アミノアシラーゼ多層架橋固定膜の バイオリアクターへの応用

中村昌則¹⁾・斎藤恭一¹⁾・杉田和之¹⁾・須郷高信²⁾

¹⁾ 千葉大学工学部物質理工学科 ☎ 263-8522 千葉市稲毛区弥生町 1-33

²⁾ 日本原子力研究所高崎研究所 ☎ 370-1292 高崎市綿貫町 1233

Application of Crosslinked-Aminoacylase-Multilayered Membranes to Bioreactor

Masanori Nakamura¹⁾, Kyoichi Saito¹⁾, Kazuyuki Sugita¹⁾
and Takanobu Sugo²⁾

¹⁾ Department of Materials Technology, Chiba University,
Inage, Chiba 263-8522, Japan

²⁾ Takasaki Radiation Chemistry Research Establishment, Japan Atomic
Energy Research Institute Takasaki, Gunma 370-1292, Japan

A diethylamino group as an anion-exchange group was introduced to the poly (glycidyl methacrylate) chain grafted onto a porous hollow-fiber membrane. Subsequently, aminoacylase was adsorbed in multilayers by the graft chains. The enzyme was crosslinked by a reaction with glutaraldehyde to prevent the leakage of the enzyme from the graft chain. Then, an acetyl-DL-methionine solution (pH 8.0) was permeated outward through the aminoacylase-immobilized porous hollow fiber at a permeation rate of 150 ml/h. At a lower feed concentration such as 10 mM, 100% conversion was attained. As the feed concentration was increased, the overall reaction was reaction-controlled. The productivity of L-methionine was maintained at 1,500 $\mu\text{mol/h/ml-fiber}$ up to space velocity of 150 h^{-1} , where space velocity is defined as effluent volume divided by membrane volume including the lumen.

Key words : aminoacylase/multilayering/crosslinking/porous hollow-fiber membrane/L-methionine

1. 緒 言

光学異性体は、立体構造のわずかな違いにより生理活性が大きく異なる例が数多く知られてい

る。そのため、医薬、食品分野では、これらの光学異性体を分離し、有効な一方の光学活性体を分取する技術の必要性が高まっている¹⁾。光学異性体の一方を選択的に加水分解する機能（不斉加水

分解能)を有する酵素アミノアシラーゼ²⁾を固定化したバイオリクターを用いて、医薬品、食品、飼料としての利用価値の高いL-アミノ酸を生成させる方法について、すでに数多くの研究が行われている。特に、アミノアシラーゼをイオン交換基を導入した多糖質である DEAE-Sephadex にイオン結合させたビーズ充填カラム法により、L-アミノ酸が工業的に生産されている³⁾。また、ポリ塩化ビニル製平膜に同酵素を物理吸着により固定化し、アミノ酸の光学分割に応用した研究も報告されている⁴⁾。

本研究では、中空糸状の多孔性精密ろ過膜にアミノアシラーゼを固定化し、L-アミノ酸を生成させる手法を提案する。本研究で作成する膜の構造および不斉酵素反応の概念図を Fig. 1 に示す。まず、放射線グラフト重合法により、精密ろ過膜の細孔表面にアニオン交換基を有するグラフト高分子鎖を膜厚方向に対して一様に導入する。次に、導入したグラフト高分子鎖にアミノアシラーゼを多層で吸着させる。この多層吸着は、アニオン交換基どうしの荷電反発によりグラフト高分子鎖が伸長し、そこにタンパク質が入り込むことによって起こることが示されている⁵⁾。さらに、膜に吸着したアミノアシラーゼ分子間を架橋剤グルタルアルデヒドで架橋する⁶⁾ ことにより、通液させる溶液の条件の変化による膜からのアミノアシラーゼの脱離を防いだ。

本研究の方法では従来の方法に対して、以下の利点が考えられる。(1)アミノアシラーゼを多層固定できるため、膜単位表面積当たりの固定量が多く、高い反応効率が期待できる。(2)膜厚が0.7 mmの多孔性精密ろ過膜(平均細孔径0.4 μm)を基材膜として用いるため、圧力損失が小さく、低い操作圧力で高い通液空間速度が得られる。および(3)柔軟なグラフト高分子鎖にアミノアシラーゼを多点で吸着し、さらに架橋剤で固定するため、高次構造を崩しにくく安定性の向上が期待できる。

本研究の目的は、上記の方法でアミノアシラーゼ固定膜を作成し、アセチル-DL-メチオニンの不斉加水分解性能を評価することである。

2. 実験

2.1 アニオン交換基を有する多孔性中空糸膜の作成

既報⁷⁾にしたがってアニオン交換多孔性中空糸膜を次のように作成した (Fig. 2)。グラフト重合用の基材膜として平均細孔径が0.4 μmのポリエチレン製の多孔性中空糸膜(外径3.1 mm, 内径1.8 mm, 空孔率70%, 旭化成工業(株)製)を用いた。基材膜に電子線を照射してラジカルを生成させた後、10 (v/v)% グリジジルメタクリレート (GMA)/メタノール溶液に313 Kで15 min 浸漬した。このようにして基材膜に対して重量が2倍のGMAグラフト重合膜を作成した。このGMAグラフト重合膜を50 (v/v)% ジエチルアミン (DEA) 水溶液に303 Kで4 h 浸漬後、エタノールアミン (EA) に303 Kで12 h 浸漬させてジエチルアミノ基と2-ヒドロキシエチルアミノ基を有する膜 (DEA-EA 膜) を作成した。ジエチルアミノ基と2-ヒドロキシエチルアミノ基の膜への導入量は滴定法で求めた。DEA-EA 膜の諸物性を Table 1 に示す。

2.2 膜へのアミノアシラーゼ吸着およびアミノアシラーゼ分子間のグルタルアルデヒド架橋

得られた DEA-EA 膜(有効長70 mm)に1.5 mg/mLのアミノアシラーゼ(ブタ腎臓由来, Sigma 社製)溶液を透過させ、膜にアミノアシラーゼをイオン交換吸着させた。実験装置を Fig. 3 に示す。アミノアシラーゼを14 mMのトリス塩酸緩衝液(pH 8.0)に溶かし、膜の内面から外面へ透過させた。膜からの流出液を連続的に採取して、280 nmの吸光度を測定することにより、流出液中のアミノアシラーゼ濃度を求めた。実験は室温(298 K)で行った。吸着量を以下の式から算出した。

$$\text{吸着量 [mg/g]} = \left\{ \left(\int_0^{V_e} (C_0 - C) dV \right) - (\text{洗浄操作での溶出量}) \right\} / W \quad (1)$$

ここで C_0 は吸着操作における供給液中のアミノアシラーゼ濃度、 C は流出液中のアミノアシラー

ゼ濃度, V は流出液量, V_0 は C が C_0 に達したときの流出液量であり, W は DEA-EA 膜の乾燥重量である.

続いてアミノアシラーゼ吸着膜を装置から取り外し, 0.05 wt% グルタルアルデヒド溶液 (pH 8.0) を 20 ml 入れた試験管内に 303 K で 12 h 浸漬させ, 膜に吸着したアミノアシラーゼ分子間を架橋した. 反応後, 膜を再び装置に組み込み, まず緩衝液で膜の細孔内に残存しているグルタルアルデヒドを洗浄した. 次に 0.5 M NaCl 溶液を通液させて, 架橋反応で固定化されずに膜に残存しているアミノアシラーゼを溶出させ, 280 nm の吸光度を測定することにより, アミノアシラーゼ溶出量を求めた. ここで, 未架橋のアミノアシラーゼ吸着膜に 0.5 M NaCl 溶液を通液させると, 吸着したアミノアシラーゼが 100% 溶出されることをあらかじめ確認した. 架橋反応後の膜へ

のアミノアシラーゼ固定量および架橋固定率を以下の式で算出した.

$$\text{架橋固定量 [mg/g]} = (\text{吸着量}) - (\text{NaCl 溶液による溶出量}) \quad (2)$$

$$\text{架橋固定率 [\%]} = 100 \times (\text{架橋固定量}) / (\text{吸着量}) \quad (3)$$

NaCl 溶液を通液させた後, 再び緩衝液を通液させて膜を洗浄し, 以下の酵素活性の測定を行った. 架橋反応後の膜を, 以後アミノアシラーゼ架橋固定膜と呼ぶ.

2.3 アミノアシラーゼ架橋固定膜の酵素活性の測定

アミノアシラーゼの基質としてアセチル-DL-メチオニン (Ac-DL-Met) を選び, 膜の加水分解活性を測定した. Ac-DL-Met の加水分解は, 次式で示される (ただし, $R = \text{CH}_3\text{S}(\text{CH}_2)_2$).

アミノアシラーゼ架橋固定膜 (有効長 5.5 cm) を 310 K の恒温室内の装置 (Fig. 3) に I 字型にセットし, シリンジポンプを用いて, Ac-DL-Met 溶液 (pH 8.0) を 10ml 透過させた. 流出液を採取し, その流出液中に生成した L-Met 濃度をニンヒドリン法⁸⁾で定量した. Ac-L-Met の L-Met への転化率を以下の式で算出した.

Fig. 1 Enzymatic hydrolysis of N-acyl-DL-amino acid using aminoacylase-multilayered porous hollow-fiber membrane.

Fig. 2 Preparation scheme of aminoacylase-multilayered porous hollow-fiber membrane.

Table 1 Properties of the DEA-EA fiber

size [mm]	
inner diameter	2.4
outer diameter	4.4
dry weight/wet volume [g/ml]	0.4
functional group density [mmol/g ^a]	
DEA group	2.0
EA group	1.2
permeation flux ^b [m/h] ($\Delta P=0.1$ MPa)	
Tris-HCl buffer (pH 8.0)	2.0
specific surface area ^c [m ² /g]	5.5

^aGrams of dry state of DEA-EA fiber^bStaring hollow fiber, 2.9 m/h^cBET surface area

Fig. 4 Breakthrough curve of aminoacylase through the DEA-EA fiber and elution curve of aminoacylase after cross-linking reaction.

Feed aminoacylase conc. ; $C_0=1.5$ mg/ml

solvent ; 14 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) Temperature ; 298 K

$$\text{転化率 [\%]} = 100 \times (\text{生成 L-Met 濃度}) / \{ (\text{供給 Ac-DL-Met 濃度}) / 2 \} \quad (5)$$

また Ac-DL-Met 加水分解活性を以下の式で算出した。

$$\text{Ac-DL-Met 加水分解活性} = \text{膜単位体積当たりの L-Met 生成速度} [\mu\text{mol/h/ml}] = (\text{L-Met 生成濃度} [\mu\text{mol/ml}]) \times (\text{流量} [\text{ml/h}]) / (\text{膜体積} [\text{ml}]) \quad (6)$$

Fig. 3 Experimental apparatus.

a) adsorption of aminoacylase during permeation through the DEA-EA fiber

b) enzymatic hydrolysis of Ac-DL-Met during permeation through the aminoacylase-immobilized fiber

また, Ac-DL-Met 溶液通液時の空間速度 (Space Velocity, SV) を次式より算出した。

$$\text{SV} [1/\text{h}] = (\text{流量} [\text{ml/h}]) / (\text{膜体積} [\text{ml}]) \quad (7)$$

ここで膜体積は, π (膜の外径)² (膜の長さ) / 4 とした。

3. 結果および考察

3.1 アミノアシラーゼ固定量の算出および流量特性

DEA-EA 膜にアミノアシラーゼ溶液を透過させたときの破過曲線と, 架橋反応後の溶出曲線を Fig. 4 に示す。破過曲線から吸着量を求めると, 108 mg/g-fiber (44 mg/ml) であった。また, グルタルアルデヒドを用いた架橋反応とそれに続く 0.5 M NaCl 溶液を用いた溶出後の膜へのアミノアシラーゼ固定量は, 81 mg/g-fiber (33 mg/ml) であった。したがって, 架橋固定率は 75% と算出された。

アミノアシラーゼの分子構造が球形であり, かつ分子量が同一の酵素であるカルボキシペプチダーゼ⁹⁾ と拡散定数が等しいと仮定して算出されるストークス半径から, アミノアシラーゼ 1 分子あたりの占有面積を求めると $7.4 \times 10^{-17} \text{ m}^2$ であった。また, 用いた DEA-EA 膜の比表面積は, BET 法で測定し, $5.5 \text{ m}^2/\text{g}$ であった。これ

Fig. 5 Conversion from Ac-L-Met into L-Met by an aminoacylase-immobilized fiber as a function of the space velocity.

らより、アミノアシラーゼが最密充填で膜の表面を覆ったと仮定したときの吸着量であるアミノアシラーゼの理論単層吸着量¹⁰⁾を求めると、11 mg/g-fiberであった。実験で得られた膜へのアミノアシラーゼの架橋固定量は、理論単層吸着量の7.4倍であり、アミノアシラーゼを約7層積層させて膜に架橋固定できた。

このアミノアシラーゼ架橋固定膜にリン酸緩衝液を透過させたときの通液空間速度は操作圧力に比例し、0.03 MPaの操作圧力下でのSVは150 h⁻¹に達した。既往のアミノアシラーゼを固定したビーズ充填カラム法では、SVは10~40 h⁻¹で操作されている^{11, 12)}。アミノアシラーゼ架橋固定膜は、低い操作圧力で高いSVが得られることが確認できた。

3.2 アミノアシラーゼ架橋固定膜のアセチル-DL-メチオニン加水分解活性

アミノアシラーゼ架橋固定膜にAc-DL-Met溶液を透過させたときの転化率のSVによる変化をFig. 5に示す。基質濃度が10 mMでは、SV=90

Fig. 6 Effect of substrate concentration and space velocity on the activity of immobilized aminoacylase.

h⁻¹まではSVに依存せず転化率は100%であった。しかしながら、どの基質濃度でもSVが高くなるにつれ転化率が低下した。この結果は、アミノアシラーゼをアミノ基を有するガラスビーズにグルタルアルデヒドによって共有結合で固定したビーズ充填カラム¹²⁾(アミノアシラーゼ固定量8~31 mg/mL-glass)での結果と同様であった(Fig. 5の波線部分)。これは、高SVでは基質の供給が過剰で、加水分解反応が十分に進行しないうちに基質が膜およびカラムを透過してしまうことを示している。同じ条件(Ac-DL-Met濃度200 mM)で、膜とガラスビーズカラムの転化率を比較すると、膜を用いる本研究の方法が約2倍高いことがわかった。

アミノアシラーゼの膜からの漏出の有無を調べるために、200 mM Ac-DL-Metを透過させたときの流出液を310 Kの恒温室内に24時間保存し、保存前後の液中のL-Met濃度を比較したが、L-Met濃度の増加はなかった。このことから、反応操作中にアミノアシラーゼの膜からの漏出はないことが確認できた。

また、実験後アミノアシラーゼ架橋固定膜を使用した緩衝液中に浸漬し、277 K の冷蔵庫内に保存することによって、膜作成後 10 日間にわたって再現性よく Ac-DL-Met を不斉加水分解できることが確認できた。

3.3 アセチル-DL-メチオニン加水分解活性のビーズ充填カラム法との比較

アミノアシラーゼ架橋固定膜および、アミノアシラーゼを固定したビーズ充填カラム^{1,2)}のそれぞれの Ac-DL-Met 加水分解活性の比較を Fig. 6 に示す。同じ条件 (Ac-DL-Met 濃度 100~200 mM, SV=10) で、膜とガラスビーズカラムの単位体積当たりの Ac-DL-Met 加水分解活性を比較すると、膜では 500~800 $\mu\text{mol/h/ml-fiber}$ であり、ガラスビーズカラムでは 192~780 $\mu\text{mol/h/ml-glass}$ であることから、Ac-DL-Met の加水分解性能は、ほぼ同等であることがわかった。しかしながら、多孔性膜は圧力損失が小さく、また転化率もビーズ充填カラム法に比べ高い点で有利である。

4. 結 言

多孔性中空糸膜の孔表面にアニオン交換基であるジエチルアミノ基を付与したグラフト高分子鎖を導入し、そのグラフト高分子鎖に酵素アミノアシラーゼを積層吸着させ、さらにグルタルアルデヒドで分子間を架橋したアミノアシラーゼ架橋固定膜を作成した。この膜で光学異性体アセチル-DL-メチオニンの不斉加水分解活性を評価した結果、次のことを明らかにした。

1) ジエチルアミノ基導入密度が 2.0 mmol/g-fiber の DEA-EA 膜へのアミノアシラーゼの架橋固定量は、81 mg/g-fiber に達した。

2) アミノアシラーゼ架橋固定膜で、Ac-DL-Met の加水分解が可能であった。しかしながら、通液空間速度が大きくなるにつれて生成する L-Met 濃度が低下した。

3) アミノアシラーゼ架橋固定膜の Ac-DL-Met 加水分解活性は、アミノアシラーゼ固定化ガラスビーズの活性の文献値と同等であった。

以上よりグラフト高分子鎖を導入した多孔性中空糸膜にアミノアシラーゼを固定した膜をバイオリアクターとして利用できることがわかった。この方法は従来のビーズ充填カラム法に比べ、低い操作圧力で高い空間速度が得られる点および転化率が高い点で有利である。

謝 辞

基材膜である多孔性中空糸膜は、旭化成工業株式会社機能膜技術開発部の渡辺幸平、久保田昇両氏から提供していただきました。また、本研究の一部は文部省科学研究費補助金 (No. 09450289) によりました。

文 献

- 1) 牧野成夫 : *PHARM TECH JAPAN*, **12**, 43 (1996)
 - 2) 丸尾文治, 田宮信雄監修 : 酵素ハンドブック, 朝倉書店, 586 (1982)
 - 3) 千畑一郎 : 固定化酵素, 講談社サイエンティフィク, 128-136 (1975)
 - 4) 東稔節治, 中村秀美 : 化学工学論文集, **14**, 347-353 (1989)
 - 5) S. Tsuneda, K. Saito, T. Sugo, K. Makuuchi : *Radiat. Phys. Chem.*, **46**, 239-245 (1995)
 - 6) 受田浩之 : 化学と生物, **35**, 496-504 (1997)
 - 7) S. Tsuneda, K. Saito, S. Furusaki, T. Sugo : *J. Chromatogr. A*, **689**, 211-218 (1995)
 - 8) K. Hirano, I. Karube, S. Suzuki : *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 311-321 (1977)
 - 9) 日本生化学会編 : 生化学データブック I, 東京化学同人, 102 (1979)
 - 10) S. Matoba, S. Tsuneda, K. Saito, T. Sugo : *Bio/Technology*, **13**, 795-797 (1995)
 - 11) T. Tosa, T. Mori, N. Fuse, I. Chibata : *Biotechnol. Bioeng.*, **9**, 603-615 (1967)
 - 12) Y. Yokote, M. Fujima, G. Shimura, S. Noguchi, K. Kimura, H. Samejima : *J. Solid-Phase Biochem.*, **1**, 1-13 (1976)
- (受付 1998 年 3 月 1 日 第二稿受付 9 月 4 日
掲載決定 10 月 7 日)