V_{max} \quad (4-14)$$

1 つの式に未定定数が 2 つあるため, これを図解法で求める工夫の 1 つとして Lineweaver-Burk plot は, 最も広く用いられている図解法である.

縦軸, 横軸ともに反応速度と基質濃度の逆数を用いているため, その値の低い領域の実験誤差の影響を受けやすいが, 縦軸, 横軸の切片から  $V_{max}$ ,  $K_m$  が直接的に求められる.

Hofstee plot は(4-12)の両辺に[S]を乗じた形で与えられている。この場合、横軸が基質濃度となり、逆数に依らない plot となる。Eadie plot は縦軸が反応速度となり、その逆数を用いる必要のない plot である。しかし、横軸にも r が関係しているので、反応速度の測定値の誤差が大きく影響する。なお、(4-12)~(4-14)に基づく図解法における反応速度は反応初期の速度を用いることが多い。これは基質は十分量存在し、生成物濃度が低い条件が反応の素過程をより明確に示すという考え方に従っているからと考えられる。本研究でも初期反応速度に基づき、Lineweaver-Burk plot を適宜用いて速度パラメーターを求めた。

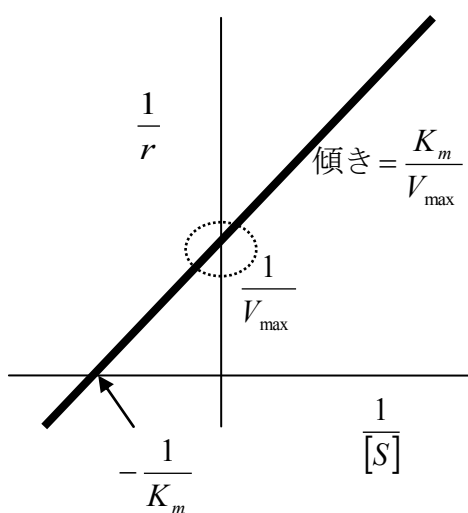


Fig.4-3 Lineweaver-Burk plot

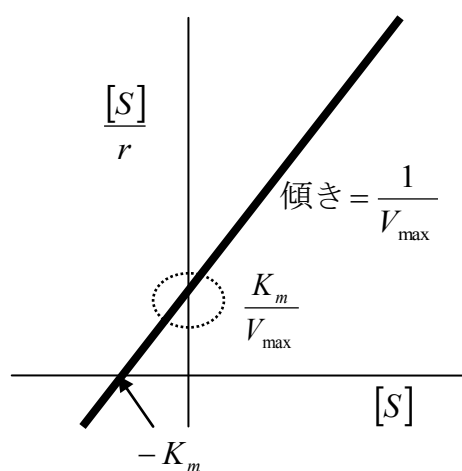


Fig.4-4 Hofstee plot

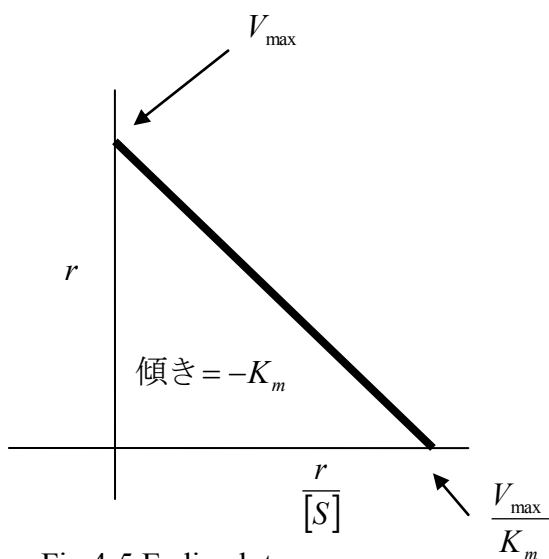


Fig.4-5 Eadie plot

#### 4-5-1 生成物の定量法(Lowry-Tinsley 法)

本研究では, **Lipase** による脂質の加水分解反応によって生じた脂肪酸を経時的に定量することにより, 酵素反応の活性を評価した.

生成された脂肪酸濃度は, Lowry-Tinsley 法に従って定量した.

##### Lowry-Tinsley 法 (1976)

銅 - 脂肪酸塩の発色はベンゼンを抽出溶媒とすると脂肪酸の定量に非常に有効である. 抽出溶媒をその他の溶媒にすると, 酢酸銅に対して不安定となり, 銅-脂肪酸塩の形成能が低下する. また, 吸光度に対する脂肪酸の炭素数の影響が他の溶媒と比較して依存性が低く, 多種の脂肪酸が共存する系においても測定値の変動幅が最小限に抑制される. 本研究では生成脂肪酸の代表としてオレイン酸に注目して検量線を作成した.

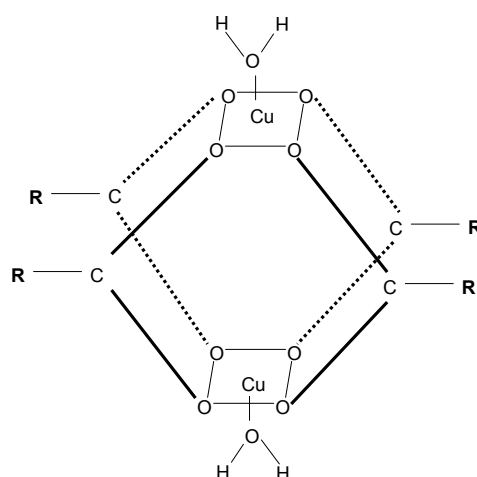


Fig.4-6 Structure of cupric soaps showing the cage-like complex formed.

R=12-20 carbon chains on the fatty acids.

## 4-5-2 試薬の調製

### <試薬>

- ・塩化カルシウム（純度 95.0%，和光純薬工業株式会社）
- ・酢酸（純度 99.0%，和光一級，和光純薬工業株式会社）
- ・酢酸ナトリウム（純度 98.0%，和光一級，和光純薬工業株式会社）
- ・ピリジン（純度 95.0%，和光純薬工業株式会社）
- ・酢酸銅（Ⅱ）一水和物  
（純度 99.0%，試薬特級，和光純薬工業株式会社）

### <器具>

- ・マグネティックスターラー
- ・pH メーター

### 酢酸緩衝溶液（pH6.5）

200 mM 酢酸-200 mM 酢酸ナトリウム水溶液（pH5.6）

Lipase の賦活剤として カルシウムを用いるため，10 mM 塩化カルシウム水溶液を緩衝液により調製する。

### <手順>

- ① 200 mM 酢酸水溶液 10 mL，200 mM 酢酸ナトリウム水溶液 50 mL を調製した。
- ② 303 K に設定した恒温槽中で加温しながら酢酸ナトリウム水溶液をマグネティックスターラーで攪拌した。
- ③ pH メーターを用いて，pH6.5 となるように酢酸ナトリウム水溶液に酢酸水溶液を添加し，攪拌した。
- ④ ③で調製した溶液を用いて，10 mM 塩化カルシウム溶液を 50 mL 調製した。

### 酢酸銅水溶液（pH6.0）

### <手順>

- ① 10 g 酢酸銅（Ⅱ）一水和物を純水 200 mL で溶解した。
- ② pH メーターを用いて pH6.0 となるように酢酸銅水溶液にピリジンを添加し，攪拌した。

### 4-5-3 Lipase によるトリオレインの加水分解反応

<試薬>

- Lipase (*Rhizopus arrhizus* 由来, SIGMA-ALDRICH)  
(*Candida rugosa* 由来, SIGMA-ALDRICH)  
(wheat germ 由来, SIGMA-ALDRICH)
- トリオレイン (純度 60.0%, 和光純薬工業株式会社)
- オレイン酸 (純度 99.0%, 東京化成工業株式会社)
- 2,2,4-トリメチルペンタン (イソオクタン)  
(純度 99.0%, 和光純薬工業株式会社)
- 1-ブタノール (純度 99.0%, 和光純薬工業株式会社)
- ベンゼン (純度 95.0%, 和光純薬工業株式会社)
- 無水硫酸ナトリウム (純度 99.0%, 和光純薬工業株式会社)
- 酢酸緩衝溶液
- シュガーエステル (以下 DK, DK-ester-F-110 ; Av.MW=703,  
Lot.No.349519, 第一工業製薬)

本研究では有機溶媒中の水分量を W/O microemulsion によって与えている。シュガーエステルは、これを形成するために系内に添加される可食性の両親媒性成分である。

Table.4-1 Chemical Composition of DK-ester-F-110

Components		Gravimetric content [%]		
Water		0.8		
Free fatty acid		1.3		
Electrolytes of fatty acid ester		2.4		
Assay of DK-ester-F-110				
Mono ester	Stearic acid	33.4	47.7	95.5
	Palmitic acid	14.3		
Di-, Tri-, Poly-ester		47.8		
Total		100.0		

Data were donated by Dai-ichi Kogyo Seiyaku Ltd. (Kyoto, Japan).

<器具>

- ・ Fine COOL STIRRER FDC-900
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ 共栓試験管 (EMKR-16.5)
- ・ 遠心分離機 (KUBOTA, SIGMA 2-16)
- ・ 紫外可視分光光度計 (SHIMADZU UV mini 1240)

<手順>

- ① DK esterF-110 を秤量し, 20 g/L<sub>org</sub> となるように 313 K 下で 3.5(v/v)%1-ブタノール/イソオクタン (mol fraction ; 1-butanol : isooctane=0.047 : 0.953) の混合有機溶媒に溶解させた. これを有機相とした.
- ② 100 mL 用スクリーバイアル瓶に有機相を 50 mL 分注し, COOL STIRRER を用いて, 310 K の温度一定条件下で 10 分間攪拌し, 保持した.
- ③ Lipase 5 mg を量りとり, サンプルケース 25  $\mu$ L の緩衝溶液を添加し, 溶解させた. これを酵素溶液とした.
- ④ 有機相に水相 (緩衝溶液) を  $W_{\text{soln}}=3.3$  ( $W$  値 $\equiv$  [mol-H<sub>2</sub>O] / [mol-DK]) となるように添加し, エマルジョン化させるため 10 分間攪拌した.
- ⑤ 基質であるトリオレインを所定濃度となるように秤量し, 上記の有機相に溶解させ, 安定化のため 10 分間保持した.
- ⑥ 酵素添加前,  $t=0$  min における脂肪酸濃度の定量のために, 有機相を 0.2 mL を分取し, Lowry-Tinsley 法に基づき測定した. これをブランクとした.
- ⑦ 酵素溶液を添加し, これを反応開始時とした. 反応開始後, 所定時間毎に反応溶液 0.2 mL を分取し, 各時間における生成脂肪酸濃度を⑧~⑬に従って定量した.
- ⑧ 共栓試験管に酢酸銅水溶液 1 mL, 次にベンゼン 5 mL を入れ, 直ちに栓をした.
- ⑨ 反応溶液 0.2 mL を共栓試験管に分取し, ボルテックスミキサーで 2 min 攪拌した.
- ⑩ 3000  $\text{min}^{-1}$  で 3 min 遠心分離を行った.
- ⑪ 無水硫酸ナトリウムを少量入れた他の共栓試験管に⑩の上相を分取し, ボルテックスミキサーで 1 min 攪拌した.
- ⑫ 3000  $\text{min}^{-1}$  で 1 min 遠心分離を行った.
- ⑬ ⑦の上相を採取し, 715 nm で UV メーターにより吸光度測定を行った.

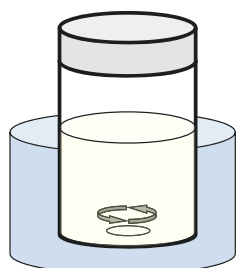
なお、④の操作の注釈として、W/O microemulsion 中の水分量は Uehara (2008) の研究結果に基づいて最適値とされる値を用いた。

W/O microemulsion 系の水分量によって酵素反応の活性は大きく影響を受ける。水分量の表示方式としては両親媒性分子と水のモル比 W 値が用いられる。

$$W \equiv \frac{[mol - H_2O]}{[mol - amphiphile]} \quad (4-15)$$

本研究でも(4-15)により、W 値を定義した。

なお、分子の水分量は添加した水分量に基づいている。有機相を調製する各原料中に当初から存在する水分量は極微量として無視した。Lipase は W/O microemulsion 中の微小水相に溶解していると考えられる。



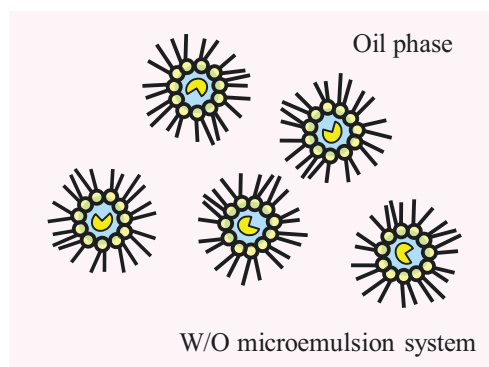
● **Reaction condition (310K)**

**Organic phase:** 3.5 (v/v)% 1-Butanol/ isooctane

**Amphiphilic component:** Sugar-ester-F-110

**Water phase:** Acetate buffer (pH 6.5)

**Water content ( $W_{soln} = 3.0$ )**



Schematic image of W/O microemulsion system. Micro-water pool was dispersed in bulk oil phase.

 : amphiphilic molecule       : enzyme

Fig.4-7 Reaction condition of enzymatic hydrolysis in W/O microemulsion system

#### 4-5-4 実験結果および考察

*R. arrhizus* lipase, wheat germ lipase, *C. rugosa* lipase を用いてトリオレインを基質とした加水分解反応を行い、生成されたオレイン酸の濃度を比較した (Fig.4-8).

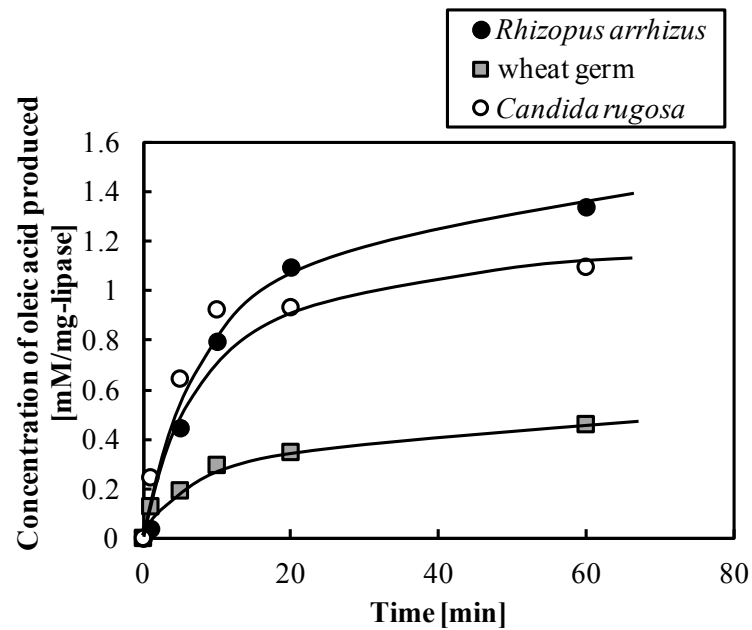


Fig.4-8 Comparison of free lipase reactivity from various species in W/O microemulsion system.

3種のLipaseを用いた加水分解反応の速度解析の一環として、一次反応を仮定する。この場合、初期基質濃度  $C_0$  との比  $C/C_0$  より求められる自然対数  $\ln(C/C_0)$  は(4-16)式に示すように反応時間と一次比例する(Table.4-2)。Fig.4-9の初期における接線から、一次反応を仮定した反応速度定数  $k$  を求めた(Table 4-2)。

$$\ln\left(\frac{C}{C_0}\right) = -kt \quad (4-16)$$



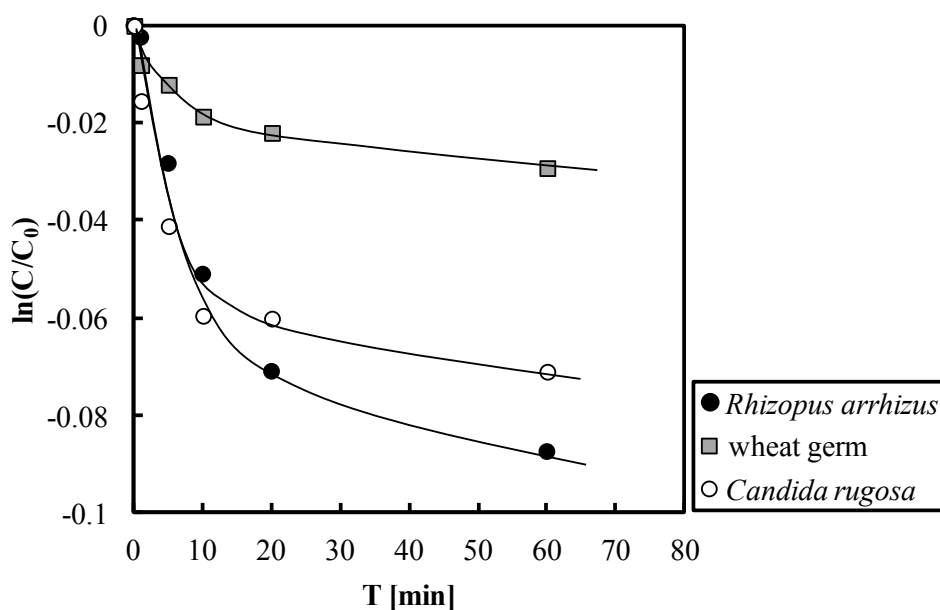


Fig.4-9 Decreasing profile of substrate assuming first ordered reaction. The reaction rate constant  $k$  in initial period (5 min) was obtained and summarized in Table 4-2

Table. 4-2 Reaction rate constant  $k$  of free enzyme system in isooctane

Lipase	$k [10^{-5} \text{ s}^{-1}]$ in initial (5 min)
<i>Rhizopus arrhizus</i>	8.67
<i>Wheat germ</i>	2.13
<i>Candida rugosa</i>	9.81

疎水性基質を扱う酵素反応では油水分散系など均一相でない反応媒体を用いることが多い。W/O microemulsion 系では、微小水相のサイズや pH 条件は、酵素の反応場として重要な反応環境になる。ここでは、*Rhizopus arrhizus* 由来の Lipase の反応における pH の影響として、微小水相として使用した緩衝液の pH 毎に生成脂肪酸（オレイン酸）量の経時変化を測定した（Fig.4-10）。これによると、*Rhizopus arrhizus* 由来の Lipase の加水分解反応においては、最も活性が高いのは pH 6.5 の条件であった(Fig.4-11 参照)。

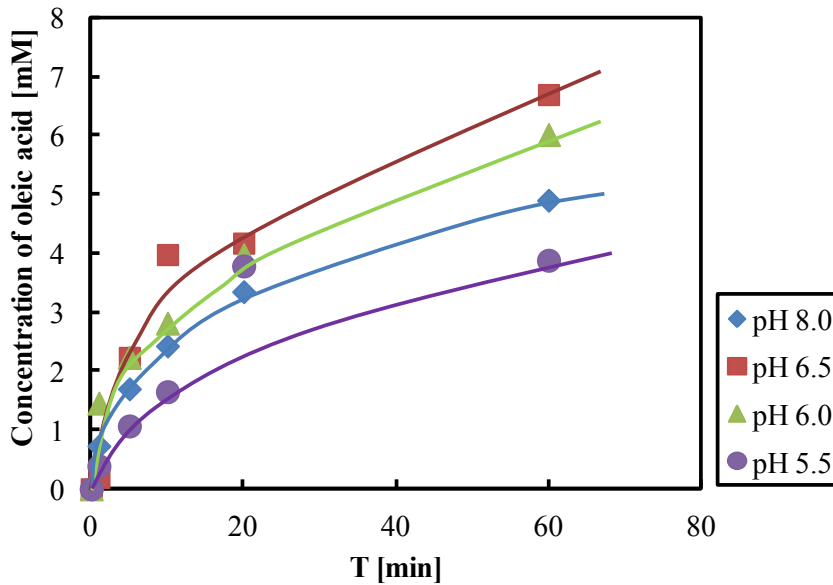


Fig.4-10 Time course of produced oleic acid concentration in various pH condition (*Rhizopus arrhizus* lipase)

pH 毎に反応初期 5 分間における初期反応速度を算出した(Fig.4-11). 初期反応速度を比較すると, pH 6~6.5 付近に極大値がみられる. 初期反応速度が高い系は 60 分後の生成物濃度も高い傾向にあった.

生成物収率と初期反応速度の解析から, pH 6.5 を最適な pH と判断し, 本研究における *Rhizopus arrhizus* lipase の実験を進めることにした.

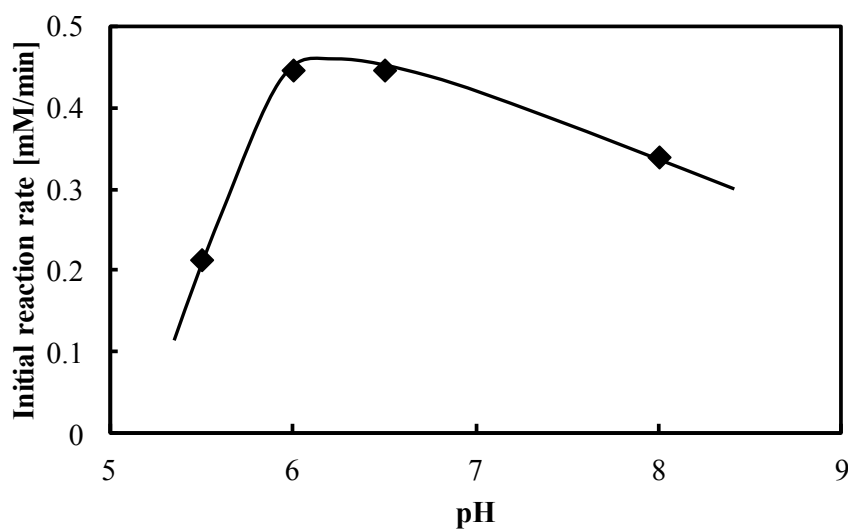


Fig.4-11 Effect of pH on the initial reaction rate (*Rhizopus arrhizus* lipase)

酵素反応の活性評価において、一般に  $V_{max}$  ならびに  $K_m$  を求めておくことは重要である。ただし、本研究のように油水分散系を反応媒体とする場合には、反応媒体の物理化学的条件を大きく受けることが指摘されており、それ自身が研究課題になり得る内容を含んでいる。本研究ではあくまで反応の総括的なパラメーターとして扱う。そこで、基質の濃度を変えて、W/O microemulsion 系にて *Rhizopus arrhizus* lipase の酵素反応を行い、その経時変化が Fig.4-12 である。基質の濃度が高くなるにしたがって、最終生成物（オレイン酸）収率，初期反応速度ともに増大した。反応に遅れ時間がなく，Sugar-ester を両親媒性分子とした W/O microemulsion 系で疎水性基質と生成物が十分に拡散していることが推定できる。

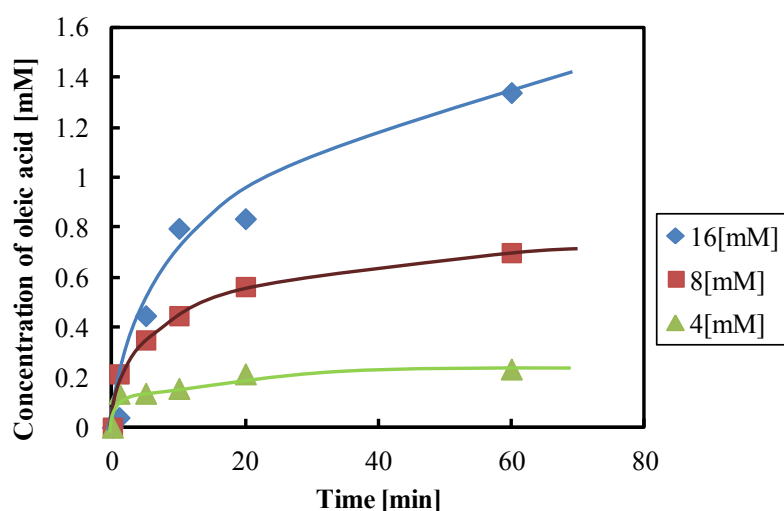


Fig.4-12 Comparison of concentration of oleic acid produced by *Rhizopus arrhizus* lipase.

反応初期 5 分間のデータに基づき初期反応速度  $V_i$  を求め、基質濃度  $S$  との間で Lineweaver-Burk plot による解析を行い、その結果を Fig.4-13 に示した。これより  $V_{max}$  と  $K_m$  を求め、既往のデータである *Candida rugosa* lipase の  $V_{max} \cdot K_m$  を合わせて示したものが、Table 4-3 である。自由溶媒系（W/O microemulsion 系）での反応では、*Rhizopus arrhizus* lipase の方が、 $V_{max}$  の点では *Candida rugosa* lipase よりも速度論的には優れているが、両者の基質に対する特異性は異なっている。*Rhizopus arrhizus* は、1,3 位特異性、*Candida rugosa* は 1,2,3 位特異性であり、基質 1 モルが反応して生成するオレイン酸のモル数が異なる。活性の比較評価には、化学量論的な点を留意する必要がある。

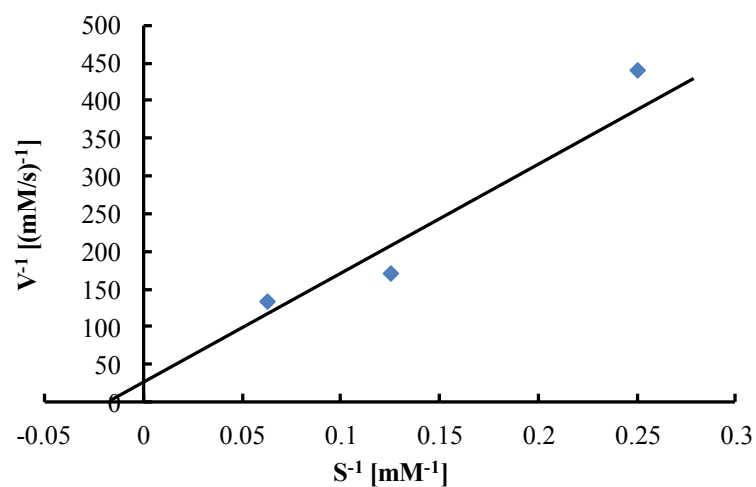


Fig.4-13 Lineweaver-Burk plot of hydrolysis by *Rhizopus arrhizus* lipase in W/O microemulsion.

Table. 4-3 Kinetic parameters of triolein hydrolysis in W/O microemulsion system.

Lipase	$V_{max}$ [mM/s]	$K_m$ [mM]	
<i>Candida rugosa</i>	$2.96 \times 10^{-2}$	14	Uehara (2008)
<i>Rhizopus arrhizus</i>	$5.88 \times 10^{-2}$	40	This work

#### 4-6 有機溶媒中で Accurel に固定化された Lipase による脂質加水分解実験

##### 4-6-1 固定化 Lipase によるトリオレインの加水分解反応

<試薬>

- ・固定化 Lipase (*Candida rugosa* 由来, SIGMA-ALDRICH)  
(*Rhizopus arrhizus* 由来, SIGMA-ALDRICH)
- ・Accurel MP100 (MEMBRANA GmbH)
- ・トリオレイン (純度 60.0%, 和光純薬工業株式会社)
- ・オレイン酸 (純度 99.0%, 東京化成工業株式会社)

- ・ シュガーエステル (以下 DK, DK-ester-F-110 ; Av.MW=703,  
Lot.No.349519, 第一工業製薬株式会社)
- ・ 2,2,4-トリメチルペンタン (イソオクタン)  
(純度 99.0%, 和光純薬工業株式会社)
- ・ 1-ブタノール (純度 99.0%, 和光純薬工業株式会社)
- ・ ベンゼン (純度 95.0%, 和光純薬工業株式会社)
- ・ 無水硫酸ナトリウム (純度 99.0%, 和光純薬工業株式会社)
- ・ 酢酸銅水溶液 (pH6.0) (4-5-2 参照)
- ・ 酢酸緩衝溶液 (pH6.5) (4-5-2 参照)

#### <器具>

- ・ Fine COOL STIRRER FDC-900
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ 共栓試験管 (EMKR-16.5)
- ・ 遠心分離機 (KUBOTA SIGMA 2-16 )
- ・ 紫外可視分光光度計 (SHIMADZU UV mini 1240)

#### <手順>

- ① 固定化 Lipase を円柱状のガラス容器 (直径 2.4cm×高さ 4.0cm) に入れた.
- ② 20g/L<sub>org</sub> となるように DKester F-110 を秤量し, 313K 下で 3.5(v/v)%1-ブタノール/イソオクタン (mol fraction ; 1-butanol : isooctane=0.047 : 0.953) の混合有機溶媒に溶解させた. これを有機相とした.
- ③ 100 mL 用スクリーバイアル瓶に有機相を 50 mL 分注し, COOL STIRRER を用いて, 310 K の温度一定条件下で 10 分間攪拌し, 保持した.
- ④ 有機相に水相 (緩衝溶液) を  $W_{\text{soln}}=3.3$  (W 値≡ [mol-H<sub>2</sub>O/mol-DK]) となるように添加し, エマルジョン化させるため 10 分間攪拌した.
- ⑤ 基質であるトリオレインを 16 mM となるように秤量し, 上記の有機相に溶解させ, 10 分間保持した.
- ⑥ 基質を溶解後, t=0 min における脂肪酸濃度の定量のために, 0.2 mL を分取し, Lowry-Tinsley 法に基づき測定した. これをブランクとした.
- ⑦ ブランク測定後, 固定化 Lipase 入りの円柱容器を添加し, 反応開始とした. 反応開始後, 所定時間に反応溶液 0.2 mL を分取し, 各時間における脂肪酸濃度

- を定量した。
- ⑧ 共栓試験管に酢酸銅水溶液 1 mL, 次にベンゼン 5 mL を入れ, すぐに栓をした。
  - ⑨ 反応溶液 0.2 mL を共栓試験管に分取し, ボルテックスミキサーで 2 min 攪拌した。
  - ⑩  $3000 \text{ min}^{-1}$  で 3 min 遠心分離を行った。
  - ⑪ 無水硫酸ナトリウムを少量入れた他の共栓試験管に⑤の上相を分取し, ボルテックスミキサーで 1 min 攪拌した。
  - ⑫  $3000 \text{ min}^{-1}$  で 1 min 遠心分離を行った。
  - ⑬ ⑦の上相を採取し, 715 nm で UV メーターにより吸光度測定を行った。
  - ⑭ 反応終了後, Fig.4-14 に示すように, 固定化 Lipase 入りの円柱容器のみを取り出し, イソオクタン溶媒で洗浄後, 新しく調製した反応溶液に添加し, 次の反応開始とした。

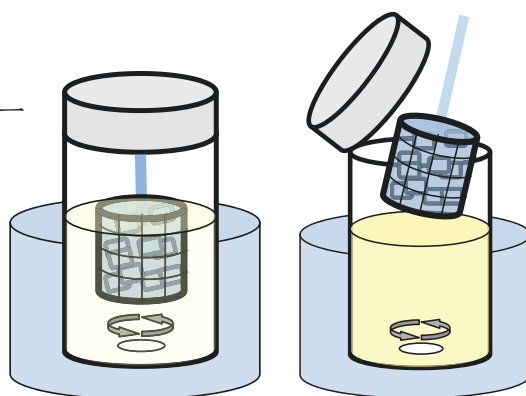


Fig.4-14 Experimental procedure of hydrolysis of triolein by immobilized lipase on Accurel

#### 4-6-2 実験結果および考察

Accurel MP100 に固定化された *Rhizopus arrhizus* lipase と *Candida rugosa* lipase の活性を比較した (Fig.4-15)。溶媒はイソオクタンを主溶媒とし, DK ester F110 を両親媒性成分とする W/O microemulsion である。反応に寄与する水分子はサブミクロンスケールの微小水相として有機相中に分散している。Lipase の種類によって担体内への固定化量は異なっているため, 生成脂肪酸量 (オレイン酸) を固定化された Lipase の質量で除し, 固定化 Lipase 単位質量あたりの生成脂肪酸量を縦軸として評価した。

Fig.4-15 で明らかなように固定化によって, 反応開始時の遅れ時間がないことがわかる。疎水性の基質や生成物によって Accurel の細孔開口部が閉塞しておらず, Accurel 内部での基質の拡散が容易であることを示している。

また, *Candida rugosa* lipase と比べて *Rhizopus arrhizus* lipase の最終生成物濃度・

初期反応速度が高く、最終生成物濃度は、*Candida rugosa* lipase の約 1.75 倍の差であった。

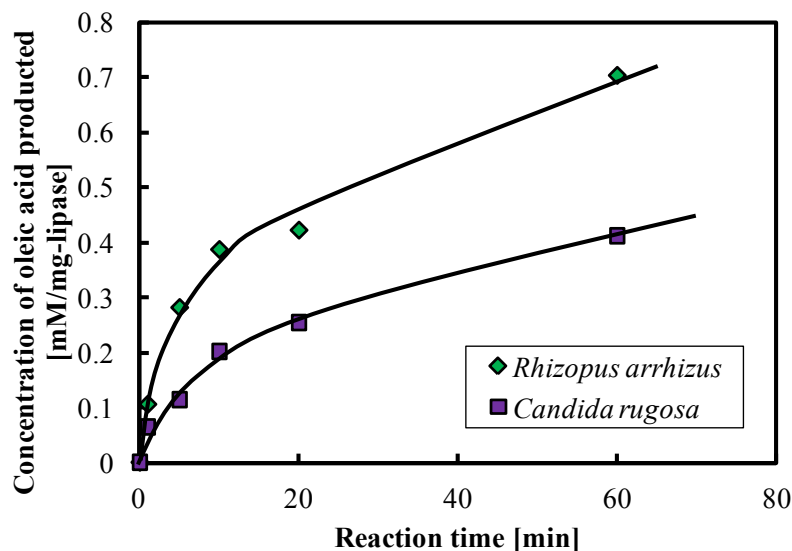


Fig.4-15 Hydrolysis of triolein by immobilized lipase on Accurel

Accurel MP100 に固定した系と W/O microemulsion 系でのトリオレイン加水分解反応における活性の比較を、Fig.4-16(a : *Rhizopus arrhizus*), (b : *Candida rugosa*)に示した。反応条件系は、Fig.4-15 と同様に溶媒はイソオクタンを主溶媒とし、DK ester F110 を両親媒性成分とする W/O microemulsion である。反応に寄与する水分子はサブミクロンスケールの微小水相として有機相中に分散している。

Fig.4-16 で明らかなように、固定化を行うことによる活性の減衰は、約 50%程度に留まっている。初期反応速度も遅れ時間なく発現している。この結果より、反復利用を繰り返すことで、W/O microemulsion 系での反応生成物量を上回ることが期待できる。

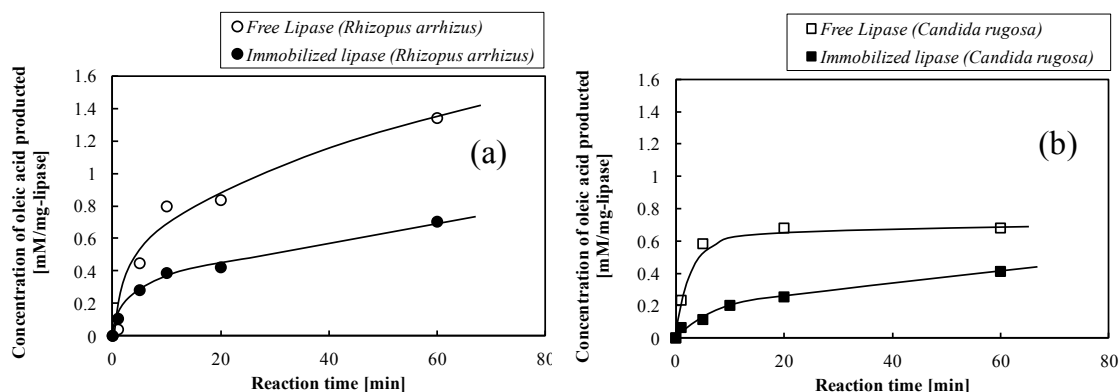


Fig.4-16 Reactivity of free lipase and immobilized one.

(a): (*Rhizopus arrhizus*), (b): (*Candida rugosa*).

固定化 Lipase (*Rhizopus arrhizus*) を反復利用した結果が, Fig.4-17 である. Lipase (in W/O microemulsion)のキーで示したプロットが自由溶媒系での反応活性であり, 1st run, 2nd run, 3rd run のキーで示したプロットが固定化酵素の繰り返し利用の活性である.

本研究の系では, 繰り返し利用においても遅れ時間が発生しなかった. 3回の反復利用において本研究の固定化 Lipase は, microemulsion での酵素活性を 50%維持している. 一般に固定化酵素の活性は, 高くても 20~30%レベルの報告が多いことを考慮すると, 本研究の系は比較的に高活性と言える.

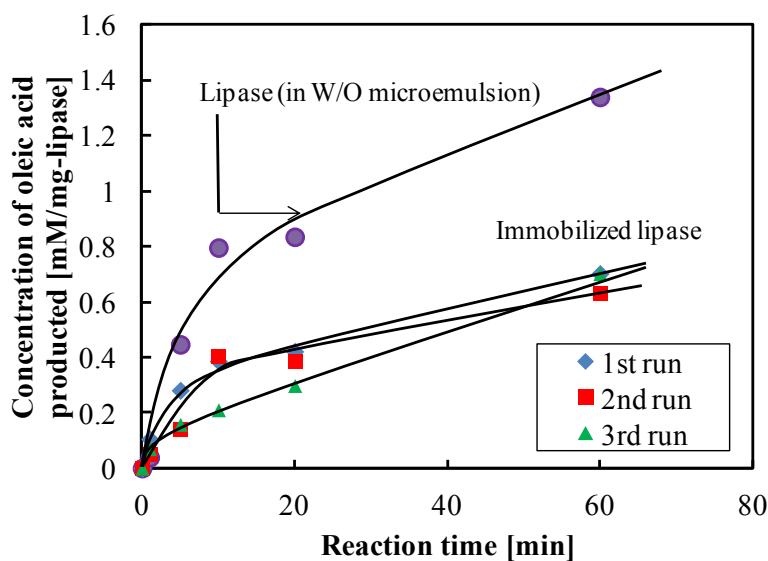


Fig.4-17 Reactivity of immobilized lipase (*Rhizopus arrhizus* lipase)



生成オレイン酸のモル数を積算した結果が Fig.4-18 である。同じ酵素量で繰り返し反応を行うことにより固定化 Lipase の系によるオレイン酸の積算生成モル数は W/O microemulsion 系での生成モル数を上回る結果となった。繰り返し反応においても約 50%の活性を維持しているためである。

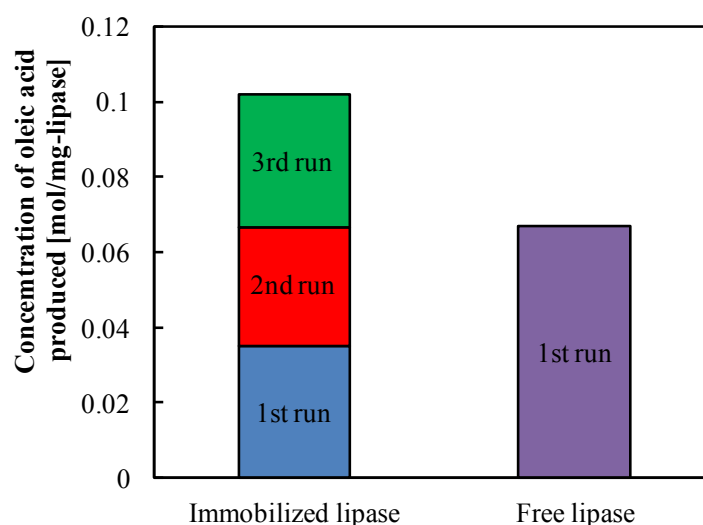


Fig.4-18 Comparison of the accumulated yield of oleic acid using immobilized lipase (*Rhizopus arrhizus*)

#### 4-7 担体の形状因子に注目した反応活性

粒子の形状因子として球形からのズレ、サイズ、並びに長期の安定性が挙げられる。これは反応速度の律速段階に占める拡散過程の割合やリアクター容器内の充填状態に影響を与えるためである。Accurel EP-100 を担体とした既往の研究では、粒径を 2.5 mm から 0.2 mm の範囲で変化させている(Montero et.al., Salis et.al., Al-Duri et.al., Sabbani et.al.). 当然ながら、粒子径の小さい固定化担体系で、より高い反応速度が得られ、Sabbani らは、1.5 mm から 0.2 mm まで粒径を小さくすることによって、反応速度が 6 倍に増加したことを報告している。

本論文第 2 章で述べた微細化された Accurel に、Lipase (*Candida rugosa*) を吸着させ、これを固定化することによって主として粒子サイズの影響を求めた。固定化

Lipase 単位質量あたりの生成脂肪酸（オレイン酸）量を算出し、用いた Accurel 担体の粒子径の影響をみたものが、Fig.4-19 である。同じ担体粒子であっても、その粒子径に反応速度ならびに最終生成物濃度は大きく依存した。固体担体を用いた場合、担体の粒子径を適正に設定することは、固定化酵素の高活性を発現させるために、重要であることが明らかになった。

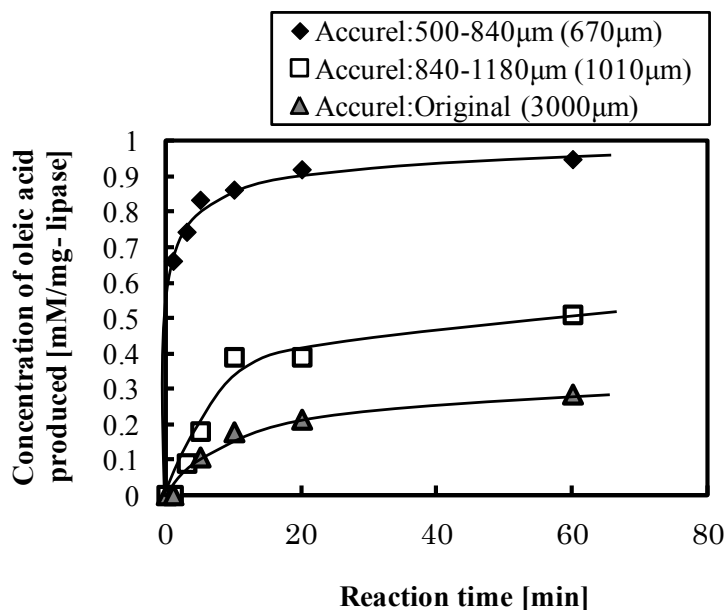


Fig.4-19 Comparison of oleic acid production per unit mass of immobilized *Candida rugosa* lipase (first run, 60min).

粒子全体の体積  $V$  が一定であれば、これを細分化することによる単位体積当たりの表面積（比表面積）は粒子径に反比例して増大する(4-23)式参照。

一辺が  $d_1$  の立方体  $n_1$  個の体積を  $V$  とすると、

$$V = n_1 d_1^3 \quad (4-17)$$

同様に一辺が  $d_2$  の場合、総体積  $V$  をなす個数は  $n_2$  個である。

$$V = n_2 d_2^3 \quad (4-18)$$

したがって

$$n_1 = \frac{V}{d_1^3} \quad (4-19)$$

$$n_2 = \frac{V}{d_2^3} \quad (4-20)$$

一方，接触表面積 A は，

$$A_1 = n_1 6d_1^2 \quad (4-21)$$

$$A_2 = n_2 6d_2^2 \quad (4-22)$$

ケース 1 と 2 の接触表面積の比  $A_1/A_2$  は(4-23)式で与えられる．

$$\frac{A_1}{A_2} = \frac{\frac{V}{d_1^3} \cdot 6d_1^2}{\frac{V}{d_2^3} \cdot 6d_2^2} = \frac{d_2}{d_1} \quad (4-23)$$

ここで，2 を Original Accurel の系とすれば， $d_2=3.0 \times 10^{-3}$  m である．

Original 粒子を微細化して  $d_1=1.01 \times 10^{-3}$  m のとき，総体積一定の場合の接触表面積は 2.97 倍となり，一層微細化して  $d_1=0.67 \times 10^{-3}$  m のときは 4.47 倍の接触面積を有することが推算できる．

この接触面積の倍数と粒子径の逆数の関係を Fig.4-20 に示した．なお，Accurel 単位質量あたりの外表面積と粒子径の関係については本論文第 3 章(3-5-3)でも記述している(Fig.3-6 参照)．

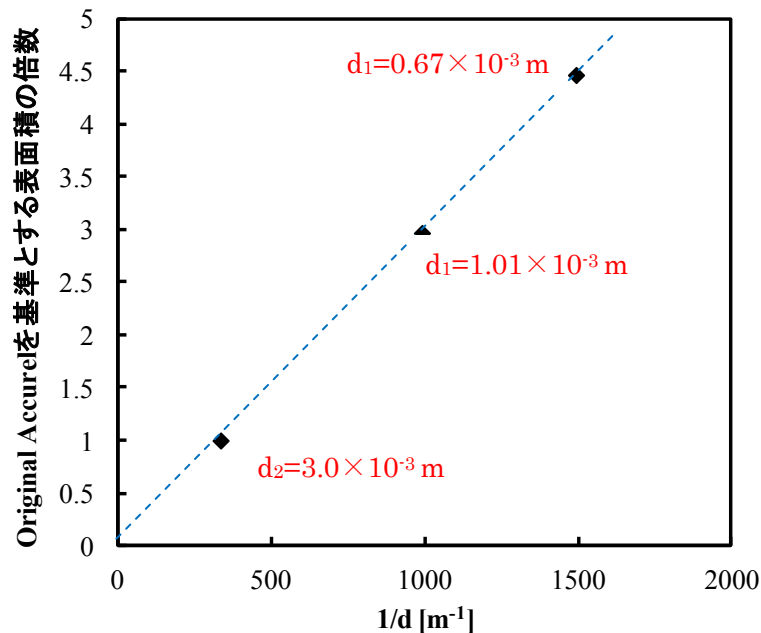


Fig. 4-20 単位体積当たりの表面積と粒子径の関係

Fig.4-18 を基に固定化 Lipase の最終的な生成脂肪酸（オレイン酸）量に対する Accurel 担体の粒子径の影響をみたものが、Fig.4-21 である。粒子径の増大とともに最終生成物濃度は増加しているが、Fig.4-20 に示した表面積の理論上の増大分と必ずしも一致していない。

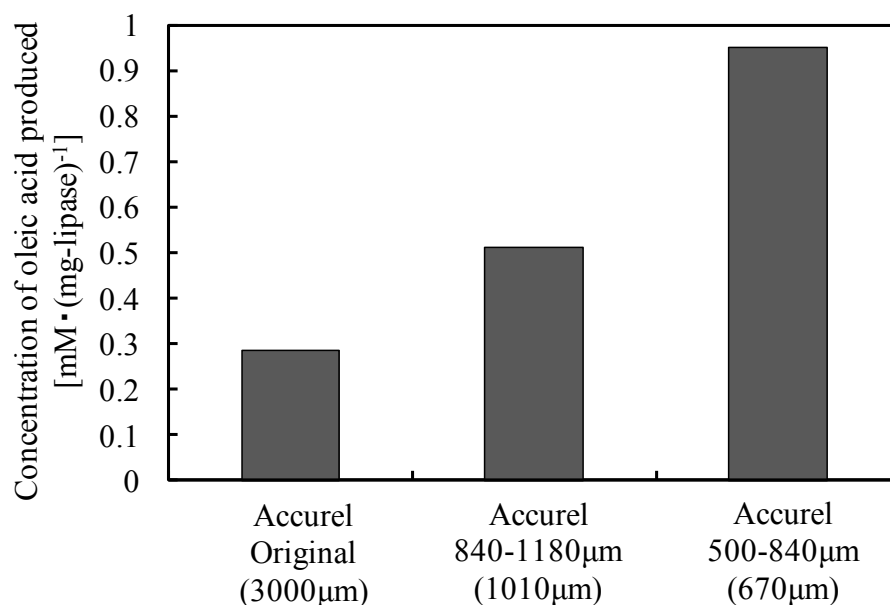


Fig.4-21 Comparison of produced oleic acid concentration by immobilized lipase (*Candida rugosa*) for various particle sizes of Accurel. The concentration of oleic acid was normalized by the unit mass of immobilized lipase.

Fig.4-21 の生成脂肪酸量に Fig.4-20 の粒子の表面積の増大幅を考慮し、生成脂肪酸量に対する粒子径の影響を Fig.4-22 に示した。このように 670 µm の粒子を使用した場合の生成脂肪酸量は、Accurel 粒子を微細化したことによる表面積の増大分を大きく上回っている。これは、第 2 章で述べたように、微細化することによって、粒子内部の微細孔が表面に露出したことによる効果であると考えられる。

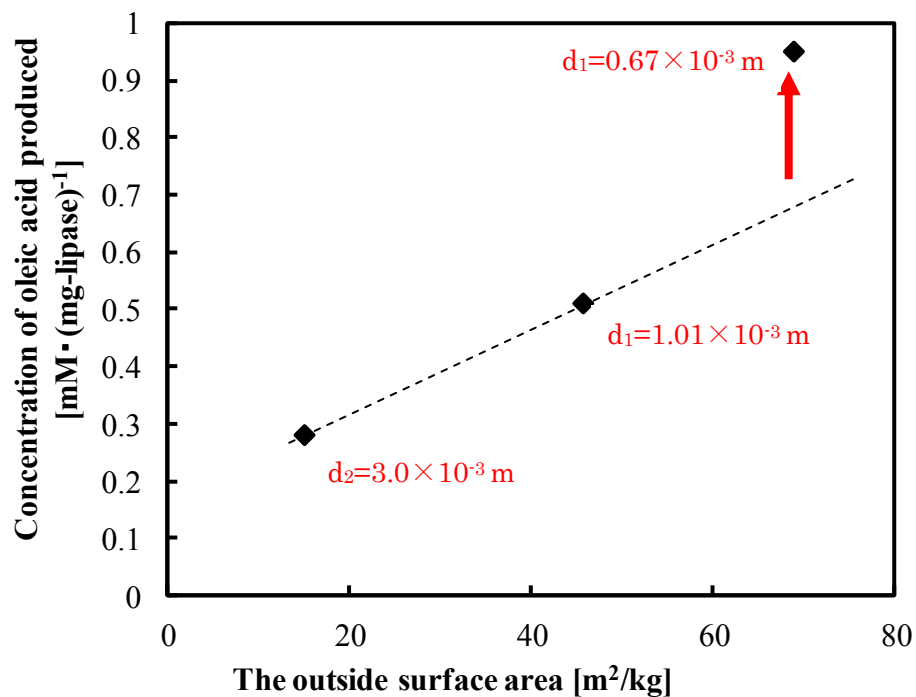


Fig.4-22 固定化 Lipase を使用した生成脂肪酸量に対する Accurel 粒子の比表面積の影響

高活性を示した小さな粒子径は反復利用においても、高活性を良く維持している。Fig.4-23 は、回分反応で高活性を発現した 500~840 $\mu$ m の Accurel 粒子を用いた反復利用の結果である。このように、3 回の反復利用においても、初期反応速度と生成物収率に低下はみられず、高活性を維持している。

粒子径が、このように大きな反応速度や高い反応収率をもたらすファクターとなり得る背景について次項 4-8 で考察した。

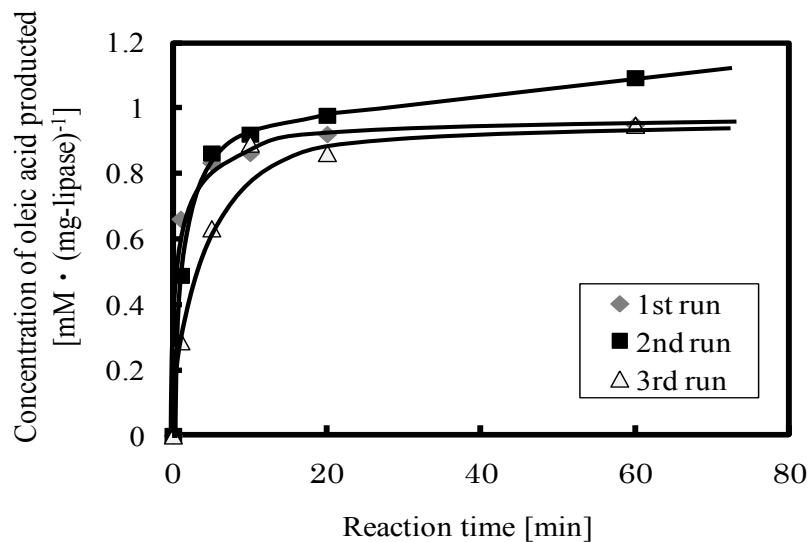


Fig.4-23 Production of oleic acid in repeated use particle size range (500 to 840 $\mu$ m).

#### 4-8 速度論的解析に基づく高分子多孔質担体の形状因子と細孔空間の機能的役割

<固定化酵素のパラメーター測定>

固定化酵素の調製とその利用に際して、注目される特性は、活性（反応速度）と酵素の多数回の反復利用における安定性である。

固定化酵素の活性に及ぼす主要な因子として、基質の担体内外の分配平衡、担体内の基質や生成物の拡散係数の挙動を含む物質移動速度、固定化による酵素分子のダメージの程度を挙げることができる。

反応速度が拡散速度に比較して高い場合には、担体内部で基質濃度が低下する。酵素反応が Michaelis-Menten 型反応のように、基質濃度に関する増加関数の場合には、基質濃度が低下すると反応速度も低下し、基質の消費速度と拡散速度が釣り合う点で反応速度が決定される。これを原因とする基質濃度の低下は、拡散速度に比較して反応速度が高いほど、顕著に現れる。一方、反応生成物は担体内部で生産されるので、生成物濃度は担体中心部から表面に向かって減少すると考えられる。

一般に固定化酵素の担体表面の内側と外側において分配平衡に基づく濃度差が存在する。この平衡状態での濃度比を分配定数（partition constant） $K_t$  とすると

$$K_t = \frac{C_{se}}{C_s} \quad (4-24)$$

で定義される。担体内外で濃度が等しいか、等しいと見なし得る場合には  $K_t=1$  である。 $K_t$ に影響を及ぼす因子としては、立体障害、静電的相互作用、親水・疎水性相互作用などがあげられる。基質が高分子の場合は、立体障害が顕著になるので、 $K_t \ll 1$  となる。また、担体と基質の親水性、疎水性の相互作用が引き合う場合は  $K_t > 1$  となり、反発の場合は  $K_t < 1$  となる。このような基質の分配は見かけ上の固定化生体触媒の特性を支配する第一因子として重要である。

固定化酵素系で反応速度が自由溶媒系と比較して低下する第二因子は、担体内における物質の拡散過程である。基質が担体内部に向かって拡散する速度が先に述べたように反応速度を支配する因子となり、担体内の有効拡散係数  $D_{eff}$  は固定化生体触媒の特性を支配する因子となる。

Table.4-4 Criteria for assessing the magnitude of mass-transfer effects on overall kinetics

Criterion	$\eta$ value	Limiting rate process	Extent of mass-transfer limitation
$\phi < 0.3$	$\sim 1$	Chemical reaction	Negligible
$\phi > 3$	$\propto \phi^{-1}$	Diffusion	Large

固定化酵素の見かけの反応速度は、担体内部で分配平衡や基質の拡散の影響を受けるので、自由溶液系の反応速度を 1 として、固定化酵素系で実際に得ることができる反応速度の比の値を有効係数 (effectiveness factor)  $\eta$  として表している。

$$\eta_{\text{exp}} = \frac{r(\text{固定化酵素系の初期反応速度 [mM} \cdot \text{s}^{-1}\text{])}}{r(\text{W/O microemulsion 系の初期反応速度 [mM} \cdot \text{s}^{-1}\text{])}} \quad (4-25)$$

本研究では、油水分散系の反応媒体を用い、基質が疎水性であるため、比較の基準となる反応速度は単なる自由水溶液系ではなく、W/O microemulsion 系における反応速度である。一次・不可逆反応を仮定した場合、分配平衡定数  $K_t$  と有効拡散係数  $D_{eff}$  を含む Thiele modulus  $\phi$  によって有効係数  $\eta$  は理論的に(4-27)式で算出することができる。一般的には計算された線図が与えられ、それより  $\eta$  の値を読み取ることが多い。

$$\phi = \frac{V_p}{S_p} \sqrt{\frac{V_{\max}}{D_{\text{eff}} \cdot K_m}} \cdot \frac{1}{\sqrt{2(1+\nu)}} \left[ \frac{1}{\nu} - \ln \left( 1 + \frac{1}{\nu} \right) \right]^{-0.5} \quad (4-26)$$

$$\eta_{\text{th}} = \frac{1}{\phi} \left[ \frac{1}{\tanh(3\phi)} - \frac{1}{3\phi} \right] \quad (4-27)$$

$C_s$ : Substrate concentration in bulk phase [mM]

$C_{se}$ : Substrate concentration on the outer surface of the carrier [mM]

$D_{\text{eff}}$ : Effective diffusion coefficient [ $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ]

$K_m$ : Michaelis-Menten constant [mM]

$K_t$ :  $C_{se}/C_s$  [-]

$S_p$ : Outer surface area of the carrier [ $\text{m}^2$ ]

$V_{\max}$ : Maximum reaction rate [ $\text{mM} \cdot \text{s}^{-1}$ ]

$V_p$ : Volume of the carrier [ $\text{m}^3$ ]

$\nu$ : Parameter used in Eq.,  $\nu = K_m/C_{se} = K_m/(K_t \cdot C_s)$  [-]

$\phi$ : Thiele modulus, defined by Eq (4-26)

$\eta$  値は  $\phi$  値が大きいほど小さくなる。  $\phi$  値が十分に大きくなると、  $\eta$  値は  $\phi^{-1}$  に比例して減少する。 この領域では、固定化酵素の反応速度が分子拡散に著しく影響されるので、拡散律速 (diffusion limited) と呼ばれる。 一方、  $\phi$  値が小さくなると  $\eta$  値は 1 に近づく。 この領域では、拡散の影響を無視することができるので、反応律速 (reaction limited) と呼ばれる。 拡散速度が小さくなるほど、担体内における基質濃度の低下が顕著となり、内部ではほとんど 0 となる。 すなわち、内部では酵素は存在するが、利用されないことになる。 したがって、  $\eta$  は酵素の有効利用率と見なすこともできる。

*Candida rugosa* lipase を用いた粒子径条件の検討結果を Fig.4-24 に示した。 Accurel 担体の粒子径が小さくなるに従って、Thiele modulus ( $\phi$ ) は減少し、粒子径 3000 $\mu\text{m}$  の Original Accurel 粒子の場合、有効係数  $\eta$  は 0.2 であるのに対し、平均粒子径を 670 $\mu\text{m}$  に微細化すると有効係数  $\eta$  は 0.6 に向上した。 有効係数の差は、3 倍であり、Fig.4-21 に示す実測値とよく一致していた。



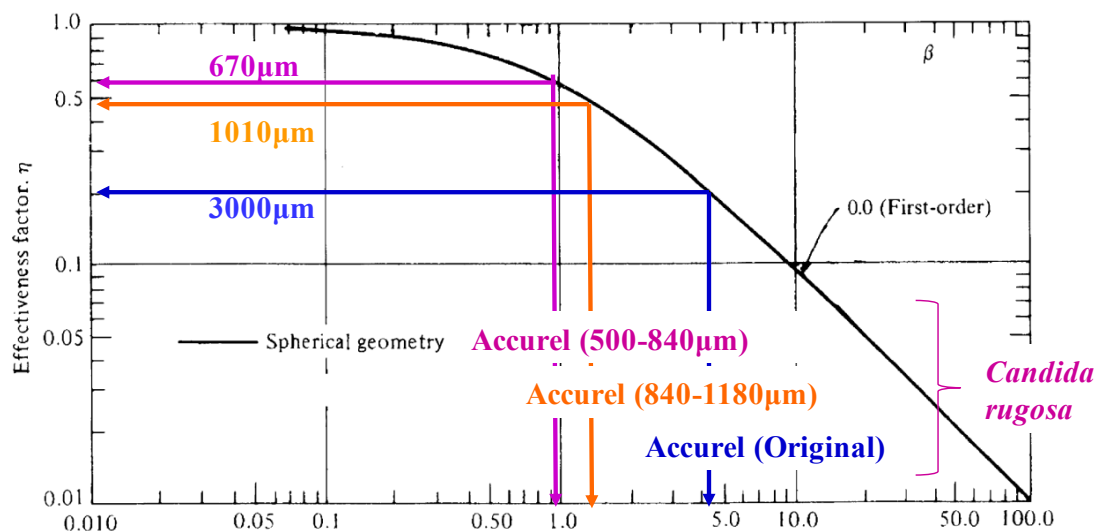


Fig.4-24 Effectiveness factor vs. Thiele modulus (effect of particle size of Accurel used for *Candida rugosa* lipase)

Fig.4-24 で示した  $\eta_{th}$  と実験値より求められた  $\eta_{exp}$  を比較した結果が Fig.4-25 である。算出された  $\eta_{th}$  は、Fig.4-21 の結果および (4-25) 式から算出された  $\eta_{exp}$  と粒子径が大きくなるほど差異が大きくなっている。その主な原因として2つの要因が考えられる。

第一は、 $\eta_{th}$  は本研究で使用した Accurel 粒子を完全な球体、かつ細孔のない平滑な表面構造の球体担体と仮定して算出したことである。実際の形状との相違により実際の表面積・体積に誤差が生まれ、(4-27) 式中の  $V_p/S_p$  の値が実際と異なっていたことが考えられる。第二は、担体内部の基質濃度と担体外の基質濃度を同一 ( $K_t=1.0$ ) と見なしていることである。微小な担体内部の基質濃度を正しく求めることは実際にはかなり困難である。これらの要因によって、誤差が生じたと考えられる。今後、担体の詳細な物性や基質の濃度状態を検討する必要がある。

Fig.4-25 の実線で示した  $\eta_{exp}$  の顕著な増加は、粒子径の微細化による活性の著しい向上を表しており、担体の形状因子に注目する重要性を示唆している。また、粒子径が微細になると実験値  $\eta_{exp}$  が理論値  $\eta_{th}$  に近づくことも、すでに述べたように粒子が微細化することによって球状に近似しやすくなったことを反映している。Original 粒子の形状は、半円柱形に近づく球形からのズレは大きい。一方、微細化された粒子は球形からの偏りがより是正されているため、計算値との一致が良好になっていると考えられる。

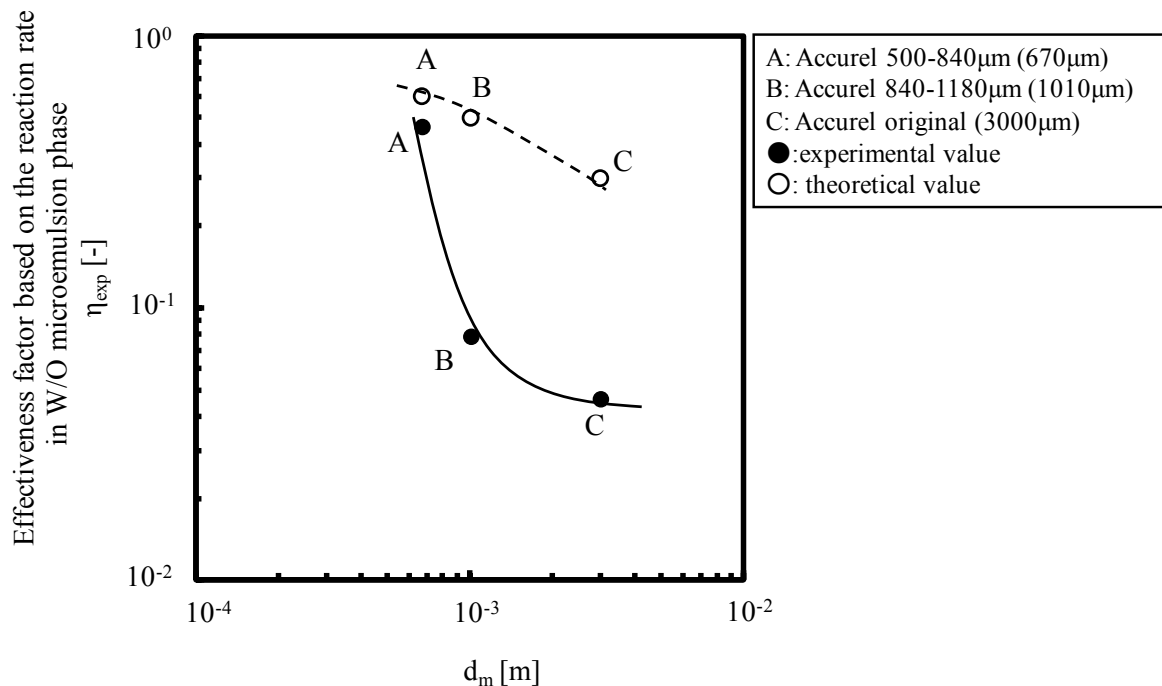


Fig.4-25 Experimental effectiveness factor  $\eta_{exp}$  based on the reaction rate in W/O micro-emulsion phase.

一方、起源の異なる Lipase の活性を理論的に解析した結果が、Fig.4-26 である。有効係数 ( $\eta_{th}$ ) は *Candida rugosa* lipase で約 0.2, *Rhizopus arrhizus* lipase で約 0.29 と 1.45 倍の差が確認できる。*Candida rugosa* lipase と比べ *Rhizopus arrhizus* lipase の方が、反応律速下ではあるが高活性が発現する。この活性の増加分は、Fig.4-15 の実測による活性の比較分とよく一致している。また、Fig.4-24 の結果を参考にすると、*Rhizopus arrhizus* lipase も粒子径を微細化することで、Original 粒子で 0.29 の  $\eta_{th}$  となっている有効係数をさらに向上させることができると期待できる。

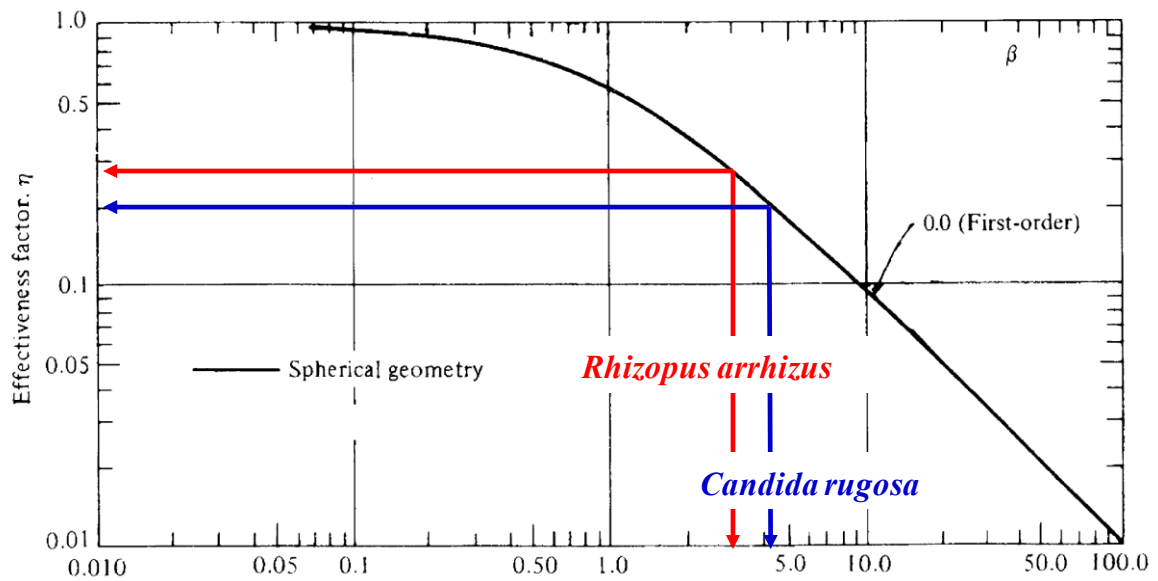


Fig.4-26 Effectiveness factor vs. Thiele modulus (effect of lipase species) Original size carrier particle was used.

#### 4-9 繰り返し利用の実証

固定化酵素の実用上の有効性は、反復利用における活性の高度な維持と耐久性である。固定化 *R. arrhizus* lipase を使用し、10 回の繰り返し利用における活性の維持を実証した結果が、Fig.4-27 である。繰り返し利用では、反応終了後に基質の溶解していない溶媒（イソオクタン）で洗浄し、新しい基質にて加水分解を行っている。10 回の繰り返し利用においても、生成オレイン酸濃度は効果的に（約 50%）維持されている。W/O microemulsion 系において高活性の発現が反復することを実証している。本研究における固定化酵素からの酵素の脱離による活性の低下は生じているとは考えられない。酵素は、担体内に高度に架橋・維持されながら、高活性が継続的に発現した。

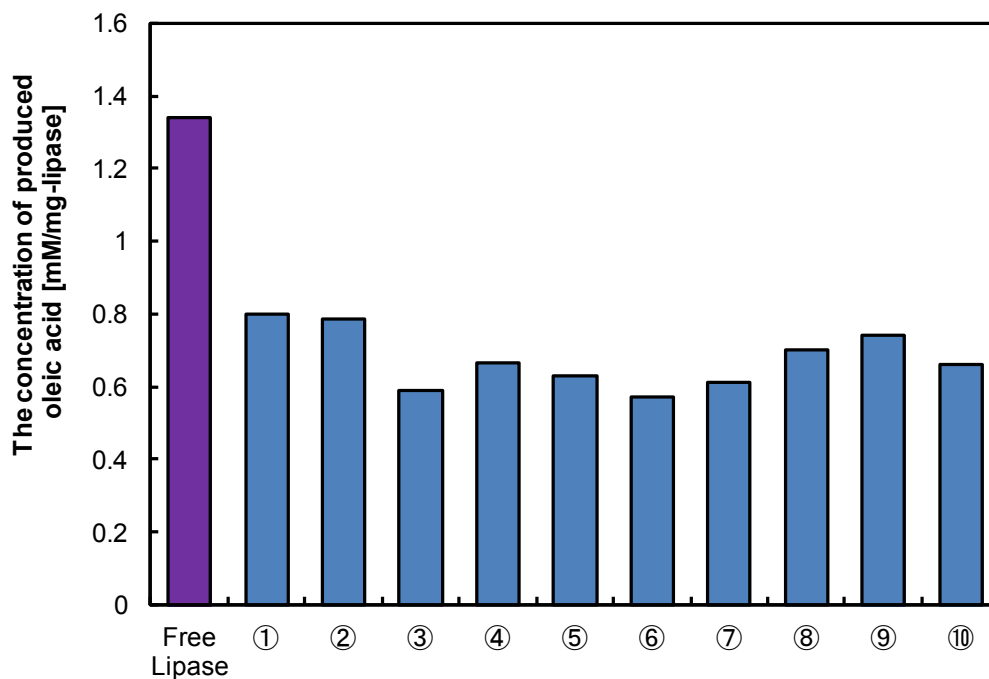


Fig.4-27 The comparison of the repeated reaction yields of hydrolysis by using immobilized lipase (*Rhizopus arrhizus* lipase, solvent: 3.5% 1-butanol/isooctane)

#### 4-10 本章の結論

本章では、生体適合性物質としてシュガーエステルを両親媒性分子とし、微小水相を有機相中に分散させた W/O microemulsion を調製し、固定化 Lipase による脂質の改質反応の反応活性を評価し、酵素反応を速度論的に解析する基礎データを得た。固定化系の担体の形状因子(粒子径)と起源の異なる Lipase の固定化に注目し、速度論評価と繰り返し利用の実証を得た。その結果、

- ① Lineweaver-Burk plot によって、*Rhizopus arrhizus* lipase の  $V_{max}$  と  $K_m$  が明らかになった(Fig.4-13, Table.4-3).
- ② 固定化 Lipase (*R. arrhizus*) を用いた系では、*C.rugosa* と比較して、固定化後も高い活性を発現した(Fig.4-15, Fig.4-16(a)(b)).
- ③ 微細化された Accurel 粒子を用いた系では、高い反応生成物収率を得ることができた(Fig.4-21)。反応速度解析上の有効係数を算出したところ、自由溶媒系

のフリー酵素活性に対し、60%以上を維持する粒子径が求められた(Fig.4-24).

- ④ 速度論に基づいた数値解析によると、酵素の種類 (*Rhizopus arrhizus* と *Candida rugosa*) によって固定化後、約 1.45 倍の有効係数に達する(Fig.4-26).
- ⑤ 繰り返し利用 (*Rhizopus arrhizus* lipase) においても、遅れ時間はなく、高いレベルの活性(50%)が安定して発現しており、実用化への可能性が期待できる(Fig.4-27).

## 第5章 超臨界二酸化炭素を溶媒として使用した固定化 Lipase による

### 脂質加水分解における反応活性と速度論

#### 5-1 固定化酵素の反応活性に対する反応媒体の影響

酵素反応は一般的には水中で、酵素に水分子が水和した形で存在して化学反応を進行させる均一相系の反応と考えられている。超臨界流体を反応溶媒として用いる酵素反応では酵素が超臨界流体には不溶と考えられるので不均一系の反応ではあるが、一般に超臨界流体中の基質の拡散性が高いことから高速の反応速度が期待される。

実際には反応基質のバルク溶媒（超臨界流体）への拡散、バルク溶媒から酵素表面への拡散、酵素内での酵素活性部位への拡散、次いで酵素活性部位での反応というステップを経ることになる。

タンパク質である酵素分子の多くは熱的に不安定であり、疎水性酵素反応の溶媒としては比較的低温で超臨界状態になり、誘電率の低いものが適している。特にCO<sub>2</sub>は優れた安全性、残留毒性のない点、低価格の点から食品・医薬品生産に向けた反応媒体として期待されている。

検討されている酵素反応の例として、Lipase によるエステル合成、エステル交換、加水分解の他、油脂の改質、香料成分の合成、光学異性体分割など多岐にわたる応用が期待されている。

ただし、工業的に実用化するためには、高压ガス取扱いの法的規制を満たす必要があり、技術的課題とともに法律面での支援が必要である。

#### 5-2 超臨界二酸化炭素に対する酵素分子と酵素活性に関する既往の研究

Dawei Chen ら(2013)は、亜臨界二酸化炭素(5-7MPa, 308-318K)と超臨界二酸化炭素(10-20MPa, 308-318K)を用いて、高压力による前処理を施した *Pseudomonas cepacia* lipase の活性が向上したと報告した。これは、高压によってむしろ高活性が発現することを述べている。また、Novak, Z.ら(2003)は silica gel を用いて *Candida rugosa* lipase と porcine pancreas lipase を固定化し、超臨界二酸化炭素中で活性が発現し、10回の反復利用で第一回目の反応収率の12%を維持したことを報告してい

る。ただし、silica gel は親水的な担体であり、疎水性基質に好適な担体とは必ずしも言えない。

超臨界流体と有機溶媒との比較として、Chi et al. (1988)は、有機溶媒中よりも超臨界二酸化炭素 (SCCO<sub>2</sub>) 中の酵素活性の方が高くなると報告しているが、その一方で有機溶媒中よりも SCCO<sub>2</sub> 中の方が活性が低くなる結果も報告されている (Kamat(1992), Vermue(1992))。基質の種類、Lipase の起源、超臨界二酸化炭素の物性などの因子が複合的に作用している現象を体系的にまとめ、技術的指針を確立してゆくことが重要である。

### 5-3 本章の目的

本章の目的は、超臨界二酸化炭素を反応溶媒として用いて、第3章で調製した4種の固定化 Lipase による脂質の改質反応の反応活性を評価し、酵素反応を速度論的に解析することである。特に、本章では、*Rhizopus arrhizus* Lipase を中心に温度・圧力条件の影響を検討し、 $V_{max}$ ・ $K_m$  等の速度論的パラメーターを求めた。さらに、工業利用に向けたアプローチとして、繰り返し利用の実証と、直列多段化による反応転化率のシミュレーションを行った。

### 5-4 超臨界二酸化炭素中での固定化 Lipase による脂質加水分解実験

#### 5-4-1 生成物の定量法(ガスクロマトグラフィー法)

超臨界二酸化炭素中の基質 (トリオレイン) の溶解度は低濃度であるため、基質が低濃度条件の酵素反応では生成するオレイン酸濃度も低い。この場合、Lowry-Tinsley 法では定量分析できないので、基質低濃度条件の反応生成物 (オレイン酸) の定量はガスクロマトグラフィーによって行った。

カラム : Agilent J&W GC column

DB-WAX

30m × 0.250mm

20°C to 250/260°C

検出条件 : Carrier gas pressure: 200kPa

Flow rate: 60mL/min

INJ:240°C

DET:250°C

OVEN:180°C

#### 5-4-2 超臨界二酸化炭素中での固定化 Lipase によるトリオレインの加水分解反応

##### < 試薬 >

- ・ 固定化 Lipase ( *Rhizopus arrhizus* 由来)  
(wheat germ 由来)  
( *Candida rugosa* 由来)  
( *Candida cylindracea* 由来)
- ・ Accurel (MP100, MEMBRANA GmbH)
- ・ トリオレイン (純度 60.0%, 和光純薬工業株式会社)
- ・ 2,2,4-トリメチルペンタン (イソオクタン)  
(純度 99.0%, 和光純薬工業株式会社)
- ・ 酢酸緩衝溶液 (pH 6.5, 5-5-2 で調製したもの)

##### < 器具 >

- ・ 超臨界二酸化炭素装置 (Fig.5-1)
- ・ マグネティックスターラー

##### < 手順 >

- ① Fig.5-1 の substrate tank (3)に所定濃度の基質 (トリオレイン) を用意した。基質には、あらかじめ微小水相 (酢酸緩衝液(pH 6.5)) が含まれている。微小水相は、基質単位質量に対して 63.6 [μL-buffer/g-substrate (triolein)]を加えた。この割合は、第 4 章における W 値から基質と水相の質量比によって決定した。



- ② CO<sub>2</sub> ポンペ (Fig.5-1 (1)) を開栓し, CO<sub>2</sub> を供給した(5-20 MPa).
- ③ ①で用意した基質をポンプにより加圧した. このときのポンプ流量 (2 [mL/min])に稼働時間(1-2.35 min)を乗じて供給した基質体積を決定した.
- ④ 加圧された CO<sub>2</sub> と基質は, スパイラルミキサー(Fig.5-1 (4))によって混合され, 予備的に亜臨界状態(10 MPa, 298 K)にしておく.
- ⑤ ①と並行して, 各種固定化 Lipase を, リアクターカラム(Fig.5-1 (5))に充填する. リアクターカラムの空体積は, 9.29 cm<sup>3</sup>であり, 酵素固定化後の Accurel を充填した際の空隙体積は, 8.05 cm<sup>3</sup>であった. リアクターカラムは, 恒温水槽にて所定の温度(313-328 K)に加熱し, これを保持した.
- ⑥ リアクターカラムに CO<sub>2</sub> ・ 基質混合流体を導入し, 固定化 Lipase と触れ合うことで, 加水分解を開始した.
- ⑦ 所定の時間ごとに, スイッチングバルブ(Fig.5-1 (7))を操作し, サンプルループ(Fig.5-1 (6))に反応生成物を含む流体を 20 μL を分取した.
- ⑧ 分取したサンプル(20 μL)をイソオクタンによるトラップ(Fig.5-1 (8))にて採取した.
- ⑨ 採取したサンプル中の生成オレイン酸の濃度を, 基質高濃度域では Lowry-Tinsley 法, 低濃度域ではガスクロマトグラフィーによって定量し, 固定化 Lipase の反応活性を評価した.

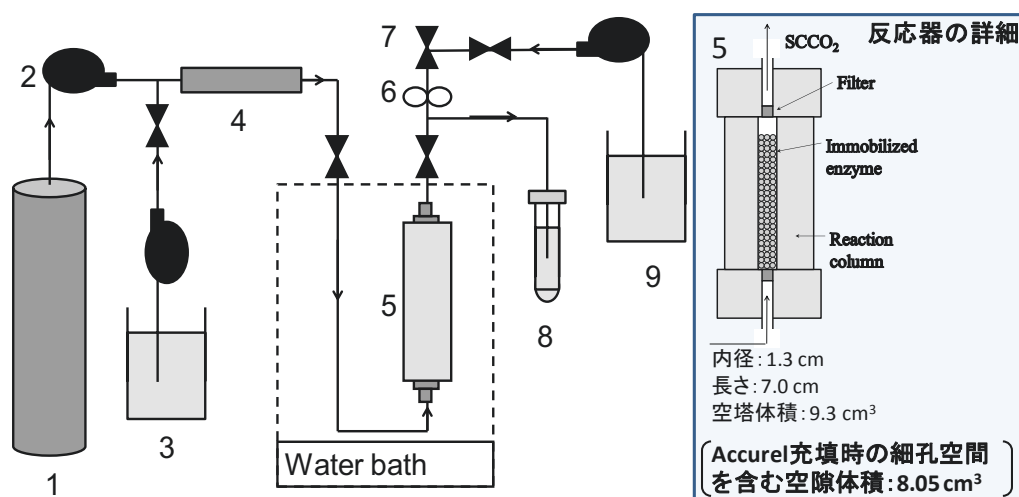


Fig.5-1 Schematic of the experimental apparatus used in measuring the solubility in SCCO<sub>2</sub>. (1) CO<sub>2</sub> gas cylinder, (2) Compressor, (3) Substrate tank, (4) Mixer, (5) Reactor vessel, (6) Sampling loop (20μL), (7) Switching valve, (8) Sample with a isooctane trap, (9) Washing fluid (isooctane).

## 5-5 速度論的解析に基づく超臨界流体溶媒の機能性

第3章にて調製した4種の固定化Lipaseを用いて、比較的温和な超臨界状態である313K・10MPa、同一基質濃度(253 mM)の条件下において、活性の比較を行った。オレイン酸の生成量の経時変化がFig.5-2である。反応開始とともにオレイン酸が遅れ時間なく生成し、反応が開始した。4種の固定化酵素を比較すると、*R. arrhizus*の活性が比較的高い結果となった。wheat germ, *Candida rugosa*, *Candida cylindracea*由来のLipaseは、基質に対して1,2,3位特異性を示すため、1 molの基質から3 molの生成物を生産する機構となる。一方、*R. arrhizus* lipaseは、基質トリオレインに対して、他の由来のLipaseと異なる1,3位特異性をもっているため、1 molの基質に対して、2 molの生成物を生産する。このことを踏まえ、Lipaseの位置特異性に基づいた反応生成モル数の化学量論上の補正を行い、反応収率を算出して、初期反応速度等と比較した結果が、Table.5-1である。位置特異性を考慮してもなお固定化*R. arrhizus* lipaseが優れている。

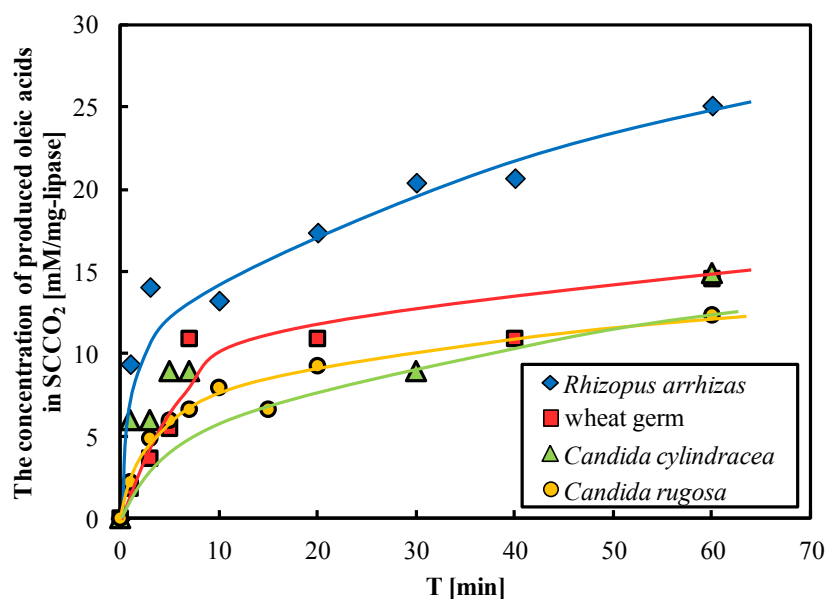


Fig.5-2 The production of oleic acid by immobilized lipase (*R. arrhizus*, wheat germ, *C. cylindracea*, *C. rugosa*) in SCCO<sub>2</sub> (10MPa, 313K)

Table.5-1 The initial reaction rates and production yields of immobilized lipases

Lipase	初期反応速度 Vi [mM/s]	反応打ち切り時(60分)の 生成脂肪酸量 [mM]	反応収率(60分) [%]
<i>Rhizopus arrhizus</i>	0.330	100.38	24.25
wheat germ	0.126	58.24	9.38
<i>Candida cylindracea</i>	0.110	52.12	8.39
<i>Candida rugosa</i>	0.093	61.77	9.95

4種の固定化 Lipase を用いた超臨界二酸化炭素中の加水分解の反応初期(5 min)において一次反応と仮定して基質の転化率  $\ln(C/C_0)$  の時間変化を示したものが Fig. 5-3 である.

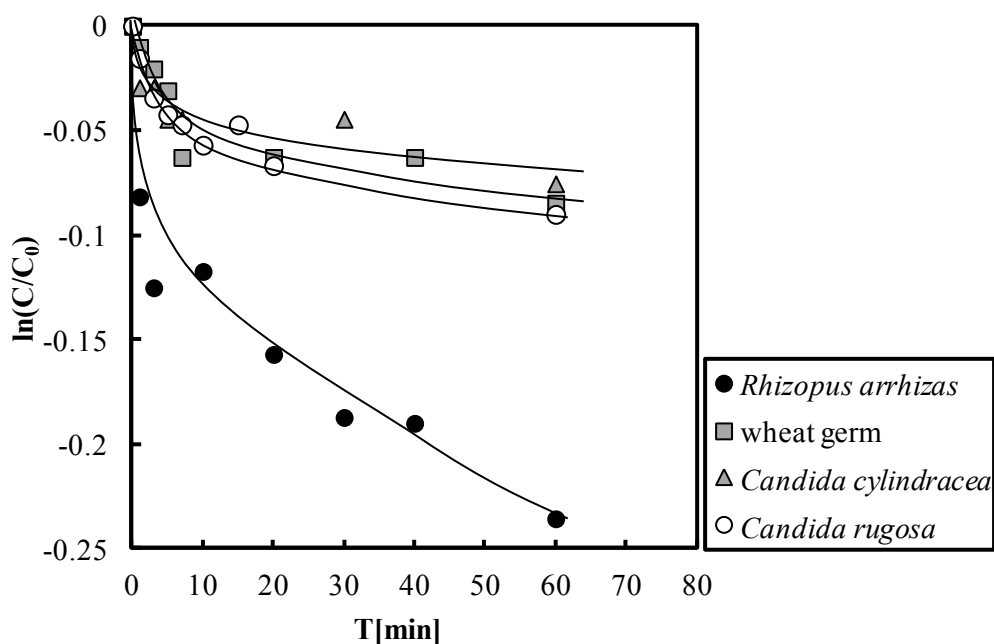


Fig. 5-3 The substrate conversion by hydrolysis reaction by four immobilized lipase in SCCO<sub>2</sub>. In the initial range, the reaction was assumed a first ordered reaction.

この曲線の初期(5 min)における接線から、反応速度定数  $k$  を求め、有機溶媒を用いた W/O microemulsion 自由溶媒系と比較したものが、Table.5-2 である。固定化 *R. arrhizus* lipase と固定化 *C. rugosa* lipase の超臨界二酸化炭素中での反応における反応速度定数  $k$  は、有機溶媒中での未固定の Lipase 反応の速度定数に匹敵する値となった。

Bodalo, A.らの研究(2009)では、21種類の起源の異なる固定化 Lipase を用いて、W/O microemulsion の solvent free の系において、ポリグリセロールとポリリシノレートの加水分解を行っている。イオン交換樹脂を担体として *R. arrhizus* lipase を担体質量あたり 8.59 [mg/g-carrier] 固定化している。本研究での Accurel への *R. arrhizus* lipase の固定化量は 5.19 [mg/g-Accurel] である(Fig.3-9 より)。Bodalo, A.らの研究では、21種類の固定化酵素のうち、*R. arrhizus* と *R. oryzae* 由来の Lipase で最も高い活性が発現した。*R. arrhizus* lipase の高い活性に着目して、以降の実験ではこれを中心に検討した。

Table.5-2 The comparison of reaction rate constant  $k$  between using free enzyme system in isooctane and immobilized enzyme in SCCO<sub>2</sub>

Lipases	$k$ [ $10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ] in initial period (5 min)	
	immobilized	free
	in SCCO <sub>2</sub>	in W/O microemulsion
<i>Rhizopus arrhizus</i>	8.30	8.67
wheat germ	13.3	2.13
<i>Candida cylindracea</i>	7.60	ND
<i>Candida rugosa</i>	5.95	9.81

基質濃度を変化(0.71-16 mM)させた際の生成オレイン酸量の経時変化が、Fig.5-4 である(10 MPa・313 K)。この場合、Fig.5-2 において見かけの活性が高かった固定化 *R. arrhizus* lipase を用いた。基質濃度の上昇とともに加水分解の初期反応速度が高く、これより初期反応速度を求めて、Lineweaver-Burk plot (Fig.5-5)より速度パラメーターを求めた。

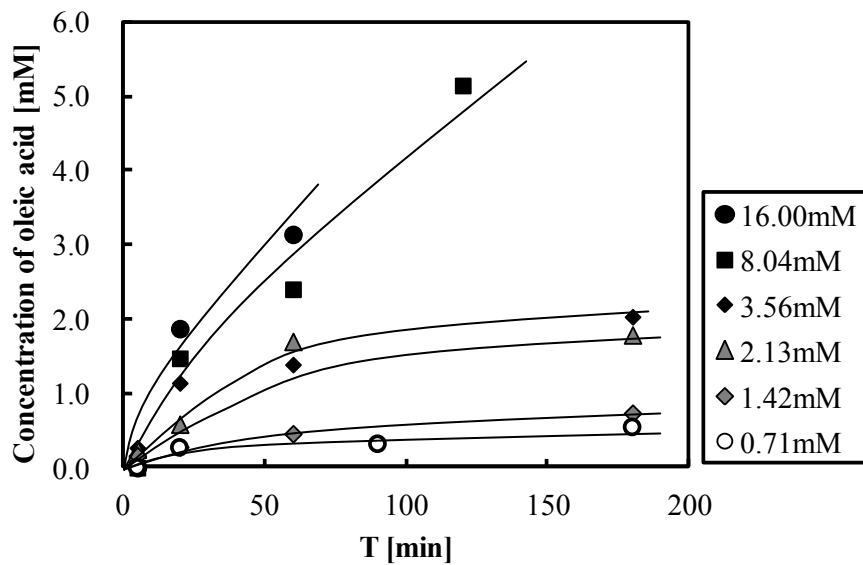


Fig.5-4 Time course of production of oleic acid by *R. arrhizus* lipase in various substrate (triolein) concentrations (313 K, 10 MPa).

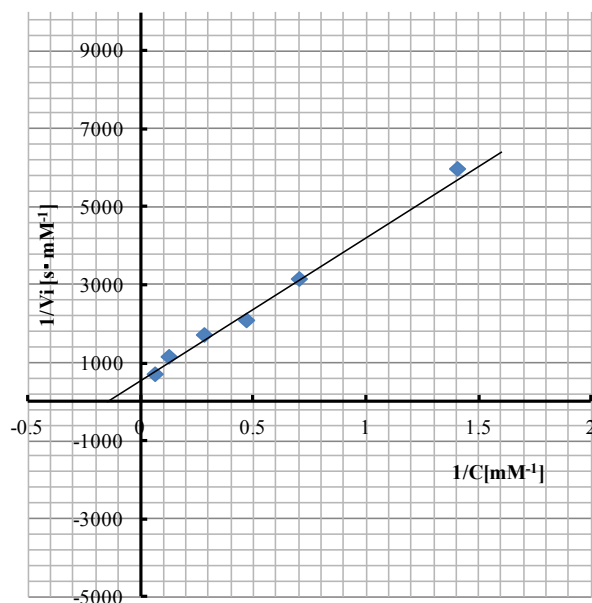


Fig.5-5 Lineweaver-Burk plot of hydrolysis by *Rhizopus arrhizus* lipase in SCCO<sub>2</sub>. (0.71 ≤ C[mM] ≤ 16.0)

Fig.5-6 は反応に使用した広い範囲の基質濃度(0.71–338.13 mM)と初期反応速度の関係を求めたものである。Chrastil (1982)と Masuda (2000)によれば, 超臨界

二酸化炭素へのトリオレインの飽和溶解度は 0.78 mM である。本研究での固定化 *R. arrhizus* lipase は、基質の飽和溶解度を越えた高濃度領域でも、反応速度は基質濃度の増大に伴って増大した。基質濃度域(0.71–16.0 mM)では、対数比例の相関が見られ、高濃度域(57.7mM–338mM)では、低濃度域とは異なる相関となった。

基質濃度が高い条件では、溶媒である超臨界二酸化炭素に基質のトリオレインが均一相を成して溶解しているとは考えにくい。現状では視覚的に確認することはできないが、二相混相状態(biphasic mixture)となっていると推察できる。反応器中の混相状態の違いを反映して、高濃度域では異なる傾向が見られたものと考えられる。

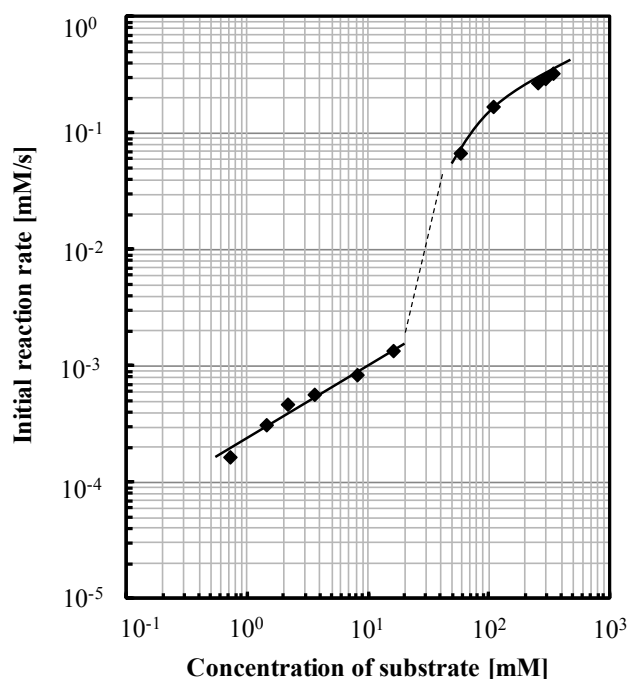


Fig.5-6 The initial reaction rate was increased with the concentration of substrate (triolein) in SCCO<sub>2</sub>

本論文の速度論解析においては、低基質濃度領域(0.71~16.0 mM)における初期反応速度を用いることとした。Lineweaver-Burk plot (Fig.5-6)によって、 $V_{max}$  と  $K_m$  を求めたところ、超臨界二酸化炭素中での固定化 *R. arrhizus* lipase の  $V_{max}$  は  $2.0 \times 10^{-3}$  mM/s、 $K_m$  は 8.33 mM であった。

速度パラメーターの面から有機溶媒(isooctane)中の酵素反応と超臨界二酸化炭

素を溶媒とした場合の比較が Table.5-3 である。固定化 *R. arrhizus* lipase を用いた場合には、超臨界二酸化炭素中での見かけの最大反応速度( $V_{\max}$ )は、有機溶媒系の  $V_{\max}$  と比較すると小さいが今後はこれに近づく条件を探索する必要がある。

Table.5-3 *R. arrhizus* lipase の速度パラメーター

Main solvent	Immobilized carrier	$V_{\max} [\times 10^{-3} \text{ mM}\cdot\text{s}^{-1}]$	$K_m [\text{mM}]$
Isooctane	W/O microemulsion	58.8	40.0
	Accurel	6.18	3.9
SCCO <sub>2</sub>	Accurel	2.00	8.3

## 5-6 温度・圧力の影響

### <圧力の影響>

温度 313 K・基質濃度 253 mM 一定下で、圧力の影響を求めた。5–20 MPa 圧力範囲のもと、固定化 *R. arrhizus* lipase の生成オレイン酸量を示したものが Fig.5-7 である。高圧条件になるにしたがって、生成するオレイン酸濃度は高くなった。特に、臨界状態に至る前の 5 MPa と超臨界状態の 10 MPa での生成脂肪酸量には、大きく差が生じている。これは、臨界状態に至る直前の圧力から超臨界状態に変化することにより、二相混相流体の状態が変化しており、基質と超臨界二酸化炭素の触れ合う面積が増加し、このことが高活性の発現に影響していると考えられる。しかし、20 MPa では生成脂肪酸量は、生成濃度の若干の減衰が見られる。既往の研究においても Romero, M.D.ら(2005) と中村 (1990)は、過度な高圧において酵素活性が失われることを論じており、その原因は一概ではないと報告している。選択した酵素・担体・固定化方法によっても差異は大きく現れると思われるので、今後詳細な検討が必要である。

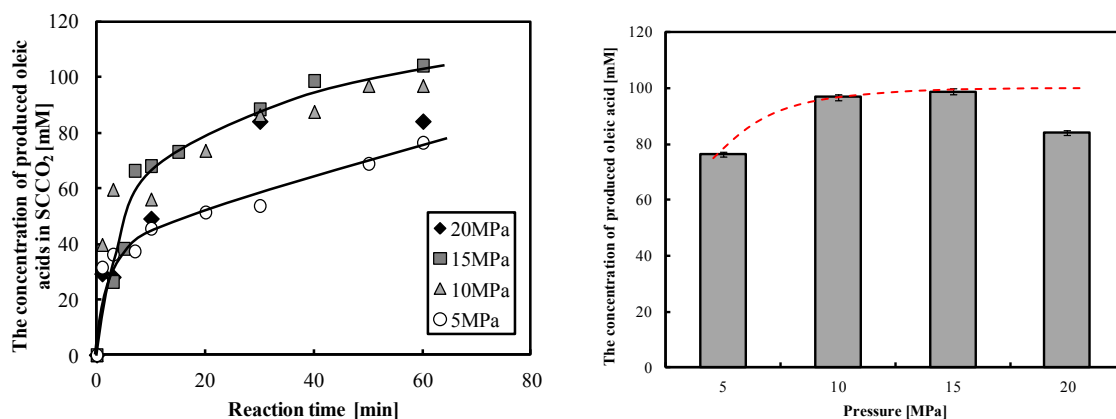


Fig.5-7 Effect of pressure on the production of oleic acid in super critical condition by immobilized *R. arrhizus* lipase. Temperature was set at constant 313K.

<温度の影響>

環境圧力 10 MPa・基質濃度 253 mM 一定下で、温度の影響を求めた。313–328 K での固定化 *R. arrhizus* lipase の生成オレイン酸量を示したものが Fig.5-8 である。高温条件になるにしたがって、生成するオレイン酸濃度は高くなった。一般に化学反応は、温度の高い条件ほど高活性を示すが、酵素を触媒としている場合は酵素が熱変性しないことが重要である。酵素を担体に固定化することによって熱耐性が発現しているとも考えられるので、より高温条件の活性の再現性を確認する必要がある。

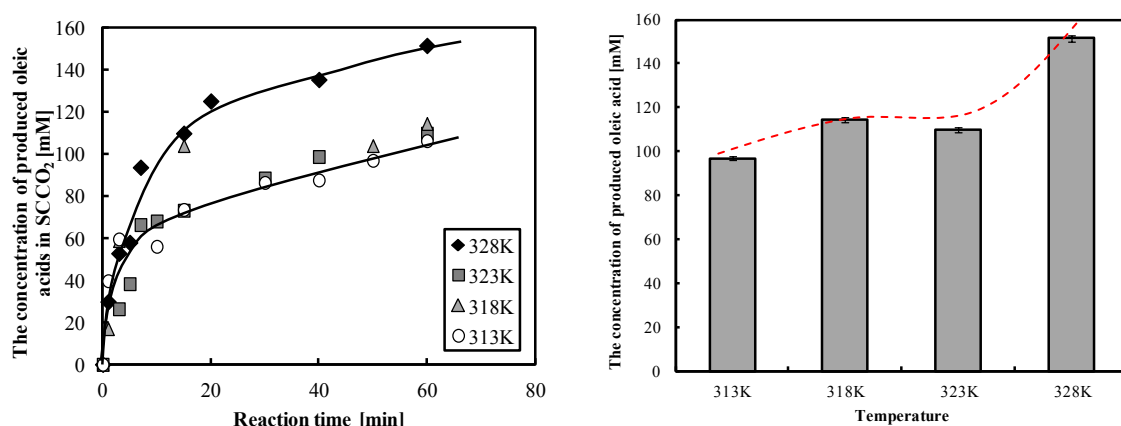


Fig.5-8 Effect of temperature on the production of oleic acid on immobilized *R. arrhizus* lipase system using SCCO<sub>2</sub> (at 10MPa)



## 5-7 連続的プロセスを目指した反復利用試験

固定化酵素の有効性は、反復利用における活性の高度な維持と耐久性によって評価することができる。本研究では超臨界二酸化炭素を溶媒として、固定化 *R. arrhizus* lipase を使用し、10 MPa・313 K、基質濃度 253 mM 一定下で、5回の反復実験によって、活性の変化を求めた。その結果を Fig.5-9 に示した。第4章での反復利用と同様に、反応終了後に基質の溶解していない溶媒（高圧二酸化炭素）で洗浄し、新しく基質を加えて加水分解を行った。5回の反復利用を経ても、反応は迅速に開始され、60分後の生成オレイン酸量もほぼ一定で安定していた。超臨界流体中でも、固定化酵素の反復利用の有効性が実証された。

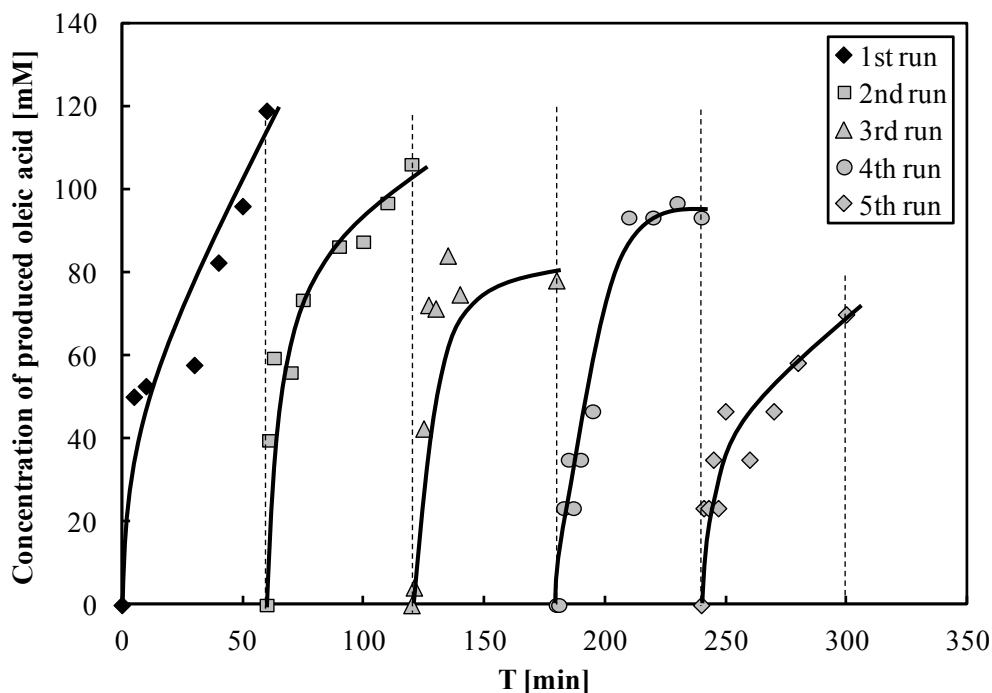


Fig.5-9 Reactivity of repeated use by immobilized *R. arrhizus* lipase in SCCO<sub>2</sub> (10MPa, 313K)

起源の異なる4種の固定化Lipaseでの繰り返し利用の結果が、Fig.5-10である。いずれも反応開始後60分で反応を打ち切った。固定化 *R. arrhizus* lipase は、第1回目の反応生成物量の60%の活性を5回目の反応で発現している。その他の起源の固定化Lipaseでは、第1回目の反応生成物量と5回目の反応生成物量を比較す

ると、90%と高い活性を維持しているが、生成オレイン酸濃度は *R. arrhizus* に及ばない。

Lipase の起源によって、固定化後の活性や反復利用における活性の維持に差異のあることが明らかとなった。このように酵素の起源別に同一反応，同一装置で活性を比較したのは本研究のオリジナルである。今後は，固定化酵素の活性を酵素の起源にも留意してデータベースを充実させることが工業利用にむけて必要である。反応系やリアクターの大きさ等に合わせて，相応しい酵素をデータベースに基づいて選択することは，固定化 Lipase の工業利用への重要なステップと考える。

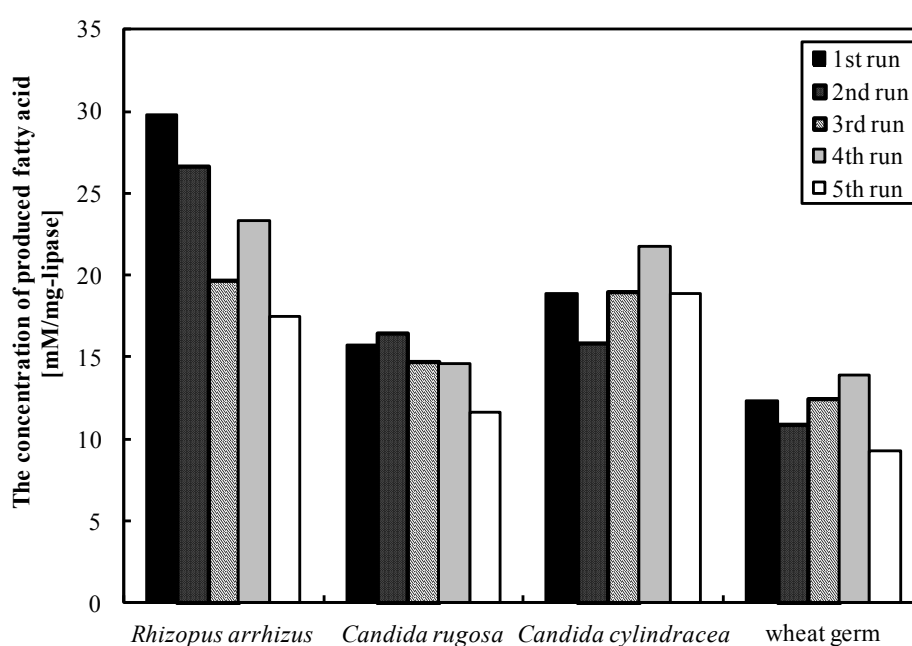


Fig.5-10 Comparison of reactivity of repeated use by immobilized lipase in four sources in SCCO<sub>2</sub> (10MPa, 313K)

### 5-8 リアクターの直列多段化による反応転化率のシミュレーション

本研究では，固定化 Lipase を脂質の加水分解での工業利用へのアプローチとして，バイオリアクターの直列多段化による反応生成物の高収率化を提案する。そのイメージ図が，Fig.5-11 である。

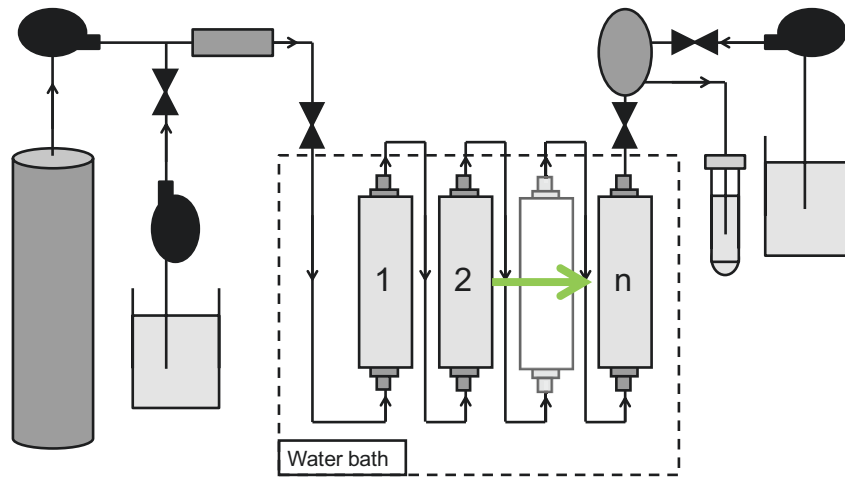


Fig.5-11 Schematic image of scale up of reaction system in reactor series

一般に直列に  $n$  段に多段化された反応器を用いた場合、 $n$  段目の反応率  $x_n$  は次のように考えられる。

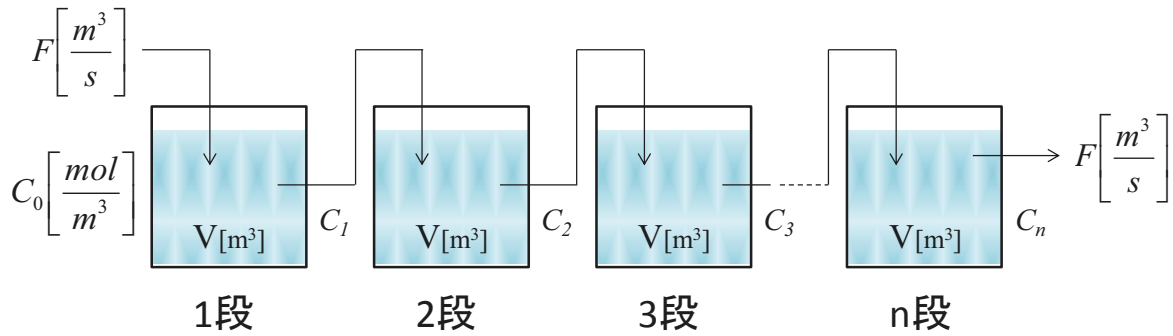


Fig.5-12 反応器の多段化

物質収支より、

$$F(C_0 - C_1) = r \cdot V \quad (5-1)$$

$$\theta = \frac{V}{F} = \frac{C_0 - C_1}{r} \quad (5-2)$$

ここで、 $\theta$  は平均滞留時間、 $r$  は反応速度であり、 $r = kC$  (5-3) (一次反応) と仮定すると、1 段目では

$$\theta = \frac{C_0 - C_1}{kC_1} \quad (5-4)$$

$$k\theta = \frac{C_0}{C_1} - 1 \quad (5-5)$$

$$\frac{C_1}{C_0} = \frac{1}{k\theta + 1} \quad (5-6)$$

2 段目においては  $C_1$  が入口濃度になるので，初期供給濃度  $C_0$  を用いると  $C_2$  は

$$\frac{C_2}{C_0} = \frac{1}{(k\theta + 1)^2} \quad (5-7)$$

以下同様に  $n$  段目においては，

$$\frac{C_n}{C_0} = \frac{1}{(k\theta + 1)^n} \quad (5-8)$$

$n$  段目の反応率  $x = \frac{C_0 - C_n}{C_0}$  (5-9) を定義すれば，

$$x_n = 1 - \frac{1}{(k\theta + 1)^n} \quad (5-10)$$

$x_n$ :  $n$  段目の反応率

$k$ : 反応速度定数 [ $s^{-1}$ ]として，基質濃度が低い条件( $K_m \gg C$ )で，  
本章(5-5)で求めた反応速度パラメーター  $V_{max}$ ， $K_m$  より

$$k = \frac{V_{max}}{K_m} = \frac{2.0 \times 10^{-3} [mM/s]}{8.3 [mM]} = 2.4 \times 10^{-4} [s^{-1}]$$

ここで平均滞留時間は反応基質が反応器内の触媒である酵素と接触する時間であるので，実質的な反応時間と考えることができる。平均滞留時間ごとに多段化による反応時間の短縮の効果を算出した。基質の流量  $F$  を仮に  $3.79 \sim 33.3 \times 10^{-4} \text{ cm}^3/\text{s}$  反応器体積  $V=8.05 \text{ m}^3$  と設定した場合のシミュレーションの結果が，Fig.5-13 と右の付表である。例えば，リアクターカラム 1 段で反応転化率 0.9 を達成しようとするると，平均滞留時間  $\theta$  は 5.90 時間になり，反応終了までに多くの時間が必要である。一方，リアクターカラム 3 段で反応転化率 0.9 を達成しようとするると，平均滞留時間  $\theta$  は 0.67 時間になり，その時間短縮は直列多段化の大きな効果である。

また，1 段の反応器では，供給流量を 33.3 から  $3.79 \times 10^{-4} \text{ cm}^3/\text{s}$  に抑制することにより，反応転化率は 0.5 から 0.9 に向上させることができる。以下，2 段，3 段においても反応転化率の向上を推算できる。

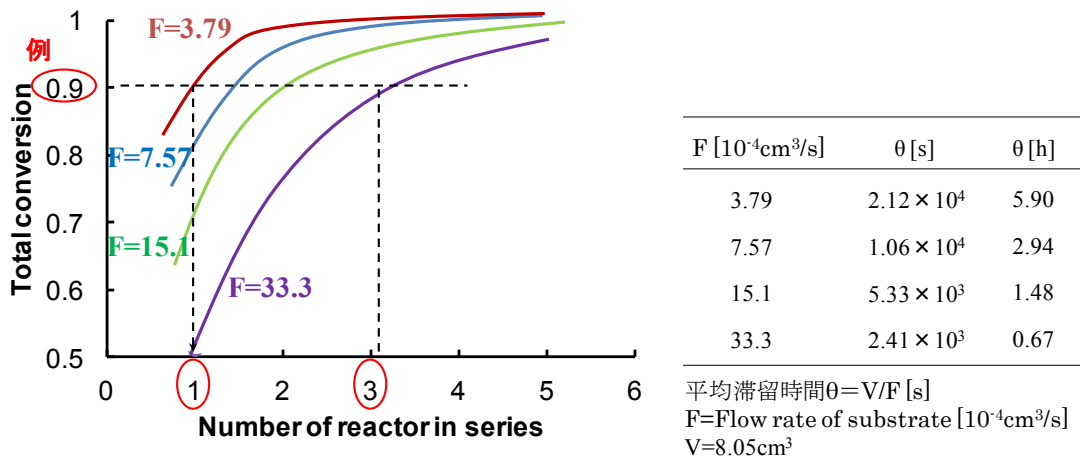


Fig.5-13 Total conversion vs. number of reactor in series

反応率を媒介変数として、反応器の数と平均滞留時間  $\theta$  [h] の関係を Fig.5-14 に示した。多段化することによる時間短縮が明らかに現れている。例えば、反応転化率  $x=0.95$  の場合、1 段で達成しようとするとして 18 時間の反応時間(平均滞留時間)が必要となるが、3 段で達成する場合には各段 2 時間の反応時間で達成することができる。このように、反応速度論より速度論パラメーターを求めておくことで、実際に工業で本研究のようなバイオリアクターを利用する際に必要なリアクターの数、基質流量から、生成物量、反応に必要な時間を適確に把握することができる。

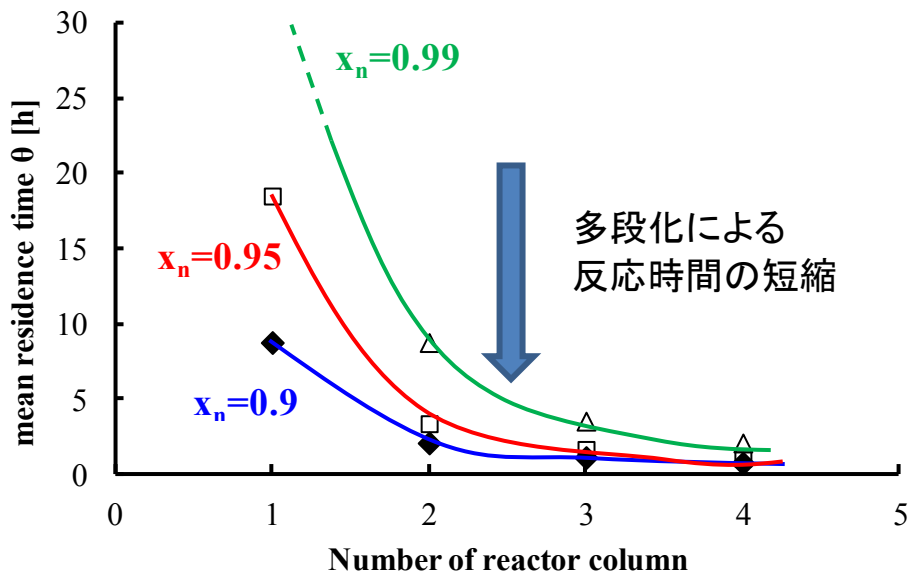


Fig.5-14 Mean residence time vs. number of reactor in series

## 5-9 本章の結論

本章では、超臨界二酸化炭素を用いて、4種の固定化 Lipase による脂質の改質反応の反応活性を評価し、酵素反応を速度論的に解析する基礎データを得た。*Rhizopus arrhizus* Lipase での温度・圧力条件の検討を行い、 $V_{\max}$ ・ $K_m$ 等の速度論的パラメーターを求めた。さらに、工業利用に向けたアプローチとして、反復利用の実証と、直列多段化による反応転化率のシミュレーションを行った。その結果、

- ① 超臨界二酸化炭素中で4種の固定化 Lipase (*R. arrhizus*, wheat germ, *C. cylindracea*, *C. rugosa*)の活性を比較したところ、*R. arrhizus* lipase が高活性であった(Fig.5-2, Table. 5-1).
- ② 4種の中で高活性であった *R. arrhizus* lipase の速度パラメーターをまとめた(Fig.5-4～Fig.5-6, Table.5-3).
- ③ 温度と圧力の影響を調査し、反応試行域では、温度・圧力ともに、高いほど高活性であった(Fig.5-7, Fig.5-8).
- ④ 5回の繰り返し反応では、*R. arrhizus* lipase は60%の活性を維持した。他のリパーゼ種は80%以上の活性の維持に成功した(Fig.5-9, Fig.5-10).
- ⑤ 直列多段の反応器モデルにおいて、一次反応の仮定により多段化による反応率の向上並びに反応時間の短縮の効果を数値解析した。

## 第6章 本研究の総括とオリジナリティー

### 6-1 本論文の要旨

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た。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した。

第1章では、本研究で注目する疎水性酵素反応の有用性と工業的利用の観点から、酵素固定化の重要性と超臨界二酸化炭素の有する機能の溶媒としての可能性について述べた。また、固定化 Lipase 既往の研究を概観し、本研究の目的を述べるとともに本論文の構成を記した。

第2章では、ポリプロピレン多孔質担体(Accurel)の蛍光顕微鏡による担体の表面疎水性の確認、電子顕微鏡による細孔構造の観察、水銀ポロシメーターによる細孔径分布測定、走査型プローブ顕微鏡(SPM)を用いた表面解析を行った。ポリプロピレン多孔質担体(Accurel)表面上で、蛍光プローブ(Nile red)の吸着を行い、蛍光顕微鏡による観察の結果、Accurel の粒子表面が高い疎水性であることを確認した。電子顕微鏡による観察結果によって、ポリプロピレン多孔質担体(Accurel)表面に細孔の存在(1-3 $\mu\text{m}$ )が明らかとなった。また、微細化された担体では、内部の微細孔が表面に露出し、表面細孔の数密度が増大した。水銀ポロシメーターによる Accurel の体積基準の細孔径分布を測定した。その結果、0.1 $\mu\text{m}$  オーダーと 1.0 $\mu\text{m}$  オーダーの2グループの二段階の微細孔群の存在が示唆された。

この構造を模式的に考えると、Accurel は開口部が広がっており、深奥部に進むにしたがってさらに微細に分岐する構造を考えることができる。このような特徴は、細孔空間により多くの酵素を吸着・固定化でき、疎水性の基質や生成物の拡散が容易となり、物質の拡散過程が律速となることを予防できる構造と期待できる。SPM 観察による Accurel の表面構造の解析を行った結果、Accurel の表面の凹凸と、細孔開口部の存在を確認した。

第3章では、担体に Lipase を物理的に吸着させ、次いでグルタルアルデヒドによる架橋固定化を行う一連の固定化操作に関する知見をまとめた。silica gel, Zeolite, Accurel の3種の素材を Lipase の固定化担体として試み、その吸着量を比較検討した結果、Accurel を使用した場合に最も高い吸着量を得た。Accurel をエタノールに浸漬する簡便な物理的修飾を施すことで、担体質量あたりの Lipase の吸着量が増大した。これは、エタノールが担体表面に吸着し、極性基(-OH 基)が固体表面に存在することによって担体の表面が親水化したことによる効果と考えられる。

Lipase の吸着特性を検討した結果、Accurel と Lipase の親和性が高いのは、*Candida rugosa* lipase と比較して *Rhizopus arrhizus* lipase の方であることが明らかとなった。初期固定化収率は、いずれの Lipase 種でも高い固定化収率(約 98%)を達成した。さらに、その初期固定化量は、300 分の有機溶媒中での攪拌後も効果的に(約 90%)維持されていた。Kyte, J. and Doolittle, R. によるアミノ酸の hydrophobic scale によって酵素の親和性を評価した。その結果、親水性の高い Lipase が前処理を施した Accurel 粒子に吸着・固定化されていることが明らかとなった。これは Accurel 粒子のエタノール前処理による効果と推定できる。

第4章では、生体適合性両親媒性分子としてシュガーエステルを用いて W/O microemulsion を調製し、自由溶液系での Lipase の反応活性を評価した。これと別に固定化 Lipase による脂質の改質反応の反応活性を評価し、酵素反応を速度論的に解析する基礎データを得た。

自由溶液系では、起源の異なる3種の Lipase(*R. arrhizus*, wheat germ, *C. rugosa*)での活性を比較し、反応速度定数  $k$  を求めた。また、Lineweaver-Burk plot によって *R. arrhizus* lipase の  $V_{max}$  と  $K_m$  を求めた。

固定化系の担体の形状因子(粒子径)と起源の異なる Lipase の固定化に注目し、速度論評価と固定化酵素の反復利用の実証を行った。固定化 *R. arrhizus* Lipase を用いた系では、*C. rugosa* Lipase と比較して、固定化後も高い活性を発現した。微細化された Accurel 粒子を用いた系では、高い反応生成物収率を得ることができた。有効係数を算出したところ、固定化 *C. rugosa* Lipase は W/O microemulsion 系のフリー酵素の活性に対し、60%以上の活性を維持する粒子径が求められた。繰り返し利用(*R. arrhizus* lipase)においても、遅れ時間はなく、固定化 Lipase の活性が安定しており、実用化への可能性が期待できる。



第5章では、超臨界二酸化炭素を用いて、4種の固定化Lipaseによる脂質の改質反応の反応活性を評価し、酵素反応を速度論的に解析する基礎データを得た。*R. arrhizus* Lipaseでの温度・圧力条件の検討を行った。温度と圧力の影響を実測したところ、温度・圧力ともに、高い条件ほど高活性であった。反復利用5回後において、*R. arrhizus* lipaseは60%の活性を維持した。他のリパーゼ種は初回目の80%以上の活性の維持に成功した。超臨界二酸化炭素中で4種の固定化Lipase (*R. arrhizas*, wheat germ, *C. cylindracea*, *C. rugosa*)の活性を比較したところ、*R. arrhizus* lipaseが最も高活性であった。4種の中で高活性であった*R. arrhizus* lipaseの反応速度論的パラメーターをまとめた。さらに、工業利用に向けたアプローチとして、反復利用の実証と、直列多段化による反応転化率のシミュレーションを行った。

第6章では、本論文の要旨を記し、オリジナリティーと学術的価値を総括するとともに、固定化Lipaseの高度化プロセスの構築に向けた今後の課題と展望を述べた。

## 6-2 本研究の総括

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 (*R. arrhizus*, wheat germ, *C. cylindracea*, *C. rugosa*)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。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。

W/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、拡散律速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。

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回の反復利用後において60%以上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、バイオリア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。

### 6-3 本研究のオリジナリティーと学術的価値

本論文は、多孔質担体に吸着・架橋化した固定化 Lipase を用いた加水分解反応における溶媒の機能性と高活性を発現する条件の情報の体系化を目的とし、W/O microemulsion を用いた有機溶媒反応系と超臨界二酸化炭素溶媒系にて、反応活性を反応速度論的解析に基づき考察した。本論文のオリジナリティーと学術的価値を以下に示した。

#### ① Accurel MP100 を担体として、固定化 Lipase の保持率・活性ともに高い固定化方法を確立した。

ポリプロピレンを基材とする担体として、Accurel MP100 を選択し、エチルアルコールで前処理し、Lipase を吸着させた後に、グルタルアルデヒドによって架橋固定化した。吸着量の 98% 以上の優れた固定化収率を達成した(Naya and Imai, Process Biochemistry 投稿中(受理番号: PRBI-D-15-00063))。簡便な手法を用いた固定化 Lipase の調製を構築したことに学術的価値がある。

#### ② 起源の異なる Lipase の固定化活性の情報を明らかにした。

固定化担体の形状因子（粒子径）の検討として、微細化された Accurel 粒子を用いた系では、固定化 Lipase の高い有効係数が実現できることを示し、拡散過程の制約なく固定化酵素反応を実行できる可能性を示した(Naya and Imai, Asia Pacific J. of Chem Eng. (2012))。

本研究では、*R. arrhizas*, wheat germ, *C. cylindracea*, *C. rugosa* を取り上げ、固定化量並びに活性を比較した。起源の異なる 4 種の Lipase の固定化に成功し、高活性を発現させることができた。(Naya and Imai, Procedia Eng. (2012)), (Naya and Imai, Process Biochemistry 投稿中(受理番号: PRBI-D-15-00063))

③ 固定化 Lipase の反復利用における活性の発現と高活性の維持を実証した.

W/O microemulsion 系では, 固定化 *R. arrhizus* Lipase の活性は 10 回の固定化酵素の反復利用において, 50%の活性を発現した. 超臨界二酸化炭素系では, 固定化 *R. arrhizus* 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することを初めて実証した. 他の 3 種の Lipase についても活性の安定な発現を実証した (Naya and Imai, Process Biochemistry 投稿中 (受理番号: PRBI-D-15-00063)).

④ 超臨界二酸化炭素中における反応活性の実証と速度論解析に基づくリアクター設計の指針.

超臨界二酸化炭素中を溶媒とし, 固定化 Lipase による加水分解の実証を行った. 超臨界二酸化炭素溶媒とする反応系で固定化 *R. arrhizus* Lipase の反応速度パラメーターを求めたことは本研究のオリジナルである (Naya and Imai, Process Biochemistry 投稿中 (受理番号: PRBI-D-15-00063)). また, 固定化 *R. arrhizus* Lipase の一次反応を仮定した速度定数より, 直列多段のバイオリアクターによる生産性の向上を示した.

#### 6-4 本研究の課題と今後の展望

本研究は, Lipase を生体触媒とする脂質の改質反応に対して, 疎水性高分子による多孔質粒子を担体とし, W/O microemulsion 並びに超臨界二酸化炭素を反応媒体として使用することにより, 残留毒性のない安全なバイオリアクタープロセスを, 食品・化粧品・医薬品分野に提案することを目指して実行されたものである. 本研究の成果を踏まえて, 固定化 Lipase による脂質の改質反応の高度化プロセスにおける今後の課題と期待される分野並びにその展望について述べる.

第一に, 本研究では脂質の改質反応を加水分解に限って展開している. Lipase を生体触媒とする疎水性基質の反応としては他にエステル交換・合成等の反応を挙げることができる. 加水分解以外の反応でも高度に活性を維持することが実証できれば, 工業的価値が拡大される.

第二に, 疎水性基質としてリン脂質に着目し, Phospholipase を生体触媒として本研究で確立した固定化 Lipase に限ることなく, Phospholipase にも拡張すれば, 生成

されるリゾリン脂質は食品・化粧品・医薬品分野における基幹成分であり，その発展が期待できる．Phospholipase (phospholipase C, phospholipase A<sub>2</sub> など)の固定化に関する既往の研究例は少なく，残留毒性の懸念のない生成プロセスが構築できれば，食品・化粧品・医薬品工業に寄与できる．

第三に，本研究のバイオリアクターのスケールアップが必要である．本研究でのLipase 固定化法は一度に大量の調製が容易であり，超臨界二酸化炭素を溶媒としたときの反応器も製作が容易である．反応器の容積を増大させたり，反応器の数を増大させる場合，反応の実証と活性保持率を求めることが必要である．本論文の第5章で示したように反応器を直列多段化させた場合の，反応転化率と所要時間のシミュレーションを実験によって実証するとともに，より大型の反応器を用いた生産を試みることは本論文の工業的寄与として重要である．これらの課題は，本研究の直近の課題として挙げられる．

また，中・長期的な課題を以下に列挙する．

疎水性担体を新たに開発・製造することで，固定化Lipase の長期に亘る安定な活性保持が期待できる．本研究では，物質の拡散過程の制約を回避できる粒子径，細孔構造の測定を求めた．疎水性の機能性成分（脂肪酸・リン脂質など）の生成に相応しい担体の種類，素材の選択，最適な空間設計に関する情報の体系化が望まれる．

固定化時においても高活性を発現できる酵素の起源の探索も課題として挙げられる．本研究中では，起源の異なる4種のLipase から固定化Lipase を調製し，活性を比較した．Lipase に関して，酵素の起源による反応活性の比較研究は極めて少ないのが現状である．超臨界二酸化炭素を溶媒とした反応では，Lipase の起源にまで踏み込んだ研究例は本研究以外にみられない．固定化Lipase の工業的利用の実現とその拡大に向けて，酵素の起源による固定化量と相応しい担体の相関，活性の長期発現に関する研究は学術的にも有意義である．

## 参考文献

- Ahn, K.W., Ye, S.H., Chun, W.H., Rah, H., Kim, S-G., *Microporous and Mesoporous Materials*. **142**, (2011), 37-44.
- Al-Duri, B., Y.P.Yong, *J. Mol. Catal. B : Enzym.*, **3**, (1997), 177-188.
- Blattner, C., Zoumpantioti, M., Kröner, J., Schmeer, G., Xenakis, A., Kunz, W., *Journal of Supercritical Fluids*, **36**, (2006), 182-193.
- Cao, L., U.T.Bornscheuer, R.D.Schmid, *J. Mol. Catal. B : Enzym.*, **6**, (1999), 279-285.
- Chi, Y.M., K. Nakamura, T. Yano, *Agric. Biol. Chem.*, **52** (6), (1988), 1541-1550.
- Dan L. Sackett and J. Wolff, *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*, **167**, (1987), 228-234
- Dizge, N., Aydiner, C., Imer, D.Y, Bayramoglu, M., Tanriseven, A., Keskinler, B., *Bioresource Technology*. **100**, (2009), 1983-1991.
- Fasce, L.A., V. Costamagna, V. Pettarin, M. Strumia, P.M. Frontini, *eXPRESS Polymer Letters*, **2**, No.11, (2008), 779-790.
- Gitlesen, T., M.Bauer, P.Adlercreutz, *Biochim. et Biophys. Acta.*, **1345**, (1997), 188-196.
- Guang Yang, Jianping Wu, Gang Xu, Lirong Yang, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **78**, (2010), 351-356
- Huang, D., Han, S., Han, Z., Lin Y., *Biochemical Engineering Journal*, **63**, (2012), 10-14.
- H. Tajalli, A. Ghanadzadeh Gilani, M.S. Zakerhamidi, P. Tajalli, *Dyes and Pigments*, **78**, (2008), 15-24
- Imai, M., K.Nagayama, K.Yamazaki, Chapter 2 “*Food Enzyme: Application of New Technologies*” Editors M.D.Busto and N.Ortega Published by Transworld Research Network, (2008), 21-47, (ISBN 978-81-7895-358-8).
- Jackson, M.A., Mbaraka, I.K., Shanks, B.H., *Applied Catalysis A: General*, **310**, (2006), 48-53.
- Kamat, S., Eric J. Beckman, Alan J. Russell, *Enzyme Microb. Technol.*, **14**, (1992), 265-271.
- Khare, S.K. and Nakajima, M., *Food Chemistry*, **68**, (2000), 153-157.
- Kiatimkul, P-P., Sutterlin, W.R., Suppes, G.J., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.*, **41**, (2006), 55-60.

- Koller, G. et al. *Biocat and Biotransform*, **19**, (2001), 37-49
- Kyte, J. and Doolittle, R., *J. Mol. Biol.* **157**, (1982), 105-132
- Langmuir, I., *J. Amer. Chem. Soc.*, **40**, (1918), 1361
- Laudani, C.G., Habulin, M., Knez, Z., Porta, G.D., Reverchon, E., *Journal of Supercritical Fluids*, **41**, (2007), 92-101.
- Knez, Z., Kavcic, S., Gubicza, L., Bélafi-Bakó, K., Németh, G., Primožic, M., Habulin, M., *Journal of Supercritical Fluids*, **66**, (2012), 192-197.
- Lozano, P., Villora, G., Gómez, D., Gayo, A.B., Sánchez-Conesa, J.A., Rubio, M., & Iborra, J.L., *Journal of Supercritical Fluids*, **29**, (2004), 121-128.
- Laura Foresti, M., M. Luján Ferreira, *Applied Surface Science*, **238**, (2004), 86-90
- Li, S-F., Wu, W-T., *Biochemical Engineering Journal*, **45**, (2009), 48-53.
- Li, S-F., Fan, Y-H., Hu, R-F., Wu, W-T., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **72**, (2011), 40-45.
- Lozano, P., Diego, T.D., Sauer, T., Vaultier, M., Gmouh, S., Iborra, J.L., *Journal of Supercritical Fluids*, **40**, (2007), 93-100.
- Lowry, R.R, I.J.Tinsley, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **53**, (1976), 470-472.
- Meng-Chun, Chi., Rui-Cin Lyu, Long-Liu Lin, Hsien-Bin Huang, *Biochemical Engineering Journal*, **39**, (2008), 376–382
- Mohammed, E., Ignacio. N-Rodrigueza, Manuel D., Jose. Luis H-H-de- Cisnerosa, *Applied Surface Science*, **257**, (2011), 10926-10935
- Montero, S., A.Blanco, M.D.Virto, L.C.Landeta, I.Agud, R.Solozabal, J.M.Lascaray, M. de Renobales, M.J.Llama, J.L.Serra, *Enzyme and Microbial Technol.*, **15**, (1993), 239-247.
- Nakamura K. Biochemical reactions in supercritical fluids. *Trends in Biotechnology*; **8**, (1990), 288–292.
- Nagayama, K., K.Karai, T.Do, M.Imai, *Biochem. Eng. J.*, **2**, (1998), 121-126
- Nagayama K., S.Matsu-ura, T.Do, M.Imai, *J. Mol. Catal. B: Enzyme*, **4**, (1998), 25-32
- Nagayama, K., N.Yamasaki, M.Imai, *Biochem. Eng. J.*, **12**, (2002), 231-236
- Nagayama, K., M.Imai, *Mol. Catal.B: Enzyme*, **34**, (2005), 44-50
- Nagayama, K., R.Katakura, T.Hata, K.Naoe, M.Imai, *Biochem. Eng. J.*, **38**, (2008), 274-276
- Nagesha, G.K., Manohar, B., Udaya Sankar, K., *Journal of Supercritical Fluids*, **32**,

- (2004), 137-145.
- Naoe, K., T.Ohsa, M.Kawagoe, M.Imai, *Biochem. Eng. J.*, **9**, (2001), 67-72.
- Nini Ma., *MSc. Thesis*, Nihon University, (2008).
- Noureddini, H., Gao, X., Philkana, R.S., *Bioresource Technology*, **96**, (2005), 769-777.
- Novak, Z., Habulin, M., Krmelj, V., Knez, Z., *Journal of Supercritical Fluids*, **27**, (2003),169-178.
- Oromiehie, A.R. H. Ebadi-Dehaghani, K. Ansari, K. Karimi, Z. Rahmani, S. Mirbagheri, *J. of Materials Science and Chemical Engineering*, **2**, (2014), 43-51.
- Ozmen, E.Y., Yilmaz, M., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **69**, (2009), 58-62.
- Palomo, J.M., G.F-Lorente, C.Mateo, C.Ortiz, R.F-Lafuente, J.M. Guisan, *Enzyme and Microbial Technol.*, **31**, (2002), 775-783.
- Pawel Grochulski, Yunge Li, Joseph D. Schrag, and Mirosław Cygler, *Protein Science*, **3**, (1994), 82-91
- Persson, M., I.Mladenoska, E.Wehtje, P.Adlercreutz, *Enzyme and Microbial Technol.*, **31**, (2002), 833-841.
- Rodrigues, R.C. and Záchia Ayub, M.A., *Process Biochemistry*, **46**, (2011), 682-688.
- Romero, M.D., Calvo, L., Alba, C., Habulin, M., Primožic, M., Knez, Z., *Journal of Supercritical Fluids*, **33**, (2005), 77-84.
- Sabbani, S., E.Hedenstrom, O.Nordin, *J. Mol. Catal. B : Enzym.*, **42**, (2006), 1-9.
- Salis, A., I.Svensson, M.Monduzzi, V.Solinas, P.Adlercreutz, *Biochim. et Biophys. Acta.*, **1646**, (2003),145-151.
- Salis, A., E.Sanjus, V.Solinas, M.Monduzzi, *J. Mol. Catal. B : Enzym.*, **24-25**, (2003), 75-82.
- Ting, W-J., Huang, C-M., Giridhar, N., Wu, W-T., *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineering*, **39**, (2008), 203-210.
- Uehara, A., M.Imai, I.Suzuki, *Colloids and Surfaces A : Physicochem. Eng. Aspects.*, **324**, (2008), 79-85.
- Uehara, A., *MSc. Thesis*, Nihon University, (2009)
- Vermue, M.H., J. Tramper, J.P.J.de Jomg, W.H.M. Oostrom, *Enzyme Microb. Technol.*, **14**, (1992), 649-655.
- Virto, M.D., I.Agud, S.Montero, A.Blanco, R.Solozabal, J.M.Lascaray, M.J.Llama, J.L.Serra, L.C.Landeta, M. de Renobales, *Enzyme and Microbial Technol.*, **16**,

(1994), 61-65.

Wang, W., Li, T., Ning, Z., Wang, Y., Yang, B., Yang, X., *Enzyme and Microbial Technology*, **49**, (2011), 192-196.

Watanabe, Y., Shimada, Y., Sugihara, A., Tominaga, Y., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **17**, (2002), 151-155.

Xie, W., Ma, N., *Biomass and Bioenergy*, **34**, (2010), 890-896.

Xie, W., Wang, J., *Biomass and Bioenergy*, **36**, (2012), 373-380.

Zhou, G., Chen, Y., Yang, S., *Microporous and Mesoporous Materials*, **119**, (2009), 223-229.

岩井美枝子著，リパーゼ—その基礎と応用，幸書房，1991

受田浩之，化学と生物，Vol.35, No.7, 1997

液化炭酸ガス取扱テキスト，2006

川鉄テクノリサーチ株式会社著，超臨界流体利用環境負荷低減技術研究開発，2002

北口博司，有機溶媒中の酵素反応，有機合成化学協会誌 第53巻第5号，1995

真田雄三，鈴木基之，藤元薫，新版 活性炭 基礎と応用，講談社サイエンティフィック，1992

白石文秀著，固定化酵素反応のコンピュータ解析法，コロナ社，1997

田畑勝好，戸谷誠之，村地孝，固定化酵素リアクター，蛋白質 核酸 酵素，Vol.31, No.3, 1986

千畑一郎編，固定化酵素，講談社サイエンティフィック，1975

千畑一郎編，固定化生体触媒，講談社サイエンティフィック，1986

東レリサーチセンター調査研究部門，無機多孔質材料：最新の創製技術とその応用，2006

農業・食品産業技術総合研究機構，リパーゼの機能と食品への応用，「食糧-その科学と技術」No.45，2007

荻野博康，有機溶媒耐性酵素，生化学 第81巻第12号，2009, 1109-1118



本論文に関する研究業績

原著論文（査読あり）（1件）

- 1) Naya, M. and Imai, M. (2012) Regulation of the hydrolysis reactivity of immobilized *Candida rugosa* lipase with the aid of a hydrophobic porous carrier, **Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering**, Volume 7, Issue S1, S157-S165.

原著論文（投稿中）（1件）

- 1) Naya, M. and Imai, M. (2015) High-performance lipid hydrolysis by immobilized lipases from four sources (*Candida cylindracea*, *Candida rugosa*, *Rhizopus arrhizus*, and wheat germ) in a hydrophobic porous carrier mediated by supercritical carbon dioxide, **Process Biochemistry**, 受理番号：PRBI-D-15-00063

著書（1件）

- 1) Naya, M. and Imai, M. (2013) Recent Advances on Soybean Isoflavone Extraction and Enzymatic Modification of Soybean Oil, **Soybean – Bio-Active Compounds**, InTech Pub., 429-452, ISBN: 978-95351-0977-8.

その他の刊行物（3件）

- 1) 納谷昌和 (2013) 6th International Congress on Biocatalysis に参加して, **化学工学**, Volume 77, No.3, 221.
- 2) Naya, M. and Imai, M. (2012) Impact of physicochemical character of hydrophobic porous carrier on reactivity of immobilized lipase progressing toward higher reaction rate and high yield in repeated use, **Procedia Engineering**, Elsevier Pub., Volume 42, 1004-1015.
- 3) Naya, M. and Imai, M. (2010) Enhanced reactivity of immobilized lipase by the aid of desired hydrophobic porous carrier, **Proceedings of Asia Pacific Confederation of Chemical Engineering 2010 (Electric edition)**.

国際会議発表（9件）

- 1) Masakazu Naya, Masanao Imai, Enhanced reactivity of immobilized lipase by the aid of desired hydrophobic porous carrier, *13<sup>th</sup> Asia Pacific Confederation of*

*Chemical Engineering Congress (APCCChE)*, #10609, Taipei (Taiwan), (Oct. 2010)

Oral

- 2) Masakazu Naya, Masanao Imai, Hydrophobic effect of porous carrier on adsorption and immobilization of lipase (*Candida rugosa* and *Rhizopus arrhizus*) to improve reactivity in lipid hydrolysis processing, *The 2<sup>nd</sup> International Symposium on Process Chemistry (ISPC 2011)*, # 2P-43, Kyoto (Japan), (Aug. 2011) Poster
- 3) Masakazu Naya, Masanao Imai, Reactivity characterization of immobilized lipase (*Candida rugosa* and *Rhizopus arrhizus*) in hydrophobic porous carrier, *8<sup>th</sup> European Congress of Chemical Engineering (ECCE 2011) & 1<sup>st</sup> European Congress of Applied Biotechnology (ECAB 2011)*, #8329, Berlin (Germany), (Sep. 2011) Oral
- 4) Masakazu Naya, Masanao Imai, Impact of physicochemical character of hydrophobic porous carrier on reactivity of immobilized lipase progressing toward higher reaction rate and high yield in repeated use, *20<sup>th</sup> International Congress of Chemical and Process Engineering (CHISA 2012)*, #1440, Prague (Czech Republic), (Aug. 2012) Poster
- 5) Masakazu Naya, Masanao Imai, High performance and repeated use of immobilized lipase for lipid hydrolysis involved with hydrophobicity of reaction media, *6<sup>th</sup> International Congress on Biocatalysis (biocat 2012)*, # L39, Hamburg (Germany), (Sep. 2012) Oral
- 6) Masakazu Naya, Masanao Imai, Development of Low Energy Lipid Modification Processes by Immobilized Lipase in Supercritical Carbon Dioxide, *The 9<sup>th</sup> Asia Pacific Conference on Sustainable Energy & Environmental Technologies (APCSEET 2013)*, # A127, Narita (Japan), (July. 2013) Oral
- 7) Masakazu Naya, Masanao Imai, Advantageous of supercritical carbon dioxide for lipid modification by immobilized lipase, *Engineering Conferences International (Enzyme Engineering XXII: Emerging Topics in Enzyme Engineering)*, Toyama (Japan), (Sep. 2013) Poster
- 8) Masakazu Naya, Masanao Imai, Stable reactivity of immobilized lipase in repeated use for lipid hydrolysis in supercritical carbon dioxide, *21<sup>th</sup> International Congress of Chemical and Process Engineering (CHISA 2014)*, Prague (Czech Republic), (Aug. 2014) Oral

- 9) Masakazu Naya, Masanao Imai, Reproducible high reactivity in repeated use of immobilized four kind lipases for lipid hydrolysis in substrate rich supercritical carbon dioxide, 7<sup>th</sup> *International Congress on Biocatalysis (biocat 2014)*, Hamburg (Germany), (Sep. 2014) Poster

日本国内学会発表 (11 件)

- 1) 納谷昌和, 陶慧, 今井正直, 鈴木功, 「疎水性担体に固定化したリパーゼによる脂質の加水分解における反応活性と粒子径の相関」『第 12 回 化学工学会学生発表会 東京大会』# B26, 江東区 (東京都), (2010 年 3 月 口頭発表)
- 2) 納谷昌和, 陶慧, 今井正直, 「疎水性担体に固定化されたリパーゼの担時条件と反応活性」『日本食品工学会 第 11 回年次大会』#2C05, 港区 (東京都), (2010 年 8 月 口頭発表)
- 3) 納谷昌和, 陶慧, 今井正直, 「リパーゼを固定化した疎水性担体の粒子特性と反応活性」『化学工学会 第 42 回 秋季大会』# O305, 京都市 (京都府), (2010 年 9 月 口頭発表)
- 4) 納谷昌和, 陶慧, 今井正直, 「高分子多孔質担体に固定化した反応特異性の異なるリパーゼの反応活性」『化学工学会 第 76 年会』# C305, 小金井市 (東京都), (2011 年 3 月 口頭発表)
- 5) 納谷昌和, 陶慧, 今井正直, 「吸着架橋法による固定化リパーゼの調製における多孔質担体の表面疎水性の寄与」『分離技術会年会 2011』# S3-P11, 川崎市 (神奈川県), (2011 年 6 月 ポスター発表)
- 6) 納谷昌和, 陶慧, 今井正直, 「Accurel 担体に固定化した起源の異なる Lipase による脂質の加水分解反応」『日本食品工学会第 12 回年次大会』#6-2A-6, 京都市 (京都府), (2011 年 8 月 口頭発表)
- 7) 納谷昌和, 陶慧, 今井正直, 「起源の異なるリパーゼの多孔質担体への固定化と表面解析から評価した反応特性」『化学工学会 第 43 回 秋季大会』# O219, 名古屋市 (愛知県), (2011 年 9 月 口頭発表)
- 8) 納谷昌和, 陶慧, 今井正直, 「固定化リパーゼによる脂質加水分解における酵素の高活性維持に対する溶媒の効果」『第 43 回 中部化学関係学協会支部連合秋季大会』#2J13, 名古屋 (愛知県), (2012 年 11 月 口頭発表)
- 9) 納谷昌和, 陶慧, 今井正直, 「超臨界二酸化炭素を溶媒とした固定化リパーゼによる脂質加水分解における活性評価」『2012 年次 (第 23 回) 新機能化工

学研究会』新宿区（東京都），（2013年1月 口頭発表）

- 10) 納谷昌和，陶慧，今井正直，「超臨界二酸化炭素と疎水性多孔質担体を用いたリパーゼによる脂質改質の高収率反応条件」『化学工学会 第45回 秋季大会』#Q105，岡山市（岡山県），（2013年9月 口頭発表）
- 11) 納谷昌和，陶慧，今井正直，「起源の異なる固定化リパーゼの超臨界二酸化炭素を溶媒とした脂質改質反応の活性評価」『化学工学会 第79回 年会』#D124，岐阜市（岐阜県），（2014年3月 口頭発表）

#### 研究奨励制度（採用）実績

- 1) 日本学生支援機構奨学金『特に優れた業績による返還免除』において，博士前期課程2年間（2010-2011年度）の奨学金の全額返還免除採択
- 2) 平成24年度 日本大学生物資源科学部 特別研究生（博士後期課程1年）
- 3) 平成25年度 日本大学生物資源科学部 特別研究生（博士後期課程1年）