

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24656465

研究課題名(和文) エマルションゲル化法を用いた新規な固定化酵素多孔質ゲルの開発と応用

研究課題名(英文) Development of polymeric macroporous hydrogels for the immobilization of enzymes using an emulsion-gelation method

研究代表者

徳山 英昭 (Tokuyama, Hideaki)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10363029

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：高性能酵素反応プロセスの構築を目指して、新規な固定化酵素多孔質ゲルを開発した。エマルションの分散滴を多孔質ゲルの孔の鑄型とするエマルションゲル化法を用いて、独立した孔の中に酵素を包括固定した固定化酵素多孔質ゲルを作製した。モデル酵素のリパーゼを固定化した多孔質ハイドロゲルおよび多孔質オルガノゲルは、水媒体中で行う加水分解および油性媒体中で行うエステル交換の酵素反応において高活性を示した。

研究成果の概要(英文)：Novel polymeric macroporous hydrogels were developed to entrap and immobilize enzymes for improved enzyme reaction process. The emulsion-gelation method using emulsions was used to simultaneously synthesize the gels and entrap enzymes in the randomly distributed, non-interconnected, sphere-like macropores. The lipase, immobilized within the macroporous hydrogel and organogel, successfully catalyzed the hydrolysis in aqueous media and the transesterification in organic media, respectively.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・化工物性・移動操作・単位操作

キーワード：反応・分離工学 化学工学 高分子合成 固定化酵素 ゲル エマルション

## 1. 研究開始当初の背景

酵素を不溶性の粒子(担体)に固定化した固定化酵素は、酵素と生成物の容易な分離、酵素の復利用、連続的な物質生産、などの特長を反応プロセスに供する。本研究では合成高分子ゲルを用いた包括法に着目した。この方法は高分子網目によって酵素を物理的に囲い込むものであるが、酵素の漏出を防ぐために網目を密にすると酵素活性が低下する。固定化酵素研究は、1970年代ごろに国内外において活発に行われており、実用化に至っているものも多くあるが、包括法による固定化の方法論はほとんど進展がないのが現状である。本研究では、固定化手法のブレークスルーとそれによってもたらされる高性能酵素反応プロセスの実現を目指して、我々が開発したエマルションゲル化法により作製されるユニークな構造の多孔質ゲル、具体的には $\mu\text{m}$ オーダーの独立した孔を持ったゲルを酵素の固定化担体に用いる着想に至った。多孔質ゲル内で酵素は、フリー酵素とほぼ同様の環境を供されてネイティブな状態であるため、高活性の発現が期待できる(図1)。さらに、多孔質ゲルには、基質と生成物の極めて良好な拡散透過性を有する利点がある。

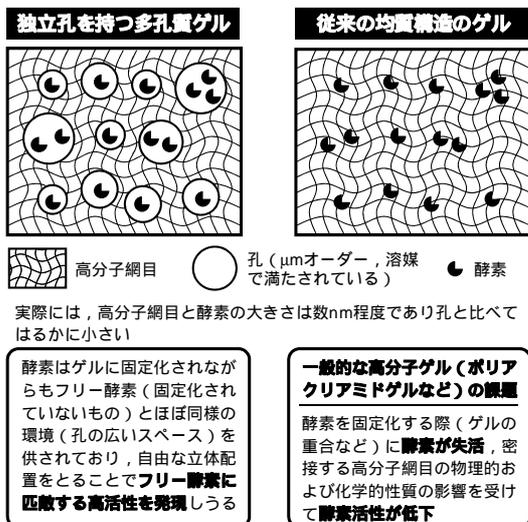


図1 酵素を固定化した多孔質ゲルの概念図と特長

## 2. 研究の目的

本研究では、これまでに類を見ない新規な固定化酵素ゲルを開発する、具体的には、我々が開発したエマルションゲル化法により作製される独立した孔(例えば数 $\mu\text{m}$ の孔径)を持つ多孔質高分子ゲルを担体に用い、孔の中に酵素を包括固定した固定化酵素多孔質ゲルを開発することを目的とする。このゲルは、フリー酵素に匹敵する(従来の固定化酵素均質(無孔)ゲルを凌駕する)高活性の発現が期待でき、水媒体中で行う加水分解や油性媒体中で行うエステル交換の酵素反

応を例に検証した。これらの酵素反応は、酵素 lipase を用いて行った。水で膨潤した多孔質ハイドロゲルと油性媒体で膨潤した多孔質オルガノゲルをそれぞれ作製した。それらの作製には oil-in-water (O/W) エマルションゲル化法(これまでに実績あり)および water-in-oil (W/O) エマルションゲル化法(本研究で新規に確立)を適用した。具体的には、O/W エマルションゲル化法では、モノマーを含む水相に不活性な微小油滴を分散させた O/W エマルションの水相を重合反応でゲル化させて油滴を含むゲル(エマルションゲル)を作製し、次いで両親媒性溶媒を用いた洗浄による油滴の除去と水洗浄による溶媒置換を経て多孔質ハイドロゲルを作製した。

## 3. 研究の方法

(1) 固定化酵素多孔質ハイドロゲルの合成と特性評価

高分子ゲルを poly(ethylene glycol)methyl ether acrylate (PEGMEA) ゲルとした多孔質ハイドロゲルの合成は、O/W エマルションゲル化法により行った。具体的には、PEGMEA モノマー、架橋剤、および重合促進剤を含むモノマー水溶液、lipase 試薬(Lipase PS amano SD)および界面活性剤を含むオレイルアルコール溶液、重合開始剤を含む開始剤水溶液を混合攪拌して O/W エマルションを作製し、内径 6 mm のガラス管で 30 で静置してラジカル重合させた。得られたゲルを長さ 2 mm に切り分けて多量の水で洗浄した。同様の操作で、モノマー水溶液に lipase 試薬を添加した固定化酵素均質ゲルを作製した(油相は未使用)。

エマルションの油滴を実体顕微鏡で、凍結乾燥した多孔質ゲルの内部構造を走査型電子顕微鏡(SEM)で観察した。ゲル内の酵素の分布を観察するために蛍光標識した lipase を固定化したゲル(油相は除去していない)を作製し、その内部構造を共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)で観察した。

モデル酵素反応をトリアセチンの加水分解反応として、37 で回分酵素反応実験を行った。バイアルにリン酸緩衝液、および lipase 試薬または固定化酵素ゲルを仕込み、次いでトリアセチンを添加して酵素反応を開始した。所定時間に採取した溶液を NaOH 水溶液で滴定して、トリアセチンの酢酸への転化率を求めた。さらに、48 h で反応を終了し、ゲルを回収して新たな反応溶液に仕込んで繰り返し酵素反応を行った。(2) 固定化酵素多孔質オルガノゲルの合成と特性評価

高分子ゲルを 2-ethylhexyl acrylate (EHA) ゲルとした多孔質オルガノゲルの合成は、W/O エマルションゲル化法により行った。EHA モノマー、架橋剤、界面活性剤および重合開始剤を含むモノマー溶液に lipase 試薬を含む水溶液を乳化させて作製した。ゲルの洗浄

は多量のアセトンで行い、乾燥させた。

(1)と同様の操作で、エマルションの水滴、多孔質オルガノゲルの内部構造、およびゲル内の酵素の分布を観察した。

モデル酵素反応を酢酸プロピルと 1-ペンタノールのエステル交換反応として、回分酵素反応実験を行った。バイアルに酢酸プロピル、1-ペンタノール、および lipase 試薬または乾燥状態の固定化酵素ゲルを仕込み 40 で酵素反応を行った。所定時間に採取した溶液をガスクロマトグラフィーで分析し、1-ペンタノールの 1-プロパノールへの転化率を求めた。繰り返し酵素反応実験を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1)固定化酵素多孔質ハイドロゲルの構造と反応特性

図 2 に、ゲル化前の O/W エマルションの油滴、多孔質ゲルの内部構造、および蛍光標識した lipase を内包した油滴を含むエマルションゲルの写真を示す。エマルションの油滴および多孔質ゲル内の孔の直径は、それぞれ 1-15  $\mu\text{m}$  だった。エマルションゲル内で酵素の存在を表す緑色に蛍光した部分は、孔と同程度の大きさだった。以上から、エマルションの油滴が多孔質ハイドロゲルの孔の鑄型として作用し、その孔内へ酵素が包括固定されたことが明らかとなった。

図 3 に、固定化酵素多孔質ハイドロゲル、固定化酵素均質ハイドロゲル、およびフリー酵素を用いた加水分解反応実験のトリアセチンの転化率の経時変化を示す。固定化酵素多孔質ハイドロゲルの反応速度は、フリー酵素のそれと同程度だった。固定化酵素多孔質ハイドロゲルが高性能だった理由として、多孔質構造が基質と生成物の良好な拡散透過性を供し、孔内に包括固定された酵素がネイティブな活性を発現したことが挙げられる。一方、固定化酵素均質ハイドロゲルの反応速度は、非常に低かった。この理由として、酵素が重合反応場に曝されて変性や失活したこと、および酵素がゲル化を妨害してゲルが不均質構造となり酵素が漏出したことが挙げられる。

固定化酵素多孔質ハイドロゲルは、繰り返し利用できることを実証した(図 4)。これにより、酵素反応の連続化が達成でき、低環境負荷型の反応プロセスを供することができる。

##### (2)固定化酵素多孔質オルガノゲルの構造と反応特性

図 5 に、ゲル化前の W/O エマルションの水滴、多孔質ゲルの内部構造、および蛍光標識した lipase を内包した水滴を含むエマルションゲルの写真を示す。エマルションの水滴は、数  $\mu\text{m}$  以下だった。多孔質ゲル内の孔は、凍結乾燥時にゲルが収縮したのほとんど観察されなかった。エマルションゲル内で酵素の存在を表す緑色に蛍光した部分は、数

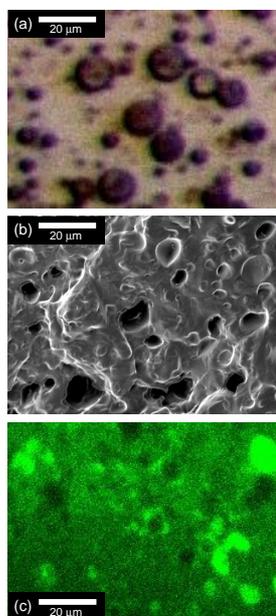


図 2 (a)O/W エマルションの油滴の実体顕微鏡写真、(b)多孔質ゲルの SEM 写真、および (c)蛍光標識した lipase を内包した油滴を含むエマルションゲルの CLSM 画像

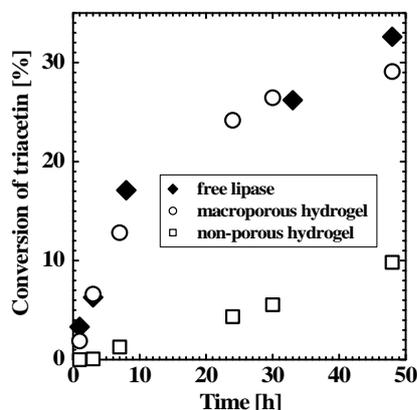


図 3 固定化酵素多孔質ハイドロゲル、固定化酵素均質ハイドロゲル、およびフリー酵素を用いた加水分解反応実験 (37) のトリアセチンの転化率の経時変化

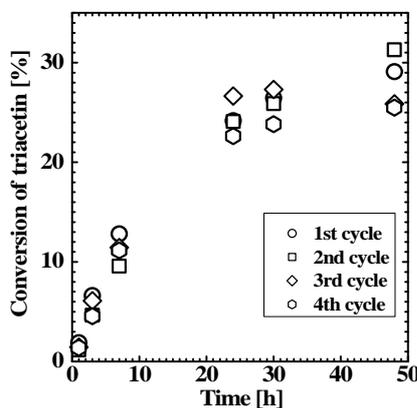


図 4 固定化酵素多孔質ハイドロゲルを用いた繰り返し加水分解反応実験 (37) のトリアセチンの転化率の経時変化

μm以下だった。以上から、エマルションの水滴に酵素を包括固定したままゲル化したことが明らかとなった。

図6に、固定化酵素多孔質オルガノゲルおよびフリー酵素を用いたエステル交換反応実験(40)の1-ペンタノールの転化率の経時変化を示す。固定化酵素多孔質オルガノゲルの反応速度は、フリー酵素のそれよりも早かった。酵素は、一般に油性媒体中で凝集・変性して失活しうる。フリー酵素が失活する一方、多孔質ゲルでは、酵素が分散して保持されていることとゲル中に残存した少量の水が酵素をより高活性にしたと考えられる。酵素固定化多孔質オルガノゲルは、8回の繰り返し利用が可能だった(図7)。なお、固定化酵素均質オルガノゲルは、酵素が油相に不溶なため、作製することが不可能だった。

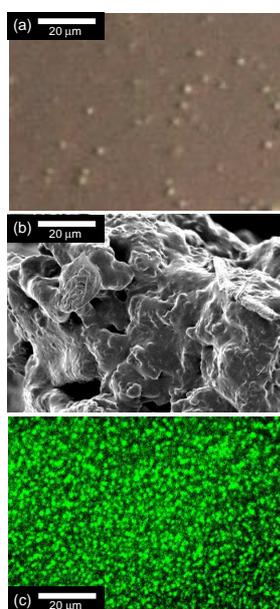


図5 (a)W/Oエマルションの水滴の実体顕微鏡写真、(b)多孔質ゲルのSEM写真、および(c)蛍光標識したlipaseを内包した水滴を含むエマルションゲルのCLSM画像

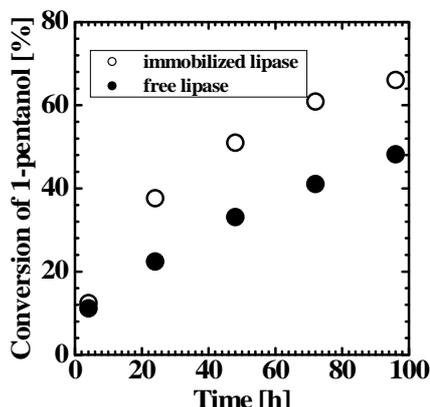


図6 固定化酵素多孔質オルガノゲルおよびフリー酵素を用いたエステル交換反応実験(40)の1-ペンタノールの転化率の経時変化

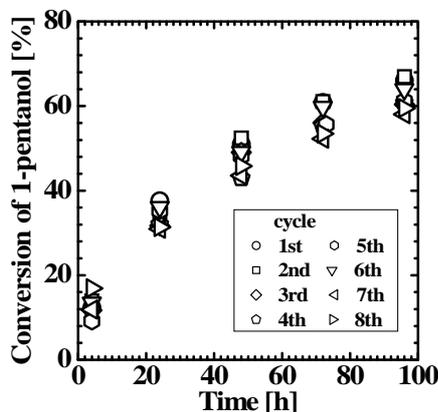


図7 固定化酵素多孔質オルガノゲルを用いた繰り返しエステル交換反応実験(40)の1-ペンタノールの転化率経時変化

## 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1件)

Ryuichi Sato, Takuro Kawakami, Hideaki Tokuyama, Preparation of polymeric macroporous hydrogels for the immobilization of enzymes using an emulsion-gelation method, *Reactive & Functional Polymers*, 76, 8-12 (2014), 査読有, DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2014.01.001

[学会発表](計4件)

佐藤龍一, 徳山英昭, エマルションゲル化法を用いた酵素固定化多孔質ゲルの作製と反応特性, 第63回高分子学会年次大会, 1Pa103, 名古屋国際会議場 (2014, 5, 28)

徳山英昭, エマルションゲルおよび多孔質ゲルの開発, 第23回日本MRS年次大会, M-110-005, 万国橋会議センター, 横浜, (2013, 12, 10)

Ryuichi Sato, Hideaki Tokuyama, Application of porous hydrogels for immobilized enzyme reaction, *International Soft Matter Conference 2013*, POL-1762, Rome, Italy (2013, 9, 17)

河上卓朗, 徳山英昭, エマルションゲル化法を用いた新規な固定化酵素多孔質ゲルの開発, 化学工学会第44回秋季大会, XA2P43, 東北大学 (2012, 9, 20)

[その他]

ホームページ等

<http://www.tuat.ac.jp/~tokuyama/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

徳山 英昭 (TOKUYAMA, Hideaki)

東京農工大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号: 10363029