

氏 名(本 籍)	ね ぎし さとし 根 岸 聡 (長 野 県)
学 位 の 種 類	学 術 博 士
学 位 記 番 号	博 甲 第 858 号
学位授与年月日	平成 3 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	農 学 研 究 科
学 位 論 文 題 目	酵素固定化用担体としての豚骨の利用と固定化における基質の浸潤効果
主 査	筑波大学教授 農学博士 高 橋 穰 二
副 査	筑波大学教授 工学博士 中 村 以 正
副 査	筑波大学教授 工学博士 片 岡 廣
副 査	筑波大学助教授 工学博士 向 高 祐 邦

論 文 の 要 旨

多くの酵素は今なお効果であるため、酵素の優れた機能を広く産業的に利用するためには、水溶性である酵素を水不溶性担体に固定化し、回収、再利用を可能にする必要があり、現在、高性能な固定化担体および高活性を発現できる固定化法の開発が望まれている。

一方、獣骨は、高い酵素吸着能を有する有機物のコラーゲンおよび無機物のヒドロキシアパタイト様リン酸カルシウムから主として構成され、物理的にも強固である。さらに、多孔質で無機質 1 g 当り 100ml 以上の大きな表面積を有することから酵素固定化担体として優れた素材と考えられる。

本研究では、新規担体を開発し高活性の固定化酵素を作製することを目的に、上記のような優れた特性をもつ豚骨に着目し、これへの酵素の固定化を試みた。すなわち、豚骨を洗浄後、オートクレーブ処理を施し、さらに粉碎して、エタノールおよび蒸留水で再度洗浄して固定化担体 (PB) とし、工業的にも利用価値の高い三大加水分解酵素のリパーゼ、プロテアーゼおよびアミラーゼの固定化について検討した。

まず、リパーゼの固定化において、担体にそのまま酵素を吸着させる従来法でも、これまでに開発されている代表的な担体よりも高い活性を持った固定化リパーゼが、PB を担体として得られた。しかし、なお活性発現率が 25% と低いため、PB を、基質であるオリーブ油に予め浸潤し、その後酵素を固定化したところ、活性発現率が 87% にまで高められるという極めて興味深い結果を得た。この時、浸潤したオリーブ油は、リパーゼ固定化後有機溶媒で洗浄する事により完全に担体から取り除かれており、活性測定には特別な影響を与えていないことも確認された。この基質浸潤効果は、PB 以外の従来の担体についても認められたが、とくに PB において顕著であり、現用の代表的な担体に比べ数倍から数十倍に相当する担体 1 g 当り 1,800 単位の非常に高い活性の固定化リパーゼが得られた。

また、このPB固定化リパーゼの安定性をオリーブ油を分解基質として46時間の繰り返し回分反応により検討した結果、攪拌による担体の崩壊も見られず、毎反応後も85%の活性が残存していることが知られた。さらに、このPB固定化リパーゼの実用化を目指し、工業的主原料の一つであるパーム油の連続加水分解を試みた。すなわち、パーム油濃度50% (w/v) で完全混合型装置による連続反応を行い、パーム油はリン酸緩衝液とは別に、イソオクタンに溶解して2.5 g/h の速度で供給した結果、分解率80%以上で300時間の長期にわたって連続的に加水分解することができ、PB固定化リパーゼは工業的にも充分利用可能であることが示唆された。

次に、豚骨担体PBプロテアーゼ固定化への応用を試みると共に、リパーゼの固定化において認められた基質浸潤効果のプロテアーゼへの応用とそのメカニズムの解明を図った。その結果、リパーゼの場合と同様に、検討した担体のほとんどにおいて、予め、基質であるカゼインを担体に浸潤、架橋することによって活性が高められることが認められた。とくに、PBについては活性が約5倍に増加し、担体1 g 当り25,000単位の高活性が得られた。この基質浸潤による活性の増加は、酵素の吸着量が増加することにもよるが、それ以上に固定化された酵素の非活性の増加が大きく寄与していることが明らかにされた。すなわち、基質を浸潤しない従来法では、酵素はランダムに固定化されるため、多くの活性部位は固定化に使われ、固定化された酵素の多くは触媒機能を失ってしまう。しかし、基質を予め担体に浸潤した場合には、固定化時に酵素の活性部位が基質により保護され、酵素は活性部位以外の場所で担体と結合して活性を維持したまま固定化されるものとして、基質が予め担体上に存在する場合の活性増加の効果が説明された。

得られた固定化プロテアーゼを用いて、カゼイン分解の繰り返し回分反応を行い、他の担体と比較した結果、イオン交換樹脂やセライトを担体とした場合は、反応中に担体自体が崩壊してしまうのに対して、PB固定化プロテアーゼは崩壊もせず、安定して使用できることが示された。しかし、活性は一反応毎に30%以上低下したので、より安定性を高めると共に、反応操作を容易にするため、微細なPBがカゼイン溶液と混合するとペースト状に固まる特性があるのを利用し、このペーストを不織布に塗布してグルタルアルデヒドで架橋処理することにより、シート状のPBを作製した。このPBシートにプロテアーゼを固定化し、繰り返し回分反応に用いたところ、安定性は著しく向上し、繰り返し回数20回、延べ反応時間400時間の長期にわたり初期活性を維持したまま使用することができ、反応操作も簡便化された。

また、アミラーゼの固定化においても基質浸潤効果は著しく、PBはじめ従来の代表的な担体であるキトパールやセライトにおいても、固定化前にデンプンを浸潤させておくことにより、無浸潤のものに比してかなり高い活性を有する固定化アミラーゼが得られることが示された。アミラーゼの場合も、基質浸潤効果はPBにおいて最も顕著であり、約10倍の増加を示し、これにより担体1 g 当り150単位の高い活性を持った固定化アミラーゼが得られた、なお、アミラーゼの場合、デンプンをグルタルアルデヒドで担体に架橋することは出来ないので、酵素を固定化するときには、浸潤デンプンが分解される前に速やかに架橋処理する必要があることも知られた。得られた固定化アミラーゼの安定性をデンプンの加水分解の繰り返し回分反応で検討した結果、イオン交換樹脂の場合は、反応時間が

100時間を過ぎると担体の崩壊などによる活性の低下がみられたのに対し、PBおよびPBシートに固定化したものは、担体の崩壊も見られず延べ反応時間300時間以上にわたって高活性を維持することができた。

以上、本研究において新たに開発された豚骨を素材とする担体PBが、非常に優れた酵素固定化用担体であることが明らかにされた。また、三大加水分解酵素であるリパーゼ、プロテアーゼ、アミラーゼの固定化を通し、固定化前処理として、基質を予め担体に浸潤させておくことにより、活性のより高い固定化酵素が得られることが見いだされ、新たな固定化法が開発された。新規担体PBおよび基質浸潤効果を生かした固定化法は、他の多くの酵素に対しても有効であると思われる。

審 査 の 要 旨

本研究は、獣骨が、コラーゲンおよびヒドロキシアパタイト様リン酸カルシウムから主として構成され、しかも極めて多孔質であることに着目し、入手の容易な豚骨の酵素固定化担体としての利用について検討したものである。

まず、豚骨をオートクレーブ処理し、粉碎洗浄して担体(PB)を調整する方法を確立し、工業的にも利用価値の高い、リパーゼ、プロテアーゼおよびアミラーゼの三大加水分解酵素の固定化を行い、PBの固定化担体としての性能を、従来から汎用されているイオン交換樹脂、セライト、キトパールなどと比較した。その結果、単位重量(あるいは単位体積)当りの活性において、いずれの酵素についてもPBを用いた場合が最も高く、また固定化された酵素の安定性も最も優れていることを見出した。

注目すべきは、固定化担体にそれぞれの酵素の基質、すなわち、リパーゼの場合はオリーブ油、プロテアーゼの場合はカゼイン、アミラーゼの場合はデンプンをそれぞれ予め浸潤させ、グルタルアルデヒドによる架橋処理(プロテアーゼの場合)などを行っておくと、固定化酵素の活性発現率が飛躍的に増加することを見出したことである。この基質浸潤処理の効果は、イオン交換樹脂やセライトなどの従来の担体においても認められるが、特にPBにおいて顕著であり、リパーゼにおいては3倍、プロテアーゼにおいては5倍、アミラーゼにおいては10倍と、それぞれ活性発現率が著増している。

さらに、上記のようにして調整された高活性のPB固定化リパーゼによるパーム油の連続加水分解、不織布を用いてPBをシート状に成形することによる固定化プロテアーゼの安定性の改善、PB固定化グルコアミラーゼによるデンプンの繰り返し回分加水分解などについても検討し、それぞれ好結果を得ている。

以上、本研究は、豚骨を素材とする新規な酵素固定化担体PBが極めて高性能であることを、リパーゼ、プロテアーゼおよびアミラーゼの三大加水分解酵素の固定化において実証すると共に、基質による担体の前処理が、固定化酵素の活性発現率の増大に極めて有効であるという新知見を明らかにしたもので、それらの成果は実用的にも学術的にも高く評価される。

よって、著者は学術博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。