

## グラフト化ポリエチレン板への リパーゼの固定化と酵素活性評価

日大生産工(院) ○手塚遥香  
日大生産工 吉宗一晃 山田和典

### 1. 緒論

酵素は、温和な条件下で反応する触媒として多くの工業反応に利用されている。その中で脂肪分解酵素であるリパーゼは、油脂加工や食品加工などで使われている。脂肪酸生産では、触媒を用いない高温高压プロセスの Colgate-Emery 法によるトリアシルグリセロールの化学分解が行われているが、製造時の熱履歴や脂肪酸の劣化などの問題点がある。*Candida cylindracea* 由来のリパーゼによる加水分解反応によって脂肪酸を製造している[1]。しかし、Colgate-Emery 法に比べてコストが高く、リパーゼ反応を用いた脂肪酸製造はあまり利用されていない。また、酵素の利用は安定性の低さや回収が困難であるなどの点から、工業反応への利用が制限されている。このような問題を解決する方法として酵素の固定化が挙げられ[2]、分離や回収の容易さ、反復利用性などの利点があげられる。本研究ではリパーゼを固定化することで、繰り返しかつ高い酵素活性を保持させた状態で利用することを目指す。

### 2. 実験操作

#### 2.1 PE板へのグラフト重合

*Candida rugosa* 由来のリパーゼの固定化担体としてアクリル酸(AA)グラフト化低密度ポリエチレン(PE)板を作成した。PE板表面にAAを光グラフト重合することで親水性な環境で酵素活性の低下を抑えて、固定化ができると考えた。増感剤であるベンゾフェノン(BP)を溶解したアセトン溶液にPE板を浸漬させることでBPを塗布した後、濃度1.0 MのAAモノマー水溶液に浸漬させ、60℃で紫外線を照射することで光グラフト重合を行った。グラフト量は(1)式から算出し、

$$\text{grafted amount (mmol/cm}^2\text{)} = \frac{W_g - W_0}{72.06 \cdot A} \cdot 10^6 \quad (1)$$

$W_g$  : Weight of grafted PE plate (g)

$W_0$  : Weight of ungrafted PE plate (g)

72.06 : Molecular mass of monomer AA (g/mol)

A : Surface area of PE plate (cm<sup>2</sup>)

である。

#### 2.2 native リパーゼの酵素活性測定

リパーゼは図に示すように *p*-ニトロフェニル脂肪酸カルボン酸を分解して *p*-ニトロフェノール(*p*-NP)を生成する酵素であり、本研究では *p*-ニトロフェニルブチレート(*p*-NPB)を使用した。

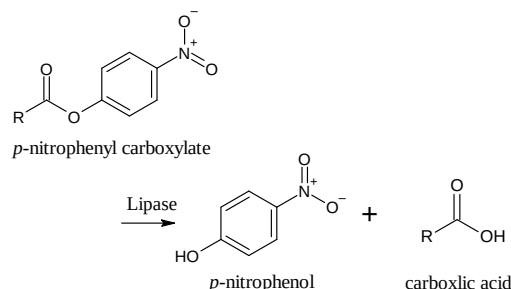


Fig. 1 Enzymatic hydrolysis of *p*-nitrophenyl carboxylate with lipase.

固定化リパーゼの酵素活性を native リパーゼと比較するため、native リパーゼの活性を評価した。まず *p*-NP 溶液のスペクトルを pH4~10 で測定し、等吸収点を決定した。*p*-NPB を 0.05 M のリン酸緩衝溶液に溶解させ、pH 4~10 でリパーゼによる加水分解によって生産する *p*-NP の吸光度を測定し、至適 pH と至適温度を決定した。

#### 2.3 リパーゼの固定化と活性測定

PAA グラフト鎖のカルボキシル基とリパーゼ分子中のアミノ基を利用して共有結合によって固定化を行った。pH 6.5 のリン酸緩衝溶液中でグラフト層を膨潤させた後、AA グラフト化 PE 板を濃度 0.05 mM の N-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS)と濃度 0.1 mM の 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)の混合溶液に 24 時間浸漬させた[3]。さらに、AA グラフト化 PE 板を、濃度 0.01 mg/ml のリパーゼ溶液に 6 時間浸漬させることでリパーゼの固定化を行った。固定化量は BCA 法を用いて固定化前後のリパーゼ溶液の吸光度の差から求めた。固定化リパーゼの活性は *p*-NPB を用いて、native リパーゼと同様に行った。

Immobilization of lipase on polyethylene plates grafted and measurement of enzymatic activity of immobilized lipase

Haruka TEZUKA, Kazuaki YOSHIMUNE and Kazunori YAMADA

### 3. 結果および考察

#### 3.1 PE板へのAAのグラフト重合

照射時間を変えてPE板へのAAの光グラフト重合を行った。照射時間に対するAAグラフト量を図2に示す。照射時間を長くすることでグラフト量は増加した。

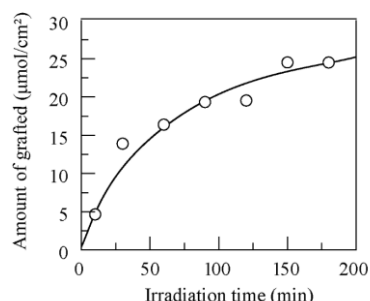


Fig. 2 Change in the grafted amount with the irradiation time for photografting of AA onto the PE plate.

#### 3.2 native リパーゼの酵素活性評価

*p*-NP溶液のスペクトルを測定すると図3に示すように波長348.8 nmの吸光度がpHを変えてもほぼ変わらないことがわかり、348.8 nmが*p*-NPの等吸収点であることがわかった。

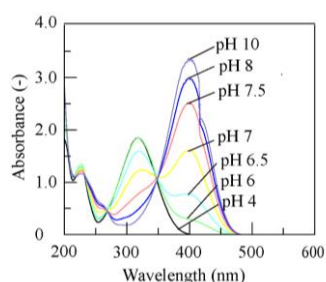


Fig. 3 The determination of isosbestic point of *p*-NP at 0.20 mM.

native リパーゼの酵素活性は、40℃でpHを変更させて評価した。pH 6.5でリパーゼによる*p*-NPの生成が最も速く進行したことから至適pHはpH 6.5と決定した。pH 6.5, 20~60℃で酵素活性を測定した。以下に温度に対する反応時間40分での*p*-NP濃度の関係を図4に示す。図4から反応時間40分における*p*-NP濃度が最大となった40℃を至適温度とした。

#### 3.3 固定化リパーゼの活性測定

AAグラフト量 10.733 μmol/cm²のPE板に固定化したリパーゼの活性測定結果を図5に示す。

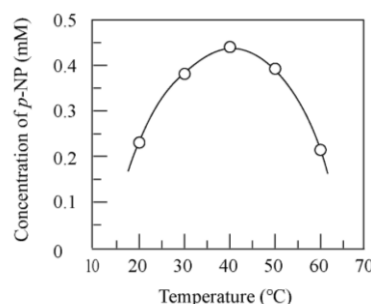


Fig. 4 The change in the concentration of *p*-NP generated from *p*-NPB by the enzymatic reaction of lipase 0.010 mg/mL with the temperature at pH 6.5.

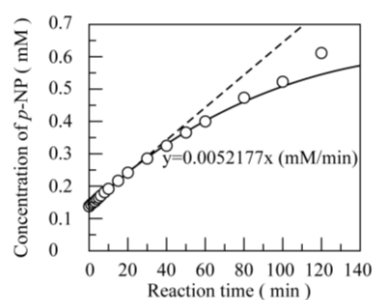


Fig. 5 The enzymatic reaction of *p*-NPB with lipase immobilized on the AA-grafted PE plate (grafted amount : 10.733 μmol/cm²) at pH 6.0 and 30℃.

固定化量は、固定化反応後のリパーゼ濃度の差から 0.0748 mg/cm²と決定した。反応時間に対して *p*-NP 濃度が上昇したことから、AA グラフト化PE板にリパーゼが固定化されたと考えられ、今後は再利用性の評価を行う。

### 4. 結論

固定化リパーゼの活性測定より、AAグラフト化PE板はリパーゼを固定化していると考えられる。今後は、リパーゼを固定化したPE板の表面解析や固定化時の至適pHの検討、グラフト量による固定化量の変化を評価する。

### 参考文献

- 1) 養島良一, オレオサイエンス, **1**, 857-862 (2001).
- 2) L. Zhang, Y. Sun, *Biochem. Eng. J.*, **132**, 122-129 (2018).
- 3) P. E. Ahranjani, M. Kazemeini, G. Singh, A. Arpanaei, *Langmuir*, **32**, 3242-3252 (2016).