

# マイクロチューブ内壁に固定化した酵素の反応特性\*

山崎 吉一\*\*  
町田 勇太\*\*  
諸岡 成治\*\*  
本田 健\*\*\*  
宮崎 真佐也\*\*\*,\*\*\*\*  
前田 英明\*\*\*,\*\*\*\*

## Reaction Characteristics of Enzyme Immobilized on Microtube Inner Surface

Yoshikazu YAMASAKI, Yuta MACHIDA, Shigeharu MOROOKA, Takeshi HONDA,  
Masaya MIYAZAKI and Hideaki MAEDA

Microreactor systems using miniaturized channels are being developed for efficient manufacturing of value-added multiproducts in small quantities. However, flow and reaction properties of immobilized microtube reactors have not been sufficiently understood. In this work,  $\alpha$ -chymotrypsin was immobilized on the inner surface of a PTFE microtube (i.d. 500  $\mu\text{m}$ ) by using glutaraldehyde and parahormaldehyde as cross linkers. In order to evaluate the amount of  $\alpha$ -chymotrypsin immobilized on the inner surface of the microtubes, the enzyme was desorbed, and hydrolyzed to amino acids. The enzyme concentration in the microtubes was of the order of 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , which was higher than enzyme concentrations used in conventional homogeneous batchwise reactors. The reactivity of the microtube reactors was then evaluated with a substrate, *N*-glutaryl-*L*-phenylalanine p-nitroanilide, by changing the residence time of the substrate in the microtubes. The initial reaction rates in the microtubes were compared with data obtained in a homogeneous batchwise reactor under the same reaction conditions (enzyme and substrate concentrations and reaction temperature). The initial reaction rates in the microtubes increased with increasing enzyme concentration even when the substrate concentration was equivalent to the enzyme concentration. The initial reaction rates in the homogeneous batchwise reactor decreased in the range of higher enzyme concentrations and were lower than those in the enzyme-immobilized microtubes.

*Key Words*: Microreactor, Immobilized Catalyst,  $\alpha$ -Chymotrypsin, *N*-glutaryl-*L*-phenylalanine p-nitroanilide, Reaction rate

### 緒言

マイクロ加工技術を応用したマイクロリアクタシステムの開発が進んでいる (Hessel *et al.*, 2004a; Hessel

*et al.*, 2004b). 現時点では、臨床検査や環境計測のための分析装置を組み込んだ分析チップ ( $\mu\text{TAS}$ ) の開発が先行している (Kitamori *et al.*, 2006; Oosterbroek and van den Berg, 2003). また、基質特異性がある酵

\* 平成20年4月3日受付

\*\* 化学システム工学科

\*\*\* 産業技術総合研究所ナノテクノロジー研究部門

\*\*\*\* 九州大学大学院総合理工学府物質理工学専攻

素を固定化したマイクロチャンネル反応系も開発されている(Gao *et al.*, 2001; Honda *et al.*, 2005; Honda *et al.*, 2006; Kaneno *et al.*, 2004; Křenková and Foret, 2004; Miyazaki *et al.*, 2004; Miyazaki and Maeda, 2006; Nakamura *et al.*, 2004). 酵素の分子識別能と、物理化学的計測を組み合わせる微量分析法は、医療、環境分析に利用されつつある。しかし、微量の分子、イオンなどの識別を目的とする分析装置の設計法は、少量とはいえ生産を目的とするマイクロリアクタシステムの設計法と異なるものであり、マイクロチャンネルに固定化した酵素の反応特性は十分に理解されたとは言い難い。マイクロチャンネルに固定化した連続反応系では、回分式均一反応系よりも反応速度が遅い可能性がある。その理由には、(1) 固定化のために酵素の活性が低下する、(2) チャンネルの内壁に固定化する系では、基質が酵素に到達するのに必要な時間(基質の拡散時間)が無視できない、などがある。これに対して、(1) 固定化によって酵素の安定性が増大する、(2) マイクロチャンネルの幅(または直径)を小さくすれば半径方向の拡散時間が無視できる、などもあり得る。

本研究では、 $\alpha$ -キモトリプシンをポリテトラフルオロエチレン(PTFE)製マイクロチューブ(内径 $500\mu\text{m}$ )の内壁に架橋重合法で固定化し、*N*-グルタルイル-*L*-フェニルアラニン *p*-ニトロアニリド(Glur-Phe-pNA)を基質として反応速度を測定する。固定化酵素マイクロチューブを切開して酵素を加水分解し、生成したアミノ酸を定量することによって、固定化した酵素量を求める。また、回分式均一反応系で同じ条件(酵素濃度、基質濃度、温度)で反応速度を測定する。両者を比較することによって、マイクロチューブ固定化酵素リアクタの特性を評価する。

## 1. 実験

### 1.1 酵素の固定化

酵素としては $\alpha$ -キモトリプシン(Calbiochem社製 Bovine Pancreas, Cat# 230832, モル質量  $25,100\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。酵素活性 $\alpha$ -キモトリプシン1236 USP U/mg, トリプシン 11 USP U/mg。担体等の不純物を含んでいない。液体クロマトグラフィーによるピークは単峰性。)を用い、リン酸緩衝液食塩水(PBS, pH=7.4)中に $20\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ の濃度に溶解した。架橋剤としては、グルタルアルデヒド(GA,  $\text{OHC}(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$ , 20%溶液)とパラホルムアルデヒド(PA,  $\text{OHC}(\text{CH}_2\text{O})_n\text{CHO}$ ,  $n\approx 400$ , 16%溶液)を用い、氷上でリン酸緩衝液(PB, pH=7.0)中に、所定の体積比(蒸留水:PB:PA:GA=20:40:20:1)となるように混合して調製した。

マイクロチューブとしては、内径 $500\mu\text{m}$ のPTFE管を長さ60, 120, 180または240mmに切り取って使用した。酵素溶液および架橋剤溶液をそれぞれマイクロシ

リンジに入れて送液し、三方コネクタを用いてマイクロチューブの直前で混合し、マイクロチューブ内に導入した。固定化温度は $4^\circ\text{C}$ 、各流量は $2.5\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ (管内平均流速 $0.21\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ )とし、所定の時間(10min-360min)連続して送液した。これによって、 $\alpha$ -キモトリプシンのリシンの側鎖アミノ基と、架橋剤のアルデヒド基が反応し、シッフ塩基を形成して重合体となり、マイクロチューブ内壁に重合膜状として固定化させた。固定化操作の後、トリス緩衝液(pH=7.6)を流量 $10\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ で送液し、架橋剤の未反応アルデヒド基を不活性化させた。固定化を行ったマイクロチューブは、その一部を切断して顕微鏡で観察し、内壁に膜状物質が付着していることを観察した。また、酵素を固定化したマイクロチューブは冷凍保存した。

### 1.2 固定化酵素量の定量

マイクロチューブに固定化した酵素の量は以下の手順で測定した。ただし、破壊測定であるので、後述する反応速度の実験の後に測定を行った。(1) 固定化酵素マイクロチューブ(長さ60mm)を正しく15mmに切断し、それぞれを試料とする。各区分試料は5ないし6mmに切断し、さらに縦に裂いて内壁を露出させる。(2) 酵素固定化マイクロチューブ片をメタノールに入れ、超音波を照射してチューブから酵素重合膜を剥離させる。(3) 遠心分離(12,000rpm, 5min)によって酵素重合膜を沈殿させた後、マイクロチューブ片を取り出す。(4) 沈殿物を再び懸濁させ、メタノールと共に耐圧バイアルに移し、減圧してメタノールを除去する。(5)  $6\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 塩酸を加え、ヘリウム雰囲気中で密栓し、115 $^\circ\text{C}$ で24時間、加水分解してアミノ酸にする。(6) 塩酸を蒸発除去する。(7) エタノール:蒸留水:トリエチルアミン:イソチオシアン酸フェニル(PITC)=7:1:1:1溶液を $20\mu\text{L}$ 加え、アルミホイルで遮光し、振動しながら室温で20min反応させ、アミノ酸をPITC誘導体化する。(8) 減圧して溶媒を除去する。(9) 誘導体化した代表的なアミノ酸(グリシン Gly, アラニン Ala, ロイシン Leu, イソロイシン Ile, セリン Ser, トレオニン Thr)を、酢酸ナトリウムおよびトリエチルアミン水溶液、ならびにアセトニトリル水溶液を溶離液として、高圧グラジエントHPLCで定量する。(10) アミノ酸の物質量から、固定化酵素の物質量を次式で算出する。

$$(\text{固定化した酵素の物質量}) = (\text{生成した当該アミノ酸の物質量}) / (\text{酵素 } 1\text{ mol 中の当該アミノ酸の物質量}) \quad (1)$$

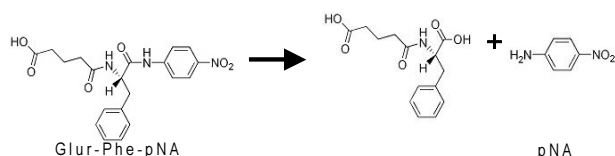
$$(\text{固定化した酵素の質量}) = (\text{固定化した酵素の物質量}) \times (\text{酵素のモル質量}) \quad (2)$$

なお、 $\alpha$ -キモトリプシンの組成は Enzyme Database BRENDA に依った。指標に使用したアミノ酸のモル構成比は、Gly:Ala:Leu:Ile:Ser:Thr=23:22:19:

10 : 27 : 22である。

### 1.3 酵素反応速度の測定

酵素固定化マイクロチューブの反応活性は、以下の加水分解反応で評価した(Abuin *et al.*, 2005)。



基質の *N*-グルタリル-*L*-フェニルアラニン *p*-ニトロアニリド (*N*-glutaryl-*L*-phenylalanine *p*-nitroanilide, Glur-Phe-pNA, MP Biomedicals)を10 mg - 20 mg 量り取り、ジメチルスルホキシド(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SOに溶解した。ついで、PBSを加えてGlur-Phe-pNA溶液の濃度を333, 500あるいは1000 μmol・L<sup>-1</sup>に調整した(冷暗所保存)。

酵素固定化マイクロリアクタの長さが60 mm の場合は、その長さのまま反応速度の測定実験に供した。長さが120, 180および240 mm の場合は60 mm に切り揃え、入口からの場所と反応速度との関係も調査した。基質溶液は、24 においてマイクロチューブ中に送入市、マイクロチューブ体積の約2倍量捨てた後、試料として約200 μL を採取した。生成したパラニトロアニリン(pNA)の濃度は吸光度を測定して定量した。pNAの最大吸収波長は375 nm 付近であるが、Glur-Phe-pNAの吸収が400 nm 付近まで見られたので、吸収波長400 nm で測定した。pNAの検量線は、0.1 mol・L<sup>-1</sup> 酢酸を加えても変化がないことを確認した。なお、酵素固定化マイクロチューブの長さを考慮し、マイクロチューブ内の基質溶液の滞留時間が10 s - 50 s となるように、送液速度を変化させて実験した。

酵素が均一溶液となっているときの反応活性は、以下の方法で測定した。(1) 所定の酵素濃度の1/2となるように酵素のPBS溶液を調製し、エッペンチューブに量り取り、24 に保つ。(2) 基質(Glur-Phe-pNA)の濃度が1000 μmol・L<sup>-1</sup>のPBS溶液を調製し、24 に保つ。(3) 酵素溶液と同量の基質溶液をエッペンチューブに加え、反応を開始させる(この時点を経験時間0 min と置く)。(4) ただちに振とう器で混合し、速やかに24の恒温槽に入れる。(5) 所定の反応時間後に反応停止剤として0.1 mol・L<sup>-1</sup> 酢酸を加え、ただちに振とう器で混合する(1,250 rpm, 5 s)。(6) 溶液の上澄みをバイアルに量り取り、PBSで希釈する。(7) 希釈溶液中のpNA濃度を分光光度計で測定する。

## 2. 結果および考察

**固定化酵素の有効濃度** 本実験条件では、マイクロチ

ューブ内に基質が滞留する時間は数10 s である。Glur-Phe-pNA のモル質量 (399 g・mol<sup>-1</sup>) を考慮すると、常温における Glur-Phe-pNA の拡散係数 *D<sub>L</sub>* は10<sup>-9</sup> m<sup>2</sup>・s<sup>-1</sup> 程度と考えられるので、最も短い反応時間 *t* = 10 s で基質が拡散する距離は次式で表される。

$$\sqrt{D_L t} = \sqrt{(10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}) \times (10 \text{ s})} = 10^{-4} \text{ m} \quad (3)$$

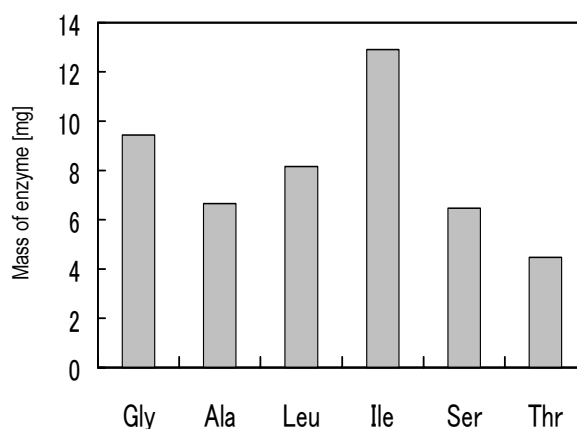
この値はマイクロチューブの半径 (2.5 × 10<sup>-4</sup> m) と同じ桁である。したがって、マイクロチューブの壁付近にある基質が、内壁に薄膜状に固定化されている酵素と反応して消費されると、壁から離れた位置にある基質が拡散して補給されると見なし得る。基質が酵素膜内を拡散するのに要する時間を無視すると、固定化された酵素と基質はマイクロチューブの体積内で均一に存在すると仮定できる。この酵素濃度をマイクロチューブ内の酵素の擬均相濃度とすると、次式で与えられる。

(マイクロチューブ内の酵素の擬均相濃度) =

$$(\text{固定化された酵素の質量}) \times \frac{4}{\pi d^2 l} \quad (4)$$

ここに、*d* はマイクロチューブの直径 (500 μm), *l* はマイクロチューブの長さである。ただし、酵素は重合膜内に固定化されていることと、基質の拡散速度も有限であることから、マイクロチューブ内に固定化された酵素の擬均相濃度は、Eq.(4) で算出される値よりも小さいであろう。

本実験では、全長120, 180, 240 mm のマイクロチューブの場合には、長さ60 mm に切断して反応速度の測定に供しているため、反応後には全てのマイクロチューブの長さは60 mm となっている。そこで、60 mm のチューブを15 mm ごとに4個に切断し、それぞれについて酵素を加水分解して、得られたアミノ酸を定量することとした。Figure 1 には、固定化時の長さが60 mm のマイ



**Fig.1** Mass of immobilized α-chymotrypsin based on amino acids produced by hydrolysis.

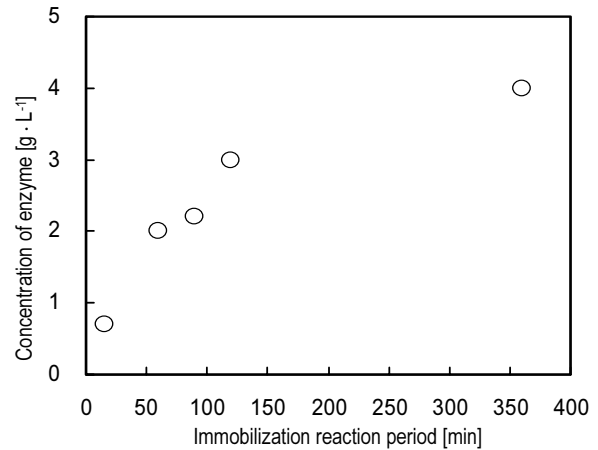
Initial microtube length = 60 mm, immobilization reaction period = 120 min, enzyme concentration in this microtube = 2.5 g・L<sup>-1</sup>

クロチューブを用いて、120分間固定化反応を行った後、15 mm ごとに切断したチューブのうち、入口から2番目のチューブの場合を例として示す。同図の縦軸は、 $\alpha$ -キモトリプシン分子に含まれる各アミノ酸の分子数に基づき、代表的アミノ酸の生成量を用いて Eq.(2) から算出した  $\alpha$ -キモトリプシンの質量である。Figure 1 に示すように、固定化した  $\alpha$ -キモトリプシンの質量は着目するアミノ酸でばらつくので平均値をとると、入口から2番目のチューブについては  $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  となった。ちなみに、入口から1番目の15 mm の酵素濃度は  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、3番目は  $4.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、出口の4番目は  $4.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  であった。固定化時の長さが60 mm のマイクロチューブについては、その他の反応時間で固定化した試料についても、入口の15 mm の酵素濃度は低く、出口に近づく酵素濃度が増大した。Figure 2 は、固定化時の長さが60 mm のマイクロチューブについて、固定化酵素の擬均相濃度に及ぼす酵素固定化時間の影響を示す。固定化時間0 ~ 120 min の間では、酵素固定化時間を長くするほど酵素の擬均相濃度が増大するが、固定化時間200 min 以上では酵素の擬均相濃度が増加する傾きは小さくなった。

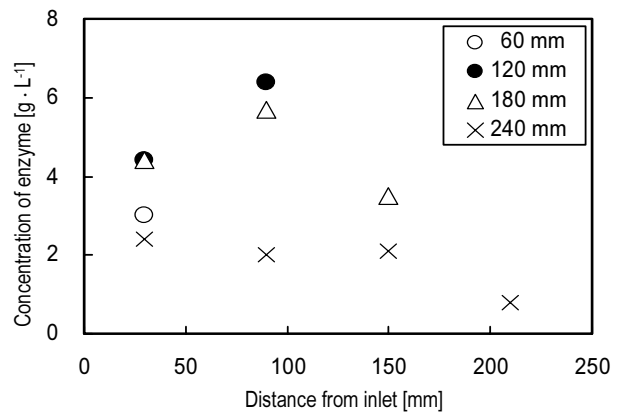
Figure 3 は、固定化酵素の擬均相濃度に及ぼすマイクロチューブ入口からの距離、ならびに固定化反応時のマイクロチューブ長さの影響を示す。ただし、固定化反応時における入口からの距離とは、分析のため切断したマイクロチューブを連結したとき、各切断区間の中間の位置を入口から加算した値であり、30, 90, 150 および 210 mm である。また、固定化反応時の長さが60 mm のマイクロチューブについては、入口からの距離が30 mm におけるデータのみとなる。入口からの距離が長くなると、固定化酵素の擬均相濃度が減少する傾向がある。

本実験で調製したマイクロチューブ内の酵素の擬均相濃度は  $1 - 6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  の範囲にある。 $\alpha$ -キモトリプシンのモル質量 ( $25,100 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) を考慮して換算すると、固定化酵素の擬均相モル濃度は  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  の桁となり極めて高い。Miyazaki *et al.* (2004) は、直径  $320 \mu\text{m}$ 、長さ  $200 \text{ mm}$  の溶融シリカマイクロチューブの内壁を修飾し、cucumisin を固定化している。固定化後の酵素量は  $130 \text{ pmol}$  であるので、マイクロチューブ内の酵素の擬均相濃度を Eq.(4) で計算すると約  $8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  となる。この値は、本実験による重合膜法で固定化した場合に比べて1桁小さい。また Honda *et al.* (2006) は、内径  $500 \mu\text{m}$ 、長さ  $130 \text{ mm}$  の PTFE チューブ内壁に、架橋剤として GA と PA を用いてアシラーゼを固定し、 $3.25 \text{ nmol}$  が固定されたと報告している。Eq.(3) を用いてマイクロチューブ内の酵素濃度に換算すると約  $130 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  となり、本実験の結果と同等である。

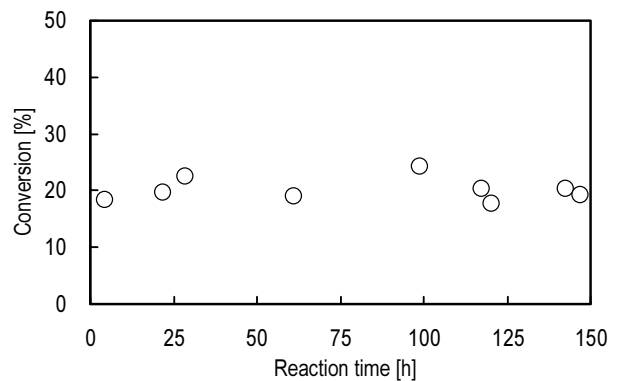
**酵素反応特性** まず、マイクロチューブに固定化した



**Fig.2** Effect of immobilization reaction period on enzyme concentration averaged over the 60-mm microtube. Initial microtube length = 60 mm



**Fig.3** Axial distribution of enzyme concentration in microtube reactors. Immobilization reaction period = 120 min



**Fig.4** Stability of an enzyme immobilized microtube reactor. Initial microtube length = 60 mm, substrate concentration =  $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

酵素の安定性を調査した。基質濃度を  $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  として連続運転したところ、Figure 4 に示すように、150時間が経過しても反応活性がほぼ一定であることが分かった。したがって、酵素を固定化したマイクロチューブを用いた以下の実験中に、酵素が剥離・流出することはない。

Figure 5 は、固定化反応時の長さ60 mm、固定化時間120 min のマイクロチューブについて、生成物である pNA の濃度と、基質がマイクロチューブ内に滞留する時間との関係を示す。基質の10 - 20%が反応するまで、pNA は滞留時間とともに直線的に増加するので、近似直線の傾きから初反応速度  $[\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}]$  を算出した。他のマイクロチューブについても、同様にして初反応速度を算出した。

Figure 6 は、長さが60 mm のマイクロチューブを用いた場合について、初反応速度と酵素固定化時間の関係を示す。データは基質濃度が  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  の場合であり、固定化酵素の擬均相濃度は Figure 2 に対応している。Figure 2 と Figure 6 を比較すると、固定化時間が長くなると酵素の擬均相濃度が増加し、初反応速度も増加することが見て取れる。Figure 7 は、Figure 3 に対応する条件における初反応速度を示す。Figure 3 と 7 の関係は、Figure 2 と 6 の関係と類似している。

そこで、チューブの長さおよび固定化時間を変えて調製した酵素固定化マイクロチューブについて、供給基質濃度を  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  とし、初反応速度と Eq.(4) を用いて算出したマイクロチューブ内の酵素の擬均相濃度との関係を調べた。Figure 8 に示すように、初反応速度と酵素の擬均相濃度は単調増加の関係となった。他の基質濃度についても同様な関係が認められた。

酵素と基質を均一に溶解させた回分式反応系について、基質の初濃度を  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  とし、酵素の均一相濃度を  $0.4 - 27 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  の範囲で変えて、初反応速度を測定した。その結果を Figure 8 に示す。均一相酵素反応系の初反応速度は、固定化酵素マイクロチューブでの初反応速度に比べて小さく、一旦は酵素濃度の増大とともに増大するが、酵素濃度が  $10 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  以上となると、酵素濃度が増大しても初反応速度は余り変化しなかった。なお、マイクロチューブ内の固定化酵素の擬均相濃度が、拡散抵抗によって Eq.(4) を用いて算出した値よりも小さいとすれば、 $k$  固定化系と均一系の初反応速度の差はさらに拡大する。 $k_{-1}$

通常の酵素反応は、酵素 E と基質 S が結合して酵素 - 基質複合体 ES を形成し、ついで ES が酵素 E と生成物 P に分解する。



酵素に比べて基質が過剰にある場合 ( $[S] \gg [E]$ )、酵素のほとんどの活性部位に基質が結合しており、ES

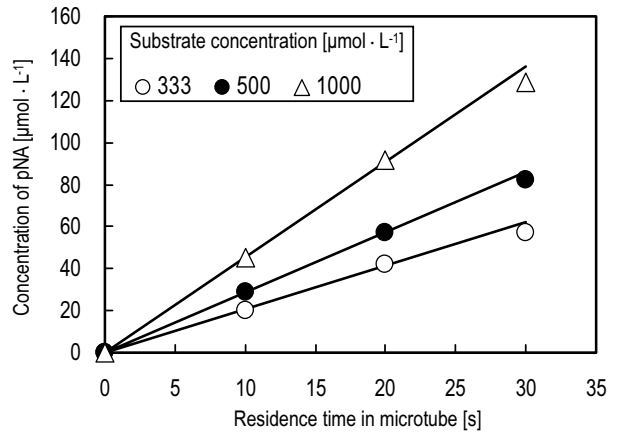


Fig.5 Changes in outlet pNA concentration. Immobilization reaction period = 120 min, initial microtube length = 60 mm

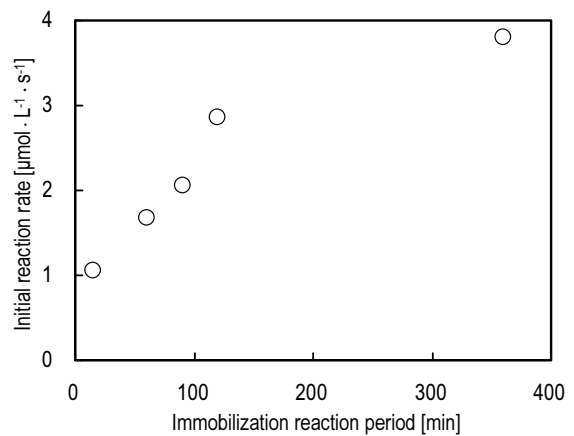


Fig.6 Effect of immobilization reaction period on initial reaction rate.

Initial microtube length = 60 mm, substrate concentration =  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

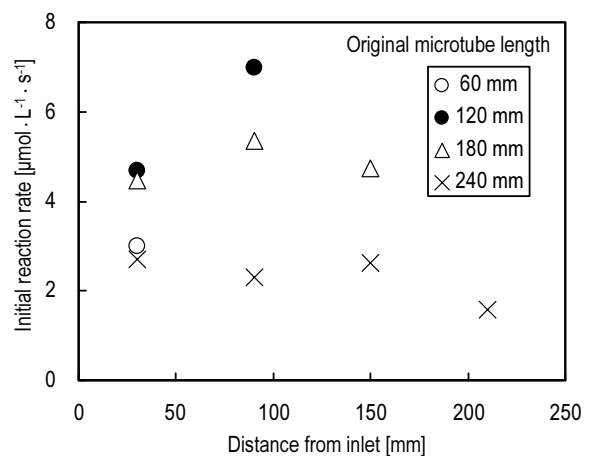


Fig.7 Axial distribution of initial reaction rate in microtube reactors.

Immobilization reaction period = 120 min, substrate concentration =  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

の濃度 [ES] は擬定常となって変化しない。このときの反応速度  $r$  はミカエリス-メンテン式で表される。

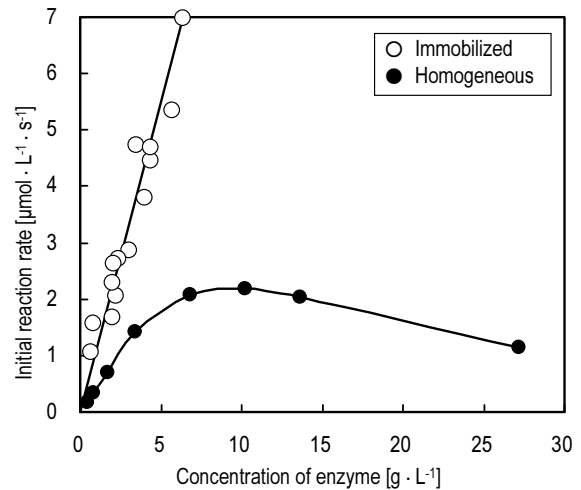
$$r = \frac{k_2[E][S]}{K_M + [S]} \quad K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \approx \frac{k_2}{k_1} \quad (6)$$

これに対し本実験で調製したマイクロチューブ内の酵素の擬均相濃度では、ミカエリス-メンテン式的前提条件 ( $[S] \gg [E]$ ) が成り立たず、基質のモル濃度  $[S]$  と酵素のモル濃度  $[E]$  は同じ桁となる。均一相反応系で酵素が多量に存在すると、酵素の活性サイト以外のサイトに吸着する基質の量が多くなり、実質的に基質濃度が低下する可能性がある。これが実際に起こると仮定すれば、Figure 8 に示した初反応速度が低下する結果が説明できる。Abuin *et al.* (2005) は、 $\alpha$ -キモトリプシンによる Glur-Phe-pNA の加水分解速度に及ぼす界面活性剤 (dodecyltrimethylammonium bromide, DTAB) の添加濃度の影響を調べ、DTAB の濃度が高くなると反応速度が大幅に低下することを見出した。吸着によって基質濃度が実質的に低下したとしている。

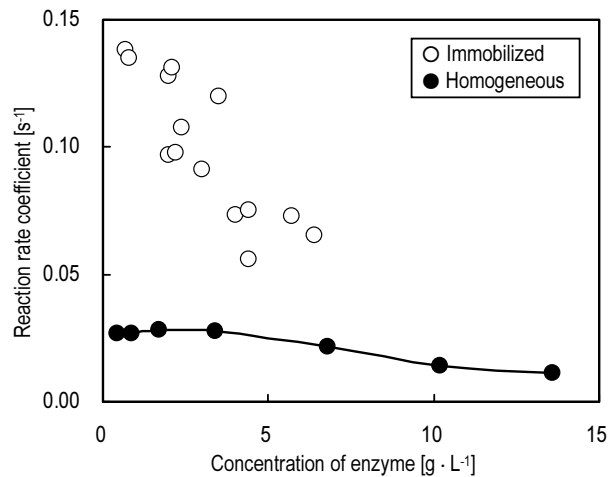
一方、固定化酵素マイクロチューブでは、基質は連続的に供給されるので、基質が酵素へ吸着する現象は、送液を開始した初期段階で達成される。それ以降、酵素の活性サイトは基質で飽和されるであろう。したがって反応開始時を除いて基質濃度の低下はないので、初反応速度は酵素の擬均相濃度とともに増大する。Figure 9 には、酵素と基質の濃度を変えて初反応速度を測定し、Eq.(6) が成り立つとして算出した  $k_2$  を示す。固定化酵素マイクロチューブでの値は、均一相反応系よりも大きい。したがって、本実験で調製した固定化酵素マイクロチューブでは、ミカエリス-メンテン式は成り立たない。

**結 言**

PTFE 製マイクロチューブ (内径500  $\mu\text{m}$ ) の内壁に、 $\alpha$ -キモトリプシンを架橋法で固定化した。固定化酵素マイクロチューブを切開して酵素を加水分解し、生成したアミノ酸を定量し、固定化した酵素量を求めた。また、*N*-グルタリル-*L*-フェニルアラニン *p*-ニトロアニリドを基質とし、固定化酵素マイクロチューブにおける初反応速度を測定した。マイクロチューブ内で、基質が内径方向の拡散に要する時間は液の滞留時間よりも短いので、酵素は固定化されているに拘わらずマイクロチューブ内に均一に溶けていると見なすことができ、その濃度 (擬均相濃度) を Eq.(4) で近似した。調製した固定化酵素マイクロチューブにおける酵素の擬均相濃度は  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  の桁となった。また、回分式均一反応系で同じ条件で初反応速度を測定したところ、固定化酵素マイクロチューブにおける値よりも小さかった。均一相反応系で酵素が多量に存在すると、酵素の活性サイト以外のサイトに吸



**Fig.8** Effect of enzyme concentration on initial reaction rate for enzyme immobilized microtubes and homogeneous reaction. Substrate concentration =  $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$



**Fig.9** Effect of enzyme concentration on reaction rate coefficient in Michaelis-Menten equation.

着する基質の量が多くなり、実質的に基質濃度が低下すると推定した。また、固定化酵素マイクロチューブでは、基質は連続的に供給されるので、基質が酵素へ吸着する現象は送液を開始した初期段階で達成され、それ以降の基質濃度の低下はないと推定した。

**謝 辞**

本研究は科研費基盤研究 (B) (課題番号60011079) の補助を受けている。実験では、安部祐一郎君、川崎慎一君、一宮聖君、徳永康浩君の協力を得た。

**Literature Cited**

Abuin, E., E. Lissi and R. Duarte; “Kinetics of *N*-glutaryl-*L*-phenylalanine *p*-nitroanilide Hydrolysis

- Catalyzed by  $\alpha$ -Chymotrypsin in Aqueous Solutions of Dodecyltrimethylammonium Bromide,” *J. Colloid Interface Sci.*, **283**, 539-543 (2005)
- Enzyme Database BRENDA  
<http://www.brenda.uni-koeln.de/index.php4?page=sequences/seq.php4?ID=13100>
- Gao, J., J. Xu, L.E. Locascio and C.S. Lee; “Integrated Microfluidic System Enabling Protein Digestion, Peptide Separation, and Protein Identification,” *Anal. Chem.*, **73**, 2648-2655 (2001)
- Hessel, V., S. Hardt and H. Löwe; *Chemical Micro Process Engineering: Fundamentals, Modelling and Reactions*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany (2004)
- Hessel, V., H. Löwe, A. Müller and C. Colb; *Chemical Micro Process Engineering: Processing and Plants*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany (2005)
- Honda, T., M. Miyazaki, H. Nakamura and H. Maeda; “Immobilization of Enzymes on a Microchannel Surface through Cross-linking Polymerization,” *Chem. Commun.*, 5062-5064 (2005)
- Honda, T., M. Miyazaki, H. Nakamura and H. Maeda; “Facile Preparation of an Enzyme-immobilized Microreactor Using a Cross-linking Enzyme Membrane on a Microchannel Surface,” *Adv. Synth. Catal.*, **348**, 2163-2171 (2006)
- Kaneno, J., R. Kohama, M. Miyazaki, M. Uehara, K. Kanno, M. Fujii, H. Shimizu and H. Maeda; “Development of Surface Modification Method and Its Application for Preparation of Enzyme-immobilized Microreactor,” *Kagaku Kogaku Ronbunshu*, **30**, 154-158 (2004)
- Kitamori, T., H. Fujita and S. Hasebe (eds.); *Micro Total Analysis Systems 2006*, Tokyo (2006)
- Křenková, J. and F. Foret; “Immobilized Microfluidic Enzymatic Reactors,” *Electrophoresis*, **25**, 3550-3563 (2004)
- Licklider, L. and W.G. Kuhr; “Characterization of Reaction Dynamics in a Trypsin-modified Capillary Microreactor,” *Anal. Chem.*, **70**, 1902-1908 (1998)
- Miyazaki, M., J. Kaneno, R. Kohama, M. Uehara, K. Kanno, M. Fujii, H. Shimizu and H. Maeda; “Preparation of Functionalized Nanostructures on Microchannel Surface and Their Use for Enzyme Microreactors,” *Chem. Eng. J.*, **101**, 277-284 (2004)
- Miyazaki, M. and H. Maeda; “Microchannel Enzyme Reactors and Their Applications for Processing,” *TRENDS Biotechnol.*, **24**, 463-470 (2006)
- Nakamura, H., X. Li, H. Wang, M. Uehara, M. Miyazaki, H. Shimizu and H. Maeda; “A Simple Method of Self Assembled Nano-particles Deposition on the Micro-capillary Inner Walls and the Reactor Application for Photo-catalytic and Enzyme Reactions,” *Chem. Eng. J.*, **101**, 261-268 (2004)
- Oosterbroek, R.E. and A. van den Berg (eds.); *Lab-On-A-Chip: Miniaturized Systems for (Bio) Chemical Analysis and Synthesis*, Elsevier B.V., Amsterdam, Netherlands (2003)