

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：54601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06550

研究課題名(和文) 熱応答性ピッカリングエマルジョンを酵素キャリアーとするメンブレンリアクターの構築

研究課題名(英文) Development of membrane reactor system using thermoresponsive Pickering emulsions as enzyme carriers

研究代表者

直江 一光 (Naoe, Kazumitsu)

奈良工業高等専門学校・物質化学工学科・教授

研究者番号：00259912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、固体粒子により形成されるピッカリングエマルジョン系に熱応答性を導入し、酵素キャリアーとすることで反応・分離に適したメンブレンリアクターシステムを構築することを目的とした。ナノ粒子またはマイクロ粒子によって形成したエマルジョン系に熱応答性生体ポリマーを導入してその安定性の制御を実現するとともに、本エマルジョン系における酵素反応条件について明らかにした。また、ろ過による本エマルジョンの濃縮・回収に成功した。

研究成果の概要(英文)：The novel membrane reactor system was developed using thermoresponsive Pickering emulsions as enzyme carriers. The thermoresponsive Pickering emulsion systems were successfully prepared by introducing thermoresponsive biopolymers to the system. The enzymatic reaction conditions in the system were obtained using a model enzyme. The concentration and recovery of the emulsions were successfully achieved by filtration process.

研究分野：工学

キーワード：ピッカリングエマルジョン 熱応答性 ナノ粒子

## 1. 研究開始当初の背景

ピッカリング(Pickering)エマルションは、固体粒子によって安定化されるエマルションであり、近年、合成界面活性剤使用の低減を目的に、食品や化粧品、医薬品分野においてその利用が期待されている。

現在、高い特異性やそれに伴う後工程の省略化などの利点から化学工業や食品工業分野において様々な生体触媒(酵素)の利用が行われている。特に食品工業分野では食用油脂の改質において加水分解酵素リパーゼの利用が行われている。リパーゼを用いる反応では有機溶媒/水の油水二相系で反応が行われることが多い。この場合、実際の反応は油水界面で起こる。また、微生物由来のリパーゼは活性部位の構造的な特徴から油水界面による構造変化が酵素活性発現にとって重要であることが知られている。そのため、系に界面活性剤を添加、或いは強い攪拌を施すことにより油水界面積を増大させるエマルション系が用いられる。しかし、界面活性剤の添加は反応終了後の分離精製工程を困難にすることが多い。

一方、環境(刺激)に対し応答する環境応答型ポリマーは、ドラッグデリバリーシステム(DDS)やセンサーなど様々な分野における応用が期待されている。中でも温度に応答するポリマーは、その可逆的な応答性から注目され、環境温度によって相分離または膨潤挙動を示す。

そこで、ピッカリングエマルションに熱応答性ポリマーを導入して熱応答性を有するピッカリングエマルションを調製すれば、温度調節によって酵素反応時には「柔らかい」エマルションとしてリパーゼに柔軟な界面を提供し、送液等のハンドリング時には「硬い」エマルションとすることが可能となる。また、反応生成物は有機溶媒相に分配するため、最終的に「硬い」エマルションをろ過することによって反応生成物を容易に回収することができる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、固体粒子によって安定化されるピッカリングエマルション系に熱応答性を導入することによって反応場であるエマルション界面の特性を温度制御し、反応・分離に適したメンブレンリアクターシステムの構築を目指すものである。

## 3. 研究の方法

### (1) 平成 27 年度

・ナノ粒子ピッカリングエマルション系の調製条件の探索を行った。モデルナノ粒子としてメルカプトカルボン酸被膜金ナノ粒子を調製し、本ナノ粒子条件(ナノ粒子濃度など)や乳化条件(塩濃度、乳化方法など)がピッカリングエマルションの形成に及ぼす影響について検討した。

### (2) 平成 28 年度

・前年度に得られたナノ粒子ピッカリングエマルション系に生体ポリマーを導入し、安定性を高めたエマルション系の構築を行った。  
・熱により物性が変化する生体ポリマーの導入により、熱に対して応答性を示すピッカリングエマルション系の構築を行った。  
・本エマルション系においてリパーゼ反応を行い、本系に適した反応条件(酵素封入方法、基質濃度など)について検討した。

### (3) 平成 29 年度

・攪拌槽を用いたピッカリングエマルションの調製条件の探索を行った。  
・マイクロ粒子ピッカリングエマルション系における酵素反応条件の探索を行った。  
・マイクロ粒子ピッカリングエマルション滴のろ過条件の探索を行った。

## 4. 研究成果

平成 27 年度：

### (1) ナノ粒子ピッカリングエマルション系の調製条件の探索

モデルナノ粒子としてメルカプトカルボン酸被膜金ナノ粒子の調製を行った。相関移動法により金ナノ粒子を調製し、炭素鎖 11 のメルカプトカルボン酸でコーティングすることによって水溶性メルカプトカルボン酸被膜金ナノ粒子を調製した(図 1)。透過型電子顕微鏡で観察したところ、金属コアの平均径は 2.1 nm であった(図 2)。

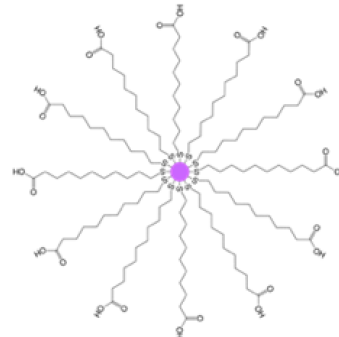


図 1. メルカプトカルボン酸によって修飾された金ナノ粒子

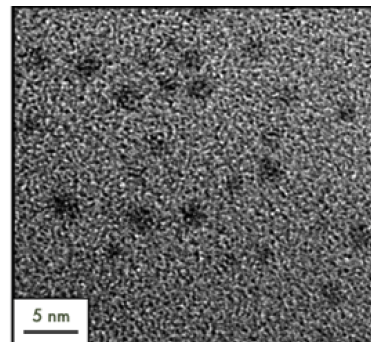


図 2. 調製された金ナノ粒子の透過型電子顕微鏡写真

得られたメルカプトカルボン酸被膜金ナノ粒子水溶液を用い、乳化条件の検討を行った。塩を添加した金ナノ粒子水溶液に toluene 溶液を同体積で添加し、超音波照射を行ったところ、有機相が白濁し、本粒子を用いたエマルジョンの形成が示された。そこで、水溶性蛍光試薬存在下において乳化を行い、得られた油相を蛍光顕微鏡観察したところ、発光が見られ、Water-in-oil (W/O)エマルジョンが形成されていることを確認した(図3)。また、サイズは1マイクロメートル弱であった。このように本モデルナノ粒子を用いてピッカリングエマルジョンの調製が行えたことは本エマルジョン系を酵素キャリアーかつ反応場として利用する本研究にとって重要な成果である。

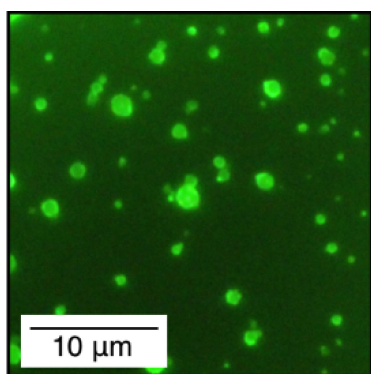


図3. 調製したエマルジョンの蛍光顕微鏡写真

続いて、添加塩の影響について検討し、安定なエマルジョンを与える添加塩条件(塩種及び濃度)を見出した。また、エマルジョン相の顕微鏡観察によりエマルジョンのサイズ分布を求め、最適添加塩条件においてより単分散なエマルジョンが得られていることが明らかとなった。さらに得られたエマルジョン系への生体ポリマーの導入についても検討し、最適な生体ポリマー導入方法を見出した。

平成 28 年度 :

(1) 生体ポリマー導入によるピッカリングエマルジョンの安定化

前年度に得られたサブミクロンオーダーのナノ粒子エマルジョン系に生体ポリマー(gelatin)を導入し、そのエマルジョン相の濁度変化を調べたところ、gelatinの導入によりエマルジョン相の濁度低下が抑制され、安定性を高めたエマルジョン系の調製に成功した(図4)。また、vortex mixerを用いて攪拌を行うことによって100 μm以上のサイズが大きいエマルジョンの調製が可能であり、さらにこのような大きいエマルジョン系では生体ポリマーの導入によってW/OエマルジョンからO/Wエマルジョンに転相することが明らかになった。また、熱により物性が大きく変化する生体ポリマー(gelatin)を導入した場合、20 度では2時間の静置後も平均

径はほぼ維持されるが、その後、40 度で静置するとエマルジョンは崩壊した。これはgelatin導入系では熱によってその安定性の制御が可能であることを示している。同様に油脂マイクロ粒子(平均径4.7 μm)を用いたエマルジョン系においても生体ポリマー導入により同様の結果が得られることを明らかにした。このように生体ポリマーの導入によってピッカリングエマルジョン系の安定化を達成するとともに、さらに熱によってその安定性の制御が行えたことは、熱応答性を有する酵素キャリアーを目指す本研究にとって重要な成果である。

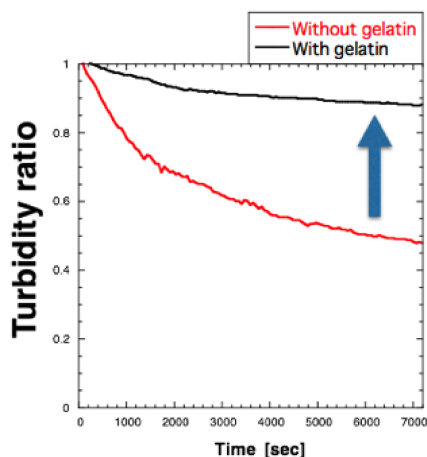


図4. 生体ポリマー導入によるエマルジョン相濁度への影響

(2) ナノ粒子ピッカリングエマルジョン系における酵素反応条件の探索

得られたナノ粒子ピッカリングエマルジョン系においてモデル酵素反応(加水分解酵素リパーゼによる油脂の加水分解)を行い、酵素活性が発現することを示した。さらに基質濃度の影響について検討し、速度論的解析を行うことにより本系における速度パラメーターを算出した。これらは本系における反応メカニズムの解析及び本系を工学的に利用する上で重要なデータとなる。

平成 29 年度 :

(1) 攪拌槽を用いたピッカリングエマルジョンの調製条件の探索

ラージスケールでのシステム構築を目指し、攪拌槽を用いたピッカリングエマルジョンの調製条件について実験的に検討した。内径10 [cm]の邪魔板4枚付きガラス製攪拌槽を使用し、6枚羽根タービン型攪拌翼(直径5 [cm])により乳化を行った。固体粒子として油脂マイクロ粒子(平均径4.7 μm)を用い、エマルジョン形成に必要な攪拌時間を明らかにするとともに、エマルジョン径が攪拌速度に依存することを示した(図5)。また、それらは生体ポリマーの存在によって影響を受けないことがわかった。回転トルクメーターにより攪拌トルクを測定し、攪拌によるエネルギー消散速度を算出したところ、エネルギー

一消散速度は攪拌速度に依存し、粒子存在による影響は見られなかった。また、エマルション径の攪拌速度依存性はホールドアップによって増加し、従来の界面活性剤エマルション系とは真逆の挙動を示した。これらの結果は本系に特有のものであり、本系の工学的利用にとって有益な知見である。

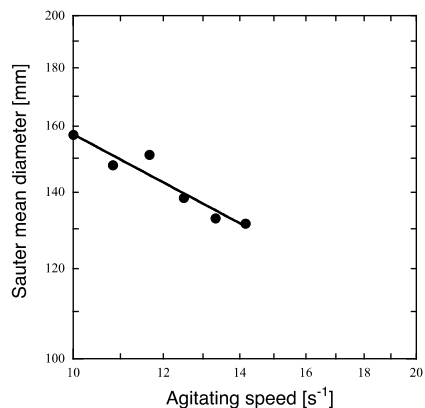


図 5. 油脂マイクロ粒子ピッカリングエマルション径と攪拌速度との関係

## (2) マイクロ粒子ピッカリングエマルション系における酵素反応条件の探索

上記油脂マイクロ粒子によって調製されたピッカリングエマルション系においてモデル酵素反応（加水分解酵素リパーゼによる油脂の加水分解）を行い、本系における酵素反応条件について検討した。油水二相系に比べ本系が高い酵素活性を発現することを示すとともに、活性発現にとって最適な操作条件を明らかにした。

## (3) マイクロ粒子ピッカリングエマルション滴のろ過条件の探索

マイクロ粒子ピッカリングエマルション滴のろ過条件について実験的に検討した。生体ポリマーを導入したピッカリングエマルション相をガラスマイクロファイバー膜によって減圧ろ過を行うことにより、水相分率 80%まで濃縮・回収することに成功した。また、回収エマルション滴は回収前に比べてサイズ分布に大きな変化は見られず(図 6)、有機相への再分散が可能であり、本エマルション系のリサイクル利用が可能であることを示した。

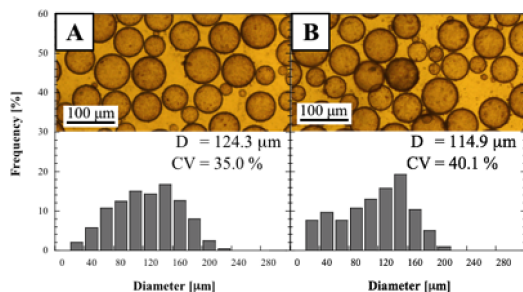


図 6. ピッカリングエマルションに対するろ過操作の影響。(A)ろ過前、(B)ろ過後

このように本研究では、熱応答性を有するピッカリングエマルションを調製し、それらを酵素キャリアーとして利用する反応・分離に適した新規メンブレンリアクターシステムの構築の基礎となる重要な知見を得た。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 7 件)

大西悟, 岡野浩明, 松田信之, 直江一光, 今井正直, 攪拌槽を用いたステアリン酸マグネシウム Pickering エマルションの調製とその安定化, 化学工学会第 83 回年会, PC217, 2018 年 3 月 14 日講演, 「関西大学(大阪府吹田市)」

大西悟, 直江一光, 今井正直, 生体高分子導入によるエマルションの安定性向上, 第 49 回化学工学会秋季大会, PA220, 2017 年 9 月 21 日講演, 「名古屋大学(愛知県名古屋市)」

Onishi, S., Naoe, K., and Imai, M., Preparation of thermoresponsive emulsions by biopolymer addition, 21th European Conference on Thermophysical Properties, EA-P7, 2017 年 9 月 4, 5 日講演, (TU Graz (Graz, Austria))

大西悟, 直江一光, 今井正直, 生体高分子添加による金ナノ粒子 Pickering エマルションの安定化, 第 26 回日本 MRS 年次大会, E1-P21-012, 2016 年 12 月 21 日講演, 「横浜情報文化センター(神奈川県横浜市)」

大西悟, 直江一光, 今井正直, 生体高分子添加によるナノ粒子 Pickering エマルションの安定化, 第 48 回化学工学会秋季大会, LP245, 2016 年 9 月 7 日講演, 徳島大学(徳島県徳島市)

Onishi, S., Naoe, K., and Imai, M., Preparation of thermoresponsive Pickering emulsions formulated with gold nanoparticles by biopolymer addition, 22nd International Congress of Chemical and Process Engineering (CHISA), P5.91, 2016 年 8 月 30 日講演, (Clarion Congress Hotel (Prague, Czech Republic))

大西悟, 直江一光, 熱応答性金ナノ粒子 Pickering エマルションの調製, 第 18 回化学工学会学生発表会(福岡大会), O27, 2016 年 3 月 5 日講演, 「福岡大学(福岡県福岡市)」

〔その他〕

ホームページ等

<http://chemhp.chem.nara-k.ac.jp>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

直江 一光 (NAOE KAZUMITSU)  
奈良工業高等専門学校・物質化学工学科・  
教授  
研究者番号：00259912

(2) 研究分担者

今井 正直 (IMAI MASANAO)  
日本大学・生物資源科学部・教授  
研究者番号：80193655

石神 徹 (ISHIGAMI TORU)  
広島大学・工学部・准教授  
研究者番号：70595850

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし