

## ポリエチレン、ポリテトラフルオロエチレンのヒドロゲル化と 酵素の固定に関する研究

松田 清美・平田 光男 (応用分子化学科)

### [緒言]

世界人口の急増による石油資源の枯渇が懸念されている今日、省エネルギー型生産技術への転換、さらには新エネルギー生産技術の開発が急務といわれている。酵素工学はこの要請に応えうる大きな可能性を持っている。酵素は生体内触媒として、生体内で起こる多数の化学反応に関与している。その特徴は、一般の化学触媒とは異なり、常温・常圧という温和な条件下で効率よく反応を触媒し、その反応特異性が非常に高く、高純度の生成物を得ることができることである。酵素はこのように優れた性質を持つが、工業的に使用する場合、その多くが水溶性のため、回収が困難で使い捨てになる。これは、資源の無駄使いであり、触媒のコストも高くなる。そこで、酵素を水不溶性にして繰り返し使用するため、固定化担体に固定化して利用することを考えた。また、固定化することによって熱や pH に対する安定性の向上が期待できる。特に、熱安定性の向上は工業的に利用する場合には非常に有利である。

酵素の固定化方法は、大別すると①担体結合法(水不溶性の担体に酵素を結合させる方法)、②架橋重合法(酵素を2個以上官能基を持つ試薬と反応させる方法)、③ゲル包括法(酵素をゲルの微細な格子の中に包み込む方法)などがある。本研究では共有結合法、イオン結合法、物理吸着法などがある担体結合法のうち、担体と酵素の結合が強固で使用中に脱離しないという長所のある共有結合法を採用した。固定化担体は、高分子基質にグラフト重合により種々のグラフト鎖を導入して調製する。その際の調製条件(モノマーの選択とグラフト量)と酵素を固定化する際の反応条件(固定化試薬の種類、濃度、反応時間など)の最適化を行う。本研究では、高分子基質としてポリエチレン(PE)板、モノマーには親水性のアクリル酸(AA)とメタアクリル酸(MAA)を用いた。モノマーには、親水性に富む環境とグラフト鎖の高い易動性により酵素の活性が保持されることが期待されるものを選択した。酵素を固定する方法には共有結合法を選択し、PAAまたはPMAAグラフト鎖のカルボキシル基と酵素として使用したトリプシン中のアミノ基を介して酵素を固定化するため、結合剤として水溶性のカルボジイミドである1-シクロヘキシル-3-(2-モルフォリノエチル)カルボジイミド-*p*-トルエンスルホン酸(CMC)を用いた。通常、酵素は固定化することにより著しく活性が低下するため、AAグラフト化PE(PE-g-PAA)板およびMAAグラフト化PE(PE-g-PMAA)板にトリプシンを固定化し、その活性をpH依存性、温度依存性、グラフト量依存性、固定化量依存性および長期保存性などを検討することから、固定化酵素の高い酵素活性維持と繰り返し利用の可能性を評価した。

さらに、高分子基質としてポリテトラフルオロエチレン多孔質膜(ePTFE)を用い、酸素プラズマ処理と光重合を併用して、親水性のアクリル酸をグラフト鎖として導入したePTFE-g-PAA膜を調製し上記同様に酵素グルコースオキシダーゼ(GOD)を共有結合法で固定化し、機能性膜としての応答と固定化酵素の活性維持について検討した。

### [実験]

固定化担体に用いる高分子基質として、厚さ1mm、密度 $0.926\text{g}/\text{dm}^3$ の低密度PE板を用いた。非極性、不活性なPE板に水素引き抜き型増感剤であるベンゾフェノン塗布した後、 $1\text{mol}/\text{dm}^3$ のAAまたはMAAモノマー水溶液中に浸漬し、理工科学産業製RH-400-10W型光化学反応装置を用い、 $60^\circ\text{C}$ で光グラフト重合を行い、PE-g-PAA板およびPE-g-PMAA板を調製した<sup>1),2)</sup>。グラフト重合後、未反応のモノマーやホモポリ

マーを除去するためイオン交換水で洗浄した。さらに 24 時間蒸留水中で洗浄し、24 時間減圧乾燥した後、重量を測定した。グラフト量は、重合前後の重量変化から算出した。酵素の固定化は、トリプシンと CMC を含む pH6.0 の酢酸緩衝溶液中に PE-g-PAA 板および PE-g-PMAA 板を浸漬させ、12~18 時間、4°C に保つことにより担体上にトリプシンを固定化した<sup>3,4)</sup>。酵素活性評価のために、トリプシンの標準基質である *N*α-ベンゾイル-D,L-アルギニン-p-ニトロアニリド塩酸塩 (BANA) 溶液中にトリプシン固定化 PE-g-PAA 板および PE-g-PMAA 板を浸漬し、時間に対する分解生成した p-ニトロアニリン量から酵素分解反応の初速度を求めた。この初速度と固定化酵素量から比初速度を算出し、native トリプシンの比初速度を用いて相対活性を求めた。

ePTFE は、平均孔径 3.0μm、空隙率 78% および 0.5μm、空隙率 83%、膜厚 40μm (ADVANTEC 社製) をアセトンおよびメタノールを用いて洗浄後、酸素プラズマ処理をして基質表面に酸素含有基を形成させた後、モノマー溶液中で光重合した。調製した PTFE-g-PAA 膜は、洗浄後の乾燥後重量からグラフト量を算出した。GOD の固定化は、トリプシンと同様に CMC を用いて行った。GOD 固定化 ePTFE-g-PAA 膜を用いたインスリンの透過量は、2 槽型セルの間に充分膨潤させた膜を挟み供給側にはインスリン含む所定 pH に調整した溶液 100cm<sup>3</sup> を入れ、透過側セルには同 pH の溶液を入れて開始し、所定時間ごとに透過側セル中の溶液の吸光度を測定して決定した。GOD の酵素活性は、グルコースとの反応によって生じる過酸化水素を 4-アミノアンチピリンにより定量した。

[結果および考察]

トリプシン固定化 PE グラフト化板

活性測定時の pH 依存性

トリプシン固定化 PE-g-PAA 板および PE-g-PMAA 板と native トリプシンの酵素活性を測定 pH に対する比初速度の変化を図 1 に示す。図より native トリプシンでは、酵素活性が pH7.8 付近で最大になるのに対し、pH6 で固定化したトリプシンでは、pH の上昇とともに酵素活性が上昇することがわかった。

これは、pH が上昇するとグラフト鎖のカルボキシル基が解離をし、その静電的反発によりグラフト鎖が伸長し、酵素が基質と接触しやすくなったことと、固定化されたトリプシン近傍の pH がカルボキシル基の解離の影響で溶媒の pH よりも低くなるためと考えられる。

グラフト量依存性

グラフト量の異なるトリプシン固定化 PE-g-PAA 板および PE-g-PMAA 板を用いて同様の酵素活性測定を行い、グラフト量に対する比初速度の変化を図 2 に示す。PE-g-PAA 板に固定化したトリプシンの酵素活性は、30μmol/cm<sup>2</sup> までグラフト量の増加に対して急激に減少するのに対して、PE-g-PMAA 板に固定化したトリプシンの場合は、20.4μmol/cm<sup>2</sup> まではほとんど活性がみられず、51.5μmol/cm<sup>2</sup> 以上で急激に上昇し 103μmol/cm<sup>2</sup> 以上でほぼ一定値を示した。以上の結果から、PE-g-PAA 板および PE-g-PMAA 板にトリプシンを固定化すると PE-g-PAA 板では低グラフト量の試料で高い酵素活性が得られ、PE-g-PMAA 板では反対に高グラフト量で高い活

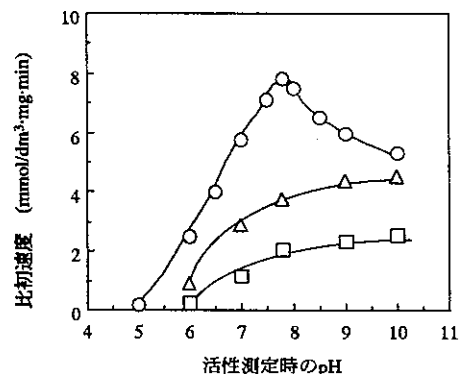


図1 ネイティブ (○) および固定化トリプシン (□: PE-g-PAA, △: PE-g-PMAA) の pH に対する比初速度の変化  
 ネイティブトリプシン濃度 = 0.0050 mg/cm<sup>3</sup>  
 固定化トリプシン量 = 0.30 ~ 0.41 mg/試料  
 BANA 濃度 = 0.50 mmol/dm<sup>3</sup>, 反応溶液量 = 40 cm<sup>3</sup>

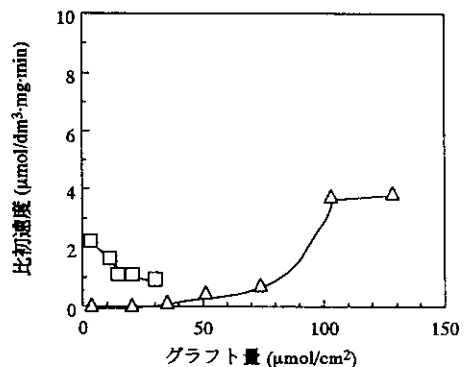


図2 30°Cにおけるグラフト量に対する固定化トリプシン (□: PE-g-PAA, △: PE-g-PMAA) の比初速度の変化  
 固定化トリプシン量 = 0.29 ~ 0.51 mg/試料  
 BANA 濃度 = 0.50 mmol/dm<sup>3</sup>, 反応溶液量 = 40 cm<sup>3</sup>  
 溶液 = KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaOH 緩衝溶液 (0.01 mol/dm<sup>3</sup>, pH7.8)

性が得られた。このことは、PE-g-PAA 板ではアクリル酸のグラフト量が増加するとグラフト鎖同士の水素結合による凝集のため親水性が低下し、酵素が動きにくくなるため活性が低下するものと考えられる。一方、PE-g-PMAA 板では、グラフト鎖のメチル基がアクリル基同士の凝集を起りにくくしているものと考えられる。

### 温度依存性

トリプシン固定化 PE-g-PAA 板および PE-g-PMAA 板の酵素活性の温度依存性を 20~70°C で測定し、反応温度に対する比初速度の変化として図 3 に示す。図 3 より native トリプシンの比初速度は、30°C で最大となりそれ以上の高温では急激に低下した。一方、固定化トリプシンの比初速度も高温では低下するが、最大活性を示す温度は 50°C となり、最大値は native の約 90% を保持していた。このことから、トリプシンは、固定化することで至適温度を上昇させることができることがわかった。また、PE-g-PAA 板では 70°C で、PE-g-PMAA 板では 50°C で繰り返し活性測定を行ったところわずかな活性の低下はあるものの繰り返し触媒として使用ができることが示された。

### 再利用性

固定化トリプシンの酵素活性を繰り返し測定した結果を図 4 に示す。固定化 PE-g-PAA 板は 70°C、固定化 PE-g-PMAA 板では 50°C で測定を行った。Native トリプシンの至適温度より高い温度で測定したが、活性の低下は認められるが、6 回の繰り返しにおいても活性の保持が確認された。

### 保存性

トリプシン固定化 PE-g-PAA 板を pH 7.8 のリン酸緩衝溶液中、4°C で長期間保存した場合の酵素活性を図 5 に示す。Native トリプシンの酵素活性は、はじめの 14 日で急激に低下したが、固定化トリプシンでは、native トリプシンに比べ緩やかに低下し、30 日以上でほぼ一定となり初回の酵素活性の 87% を保持した。このことから、トリプシンを固定化することにより、トリプシン同士の自己消化による失活を防ぐことができたものと考えられる。

### GOD 固定化アクリル酸グラフト化延伸 PTFE 膜 インスリン透過性

GOD 固定化 ePTFE-g-PAA 膜の pH 変化によるインスリンの透過について図 6 に示す。GOD 固定化 ePTFE-g-

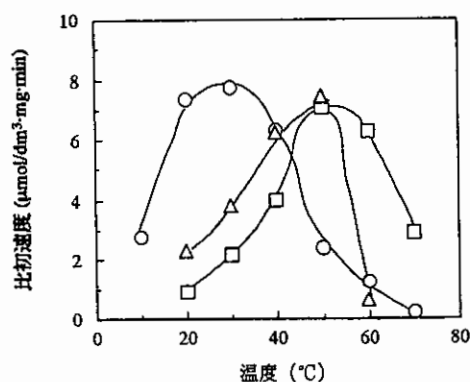


図3 ネイティブ (○) および固定化トリプシン (□: PE-g-PAA, △: PE-g-PMAA) の比初速度の温度に対する変化  
ネイティブトリプシン濃度=0.0050mg/cm<sup>3</sup>  
固定化トリプシン量=0.29~0.43 mg/試料  
BANA 濃度=0.50 mmol/dm<sup>3</sup>, Volume = 40 cm<sup>3</sup>  
溶液=KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaOH 緩衝溶液 (0.01 mol/dm<sup>3</sup>, pH7.8)

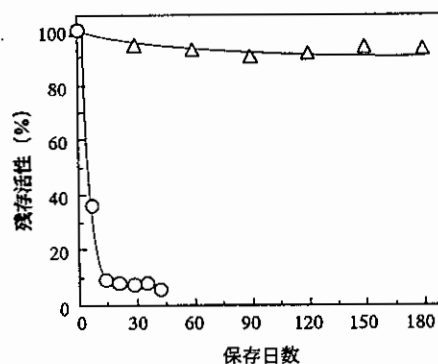


図5 pH 7.8 緩衝溶液中、4°Cにおけるネイティブ (○) および固定化トリプシン (△: PE-g-PMAA) の保存安定性  
グラフト量=3.50 mmol/cm<sup>2</sup>  
固定化トリプシン量=0.014 mg/cm<sup>2</sup>

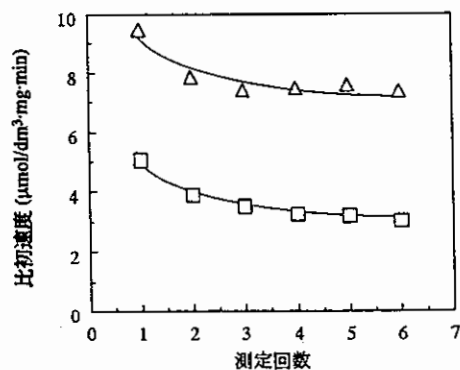


図4 固定化トリプシン (□: PE-g-PAA at 70°C, △: PE-g-PMAA at 50°C) の再利用性  
ネイティブトリプシン濃度=0.0050mg/cm<sup>3</sup>  
固定化トリプシン量=0.30~0.41 mg/sample  
BANA 濃度=0.50 mmol/dm<sup>3</sup>, 反応溶液量=40 cm<sup>3</sup>  
溶液=KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaOH 緩衝溶液 (0.01 mol/dm<sup>3</sup>, pH7.8)

PAA 膜は、PAA の伸長状態の高 pH ではインスリンの透過を抑制した。これは、多孔質 PTFE 膜の孔を膨潤した PAA グラフト鎖が塞ぎ、インスリンの透過が妨げられたものと考えられる<sup>3)</sup>。

GOD の酵素活性

図 7 に ePTFE に固定化した GOD の活性の経時変化を示す。固定化直後の活性とリン酸緩衝溶液中、冷蔵庫内で 6 ヶ月保存した場合、酵素活性は約 60% 保持されていることがわかった。

[結論]

PE-g-PAA 板および PE-g-PMAA 板に CMC を用いて固定化したトリプシンの酵素活性を検討した結果、

1. 固定化により、pH6~10 では pH の上昇とともに酵素活性が増加する。
2. 固定化により、トリプシンの至適温度は上昇する。
3. トリプシン固定化 PE-g-PAA 板の酵素活性は、リン酸緩衝溶液 (pH7.8) 中、4°C で 6 ヶ月間保存しても、初回の酵素活性の 87% を保持できる

ePTFE-g-PAA 膜に GOD を固定化した膜では

4. 固定化膜は、PAA グラフト鎖の解離状態に応答して透過性を制御できる。
5. 固定化 GOD は、6 ヶ月後に初期の酵素活性の約 60% を保持する。

ことが明らかとなった。

以上により、トリプシンを固定化した PE-g-PAA 板および PE-g-PMAA 板は、トリプシンの酵素活性を保持し、繰り返し利用することができる。また、GOD を固定化した ePTFE-g-PAA 膜は、酵素活性を保持した機能性膜として利用できる。

[文献]

- 1) K. Yamada, S. Tatekawa, M. Hirata, *J. Colloid Interface Sci.*, **142**, 144 (1994)
- 2) K. Yamada and M. Hirata, *Recent Res. Devel. Polym. Sci.*, **1**, 19 (1997)
- 3) C. C. Wang and G-H. Hsiue, *J. Appl. Polym. Sci.*, **40**, 235 (1990)
- 4) 山田和典, 中曽根寿明, 永野亮一, 平田光男, *マテリアルインテグレーション*, **12**, (7) 56 (1999)
- 5) 松坂英俊, 松田清美, 日本大学生産工学部第 33 回学術講演会工業化学部会概要集, p83 (2000)
- 6) 松坂英俊, 松田清美, 日本化学会第 78 春季年会要旨集 II, p1352 (2001)

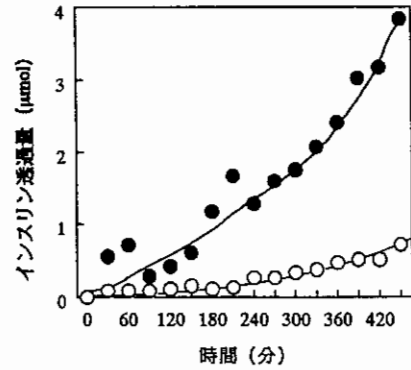


図6 GOD固定化PTFE-g-PAA膜を用いたインスリン透過性のpH7.35 (●) および8.00 (○) リン酸緩衝溶液中における経時変化  
アクリル酸グラフト量=5.96 mmol/g

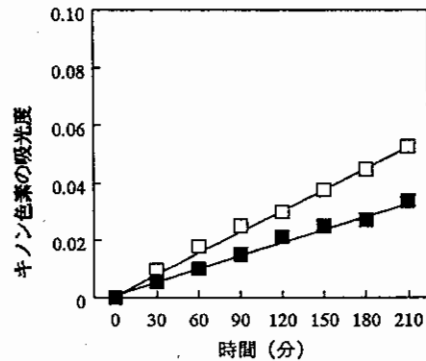


図7 固定化GODの酵素活性の保存性  
固定化直後: □  
6ヶ月後: ■