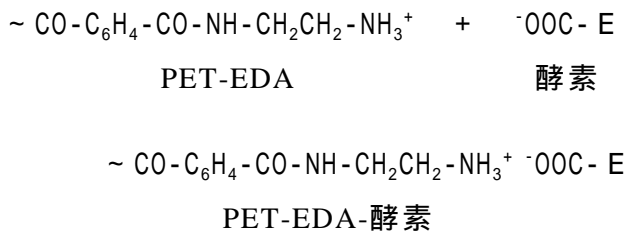


とが必要となる。

続いて、PET-EDA を酵素水溶液中に浸漬すると、PET-EDAのアミノ基(-NH₂：水中では-NH₃⁺)と、酵素分子内アミノ酸残基のカルボキシル基(-COOH：水中では-COO⁻)がイオン結合を形成する。



ただし、水中では温度やpHによって酵素と繊維の相互作用が低下して脱離が起きやすく、かつ酵素の高次構造の乱れ等が生じて失活しやすくなるため、実質的な酵素固定化量は徐々に減少する。酵素の活性低下は、分子構造の安定な酵素を選択することで抑制できるが、酵素の脱離は、酵素-担体間の結合力と密接に関わっているため、固定化酵素の耐久性を向上させる上で重要な要素である。

これまでに、PET-EDAに対し酸性染料³⁾や糖ラクトン⁴⁾を固着させた研究事例はあるが、酵素をPETに固定化させる試みはなされていない。そこで本研究では、加水分解酵素を表面に固定化したPET材料の開発を目的として、比較的失活しにくく活性評価が簡便な加水分解酵素であるインベルターゼを用いて基礎実験を行った。さらに、酵素固定化PETの水質浄化フィルター等への応用を想定して、インベルターゼ固定化PETを繰り返し水洗した場合、反応槽中で連続使用した場合、界面活性剤を添加した場合の各々について、固定化酵素の耐久性を評価した。

2. 実験方法

2.1 試料の前処理

PET平織物(JIS染色堅牢度試験用添付白布)を2cm×4cmの大きさに切断し、これをEDA(和光純薬工業(株))を所定濃度に調整した液に浸漬し、ウォーターストーム中で所定温度に一定時間保持した後、蒸留水で洗浄した。

2.2 酵素の固定化と活性評価

2.2.1 インベルターゼの固定化

インベルターゼ(パン酵母由来、シグマアルドリッチ(株))を酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.5)に加え

て1%溶液とし、これに前述のEDA処理したPET布を室温で浸漬してインベルターゼを固定化した後、緩衝液で洗浄した。

2.2.2 インベルターゼの活性測定

スクロース(和光純薬工業(株))を酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液に溶かして1%溶液とし、そのうち4mLを試料瓶に採取して、インベルターゼ固定化PETを1枚浸漬し、一定温度に保持したウォーターストーム中で20分間静置した。この反応液から0.02mLを採取し、グルコースBテストワコー(和光純薬工業(株))の発色液(グルコースと反応して赤紫色を呈する)2mLに添加して、37℃で20分間静置した。その後、分光光度計(Ubest-55型、日本分光工業(株))により505nm波長光の吸光度を測定し、固定化インベルターゼによりスクロースが加水分解されて生成したグルコースの濃度(C_G、単位g/L)を検量線に基づき算出した。また、インベルターゼ固定化PETの代わりに、インベルターゼ水溶液0.02mLを加えた場合についても同様に、グルコース濃度(C_g、単位g/L)を測定した。ここで、インベルターゼ固定化PETの酵素活性(以下A_Iと略)を次式のように定義する。wはPET試料の重量[g]である。

$$A_I = (C_G / C_g) / w \quad [\text{U} / \text{g}]$$

スクロース1%溶液(10g/L, 2.92×10⁻² mol)から、37℃において20分間にグルコース1g/L(0.56×10⁻² mol)を生成するインベルターゼの量を1[U]と定義すると、A_IはPET単位重量あたりに固定化されたインベルターゼ量に相当する。上記の式にwを導入したのは、EDA処理条件(EDA液濃度、温度、時間)によってPET布の減量率が異なり、その重量に応じてインベルターゼの固定化量が決定されるためである。

2.3 破断強度測定

引張り試験機(AG-5kNI、島津製作所)によりPET-EDAの引張り試験を行い、破断強度を測定した。引張り速度は2cm/minとした。EDA未処理PETの破断強度(S₀)に対するEDA処理PETの破断強度(S)の割合を相対破断強度(Relative Tensile Strength, 以下RSと略)として、次式により定義する。

$$RS = (S / S_0) \times 100 \quad [\%]$$

2.4 固定化酵素の耐久性評価

2.4.1 繰り返し水洗による影響

インベルターゼ固定化PETを、スクロース1%水溶液に20℃もしくは37℃で20分間浸漬し、生成したグルコース濃度(C_G)を測定後、試料を蒸留水で3回洗浄する、という一連の操作を繰り返し、固定化インベルターゼの活性変化を調べた。ここで、1回目の反応時のグルコース濃度(C_{G1})に対する n 回目のグルコース濃度(C_{Gn})の比率を、相対活性値(Relative Activity, 以下 RA_{In} と略)として次のように表す。

$$RA_{In} = (C_{Gn} / C_{G1}) \times 100 \quad [\%]$$

2.4.2 反応槽での連続使用に伴う影響

二重構造を有する反応槽(容量500mL, 東京理化学(株))の内槽に、スクロース1%水溶液300mLとインベルターゼ固定化PET1g(2cm×4cm, 30枚)を入れ、その外槽に20℃または37℃の水を循環させて内槽を恒温に保ちながら、マイクロチューブポンプにより新しいスクロース液を40mL/hずつ槽内に供給する。同速度で槽内の反応液を排出し、反応槽内の水位を一定に保ちながら連続的に運転を継続し、排出液中のグルコース濃度変化を測定した。ここで、運転初期のグルコース濃度(C_{G0})に対する d 日後のグルコース濃度(C_{Gd})の割合を、相対活性(RA_{Id})として次のように定義した。

$$RA_{Id} = (C_{Gd} / C_{G0}) \times 100 \quad [\%]$$

一方、インベルターゼ自体の水中における失活の影響を調べる目的で、インベルターゼ1%液を入れた容器を上記反応槽と同温度の水槽に浸し、浸漬時間に対する相対活性(RA_{id})の変化を測定した。ここで RA_{id} は、固定化されていない遊離インベルターゼにより生成したグルコース濃度(C_g)の初期値(C_{g0})に対する比率として以下のように定義する。

$$RA_{id} = (C_{gd} / C_{g0}) \times 100 \quad [\%]$$

2.4.3 界面活性剤の添加による影響

界面活性剤が固定化酵素の活性に及ぼす影響を検討する目的で、市販の台所洗剤の多くに用いられているアニオン性およびノニオン性の界面活性剤をスクロース水溶液に添加し、固定化インベルターゼおよび遊離インベルターゼの活性を測定した。アニオン界面活

性剤として、石けんの主成分である脂肪酸ナトリウム(フレークマルセルND, 北広ケミカル(株)), 台所用洗剤の成分の一つであるラウリル硫酸ナトリウム(エマル0, 花王(株)), 市販の台所用中性洗剤(ファミリーフレッシュ: アルキルエーテル硫酸エステルナトリウム22%含有, 花王(株)), ノニオン性界面活性剤として、ポリオキシエチレンラウリルエーテル(エマルゲン130K, 花王(株))を使用した。各々をスクロース1%水溶液に所定濃度添加し、インベルターゼ固定化PETを1枚浸漬して37℃で20分間静置した。生成したグルコース濃度(C_{Gs})と、界面活性剤を加えずスクロース溶液中で反応させた時のグルコース濃度(C_G)との比率から、次式により相対活性(RA_{Is})を求めた。

$$RA_{Is} = (C_{Gs} / C_G) \times 100 \quad [\%]$$

同じく、界面活性剤を添加したスクロース1%水溶液中にインベルターゼ1%溶液を0.02mL添加して37℃で20分間静置した後、生成したグルコース濃度(C_{gs})を測定し、界面活性剤を添加しない場合のグルコース濃度(C_g)との比から相対活性(RA_{is})を求めた。

$$RA_{is} = (C_{gs} / C_g) \times 100 \quad [\%]$$

3. 結果と考察

3.1 試料の前処理と固定化条件の把握

PET-EDAへの酵素固定化量と、EDA処理条件との相関性について考察する目的で、(a)EDA100%液、(b)EDA50%水溶液、(c)EDA50%エタノール溶液の各々にPETを浸漬したときの、浸漬時間及び温度に対する A_I の変化を測定した。これらのうち、(a)に関するデータを図1に示す。

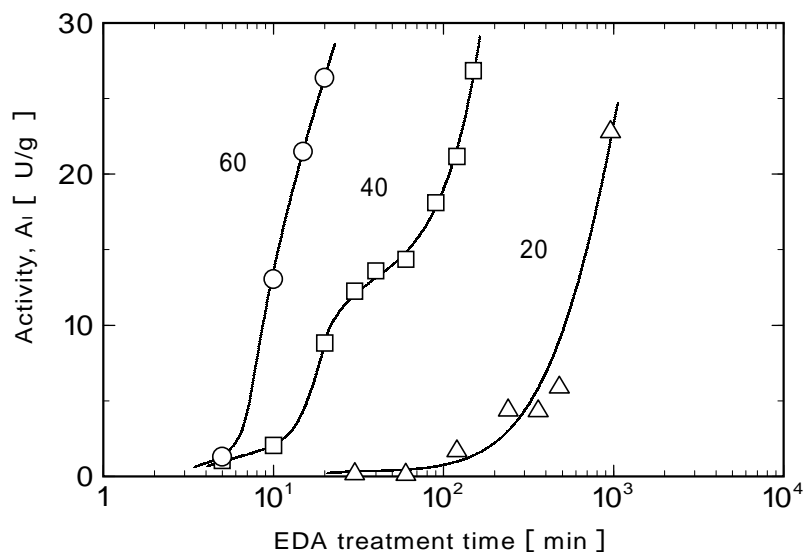


図1 EDA100%液による処理条件と A_I との関係

EDA液の温度が高いほど、一定の A_I に達するのに必要な処理時間は短くなっており、(b),(c)も同様の傾向を示した。また、同一処理温度で A_I を比較した場合、(a)が最も処理時間が短く、以下(c),(b)の順で処理時間が長くなる傾向がみられた。すなわち、EDA100%液がPETとの反応性が最も高く、また溶媒が水よりもエタノールの方がPETとの反応性が高いと考えられる。

一方、(a)~(c)の試料について引張り試験を行い、破断強度(RS)を測定した。この中で、(a)に関するデータを図2に示す。ここで、処理温度が高いほど、より短い処理時間でRSが低下しており、(b),(c)も同様の傾向であった。

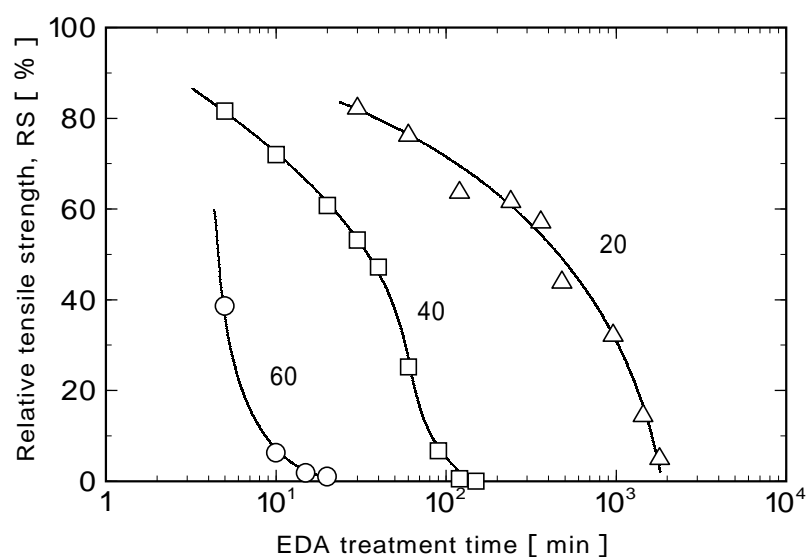


図2 EDA100%液で処理したPETのRS

また、ここでは図示していないが、同じ処理温度で比較した場合は、(a)が最も短時間で強度低下を起こし、次いで(c),(b)の順で強度低下に要するEDA処理時間が増加した。これは前述のように、PETとの反応性はEDA100%液が最も高いため、単位面積あたりの酵素固定化量が多くなる反面、PET自体の強度低下も顕著であることを示している。

A_I とRSの関係を明確にするために、(a)~(c)における A_I とRSとを同一グラフ上に重ね合わせた。その中の一例として、40°CのEDA50%水溶液に関するプロットを図3に示す。さらに、RS = 50%における A_I の値を $A_I(S_{1/2})$ とし、これを処理温度に対してプロットした結果を図4に示す。その結果、40°CのEDA50%水溶液における $A_I(S_{1/2})$ が最大となった。すなわち、強度低下が最も少なく、かつ酵素固定化率が最大となる処理条件は、40°CのEDA50%水溶液で処理した場合と考えられるので、以後の実験においては、同条件で24h処理したPET-EDAを用いることとした。

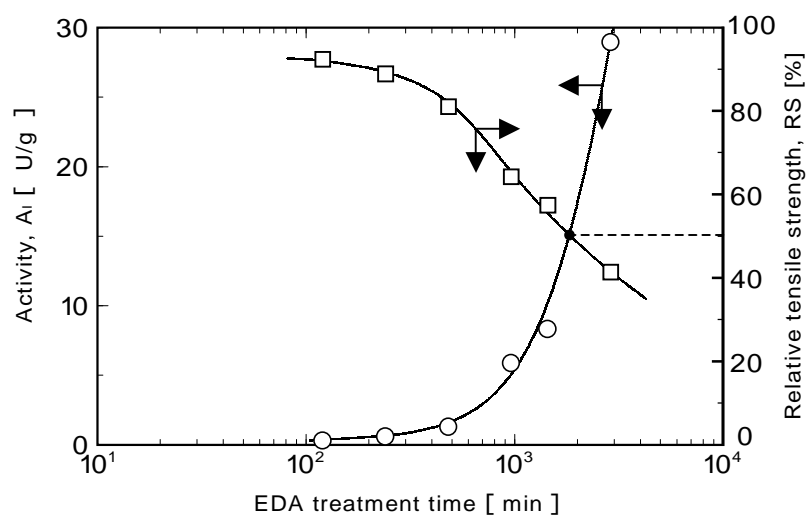


図3 A_I 及びRSのEDA処理時間依存性 (EDA50%水溶液, 処理温度40°C)

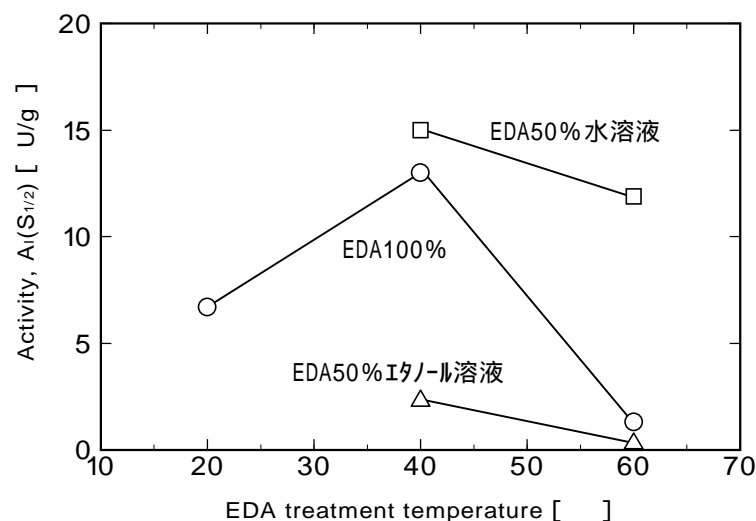


図4 RS = 50%における A_I

3.2 繰り返し水洗による影響

インペルターゼ固定化PETを繰り返し水洗した場合の、洗浄回数に伴う RA_{In} のプロットを図5に示す。

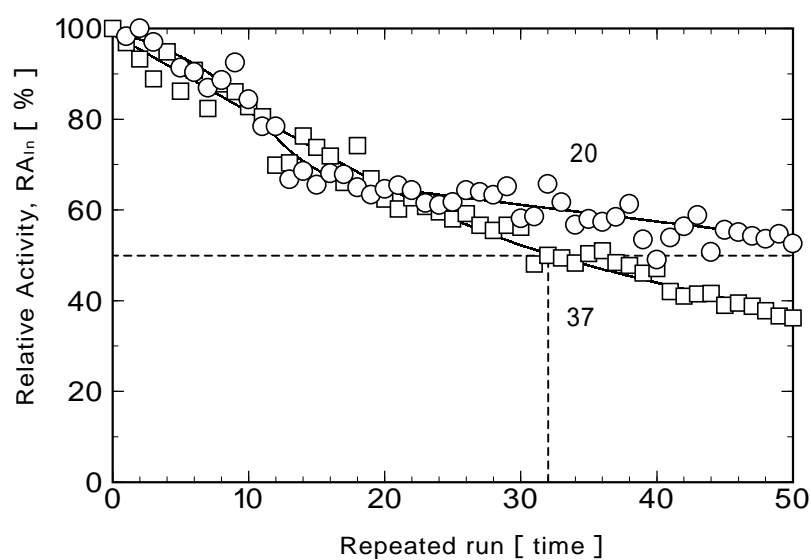


図5 水洗回数に対する RA_{In} の変化

20°C, 37°Cのいずれも、回数の増加と共に RA_{In} は徐々に低下しているが、15回目あたりを境に、20°Cの方が37°Cの場合に比べて傾斜がやや緩やかになり、

50 回後も RA_{In} は 50% 台を維持していたのに対して、37 では RA_{In} はより速やかに減少し、32 回目で 50% に達した。20、37 のいずれも、洗浄時の条件(水温、回数)は同じであることから、両者の差は、スクロース液の温度の違いに起因すると思われる。すなわち、37の方が水分子の熱運動による酵素の脱離と失活がより顕著であり、PET 表面の酵素残存率が徐々に低下したと推測される。

3.3 反応槽での連続使用に伴う影響

反応槽中で連続運転を行った時の、経過時間に対する RA_{Id} の変化を図6に示す。 RA_{Id} は 20 では開始後3日目から、37 では2日目から減少し始め、半減期は、20 の13日に対し、37 の場合は7日であった。これは前述のように、温度が高いと水分子の熱運動によって固定化インペルターゼの脱離が促進され、脱離した酵素が反応液と共に排出されるので、PET 表面の酵素残存率が徐々に低下していくためと考えられる。

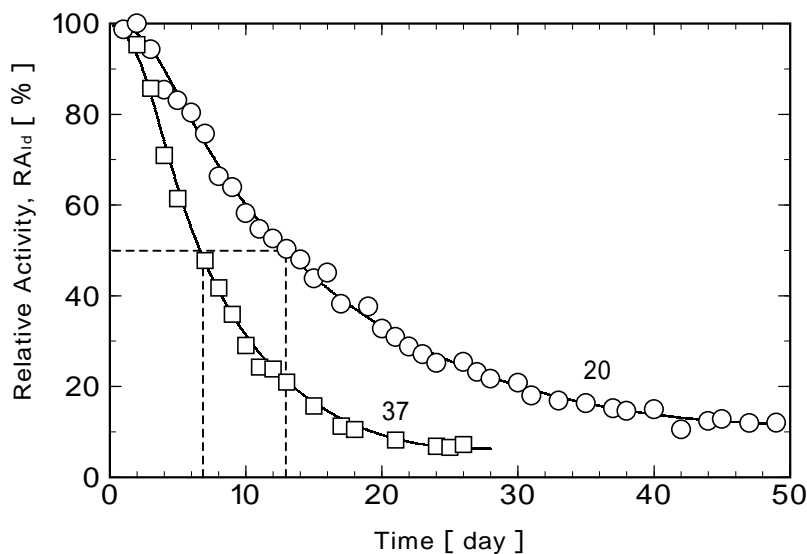


図6 反応槽中の使用時間に対する RA_{Id} の変化

経過時間に対する RA_{id} の変化を図7に示す。20において RA_{id} は10日目まではほとんど減少せず、その後徐々に減少しているため、インペルターゼ自体は少なくとも最初の10日間は水中でほとんど失活していないと推察される。従って、初期の10日間における RA_{id} の減少は大部分がインペルターゼの脱離に起因するものであり、それ以後の減少は脱離に加えて失活も進行したことによると考えられる。37の場合、 RA_{id} は7日目あたりから減少し始め、12日後に50%に達したが、これは20の場合に比べて温度が高い分、インペルターゼの失活がより顕著になったためと思われる。

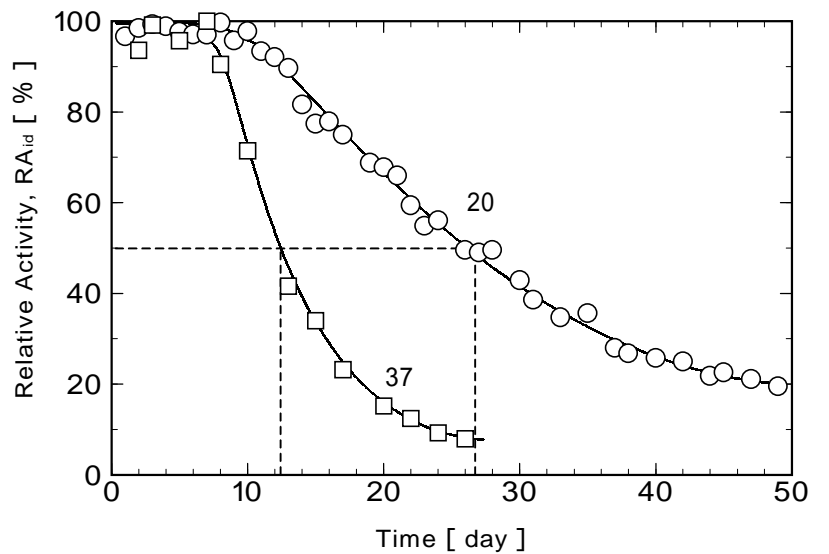


図7 反応槽中の経過時間に対する RA_{id} の変化

3.4 界面活性剤の添加による影響

図8に、各界面活性剤の濃度変化に対する RA_{Is} のプロットを示す。いずれの界面活性剤に関しても、濃度の増加と共に RA_{Is} は減少しており、濃度1%では全ての RA_{Is} が50%を下回っている。

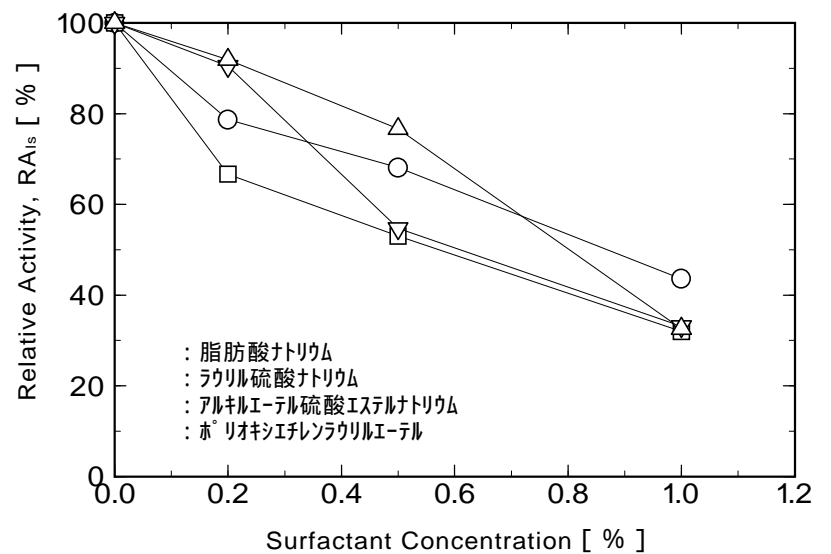


図8 界面活性剤濃度に対する RA_{Is} の変化

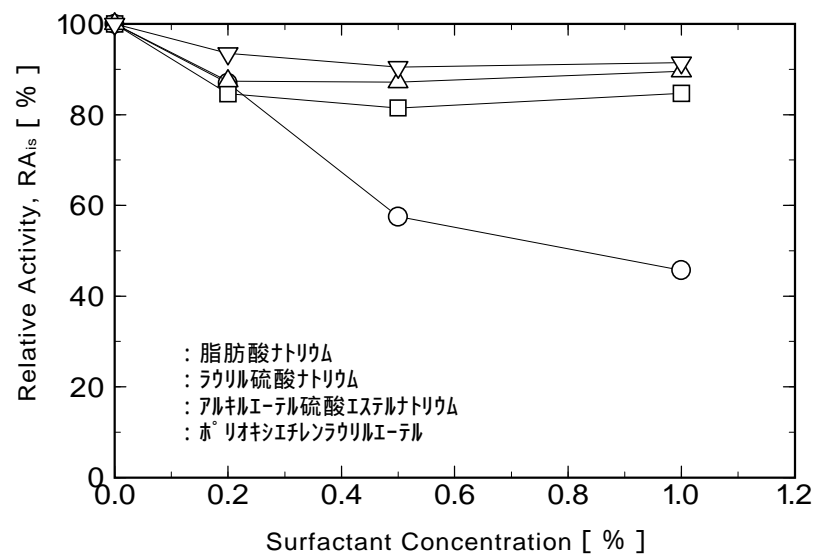


図9 界面活性剤濃度に対する RA_{Is} の変化

続いて、 RA_{is} のプロットを図 9 に示す。ここで、3 種類の界面活性剤(ラウリル硫酸ナトリウム、アルキルエーテル硫酸エステルナトリウム、ポリオキシエチレンラウリルエーテル)に関して、無添加の場合に比べると RA_{is} は 80~90% 台に下がるものの、濃度に関わらずほぼ一定水準を維持しているのに対し、脂肪酸ナトリウムの場合のみ濃度に伴って RA_{is} が減少する傾向がある。図 10 に示すように、脂肪酸ナトリウムの濃度変化に対して RA_{Is} と RA_{is} が同様の傾向を示すことから、ここでの RA_{Is} の減少は主に酵素自体の失活に起因するものであると推察される。残る 3 種類の界面活性剤では、濃度に対して RA_{is} がほとんど変化せず、 RA_{Is} は減少していることから、これら 3 種類の界面活性剤はインベルターゼの反応を阻害する要因ではなく、むしろ固定化インベルターゼの脱離を促す作用があると考えられる。

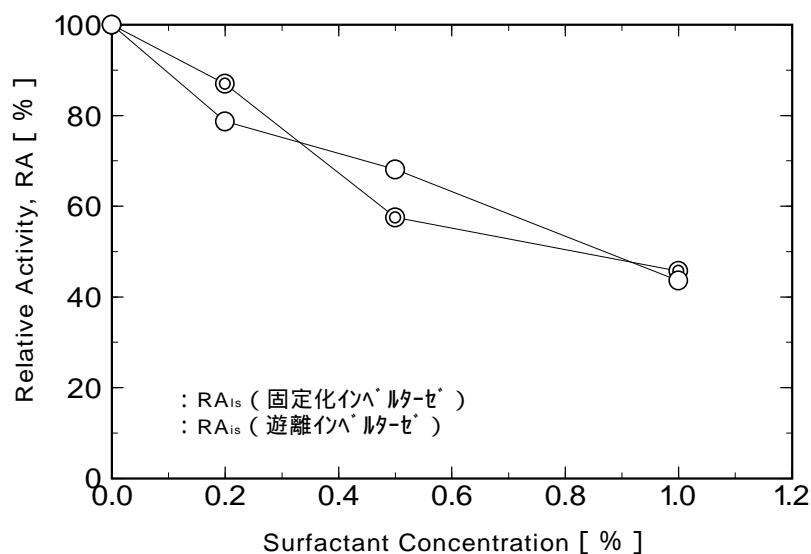


図 10 脂肪酸ナトリウム添加時の RA_{Is} と RA_{is} の比較

4. 結 言

本研究では、加水分解酵素を固定化した機能性繊維素材の開発を目的として、スクロース加水分解酵素であるインベルターゼをPET表面に固定化させる実験ならびに固定化インベルターゼの耐久性試験を行った。その結果を以下に総括する。

(1) PETをEDAにより前処理してインベルターゼを固

定化させる場合、EDA50%水溶液で処理すると、EDAとの反応によるPETの強度低下が少なく、かつ酵素固定化率が高くなることが分かった。

(2)インベルターゼ固定化PETを繰り返し水洗すると、洗浄回数の増加と共に相対活性は減少する傾向がみられた。浸漬温度が20 の場合、37 に比べ酵素の失活ならびに脱離は少なく、水洗を50回行っても50%以上の相対活性を維持した。

(3)連続運転が可能な反応槽内でインベルターゼ固定化PETを使用した場合、時間と共に固定化酵素の脱離と失活が進行するが、20 では13日間、37 では7日間にわたり50%以上の相対活性を維持した。

(4)界面活性剤を添加した基質溶液中でインベルターゼ固定化PETを使用した場合、脂肪酸ナトリウムは酵素の脱離よりも失活への影響が大きかった。なお、他のアニオン性界面活性剤であるラウリル硫酸ナトリウム、アルキルエーテル硫酸エステルナトリウム、およびノニオン性界面活性剤のポリオキシエチレンラウリルエーテルの場合、界面活性剤の濃度が高くなるにつれて、酵素は脱離しやすくなる傾向がみられた。

謝 辞

本研究は、研究成果活用プラザ石川の平成15年度FS委託研究事業において実施したものであり、ご支援に感謝します。また、本研究の遂行にあたり、実験装置等に関してご協力いただいた、福井大学工学部の中根幸治助手に感謝します。

参考文献

- 1)千畑一郎. 固定化酵素. 講談社, 1975, p.2 .
- 2)吉田, 若野, 浮田, 安東. Chem. Express, Vol. 4, No. 5, 1989, p. 353-356
- 3)王, 堀, 中村. 繊維工業研究協会報告, Vol. 2, 1992, p. 32-38
- 4)大江, 吉村, 安部. 繊維学会誌, p. 139-144, Vol. 59, No. 4, 2003, p. 139-144