

逆ミセルを用いたリパーゼ内包ナノカプセルの調製

著者	塩盛 弘一郎, 松永 龍一, 清山 史朗, 吉田 昌弘, 幡手 泰雄
雑誌名	化学工学シンポジウムシリーズ80 : 機能性微粒子の高機能化・新展開・用途開発
巻	80
ページ	58-63
発行年	2008-07-31
URL	http://hdl.handle.net/10458/3715

逆ミセルを用いたリパーゼ内包ナノカプセルの調製

塩盛弘一郎¹、松永龍一¹、清山史朗²、吉田昌弘³、幡手泰雄³

キーワード

逆ミセル、リパーゼ、酵素活性、粒径制御、エマルション

要旨

ジ-2-エチルヘキシルスルホコハク酸ナトリウム (AOT) が形成する逆ミセルにリパーゼを溶解し、*in situ* 重合によりスチレン-ジビニルベンゼン共重合体を壁物質としたリパーゼ内包ナノカプセルを調製した。種々の調製条件がリパーゼの内包特性、酵素活性およびカプセル形状におよぼす影響を明らかにした。リパーゼ内包ナノカプセルの形状はほぼ球状であり、平均粒子径は約 900nm であった。リパーゼ内包ナノカプセルは、オリーブ油の加水分解活性を示し、酵素活性を保ったままリパーゼが内包されていることが確認された。カプセル内に内包されたリパーゼの活性は、逆ミセル内に溶解した場合とほぼ同じように低下した。リパーゼ内包ナノカプセルをオリーブ油の加水分解反応に繰り返し使用した場合、使用回数とともに加水分解活性は低下した。

1. 緒言

逆ミセルは、無極性有機溶媒中で界面活性剤などの両親溶媒性分子によって形成されるナノオーダーの会合コロイドである¹⁾。逆ミセルを形成する界面活性剤には、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンオレート、塩化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム、ジ-2-エチルヘキシルスルホコハク酸ナトリウム(AOT)がある。AOTは、逆ミセルを利用したタンパク質の抽出²⁻⁴⁾や酵素反応⁵⁾などの逆ミセルに関連した研究で最も広く用いられている界面活性剤の一つである。逆ミセル内の微少水相は、界面活性剤の極性頭部と強く相互作用しており粘度、極性および活量などにおいてバルクの水とは異なった性質を示すことが知られている。逆ミセル中で酵素を保持する場合は酵素の再利用は難しいが、固定化することによって、回収・再利用することが可能となる。含水率、 $W_o=5\sim 10$ において逆ミセルの平均粒子径は、2.7~3.4nm であり、リパーゼの大きさとほぼ同じであることが報告されていることから⁶⁾、一つの逆ミセルに対して一つの酵素を内包することが可能であり、

高い分散状態を保つことが可能であると考えられる。

酵素の固定化法には担体結合法、架橋法、包括法および複合法などがあり、その中でも包括法であるマイクロカプセル型は、酵素の自然な状態を保ったまま固定化することが可能である。そこで本研究では、AOT逆ミセルを用いてリパーゼのマイクロカプセル化を行い、調製条件が酵素の内包特性、酵素活性およびカプセル形状におよぼす影響を検討した。

2. 実験

2.1 リパーゼ内包カプセルの調製方法

AOT逆ミセル法を用いたカプセル調製方法を図1に示す。AOT/イソオクタン溶液(100mM)30gに、所定濃度のリパーゼ/トリス緩衝液(pH7.0)を注入溶解させて逆ミセルを調製 (W_o =約 8.0) した。逆ミセル溶液にスチレン 1.0g とジビニルベンゼン 1.0g を溶解させ、重合開始剤である 2,2'-アゾビス (2,4-ジメチルバレロニトリル (ADVN) 0.0045g を加えた。スターラーにより攪拌しながら、313 K で5時間 *in situ* 重合を行った。重合した

ポリマーはイソオクタンに不溶であるため重合が進行に従い、生成したマイクロセルが析出する。調製したカプセルはイソオクタンで洗浄を行い、イソオクタン中 301 K にて保存した。

2.2 測定

得られた酵素内包マイクロカプセルの観察は、自然乾燥によりイソオクタンを蒸発させた後に減圧乾燥を行い、走査型電子顕微鏡（日立 S-4100M）で観察した。カプセル粒子径は、撮影した SEM 写真から Digital Scale 1.0J を用いて直接測定した。

重合前後のイソオクタン溶液中の水分濃度をカールフィッシャー水分計（KYOTO ELECTRONICS MKS-1S）により測定し、カプセル化率 R_C を式(1)より求めた。

$$R_C = \frac{C_{H_2O,i} - C_{H_2O,o}}{C_{H_2O,i}} \times 100 \quad [\%] \quad (1)$$

2.3 リパーゼ活性の測定

リパーゼの酵素活性測定に用いる反応には、オリーブ油の加水分解反応を用いた。逆ミセル溶液中でリパーゼの酵素反応を行う場合には、まず、100 mM の AOT 逆ミセル溶液に所定濃度のリパーゼを溶解させたもの（①酵素/逆ミセル/イソオクタン溶液）を調製した。一方、基質には 100 mM AOT/イソオクタン溶液にオリーブ油 456 mM を溶解させた後に、①と同じ含水率にな

るように緩衝液を注入したもの（②基質/逆ミセル/イソオクタン溶液）を調製した。反応は、①と②を 10 ml ずつ混合し 298 K で行った。

カプセル化したリパーゼの酵素反応は、カプセルをイソオクタン 25 ml に分散させ 10 ml 採取したものと、□の溶液 10 ml を混合し、298 K で反応を行った。所定時間ごとに反応液を採取し生成脂肪酸量を測定した。

脂肪酸量の測定は、Lowry 法⁷⁾を用いて行った。5.0 w/v%の酢酸銅水溶液をピリジンで pH 6.0 にしたものを 1.0 ml、ベンゼン 5.0 ml および所定時間に採取した反応液 1.0 ml を混合、攪拌した。その後遠心分離し、ベンゼン相の 715 nm の吸収を測定した (HITACH U-3200)。生成脂肪酸速度 V_A は、縦軸に生成脂肪酸濃度 C_{FA} 、横軸に反応経過時間をプロットし、その直線の傾きの値とした。ここで V_{ACAP} は、リパーゼ内包マイクロカプセルを用いた場合の生成脂肪酸速度、 V_{ARM} は、逆ミセルに溶解したリパーゼを用いた場合の生成脂肪酸速度とした。

酵素活性 E_A は、式 (2) より求めた。

$$E_A = \frac{V_A}{W_L} \quad [M/min, g-enz] \quad (2)$$

ここで W_L は酵素反応に用いたリパーゼの重量 [g] である。カプセルの場合はカプセル調製に用いたリパーゼの全量が内包されているとして算出した。 E_{ACAP} は、カプセル化したリパーゼの活性、 E_{ARM} は逆ミセルに溶解したリパーゼの活性とした。

3. 結果及び考察

3.1 逆ミセル形成の影響

100mM AOT/イソオクタン溶液 30.0g に蒸留水 0.5ml を注入して逆ミセルを形成させた後に、モノマーを溶解し重合を行って得られた微粒子の SEM 写真を **図 2** に示す。一方、単にイソオクタンにモノマーを溶解して同様に重合を行って得られた微粒子の SEM 写真を **図 3** に示す。逆ミセルが存在する条件で調製した場合は、球状の粒子が形成されていることが分かる。一方、逆ミセルが存在しない条件で調製した場合は、球状の粒

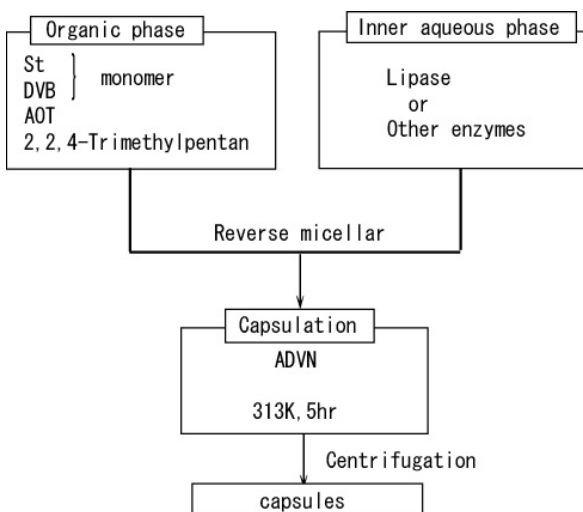


図 1 カプセル調製法

子がいくつか確認出来るが、不定形の粒子が多く存在していることが確認出来る。このことから、微量の水を注入せずに逆ミセルを形成しない条件でも微粒子の調製は可能であるが、均一な球状の微粒子を得る為には逆ミセルが存在しなければならないことが分かった。逆ミセルが無い場合は、中心が空洞のカプセルではなく、空洞のないナノスフィアであると考えられる。

3.2 リパーゼ固定化カプセルの特性

100mM AOT/イソオクタン溶液 30.0g に 20g/l リパーゼ緩衝液 0.5ml を注入して逆ミセルを形成させて調製したリパーゼ内包ナノカプセルのSEM写真を図4に示す。カプセルの形状はほぼ球状であり、粒子径は最小で300 nm, 最大で1300 nm であり、平均粒子径は約900 nm であった。カプセル化率 R_C は10-20%であった。収率 γ は2.0-4.0%であった。得られたリパーゼ内包カプセルをオリーブ油の加水分解反応に用いたときの反応時間と生成脂肪酸濃度の関係を図5に示す。反応初期において生成脂肪酸濃度は、反応時間とともに直線的に増加し、カプセルに内包されたリパーゼが活性を保持していることが確認された。直線の傾きより求めたナノカプセルに内包したリパーゼの活性は

0.0087M/min.g-enz であった。同じ条件で逆ミセルに溶解したリパーゼの活性は、0.101M/min.g-enz であり、カプセルに内包したリパーゼは逆ミセルに溶解した場合よりも活性が低くなった。ナノカプセルを遠心分離した後の上澄にはリパーゼ活性は全くなかったことから逆ミセルに溶解したリパーゼの全量がナノカプセルに内包されたと考えられる。ナノカプセルに内包したリパーゼの酵素活性が低くなったことは、重合過程でのリパーゼの失活と基質および生成物のカプセル壁透過が遅いためと考えられる。

3.4 リパーゼ濃度の影響

含水率 W_0 を一定に保ち注入するリパーゼ緩衝液の濃度を変化させてカプセル調製を行い、リパーゼ内包カプセル特性におよぼすリパーゼ濃度の影響を検討した。リパーゼ内包カプセルの特性におよぼすリパーゼ濃度の影響を図6に示す。カプセル化率 R_C は、リパーゼ濃度に影響されず一定であった。カプセル化したリパーゼ活性 $E_{A,CAP}$ は、リパーゼ濃度の増加に伴い増加した。これに対して、逆ミセルに溶解したリパーゼの酵素活

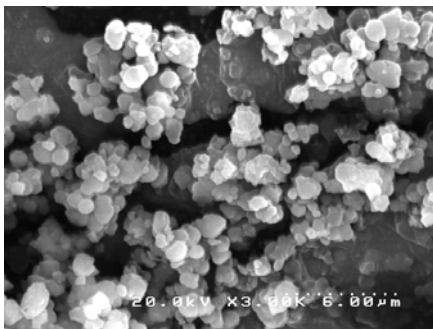


図2 逆ミセルが存在する状態で得られた微粒子のSEM写真

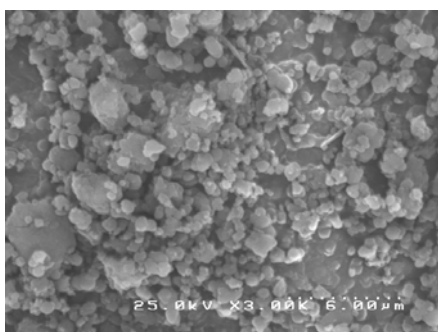


図3 逆ミセルが存在しない状態で得られた微粒子のSEM写真

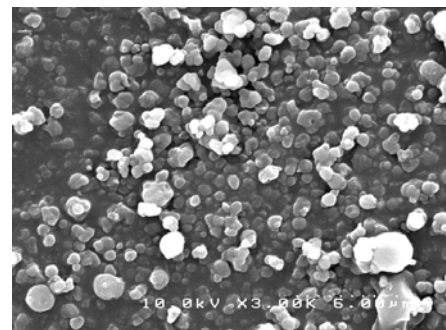


図4 リパーゼ内包ナノカプセルのSEM写真

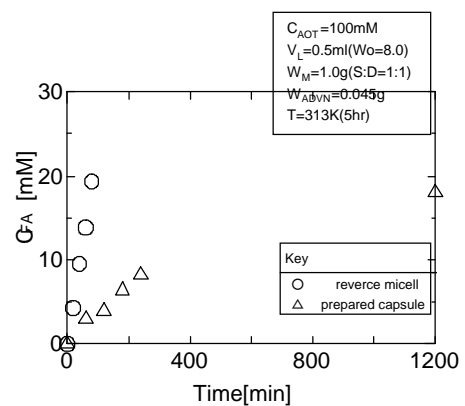


図5 反応時間と生成脂肪酸量の関係

性 E_{ARM} は、リパーゼ濃度によらずほぼ一定であった。リパーゼ濃度が高くなるに従い重合過程での失活するリパーゼの割合が低くなり、活性を保ったままで内包されるリパーゼ量が増えるためと考えられる。

3.5 重合温度の影響

重合温度を 303 K–333 K と変化させて、ナノカプセル調製におよぼす影響を検討した。リパーゼ内包ナノカプセルの特性におよぼす重合温度の影響を図7に示す。カプセル化率 R_C は、重合温度によらずほぼ一定であった。カプセルに内包されたリパーゼ活性 E_{ACAP} は重合温度の増加に従い減少した。これは、重合温度が高くなることにより、リパーゼの変性・失活が起こりやすくなったためと考えられる。収率、 y は、重合温度増加に従い増加した。これは重合温度増加により重合速度が増加し、析出するポリマーが増加したためと考えられる。

3.6 重合時間の影響

重合時間を変化させてナノカプセル調製を行い、リパーゼ内包カプセルへの影響を検討した。リパーゼ内包ナノカプセルの特性におよぼす重合時間の影響を図

8に示す。カプセル化率 R_C は、重合時間経過に影響を受けず一定であった。カプセルに内包されたリパーゼ活性 E_{ACAP} は、重合時間が長くなるに従い減少した。これは、時間経過による酵素の失活およびカプセル粒子径の増大によるためであると考えられる。収率、 y は重合時間が長くなるに従い増加した。これは、重合時間が長くなるに従い重合反応が進行し、析出するポリマー量が増加したためと考えられる。

3.7 リパーゼの安定性

逆ミセルにリパーゼを溶解した場合と、ナノカプセルに内包した場合について4°Cで保存し、リパーゼの活性変化を測定した。それぞれ調製して1日後の活性に対する残存活性の比を活性残存率として経過時間に対してプロットしたものを図9に示す。リパーゼを逆ミセルに溶解した場合とナノカプセルに内包した場合の活性残存率は、2週間まではほぼ同じように減少した。いずれの場合もリパーゼは、時間とともに緩やかに失活することがわかった。また、逆ミセルに溶解されたリパーゼとナノカプセル内に内包されたリパーゼの周囲環境はよく似ていると考えられる。

3.8 リパーゼ内包カプセルの繰り返し使用

調製したリパーゼ内包ナノカプセルをオリーブ油の

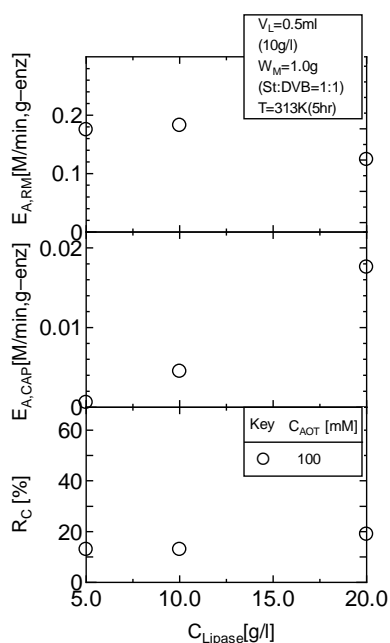


図6 リパーゼ内包ナノカプセルの特性におよぼすリパーゼ濃度の影響。

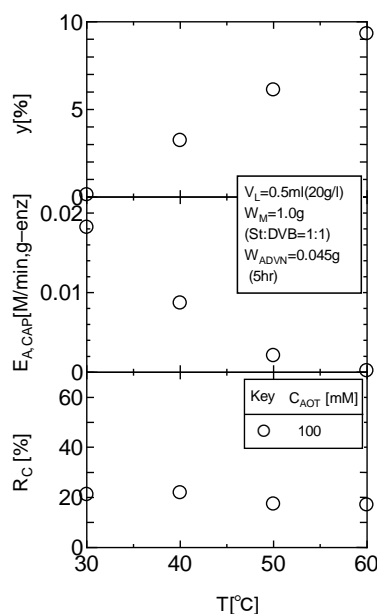


図7 リパーゼ内包ナノカプセルの特性におよぼす重合温度の影響。

加水分解反応に用い、反応終了後は遠心分離により回収し、繰り返し加水分解反応に用いた。リパーゼ活性におよぼす繰り返し使用の影響を図10に示す。カプセル酵素活性 $E_{A,CAP}$ は、使用回数が多くなると伴に減少した。これは、ナノカプセルの粒径が小さいことから回収の際のナノカプセルのロスがあったことと、調製時より時間が経過することによるリパーゼの変性・失活が起こったためと考えられる。

4 結言

AOT 逆ミセルに溶解したリパーゼを *in situ* 重合法によりナノカプセル内に内包した。平均粒径が 900nm の球形のナノカプセルが得られ、ナノカプセルに内包されたリパーゼは酵素活性を保持しており、オリーブ油の加水分解反応が行えた。調製条件がリパーゼ活性、カプセル化率、平均粒子径および収率などのカプセル特性におよぼす調製条件の影響を明らかにし、リパーゼ内包ナノカプセルの調製条件を明らかにした。

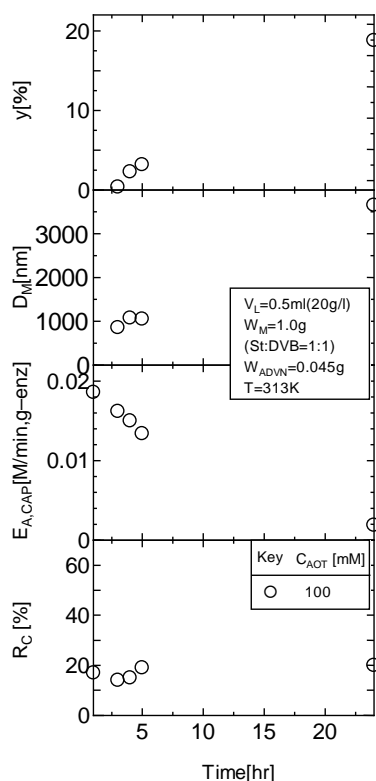


図8 リパーゼ内包ナノカプセルの特性におよぼす重合時間の影響

参考文献

- 1) P.L.Luisi, M.Giomoni, M.P.Pileni and B.H.Robinson, *Biochem. Biophys. Acta.*, **947**, 209-246 (1988)
- 2) 久保井亮一, 森義昭, 駒沢勲, 化学工学論文集, **16**, 1060-1066 (1990)
- 3) K. Shiomori, Y. Kawano, R. Kuboi, I. Komasaawa, *J. Chem. Eng., Japan*, **28**, 803-809 (1995)
- 4) K. Shiomori, Y. Kawano, R. Kuboi, I. Komasaawa, *J. Chem. Eng., Japan*, **32**, 177-183 (1999)
- 5) K. Shiomori, M. Ishimura, Y. Baba, Y. Kawano, *J. Ferment. Bioeng.*, **81**, 143-147 (1996)
- 6) 久保井亮一, 森義昭, 駒沢勲, 化学工学論文集, **16**, 335-342 (1990)
- 7) R. R. Lowry, I. J. Tinsley, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **53**, 470-472 (1976)

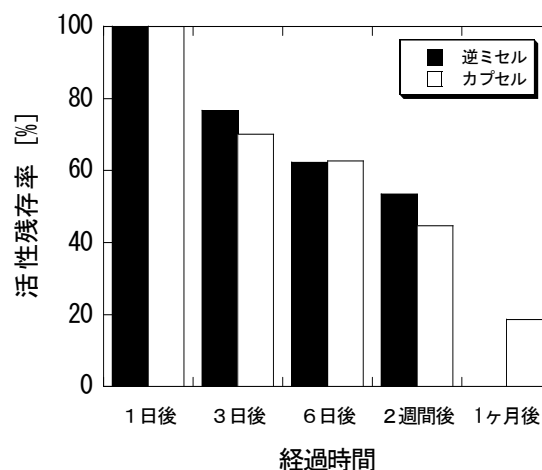


図9 保存時間によるリパーゼ活性の変化

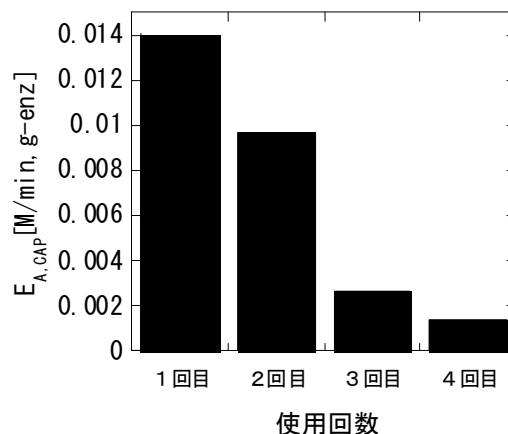


図10 繰り返し使用した場合のリパーゼ活性の変化