

生体模倣を利用した安価な酵素固定化法の確立と酵素活性評価

(愛知工業大学¹産業技術総合研究所²)

○川地佑樹¹, 釘宮慎一¹, 中村仁美², 加藤且也^{2*}

【諸言】 酵素固定化法の中の1つである包括法は、酵素の周りに担体が形成する為、酵素の過度な変性を抑えることが可能であること、脱着が起こりにくいなどの特徴を持つ。一方で、合成時に酸塩基触媒を使用することから、酵素が活性を失ってしまう恐れがある。また、細孔径を制御することが困難であるために、基質の拡散を阻害してしまう、または繰り返し使用することができない可能性がある。

この問題点を解決する方法として、ケイ酸を顆粒状に凝集させる silaffin protein を模倣したペプチドを酸塩基触媒の代替として使用する方法や、ペプチドの二次構造を利用し、細孔を制御する方法が報告されている。しかし、前者の方法は使用するペプチドが高価であること、後者の方法は塩基性条件下で反応が進むことや得られた細孔がマイクロポーアであることなどの改善点が存在する。

そこで本研究では、これらの改善点を解決する酵素固定化法の確立を目的とした。以前の当研究室の研究により、ペプチドの配列を変化させることで金属アルコキシドの加水分解、縮合反応に対する触媒能と形成されるシリカの球径を制御できることが明らかとなった。本研究では、その知見を基にシリカの球径を制御することで、メソポーア構造を有した担体を作製し、より安価なペプチドを用いることで、生体模倣を用いた安価な酵素固定化法を確立することを目的とした。

【実験方法】 今回使用したペプチド類は固相合成により合成し、分子量は MALDI-MS によって確認した。ゲルの合成方法は、蒸留水 3mL に合成ペプチド 1.5mg を溶解し、テトラエトキシシラン(TEOS)をゆっくり上層に 3mL 添加し、1週間室温に静置することでシリカゲルを合成した。またシリカゲルを凍結乾燥し、BET、FE-SEM 等でその特性について評価を行った。

【結果と考察】 合成ペプチド4種類 [Lys10, His10, Lys5Asp5, (LysAsp)5]により合成されたゲルを凍結乾燥後、BET 測定を行った結果、静置状態で合成したシリカゲルは、攪拌により合成したゲルとは異なり、メソポーラス構造を有することが確認された (Table.1)。これは、加水分解・縮合反応の速度が遅くなり粒子サイズが増大し、粒子間細孔のサイズ拡大へと繋がった為であると考えられる。また、安価なペプチドで代用した結果、ペプチドの分子量を変化させた時、表面積、細孔体積、細孔径に影響がなく、本法を用いて酵素をゲル内に封入し、活性を測定した結果、高活性を保持することに成功した。

Table 1 Surface area, pore volume and pore diameter of silica gel prepared by synthetic peptides

catalyst	surface area (m ² /g)	pore volume (cm ³ /g)	pore diameter (nm)
Lys10	481	0.35	2.9
His10	451	0.30	3.4
Lys5Asp5	352	0.07	2.1
(LysAsp)5	350	0.15	1.7