一般報文

(平成元年 6 月 2 日受理)

多孔性キトサン膜を担体とする固定化リパーゼの調製と性質

福井工業大学・工学部 草桶 秀夫・松井 典子・坪倉 幸男
福井大学・工学部 桜井 謙資PREPARATION AND PROPERTIES OF IMMOBILIZED LIPASE SUPPORTED
BY POROUS CHITOSAN MEMBRANEBy Hideo Kusaoke, Noriko Matsui, Yukio Tsubokura*¹, and Kensuke Sakurai*²*¹ (Faculty of Engineering, Fukui Institute of Technology, Gakuen, Fukui,
910 Japan)*² (Faculty of Engineering, Fukui University, Bunkyo, Fukui, 910 Japan)

ABSTRACT: Porous chitosan membrane was prepared by drying a mixed solution of chitosan and polyethylene glycol (PEG) in an oven at 50°C on a plate, followed by dialysis, and lipase was immobilized in the porous chitosan membrane with glutaraldehyde. The lipase immobilized in porous chitosan membrane obtained from the mixture of chitosan and PEG with the molecular weight of 20000 (1 : 1 in weight) had a high hydrolysis activity towards olive oil. The activity yield of the immobilized enzyme was as much as 64% of the native enzyme, and increased with decreasing membrane thickness. Much difference was found neither in pH nor temperature dependency between the activities of immobilized and native enzymes. The immobilized lipase in porous chitosan membrane retained about 180% of the activity at initial use after repeated use of 7 times.

(Received June 2, 1989)

1. 緒 言

酵素を膜に固定化させた酵素固定化膜は、非常に薄い膜担体に酵素が局在化し、固体状なのでシステム化やデバイス化がしやすく、膜の選択的透過性を利用して生成物の分離を行ったり、電極と固定化酵素を組み合わせる特定の物質の定量を行うことが可能である¹⁾。したがって、酵素固定化膜はバイオセンサー、バイオリアクター、バイオエレクトロニクス、アフィニティークロマトグラフィー、臨床検査などの機器材料として注目されている。

固定化膜材料として、これまで、酢酸セルロース、アガロース、カラギーナン、アルギン酸ナトリウム、ポリアクリルアミド、ポリ塩化ビニル、ポリアクリロニトリル、ポリウレタン、ポリスルホン、水溶性レジスト、ポリビニルアルコールなどを用いた報告²⁾があるが、多孔性膜に酵素を固定化した報告は見あたらない。

著者らは、バイオリアクター用固定化担体として種々のキトサン誘導体ゲルを合成し、これに酵素や微生物を

固定化してゲルの担体としての有効性について検討してきた³⁻⁶⁾。とくに、キトサン-アルデヒドゲルを用いると、微水系（反応溶媒中の水分含有量 1 ~ 2 %）において固定化リパーゼによるオリブ油の加水分解反応が効率よく進むことがわかった⁷⁾。

本研究では、固定化用担体としてのキトサンの利用に関する一連の研究において、キトサンの膜形成能に注目し、キトサン膜へのリパーゼの固定化を試みた。そして、リパーゼの油脂分解活性に及ぼす多孔性キトサン膜の製膜条件やリパーゼ固定化キトサン膜の性質などについて検討した。

2. 実験方法

2.1 試料と試薬

キトサンは、脱アセチル化度 97% の片倉チッカリン(株)製のものをを用いた。リパーゼは *Candida cylindracea* 起源 (Sigma 社製) であり、比活性は 28U/mg であった。多孔性膜用添加剤として和光純薬工業(株)製のポリエチレングリコール (PEG) をを用いた。PEG は平均分

子量1000, 2000, 4000, 6000, 20000, 50000の6種のものを用いた。リパーゼ活性測定のための基質として、オリーブ油(和光純薬工業(株)製)を用いた。そのケン化価は176であった。

2.2 多孔性キトサン膜の調製

多孔性キトサン膜は、見矢らの方法⁸⁾を一部改良して調製された。すなわち、キトサン粉末0.2gを1.5%酢酸溶液10mlに加え、さらに、PEG 0.2gを添加し、かきまぜながら完全に溶解した。次に、1N NaOHを少しずつ加えてpHを6.0にしたのち、この溶液をアクリル板(4.4cm×9.3cm)上に流延し、50°Cで乾燥した。アクリル板とともに4%水酸化ナトリウム水溶液に浸漬し、アクリル板からキトサン膜を分離したのち、添加剤が完全に溶出するまで流水にて2日間透析を行った。最後に、蒸留水で十分洗浄し、リパーゼ固定化用キトサン膜とした。

2.3 キトサン膜へのリパーゼの固定化

2.2で得られた膨潤キトサン膜をリパーゼ6mgを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)19mlを入れたシャーレに浸漬し、これに、1%グルタルアルデヒド1mlを加え、時々かきまぜながら、2時間放置した。処理後、キトサン膜を蒸留水で十分洗浄し、室温にて風乾したのち、4°Cにて保存した。

2.4 リパーゼ活性の測定

1cm×1cm平方に細断したリパーゼキトサン膜(膜厚約70μm)を0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)6mlに2時間浸漬したのち、基質としてオリーブ油乳液4mlを加え、37°Cで24時間反応させた。反応後、3分間沸騰水中に浸すことによって反応を停止させた。なお、オリーブ油乳液はオリーブ油23gと1%ポリビニルアルコール溶液75mlとの混合物をホモジナイザーに入れ、5~10°Cに冷却しながら11000rpmで15分間乳化することによって調製した⁹⁾。反応液中に生成した遊離脂肪酸は、1/20N KOH溶液によるアルカリ滴定法によって定量した。活性単位は、1分間当たり1μmolの遊離脂肪酸を生成させる酵素量を1Uと定義した。

2.5 キトサン膜への酵素結合量

Lowryらの方法¹⁰⁾により固定化後の洗浄液中の未結合タンパク質量を求め、固定化されたタンパク質量は加えた酵素タンパク質量と未結合タンパク質量との差から求めた。

3. 結果と考察

3.1 キトサン膜へのリパーゼの固定化

キトサン膜に固定化されたリパーゼの加水分解活性を調べるため、種々の方法によってリパーゼキトサン膜を

調製し、その活性収率を求めた。活性収率は、固定化において加えたリパーゼ活性に対する固定化リパーゼの活性との比により求めた。表1に示すように、リパーゼ固

Table 1 Immobilization procedure of lipase on chitosan membrane

Immobilization method	Lipase activity (U)	Activity yield (%)
A	29	17
B	48	28
C	100	59

Lipases were immobilized on chitosan membranes obtained by drying a chitosan solution in an oven at 50°C on a plate (A), by drying a mixed solution of chitosan and PEG (1:1 in weight) in an oven at 50°C on a plate (B), and by drying a mixed solution of chitosan and PEG (1:1 in weight) with glutaraldehyde in an oven at 50°C on a plate (C). Lipase (168 U, 6 mg) was added to each membrane (A—C) and the mixture was kept at room temperature for 2 h. Immobilized enzyme activity was assayed on olive oil at 37°C in 0.1 M phosphate buffer at pH 7. Activity yield of immobilized lipase was expressed as the ratio of activity of immobilized enzyme to activity of enzyme added.

定化キトサン膜は、A法ではキトサン溶液をアクリル板上で乾燥して得たキトサン膜にリパーゼを固定化し、B法では、A法のキトサン溶液のかわりにキトサンとPEGとの混合溶液を、A法と同様に乾燥してキトサン膜を得、これにリパーゼを固定化して調製した。さらに、C法では、B法と同様に、キトサンとPEGとの混合溶液からキトサン膜を得、これにグルタルアルデヒドとともにリパーゼを包括架橋してリパーゼキトサン膜を調製した。この表からわかるように、活性収率はA法によって得られたキトサン膜に比べ、B法によるキトサン膜の方が高く、さらに、C法によるキトサン膜では、架橋処理したことによってもっとも高い59%の値となった。このことは、キトサンの細孔内に包括されたリパーゼがグルタルアルデヒドとの架橋によって強固にキトサン膜に結合したためと考えられる。

キトサンの膜組織を調べるために、製膜時にキトサン溶液にPEGを添加して得られるキトサン膜およびさらにこのキトサン膜をグルタルアルデヒドと処理したキトサン膜の電子顕微鏡観察を行った(図1および図2)。図1に示すように、キトサン膜は膜内部に数μmの細孔が多数観察され、また、膜表面にも多くの微小な孔組織が観察される微多孔質膜であった。このキトサン膜をグル

(A)

(B)

Fig. 1 Scanning electron micrograph of chitosan membrane. Chitosan membrane was prepared by drying the mixed solution of chitosan and PEG at 50°C on a plate. (A), surface of membrane; (B), cross section of membrane.

(A)

(B)

Fig. 2 Scanning electron micrograph of chitosan membrane crosslinked with glutaraldehyde. Chitosan membrane was prepared as shown in Fig. 1, followed by the treatment with glutaraldehyde. (A), surface of membrane; (B), cross section of membrane.

タルアルデヒドで架橋したキトサン膜 (図2) においても、細孔の大きさは図1で示したキトサン膜に比べ、やや小さいものの、膜表面ばかりでなく膜内部にも多くの細孔組織が観察された。したがって、これらの細孔が酵素反応における基質の膜内拡散に効果的に作用するものと考えられる。

3.2 リパーゼ活性に及ぼすキトサンの製膜条件の検討

添加剤として分子量2000のPEGを用い、キトサンに対するPEGの添加量を変化させて、種々のキトサン膜を調製した。これにリパーゼを固定化し、その固定化物のリパーゼ活性を調べた (図3)。図3からわかるように、PEGの添加量が増大するとともに活性も増加した。このことは、PEGの添加量の増加とともに膜中の細孔が増加し、膜内における基質あるいは生成物の膜透過性がよくなったためリパーゼ活性が増加したものと考え

えられる。しかし、PEG量をキトサン量の2倍としたとき、膜が脆くなったので、以下の実験ではキトサンとPEGの比率を1:1として膜を調製した。また、リパーゼの固定化において、グルタルアルデヒドの濃度が0.05%以上でも膜が脆くなったので、0.05%の濃度にて固定化した。

次に、リパーゼ活性に及ぼす製膜におけるPEGの分子量の影響を調べたのが図4である。PEGの分子量が比較的小さいうちは分子量の増加とともにリパーゼ活性は高くなり、PEGの分子量が20000のときもっとも高い値を示した。しかし、分子量50000のPEGを用いた場合には活性は低下した。したがって、以下の実験では分子量20000のPEGを用いた。

固定化リパーゼの活性に及ぼすキトサン膜の膜厚の影響を調べた結果が図5である。この図からわかるように、キトサン膜の膜厚が大きい程、活性は減少した。こ

Table 2 The effects of the amount of enzyme added on the immobilized lipase activity and on the amount of enzyme immobilized to chitosan membrane

Added enzyme (mg)	Added enzyme activity (U)	Immobilized enzyme activity (U)	Activity yield (%)	Amount of enzyme immobilized (mg)	Yield of immobilized enzyme (%)
3	84	43	51	2.3	76
6	168	108	64	3.7	62
12	336	125	37	7.0	58
60	1680	250	15	15.7	26

Lipase (84–1680 U) was added to porous chitosan membrane with 0.05% glutaraldehyde as described in experimental section (procedure C in Table 1) and the mixture was kept at room temperature for 2 h. The activity yield was expressed as the percentage of immobilized enzyme activity to activity of enzyme added. The yield of immobilized enzyme was expressed as the percentage of the amount of enzyme immobilized to the amount of enzyme added.

Fig. 3 Effect of amounts of PEG added to chitosan on the relative activity of lipase immobilized on chitosan membrane. Weight ratio is expressed as the ratio of amounts of PEG with a molecular weight of 20,000 added to chitosan. Immobilization was carried out by the procedure (C) as described in Table 1.

Fig. 4 Effect of molecular weights of PEG added to chitosan on the relative activity of immobilized enzyme. Amounts of PEG added was equi-weight to that of chitosan. Immobilization was carried out as described in Fig. 3 except for the change of molecular weights of PEG.

のことは、膜厚が大きい程基質あるいは生成物の膜透過性が悪くなり、反応速度が低くなるためと考えられる。膜厚が50 μ mのとき、もっとも高い活性を示したが、この場合、膜がうすく破断しやすかったため、以下の実験では、膜厚70 μ mのキトサン膜を用いた。

3.3 リパーゼ固定化キトサン膜の活性収率と酵素結合率

種々の濃度の酵素溶液を用いてキトサン膜にリパーゼを固定化し、得られた固定化リパーゼの活性収率および酵素結合量を調べた結果を表2にまとめた。酵素6mgをキトサン膜に固定化した場合、活性収率は64%となり、もっとも高い値を示したが、それ以上の酵素をキトサン膜に固定化すると、酵素の加える量の増加とともに活性収率は低下した。また、キトサン膜への酵素の結合

量を調べたところ、一定量のキトサン膜（乾燥重量0.2g）に対して加えた酵素量の増加とともに酵素結合率は減少した。キトサン膜に対して12mg以下の酵素を固定化した場合、酵素結合率は58–76%とかなり高い値を示した。このことから、酵素はキトサン膜の膜表面ばかりでなく、膜内の細孔中にも結合しているものと考えられる。以上の結果から、以後の実験では、キトサン膜に対する酵素添加量を6mgとした。

3.4 リパーゼ固定化キトサン膜の性質

遊離リパーゼおよびキトサン膜に固定化したリパーゼの酵素活性に及ぼすpHの影響を調べた。その結果を図6に示した。遊離リパーゼおよび固定化リパーゼのいずれもpHが7.0のときもっとも高い活性を示した。固定化リパーゼは、遊離リパーゼに比べ、pH7.0より酸性側およびアルカリ側のいずれも低い酵素活性を示し、pH-

Fig. 5 Effect of thickness of chitosan membrane on the relative activity of immobilized enzyme. Membrane thickness was measured at the dry state. Immobilization was carried out as described in Fig. 3.

Fig. 6 Effect of pH on lipase activity. Activity was assayed in 24 h at 37°C in 0.1 M phosphate buffer. (○), native enzyme; (●), immobilized enzyme.

活性曲線は幅の狭い形となった。同様な挙動パターンは、キチンに物理的に吸着させたアミラーゼ¹¹⁾や Sepharose に化学結合させたリパーゼ¹²⁾の場合にも報告されている。

次に、リパーゼ活性に及ぼす反応温度の影響を調べ、その結果を図7に示した。遊離リパーゼおよび固定化リパーゼのいずれも、反応温度が50°Cのとき、もっとも高い酵素活性を示した。しかし、50°Cより高温側において、固定化リパーゼは遊離リパーゼに比べ、高い活性を示した。このことは、固定化することによって高温側に対して熱安定性が増加したことを示している。

リパーゼ固定化キトサン膜のくり返し使用による活性の保持性を調べるために、くり返し回数に対するリパーゼ活性を求めた(図8)。図8からわかるように、4回のくり返しまでは活性が増加したが、それ以上くり返すと

Fig. 7 Effect of temperature on lipase activity. Activity was assayed in 1 h in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.0. (○), native enzyme; (●), immobilized enzyme.

Fig. 8 Effect of repeated assays on lipase activity of immobilized enzyme. The reaction conditions are described in the text. At the end of each reaction, the mixture was filtered off. The lipase activity of the immobilized enzyme was assayed by measuring the amount of free fatty acid in the filtrate and expressed as the percentage of the initial activity.

活性は一定となり、活性の低下は認められなかった。4回のくり返し反応におけるリパーゼ活性は、最初の活性の約1.8倍となった。このことは、おそらく、くり返し反応の増加とともに、キトサン膜の膨潤が進み、基質または生成物の膜透過がよくなり、酵素と基質との接触がおこりやすくなったためと考えられる。

4. 結 論

キトサン膜にリパーゼを固定化し、リパーゼ活性に及

ばすキトサンの製膜条件の影響, 固定化リパーゼの活性収率, キトサン膜への酵素結合量, および, 固定化リパーゼの性質について検討した。これらの実験結果から以下のような結論を得た。

(1)電子顕微鏡観察から, キトサン膜の内部および表面に無数の細孔が認められ, この細孔に酵素が包括架橋された。

(2)キトサン膜は多孔性にするにより, 基質または生成物の膜透過性が向上した。

(3)多孔性膜用添加剤として分子量20000のPEGをキトサンに対して等重量用いて得られるリパーゼキトサン膜は, 膜の脆化が認められず, 酵素活性の高いキトサン膜を与えた。

(4)固定化リパーゼの至適 pH および至適温度が遊離リパーゼのそれと同じであったことから, 固定化リパーゼは酵素反応における基質あるいは生成物の膜内拡散の影響が少ないことが推測された。

(5)キトサン膜の膨潤によって, 4回のくり返し使用まで固定化リパーゼの活性の増加が認められたため, キトサン膜は湿潤状態で保存することが望まれる。

これらの結論から, 多孔性キトサン膜は酵素固定化用機能性膜としてバイオセンサーやバイオリクターへの応用が期待される。

付記: キトサン試料を提供していただいた片倉チカリン株式会社に厚く感謝します。なお, この研究は, 平成元年度繊維学会第4回バイオテクノロジーに関するシンポジウムにおいて発表した。

文 献

- 1) 相沢益男, 「化学総説, 機能性有機薄膜」, 学会出版センター, 1984
- 2) A. I. Laskin, "Enzymes and Immobilized Cells in Biotechnology", Benjamin/Cummings Publishing Co., 1985
- 3) H. Kusaoke, K. Kasaba, and T. Sakurai, *Sen-i Gakkaishi*, **43**, 495 (1987)
- 4) H. Kusaoke, S. Iso, K. Hirose, T. Sakurai, and K. Kimura, *Sen-i Gakkaishi*, **43**, 608 (1987)
- 5) H. Kusaoke, T. Nihei, H. Kusano, and K. Kimura, *Sen-i Gakkaishi*, **44**, 28 (1988)
- 6) 草桶秀夫, 鈴木健郎, 木村一雄, 繊維学誌, **44**, 402 (1988)
- 7) 草桶秀夫, 出口光晴, 前川昌幸, 木村一雄, 繊維学誌, **46**, 69 (1990)
- 8) 見矢 勝, 岩本令吉, 吉川 進, 美馬精一, 高分子論文集, **39**, 649 (1982)
- 9) K. Yamada, Y. Ota, and H. Machida, *Bull. Agric. Chem. Soc.*, **36**, 860 (1962)
- 10) O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, and R. J. Ramdall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
- 11) S. Hayashida and P. Q. Tlor, *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1639 (1982)
- 12) A. Kilara and K. M. Shahani, *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1703 (1977)