

N-3

ペルオキシターゼ固定化ビーズ内包中空球状バクテリアセルロースゲルの調製と活性評価
 Encapsulation of Peroxidase Immobilized Beads
 with a Hollow type Spherical Bacterial Cellulose Gel and Its Enzymatic Activity Evaluation.

○鈴木正成¹, 星徹², 青柳隆夫²*Masashige Suzuki¹, Toru Hoshi², Takao Aoyagi²

Abstract: We prepared a hollow-type spherical bacterial cellulose (HSBC) gel encapsulating enzyme-immobilized beads larger than the pore size of the BC gelatinous membranes. This encapsulation method involved producing the BC gelatinous membrane on the surface of the spherical alginate gel containing the enzyme-immobilized beads. With this method, the BC gelatinous membrane was biosynthesized using *Gluconacetobacter xylinus* at the interface between the cell suspension attached onto the alginate gel and the silicone oil. After the BC gelatinous membrane was biosynthesized, an alginate gel was dissolved in a phosphate buffer to prepare a HSBC gel with the enzyme-immobilized beads. The immobilized enzymes encapsulated in HSBC gel showed high enzymatic activity.

1. 緒言

バクテリアセルロース (BC) ゲルとは、酢酸菌によって産生される高純度のセルロースから構成されたヒドロゲルである。培養過程で酢酸菌は任意の方向に、セルロースナノファイバーを排出しながら移動するため、BC ゲルは緻密な三次元網目構造と選択的膜透過能を有する。

我々は培養液-疎水性界面で BC ゲルが産生することに着目し、酢酸菌を含む培養液を付着させたアルギン酸カルシウムゲル (Ca-Alg gel) を、シリコンオイルで満たした 96 ウェルプレートの各ウェル中に入れ、所定日数培養後、リン酸緩衝液 (PBS) 中で Ca-Alg gel を溶解除去することで、新規形状である中空球状 BC (HSBC) ゲルの調製に成功した。この方法は、粒子を分散させた Ca-Alg



Fig. 1 Photograph of HSBC gel included cosmetic glitter.

gel を用いることで、HSBC ゲル調製後の充填が困難であるミリサイズの粒子を内包した HSBC ゲルの調製も可能である¹⁾ (Fig. 1)。Ca-Alg gel は PBS により室温下で除去が可能であり²⁾、酵素等の生体成分の内包に適すと考えられ、酵素固定化ビーズも同様に内包可能であると示唆される。本研究では酵素固定化ビーズ内包 HSBC ゲルの調製及び、内包した酵素の活性について、UV-Vis を用いて評価を行った。

2. 実験操作

2-1. ペルオキシターゼ固定化ビーズ内包 HSBC ゲルの調製

酵素の固定化は桜井らの方法³⁾に準じた。ペルオキシターゼ固定化ビーズ (粒径 40-50 μm) 100 mg を 1 wt% アルギン酸ナトリウム水溶液 10 mL 中に分散させた。この溶液 20 μL を 10 wt% 塩化カルシウム水溶液中に滴下して Ca-Alg gel を調製した。先行研究¹⁾と同様に 7 日間の培養によって Ca-Alg gel 表面に BC ゲルを産生した。得られたゲルを純水で洗浄し、PBS 中で 1 日静置して Ca-Alg gel を取り除きペルオキシターゼ固定化ビーズ内包 HSBC ゲルを得た。

2-2. ペルオキシターゼ固定化ビーズ内包 HSBC ゲルの活性試験

3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) 30.3 mg をジメチルスルホキシド 3 mL 中に溶解させた。この溶液 100 μL と酢酸緩衝液 (pH 5.0) 9.9 mL, 過酸化水素 1.0 μL を混合した溶液を TMB 基質溶液とした⁴⁾。2-1 で調製したペルオキシターゼ固定化ビーズ内包 HSBC ゲルを TMB 基質溶液 3 mL の入った角型石英セル (光路長 1 cm) 中に入れ、37 $^{\circ}\text{C}$ 、攪拌速度 100 rpm の条件で UV-Vis 装置を用いて 10 min 毎にスペクトル測定を行い、TMB 二量体の最大吸収波長 370 nm 及び 655 nm の吸光度変化を測定した。

1 : 日本大学大学院 理工学研究科 物質応用化学専攻、Graduate School of Science and Technology, Nihon University.

2 : 日本大学 理工学部、College of Science and Technology, Nihon University.

3. 結果

3-1. ペルオキシターゼ固定化ビーズ内包 HSBC ゲルの調製

Ca-Alg gel に酵素固定化ビーズを担持させた場合においても、酢酸菌の生育を阻害することなく HSBC ゲルの調製が可能であることを確認した。ペルオキシターゼ固定化ビーズ内包 HSBC ゲルを TMB 基質溶液中で反応させると、時間経過に伴い HSBC ゲル内部が TMB 二量体由来の青色に呈したことからペルオキシターゼの活性を確認した (Fig. 2)。

また過酸化水素を過剰量加えた場合において、過酸化水素の分解によって生じたと考えられる気泡が HSBC ゲル内部に確認された。この気泡を中空内部から取り除くのは困難であったことから、HSBC ゲル内部で気体の発生を伴う反応を行う場合、中空内部が気体で満たされて溶液が内部へ含浸しない恐れがあることが示唆された。

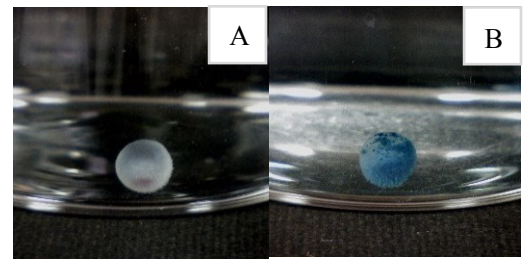


Fig. 2 Photographs of enzyme-immobilized beads encapsulated HSBC gel. (A) before reaction, (B) after reaction (60 min).

3-2. ペルオキシターゼ固定化ビーズ内包 HSBC ゲルの活性試験

UV-Vis を用いて測定した TMB 二量体の極大吸収波長 370 nm 及び 655 nm における吸光度が時間の経過とともに増加することを確認した (Fig. 3)。また、吸光度の増加量を TMB 基質溶液単体と比較すると、ペルオキシターゼ固定化ビーズ内包 HSBC ゲル存在下の方が吸光度の増加が大きいことから、内包したペルオキシターゼが作用したと考えられる。

ペルオキシターゼ固定化ビーズ内包 HSBC ゲルを添加した場合とブランクの 655 nm における吸光度の差を Fig. 4 に示す。測定開始 10 min 以降の吸光度の増加率が一定であることから、BC ゲル膜は反応生成物の放出を阻害せず一定量で放出し続けていると考えられる。また、測定開始から 10 min までの上昇が緩やかだった。HSBC ゲルに充填した蛍光標識化デキストラン ($M_w:10000$) の 60 % が 10 min で放出されることが既に報告されている⁵⁾。BC ゲル膜を透過した TMB は、HSBC ゲル内部での酵素反応により TMB 二量体を生じ、この TMB 二量体が HSBC ゲル外部に放出されるまでに要する時間であると考えられる。

これらの結果から、HSBC ゲルの調製に用いた試薬成分は HSBC ゲルへ内包したペルオキシターゼを失活させないことを示し、他の酵素においても同様に活性を維持させたまま HSBC ゲルへ内包することが可能であると示唆された。

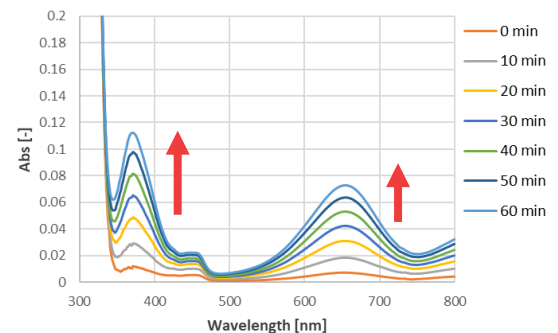


Fig. 3 UV-Vis absorption spectra of TMB oxidation products by addition of Peroxidase-immobilized beads encapsulated HSBC gel.

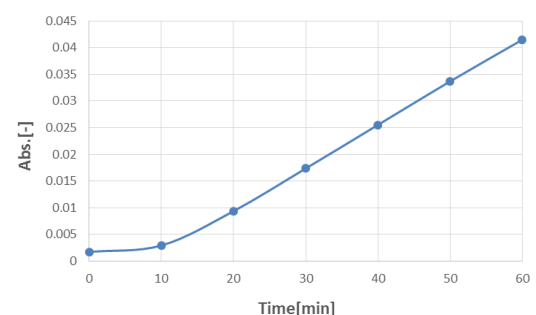


Fig. 4 Differences in UV-Vis absorption spectra of peroxidase-immobilized bead-encapsulated HSBC gel addition and blank TMB oxidation product (655 nm).

4. 参考文献

- 1) T. Hoshi, *et al.*, *International Journal of Molecular Sciences*, **20**(19), 4919 (2019).
- 2) A. Kikuchi *et al.*, *Journal of Controlled Release*, **47**, 21-29, (1997)
- 3) K. Sakurai, *et al.*, 福井大工報, **33**, 173-182 (1989).
- 4) E. S. Bos, *et al.*, *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, **2**(3-4), 187-204 (1981).
- 5) T. Hoshi, *et al.*, *Heliyon*, **4**(10), e00873 (2018).