

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月8日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22760591

研究課題名（和文） メソポーラス材料を利用した酵素固定化法の最適化

研究課題名（英文） Enzyme immobilization onto mesoporous silica supports

研究代表者

片岡 祥（KATAOKA SHO）

独立行政法人産業技術総合研究所・環境化学技術研究部門・研究員

研究者番号：50435765

研究成果の概要（和文）：有機溶媒中での酵素反応の高効率化を目指して、メソポーラスシリカへの酵素の固定化を検討した。リパーゼ、グルタミン酸脱炭酸酵素（GAD）、ラッカーゼに対して、表面修飾や細孔径の拡大など、メソポーラスシリカを改質することで、酵素の固定化を向上させることができた。有機溶媒中での酵素反応を行ったところ、長時間に渡って、活性を高く維持することができた。

研究成果の概要（英文）：Enzymes were immobilized onto mesoporous silica to maintain their enzymatic activity in organic solvents. The immobilization of lipase, glutamic acid decarboxylase (GAD), and laccase was improved via the surface modification and pore expansion of mesoporous silicas. When enzymatic reactions were performed in organic solvents, the immobilized enzymes exhibited a high activity over long-time reactions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・反応工学・プロセスシステム

キーワード：反応・分離工学、化学工学、酵素、メソポーラス材料、固定化

## 1. 研究開始当初の背景

グリーンケミストリーの観点から、穏やかな条件で進行する酵素反応の有機合成プロセスへの利用が広く検討されている。一般的に、酵素は水溶液中で高い活性を発揮するが、非水溶性有機溶媒中では溶解しなかったり失活したりする場合が多い。そこで、シリカやポリマーへの固定化や、界面活性剤による

被覆やイオン流体の利用といった手法が、有機溶媒中で酵素を用いた合成反応を高効率で行うための解決法として研究されてきた。

酵素の固定化は、工業化の観点から様々な反応系において使用されてきたが、有機溶媒中では、酵素を溶媒から保護しながら高分散な酵素を得ることを目的とする。しかし、多くの固定化酵素は実験室レベルで非常に有

効であるが、工業プロセスで連続的に利用するためには、問題がある。特に、シリカやポリマーへの固定化では、リーチング、低活性、耐環境性など、解決すべき課題がある。そこで本研究では、有機溶媒中で合成プロセスを高効率で行うことを目的とした酵素固定化法の開発を研究課題とした。

メソポーラス材料とは、均一な細孔径(2~30nm)を有するメソ孔が規則的に配列した材料であり、前駆体溶液に界面活性剤を添加することで合成される。高温で焼成することにより、界面活性剤ミセルは熱分解され、空いたスペースが規則的な細孔となる。これまで、数多くのメソポーラス材料が報告されてきた。今後、規則的な細孔構造を利用して、吸着材や触媒担体、センサーなど様々な用途への応用が期待されている。その一つに、均一な細孔径を利用した酵素の固定化が近年試みられている。酵素の大きさは、数 nm から数 10 nm であり、多くの酵素がメソポーラス材料の細孔内に固定化することができると考えられている。この固定化法では、細孔内に酵素が1つ納まり、周りをほぼシリカで覆われた状態になるため、一般的なシリカなどに比べてもリーチングが少なく耐環境性の高い酵素が得られると考えられる。また酵素の凝集を防ぐことができるため、活性を維持したまま、固定化量を増やすことができることが期待できる。従って、従来の担体であるシリカやポリマーに比べ、メソポーラス材料は優れた担体であると予想される。そこで、メソポーラスシリカを酵素担体として利用して、有機溶媒中での合成への応用を検討した。

## 2. 研究の目的

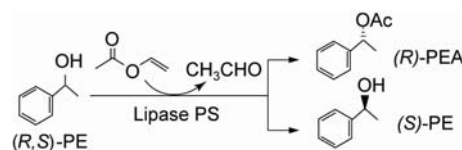
有機溶媒中で酵素反応を効果的に行うため、メソポーラス材料を担体として用いた酵素の固定化法を開発する。メソポーラス材料表面と酵素の相互作用を考慮に入れて、表面修飾を施し、固定化量、活性、耐久性の向上を目指す。得られた固定化酵素に対し、厳密な反応速度解析により酵素活性を評価する。最終的に、固定化酵素の活性、耐久性を評価して、メソポーラス材料を用いた固定化法の最適化を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

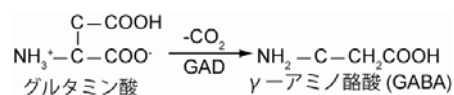
### (1) 2010 年度

メソポーラス材料に固定化する酵素として、リパーゼとグルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)に選択し、様々な条件で固定化を行った。リパーゼに関して、細孔径が 8 nm で

あるメソポーラスシリカ(SBA-16)を担体として選択した。そこで、SBA-16に表面修飾することで固定化量・活性の向上を試みた。得られた固定化酵素を用いて酢酸ビニルのエステル交換反応を行った。



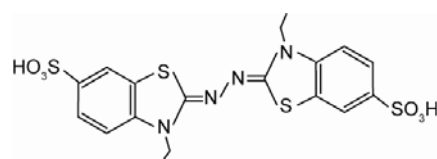
一方、1つのGADの大きさは約8nmであるが、使用したGADは4量体であり、酵素全体の大きさが30nm以上である。そこで、固定化にはキャリアクトQ-50(富士シリシア化学)を担体として選択した。グルタミン酸脱炭酸反応を行った。このグルタミン酸脱炭酸反応での生成物は、γ-アミノ酪酸(GABA)である。



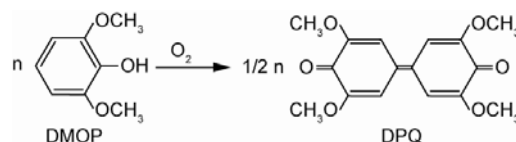
### (2) 2011 年度

多くの酵素を固定化することを目的として、10~50 nmの細孔径を持つメソポーラス材料の作製を新規に開発した。そこで、鋳型剤としてポリスチレン-ポリビニルピリジンのブロックコポリマーを用いて、メソポーラスシリカを作製した。固定化する酵素として、ラッカーゼを選択した。

固定化したラッカーゼの活性を評価するため、2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)(ABTS)の酸化を水溶液中で行った。



また、有機溶媒中でのラッカーゼの耐久性を評価するために、ジメトキシフェノール(DMOP)の酸化による、テトラメトキシジフェノキノン(DPQ)の合成反応を行った。



#### 4. 研究成果

##### (1) 2010 年度

リパーゼの固定化に関して、メソポーラス材料 (SBA-16) への表面修飾により吸着量が大幅に変化することが分かった。シランカップリング剤で SBA-16 表面にアミノ基やエポキシ基を導入した場合、吸着量はほとんど変化しなかったが、アルキル基により疎水化した場合、リパーゼ吸着量が増加した。リパーゼの固定化において、親水性である SBA-16 表面を疎水化することが適当であると考えられる。そこで、水晶振動子の上に SBA-16 薄膜を作製し、リパーゼの吸着量を厳密に測定した (図 1)。疎水化後の SBA-16 薄膜への吸着量が約 10 倍に向上していることが分かった。また、固定化したリパーゼを用いて、酢酸ビニルのエステル交換反応を行ったところ、疎水化した SBA-16 へ固定したリパーゼによる収率が高いことが分かった。また、固定化リパーゼの活性は、有機溶媒中で長時間維持されることも明らかになった。

一方、GAD の固定化に関して、キャリアクトに表面修飾を施した場合、表面修飾による吸着量の増加はほとんどなく、エポキシ基やアルキル基を導入した場合、GAD の吸着量は低下した (図 2)。よって、GAD の固定化に対して、キャリアクトへ直接固定化することが適していると判断した。固定化 GAD を利用して、グルタミン酸脱炭酸反応をバッチ式で行ったところ、反応時間が 1 時間で、収率 97% の GABA が得られた。一方、連続

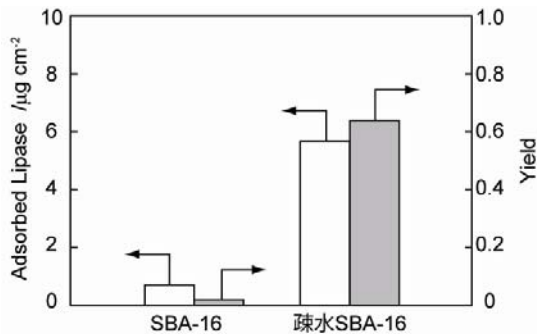


図 1. SBA-16 へのリパーゼの固定化量と反応収率

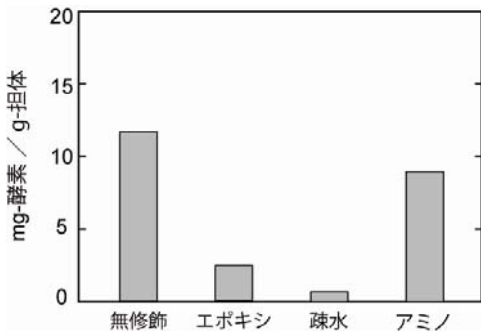


図 2. キャリアクトの表面修飾による GAD 吸着量の変化

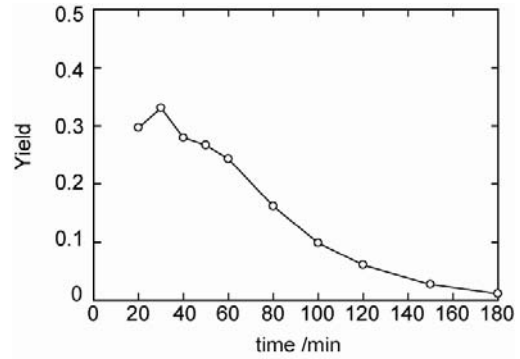


図 3. 固定化 GAD による GABA 収率の時間変化

槽型反応器を作製し、固定化 GAD による GABA 連続合成の結果を図 3 に示す。出口での GABA 収率が時間とともに低下することが分かった。この酵素活性の低下は、反応の過程で副反応により補酵素 (ピリドキサルリン酸) が流出したことによる GAD の失活が原因と考えられる。

##### (2) 2011 年度

10~50 nm の細孔径を持つメソポーラス材料の作製するために、鋳型剤としてポリスチレン-ポリビニルピリジンのブロックコポリマーを用いた。シリカ源として、テトラエトキシシラン (TEOS) を利用して、ブロックコポリマーと混合し、550°C で焼成した。作製したメソポーラスシリカ (以下、PS と呼ぶ) の電子顕微鏡 (SEM) 像を図 4 に示す。

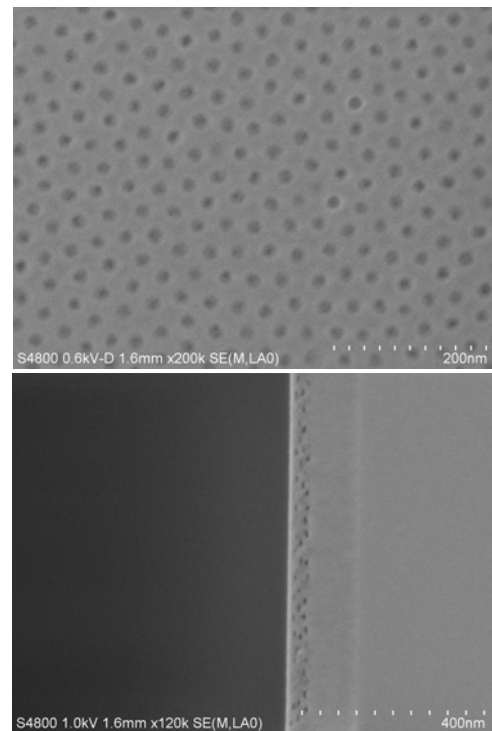


図 4. 新規に作製したメソポーラスシリカ薄膜 (上図: 表面 SEM 像、下図: 断面 SEM 像)

作製した PS 薄膜は、膜厚が約 50 nm で、約 19 nm の細孔径を持ち、3 次的に繋がったキュービク構造を取ることが分かった。

作製した PS 薄膜へのラッカーゼ吸着量を評価した。ラッカーゼの等電点は約 4 であり、シリカの表面電荷の等電点は約 2.3 であるため、pH4 以上の水溶液中ではラッカーゼとシリカは静電的に反発する。そのため、表面を修飾しない場合、ラッカーゼは全く吸着しなかった。そこで、PS 薄膜の表面を 3-アミノプロピルトリエトキシシランで修飾し、グルタルアルデヒドを用いて、ラッカーゼをシリカと結合した。水晶振動子微量天秤法で、ラッカーゼの吸着量を評価したところ、PS 薄膜には約  $0.6 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  吸着することが分かった。これは、PS 薄膜にある細孔の全域で、ラッカーゼが吸着していることに相当する。このように、細孔内への酵素の固定化を最適化することができた。

PS に固定化したラッカーゼの活性を評価するため、水溶液中で ABTS の酸化を行ったところ、酵素活性を維持することが確認できた。そこで、有機溶媒中でのジメトキシフェノールの酸化反応を、流通型反応器を用いて行った (図 6)。メソポーラス材料に固定化していないラッカーゼが短時間で活性を失う

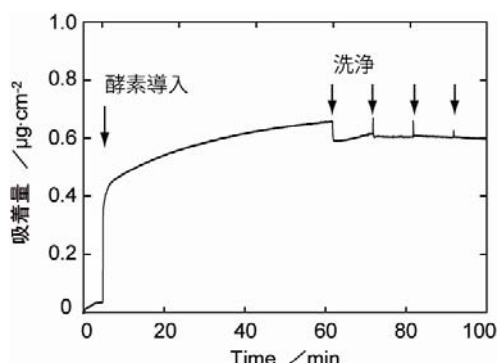


図 5.水晶振動子微量天秤法による PS 薄膜および SBA 薄膜へのラッカーゼ吸着量

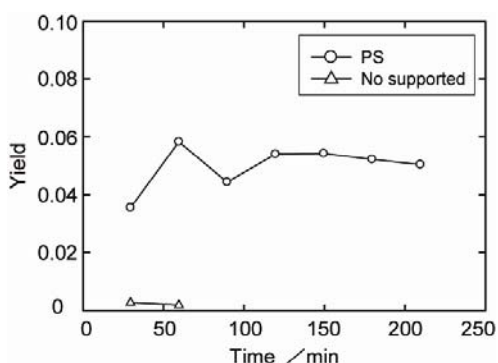


図 6. 有機溶媒中での固定化ラッカーゼの活性変化

のに対して、PS に固定化したラッカーゼは、活性を長時間維持することが明らかになった。以上の結果から、メソポーラスシリカの細孔径や表面性情を最適化することで、酵素の固定化量を増加することができることを明らかにした。また、固定化酵素の活性は、有機溶媒中の反応においても、長時間維持することが確認できた。

## 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 2 件)

① “メソポーラス材料固定マイクロリアクターと酵素反応への応用” 片岡祥、遠藤明、ケミカルエンジニアリング、(査読無し)、56、37-42 (2011).

<http://www.kako-sha.co.jp/>

② “マイクロリアクター内壁での不均一触媒反応における拡散の影響と触媒層の評価” 片岡祥、竹内康隆、遠藤明、化学工学論文集 (査読有り)、37、420-425 (2011).

DOI : 10.1252/kakoronbunshu.37.420

[学会発表] (計 2 件)

① “メソポーラスシリカ薄膜の作製と酵素反応への応用” 片岡祥、竹内康隆、遠藤明、化学工学会第 77 年会、2012 年 3 月 15 日、工学院大学 (東京)

② “酵素反応のためのメソポーラス材料固定反応器” 片岡祥、竹内康隆、遠藤明、日本化学会第 91 会春季年会、2011 年 3 月 27 日、神奈川大学 (神奈川)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

片岡 祥 (KATAOKA Sho)

(独) 産業技術総合研究所・環境化学技術研究部門・研究員

研究者番号 : 50435765