

教育研究業績書

2024年12月19日

氏名 市原 実幸

研 究 分 野		研究内容のキーワード		
化学工学		バイオ機能応用、バイオプロセス工学、反応工学、触媒・資源化学プロセス工学		
教育上の能力に関する事項				
事 項		年月日	概 要	
1 教育方法の実践例				
2 作成した教科書、教材				
3 教育上の能力に関する大学等の評価				
4 実務の経験を有する者についての特記事項				
5 その他				
職務上の実績に関する事項				
事 項		年月日	概 要	
1 資格、免許 化学工学修習士		2008年10月	公益社団法人 化学工学会	
2 特許等				
3 実務の経験を有する者についての特記事項				
4 その他				
研究業績等に関する事項				
著書、学術論文等の名称	単著・ 共著の別	発行又は 発表の年月	発行所、発表雑誌等 又は発表学会等の名称	概 要
(著書)				
1				
2				
3				
(学術論文)				
1 PEG製マイクロスフェアに 固定化された酵素の有機溶媒中 での活性に及ぼす糖類の影響		2007年9月	化学工学会	迫口 明浩, 船越 修, 市原 実幸, 田丸 俊一, 中塩 文行, 後藤 雅宏
2				
3				
(学会発表)				
1 ミクロ構造の異なるPEG マイクロスフェアに固定化された リパーゼによるエステル合成反応		2005年7月	第42回化学関連支部合同 九州大会	市原実幸、山田健、迫口明浩、中塩文行、後藤雅宏
2 O/W/Oエマルションの凍結乾燥 によるPEGマイクロスフェアへの リパーゼの固定化		2006年9月	化学工学会 第38回秋季大会	市原実幸、迫口明浩、中塩文行、後藤雅宏
3				
(外部資金導入実績)				
1				
2				
3				
(その他)				
1				
2				
3				

Vb033

O/W/O エマルションの凍結乾燥による
PEG マイクロスフェアへのリパーゼの固定化(崇城大工) ○(学)市原実幸・(正)迫口明浩*・(正)中塩文行
(九大工) (正)後藤雅宏

1.緒言

有機溶媒中において酵素機能を発現させるため様々な研究がなされている。本研究において、O/W/O型多相エマルションを凍結乾燥することにより、リパーゼPSをPEGマイクロスフェアに固定化したところ(固定化ネイティブリパーゼ)、有機溶媒中で均一系触媒である界面活性剤-酵素複合体とほぼ等しい酵素活性を示す結果が得られている¹⁾。

本研究においては、高活性なリパーゼ SM(*Serratia marcescens* 起源)を用い、酵素活性に及ぼす固定化ネイティブリパーゼ SM の調製条件の影響について検討した。

2.実験

2-1.固定化ネイティブリパーゼ SM の調製法

界面活性剤を溶解したトルエン溶液とリパーゼ SM、およびポリエチレングリコールを溶解させた水相を混合させ、ホモジナイザーにより O/W エマルションを得た。この O/W エマルションに界面活性剤を溶解させたトルエン溶液を加え、高速攪拌により O/W/O 型多相エマルションを得た。この O/W/O 型多相エマルションを凍結乾燥させることで白色粉末が得られた。白色粉末をイソオクタンにて洗浄し、乾燥させたものを固定化ネイティブリパーゼ SM として用いた。

2-2.酵素活性測定法

酢酸とベンジルアルコールのエステル合成反応をモデル反応として用いた。エステルの生成量をFIDを検出器とするガスクロマトグラフにより定量し、酵素活性の指標としての初速度(V_0)を求めた。

3.結果と考察

固定化ネイティブリパーゼSM調製時におけるPEGとリパーゼSMのモル比 $R_{\text{PEG/SM}}$ が酵素活性に及ぼす影響に

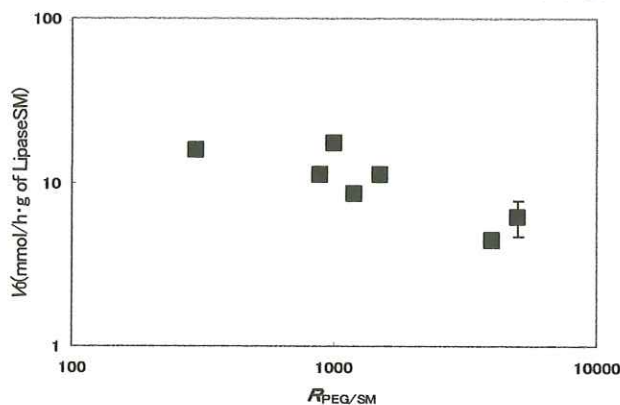


図1 酵素活性に及ぼす固定化ネイティブリパーゼ SM 調製時におけるPEGとリパーゼSMのモル比 $R_{\text{PEG/SM}}$ の影響

ついて検討を行った(図1)。なお、調製時の緩衝液濃度は、特異的に高活性を示した40mM²⁾とした。 $R_{\text{PEG/SM}}$ が1000以上において $R_{\text{PEG/SM}}$ の増大とともに酵素活性が減少する傾向が得られた。

次に、固定化ネイティブリパーゼSM調製時のPEGの添加量 C_{PEG} (wt%)が酵素活性に及ぼす影響について検討した結果を図2に示す。 $C_{\text{PEG}}=20\text{wt}\%$ で調製した固定化ネイティブリパーゼSMが最も高い活性を示した。

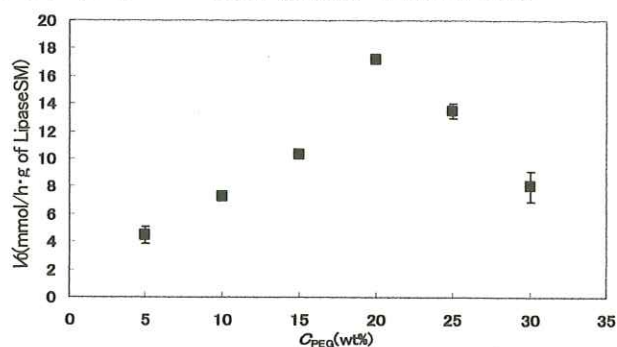


図2 酵素活性に及ぼす固定化ネイティブリパーゼ SM の添加量 C_{PEG} の影響

また、 $R_{\text{PEG/SM}}$ および C_{PEG} の異なる条件で調製された固定化ネイティブリパーゼSMのSEM観察を行った。今回検討した中で最も高活性であった固定化ネイティブリパーゼSM($R_{\text{PEG/SM}}=1000$, $C_{\text{PEG}}=20\text{wt}\%$)は、SEM写真(図3)より、多孔質のPEG マイクロスフェアであることが観察された。一方、活性が低かった他の調製条件で得られた固定化ネイティブリパーゼSMでは、図3のような粒状で多孔質なPEG マイクロスフェアは得られていなかった。よって、 $R_{\text{PEG/SM}}=1000$, $C_{\text{PEG}}=20\text{wt}\%$ において安定なO/W/O型多相エマルションが調製され、リパーゼSMがPEGマイクロスフェア中によく分散されたため、高い活性を示したのではないかと考えられる。

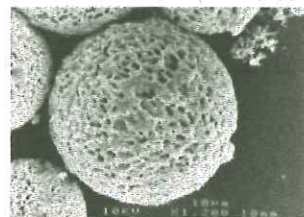


図3 固定化ネイティブリパーゼ SM ($R_{\text{PEG/SM}}=1000$, $C_{\text{PEG}}=20\text{wt}\%$) の SEM 写真 —10 μm

引用文献

- 1) H. Sawae, A. Sakoguchi, F. Nakashio and M. Goto: Proceedings of the 10th APCChE congress, CD On-line Number 826, 1-6(2004)
- 2) 市原実幸, 山田健, 迫口明浩, 中塩文行, 後藤雅宏: 第42回化学関連支部合同九州大会講演予稿集, 274(2005)

*TEL 096-326-3746 FAX 096-326-1347

E-mail: sakoguti@chem.sojo-u.ac.jp

30P042

PEG 製マイクロスフェアに固定化された酵素の
有機溶媒中での活性に及ぼす糖類の影響(崇城大工)○(正)迫口 明浩*・(学)船越 修・(学)市原 実幸
田丸 俊一・(正)中塩 文行・(九大工)(正)後藤 雅宏

1. 目的 本研究室にて開発された酵素の固定化法は、酵素をリパーゼPSとしたとき、有機溶媒中において高い酵素活性を発現させることに成功した¹⁾。この固定化リパーゼPSの活性は均一系触媒であるリパーゼPS-界面活性剤複合体と同程度であった²⁾。そこで、本固定化法のスプチリン(以下、STCと略す)およびリパーゼSMへの応用を試みたところ、固定化STCの酵素活性はSTC複合体の活性の約300倍であった²⁾のに対し、リパーゼSMの活性はリパーゼSM複合体と比較して約0.5倍であった^{3) 4)}。そこで本研究では、凍害防除やタンパク質の安定化に効果を持つとされるトレハロースを、酵素の担体であるPEG製マイクロスフェア中に添加することで、酵素の安定化を図り、活性の増大を目指して、本固定化法におけるトレハロースの添加効果について検討を行うこととした。

2. 実験 【固定化酵素の調製法】酵素としてリパーゼSMまたはSTC、高分子担体としてPEG、および濃度を変化させたトレハロースを溶解させたリン酸緩衝液を調製し、これを水相とした。これに界面活性剤(L-グルタミン酸ジオレイルリビトール)を溶解した有機相(トルエン)を加えて、11000 r.p.m.で2分間高速撹拌した。得られたO/W型エマルジョンに界面活性剤を溶解した有機相(トルエン)を加え、11000 r.p.m.で2分間高速撹拌し、O/W/O型多相エマルジョンを得た。このO/W/O型多相エマルジョンを液体窒素で急速凍結させ、凍結乾燥させた。得られた白色粉末を洗浄、乾燥させたものを固定化酵素として用いた。

【酵素活性測定法】リパーゼSMにおいては、イソオクタン中での酢酸とベンジルアルコールのエステル合成反応をモデル反応とした。一方、STCではイソオクタン中における酪酸ビニルとベンジルアルコールのエステル交換反応をモデル反応とした。それぞれのモデル反応の生成物(酢酸ベンジルおよび酪酸ベンジル)の生成量をガスクロマトグラフにて定量し、初速度 V_0 を求め、これを酵素活性の指標とした。

3. 結果と考察 トレハロースの添加が、マイクロスフェア内に固定化されたリパーゼSMの酵素活性に及ぼす影響について検討した結果を図1に示す。図1に示されるように固定化リパーゼSMではトレハロース濃度100 mMで調製された場合に最も高い活性を示した。また、このとき固定化リパーゼSMは均一系触媒であるリパーゼSM複合体の酵素活性より高い酵素活性を示した。

次に、固定化STCの酵素活性に及ぼすトレハロースの添加効果を図2に示す。図2に示されるように、STCではトレハロース濃度50 mMのときに最も高い酵素活性が得られた。また、このときの活性はトレハロース無添加の場合と比較して約1.5倍に達し、酵素活性の更なる増大がみられた。PEG製マイクロ

スフェア中でのリパーゼSMやSTCの安定構造を、凍結乾燥時および有機溶媒中においてトレハロースが保護することによって図1および2に示されるような高活性が得られたものと考えられる。

本研究により、PEG製マイクロスフェア中に様々な酵素を固定化する場合、トレハロースを添加することで、得られた固定化酵素が有機溶媒中で高い活性を発現できる可能性が示唆されたものと考えられる。

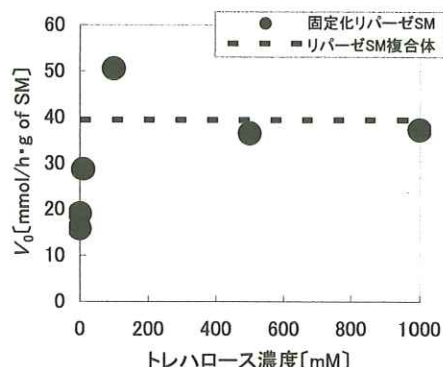


図1 トレハロースの添加が固定化リパーゼSMの酵素活性に及ぼす影響

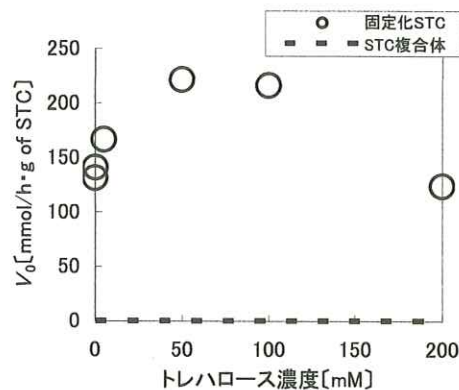


図2 トレハロースの添加が固定化STCの酵素活性に及ぼす影響

- 1) H. Sawae, A. Sakoguchi, F. Nakashio and M. Goto; Proceedings of the 10th APCChE congress, CD On-line Number 827, 1-6(2004)
- 2) 船越修, 迫口明浩, 中塩文行, 後藤雅宏; 化学工学会第38回秋季大会研究発表講演要旨集(2006)
- 3) 市原実幸, 山田健, 迫口明浩, 中塩文行, 後藤雅宏; 第42回化学関連支部合同九州大会講演予稿集(2005)
- 4) 長濱亜希, 迫口明浩, 中塩文行, 後藤雅宏; 化学工学会第68回年会研究発表講演要旨集(2003)

*TEL 096-326-3746, FAX 096-326-1347
E-mail : sakoguti@nano.sojo-u.ac.jp