

# キトサン-アルギン酸コア・シェル担体の調製と評価

前田 良輔・坂井 里菜\*

## Preparation and characterization of chitosan-alginate core-shell type support

Ryosuke MAEDA, Rina SAKAI\*

### Abstract.

Core-shell type support which is composed of chitosan core and alginate shell was prepared for the purpose of a immobilization of enzymes. Both chitosan and sodium alginate solution easily gelate with electrostatic crosslinking using sodium tripolyphosphate (NaTPP) and calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>) solution, respectively. The alginate shell is very stable in the solution of pH 1 to 10. On the other hand, chitosan core liquefied for pH 1 and 2 in the first period of several hours, which suggest elution of crosslinker TPP from chitosan matrices by acidic solution. This behavior is not negative information but very interesting and valuable to immobilization of enzyme. In this paper, we prepared core-shell type support consisting of chitosan and alginate, then investigated the elution properties of amino acid and protein containing in the core.

Key words : Chitosan, Alginate, Core-shell type support, Immobilized enzyme

### 1. 諸言

酵素や微生物のような生体触媒の固定化は、医薬、食品など様々な産業において重要とされるキーテクノロジーであり、これまで多くの研究成果が発表されてきた。そして固定化用担体およびその調製段階において重要な特徴は、少なくとも次の3点が挙げられる。①容易に分解・変性しないこと、②酵素や微生物の失活を防ぐなど生体触媒への適合性に優れること、そして③酵素と基質の反応が十分進行すること。そこで、本研究では Fig. 1 に示すようなキトサン及びアルギン酸ナトリウムの2種類の生体高分子を用いて Fig. 2 に示すようなコア・シェル構造を有する担体を調製し、二段階の酵素反応が同時に行えるような固定化酵素担体への応用に関する基礎的な研究を行うことを目的とする。

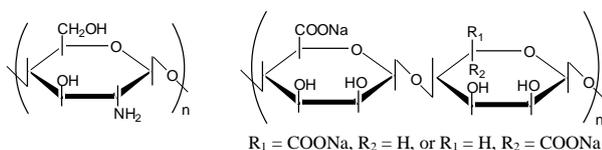


Fig. 1 Chemical structures of (a) chitosan and (b) sodium alginate.

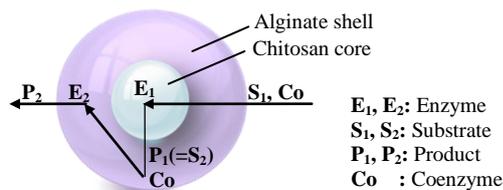


Fig. 2 Schematic representation of core-shell type immobilized enzyme.

### 2. 実験方法

#### 2.1 試薬

キトサンは大日精化工業(株)製脱アセチル化度 100%のものを使用した。酢酸、トリポリリン酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、ペルオキソ二硫酸カリウム、アスコルビン酸、ビス[(+)-タルトラト]二アンチモン(III)酸二カリウム三水和物(酒石酸アンチモニルカリウム)、アミノ酸、プロテインアッセイ CBB 溶液(5倍濃縮)はナカライテスク(株)、アンモニア水、グルタルアルデヒド溶液は関東化学(株)、モリブデン酸アンモニウム(4水和物)粉末はキシダ化学(株)、ニンヒドリンは和光純薬工業(株)、牛血清アルブミンは Sigma-Aldrich Co. より入手し、いずれの試薬もさらなる精製は行わずに使用した。

#### 2.2 キトサンコアの調製

担体の調製は、Ispas らの手法<sup>1)</sup>を改良し、以下のように行った。0.1 M 酢酸で調製した 1.25%キトサン溶液( $M_w 5.1 \times 10^5$ )を 1.5%トリポリリン酸ナトリウム(NaTPP)浴中に攪拌しながら、注射器を用いて滴下し凝固させた。全て滴下した後、1時間攪拌を行った。こうして得られたビーズをキトサンコアと呼び、コアの pH 安定性を調べるため、pH 1~11 に調整した 0.2 M HCl-NH<sub>3</sub>緩衝液 40 ml とコア 10 粒をバイアル瓶中、30℃下で 20 分~4 日間穏やかに振とうし、コアの状態を目視により観察した。

#### 2.3 アルギン酸シェルの調製

上で得られたキトサンコアを回収し、2%グルタルアルデヒド溶液に入れ、10 分間浸漬した。その後さらに 0.34 M CaCl<sub>2</sub> 溶液に浸漬し、続いて 2%アルギン酸ナトリウム溶液に移した。この時点で、ある程度凝固したシェルが形成されるが、完全な架橋のため再び 0.34 M CaCl<sub>2</sub> 溶液に浸漬した。ここで得られた 2 層からなる担体をコア・シェル担体として回収した。(以後、担体と呼ぶ。)完成した担体の pH 安定性を調べるため、pH 1~11 に調整した 0.2 M HCl-NH<sub>3</sub>緩衝液 40 ml と担体

\*本校専攻科物質化学工学専攻

3 個をバイアル瓶中、30℃下で 30 分～2 日間振とうし、担体の状態を観察した。さらに、pH 1 でのコアの消失について調べるため、pH 1～11 に調製した 0.2 M HCl-NH<sub>3</sub> 緩衝液 40 ml と担体 2 個をバイアル瓶中、30℃下で 30 分～6 時間穏やかに振とうし、各時間の担体の状態を目視により観察した。

#### 2.4 TPP の溶出挙動

担体 5 個を、pH 1 に調整した 0.2 M HCl-NH<sub>3</sub> 緩衝液 40 ml、バイアル瓶中、30℃下で穏やかに振とうし、30 分から 6 日間の間でろ液を回収した。その後、ろ液中の TPP をペルオキソ二硫酸カリウム分解法とモリブデン青法を組み合わせた手法で定量した。また、検量線はリン酸二水素ナトリウム二水和物を標準物質としてリン酸二水素ナトリウム二水和物の濃度 (5, 10, 20, 40, 50 μM) に対するモリブデンブルーの吸収極大波長 888 nm における吸光度を紫外可視分光光度計(島津製作所製 UV-1240)を用いて測定した結果から作成した。

ペルオキソ二硫酸カリウム分解法では、回収したろ液にペルオキソ二硫酸カリウム溶液を加え、オートクレーブ(ALP 社製 TR-24S)により 120℃、30 分間高温・高圧で処理を行った。

#### 2.5 アミノ酸およびアルブミンの溶出挙動

担体の調製は 2.3 の通りとし、コアを調製する段階でアミノ酸(グリシン)及び BSA が 0.1 M になる様添加した担体を調製した。さらに、担体からのアミノ酸及び BSA の溶出挙動を調べるために、このアミノ酸及び BSA 含有担体 5 個を pH 1 の緩衝液 40 ml 中で穏やかに振とうし、10 分～2 日間の間で所定時間毎にろ液を回収した。また、アミノ酸の溶出量はニンヒドリン法<sup>2)</sup>、BSA の溶出量は色素結合法(CBB 法)<sup>3)</sup>により定量した。また、アミノ酸の検量線は、アミノ酸濃度(1～3 mM) に対するニンヒドリン法によるルーエンマン・パープルの吸収極大波長 568 nm における吸光度をとり作成した。一方、CBB 法は、0.1～1.0mg/ml のアルブミン溶液を用いて波長 280nm で BSA 濃度を決定した後(A<sub>280</sub><sup>1%</sup>=6.6)、各アルブミン溶液 100 μl に 5 倍希釈した CBB 溶液 5ml を加え試験管ミキサーで攪拌し、10 分間静置後、波長 595nm で吸光度を測定し、CBB によるアルブミンの検量線を作成した。

### 3 結果と考察

#### 3.1 キトサンコアの調製

キトサンコアは NaTPP 溶液中に滴下後、直ちに凝固し形成され、Fig. 3 に示すような直径 2～3 mm の白色球状であった。このゲル形成は酸性溶液中でのキトサン分子中のプロトン化したア



Fig. 3 Photograph of chitosan core.

ミノ基と TPP の間の静電的な相互作用(Fig. 4)

が主な原因であり、寄与は小さいながら NaTPP 溶液により pH が変化したことによる不溶化による凝固も関与している。キトサンコアの pH 安定性は、pH 1 及び 2 で消失し、pH 3 以上では長時間安定であることが分かった。またキトサンコアの減圧乾燥を行ったところ、キトサンコアは収縮し硬化したことから乾燥したキトサンコアを担体として今後用いるのは困難であると考えられる。したがって、本研究ではキトサンコアは調製後は湿潤状態で保存した。

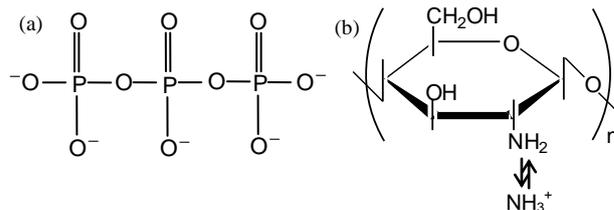


Fig. 4 Chemical structures of (a) TPP and (b) chitosan.

また、得られたキトサンコアを 2% グルタルアルデヒド水溶液中で架橋反応を行い、0.34 M CaCl<sub>2</sub> 溶液に浸漬したところ、10 分以上浸漬したキトサンコアは Fig. 5 から明らかのように脆く崩壊しやすくなることがわかった。そのため、2% グルタルアルデヒド溶液による架橋処理は行わずにコアの調製を行った。



Fig. 5 The chitosan core after crosslinking by glutaraldehyde for over 10 min..

キトサンとグルタルアルデヒドの架橋反応は、グルタルアルデヒドのカルボニル基とキトサンのアミノ基によるイミンの形成によるものである。キトサンのアミノ基(第一級アミン)の窒素原子上に存在する非共有電子対は、グルタルアルデヒドのカルボニル炭素原子に対して窒素系の求核試薬として作用する。その結果、炭素-窒素間の二重結合を形成する。グルタルアルデヒドには、カルボニル炭素が対称的に二つ存在するため、キトサンの分子鎖間あるいは同一分子内のアミノ基間での架橋剤として作用する。このグルタルアルデヒドはキトサンと反応していた TPP と置換して反応するため、キトサンコアが剛直になり崩壊しやすくなったと考えられる。

#### 3.2 アルギン酸シェルの調製

アルギン酸シェルは Fig. 6 に示すように、キトサンコアの周辺に形成され、最終的に調製された担体として直径約 5 mm となった。このアルギン酸シェルは、Fig. 7 に示すようにアルギン酸ナトリウムが Ca<sup>2+</sup> によるイオン架橋で容易に透明なゲルとして凝固した。



Fig. 6 Photograph of alginate shell formed around the chitosan core.

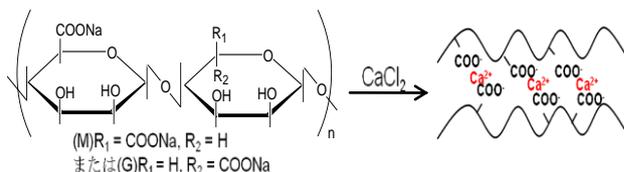


Fig. 7 Schematic representation of formation of alginate shell by electrostatic interaction between alginate ion and calcium ion.

得られた担体の pH 安定性において、シェルは pH 1～11 の範囲で安定に存在し、コアは Fig. 8 から明らかのように pH 1 で処理すると白色から透明となり、pH 3 ではほとんど変化し

ていないことが明らかである。さらに Fig. 9 では pH 1 での処理時間が 20 分と 48 時間の違いを示している。Fig. 8 及び Fig. 9 より、コアシェル担体を pH 1 で処理することにより、時間と共にコアが液状化することを見出した。このコアの液状化は、Fig. 10 に示した Shu と Zhu の研究結果<sup>4)</sup>から明らかのように、最初キトサンと TPP の電荷数が 3 以上あったのに対し、pH 1 に近づくことによって TPP の電荷数が 1 以下になる。その結果、キトサンと TPP 間の静電的な相互作用が起こりにくくなったことによるものと考えられる。

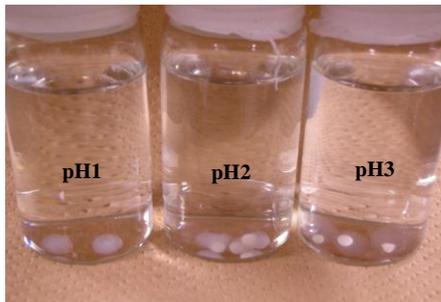


Fig. 8 The core-shell support incubated in the solution of pH 1, 2, and 3.

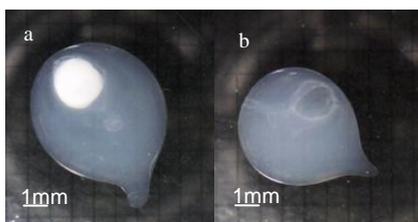


Fig. 9 Images of the core-shell type support treated at pH 1 for 20 min (a) and 48 h (b).

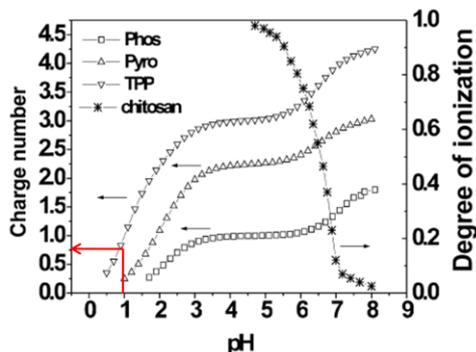


Fig. 10 The pH-dependent charge number of Phos, Pyro and TPP, and the degree of ionization of chitosan. (Shu and Zhu. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 54, 235-243 (2002))

### 3.3 コアからの TPP の溶出

pH 1 におけるコアの消失を外部溶液中に溶出した TPP 濃度を追跡することで確認するため、ペルオキシ二硫酸カリウム分解法とモリブデン青法を合わせた定量法を確立した。はじめに Fig. 11 にリン酸二水素カリウム濃度(5, 10, 20, 40, 50  $\mu\text{M}$ ) に対するモリブデンプールの吸収極大波長 888 nm における吸光度をとった検量線を示した。検量線は、良好な直線関係を示した。今後 TPP の定量にはこの検量線を使用する。次に pH 1 での担体からの TPP の溶出挙動における経時変化を調べた結果を Fig. 12 に示した。Fig. 12 から明らかなように、pH 1 の

溶液中での振とう開始から 7 時間で TPP は徐々に溶出し、7 時間以降で溶出量は一定となった。またこのときの担体の様子は Fig. 13 に示した。以上のことから TPP の溶出挙動はコアの消失と相関があることが明らかとなった。

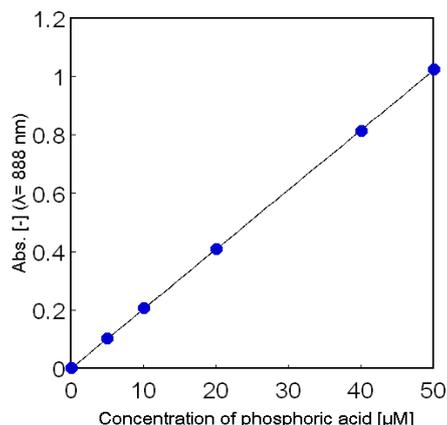


Fig. 11 Calibration curve of phosphomolybdateblue for quantification of total phosphoric acid.

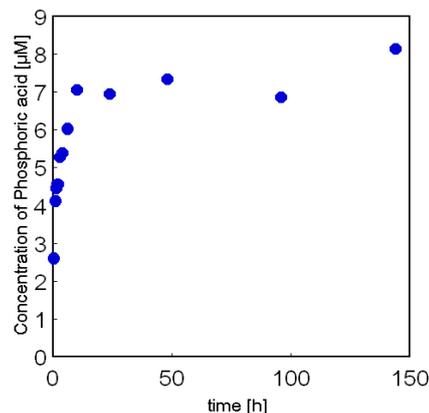


Fig. 12 Time-dependent change of concentration of phosphoric acid released from core of the support.

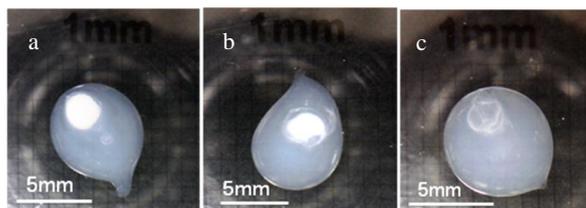


Fig. 13 Images of core-shell support treated with the solution of pH 1. ((a)10 min, (b)1~4 h, (c)6 h)

### 3.4 コアからのグリシンの溶出

アミノ酸をコアに添加した目的は、コアからの様々な分子サイズの物質の外部への徐放を調べるためである。そこで、担体のコア部分にグリシンを添加し、pH 1 における各アミノ酸の溶出挙動をニンヒドリン法による吸収極大波長 568 nm における吸光度を経時変化として調べた。このニンヒドリン法によるルーエンマン紫の吸光度によりグリシンの定量を行った。アミノ酸含有担体から同時に溶出するグリシン及び TPP の溶出挙動を比較したものを Fig. 14 に示した。Fig. 14 から明らかなようにグリシンは時間とともに外部溶液へ徐々に溶出

しており、同時に溶出するリン酸の濃度の経時変化も非アミノ酸含有担体と同様に外部溶液へ徐々に溶出している。また、グリシンの溶出は pH 1 での処理開始後間もなく起こっており、コア内に共存していた TPP の溶出とほぼ同様の挙動を示した。さらに TPP の溶出に比べ、グリシンの溶出の方が初期の勾配が急であり、TPP より素早くコアからシェルを経て外部へ放出された。これは、TPP の分子量が 345 に対してグリシンの分子量が 75 であることから、シェル内の拡散が容易なためと考えられる。従って、シェル内の拡散の程度は分子量が影響していると考えられる。

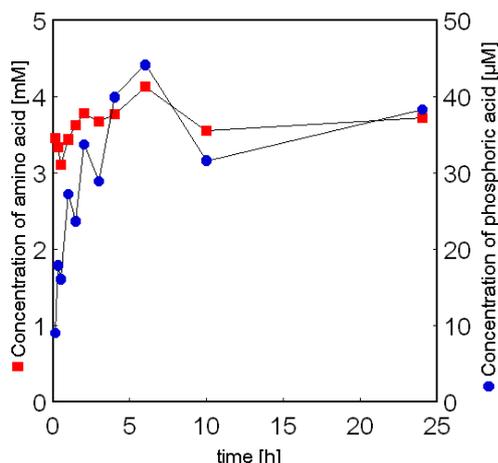


Fig. 14 Time course of elution behavior of glycine and TPP.

初めに、牛血清アルブミンの CBB による吸収極大波長 595 nm における検量線を作成し、アルブミンの定量に用いた。続いて、アミノ酸含有担体と同様にコア部分にアルブミンを添加し、アルブミンの pH 1 における溶出挙動を CBB による吸収極大波長 595 nm における吸光度を経時変化として調べ、また同時に溶出するリン酸の溶出挙動と比較した結果を Fig. 15 に示した。Fig. 15 から明らかなように、BSA の溶出率は約 90% と大きなものであり、固定化酵素担体として使用する場合には大きな問題点となる。そこでシェルの厚さを 1 mm から 3 mm に大きくし、同様にアルブミンの溶出挙動を調べた。その結果、Fig. 16 に示したように BSA の溶出率は約 40% まで低減

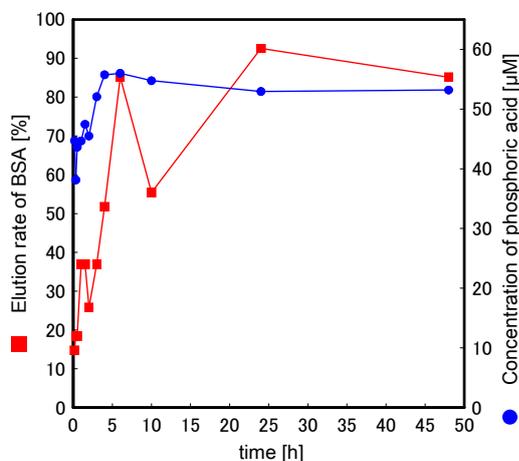


Fig. 15 Time course of elution behavior of BSA and phosphoric acid. (Thickness of shell is 1 mm)

された。しかし、固定化酵素担体として用いるにはこの溶出率も大きく改善方法を検討していかなければならない。

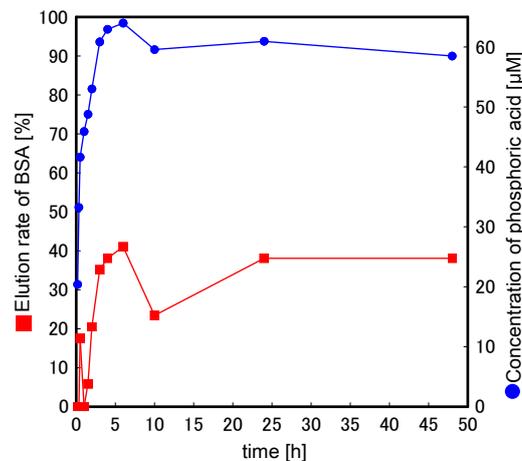


Fig. 16 Time course of elution behavior of BSA and phosphoric acid. (Thickness of shell is 3 mm)

#### 4. 結言

2 段階の連続酵素反応が可能な固定化酵素単体の調製を目的として、キトサン製コアとアルギン酸ナトリウム製シェルからなるコア-シェル型担体を調製した。担体の pH 安定性を調べる中で、pH 1 および 2 のような酸性領域ではキトサンコア層が液化化することが分かった。この現象が架橋剤である TPP の溶出挙動と相関関係があることが分かった。またコア内にグリシンおよび牛血清アルブミンを内包し、pH 1 の酸性条件下での溶出挙動を調べた。その結果グリシンおよび BSA は TPP と同様の挙動で溶出したが、シェル層の厚みを 1 mm から 3 mm に変更した結果、BSA の溶出率を 40% に抑制することができた。

#### 謝辞

キトサンを提供していただいた大日精化工業㈱に御礼申し上げます。また、本研究の一部は本校教育・研究プロジェクト経費によって行われました。記して謝意を表します。

#### 引用文献

- 1) C. R. Ispas *et al.*, *Water Research*, **44**, 1961-1969 (2010)
- 2) 基礎生化学実験法, 第 3 巻, 東京化学同人
- 3) 蛋白質の定量法, 第 3 版, 学会出版センター
- 4) X. Z. Shu and K. J. Zhu, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **54**, 235-243 (2002)

(2012 年 11 月 12 日 受理)