〔綜 説〕

酵 素 - コ ラ ー ゲ ン 複 合 膜*

原 田 三 郎**

1. 固定化の方法
 2. 固定化酵素の担体
 3. 酵素-コラーゲン複合体の形成法
 4. 酵素-コラーゲン複合体の性質
 5. 固定化酵素の安定性
 6. 反応器形態
- おわりに

は じ め に

酵素は複雑な化学反応を容易に、しかも副反応を生ずることなく行なうことができる触媒で、反応条件が温和で、反応速度も大きいので生体系反応の主役を果たしているが、工業界でも反応の経済性を高めるために広く使用されている。酵素反応の最大の特徴として酵素が特異的に特定の物質のみに働くことが上げられる。このような利点がある反面、酵素が一般には生体細胞付近に存在するので、酵素の抽出・分離・精製には複雑な操作の組合せを行なわねばならないのみならず酵素活性がタンパク質の三次構造に由来するので温和な条件で操作することが必要となり、酵素自体は大変高価なものとなる。食品工業や医薬品工業では製品価格が高いものであれば、このような高価な酵素も使用できるが、一般には高純度の精製酵素を使用するよりも、精製度の低い、安い粗酵素が使用されている場合が多い。

高価な酵素でも再使用が可能になれば、その応用分野も拡大し、さらに現状の酵素反応プロセスの経済性も向上する。そのために固定化酵素や membrane enzyme reactor などが出現したが、特に固定化酵素は利点が多く、種々の担体に固定化する方法が開発され実用化も進んでいる。現在実用化されている固定化酵素では、粒状の担体に固定化した酵素をカラムに充填し、これに基質溶液を流し連続的に反応される方式が採用されているが、この場合充填層内での圧力損失が大きいことと、充填層の圧密化による反応効率低

下などの問題がある。これらの欠点を解決する方法として、コラーゲン膜に酵素を固定化する方法が開発された。しかもコラーゲンは固定化の担体として優れた性質を有しているので、実用面に使用されるのも近い。本文ではコラーゲンへの酵素固定化を中心に固定化酵素を紹介する。

1. 固定化の方法

酵素が触媒として働くためには、酵素分子内のいくつかのアミノ酸から構成されている活性部位の三次構造が重要な因子である。そのために固定化反応は温和な条件で行なうことが必要であり、高温処理、極端な酸・アルカリ処理、高い塩濃度の使用は避けなければならない。

酵素の固定化法は次の様に大別される。

- (1) 固体表面への吸着法
- (2) ゲル内への包括法
- (3) 二官能性試薬で架橋させる方法
- (4) 共有結合法

酵素の固定化は上記の一種の方法のみで行なわれるだけでなく、(1)と(3)及び(2)と(3)の組合せで行なわれることも多い。次に各々の固定化法を簡単に紹介する。

(1) 吸着法

温和な条件下で担体表面に酵素液を接触させるだけという最も簡単な操作で固定化できるが、担体と酵素との結合力は弱い。このために固定化酵素が基質あるいは電解質の濃厚溶液に接触すると酵素が脱離しやすい欠点がある。さらに担体と酵素との吸着が非特異的なものであれば、酵素の変性を招く恐れもある。従って担体の選択基準として、酵素との親和性が高く酵素の変性をできるだけ起こさせないものがよい。

インペルターゼ、L-アスパラギナーゼ、アミノアアシラーゼなどを固定化する担体としては、DEAE-セファデックス、DEAE-セルロース、カルボキシメチルセルロースなどが使用されている。

(2) 包括法

担体としての高分子ゲルは、包括された酵素に対しては物理的なバリアーとなるが、基質及び反応生産物

* Enzyme-Collagen Complex Membrane

** Saburo Harada: バイオエンジニアリング (株)
東京都墨田区緑1-4-17 (〒130)

は自由に拡散できることが必要である。酵素の包括は、担体のモノマーと酵素を含んだ水溶液を架橋剤の存在下で重合させる方法が一般に使われている。物理的な包括法は反応条件が非常に温和なために酵素の変性が少ないことと、種々な酵素に広く適用できる利点があるが、次の様な欠点がある。(a) 高分子ゲルには種々の孔径のものが分布しているので、これらの孔の中には酵素が透過するのに十分な大きさの孔径のものもあり、活性の損失が連続的に起こる。(b) 担体が基質及び反応生産物の拡散に対してもバリアーとなるので、反応速度が遅い。このことは特に基質が高分子物質であったり、反応生産物が高分子物質の場合には問題となる。

担体としては、ポリアクリルアミドと澱粉ゲルが主に使用されている。また包括法の変形としてマイクロカプセルがある。これは薄い半透膜（例えばナイロン膜、コロジオン膜）をマイクロカプセルの形にして、その内部にウレアーゼ、ウリカーゼ、カルボニックアンハイドラーゼなどの酵素を固定化したものがある。

(3) 分子間架橋法

グルタルアルデヒド、ビスジアゾベンジジン-2,2'-ジスルホン酸、トルエン-2-イソシアヌ酸塩-4-イソチオシアヌ酸塩、トリクロロ-S-トリアジンなどの二官能性試薬で担体と結合させるものである。

(4) 共有結合法

この方法が最も広く研究されているが、酵素活性部位構成に関与していない官能基を用いて担体と結合させる方法である。官能基としては、遊離のアミノ基、カルボキシル基、水酸基、フェノール基、イミダゾール基及びSH基が利用される。

共有結合反応は、次の3種類に大別される。

(a) ペプチド結合形成による方法

(b) アルキル化による方法

(c) ジアゾ結合による方法

ペプチド結合形成による方法は、BrCNのような試薬を用いてε-アミノ基あるいはN-末端アミノ基のいずれかと担体とを結合させるものである。担体のカルボキシル基の活性化は、カルボジイミド法あるいはwoodward's 試薬を用いる方法とか、アジドへの変換によって行なわれる。

アルキル化による方法は、担体の有するハロゲンのような官能基を利用して、遊離のアミノ基、フェノール基、SHをアルキル化するものである。ジアゾ結合による方法は、中間体として担体のポリジアゾニウム

塩を作り、これと酵素を反応させるものである。

表1 酵素固定化技術の比較

	吸着法	包括法	共有結合法	架橋法
1. 調 製	簡単	複雑	複雑	複雑
2. 結 合 力	弱	弱	強	強
3. 酵 素 活 性	低*	低	高	低
4. 担 体 の 再 生	可	不可	不可	不可
5. 固定化コスト	低	適切	高	適切
6. 他の酵素への一般融通性	可	可	不可	不可

* イオン交換樹脂（例えば DEAE-セロルース）へイオン結合させたような例では、高い酵素活性が報告されている。（例、田辺製薬のアミノアシラーゼ）

上記の方法の特徴を要約して示したのが表1であるが、どの方法が特に優れているとは言えない。また、これらの方法は実験室規模で行なわれていて工業的に実用化されているものは少なく、田辺製薬のアミノアシラーゼ、欧州及び米国でのペニシリンアミダーゼ、グルコースイソメラーゼが実用化されているだけで、多く吸着法で固定化されている⁸⁾。

固定化酵素の工業的規模での使用が普及するには、固定化の操作が簡単で安価なこと、その技術が種々の酵素を固定化する場合にも使用できるという一般融通性が高いこと、さらにスケールアップが容易に可能であることが必要である。そのために新しい固定化法が研究されているが、その一つに甜菜糖工業で使用されているラフィノース分解酵素のメリビアーゼを、その生産菌体自体のままペレット状にした固定化酵素も実用化されている⁹⁾。これはメリビアーゼやグルコースイソメラーゼのような菌体外酵素を対象とする場合には注目し値するが、一般融通性には限界がある。その点、コラーゲン膜に固定化する方法は融通性が高く、一種の固定化技術で20種以上もの酵素の固定化が満足に達成されている。さらに菌体外酵素を利用する場合には、菌体自体を固定化して経済性を高めることができるが、これにもコラーゲンは優れた担体である。また別の方法として、遷移金属塩のようなキレート剤を使用して固定化する方法や、リキッドメンブレン、ホローファイバーへの酵素固定化、さらに固定化操作を行なわなくても酵素の再利用及び反応生産物と基質・酵素との分離が可能な membrane enzyme reactor などが出現しているが、ここでは省略する。

2. 固定化酵素の担体

種々の有機、無機物質が担体として使用されている

が、酵素自体の性質を考慮して担体を選択することが重要である。固定化酵素を使用したプロセスの経済性を高めるには、結合容量の大きな担体を選択し、担体の酵素活性に及ぼす影響も考慮する必要がある。結合容量に及ぼす因子として、担体の有孔度、電荷分布、親水性と疎水性のバランスがあり、酵素活性に及ぼす因子としては、担体粒子の大きさ、形状、電荷、基質及び反応生産物に対する拡散抵抗がある。一般には、担体が親水性であることが酵素の固定化には望ましい。担体が親水性であれば担体に結合している酵素への基質の拡散が維持され、酵素の安定性も良くなるためである。担体の電荷分布はイオン結合で結合している場合は非常に重要で、さらに固定化酵素の性質にも影響し、特に最適 pH を変化させる場合が多い。

担体の形態には、粒子、薄片、膜、シート、粉末、繊維が考えられる。繊維は単位体積当りの表面積は大きい、切断されやすい欠点がある。粒子は充填層で使用できるが、このような反応器へ基質を流す場合、充填物の圧密化及びチャンネリングが起こらないようにすることが必要である。圧密化現象が生じると圧力損失が大きくなり必要流速の確保がむづかしくなり、チャンネリングが生ずると反応効率が低下する。充填層でのこれらの問題を解決するものとして、膜状の反応器モジュールが考案されている。膜状にするには担体物質から選択する必要があるが、膜に成形するのに適し、さらに多くの担体選択基準に合致するものにコラーゲンがある。

コラーゲンは 19 種の α -アミノ酸から構成されており、グリシン含量が 33%，残りの成分中の約 25% がプロリン及びヒドロキシプロリンである。基本分子は、それぞれ異種の 3 本のペプチド鎖から成るトリプルヘリックス構造を形成しており、このものの長さは、 $2800 \text{ \AA}$ 、直径 $14 \text{ \AA}$ で分子量は約 30 万である。このようなコラーゲン分子はトロポコラーゲンと呼ばれており、生理学的範囲の pH、温度、イオン強度で自然に凝集してマイクロフィブリルと呼ばれるものになる。これは直径が数百 $\text{\AA}$ もあり長さは数ミクロン以上である。各トロポコラーゲンの約 3/4 は隣りのものに重なり合っており、さらに全長の約 9% が次のトロポコラーゲンにオーバーラップしてマイクロフィブリルを形成している。このために、コラーゲンには一定の間隔で規則正しく軸方向に長さ $400 \text{ \AA}$ 、幅 $15 \text{ \AA}$ 程度の孔が配列され、これが連続的あるいは断続的なチャンネルを形成している。この模式図を図 1 に示した。

図 1 コラーゲンのマイクロ構造

図 2 アルカリ処理したコラーゲンの水吸収曲線

固定化酵素の担体としてコラーゲンが適しているのは、第 1 に、ヒドロキシアミノ酸が多いので親水性が高いことで、このことは図 2 に示されているように、中性 pH でも 100% 以上の水を吸収し、酸性・アルカリ性溶液中では 300% 以上もの高い膨潤度が得られていることから明らかである。第 2 は、チャンネルを形成している部分は官能基が遊離の状態であるために、酵素との結合容量が大きい。第 3 は、繊維状であるために膜に成形したものでは、機械的な強度が優れており、さらに安価に入手可能なことも有利な条件である。

3. 酵素-コラーゲン複合体の形成法

コラーゲンに酵素を固定化するには、次の 3 種類の方法が採用されており、その操作の概略を図 3 に示した。

- (1) 含浸法
- (2) 複合法

(3) 電気的共析出法

(1) 含浸法

含浸法とは、コラーゲン膜を酵素液に含浸して固定化するもので、先ずコラーゲン膜を作らねばならないがこれについては米国特許 2920000 に示されている。その方法では、水-メタノール（容積比1:1）の溶媒にコラーゲンを1%になるように分散させた後、Mylar フィルム上に Gardner ナイフでキャストして膜を作っている。キャストした膜は乾燥後に 55°C、相対湿度 90% の所に 48 時間保ってアニーリングを行なう。このように調製された膜を酵素の最適 pH の酸あるいはアルカリ溶液中で膨潤させた後、酵素水溶液へ浸漬して酵素を結合させる。コラーゲン膜へ酵素を浸透させる駆動力は図 4 に示すように、酵素液と膜間の酵素濃度差及び pH 勾配である。

(2) 複合法

複合法とは、コラーゲンと酵素の混合溶液から高分子複合体を形成する方法である。コラーゲンを水に

分散させた後、適当な pH に調整後酵素を混合し、膜へキャストする。キャストした膜を乾燥させ、この間にコラーゲンと酵素の複合化を促進させる。必要ならば膜をグルタルアルデヒドで架橋させ、膜強度を増すと同時に酵素との結合力を高める。

(3) 電気的共析出法

電気的共析出法は、電気泳動の原理を利用する方法で、タンパク質が両性の高分子電解質であるので、等電点でない pH では電位差があるとタンパク質が移動するという現象を利用したものである。適当な pH 条件下でコラーゲン分散液に酵素を加えると、コラーゲンと酵素の一部の荷電基が結合し高分子複合体を形成する。さらにこれに外部から電場をかけると、この複合体が移動して電極表面上に析出する。電極の表面積、共析出槽及び電場の強さを調整すると、種々の厚さの酵素-コラーゲン複合膜を作ることができる。また電極の形をらせん状にするなどで希望の形態の複合体を作ることできる。この方法は工業的に使用出来るよ

図 3 酵素-コラーゲン複合体の製造工程

図 4 コラーゲン膜内の濃度及び pH 分布

- 10 電気的共析出槽
- 12 電極（白金）
- 14 直流電源
- 16 電極となるドラム（ステンレススチール）
- 18 電導性のシャフト
- 20 電導性のフィン
- 22, 22' 電導性のベアリング
- 24, 24' 絶縁体
- 26, 26' シャフト支持柱
- 28 酵素とコラーゲンの分散液
- 30 酵素-コラーゲン共析出膜
- 32 サポート用フィルム
- 34 ドクターブレード
- 36 ニップロール

図 5 電気的共析出装置

うな多量の酵素-コラーゲン複合体を製作する場に過している。膜状の複合体を多量に製作するための装置の概略を図5に示した。この方法は、電気的共析出自体が複合体の部分的脱水の結果であるので、次の乾燥工程が短縮される利点も有る。

コラーゲンに酵素を固定化した場合、特に電気的共析出法で固定化した場合には、結果的に酵素がある程度精製される現象が生ずる。この現象は、純度の低い酵素や希薄な酵素液から固定化する場合に顕著である。このような精製が起こるのは、コラーゲンと酵素とのタンパク質-タンパク質の選択的な相互作用のためである。さらにタンパク質によってその等電点が異っているため pH で電気泳動の易動性が変化するので、電気的共析出法で適切な pH を採用すると、酵素タンパク質を選択的に電極上に析出させることが出来、精製が同時に達成される。

4. 酵素-コラーゲン複合体の性質

酵素-コラーゲン複合体の調製条件と、その反応器モジュールの性能を表2に示した。また、コラーゲンに固定化したウレアーゼ、インペルターゼ、リゾチム及びグルコースオキシダーゼの安定性と再使用可能

図6 酵素-コラーゲン複合体モジュールの安定性と再使用能

な活性能力を図6に示した。

それぞれの酵素-コラーゲン複合体の反応器は、結合している酵素の活性が安定した時点では、初期活性の約15%から30%の活性があり、さらに多量の液を流しても実際この安定状態での酵素活性を保持している。

反応器に液を流した初期に酵素活性が減少するのは、結合が緩い酵素が膜表面近くのサブレイヤーから離脱するためである。酵素-コラーゲン複合体を多量の液

表2 酵素-コラーゲン複合体モジュールと性能

酵 素	複合体形成法	反応器形態 (反応器容量)	安定状態で の酵素活性	置換液量 (液 量) (反応器容量)	精 製 率 (I.U./cc複合体) (I.U./cc酵素液)	基質溶液と 循環速度
リゾチム	含浸法 トリス緩衝液(pH9) で膨潤	キャピラリー状 コイル (150cc)	70 mg/lの基質が 1 ccの複合体で1 分間で溶解する	5,000	— (精製酵素を使 用したため)	300mg/lのM. lysodeikticus 液 200 ml/ (0.1Mリン酸 緩衝液pH7に 溶解)
インペルターゼ	含浸法 乳酸(pH3)で膨潤	キャピラリー状 コイル (40cc)	280 I.U./cc 複合体	12,500	— (精製酵素を使 用したため)	6%蔗糖液400 ml (250 ml/ 分)
ウレアーゼ	含浸法 トリス緩衝液(pH8) で膨潤	キャピラリー状 コイル (40cc)	250 I.U./cc 複合体	11,200	— (精製酵素を使 用したため)	0.1% 尿素液 200 ml (250 ml/分)
グルコース オキシダーゼ	電気的共析出法 (pH3)	らせん状 (270 cc)	450 I.U./cc 複合体	5,040	6.5	0.1%ブドウ糖 液 1.8 l (リン酸 緩衝液 pH 5.9 に溶解)
ペニシリン アミダーゼ	含浸法 トリス緩衝液(pH8) で膨潤 UF 処理した粗酵素	一定容量の反応 槽への膜の浸漬 (25 cc)	1 I.U./cc 複合体	—	10	10mg/mlのペ ニシリンペニシ ン液 2.5 ml/
グルコース イソメラーゼ	電気的共析出法 (pH4)	支持体つきコイ ル (60 cc)	13 I.U./cc 複合体	5,040	30	50%ブドウ糖 液 60 ml/ (60 ml/分)

で洗滌し、安定状態に達した時の酵素活性は、酵素がリゾチーム、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼの場合には、半年もの間酵素活性の減少がなかったと報告されている。ウレアーゼの場合、安定状態での酵素活性は複合体 1cc 当たりタイプ III ウレアーゼ 23.5mg から 47mg に相当する。つまり、ウレアーゼ-コラーゲン複合体が、タイプ III ウレアーゼを重量として約 2% から 5% 固定化していることを示している。

コラーゲンへの酵素の結合は共有結合ではなく、タンパク質間の相互利用によるものである。つまり、水素結合、塩結合、van der Waals 結合によるものである。酵素の結合機構がこのように考えられている理由は、前記三種の方法で調製した酵素-コラーゲン複合体が本質的に同じ酵素活性を有していることと、同じ反応動力学的挙動を示すためである。図 7 は含浸法及び電気的共析法で得たリゾチーム-コラーゲン複合膜の安定状態に達した時点での活性を、複合膜調製時の浸漬槽酵素濃度に対してプロットしたものである。

図 7 リゾチーム-コラーゲン複合体の吸収曲線

複合膜への酵素の収着曲線が、含浸法複合膜では槽酵素濃度が 15 mg/ml から 20 mg/ml で最大値に達しているのに対し、電気的共析法複合膜では槽酵素濃度 2.25 mg/ml で最大値に達している。この結果はいくつかの重要な意味を持っている。第 1 はコラーゲンマトリックス内の結合部位数には限界がある。第 2 は結合機構が共に同一である。第 3 は含浸法プロセスに先立って、リゾチームと分散コラーゲンフィブリルとの予備複合化あるいは短期間の電気的共析法を採用することで、固定化の操作が安定化する。第 4 は高い酵素濃度（例えば 30 mg/ml）での含浸法複合膜の安定状態での活性が減少するのは、このような高い酵素濃度では酵素分子の凝集が起るためと考えられることである。

有効結合部位の数を決定する因子の一つは、コラーゲンフィブリル内の「孔」の積み重ねで形成されているチャンネルの数である。他の重要な因子は、コラーゲンと酵素の分散液の pH である。すなわち、コラーゲンと酵素のタンパク質間の相互作用が直接あるいは間接にある特定の基のイオン化の状態、つまりその基の環境の pH に依存していることに起因している。このことは種々な pH 溶液でリゾチーム-コラーゲン複合膜を形成した実験で確認されている。図 8 から有効結合部位数が最大、つまり安定状態での活性が最大となる最適 pH は 8 から 8.5 にあることがわかる。コラーゲンの等電点が pH 6.6~6.8 であり、リゾチームの等電点が pH 10.5~11.0 であるので、この pH 8~8.5 は両タンパク質の荷電差が最大となる pH 値であることがわかる。

図 8 複合法での結合機構

5. 固定化酵素の安定性

固定化酵素を工業的規模で使用する場合に考慮せねばならない問題はその安定性である。一般には、固定化によって酵素の安定性は向上するが、その主な理由は、担体によって酵素タンパク質の立体構造が保護されるため変性し難くなるためであると考えられている。またタンパク質分解酵素の場合にも、担体に結合しているために自己分解が減少して安定性が増す。担体の化学的性質も酵素の安定性に影響を及ぼすことが考えられる。つまり担体中に疎水基が存在すると、一般の疎水性溶媒と同じように酵素タンパク質を変性させる可能性がある。担体と酵素間に静電的な相互作用が存在すると酵素の安定性は良くもなるが、これはその相互作用の性質に依存する。

固定化酵素の安定性を論ずるには、次の 3 つのタイプの安定性を考える必要がある。

- (1) 貯蔵安定性
- (2) 操作上の安定性
- (3) 温度及び pH に対する安定性

(1) 貯蔵安定性

貯蔵安定性は酵素の種類により、遊離酵素に比較して増加も減少もしていると報告されているが、一般には多くの固定化酵素が4°Cで貯蔵して数カ月活性の損失はほとんどない。Weetallは無機物担体に固定化した酵素の方が、有機物担体を用いたものよりも活性の保持が優れていると結論している。しかし、コラーゲンに複合法で固定化した酵素では、冷所に保存してときどき使用して1年以上も活性を保持していたと報告されている。貯蔵安定性を知ることは、交換用の予備反応器を準備するのに必要である。

(2) 操作上の安定性

操作上の安定性は、エンジニアリング上のパラメーターの中でも当面最も大切なものであるにもかかわらず研究は少ないが、数種の固定化酵素系での操作安定性を表3に示した。ここでは操作上の安定性を酵素活性の半減期、つまり酵素活性の50%が失活するまでに経過する時間で表わしてある。活性の損失は時間経過とともに指数的に増加するという仮定に基づいて、半減期を次式で計算して求めている。

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{K_D}$$

K_D は活性の減少定数であり、次式で計算される。

$$K_D = \frac{2.303}{t} \log \left(\frac{E_0}{E} \right)$$

E_0/E は t 時間後に残存している酵素活性の比率で

ある。経時的な活性の低下は、主に酵素タンパク質が変性し担体から酵素が脱着するためであるが、高分子基質がプロセスの対象となるときには、担体マトリックスからの酵素の緩やかな流出がしばしば起こる。基質と担体の一方あるいは両方が荷電した高分子電解質の場合には、この影響が著しくなる。酵素の脱着の程度が担体と酵素の結合力の強さに依存していると考えられるけれども、共有結合させた酵素の場合でも酵素の脱着は起こる。食品工業での固定化酵素の利用は、タンパク質や澱粉などの高分子基質の加水分解も対象となるので、この現象は重要な問題である。

固定化酵素の温度安定性は、固定化酵素によって大きな差があり一般性のあるパターンはない。この原因が担体の種類、固定化の方法あるいは酵素自体の性質のいずれにあるのかを判断するのは極めて困難で、固定化酵素の温度安定性が向上した例として、DEAE-セルロース-アミノアシラーゼ、ポリアクリルアミド-エノラーゼ、多孔性ガラスに共有結合させたパバイン及びトリプシン、セロファンシートに共有結合させたグルコースオキシダーゼ等の報告があり、また他の多くの報告例では温度安定性は減少している。特にコロジオン-アルカリフォスファターゼ、DEAE-セルロース-インペルターゼ、 p -アミノベンジルセルロース-パバインでは温度安定性が激減したと報告されている。

固定化酵素の pH 安定性は、担体表面の荷電状態に大きく依存している。ポリアニオンの担体を使用したものではアルカリ領域での安定性は良くなるし、ポリカチオンの担体を使用すると酸性領域での安定性が増加する。 p -アミノベンジルセルロースや、ロイシン-

表3 固定化酵素活性の操作安定性

固定化酵素システム	固定化法	操作温度(°C)	操作日数(日)	酵素活性の半減期(日)
多孔性ガラス(Zrコーティング)/グルコミラーゼ	共有結合	45	21	645
多孔性ガラス/グルコミラーゼ	共有結合	60	15	4.2
多孔性ガラス/インペルターゼ	共有結合	23	28	42.5
セルロース/インペルターゼ	共有結合	23	16	3.7
DEAE-セファデックス/アシラーゼ	イオン結合	50	35	65
アルカリガラス/カルボミル フォスフォキナーゼ	共有結合	40	14	55
DEAE-セルロース/グルコミラーゼ	イオン結合	45	25	61
多孔性ガラス/グルコースイソメラーゼ	共有結合	60	46	14.4
ポリアクリルアミド/グルコミラーゼ	包括法	50	9.5	29
DEAE-セルロース/ β -ガラクトシダーゼ	共有結合	45	30	10.4
DEAE-セルロース/アミログルコンダーゼ	共有結合	50	7	30
コラーゲン/ウレアーゼ	複合法	25	15	300
コラーゲン/インペルターゼ	複合法	30	15	200
コラーゲン/菌体(グルコースイソメラーゼ活性)	複合法	70	55	50

p-アミノフェニールアラニン共重合体のような電氣的に中性の担体に結合させたペパインでは、pH 安定性はネイティブな酵素と同じであったと報告されている。しかし一般には中性の担体に結合させた酵素でも、遊離の酵素の安定 pH からはずれた領域でも安定な場合が多い。

尿素のようなタンパク質変性剤に対する安定性は簡単な調査があるだけで、一般には変性剤に対する耐性は改善されない。

可溶性酵素と異なり、固定化酵素を使用する場合に安定した状態で効率良く操作するためには、上記の他にもいくつかの問題を考慮する必要がある。例えば、残留している結合剤がさらに化学反応して直接、間接

に酵素の側鎖をブロックする問題、担体構造の圧密化の問題、懸濁固形物で担体が塞がれる問題、そして最も重要な問題として微生物による担体の攻撃がある。微生物の問題以外は、適切な固定化技術を用い適切な操作条件下で使用することで大部分解決出来る。多孔性ガラスのような微生物の攻撃を受けない担体を用いても、固定化酵素の微生物に対する安定性を改善することは不可能である。その理由は、微生物が酵素自体も攻撃するためである。担体の構造内に酵素をうまく固定化しても、酵素の微生物による直接的な攻撃は減少するが、逆に基質と反応生成物の拡散にとっては大きな抵抗となるし、さらに微生物の増殖に伴い基質と反応生成物の通過部分が塞がれてしまう可能性がある

図 9 固定化酵素の反応器型式¹⁰⁾

ので、問題の解決にはならない。この問題を解決する最善の方法は、制菌剤を低濃度で連続的あるいは断続的に使用することである。

6. 反応器形態

固定化酵素を使用する場合の反応器としては、図9の様な形態のものが使用される。基質溶液を連続的に流通させる攪拌タンク式反応器(CSTR)では固定化酵素を反応槽内に保持する手段を施す必要があるが、このためには反応器出口にフィルターを取り付けたり、固定化酵素を分離するために沈降槽を設けたり、反応器とウルトラフィルトレーションを組合せて固定化酵素を分離回収して再使用する方法がある。

充填層反応器が一般には使用されているが、理想的なピストン流の条件下では、CSTR に比較して反応器内滞留時間が同じであれば酵素による基質変換率は高い値が得られる。充填層で使用する場合には、粒状、薄片状、ペレット状の担体に酵素を固定化したもの及びマイクロカプセルが使用されるが、これらの固定化酵素が比較の変形しやすいものであったり、凝集しやすいもの場合には、基質溶液を流すときの圧力損失が大きくなり工業操作に必要な流速を確保するのが不可能となる恐れがある。

流動層反応器は使用可能性が高いものであり、特に基質溶液中微粒子の懸濁物が含まれている場合にも使用できる。操作にあたっては、流動化に必要な流速を維持し基質の生産物への変換率を確保するために、大きな動力で液を循環させる必要がある。

酵素-コラーゲン複合体に対しては、らせん状モジュール(図9・e)やキャピラリー状コイルモジュール反応器(図9・f)が考案されている。特に前者のモジュール形成には電気的共析出法が用いられている。キャピラリー状コイルモジュールでは、コラーゲンが膜状であるために機械的強度が優れており、基質溶液の流れが多くキャピラリー部分に抵抗を等しくするように分離されるので、各エレメントでの膜との接触時間が等しくなり反応効率も良い。さらに流路が小容量であるために単位反応器容積当たりの膜面積が大きい。このタイプではモジュール製作時に VEXAR[®] のような膜状のメッシュスパーサーをコラーゲン膜の間に入

れると、製作が非常に簡単になるうに、各キャピラリー内での基質溶液の放射状の混合が良くなる。

お わ り に

固定化酵素は高価な酵素を再利用可能にするだけでなく、反応生産物と酵素の分離工程も省略できるなど経済性の高いプロセスである。従って固定化酵素の調製法を述べ、特に最近注目されているコラーゲンを担体とした固定化酵素の調製法とその性質を述べてみた。

固定化酵素は食品、医薬品工業の一部で実用化されている他に、分析化学分野での計測機器としての酵素電極やアフィニティークロマトグラフ、医療分野での人工腎臓などへの応用研究は着々と進んでいるが、酵素反応機構や反応動力学的な解析などの科学的、技術的基礎を固めることで、応用面の進展が期待される。それには、工学、化学、生物学など多くの分野の研究者が協力していくことが必要であろう。

本文をまとめるにあたり、Vieth 教授および鈴木周一教授の文献を主として参考とさせていただいた。

参 考 文 献

- 1) Vieth, W. R. and K. Venkatasubramanian: *CHEMTECH.*, **2**, 677 (1973)
- 2) Vieth, W. R. and K. Venkatasubramanian: *ibid.*, **3**, 47 (1974)
- 3) Vieth, W. R. and K. Venkatasubramanian: *ibid.*, **3**, 309 (1974)
- 4) Vieth, W. R. and K. Venkatasubramanian: *ibid.*, **3**, 434 (1974)
- 5) 鈴木周一: 化学の領域, **28**, 821 (1974)
- 6) Vieth, W. R., S. S. Wang, F. R. Bernath and A. O. Mogensen: *I Recent Developments in Separation Science* (ed. N. N. Li) p. 175, Chemical Rubber Co., (1972)
- 7) Saini, R. and W. R. Vieth: *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, **25**, 115 (1975)
- 8) 高崎洋三: 化学と工業, **28**, 892 (1975)
- 9) 上林 明: 化学工学, **40**, 133 (1976)
- 10) Pitcher, W. H. Jr., and N. B. Have wala: *Immobilized Enzymes, Antigens, Antibodies and Peptides* (ed. H. H. Weetall) p. 93, Marcell Dekker Inc. (1975)