

キトサン-アルギン酸コア・シェル担体による酵素固定化に関する基礎的研究

前田 良輔・坂井 里菜*

Basic studies of enzyme immobilization into chitosan-alginate core-shell capsules

Ryosuke MAEDA and Rina SAKAI*

Abstract

The final goal of this study is preparation of Core-shell type capsules and it was applied to enzyme immobilization. The core and shell are comprised of chitosan and alginate, respectively. The elution behavior of the model protein in the core was improved by increasing the numbers of the layer of the shell, but it is not essential solution of the problem. It is interesting that the leak of alcohol dehydrogenase which was an enzyme to practical use was largely restrained when calcium chloride which was alginate cross-linker was changed to barium chloride. When we used a barium ion as alginate cross-linker, a leakage rate of ADH in the core was about 20% and which decreased to about half in case of the calcium ion. Then kinetic studies of enzymatic reaction of free ADH were carried out, and the parameters such as maximum velocity and Michaelis constant were obtained.

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

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。

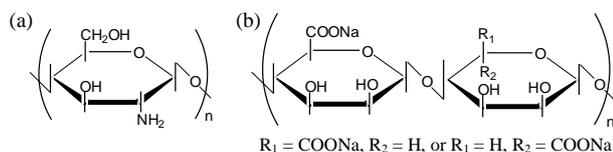


Fig. 1 Chemical structures of (a) chitosan and (b) sodium alginate.

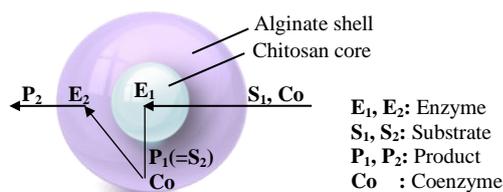


Fig. 2 Schematic representation of core-shell type immobilized enzyme.

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、ペルオキシ二硫酸カリウム、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水和水物)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 担体の調製

担体の調製は、著者らの前報¹⁾に示したとおり行った。以下に実験方法を簡単に示す。0.1 M 酢酸で調製した 1.25%キトサン溶液を 1.5%トリポリリン酸ナトリウム(NaTPP)浴中に滴下し凝固させた。滴下後、1時間攪拌を行い得られたビーズをキトサンコアとした。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 CaCl₂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 CaCl₂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。)

2.3 内包物の溶出抑制

内包物の溶出率を抑制するために、シェルの厚さを 1 mm 及び 3 mm、層数を 1~3 層と増やした各々の条件の BSA 内包担体それぞれ 10 個を pH 1 及び 9 に調整した 0.2 M HCl-NH₃緩衝液 20 ml、30 °C 下で穏やかに 24 時間振とうし、ろ液を回収

*本校専攻科物質化学工学専攻

後、溶出量を色素結合法(CBB 法)³⁾により定量した。

2.4 固定化酵素反応系の構築

2.4.1 遊離のアルコール脱水素酵素の活性測定

実際の酵素反応系に用いる予定のアルコール脱水素酵素(ADH)について、まず、遊離酵素を用いた回分反応による ADH の活性測定を以下の様に行った²⁾。一般的な活性測定法は、反応液として 85 mM ピロリン酸ナトリウム, 76.5 mM セミカルバジド, 2.1 mM ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD⁺), 1.0 mM グルタチオンを含むリン酸緩衝液(pH 9)中に、基質であるエタノールを所定量添加し、恒温ジャケットにより、25 °C に調整された紫外可視吸光度計(Shimadzu UV-260)で、出芽酵母由来 ADH(Sigma 製)を 20 μ l 添加し素早く攪拌した後、波長 340 nm における吸光度を追跡した。得られた経時変化をもとに初速度を求めた。基質濃度依存性実験では、29.12 ~ 582.4 mM のエタノール濃度に対して、同様の活性測定を行った。また、ADH の失活における温度依存性実験を行った。

2.4.2 アルコール脱水素酵素の溶出挙動

担体の調製は 2.2 の通りとし、コアを調製する段階で ADH が 26.7 μ M になる様内包した担体を調製した。さらに、実際の固定化酵素反応系での担体からの ADH の溶出挙動を調べるために、この ADH 内包担体 10 個を pH 9 に調製した 0.1 M N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-3-アミノプロパンスルホン酸(TAPS)-NaOH 緩衝液 15 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、ADH の溶出量は CBB 法により定量した。検量線は、0.05~2 mg/ml の ADH 溶液を用いて 2.3 の CBB 法と同様の操作で作成した。

2.4.3 アルコール脱水素酵素の溶出の抑制

2.2 に示したアルギン酸シェルを調製する際に前処理として用いた架橋剤 CaCl₂ を BaCl₂ に変更し、2.4.2 と同様に溶出実験を行った。

3 結果と考察

3.1 内包物の溶出制御

得られた担体を固定化酵素担体として用いる場合、モデルタンパク質である BSA の高い溶出率は課題となる。そこで、Fig. 3 にシェルの厚さや層数及び緩衝液の pH を変化させ、様々な条件での BSA の溶出率を示した。pH 1 は担体のコア部が液状化している状態、pH 9 は非液状化の状態である。

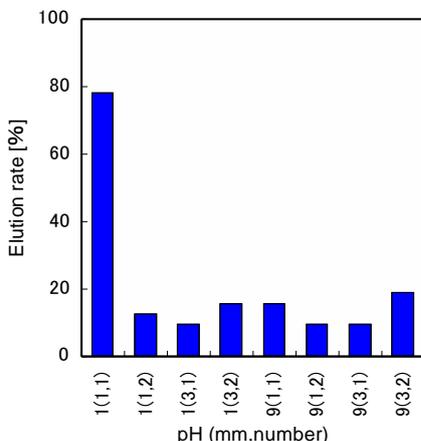


Fig. 3 Effects of number and thickness of shell layer on the elution rate of BSA.

Fig. 3 より、pH によるキトサンコアの液状化の状態に関わらず、比較的分子量の大きな内包物である BSA の溶出は 15 ~ 20% 程度まで抑制可能であるが完全に抑制することは困難であることが明らかとなった。

3.2 固定化酵素反応系の構築

3.2.1 遊離のアルコール脱水素酵素の活性測定

固定化酵素の反応性を議論するにあたって、遊離の酵素反応特性を動力学的に検証しておくことが必要である。遊離の ADH の活性は(1)式より、還元された補酵素 NADH を波長 340 nm で測定することにより測定した。

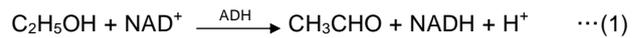


Fig. 4 に ADH の基質であるエタノール濃度依存性を示した。図中の実線は、(2)式に示す Michaelis-Menten 式に基づいて Delta Graph ver. 6 を用いて回帰計算を行った計算線である。ADH の酵素活性は Michaelis-Menten 式に良好な相関が得られており、得られた Michaelis 定数 K_m と最大速度 V_{max} はそれぞれ $K_m = 26.1$ [mM], $V_{max} = 1.91 \times 10^{-4}$ [mM/s] となった。

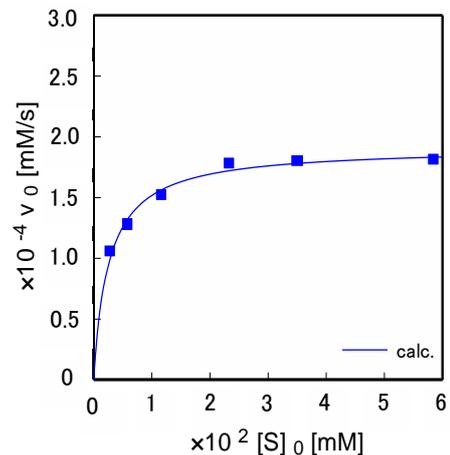


Fig. 4 Relationship between initial rate of enzymatic reaction of ADH and concentration of substrate.

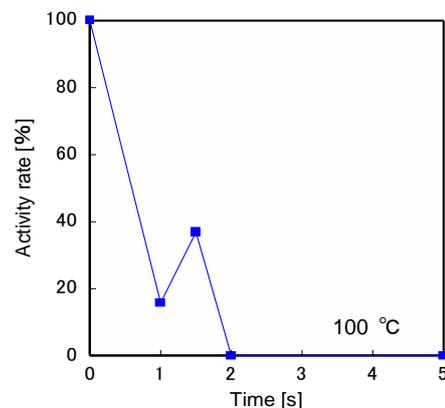


Fig. 5 Timecourse of residual activity on heat treatment of ADH.

$$v = \frac{V_{max}[S]_0}{K_m + [S]_0} \quad \dots(2)$$

また、ADH 活性の温度依存性実験を行った。初めに、ADH 溶液を沸騰水浴中で処理した時の残存活性の経時変化を Fig. 5 に示した。Fig. 5 の結果より、ADH は沸騰水中で 2 分間処理することで失活していることが分かった。次に処理時間を 2 分間とし、25~100 °C で処理した時の残存活性を Fig. 6 に示した。Fig. 6 の結果より、ADH は 80 °C で 2 分

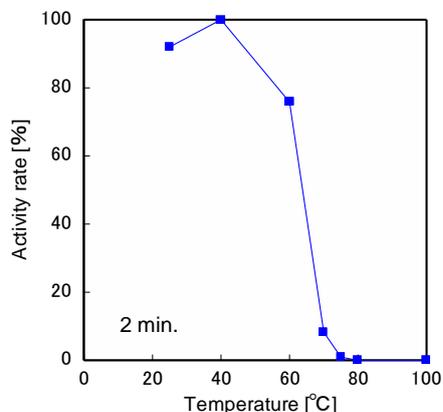


Fig. 6 Effect of temperature on enzymatic activity of ADH.

間加熱することにより失活することが分かった。このデータは、実際の固定化酵素反応系での ADH の活性測定における失活条件として用いる。

3.2.2 アルコール脱水素酵素の溶出挙動

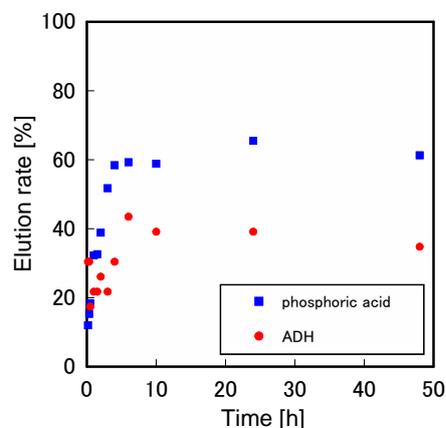


Fig. 7 Elution rate of phosphoric acid and ADH simultaneously released from core of the support. (Alginate was gelled by CaCl_2)

ADH の定量は CBB を用いた検量線を用いた。続いて、キトサンコア内に ADH を内包したアルギン酸シェルを Ca^{2+} で調製した担体について、ADH の実際の固定化酵素反応系における溶出挙動を、CBB による吸収極大波長 595 nm における吸光度の経時変化として調べ、また同時に溶出する TPP の溶出挙動と比較した結果を Fig. 7 に示した。Fig. 7 から明らかかなように、ADH の溶出率は約 40 %、リン酸も 60% 程度となり固定化酵素担体として使用するには、この大きな溶出率は改善する必要がある、次にシェルを調製する際の架橋剤の変更を試みた。

3.2.3 アルコール脱水素酵素の溶出抑制

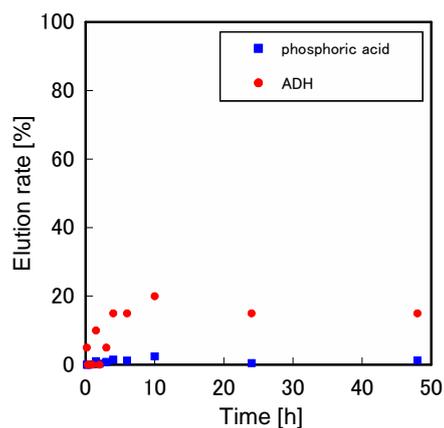


Fig. 8 Elution rate of phosphoric acid and ADH simultaneously released from core of the support. (Alginate was gelled by BaCl_2)

3.2.2 で得られた溶出率の抑制を、Taqieddin と Amiji のアルギン酸-キトサンコア-シェルマイクロカプセルの調製の研究結果³⁾を参考に行った。アルギン酸シェルを調製する際の架橋剤 CaCl_2 を BaCl_2 に変更したところ、Fig. 8 の結果が得られた。Fig. 8 より、コア調製時に架橋剤として用いる NaTPP がほぼ溶出していないことが分かる。これは、Taqieddin と Amiji の結果と同様、NaTPP が Ba^{2+} と相互作用しないことによるものと考えられる。Mørch ら⁴⁾によれば、アルギン酸の構成要素であるグルロン酸(G-blocks)とマンヌロン酸(M-blocks)のうち、グルロン酸の役割が重要であり、特に Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} が架橋剤として適している。総じてアルギン酸のゲル化には以下の 2 点が必要である。①アルギン酸分子内のグルロン酸とマンヌロン酸の割合、②架橋用イオン種の選択⁵⁾。また架橋剤としてアルギン酸に対する親和性は $\text{Pb} > \text{Cu} > \text{Cd} > \text{Ba} > \text{Sr} > \text{Ca} > \text{Co}$, $\text{Ni} > \text{Mn}$ である^{6,7)}。この溶出率の抑制方法は大変効果的であるため、今後の実際の固定化酵素反応系の研究に用いる。

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製シェルからなるコア・シェル型担体を調製した。コア内に内包した牛血清アルブミンの系外への漏出を抑制するために、アルギン酸シェルの層数を増やした結果、漏出率が 15~20% まで低下することが分かった。これまで酵素のモデルタンパク質として BSA を用いてきたが、実際の酵素反応系を確立する基礎的な検討を行った。まず、遊離の ADH の活性測定を行い、Michaelis-Menten 式より Michaelis 定数及び最大速度を求めた。またコア内の ADH の漏出率を抑制するために、シェル層数の検討とは別にアルギン酸の架橋剤として用いる 2 価の金属イオン種を Ca^{2+} から Ba^{2+} に変更した。これにより簡単に漏出率を 15~20% 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) 前田良輔, 坂井里菜, 北九州工業高等専門学校研究報告, 第46号, 47 (2013)
- 2) TOYOBO, TOYOBO ENZYMES, Ver.17 (2010)
- 3) E. Taqieddin and M. Amiji, *Biomaterials*, **25**, 1937 (2004)
- 4) Y. A. Mørch, *et al.*, *Biomacromolecules*, **7**, 1471 (2006)
- 5) O. Smidsrød, and A. Haug, *Acta Chem. Scand.*, **26**, 79 (1972)
- 6) A. Haug, and O. Smidsrød, *Acta Chem. Scand.*, **24**, 843 (1970)
- 7) A. Haug, *Acta Chem. Scand.*, **15**, 1794 (1961)

(2013年11月11日 受理)