

バイオリアクター用多孔質セラミックス

日本ガイシ(株)エンジニアリング事業本部 川瀬 三雄

Porous ceramic carrier for bioreactor

Mitsuo Kawase

NGK INSULATORS, Ltd.

Bio Research Section

Research & Development Division
of Engineering Business Group

酵素固定化用担体としての無機材料は一般に、有機材料に比較して構造的に強固であり圧力、熱、pH に対し安定であるという特長を持つ¹⁾²⁾³⁾。従って無機材料を担体として用いた酵素固定化型バイオリアクターはスケールアップや滅殺菌等に有利である。

また高効率なリアクターを構築し装置をコンパクト化するためには、高い酵素固定化能を持った担体を調製することが必要である。

多孔質ガラス (CPG) については Messing, Weetall 等により多くの研究が報告されており、比表面積が大きく酵素固定化量の高い担体として評価を受けている。しかしながら、この多孔質ガラスの製造工程は複雑であり、担体としてはかなり高価なものとなっているのが現状である¹⁾²⁾³⁾。

そこで筆者らは無機材料の特長を活かし安価でしかも酵素固定化量の多い多孔性セラミックスを調製することを目的に検討を進めた。先に筆者らは、アルカリ土類金属を含むコーディライトを酸により表面修飾する事で比表面積を増大させることを報告した⁵⁾。しかしながら酸処理により生成する細孔の穴径は数 nm であり、酵素固定化に有効であると考えられる数 10 nm 以上の細孔の増加は僅かであった。そのため全比表面積は 170 倍に増加したものの、発現酵素活性はインペルターゼの場合で、酸処理を施す前の 2 倍に増加するのに留まった⁵⁾。

そこで筆者らは、数 10 nm の細孔径を持つ各種無機材料を調査した結果、天然粘土の一種であるスメクタイトが 30 nm 付近の細孔を多量に持ちしかも高い比表面積を有することを見いだした。よって、その多孔性を保存しながら酵素固定化能の高いセラミックス担体を調製することを目的とし、焼成温度条件を中心に検討した結果、酵素固定化能の優れたセラミックス担体 SM-10 を得た。SM-10 の高い酵素固定化能を確認した後、同担体を充填した酵素固定化型バイオリアクターを分岐サイクロデキストリン合成系に適用したところ、従来法に比較して反応時間を大幅に短縮できることが判った。

1. 実験方法および実験装置

1.1 焼成温度条件の検討

酵素固定化能の優れたセラミックス担体を得るため、以下の如く焼成条件の検討を行なった。原料には天然粘土の一種であるスメクタイトを用いた。同粘土の化学組成を Table 1 に示した。同粘土の主成分は SiO_2 、 MgO よりなり、その他微量成分として Al_2O_3 、 CaO を含む。この粘土塊を破碎し、粒度調整のために 80~100 メッシュに篩分した。次にその破碎粘土 100 g を石英のつぼに分取し、函型カンタル電気炉 (共和高熱工業製) 内で 5 時間所定温度により焼成した。温度条件は 300°C~1400°C の間の 14 条件である。

Table 1 Typical chemical analysis of SM-10.

SiO ₂	66.2 %
MgO	29.7 %
Al ₂ O ₃	1.9 %
CaO	1.0 %

SM-10 was analyzed according to JIS K0119.

1.2 無機材料の物性測定方法

無機材料の化学組成分析は JIS K 0119 (蛍光 X線分析法通則) により行った。細孔容積分布は Washburn の式による水銀圧入法を利用した自動ポロシメーター (島津オートポア 9200) で測定した⁶⁾。また水銀の圧入容積を全細孔容積とし細孔形状が幾何学的な円筒と仮定した全細孔の表面積を細孔比表面積とした。平均細孔径は、全細孔容積と細孔比表面積との商より求めた。

SM-10 表面の電子顕微鏡観察は走査型電子顕微鏡 (日本電子 JSM-T 100) を用いて行った。また見かけ気孔率の測定は JIS R 2205 (耐火煉瓦の見かけ気孔率、吸水率及び比重の測定方法) に従った。

1.3 インペルターゼの担体への固定化方法

無機担体をシランカップリング法⁷⁾によりアミノプロピルトリエトキシシランで修飾した。次に 1% グルタルアルデヒド水溶液に浸潤し室温で 1 時間静置したのち十分に水洗した。その後この修飾担体を 1g とり 1ml の 2% インペルターゼ (片山化学製、酵母起源、工業用グレード、W/V)/50 mM 酢酸バッファー (pH 4.0) 中に浸潤しインペルターゼを固定化した。これをさらに 500 mM NaCl/50 mM 酢酸バッファーで洗浄することにより担体に非特異的に吸着したインペルターゼを除いたものを、固定化インペルターゼ標品とした。

1.4 インペルターゼ活性測定方法

5% ショ糖/50 mM 酢酸バッファー (pH 4.0) に一定量の固定化インペルターゼを添加し、経時的に反応系中に生成するグルコースの量を和光純薬 (株) グルコース B テストにより測定した。IU は 30°C で 1 分間に 1 μmol のグルコースを生成する

インペルターゼ量とした。

1.5 固定化プルラーナーゼによる分岐サイクロデキストリンの合成

プルラーナーゼは NOVO 社製のプロモザイム 200 L を 1000 倍量の 50 mM 酢酸バッファー (pH 5.0) 中で透析したものを用いた。50 mM 酢酸バッファー (pH 5.0) 中で十分に脱気した SM-10、1g を同バッファーに溶解したプルラーナーゼ溶液 (Lowry 法⁹⁾による蛋白質濃度 25 mg/ml) 1 ml に浸潤、2 時間室温にて静置したのち、上記バッファーで洗浄したものを固定化プルラーナーゼとした。基質として、マルトースとサイクロデキストリンの混合溶解液 (マルトース:CD=4:1、固形化分濃度 78%、溶媒、50 mM 酢酸バッファー (pH 5.0)) を用いた。

Fig. 1 に使用した分岐サイクロデキストリン合成用実験装置を示す。各カラム (D=10 mm, L=30 mm) 内には SM-10 を担体とした固定化プルラーナーゼ (平均粒径 160 μm) が充填されており、カラムジャケットに恒温水を循環して反応温度 60°C を維持した。3 段直列の装置によりカラム内滞留時間と後述の分岐化率の関係を検討した。また、1 段の装置により固定化プルラーナーゼの安定性を検討した。

分岐化率は HPLC (日本分光製 BIP-1、カラム 山村化学研究所製 A 312) を用いて反応液中の全サイクロデキストリンに占める分岐サイクロデキストリンの重量%を測定することにより求めた。

1.6 固定化プルラーナーゼのプルラン分解活性測定方法

上記方法で調製した単位量の固定化プルラーナーゼを 3% プルラン/50 mM 酢酸バッファー (pH 5.0) に添加し、37°C で振とうしながら反応させた。1U は 1 分間当り 1 μmol のグルコース相

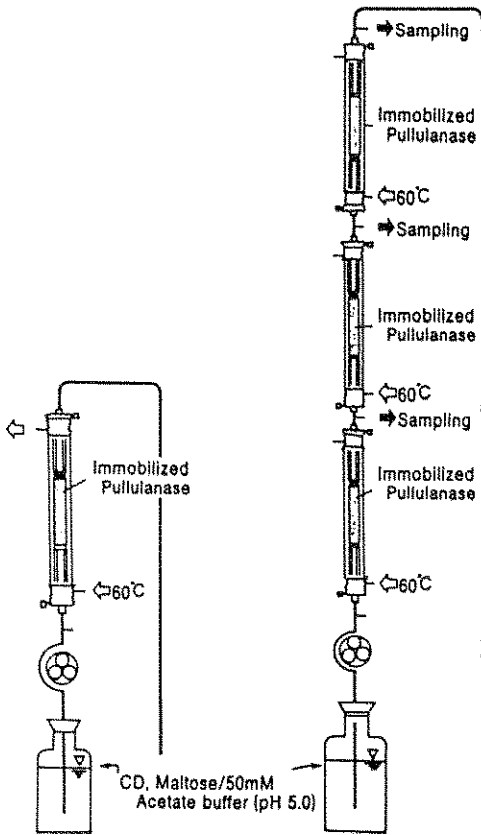


Fig. 1 Scheme of the reactor for branched CD synthesis.

Pullulanase was immobilized on SM-10 and packed in the column (10 mmD×30 mmL). Multi column reactor was used to investigate the relationship of residence time and yeild.

当還元力をもたらす酵素量とした。還元力はソモジ・ネルソン法⁹⁾によりグルコースを標準として測定した。

2. 実験結果及び考察

2.1 焼成条件の検討

一般にセラミックス原料はセラミックス製造工程において熱処理を受けることにより、結晶表面が焼結し初めて強固な構造体となる。本研究で酵素固定化用のセラミックス担体を調製するために用いたスメクタイトの場合も例外ではなく、熱処理を施さずに、酵素反応が進行する水系に長時間浸漬すると脆弱となった。従って強固な形状を維

持するためには、焼成工程が必要であると考えられた。しかしながらこの焼成工程においては、焼成温度を必要以上に高く設定すると、結晶構造全体が完全に溶融しスメクタイトの持つ多孔性が失われる事が予想された。従って筆者らはSM-10を調製するに当たり、セラミックス担体が強固な構造体となりしかもスメクタイトの多孔性をそのまま維持している焼成温度を検討する必要があった。

Fig. 2にスメクタイトの焼成温度による気孔率の変化を示す。気孔率は1000°C以下の熱処理を施した場合では70%前後を維持しているのに対し1000°C付近から徐々に低下し1100°C以上では急激に低下している。従ってSM-10原料は1100°C以上では結晶構造全体の溶融が進行し気孔が閉塞してしまうものと考えられる。このことよりスメクタイトの多孔性を維持し、しかもシンタリングによりその機械的強度を向上させ得る熱処理温度は、少なくとも1000°C以下であることが判明した。

2.2 セラミックス担体の細孔径分布

次に1000°C以下の各温度で焼成したセラミックス担体の細孔径分布を測定した。その結果をFig. 3に示す。

未焼成のスメクタイトは前述のように30 nm付近にブロードな細孔径分布のピークを持っていた。焼成温度を200°Cから1000°Cまで変化させると、900°Cまでは20~60 nmの細孔径のピークがシャープに立ち上がってくるのが観察された。また1000°Cで処理したセラミックス担体については、気孔率のデータと同様、900°Cのデータに比較しピークが低下する傾向がみられた。以上の結果よりスメクタイトは、900°C付近の温度で熱処理することにより20~60 nmの細孔径分布がシャープになると考えられる。また、このセラミックス担体を水中に半年間浸漬し、その安定性を検討したが機械的強度に変化は認められなかった(以下、このセラミックス担体をSM-10とする)。

Messingらは、酵素の固定化量と多孔性ガラスの細孔径の関係を検討し、担体の酵素固定化量は、グルコアミラーゼ(分子量97000)の場合、30 nm

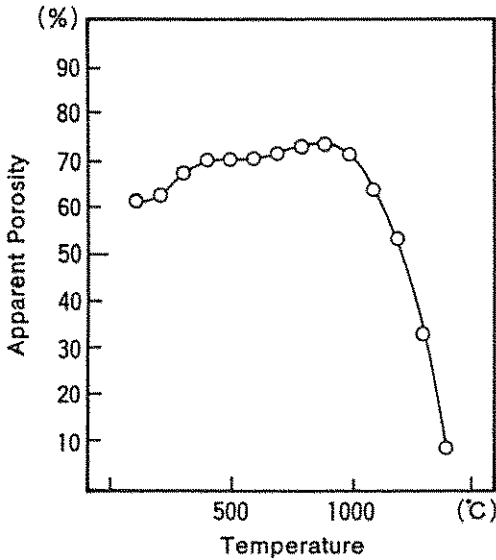


Fig. 2 Effect of heat treatment on the apparent porosity.
The material of SM-10 was treated with heat at different temperature, and apparent porosity was determined.

以上の細孔比表面積に比例することを報告している¹⁰⁾。この場合 30 nm はグルコアミラーゼ蛋白が固定化され、反応を触媒するのに支障の無い最小の細孔径と考えることができる。この最小細孔径は、分子量の三乗根に比例することが予想される。従って、20~60 nm の細孔径分布をもつ SM-10 は、分子量約 80 万以下の酵素蛋白、すなわち大部分の酵素に対して、担体として有効と思われる。

Table 2 に SM-10 の物理的特性の測定結果を示す。細孔容積は、0.73 ml/g-担体であった。又、比表面積は 77.7 m²/g、平均細孔径は 37.6 nm であった。

一方、Messing 等が高価な多孔質ガラス (CPG) の代替品として考案した酵素固定化多孔質セラミックス (チタニアビーズ) は、細孔径が 20~40 nm の場合比表面積が 50 m²/g と報告されている¹¹⁾。従って、SM-10 は、Messing 等の多孔性セラミックス以上の比表面積をもつと思われる。

2.3 SM-10 の特性

Fig. 4 に SM-10 表面の電子顕微鏡写真を示した。比較の為に左下白枠の中に一般的なセラミッ

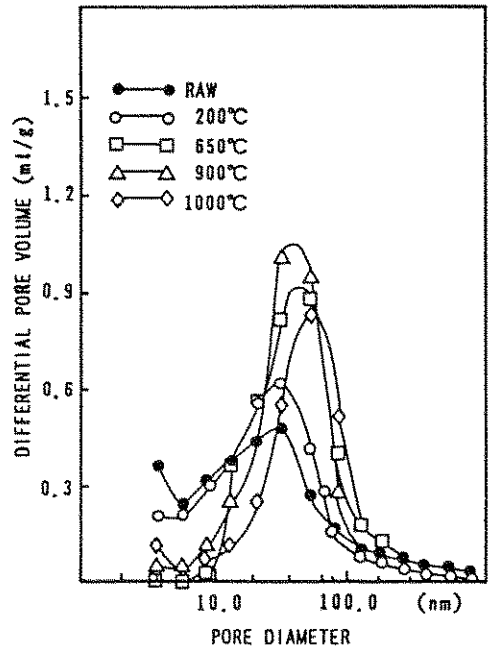


Fig. 3 Effect of heat treatment on the distribution of pore volume.

Intrusion volume vs. pore diameter was determined by autoporosimeter (Shimadzu auto-pore 9200). Differential intrusion volume vs. pore diameter was defined as distribution of pore volume.

クス素材であるムライトの同倍率の写真を示す。ムライトの表面には、1 μm × 2.9 μm 程度の比較的平滑な棒状の結晶が焼結したものが観察されるのに対し、SM-10 表面には数 10 nm の繊維状結晶の網目構造が特徴的に観察された。SM-10 の高い比表面積は、この網目構造に由来すると考えられる。

2.4 SM-10 と他の無機担体との酵素固定化量の比較

SM-10 の酵素固定化量を評価する為、実際にインペルターゼを固定化し、単位担体重量当りの発現活性を他の無機担体と比較した。その結果を Table 3 に示す。

Table 3 から SM-10 は、先に報告した酸処理コーディライト⁵⁾の 14 ないし 15 倍の活性を示すことがわかった。又、Messing らが考案した多孔質セラミックス¹¹⁾ (チタニアビーズ、アルミナビーズ) と比較した場合、SM-10 はおよそ 2 倍の活性

Table 2 Typical physical analysis of SM-10.

Pore Volume	0.73 ml/g
Pore Surface	77.7 m ² /g
Mean Pore Diameter	37.6 nm

Pore volume was analyzed by autoporosimeter (Shimazu auto-pore 9200). Surface area was calculated from the data of pore volume assuming that the pore shape was geometrical cylinder.

Mean pore diameter was obtained by dividing the pore volume by the pore area.

Table 3 Comparison of immobilized invertase activity on SM-10 and other supports.

Support	Chemical Component	Surface Area (m ² /g)	Pore Diameter (nm)	Immobilized Invertase Activity (U/g)
a) Cordielite	SiO ₂ , Al ₂ O ₃ , MgO	1	1~1000	50
Acid Treatment Codi.	SiO ₂ , Al ₂ O ₃ , MgO	~174	1~1000	93
Mulite	SiO ₂ , Al ₂ O ₃	1	1~1000	21
Acid Treatment Mu.	SiO ₂ , Al ₂ O ₃	1	1~1000	23
b) CPB-300	Silica Glass	68.4	34.7	1370
CPG-500	Silica Glass	56.2	52.4	1350
CPG-3000	Silica Glass	7.2	300.2	565
Alumina Beads	Al ₂ O ₃	—	—	800
Titania Beads	TiO ₃	—	—	615
c) SM-10	SiO ₂ , MgO	77.7	20~60	1450

Invertase was immobilized on inorganic supports. a) Common ceramics for automobile component.

b) Commercial supports for enzyme. c) Proposal support.

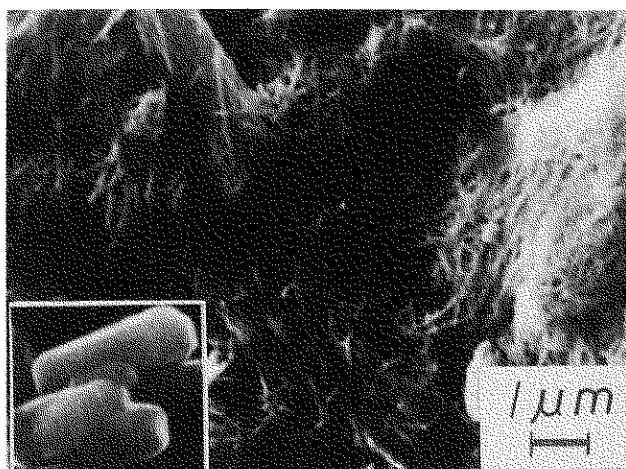


Fig. 4 Observation of SM-10 surface by electron microscope.

Observation by electron microscope was performed with Nihondenshi JSM-T100.

を示すことが判明した。

更に、比表面積が高く酵素固定化量の多い担体として高い評価を受けている多孔質ガラス¹¹⁾(CPG)と比較しても、SM-10は、同等以上の活性を示した。従ってSM-10は、酵素固定化用の担体として優れた性能を持つことが確認された。

2.5 SM-10を担体とした酵素固定化型バイオリアクターによるマルトシルサイクロデキストリン(G₂-CD)の合成

SM-10が酵素の固定化担体として優れていることが確認されたため、次にSM-10を充填した酵素固定化型バイオリアクターを試作し近年食品機能性材料として注目を集めているG₂-CDの合成系への適用を試みた。

このG₂-CDは、高濃度のCDとマルトースから枝切り酵素、プルラーナーゼの逆反応を利用して合

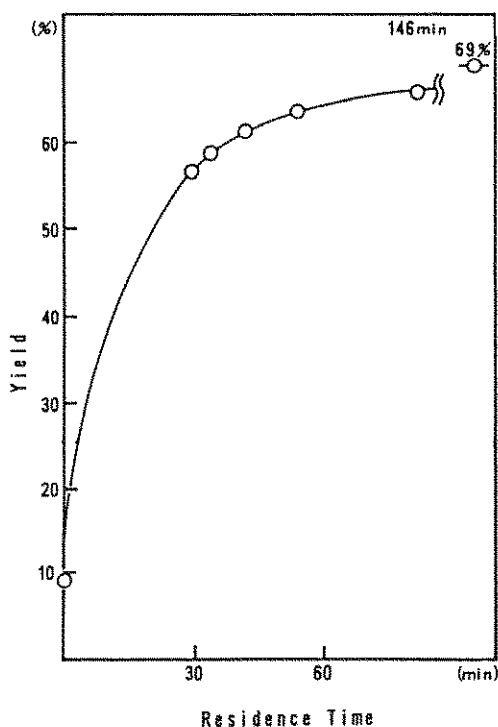


Fig. 5 The relationship of residence time and yield. Pullulanase was immobilized on SM-10 and packed in the multi column reactor. Then the different residence time was obtained and the yield was analyzed by HPLC.

成されることが坂野等により報告されている¹¹⁻¹⁴⁾。現在、G₂-CDは、同反応を利用し、工業的に生産されているが、プルラーナーゼは使い捨てであり、しかも反応に72時間という長時間を要している。

本研究ではまず、リアクターのG₂-CD合成速度を観察するため、カラム内滞留時間と分岐化率の関係を測定した。その結果をFig. 5に示す。

現在、工業的には、分岐化率57%のプロダクトを72時間という長時間を要して合成されているが、本リアクターにおいては、約30分という短い反応時間で分岐化率57%のプロダクトが生産可能となったことがわかる。これはリアクター内のSM-10上にプルラーナーゼが高密度に固定化され、高い発現活性を保持している為と考えられる。単位SM-10重量あたりのプルラン分解活性は、2000 U/gと測定された。SM-10の嵩比重が0.59 g/ml、リアクターボリュームに対する有効液容量が43%であることを考慮すると、リアクター内の有効液容量1 mlあたりに作用するプルラーナーゼ活性は2735 Uと算出される。

一方現行法ではプルラーナーゼが使い捨ての為、有効液容量1 ml当り20 Uのプルラーナーゼを添加するに留まっている。従って本酵素固定化型バイオリアクターの場合、1 ml当りに作用する酵素量は現行法の137倍に相当し、反応時間が約1/140に短縮したことと一致する。SM-10への固定化によるプルラーナーゼの高密度化が大幅な反応時間の短縮をもたらしたのと考えられる。この反応時間の短縮は、リアクター体積の縮小につながるものである。

反応時間の短縮よりリアクター体積の縮小を算出する上で、カラム充填式リアクターの場合、担体自体の体積を考慮する必要がある。すなわち、反応時間の1/140の短縮は、リアクターの有効液容量が1/140に縮小されることを意味し、担体自体の体積を考慮に入れるとG₂-CD合成用バイオリアクターの場合は現行反応槽のおよそ1/60に縮小されることになる。

更にG₂-CDの生産に於て、現行法では60°Cで72時間反応を行なうため反応物に着色がみられ脱色等の後処理工程が必要である。これに対し本

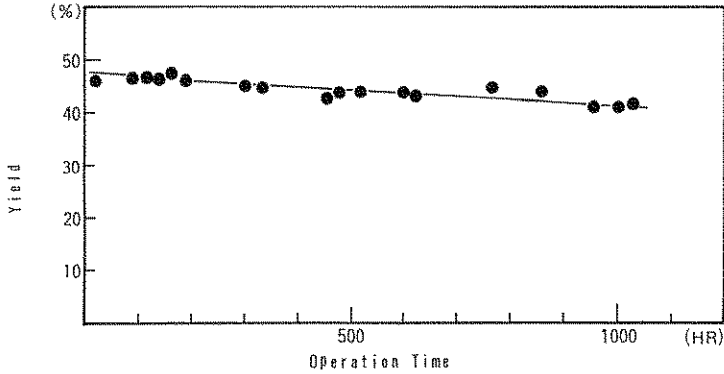


Fig. 6 Stability of immobilized pullulanase. Pullulanase was immobilized on SM-10 and packed in the column. Then the substrate (Mal: CD=4: 1, 78 % conc. pH 5.0) was fed in constant flow rate.

バイオリクターを使用すると、カラム内滞留時間が僅か 30 分であるため反応物への着色を大幅に軽減することが可能となる。

Fig. 6 に実験装置の連続運転結果を示す。尚、初期の分岐化率は反応系が化学平衡に近づく 60 % 以上はさけ、48 % に設定した。連続運転の結果、1000 時間後もなお初期分岐化率のおよそ 80 % を維持していた。

以上の結果より、SM-10 を担体とした酵素固定化型バイオリクターは、分岐サイクロデキストリン合成系において、酵素代の節約、装置規模の縮小等の多くのメリットを生むことが予想される。

(発酵工学会誌 Vol. 63, No. 4 より転載)

参考文献

- 1) 作花 濟夫：化学装置，3，52 (1983)。
- 2) 牧島亮男：多孔質セラミックスの開発・応用 (服部信，山事昭司)，p. 167，シーエムシー，東京 (1984)。
- 3) Messing, R. A.: *Process Biochem.*, 9, 26 (1974)。
- 4) 牧島亮男：多孔質セラミックスの開発・応用 (服部 信，山事昭司)，p. 79，シーエムシー，

東京 (1984)。

- 5) 寺内安子，川瀬三雄，馬島剛，日本農芸化学会大会講演要旨集 (昭和 61 年)
- 6) 竹内 和，鷺尾一裕：耐火物，41，297-303 (1987)
- 7) Messing, R. A., Weetall, H. H 公告特許公報 昭 55-32357
- 8) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, 193, p. 265 (1951)
- 9) Somogyi, M.: *J. Biol. Chem.*, 195, p. 19 (1952)
- 10) EATON D. L. PITCHER W. H.: AICHe National Meeting, Pittsburgh Pennsylvania No. 11D (1974)
- 11) 坂野好幸，白石尊憲，丹羽弘亮，公開特許公報 昭 61-70996
- 12) 坂野好幸，白石尊憲，丹羽弘亮，公開特許公報 昭 61-197602
- 13) 坂野好幸，白石尊憲，丹羽弘亮，公開特許公報 昭 61-236801
- 14) 坂野好幸，白石尊憲，丹羽弘亮，公開特許公報 昭 61-236802

〔筆者紹介〕



川測 三雄 (かわせ みつお)
昭和51年3月 名古屋大学工学
部応用化学合成
化学科卒業
昭和54年3月 東京大学工学部
工業化学修士過
程終了
昭和51年4月 岐阜大学教養学
部助手

昭和54年4月 日本碍子株式会社入社 環境装置, バ
イオリアクター等の開発に従事

現在 同社技術開発研究所 主任研究員

昭和63年3月 「多孔性セラミックスを利用した高温
メタン発酵用バイオリアクターの開
発研究」により日本水質汚濁研究協会
第1回技術賞受賞

Abstract

The authors had succeeded in developing a ceramic carrier for immobilizing enzyme by sintering smectite at 600~900°C. The carrier SM-10 was proved to yield higher invertase activity than any other inorganic materials tested.

Pullulanase, an enzyme for synthesizing branched cyclodextrin, was immobilized to the carrier SM-10. The retention time for the continuous bio-reactor with the immobilized enzyme, was reduced to about 1/140 of that for a conventional batch process with free enzyme.