

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26289284

研究課題名(和文) 新規なサスペンションゲル化法による微生物・酵素固定化多孔質ゲルの創製

研究課題名(英文) Preparation of biocatalyst-entrapped macroporous gel using a suspension-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) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新規なゲルの作製法であるサスペンションゲル化法を提案・確立し、この手法により作製される高分子多孔質ゲルの独立した孔(μm オーダー)に生体触媒(微生物および酵素)を包括固定した微生物固定化ゲルおよび酵素固定化ゲルを創製した。当該ゲルは、良好な基質と生成物の拡散透過性を付与し、生体触媒をネイティブな状態で包括固定できる点に特長を有する。当該ゲルの性能をエネルギー・環境分野での反応(バイオ燃料の製造、排水処理など)を例に検証し、その適用可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We proposed and developed the suspension-gelation method to prepare macroporous gels for immobilization of biocatalyst such as enzyme and bacteria. Using this technique, in situ entrapment of biocatalyst within macropores in the gels is achieved without requiring contact between the reactive chemical species and biocatalyst during polymerization. The performance and feasibility of biocatalyst-entrapped macroporous gel were demonstrated for the biocatalyzed reaction such as biodiesel production and ammonia oxidation.

研究分野：工学

キーワード：化学工学 反応・分離工学 酵素 微生物 高分子合成

1. 研究開始当初の背景

生体触媒を不溶性の粒子(担体)に固定化した材料は、生体触媒と生成物の容易な分離、生体触媒の反復利用、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生体触媒を物理的に囲い込むものである。従来の均質構造のゲルを用いた包括法では、生体触媒がゲルの重合反応場に曝され、さらに密な高分子網目との相互作用および立体障害により活性が低下しうる。一方、反応を高速化するアプローチとして、担体に貫通孔を有する多孔体を用いる方策が広く用いられる。しかし、この担体では、酵素の細孔内表面への化学固定による活性低下、および微生物が多層に付着したバイオフィームが形成されることで基質の深部への輸送が律速になり、生体触媒の十分な機能発現に至らない。酵素の固定化に関する研究は、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。微生物の包括固定化については、国内で唯一、日立製作所が高分子均質ゲルの合成時に微生物を包括固定する技術を有しており、上市しているのみである。

2. 研究の目的

本研究では、生体触媒の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生体触媒反応プロセスの実現を目指して、新規なゲルの構造制御技術であるサスペンションゲル化法(図1)を提案する。これは、プレゲル水溶液にマイクロカプセル(例えば物理架橋ゲル微粒子)を分散させたサスペンション(懸濁液)の水相をゲル化させる方法である。この段階で、微粒子を内包したハイドロゲル(複合ゲル)が作製される。ゲル内の微粒子を化学処理により崩壊(ゾル化)させることで独立孔を有する多孔質ゲルが作製される。あらかじめマイクロカプセル内に生体触媒を仕込んでおくことで、生体触媒の高分子多孔質ゲル内の孔への完全な包括固定が実現できる。提案する生体触媒固定化多孔質ゲルは、高速反応が期待できる高機能な材料である。

本研究では、エネルギー・環境分野での高性能生体触媒反応プロセスの構築を目指して、サスペンションゲル化法による生体触媒固定化多孔質ゲルの開発、その反応メカニズムの解明、および反応プロセスの設計指針の確立を目的とする。モデル反応系は、酵素(リパーゼ)を用いた水性媒体中での4-ニトロフェニル酢酸の加水分解反応および油性媒体中でのオレイン酸とエタノールのエステル化反応およびトリオレインとエタノールのエステル交換反応、および微生物(アンモニア酸化細菌)を用いたアンモニア酸化反応とした。

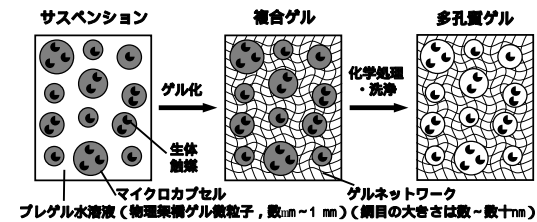


図1 サスペンションゲル化法の概念図

3. 研究の方法

(1) マイクロカプセルの作製

モデルマイクロカプセルには、作製が容易(2液を接触させることで瞬時にゲル化する)で低毒性のアルギン酸カルシウムゲルを用いた。生体触媒およびアルギン酸ナトリウムを含む水溶液(または懸濁液)を静電微粒化法で噴霧させた液滴を塩化カルシウム水溶液で捕集してゲル微粒子を作製した。粒子径は、作製条件によって変わるが概ね数百 μm であった。

(2) 複合ゲルおよび多孔質ゲルの作製

種々のゲルを作製したが基本的には、モノマー、架橋剤、およびマイクロカプセルを含むサスペンション(懸濁液)に開始剤水溶液を投入してフリーラジカル重合を試験管内で行い、塊状の複合ゲルを作製した。ゲル内のマイクロカプセルをクエン酸三ナトリウム水溶液に浸す化学処理により崩壊(ゾル化)させて、多孔質ゲルを作製した。

上述のゲル合成を沈降重合法で行いゲル粒子を作製した。具体的には、プレゲル水溶液をシリコンオイルに滴下して、その沈降中に重合させた。反応プロセスに適する粒子径1~数mm程度のゲル粒子が作製できた。

(3) 生体触媒反応実験

種々の生体触媒反応を行ったが基本的には、バイアル内で生体触媒固定化ゲルと基質を含む反応溶液を接触させる回分反応実験を行い、溶液中の基質濃度の変化を分析により追跡し、基質の転化率を求めて反応特性評価した。所定時間で反応終了したゲルを回収し、新たな反応溶液に仕込んで繰り返し反応を行った。

微生物固定化ゲルは、上述の反応特性評価をする前に、連続槽型反応器を用いてアンモニア水溶液を連続供給してゲル内の微生物を増殖させる馴養を数ヶ月行った。

4. 研究成果

(1) サスペンションゲル化法による多孔質ゲルの創製

まず、本研究の基盤であるサスペンションゲル化法を確立した。モデル高分子ゲルは、N-イソプロピルアクリルアミドゲルを用いた。このゲルは、水中で温度変化にตอบสนองして体積相転移する感温性ゲルである。アルギン酸カルシウムゲルマイクロカプセルの粒子径は、100 μm 程度だった。顕微鏡法により複合ゲルおよび多孔質ゲルの内部構造を観察

したところ(図2)複合ゲルにはマイクロカプセルが含まれており、多孔質ゲルにはそれが鑄型となった独立孔が存在した。

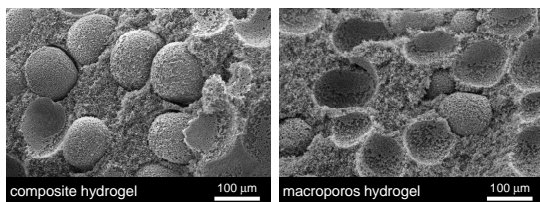


図2 複合ゲルおよび多孔質ゲル内部の電子顕微鏡写真

(2) 酵素固定化多孔質ゲルの開発と応用

酵素リパーゼを固定化した多孔質ゲル粒子を開発した。図3に示すとおり、ゲル内にマイクロカプセルが、その中に分散した酵素が観察された。酵素固定化多孔質ゲルの酵素反応特性を、4-ニトロフェニル酢酸の加水分解反応をモデルとして検証し、従来の酵素固定化均質ゲルと性能比較した。酵素固定化多孔質ゲル粒子は、モデル反応を良く触媒し、その活性が低下することなく繰り返し利用が可能だった(12回まで実証)。従来の均質ゲルの合成と同時の酵素の包括固定法では酵素が重合反応場に曝されて失活すること、およびサスペンションゲル化法ではマイクロカプセルが酵素を保護してその失活を防げることを明らかとした。

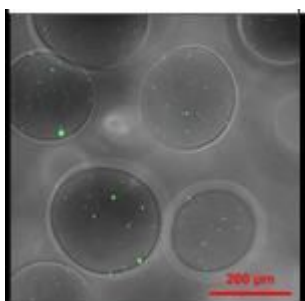


図3 酵素固定化複合ゲルの共焦点レーザー顕微鏡写真

高分子を機能化して、油性媒体中で使用できる酵素固定化ゲルを開発した。油性媒体中で酵素反応を行う場合、一般に酵素は変性や凝集を生じてその活性が低下する。これを克服する材料として、疎水性モノマーと親水性モノマーの共重合ゲルを担体に用いた酵素固定化ゲルを開発した。バイオ燃料の製造を模擬した実験系である酵素リパーゼを用いたオレイン酸とエタノールのエステル化反応およびトリオレインとエタノールのエステル交換反応において、当該ゲルが高性能であることを実証した。共重合ゲルの疎水部が油溶性基質の拡散を促し、親水部が酵素に適度な水環境を提供したためと考えられる。さらに、酵素リパーゼを固定化した多孔質ゲル

粒子をトリオレインとエタノールのエステル交換反応に適用した。多孔質ゲルはこの反応を触媒したが、その反応速度は従来の均質ゲルと比べて遅かった。多孔質ゲルの孔の鑄型に用いたアルギン酸カルシウムがゲル内に残存して、酵素の触媒活性を低下させたことが窺われた。

(3) 微生物固定化多孔質ゲルの開発と応用

アンモニア酸化細菌を固定化した多孔質ゲル粒子を開発し、アンモニアの酸化(硝化)反応に適用した。連続槽型反応器を作製し、これにアンモニア水溶液を連続供給してゲル内の微生物を増殖させる馴養を行い、約2ヶ月の連続運転で固定化微生物は十分な活性を示すようになった。このとき、ゲルはその外観と内部とも合成直後の白色から茶色へと変化し(図4)微生物の増殖が目視確認できた。それ以降の数ヶ月の間も一定の反応活性を維持し、アンモニアの連続処理に成功した。初期アンモニア濃度を実験パラメータとした回分実験でアンモニア酸化反応初速度を測定し、種々のモデル式でフィッティングした。反応速度は、Edwards式などの高濃度の基質が反応を阻害するモデルで表現できた。多孔質ゲルは、その反応速度が従来の均質ゲルのそれと比べて速いという良好な結果が得られ、アンモニア排水処理への適用可能性が大いに示された。



図4 馴養した微生物固定化多孔質ゲル粒子の外観(上)および切断面(下)

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3件)

[1] Ryuichi Sato, Hideaki Tokuyama, Fabrication of enzyme-entrapped composite and macroporous gel beads by suspension gelation combined with sedimentation polymerization, *Biochemical Engineering Journal*, 113, 152-157 (2016), 査読有, DOI: 10.1016/j.bej.2016.06.013

[2] Ryuichi Sato, Ryoko Noma, Hideaki Tokuyama, Preparation of macroporous poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels using a suspension-gelation method,

European Polymer Journal, 66, 91-97 (2015),
査読有,

DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2015.01.051

[3] Ryuichi Sato, Ayumi Sato, Hideaki Tokuyama, Fabrication of amphiphilic copolymeric gels with enhanced activity of immobilized enzymes in organic media, Journal of Applied Polymer Science, 132, 41905(5 pages) (2015), 査読有,

DOI: 10.1002/app.41905

〔学会発表〕(計 11 件)

[1] Ayaka Naito, Hideaki Tokuyama, Fabrication of lipase-entrapped amphiphilic copolymeric gel beads and their use for transesterification reaction in organic media, 12th Japan-Korea Symposium on Materials & Interfaces, P-15, 御殿場高原時之栖(静岡県御殿場市) (2016, 11, 3)

[2] 内藤絢香, 徳山英昭, 酵素固定化高分子ゲルの繰り返し利用性能に関する研究, 分離技術会年会 2016, S3-P2, 日本大学津田沼キャンパス(千葉県習志野市) (2016, 5, 28)

[3] 徳山英昭, 佐藤龍一, サスペンションゲル化法を用いた酵素固定化多孔質ゲル粒子の開発および酵素反応特性, 第 65 回高分子学会年次大会, 2Pa071, 神戸国際会議場・展示場(兵庫県神戸市) (2016, 5, 26)

[4] Ryuichi Sato, Ryoko Noma, Hideaki Tokuyama, Ammonium oxidation reaction catalyzed by bacteria entrapped within macroporous polymeric hydrogels using a suspension-gelation method, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2015), MACR615, Honolulu, USA (2015, 12, 17)

[5] Hideaki Tokuyama, Ryuichi Sato, Ayumi Sato, Esterification in organic media using lipase immobilized within amphiphilic NIPA-co-PEGMEA gels, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2015), MACR617, Honolulu, USA (2015, 12, 17)

[6] 佐藤龍一, 徳山英昭, サスペンションゲル化法を用いた酵素固定化多孔質ゲルの開発, 化学工学会第 47 回秋季大会, ZB2P04, 北海道大学(北海道札幌市) (2015, 9, 10)

[7] 徳山英昭, 野間涼子, 佐藤龍一, サスペンションゲル化法による感温性多孔質 semi-IPN ゲルの創製, 第 64 回高分子学会年次大会, 3Pc63, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市) (2015, 5, 29)

[8] 佐藤龍一, 佐藤あゆみ, 徳山英昭, 酵素固定化両親媒性ゲルの開発と油性媒体中でのエステル化反応の特性, 第 64 回高分子学会年次大会, 1J10, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市) (2015, 5, 27)

[9] Ryuichi Sato, Ryoko Noma, Hideaki

Tokuyama, Preparation of Macroporous Hydrogels for The Immobilization of Bacteria Using A Suspension-gelation Method, The Materials Research Society of Indonesia (MRS-Id) Meeting 2014, E0.2, Denpasar, Indonesia (2014, 9, 28)

[10] 佐藤あゆみ, 佐藤龍一, 徳山英昭, 油性媒体中で高活性を発現する酵素固定化高分子ゲルの創製, 化学工学会第 46 回秋季大会, ZC2P28, 九州大学(福岡県福岡市) (2014, 9, 18)

[11] 野間涼子, 佐藤龍一, 徳山英昭, サスペンションゲル化法による感温性多孔質ゲルの創製, 化学工学会第 46 回秋季大会, ZC2P50, 九州大学(福岡県福岡市) (2014, 9, 18)

〔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

(2) 研究分担者

寺田 昭彦 (TERADA, Akihiko)

東京農工大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号: 30434327

(3) 連携研究者

長津 雄一郎 (NAGATSU, Yuichiro)

東京農工大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号: 60372538