含 酵 素 マ イ ク ロ カ プ セ ル

(昭和43年10月12日受理)

北島 昌夫・宮野 静夫・近藤 朝士^{*1}

カタラーゼ、ウレアーゼ、リパーゼ、ヘモリゼートなどの酵素水溶液を、ポリスチレン、シリコン誘導体、エチルセルローズなどの合成高分子よりなる、粒径数百ミクロンの半透膜球中に封入したマイクロカプセルをつくり、酵素活性その他の性質を調べた。操作中の酵素の失活をさけて、マイクロカプセル化は反応性試薬を全く用いない水中乾燥法によった。その結果、カタラーゼについては、カプセル化後も未処理の場合の約70%の活性が保持されていること、反応速度はほぼカプセル量に比例することなどが分った。ウレアーゼでは、サマー単位/gが 1.75×10^4 であった酵素を用いて 3.1×10^3 のものが得られた。リパーゼでは低分子量基質に対しては有効であったが、高級脂肪酸エステルに対しては分解活性を示さなかった。ヘモリゼートカプセルも過酸化水素分解活性を示し、酵素液としてそのまま利用し得ることが分った。これらは反応系からの回収が容易であって、くり返して反応に利用できる。

マイクロカプセル化酵素を用いた反応では、酵素反応そのものには何の変化もないが、膜の透過性および反応系において酵素が局在すること、などの効果が大いことが分った。

1 緒 言

酵素はきわめて温和な条件の下に複雑な反応を接触する生体触媒であって、一般に均一水溶液反応に用いられるが、反応終了後これを系外に取り除くことは容易でなく、特に酵素自身を変性させずに回収するには複雑な手段を必要とする。酵素のもつ基質特異性など優れた性質は保持させたままこれを水に不溶性にすると、反応系からの酵素の分離が容易になるばかりでなく、不溶化以前とは異なった利用法が考えられる。例えばカラムに充填して連続反応系として扱えること、あるいはその活性を保持したまま回収できるので繰り返し反応に利用できること、さらには適当な操作により保存中の安定性の増加や、基質特異性の制御なども期待される。

このような観点から酵素の不溶化については、多くの研究結果が報告されている。これまでに報告された不溶化の方法は、酵素をポリマーなど、水不溶性担体と化学結合によって結びつけるもの¹⁻³⁾、イオン交換樹脂などにイオン結合させるもの⁴⁻⁶⁾、活性炭などに吸着させるもの⁷⁾、水膨潤性のポリマー皮膜中に包埋するもの^{8,9)}などに分けることができる。これらの方法はそれぞれ特徴をもっているが、いずれの方法による場合も不溶化すべき酵素の至適活性水素イオン濃度や安定領域、さらには活性部位と非活性部位にある官能基の種類などを十分に確認した上で、それに合った条件を捜しださなければならない。一般に酵素は産生の条件

によっておのおのその性質が大きく異なる場合が多いので、最適条件を得るための労力は少なくない。また化学反応やイオン結合を利用するものでは、用いられる酵素は不純物の含まれない、十分精製したものである必要があるし、反応による酵素分子自身の変化が含まれるので、基質特異性や活性などの完全な保存はきわめて難しい。

著者らは酵素自身およびその反応する環境にはまったく手を加えずに、これを微小な半透膜球中に封じ込めること、すなわち酵素のマイクロカプセル化を行なった。ここでいうマイクロカプセル化酵素による反応は、図1のようなモデルにより理解される。

図1 マイクロカプセル化酵素による反応
E: 酵素 S: 基質 P: 生成物

まず酵素(E)をその活性を減ることなく疎水性の半透膜でつつみ込んだマイクロカプセルを得る。これを基質(S)水溶液中に浸漬すると基質が高分子物でない場合にはカプセル皮膜を透過してカプセル内に入り、酵素にて反応を接触される。反応生成物(P)は濃度勾配に従ってカプセル外に送り出される。一方、酵素自身は一般に分子量が大きいので、皮膜を透過できず常にカプセル内に止っている。

このような系ではカプセル皮膜の存在以外には天然の反応条件とまったく同じであり、酵素自身のもつ基質特異性、至適pHなどの性質には何の変化も含まれず、また反応自身は均一水溶液系で進行するので、これまでの不溶化法とは異なった特徴をもつ。

水溶液をマイクロカプセル化する方法としては、これまでにもいくつか知られているが¹⁰⁾、一般に反応性試薬を用いたり有機溶

10) 近藤朝士, 薬剤学, 21, 1 (1966).

*1 Masao KITAJIMA, Shizuo MIYANO, Asaji KONDO 富士写真フィルム株式会社中央研究所：埼玉県朝霞市溝沼。

- 1) G. Maneck, G. Günzel, *Makromol. Chem.*, 51, 199 (1962).
- 2) E. Riesel, E. Katchalski, *J. Biol. Chem.*, 239, 1521 (1964).
- 3) R. Axén, J. Porath, *Nature*, 210, 367 (1966).
- 4) M. A. Mitz, R. J. Schlueter, *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 4024 (1959).
- 5) Y. Levin, M. Pecht, L. Goldstein, E. Katchalski, *Biochemistry*, 3, 1905, 1913 (1964).
- 6) T. Tosa, T. Mori, N. Fuse, I. Chibata, *Enzymologia*, 31, 214, 225 (1966); 32, 153 (1967).
- 7) 宇佐美昭次, 武富 昇, 醗酵協, 23, 267 (1965).
- 8) A. D. McLaren, *Science*, 125, 697 (1957).
- 9) P. Bernfeld, J. Wan, *ibid*, 142, 678 (1963).

剤中に行なう場合が多い。一方、酵素は水溶液に溶解した状態でのみ活性を示し、熱、水素イオン濃度、塩類濃度、活性原子または基をもつ有機溶剤との共存などの条件に敏感であって、変性や凝集をおこし失活しやすいので、マイクロカプセル化の方法はよく吟味したものでなければならない。Chang らは^{11,12)}、ジアミンと酸塩化物とを用いた界面重合法や、コロジオンと安息香酸ブチルを用いた相分離法により、溶血液のマイクロカプセルを得ているが、界面重合法では変性の著しいことを報告している。また彼らは、カタラーゼおよびウレアーゼのコロジオンマイクロカプセルを得て、これを酵素欠損症へ応用することを検討している¹³⁾。

著者らは人工赤血球研究の第一段階として、低張液中でも溶血しない赤血球モデルとして、赤血球膜をとり除いた溶血液を、生体に不活性な合成高分子でマイクロカプセル化することを検討してきた¹⁴⁾。その結果、ポリスチレン、シリコン誘導体、デキストラン誘導体などを壁膜として、内蔵されたヘモグロビンについては酸素脱吸着能、解離平衡曲線、保存性などの性質に何ら変化を引き起こすことなくマイクロカプセル化し得ることを見出して報告した^{15,16)}。

この報告では、カタラーゼ、ウレアーゼ、リパーゼおよびヘモリゼートについてポリスチレン、シリコン誘導体、エチルセルローズによるマイクロカプセル化を行ない、その製造条件を検討した。さらに得られたマイクロカプセル化酵素を用いた反応について、マイクロカプセル化操作による酵素活性への影響、基質濃度あるいはカプセル量と反応速度の関係、カプセル皮膜の透過性、あるいは繰り返し使用した際の活性の変化などについて、検討した結果を報告する。

2 実験方法

2.1 マイクロカプセル化酵素の製法^{17,18)}

マイクロカプセル化は水中乾燥法によって行なった。すなわちポリスチレン、フェニルシロキサン、ラダーポリマーなどの5ないし10%ベンゼン溶液15部に適当な濃度の酵素水溶液3部を加え、ホモジナイザーで乳化し、数ミクロンの粒径をもつ[w/o]型の乳化液(第一次乳化液)をつくる。次にこの第一次乳化液を非イオン性界面活性剤、またはゼラチンなどを含む保護コロイド溶液100部の中に手早く乳化、分散して第二次乳化液を得る。この系では[w/o]がさらに水中に分散した[(w/o)/w]型の複合乳化液が形成されている。この状態でかきまぜを続けながら系の温度を35°Cないし40°Cに上昇し、数時間その温度に保って、粒径数十μから数百μのマイクロカプセルを得る。第二次乳化液中では、ポリマーを溶解しているベンゼンが徐々に水中に溶け込

み、さらにこのベンゼンが水性母液の表面から蒸発するというサイクルがくりかえされ、次第にポリマーが酵素水溶液滴の周囲に析出し、フィルムを形成するものと思われる。ベンゼンが完全に蒸発してから口過、沈降などの方法によりカプセルを捕集、蒸留水にてカプセル壁に付着している酵素をよく洗い落してからスラリー状にて回収し、湿潤または乾燥状態で冷蔵庫内に保存しておく。

2.2 試薬

マイクロカプセル化に使用した素材はデンカスチロール(電気化学製)、フェニルシロキサンのラダーポリマー(信越化学製)、エチルセルローズ T-100(ハーキュリーズ社製)であっていずれも市販品をそのまま用いた。ベンゼンおよびエーテルは和光純薬製、試薬特級を用いた。

また酵素はカタラーゼ I(シグマ化学製)、カタラーゼ II(ワシントン化学製)、ウレアーゼ I および II(和光純薬製)、リパーゼ(和光純薬製)の市販品を用いた。ヘモリゼートは、牛血液を用い、遠心器にて赤血球を捕集し数回生理食塩水で洗浄してから凍結、融解をくりかえして溶血し、これにエーテルを加えてふりまぜ後遠心分離してストロマを除去したものを用いた。このものは可視部の吸収スペクトルから酸素化型および還元型ともに正常であることをたしかめてから用いた。

2.3 酵素活性の測定

2.3.1 カタラーゼおよびヘモリゼート 500 ml のビーカー中に所定量の過酸化水素、pH 7.0 の 1/10 N リン酸緩衝液 25 ml を含む水 250 ml 中に、あらかじめ十分湿潤させたカタラーゼ(ヘモリゼート)マイクロカプセルの所定量を加えて電磁かきまぜ装置でかきまぜながら 20°C にて反応させる。反応の進行に従って反応液 1 ml を 180 メッシュのポリエステルロ布を通して採取し、残過酸化水素量をヨウ化カリウム-ハイポにて滴定した。滴定法は 50 ml のビーカーに 50% ヨウ化カリウム水溶液 1 ml をとり、これに 12 N 硫酸 2 ml を加えて 1 分後、採取量を正確に計った試料水溶液を加える。触媒として 10% モリブデン酸ナトリウム水溶液 2 滴を加えてから 5 分間放置した後、0.05 N または 0.005 N ハイポにて滴定した。

ロ布を通して標定液を採取することにより、カタラーゼ(ヘモリゼート)は完全に除去されるので、採取と同時に標定液中での反応は停止すること、また滴定による系の pH 変化に伴う凝集蛋白質によるにごりのない透明な状態で滴定できる、などの利点がある。なおすべての場合について、酵素カプセルは洗液が基質分解能を示さなくなるまで、繰り返し十分に洗浄してから測定に供した。

2.3.2 ウレアーゼ 基質として尿素を用い、系の pH が 6.7 から 7.7 に変化するに要する時間を測定し、これから Sumner Unit を算出した。すなわち試験管に 0.15 g の尿素を含む pH 6.7 のリン酸緩衝液 5 ml を取って、20°C の恒温槽中にセットしておき、これにウレアーゼカプセルを加え系の pH が 7.7 になるまでの時間を比色法により求めた¹⁹⁾。

2.3.3 リパーゼ 基質としてオリーブ油、Tween 20(アトラス社製ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート)およびトリアセチンを用い、反応の進行により遊離される脂肪酸のカルボキシル基濃度を 1/100 N カセイソーダにて滴定した。

19) 赤堀四郎編, “酵素研究法 Vol. 2”, 朝倉書店(1966)p. 230

- 11) T. M. S. Chang, F. C. McIntosh, S. G. Mason, *Can. J. Physiol. & Pharmacol.*, **44**, 115 (1966).
- 12) T. M. S. Chang, L. F. Johnson, O. J. Ransome, *ibid.*, **45**, 705 (1967).
- 13) T. M. S. Chang, M. J. Poznansky, *Nature*, **218**, 243 (1968).
- 14) 豊田忠之, 日本外科学会誌, **67**, 36 (1966).
- 15) 関口, 豊田, 堀, 木本, 近藤, 宮野, 北島, 日本輸血学会第 15 年会講演 (1967 年 3 月).
- 16) 関口, 豊田, 堀, 木本, 北島, 近藤, 日本輸血学会第 16 年会講演 (1968 年 4 月).
- 17) Gevaert, Fr. P., 1362933 (1964).
- 18) 富士フィルム, 日特公, 昭 42-13703.

3 結果および考察

3.1 マイクロカプセル化

水中乾燥法によりカタラーゼ、ヘモリゼート、ウレアーゼおよびリパーゼをマイクロカプセル化した結果を表1に示した。カプセルの大きさは第一次および第二次乳化のかきまぜ条件やポリマー溶液の粘度などにより調節できる。カプセル粒径が小さいほど基質溶液との接触面積

が増大し、またカプセル内での混合効果も上昇するので反応速度は大きくなることが期待されるが、ここでは回収操作や取り扱いに便利なることを考慮して粒径を100~500 μ の範囲になるように調節した。水中乾燥法ではカプセル化の操作中には化学反応は含まれず、器具への付着その他のロスを除けば、収率はほぼ100%となるが、カプセル化の過程は不安定な複合エマルジョン状態を経るため、操作中にこれがこわれて、母液中へ流出する酵素が多く、これが本法の最大の欠点になっている。このカプセル化効率は、用いる酵素液や皮膜ポリマーの種類、あるいは目的とする粒径範囲によっても異なるが、カプセル内酵素の比活性や吸光度からの推定ではおよそ30~60%である。

乾燥工程でのベンゼンの蒸発除去はスケールによっても異なるが、40 $^{\circ}$ Cで2~5時間かきまぜを続けることにより完了した。終点は母液の255m μ での紫外吸収スペクトルの測定により確認できる。ヘモリゼートを内蔵したポリスチレンマイクロカプセルおよびカタラーゼのシリコンカプセルの顕微鏡写真を図2に示す。得られたマイクロカプセルの形態は、丈夫な球であって、口過、秤量、分取などの操作によっては破壊されず、また乾燥して水分を完全に除去してしまっても球形を保っている。

図2 含酵素マイクロカプセルの顕微鏡写真(28倍)

上：ヘモリゼート内蔵ポリスチレンマイクロカプセル(水中に分散)
下：カタラーゼ内蔵シリコンマイクロカプセル(乾燥状態)

水中乾燥法は、1. 用いる試薬はすべて酵素に対して完全に不活性である。2. 操作過程には系のpHは変化せず、また塩類濃度などの影響を受けないので、酵素の性質に従って任意のpHの安定液中でカプセル化でき、酵素を失活させる因子をきわめて少

表1 水中乾燥法による酵素のマイクロカプセル化

Sample	Cat	Cap 1	Cat	Cap 2	UCap 1	UCap 2	UCap 3	LCap	HbCap
Enzyme	Catalase	I	Catalase	II	Urease	I	Urease	II	Lipase
Enzyme Wt (mg)	300		450		100	100	1000	250	4500 ^{a)}
Water (ml)	30		20		1.0	1.0	30	5	30
Wall Polymer ^{b)}	PS		Sil		PS	Sil	PS	EtCell	PS
Polymer Wt (g)	15		4.5		0.5	0.25	14.3	0.5	150
Benzene (ml)	150		100		5.0	5.0	135	30 ^{c)}	150
2% Gel (ml)	1200		1000		50	50	1200	100 ^{d)}	1200
Yield (Wetg) ^{e)}	24		16		0.94	0.53	19.5	3.5	140
Size ($\mu\phi$)	100~500		50~500		100~1000	50~500	50~500	50~500	50~500

a) 542m μ の吸収強度から算出したヘモグロビン量

b) PS: polystyrene, Sil: Silicone derivative, EtCell: Ethyl cellulose.

c) Ether 使用. d) 5% PVA 使用. e) ロ布にて回収、半乾燥状態での重量.

なくできる。3. カプセル化は水系で行なわれるので皮膜表面は有機溶媒による汚れがなく、回収後ただちに反応に使用できる。4. カプセル皮膜はきわめて丈夫であって乾燥操作やカラム充填に耐える。5. 膜質や膜厚を広い範囲にわたって変えうる、など他の方法に比べて有利な点が多い。

3.2 マイクロカプセル化酵素の活性

3.2.1 カタラーゼおよびヘモリゼート

(1) カプセル量と反応速度 含カタラーゼマイクロカプセル1 (Cat Cap 1) について、基質初濃度を一定にしカプセル量を種々にかえて測定した全反応速度曲線を図3に示した。カタラーゼによる過酸化水の分解反応は1次反応であることが知られている。したがって基質濃度を c 、反応時間を t とすれば、この反応は次式で示される。

$$dc/dt = -kc \quad (1)$$

ここで k は反応速度定数である。この式を解いて、基質の初濃度を a 、時間 t における分解量を x とすれば次式となる。

$$\log(a-x) = \log a - kt \quad (2)$$

したがってマイクロカプセル化カタラーゼを用いた反応が1次であるならば、 $\log(a-x)$ と t の関係をプロットすれば、その勾配から反応速度定数 k が求められる。

図3 マイクロカプセル化カタラーゼによる過酸化水素の分解 (Cat Cap 1)

H₂O₂ 215mmol/l, 湿潤 Cat Cap 1 重量 (g/l)
—○—: 3.3, —●—: 6.6, —△—: 13.2, —×—: 26.4, 20 $^{\circ}$ C, pH 7.0

図3に示した Cat Cap 1 について、この関係を示したのが図4である。反応の初期には測定技術、基質のカプセル内への拡散の影響などに基づくと思われるばらつきがあるが、その後はほぼ直

図4 反応速度定数 k の算出 (Cat Cap 1)

k (min^{-1}) —○—: 0.0013, —●—: 0.0048, —△—: 0.010, —x—: 0.020

図5 カプセル量と反応速度
 H_2O_2 : 215 mmol/l, 20°C, pH 7.0

図6 マイクロカプセル化カタラーゼによる過酸化水素の分解 (Cat Cap 2)

Dry Cat Cap 2: 2.44 g/l, 20°C, pH 7.0
 H_2O_2 (mmol/l) —○—: 460, —●—: 920, —x—: 1380, —△—: 2300

線となり Cat Cap による反応が (1) 式に従っていることがわかる。ここで得られた k から算出した反応初速度とカプセル量の関係を示したのが図5であるが、一般の酵素反応から期待されるように直線となり、反応速度がカプセル量に比例することがわかる。

(2) 基質濃度と反応速度 マイクロカプセル化カタラーゼ 2 (Cat Cap 2) とマイクロカプセル化ヘモリゼート (Hb Cap) について、過酸化水素の分解量と反応時間の関係を基質初濃度を種々にかえて測定した結果を図6, 7に示した。ヘモリゼートは、カタラーゼをはじめとして過酸化物分解能を有する鉄ポルフィリン酵素を含んでおり、粗酵素液とみなすことができる。図7にみられるように Cat Cap 2 に比べて低い値ではあるがかなりの過酸化水素分解能を示す。ヘモリゼートは最も容易にかつ豊富に得られる粗酵素液であるのでカタラーゼ活性を有するカプセル化酵素として広く利用し得ることがわかる。

Cat Cap 2 について (2) 式に従って $\log(a-x)-t$ をプロットしたものとその勾配より求めた k を図8に示した。図9は、ここに得た k と基質初濃度 (S_0) の積を反応初速度として、Line-

図7 マイクロカプセル化ヘモリゼートによる過酸化水素の分解

Wet Hb Cap: 6.6 g/l, 20°C, pH 7.0
 H_2O_2 (mmol/l) —○—: 9.3, —●—: 18.5, —△—: 31.5, —x—: 78.0

図8 反応速度定数 k の算出 (Cat Cap 2)

k (min^{-1}) —○—: 0.133, —●—: 0.115, —△—: 0.101, —x—: 0.051

図9 Lineweaver-Burk plot (Cat Cap 2)

 $K_M = 1.8 \text{ mol/l}$ $V_m = 0.28 \text{ mol/min}$

weaver-Burk plot を行なったものである。図からわかるように S_0 が 2300 mmol では大きくずれるが、それ以下ではよく直線になっている。これからミハエリスの定数 K_M は 1800 mmol/l、最大反応速度 V_m は 280 mmol/min と求められる。

Lineweaver-Burk の plot にのることから Cat Cap 2 では通常の酵素反応と同じ反応機構によって加水分解反応が進行していることが推定される。

(3) カプセル内酵素の活性の評価 水中乾燥法によって得られたマイクロカプセル化カタラーゼが、そのカプセル化の操作中にどの程度活性を減じているかを検討した。

まず未処理のカタラーゼ (Cat II)、カタラーゼカプセル (Cat Cap 2)、カプセル化に用いた反応母液、および Cat Cap 2 を乳ばちでよくすりつぶし、カプセル内酵素を抽出し均一化した溶液について、それぞれ 460 mmol/l の基質初濃度にて分解反応を測定し、これより反応速度定数 k を得た。カタラーゼの活性は一般に Katalasefähigkeit f (Kat. f) によって表わされる。これは反応速度定数 k と反応液 50 ml 中の乾燥物重量 W_0 (mg) とから次式によって与えられる。

$$\text{Kat. } f = k / W_0 \quad (3)$$

それぞれの実験条件における k 、 W_0 から単位重量当りの力価 Kat. f を求め、これと試料の全量からそれぞれについての全力価が得られる。表2にこれらの結果を示した。表からわかるように、未処理のカタラーゼで全力価が 72 であったのに対して、母液中に見出されたものは 24 であった。したがってカプセル内酵素の全力価は両者の差 48 と計算される。

表2 マイクロカプセル内カタラーゼの残存活性の評価

	k	W_0 (mg)	Kat. f (g^{-1})	全重量 (g)	全活性	比活性 (%)
Catalase II	0.085	0.54	160	0.45	72	—
反応母液	0.12	(0.4)	(160)	0.15	24	—
カプセル内 Catalase II ^{a)}	(0.085)	(0.54)	160	0.30	48	100
Cat Cap 2	0.13	122	1.1	4.95	5.4	11
Extract	0.16	24.4	6.6	(4.95)	33	69

a) カプセル化に使用した全量から、反応母液中へ流出した量 (Kat. f を 160 としてこれから算出) を差引いたもの。() 内は推定値。

これに対してカプセル化した Cat Cap 2 による測定では、全力価は 5.4 であって、計算値に対して 11% の活性しか示さない。しかしこの測定では酵素は不均一な分布をしており、カプセル皮膜の透過性や酵素の高濃度での局在などの影響が含まれている。すなわち第二次分散液中で形成された酵素滴は、カプセル化

が完了するまで希釈されることはないと考えられるので、カプセル内の酵素濃度は始めに用いられた酵素液と同じ約 10% であって、分解活性の測定条件下では、このきわめて高濃度の酵素液滴が基質溶液内に点在していることになる。したがって実際に反応が進行しているカプセル内では、かなり広い基質濃度範囲にわたって、基質に対して過剰の酵素量が存在しており、過酸化水素はカプセル皮膜を通過してただちに分解されてしまう。このためカプセルの内部に存在している酵素はほとんど反応に関与していない。一方、未処理の酵素を用いた場合には、酵素は均一に分布していて基質に対して十分効率よく接触するので、みかけの反応速度をとるとカプセル化酵素に比べて非常に高い値を示すと考えられる。

そこで、不均一な分散状態や皮膜の存在の影響を取り除き、カプセル内酵素自身の活性を測定したのが抽出液の場合である。抽出液では全力価は 33 となり、これは計算値の 48 に対しておよそ 70% となり、カプセル内の酵素自身はあまり失活していないことがわかる。

以上はごくおおざっぱな計算であるが、母液中にのがれ出た酵素量の算出は、未処理のカタラーゼと同じ活性を有しているものとした場合の値であるから、操作中の系外への損失や溶液状態で長時間保存したことによる自然に起こる失活などを考慮すると、水中乾燥法によるカプセル化の操作そのものに基づく失活はほとんどないといえる。

(4) 繰り返し使用と活性 マイクロカプセル化酵素の特徴の一つは酵素活性を損うことなく反応系からの回収が容易にできることにある。図10は、460 mmol/l の過酸化水素濃度中でその全量を分解させた後これを回収し、繰り返し使用して同じ反応条件にて活性を測定した際の全反応速度曲線である。反応終了後ろ布を用いてろ過し、十分に水洗してから湿潤状態にて冷蔵庫内に一夜保存し、前と同じ反応条件にてその全量を分解させた。図11は各回の反応における速度定数 k をもとめ、使用回数による k の変化を示したものである。図からみられるように5回目の使用に際しても始めの約 15% の活性をもつことがわかる。カタラーゼは基質との反応によりその活性が急激に低下することはよく知られているが、これを考慮すれば残存活性はかなり高いと言える。カプセル内の酵素濃度が高いので、希薄溶液での保存よりも酵素が安定化されており、これが失活の程度を小さくしているとも考

図10 マイクロカプセル化カタラーゼによる過酸化水素の分解 (Cat Cap 2)

Dry Cat Cap 2 : 2.44 g/l, H_2O_2 : 460 mmol/l, 20°C, pH 7.0
使用回数 (回) $\triangle$ —: 1, $\bullet$ —: 3, $\circ$ —: 5

図 11 使用回数と比活性 (Cat Cap 2)

えられる。

3.2.2 ウレアーゼ マイクロカプセル化ウレアーゼの活性は基質として尿素を用い系の pH 変化よりサマナー単位を算出しこれにより比較した。しかしウレアーゼ II の活性は著しく低く緩衝液を用いると、測定時間が長くなるだけでなく反応の終点が不明瞭となるので、緩衝液を用いない系で検量線をつくっておき、これから活性を算出した。図 12 は 20°C の恒温槽中に 0.15 g の尿素を溶解した pH 6.0 の水 5 ml を入れた試験管を浸漬し、ウレアーゼカプセルを加えた場合について系の pH 変化を測定した結果である。カプセル化ウレアーゼの活性は系の pH が 6.7 から 7.7 に上がるのに要した時間 t を求め、未処理カタラーゼについて得た検量線からカプセル化酵素の活性が未処理カタラーゼのどれだけに相当するかを求める。一方、未処理カタラーゼについて緩衝液を用いた標準法によりサマナー単位を求め、この関係を用いて酵素の活性を算出した。表 3 に U Cap 1, 2, 3 についてこれらの結果をまとめて示した。表からみられるように酵素活性のきわめて高い U II を用いた場合にはサマナー単位が未処理ウレアーゼで 1.75×10^4 、カプセル化した U Cap 3 で 3.1×10^3 であ

図 12 マイクロカプセル化ウレアーゼによる尿素の分解 (U Cap 1, 2)
 U Cap 1 (mg) —○—: 100, —△—: 300
 U Cap 2 (mg) —●—: 100, —×—: 550
 尿素: 150 mg, H₂O: 5 ml, 20°C

表 3 マイクロカプセル化ウレアーゼの活性の比較

試料番号	Sumner Unit/g	比活性 (%)
Urease I	23	100
U Cap 1	18	78
U Cap 2	20	87
Urease II	1.75×10^4	100
U Cap 3	3.1×10^3	18

ってその活性比は約 18% であるのに対し、粗酵素を用いた場合には未処理で 23 であるのに対し、U Cap 1 および 2 では 18 と 20 であってその活性比は 78%, 87% となりきわめて高い保存率であることがわかる。これは Cat Cap 1 にみられたように高活性の酵素をカプセル化した場合には、基質のカプセル内への拡散や、カプセル内での基質と酵素の比などの影響があって、見かけの反応速度は測定値がかなり低くでるのに対して、粗酵素ではこの影響が少なく見かけの残存活性比は大きくでるのではないかとと思われる。

3.2.3 リパーゼ リパーゼのエチルセルローズマイクロカプセル L Cap の活性を水溶性基質であるトリアセチンを用いて測定した結果を図 13 に示す。一方、L Cap について Tween 20 あるいはオリーブ油を基質とした場合には、分解反応はまったくみられなかった。Tween 20 は水に対する溶解度は十分大きいので、この両者の差は分子量 (分子の大きさ) の違いに基づくものと考えられる。すなわち L Cap のカプセル壁膜は、トリアセチン (分子量 218) は透過させるが、Tween 20 (分子量約 800) はほとんど通さない程度の透過性をもっているのではないかと。またもし水中乾燥法によって得られた含酵素マイクロカプセルの実際の形態が、さきにあげたモデルとは異なって、酵素がカプセル壁膜の一部を埋め込まれた形であったり、あるいは、反応操作中に破壊、ろうえいがあるとするならば、高分子量基質についてもいくらかの活性は示すはずであるので、リパーゼの実験結果から、さきのモデルがほぼ正しいことが結論される。

図 13 マイクロカプセル化リパーゼによるトリアセチンの分解
 Wet L Cap: 10 g/l, Triacetin: 44 mmol/l, 20°C, pH 7.0

4 結 言

マイクロカプセル化酵素は、これまでの不溶性酵素にはみられないいくつかの特徴をもっている。1. 酵素本来の性質には変化がない。すなわち単に加水分解酵素についてのみではなく、光学異性化、酸化還元、アミノ酸合成など酵素がもつ特徴を利用し得るところではあらゆる分野に使用できる。2. 半透膜を通しての反応であるため、基質や生成物の分子量の大きいもの、あるいは水への溶解性のきわめて低い基質に対しては利用できないという制限がある。しかしこれは利用法によっては、低分子量に対してのみ活性を示すという点で新たな特性とみることもできる。3. 取り扱いが容易である。容易に回収できるので、繰り返して反応に利用したり、カラムに充填して連続系に用いられる。4. 粗酵素をそのまま使える。酵素の種類によってカプセル化の方法を変

える必要がないので、2 種あるいはそれ以上の酵素を共存させて封入することにより、細胞内反応に類似の、複雑な多段階反応にも利用し得る。

今後、目的にあった透過性を有する皮膜の形成、あるいはより完全に効率のよいマイクロカプセル化の方法などが検討されれば

応用の範囲は広まり、その有用性はさらに高まるものと期待される。

(昭和 43 年 4 月、日本化学会第 21 年会一部発表)

本研究を支持し、発表を許可された当社副社長藤沢 信博士ならびに中央研究所長大庭成一博士に深謝する。

微生物反応における非定常プロセス

——アゾバクテリアによる RNA の生産とその二、三の実験的検討——

(昭和 43 年 10 月 22 日 受理)

遠 藤 勲・永 井 史 郎・合 葉 修 一^{*1}

環境変化に対する適応現象は一般に生物（微生物）の特性であるが著者らは空中窒素固定菌、*Azotobacter vinelandii* の連続反応装置を用い、増殖反応に関して定常状態を実現したあとの系の環境（ケモスタット）^{*2}、すなわち反応系を連続から回分へ切り換えかつ培地組成（グルコース濃度）を段階的に変動させた場合、必然的に生ずる菌の増殖に関する非定常状態を工業的に利用する可能性につき二、三の実験的な検討を行なった。ここにいう工業的利用とは便宜上、菌体内核酸物質 RNA を目的の生産とした場合である。なお、この非定常プロセスは希釈率（流入培養液の槽内平均滞留時間の逆数）の低いケモスタットから出発すると対糖収率は定常プロセスとくらべて著しく向上したが、希釈率の高い系から非定常プロセスに移行させた場合にはその対糖収率の上昇はさして顕著ではなかった。本報告は *Azotobacter vinelandii* による実験的検討にすぎず、かつこのような非定常プロセスを他の生産物および一般の工業微生物についても利用しうるか否かは必ずしも簡単に予測できない。しかしながら、ここで述べる実験的検討は少なくとも他の微生物への応用につき一つの可能性を示唆するものと考えられる。

1 緒 論

広く知られているように生物（微生物）の大きな特性の一つは環境変化に対する適応性である。しかしその調節機構についてはすでに分子レベルで数多く論じられており^{1,2)}、また制御工学の分野でも生体現象の解明という観点を包含して適応制御の問題が注目されつつある³⁾。

一方、種々の単位操作、例えば蒸留、抽出、晶析、反応などの単位操作で連続定常プロセスにくらべ、非定常プロセスは装置の安定性に関連した制御上の困難さがあるとはいえ、過渡特性を利用する点でその有用性が論じられている⁴⁾。またかきまぜ槽型等温反応器の設計で反応物質濃度（入力）を変動させ、振動反応をおこなわせた場合などに反応収率の増大が認められた例もある⁵⁾。

これらの例は、生物現象と一見して何の関連もない事例ではあるが、非定常プロセスの応用という意味からは、その内容は異なるものの結果的には同一の目的を目指しているともいえる。

一方、生物（微生物）を反応器の 1 種と考え生物をとりまく環境条件が変化した場合、生体内で何らかの振動反応がおこることも

一応は予期されるし、事実これに関する報告も見うけられる^{6,7)}。

ここでとりあつかう *Azotobacter vinelandii* については、その増殖につき連続定常状態に維持した反応系（ケモスタット）で制限基質としてえらんだグルコース濃度を急激に変動した場合の諸現象につきすでに報告した⁸⁾。すなわち、環境変動に対するこの菌の適応および増殖について、RNA をパラメーターとして、比増殖速度およびグルコースの比消費速度を表わし、かくして、マクロ的観点から *Azotobacter vinelandii* の適応制御過程の一部を考察した⁸⁾。

ここでは前報⁸⁾ でえられた結果を基盤として、RNA を目的の生産物とする非定常プロセスが工業的にどの程度有利であるか検討しようとする^{*3}。

2 実験方法

2.1 使用菌株

東大応微研保存 *Azotobacter vinelandii* IAM 1078 (ATCC 9046)。

2.2 培地組成

グルコース 5g, リン酸第 1 カリウム 0.8g, リン酸第 2 カリ

^{*1} Isao ENDO, Shiro NAGAI, Shuichi AIBA 東京大学応用微生物研究所 11 研究部：東京都文京区弥生。

^{*2} ケモスタット：連続培養（反応）に関する慣用語で、培養液の組成中例えばグルコース等の化学物質を制限因子にえらび、この濃度の変動が、菌の生理活性に支配的に影響を及ぼすように設定した系。

1) L. Szilard, *Proc. N. A. S.*, 46, 277 (1960).

2) D. E. Atkinson, *Science*, 150, 851 (1965).

3) F. S. Grodins, "Control theory and biological systems", Columbia Univ. Press. (1963).

4) V. N. Schrodtt, *I. & E. C.*, 59, 58 (1967).

5) J. M. Douglas, *C. E. S.*, 21, 305 (1966).

6) B. C. Goodwin, "Temporal organization in cells", Academic Press, New York (1963).

7) J. Higgins, *I. & E. C.*, 59, 19 (1967).

8) S. Nagai, Y. Nishizawa, I. Endo, S. Aiba, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 14, 721 (1968).

^{*3} この菌（バクテリア）は無窒素源培地で増殖する特殊な菌のごとく考えられるが、窒素源を培地に加えるなど他のバクテリアの培地と同様の組成を用いれば、一般のバクテリアと同程度の増殖がみられることを考慮し、その特異性をとくにここで強調する必要はない。