

## グラフト化ポリテトラフルオロエチレン膜へのリパーゼの固定化

松田 清美・山田 和典・平田 光男 (応用分子化学科)

### 1 緒言

本研究では、人工血管として広く臨床で使用されている延伸ポリテトラフルオロエチレンフィルム(ePTFE フィルム) 表面に、生体適合性に優れるメタクリル酸-2-ヒドロキシエチル(HEMA)を酸素プラズマ処理と光グラフト重合の併用により、グラフト鎖として導入した。さらに、血中の中性脂肪を分解する働きを持つリパーゼを共有結合により固定化し、生活習慣病のひとつである高脂血症の治療に応用できる医用システムの構築を検討した。酵素の固定化には、HEMA グラフト化 ePTFE フィルム(ePTFE - g - PHEMA フィルム)に結合剤としてグルタルアルデヒド(GA)を導入した後、直接リパーゼを固定化する方法と 6-アミノヘキサン酸(6-AA)をスペーサーとして導入し、*N*-シクロヘキシル-*N'*-(2-モルフォルリノエチル)カルボジイミド-メソ-*p*-トルエンスルホン酸(CMC)または 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)を縮合試薬として用いて固定化する方法、ヘキサメチレンジアミン(HMDA)をスペーサーとして導入し、CMC もしくは EDC を用いてリパーゼを固定化する方法の 3 種類 5 つの方法を用いた。それぞれのリパーゼの酵素活性について、pH・温度依存性、固定化時間・固定化量依存性また酵素活性の持続性・保存性などの最適条件を検討し、活性に優れ再利用性の高い膜の調製を目的とした。

### 2 実験

#### 2. 1 ePTFE - g - PHEMA フィルムの調製

ePTFE フィルム(孔径 3.0  $\mu\text{m}$ , 空隙率 83%, 直径 47mm)に酸素プラズマ処理を 2 分間行い、フィルム表面に酸素含有基を形成させた。プラズマ処理後、重合促進剤としてベンゾフェノン塗布し、モノマー溶液中で、反応温度 60 $^{\circ}\text{C}$ にて光グラフト重合を行い、ePTFE - g - PHEMA フィルムを調製した<sup>1~3)</sup>。

#### 2. 2 酵素の固定化

##### 2. 2. 1 直接固定化

ePTFE - g - PHEMA フィルムを 5%GA 溶液に室温で 24 時間浸漬し、HEMA グラフト鎖の -OH 基に GA を結合させた。そのフィルムを酵素溶液に入れ、リパーゼを直接固定化した。

##### 2. 2. 2 間接固定化

GA を結合させた ePTFE - g - PHEMA フィルムを室温で 24 時間 6-AA 溶液に浸漬し、6-AA をスペーサーとして導入した後、CMC または EDC を用いて間接的に固定化した<sup>4)</sup>。同様に GA を結合させた ePTFE - g - PHEMA フィルムを 80 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間 HMDA 溶液に浸漬し、HMDA をスペーサーとして導入した後、CMC または EDC を用いて間接的に固定化した<sup>5)</sup>。

#### 2. 3 酵素活性測定

酵素活性を JIS<sup>6)</sup>に基づき乳化剤添加法および乳化剤無添加法により測定した。乳化剤添加法では、乳化剤としてポリビニルアルコール(PVA)溶液、基質としてオリーブ油を用い、

ホモジナイザーにより基質乳化液を調製した。基質乳化液  $5.0\text{cm}^3$  に  $0.1\text{mol}/\text{dm}^3$  リン酸緩衝溶液 (pH 6.5~8.0) を  $5.0\text{cm}^3$  加え  $37^\circ\text{C}$  の恒温槽中に 5 分間保った後、リパーゼを加え 20 分間静置して反応させた。その後、アセトン-エタノール (1 : 1) 混合溶液  $10\text{cm}^3$  を加え反応を停止させた後、 $0.05\text{mol}/\text{dm}^3$  水酸化ナトリウム溶液  $10\text{cm}^3$ 、アセトン-エタノール (1 : 1) 混合溶液  $10\text{cm}^3$  およびフェノールフタレイン 2~3 滴を加え、窒素がスを吹き込みながら、 $0.05\text{mol}/\text{dm}^3$  塩酸で逆滴定した。

乳化剤無添加法では、PVA を用いずに基質溶液を調製し、上記同様に逆滴定により酵素活性を測定した。

### 3 結果および考察

#### 3. 1 各固定化方法における酵素活性

リパーゼの至適条件 pH8.0,  $37^\circ\text{C}$  において native および種々の条件によって ePTFE-g-PHEMA フィルムに固定化したリパーゼの酵素活性の測定結果を Fig.1 に示す。Native リパーゼに比べ固定化リパーゼの酵素活性は著しく低下した。これは、固定化に共有結合を用いているため、固定化の際に酵素の活性部位に対して、変性などの影響があったためと考えられる。また、スペーサーを介すことにより活性が上昇した。これは、スペーサーを介すことで、酵素とフィルム間の距離が長くなり基質と接触しやすくなったためと考えられる。また、6-AA と HMDA を比べると、HMDA の方が活性値は高くなった。これはリパーゼの -NH<sub>2</sub> 基が活性発現に対し重要な働きをするためであると考えられる。

#### 3. 2 活性の pH 依存性

Fig.2 に pH6.5 から 9.0 までの種々の pH に

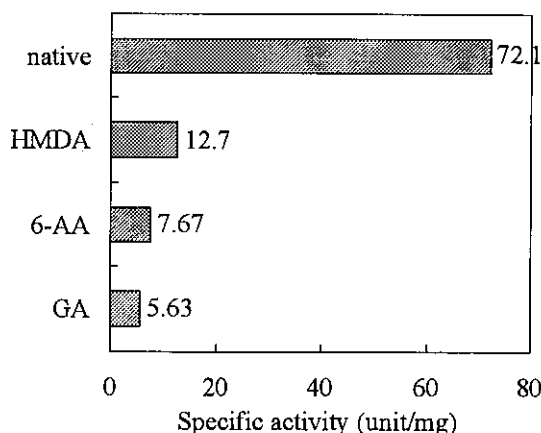


Fig.1 Specific activity of various kinds of immobilized lipase in  $0.1\text{mol}/\text{dm}^3$  phosphate buffer at  $37^\circ\text{C}$

おける酵素活性を示す。酵素活性は、いずれの固定化方法においても native と同じ pH8.0 となった。また使用した固定化酵素では、pH8.0 以外の pH では native 酵素より活性が高いことが示され、pH 変化に対する耐性の上昇が見られた。

#### 3. 3 活性の温度依存性

酵素活性への温度の影響を調べるため、温度を変えて酵素活性を測定した結果を Fig.3 に示す。酵素活性はいずれの固定化方法においても native と同じ  $37^\circ\text{C}$  となり、至適温度は固定化によっても変化のないことが示された。また、pH 変化に対する耐性が上昇したように、温度に対する耐性の上昇も期待されたが、全ての固定化方法で温度に対する耐性の上昇は見られなかった。

Fig.1~3 に示したこれまでの実験結果から、HMDA をスペーサーとして用いた固定化方法が最も高い酵素活性および pH 安定性を示したことから以後の実験では、HMDA スペーサーを介した固定化を行った ePTFE-g-PHEMA フィルムについて検討を行った。

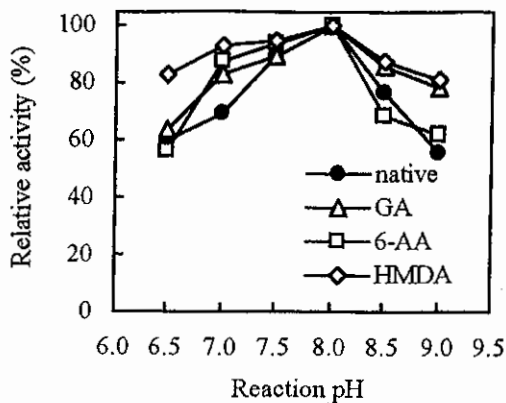


Fig.2 pH dependence of the enzyme activity of native and immobilized lipase at 37 °C

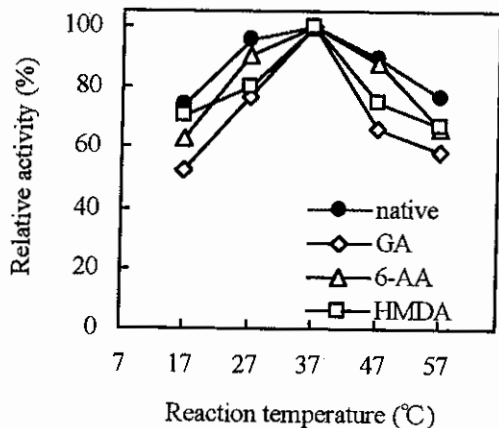


Fig.3 Temperature dependence of the enzyme activity of native and immobilized lipase at pH 8.0

### 3. 4 活性の固定化量依存性

酵素固定化量と酵素活性の関係を Fig.4 に示す。測定した酵素活性は、固定化量の増加に伴い減少した。これは、固定化量が増加すると、固定化された酵素が緻密に存在することによる立体障害等が起こり、基質との接触性が低下したためであると考えられる。

### 3. 5 活性の固定化時間依存性

酵素活性と固定化時間の関係を Fig.5 に示す。酵素活性は酵素固定化時間の増加に伴い減少した。このことは、固定化の際に縮合試薬を用いているため、固定化時間が長くなると固定化された酵素同士が縮合してしまうなどの変性が起こったためであると考えられる。

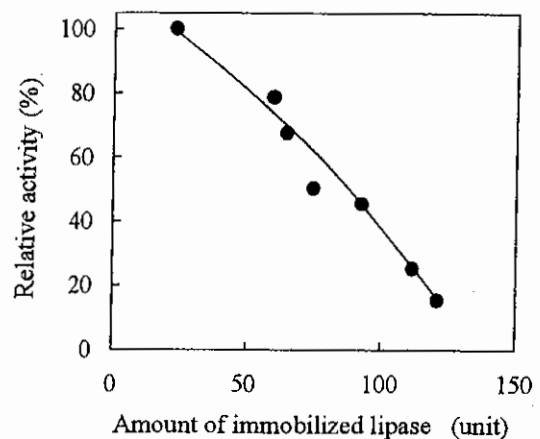


Fig.4 Amount of immobilized lipase dependence of enzyme activity of native and immobilized lipase in 0.1mol/dm<sup>3</sup> phosphate buffer (pH 8.0) at 37 °C

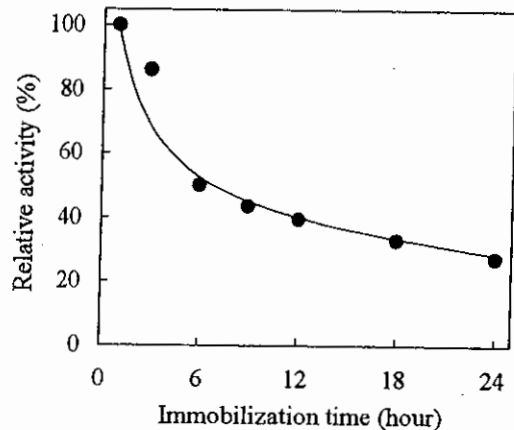


Fig.5 Immobilized time dependence of enzyme activity of native and immobilized lipase in 0.1mol/dm<sup>3</sup> phosphate buffer (pH 8.0) at 37 °C

### 3. 6 活性の持続性

反復使用における酵素活性を確認するため、繰り返し酵素活性を測定した。その結果を Fig.6 に示す。酵素活性は緩やかに減少しているが、5 回使用時においても初期活性の約 80% を保持した。この際の活性の低下は、活性測定時および洗浄時に固定化したリパーゼおよび物理吸着されていたリパーゼの遊離が原因であると考えられる。しかし、活性を約 80% 保持したことから反復利用が可能であると考えられる。

### 3. 7 活性の保存性

長期間保存した場合の酵素活性を Fig.7 に示す。酵素活性は日数の経過と共に急激に減少した。この原因を推察するとグラフト鎖 HEMA が COO 結合を持っているため、保存中に加水分解してしまったためではないかと考えられる。反応溶液の UV スペクトルから日数の経過とともに HEMA に起因するスペクトル強度の増加が確認された。そのため、酵素を固定化したグラフト鎖が ePTFE フィルムから外れ、保存期間の経過に伴い活性が急激に減少したと考えられる。

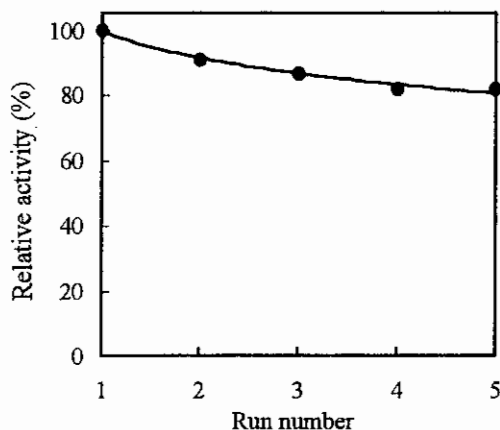


Fig.6 Reusability of immobilized lipase in  $0.1\text{mol/dm}^3$  phosphate buffer(pH8.0) at  $37^\circ\text{C}$

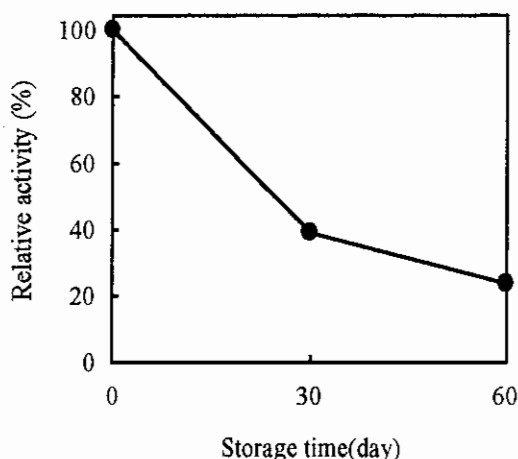


Fig.7 Dependence of relative activity of immobilized lipase during storage in  $0.1\text{mol/dm}^3$  phosphate buffer (pH8.0) at  $4^\circ\text{C}$

### 4 結論

酸素プラズマ処理と光グラフト重合の併用により調製した ePTFE - g - PHEMA フィルムに、リパーゼを直接およびスパーサー(6-AA, HMDA)を介して固定化し、その酵素活性を測定した結果、次の結論が得られた。

1. 固定化したリパーゼの至適 pH および至適温度は native リパーゼと同様であったが、pH に対する耐性は上昇した。
2. 固定化したリパーゼの酵素活性は、固定化量の増加に伴い減少した。また、固定化時間が長くなるほど酵素活性は減少した。
3. 固定化したリパーゼは、5 回の反復使用において初期活性の約 80% 保持し再利用が可能である。しかし、長期間保存における活性は低下するが、30 日後でも反復使用できる。

以上の結果から、3 つの固定化方法で ePTFE - g - PHEMA フィルムにリパーゼを固定化することによって、広い pH 範囲で安定な酵素活性が得られ反復利用が可能であることが明らかになった。

### 【参考文献】

- 1) K. Yamada, S. Tatekawa and M. Hirata, *J. Colloid and Interface Sci.*, **162**, 144-150 (1994)
- 2) K. Yamada, T. Sato, S. Tatekawa and M. Hirata, *Polym. Gels Networks*, **2**, 323 (1994)
- 3) K. Yamada, M. Hirata, *Recent Res. Develop. Polym. Sci.*, **1**, 19 (1997)
- 4) P. Zhuang, D. A. Butterfield, *J. Appl. Poly. Sci.*, **47**, 1329~1342(1993)
- 5) F. Ayhan, H. Ayhan, E. Pigin, A. Tanyolac, *Bioresour. Technol.*, **81**, 131~140 (2002)
- 6) JIS, Determination of lipolytic activity of lipase for industrial use, K 0601, p.1 (1995)