

微生物包含マイクロカプセルの合成とその性質 (I)

—パン酵母包含マイクロカプセル—

英 謙二・窪田茂男・白井汪芳・北條舒正

信州大学繊維学部機能高分子学科

I 諸 言

今日、めざましい発展を遂げつつあるバイオテクノロジーの一分野に酵素利用の研究がある。酵素は温和な条件下で、基質、反応、立体、位置といった数々の点で特異性の高い反応を行なえる魅力ある生体触媒である。しかし、酵素は一般に安定ではなく、一度使用すれば変性し易く、除去しなければならない場合が多い。また、酵素自体が高価な場合では、使用限度がある。そこで酵素のもつ生体触媒作用を安定に、しかも連続的に使用するという目的で、記録材料、表示材料、医薬品、香料、肥料、農薬、防錆剤、生医学材料等に広く利用されているマイクロカプセル¹⁾を用いて、有用酵素を含む微生物の固定化^{2,3)}を考えた。

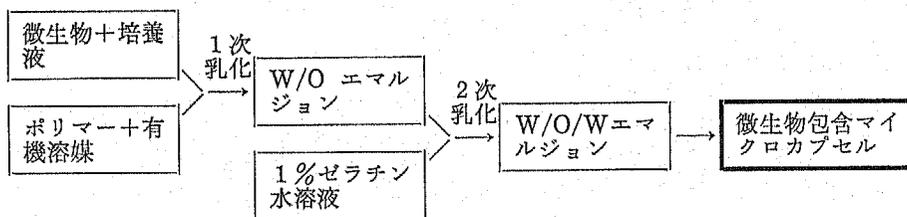
本研究では、有用微生物としてパン酵母をとり上げ、パン酵母包含マイクロカプセルを合成し、基質にアセト酢酸エチルを用いて、その不斉還元反応の触媒作用を検討した。

II 実 験

1 パン酵母包含マイクロカプセルの合成

パン酵母包含マイクロカプセルは、界面沈殿法^{1,4)}と液中硬化法^{1,5)}の二通りの方法により合成した。

1-1 界面沈殿法によるパン酵母包含マイクロカプセルの合成



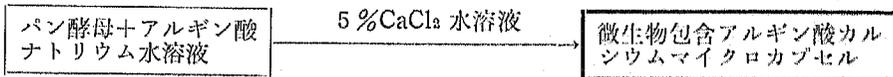
(1) 試薬 ポリスチレン、エチルセルロース、ゼラチンは、市販品をそのまま用いた。ジクロロメタンは市販特級品を用いた。パン酵母はオリエンタル酵母社製のドライイー

ストを使用した。

(2) 合成方法

ポリマー（ポリスチレン、エチルセルロース）2.0gを18.0gのジクロロメタンに溶解し、1.0gのドライイーストを含む3.0mlの培養液（麦芽エキス2.0%、ブドウ糖2.0%、ペプトン0.1%）を加え、マグネチックスターラーで攪拌して1次乳化させ、W/Oエマルジョンとした。このエマルジョンを1%ゼラチン水溶液中に加え、ケミスターラー（羽根径30mm、6枚羽根）で382rpmで2次乳化させ、W/O/Wエマルジョンとし、これを35°C、2.0時間攪拌してパン酵母包含マイクロカプセルを合成した。カプセルは滅菌水で数回洗浄して使用した。なお、使用した水溶液等は、すべてオートクレーブ（120°C、15分間）で滅菌した。

1-2 液中硬化法によるパン酵母包含マイクロカプセルの合成



(1) 試薬

アルギン酸ナトリウムは市販品を、塩化カルシウムは市販一級品をそのまま用いた。パン酵母はオリエンタル酵母社製のドライイーストを使用した。

(2) 合成方法

アルギン酸ナトリウム2.0gを90mlの滅菌水に溶解し、①ドライイースト1gを含む10mlの培養液、あるいは、②ドライイースト5gを含む10mlの培養液を加え、けん濁させた。これを5%塩化カルシウム水溶液中に滴下することにより、パン酵母包含アルギン酸カルシウムマイクロカプセルを合成した。このマイクロカプセルから余剰の塩化カルシウムを除くため、滅菌水で数回洗浄した。なお、以後マイクロカプセル中のパン酵母含有量は、アルギン酸ナトリウム2.0gに対して、①1.0gのドライイーストを含むものを33wt%とし、②5.0gのドライイーストを含むものを71wt%と略記する。

2 パン酵母包含マイクロカプセルからのパン酵母の増殖観察

2-1 増殖培地上でのパン酵母包含マイクロカプセルからの増殖観察

(1) パン酵母増殖培地

麦芽エキス2.0%、ブドウ糖2.0%、ペプトン0.1%、寒天1.8%より成る培地を、5mlずつ、耐熱キャップ付ねじ口試験管に入れ、オートクレーブ中で、120°C、15分間滅菌し、これを斜面培地とした。

(2) パン酵母増殖の観察

1-1で合成した界面沈殿法によるパン酵母包含ポリスチレンマイクロカプセル、およびエチルセルロースマイクロカプセルを斜面培地に移植して、30°Cで48時間培養し、それぞれのマイクロカプセルからのパン酵母の増殖の様子を観察した。

2-2 パン酵母包含マイクロカプセル中のパン酵母の酸素消費測定

ワールブルグ検圧計を用いてパン酵母による酸素の消費量を測定した。ワールブルグ検圧計専用容器にパン酵母包含アルギン酸カルシウムマイクロカプセルを10個（あらか

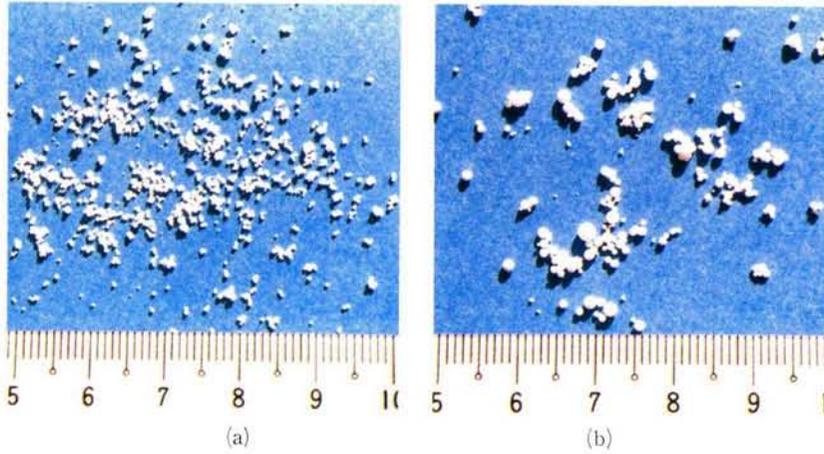


Fig. 1 (a): Polystyrene microcapsules containing *dry yeast* (33wt%)
(b): Ethyl cellulose microcapsules containing *dry yeast* (33wt%)



Fig. 2 Cultured *dry yeast* by transferring polystyrene microcapsules containing *dry yeast* to medium.



Fig. 3 Cultured *dry yeast* by transferring ethyl cellulose microcapsules containing *dry yeast* to medium.

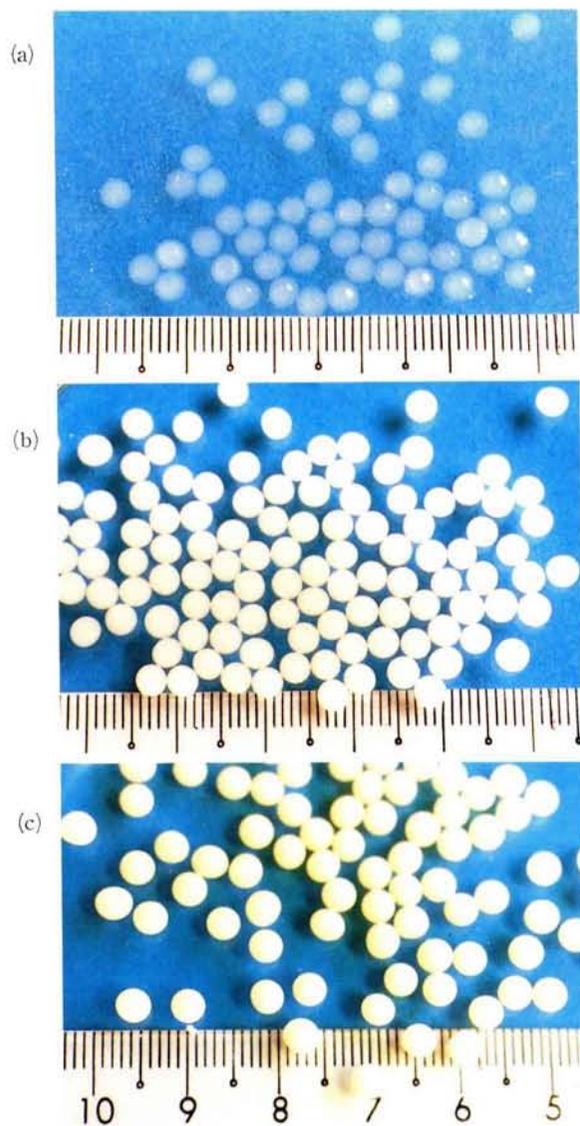


Fig. 4 Photographs of calcium alginate microcapsules containing *dry yeast* (a) : 0wt%, (b) : 33wt%, (c) : 71wt%.

じめ、質量を測定したもの) 入れ、滅菌水を 2.5ml 加え、1N KOH を浸した口紙の
小片を容器中央の隔壁内に入れ、ワールブルグ検圧計で、30°C の恒温槽中で12時間、測
定した。ブランクとして、パン酵母を含まないアルギン酸カルシウムマイクロカプセル
を用いた。なお、パン酵母包含有量、33wt% および 71wt% の 2 種類について、酸素
消費を測定した。

2-3 パン酵母包含マイクロカプセルを用いる不斉還元反応

パン酵母包含アルギン酸カルシウムマイクロカプセルを用いて、アセト酢酸エチルの
不斉還元反応⁶⁾による (s)-3-ヒドロキシブタン酸エチルの合成をおこなった。300ml の
セパラブルフラスコに滅菌水 50ml、サッカロース 6 g を入れ 30°C に加温した。体積容
量で 45cm³ のパン酵母包含マイクロカプセルを加え、30°C でケミスターラー (羽根径
30mm, 6 板羽根) を使い、382rpm で10分間バブリングしながら攪拌した。その後、
アセト酢酸エチル 1.0 g (0.98ml) を投入し、所定時間、30°C で攪拌バブリングを続けた。
所定時間の反応後、パン酵母包含マイクロカプセルを口別除去した。口液を塩化ナ
トリウムで飽和し、100ml のエーテルで抽出した。エーテル層を硫酸マグネシウムで乾
燥し、ロータリーエバポレーターを用いて減圧濃縮した。残渣を GLC 分析 (5% PEG-
HT, カラム温度 100°C より 5°C/mir 昇温, N₂ 圧 1.0kg/cm²) し、原料のアセト酢酸
エチルと 3-ヒドロキシブタン酸エチルの面積強度比から還元率を求めた。また GLC 分
析より還元率 100% だった残留残渣をワコーゲル C-200 を充填したカラムクロマトによ
り精製した。n-ヘキサン: エーテル (10: 1) の混合液で原料を流去し、エーテルを流
して純粋な (S)-3-ヒドロキシブタン酸エチルを得た。得られた (S)-3-ヒドロキシブ
タン酸エチルをクロロホルムに溶解して、比旋光度を測定した。

III 結果と考察

1 合成したパン酵母包含マイクロカプセルの形状と酵母の増殖

界面沈殿法により合成したポリスチレン、およびエチルセルロースのパン酵母包含マ
イクロカプセルの形状を Fig. 1 に示した。これらのマイクロカプセルに包含されたパ
ン酵母が死滅していないことを確認するため、マイクロカプセルを斜面培地に移植し、
30°C で 48 時間培養した結果を Fig. 2 Fig. 3 に示した。いずれのパン酵母包含マイ
クロカプセルからも酵母の増殖がみられた。

また、液中硬化法により合成したパン酵母包含アルギン酸カルシウムマイクロカプ
セルの形状を Fig. 4 に示した。(a) はパン酵母を含まないアルギン酸カルシウムマイ
クロカプセル、(b) は、33wt% のパン酵母を包含したアルギン酸カルシウムマイ
クロカプセル、そして (c) は 71wt% のパン酵母を包含したアルギン酸カルシウムマイ
クロカプセルである。これらのマイクロカプセルにおいて、パン酵母の包含量の増加により黄褐色
が増すことがはっきりわかる。

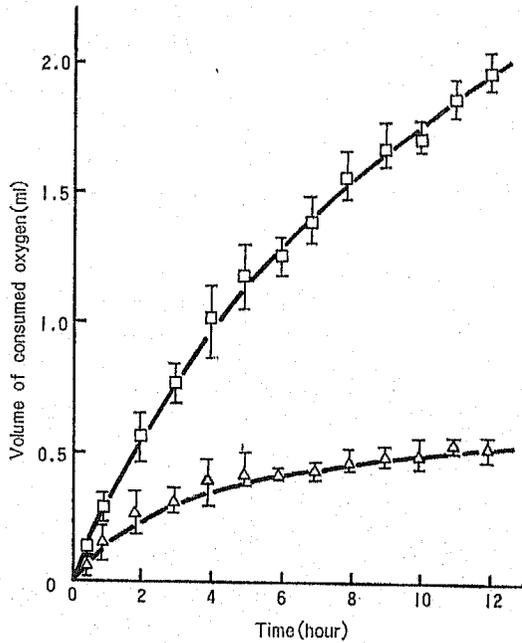
Tab. 1 に界面沈殿法、液中硬化法により合成した各パン酵母包含マイクロカプセル
の直径と斜面培地に移植した時の増殖の様子を示した。パン酵母の増殖は、界面沈殿法、

Tab. 1 Preparation of microcapsules containing *dry yeast*

Polymer	Method ^{a)}	Diameter of microcapsule (μm)	Proliferation ^{b)} potency
Polystyrene	A	50-500	+
Ethyl cellulose	A	50-1000	+
Calcium alginate	B	3000-4500	+

a) A : Interfacial precipitation, B : Hardening in solution

b) + : moderately

Fig. 5 Oxygen consumption with *dry yeast* included in calcium alginate microcapsules.(□) : Microcapsules (1g) containing *dry yeast* with 71wt%(△) : Microcapsules (1g) containing *dry yeast* with 33wt%

液中硬化法のいずれの方法で合成したマイクロカプセルからも確認された。すなわち、ポリスチレン、エチルセルロース、アルギン酸カルシウムの各マイクロカプセルは、パン酵母の包含に適していると思われる。

2 パン酵母包含マイクロカプセルの酸素消費

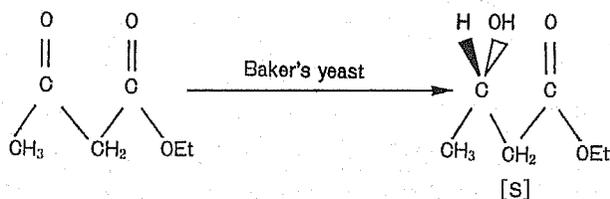
パン酵母包含アルギン酸カルシウムマイクロカプセル (33wt%, 71wt%) のカプセル 1g 当りの酸素の消費を Fig. 5 に示した。これは、ワールブルグ検圧計を用いて12時

間、連続測定したものであるが、アルギン酸カルシウムマイクロカプセルに包含させたパン酵母の割合（5：1）に対して、ほぼ同じ割合で酸素消費があることがわかる。すなわち、液中硬化法でマイクロカプセルを合成する時、初めのパン酵母の仕込比がそのまま、生成するパン酵母包含マイクロカプセルの性質に反映されることを意味し、仕込量を変えることにより、種々の触媒活性を有するマイクロカプセルが調整できることがわかる。

これと同様な実験を界面沈殿法により調整したパン酵母包含ポリスチレンマイクロカプセルおよびエチルセルロースマイクロカプセルで行なったが、得られたデータには著しいバラツキがみられ、再現性がなかった。これは、これらのマイクロカプセルに包含されたパン酵母は生きてはいるものの（Fig. 2, Fig. 3）、その酸素消費という点では、その活性に差異があることを示している。このように、パン酵母包含には、アルギン酸カルシウムを用いる液中硬化法が最も適していると思われる。

3 パン酵母包含マイクロカプセルを用いる不斉還元反応

パン酵母包含アルギン酸カルシウムマイクロカプセルの不斉還元触媒としての機能を検討するため、下式のアセト酢酸エチルから (S)-3-ヒドロキシブタン酸エチルへの不斉還元反応を行なった。その結果を Tab. 2 に示した。比旋光度（71wt%パン酵母包含マイクロカプセル、12時間反応）は、下式により求めた。クロロホルム中で測定したこの比旋光度は 33.9° となり、文献値⁶⁾ と比較すると、80%以上の高光学純度を示すこと



Tab. 2 Asymmetry reduction of ethyl acetoacetate by calcium alginate microcapsules containing *dry yeast*

Concentration of <i>dry yeast</i> (wt%)	Reaction time (h)	Conversion (%)	$[\alpha]_D/\text{CHCl}_3$ ($^\circ$)
71a)	3.0	19.4	—
	6.0	71.5	—
	12.0	100.0	+33.9
33b)	3.0	13.7	—
	6.0	32.2	—
	12.0	52.6	—

a) Preparation by sodium alginate (1g) containing *dry yeast* (2.5g)

b) Preparation by sodium alginate (1g) containing *dry yeast* (0.5g)

$$[\alpha]_D = \frac{\alpha_1 - \alpha_0}{c \cdot l} \quad \begin{array}{l} c: \text{濃度 g/ml} \\ l: \text{セル長 dm} \end{array}$$

$$[\alpha]_D / \text{CHCl}_3 = \frac{0.164 - (-0.007)}{0.010086 \times 0.5} = 33.9^\circ$$

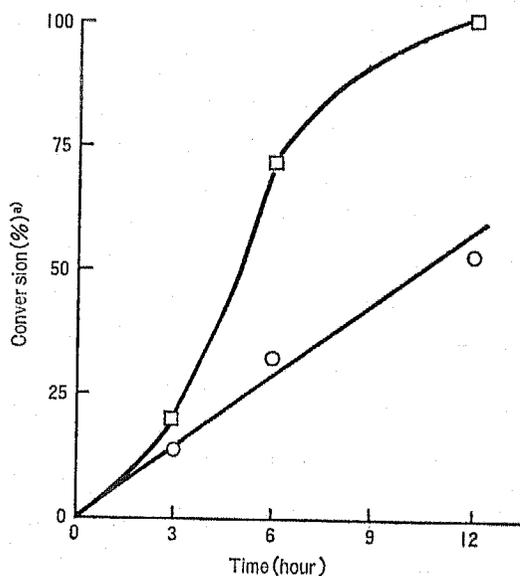


Fig. 6 Relationship between conversion and reaction time

- a) $\frac{\text{Ethyl 3-hydroxybutylate}}{\text{Ethyl acetoacetate} + \text{Ethyl 3-hydroxybutylate}} \times 100$
 (□): Microcapsules (1g) containing *dry yeast* with 71wt%
 (○): Microcapsules (1g) containing *dry yeast* with 33wt%

がわかった。また、反応率と反応時間との関係を Fig. 6 に示した。このようにパン酵母の包含量の多いもの程、不斉還元触媒活性が高いことが認められた。

IV 結 論

パン酵母を包含したマイクロカプセルを界面沈殿法（ポリスチレン、エチルセルロース）、液中硬化法（アルギン酸カルシウム）の2方法により、3種類を合成し、そのパン酵母による不斉還元触媒活性を検討した。3種類のマイクロカプセル中に包含されたパン酵母は、培地上に移殖すると新しくパン酵母が増殖することより、生存していることが示された。また、ワーブルグ検圧計により酸素消費量を測定したところ、液中硬化法により調整したパン酵母包含アルギン酸カルシウムマイクロカプセルは、マイクロカ

プセル調整時のパン酵母の仕込み量を反映した酸素消費を示し、界面沈殿法で合成した他のマイクロカプセルと比べ、極めて良好なパン酵母包含マイクロカプセルであることが示された。

また、パン酵母包含アルギン酸カルシウムマイクロカプセルを触媒とするアセト酢酸エチルの不斉還元反応では、高い不斉還元収率を示し、勝れた触媒であることが示された。パン酵母をそのまま不斉還元を用いる従来法⁶⁾と比較して、本報告のようにパン酵母包含マイクロカプセルを用いる利点は、

- ① 反応後の生成物とパン酵母との分離の容易さ
- ② カラムにつめて連続反応が可能
- ③ 連続使用に伴うパン酵母の使用量の節約である。パン酵母自体を不斉還元触媒に用いる場合、菌体の分離除去が難しく、多量のパン酵母を必要とするのに対し、パン酵母をマイクロカプセルに包含した場合、菌体の使用量が少なくてすみ、反応後の分離が容易で、連続使用も可能である。

このように微生物を包含したマイクロカプセルは、微生物のもつ高選択・高特異的反応、高収率、無公害等の特長を生かせるとともに、微生物のもつ取り扱いにくさ、高価さ等の欠点を補う触媒であり、今後の応用が期待される。

文 献

- 1) 近藤保, 小石真純: マイクロカプセル (その製法・性質・応用), (1978) 三共出版
- 2) 千畑一郎: 固定化酵素, (1975) 講談社サイエンティフィク
- 3) 千畑一郎: 固定化生体触媒, (1986) 講談社サイエンティフィク
- 4) 東出福司, 牛川務: 薬剤学, 34, 72 (1974)
- 5) 戸塚昭, 原昌道: 醸酵工学, 59, 231 (1981)
- 6) 須貝威, 藤田満, 森謙治: 日本化学会誌, 1315 (1983)

Summary

The Syntheses and Properties of Microcapsules containing Microorganism (I)

—Microcapsules containing Baker's Yeast—

Kenji HANABUSA, Shigeo KUBOTA

Hirofusa SHIRAI and Nobumasa HOJO

Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Ueda, Japan
Shinshu University, Matsumoto, Japan

Three microcapsules containing dry baker's yeast were prepared by both interfacial precipitation (polystyrene and ethyl cellulose) and hardening in solution method (calcium alginate), and the catalytic asymmetry reduction of ethyl acetoacetate were studied by using these microcapsules. It was shown that baker's yeast lived in microcapsules by the multiplication on culture medium. The measurement of oxygen consumption by WARBURG apparatus indicated that the activity of baker's yeast in calcium alginate microcapsule was proportional to the weight ratio of baker's yeast to polymer and the microcapsules obtained by hardening in solution were better than those obtained by interfacial precipitation method.

The asymmetry reduction of ethyl acetoacetate catalysed by the calcium alginate microcapsule containing dry baker's yeast gave the high asymmetry reduction conversion, whereas the microcapsules prepared by interfacial precipitation method gave the insufficient results with respect to the asymmetry reduction. The advantages of microcapsules containing baker's yeast as compared to untreated one were summarized below.

- 1) The facility of separation of reduction product from baker's yeast
- 2) The possibility of continuous reduction by using packed column
- 3) The saving of baker's yeast by continuous employment

Furthermore it was indicated that the encapsulations of microorganism into polymer maintained their merits e. g. high selectivity, high specificity, high yield and non-pollution and made up for their demerits e. g. high price and troublesomeness in handling.