

博士論文

酵素固定化高分子ゲルの創製

Fabrication of enzyme-entrapped polymeric gels

東京農工大学 大学院工学府 応用化学専攻

佐藤 龍一

目 次

1 章 序論	
1.1. 固定化酵素	1
1.2. 多孔質高分子ゲルの固定化担体への応用	4
1.3. 機能性高分子の固定化担体への応用	7
1.4. 本論文の構成	10
引用文献	12
2 章 O/W エマルションゲル化法を用いた酵素固定化多孔質ハイドロゲルの作製と加水分解反応特性	
2.1. 緒言	15
2.2. 実験方法	
2.2.1. 酵素固定化多孔質 PEGMEA ゲルの作製	16
2.2.2. ゲルの内部構造の観察	17
2.2.3. triacetin の加水分解反応実験	18
2.3. 結果および考察	
2.3.1. エマルションの油滴径およびゲルの内部構造	18
2.3.2. 酵素反応特性	18
2.4. 結言	20
引用文献	22
3 章 W/O エマルションゲル化法を用いた酵素固定化多孔質オルガノゲルの作製とエステル化およびエステル交換反応特性	
3.1. 緒言	23
3.2. 実験方法	
3.2.1. 酵素固定化多孔質 EHA オルガノゲルの作製	24
3.2.2. ゲルの内部構造の観察	25
3.2.3. エステル化およびエステル交換反応実験	25
3.3. 結果および考察	
3.3.1. エマルションの水滴径およびゲルの内部構造	26
3.3.2. 酵素反応特性	26

3.4. 結言	29
引用文献	29
4章 サスペンションゲル化法を用いた複合および多孔質ハイドロゲルの創製	
4.1. 緒言	30
4.2. 実験方法	
4.2.1. マイクロカプセルの作製	31
4.2.2. 複合および多孔質 NIPA ゲルの作製	32
4.2.3. ゲルの観察	33
4.2.4. ゲルの膨潤特性と力学特性の評価	33
4.3. 結果および考察	
4.3.1. ゲルの外観と内部構造	34
4.3.2. ゲルの膨潤特性	38
4.3.3. ゲルの力学特性	40
4.4. 結言	41
引用文献	41
5章 サスペンションゲル化法を用いた酵素固定化複合および多孔質ハイドロゲルの作製と加水分解反応特性	
5.1. 緒言	43
5.2. 実験方法	
5.2.1. 酵素固定化複合 PEGDA ゲル粒子の作製	44
5.2.2. ゲルの観察	45
5.2.3. <i>p</i> -nitrophenyl acetate の加水分解反応実験	46
5.2.4. ゲルの熱重量分析	47
5.2.5. GPC 分析	47
5.3. 結果および考察	
5.3.1. ゲルの粒子径分布と内部構造	47
5.3.2. ゲルの酵素反応特性	51
5.4. 結言	57
引用文献	57
6章 油性媒体中で高活性を発現する酵素固定化両親媒性共重合ゲルの作製とエステル化反応特性	
6.1. 緒言	59
6.2. 実験方法	

6.2.1. 酵素固定化 NIPA-co-PEGMEA ゲルの作製	60
6.2.2. oleic acid と ethanol のエステル化反応実験	60
6.3. 結果および考察	
6.3.1. ゲルの膨潤特性	61
6.3.2. 酵素反応特性	63
6.4. 結言	68
引用文献	69
7章 総括	70
本論文に関する公表	72
謝辞	74

## 1 章 序論

### 1.1. 固定化酵素

酵素は、タンパク質からなる触媒であり、常温、常圧、および中性条件といった温和な条件下で化学反応を促進し、さらに、立体選択性、位置特異性、官能基特異性といった反応特異性を発現することから、低環境負荷型の物質生産プロセスを供する。しかし、酵素は、高価であり、熱や試薬等に対して不安定で失活しやすく、繰り返しおよび連続利用のためには反応溶液中からの高度な分離・回収プロセスを要する、従来の酸・アルカリ触媒を用いた高温・高圧での反応に比べて反応速度が遅い、など工業的利用が困難な場合もある。例えば、油脂に含まれる triglyceride の加水分解反応に対して、油脂分解酵素の lipase は、35°C、大気圧下で触媒できる<sup>1)</sup>。しかし、工業的には Colgate-Emery プロセスという無触媒で、260°C、60 bar で triglyceride と水を向流接触させて連続的に反応させる方法が確立されている<sup>2)</sup>。表 1 に、国内の酵素反応を適用した物質生産の例を示す<sup>3)</sup>。

酵素の工業的利用を促す方法論として、酵素の分子育種と酵素を水に不溶の状態とした固定化（固定化酵素）がある。分子育種とは、部位特異的変異の導入、融合タンパク質の作成、化学修飾などの方法により酵素の触媒能を改善するものである。例えば、酵素中の残基の置換、S-S 結合の導入、polyethyleneglycol による化学修飾などにより酵素の熱安定性や活性が向上し、酵素の有機溶媒中での使用を可能にする研究がある<sup>4-9)</sup>。分子育種した酵素の工業的な利用例として、三和澱粉工業株式会社と江崎グリコ株式会社は、2005 年にアミノ酸置換した酵素の *scrose phosphorylase* および *glucan phosphorylase* を用いた amylose の合成の量産化技術開発に世界で初めて成功した<sup>10)</sup>。また、Novozymes 社は、2014 年に廃油からバイオディーゼル燃料を製造できる液状酵素（Novozymes Eversa®）を世界で初めて上市した<sup>11)</sup>。本研究では、固定化酵素に注目した。固定化酵素は、ある一定の空間内に閉じ込められた状態にある酵素のことであり、さらに連続的に酵素反応を行うことができ、かつ反応後に酵素を回収し、再利用できる状態にある酵素、と定義される<sup>12)</sup>。固定化酵素は、酵素と生成物の容易な分離、酵素の反復利用、連続的な物質生産、などの特長を反応プロセスに供する。固定化酵素の工業的な利用例として、田辺製薬（現田辺三菱製薬）株式会社の千畑らは、1969 年に *aminoacylase* を DEAE-Sephadex® にイオン結合した固定化酵素を用いて、L-amino acid の工業的製造に世界で初めて成功した<sup>12)</sup>。また、微生物を担体に固定化してそれが生産する酵素を利用した工業プロセスが多くあり、例えばイオン交換樹脂に *glutaraldehyde* を用いて固定化した *Pseudomonas sp.* の *amidase* を用いた 7-aminocephalosporanic acid の製造、 $\kappa$ -carrageenan に包括固定した *Brevibacterium flavum* 菌体が生産する *fumarase* を用いた L-malic acid の製造、などがある<sup>13)</sup>。

酵素の固定化手法には、担体結合法、架橋法、および包括法がある（図 1-1）<sup>1,12)</sup>。担体結合法は水に不溶な担体（天然高分子の agarose などの多糖、silica gel などの無機物質、

合成高分子ゲルなど) に酵素を共有結合や物理吸着により固定する方法である<sup>14-17)</sup>。Sánchezらは、tosyl基を導入した agarose および trichlorotriazine を導入した silica gel を作製し、緩衝液を用いて lipase を共有結合した固定化酵素のエナンチオ選択性が担体に未固定のフリー酵素のそれよりも増大したと報告した<sup>14)</sup>。Knezevicらは、Eupergit® (N,N'-methylene-bis-(methacrylamide)、glycidyl methacrylate、allyl glycidyl ether、および methacrylamide の共重合ゲル) 上の amine 基に carbohydrate を修飾した lipase を共有結合した<sup>18)</sup>。この固定化酵素の活性は、酵素の活性部位が塞がれないために、従来の固定化酵素 (Eupergit® に lipase を直接結合したもの、および Eupergit® に glutaraldehyde を用いて lipase を結合したもの) のそれよりも高かった。架橋法は、2 個以上の官能基を有する試薬を用いて酵素分子同士を架橋させて巨大分子とする方法である。Quiochoらは、酵素 carboxype-

表 1-1 Recent Industrial Application of Microbial Reactions in Japan (1984-2003) (文献<sup>3)</sup>より転載)

Item	Product	Year	Organization
Aminoacids	D- <i>p</i> -Hydroxyphenylglycine	1979/1995	Kyoto Univ. & Kaneka
	Aspartate	1984	Ajinomoto
		1986	Mitsubishi Chemical
	DOPA	1994	Kyoto Univ. & Ajinomoto
	Hydroxyproline	1997	Kyowa Hakko Kogyo
Nucleotides	5'-IMP & 5'-GMP	2003	Toyama Pref. Univ. & Ajinomoto
Sweetners	Paratinose	1984	Shin Mitsui Sugar
	Aspartame	1987	Tosoh Corporation
	Lactosucrose	1990	Hayashibara
	Galactooligosaccharide	1990	Nissin Sugar mfg.
	Maltotriose	1990	Nihon shokuhin Kako
	Engineered stevia sweetner	1993	Toho Rayon
	Theandeoligosaccharide	1994	Asahi Chemical Industry
	Treharose	1995	Hayashibara
	Nigerooligosaccharide	1998	Nihon Shokuhin Kako, Kirin Brewery & Takeda Food Products
Oils	Physiologically functional oils	1989	Fuji oil
		1990	Kao
		1998	The Nissin Oil Mills
	Polyunsaturated fatty acids	1998	Kyoto Univ. & Suntory
Vitamins	Stabilized Vitamin C	1990	Hayashibara
	Nicotinamide	1998	Kyoto Univ. & Lonza Group
	Vitamin C-phosphate	1999	Kyowa Hakko Kogyo
	Pantothenate intermediate	1999	Kyoto Univ. & Daiichi Fine Chemical
Chemicals	Acrylamide	1988	Kyoto Univ. & Mitsubishi Rayon
	Chiral epoxides	1985	Japan Energy & Canon
Pharma intermediates	'Herbesser' intermediate	1992	Tanabe Seiyaku
	Chiral alcohols	2001	Kyoto Univ. & Kaneka
Others	Casein phospho peptide	1988	Meiji Seika
	Hypoallergenic rice	1991	Tokyo Univ. & Shiseido
	Hypoallergenic protein	1991	Meiji Milk Product

ptidase-A を glutaraldehyde の aldehyde 基を用いて架橋（シッフ塩基を形成）して水に不溶の結晶状態にさせた固定化酵素は、carbobenzoxyglycyl-L-phenylalanine の加水分解反応においてフリー酵素よりも活性が低かったが、反応を触媒したと報告した<sup>19)</sup>。担体結合法および架橋法の長所は、酵素を強固に固定化できることである。短所は、酵素を結合させる操作と、そのための glutaraldehyde のような限定された試薬を要すること、および酵素は高分子との結合箇所によっては活性が低下することである。包括法は、酵素を水に不溶な担体の中に物理的に閉じ込める方法である。包括法には acrylamide ゲルなどの高分子網目の中に酵素を閉じ込める格子型と polyethylene などの膜材高分子で酵素を被覆するマイクロカプセル型がある。Iso らは、液中乾燥法を用いて酵素 (lipase、glucoamylase、および glucose isomerase) を poly(styrene) と styrene-butadiene rubber の混合膜の中へ包括固定したマイクロカプセルを作製し、その材料を 3 ヶ月連続利用しても活性の低下やカプセルの破損がなかったと報告した<sup>20)</sup>。包括法では、あらゆる種類の酵素を固定化でき、酵素と担体の相互作用は弱いので酵素の高次構造の変化が起こりにくく失活を最小限にできる。しかし、一般に固定化担体の作製（ゲルの合成など）と同時に酵素を固定化するため、酵素がモノマーやラジカルなどの化学種に曝されてその活性が低下しうる。文献調査した範囲では、酵素の固定化には担体結合法を用いたものが多く、包括法による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、酵素の高分子ゲルへの包括固定に着目した。高分子ゲルとは溶媒を吸収した三次元網目構造の高分子膨潤体である。本研究では、高分子ゲルの多孔質構造の制御および機能性高分子の適用の 2 つの観点で、あらゆる酵素に適用でき、高性能な酵素固定化高分子ゲルの開発を検討する。

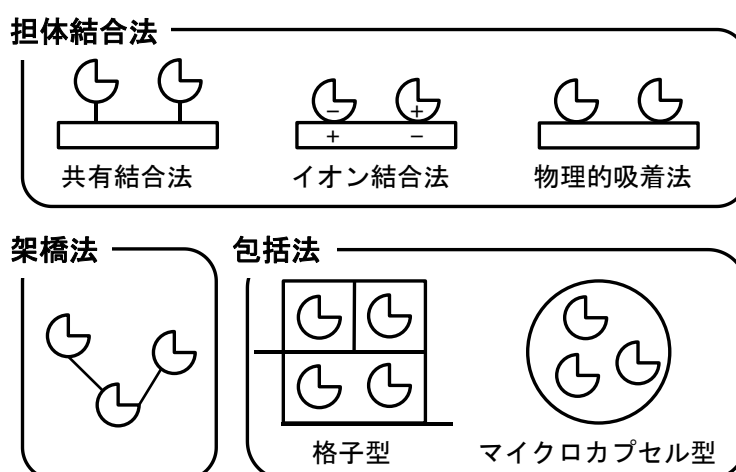


図 1-1 酵素の固定化方法の概念図

## 1.2. 多孔質高分子ゲルの固定化担体への応用

高分子ゲル中に独立孔や貫通孔をもつ多孔質ゲルを酵素の固定化担体に用いた場合、物質の極めて良好な拡散透過性により固定化酵素の見かけの反応速度が増大し、大きな比表面積をもつゲルに担体結合法で多量の酵素を導入できる。Novozymes社は、lipaseを多孔質 acrylic 樹脂上に固定化した Novozyme® 435 を販売している。酵素固定化多孔質高分子ゲルの作製手法およびその有用性に関する近年の研究報告を以下に記す。

Vaidyaらは、高分子に対して貧溶媒の cyclohexanol を用いた溶媒誘起相分離により allyl glycidyl ether (AGE) と ethylene glycol dimethacrylate (EGDM) の多孔質ゲル粒子を作製し、緩衝液を用いて lipase を含浸させて高分子網目の AGE 由来の epoxy 基と化学結合させた<sup>21)</sup>。種々の pH および温度で *p*-nitrophenyl phosphate の加水分解反応を行い、固定化酵素の活性は、どの条件においてもフリー酵素のそれよりも高かった。また、固定化酵素は、4°C で緩衝液 (pH 7) 中に 30 日置いても活性を維持し、良好な貯蔵安定性を示した。さらに、同著者は、貧溶媒に lauryl alcohol を、酵素に L-aminoacylase を用いた酵素固定化多孔質ゲル粒子も開発し (図 1-2)、固定化酵素の pH、温度、および貯蔵に対する安定性が改善したと報告した<sup>22)</sup>。

Miletićらは、高分子に対して貧溶媒の aliphatic alcohol を用いた溶媒誘起相分離により glycidyl methacrylate (GMA) と EGDM の共重合ゲルを作製し、緩衝液を用いて lipase を含浸させて高分子網目の GMA 由来の epoxy 基と化学結合させた (図 1-3)<sup>23)</sup>。*p*-nitrophenyl acetate の加水分解反応において、用いた aliphatic alcohol の炭素数の増大により引き起こされるゲルの孔径および比表面積の増大に伴い固定化酵素の活性が増大することを明らかにした。

Mengらは、magnetite 粒子表面上に water-in-oil (W/O) エマルションの水滴 (大きさは nm オーダー) を孔の鋳型とした多孔質構造の methylmethacrylate (MMA) と divinylbenzene (DVB) の共重合ゲルを作製し、緩衝液を用いて lipase を含浸させて物理吸着させた (図

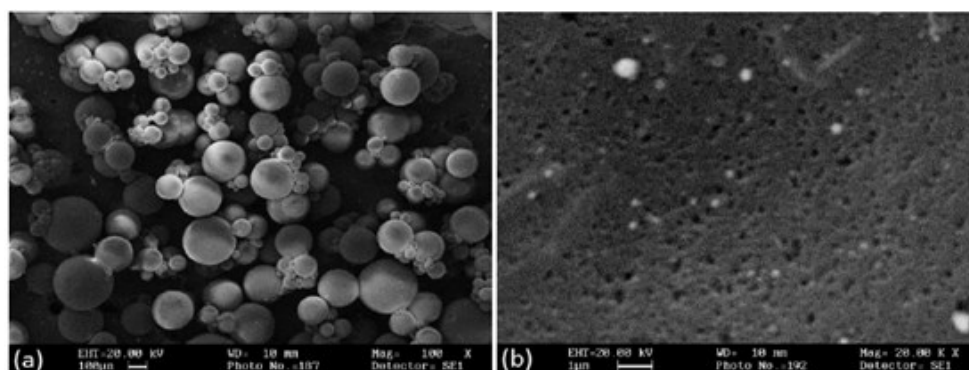


図 1-2 酵素固定化多孔質ゲル粒子の (a) 外観と (b) 表面 (孔径は数 100 nm) の SEM 写真 (文献<sup>22)</sup>より転載)



1-4) <sup>24)</sup>。 glycerol と oleic acid のエステル化反応を行い、固定化酵素は、その活性がフリー酵素のそれに比べて7倍高く、30回の繰り返し利用が可能だった。

poly(high internal phase emulsion) (poly(HIPE)) は、孔の鑄型となる油滴または水滴を分散させたエマルジョン (分散相の体積分率は約74%以上) の連続相をゲル化させて作製され、分散相同士が連結したマクロ孔を形成する多孔質ゲルである <sup>25)</sup>。 Dizgea らは、styrene (ST) と DVB から成る孔径が約10 μm の poly(HIPE) に polyglutaraldehyde (PGA) を導入し、緩衝液を用いて lipase を含浸させて PGA と共有結合させた (図1-5) <sup>26)</sup>。 種々の pH および温度で *p*-nitrophenyl palmitate と butanol の回分エステル化反応 (溶媒は水飽和 hexane)

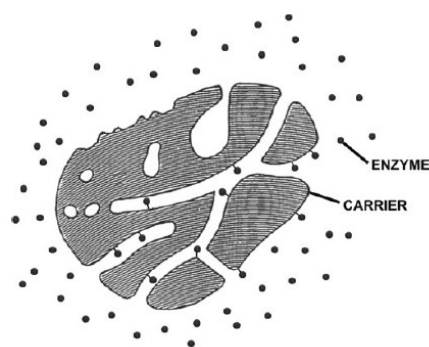


図1-3 多孔質共重合 GMA-co-EGDMA ゲルへの酵素の固定化の概念図 (文献 <sup>23)</sup> より転載)

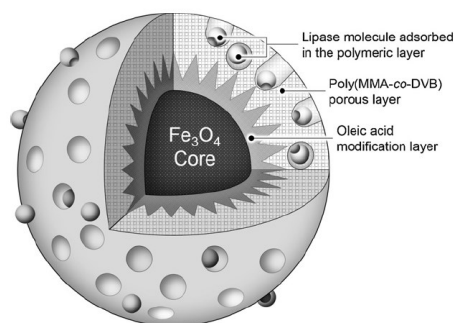


図1-4 poly(MMA-co-DVB)-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 多孔質ゲル粒子の内部構造の概念図 (文献 <sup>24)</sup> より転載)

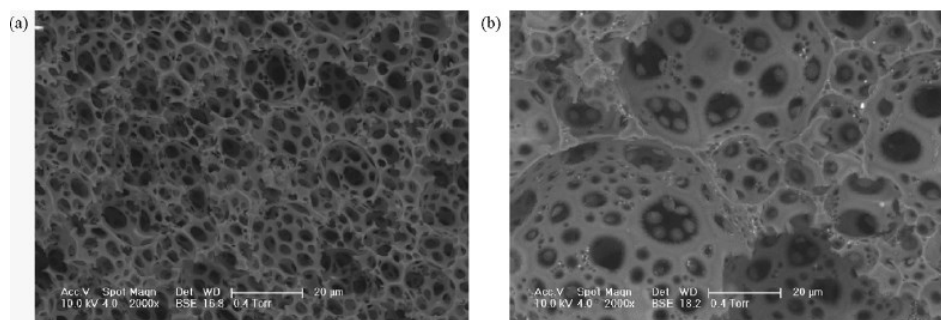


図1-5 (a) 多孔質ゲルおよび (b) 酵素固定化多孔質ゲルの SEM 写真 (文献 <sup>26)</sup> より転載)

を行い、固定化酵素の活性は、どの条件においてもフリー酵素のそれよりも高かった。また、同著者は、この固定化酵素を用いて canola oil、sunflower oil、soybean oil、および waste cooking oil からのバイオディーゼル燃料の合成に成功した<sup>27,28)</sup>。

Huang らは、poly(ST)微粒子の周りに低分子量の線状 poly(ST) (孔の鋳型) を合成し (シード重合)、さらにその周りで ST と DVB の共重合ゲルを作製し、低分子量の poly(ST) を洗浄、除去して多孔質 ST-co-DVB ゲル粒子を作製した (図 1-6)<sup>29)</sup>。これに、緩衝液を用いて lipase を含浸させて物理吸着させた。種々の温度で isooctane 中の olive oil の加水分解反応の反応速度解析を行い、固定化酵素の活性が減少する速度がフリー酵素よりも遅くなったことを明らかにした。

Petrov らは、酵素 urease を含むプレゲル溶液を -20°C で凍結させたものに紫外線を照射して N-isopropylacrylamide (NIPA) ゲルを作製し、水洗浄で氷晶を除去して μm オーダーのマクロ孔を有し、高分子網目に urease を内包した多孔質 NIPA クリオゲルを作製した (図 1-7)<sup>30)</sup>。urea の加水分解反応において、固定化酵素は、物質の良好な拡散透過性を供して、従来の酵素固定化 NIPA ハイドロゲルよりも高い活性を示した。

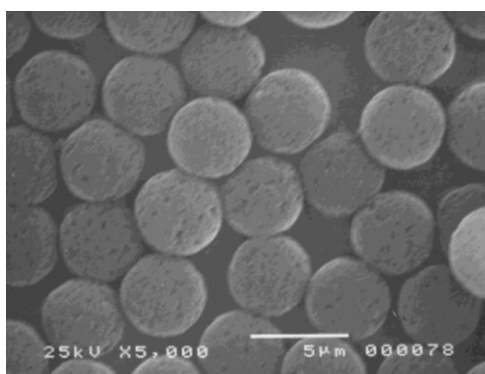


図 1-6 多孔質 ST-co-DVB ゲル粒子の SEM 写真 (文献<sup>29)</sup>より転載)

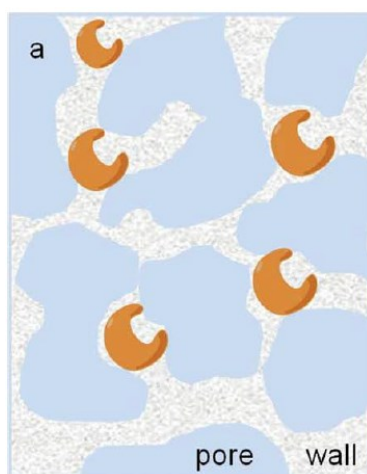


図1-7 酵素固定化多孔質クリオゲルの概念図 (文献<sup>30)</sup>より転載)

以上の文献に示されたように、多孔質ゲルへ酵素を固定化する技術として、既製のゲルへの共有結合や物理吸着、およびゲルの合成と同時に酵素を高分子網目の中へ固定化する技術がある。多孔質ゲルの合成と同時に酵素をゲル内の独立したマクロ孔内へ包括固定する技術は、文献調査した範囲では皆無だった。

### 1.3. 機能性高分子の固定化担体への応用

酵素の固定化担体に機能性高分子を適用することにより、酵素の活性の増大および熱や pH に対する安定性の改善を可能にして高性能な固定化酵素を開発できる。固定化担体に用いられている機能性高分子には、刺激応答性高分子、親水性部と疎水性部を有する共重合高分子などがある。刺激応答性高分子は、温度、pH、電場、光、などの外部環境のわずかな変化に反応して物理化学的特性（親・疎水性、膨潤特性、力学特性、拡散透過性など）が劇的に変化する<sup>31)</sup>。機能性高分子を利用した固定化酵素の作製手法およびその有用性に関する近年の研究報告を以下に記す。

Murakata らは、感温性 NIPA ゲル粒子（直径は約 60  $\mu\text{m}$ ）の合成と同時に lipase を包括固定した<sup>32)</sup>。NIPA ゲルは、約 33°C の転移温度を境にして親・疎水転移を起こして膨潤・収縮の体積相転移を起こすことが知られている<sup>33)</sup>。このゲル粒子は、転移温度以下では親水性となるために水媒体中での反応（indoxyl acetate の加水分解反応）に供することができ、転移温度以上では疎水性となるために油性媒体中での反応（dodecanol および lauric acid のエステル化反応）に供することができる。

Park らは、NIPA と acrylamide の共重合ゲル粒子（水で膨潤したゲル粒子の直径は 200–400  $\mu\text{m}$ 、転移温度は 37–40°C）の合成と同時に酵素  $\beta$ -galactosidase を包括固定した<sup>34)</sup>。充填層を用いた O-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside の連続加水分解反応において、30 および 35°C で温度スイングさせながら反応を行うとゲルの体積相転移が物質の拡散を促して（図 1-8）、30 または 35°C の一定温度で反応を行うよりも高い転化率が得られた。

Milašinović らは、NIPA と carboxy 基を有する itaconic acid (IA) の共重合ゲルの合成と同時に lipase を包括させた<sup>35)</sup>。lipase は、37°C で疎水性の NIPA 部分およびイオン性の IA 部分に吸着した。種々の pH での水媒体中の olive oil の加水分解反応を行い、固定化酵素は、pH 応答性の IA 由来の carboxy 基がゲル内の酵素の周りのマイクロ環境の pH を減少させるため、酵素の活性に対する最適 pH がフリー酵素のそれよりもアルカリ側に 1.0 シフトし、pH に対する安定性が改善された。また、この固定化酵素は、*n*-hexane 中の *n*-amyl alcohol と isobutyric acid のエステル化反応に対して 15 回の繰り返し使用が可能だった<sup>36)</sup>。

Basri らは、親水性の *N*-vinyl-2-pyrrolidone (VP) と疎水性の ST の共重合ゲルの合成過程で、プレゲル溶液の粘性が高くなったところで lipase 水溶液を添加して包括固定した<sup>37)</sup>。油性媒体中の oleic acid と butanol のエステル化反応を行い、VP と ST の物質量比が 3:7 および 5:5 のゲルが最も高い活性を示した。ST は油性の反応溶液を吸収し、VP は酵素に至

適な水環境を供した。

Bruns らは、ガラス基板上に親水性の 2-hydroxyethyl acrylate (HEA) と疎水性マクロマーの  $\alpha,\omega$ -methacryloxypropyl poly(dimethylsiloxane) (PDMS) から成る両親媒性ゲルの薄膜を光重合を用いて作製し、緩衝液を用いて酵素 horseradish peroxidase および chloroperoxidase を含浸させてゲルに包括固定した (図 1-9) <sup>38)</sup>。n-heptane 中の N,N'-dimethyl-p-phenylene diamine または tert-butyl hydroperoxide の酸化カップリング反応 (2 種類) を行い、固定化酵素の活性はフリー酵素のそれよりも 10 倍以上高かった。ゲル中の親水性部と疎水性部は、ナノ相分離していた。疎水性部は油性媒体で膨潤してゲル中の反応物質に良好な拡散透過性を供し、酵素を包括した親水性部が収縮して酵素の漏出を防いだ。

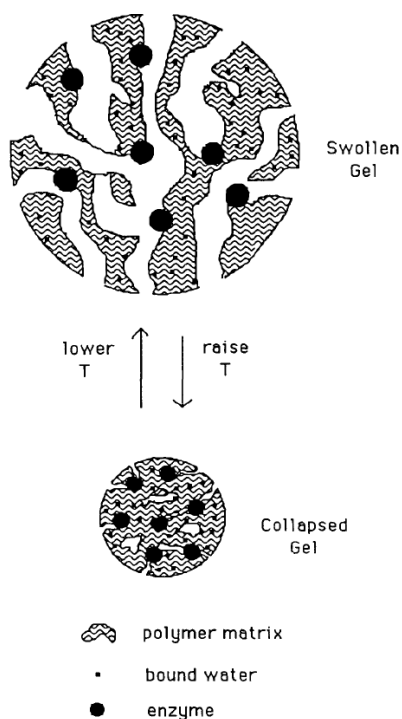


図 1-8 酵素固定化ゲルの温度変化に伴う膨潤収縮挙動の概念図 (文献 <sup>34)</sup>より転載)

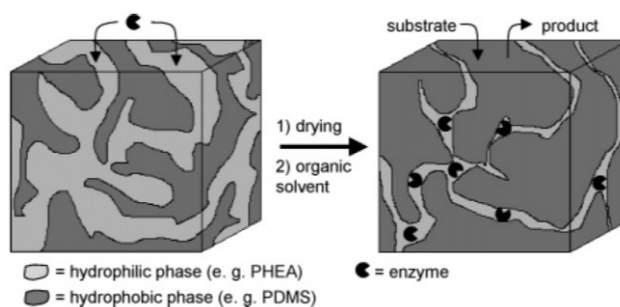


図 1-9 ナノ相分離した酵素固定化両親媒性ゲルの概念図 (文献 <sup>38)</sup>より転載)

Zhang らは、pyrolytic graphite 電極表面に電解重合を用いて poly(4-vinylpyridine) (P4VP) 薄膜を作製し、その上に *N,N'*-diethylacrylamide (DEA) ゲルの合成と同時に酵素 glucoseoxidase (GOD) を包括固定した<sup>39)</sup>。P4VP は、pH 応答性 (酸解離定数は 4.5) があり、カオトロピックの ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>アニオンと特異的に静電相互作用をする。DEA ゲルは、温度変化 (相転移温度は 32°C) またはコスモトロピックの SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>アニオンの添加により体積相転移する。固定化酵素は、1,1'-ferrocenedicarboxylic acid 緩衝液中の glucose の酸化反応を種々の刺激 (pH、ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>濃度、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>濃度、または温度の変化) で on-off 制御でき、バイオセンサーとして利用できる (図 1-10)。

Arica らは、2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) と GMA の共重合ゲル膜の表面に chitosan (CH) を GMA 由来の epoxy 基と CH の amine 基の共有結合によりグラフトし、CH に Fe(III) イオンを配位結合させて、緩衝液を用いて酵素 glucose oxidase を含浸して Fe(III) に強固に多量に物理吸着させた (図 1-11)<sup>40)</sup>。glucose の酸化反応を行い、固定化酵素は、フリー酵素よりも pH および熱安定性が改善された。

以上の文献に示されたように、機能性高分子を利用して固定化酵素の活性の改善や反応の on-off 制御のような特殊な機能の発現が達成されている。今後、機能性高分子を利用した新しい概念の酵素の固定化技術、および高性能化や特殊な機能を発現する応用技術の開発が期待される。

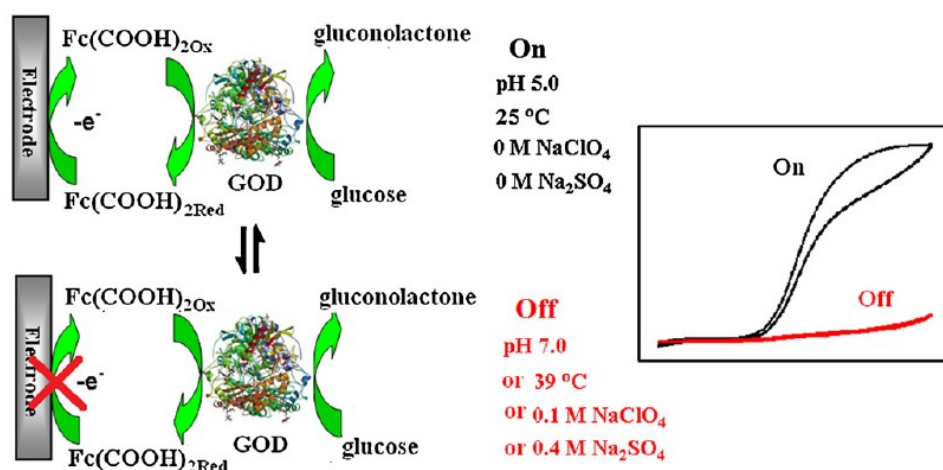


図 1-10 刺激応答性酵素固定化ゲルを用いた glucose の酸化反応の on-off 制御の概念図 (文献<sup>39)</sup>より転載)

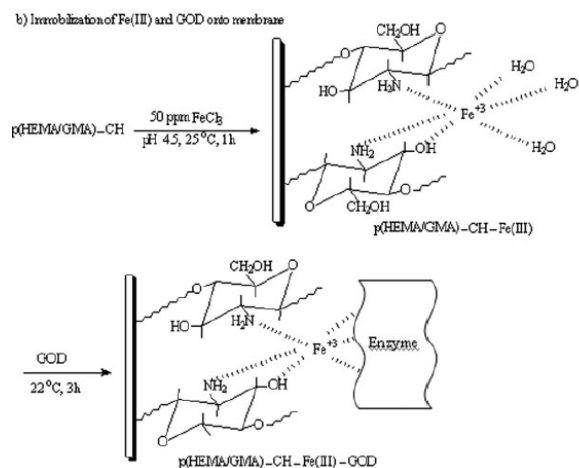


図 1-11 CH をグラフトした HEMA-co-DMA ゲル膜に配位させた Fe(III) への酵素の固定化の概念図 (文献<sup>40</sup>)より転載)

#### 1.4. 本論文の構成

図 1-12 に、本研究の目的および本論文の構成図を示す。本研究では、高分子ゲルの多孔質構造の制御および機能性高分子の適用の 2 つの観点から、高性能な酵素固定化高分子ゲルを開発する。酵素の固定化手法に着目し、酵素を温和な条件で固定化してその失活を最小限に留め、反応への適用時には固定化酵素の活性が最大限に発現できる酵素の新規な包括固定法を提案する。多孔質構造の制御では、孔の鑄型となる、油滴、水滴、およびマイクロカプセルを介して多孔質ゲルの合成と同時に独立したマクロ孔に酵素を包括できる新規な固定化技術を開発する。機能性高分子の適用では、両親媒性モノマーと親水性モノマーを用いて、油性媒体中の酵素反応でもゲル内の酵素に至適な水環境を供する酵素固定化両親媒性ゲルを開発する。本論文は 7 つの章から成り、各章の概要を以下に述べる。

第 1 章では、酵素の固定技術と工業的な応用、特に、近年の多孔質ゲルおよび機能性ゲルを担体に用いた固定化酵素に関する研究を調査してまとめた。

第 2 章では、O/W エマルションゲル化法を用いて多孔質ハイドロゲルの合成と同時に油滴を介して酵素 lipase を重合反応場に曝すことなくその孔の中に包括固定した新規な酵素固定化多孔質 poly(ethylene glycol) methyl ether acrylate (PEGMEA) ハイドロゲルを開発する。酵素固定化多孔質ゲルの triacetin の加水分解反応特性を評価し、フリー酵素および酵素固定化均質ゲルと性能比較する。

第 3 章では、2 章の O/W エマルションゲル化法の油と水の役割を逆転させた W/O エマルションゲル化法を用いて、多孔質オルガノゲルの合成と同時に水滴を介して lipase を重合反応場に曝すことなくその孔の中に包括固定し、油性媒体中で使用できる酵素固定化多孔質 2-ethylhexylacrylate オルガノゲルを開発する。酵素固定化多孔質オルガノゲルの propylacetate と 1-pentanol のエステル交換反応特性を評価し、フリー酵素と性能比較する。

第4章では、サスペンションゲル化法を用いて calcium alginate マイクロカプセルを内包または鋳型とし、線状 poly(NIPA)を添加することで semi-IPN 構造と呼ばれる NIPA 複合ハイドロゲルおよび多孔質ハイドロゲルを作製する。ゲルの構造と膨潤および力学的特性の関係性を解明する。

第5章では、4章のサスペンションゲル化法を応用して、多孔質ハイドロゲルの合成と同時にマイクロカプセルを介して lipase を重合反応場に曝すことなくその孔の中に包括固定した酵素固定化複合および多孔質 polyethylene glycol diacrylate ゲル粒子を開発する。酵素固定化多孔質ゲルの *p*-nitrophenyl acetate の加水分解反応特性を評価し、フリー酵素と性能比較する。

第6章では、ゲルの合成（溶媒は水）と同時にゲル内に酵素 lipase を分散して固定化でき、油性媒体中の反応に適用でき、さらに lipase へ至適な水環境を提供できる NIPA-co-PEGMEA ゲル (NIPA; *N*-isopropylacrylamide) を開発する。酵素固定化ゲルの oleic acid と ethanol のエステル化反応特性を評価し、フリー酵素と性能比較する。

第7章では、本研究で開発した酵素固定化高分子ゲルの成果と今後の展望をまとめる。

# 本研究の目的

多孔質構造の制御と機能性高分子の適用の2つの観点から、高性能な酵素固定化高分子ゲルを開発

- ・フリー酵素と同等以上の見掛けの反応速度
- ・酵素の失活や漏出のない長期の繰り返し利用が可能



従来法  
✓ 結合法：高分子ゲルの合成後に酵素を固定化  
✓ 包括法：ハイドロゲルの合成と同時の酵素の固定化  
酵素をゲルの合成と同時に**多孔質ゲルの孔**および**オルガノゲル**に包括固定した研究例はない

水媒体中の酵素反応および油性媒体中の酵素反応のそれぞれに適用できる**多孔質ゲル**および**オルガノゲル**（酵素反応適用時）の合成と同時に酵素を包括固定する技術を提案・確立

## 本論文の構成

### 水媒体中の酵素反応に利用

従来の酵素の包括固定の課題：ゲル合成時の酵素の失活  
目標：多孔質ハイドロゲルの合成と同時に酵素を失活させることなくゲルのマクロ孔に包括固定すること

O/Wエマルションゲル化法（孔の鑄型は油滴）を用いた酵素固定化多孔質ハイドロゲルの開発（第2章）

↓ 酵素の固定化手法をより温和に行えるように

サスペンションゲル化法（孔の鑄型はマイクロカプセル）を用いた酵素固定化多孔質ハイドロゲルの開発（第4, 5章）

### 油性媒体中の酵素反応に利用

従来の酵素の包括固定の課題：オルガノゲルの合成と同時の固定化の技術は皆無  
目標：水溶性の酵素を分散してオルガノゲルに固定すること

W/Oエマルションゲル化法（孔の鑄型は水滴）を用いた酵素固定化多孔質オルガノゲルの開発（第3章）

両親媒性モノマーと親水性モノマーと用いた酵素固定化両親媒性共重合ゲルの開発（第6章）

#### 多孔質構造の制御

- 新規性  
✓ 多孔質ゲルの合成と同時のマクロ孔への酵素の包括固定
- 特長  
✓ 孔の鑄型が重合反応時の酵素の失活を防ぐ  
✓ 基質および生成物の良好な拡散透過性を供する

#### 機能性高分子の適用

- 新規性  
✓ 開発する材料そのもの
- 特長  
✓ 合成時はハイドロゲルなので酵素を分散して固定  
✓ 酵素反応時は酵素の分散を維持したままオルガノゲルに変化する

図 1-12 本研究の目的および本論文の構成図

### 引用文献

- 1) V. R. Murty, J. Bhat, P. K. A. Muniswaran, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 7, 57-66 (2002)
- 2) E. R. Riegel, J. A. Kent, *Riegel's Handbook of Industrial Chemistry*. 10th Edition, Springer, Berlin (2003)



- 3) 吉田隆, バイオプロセスハンドブックーバイオケミカルエンジニアリングの基礎から有用物質生産・環境調和技術までー, エヌ・ティー・エス (2007)
- 4) S. Kanaya, C. Katsuda, S. Kimura, T. Nakai, E. Kitakuni, H. Nakamura, K. Katayanagi, K. Morikawa, M. Ikehara, *J. Biol. Chem.*, 266, 6038-6044 (1991)
- 5) T. Imakawa, M. Shibasaki, M. Takagi, *Nature*, 324, 695-697 (1986)
- 6) K. A. Brown, P. BRICK, D. M. Blow, *Nature*, 326, 416-418 (1987)
- 7) W. Mandecki, M. A. Shallcross, J. Sowadski, S. T. Allen, *Protein Eng.*, 4, 801-804 (1991)
- 8) K. Chen, F. H. Arnold, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 5618-5622 (1993)
- 9) 稲田祐二, 前田浩, 和田博, タンパク質ハイブリッド, I, II, III 巻, 共立出版 (1987, 1988, 1990)
- 10) 江崎グリコ株式会社ホームページ  
[http://www.ezaki-glico.com/release/20050208/index\\_2.html](http://www.ezaki-glico.com/release/20050208/index_2.html) (2015年12月3日)
- 11) Novozymes 社ホームページ  
<http://www.novozymes.com/en/news/news-archive/Pages/New-enzyme-technology-converts-waste-oil-into-biodiesel.aspx> (2015年12月3日)
- 12) 千畑一郎, 固定化酵素, 講談社 (1975)
- 13) 田中渥夫, 松野隆一, 酵素工学概論, コロナ社 (1995)
- 14) E. M. Sánchez, J. F. Bello, M. G. Roig, F. J. Burguillo, J. M. Moreno, J. V. Sinisterra, *Enzyme Microb. Technol.*, 18, 468-476 (1996)
- 15) A. Prošková, Z. Kopicová, J. Kučera, L. Škarková, *Res. Agr. Eng.*, 56, 122-125 (2010)
- 16) H. Jaladi, A. Katiyar, S. W. Thiel, V. V. Guliants, N. G. Pinto, *Chem. Eng. Sci.*, 64, 1474-1479 (2009)
- 17) H. Gustafsson, E. M. Johansson, A. Barrabino, M. Odén, K. Holmberg, *Colloids Surf., B*, 100, 22-30 (2012)
- 18) Z. Knezevic, N. Milosavic, D. Bezbradica, Z. Jakovljevic, R. Prodanovic, *Biochem. Eng. J.*, 30, 269-278 (2006)
- 19) F. A. Quioco, F. M. Richards, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 52, 833-839 (1964)
- 20) M. Iso, *Membrane*, 18, 220-227 (1993)
- 21) B. K. Vaidya, G. C. Ingavle, S. Ponrathnam, B. D. Kulkarni, S. N. Nene, *Bioresour. Technol.*, 99, 3623-3629 (2008)
- 22) B. K. Vaidya, G. C. Ingavle, S. Ponrathnam, S. N. Nene, *React. Funct. Polym.*, 72, 687-694 (2012)
- 23) N. Miletić, Z. Vuković, A. Nastasović, K. Loos, *Macromol. Biosci.*, 11, 1537-1543 (2011)
- 24) X. Meng, G. Xu, Q. L. Zhou, J. P. Wu, L. R. Yang, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 89, 89-92 (2013)
- 25) N. R. Cameron, D. C. Sherrington, *Adv. Polym. Sci.*, 126, 165-214 (1996)

- 26) N. Dizgea, B. Keskinlera, A. Tanriseven, *Colloids. Surf., B*, 66, 34-38 (2008)
- 27) N. Dizgea, B. Keskinlera, A. Tanriseven, *Biochem. Eng. J.*, 44, 220-225 (2009)
- 28) N. Dizgea, C. Aydinler, D. Y. Imer, M. Bayramoglu, A. Tanriseven, B. Keskinler, *Bioresour. Technol.*, 100, 1983-1991 (2009)
- 29) F. C. Huang, C. H. Ke, C. Y. Kao, W. C. Lee, *J. Appl. Polym. Sci.*, 80, 39-46 (2001)
- 30) P. Petrov, S. Pavlova, C. B. Tsvetanov, Y. Topalova, R. Dimkov, *J. Appl. Polym. Sci.*, 122, 1742-1748 (2011)
- 31) E. S. Gil, S. M. Hudson, *Prog. Polym. Sci.*, 29, 1173-1222 (2004)
- 32) T. Murakata, X.B. Liu, S. Sato, *J. Chem. Eng. Jpn.*, 26, 681-685 (1993)
- 33) Y. Hirokawa, T. Tanaka, *J. Chem. Phys.*, 81, 6379-6380 (1984)
- 34) T. G. Park, A. S. Hoffman, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 19, 1-9 (1988)
- 35) N. Milašinović, J. Filipović, Z. K. Jugović, M. K. Krušić, *React. Funct. Polym.*, 70, 807-814 (2010)
- 36) N. Milašinović, Z. K. Jugović, Z. Jakovljević, J. Filipović, M. K. Krušić, *Chem. Eng. J.*, 181-182, 614-623 (2012)
- 37) M. Basri, A. Harun, M. B. Ahmad, C. N. A. Razak, A. B. Salleh, *J. Appl. Polym. Sci.*, 82, 1404-1409 (2001)
- 38) N. Bruns, J. C. Tiller, *Nano. Lett.*, 5, 45-48 (2005)
- 39) K. Zhang, Y. Liang, D. Liu, H. Liu, *Sens. Actuators, B*, 173, 367-376 (2012)
- 40) M. Y. Arica, M. Yilmaz, G. Bayramoğlu, *J. Appl. Polym. Sci.*, 103, 3084-3093 (2007)

## 2 章 O/W エマルションゲル化法を用いた酵素固定化多孔質ハイドロゲルの作製と加水分解反応特性

### 2.1. 緒言

当研究室では、油相を分散させた状態でモノマーを含む水相をゲル化させる oil-in-water (O/W) エマルションゲル化法を開発し、新規なゲルの形態であるエマルションゲルを作製している (図 2-1) <sup>1)</sup>。エマルションゲルとは、均質構造のハイドロゲル内部に、分散した微小油滴を含むものである。当研究室では、高分子に poly(*N*-isopropylacrylamide) を、油相に oleyl alcohol を用いた系のエマルションゲルの作製実績がある。そして、エマルションゲル内の分散した油相を洗浄除去して多孔質ハイドロゲルを作製しており、油滴が多孔質ゲルの内部の孔の鑄型となったことを確認した (図 2-1)。さらに、エマルションの作製条件 (油相の体積分率、界面活性剤濃度、攪拌条件など) を変えることで、油滴の大きさとその体積分率を幅広い範囲で制御できることを明らかにした (数十 nm–数百 μm の油滴) <sup>2)</sup>。この種のゲルの内部の油滴または孔を、分離・反応・貯蔵の場として活用する機能性材料の開発およびその応用展開が期待でき、当研究室では、以下の研究実績がある。油滴を分離の場として利用した例として、油滴に油溶性錯化剤 (抽出剤) を使用することで、水溶液中から金属イオンを固相抽出する吸着材を開発した <sup>3,4)</sup>。油滴を貯蔵の場として利用した例として、油滴に薬物を貯蔵充填し、温度変化で感温性ゲル相における薬物の拡散を制御する薬物徐放材料を開発した <sup>5)</sup>。

本研究では、O/W エマルションゲル化法を用いて作製される多孔質ゲルを酵素固定化担体として利用することを提案する。具体的には、油滴に酵素を内包させてエマルションゲルを合成し、その油滴を洗浄除去して多孔質ゲルの合成と同時に酵素をゲルのマクロ孔内に包括固定する。従来の均質ゲルの合成と同時に酵素を包括固定する方法では、酵素が重合反応場に曝さらされてラジカルなどの化学種と接触して失活しうる <sup>6,7)</sup>。O/W エマルションゲル化法では、油滴が重合反応時の化学種などから酵素を保護すると考える。また、既製のゲルへの酵素の固定化は、均質と多孔質の構造によらず物理吸着または glutaraldehyde などを用いた化学的な結合によりなされる。酵素は、このような高分子との相互作用で失活する恐れがある <sup>8)</sup>。O/W エマルションゲル化法では、孔内の酵素は高分子との相互作用なしに自由な立体配置を取ることができうる、つまり水中のフリー酵素と同様の状態であるためにフリー酵素に匹敵する活性を有すると考える。さらに、提案する手法では、あらゆる種類の高分子が適用可能、プロセスに適合する形状のゲルが作製可能、および基質および生成物の良好な拡散透過性の利点があるといえる。

本研究の目的は、O/W エマルションゲル化法を用いた新規な酵素固定化多孔質ゲルを開発すること、および固定化酵素反応での多孔質構造の優位性を明らかにすることである。

モデル実験系は poly(ethylene glycol) methyl ether acrylate (PEGMEA) ゲル (図 2-2) および油脂分解酵素の lipase による triacetin の加水分解反応とした。ゲルの内部構造を走査型電子顕微鏡 (scanning electron microscope; SEM) および共焦点レーザー顕微鏡 (confocal laser scanning microscope; CLSM) を用いて観察した。

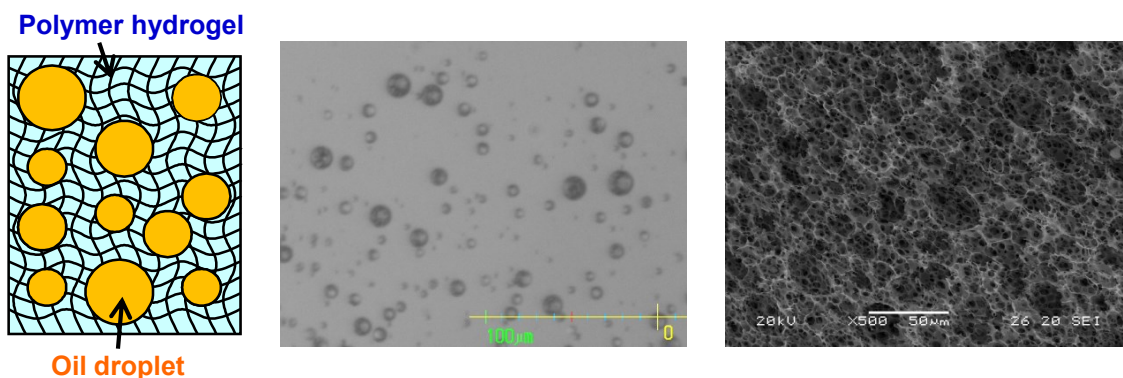


図 2-1 エマルションゲルの概念図と oleyl alcohol を内包した poly(*N*-isopropylacrylamide) ゲル (油相の体積分率 $\phi_{oil} = 0.5$ ) のプレゲルエマルションの実体顕微鏡写真 (左) および油滴を洗浄除去した多孔質ゲルの走査型電子顕微鏡写真 (右) (写真は文献<sup>1)</sup>より転載)

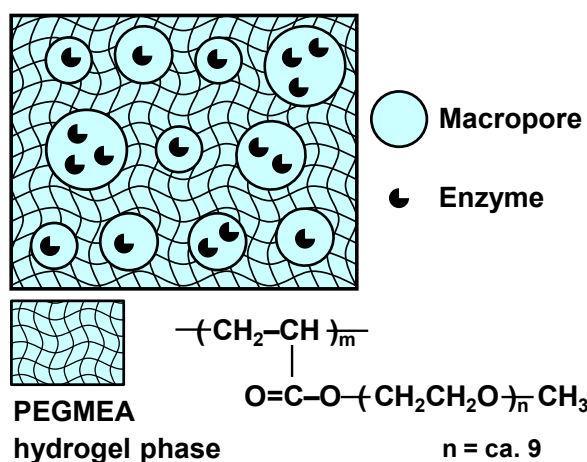


図 2-2 酵素固定化多孔質 PEGMEA ゲルの概念図

## 2.2. 実験方法

### 2.2.1. 酵素固定化多孔質 PEGMEA ゲルの作製

溶媒には pH 7 のリン酸緩衝液 (1/15 kmol/m<sup>3</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 水溶液と 1/15 kmol/m<sup>3</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 水溶液の質量比が 3:2 の混合液) を用いた。モノマーの PEGMEA、架橋剤の *N,N'*-methylenebisacrylamide (MBAA)、および重合促進剤の *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED) を含むモノマー水溶液 7.2 cm<sup>3</sup> を試験管に調製した。重合開始剤の ammonium peroxodisulfate (APS) を含む開始剤水溶液 5 cm<sup>3</sup> をメスフラスコ

に調製した。最終の水相（プレゲル水溶液）の組成は PEGMEA:MBAA:TEMED:APS = 500:100:10:1 mol/m<sup>3</sup>とした。100 kg/m<sup>3</sup>-oil の polyoxyethylene(20) sorbitan monolaurate (Tween 20; HLB 値 16.7) および種々の濃度 (27.5、55.0、137.5、および 275 kg/m<sup>3</sup>-oil) の lipase 試薬を含む oleyl alcohol 溶液 3 cm<sup>3</sup> を試験管に調製した。lipase 試薬には天野エンザイム株式会社製 Lipase PS Amano SD (lipase (約 10%) と dextrin (約 90%) の混合物) を用いた。モノマー水溶液および oleyl alcohol 溶液を 20°C で、開始剤水溶液を室温でそれぞれ 1 h 窒素パージした。その後、マイクロピペットを用いて oleyl alcohol 溶液 2 cm<sup>3</sup> をモノマー水溶液上部に加え、開始剤水溶液 0.8 cm<sup>3</sup> を下層の水相部分に注射器で注入した。油相の体積分率 $\phi_{oil}$ を 0.2 とした。試験管ミキサーを用いて 30 sec 攪拌し、O/W エマルションを作製した。作製したエマルションを内径 6 mm のテフロン管に仕込み、30°C で 24 h 静置してフリーラジカル重合によりゲル化させた。ゲルを取出し、disc 状 ( $\phi 6 \times 2$  mm) に切り分けた。ゲルを変性 ethanol に浸して 1 日毎の溶媒の交換を 5 回行い、次いで水を用いた半日毎の溶媒の交換を 5 回行い洗浄した。

同様の方法で、種々の濃度 (5.5、11.0、27.5、および 55.0 kg/m<sup>3</sup>-gel) の lipase 試薬を用いた酵素固定化均質ゲルを作製した。

APS および lipase を含まないプレゲル O/W エマルションを水に少量垂らし、油滴径を実体顕微鏡 (Nikon 社製 SMZ1500) で観察した。一連の操作は室温で行った。

### 2.2.2. ゲルの内部構造の観察

室温の水で膨潤した多孔質ゲル (酵素無しの条件で合成して水洗浄したもの) を液体窒素で凍結した。凍結ゲルをテフロンシート上に置き、真空定温乾燥器 (EYELA 社製 VOS-201SD) に入れ、真空ポンプ (ULVAC 社製 DTC-22、排気速度 0.02 m<sup>3</sup>/min (50Hz)、到達真空度  $1.0 \times 10^3$  Pa) を用いて 4 h 以上真空引きして乾燥させた。そして、真空ポンプを止めて、その圧力で一晚ゲルを置いた。得られた乾燥ゲルを裂き、その破断面に Pt/Pd を 15kV で 120 sec 蒸着させた試料を SEM (philips 社製 XL-30) で観察した。一連の操作は室温で行った。

エマルションゲル内部の酵素の分布を観察するために fluorescein-4-isothiocyanate-I (FITC) で蛍光標識した lipase (FITC-labeled lipase) を以下の方法で作製した。40 kg/m<sup>3</sup> lipase 試薬および 0.1 kg/m<sup>3</sup> FITC を含む sodium bicarbonate 緩衝液 (0.06 mol/m<sup>3</sup> sodium carbonate および 1 mol/m<sup>3</sup> sodium bicarbonate を含む水溶液、pH 9) 50 cm<sup>3</sup> をアルミホイルで包んだガラス製バイアルに調製し 10°C で 12 h 緩やかに攪拌した。この黄色で透明な溶液に約 150 cm<sup>3</sup> の acetone を加えて黄色の懸濁液を得た。これを、3500 rpm で 90 min 遠心分離し、デカンテーションした残渣の高粘度の塊 (大きさは数 cm、チューイングガム状) を回収した。完全に乾燥した粉末を得るために、まず残渣を約 40 cm<sup>3</sup> の水に再溶解させて、シャーレ上に敷いた食品用ラップフィルム上に薄く広げた。そして、40°C で真空乾

燥し、溶媒を完全に揮発させて黄色のフィルム状の固体を得た。これを乳鉢ですりつぶして黄色の粉末状の FITC-labeled lipase を得た。FITC-labeled lipase を用いて酵素固定化エマルジョンゲルを作製し、その内部構造を CLSM (Carl Zeiss 社製 LSM710 NLO 2 フォトン) で 480 nm の Ar レーザーを用いて観察した。

### 2.2.3. triacetin の加水分解反応実験

酵素反応実験は回分操作で行った。ガラス製バイアルに  $1/15 \text{ kmol/m}^3$  リン酸緩衝液 (pH 7)  $49 \text{ cm}^3$  と種々の酵素固定化ゲル (均質ゲルおよび多孔質ゲル、 $\phi 6 \times 2 \text{ mm}$ ) 20 個 (lipase 試薬 6.2 mg 相当) を仕込んだ。ゲルと攪拌子の接触によるゲルの破壊を防ぐため、ゲルを網で作製した籠に入れた。バイアルに  $1 \text{ cm}^3$  (1.15 g) の triacetin を注入して  $37^\circ\text{C}$  で酵素反応を開始した。所定時間に採取した溶液  $1 \text{ cm}^3$  を  $0.01 \text{ kmol/m}^3$  NaOH 水溶液 (実験日ごとに正確な濃度を  $0.01 \text{ kmol/m}^3$  HCl 水溶液を用いた中和滴定から求めた) で滴定して acetic acid の濃度を求め、triacetin の acetic acid への転化率を求めた。ここで、検量線は、 $0.01 \text{ kmol/m}^3$  NaOH 水溶液を用いた  $0-0.1 \text{ kmol/m}^3$  acetic acid 溶液 (溶媒は  $1/15 \text{ kmol/m}^3$  リン酸緩衝液)  $1 \text{ cm}^3$  の中和滴定により作成した。酵素反応実験後のゲルを回収し、表面を軽く拭いてから新たな反応溶液に浸して繰り返し酵素反応実験を行った。同様の方法で、種々の酵素濃度 (5.5、11.0、27.5、および  $55.0 \text{ kg/m}^3\text{-gel}$ ) の条件で作製したゲルを用いた酵素反応実験も行った。このとき、酵素反応実験系の酵素量が各実験で同じになるように、ゲルの個数を調節した。同様の方法で、フリー酵素反応実験も行った (lipase 試薬 6.2 mg)。

## 2.3. 結果および考察

### 2.3.1. エマルジョンの油滴径およびゲルの内部構造

図 2-3 に、プレゲルエマルジョン (開始剤はなし) 中の油滴の実体顕微鏡写真、凍結乾燥した多孔質ゲルの破断面の SEM 写真、および FITC-labeled lipase を用いた酵素固定化エマルジョンゲルの CLSM 画像を示す。エマルジョン中の油滴径は  $1-15 \mu\text{m}$  であった。多孔質ゲルの孔径は、エマルジョンの油滴径と同程度だった。CLSM 画像から FITC で蛍光染色した酵素を示す緑色に蛍光した球状の部分が確認できた。その直径は、油滴径および孔径と同程度であった。これらの結果から、エマルジョンの油滴が多孔質ゲルのマクロ孔のための鋳型として作用し、マクロ孔内へ酵素が包括固定されたことが示された。

### 2.3.2. 酵素反応特性

図 2-4 に、フリー酵素、酵素固定化均質ゲル、および酵素固定化多孔質ゲルを用いた  $37^\circ\text{C}$  での酵素反応実験における triacetin の転化率の経時変化を示す。フリー lipase の転化率は 48 h で 32.6% に達し、約 40% で平衡に達した (400 h)。Lipase PS Amano SD の最適 pH は、7.0-8.0 である。本酵素反応系では  $1/15 \text{ kmol/m}^3$  リン酸緩衝液 (pH 7) を用いたが、acetic acid の生成により pH が低下した (8 h で pH 5、400 h で pH 4.2)。この pH の低下により lipase

が失活し、転化率が 100%に到達しなかったと考えられる。酵素を含まない実験系では、48 h の triacetin の転化率は酵素反応溶液中のゲルの有無によらず約 3%だった。多孔質ゲルに固定化された酵素の活性は、フリー酵素に匹敵する高い活性を示した。エマルションゲル化法により作製された多孔質ゲルが基質と生成物の良好な拡散透過性を供し、包括固定された酵素がフリー酵素に匹敵する活性を発現したと考えられる。一方、均質ゲルに固定化された酵素の活性は、非常に低かった。酵素固定化均質ゲルの反応速度が低い理由として、lipase が重合反応場に曝されて変性し失活したこと、および酵素が高分子網目に疎密を生じさせて lipase が漏出したことが考えられる。

図 2-5 に、酵素固定化均質ゲルおよび酵素固定化多孔質ゲルを用いた 37°C での繰り返し酵素反応実験における triacetin の転化率の経時変化を示す。4 回の繰り返し酵素反応実

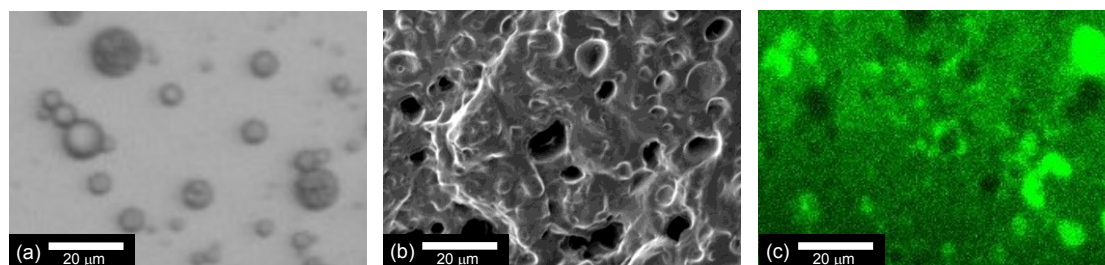


図 2-3 (a) プレゲルエマルション（開始剤はなし）中の油滴の実体顕微鏡写真、(b) 凍結乾燥した多孔質ゲルの破断面の SEM 写真、および (c) FITC-labeled lipase を用いた酵素固定化エマルションゲルの CLSM 画像

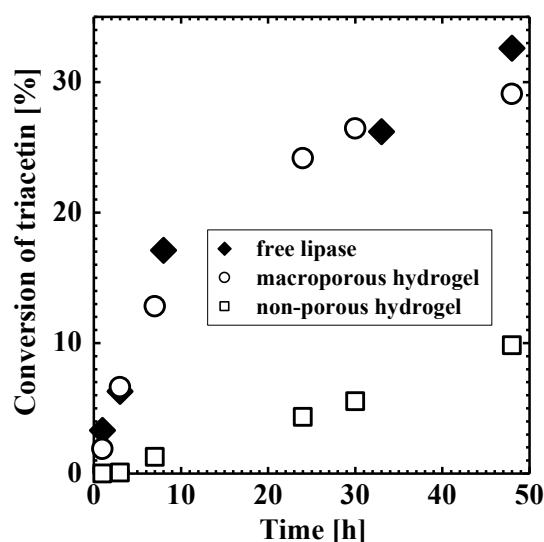


図 2-4 フリー酵素、酵素固定化均質ゲル、および酵素固定化多孔質ゲルを用いた 37°C での酵素反応実験における triacetin の転化率の経時変化

験で均質ゲルおよび多孔質ゲルともに固定化酵素は活性を維持した。固定化された酵素は、繰り返し利用してもゲルからほとんど漏出しないと考えられる。

triacetin の加水分解反応の繰り返し利用に関する既往の研究結果を示す。Hernandez らは、octadecyl 基を有するアクリル樹脂の Sepabeads EC-OD に物理吸着させた *Rhizomucor miehei* lipase を用いて 22°C で 5 回の繰り返し反応（1 回の反応は 70 min）を行い、繰り返し利用しても活性を維持したと報告した<sup>9)</sup>。Yang らは、carboxyl-functionalized ionic liquid で修飾したメソポーラスシリカ（SBA-15）に共有結合させた *Porcine pancreas* lipase（PPL）を用いて 35°C で 5 回の繰り返し反応（1 回の反応は 10 min）を行い、5 回の繰り返し利用で活性が 55.2% に減少したと報告した<sup>10)</sup>。Xu らは、(3-aminopropyl) triethoxysilane で修飾した SBA-15 に共有結合させた PPL を用いて 35°C で 5 回の繰り返し反応（1 回の反応は 10 min）を行い、5 回の繰り返し利用で活性が 49.2% に減少したと報告した<sup>11)</sup>。Li らは、ファイバー状の SBA-15 に物理吸着させた PPL を用いて 35°C で 5 回の繰り返し反応（1 回の反応は 10 min）を行い、5 回の繰り返し利用で活性が 40% に減少したと報告した<sup>12)</sup>。Zou らは、ionic liquid で修飾した SBA-15 に物理吸着させた PPL を用いて 36°C で 6 回の繰り返し反応（1 回の反応は 10 min）を行い、6 回の繰り返し利用で活性が 35% に減少したと報告した<sup>12)</sup>。本研究の酵素固定化多孔質ゲルは、day オーダーの 4 回の繰り返し利用で活性を維持したため、繰り返し利用性能が十分高いと考える。

ゲル中の酵素の濃度をその活性が低下しない範囲で高くできれば、ゲル体積あたりの活性を高くでき酵素反応プロセスがより良いものとなる。図 2-6 に、種々の酵素濃度の酵素固定化均質ゲルおよび酵素固定化多孔質ゲルを用いた 37°C での繰り返し酵素反応実験における triacetin の転化率の経時変化を示す。lipase 試薬濃度が 5.5、11.0、27.5、および 55.0 kg/m<sup>3</sup>-gel のゲルは、実験系の lipase 試薬量が 6.2 mg となるように、それぞれ 20、10、4、および 2 個を用いた。均質ゲルの反応速度は、ゲル中の酵素濃度によらず同程度だった。多孔質ゲルの反応速度は、ゲル中の酵素濃度の増大、すなわちゲルの個数の減少に伴い減少した。ゲルの総表面積の減少により、単位時間あたりに基質と接触する lipase 量が減少し、見かけの反応速度が減少したと考えられる。

## 2.4. 結言

新規な酵素の包括法の技術として O/W エマルションゲル化法を提案し、それを用いて多孔質ゲルの合成と同時に酵素を重合反応場に曝すことなくその孔の中に包括固定した酵素固定化多孔質 PEGMEA ハイドロゲルを作製できることを実証した。lipase による triacetin の加水分解反応をモデルとして、このゲルの酵素反応への適用可能性を検討し、以下の知見を得た。

- 1) エマルションおよびゲルの顕微鏡観察から、油滴がゲルの孔の鑄型となり、その孔内



へ酵素が包括固定されたことが示された。

- 2) 酵素固定化多孔質ゲルの反応速度は、フリー酵素のそれと同程度であり、酵素固定化均質ゲルのそれと比べて極めて速かった。多孔質構造が基質および生成物に良好な拡散透過性を供したこと（多孔質構造の優位性）が示された。
- 3) 酵素固定化ゲルは、繰り返し利用できる。
- 4) 多孔質ゲル内の酵素濃度を増加させると、プロセスに供するゲルの体積を減らすことができるが、単位酵素質量あたりの反応速度が低下しうる。

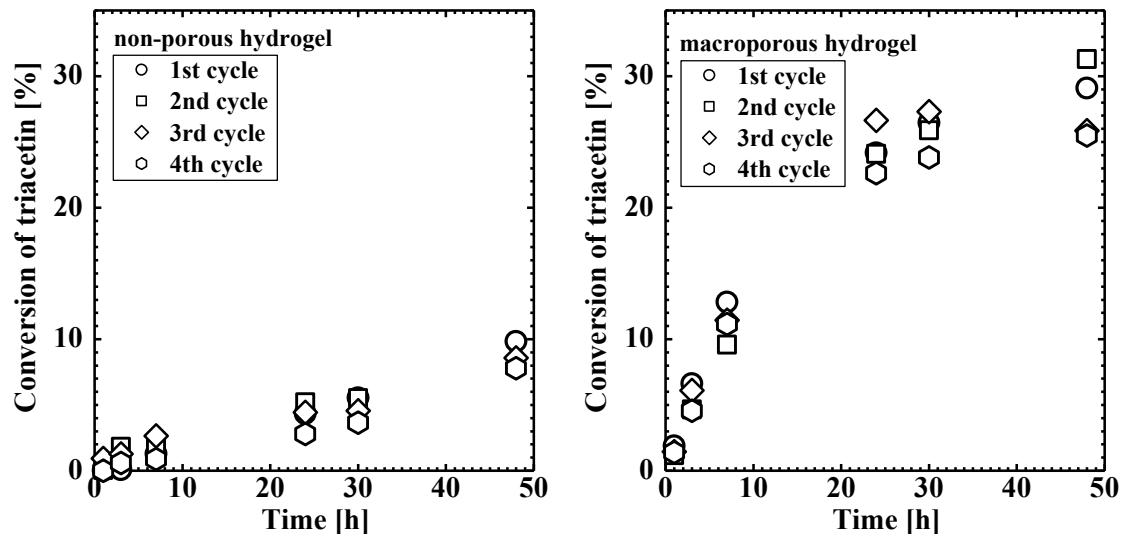


図 2-5 酵素固定化均質ゲルおよび酵素固定化多孔質ゲルを用いた 37°C での繰り返し酵素反応実験における triacetin の転化率の経時変化

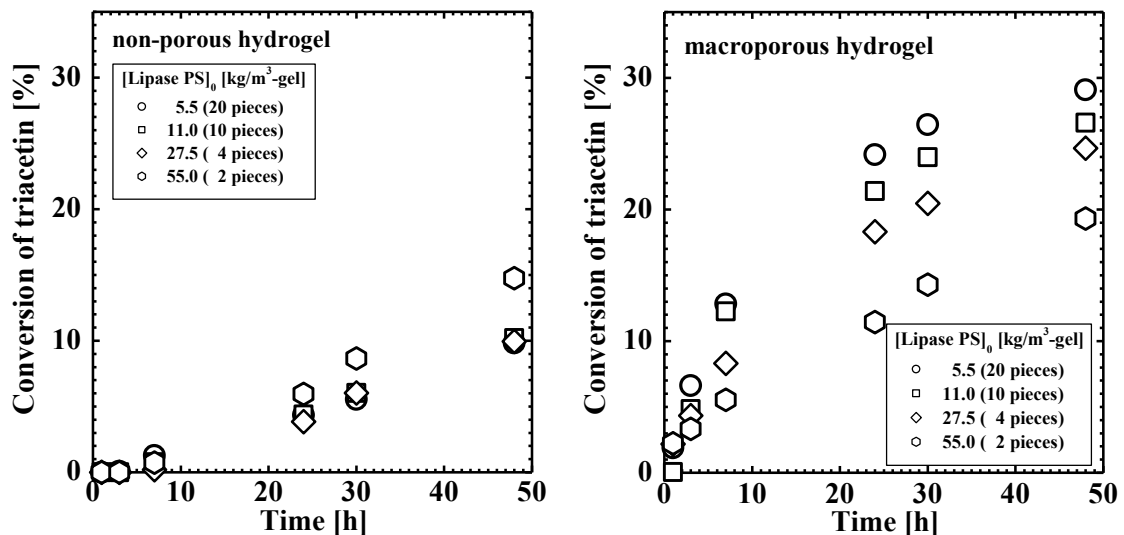


図 2-6 種々の酵素濃度 (5.5、11.0、27.5、および 55.0 kg/m<sup>3</sup>-gel) の酵素固定化均質ゲルおよび酵素固定化多孔質ゲルを用いた 37°C での繰り返し酵素反応実験における triacetin の転化率の経時変化

## 引用文献

- 1) H. Tokuyama, A. Kanehara, *Langmuir*, 23, 11246-11251 (2007)
- 2) H. Tokuyama, H. Sumida, A. Kanehara, S. Nii, *Colloid Polym. Sci.*, 287, 115-121 (2009)
- 3) H. Tokuyama, T. Yoshida, L. He, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 50, 10270-10277 (2011)
- 4) H. Tokuyama, T. Yoshida, *React. Funct. Polym.*, 73, 550-554 (2013)
- 5) H. Tokuyama, Y. Kato, *Colloids Surf., B*, 67, 92-98 (2008)
- 6) S. Soni, J. D. Desai, S. Devi, *J. Appl. Polym. Sci.*, 77, 2996-3002 (2000)
- 7) P. Bernfeld, J. Wan, *Science*, 142, 678-679 (1963)
- 8) Z. Knezevic, N. Milosavic, D. Bezbradica, Z. Jakovljevic, R. Prodanovic, *Biochem. Eng. J.*, 30, 269-278 (2006)
- 9) K. Hernandez, E. Garcia-Verdugo, R. Porcar, R. Fernandez-Lafuente, *Enzyme Microb. Technol.*, 48, 510-517 (2011)
- 10) J. Yang, Y. Hu, L. Jiang, B. Zou, R. Jia, H. Huang, *Biochem. Eng. J.*, 70, 46-54 (2013)
- 11) Y. Xu, G. Zhou, C. Wu, T. Li, H. Song, *Solid State Sci.*, 13, 867-874 (2011)
- 12) Y. Li, G. Zhou, W. Qiao, Y. Wang, *Mater. Sci. Eng., B*, 162, 120-126 (2009)
- 13) B. Zou, Y. Hu, D. Yu, J. Xia, S. Tang, W. Liu, H. Huang, *Biochem. Eng. J.*, 53, 150-153 (2010)

### 3 章 W/O エマルションゲル化法を用いた酵素固定化多孔質オルガノゲルの作製とエステル化およびエステル交換反応特性

#### 3.1. 緒言

一般に酵素は水溶性で、油性媒体中で沈殿、凝集する。そのため、油性媒体を用いたオルガノゲルの合成と同時に酵素をゲル内に分散させて包括固定することは困難であり、研究報告例はない。既製の多孔質構造のオルガノゲルへの酵素の固定化は、実施されている。Miletićらは、高分子に対して貧溶媒の cyclohexanol および aliphatic alcohol を用いた溶媒誘起相分離により多孔質構造の GMA と ethylene glycol dimethacrylate の共重合ゲルを作製し、緩衝液を用いて lipase を含浸させて高分子網目の GMA 由来の epoxy 基と共有結合させた<sup>1)</sup>。Dizge らは、高内相 W/O エマルション中の水滴を孔の鑄型とした多孔質構造の ST と DVB の共重合ゲルを作製し、緩衝液を用いて lipase を含浸させて polyglutaraldehyde と共有結合させた<sup>2)</sup>。Meng らは、magnetite 粒子表面上に water-in-oil (W/O) エマルションの水滴を孔の鑄型とした多孔質構造の methylmethacrylate (MMA) と DVB の共重合ゲルを作製し、緩衝液を用いて lipase を含浸させて物理吸着させた<sup>3)</sup>。

本研究では、多孔質オルガノゲルの合成と同時に酵素を固定化する手法として W/O エマルションゲル化法を提案する (図 3-1)。この方法は、第 3 章で示した oil-in-water (O/W) エマルションゲル化法の連続相と分散相の媒体を逆転させたものである。具体的には、酵素を含む水滴を分散させたプレゲル溶液 (油相) をゲル化させて、水滴を洗浄除去することで酵素固定化多孔質オルガノゲルが作製される。酵素は、ハイドロゲルの合成と同時に固定化すると、重合反応場に曝されて完全に失活したとの報告がある<sup>4)</sup>。W/O エマルションゲル化法では、水溶性の酵素は、水滴に含まれていてオルガノゲル合成時の油相へ移動しないので、失活することなく多孔質ゲルの合成と同時に孔内に包括固定される。また、多孔質構造の固定化担体は、基質および生成物の拡散透過性が良いために見掛けの反応速度を増大させることができる。

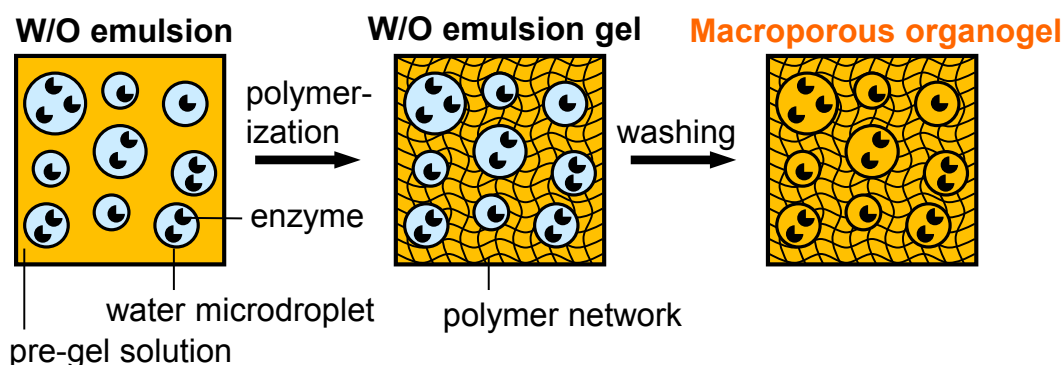


図 3-1 W/O エマルションゲル化法を用いて作製される酵素固定化オルガノゲルの概念図

本研究の目的は、W/O エマルションゲル化法を用いた酵素固定化多孔質オルガノゲルを開発すること、およびその酵素反応特性を解明することである。モデル高分子は、2-ethylhexyl acrylate (EHA) ゲル、モデル酵素反応は油脂分解酵素の lipase による oleic acid と種々の alcohol のエステル化反応および propylacetate と 1-propanol のエステル交換反応とした。W/O エマルションの水滴径を実体顕微鏡で、ゲルの内部構造を走査型電子顕微鏡 (scanning electron microscope; SEM) および共焦点レーザー顕微鏡 (confocal laser scanning microscope; CLSM) を用いて観察した。

## 3.2. 実験方法

### 3.2.1. 酵素固定化多孔質 EHA オルガノゲルの作製

モノマーの EHA、架橋剤の ethylene glycol dimethacrylate (EGDM)、および界面活性剤の sorbitan monolaurate (Span20; HLB 値 8.6) を含む hexane (油相溶液) 7.5 cm<sup>3</sup> をガラス製バイアルに調製した。最終の油相 (プレゲル溶液) の組成は EHA:EGDM = 1500:200 mol/m<sup>3</sup>-oil および Span20 = 100 kg/m<sup>3</sup>-oil とした。120 kg/m<sup>3</sup>-water の lipase 試薬を含む酵素水溶液 8 cm<sup>3</sup> を試験管に調製した。lipase 試薬には天野エンザイム株式会社製 Lipase PS Amano SD (lipase (約 10%) と dextrin (約 90%) の混合物) を用いた。油相溶液および酵素水溶液を 30°C でそれぞれ 60 min 窒素パージした。このとき、油相溶液を 50 min 窒素パージしたところで、開始剤の 2,2'-azobis(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitrile) (V-70、20 mol/m<sup>3</sup>-oil) を添加した。V-70 の 10 h 半減期温度は 30°C なので、添加した時点でフリーラジカル重合反応は開始すると考えられるが、固体の V-70 の hexane への溶解性が非常に低いためにこのタイミングで添加することとした (V-70 は 50–60 min にかけてある程度溶解した)。なお、ゲル化時間は約 3 h だった。油相溶液に酵素水溶液 7.5 cm<sup>3</sup> を添加してホモジナイザー (IKA ジャパン株式会社製 IKA ULTRA-TURRAX T 18 digital および S18N-10G、15,000 rpm) で 5 min 乳化して W/O エマルション (油相の体積分率 0.5) を作製した。そして、エマルションを  $\phi 5.8$  mm のガラス管に移して 30°C で 12 h 以上静置した。ゲルを取出し、disc 状 ( $\phi 5.8 \times 2$  mm) に切り分けて acetone に浸し、1 日毎の acetone の交換を 3 回行い洗浄した。洗浄後のゲルは、大気下・室温に約 1 h 置いて乾燥させた。次いで、ゲルをテフロンシートの上に置き、真空定温乾燥器 (EYELA 社製 VOS-201SD) に入れ、真空ポンプ (ULVAC 社製 DTC-22、排気速度 0.02 m<sup>3</sup>/min (50Hz)、到達真空度  $1 \times 10^3$  Pa) を用いて 4 h 以上真空引きして乾燥させた。そして、真空ポンプを止めて、その圧力で 12 h 以上ゲルを置いて乾燥させた。

W/O エマルションゲル内の酵素の分布を調べた。fluorescein-4-isothiocyanate (FITC) で蛍光標識した lipase (FITC-labeled lipase、2.2.2.項を参照) を用いて W/O エマルションを作製した (ただし、V-70 は含まず)。この W/O エマルションを hexane に少量垂らし、液

面に対して斜め上からファイバーライトを照射して FITC-labeled lipase を蛍光させて実体顕微鏡 (Nikon 社製 SMZ1500) で観察した。一連の操作は室温で行った。

### 3.2.2. ゲルの内部構造の観察

ゲルの内部構造を SEM (日立ハイテクノロジーズ社製 TM-3030) で観察した。試料ゲルの前処理を以下のように行った。乾燥した酵素固定化多孔質 EHA オルガノゲルを室温の cyclohexane (凝固点 5.5–7.5°C (和光純薬製品規格)) に浸して膨潤させた。このゲルを液体窒素で凍結させた。凍結ゲルをナス型フラスコに入れて氷浴に置き真空ポンプ (佐藤真空社製 P165D (排気速度 0.165 m<sup>3</sup>/min (50Hz)、到達真空度 6.7×10<sup>-2</sup> Pa)) を直結して 5 h 真空乾燥した。得られた乾燥ゲルを裂き、その破断面にスパッタ装置 (サンヨー電子社製 QUICK COATER SC-701Mk II ECO) で Au を 1 min 蒸着させた。

FITC-labeled lipase を用いて作製した酵素固定化 EHA オルガノゲルの内部構造を CLSM で観察した (2.2.2.項を参照)。

### 3.2.3. エステル化およびエステル交換反応実験

エステル化反応実験を回分操作で行った。ガラス製バイアルに 5 mmol の種々の alcohol (ethanol (0.230 g)、1-propanol (0.301 g)、または 1-pentanol (0.441 g))、45 mmol の oleic acid (12.7 g)、および乾燥した酵素固定化多孔質 EHA オルガノゲル 20 個 (lipase 試薬 63.4 mg 相当) を仕込み、酵素反応を開始した。バイアルは、振盪水槽 (東京硝子器械社製 FWB-1) と恒温装置 (ASONE 社製 TR-1AR) を用いて、約 190 rpm、40°C で振とうした。所定時間に採取した溶液 0.06 g を 3 g の methanol で希釈した。この試料をガスクロマトグラフ (SHIMADZU 社製 GC-2025) で分析して oleic acid (OA)、ethyl oleate (EO)、1-propanol (PrOH)、および 1-pentanol (PeOH) の濃度 ( $C_{OA}$ 、 $C_{EO}$ 、 $C_{PrOH}$ 、および  $C_{PeOH}$  [mol/kg-sample]) を求め、種々の alcohol の転化率  $X$  [%] を以下の式を用いて算出した。

$$\text{ethanol: } X = 100 C_{OA} / (C_{OA} + C_{EO}) \quad (1)$$

$$\text{1-propanol: } X = 100 (C_{OA} / C_{PrOH} - C_{OA0} / C_{PrOH0}) / (C_{OA0} / C_{PrOH0} - 1) \quad (2)$$

$$\text{1-pentanol: } X = 100 (C_{OA} / C_{PeOH} - C_{OA0} / C_{PeOH0}) / (C_{OA0} / C_{PeOH0} - 1) \quad (3)$$

ただし、下付文字 0 は時間 0 を表す。ここで、ethanol の GC 分析は希釈に用いた methanol と沸点が近いのが困難だった。また、propyl oleate および pentyl oleate は、その試薬が販売されていなかったため定量できなかった。酵素反応実験後のゲルを回収し、表面を軽く拭いてから新たな反応溶液に浸して繰り返し酵素反応を行った。フリー酵素を用いた同様の反応実験も行った (lipase 試薬 63.4 mg)。

エステル交換反応実験を基本的には上述の方法で行った。基質は 1-pentanol (10 mmol、0.882 g) および propylacetate (PA、90 mmol、9.19 g) とした。ガスクロマトグラフで基質および生成物 (1-propanol および pentylacetate (PeA)) のそれぞれの濃度 ( $C_{PrOH}$ 、 $C_{PA}$ 、 $C_{PrOH}$ 、および  $C_{PeA}$  [mol/kg-sample]) を求め、1-pentanol の転化率  $X$  [%] を以下の式を用いて

算出した。

$$X = 100 \{C_{Ppa}/C_{PtOH} - (C_{Ppa} + C_{Pta}) / (C_{PtOH} + C_{PpOH})\} / (C_{Ppa}/C_{PtOH} - 1) \quad (4)$$

### 3.3. 結果および考察

#### 3.3.1. エマルションの水滴径およびゲルの内部構造

図 3-2 に、プレゲル W/O エマルション（開始剤はなし）中の FITC-labeled lipase を内包した水滴の実体顕微鏡写真、凍結乾燥した酵素固定化多孔質 EHA オルガノゲルの破断面の SEM 写真、および FITC-labeled lipase を用いた酵素固定化エマルションゲルの CLSM 画像を示す。実体顕微鏡写真では、緑色に蛍光した直径が数 $\mu\text{m}$ の球状のものが分散していた。これは、FITC-labeled lipase を含む水滴と判断される。SEM 写真では、水滴を鋳型とした独立孔を明確に確認できなかったが、1  $\mu\text{m}$  程度の球状のものが確認できた。試料ゲルは前処理の凍結乾燥の過程で収縮したので（直径が約半分になった）、凍結乾燥時にゲル内の孔が潰れたと考えられる。また、球状のものは、lipase 試薬が凝集したものと考えられる。CLSM 画像では、緑色に蛍光した球状のものが分散していた。これは、FITC-labeled lipase を含む水滴だと考えられ、その直径は実体顕微鏡で確認された水滴径と同程度であった。これらの結果から、ゲル内にエマルションの水滴を鋳型とした孔が形成され、その孔内へ酵素が包括固定されたことが示唆された。

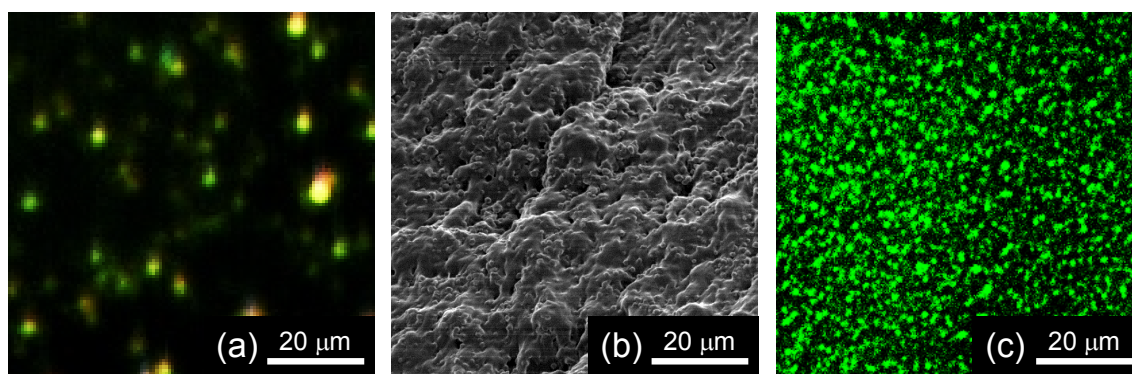


図 3-2 (a) プレゲル W/O エマルション（開始剤はなし）中の FITC-labeled lipase を内包した水滴の実体顕微鏡写真、(b) 凍結乾燥した酵素固定化多孔質 EHA オルガノゲルの破断面の SEM 写真、および (c) FITC-labeled lipase を用いた酵素固定化エマルションゲルの CLSM 画像

#### 3.3.2. 酵素反応特性

図 3-3 に、フリー酵素および酵素固定化多孔質オルガノゲル（1st–12th cycle）を用いた 40°C での propylacetate と 1-pentanol の繰り返しエステル交換反応実験における 1-pentanol の転化率の経時変化と各 cycle での 96 h の 1-pentanol の転化率を示す。フリー酵素の転化

率は、96 h で 48.6% だった。このとき、lipase は反応溶液中で懸濁していた。つまり、lipase は凝集状態で、仕込んだ lipase の一部のみが反応に関与していると考えられる。酵素固定化ゲルの 96 h の転化率は、1st cycle で 66.2%、12th cycle で 48.3% だった。酵素固定化ゲルの反応速度は繰り返し利用に伴い徐々に低下したが、12th cycle でもフリー酵素のそれと同程度だった。lipase はゲル中で分散しており、有効に反応に関与していると考えられる。

ゲルに固定化された lipase の構造を考察する。以下の文献に示されているように、lipase には活性部位を覆う蓋があり、それが開くことで活性を発現する（活性化状態）。水中で界面活性剤と接触した lipase は、活性化状態になり、界面活性剤と接触していないそれよりも高い活性を発現した<sup>5)</sup>。MMA と DVB の共重合ゲルに物理吸着した lipase は、活性化状態となり、エステル化反応においてフリー酵素よりも高い活性を発現した<sup>3)</sup>。本実験系においても、界面活性剤を用いて疎水性の担体に包括固定された lipase が、活性化状態となりフリー酵素よりも高い活性を発現したと推測される。

図 4 に、フリー酵素および酵素固定化多孔質オルガノゲルを用いた 40°C での oleic acid と種々の alcohol (ethanol、1-propanol、および 1-pentanol) の繰り返しエステル化反応実験における種々の alcohol の転化率の経時変化を示す。フリー酵素の反応速度は、ethanol を用いた系では 96 h まで一定で、1-propanol および 1-pentanol を用いた系では 0–24 h では遅く、24 h から加速した。エステル化反応では副生成物の水が生成する。油性の反応溶液中の少量で適量の水は、酵素の構造をその活性が高くなるように変化させることが知られている<sup>6,7)</sup>。フリー酵素反応では、どの alcohol でも 24 h で約 1 mmol の水が副生成した（転化率から算出）。本実験系の lipase 試薬 63.4 mg に対して約 1 mmol (18 mg) 以上の水は、

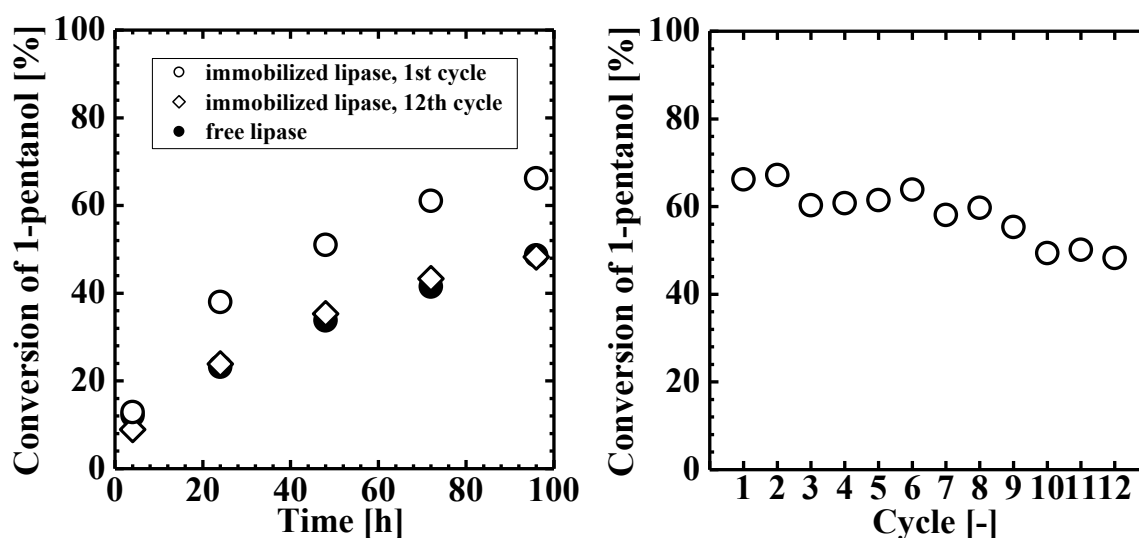


図 3-3 フリー酵素および酵素固定化多孔質オルガノゲル (1st–12th cycle) を用いた 40°C での propylacetate と 1-pentanol の繰り返しエステル交換反応実験における 1-pentanol の転化率の経時変化と各 cycle での 96 h の 1-pentanol の転化率

酵素の活性を増大させると考えられる。

1st cycle の酵素固定化ゲルの反応初速度は alcohol の種類に依らずフリー酵素のそれよりも大きく、96 h の転化率はフリー酵素のそれと同程度だった。フリー酵素および 1st cycle の酵素固定化ゲルの反応速度は、alcohol の炭素数の増大に伴い増大した。これは、より極性の高い（炭素数の少ない）alcohol が lipase の周囲にある水を剥ぎ取る、すなわち失活させるためである<sup>8,9)</sup>。酵素固定化ゲルの反応速度は、どの alcohol でも繰り返し利用により低下した。副生成した水は、ゲル内に保持され、疎水性の基質のゲル内への拡散を妨げたと推測される。これを改善するための方策として、ゲルの高分子網目に親水性部を導入して水のゲル内外への移動を促すことがあげられる。

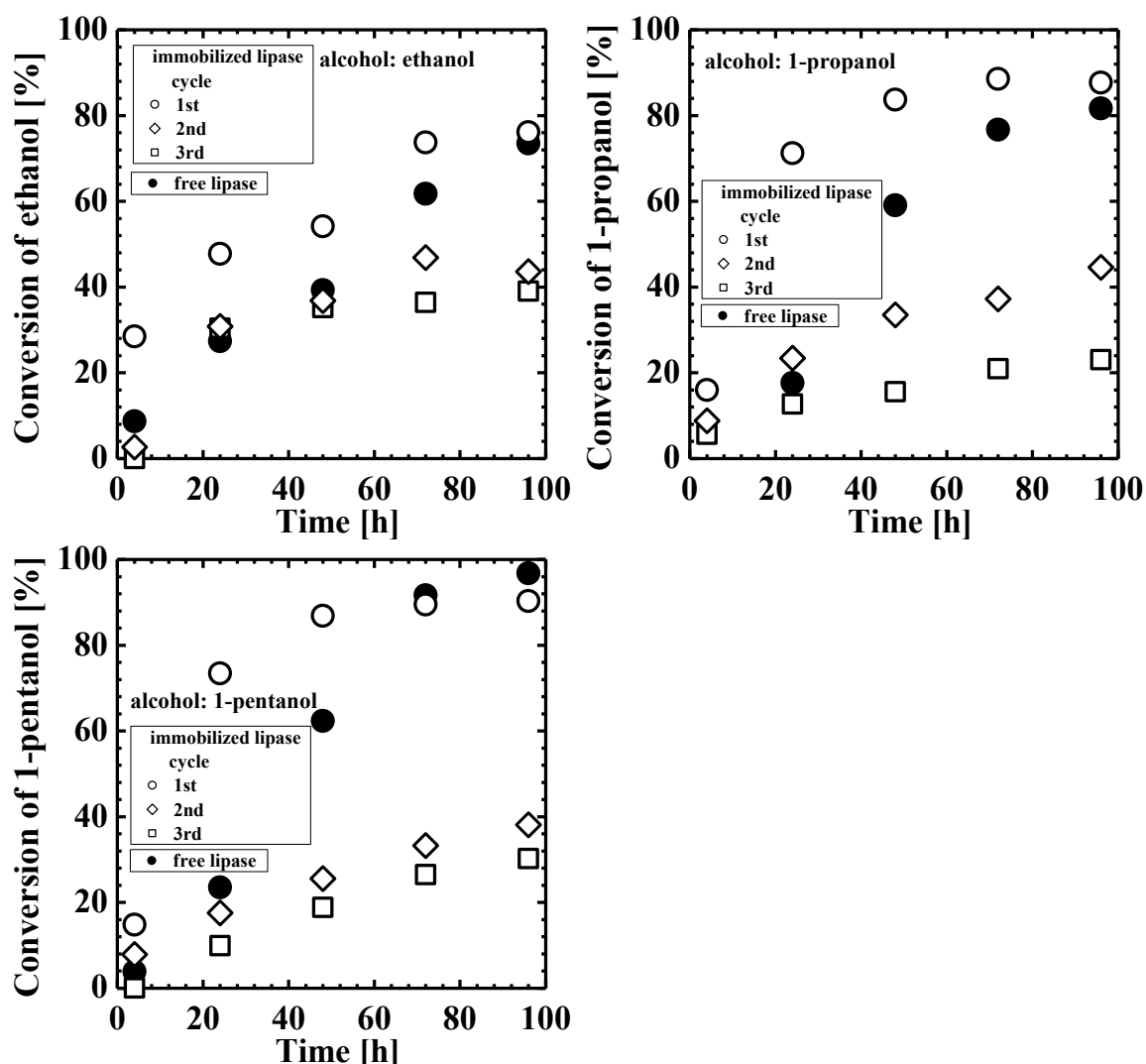


図 3-4 フリー酵素および酵素固定化多孔質オルガノゲルを用いた 40°C での oleic acid と種々の alcohol (ethanol、1-propanol、および 1-pentanol) の繰り返しエステル化反応実験における種々の alcohol の転化率の経時変化



### 3.4. 結言

W/O エマルションゲル化法を用いて、多孔質ゲルの合成と同時に酵素を重合反応場に曝すことなくその孔の中に包括固定した酵素固定化多孔質 EHA オルガノゲルを作製した。lipase による種々の alcohol (ethanol、1-propanol、および 1-pentanol) と oleic acid のエステル化反応および 1-pentanol と propylacetate のエステル交換反応をモデルとして、このゲルの酵素反応への適用可能性を検討し、以下の知見を得た。

- 1) エマルションおよびゲルの顕微鏡観察から、酵素が水滴に内包され、ゲルの孔内へ包括固定されたことが示された。
- 2) 多孔質オルガノゲルに固定化された酵素のエステル化反応およびエステル交換反応に対する活性は、フリー酵素のそれと比べて極めて高かった。W/O エマルションゲル化法において、lipase はエマルションの水滴を介して重合時に失活せずに固定化される。
- 3) 酵素固定化多孔質オルガノゲルの繰り返し利用性能は、エステル交換反応に対しては良好だが、水が生成するエステル化反応に対しては悪い。

### 引用文献

- 1) N. Miletić, Z. Vuković, A. Nastasović, K. Loos, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 56, 196-201 (2009)
- 2) N. Dizge, B. Keskinler, A. Tanriseven, *Colloids Surf., B*, 66, 34-38 (2008)
- 3) X. Meng, G. Xu, Q.L. Zhou, J.P. Wu, L.R. Yang, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 89, 89-92 (2013)
- 4) S. Soni, J. D. Desai, S. Devi, *J. Appl. Polym. Sci.*, 77, 2996-3002 (2000)
- 5) I. Mingarro, C. Abad, L. Baco, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 3308-3312 (1995)
- 6) A. Zaks, A.M. Klibanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 3192-3196 (1985)
- 7) W. Chulalaksananukul, J.S. Condoret, P. Delorme, R.M. Willemot, *FEBS Lett.*, 276, 181-184 (1990)
- 8) M. Basri, A. Harun, M. B. Ahmad, C. N. A. Razak, A. B. Salleh, *J. Appl. Polym. Sci.*, 82, 1404-1409 (2001)
- 9) C. Delimitsou, M. Zoumpantioti, A. Xenakis, H. Stamatis, *Biocatal. Biotransform.*, 20, 319-327 (2002)

## 4章 サスペンションゲル化法を用いた複合および多孔質ハイドロゲルの創製

### 4.1. 緒言

球状の非連結孔が分散した多孔質ゲルは、その孔を反応・分離・貯蔵の場として利用できる。この種の多孔質ゲルの作製方法として、界面活性剤<sup>1,3)</sup>、シリカ粒子<sup>4,5)</sup>、およびエマルションの分散相（油滴（2章）および水滴（3章））を孔の鋳型に用いた方法が開発されている。

本研究では、新規な多孔質ハイドロゲルの作製手法であるサスペンションゲル化法を提案する（図 4-1）。これは、プレゲル水溶液に孔の鋳型となるマイクロカプセル（例えば、 $\mu\text{m}$  オーダーの物理架橋ゲル微粒子）を分散させたプレゲル水溶液（サスペンション）の水相をフリーラジカル重合などによりゲル化させる方法である。この段階で、マイクロカプセルを内包したハイドロゲル（複合ゲル）が作製される。次いで、複合ゲル内のマイクロカプセル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。サスペンションゲル化法では、ゲル相は従来のゲルと同じ高分子網目構造になり、マイクロカプセルの大きさおよび量を変えることでゲルの孔の大きさおよび多孔度を自由に設計できる。この手法は、5章で示すように水溶性の機能性物質（酵素、微生物など）をマイクロカプセルを介して失活、漏出させることなく多孔質ゲルの孔内に包括固定した材料の作製に応用できる。サスペンションゲル化法では、重合時にマイクロカプセルが沈降する懸念がある。本研究では、それを分散安定化させる工夫として、重合反応系に線状ポリマーを添加して溶液を増粘させる方法を提案する。線状ポリマーを含んだ状態でゲル合成を行うと semi-IPN（semi-interpenetrating polymer network、セミ相互侵入高分子網目）と呼ばれる構造のゲルが作製される。IPN は、2 個以上の網目が少なくとも分子スケールで部分的に織り混ざっており、互いに共有結合でつながっているわけではないが化学結合を切ることなしに分けることのできないポリマーとして定義される<sup>6)</sup>。一方の成分が線状または枝分かれポリマーで、他方の成分が高分子網目である系は semi-IPN と呼ば

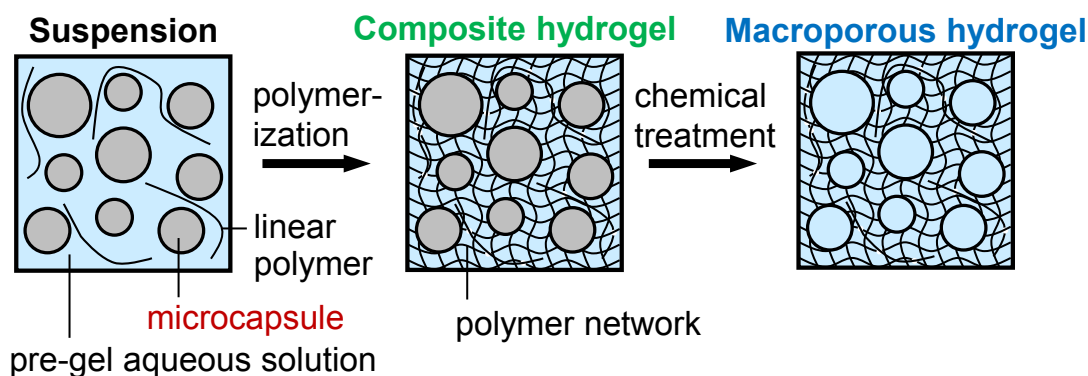


図 4-1 サスペンションゲル化法により作製される複合ゲルおよび多孔質ゲルの概念図

れる。IPN 構造および semi-IPN 構造は、ゲルを高強度にすることが知られている<sup>7-9)</sup>。つまり、サスペンションゲル化法において、プレゲル水溶液に線状ポリマーを添加することは、マイクロカプセルの分散安定化およびゲルの強靱化の2つの効果が期待できる。

本研究の目的は、サスペンションゲル化法を確立し、作製される複合および多孔質ゲルの構造と膨潤特性および力学特性の関係性を明らかにすることである。モデルマイクロカプセルは、作製および崩壊が容易で低毒性の calcium alginate ゲルとした。calcium alginate ゲルは、sodium alginate 水溶液を calcium chloride 水溶液に接触させることで瞬時にゲル化して作製でき、trisodium citrate 水溶液中でゾル化することが知られている。マイクロカプセルの作製における液滴の微粒化技術には、静電微粒化法<sup>10)</sup>を採用した。静電微粒化法とは、液体が供給される導電性細管に電圧を加えることで、ノズル先端の液滴にかかる静電気力を増加させ滴下を促し、静電気力が表面張力を超える条件では液滴を破壊して噴霧を起し、液滴を微粒化させる方法である。モデル高分子ゲルは、線状 poly(*N*-isopropylacrylamide) (poly(NIPA)) を含む NIPA ゲルとした。NIPA ゲルは、約 33°C の転移温度を境にして親・疎水転移を起して膨潤・収縮の体積相転移を起すことが知られている<sup>11-13)</sup>。また、多孔質構造の NIPA ゲルは、温度変化に応答する体積変化の速度が速いことが知られている<sup>14)</sup>。

本研究では、種々のマイクロカプセルの体積分率の複合ゲルおよび多孔質ゲル、マイクロカプセルを含まない semi-IPN ゲル、およびマイクロカプセルおよび線状 poly(NIPA) を含まない従来の NIPA ゲルを作製した。ゲルの外観および内部構造の観察、膨潤特性、および力学特性を調査した。

## 4.2. 実験方法

### 4.2.1. マイクロカプセルの作製

静電微粒化法を用いて、calcium alginate マイクロカプセルを作製した。sodium alginate は、和光純薬工業株式会社製の規格 80–120 cP (約 64,000 g/mol) を用いた。図 4-2 に、静電微粒化装置の概略図を示す。5 kg/m<sup>3</sup> sodium alginate 水溶液を poly(propylene)製シリンジに仕込み、シリンジポンプ (Harvard Apparatus 社製 Pump11) を用いて 9 cm<sup>3</sup>/h で送液し、高電圧電源 (MECC 社製 HVU-30P100) の+極の針金を備え付けたステンレス鋼製ノズル (外径 0.41 mm、内径 0.21 mm、長さ 18 mm) より印加電圧 3.2 kV で噴霧させた。ノズル先端の周囲にアースを取り付けた鉄鋼製のリング (リング内径 8.2 mm) を置き、これを対向電極とした。噴霧した液滴をノズル先端の下 5 cm に置いたシャーレに入れた 5 kg/m<sup>3</sup> calcium chloride 水溶液で捕集した。この時、瞬時に calcium alginate ゲル微粒子のマイクロカプセルが作製された。マイクロカプセルを実体顕微鏡 (Nikon 社製 SMZ1500) で観察し、その写真画像からその直径 (定方向径) を求めた。一連の実験は室温で行った。

#### 4.2.2. 複合および多孔質 NIPA ゲルの作製

マイクロカプセル体積分率  $\phi_m = 0.5$  の複合ゲルの作製手法を以下に示す。NIPA、*N,N'*-methylenebisacrylamide (MBAA)、*N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED)、および後述の poly(NIPA)を含むモノマー水溶液 4.5 cm<sup>3</sup> を試験管に調製した。そこに、水中で保管していたマイクロカプセルを沈降させてデカンテーションにより水を取り除いたシャーベット状のマイクロカプセルを加えてモノマー懸濁液 9.5 cm<sup>3</sup> を得た。ammonium peroxodisulfate (APS) を含む開始剤水溶液 5 cm<sup>3</sup> をメスフラスコに調製した。プレゲル水溶液の組成は、NIPA:MBAA:TEMED:APS = 1000:50:20:2 mol/m<sup>3</sup>、および線状 poly(NIPA) = 15 kg/m<sup>3</sup> とした。この線状 poly(NIPA)の濃度は、プレゲル水溶液中でマイクロカプセルを分散でき、モノマー懸濁液が取り扱える粘性となるよう決めた (10 kg/m<sup>3</sup> だとマイクロカプセルが沈降し、20 kg/m<sup>3</sup> だと高粘性で取り扱いにくい)。溶液をそれぞれ 10°C で 1 h 窒素パージした。開始剤水溶液 0.5 cm<sup>3</sup> をモノマー懸濁液に添加し、内径 6 mm のガラス管に移し、12 h 以上静置して 10°C でフリーラジカル重合させた。ゲルを取り出して長さ 6 mm に切り分けて多量の水に浸し、水の交換を 3 回以上行い洗浄して複合ゲルを得た。多孔質ゲルは、複合ゲルを 100 mol/m<sup>3</sup> trisodium citrate 水溶液 10 cm<sup>3</sup> に 24 h 以上浸し、次いで水で 5 回以上洗浄して作製した。同様の操作で、マイクロカプセルを添加しない semi-IPN ゲル、 $\phi_m = 0.3$  および 0.7 の複合ゲルおよび多孔質ゲル、およびマイクロカプセルおよび線状 poly(NIPA)を添加しない NIPA ゲルを作製した。

線状 poly(NIPA)を既報<sup>12,13)</sup>と同様の手順でフリーラジカル重合により作製した。NIPA、TEMED を含むモノマー水溶液 49 cm<sup>3</sup> をマヨネーズ瓶に調製した。APS を含む開始剤水溶液 4 cm<sup>3</sup> を試験管に調製した。プレポリマー水溶液の組成は、NIPA:TEMED:APS = 760:10:1 mol/m<sup>3</sup> とした。モノマー水溶液を室温で 70 min、次いで 10°C で 10 min 窒素パージした。同時に、開始剤水溶液を室温で 80 min 窒素パージした。開始剤水溶液 1 cm<sup>3</sup> をモノマー水溶液に加え、10°C に 24 h 静置した。合成したポリマー水溶液を透析膜 (三光純薬製、透

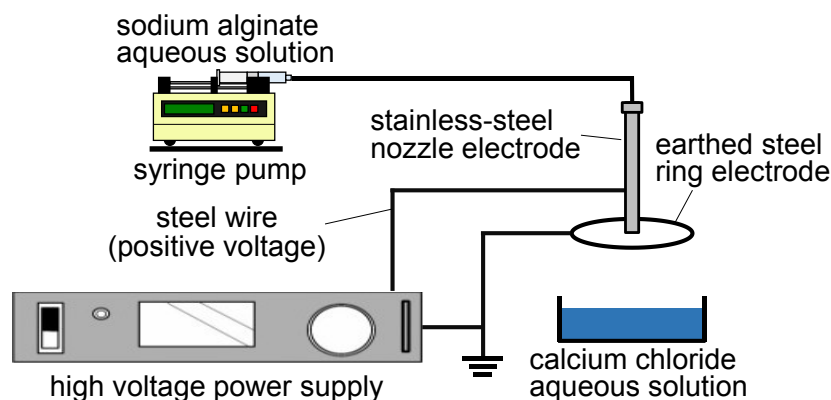


図 4-2 静電微粒化装置の概略図

析膜 1-7/8、分画分子量 14,000 g/mol) に入れて約 0.01 m<sup>3</sup>の水に浸し、1 日ごとの水の交換を 3 回行い洗浄した。洗浄後のポリマー水溶液をシャーレ上に敷いた食品用ラップの上に薄く広げ、50°C の乾燥機に 3 日静置して、乾燥ポリマーを作製した。線状 poly(NIPA) の分子量は、gel permeation chromatography (GPC) 分析により測定した。移動相溶媒には、10 mol/m<sup>3</sup> の BrLi·H<sub>2</sub>O を含む *N, N*-dimethylformamide を用いた。カラムに shodex GPC KD806M、検出器に島津示差屈折率検出器 RID-10A を用いた。流量は 0.8 cm<sup>3</sup>/min、カラム温度は 40°C、測定時間は 20 min とした。標準試料は、平均分子量が 4.0×10<sup>2</sup>、8.0×10<sup>3</sup>、2.0×10<sup>4</sup>、5.0×10<sup>5</sup> および 2.0×10<sup>6</sup> g/mol の polyethylene glycol を用い、その濃度は 1.2–2.7 kg/m<sup>3</sup> とした。線状 poly(NIPA) の数平均分子量  $M_n$ 、重量平均分子量  $M_w$ 、および多分散度  $M_w/M_n$  は、それぞれ 9.32×10<sup>5</sup> g/mol、4.32×10<sup>6</sup> g/mol、および 4.61 だった。

#### 4.2.3. ゲルの観察

ゲルの外観を実体顕微鏡 (Nikon 社製 SMZ1500) で観察した。室温の水で膨潤したゲルを厚さ 0.5 mm 程度に切りシャーレに乗せ、水を上から数滴垂らして観察した。

ゲルの内部構造を走査型電子顕微鏡 (SEM、philips 社製 XL-30) で観察した。20 または 50°C の水で膨潤させた円柱状ゲルを縦半分に切り、液体窒素で凍結させた。凍結ゲルをナス型フラスコに入れて氷浴に置き真空ポンプ (佐藤真空社製 P165D、排気速度 0.165 m<sup>3</sup>/min (50Hz)、到達真空度 6.7×10<sup>-2</sup> Pa) を直結して 8 h 真空乾燥した。得られた乾燥ゲルを裂き、その断面にイオン Sputter (日立製作所社製 E-1030) で Pt/Pd を 15kV で 120 sec 蒸着させてから SEM で観察した。

#### 4.2.4. ゲルの膨潤特性と力学特性の評価

所定温度 (10°C から 50°C まで段階的に昇温) における水中の円柱状ゲルの直径 (膨潤径) をデジタルカメラの写真画像から求めた。ゲルの収縮過程における膨潤径の経時変化、すなわち収縮速度は、10°C の水中にあるゲルを 50°C の水中に移したときを時刻 0 とし、所定時間にデジタルカメラで写真を撮り、その画像から膨潤径を求めた。同様の操作で、膨潤速度の測定は 50°C の水中にあるゲルを 10°C の水中に移して行った。

円柱状ゲルの圧縮試験を行い、せん断弾性係数  $\mu$  [Pa] および圧縮強度  $F_c$  [Pa] を求めた<sup>14-16</sup>。レオメータ (TA instrument 社製 AR-G2) を用いて、円柱状ゲル (合成直後の大きさが  $\phi 6 \times 6$  mm、水洗浄して 20°C の水中で保管していたもの) の圧縮試験を圧縮速度 10  $\mu$ m/s、20°C の条件で行った。 $\mu$  を、次式により算出した<sup>17</sup>。

$$\Delta P = 3\mu(\Delta l/l) \quad (1)$$

ここで、 $\Delta P$  [Pa] は応力、 $\Delta l$  [m] はゲルの長さの変化量、および  $l$  [m] は初期のゲルの長さである。式(1)は、式(2)に置き換えられる。

$$4F/(\pi d'^2) = 3\mu(l - l')/l \quad (2)$$

ここで、 $F$  [N] はゲルに加えた垂直方向の力、 $d'$  [m] および  $l'$  [m] は加重変形したゲルの直

径および長さである。試料ゲルは、人の手でカミソリで切っているので完全な円柱状になっておらず、 $l$ を正確に評価するのは困難だった。 $l$ を用いずに、 $\mu$ を算出できるように以下の式変形を行った。式(1)に体積一定条件  $\pi d^2 l / 4 = \pi d'^2 l' / 4$  ( $d$  [m]は初期のゲルの直径)を代入して、次式を得る。

$$4F l' / (\pi d'^2) = -3\mu l' + 3\mu l \quad (2)$$

$\mu$ を、 $F l' / (\pi d'^2)$ と  $l'$ のプロットの近似直線の傾きから求めた。 $\mu$ は、以下に示す制限の下で算出した。まず、ゲル断面の凹凸により圧縮試験の開始直後は  $F$ の測定値が増減するため、 $F$ が増加傾向と判断される初めの  $F$ の値に対応するゲルの長さを  $l$ とした(ただし、この  $l$ の値自体は  $\mu$ の算出には用いていない)。また、 $l'$ の範囲は  $\Delta l / l$ の値が 0.05–0.1、かつ式(2)が最もよく直線性を示すときの  $l'$ までとした。ある条件で作製したゲルの  $\mu$ は、複数個(2または3個)のゲルの測定値の平均値とした。ある1個のゲルの  $\mu$ は、複数回(2または3回)の測定の平均値とした。

ゲルの  $F_c$ は、円柱状ゲルを垂直方向に圧縮していき単調増加する  $F$ が初めて減少したときの応力とし、次式により算出した。

$$F_c = 4F / (\pi d^2) \quad (3)$$

ゲルの  $F_c$ は、複数個(2個または3個)の測定値の平均値とした。

### 4.3. 結果および考察

#### 4.3.1. ゲルの外観と内部構造

図4-3に、マイクロカプセルの粒子径分布および外観を示す。粒子径分布は個数基準頻度で表し、階級間隔は 5  $\mu\text{m}$ である。作製したマイクロカプセルは透明で、その個数中位径は 121  $\mu\text{m}$ 、変動係数は 6.5%で単分散だった。なお、図4-3に示したマイクロカプセルは、sodium alginate 水溶液の安定した噴霧状態が得られる印加電圧 3.2 kV で作製した。sodium alginate 水溶液は、印加電圧が 2.8 kV 以下では滴下様式、2.9 kV 以上では一列に連なった噴霧様式、4.0 kV 以上では放射状に広がった噴霧様式だった。

図4-4に、10°Cの水中における種々のゲルの外観を示す。従来の NIPA ゲルは、透明だった。poly(NIPA)を添加した semi-IPN ゲル、複合ゲル、および多孔質ゲルは、白色だった。poly(NIPA)の添加は、マトリックスの高分子網目を不均質構造にすると考えられる。複合ゲルおよび多孔質ゲルの外観は、 $\phi_m$ の増大に伴い透過性が増大した。同じ  $\phi_m$ の複合ゲルおよび多孔質ゲルの外観は、目視では同程度だった。

図4-5に、室温の水中における  $\phi_m = 0.3$ の多孔質ゲルの実体顕微鏡写真を示す。直径が約 100  $\mu\text{m}$ の円形のものが観察された。他の  $\phi_m$ の複合ゲルおよび多孔質ゲルでも同様のものが観察された。これは、マイクロカプセルまたはそれを鋳型とした孔と考えられる。

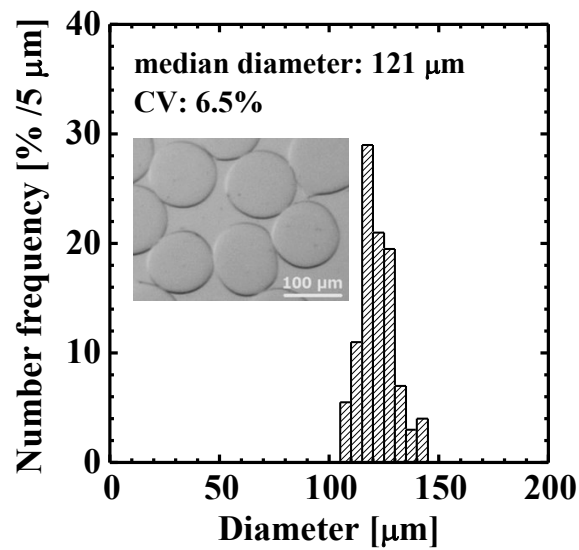


図 4-3 マイクロカプセルの粒子径分布および外観

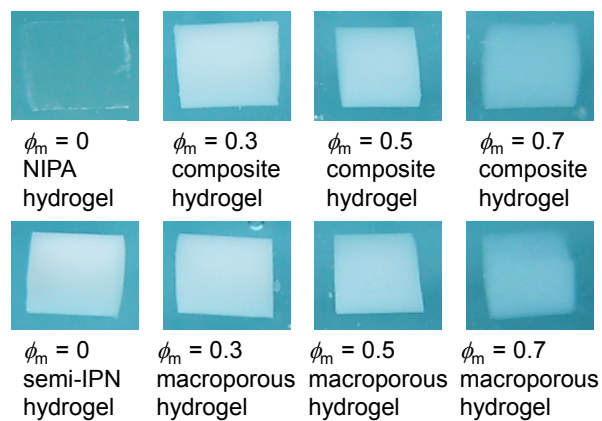


図 4-4 10°C の水中における種々のゲル（NIPA ゲル、semi-IPN ゲル、および種々の  $\phi_m$  の複合ゲルおよび多孔質ゲル）の外観

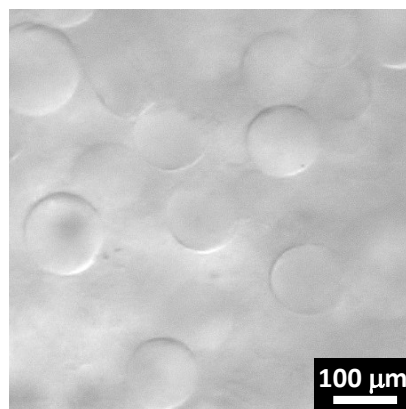


図 4-5 室温の水で膨潤した  $\phi_m = 0.3$  の多孔質ゲル（厚さ 0.5 mm 程度のディスク状）の実体顕微鏡写真

図 4-6 に、20°C の水中で膨潤した種々の $\phi_m$ のゲル (semi-IPN ゲル、複合ゲル、および多孔質ゲル) および 50°C の水中で収縮した $\phi_m = 0.5$  の複合ゲルおよび多孔質ゲルを凍結乾燥させたものの SEM 写真を示す。まず、20°C の膨潤ゲルについて述べる。semi-IPN ゲル ( $\phi_m = 0$ ) は、直径が数 100 nm—数  $\mu\text{m}$  の小さな孔を有する不均質構造だった。この不均質構造は、線状 poly(NIPA) の存在下での重合で高分子網目に粗密ができたこと、および線状 poly(NIPA) の一部がゲルから漏出して形成されたと考えられる<sup>18)</sup>。複合ゲルでは、どの $\phi_m$ でも直径が 100  $\mu\text{m}$  程度のマクロ孔とそのマクロ孔に内包された球状のものが観察された。この球状のものは、その数が $\phi_m$ の増大に伴い増大し、その大きさがマイクロカプセルのそれ (105–145  $\mu\text{m}$ 、図 4-3) と同程度だったことから、マイクロカプセルといえる。多孔質ゲルでは、どの $\phi_m$ でも直径が 100  $\mu\text{m}$  程度のマクロ孔が観察された。マクロ孔は、その数が $\phi_m$ の増大に伴い増大し、 $\phi_m = 0.7$  でも連結せずにそれぞれ独立していた。マイクロカプセルは、trisodium citrate により崩壊してマクロ孔を形成し、NIPA ゲルの重合反応には関与しないといえる。

次に、50°C の収縮ゲルについて述べる。複合ゲルおよび多孔質ゲルは、全体的に滑らかだった。複合ゲルでは直径が約 50  $\mu\text{m}$  の球状のものが観察され、多孔質ゲルではそのようなものがなかった。他の $\phi_m$ のゲルでも同様の構造が観察された。ゲルの膨潤特性で後述するように、50°C では複合ゲルおよび多孔質ゲルは収縮するので、ゲル内のマイクロカプセルおよびマクロ孔が潰れたものと考えられる。



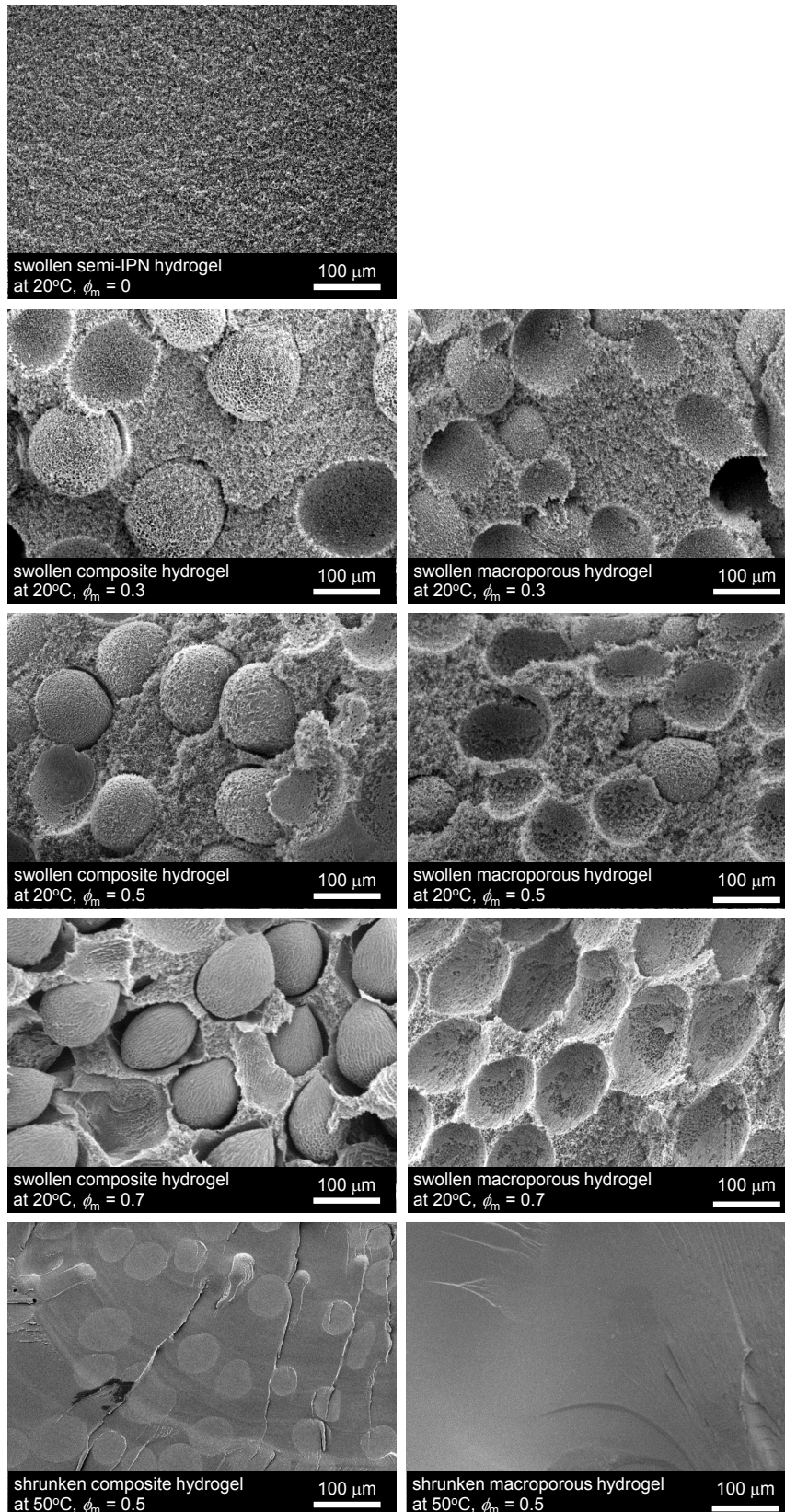


図 4-6 20°C の水中で膨潤した種々の  $\phi_m$  のゲル (semi-IPN ゲル、複合ゲル、および多孔質ゲル) および 50°C の水中で収縮した  $\phi_m = 0.5$  の複合ゲルおよび多孔質ゲルを凍結乾燥させたものの SEM 写真

### 4.3.2. ゲルの膨潤特性

図 4-7 に、所定温度における水中の種々の円柱状ゲルの膨潤径を示す。NIPA ゲルの膨潤径は、10–30°C では温度の上昇に伴い緩やかに減少し、33°C 付近で大きく減少して 40°C で約 3.4 mm で一定になった (図なし)。この挙動は、NIPA ゲルの感温性としてよく知られたものである<sup>15)</sup>。semi-IPN ゲルの膨潤挙動は、NIPA ゲルのそれとほぼ等しかった。NIPA ゲルへの線状 poly(NIPA) の添加が平衡膨潤特性に及ぼす影響はほとんどないといえる。

複合ゲルの膨潤挙動を述べる。 $\phi_m = 0.3$  と  $0.5$  の複合ゲルの膨潤挙動は、semi-IPN ゲルのそれとほとんど同じだった。 $\phi_m = 0.7$  の複合ゲルは、約 35°C 以上の収縮状態で semi-IPN ゲル、および  $\phi_m = 0.3$  および  $0.5$  の複合ゲルより大きかった。多量のマイクロカプセルは、NIPA ゲルの収縮を阻害するといえる。多孔質ゲルの膨潤挙動を述べる。多孔質ゲルの収縮時 (36–50°C) の膨潤径は、 $\phi_m$  の増大に伴い減少し、いずれも複合ゲルのそれよりも小さかった。これは、マイクロカプセルの崩壊を示唆するものである。

図 4-8 に、10°C から 50°C または 50°C から 10°C の水中に移した時の種々の  $\phi_m$  の円柱状ゲルの収縮速度および膨潤速度を示す。収縮速度について述べる。NIPA ゲルは、10°C から 50°C の水中へ移した直後に表面が白濁した。この変化はスキン層と呼ばれる疎水性のゲル層の形成を示しており、スキン層はゲルの収縮を妨げることが知られている<sup>18,19)</sup>。NIPA ゲルは、4 h で表面にひび割れが生じて徐々に収縮し始め、およそ 24 h で平衡に達した (図なし)。semi-IPN ゲル、複合ゲル、および多孔質ゲルは、円柱状を保ったまま収縮し、10 min 以内で平衡に達した。多孔質ゲルの収縮速度は、複合ゲルのそれより速い傾

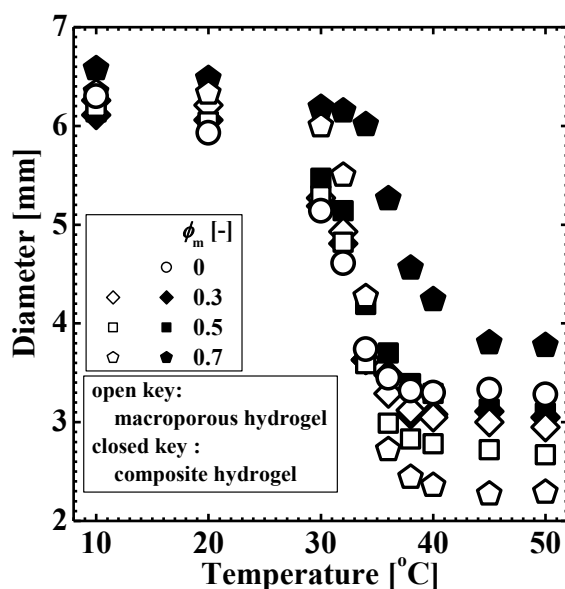


図 4-7 所定温度における水中の種々の  $\phi_m$  の円柱状ゲル (semi-IPN ゲル、複合ゲル、および多孔質ゲル、合成直後の大きさ  $\phi 6 \times 6$  mm) の膨潤径

向にあり、その差は $\phi_m = 0.7$  のゲルで最大となった。semi-IPN ゲルの収縮速度が従来の NIPA ゲルのそれよりも著しく速い理由として、構造の自由度の大きい線状 poly(NIPA)の存在およびその添加により生じた高分子網目の不均質構造の 2 つが挙げられる。Yoshinari らは、NIPA ゲルの合成と同時に線状 poly(NIPA)を添加した semi-IPN ゲルを作製し、ゲル中の線状 poly(NIPA)は通常の poly(NIPA)よりも低い温度 (20–30°C) で親・疎水転移することを明らかにした<sup>20)</sup>。また、この種の semi-IPN ゲルでは、合成時に線状 poly(NIPA)が高分子網目に粗密を生じさせ、相転移温度以上で水を排出するチャンネルがあるためにゲルの収縮速度が速くなると推測した。Yoshida らは、線状 poly(NIPA)をグラフトさせた NIPA ゲルを作製し、末端の自由度の大きいグラフト鎖が高分子網目よりも速く温度変化に応答して収縮して疎水性の核になり、高分子網目に強い疎水的な凝集力を作用させて収縮速度が速くなったと結論付けた<sup>21)</sup>。本研究の semi-IPN ゲルでも、線状 poly(NIPA)の素早い収縮および高分子網目の不均質構造により収縮速度が速くなったと考えられる。

膨潤速度について述べる。全てのゲルは、膨潤の初期段階では水に対する表面積が大きいところ (円柱の底面側) での膨潤が速くダンベル状になり、円柱の中央部分が他の位置よりも遅れて膨潤し、最終的に円柱状となった。NIPA ゲルは、約 1500 min で膨潤平衡に達した (図なし)。semi-IPN ゲルは、約 2000 min で膨潤平衡に達し、NIPA ゲルのそれよりも遅かった。線状 poly(NIPA)の添加により生じたゲルの不均質構造は、膨潤速度を速めると予想したがそうならなかった。複合ゲルおよび多孔質ゲルの膨潤挙動は同じであり、

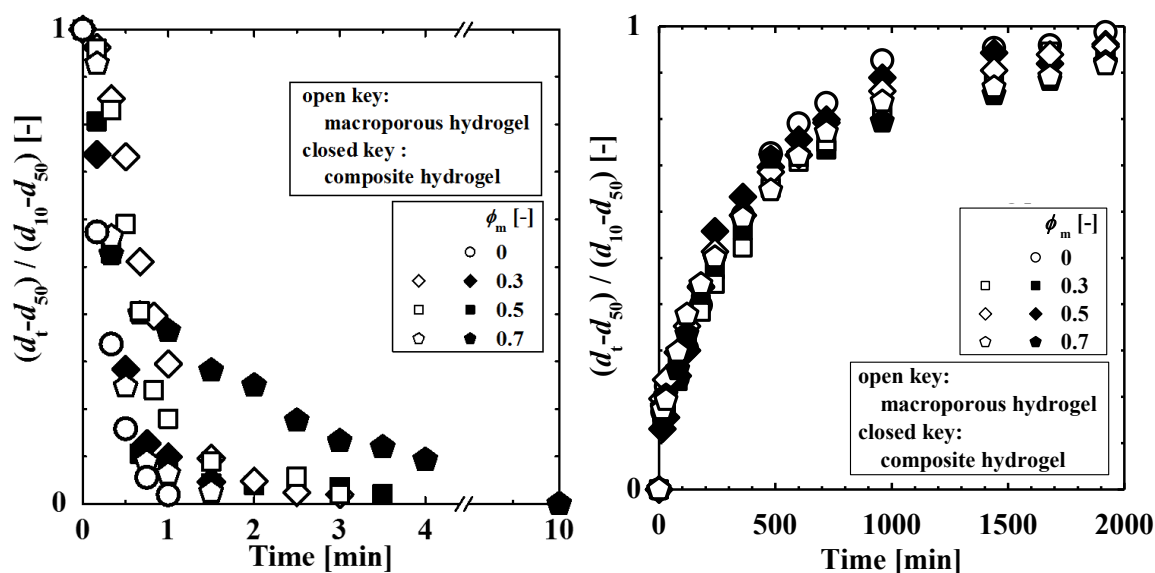


図 4-8 10°C から 50°C (左) または 50°C から 10°C (右) の水中に移した時の種々の  $\phi_m$  の円柱状ゲル (semi-IPN ゲル、複合ゲル、および多孔質ゲル、合成直後の大きさ  $\phi 6 \times 6$  mm) の収縮速度および膨潤速度 ( $d_t$ : 所定時間における膨潤径、 $d_{10}$ : 10°C における平衡膨潤径、 $d_{50}$ : 50°C における平衡膨潤径)

膨潤平衡に達するまでに 2000 min 以上を要した。わずかな差であったが、 $\phi_m$  の増加に伴い膨潤速度が遅くなる傾向があった。

### 4.3.3. ゲルの力学特性

図 4-9 に、種々の円柱状ゲルの圧縮試験における応力  $\Delta P$  とゲルの長さの変化の割合  $\Delta l/l_0$  の関係、およびせん断弾性係数  $\mu$  および圧縮強度  $F_c$  の関係を示す。ゲルの圧縮挙動について述べる。semi-IPN ゲルでは、圧縮変形したゲルの長さが初期の長さの 35% ( $\Delta l/l_0 = 0.65$ ) になったときに  $\Delta P$  が 28.1 kPa となり、さらなる圧縮で応力が減少した。この応力の減少は、ゲルが崩壊したことを示す。複合ゲルおよび多孔質ゲルは、どの  $\phi_m$  でも初期の長さの 43% まで圧縮されても壊れなかった。NIPA ゲルは、初期の長さの 52% に圧縮されると崩壊した。ゲルへの線状ポリマーの添加は、ゲルの弾性を改善したといえる。なお、ゲルが崩壊する前に応力を取り除くと、どのゲルも元の大きさに復元した。

ゲルの  $\mu$  および  $F_c$  について述べる。NIPA ゲルの  $\mu$  は 39.9 kPa、 $F_c$  は 103 kPa だった。semi-IPN ゲルの  $\mu$  は 23.8 kPa、 $F_c$  は 573 kPa だった。複合ゲルおよび多孔質ゲルの  $\mu$  および  $F_c$  は  $\phi_m$  の増大に伴い減少したが、 $\phi_m = 0.3$  のゲルの  $F_c$  は NIPA ゲルのそれよりも大きかった。semi-IPN 構造のゲルは、従来の NIPA ゲルよりも柔軟で丈夫だった。semi-IPN 構造では、図 4-1 に示したようにゲル中の線状 poly(NIPA) がマトリックスの高分子網目に複雑に絡み合い擬似的な架橋点を形成したためと考えられる。このことに関連して、Muniz らは、線状 poly(NIPA) を有する semi-IPN acrylamide ゲルの  $\mu$  が poly(NIPA) の量の増大に伴い

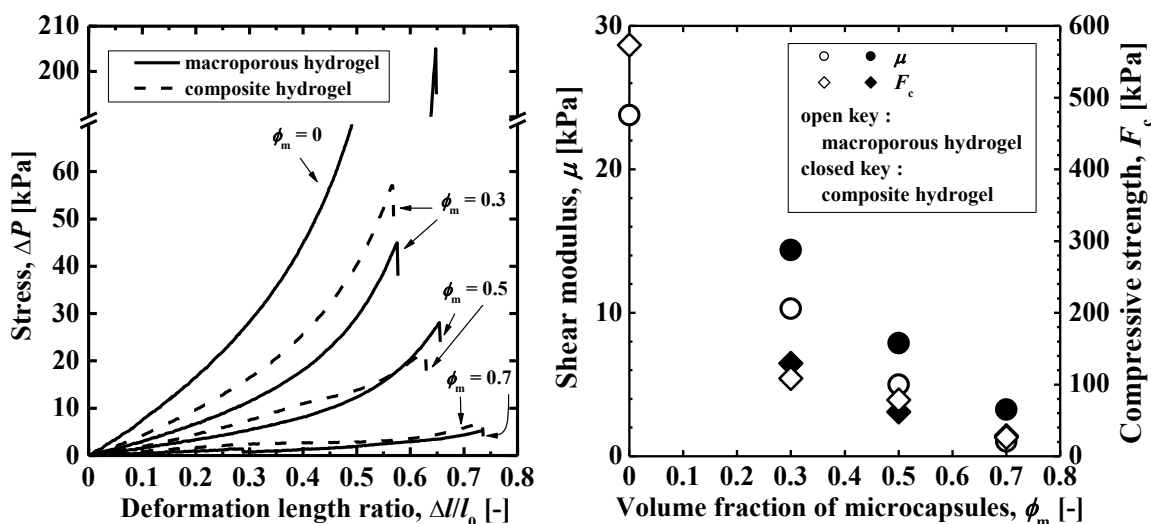


図 4-9 種々の円柱状ゲル (semi-IPN ゲル ( $\phi_m = 0$ )、および複合ゲルおよび多孔質ゲル ( $\phi_m = 0.3, 0.5$ 、および  $0.7$ )、合成直後の大きさ  $\phi 6 \times 6$  mm) の圧縮試験 (20°C) における応力  $\Delta P$  とゲルの長さの変化の割合  $\Delta l/l_0$  の関係 (左)、およびせん断弾性係数  $\mu$  および圧縮強度  $F_c$  の関係 (右)

増大する理由として、見掛けの架橋密度が増大するためと結論づけた<sup>9)</sup>。また、Flory 理論では、 $\mu$  はゲルのポリマーの体積分率の増大に伴い増大する<sup>22-24)</sup>。ポリマーの体積分率は、線状 poly(NIPA)の添加により増大し、 $\phi_m$ の増大に減少する。そのため、複合ゲルおよび多孔質ゲルの強度は $\phi_m$ の増大に伴い低下するが、 $\phi_m = 0.3$  のゲルでは線状 poly(NIPA)の存在により従来の NIPA ゲルよりも丈夫だったと考えられる。多孔質ゲルの  $\mu$  は、複合ゲルのそれより小さかった。これは、多孔質ゲルが複合ゲルより柔らかいことを示しており、マイクロカプセルの崩壊を示唆するものである。複合ゲルと多孔質ゲルの  $F_c$  は、同程度だった。結論として、この種のゲルの強度はゲルのポリマーの体積分率によって支配され、マイクロカプセルの有無はそれに影響を及ぼさないと考えられる。

#### 4.4. 結言

サスペンションゲル化法を用いて、calcium alginate マイクロカプセルを内包または鋳型とした semi-IPN NIPA 複合ハイドロゲルおよび多孔質ハイドロゲルを開発した。ゲルの特性評価から、以下の知見を得た。

- 1) 静電噴霧法により、個数中位径が約 120  $\mu\text{m}$  の単分散なマイクロカプセルを得た。
- 2) NIPA ゲルの外観は透明で、マイクロカプセルを含まない semi-IPN ゲル、複合ゲル、および多孔質ゲルの外観はいずれも白色だった。
- 3) ゲルの顕微鏡観察から、複合ゲルでは直径が約 120  $\mu\text{m}$  のマイクロカプセルが内包されていること、および多孔質ゲルではそのマイクロカプセルが崩壊して生じた直径が約 120  $\mu\text{m}$  の独立した孔を有する多孔質構造が明らかとなった。
- 4) 膨潤特性の評価から、複合ゲルおよび多孔質ゲルは、一般的な NIPA ゲルの性質である温度変化に伴う膨潤・収縮の体積相転移を示すことが明らかとなった。semi-IPN ゲル、複合ゲル、および多孔質ゲルの収縮速度は、ゲル内の線状 poly(NIPA)の速い温度応答性のために非常に速かった。semi-IPN ゲル、複合ゲル、多孔質ゲル、および NIPA ゲルの膨潤速度は同程度であり、マイクロカプセルおよびマクロ孔が膨潤速度に及ぼす影響はなかった。
- 6) 圧縮試験による力学特性の評価から、マイクロカプセルの体積分率が 0.3 の複合ゲルおよび多孔質ゲルは、従来の NIPA ゲルよりも強度が高かった。複合ゲルおよび多孔質ゲルの強度はゲルのポリマーの体積分率によって支配され、マイクロカプセルの有無はそれに影響を及ぼさない。

#### 引用文献

- 1) M. Antonietti, R. A. Caruso, C. G. Goltner, M. C. Weissenberger, *Macromolecules*, 32, 1383-1389 (1999)
- 2) Q. Zhao, J. Sun, Q. Ling, Q. Zhou, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 46, 6594-6603 (2008)



- 3) Q. Zhao, J. Sun, Q. Ling, Q. Zhou, *Langmuir*, 25, 3249-3254 (2009)
- 4) T. Kaneko, T. Asoh, M. Akashi, *Macromol. Chem. Phys.*, 206, 566-574 (2005)
- 5) Y. Takeoka, M. Watanabe, *Langmuir*, 18, 5977-5980 (2002)
- 6) 公益社団法人高分子学会ホームページ  
国際純正応用化学連合(IUPAC)高分子命名法委員会による高分子科学の基本的術語の用語集 (日本語訳)  
<http://main.spsj.or.jp/c19/iupac/Recommendations/glossary36.html> (2015年12月3日)
- 7) X. Z. Zhang, D. Q. Wu, C. C. Chu, *Biomaterials*, 25, 3793-3805 (2004)
- 8) N. K. Apohan, B. M. Baysal, *Macromol. Chem. Phys.*, 202, 1182-1188 (2001)
- 9) E. C. Muniz, G. Geuskens, *Macromolecules*, 34, 4480-4484 (2001)
- 10) Y. Fukui, T. Maruyama, Y. Iwamatsu, A. Fujii, T. Tanaka, Y. Ohmukai, *Colloids. Surf, A*, 370, 28-34 (2010)
- 11) Y. Hirokawa, T. Tanaka, *J. Chem. Phys.*, 81, 6379-6380 (1984)
- 12) H. Tokuyama, T. Iwama, *Sep. Purif. Technol.*, 68, 417-421 (2009)
- 13) H. Tokuyama, J. Hisaeda, S. Nii, S. Sakohara, *Sep. Purif. Technol.* 71, 83-88 (2010)
- 14) H. Tokuyama, T. Yoshida, L. He, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 50, 10270-10277 (2011)
- 15) H. Tokuyama, A. Kanehara, *Langmuir*, 23, 11246-11251 (2007)
- 16) H. Tokuyama, N. Ishihara, S. Sakohara, *Euro. Polym. J.*, 43, 4975-4982 (2007)
- 17) T. Tanaka, L. O. Hocker, G. B. Benedek, *J. Chem. Phys.*, 59, 5151-5159 (1973)
- 18) X. Z. Zhang, D. Q. Wu, C. C. Chu, *J. Appl. Polym. Sci.*, 89, 1935-1941 (2003)
- 19) H. Tokuyama, R. Kanazawa, S. Sakohara, *Sep. Purif. Technol.*, 44, 152-159 (2005)
- 20) E. Yoshinari, H. Furukawa, K. Horie, *Polymer*, 46, 7741-7748 (2005)
- 21) R. Yoshida, K. Uchida, Y. Kaneko, K. Sakai, A. Kikuchi, Y. Sakurai, T. Okano, *Nature*, 374, 240-242 (1995)
- 22) P. J. Flory, *Principles of Polymer Chemistry*, New York, Cornell University (1953)
- 23) Y. H. Bae, T. Okano, S. W. Kim, *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.*, 28, 923-936 (1990)
- 24) S. Sakohara, T. Takioka, T. Nikai, K. Takatani, *Kagaku Kogaku Ronbunshu*, 29, 62-69 (2003)

## 5 章 サスペンションゲル化法を用いた酵素固定化複合および多孔質ハイドロゲルの作製と加水分解反応特性

### 5.1. 緒言

酵素を高分子ゲルに固定化する手法の1つに包括法がある。酵素を含むプレゲル溶液をフリーラジカル重合することで、ゲルの合成と同時に酵素を高分子網目の中に固定できる。包括法の長所は、あらゆる種類の酵素および高分子を適用できること、および酵素が高分子との相互作用で失活する可能性が担体結合法および架橋法と比べて低いことである。短所は、酵素が重合反応場に曝されて失活すること、および高分子網目が大きすぎると酵素が漏出しやすく、小さすぎると酵素の構造の自由度が制限されて活性が低下しうることである。ゲルの合成時に酵素が失活した例として、Bernfeld は、trypsin などの7種類の酵素を均質 acrylamide ゲルの合成と同時に包括固定したが、酵素が重合反応場に曝されたために、その活性が著しく低下したと報告した<sup>1)</sup>。ゲルの合成時の酵素の失活を改善した例として、Soni らは、acrylamide と 2-hydroxyethyl methacrylate のゲルの合成同時の酵素  $\alpha$ -chymotrypsin の包括固定の際に、重合反応開始から 5 min 後にプレゲル水溶液に酵素水溶液を添加することで酵素の失活を防いだ<sup>2)</sup>。高分子ゲルが多孔質構造の場合、物質の良好な拡散透過性により見かけの反応速度を増大できうる。Petrov らは、孔の鑄型に氷晶を用いた多孔質 *N*-isopropylacrylamide (NIPA) ゲルの合成と同時に高分子網目内に酵素 urease を包括固定した<sup>3)</sup>。多孔質高分子ゲルの合成と同時にゲルのマクロ孔内へ酵素を包括固定した研究例は、文献調査した限り、我々の研究(2および3章)の他にはなかった。

本研究では、我々の開発したサスペンションゲル化法(4章)を酵素固定化担体の作製手法として応用することを提案する。サスペンションゲル化法では、酵素を含むマイクロカプセルを分散させたプレゲル水溶液をゲル化させて酵素固定化複合ゲルが作製される。次いで、そのマイクロカプセルを化学処理により崩壊させることで酵素固定化多孔質ゲル

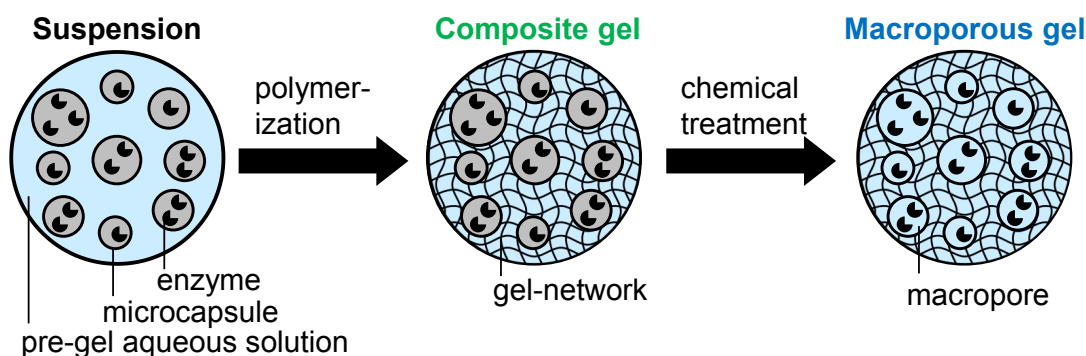


図 5-1 サスペンションゲル化を用いた酵素固定化複合および多孔質ハイドロゲルの概念図

が作製される (図 5-1)。この方法は、マイクロカプセルを介して酵素を重合反応場に曝すことなく多孔質ゲルの合成と同時にゲルのマクロ孔に酵素を包括固定できうる。さらに、多孔質ゲルの孔内の酵素は、高分子との相互作用や立体障害を受けずに、未固定の酵素と同等の機能を発現すると期待される。本研究の目的は、サスペンションゲル化法により酵素固定化多孔質ゲル粒子を開発し、その酵素反応特性を解明して多孔質構造の優位性を検証することである。モデル高分子は poly(ethylene glycol) diacrylate (PEGDA) ゲル粒子とし、プレゲル水溶液をノズルから滴下して油性媒体中でゲル化させる沈降重合法を用いて作製する<sup>4,5)</sup>。モデル酵素反応系は、酵素活性の評価が容易な加水分解酵素 lipase を用いた *p*-nitrophenylacetate (*p*-NPA) の *p*-nitrophenol (*p*-NP) への加水分解反応とした。酵素固定化ゲル粒子の外観および内部構造の観察、およびその酵素反応特性を調査した。ゲル作製時の化学種が lipase の活性に及ぼす影響を調査した。

## 5.2. 実験方法

### 5.2.1. 酵素固定化 PEGDA ゲル粒子の作製

lipase を内包した calcium alginate マイクロカプセルを、4.2.1.項に示した手法で作製した。lipase 試薬には天野エンザイム株式会社製 Lipase PS Amano SD (lipase (約 10%) と dextrin (約 90%) の混合物) を用いた。5 kg/m<sup>3</sup> sodium alginate および 10 kg/m<sup>3</sup> lipase 試薬を含む水溶液を、送液流量 10 cm<sup>3</sup>/h、印加電圧 3.1 kV で噴霧し、15 kg/m<sup>3</sup> calcium chloride および 10 kg/m<sup>3</sup> lipase 試薬を含む水溶液で捕集した。対向電極の内径は 10.72 mm とした。

酵素固定化複合ゲル粒子および多孔質ゲル粒子を、図 5-2 の装置を用いた沈降重合法で作製した。モノマーの PEGDA および重合促進剤の *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED) を含むモノマー水溶液 6 cm<sup>3</sup> を試験管に調製した。そこに、水中で保管していたマイクロカプセルを沈降させてデカンテーションによりできるだけ水を取り除いたシャーベット状のマイクロカプセルを加えて、モノマー懸濁液 9 cm<sup>3</sup> を調製した。開始剤の ammonium peroxodisulfate (APS) を含む開始剤水溶液 5 cm<sup>3</sup> をメスフラスコに調製した。最終のプレゲル水溶液 (連続相) の組成は PEGDA:TEMED:APS = 200:40:20 mol/m<sup>3</sup>-pre-gel aqueous solution、マイクロカプセルの体積分率は 0.3、およびプレゲル懸濁液の lipase 試薬濃度は 3 kg/m<sup>3</sup>-pre-gel suspension とした。モノマー懸濁液および開始剤水溶液をそれぞれ polypropylene 製シリンジに移して 1 h 窒素パージした。沈降重合の反応器 (ガラス管の内径 41 mm、液深さ 780 mm) 中の沈降媒体の silicone oil (信越シリコーン社製 KF-96-20cs) を 2 h 窒素パージした。モノマー懸濁液および開始剤水溶液をシリンジポンプを用いてそれぞれ 1.8 cm<sup>3</sup>/min および 0.2 cm<sup>3</sup>/min で送液した。モノマー懸濁液は、マイクロカプセルを分散させるためにシリンジ内に回転子 (φ5×15 mm) を入れて攪拌しながら送液した。これらの水溶液を合流させた流体を polypropylene 製ノズル (外径 5.10 mm、内径 2.60 mm、



2液の合流地点からノズル先端までの長さ 5.5 mm) から室温の silicone oil (23–27°C) へ滴下し、沈降重合を行った。ノズル先端から silicone oil 液面までの距離を約 40 mm とし、プレゲル液滴は反応器の壁面近傍に滴下した。液滴内のマイクロカプセルを分散させるために、反応器は地面に対して 73°に傾け、silicone oil 液面から約 260 mm 下の位置から窒素パージして silicone oil を攪拌して沈降中のプレゲル液滴が回転するようにした。滴下終了から 1 h 後に反応器の底部に堆積した複合ゲル粒子を取り出した。ゲル粒子を定規とともに写真撮影し、画像解析ソフトの ImageJ を用いて粒子径 (円相当径) を求めた。ゲル粒子を約 500 cm<sup>3</sup> の水に浸し、300 rpm で緩やかに攪拌しながら水で洗浄した (1 日毎の水の交換を 3 回行った)。水洗浄後の複合ゲル粒子の一部を 100 mol/m<sup>3</sup> trisodium citrate 水溶液に 48 h 以上浸し、次いで水で洗浄 (1 日毎の水の交換を 3 回) して多孔質ゲル粒子を作製した。同様の方法で、マイクロカプセルを含まない 3 kg/m<sup>3</sup> lipase 試薬の均質ゲル粒子を作製した。このとき、TEMED = 40 mol/m<sup>3</sup> ではノズル内でゲル化するため、TEMED = 20 mol/m<sup>3</sup> とした。

### 5.2.2. ゲルの観察

ゲルの内部構造を走査型電子顕微鏡 (SEM、日立ハイテクノロジーズ社製 TM-3030) で観察した。室温の水で膨潤した酵素固定化ゲル粒子を試料とし、3.2.2.項と同様の操作で前処理した。

ゲル内部の酵素の分布を観察するために、fluorescein-4-isothiocyanate (FITC) で蛍光標識した lipase (FITC-labeled lipase) 用いた酵素固定化複合および多孔質ゲル ( $\phi 5.8 \times 2$  mm)

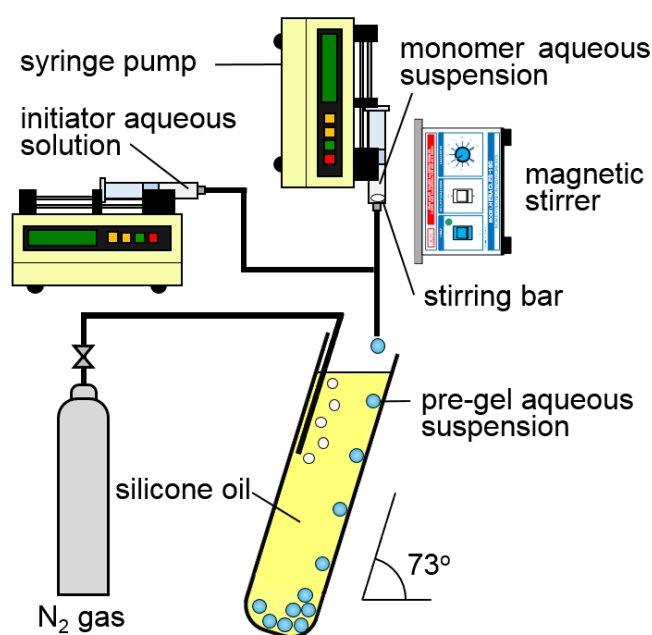


図 5-2 沈降重合法を用いたゲル粒子の合成装置の概略図

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 (実験方法の詳細は、2.2.2.項を参照)。ただし、FITC-labeled lipase の作製条件を、反応時間 4 h、遠心分離の時間 60 min、沈殿物の真空乾燥を 40°C で 2 日、次いで 50°C で 1 日とし、得られたフィルム状の FITC-labeled lipase をそのままゲルの作製に用いた。

### 5.2.3. *p*-nitrophenyl acetate の加水分解反応実験

酵素反応実験は回分操作で行った。ガラスセル (東新理工社製、光路長 10 mm、光路幅 10 mm、高さ 45 mm) に種々のゲル粒子 (均質、複合、および多孔質ゲル粒子) 4 個および 0.1 kmol/m<sup>3</sup> リン酸緩衝液 (0.05 kmol/m<sup>3</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O および NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O を含む水溶液、pH 6.8) 3 cm<sup>3</sup> を入れて、プログラム機能付恒温セルホルダを取り付けた紫外可視分光光度計 (日立ハイテクノロジーズ社製 U-2910) にセットした。そこに種々の濃度の *p*-NPA 溶液 (*p*-NPA は水に難溶であり、溶媒を 1,4-dioxane とした) 0.03 cm<sup>3</sup> を添加して、25°C、攪拌速度 SLOW (回転速度は不明) で酵素反応を開始した。酵素反応溶液中の *p*-NPA の初濃度  $S_0$  は、基本的には 0.2 mol/m<sup>3</sup> とし、反応速度解析では 0.1–0.3 mol/m<sup>3</sup> とした。水溶液の吸光度 (400 nm) を連続測定して生成物の *p*-NP の濃度  $S$  [mol/m<sup>3</sup>] を求め、 $S$  および  $S_0$  から *p*-NPA の転化率 ( $100S/S_0$ ) を求めた。*p*-NP の検量線は、所定濃度 (0–30 mol/m<sup>3</sup>) の *p*-NP 溶液 (溶媒 1,4-dioxane) 0.03 cm<sup>3</sup> と 0.1 kmol/m<sup>3</sup> リン酸緩衝液 3 cm<sup>3</sup> を混合した標準溶液の吸光度を連続的に 1 min 測定したデータの平均値を用いて作成した (*p*-NP 濃度が高いと吸光度の測定値が安定しなかった)。リファレンスには、*p*-NPA および *p*-NP を含まない 1,4-dioxane とリン酸緩衝液溶液の混合溶液を用いた。反応終了後のゲルを回収し、約 300 cm<sup>3</sup> の水に約 200 rpm で 20 min 以上浸した後ゲルの表面の水を軽く拭いてから繰り返し酵素反応実験を行った。また、ゲルの代わりに lipase 試薬 0.01 mg を仕込んだフリー酵素反応実験も行った。さらに、lipase 試薬を含まない加水分解反応実験 (ブランク実験) も行った。

ゲル合成時の化学種が lipase の活性に及ぼす影響を調査するため、重合反応場に曝された lipase を用いたフリー酵素反応実験を行った。TEMED:APS = 10:5、40:20、および 160:80 mol/m<sup>3</sup> および 3 kg/m<sup>3</sup> lipase 試薬を含む水溶液 (模擬プレゲル水溶液) を調製した。ガラスセルに模擬プレゲル水溶液 (調製して直ぐのもの、および 25°C で所定時間静置したもの) 0.005 cm<sup>3</sup> およびリン酸緩衝液 3 cm<sup>3</sup> を仕込み、*p*-NPA 溶液 0.03 cm<sup>3</sup> を添加して酵素反応を開始した。酵素反応溶液中の *p*-NPA の初濃度は、0.2 mol/m<sup>3</sup> とした。

trisodium citrate が lipase の活性に及ぼす影響を調査するため、trisodium citrate 水溶液に曝された lipase を用いたフリー酵素反応実験を行った。100 mol/m<sup>3</sup> trisodium citrate および 10 kg/m<sup>3</sup> lipase 試薬を含む水溶液を調製した。ガラスセルに、その水溶液 (調製して直ぐのもの、および 25°C で所定時間静置したもの) 0.005 cm<sup>3</sup> およびリン酸緩衝液 3 cm<sup>3</sup> を仕込み、*p*-NPA 溶液 0.03 cm<sup>3</sup> を添加して酵素反応を開始した。酵素反応溶液中の *p*-NPA の

初濃度は、 $0.2 \text{ mol/m}^3$ とした。

#### 5.2.4. ゲルの熱重量分析

ゲルの熱重量分析を行った。試料は、室温の水中の種々の酵素固定化ゲル粒子（均質、複合、および多孔質ゲル）を8分割したもの、Lipase PS Amano SD、sodium alginate、calcium alginate（5.2.1節と同様の操作で作製）、および酵素固定化 calcium alginate（5.2.1節で作製したもの）とした。それぞれの試料を前処理として  $50^\circ\text{C}$  の乾燥機で真空ポンプ（ULVAC社製 DTC-22、排気速度  $0.02 \text{ m}^3/\text{min}$ （50Hz）、到達真空度  $1.0 \times 10^3 \text{ Pa}$ ）を用いて 48 h 真空引きして乾燥させた（ただし、夜間は真空ポンプを停止した）。乾燥ゲル約 6 個（均質ゲル：3.093 mg、複合ゲル：3.168 mg、多孔質ゲル：2.932 mg）、Lipase PS Amano SD（粉末状、3.02 mg）、sodium alginate（粉末状、3.332 mg）、calcium alginate（フィルム状、2.745 mg）、および酵素固定化 calcium alginate（フィルム状、0.836 mg）をクリンプセル（直径 6 mm、高さ 1.5 mm、aluminum 製）に入れ質量を測定した。試料を熱重量測定装置（島津製作所社製 TGA-50H）に入れ、空気雰囲気下で  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  で  $600^\circ\text{C}$  まで加熱し、試料の質量変化をモニタリングした。

#### 5.2.5. GPC 分析

Lipase PS Amano SD および 2 種類の sodium alginate（和光純薬製、粘度の規格 80–120 cP および 300–400 cP）の平均分子量を GPC（gel permeation chromatography）を用いて測定した。カラムに昭和電工社製 OHpak SB-806M HQ、ガードカラム（不純物をトラップ）に昭和電工社製 OHpak SB-G、および検出器に示差屈折率検出器（島津製作所製 RID-10A）を用いた。移動相溶媒には、 $100 \text{ mol/m}^3 \text{ NaNO}_3$  水溶液を用いた。 $1 \text{ kg/m}^3$  Lipase PS Amano SD または  $1 \text{ kg/m}^3$  sodium alginate を含む  $\text{NaNO}_3$  水溶液を  $1 \text{ cm}^3/\text{min}$  で供給した。カラム温度は  $40^\circ\text{C}$ 、測定時間は 20 min とした。ピークトップ分子量が 6,100、9,600、21,100、47,100、107,000、194,000、337,000、および 642,000 g/mol の pullulan を標準物質とした。 $0.02 \text{ kg/m}^3$  pullulan の  $\text{NaNO}_3$  水溶液を用いて検量線を作成した。

### 5.3. 結果および考察

#### 5.3.1. ゲルの粒子径分布と内部構造

図 5-3 に、lipase を内包したマイクロカプセルの粒子径分布と外観を示す。粒子径分布は個数基準頻度で表し、階級間隔は  $10 \mu\text{m}$  である。マイクロカプセルの個数中位径  $d_{m50}$  は  $342 \mu\text{m}$  で、変動係数 CV は 11.2% だった。マイクロカプセル中の黒点は、lipase 試薬由来の水に不溶性の物質（不純物）だと思われる。

図 5-4 に、酵素固定化均質ゲル粒子および酵素固定化複合ゲル粒子の粒子径分布を示す。均質ゲル粒子の個数中位径  $d_{50}$  は  $4.16 \text{ mm}$  で、CV は 4.51% で単分散だった。送液したプレゲル溶液の体積と時間から求めたプレゲル溶液の液滴径は  $4.36 \text{ mm}$  で、 $d_{50}$  と同程度だっ

た。複合ゲル粒子の個数中位径  $d_{50}$  は 4.42 mm で、CV は 2.42% で単分散だった。プレゲル溶液の液滴径は 4.34 mm で、 $d_{50}$  と同程度だった。

図 5-5 に、酵素固定化均質ゲル粒子、複合ゲル粒子、および多孔質ゲル粒子を凍結乾燥したものの SEM 写真を示す。どのゲル粒子も、凍結乾燥により直径が元の約 4 mm から約 2 mm になり収縮した。均質ゲル粒子は、表面が凸凹していた。重合反応場に存在していた酵素は、高分子網目に疎密を生じさせたと考えられる。複合ゲル粒子は、短軸の長さが 100  $\mu\text{m}$  程度のいびつで皺のある粒子と表面が滑らかな連続部分が観察された。その粒

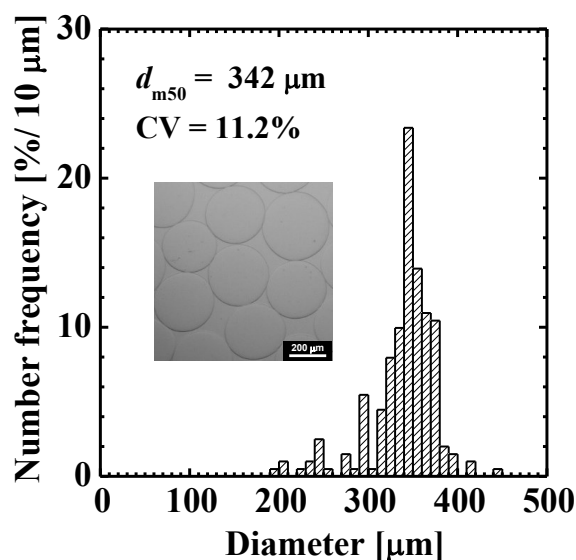


図 5-3 lipase を内包したマイクロカプセルの粒子径分布と外観

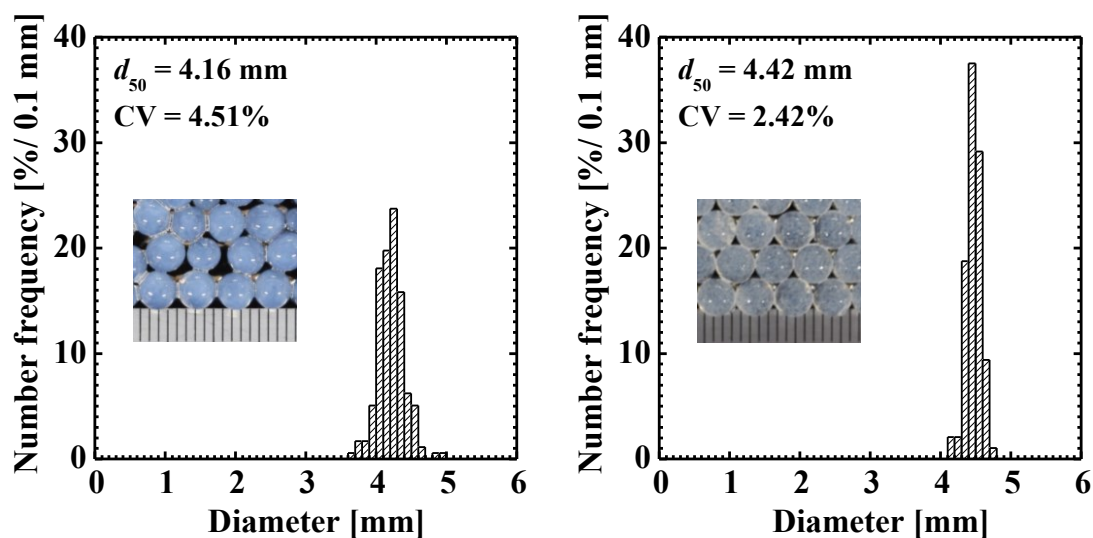


図 5-4 酵素固定化均質ゲル粒子（左）および酵素固定化複合ゲル粒子（右）の粒子径分布と外観

子は、マイクロカプセルの大きさが  $342\ \mu\text{m}$  (図 5-3) で、試料ゲル粒子の直径が凍結乾燥時に約半分になったことから、収縮したマイクロカプセルだと考えられる。滑らかな部分はゲル相であり、均質構造であると考えられる。多孔質ゲル粒子は、複合ゲルと同様の構造だった。このことをゲルの熱重量測定および sodium alginate の分子量測定の結果から議論する。

図 5-6 に、酵素固定化ゲル粒子 (均質ゲル、複合ゲル、および多孔質ゲル粒子)、Lipase PS Amano SD、sodium alginate、calcium alginate、および酵素固定化 calcium alginate (それぞれを  $50^\circ\text{C}$  で 2 日真空乾燥させたもの) の TG 測定結果を示す。縦軸の Weight [%] は TG 測定におけるサンプルの初期 (室温) の質量に対するある温度での質量の割合を示す。均質ゲルの Weight は、室温 -  $200^\circ\text{C}$  では緩やかに減少し、 $200^\circ\text{C}$  から著しく減少し始め、 $440^\circ\text{C}$  では数%、 $600^\circ\text{C}$  では 0% だった。すなわち、 $600^\circ\text{C}$  で PEGDA ゲルおよび lipase 試薬は全て完全燃焼した。複合ゲルおよび多孔質ゲルの Weight は、室温 -  $440^\circ\text{C}$  では均質ゲルのそれと同様の挙動を示したが、 $440^\circ\text{C}$  の約 10% から緩やかに減少し、 $500^\circ\text{C}$  付近でさらに減少して  $600^\circ\text{C}$  でそれぞれ 1.62 および 1.45% だった。均質ゲル、および複合ゲルと多孔質ゲルの Weight の変化の挙動は、 $440$  -  $520^\circ\text{C}$  で明らかに異なった。Lipase PS Amano SD の Weight は、室温 -  $300^\circ\text{C}$  では緩やかに減少し、 $300^\circ\text{C}$  付近で著しく減少し始めて、 $600^\circ\text{C}$  で 1.38% だった。sodium alginate の Weight は、 $230^\circ\text{C}$  付近で著しく減少し始めて、 $300^\circ\text{C}$  付近で緩やかになり、 $590^\circ\text{C}$  で再び著しく減少して  $600^\circ\text{C}$  で 26.4% だった。sodium alginate ( $(\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_6)_n$ ) 中の Na の質量分率は、0.117 である。Na が空气中で水および  $\text{CO}_2$  の存在下で酸化反応すると  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  が生成されると予測される。sodium alginate から  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  が生成した場合の質量分率は、0.267 である。calcium alginate の Weight は、酵素の有無によらずその変化の挙動が sodium alginate のそれと同様だったが、 $520^\circ\text{C}$  で再び著しく減少して  $600^\circ\text{C}$  で約 23% だった。sodium alginate および calcium alginate では、 $600^\circ\text{C}$  でも Na 酸化物または Ca 酸化物が灰分として残留したと考えられる。 $440$  -  $520^\circ\text{C}$  での均質ゲル、および

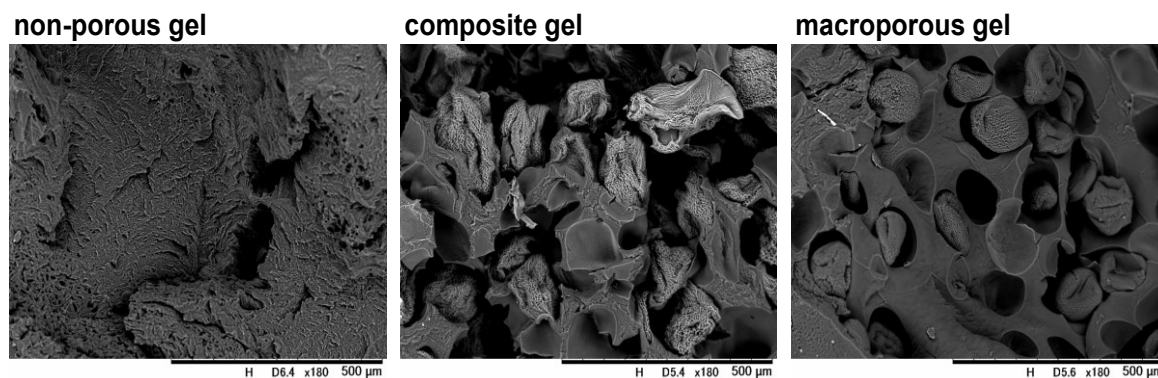


図 5-5 酵素固定化均質ゲル粒子、複合ゲル粒子、および多孔質ゲル粒子を凍結乾燥したものの SEM 写真

複合ゲルと多孔質ゲルの Weight の異なる挙動は、複合および多孔質ゲルの内部に sodium alginate または calcium alginate が存在しているためといえる。

表 5-1 に、sodium alginate および Lipase PS Amano SD の数平均分子量  $M_n$ 、重量平均分子量  $M_w$ 、および多分散度  $M_w/M_n$  を示す。sodium alginate の  $M_w$  は、約 670,000 g/mol だった。マイクロカプセルは trisodium citrate により崩壊したと考えられるが、sodium alginate はその大きさから均質構造の高分子網目を通過できずにゲル内に残留し、凍結乾燥時に集合体になったと考えられる。Lipase PS Amano SD の GPC 分析では 2 つのピークが得られ、それぞれの  $M_w$  は約 33,000 および 1,200 g/mol だった。lipase の分子量は、起源により異なるが、数万〜10 万程度である<sup>9)</sup> (詳細は不明だが、クロマトグラフィーを用いて測定したと思われる)。  $M_w = 33,000$  g/mol のものは lipase 由来で、  $M_w = 1,200$  g/mol のものは Lipase 試薬に含まれている dextran (glucose のみからなる多糖類) だと考えられる。

図 5-7 に、FITC-labeled lipase を用いた合成直後の酵素固定化複合ゲル粒子、水洗浄後の酵素固定化複合ゲル粒子、および多孔質ゲル粒子の CLSM 画像を示す。どのゲルにおいても直径が約 200  $\mu\text{m}$  の球状のものと、その中にのみ緑色に蛍光した約 3  $\mu\text{m}$  の斑点が確認された。直径が約 200  $\mu\text{m}$  の球状のものは、マイクロカプセルまたはマクロ孔だと考えられる。緑色に蛍光した斑点は FITC-labeled lipase であり、lipase はマイクロカプセルまたはマクロ孔の中に包括固定されていることが明らかとなった。

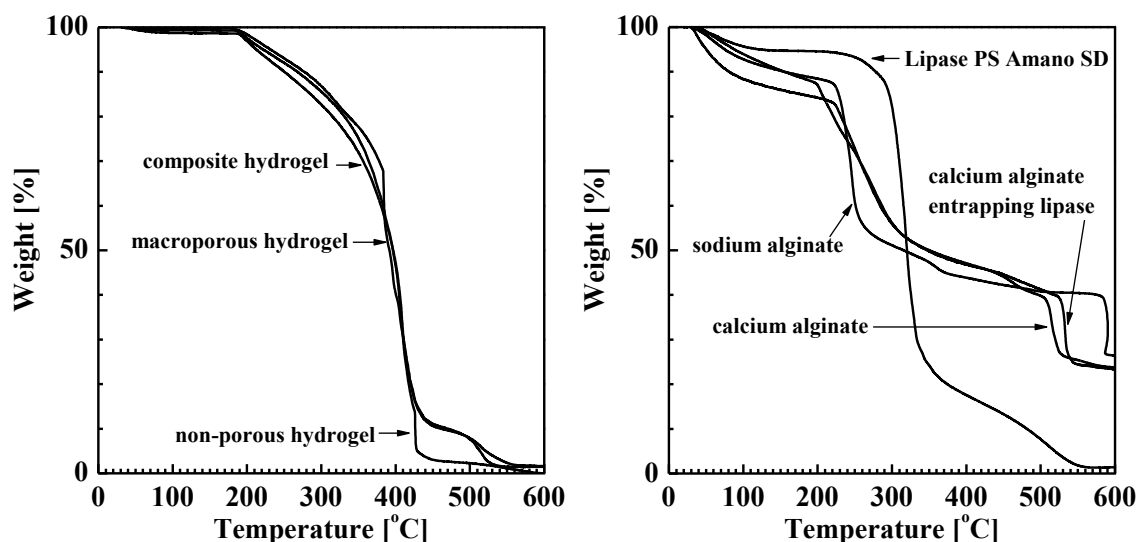


図 5-6 酵素固定化ゲル粒子 (均質ゲル、複合ゲル、および多孔質ゲル粒子)、Lipase PS Amano SD、sodium alginate、calcium alginate、および酵素固定化 calcium alginate のそれぞれを 50°C で 2 日真空乾燥させたものの TG 測定結果

表 5-1 sodium alginate (2 種類の規格) および Lipase PS Amano SD の数平均分子量  $M_n$ 、重量平均分子量  $M_w$  および多分散度  $M_w/M_n$

Type of polymer	run	Number of Peak [-]	$M_n$ [g/mol]	$M_w$ [g/mol]	$M_w/M_n$ [-]
sodium alginate (80–120 cP) <sup>a</sup>	1	1	282,000	681,000	2.42
sodium alginate (80–120 cP) <sup>a</sup>	2	1	256,000	663,000	2.59
sodium alginate (300–400 cP) <sup>b</sup>	1	1	429,000	834,000	1.93
sodium alginate (300–400 cP) <sup>b</sup>	2	1	368,000	841,000	2.29
Lipase PS Amano SD	1	2 (1st peak)	16,700	33200	1.98
Lipase PS Amano SD	1	2 (2nd peak)	502	1240	2.47
Lipase PS Amano SD	2	2 (1st peak)	15,900	32300	2.03
Lipase PS Amano SD	2	2 (2nd peak)	459	1210	2.63

<sup>a</sup> 本研究で使用

<sup>b</sup> 本研究で使用していない (参考)

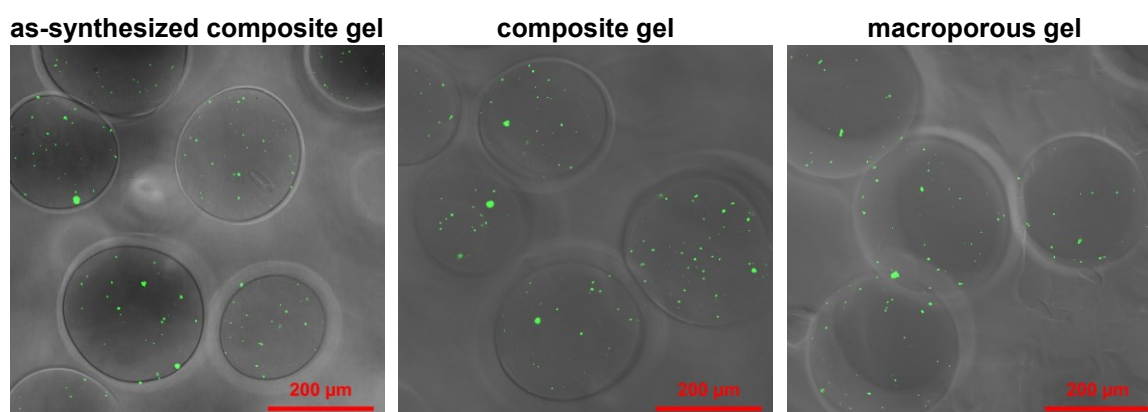


図 5-7 FITC-labeled lipase を用いた合成直後の酵素固定化複合ゲル粒子、水洗浄後の複合ゲル粒子、および多孔質ゲル粒子の CLSM 画像

### 5.3.2. ゲルの酵素反応特性

図 5-8 に、酵素を添加しない系および酵素を添加した系の 25°C での  $p$ -NPA の加水分解反応における  $p$ -NP の転化率の経時変化を示す。10 kg/m<sup>3</sup> lipase 試薬を内包したマイクロカプセル 0.1 cm<sup>3</sup> を用いた  $p$ -NPA の加水分解反応を行ったところ、リン酸緩衝液中のマイクロカプセルは数分で溶解したため、実験を中止した。酵素を添加しない系の転化率は経時的に増大し、 $p$ -NPA は自発的に加水分解した。酵素を添加した系の転化率は酵素の形態によらず経時的に増大した。酵素を添加した系の酵素量は、反応速度がそれぞれの系で同程度になるように、そして酵素を添加しない系よりも速い反応速度が得られるように調整した。本実験系では  $p$ -NPA が酵素なしでも加水分解されるが、酵素を添加した系の反応初速度  $V_0$  [mol/(s·kg-Lipase PS)] は、自発的な  $p$ -NPA の加水分解を含んだ値とし、転化率が

5%以下となる  $p$ -NP の生成量 [mol] の経時変化の近似直線の傾きから求めた。

図 5-9 に、種々の酵素固定化ゲル粒子を用いた 25°C での  $p$ -NPA の繰り返し加水分解反応実験 ( $S_0 = 0.2 \text{ mol/m}^3$ ) の単位 lipase 試薬質量あたりの反応初速度  $V_0$  を示す。均質ゲル粒子、複合ゲル粒子、および多孔質ゲル粒子の  $V_0$  は 1st–12th cycle で同程度だった。酵素固定化ゲル粒子は、ゲルからの酵素の漏出がなく、繰り返し利用できることが示された。

$p$ -NPA の加水分解反応の反応速度解析を以下の Michaelis-Menten 式<sup>6-8)</sup>を用いて行った。



$$V = V_{\max} S / (K_m + S) \quad (2)$$

$$K_m = (k_{-1} + k_2) / k_{+1} \quad (3)$$

ここで、E は酵素 (lipase)、S は基質 ( $p$ -NPA)、ES は酵素と基質の複合体、および P は生成物 ( $p$ -NP) である。 $K_m$  [mol/m<sup>3</sup>] はミカエリス定数、 $k_{+1}$  [m<sup>3</sup>/(mol·s)]、 $k_{-1}$  [s<sup>-1</sup>]、および  $k_2$  [s<sup>-1</sup>kg-Lipase PS<sup>-1</sup>] はそれぞれ ES の生成反応の正反応および逆反応、および P の生成反応の正反応の反応速度定数である。 $V_{\max}$  [mol/(s·kg-Lipase PS)] は最大反応速度であり、 $V_{\max} = k_2 E_0$  ( $E_0$  [mol/m<sup>3</sup>] は総括の (仕込みの) 酵素濃度) で表される。また、 $V_{\max}$  は、反応溶液中の基質の濃度  $S \rightarrow \infty$  のときの反応速度  $V$  [mol/(s·kg-Lipase PS)] である。

$K_m$  および  $V_{\max}$  は、反応溶液中の  $p$ -NPA の初濃度  $S_0$  の逆数に対して  $V_0$  の逆数をプロットした、以下のいわゆる Lineweaver-Burk プロットの直線の傾きおよび y 切片の値から求めた。

$$1/V_0 = (K_m/V_{\max}) (1/S_0) + 1/V_{\max} \quad (4)$$

図 5-10 および表 5-2 に、フリー酵素および種々の酵素固定化ゲル粒子を用いた  $p$ -NPA

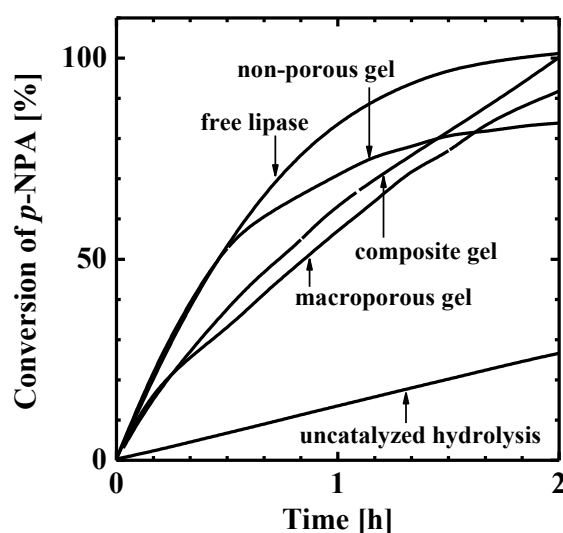


図 5-8 酵素を添加しない系および酵素を添加した系 (フリー酵素 (0.01 mg)、均質ゲル (lipase 試薬 0.45 mg 相当)、複合ゲル、および多孔質ゲル (lipase 試薬 0.54 mg 相当)) の 25°C での  $p$ -NPA の加水分解反応 ( $S_0 = 0.2 \text{ mol/m}^3$ ) における  $p$ -NPA の転化率の経時変化



の加水分解反応の Lineweaver-Burk プロット、および  $V_{\max}$  および  $K_m$  を示す。 $V_{\max}$  は、反応溶液中の  $p$ -NPA の初濃度  $S_0 \rightarrow \infty$  のときの反応速度である。 $K_m$  は、反応速度が  $V_{\max}/2$  となるときの基質の濃度に相当し、種々の反応系で  $V_{\max}$  が同じであれば、 $K_m$  の値は小さい方が物質生産にとって良い。フリー酵素の  $V_{\max}$  はどの固定化酵素のそれよりも約 100 倍大きく、フリー酵素の  $K_m$  は固定化酵素のそれと同じオーダーだった。フリー酵素は反応溶液全体に分布するために基質との接触頻度が高く、固定化酵素はゲル中を通る基質の拡散抵抗が生じて基質との接触頻度が低いと考えられる。

固定化酵素の  $V_{\max}$  および  $K_m$  について述べる。均質ゲルの  $V_{\max}$  は、複合および多孔質ゲルのそれよりも約 1.5 倍大きかった。均質ゲルの  $K_m$  は、複合および多孔質ゲルのそれより小さかった。つまり、均質ゲルは、複合ゲルおよび多孔質ゲルよりも反応を良く触媒しているといえる。酵素は、均質ゲルでは全域に存在しており、複合ゲルおよび多孔質ゲルでは局所（マイクロカプセルおよびマクロ孔の中）に存在している。 $p$ -NPA の加水分解反応速度が速く、用いたゲルの大きさではどのゲルも中心部の酵素が働いていないと考えられる。したがって、ゲルの表面近傍の酵素量、すなわち酵素反応に有効な酵素量は均質ゲルの方が複合および多孔質ゲルよりも多く、均質ゲルの単位 lipase 試薬量あたりの最大反応速度が大きくなったと推測される。複合ゲルと多孔質ゲルでは多孔質ゲルの方が物質生産にとって良いと予想したが、 $V_{\max}$  および  $K_m$  は同程度だった。この理由として、多孔質ゲルのマクロ孔内に残存した sodium alginate が基質の拡散抵抗となっているためと推測される。

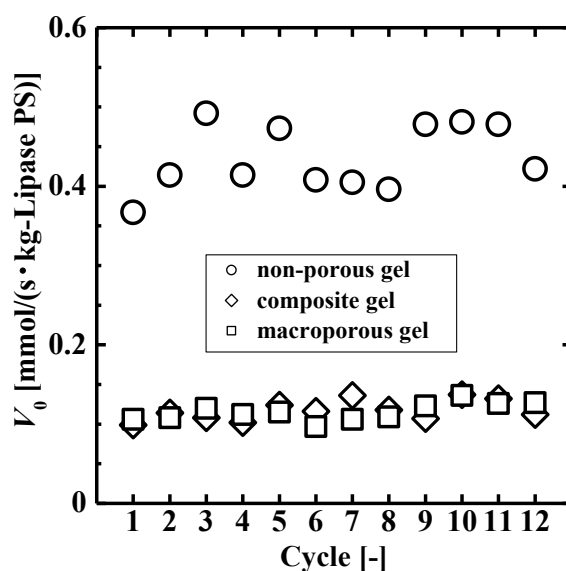


図 5-9 種々の酵素固定化ゲル粒子（均質ゲル (lipase 試薬 0.45 mg 相当)、複合ゲル、および多孔質ゲル (lipase 試薬 0.54 mg 相当)) を用いた 25°C での  $p$ -NPA の繰り返し加水分解反応 ( $S_0 = 0.2 \text{ mol/m}^3$ ) の単位 lipase 試薬質量あたりの反応初速度  $V_0$

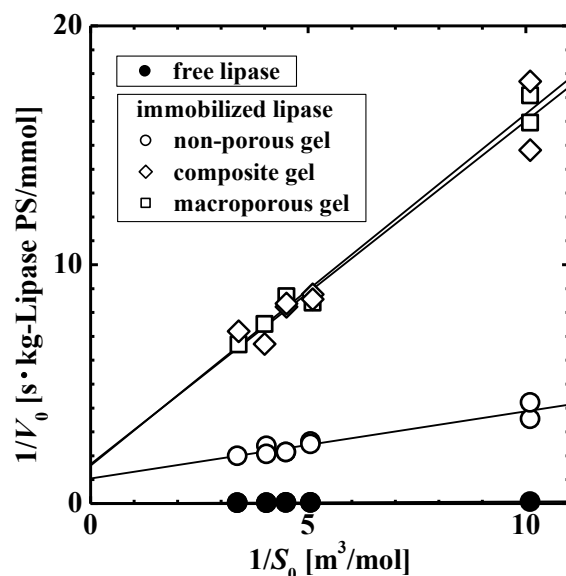


図 5-10 フリー酵素 (lipase 試薬 0.01 mg) および種々の酵素固定化ゲル粒子 (均質ゲル (lipase 試薬 0.45 mg 相当)、複合ゲル、および多孔質ゲル (lipase 試薬 0.54 mg 相当)) を用いた 25°C での *p*-NPA の加水分解反応の Lineweaver-Burk プロット

表5-2 フリー酵素および種々の酵素固定化ゲル粒子均質ゲル粒子、複合ゲル粒子、および多孔質ゲル粒子を用いた25°Cでの*p*-NPAの加水分解反応の最大反応速度 $V_{max}$ およびミカエリス定数 $K_m$

	Lineweaver-Burk プロットの 近似直線の式	R <sup>2</sup> 値 [-]	$V_{max}$ [mmol/(s·kg-Lipase PS)]	$K_m$ [mol/m <sup>3</sup> ]
free lipase	$1/V_0 = 0.6771 (1/S_0) + 1.061$	0.9845	94.0	0.638
non-porous gel	$1/V_0 = 0.6200 (1/S_0) + 2.303$	0.9196	0.956	0.269
composite gel	$1/V_0 = 2.638 (1/S_0) + 3.147$	0.9539	0.607	0.873
macroporous gel	$1/V_0 = 2.718 (1/S_0) + 2.936$	0.9878	0.628	0.926

表5-3 フリー酵素および酵素固定化多孔質SBA-15粒子を用いた23°Cでの*p*-NPAの加水分解反応の最大反応速度 $V_{max}$ およびミカエリス定数 $K_m$ )

	孔径 [Å]	粒子径 [μm]	酵素含有量 [mg-lipase/mg-support]	$V_{max}$ [mmol/(s·kg-lipase)]	$K_m$ [mol/m <sup>3</sup> ]
free lipase	none	none	none	$14 \times 10^3$	0.25
固定化酵素	55	2.2	7.81	$4.3 \times 10^3$	0.16
固定化酵素	240	2.4	44.5	$14 \times 10^3$	0.26

図 5-11 に、25°C で 100 mol/m<sup>3</sup> trisodium citrate 水溶液に所定時間浸漬した lipase 試薬を用いた 25°C での *p*-NPA の加水分解反応の反応初速度  $V_0$  を示す。lipase は、24 h の浸漬でも活性を維持した。多孔質ゲルの作製に用いた trisodium citrate 水溶液が lipase の活性に及ぼす影響はないといえる。複合ゲルおよび多孔質ゲルの反応速度および繰り返し性能は同程度であり、マイクロカプセルはリン酸緩衝液中で崩壊することから、複合ゲルのままでも十分に酵素反応に適用できうる。

*p*-NPA の加水分解反応の反応速度解析に関する既往の研究結果を示す。Jaladi らは、孔径が 55 および 240 Å、粒子径が約 2 μm のメソポーラスシリカ (SBA-15) に物理吸着させた *Burkholderia cepacia* lipase (天野エンザイム社製、純度 88.3%、lipase の起源は Lipase PS と同じ) を用いて 23°C で反応を行った (表 5-3) <sup>7)</sup>。固定化酵素の  $V_{max}$  および  $K_m$  は、孔径が 55 Å のものはそれぞれ  $4.3 \times 10^3$  mmol/(s·kg-lipase) および 0.16 mol/m<sup>3</sup>、孔径が 240 Å のものはそれぞれ  $14 \times 10^3$  mmol/(s·kg-lipase) および 0.26 mol/m<sup>3</sup> だった。フリー酵素のそれらは、 $14 \times 10^3$  mmol/(s·kg-lipase) および 0.25 mol/m<sup>3</sup> だった。酵素の活性は、固定化によって大きく低下することはなかった。固定化酵素の  $V_{max}$  の違いは基質の拡散速度の違いによるものと結論付けた。Pencreac'h らは、既製の粒子径 200–1000 μm の多孔質 polypropylene に物理吸着させた *Pseudomonas cepacia* lipase を用いて 37°C で反応を行った <sup>8)</sup>。固定化酵素の  $V_{max}$  および  $K_m$  はそれぞれ 0.048 mmol/(s·kg-lipase) および 0.9 mol/m<sup>3</sup> で、フリー酵素のそれらはそれぞれ 0.15 mmol/(s·kg-lipase) および 0.87 mol/m<sup>3</sup> だった。Abuin らは、界面活性剤 sodium 1,4-bis (2-ethylhexyl) sulfosuccinate を含む種々の有機溶媒に *Mucor javanicus* lipase を含む水溶液を添加したフリー酵素を用いて 25°C で反応を行い、 $K_m$  は 1.0–3.4 mol/m<sup>3</sup> だった ( $V_{max}$  は求めている) <sup>9)</sup>。

本研究の  $V_{max}$  および  $K_m$  を、lipase の起源および反応条件が類似の Jaladi らのそれらと比較する。フリー酵素の  $V_{max}$  および  $K_m$  を比較する。本研究の  $V_{max}$  は、Jaladi らのそれの約 140 分の 1 だった。本研究の  $V_{max}$  は単位 Lipase 試薬量で除しており、Jaladi らは単位 lipase 量で除している。Lipase PS 中の lipase の含有量は 10%程度であることを勘案しても、本研究の  $V_{max}$  は Jaladi らのそれよりも小さい。また、本研究の  $K_m$  は、Jaladi らのそれよりも約 3 倍大きかった。これらは、lipase の Lot no.の違いによる活性の違いだと考えられる。固定化酵素の  $V_{max}$  および  $K_m$  を比較する。本研究の  $V_{max}$  は、Jaladi らのそれよりも著しく小さかった。これは、反応に用いた固定化担体の大きさの違いによるものと考えられる。本研究の  $K_m$  は、Jaladi らのそれと同程度だった。本研究の固定化酵素は、 $k_1$  が非常に小さいと考えられ、酵素と基質の接触頻度が低いと推測される。種々の大きさのゲル粒子を用いた反応速度解析を行えば、酵素反応機構を解明できると考える。

図 5-12 に、種々の濃度の TEMED および APS の重合反応場に所定時間曝された lipase を用いた 25°C での *p*-NPA の加水分解反応の反応初速度  $V_0$  を示す。 $V_0$  は、どの条件でも

重合反応場に曝された時間の増大に伴い減少した。0 h の  $V_0$  は、条件ごとに異なった。模擬プレゲル溶液を調製してから吸光度の測定開始までに数分かかり、 $V_0$  は測定開始から数分までのデータを用いて求めた。lipase は、TEMED および APS と接触してから数分間にその一部が失活したと考えられる。24 h での TEMED:APS = 10:5、40:20、160:80 mol/m<sup>3</sup> の応初速度は、それぞれ 0.183、0.331、および 0.274 nmol/s だった。TEMED、APS、およ

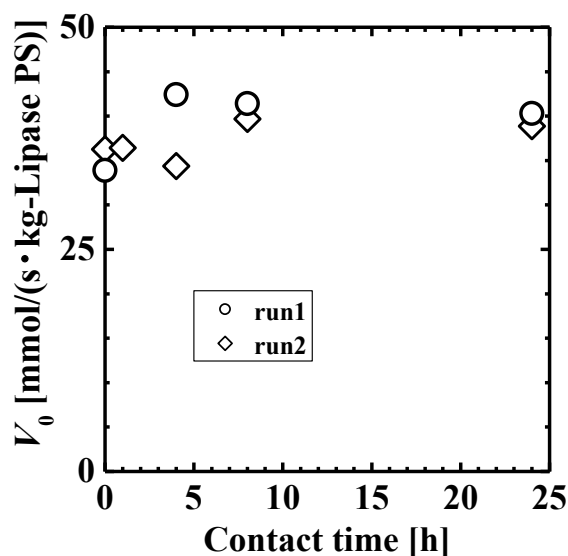


図 5-11 25°C で 100 mol/m<sup>3</sup> trisodium citrate 水溶液に所定時間浸漬した lipase 試薬 (10 kg/m<sup>3</sup>) を用いた 25°C での *p*-NPA の加水分解反応 ( $S_0 = 0.2$  mol/m<sup>3</sup>) の反応初速度  $V_0$

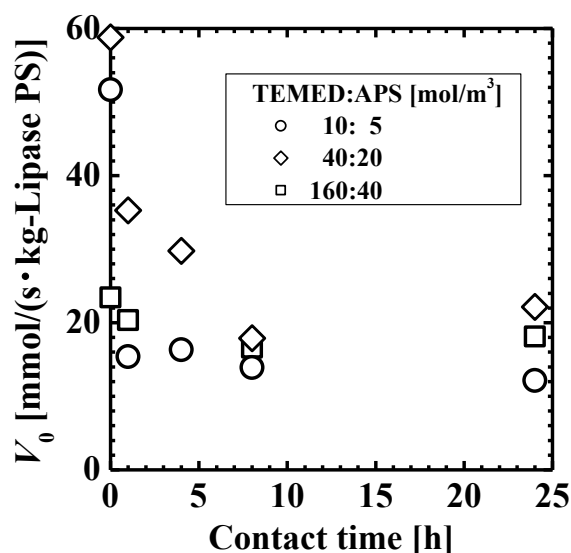


図 5-12 種々の濃度の TEMED および APS (TEMED:APS = 10:5、40:20、および 160:80 mol/m<sup>3</sup>) の重合反応場 (25°C) に所定時間曝された lipase 試薬 (3 kg/m<sup>3</sup>) を用いた 25°C での *p*-NPA の加水分解反応 ( $S_0 = 0.2$  mol/m<sup>3</sup>) の反応初速度  $V_0$

び lipase を含まない系では、*p*-NPA の自発的な加水分解の反応初速度が約 0.05 nmol/s だった。したがって、lipase 試薬を用いた系では、反応初速度が 0.05 nmol/s になったときに lipase が完全に失活したといえる。lipase は、重合反応場に曝された瞬間から失活し始め、数時間でほとんど失活しうる。

#### 5.4. 結言

サスペンションゲル化法を用いて、複合および多孔質ゲルの合成と同時に酵素 lipase を重合反応場に曝することなくその calcium alginate マイクロカプセルおよび孔の中に包括固定した酵素固定化複合ゲル粒子および多孔質ゲル粒子を開発した。ゲルの特性評価から、以下の知見を得た。

- 1) 静電噴霧法により個数中位径が約 230  $\mu\text{m}$  の酵素を含むマイクロカプセル、および沈降重合法により個数中位径が約 4 mm の単分散な酵素固定化均質ゲル粒子および複合ゲル粒子を得た。
- 2) ゲルの顕微鏡観察から、均質ゲルは高分子網目に疎密があること、複合ゲルにマイクロカプセルが内包されていること、および多孔質ゲルではマイクロカプセルが崩壊しているがゲル外に排出されていないことが明らかとなった。複合ゲルおよび多孔質ゲル内で、lipase はマイクロカプセルおよびマクロ孔の中にのみ存在していることが明らかとなった。
- 3) 酵素固定化複合ゲル粒子および多孔質ゲル粒子は、*p*-NPA の加水分解反応を触媒し、繰り返し利用できる。反応速度解析の結果、複合ゲルおよび多孔質ゲルに固定化された lipase の活性は、同程度だった。
- 4) lipase は、重合反応場に曝された瞬間から失活し始め、数時間でほとんど失活した。多孔質ゲルを作製するために用いる trisodium citrate は、lipase の活性に及ぼす影響はない。

#### 引用文献

- 1) P. Bernfeld, J. Wan, *Science*, 142, 678-679 (1963)
- 2) S. Soni, J. D. Desai, S. Devi, *J. Appl. Polym. Sci.*, 77, 2996-3002 (2000)
- 3) P. Petrov, S. Pavlova, C. B. Tsvetanov, Y. Topalova, R. Dimkov, *J. Appl. Polym. Sci.*, 122, 1742-1748 (2011)
- 4) E. Ruckenstein, L. Hong, *Polymer*, 36, 2857-2860 (1995)
- 5) H. Tokuyama, N. Yazaki, *React. Funct. Polym.*, 70, 967-971 (2010)
- 6) 岩井美枝子、リパーゼ その基礎と応用、幸書房、pp.145-146、1991年
- 7) H. Jaladi, A. Katiyar, S. W. Thiel, V. V. Gulians, N. G. Pinto, *Chem. Eng. Sci.*, 64, 1474-1479 (2009)

- 8) G. Pencreac'h, J. C. Baratti, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 47, 630-635 (1997)
- 9) E. Abuin, E. Lissi, M. A. Biasutti, R. Duarte, *Protein J.*, 26, 475-479 (2007)

## 6 章 油性媒体中で高活性を発現する酵素固定化両親媒性共重合ゲルの作製とエステル化反応特性

### 6.1. 緒言

脂肪分解酵素の lipase は、一般に水中で触媒活性を示す。lipase は、油性媒体中において沈殿、凝集するために基質と接触する機会が減少して見掛けの活性が減少し、さらに、活性部位を内部に閉じ込める構造変化によって失活しうる<sup>1)</sup>。このような欠点は、不溶性の担体、例えば高分子ゲルへの固定化によって改善されうる。N-vinyl-2-pyrrolidone と styrene 共重合ゲルに包括固定した lipase は、油性媒体中のエステル化反応で固定化していないフリーlipase よりも高い活性を発現した<sup>2)</sup>。親水性の 2-hydroxyethyl acrylate および疎水性の dimethylsiloxane の共重合ゲルに包括固定した酵素 horseradish peroxidase (HRP) は、ゲル内の局所の親水部が酵素に至適な水環境を供し、疎水部が油性の基質および生成物の拡散を容易にして、油性媒体中の酸化カップリング反応でフリーHRP よりも高い活性を発現した<sup>3)</sup>。

本研究の目的は、油性媒体中での酵素反応において高活性を発現する新規な酵素固定化高分子ゲルを開発することである。具体的には、感温性と両親媒性の性質をもつ N-isopropylacrylamide (NIPA) ゲルに親水性モノマーの poly(ethylene glycol) methyl ether acrylate (PEGMEA) を共重合した NIPA-co-PEGMEA ゲルを提案する。poly(NIPA)を用いる狙いは、以下の2点がある。ゲルの合成時の溶媒を水とすれば、ゲルの合成と同時にゲル内への酵素の分散した固定化を容易に行える。ゲルを酵素反応へ適用する時には、まず転移温度(約 33°C)以上で疎水性となる NIPA ゲルは油性媒体を吸収でき、その後は使用温度によらず(転移温度以下でも)疎水性の分子がゲル内外へ拡散できるようになる。NIPA ゲルへの PEGMEA の導入の狙いは、油性媒体を吸収したゲルの局所を保水状態にして酵素に至適な水環境を提供しその活性および安定性を高めることである。さらに、油性媒体を吸収したゲル内の親水性の poly(ethylene glycol)部分は、それ同士がチャンネルを形成し、エステル化反応で副生成する水をゲル外へ排出しうる<sup>3,4)</sup>。

本研究のモデル酵素反応系は、バイオディーゼル燃料の生産を指向して lipase を用いた oleic acid と ethanol のエステル化反応とした ( $C_{18}H_{34}O_2 + C_2H_5OH \rightarrow C_{18}H_{34}O_2C_2H_5 + H_2O$ )。種々のモノマー濃度の酵素固定化 NIPA-co-PEGMEA ゲルを作製した。ゲルの水中および反応溶液(油性媒体)中での膨潤特性、フリー酵素の試薬耐性、および酵素固定化ゲルの反応特性(温度依存性および繰り返し性能)を調査した。

## 6.2. 実験方法

### 6.2.1. 酵素固定化 NIPA-co-PEGMEA ゲルの作製

ゲルの合成は、以下の手順のフリーラジカル重合により行った。溶媒は水を用いた。モノマーの NIPA、コモノマーの PEGMEA、架橋剤の *N,N'*-methylenebisacrylamide (MBAA)、重合促進剤の *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED)、および lipase 試薬を含むモノマー水溶液 20 cm<sup>3</sup> をビーカーに調製した。lipase 試薬には天野エンザイム株式会社製 Lipase PS Amano SD (lipase (約 10%) と dextrin (約 90%) の混合物) を用いた。重合開始剤の ammonium peroxydisulfate (APS) を含む開始剤水溶液 5 cm<sup>3</sup> をメスフラスコに調製した。モノマー水溶液 6 cm<sup>3</sup> を試験管 3 本にそれぞれ仕込んだ。モノマー水溶液を 10°C の恒温槽で、開始剤水溶液を室温でそれぞれ 1 h 窒素パージした。注射器を用いて開始剤水溶液 0.6 cm<sup>3</sup> をモノマー水溶液に注入し、試験管ミキサーにより 20 sec 攪拌した。プレゲル水溶液の組成は、NIPA:PEGMEA = 1000:0、990:10、950:50、900:100、または 800:200 mol/m<sup>3</sup>、MBAA:TEMED:APS = 200:40:4 mol/m<sup>3</sup>、および Lipase PS Amano SD = 64 kg/m<sup>3</sup> とした。アクリル製のウェルプレート (φ5×2 mm の孔 64 個) 3 個にプレゲル水溶液を流し込み、その上部をプレートで蓋をして密閉状態にして、10°C の恒温槽に 24 h 静置した。合成したゲルを水に浸し、1 日毎の水の交換を 3 回行い洗浄した。洗浄に用いた合計 300 cm<sup>3</sup> の水中のタンパク質の量は、Lowry 法で検出されないレベルだった。したがって、酵素はゲルから漏出しないといえる。ゲルを大気下・室温で乾燥させたものを用意した。

ゲルの膨潤特性を調べた。ゲルをガラス製バイアル内の水に浸し、恒温槽で温度制御して 20°C から段階的に 60°C まで昇温した。所定温度で 1 日静置したゲルを取り出して定規とともに写真撮影し、画像解析によりゲルの直径 (膨潤径) を求めた。また、乾燥ゲルをガラス製バイアル内の酵素反応溶液 (oleic acid 2 g および ethanol 0.2 g) に浸し、40°C の恒温槽に静置し、所定時間にゲルを写真撮影して膨潤径を求めた。

### 6.2.2. oleic acid と ethanol のエステル化反応実験

実験は回分操作で行った。ガラス製バイアルに oleic acid 10 g および乾燥した酵素固定化ゲル 20 個 (lipase 試薬 0.05 g 相当) を仕込んだ。バイアルを 40°C の恒温槽に 1 日静置し、ゲルを oleic acid で膨潤させた。その後、ethanol 1 g を加え、所定温度 (20、30、40 および 50°C) に制御して、マグネチックスターラーで攪拌しながら酵素反応を行った。攪拌子によるゲルの破壊を防ぐため、網を設置してその上にゲルを置いた。所定時間に反応溶液 0.04 g を採取し、methanol 5 g で希釈した。この試料をガスクロマトグラフ (島津製作所社製 GC-2025) で分析して oleic acid および ethyl oleate の濃度 ( $C_{OA}$  および  $C_{EO}$ ) を求め、oleic acid の ethyl oleate への転化率 ( $= 100 C_{EO}/(C_{OA} + C_{EO})$ ) を算出した。酵素反応終了後、ゲルの表面をキムワイプで拭いて、新しい反応溶液に仕込んで繰り返し酵素反応実験を行った。同様の操作でフリー酵素を用いて反応実験を行った。具体的には、ガラス製



バイアルに lipase 試薬 0.05 g または lipase 試薬および水 0.2 g を仕込み、oleic acid 10 g および ethanol 1 g を添加し酵素反応を開始した。

フリー酵素の試薬耐性試験を行った。ガラス製バイアルに lipase 試薬 0.05 g を仕込み、3 セットを用意した。次いで、oleic acid 10 g (バイアル(i))、ethanol 1 g (バイアル(ii))、または ethyl oleate 1.5 g (バイアル(iii)) を添加した。それを 20、30、40 および 50°C の恒温槽に入れてマグネチックスターラーで攪拌しながら 7 日または 28 日置いた。その後、バイアル(i)に ethanol 1 g および水 0.2 g、バイアル(ii)に oleic acid 10 g および水 0.2 g、バイアル(iii)に oleic acid 10 g、ethanol 1 g、および水 0.2 g を加えて酵素反応を開始した。ethyl oleate に浸漬した lipase の対照実験として、未処理の lipase 試薬に oleic acid 10 g、ethanol 1 g、ethyl oleate 1.5 g、および水 0.2 g を添加した実験も行った。

### 6.3. 結果および考察

#### 6.3.1. ゲルの膨潤特性

図 6-1 に、所定温度における種々のモノマー濃度の酵素固定化 NIPA-co-PEGMEA ゲルの水中の膨潤径を示す。酵素固定化 NIPA ゲルの膨潤径は、昇温に伴い減少した（降温に伴い増大する可逆性あり）。NIPA ゲルは、約 33°C の転移温度を境にして親・疎水転移を起こして膨潤・収縮の体積相転移を起こすことが知られている<sup>5)</sup>。酵素固定化 NIPA ゲルの温度変化に応答する体積変化は、通常の NIPA ゲルの体積相転移に比べて緩やかだった。これは、親水性の酵素が疎水性の NIPA ゲルの水を排除しようとする作用を阻害したためと考えられる。酵素固定化 NIPA-co-PEGMEA ゲルは、どの組成のゲルも感温性を示した。ゲルの体積変化が緩やかなので転移温度を明確に決定できないが、ゲルの転移温度および

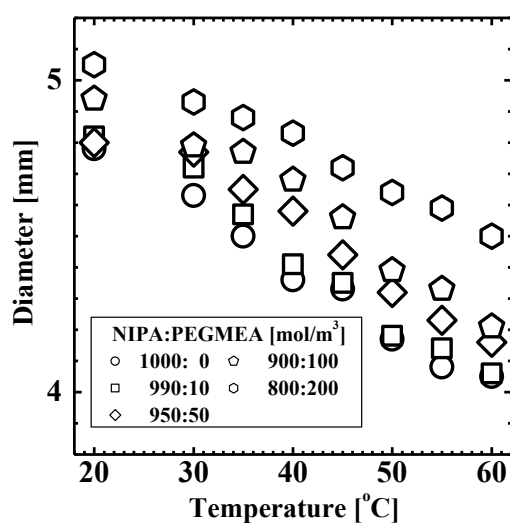


図 6-1 所定温度における種々のモノマー濃度の酵素固定化 NIPA-co-PEGMEA ゲルの水中の膨潤径

大きさはゲル中の親水性の PEGMEA 量の増大に伴い増大する傾向があった。

図 6-2 に、種々のモノマー濃度の酵素固定化 NIPA-co-PEGMEA ゲル（初期状態は乾燥）の 30 および 40°C の反応溶液（oleic acid 10 g および ethanol 1 g）中の膨潤径の経時変化を示す。ゲルは、どの組成でも 30 および 40°C の反応溶液中で膨潤した。なお、NIPA:PEGMEA = 950: 50 mol/m<sup>3</sup> のゲルは、oleic acid 中で 30°C では膨潤しなかったが、40°C では膨潤した（図なし）。30°C では反応溶液中の ethanol が oleic acid のゲル内への拡散を促進しており、40°C では poly(NIPA)が疎水性のためにゲルが oleic acid を吸収できると考えられる。

30°C の反応溶液中のゲルの膨潤速度は、PEGMEA 濃度の増大に伴い速くなった。PEGMEA = 100 および 200 mol/m<sup>3</sup> のゲルの膨潤径は、72–96 h にかけて減少した。96 h のとき、PEGMEA = 100 および 200 mol/m<sup>3</sup> のゲルは透明で反応溶液中に相分離した水相がなかったが、PEGMEA = 50 mol/m<sup>3</sup> 以下のゲルは白色で相分離した水相が観察された。本実験系では、ゲルの膨潤と同時に酵素反応が進行して水が副生成する。PEGMEA = 100 および 200 mol/m<sup>3</sup> のゲルは、親水性の PEGMEA が水を保持したと考えられる。

40°C の反応溶液中のゲルの膨潤速度は、NIPA:PEGMEA = 800:200 mol/m<sup>3</sup> が最も速く、それ以外の組成では同程度だった。NIPA:PEGMEA = 800:200 mol/m<sup>3</sup> のゲルは、8 h で自発的に表面に亀裂が生じ、24 h で全体がばらばらに砕けた。40°C の NIPA-co-PEGMEA ゲルでは、疎水性の poly(NIPA)が水を排除しようとし、親水性の PEGMEA が水を保持しようとする。PEGMEA の量が多いゲルでは、後者の作用が強くなりゲルが崩壊すると考えられる。96 h のゲルの外観はどの組成のものも黄色で、NIPA ゲルは濁っており、PEGMEA 濃度の増大に伴い透明度が高くなった。なお、反応溶液は 40°C で濃い黄色だった（30°C では薄い黄色）。どのゲルの反応溶液中でも相分離した水相が観察された。疎水性の poly(NIPA)が、水をゲル外へ排除したと考えられる。

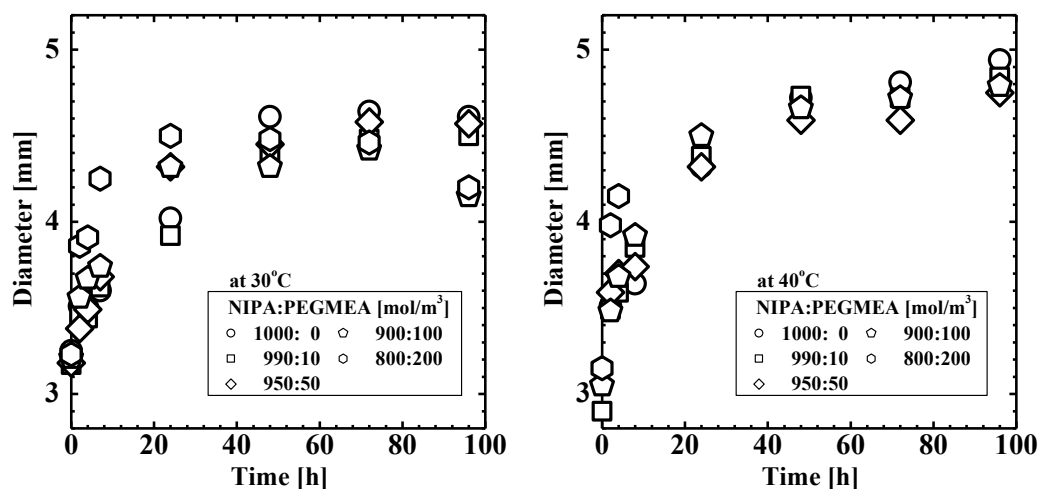


図 6-2 種々のモノマー濃度の酵素固定化 NIPA-co-PEGMEA ゲル（初期状態は乾燥）の 30 および 40°C の反応溶液（oleic acid 2 g および ethanol 0.2 g）中の膨潤径の経時変化

### 6.3.2. 酵素反応特性

図 6-3 に、フリー酵素を用いた 40°C での酵素反応実験における oleic acid の転化率の経時変化（水を添加していない系および 0.2 g の水を添加した系）を示す。水を添加していない系の攪拌下の反応溶液中の酵素は、バイアルの底に堆積するものと、小さな凝集体として分散するものがあった（反応が進行して水が副生成して相分離するとバイアルの底で粘着性のある塊状のものを生じた）。水を添加した系の攪拌下の反応溶液中の酵素は、水を含んだ状態でバイアルの底で粘着性のある塊状になるものと、水滴と一緒に溶液中に分散するものがあった。反応溶液の攪拌を止めると、酵素は水の有無によらず 10 min 程度は懸濁しており、12 h 以上では完全に沈降した。水を添加していない系の転化率は、72 h までは経時的に緩やかに増大し、72 h 以降から著しく増大して約 52% で一定になった（200 h）。水を添加した系のそれは、反応開始から著しく増大し、52 h で 52% に達して一定になった。lipase は油水界面に吸着してその活性が増大することが知られている<sup>6)</sup>。本実験系においてもそのような挙動が示された。水を添加していない系の転化率が 72 h で著しく増大した原因は、酵素反応で副生成した水が酵素の活性を増大させたためと考えられる。

図 6-4 に、所定温度で所定時間 oleic acid または ethanol に浸漬したフリー酵素を用いた 40°C での酵素反応実験における oleic acid の転化率の経時変化を示す。所定時間 oleic acid に浸漬した lipase はどの条件においても浸漬していない lipase（図 3 の水を添加した系）と同程度の活性を示した。lipase と oleic acid の接触が lipase の活性に及ぼす影響はないといえる。ethanol に 7 日浸漬した場合の 96 h の転化率は、20°C で 49.3%、30°C で 42.8%、40°C で 33.6%、および 50°C で 30.1% だった。ethanol に 28 日浸漬した場合のそれは、20°C で 38.3%、30°C で 27.0%、40°C で 9.4%、および 50°C で 8.7% だった。反応速度は、lipase を ethanol に浸漬する温度および時間の増大に伴い減少した。極性の高い有機溶媒は、酵素の周辺の水を奪い、その活性を低下させることが知られている<sup>7,8)</sup>。本実験系では、極性の高い ethanol が lipase の構造を変化させて失活させると考えられる。

図 5 に、40°C で所定時間 ethyl oleate に浸漬したフリー酵素を用いた 40°C での酵素反応実験における oleic acid の転化率の経時変化を示す。フリー酵素の反応速度は、7 日浸漬しても低下しなかったが、28 日浸漬したら著しく低下した。lipase は、失活したと考えられる。また、反応溶液に生成物の ethyl oleate を予め添加した系の反応速度は、通常系（図 3 の水を添加した系）の 20% 程度で遅かった。酵素反応開始時から生成物の ethyl oleate と水が存在していると、エステル化反応の逆反応が促進されると考えられる。

図 6-6 に、フリー酵素および種々のモノマー濃度の酵素固定化ゲルの 40°C での酵素反応実験における oleic acid の転化率の経時変化を示す。酵素固定化ゲルの転化率は、経時的に増大し、どの組成のゲルも 96 h でおよそ 50% に達した。種々の組成のゲルの反応速度はほとんど同程度だったが、NIPA:PEGMEA = 800:200 および 950:50 mol/m<sup>3</sup> のゲルは他

のものより少し速かった。酵素固定化ゲルの反応速度は、いずれもフリー酵素のそれよりも速かった。フリー酵素は、攪拌下の反応溶液中でバイアルの底に堆積していたのでそのほんの一部が反応に関与したと考えられる。ゲル中の lipase は、分散して固定化されておりその大部分が反応に関与したと考えられる。NIPA:PEGMEA = 800:200 mol/m<sup>3</sup> のゲルは、図 1 のゲルの膨潤速度で述べたように酵素反応中に崩壊した。

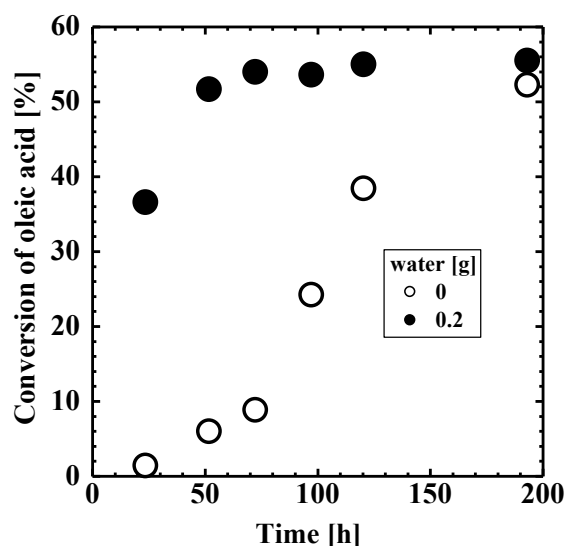


図 6-3 フリー酵素を用いた 40°C での酵素反応実験における oleic acid の転化率の経時変化（水を添加していない系および 0.2 g の水を添加した系）

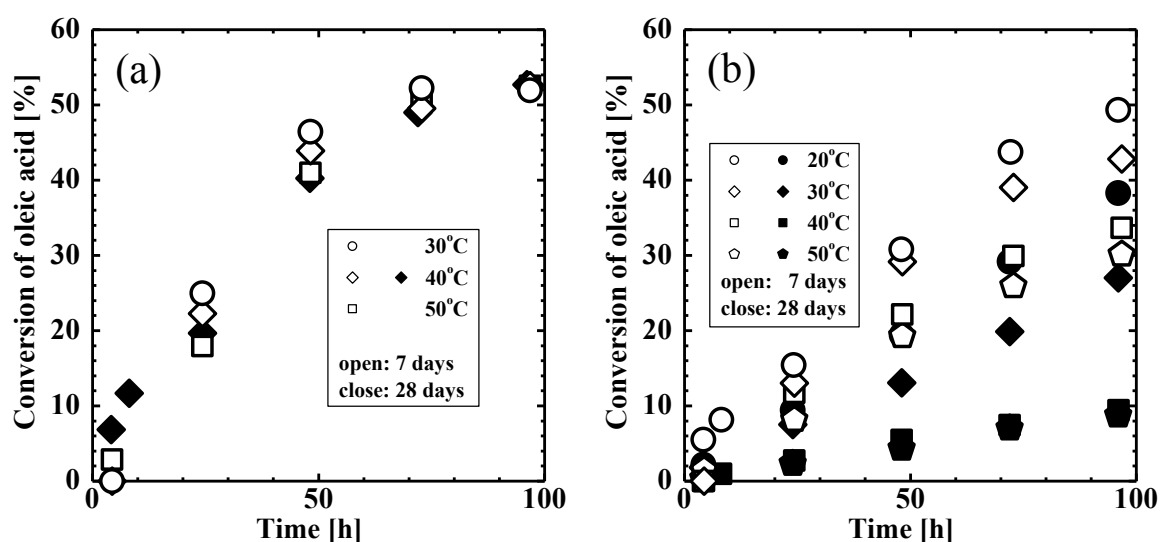


図 6-4 所定温度で所定時間 (a) oleic acid または (b) ethanol に浸漬したフリー酵素を用いた 40°C での酵素反応実験における oleic acid の転化率の経時変化

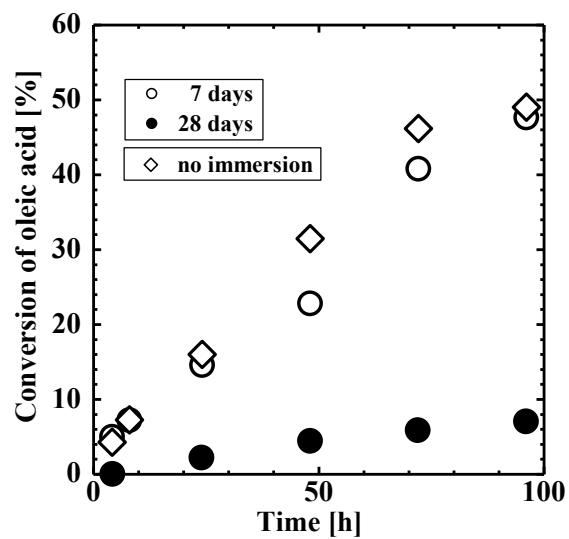


図 6-5 40°C で所定時間 ethyl oleate に浸漬したフリー酵素を用いた 40°C での酵素反応実験における oleic acid の転化率の経時変化

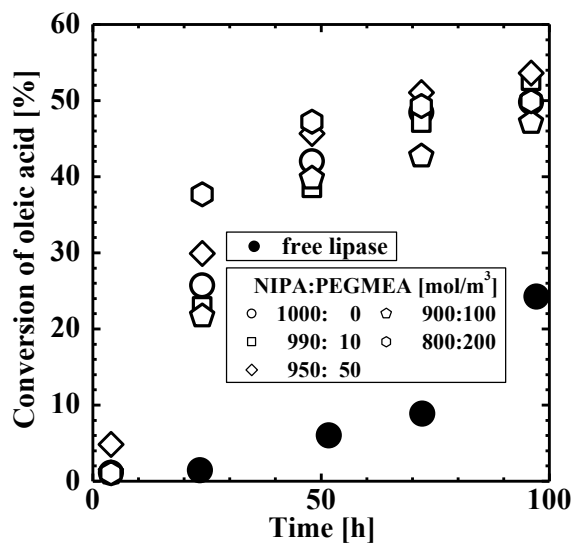


図 6-6 フリー酵素（図 3 の水を添加していない系と同じもの）および種々のモノマー濃度の酵素固定化ゲルの 40°C での酵素反応実験における oleic acid の転化率の経時変化

図 6-7 に、種々のモノマー濃度の酵素固定化ゲルの 40°C での繰り返し酵素反応実験における oleic acid の転化率の経時変化を示す。NIPA:PEGMEA = 1000:0 および 990:10 mol/m<sup>3</sup> の酵素固定化ゲルの反応速度は、繰り返し利用するごとに低下した。NIPA:PEGMEA = 900:100 mol/m<sup>3</sup> の酵素固定化ゲルの反応速度は、1st-4th cycle では同程度で、5th cycle で低下した。NIPA:PEGMEA = 950:50 mol/m<sup>3</sup> の酵素固定化ゲルの反応速度は、1st-5th cycle で同程度だった。転化率および繰り返し利用性能の観点から、NIPA:PEGMEA = 950:50 mol/m<sup>3</sup> のゲルが優れていた。Affleck らは、油性媒体中の少量で適量の水は lipase の活性部位の構造の自由度を増大させてその活性を増大させるが、過剰量の水は lipase の構造を変化させて活性を減少させると報告した<sup>9)</sup>。Murakata らは、油性媒体中のエステル化反応において lipase を固定化した NIPA ゲルの内部および周囲に適量の水が存在するときにその活性が最大になると報告した<sup>10)</sup>。本実験結果および報告から、ゲル担体中の親水性と疎水性のバランスが固定化 lipase の活性および安定性に大きく影響すると考えられ、NIPA:PEGMEA = 950:50 mol/m<sup>3</sup> のゲルはそのバランスが最も優れた担体といえる。

図 6-8 に、フリー酵素および NIPA:PEGMEA = 950:50 mol/m<sup>3</sup> の酵素固定化ゲルを用いた種々の温度 (20、30、40、および 50°C) での繰り返し酵素反応実験における oleic acid の転化率の経時変化を示す。フリー酵素の 20、30、40、および 50°C の 200 h の転化率はそれぞれ 24、45、52、および 38%であり、その反応速度は 40°C で最も速かった。この実験結果は、Lipase PS Amano SD の活性が 35-70°C では温度の上昇に伴い増大し、40°C 以下では所定温度に 60 min 置いても低下しないという製品情報と一致した。1st cycle の固定化酵素の活性は、20°C で低く、30-50°C で同程度だった。繰り返し利用した時の固定化酵素の活性は、20-40°C では低下しなかったが、50°C では 5 th cycle で低下した。固定化酵素の活性に及ぼす温度の影響は、フリー酵素のそれと同程度だった。

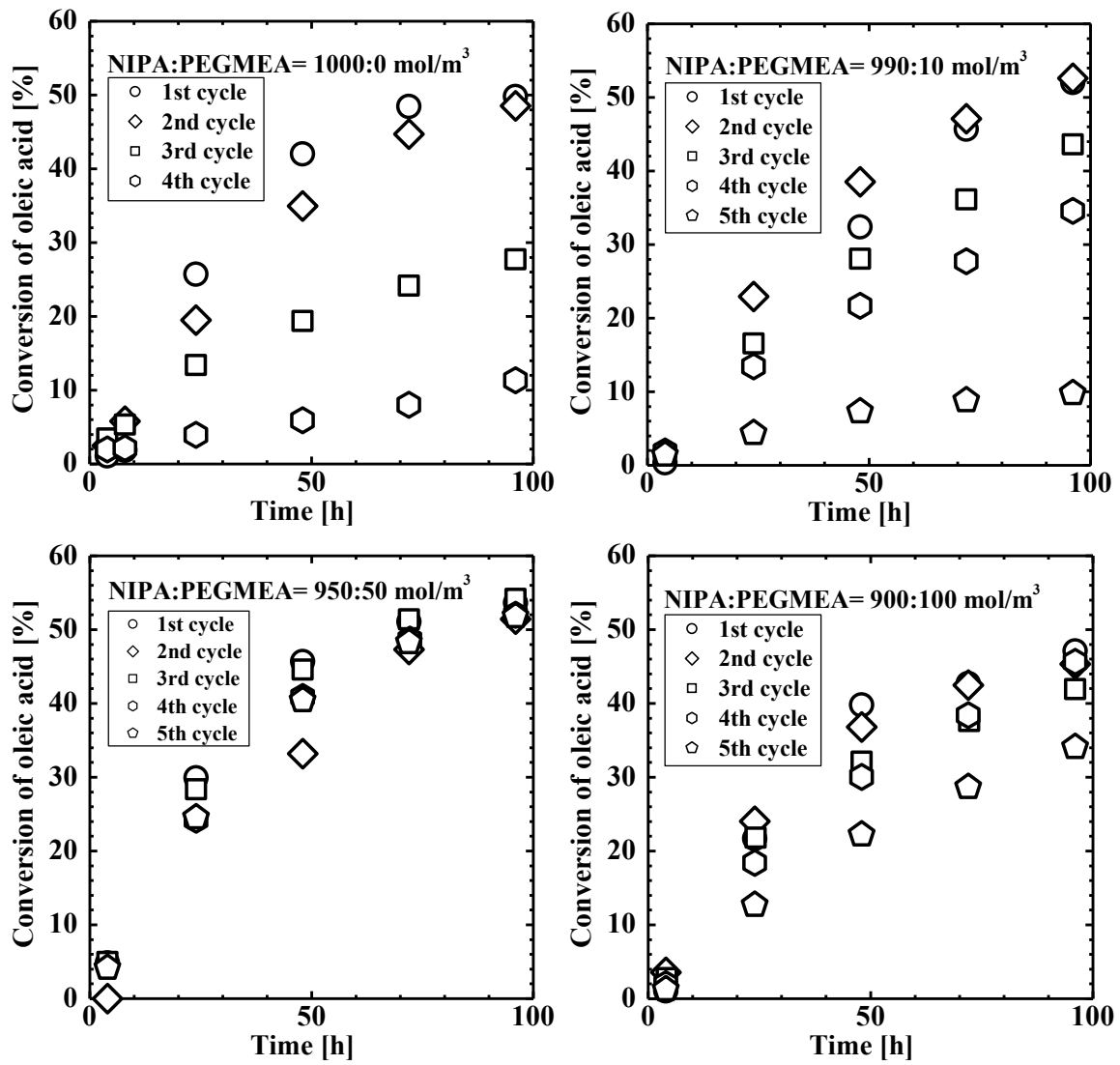


図 6-7 種々のモノマー濃度の酵素固定化ゲルの 40°C での繰り返し酵素反応実験における oleic acid の転化率の経時変化

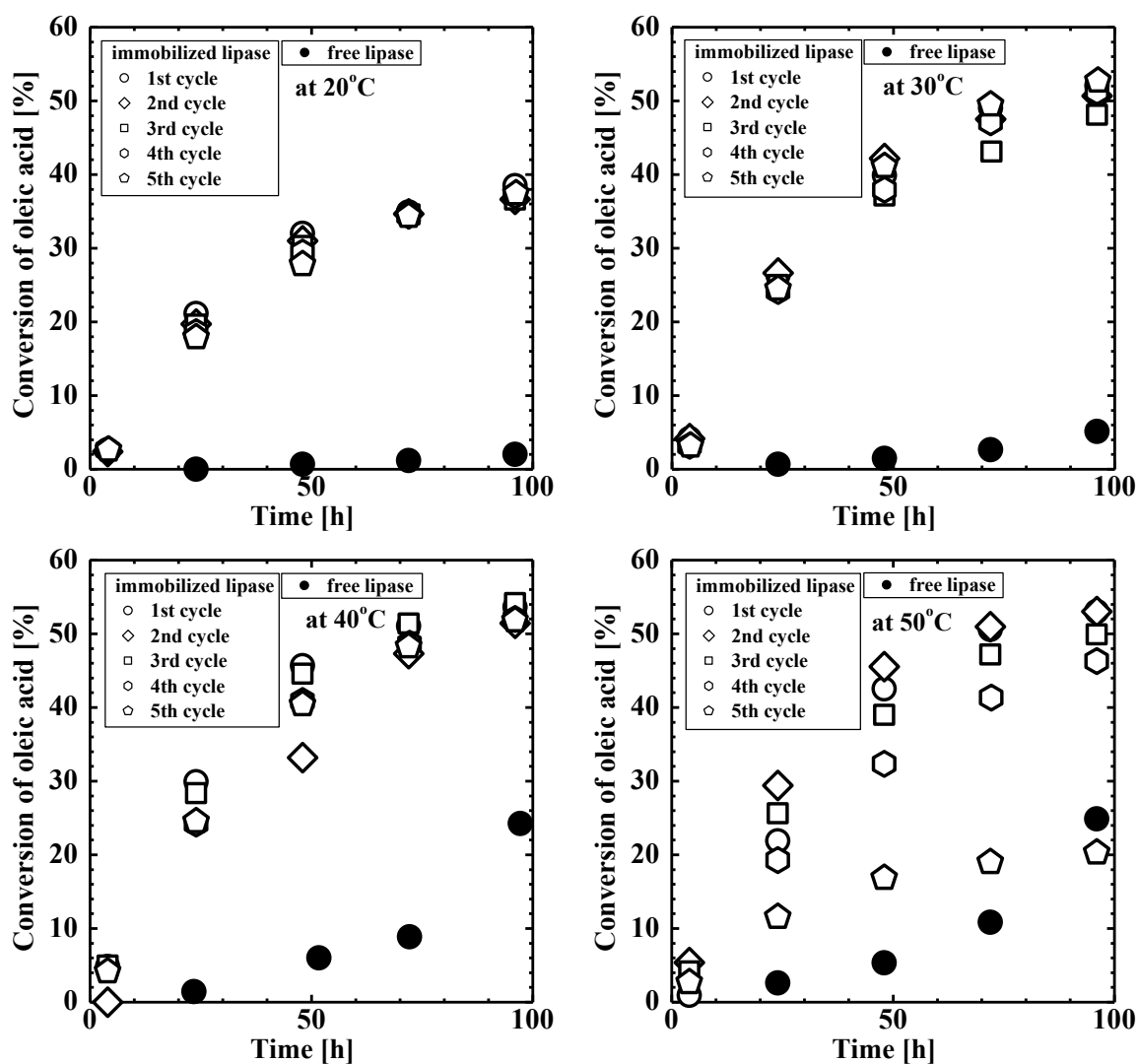


図 6-8 フリー酵素および NIPA:PEGMEA = 950:50 mol/m<sup>3</sup> の酵素固定化ゲルを用いた種々の温度 (20、30、40、および 50°C) での繰り返し酵素反応実験における oleic acid の転化率の経時変化

#### 6.4. 結言

ゲルの合成 (溶媒は水) と同時にゲル内に酵素を分散して固定化でき、油性媒体中の反応に適用でき、さらに酵素へ至適な水環境を提供できる酵素固定化 NIPA-co-PEGMEA ゲルを開発した。モデル酵素反応は、酵素 lipase を用いた oleic acid と ethanol のエステル化反応とした。以下に得られた知見をまとめる。

- 1) 水中の酵素固定化 NIPA-co-PEGMEA ゲルは、poly(NIPA)の感温性に起因する温度変化に伴う膨潤・収縮の体積相転移を引き起こす。その転移温度は、ゲル中の PEGMEA 量の増大に伴い増大する。
- 2) 乾燥した酵素固定化 NIPA-co-PEGMEA ゲルは、40°C で油性媒体 (酵素反応溶液) を



吸収して膨潤する。ゲル中の PEGMEA の量を多くすると、反応溶液中で膨潤する過程で崩壊する。

- 3) フリー酵素反応において、油性の酵素反応溶液に水を少量添加することで lipase の活性は著しく増大する。lipase は、oleic acid との接触では失活しないが、ethanol および ethyl oleate との接触で失活する。
- 4) 酵素固定化 NIPA-co-PEGMEA ゲルの反応速度は、フリー酵素のそれよりも速かった。これは、lipase がゲル内で分散して固定化された効果によるものと考えられる。
- 5) 調査したゲルの組成の中で NIPA:PEGMEA 950:50 mol/m<sup>3</sup> のゲルの性能（反応速度、繰り返し利用）が最も良く、ゲル内の親水性と疎水性のバランスが lipase の活性に至適といえる。
- 6) 酵素固定化 NIPA-co-PEGMEA ゲルを用いた酵素反応の温度は、30°C 程度とするのが良い。20°C では反応速度が遅く、50°C 以上では繰り返し使用により酵素が失活する。

## 引用文献

- 1) M. Iso, B. Chen, M. Eguchi, T. Kudo, S. Shrestha, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 16, 53-58 (2001)
- 2) M. Basri, A. Harun, M. B. Ahmad, C. N. A. Razak, A. B. Salleh, *J. Appl. Polym. Sci.*, 82, 1404-1409 (2001)
- 3) N. Bruns, J. C. Tiller, *Nano. Lett.*, 5, 45-48 (2005)
- 4) S. Hirotsu, *Jpn. J. Appl. Phys.* 37, L284-287 (1998)
- 5) H. Tokuyama, A. Kanehara, *Langmuir*, 23, 11246-11251 (2007)
- 6) 岩井美枝子, リパーゼ その基礎と応用, 幸書房 (1991)
- 7) A. Zaks, A. M. Klivanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 3192-3196 (1985)
- 8) C. Delimitsou, M. Zoumpantioti, A. Xenakis, H. Stamatis, *Biocatal. Biotransform.*, 20, 319-327 (2002)
- 9) R. Affleck, Z. F. Xu, V. Suzawa, K. Foct, D. S. Clark, J. S. Dordick, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 1100-1104 (1992)
- 10) T. Murakata, X.B. Liu, S. Sato, *J. Chem. Eng. Jpn.*, 26, 681-685 (1993)

## 7章 総括

本研究では、高分子ゲルの多孔質構造の制御および機能性高分子の適用の2つの観点から、高性能な酵素固定化高分子ゲルを開発した。酵素の固定化手法に着目し、酵素を温和な条件で固定化してその失活を最小限に留め、反応への適用時には固定化酵素の活性が最大限に発現できうる酵素の新規な包括固定法を開発した。

第1章では、酵素の固定技術と工業的な応用についてまとめた。特に、近年の多孔質ゲルおよび機能性ゲルを担体に用いた固定化酵素に関する研究を調査してまとめた。

第2章では、O/W エマルジョンゲル化法を用いて多孔質ハイドロゲルの合成と同時に油滴を介して lipase を重合反応場に曝すことなくその孔の中に包括固定した新規な酵素固定化多孔質 poly(ethylene glycol) methyl ether acrylate (PEGMEA) ハイドロゲルを開発した。triacetin の加水分解反応を行い、多孔質ゲルに固定化された酵素の活性は、担体に未固定のフリー酵素のそれと同程度であり、均質ゲルに固定化された酵素のそれと比べて極めて高かった。

第3章では、W/O エマルジョンゲル化法を用いて多孔質オルガノゲルの合成と同時に水滴を介して lipase を重合反応場に曝すことなくその孔の中に包括固定し、油性媒体中で使用できる酵素固定化多孔質 2-ethylhexylacrylate オルガノゲルを開発した。propylacetate と 1-pentanol のエステル交換反応において、固定化酵素はフリー酵素より高い活性を示し、繰り返し利用可能だった。

第4章では、サスペンションゲル化法を用いて calcium alginate マイクロカプセルを内包または鋳型とし、線状 poly(NIPA) を添加することで semi-IPN 構造と呼ばれる NIPA 複合ハイドロゲルおよび多孔質ハイドロゲルを作製した。開発したゲルの構造と膨潤および力学的特性の関係性を解明した。

第5章では、4章で開発したサスペンションゲル化法を応用して、多孔質ハイドロゲルの合成と同時にマイクロカプセルを介して lipase を重合反応場に曝すことなくその孔の中に包括固定した酵素固定化複合および多孔質 polyethylene glycol diacrylate ゲル粒子を開発する。p-nitrophenyl acetate の加水分解反応において、反応速度解析を行い、酵素活性を評価した。

第6章では、ゲルの合成（溶媒は水）と同時にゲル内に酵素 lipase を分散して固定化でき、油性媒体中の反応に適用でき、さらに lipase へ至適な水環境を提供できる NIPA-co-PEGMEA ゲル (NIPA; N-isopropylacrylamide) を開発した。oleic acid と ethanol のエステル化反応において、固定化酵素は担体に未固定のフリー酵素より高い活性を示し、繰り返し利用可能だった。

最後に、本研究成果の今後の展望を述べる。本研究では、水媒体および油性媒体中の酵素反応で高活性を発現する酵素固定化高分子ゲルを開発した。提案した孔の鋳型を介して

酵素を多孔質ゲルのマクロ孔に包括する技術、および機能性高分子の適用によりゲルの合成を水媒体で行い酵素を分散して包括固定でき、油性媒体に溶媒置換して反応に供することができるオルガノゲルの作製技術は、あらゆる種類の酵素および高分子に適用できる。したがって、開発した酵素固定化高分子ゲルの作製技術は、本研究以外の工業的に有用な反応系に容易に導入できる。今後、開発した酵素固定化高分子ゲルおよびその作製技術を応用・実用化するために、ゲル粒子の固定層を用いた連続酵素反応 (year オーダーの使用) への適用可能性の検証、反応速度解析と反応メカニズムの解明、反応モデルおよび拡散モデルに基づく反応プロセスの設計指針の構築を行うことが肝要と考える。

## 本論文に関する公表

### 学術論文

- [1] R. Sato, T. Kawakami, H. Tokuyama, Preparation of polymeric macroporous hydrogels for the immobilization of enzymes using an emulsion-gelation method, *Reactive and Functional Polymers*, 76, 8-12 (2014) (本論文の第 2 章に関連)
- [2] R. Sato, H. Tokuyama, In situ entrapment of enzymes into macroporous polymeric organogels using a water-in-oil emulsion-gelation method for reactions in organic media, *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 49, 48-51 (2016) (本論文の第 3 章に関連)
- [3] R. Sato, R. Noma, H. Tokuyama, Preparation of macroporous poly(*N*-isopropylacrylamide) hydrogels using a suspension-gelation method, *European Polymer Journal*, 66, 91-97 (2015) (本論文の第 4 章に関連)
- [4] R. Sato, A. Sato, H. Tokuyama, Fabrication of amphiphilic copolymeric gels with enhanced activity of immobilized enzymes in organic media, *Journal of Applied Polymer Science*, 132, 41905 (2015) (本論文の第 6 章に関連)

### 国際会議発表

- [1] R. Sato, H. Tokuyama, Application of porous hydrogels for immobilized enzyme reaction, *International Soft Matter Conference 2013*, POL-1702, Rome (2013)
- [2] R. Sato, R. Noma, H. Tokuyama, Preparation of macroporous hydrogels for the immobilization of bacteria using a suspension-gelation method, *The Material Research Society of Indonesia Meeting 2014*, E0.2, Denpasar (2014)
- [3] R. Sato, R. Noma, H. Tokuyama, Ammonium oxidation reaction catalyzed by bacteria entrapped within macroporous polymeric hydrogels using a suspension-gelation method, *Pacificchem 2015*, MACR615, Honolulu (2015)
- [4] H. Tokuyama, R. Sato, A. Sato, Esterification in organic media using lipase immobilized within amphiphilic NIPA-*co*-PEGMEA gels, *Pacificchem 2015*, MACR617, Honolulu (2015)

### 国内会議発表

- [1] 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、名古屋国際会場、2014 年 5 月
- [2] 佐藤龍一、徳山英昭、W/O エマルションゲル化法による酵素固定化多孔質オルガノゲルの創製、化学工学会第 46 回秋季大会、ZC2P29、九州大学、2014 年 9 月
- [3] 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、2014 年 9 月

- [4] 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、2014 年 9 月
- [5] 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、2015 年 5 月
- [6] 徳山英昭、佐藤龍一、野間涼子、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、3Pc063、札幌コンベンションセンター、2015 年 5 月
- [7] 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 46 回秋季大会、ZB2P04、北海道大学、2015 年 9 月（材料・界面部会ポスターセッション・優秀ポスター賞受賞）

## 謝辞

本研究は、筆者が東京農工大学大学院工学府応用化学専攻博士後期課程在学中に、徳山英昭准教授の指導のもと行った研究成果をまとめたものです。本研究を遂行し、学位論文としてまとめるにあたり、終始ご指導ご鞭撻を賜りました徳山英昭准教授には、心より厚くお礼申し上げます。徳山准教授の指導の中で、最も印象深いのは文書の校閲です。私の全ての研究成果は、徳山准教授の文書校閲の指導がなければ世に出なかったといっても過言ではないくらいに温かいご指導をいただきました。自分の時間を割き、夜遅くまで私の拙い文章を校閲していただいたことには、深謝申し上げます。

博士論文の審査の主査を滝山博志教授に、副査を細見正明教授、山下善之教授、寺田昭彦准教授に務めていただきました。厚くお礼申し上げます。私の博士論文に関して大変有意義なコメントを数多く頂き、本論文をよりよいものへと昇華できました。

レオメータの貸し出しおよびその使用方法について数多くの助言や指導をしていただいた長津雄一郎准教授に、心より感謝申し上げます。

ゲルの内部構造の観察での共焦点レーザー顕微鏡の貸し出しおよびその使用方法について、数多くの助言や指導をしていただいた本学農学府応用生命化学専攻の佐々木信光助教に、心より感謝申し上げます。

本研究に直接協力していただいた河上卓朗氏（2章）、野間涼子氏（4章）、佐藤あゆみ氏（6章）をはじめとして、我が道を行く私にお付き合いいただいた諸先輩、同期、後輩方に、深くお礼申し上げます。

残念ながら本文に掲載できる成果を上げることはできませんでしたが、FIA分析装置の使用法の指導をはじめ、様々な相談に多くの時間を割いていただいた株式会社アクア・ラボ技術グループの島田勝久氏に、厚くお礼申し上げます。

最後に、私を私の思うままの道に進ませ、温かく見守り支援してくださった両親に心から感謝します。

2016年1月30日

佐藤 龍一