

グルコースオキシダーゼのマイクロカプセル化と分析への応用

重富康正・難波孝次・尾崎紀博・小嶋健博*

岡山理科大学理学部化学科

*岡山理科大学理学部臨床生命科学科

(2004年9月29日受付、2004年11月5日受理)

1. 緒言

マイクロカプセル(カプセル)は実用面できわめて有用な性質を有しているため、応用分野において広く、多くの研究者によりカプセル化の研究が行われている。既に一般的な総説¹⁻³⁾の他に医薬品への応用に関する報告⁴⁾もある。マイクロカプセル化の技術は芯物質の保護や芯物質の放出について研究されたものが大部分であり、最近では除放射性農薬や人工細胞にも応用されている⁵⁻⁶⁾。マイクロカプセルの分離分析への応用例は渡会により初めて報告された⁷⁻⁹⁾。著者等はジチゾンやオキシムのようなキレート試薬を溶解したクロロホルム-マイクロカプセル化と金属イオンの抽出性について報告した¹⁰⁻¹¹⁾。酵素のマイクロカプセル化¹⁻⁵⁾や固定化法¹²⁾についての報告はあるが、酵素含有マイクロカプセルの分析試薬としての報告は見られない。そこで、本研究はグルコースを分析する目的で4種類のマイクロカプセル(アルギン酸ミニカプセル, アルギン酸マイクロカプセル, スチレンマイクロカプセル, ポリウレタンマイクロカプセル)を調製して、その特性を比較検討した。

2. 実験

2.1 試薬と装置

グット緩衝溶液調製用, 2-(モルホリノ)エタンスルホン酸(MES), 3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸(MOPS), とトリンダー試薬, N-エチル-N-スルホプロピルアニリンは同仁化学製, 酵素, グルコースオキシダーゼ(GOD: EC 1.1.3.4)とペルオキシダーゼ(POD: EC 1.11.1.7)はシグマ製を使用した。また, マイクロカプセルの調製はアルギン酸ナトリウム, ポリスチレン, テトラエチレンペンタミン, ポリビニルピロリドン(K30), ソルビタンモノラウレート, アラセルC(Span83), およびエーロゾルOTはナカライテック製, トルエンジイソシアネートは東京化成製, その他の試薬は試薬特級品を, 純水はイオン交換水をMilli-Qに通したものを使用した。

吸光度の測定は日立製作所製U-2000分光光度計に光路長1cmガラスセルを用い, pHの測定には日立堀場製作所製ガラス電極pHメーターM-8を使用した。高速液体クロマトグラフ装置は, 日立製作所製L-6000システムを用い, 検出器は同社製のL-3300RI検出器, カラムはShodexのIonpak KS-801, プレカラムとして同社製KS-6を使用した。恒温槽はタイテック製Thermo Minder DX-10, 振とう器には同社製Personal-11を使用した。

2.2 マイクロカプセルの調製

2.2.1 アルギン酸カルシウムミニカプセルの調製¹³⁻¹⁵⁾

グルコースオキシダーゼ(GOD)含有アルギン酸カルシウムミニカプセルは液中硬化法により調製した。調整法はScheme 1に示した。1.5%アルギン酸ナトリウム水溶液4 mlに酵素溶液(GOD)を10 U/ml溶液になるように加え混合した。この混合溶液を1%塩化カルシウム溶液に攪拌しながら加え, アルギン酸カルシウムミニカプセルを調製した。調製したミニカプセルはろ過により採取し, イオン交換水で洗浄後, 1%塩化カルシウム溶液で洗浄した。その後, 純水で洗浄し, リン酸ナトリウム緩衝溶液(pH 5.1)で洗浄したのち, 緩衝溶液に入れ, 冷蔵庫に保存した。このようにして調製したミニカプセルの平均粒径は2 mmであった。このミニカプセルを以下の実験でMC-1と略する。

2.2.2 アルギン酸カルシウムマイクロカプセルの調製¹⁶⁾

1.5%アルギン酸カルシウム溶液4 mlにGOD溶液1 mlを加え, よく混合した。この混合溶液を界面活

性剤エーロゾル OT を 1% 含むクロロホルム-シクロヘキサン混合溶媒 (混合比 1:2 (v/v)) 12 ml 中に攪拌しながら加え W/O 型エマルジョンを調製した (Scheme 2)。この乳化液を三ツ口フラスコに 5% 塩化カルシウム溶液 100 ml を入れ、450 rpm で攪拌しながら注ぎ込み、10 分間攪拌しマイクロカプセル化を行った。マイクロカプセルはろ取して、2.2.1 の操作に従って洗浄後、冷蔵庫に保存した。このマイクロカプセルの粒径は 110 μm であった。このマイクロカプセルを以下の実験で MC-2 と略する。

2. 2. 3 ポリスチレンマイクロカプセルの調製¹⁷⁾

GOD 含有ポリスチレンマイクロカプセルは液中乾燥法により調製した (Scheme 2)。pH を調整した 8% ゼラチン水溶液 2 ml に GOD (10 U) 溶液 2 ml を加え混合した。この混合溶液を 10% ポリスチレン-塩化メチレン溶液 20 ml に加え、10 分間室温で攪拌し W/O 型一次乳化溶液を調製した。次に pH を調整した 1% ゼラチン水溶液 250 ml に攪拌しながら一次乳化溶液を加え、[(W/O) /W] 型の溶液を調製する。この操作を恒温槽中で行い、温度を室温から徐々に 37 $^{\circ}\text{C}$ に上げ、この温度を数時間保った。この操作中、塩化メチレンの蒸発に伴い、ポリスチレンが液滴のまわりに析出して壁膜となりポリスチレンマイクロカプセルが生成した。生成したマイクロカプセルはろ過後、純水でよく洗浄した。次に 0.05 M 酢酸緩衝溶液 (pH 5.1) で洗浄した後、酢酸緩衝溶液中で冷蔵庫に保存した。この様にして調製したマイクロカプセルの平均粒径は 143.0 μm であった。このマイクロカプセルを以下の実験で MC-3 と略する。

2. 2. 4 ポリウレタンマイクロカプセルの調製¹⁸⁾

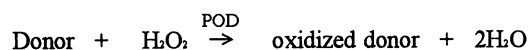
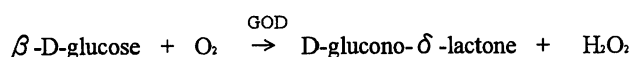
GOD 含有ポリウレタンマイクロカプセルはテトラエチレンペンタミン水溶液とトルエンジイソシアナートとの界面重合反応を利用して調製した。0.2 M テトラエチレンペンタミン 2.5 ml と 0.25 M 炭酸ナトリウム水溶液 2.5 ml を混合して、この溶液に GOD を含むポリビニルピロリドン水溶液 5 ml を加えた。この溶液を攪拌しながら 2% アラセル C-シクロヘキサン溶液 50 ml に W/O 型エマルジョンを分散させた後、0.1 M トルエンジイソシアナート-クロロホルム溶液 50 ml を加え、界面重合を行った。この溶液は室温で 10 分放置して、50% ソルビタンモノラウレートを加えると生成したポリウレタンマイクロカプセルが有機相から水相に析出する。この様に調製したマイクロカプセルの平均粒径は 62.2 μm であった。このマイクロカプセルを以下の実験で MC-4 と略する。

2. 3 グルコースの定量

20 ml 試料瓶に既知量のグルコースを含む pH 5.1 の 0.05 M リン酸ナトリウム緩衝溶液 10 ml と GOD 含有マイクロカプセル 2.0 ml を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ にセットした恒温水槽に入れ、バッチ法で 3 時間培養した。グルコースの定量は反応溶液を適量採取してトリンダー法で行った¹⁹⁻²⁰⁾。適量のグルコースを 10 ml 共栓付き試験管に採取し、0.1 M 4-アミノアンチピリン 0.1 ml、0.1 M ALPS (N-エチル-N-スルホン酸プロピルアニリンナトリウム塩) 0.1 ml、pH 7.0 の 0.1 M MOPS 緩衝溶液 2.6 ml、ペルオキシダーゼ (POD) : 100 U) 0.1 ml を加える。この試験管を 37 $^{\circ}\text{C}$ にセットした恒温水槽に入れ、37 $^{\circ}\text{C}$ にて 10 分間培養した後、561 nm で吸光度を測定した。この吸光度から生成した過酸化水素の濃度を求めることによりグルコースを間接的に定量する。

2. 4 酵素含有マイクロカプセルの酵素活性の測定

グルコースオキシダーゼ含有マイクロカプセルの活性の測定は次のような酵素反応に基づいて行った。



20 ml サンプル瓶中に任意量の D-グルコースを含む pH 5.1 の 0.05 M リン酸緩衝溶液 10 ml とグルコースオキシダーゼ含有マイクロカプセルを加え、バッチ法で 37 $^{\circ}\text{C}$ で反応させた。反応の進行に従って、10 ml 共栓付き試験管に反応液 0.1 ml を採取し、トリンダー法により D-グルコースを測定した。

3. 結果と考察

3. 1 4 種類のカプセルの定性的比較

初めに MC-1 の調製時のアルギン酸ナトリウム水溶液と GOD 水溶液との容量比を検討した。アルギン酸ナトリウム水溶液 4 に対して GOD 水溶液を 0.5, 1.0, 1.5, および 2.0 と変え試験した結果、4:1 の割合で安定なカプセルが得られた。次に硬化剤、塩化カルシウム水溶液の濃度を 1% から 5% に変えて試験した結

果、5%塩化カリウム溶液で硬化したものが機械的に安定であった。MC-1, MC-2, MC-3, および MC-4 のマイクロカプセルを調製する場合、GOD 活性を 10, 25, 50, および 100 U/ml と変え、その酵素活性をトリンダー法で試験した結果、GOD は 50 U/ml のものが大きな酵素活性を示した。しかし、MC-3 は酵素活性をほとんど示さなかった。そこで、MC-3 を乳鉢ですりつぶしてカプセル内の GOD の酵素活性を調べた結果、カプセル内の溶液は活性を示した。ポリスチレン膜は分子量 800 以下のものを透過すると報告²¹⁾もあり、分子量の小さなグルコースはポリスチレン膜を透過すると考えられる。しかし、MC-2 はグルコースに対して活性を示さなかったのは、ポリスチレン膜は、1) 疎水性であり、また、2) カプセル調製時に塩化メチレンのような有機溶媒を使用したことによる GOD の失活が考えられる。GOD の 50U の未カプセル GOD (遊離 GOD と略) と MC-1, MC-2, および MC-4 を用いてグルコースを定量した結果、遊離 GOD の反応性を 100% とした時、MC-1 と MC-2 は約 96%, MC-4 は約 47%であった。MC-1 と MC-2 の再利用において、2 回目は 68% に低下した。

3. 2 カプセル中の酵素量の変化

MC-1 の活性を調べるために基質の初濃度を一定にして、MC-1 中の酵素含有量を変えて検討し遊離 GOD と比較検討した。MC-1 は GOD を 10 U, 20 U, 40 U, および 50 U/ml と変え調製した。その結果は Fig. 1 に示した。反応初期において、50 U/ml GOD 含有 MC-1 の反応率は遊離 GOD の 1/2 であることがわかる。GOD によるグルコースの分解反応は水溶液中に十分溶解しているとき、一次反応であることが知られている。基質濃度を c 、反応時間 t とすれば反応速度式は

$$dc / dt = -kc \quad (1) \quad \text{で示される。} \quad k : \text{反応速度定数}$$

c の初濃度を a 、 t 時間後の a の濃度を $a-x$ とすると

$$-d(a-x) / dt = dx / dt = k(a-x)$$

$$dx / (a-x) = -kdt$$

$$\ln(a-x) = -kt$$

$$\log(a-x) = -kt / 2.303 \quad (2)$$

MC-1 を用いたグルコースの分解反応が一次反応であるなら、 $\log(a-x)$ と t のプロットは直線になり、この直線の勾配から k が得られる。Fig. 2 からほぼ直線関係が得られ、反応速度定数と基質の初濃度の積を反応速度とすると、50 U/ml の GOD を含有する MC-1 と 10 U/ml 遊離 GOD の反応速度はそれぞれ、 $8.3 \times 10^2 \mu \text{ mol/min}$, $1.89 \times 10^1 \mu \text{ mol/min}$ であった。

3. 3 基質濃度と反応性

GOD によるグルコースの分解と反応時間との関係について MC-1 を用いて基質の濃度を変えて検討した。その結果を Fig. 3 に示した。この MC-1 の反応速度定数 k を求めるため、(2)式を用い $\log(a-x)$ と t をプロットし、この直線の勾配より求めた k を Fig. 4 と Table 1 に示した。反応速度定数 k と基質初濃度 a より反応初速度を計算して、Fig. 5 に示した Lineweaver-Burk plot からミハエリス定数、 k_m は 2.17 mmol/l 、最大反応速度 V_m は 281.6 mmol/min が得られた。Lineweaver-Burk plot に乗ることから MC-1 も通常の酵素反応と同じ様な反応機構により進行することを示唆する。

3. 4 酵素反応の停止

MC-1 をグルコース溶液中に入れ酵素反応の途中で、MC-1 を反応系から取り出したとき、その反応の進行について検討した。反応開始 2 時間後、MC-1 を取り出し、取り出した後の過酸化水素の生成を調べた結果を Fig. 6 に示した。Fig. 6 から MC-1 を反応系から取り出すと反応が進行しないことがわかる。この結果、MC-1 中の酵素は反応系に溶出することなしに MC-1 内で酵素反応が起こっているものと思われる。また、酵素反応は途中で MC-1 を系外に取り出すことで停止できることがわかった。

3. 5 実試料への応用

日本酒に含まれるグルコースの定量は 50 U/ml の GOD を含む MC-2 を用いて酵素反応を行い、トリンダー法と GPC により分析を行った。日本酒を pH 5.1 の 0.05 M リン酸ナトリウム緩衝溶液で 400 倍に希釈したものを試料とした。その結果を Table 2 と Fig. 7 に示した。MC-2 の値は 2.68%、遊離 GOD では 2.67%、GPC 分析では 2.55%の値を得、5 回の測定による RSD (%) は MC-2, 遊離 GOD, および GPC に対して、それぞれ 5.41, 2.72, および 1.75 とほぼ満足できる値を得た。

参考文献

- 1) 近藤保, 小石真純: “マイクロカプセル”, 新版. (1987), (三共出版).
- 2) 近藤保: “マイクロカプセル”, 初版, (1987), (共立出版).
- 3) 近藤保 監修: “最新マイクロカプセル化技術”, (1990), (総合技術センター).
- 4) T. Mori, T. Tosa, and I. Chibata: *Biochimica Biophysica Acta*, 321, 653(1973).
- 5) T. M. S. Chang: *Nature*, 229, 117(1971).
- 6) J. Grunwald and T. M. S. Chang: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 81, 565(1978).
- 7) H. Watarai, S. Hatakeyama: *Anal. Sci.*, 7, 487(1991).
- 8) 渡会仁, 安田美和子, 高橋聡子: *分析化学(Bunseki Kagaku)*, 42, 740(1993).
- 9) 渡会仁: *化学と工業 (Kagaku to Kogyo)*, 47, 1542(1994).
- 10) 小嶋健博, 難波孝次, 重富康正: *日本化学会第63春季年会講演要旨集*, P.858(1992).
- 11) 小嶋健博, 難波孝次, 重富康正: 投稿準備中.
- 12) 千畑一郎 編: “固定化酵素”, 第4刷, (1980), 講談社.
- 13) F. Lim and A. M. Sun: *Science*, 210, 908(1980).
- 14) Y. F. Leung, G. M. O Shea, M. F. A. Goosen, and A. M. Sun: *Artif. Organs*, 7, 208(1983).
- 15) Y. Miura, T. Akimoto, H. Kanazawa, and K. Yagi: *Artif. Organs*, 10, 460(1986).
- 16) D. A. Wood, T. L. Whateley: *J. Pharmacol.*, 34, 552(1982).
- 17) 野沢靖夫, 八木利男, 東出福司: *薬剂学(yakuzaigaku)*, 35, 81(1975).
- 18) 富士写真フィルム: 特公昭 49-45133(1984), 特公昭 49-37710(1984).
- 19) K. Tamaoku, K. Ueno, K. Akiura, and Y. Ohkura: *Chem. Pharm. Bull.*, 30, 2492(1982).
- 20) K. Tamaoku, Y. Muraio, K. Akiura, and Y. Ohkura: *Anal. Chim. Acta*, 136, 121(1982).
- 21) 北島正夫, 宮野静夫, 近藤朝二: *工業化学*, 72, 493(1969).

Preparation and analytical application of microcapsules containing glucose oxidase.

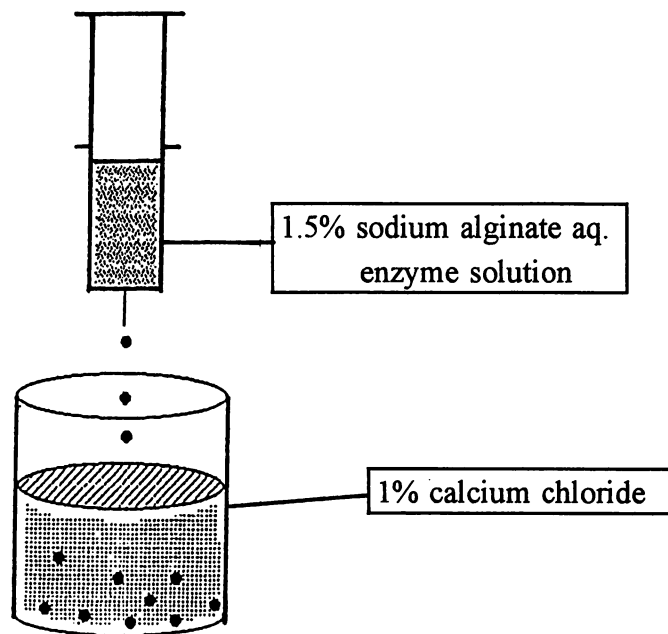
Yasumasa SHIGETOMI, Kouji NANBA, Norihiro OZAKI ,
and Takehiro KOJIMA*

Department of Chemistry, Faculty of Science, Okayama University of Science, 1-1, Ridai-cho, Okayama 700-0005, Japan

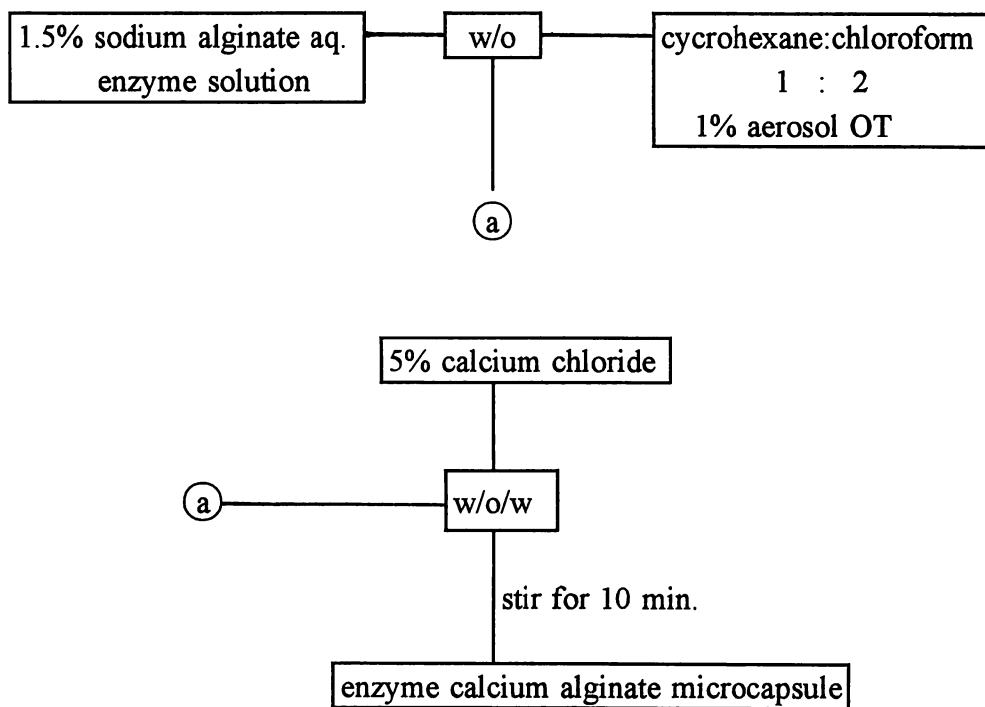
**Department of Life Science, Faculty of Science, Okayama University of Science, 1-1, Ridai-cho, Okayama 700-0005, Japan*

(Received September 29, 2004; accepted November 5, 2004)

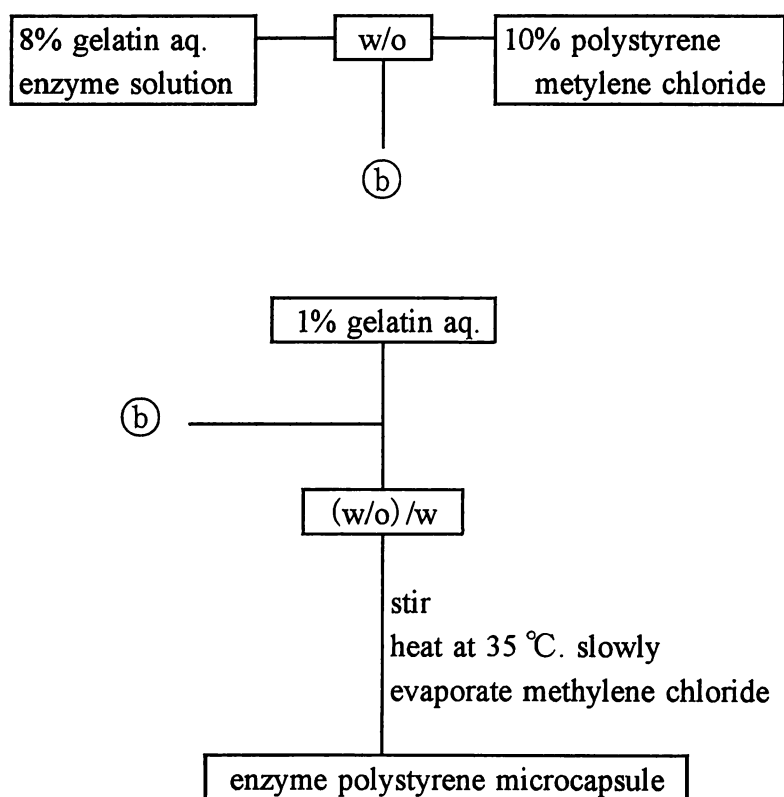
Four types of microcapsules containing glucose oxidase(EC 1.1.3.4) have been prepared and assessed as a n immobilized-enzymed system for the conversion of glucose into gluconate and hydrogen peroxide in phosphate buffer solution(pH 5.1) at 37 °C. The calcium alginate- and polyurethane-microcapsules are recommended. They have excellent enzyme activities.



Scheme 1 Preparation of calcium alginate minicapsule.



Scheme 2 Preparation of calcium alginate microcapsule.



Scheme 3 Preparation of polystyrene microcapsule.

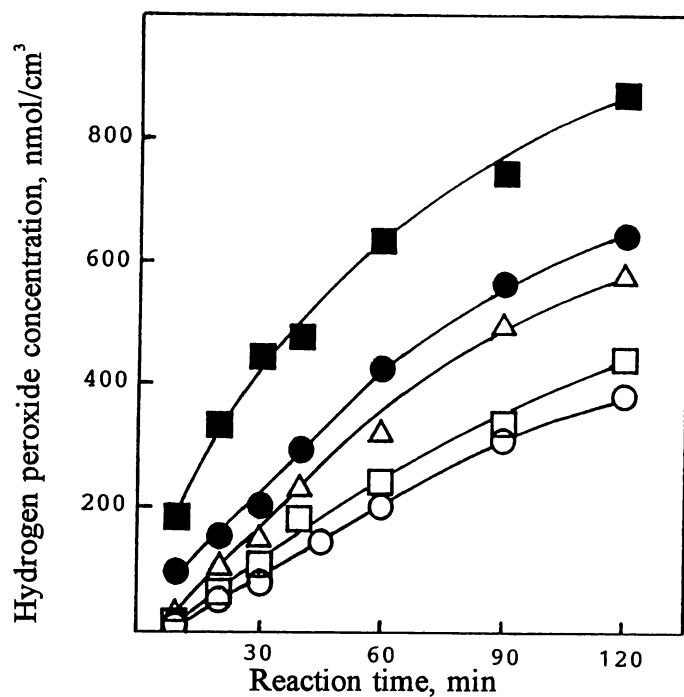


Fig. 1 Effect of the amount of GOD entrapped in microcapsules on the overall enzymatic reaction

○ 10U; □ 20U; △ 40U; ● 50U; ■ Free Enzyme

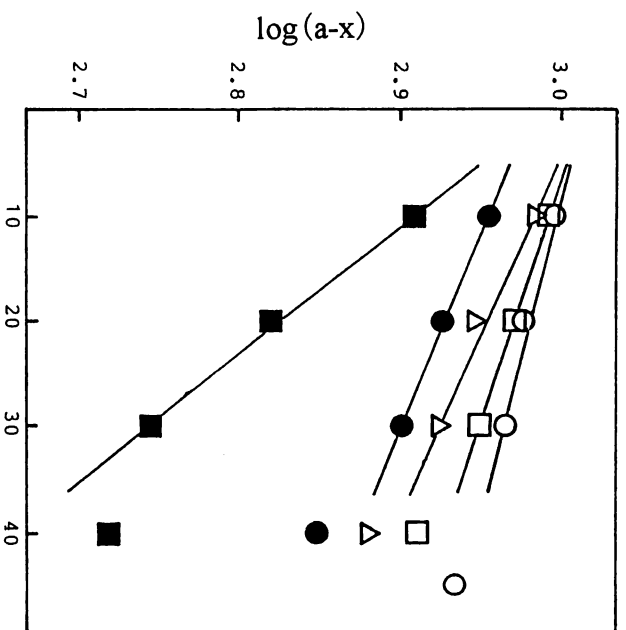


Fig. 2 Plots of reaction time, $\log(a-x)$ for GOD-MC. GOD-MC were containing 10, 20, 40, 50U of enzyme, respectively.

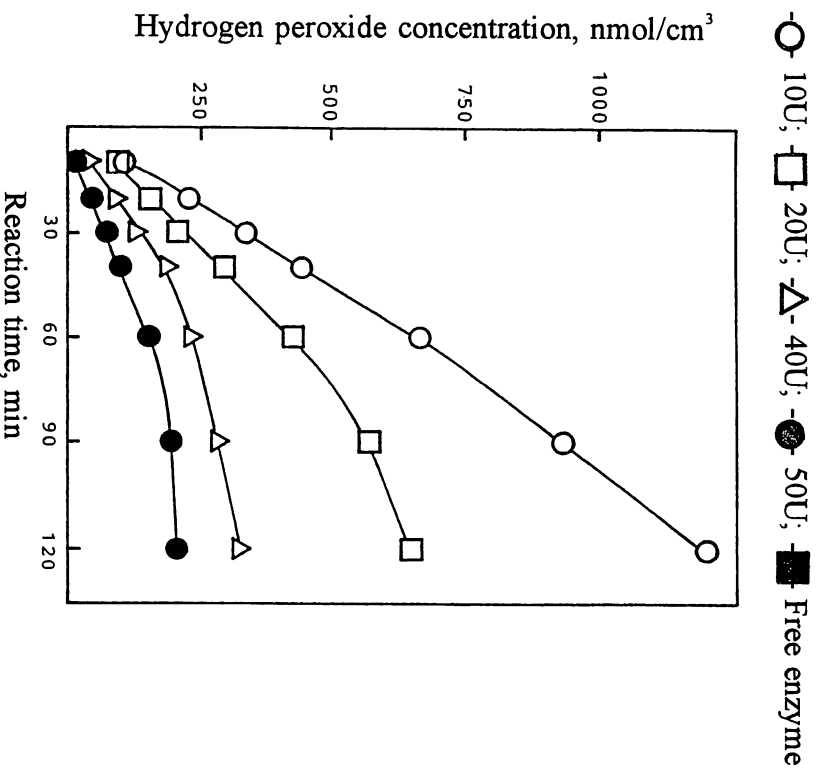


Fig. 3 Effect of substrate concentration on the overall enzymatic reaction.

● 0.3 mM; △ 0.5 mM; □ 1mM; ○ 2 mM

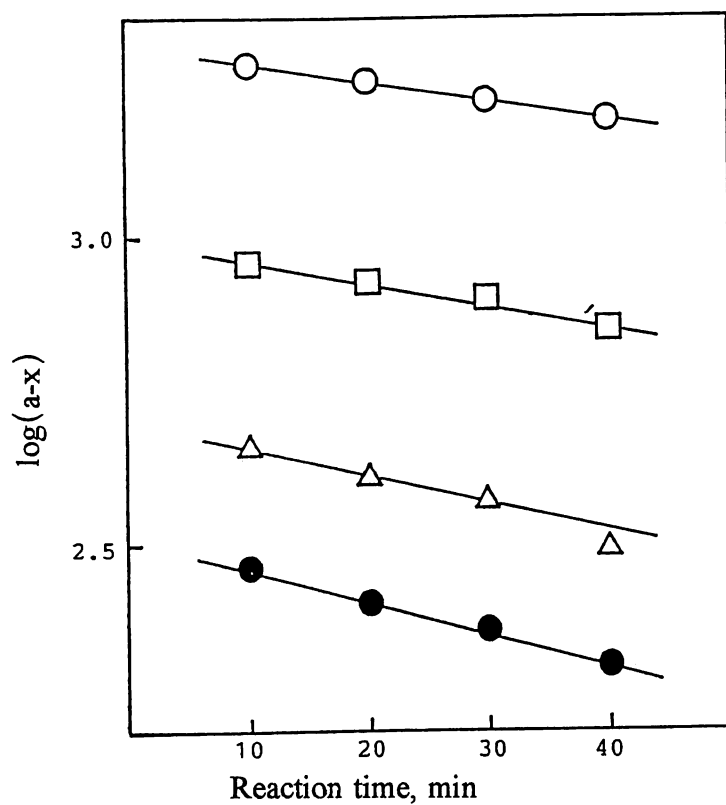


Fig. 4 Calculation of rate constant, $k(\text{GOD-MC})$.

$k(\text{min}^{-1})$ ○- 0.0069, □- 0.0083, △- 0.0104, ●- 0.0115

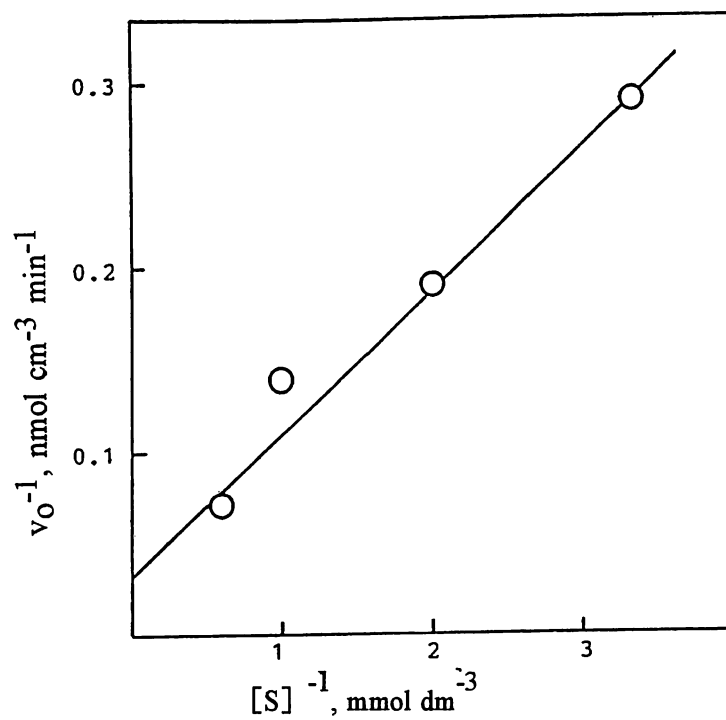


Fig. 5 Lineweaver-Burk plots for GOD-MC.

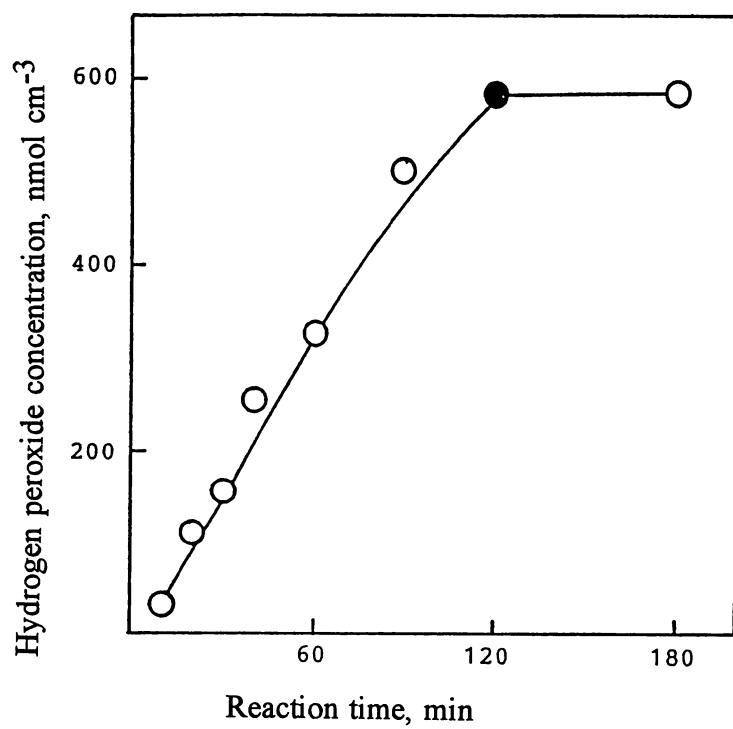


Fig. 6 Overall enzymatic reaction of GOD-MC. GOD-MC had been removed from the reaction vessel after 120 minutes.

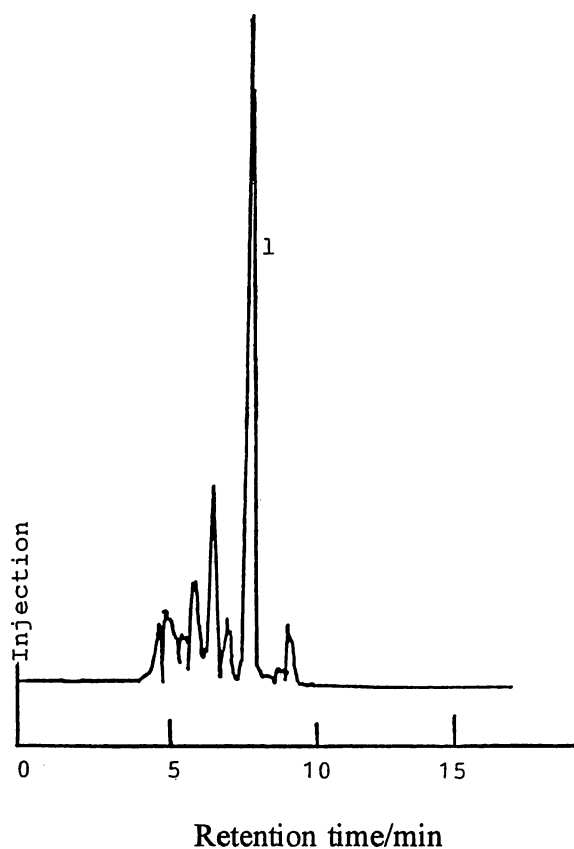


Fig. 7 Gel permeation chromatogram of glucose in Sake
 Injection volume: 5 μ l, mobile phase: water
 Flow rate: 1.0 ml/min, Temperature: 60 $^{\circ}$ C,
 detector: RI (1): glucose

Table 1 Velocity constant and initial velocity for GOD-MC

Substrate concentration (mmol dm^{-3})	Velocity constant, k	Initial velocity, v_0 ($\mu\text{mol/min}$)
0.3	0.0115	3.45×10^{-2}
0.5	0.0104	5.20×10^{-2}
1.0	0.0083	8.30×10^{-2}
2.0	0.0069	1.38×10^{-1}

Table 2 Determination of D-glucose in Sake

Method	Concentration, %
MC-2/Trinder	2.68
Free GOD/Trinder	2.67
GPC	2.55