光架橋性樹脂プレポリマーによる生体触媒の 固定化とその利用

田 中 渥 夫

京都大学工学部工業化学教室 〒606 京都市左京区吉田本町
昭和58年8月20日 第36回膜研究会 学会会赤門分館にて講演

Application of Biocatalysts Entrapped with Photo-crosslinkable Resin Prepolymers

Atsuo Tanaka

Laboratory of Industrial Biochemistry, Department of Industrial Chemistry, Faculty of Engineering,
Kyoto University, Yoshida, Sakyo-ku, Kyoto 606

Of various immobilization methods developed hitherto, entrapment of biocatalysts in natural or synthetic polymer gels is the most promising because this method is applicable to immobilization not only of single enzymes but also of plural enzymes, cellular organelles, microbial cells, plant cells and animal cells. We have developed simple and convenient entrapment methods by using photo-crosslinkable resin prepolymers and urethane prepolymers of different chemical structures and physico-chemical properties. Gel-entrapped biocatalysts thus prepared have been successfully applied to the bioconversions of various compounds including lipophilic and water-insoluble compounds, and to the assays of different substances. Furthermore, entrapped living and growing microbial cells, which are used in multi-step and cooperative reactions, can be prepared by the prepolymer methods. Catalytic activities of the entrapped biocatalysts were proved to be affected by the physico-chemical properties of gels prepared from these prepolymers, such as net-work size, hydrophilicity-hydrophobicity balance and ionic nature. The prepolymer methods offer an easy selection of gel properties.

Key words: Photo-crosslinkable resin prepolymers, Urethane prepolymers, Entrapment of biocatalysts, Prepolymer methods, Bioconversion

ただ今ご紹介にあずかりました京都大学の田中でございます。私は鈴木先生にご紹介いただきましたように、応用微生物あるいは微生物生理といったことをやっておりまして、膜ということに関してはあまり知識もございません。従いまして、皆様のご参考になるかどうかわかりませんが、私共が応用微生物学あるいは応用生化学の一部門といたしまして、生体触媒の、生体触媒といえますのは、酵素や微生物菌体、あるいは細胞内オルガネラそれから動植物細胞、このような生化学反応を触媒するものを固定化するという分野で仕事をしております

ので、それをご紹介させていただきます。

皆様既にご存知だと思いますが、今申しましたような生体触媒を固定化して、バイオリクターなりバイオセンサー、あるいはその他いろいろな分野で使います場合には、いろいろな固定化法が使われます。代表的なものとしたしまして、不溶性の担体に共有結合であるとかイオン結合であるとか、あるいは疎水的な力で吸着させるとかいった担体結合法、それから酵素や微生物菌体などを、例えばグルタルアルデヒドのような二官能性あるい

は多官能性の試薬で架橋して、巨大分子化して不溶性にするといったいわゆる架橋法、それに、高分子のゲルの中あるいはマイクロカプセルの中、また、もう少しこの定義を拡張すると限外濾過膜の中に閉じ込めるとかあるいはホローファイバーの中に閉じ込めるといった方法で固定化する、いわゆる包括法、それから、それ等を組み合わせた方法といったふうに分類されるかと思います。このなかで、私共は特に高分子ゲルに包括する方法に興味を持って仕事を進めております。と申しますのは、この方法は同じ操作で酵素を、単一の酵素だけではなく複数の酵素も、あるいは微生物菌体、細胞内オルガネラ、そういったものを固定化することができる、非常に汎用性の大きな方法ということができるからです。

このような高分子ゲルの中に生体触媒を閉じ込めるための担体といたしましては、これはまた非常に沢山のものが知られております。その中でも比較的よく利用されているものとしたしましては、天然の高分子、例えばアルギン酸、カラギーナン、寒天といった多糖類、またタンパクも、例えば鈴木先生のところでよくお使いになっておられるコラーゲンですとか、あるいはアルブミンとグルタルアルデヒドを共存させて高分子化する、そういったものを用いて固定化することができます。ところが、こういう多糖類にしましても、タンパクにしましても、多くの場合親水性のものが使われております。したがって、これらの担体に固定化した生体触媒を使う反応というのは、水に溶解する、いわゆる親水性の化合物、

こういったものの変換反応に非常に都合がいいということがいえると思います。しかしながら、生体触媒の利用というのが段々と幅が広がってまいりますと、こういう親水性の担体だけでは不十分なのではないかということになってくるわけでございます。合成ポリマーを使う方法といたしまして、最も代表的なのはアクリルアミドのポリマーでございます。この場合、アクリルアミドに限らず、この類縁化合物あるいは誘導体、こういうものを使うことによってイオン性だとか疎水性、親水性だとかの違うものを調製することができるわけなのですけれども、こういうモノマーというのが場合によっては酵素を失活させるという現象がみられます。私共もこの方法をいくつかの生体触媒の固定化に使いましたけれども、モノマーと生体触媒を混合するだけで活性がなくなってしまう場合もあり、そういったことからもう少しマイルドな条件で、そういう失活が起こらない方法はないのだろうかと考えたわけでございます。

そこで私共は、モノマーが場合によっては酵素に対して失活作用をもつのであれば、最初の出発物質をもう少し大きな分子のものにしてやればどうだろうか、ということ、プレポリマーあるいはオリゴマーと呼ばれるものを基調にした素材を使って生体触媒を固定化することを試みたわけでございます。それで、今日の演題といたしまして、いわゆる光架橋性樹脂プレポリマーを使う方法というのをいただいたわけでございますが、私共はこのような光架橋性のプレポリマーと同時にウレタン

Fig. 1 Structures of typical photo-crosslinkable resin prepolymers. ENT, water-soluble; ENTp, water-insoluble.

樹脂のプレポリマーも使っております。したがって、研究をやっていくうえで両者を比較したり、あるいは同時に使ったり、そういうこともやっておりますので、ついでにこのウレタン樹脂を使いました方法についてもご紹介させていただきたいと思うわけでございます^{1,2)}。

今申しましたように従来のアクリルアミドを使いました方法というのは、モノマーからポリマーにもっていくその全過程に生体触媒を含んでいるわけでございまして、酵素とモノマーを混合した時点で既に酵素の失活が起こるといった場合には、この方法は非常に使いにくいものになってまいります。それに対して、プレポリマーを使う方法では、このプレポリマーを合成する段階には生体触媒は含まれず、したがって、過激な条件をとることができます。すなわち、プレポリマーを合成する時にいろいろな性質を付与することができ、その付与された性質は、非常に単純な条件下、非常にマイルドな条件下でポリマー化された時にも保持されている、そういっ

た特徴があるかと思います。

光架橋性のプレポリマーとして私共が主に使っておりますのは、ENT と略しているものと ENTP と略しているものでございます (Fig. 1)。ENT というプレポリマーは主鎖にポリエチレングリコールをもっており、親水性でございます。そしてイソホロンジイソシアナートとヒドロキシエチルアクリレート、こういったものを両側にくっつけているということでございます。で、この末端のダブルボンドが光感応基でございまして、適当な増感剤の存在下に光を当てますと重合し、ゲルを生成するというところでございます。また、主鎖にポリプロピレングリコールをもっております。ENTP は、水に溶けないプレポリマーで、これからリポマーを作りますと疎水性の性質を示します。それ以外にいろいろなタイプのもの、例えばイオン性を含めましていろいろなものをデザインすることができます。それからもう1つの特徴は、このポリエチレングリコールなりポリプロピレングリコールなりの鎖長を変えることことができるということでござ

Table 1 Properties of several photo-crosslinkable resin prepolymers

Prepolymer	Main chain	Mw of main chain	Property
PEGM-1000	Poly(ethylene glycol)	ca. 1,000	Hydrophilic
-2000		2,000	
-4000		4,000	
ENT-1000	Poly(ethylene glycol)	1,000	Hydrophilic
-2000		2,000	
-4000		4,000	
-6000		6,000	
ENTP-1000	Poly(propylene glycol)	1,000	Hydrophobic
-2000		2,000	
-3000		3,000	
-4000		4,000	
ENTB-1000	Polybutadiene	1,000	Hydrophobic
PB-200k	Polybutadiene	200,000	Hydrophobic
PBM-2000	Maleic polybutadiene	2,000	Hydrophobic
ENTE-1	[Poly(vinyl alcohol)]	—	Emulsion-type
ENTA-1	Trimellitic poly(propylene glycol)	2,200	Anionic

Prepolymer	$\bar{M}_w$ of polyol	NCO content (%)	Ethylene oxide content (%)
PU-3	2529	4.2	57
PU-6	2627	4.0	91
PU-9	2616	4.0	100

Fig. 2 General formula of water-miscible urethane prepolymers (PU).

います。この鎖長を変えるということは、できあがりとしたゲルの網目の構造をある程度は規制しようということを意味するかと思います。Table 1 は代表的な光架橋性樹脂プレポリマーの性質をまとめたものでございます。このように1000とか2000とか呼んでおりますのは、主鎖になる、例えばポリエチレングリコールの分子量が約1000あるいは2000のものを使っているという意味でございす。こういうふうに、親水性のもの、それから疎水性のもの、あるいはイオン性のものでとか、それから膨潤を非常にきらいような場合にはエマルジョン・タイプのものを使ったり、いろいろその用途、用途によってこういうものを使い分ける、ということをやっております。

こういうプレポリマーを使いました固定化法でございすが、例えば親水性の ENT を使いました場合には、プレポリマー 1g に増感剤といたしましてベンゾインエチルエーテルを1%加えまして、それに適当なバッファーに溶解しました酵素あるいは懸濁しました菌体を混合し、そして適当な厚さのフィルムを形成するようにしまして、300~400nm の近紫外線を3分間程度照射することにより固定化物が得られるということでございます。それから、疎水性のプレポリマーを使います場合には、その溶媒としまして、水の代わりに適当な溶剤を使うといったことで、同様に固定化することができます。通常、私共はだいたい厚さ 0.5mm 程度のフィルム状に作りまして、それを適当な大きさに切って反応に使っております。場合によっては 50 μ m 程度の薄いフィルム状にしま

して、酸素電極の先端にとりつけ、酵素センサーあるいは微生物菌体センサー、そういったものを構築することもございます。

それからもう1つのタイプのものとして、私共はウレタンのプレポリマーを使っております。これはポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールからなるポリエーテルジオールを主鎖にしまして、その両末端にトルエンジイソシアナートをくっつけた構造のものでございます (Fig. 2)。このイソシアナート基が水の存在下重合いたしましてゲル化する、その場合に生体触媒が共存すれば包括固定化ができるということでございます。この場合も主鎖のポリエーテルジオールの分子量を変えとか、あるいはポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールの割合を変える、例えばポリエチレングリコールの含量が91%とか100%のものですと親水性のゲルを、一方、57%のものですと疎水性のゲルを与えとか、そういったものを調製することができますので、いろんな反応に使い分けることができるわけでございます。この固定化法というのは、私は世界で1番簡単な方法だろうと思っているわけですが、菌体を適当なバッファーに懸濁する、あるいは酵素を溶解いたしまして、それをこのプレポリマーと混合すると、数分間でゲル化いたします。通常、更にゲル化を完了させるために冷蔵庫中に30分~1時間位放置いたしますが、非常に簡単な方法でございます。実際には、私共はビーカーの中でゲル化させますので、ブロックとして数ミリ角に切って反

Fig. 3 Hydroxylation of steroids by immobilized microbial cells in water-organic cosolvent systems.

Abbreviation used: 4-AD, 4-androstene-3, 17-dione.

応に使っておりますが、例えばこのゲル化し始める寸前にガラス板にはさみ込むとか、そういったことで非常に薄いフィルムを作ることも可能でございます。

こういうプレポリマー法の特徴を簡単にまとめますと、一つは固定化法が非常に簡単であるということです。それから、緩和な条件下で固定化ができるということでございます。したがって、かなり不安定な、例えば細胞内オルガネラであるとか植物細胞といったようなものもこういった方法で固定化できるのだということです。もちろん、全てのものがこれらの方法でうまくゆくとは言えないわけで、場合によっては、光を当てるだけで失活するものもございますし、ウレタン系のものではイソシアナート基がアミノ基などと比較的好く反応いたしますので、酵素によっては重要なアミノ基が反応して失活するということもございます。しかしながら、多くの場合、非常によい固定化法だと言えらると思います。二番目とし

まして、プレポリマーの鎖長を選ぶことによって高分子ゲルの格子の疎密というものをある程度規制することができるということです。もちろん非常にランダムな反応でございまして、必ずしも最初決めた長さどおりの格子ができるわけではございませんが、後で例を示しますように、ある程度規制というのは成功しているのではないかとこのように思うわけでございます。それから三番目といたしまして、プレポリマー合成の段階には生体触媒を含めない、それでその段階で、その主鎖なりそういうものにいろいろな性質の異なったものを取り込むことができるということでございます。したがって、プレポリマーの鎖長以外にも、疎水性、親水性の問題、あるいはイオン性の問題、こういったものを取り扱うことができるのだということです。四番目としまして、モノマーを含んでおりませんので、酵素を失活させることが比較的少ないということでございます。

それで最初の応用例といたしまして、ステロイドの水酸化反応 (Fig. 3) を取り上げまして、ここではプレポリマーの鎖長がどういふふうに影響するのかということをご紹介したいと思います。コルテクソロンの 11β -位に水酸基を入れる反応は *Curvularia lunata* という糸状菌によって触媒されますが、この反応は酸素の活性化だとか NADH か NADPH の再生系といったものを含みますので、酵素を取り出して再構成するのは非常に難しいという系でございます。したがって、微生物菌体、しかも生きている微生物菌体を使うのが最も都合がいいわけでございます。ところが、糸状菌というのはなかなかそのまま均一に固定化するのが難しく、ホモジネイトしたり、あるいは適当な方法で均一化して固定化しますと、たいていはそういう水酸化活性がなくなってしまう。私共は、光架橋性樹脂で孢子を固定化いたしました。この孢子をゲルの中で生育させると同時に酵素を誘導するといったことで、いわゆる固定化菌糸というものを調製いたしました。これを反応に使うといったことをやっているわけです^{3,4)}。その孢子を固定化する時に、親水性の光架橋性樹脂プレポリマー ENT の鎖長を変えてやった実験でございますが、プレポリマーの鎖長が短い時には菌糸の発達が非常に悪い、要するにゲルの格子が密であると、それをつき破って菌糸がなかなか生えてくれない。それに対して、プレポリマーの鎖長が長いものを使いますと菌糸が非常によく発達する、こういうふうにプレポリマーの鎖長というのは、菌糸が増殖して発達していくところで大きな意味をもっているということがわかったわけでございます。酵素活性の面からいきますと、当然菌糸の発達が悪いものでは非常に低い。ところが、菌糸が発達しすぎますと今度はゲルから漏れてまいりまして、やはり活性が低下いたします。この場合には、だいたい鎖長 40nm、すなわち我々が ENT-4000 と呼んでいるプレポリマーを使うのが最もよいということがわかったわけでございます。もちろん、菌の種類が変わりますと最適の鎖長というのは変わってまいります⁵⁾。

このようにして固定化、しかも増殖させた菌糸をコルテクソロンの水酸化反応に用いますと、固定化しない菌体とほとんど同じような活性を示します。こういう固定化物を繰り返し反応に使ってみた結果が Fig. 4 でございます。これは1回の反応が2日ですので、50回の反応というのは100日間同じ固定化物を使ったということでございます。この系の特徴というのは、反応をやっ

Fig. 4 Repeated use of *Curvularia lunata* mycelia in hydroxylation of cortisone^{3,4)}. Each reaction was carried out for 48 h. Arrows indicate the incubation of free or entrapped mycelia in a nutrient medium under various conditions. (○), ENT-4000-entrapped mycelia; (△), free mycelia.

ますと当然活性が下がってまいりますが、この時適当な栄養培地に酵素の誘導基質を入れて培養してやりますと、また活性が上がるということでございます。それに対して、遊離の菌糸の場合には活性の低下が激しい、すなわち、固定化することによって非常に安定化されるということでございます。

微生物がゲルの中で生育してゆくという時に、担体の格子構造の疎密というものが1つの大きなファクターになる、そういうものを変えることがこのプレポリマー法では可能なのだということを示した例でございます。

次の例といたしましては、担体の疎水性、親水性というものが生化学反応にどういふふうに影響するかということでございます。最近、水に溶けない化合物というのが生化学反応の対象として非常に興味もたれております。また、私自身工学部の工業化学におりますと、まわりで扱っている化合物の多くは水に溶けない化合物であり、したがって、そういうものを生化学的に変換してゆくということは、今後重要性を増すのではないかと考えております。ここではステロイドをモデルとして取り上げているわけでございますが、それはステロイドというのはいろいろなタイプの化合物が手に入りやすいことと、ステロイドの変換に関与します酵素というのは割合基質特異性が広いことと、そういったことが理由でございます。ここでは特にコレステロール、この17位に

Fig. 5 3β -Hydroxysteroid dehydrogenation by *Nocardia rhodocrous*.

大きなアリファティックな側鎖をもち、非常に疎水性の高い基質でございますが、それと17位にカルボニル基をもつデヒドロエピandroステロン、これはコレステロールに比べまして疎水性の低い化合物、こういうふうなものを代表として反応を行ってみました (Fig. 5).

この場合には *Nocardia rhodocrous* という細菌の凍結融解菌体を使いまして、これをいろいろなタイプのプレポリマーで固定化し、コレステロールとデヒドロエピandroステロンの変換を水を飽和した *n*-ヘプタンとベンゼンの1:1混合物という有機溶媒系で行わせると、非常に特徴的な結果が出てまいります。コレステロールを基質といたしますと、ENTPやPU-3のようないわゆる疎水性のプレポリマーで包括したものは高い活性を示します。それに対して、親水性のゲルを与えるプレポリマーで固定化したものでは、全く活性が出てこないという結果でございます。デヒドロエピandroステロンでは、親水性の担体で固定化した菌体もかなりの活性を示しますが、疎水性の担体で固定化したものの方がはるかに良い活性を示すということがわかったわけでございます⁶⁾。この現象をもう少し系統的にしらべたいということで、私共は疎水性のゲルを与えますPU-3というウレタンプレポリマーと、親水性のゲルを与えますPU-6というウレタンプレポリマー、これらをいろいろと量比を変えて混合して、そして担体の疎水性-親水性バランスを変えてやるということをやったわけでございます (Fig. 6)。そういたしますと、Bがデヒドロエピandroステロンの場合でございますが、PU-6が100%という最も親水性が高いゲルの場合でもかなりの活性がある、しかしゲルの疎水性を上げてゆくに従って活性は上がってくるということがわかりました。我々はこのよう

な現象に対して何かパラメーターを考えたいということで、最も単純なものとして分配係数、これはゲル中の基質の濃度と反応外液中での基質濃度の比でございますが、これを取り上げたわけです。この分配係数をみてみますと、疎水性のゲルでは大きくなる、すなわち基質がゲルの中に蓄積される傾向があるということです。それと同様な実験をコレステロールについてやりますと(A)、この場合はもっとはっきりしておりまして、親水性のゲルの中へは基質は入ってゆかず、したがって、当然活性は現われてまいりません。だんだんと担体の疎水性が増しますと、基質が取り込まれるようになり、そして変換活性が現われるということがわかったわけでございます。このように、ベンゼンとヘプタンの等容混合物のような非常に極性の低い溶媒の中で反応させる場合、担体の疎水性-親水性バランスというのは非常に重要な役割を示すのだということがいえるかと思ひます。

ところがこういう反応系で、今申しましたなかに、担体の疎水性-親水性のバランス、それから基質の疎水性の大きさというものがでてまいったわけですが、もう1つのファクターとして反応溶媒の極性というのが重要になってまいります。親水性のゲルに *N. rhodocrous* の菌体を固定化しましてコレステロールの変換反応を行った場合、先程のヘプタン50%、ベンゼン50%という溶媒系では活性はございません。このベンゼンをクロロホルムに置き換えてだんだんと極性を増してゆきますと、あるところから活性が出てまいります。それと同時に、分配係数も大きくなってまいります。このように、溶媒の極性を上げてやりますと、親水性のゲルで固定化した菌体も、コレステロールのような疎水性の大きな化合物の変換が

Fig. 6 Effect of gel hydrophobicity on steroid conversion activity of gel-entrapped *Nocardia rhodocrous* cells and on partition coefficient of substrate⁶⁾.

A, cholesterol; B, dehydroepiandrosterone. Reaction was carried out in water-saturated benzene-*n*-heptane (1: 1 by volume).

(○), Relative activity to that of the free cells; (Δ), partition coefficient.

できるということがわかったわけです。ところが、溶媒の極性が上がれば上がる程、菌体中の酵素は失活しやすくなり、こういう反応を組み立ててゆく場合に、基質が溶解する限りはできるだけ極性の低い溶媒を使った方が有利ということになるかと思えます。このような場合には、疎水性のゲルは親水性のゲルよりも優れているといえます。もちろん、溶媒の極性がだんだん上がってくるにつれて、担体としての性質はあまり重要でなくなってくる傾向がございます。また場合によっては、親水性の担体の方が優れた性質を示すこともあります。こういうふうはこの担体の親水性—疎水性のバランスを反応系に応じて適当に選ぶことができる、こういった意味からも我々の使っておりますプレポリマー法というのは面白い方法であると考えているわけでございます。

その他、例えばオリーブ油のようなオレイン酸を比較的にたくさん含んでいる油脂の1位と3位をステアリン酸のような飽和酸と交換して、融点のもう少し高い、食用として使えるようなカカオバター様油脂を作る、そういった反応にリパーゼを使うわけですが、この反応は、例えば *n*-ヘキサンの中でやることができます。そういうふ

うな反応系では、やはり疎水性の担体でリパーゼを固定化するということが非常に重要になってまいります⁷⁾。

それから、メントールエステルの立体選択的な加水分解でございますが、*dl*-メントールのコハク酸エステル、こういうものを加水分解して *l*-メントールを得るといったような反応、これは *n*-ヘプタンの中でやっておりますが、こういう反応の場合にもやはり疎水性の担体を使う方が有利であるということがわかってまいりました⁸⁾。

以上申しましたように、疎水性の担体というのは、こういう水に不溶性の、あるいは疎水性の高い化合物の変換に非常に有利であると、良い面を強調したわけでございますが、全ての反応にそういうことがいえるかというと、なかなかそうはうまくいかないという例もお示しいたします。

4-アンドロステロン-3, 17-ジオン (4-AD) というステロイドの 9 α -位に水酸基を導入し、9 α -ヒドロキシ-4-アンドロステン-3, 17-ジオン (9 α -OH-4-AD) に変換するという反応ですが、これは *Corynebacterium* sp. の生菌を用いて行います⁹⁾。この反応を水系でやりますと、担体の

Fig. 7 Possible structure of immobilized enzyme tube.

疎水性が高くなる程見かけの活性が減少してくるという現象が見られたわけでございます。この反応を、例えば15%のジメチルスルホキシド中でやりますと、そういう差はなくなってくるのですが、ともかく水系でやりますと、我々が予想したのとは逆の結果が出てまいりました。これはどういうことなのかということではいろいろ調べました結果、この4-ADという化合物は9 α -位に水酸化された後、この菌によって更に代謝されて、分解されてゆくことがわかりました。したがって、9 α -OH-4-ADの分配係数が大きい条件、すなわち疎水性のゲルで菌体を固定しておきますと、この化合物がゲル中に保持されたまま外に出てくることなく、代謝分解されてしまうということでございます。そのような場合には、担体の親水性-疎水性バランスや溶媒の極性を適当に変える、そういうことによって生成した水酸化物を次から次へとゲルから抽出してやる必要があるのだと、そのことをこの実験結果は示しているわけでございます。こういうふうに目的物が代謝中間体であるような場合、担体の方からもう一工夫必要なんではないかと私共は考えているわけでございます。

ここで少し話は変わりますが、このような光架橋性のプレポリマーを使う方法というのは、工業的な規模でもやれるのだということを少しお示ししたいと思います。

固定化酵母を使ってエタノールを生産するという国家プロジェクトがございまして、関西ペイントでは光架橋性樹脂プレポリマーを使いまして連続的に酵母菌体を固

定化し、その固定化物を適当な大きさのシートとして包装して取り出す、そのような装置を開発しております。そのシートを適当な大きさに切断し、枠の中に並べるわけですが、こういう1種のカートリッジのようなものを作りまして、これをリアクターの中に納めて、そして連続的にアルコール発酵をさせる、このシステムはパイロットプラントの規模で運転されております¹⁰⁾。このように光架橋性樹脂プレポリマーを使う方法は、私共は実験室で小さな規模でやっておりますが、かなり大きな規模でも固定化物の連続生産ができる、優れた方法であるといえるかと思ひます。

この光架橋性樹脂プレポリマー法はいろいろな使い方があるのですが、その1つとして分析への応用がございまして。内径2mm程度のガラスチューブの内壁に酵素あるいは微生物菌体とプレポリマーの混合物をコーティングしまして、光を当ててゲル化させるという方法で酵素チューブあるいは微生物菌体チューブを作製いたしました。これをオートアナライザーに組み込みまして、いくつかの分析系を組み立てたわけでございます。グルタミン酸デカルボキシラーゼを用いてL-グルタミン酸を測定した例では、前述のようにして作りました酵素チューブ (Fig. 7) は、標準溶液の測定に500回程度使いましても活性は低下しない、また、実際の発酵液に使いましても良好な結果が得られております¹¹⁾。このようなチューブの作成には膨潤のないエマルジョン型のプレポリマーが適していることがわかりました。

それからまた、酸素電極に厚さ50 μ m程度のフィルム

にした固定化酵素をくっつけて酵素センサーを構築することもできます¹²⁾。コリンオキシダーゼでコリンを測る場合、鎖長の違うプレポリマーを使いましたが、ENT-1000 で酵素を固定化したしますと、非常に応答が遅いことがわかりました。これは担体ゲルの網目が密だということが、結局基質の拡散というものに影響を与えているのだらうということでございます。それに対して、ENT-2000 とか ENT-4000 で固定化したしますと応答が速くなる、ところが鎖長が長すぎますと、今度は酵素が漏れ出すためにセンサーが不安定になる、という問題点があるわけで、そのようなことから、このシステムでは ENT-1000 と ENT-2000 の混合物が最適だという結論が得られたわけです。また、コリンはカチオニックな化合物でございますので、担体の方にイオンの性質を与えたらどのようになるのだらうかという興味がございます。実際、前述の中性プレポリマーにアニオニックなプレポリマーを混合して固定化したしますと、確かに応答速度が大きくなり、非常に都合がよいことがわかりました。一方、カチオニックなプレポリマーを混ぜますと応答が悪くなる、すなわち、基質が担体の中に取り込まれにくくなります。こういうふうに、光架橋性樹脂プレポリマーを使う時には、単に中性のものだけでなく、アニオン性、カチオン性のもの、こういうものを場合に依りて使いわけることでもできるということでございます。

次の例は私共の研究ではございませんが、京都大学工学部化学工学教室の佐田先生、加藤先生のグループがおやりになっているものでございます。私共の使っております光架橋性樹脂プレポリマー、特に疎水性のプレポリマーですけれども、これに更にいろんな化合物を組み込むことによって機能性をもたせる、そういうことをやっておられるわけです、例えば、アシル基としてパルミトイル基を2つ入れたホスファチジルコリンのようなリン脂質をこの疎水性プレポリマーと混合して膜を形成させる。そういたしますと、プレポリマーだけから膜を形成したものではありませんが、このようなリン脂質を組み込みますと 42°C で変化が起こる、すなわち結晶状態から液晶状態に変わります。ミリストイル基を2つ含んだホスファチジルコリンの場合ですと、転移温度が 23°C というふうに下がってまいります。

代表的な例といたしまして、サリチル酸とかピリドキシン、すなわちビタミン B₆、こういうものの膜透過性をしらべますと、サリチル酸の方の透過性が非常に高くなっている、また、23°C なり 42°C といった相転移のところで透過性の変化が起こるのだと、こういうようなことを報告しておられるわけです¹³⁾。私共といたしましては、このような系にさらに酵素を組み込むことによって、こういう透過性の変動というものと酵素反応の制御というものとをうまく組み合わせることができないだらうか、といふふうに考えているわけでございます。

したがって、今申しました光架橋性樹脂プレポリマーあるいはウレタンプレポリマー、こういったものをそのまま使う、あるいはいろいろと構造を変えたものを使うということ以外に、リン脂質をはじめいろいろな化合物と組み合わせて使うことによって、より機能性あるいは選択性をもたせた膜として生化学反応に使っていいのではないかと、またこれらのプレポリマーの使いみちも広がってくるのではないかと考えている次第でございます。どうも有難うございました。

文 献

- 1) 園元謙二, 田中渥夫: 醗酵工学, **61**, 153 (1983)
- 2) S. Fukui, A. Tanaka: *Adv. Biochem. Eng.*, **29**, 1 (1984)
- 3) K. Sonomoto, M. M. Hoq, A. Tanaka, S. Fukui: *J. Ferment. Technol.*, **59**, 465 (1981)
- 4) K. Sonomoto, M. M. Hoq, A. Tanaka, S. Fukui: *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 436 (1983)
- 5) K. Sonomoto, K. Nomura, A. Tanaka, S. Fukui: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **16**, 57 (1982)
- 6) T. Omata, T. Iida, A. Tanaka, S. Fukui: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **8**, 143 (1979)
- 7) K. Yokozeki, S. Yamanaka, K. Takinami, Y. Hirose, A. Tanaka, K. Sonomoto, S. Fukui: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **14**, 1 (1982)
- 8) T. Omata, N. Iwamoto, T. Kimura, A. Tanaka, S. Fukui: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **11**, 199 (1981)
- 9) K. Sonomoto, N. Usui, A. Tanaka, S. Fukui: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **17**, 203 (1981)
- 10) S. Nojima: *Chem. Econ. Eng. Rev.*, **15**(4), 17 (1983)
- 11) N. Itoh, N. Hagi, T. Iida, A. Tanaka, S. Fukui: *J. Appl. Biochem.*, **1**, 291 (1979)
- 12) S. Fukui, K. Sonomoto, N. Itoh, A. Tanaka: *Biochimie*, **62**, 381 (1980)
- 13) E. Sada, S. Kato, M. Terashima: *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 317 (1983)