静電微粒化法による固定化酵素粒子作製とその評価

The Formation of an Immobilized Enzyme Particle by
Electrostatic Atomization and Its Performance

渡 辺 秀 夫*, 松 山 達*, 山 本 英 夫*

Hideo WATANABE*, Tatsushi MATSUYAMA*, Hideo YAMAMOTO*

If the size of an immobilized enzyme particle can be reduced using enzyme immobilization by the entrapment method, the effectiveness factor is expected to increase. In this work, the atomization of sodium alginate aqueous solution containing enzyme was performed by an electrostatic atomization method to produce a small immobilized enzyme particle of than 1 mm in diameter. The effectiveness factor of the immobilized enzyme prepared by this method qualitatively agreed with the theoretical value. However, if the diameter is less than 1 mm, the effectiveness factor was smaller than theoretical value. It was experimentally confirmed that there was no denaturation of the enzyme caused by the electrical field. Therefore, it is thought that leakage of the enzyme occurs during the immobilization process for the smaller particle diameter, making enzyme concentration in the particle low.

Key Words : Electrostatic Atomization, Immobilized Enzyme, Effectiveness Factor

1. 緒 言

酵素を工業的レベルで利用するためには、酵素の活性を安定化し、なおかつ反応後に回収して繰り返し利用することが必要である。酵素の固定化はこの要請を満たすために有効な方法であり、様々な固定化法・固定化酵素を用いたバイオリアクターが盛んに研究され、数多くの応用例が報告されている¹⁾。一般に、固定化酵素では一部の可溶性固定化酵素などを除いて、基質が担体内を拡散して移動するため、遊離酵素の場合に比して拡散抵抗の寄与が大きくなり、その反応は拡散律速になる。また、固定化担体内における基質の拡散と酵素反応に基づく基質の濃度分布が形成され、担体中心部では酵素反応速度が低下し、酵素が有効に利用できていないということが問題になる。こうした問題を改善するために拡散距離を小さくする（固定化酵素粒子のサイズを微小化する）ことが有効であることは容易に想像がつく。

ところで、液滴を微粒化する有力な方法に静電微粒化法がある。静電微粒化とは帯電液面や液滴に働く静電気力により、液体が分裂現象を起こし、多数の液滴微粒子や噴霧を発生する現象であり、インクジェットプリンターや静電塗装、静電農薬散布などの技術に応用されている²⁾。ただし、酵素固定化担体として良く用いられるアルギン酸ナトリウム水溶液のような高粘性液体についての静電微粒化については、さほど詳しい検討がなされていない。

そこで、本研究ではアルギン酸ナトリウム水溶液の静電微粒化について検討するとともに、これによって作成される固定化酵素粒子の特性評価を行った。

2. 静電微粒化の原理

静電微粒化に伴う液滴滴下モードの変化の様子を、模式的に Fig. 1 に示した。通常、このような毛細管からの滴下では、毛細管先端に形成される液滴に作用する重力が液滴表面の表面張力による作用より大きくなると滴下が起こる。(Fig.1-a)。電圧印加時には液滴表面が帯電し、それに伴う静電気力の効果が加わるので、液滴が小さい状態で滴下するようになる (b)。さらに高い電圧を印加していくと毛細管先端から液が円錐状に引き伸ばされ、その先端から微小な液滴が分

1997年3月4日受付
第34回粉体に関する討論会（1996年10月、高松）にて発表
*創価大学工学部生物工学科
〒192 東京都八王子市丹木町1-236) TEL 0426-91-9454
Dept. of Bioengineering, Fac. Eng., Soka Univ.
(1-236 Tangi-cho, Hachioji-shi, Tokyo 192)

Fig. 1 Schematic illustration of electrospaying

裂してくる (c)。この円錐状に伸ばされた部分は Taylor cone と呼ばれている。また、更に高い電圧を印加すると、先端からスプレー状の微小な液滴が発生することが知られている²⁾。

3. 実験方法

3. 1 アルギン酸ナトリウム水溶液の静電微粒化

本研究で用いた静電微粒化実験装置の概略図を Fig. 2 に示す。毛細管電極には、ガラス毛細管もしくはステンレス製の皮下注射針を加工したものを用いた。対向電極としては、銅線 (ϕ 0.8mm) を内径 7mm の円形に加工したリング電極を用い、毛細管電極がリング電極の中心軸上にくるように位置を調節した。リング電極の中心と毛細管電極の先端の間の距離を、ここでは便宜上電極間距離と呼ぶことにするが、これは本実験を通じて 2mm で固定した。

2wt % に調製したアルギン酸ナトリウム (関東化学, 鹿 1 級) の水溶液をマイクロチューブポンプによって送液し、毛細管から 0.5wt % CaCl_2 溶液へ滴下させた。この滴下時に、電極間に直流高圧電源を用いて 0~5kV の電圧を印加し液滴の微粒化を行った。生成した液滴は CaCl_2 溶液の Ca^{2+} と反応して容易にゲル化し、アルギン酸カルシウムビーズとなる。得られたビーズの粒径測定は、粒径が 1mm 以下のものについては顕微鏡観察によって測定し、それ以上の粒子についてはノギスで直接測定して、数十個の測定値の平均を求めてこれを粒径とした。なお、調製した 2wt % アルギン酸ナトリウム水溶液の粘度を回転型粘度計 (芝浦システム, ビスメトロン粘度計 VSA-1) を用いて実測したところ、温度 23℃ において $1.69\text{Pa} \cdot \text{s}$ であっ

Fig. 2 Schematic illustration of electrospaying apparatus

た。

3. 2 静電微粒化法による固定化酵素粒子の作製と酵素反応

固定化の対象酵素としてはショ糖の加水分解酵素であるインペルターゼを用いた。アルギン酸ナトリウム水溶液にこの酵素を 1mg/ml になるように加え、上述の静電微粒化法で酵素溶液の微粒化を行った。

得られた固定化酵素は一晩 4℃ で保管し、ゲルを安定化させた後、粒子間の液がなくなる程度まで吸引ろ過し、重量を測定してから反応実験に用いた。反応は回分反応で、基質として 50mmol/l ショ糖を用い、40℃, pH4.6, (0.32mol/l Acetate buffer) という条件で、50ml ビーカー中で攪拌しながら行った。インペルターゼはショ糖をグルコースとフラクトースに加水分解するので、反応の追跡は、生成されるグルコースの濃度をグルコース・オキシターゼを用いた方法により定量し、その経時変化を調べ、反応初速度を求めた。

3. 3 遊離酵素のミカエリス定数と基質のゲル内有効拡散係数の測定

遊離酵素に対するミカエリス-メンテン反応速度式の V_m , K_m は、pH4.6, 40℃ の条件で、基質濃度を 170mmol/l から 17mmol/l まで 5 点変化させて反応実験を行い、各基質濃度での反応速度から、Lineweaver-Burk plot を行うことにより求めた。

また、ゲル内の基質の拡散係数 D_{se} は非定常拡散流束法³⁾によって求めた。実験は直径数 mm のビーズを十分過剰量の基質溶液で平衡化し、平衡化ビーズを基質を含まない緩衝液に投入した時に、溶出してくる基質濃度の経時変化を調べるにより求めた。さらに、ビーズから基質が完全に溶出したときの溶出液の基質濃度を用いて、基質のゲルへの分配係数を求め

Fig. 3 Dependency of the diameter of calcium alginate beads on the applied voltage for electrospaying

Fig. 4 Relation between the volume flow and the diameter of calcium alginate beads

た。

4. 結果及び考察

4.1 アルギン酸ナトリウム水溶液の静電微粒化

静電微粒化によって得られたアルギン酸ビーズは、何れの実験条件に於いても、粒径の良く揃った単分散粒子で、相対標準偏差は4~10%程度であった。**Fig. 3**は印加電圧と得られたビーズの粒径の関係を示したものである。毛細管電極として外径0.07mmのガラス毛細管を用い、アルギン酸ナトリウム水溶液の送液流量を0.18ml/minとしたこの実験では、自然滴下時に形成されるビーズ径が1.5mmであったのに対して、印加電圧を増加させるにつれて得られるビーズ径は減少していった。目視観察によるとTaylor coneが形成される電圧（これを以下臨界電圧 V_c と称す）は、この場合2.5kVであった。 V_c 以上の電圧を印加すると急激に微粒化が進行し、0.2mm程度のアルギン酸ビーズが得られた。 V_c 以上の印加電圧では、印加電圧の変化に対して粒径はあまり大きくは変化しなかった。

次に、印加電圧を5kVとして、アルギン酸ナトリウム水溶液の滴下流量を変化させた場合の粒径の変化を**Fig. 4**に示した。ここでは、流量調節の都合上、毛細管電極として外径0.4mmと0.5mmのステンレス製注射針を加工したものをを用いた。液供給流量の減少に伴って、得られるアルギン酸ビーズ径は減少し、流量条件の設定によって、0.2~0.6mmの範囲で粒径を制御したビーズが得られることが解った。

これらの結果から、アルギン酸ナトリウムのような

高粘性液体でも静電微粒化法により、微粒化が可能であることが示された。

4.2 静電微粒化法によって作製された固定化酵素粒子の特性評価

固定化酵素の能力は（触媒）有効係数 $\eta = V_{SR}/V_{SR}$ で評価される。 V_{SR} は固定化酵素担体内の反応速度であり反応器内で実際に観測される反応速度を ν_s とすると、

$$V_{SR} = \frac{V}{(w/\rho)} \nu_s \quad (1)$$

で計算される。ここで V は反応器容積、 w は固定化酵素の質量、 ρ は固定化酵素の密度である。 V_{SR} は担体内に基質濃度分布がないと仮定し、単体内表面の基質濃度（ C_{SR} ）で反応が進行するとした場合の仮想的な反応速度であり、ミカエリス-メンテンの反応速度式

$$V_{SR} = \frac{V_m C_{SR}}{K_m + C_{SR}} \quad (2)$$

により与えられる。本研究では、酵素反応の速度パラメータである V_m 、 K_m を遊離酵素を用いた反応実験によって求めた。この結果、pH4.6、40℃の条件で、酵素濃度1mg/mlに対して、 $K_m = 47\text{mmol/l}$ 、 $V_m = 0.89\text{mol/(l}\cdot\text{min)}$ であった。

また、担体内表面の基質濃度 C_{SR} は、 C_s を反応溶液の基質濃度として、担体表面の分配係数 $K = C_{SR}/C_s$ を求めることにより得られる。実測の結果、分配係数は $K = 0.93$ であった。

一方、有効係数は理論的には C_{SR}/K_m を一定にする

Fig. 5 Relation of effectiveness factor and beads diameter

と、次に示すシーレモジュラス ϕ_m ,

$$\phi_m = R \sqrt{\frac{V_m}{K_m D_{sc}}} \quad (3)$$

のみの単調減少関数になることが知られている³⁾。

式中の D_{sc} は基質の担体内有効拡散係数であり、 R は固定化酵素粒子の半径である。この D_{sc} を実測することで、上述のパラメータから有効係数の理論値を求め実測値と比較した。実測の結果、本実験では基質のゲル内有効拡散係数 D_{sc} は、40℃、pH4.6の条件で、 $D_{sc} = 4.8 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ であった。本実験では R 以外を一定にして実験を行ったので固定化酵素の粒径を小さくすると、有効係数は大きくなると期待される。

Fig. 5に、反応実験から求めた反応速度から算出した有効係数と、粒径との関係を示した。図中の実線はシーレモジュラス ϕ_m から求めた理論値を、粒子径の関数として計算し直して表示したものである。

この結果より粒径1.0mmまでは有効係数の増加が見られ、その傾向は理論値と良く一致した。これに対して、Taylor coneが形成されるような条件で作製した0.5mmと0.2mmのものでは、理論線から期待されるような有効係数の増加が見られず、むしろわずかに減少した。この原因としては、電界の影響による酵素の失活か、或いは、固定化時に於ける酵素の漏出に起因する酵素固定化量の減少が考えられる。そこで遊離酵素溶液をそのまま直接静電微粒化処理（固定化酵素微粒化実験と同じようにTaylor coneが形成される条件で滴下する）した後、酵素活性を調べたが、活性に

は変化が見られなかった。従って電界の影響による酵素の失活を生じていないものと考えられた。次に、固定化操作時の上澄みを採用して調べてみたところ、酵素活性の存在が認められ、固定化時に酵素の漏洩があったことが定性的に確認されたが、これを定量的に把握するまでには至らなかった。何れにせよこれらの結果から、粒子がある程度より小さくなると、アルギン酸のゲル化中に、酵素の CaCl_2 水溶液中への溶出の影響が大きくなってしまうものと考えられた。この場合、上で示した有効係数の減少は、固定化担体に含まれる酵素量をオーバーエスティメイトしているために見かけ上生じていることになるので、今後、担体内に固定された酵素量を定量的に評価して、（真の）有効係数を再度評価する必要がある。また、この漏洩が、固定化担体粒子のサイズに起因するものなのか、或いは静電微粒化特有の問題なのか、と言う点について更に詳細に検討する必要があるものと考えている。他方、固定に用いるアルギン酸ナトリウムの濃度を増加させることで、ゲルのメッシュ密度を増加させ、これによって酵素漏洩量を抑えるといった対策も考えられ、これらの可能性について今後更に検討を加える予定である。

5. 結 言

静電微粒化法により、通常より粒径で一桁小さい（0.2mm程度）アルギン酸カルシウムビーズ（固定化担体）の作製が可能であり、流量および印加電圧などを変化させることにより粒径制御が可能であることが示された。

静電微粒化法により微粒化して作製した固定化酵素粒子は、粒径1.0mmまでは粒径の減少に伴う有効係数の増加が見られ、この傾向は理論値と良く一致したが、0.5mmと0.2mmの固定化酵素では有効係数の増加が見られなかった。実験的に、電界の影響による酵素の失活は生じていないことが確認され、固定化時の酵素の漏洩量が定性的には確認されたので、この原因としては、粒子がある程度より小さくなると、固定化時（ゲル化時）の CaCl_2 水溶液中への酵素溶出の影響が大きくなってしまうものと考えられた。この問題については、今後の課題として、担体内に固定化された酵素量を測定して詳細に検討してみる必要がある。

Nomenclature

C_s : concentration of substrate in reactor medium	particle	(mol/(l·min))
		(mol/l)
D_s : effective diffusion coefficient of the substrate in the gel	V_{sh} : reaction rate with no diffusion limit	(mol/(l·min))
		(m ² /s)
K : partition coefficient	V : reactor volume	(m ³)
		(-)
K_m : Michaelis constant	ν_s : reaction rate in the reactor	(mol/(l·min))
		(mol/l)
R : radius of the immobilized enzyme particle	w : weight of the immobilized enzyme particles	(g)
		(mm)
V_m : maximum reaction rate in the Michaelis-Menten reaction	ϕ_m : Thiele modulus	(-)
		(mol/(l·min))
V_{se} : reaction rate inside the immobilized enzyme	η : effectiveness factor	(-)
		(g/cm ³)
	ρ : density of the immobilized enzyme particle	

References

- 1) e. g., Asenjo, J. A. and C. Merchuk, eds., : "Bioreactor system design", Marcel Dekker (1995)
- 2) Watanabe, A., : "Liquid atomization Technology in air subjected to the D. C. high voltage", Proc. Inst. electrostat., Jpn., 17, 193-199 (1993)
- 3) Tanaka A., *et. al.*, : "Introductions to bioreactor experiments", pp. 142, 159, Gakkai Syuppan Center (1992)