

エチレン-ビニルアルコール共重合体による酵素の固定化 —粒子同時包括の影響—

福永公寿*・森川祐次**・中尾勝實*

Enzyme Immobilization by Ethylene-Vinylalcohol Copolymer Entrapment —The Effects of Coimmobilization of Fine Particles—

Kimitoshi FUKUNAGA, Yuji MORIKAWA and Katsumi NAKAO

Abstract

In order to elucidate the effects of the presence of a particle within an immobilized enzyme, β -glucosidase (β -GD) and a fine particle such as silicon, γ -alumina and hydroxyapatite has been coimmobilized in ethylene-vinylalcohol copolymer (EVA) membrane. The coimmobilized β -GD was characterized enzymatically compared with native enzyme, using p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (PNPG) as a substrate. Diffusion and partition coefficients (D and P, respectively) of PNPG and reaction products in EVA membrane with and without particles were determined by a conventional method. Apparent affinity for the substrate increased by the presence of a particle. Enzyme affinity for substrate in the EVA membrane was discussed on the basis of the data of D, P, membrane thickness and kinetic parameters.

1. 緒 言

固定化生体触媒は、バイオリアクターの重要な要素であり、最近はとくに反応と分離の機能を合わせ持つような膜状の固定化生体触媒が注目されている。生体触媒の固定化法のうち、包括法は酵素・微生物のみならず動物及び植物細胞まで広範囲に利用できる。

エチレン-ビニルアルコール共重合体 (EVA) は生体無害性などから食品包装フィルムなどに多用されている汎用合成ポリマーの一種で、そのエチレン含量が30モル%程度のはアルコールと水の混合溶媒に可溶で、それらの単独溶媒には不溶であるという特異的な溶解特性を有しており¹⁾、著者らはさきに、このEVAの溶解特性を利用した生体触媒の包括固定化法を開発した²⁾。

本報告では膜機能を拡大するため固定化時にフィラー(粒子分散複合材料)を固定化酵素膜に包括充填し、

得られた固定化酵素の反応性に及ぼす影響について検討した。

2. 実 験

2.1 試薬

酵素にはスイートアーモンド起源の β -グルコシダーゼ(β -GD) (シグマ化学(株)製、表示活性5.3U/mg)を、EVAにはエチレン含量32モル%、平均分子量3万、平均重合度770、けん化度99.8%のもの(ソアノールDC、日本合成化学工業(株)製)を用いた。n-プロパノール(n-PrOH)は、液クロ用試薬(和光純薬(株)製)を、p-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシド(PNPG)はSidhuらの方法³⁾で合成したものをを用いた。グルコスタット試薬にはグルコースB-テストワコー(和光純薬工業(株)製)を用い、その他の試薬は市販特級品をそのまま用いた。

2.2 フィラー粒子

EVA膜へのフィラーとしては疎水性粒子としてシリコン微粒子(Si) (東芝シリコン(株)製トスパール) (Si

*応用化学工学科

**大阪酸素工業(株)

-105: 平均粒径 $0.5\mu\text{m}$; Si-120: $2.0\mu\text{m}$; Si-145: $4.5\mu\text{m}$; Si-3120: $120\mu\text{m}$ 、親水性粒子として γ -アルミナ粒子 (Al) (日化精工(株)製; 平均粒径 $\sim 75\mu\text{m}$) およびヒドロキシアパタイト粒子 (HA) (三井東圧化学工業(株)製高速液クロ用 HCA-100S; 平均粒径 $20\mu\text{m}$) を使用した。

2.3 固定化酵素膜の調製

2.3.1 粒子を同時包括しない固定化酵素 EVA 膜

既報²⁾と同様に、次のようにして固定化酵素膜を調製した。

0.4g の EVA を 5ml の n-PrOH/水 (1:1 体積比) に加熱溶解させ、放冷後、メンブランフィルター ($0.5\mu\text{m}$ 孔径) で少量の不溶物を除去した。 β -GD の 0.05M 酢酸緩衝液 (pH5.7) 溶液 (40mg/ml) の 50~150 μl を 1ml の EVA 溶液にボルテックス混合しながら加えて溶解し、ポリエステルテープ (厚さ $136\mu\text{m}$) で厚みをガイドしたベークライト板上に流し込み、ガラス棒で展開した。約10分間クリーンルーム中で室温で風乾し、得られた酵素包括 EVA 膜を冷エタノール中で20分間リーチングし、ついで0.05M 酢酸緩衝液 (pH5.7) で数回洗浄し、ろ紙にはさんで水分を切り、冷蔵庫中に熟成・保存して使用に供した。

2.3.2 固体粒子を同時包括した固定化 EVA 膜

フィルターの固体粒子 (一般に0.05g) を EVA の n-PrOH/水混合液溶液 (8.79wt%) にまず懸濁して、次に β -GD の酢酸緩衝液溶液を溶解した以外は2.3.1と全く同様にしてフィルター充てん固定化酵素 EVA 膜を調製した。

膜強度測定用の EVA 膜は固体粒子をまず懸濁して次に水分のブランクとして酢酸緩衝液のみを β -GD 溶液の添加体積と同量添加して、フィルターのみを充填した EVA 膜を調製した。

2.3.3 固定化酵素中の β -GD 固定化量の測定

EVA およびフィルター粒子は窒素原子を含有しないので、EVA 中の β -GD の固定化量は微量元素分析による窒素の定量値から求めた。

この元素分析は (株) UBE 科学分析センターで行なわれ、 β -GD の元素分析値は C: 45.01%、H: 6.82%、N: 16.68% であった。

2.4 酵素活性の測定

2.4.1 遊離酵素の活性

酵素反応は 25°C で磁気攪拌下に、2~50mM の PNP の 0.05M 酢酸緩衝液 (pH5.7) 溶液 5ml に 3.6 mg の β -GD の同緩衝液 20 μl を添加して行なった。

10分後、反応液を 20 μl サンプリングし、ただちにグルコース試薬 3ml に加え、 37°C で 20分間振とう後、505 nm で、グルコース濃度を分光光度定量した。

一般に β -GD による PNP の加水分解反応では生成する p-ニトロフェノール (PNP) が定量されるが、本研究では後述するように生成した PNP は EVA 膜に吸着されやすいので、生成したグルコースの方を定量して反応速度を測定した。

2.4.2 固定化酵素の活性

2.4.1 と同じ基質溶液に 5 cm^2 (面積) の正方形に切った固定化酵素を加え、攪拌下に 20分間反応させ、10分毎に反応液を 20 μl サンプリングして、生成グルコース濃度を測定した。

2.5 フィラー充填 EVA 膜の強度測定

フィルターの粒径及び包括量の生成 EVA 膜に対する影響を見るため、球形で均一な粒径の豊富なシリコン粒子について粒径と包括量を色々変えた EVA 膜を調製して、湿潤状態での膜強度を図 1 に示すような広瀬ら⁴⁾と同じ装置を製作して Orientec RTM-IT 型オートグラフで測定した。

2.6 EVA 膜中の拡散係数の測定

酵素を含まない EVA 膜 (厚さ約 $50\mu\text{m}$) を 25°C の 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH5.7) 中に浸しておいて、内径 2cm のガラス管に接合し、ゴムリングで固定した (これを内部セルと呼ぶ)。内部セルを 250ml の同緩衝液を含む 25°C に保たれた外部セル内に、図 2 のように設置し、ただちに PNP、PNP あるいはグルコースの同緩衝液溶液を 20ml 入れ、内部液と外部液の両液面を一致させ、両液を攪拌しながら EVA 膜を通して内部セルから外部セルへ拡散させた。内部液濃度は 2~50mM とし、適当な時間間隔で両セルから少量の溶液をサンプリングし、濃度の時間変化を測定した。PNP の場合は 0.5M 炭酸ナトリウムで発色させて 300nm で、PNP の場合は 0.6M 炭酸ナトリウムで発色させて 410nm で分光光度定量した。

EVA 膜中の各溶質の拡散係数 D [cm^2/s] は次式により 60分後のデータを用いて算出した。

$$d = (AD/lV_o)(S_i - S_o) \quad (1)$$

ここで、 d : 溶質の拡散速度 [m/s]、 A : 膜面積 [cm^2]、 l : 膜厚 [cm]、 V_o : 外部セル内の溶液体積 [cm^3]、 S_i : 内部セル中の溶質濃度 [M]、 S_o : 外部セル中の溶質濃度 [M]、である。

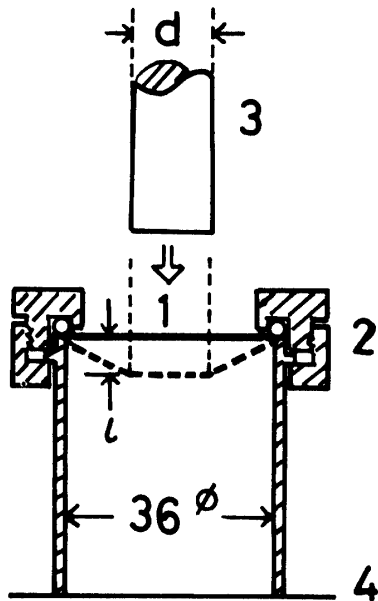


Fig.1 Apparatus for measuring membrane strength

- 1: Wet EVA membrane (43mm diameter)
- 2: Membrane holder
- 3: Load cell (diameter $d=15.5\text{mm}$)
- 4: Stage of an autograph machine

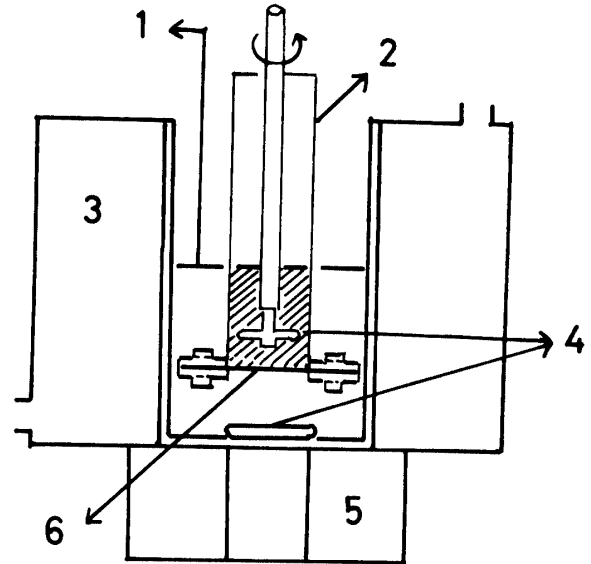


Fig.2 Diffusion cell

- 1: Outer cell
- 2: Inner cell
- 3: Constant temp. bath
- 4: Magnet bar
- 5: Magnetic stirrer
- 6: EVA membrane

2.7 分配係数の測定

EVA 膜中への各溶質の分配係数は2.6の実験に用いたのと同じEVA膜約 0.1cm^2 を 0.05M 酢酸緩衝液($\text{pH}5.7$)の中に入れ、 25°C で24時間攪拌した後の溶液の濃度を測定することにより求めた。

3. 結果および考察

3.1 膜強度とフィラー粒径および充填量との関係

フィラーとしてシリコン粒子を用い、その粒径及び充填量を種々変化させて得たEVA膜の強度をオートグラフ装置で測定した。図3に同一充填量で包括シリコン粒子の粒径を種々変えた、一方、図4にSi-3120の充てん量を種々変化させて得たシリコン包括EVA膜に対する荷重対伸び曲線を示した。両図の結果から、一般的傾向として、大きなシリコン粒子を少量充填する方が得られるEVA膜の強度が大きいことがわかった。

表1に膜強度 $[\text{kg}/\text{cm}^2/\text{cm}]$ の計算結果を示す。粒径の小さい粒子を多量に包括するほど膜は脆くなり、Si

-3120を6 wt% (対EVA) 充填すると元のEVA膜と強度が同一で約半分の弾性を示すEVA膜が得られることがわかった。このことは柔軟すぎて水中で泳動しやすいEVA薄膜の性質を粒子の包括により改善できることを示唆している。

ここでの実験結果からHAおよびAlの粒子充填量も6 wt% (対EVA) に固定した。

EVA膜単独とSi、HA、Al粒子を包括したEVA膜の典型的な電子顕微鏡(SEM)写真を図5に示した。

EVA膜は広瀬ら⁴⁾の調製した多孔性ポリ塩化ビニル膜と類似したスポンジ状の表面構造を有し(図5(1))、シリコン粒子の最適充填量(6 wt%)では粒子が適度に分散してEVA膜のスポンジ構造がかなり保持されていることがよくわかる(図5(5))。

なお、Siは撥水性であるが、本研究ではアルコールと水の混合溶媒を用いているのでEVA膜に良好に分散させることができた。

3.2 酵素の活性

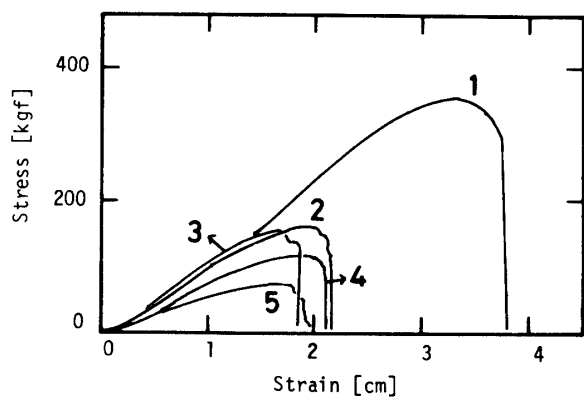


Fig. 3 Stress-strain curve for the wet EVA membrane which contains silicon particle (0.23 g-Si/g-EVA).

1 : None 2 : Si-3120 (12.0 μ m) 3 : Si-145 (4.5 μ m) 4 : Si-120 (2.0 μ m) 5 : Si-105 (0.5 μ m)

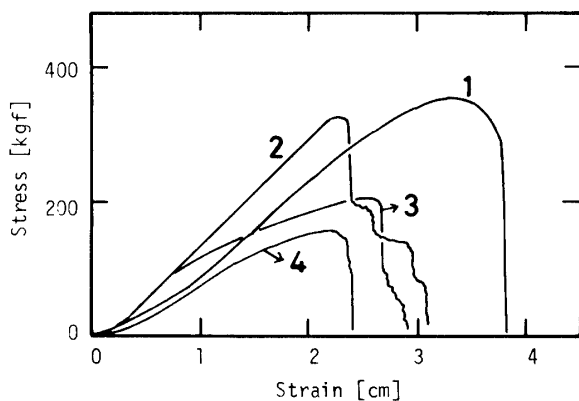


Fig. 4 Stress-strain curve for the wet EVA membrane which contains silicon particle (Si-3120).

Charged amount of silicon [g-Si/g-EVA]
1 : 0 2 : 0.06. 3 : 0.18 4 : 0.23

β -GDによるグルコシドの加水分解反応には生成物のグルコースによる拮抗阻害があることが知られ、pH5.7、65 $^{\circ}$ CでのPNPGの加水分解反応に対する阻害定数 $K_i=2.8$ mMとMichaelis定数 $K_m=0.24$ mM、が報告されている⁵⁾。本研究の反応条件下では図6に示すよう

Table.1 Mechanical properties of wet EVA membrane

Silicon	Conc. [g/g-EVA]	Membrane thickness [μ m]	Fracture point	
			Strength ^{a)} [kg/cm ² /cm]	Elongation ^{b)} [cm]
None	0	58	0.148	4.61
Si-105	0.23	91	0.052	1.73
Si-120	0.23	106	0.090	1.68
Si-145	0.23	107	0.121	1.65
Si-3120	0.23	101	0.117	2.04
Si-3120	0.18	79	0.117	2.77
Si-3120	0.06	66	0.152	2.17
Si-105	0.18	87	0.123	3.22

a) Observed stress/contract area of the load cell/membrane thickness.

b) Possible distance of the load cell in the vertical direction (l in Fig.1).

に30分以内では反応阻害は無視できるので、宮入ら⁶⁾と同様に遊離及び固定化 β -GDに対して拮抗阻害を考慮しないMichaelis-Menten型の速度式を適用した。

なお、 β -GDの1ユニット(U)は本反応条件下で1分間に1 μ molのグルコースを生成する量と定義した。

3.3 反応速度パラメーター

図7にEVA膜(β -GD含量0.129mg)およびシリコン粒子(Si-3120)含有EVA膜(β -GD含量0.147mg)に包括された β -GDのPNPGの加水分解反応(25 $^{\circ}$ C、pH5.7)に対するLineweaver-Burkプロットを示す。みかけのMichaelis定数 K_m (app) はそれぞれ15.3 mM、6.35mMで、みかけの最大反応速度 V_{max} (app) はそれぞれ 2.57×10^5 U/g- β -GD、 9.33×10^4 U/g- β -GDであった。一方、遊離の β -GDの K_m は2.50mMであった。

3.4 EVA膜の物質透過性

EVA膜中の溶質の拡散係数Dは図8に代表例を示したような膜透過実験の180分後の結果から、pH5.7、25 $^{\circ}$ Cで2~50mM濃度の各溶質に対して表2に示すような値を得た。D値は幾分溶質濃度に依存している。

EVA膜ではPNPGに対するDは絹フィブリン膜の文献値⁹⁾の約2倍、セリシン膜の文献値⁷⁾の約1/3の大きさで、PNPに対しては絹フィブリンの文献値⁹⁾とほぼ等しく、セリシン膜の文献値⁷⁾の約1/4の大きさで

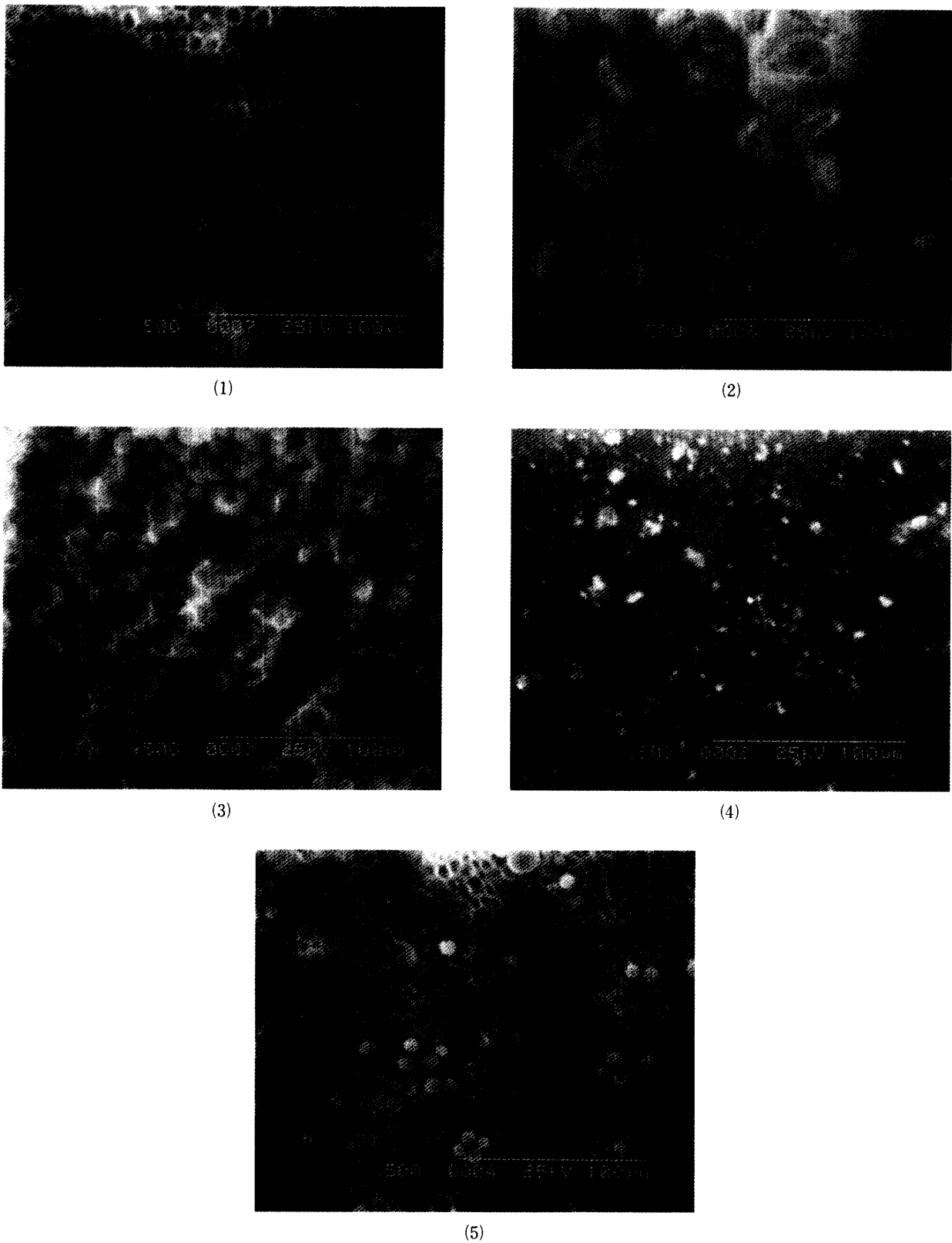


Fig.5 SEM photographs of the EVA membranes
(1) EVA (2) HA/EVA (6wt%) (3) Si-3120/EVA (23wt%) (4) Al/EVA (6wt%)
(5) Si-3120/EVA (6wt%)

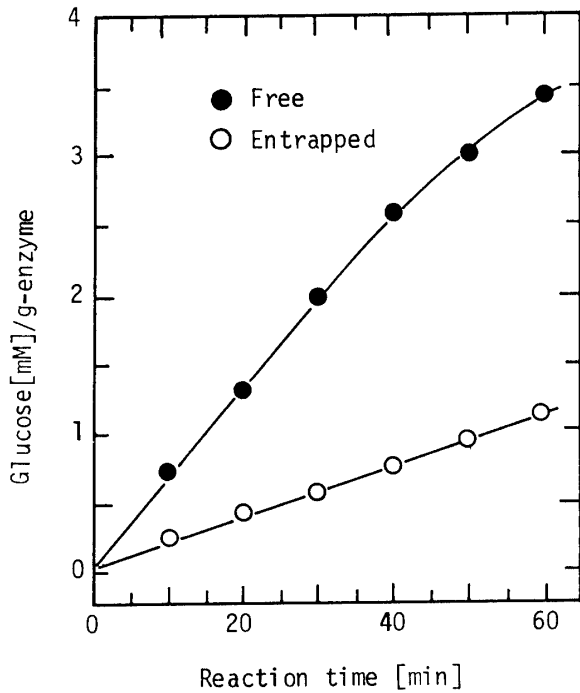


Fig.6 Time course of enzyme reaction

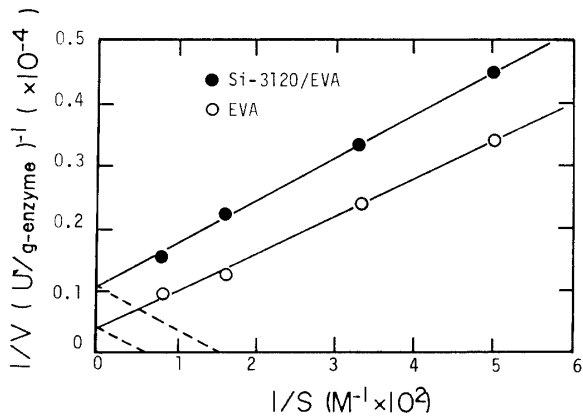


Fig.7 Lineweaver-Burk's plots of immobilized enzyme reaction

ある。

一方、EVA膜とフィラーを充填したEVA膜を比較するとPNPGに対してはEVA単独の膜の方がDが大きく、とくに、HAおよびAl粒子ではその低下が著しい。逆に、PNPに対してはフィラーを充填したEVA膜の方が大きくなった。

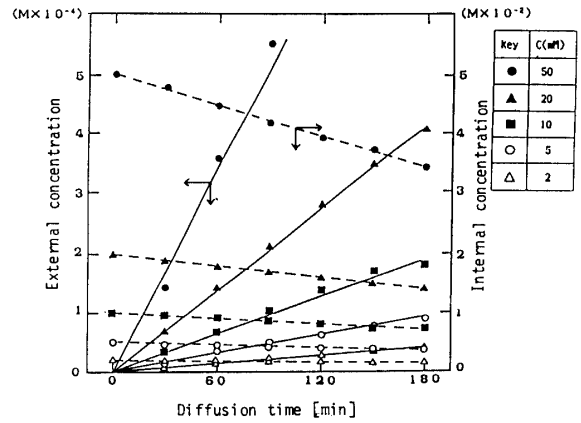


Fig.8 Time course of diffusion of PNPG through EVA membrane

Table.2 Diffusion coefficients (D) of PNPG and PNP in EVA membrane

Membrane	Conc. of Substrate [mM]	PNPG [$\times 10^{-7} \text{cm}^2/\text{s}$]	PNP [$\times 10^{-7} \text{cm}^2/\text{s}$]
EVA	2	2.44	10.5
	5	2.13	5.88
	10	1.74	3.83
	20	1.17	4.97
	50	2.07	5.15
Si-3120/EVA (6wt%)	2	1.78	7.61
	5	1.36	7.19
	10	0.872	6.44
	20	0.594	8.73
	50	0.608	7.62
HA/EVA (6wt%)	10	0.721	6.82
	50	—	6.68
A1/EVA (6wt%)	10	0.854	5.03
Fibroin ^{a)}	10	0.83	3.9
Sericin ^{b)}	10	5.9	16.0

a) Reference 6.

b) Reference 7.

3.5 EVA膜への溶質の分配係数

EVA膜へのPNPGとPNPの分配係数Pの測定結

Table.3 Partition coefficients (P) of PNPG and PNP in EVA membranes

Membrane	PNPG	PNP
EVA	1.69	19.8
Si-3120/EVA (6wt%)	2.91	21.5
HA/EVA (6wt%)	3.27	23.1
Al/EVA (6wt%)	3.24	24.8
Fibroin ^{a)}	0.56	0.68
Sericin ^{b)}	0.80	0.86

a) Reference 6.

b) Reference 7.

果を表3に示す。PNPGとPNPに対するP値は前述の両タンパク質膜の文献値⁶⁾⁷⁾のいずれよりも大きく、とくにPNPに対するP値はEVA膜、粒子包括EVA膜ともに著しく大きい。この現象はEVA膜へは膜中の水酸基とPNP中のニトロ基、フェノール性水酸基との間の水素結合により、また、粒子包括EVA膜では粒子への吸着が起るためと考えられる。

図9は反応で生成したPNPを吸着して黄色に着色したEVA膜のSEM写真で、吸着されたPNPが膜孔を閉塞している様子がよくわかる。

3.6 固定化された酵素の基質に対する親和性

Laidlerら⁸⁾⁹⁾は固定化酵素膜のみかけのKm値が次式(2)で表わされることを示した。

$$K_m(\text{app}) = K_m'/PF \quad (2)$$

ここで、 $K_m(\text{app})$ と K_m' はそれぞれ、みかけおよび真のMichaelis定数で、Pは分配係数である。Fは膜内の反応が拡散支配である程度に関係し、次式(3)で表わされる。

$$F = (\tanh \gamma l / \gamma l) \quad (3)$$

ここで、 l は膜厚 [cm] で、 γ [cm^{-1}] は

$$\gamma = [kc(\text{app})(E)m / 4DK_m'] \quad (4)$$

で与えられる。

ここで、 $kc(\text{app})(E)m$ [M/S] はLineweaver-Burkプロットから計算される 1 dm^3 の固定化酵素膜による最大反応速度に等しい。



Fig.9 SEM photograph of the EVA membrane which adsorbed PNP

式(2)~(4)に、EVA膜中の β -GDのPNPGの加水分解反応に対する $K_m(\text{app})$ 値、D、P、 $kc(\text{app})(E)m$ 、 l の実験値を用いてEVA膜中の β -GDの K_m' 値を求めた結果を表4に示す。

これらの結果は、EVA膜およびSi-3120包括EVA膜中の β -GDの K_m' 値は遊離酵素の K_m 値にほとんど等しく、酵素の基質に対する親和性は固定化によって影響されていないことを示唆しており、本法が純物理的な穏和な固定化法であることが実証できた。

3.7 酵素の固定化に対する粒子同時包括の影響

Si包括EVA膜の K_m' 値はEVA膜よりもむしろ小さいにもかかわらず $V_{\text{max}}(\text{app})$ が大きくなるのは膜中の固定化酵素量が少ないからで、粒子による膜容積の占有による。また、図5からも明らかのように、粒子の同時包括により膜孔部が減少し、基質の透過速度が低下することも反応速度低下の原因であろう。

Al/EVAおよびHA/EVAに包括した β -GDの定量が困難なためAlおよびHA粒子については定量的な検討は出来なかったが、図10は仕込み β -GD量を同一にした固定化 β -GDの包括酵素量が同一になると仮定して得たLineweaver-Burkプロットで、Si、HA、Alの順に活性が低下しているが、これは図5からもよくわかるように膜孔を粒子が閉塞している度合いとよく一致している。

4. 結 言

固定化酵素膜の機械的強度をフィラーの充填により

Table.4 Calculated values of Michaelis constant of enzyme (K_m') in EVA membrane

Membrane	Thickness [μm]	$V_{\text{max}}(\text{app})$ [$\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g-enzyme}$]	$V_{\text{max}}(\text{app})[\text{E}]m$ [$\mu\text{mol}/\text{s}/\text{liter}$ of membrane]	$K_m(\text{app})^{\text{a)}$ [mM]	K_m' at D employed [mM]
EVA (β -GD:1.29 wt%)	19.3	2.57×10^5	5.73×10^4	15.3	2.60 (D: 2.44×10^{-7} cm ² /s)
Si-3120/EVA (β -GD:1.23 wt%)	22.3	9.33×10^4	2.05×10^4	6.35	2.51 (D: 1.78×10^{-7} cm ² /s)

a) K_m value of the soluble enzyme is 2.50 mM.

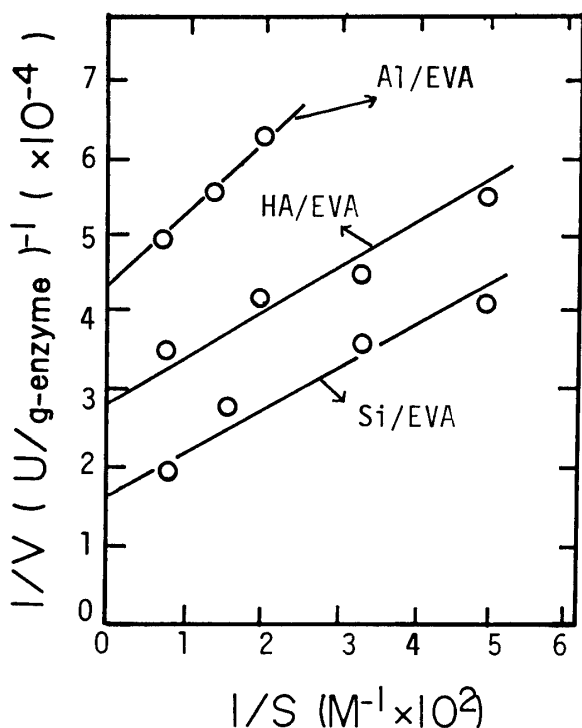


Fig.10 Lineweaver-Burk's plots of immobilized enzyme reaction

改善できた。

固定化酵素膜に固体粒子を同時包括しても酵素と基質との親和性には粒子の存在はほとんど影響しないが、膜孔部を減少させ、酵素包括量や基質透過速度を低下させることがわかった。膜内包括酵素量を大きくするためにはあらかじめ酵素を吸着させた微粒子を充てん

する方法が有効と思われる。

終りに、オートグラフ測定をご指導頂いた本学応用化学工学科の中倉英雄助手、トスパールを提供頂いた東芝シリコン(株)技術開発研究所の木村博氏、ならびにヒドロキシアパタイトを提供頂いた三井東圧化学(株)の彦島工業所技術室の方々に感謝の意を表します。

参考文献

- 1) 松本恒隆、中前勝彦、落海 司、繊維学会誌、**30**、398 (1974)
- 2) K. Fukunaga and K. Nakao :Preprints of Fourth World Congress of Chemical Engineering, II7・2-21(1991).
- 3) D. Dess, H. P. Kleine, D. V. Weinberg, R. J. Kaufman, R. S. Sidhu, Synthesis, **1981**,883
- 4) S. Hirose, E. Yasukawa, T. Nose, J. Appl. Polym. Sci., **26**, 1039(1981)
- 5) M. B. Fadda, M. R. Dessi, A. Rinaldi, G. Satta, Biotechnol. Bioeng., **33**, 777(1989)
- 6) S. Miyairi, M. Sugiura, S. Fukui, Agric. Biol. Chem., **42**,1661(1978)
- 7) S. Miyairi and M. Sugiura, J. Ferment. Technol., **56**, 303(1978)
- 8) P. V. Sundaram, A. Tweedale, K. J. Laidler, Can. J. Chem., **48**,1498(1970)
- 9) P. S. Bunting and K. J. Laidler, Biochemistry, **11**, 4477(1972)

(平成3年10月15日受理)