

アクリル酸グラフト化ポリエチレン板に固定化したリパーゼの酵素活性と反復利用の評価

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

脂肪分解酵素の一種であるリパーゼは工業分野では主に脂肪酸の製造に利用されている。この脂肪酸の製造には Colgate-Emery 法と酵素法がある¹⁾。Colgate-Emery 法ではコストが低く高収率で反応が進行するが、高温高压による脂肪酸の劣化(酸化, シストランス異性化, 熱重合)という問題点がある。これに対して酵素法は常温常圧で行われるので、エネルギー消費を抑え、脂肪酸の劣化が少ないがコストが高く、脂肪酸の製造では利用されにくい。また、酵素は安定性の低さや回収が困難であるなどの点から、工業分野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あげられ、反復利用や簡易な保存が可能になる²⁾。本研究では、アクリル酸(AA)をグラフト化した低密度ポリエチレン(PE) (PE-g-PAA)板に共有結合を介してリパーゼを固定化した。native リパーゼの酵素活性と固定化後の酵素活性を比較し、pHや熱安定性、固定化リパーゼの反復利用性、保存性などを評価した。

2. 実験操作

2.1 PE板へのAAグラフト重合

ベンゾフェノン(BP)をPE板に塗布した後、濃度1.0 MのAAモノマー水溶液に浸漬させ60°Cで紫外線を照射することで光グラフト重合を行い、リパーゼの固定化担体であるPE-g-PAA板を作成した。グラフト前後のPE板の質量の差からグラフト量($\mu\text{mol}/\text{cm}^2$)を算出した。

2.2 リパーゼの固定化

Sigma-Aldrich(株)製 *Candida rugosa*由来(Type VII, 1008 unit/mg)のリパーゼを用いた。PE-g-PAA板(グラフト量 $15 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$)を濃度0.05 M, pH 6.0のリン酸緩衝溶液に浸漬させることでグラフト層を膨潤させた後、結合剤である濃度 $4.0 \text{ mg}/\text{cm}^3$ の1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノエチル)カルボジイミドメト-*p*-トルエンスルホン酸(CMC)と濃度 $0.50 \text{ mg}/\text{cm}^3$ のリパーゼの混合溶液に24時間浸漬させることで、PE-g-PAA板のAAグラフト鎖のカルボキシ基にリパーゼ分子中のアミノ基を共有結合によって固定化した³⁾。PE-g-PAA板に固定化されたリパー

ゼの量はThermo Scientific(株)のPierce™ BCA Protein Assay Kitsを使用して求め、BCA法により固定化前後のリパーゼ溶液の濃度の差から算出した。

2.3 リパーゼの酵素活性測定

リパーゼが

-ニトロフェニルブチレート(*p*-NPB)を加水分解し、*p*-ニトロフェノール(*p*-NP)を生成することを利用して、本研究では基質として*p*-NPBを使用した。*p*-NPBを緩衝溶液に溶解させ、pH 4.0~8.0でnativeリパーゼまたは固定化リパーゼによって生産する*p*-NPの348.8 nmでの吸光度を測定し、至適pHと温度を決定した。

2.4 nativeリパーゼと固定化リパーゼの反復利用と保存安定性

リパーゼを固定化したPE-g-PAA板(lipase-i-PE-g-PAA)が入ったpH 6.0の緩衝液と濃度 $0.05 \text{ mg}/\text{cm}^3$, pH 6.0のリパーゼ溶液を4, 25および40°Cで保存し、酵素活性を繰り返し測定した。

3. 結果および考察

3.1 固定化時のpHとリパーゼ固定化量

PE-g-PAA板へのリパーゼ固定化時のpHを変化させた時の固定化量を図1に示す。固定化時のpHが6.0で固定化量が最大となった。これはpHがこの値より高くもしくは低くなると固定化に使用されるAAグラフト鎖のカルボキシ基とリパーゼ分子のアミノ基がイオン化するので、固定化が起きにくくなると考えられる。

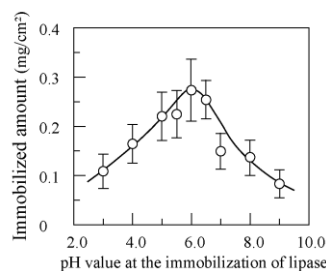


Fig. 1 Variation in the immobilized amount with the pH value at the immobilization of lipase on PE-g-PAA plates with the grafted amount of $15 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$

3.2 リパーゼの酵素活性評価

p-NPの等吸収点を348.8 nmと決定し、nativeリパーゼの酵素活性のpHと温度依存性を図2に示す。nativeリパーゼによる*p*-NPの生成量はpH 6.0, 40°Cで最大となった。pHが6.0以上では

リパーゼ不在下でも *p*-NPB が加水分解するため、酵素活性が低く見えると考えられる。50と60°Cではリパーゼが熱失活するため、酵素活性が低下したと考えられる。よってnativeリパーゼの至適pHと温度をそれぞれpH 6.0と40°Cに決定した。

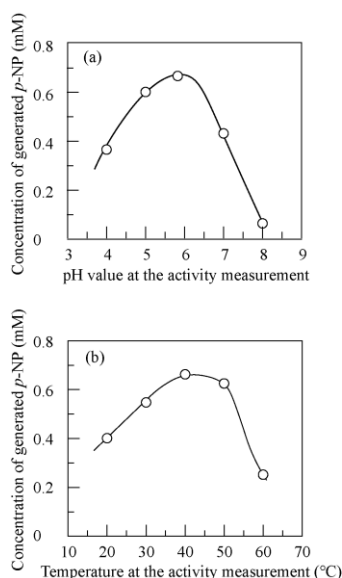


Fig. 2 Variation in the concentration of generated *p*-NP with the (a) pH value and (b) temperature at the activity measurement for native lipase.

lipase-i-PE-g-PAA板(固定化量0.25 mg/cm²)の固定化リパーゼの酵素活性をpHを変えて測定した結果を図3に示す。固定化リパーゼの酵素活性もnativeリパーゼと同様にpH 6.0で最大となった。このことから至適pHは変わらなかったが、pH 6.0以下での酵素活性の低下が緩やかとなり、固定化によってリパーゼの変性が抑えられたといえる。

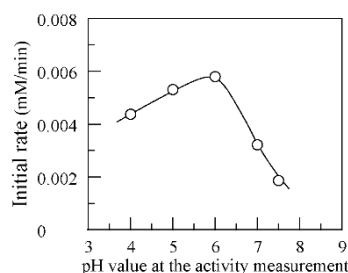


Fig. 3 Variation in the initial rate with the pH value at the activity measurement for lipase immobilized on the PE-g-PAA plates with 15 μmol/cm² at 40°C

3.3 保存安定性および反復利用性評価

4, 25および40°Cで保存した nativeリパーゼとlipase-i-PE-g-PAA板の酵素活性を測定し、保存日数に対する初速度を図4に示す。nativeリパーゼと固定化リパーゼをpH 6.0, 4°Cで保存し

たときの酵素活性は、固定化リパーゼはnativeリパーゼの10%の初速度であり、どちらも30日後も活性が保たれた。

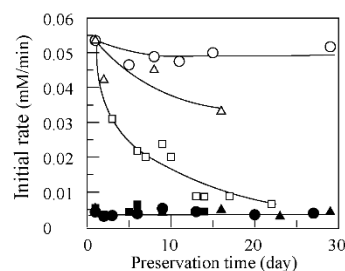


Fig. 4 Effect of preservation time on the initial rate of native lipase (open) and lipase immobilized on PE-g-PAA plates with 15 μmol/cm² (closed) in pH 6.0 buffer solution (preservation temperature at 4 (○, ●), 25 (△, ▲), 40 (□, ■) °C)

25°Cでは、nativeリパーゼの酵素活性が徐々に低下するのに対して固定化リパーゼは酵素活性が保たれた。40°Cでは、nativeリパーゼは酵素活性が約20日で12%まで低下したのに対して、固定化リパーゼは活性が保たれた。このことより固定化リパーゼは酵素活性を維持できることがわかった。また、固定化リパーゼは、共有結合によりリパーゼの構造が変化するため、いずれの保存温度でもnativeリパーゼに比べて酵素活性が低いが、反復利用できることがわかった。特に保存温度が40°Cでは、nativeリパーゼに比べ、固定化リパーゼの酵素活性が低下しにくいことから、共有結合によるリパーゼの固定化によって、リパーゼの構造が変化し、安定性が向上したと考えられる。

4. 結論

リパーゼをPE-g-PAA板に固定化することで反復利用が可能となった。また、保存温度が40°Cのように高い条件でも、nativeリパーゼと比べて酵素活性が低下しにくいため、共有結合によるリパーゼの固定化によって、安定性が向上したと考えられる。今後は、pHが低い保存条件での保存安定性や固定化リパーゼの酵素活性を温度を変えて測定する。

参考文献

- 1) F. O. Nitbani, P. J. P. Tjitda, B. A. Nurohmah, H. E. Wogo, *J. Oleo Sci.*, **69**, 277-295 (2020).
- 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).