

酵母固定化コア/シェル型マイクロカプセル を用いた不斉還元に関する基礎的研究

永徳圭一*、吉田昌弘**、上村芳三**、幡手泰雄**

ASYMMETRIC REDUCTION UTILIZING CORE/SHELL MICROCAPSULES IMMOBILIZED BAKER'S YEAST

Keiichi EITOKU, Masahiro YOSHIDA, Yoshimitsu UEMURA and Yasuo HATATE

A new method for the preparation of core/shell microcapsules suitable for a cell immobilization matrix was developed by utilizing the solvent evaporation technique of water-in-oil-in-water(w/o/w) emulsions. The method was based on the phase separation of polymer chains within w/o/w emulsion droplets. The effect of poly(methylmetacrylate) concentration on the microcapsule morphology was investigated. It was found that the formation of both core and micropore is significantly affected by PMMA concentrations. In addition, yeast cells immobilized into the PMMA microcapsules catalyzed the asymmetric reduction of acetophenone to 1-phenylethanol, and it maintained the high enantiomer excess.

Keywords: core/shell microcapsule, Baker's Yeast, microbioreactor, asymmetric reduction, organic media

1. 緒言

私たちの身の回りには、糖、アミノ酸、薬物に代表される光学活性化学物が数多くある。それらの合成法の一つとして、酵素や微生物などの生体触媒を用いる方法がある。特に微生物に関して、補酵素を微生物の細胞内部で再生するシステムが確立されていることからその化学触媒としての有用性が期待されている¹⁾。合成の対象となる物質は、疎水性の高い物質が大半であり、このような優れた性質を利用するには微生物を有機媒体中で使用する必

要がある²⁾。有機媒体中においてたいの微生物は、有機溶媒の高い毒性と細胞の耐性が低いために失活してしまうことが一般的である³⁾。そこで、微生物を生体適合のゲルマトリクスに包括固定化する固定化触媒としての利用法が検討されている⁴⁻⁷⁾。しかしながら、ゲルマトリクスは、その長期使用の膨潤-伸縮を繰り返すことに起因するマトリクスの崩壊や微生物自体の漏洩という欠点を有する。

そこで、本研究では微生物の固定化技術として機械的強度に優れ、かつ微生物の漏洩のないマイクロカプセル化技術を採用した。具体的には、カプセル基材として機械的強度に優れるポリメタクリル酸メチル(PMMA)を使用し、微生物を高効率で内包でき、カプセル内部への反応基質/反応生成物の拡散性に優れた単核構造を有するコア/

2003 年 8 月 31 日受理

* 博士前期課程応用化学工学専攻

** 応用化学工学科

シェル型マイクロカプセルの調製を行った⁸⁾。本稿では、まずコア/シェル型マイクロカプセルを調製するために、w/o/w エマルションの液中乾燥による高分子の相分離法を利用し、そのカプセル基材として用いた PMMA の濃度がカプセルの構造や微生物(酸化還元酵素であるアルコールデヒドロゲナーゼを含むパン酵母)の固定化に対する影響を調査した。さらに、調製した酵母固定化マイクロカプセルの有機媒体中におけるアセトフェノンの不斉還元をモデル反応として行い、その不斉還元反応特性を評価した。

2. 実験

2.1 試薬

アルギン酸ナトリウム(和光純薬)を微生物保護剤として用いた。ポリメタクリル酸メチル(和光純薬)をカプセル壁材、ジクロロメタン(沸点:40℃、和光純薬、以後 DCM と省略)を高分子良溶媒として用いた。界面活性剤としてソルビタンモノオレエート(和光純薬、以後 Span 80 と省略)を用いた。また、分散安定剤としてポリビニルアルコール(重合度:500、和光純薬、以後 PVA と省略)および第三リン酸カルシウム10%スラリー(大平化学産業、以後 TCP-10・U と省略)を用いた。

2.2 単核構造を有するコア/シェル型のマイクロカプセルの調製原理

単核構造を有するコア/シェル型のマイクロカプセルの調製法は、高分子の相分離を利用した w/o/w エマルションの液中乾燥法による新しい調製法である。その調製概念を図1に示す。

有機相はカプセル壁材となる高分子、溶媒、乳化剤からなる。芯物質と内水相の混合物を有機相に分散させ、w/o エマルションを調製する。その調製された w/o エマルションを外水相に分散させることで w/o/w エマルションを調製した後、減圧下での温度上昇に伴う溶媒の除去によって高分子の相分離を起こさせる。

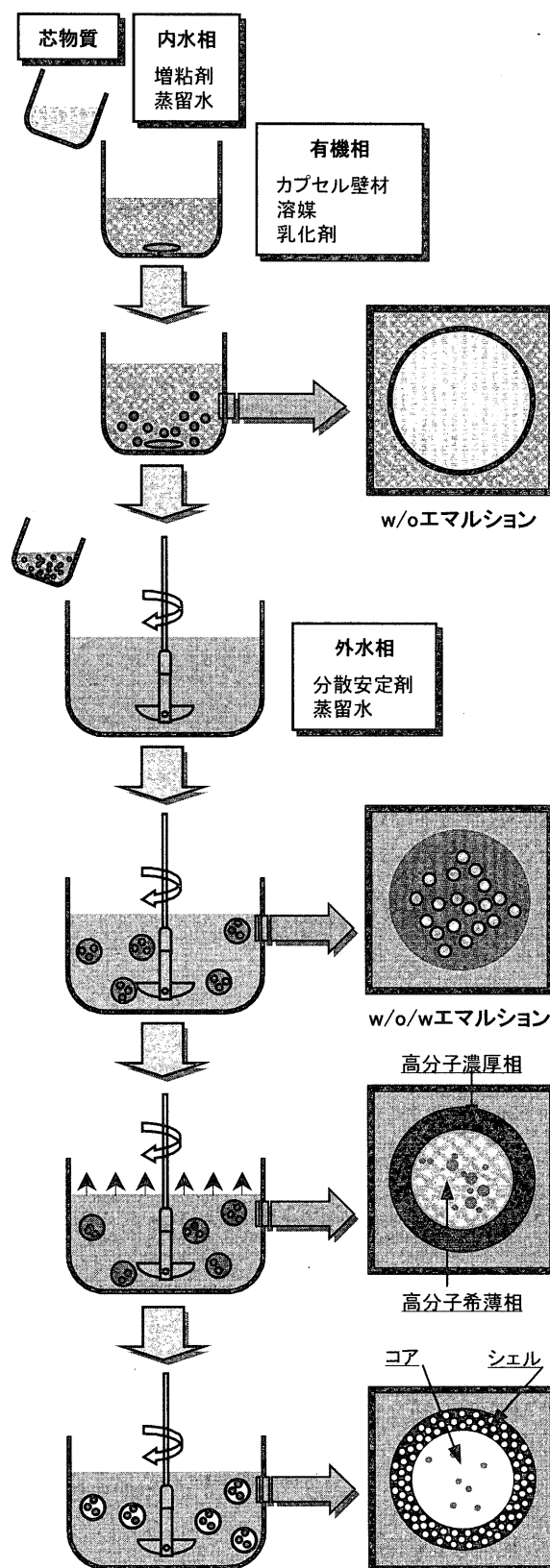


図1 コア/シェル型のマイクロカプセルの調製概念図

このように、w/o/w エマルジョンの液滴内での溶媒蒸発による高分子の相分離を行うことで単核構造を有するコア/シェル型のマイクロカプセルの調製が可能になる。

2.3 単核構造を有するコア/シェル型のマイクロカプセルの調製

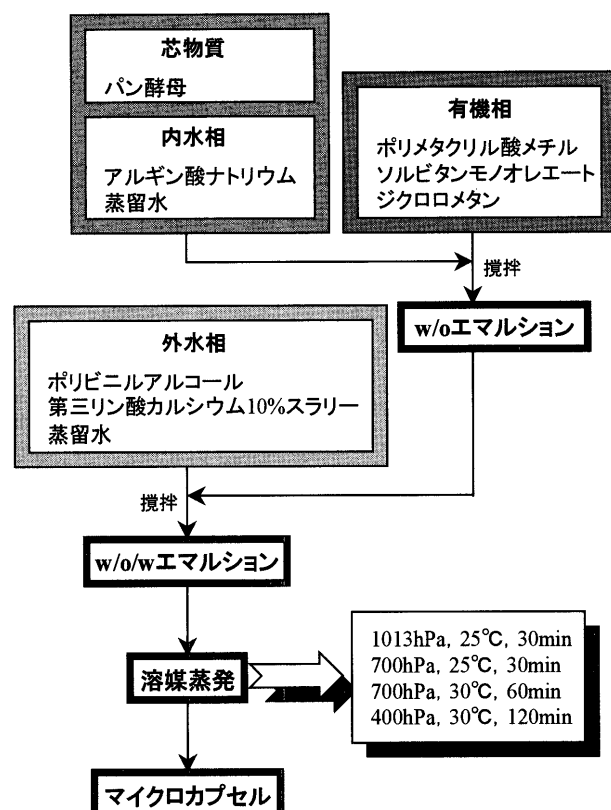


図2 コア/シェル型のマイクロカプセルの調製スキーム

マイクロカプセルの調製スキームを図2に示す。芯物質としてパン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を用い、内水相は、4.95g の蒸留水に 0.05g のアルギン酸ナトリウムを溶かしたものを用いた。有機相は、PMMA とジクロロメタンの質量混合比(PMMA/DCM)を変化させたものに、1.8g の Span 80 を添加したものを用いた。外水相は、345g の蒸留水に 5g の PVA を溶かし、150g の TCP-10・U を添加したものを用いた。スターラーで攪拌している有機相に芯物質と内水相からなる混合液を分散させ、w/o エマルジョンを調製した。その w/o エマルジョンを 150rpm で攪拌している外水相に分散させ、w/o/w エマルジョンを調製した。次に、

700hPa で 25°C から 30°C に昇温することで、ジクロロメタンを除去した。その後、400hPa まで減圧することで、マイクロカプセルを固化させた。得られたマイクロカプセルを 0.5N 塩酸で洗浄した後、濾過して回収した。

2.4 コア/シェル型マイクロカプセルの構造評価

マイクロカプセルの構造は、走査型電子顕微鏡 (SEM、HITACHI S-2500) を用いて観察した。

2.5 酵母固定化マイクロカプセルを用いたアセトフェンの不斉還元

モデル反応としてアセトフェンの不斉還元を選択した。アセトフェンの不斉還元反応スキームを図3に示す。

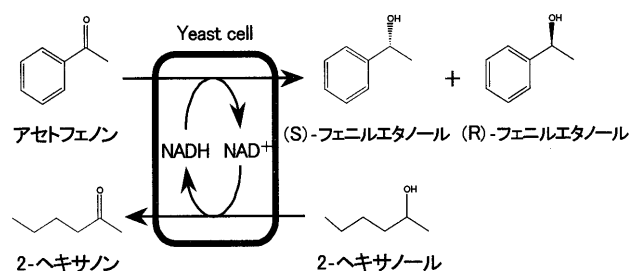


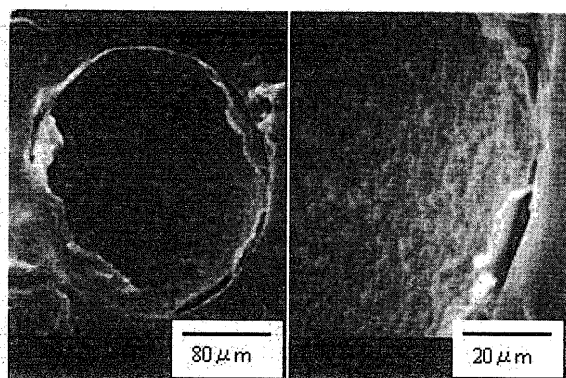
図3 アセトフェンの不斉還元

反応は、ドデカン中に行った。酵母固定化マイクロカプセル 1g とそれぞれ濃度が 50mmol/l のアセトフェン (基質) と 2-ヘキサノール (補助基質) の混合溶液 5ml をサンプル瓶 (20ml) に入れた。振とう恒温槽を用いて、120rpm、30°C で 2 時間反応させた。所定時間にサンプリングした混合溶液はメンブレンフィルターにより濾過後、ガスクロマトグラフィー (SHIMADZU GC-17A) を用いて分析した。

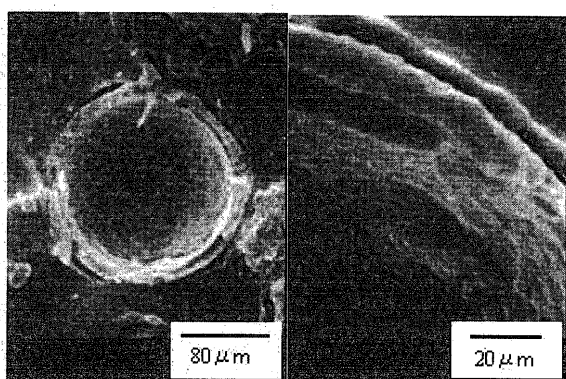
3. 結果および考察

3.1 PMMAとDCMの混合比がマイクロカプセルの構造に及ぼす影響

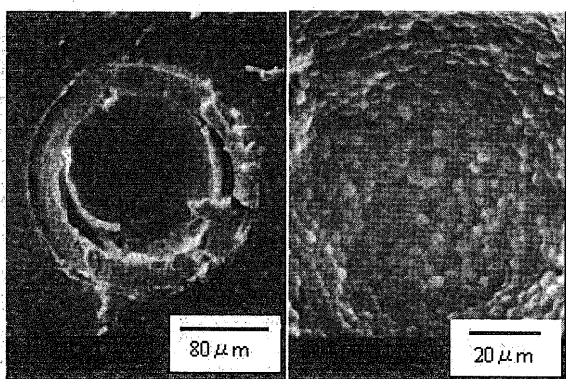
有機相中の PMMA と DCM の混合比を変化させ、マイクロカプセルの構造に及ぼす影響を調べた。調製したマイクロカプセルの SEM 写真を図4に示す。



PMMA/DCM=0.0526 (w/w)



PMMA/DCM=0.0640 (w/w)



PMMA/DCM=0.141 (w/w)

図4 調製したマイクロカプセルの断面図

PMMA/DCM=0.0526 の質量混合比で調製したマイクロカプセルは、粒径が約 50～300 μm 、膜厚が約 4 μm の球状マイクロカプセルであった。マイクロカプセルの断面観察を行ったところ、多くのマイクロカプセルが単核中に酵母を固定化していることを確認した。しかし、単核中に酵母が固定化されていないものや酵母の固定化量が少ないものもわずかながら存在した。膜厚が非常に薄いために

マイクロカプセルの回収時にカプセル壁膜が破損してしまったものもあった。

PMMA/DCM=0.0640 の質量混合比で調製したマイクロカプセルは、粒径が約 50～300 μm 、膜厚が約 8 μm の球状マイクロカプセルだった。マイクロカプセルの断面観察を行ったところ、極わずかではあるが単核構造ではなく多核構造になっているマイクロカプセルが存在した。多くのマイクロカプセルは単核中に酵母を固定化しており、単核中に酵母が固定化されていないものや酵母の固定化量が少ないものはわずかだった。膜厚が 8 μm 程度になるとカプセル壁膜の破損は確認されなかった。

PMMA/DCM=0.141 の質量混合比で調製したマイクロカプセルは、粒径が約 50～300 μm 、膜厚が約 25 μm の球状マイクロカプセルだった。PMMA の質量が増すことで、多核構造のマイクロカプセルが存在するようになる傾向が見られた。しかし、PMMA/DCM=0.141 の質量混合比でも単核構造を有するマイクロカプセルが多くの割合を占めていた。マイクロカプセルの断面観察を行ったところ、多くのマイクロカプセルが単核中に酵母を固定化していることを確認したが、単核中に酵母が固定化されていないものや酵母の固定化量が少ないものもわずかながら存在した。

以上の結果より、PMMA と DCM の混合比を変化させることで、マイクロカプセルの壁膜の厚さを変化させることが可能であった。PMMA/DCM の値を小さくしていくとマイクロカプセルの壁膜が薄くなり、PMMA/DCM の値を大きくするとマイクロカプセルの壁膜が厚くなる傾向が見られた。PMMA/DCM の値が大きくなりすぎることで、調製したマイクロカプセルの中に多核構造のマイクロカプセルの存在が確認できた。

3.2 酵母固定化マイクロカプセルを用いたアセトフェンの不斉還元

酵母固定化 PMMA マイクロカプセル (PMMA/DCM=0.141 (w/w)) を用いて、モデル反応のアセトフェンの不斉還元反応を行った。対象実験として、非固定化酵母あるいは酵母固定化アルギン酸カルシウム

ビーズを用いたアセトフェンの不斉還元反応も行った。対象実験として用いた酵母固定化アルギン酸カルシウムビーズは、ホモジナイザー (POLYTRON, KINEMATICA AG) を用いて調製されたものであり、粒径が約 $50\mu\text{m}$ の球状ゲルビーズであった。非固定化酵母、酵母固定化アルギン酸カルシウムビーズ、酵母固定化 PMMA マイクロカプセルを各サンプル瓶に 1g ずつ加え、さらに、溶媒にドデカン、基質にアセトフェン、補助基質にラセミ体の 2-ヘキサノールを用いて 50mmol/l、5ml とした反応溶液を加えた。振とう恒温槽により 120rpm、 30°C で 2 時間反応させ、反応後の混合溶液をメンブレンフィルターにより濾過後、ガスクロマトグラフィーにより分析して得られた結果を図 5 に示す。

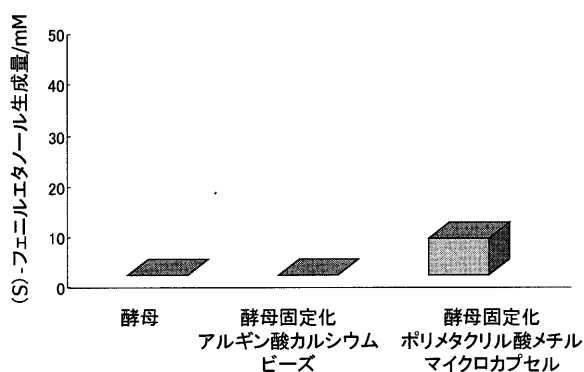


図 5 アセトフェンの不斉還元における固定化の影響

非固定化酵母、酵母固定化アルギン酸カルシウムビーズとともに (S)-フェニルエタノールを生成することができず、酵母固定化 PMMA マイクロカプセルは (S)-フェニルエタノールを光学純度 100% で 7.3mM 生成した。この結果から、固定化することにより酵母の失活が抑えられたと考えられる。また、反応時の酵母と酵母固定化アルギン酸ゲルビーズの状態が凝集した状態だったのに対して、酵母固定化 PMMA マイクロカプセルは分散性及び孤立性が良かった。すなわち、固定化担体であってもアルギン酸カルシウムビーズの凝集がゲルの崩壊を引き起こし、固定化した酵母が有機溶媒にさらされ、失活したものと考えられる。

3.3 アセトフェンの不斉還元における補助基質の影響

酵母固定化 PMMA マイクロカプセル (PMMA/DCM=0.141 (w/w)) を用いて、モデル反応のアセトフェンの不斉還元における補助基質の影響を調べた。反応溶液中に補助基質が存在しないものと存在するもので比較して実験を行った。酵母固定化 PMMA マイクロカプセルを 1g サンプル瓶に加え、さらに、溶媒にドデカン、基質にアセトフェン、補助基質にラセミ体の 2-ヘキサノールを含むものと含まないものを用いて 50mM、5ml とした反応溶液を各サンプル瓶に加えた。振とう恒温槽により 120rpm、 30°C で 2 時間反応させた。反応後の混合溶液をメンブレンフィルターにより濾過後、ガスクロマトグラフィーにより分析して得られた結果を図 6 に示す。

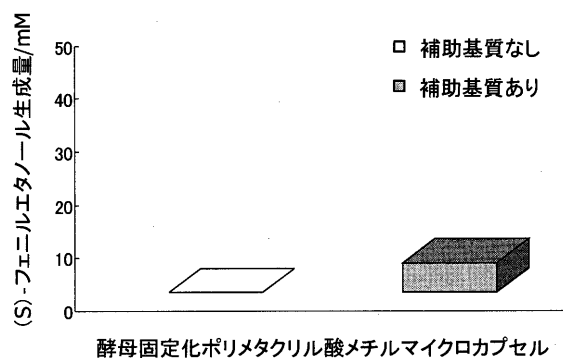


図 6 反応における補助基質の影響

補助基質がある場合において (S)-フェニルエタノールが光学純度 100% で 5.6mM 生成した。一方、反応溶液中に補助基質が存在しない場合は (S)-フェニルエタノールが生成しなかった。このことから、反応には補助基質による補酵素の再生反応が必要であることを確認した。

4. 結言

高分子の相分離を利用した w/o/w エマルジョンの液中乾燥法によって単核構造を有するコア/シェル型のマイクロカプセルを調製することができた。マイクロカプセルの壁膜の厚さが有機相中の PMMA と DCM の混合比に大きく依存することがわかった。調製したマイクロカプセルは粒

径が約 50~300 μm 、PMMA/DCM の値を変化させることで膜厚がそれぞれ約 4 μm 、8 μm 、25 μm となった。さらに、調製されたマイクロカプセルの単核中には酵母が固定化されており、固定化された酵母は、アセトフェノンを (S)-フェニルエタノールへ還元した。さらに、酵素の高い基質特異性により高い光学純度を達成できた。また、反応において補助基質による補酵素の再生反応が必要であることを確認した。

以上のことから、調製された PMMA マイクロカプセルは酵母に代表される微生物の有効な固定化担体として利用可能であることが示された。

参考文献

- 1) K. Ishihara, M. Nishitani, H. Yamaguchi, N. Nakajima, T. Ohshima, and K. Nakamura, *J. Ferment. Bioeng.*, Vol.84, No.3, pp.268-270 (1997)
- 2) J. Qun, Y. Shanjiang, M. Lehe, *Enzyme Microbial Technol.*, Vol.30, pp.721-725 (2002)
- 3) N. Llanes, J. Pendas, A. Falero, C. Perez, B. R. Hung, T. Moreira, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, Vol.80, pp.131-133 (2002)
- 4) Y. Hasegawa, S. Adachi, and R. Matsuno, *J. Ferment. Bioeng.*, Vol.89, No.4, pp.329-333 (2000)
- 5) P. Christov, G. Spassov, V. Pramatarova, *Process Biochem.*, Vol.34, pp.231-237 (1999)
- 6) D. R. Griffin, F. Yang, G. Carta, and J. L. Gainer, *Biotechnol. Prog.*, Vol.14, pp.588-593 (1998)
- 7) 千畑一郎, 固定化生体触媒, 講談社サイエンティフィク, pp.1-36 (1985)
- 8) 永徳圭一, 吉田昌弘, 樋之口大作, 幡手泰雄, 上村芳三, 河野恵宣, “微生物固定化マイクロカプセルの製造方法”, 特願 2003-132626 (2003)