

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：37401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2014

課題番号：23656498

研究課題名(和文) マルチエマルジョンを活用した貫通型細孔を有する微粒子の創製と応用

研究課題名(英文) Preparation of microsphere with minute through-holes by using multi emulsion and its application

研究代表者

迫口 明浩 (SAKOGUCHI, Akihiro)

崇城大学・工学部・教授

研究者番号：30196141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：酵素、ポリマーおよび糖類を水相中に共存させたO/W/O型マルチエマルジョンの凍結乾燥によって、貫通型細孔を有する微粒子が得られた。とくに、マルチエマルジョン調製時のPEGおよび糖の濃度を最適化することで、微粒子に固定化された酵素の有機溶媒中における酵素活性を増大させることができた。さらに、この微粒子をマイクロ空間に導入したバイオマイクロリアクターに関するプロセス工学的な基礎的検討を行い、高活性を示す固定化酵素をマイクロ空間に形成する新しい簡便な方法を見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, I proposed a simpler preparation method for microsphere with minute through-holes by lyophilization of O/W/O multiple emulsion. And I succeeded in immobilizing of enzyme in PEG microsphere with minute through-holes. The effects of sugar addition on enzymatic activity of the immobilized enzyme were investigated and the optimum concentrations of sugars were found. Furthermore, it was found that immobilized enzyme in PEG microsphere with minute-holes, which adhered to the surface of microchannel by simple method, exhibited high activity.

研究分野：プロセス・化学工学、生体触媒工学、バイオ生産プロセス、薄膜・微粒子形成操作、分離科学工学、化工物性

キーワード：微粒子 貫通型細孔 マルチエマルジョン 固定化酵素 糖 マイクロリアクター 薄膜 接着

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究の学術的背景

吸着剤や固体触媒において広い表面積を有することは重要な特性の一つであり、様々な手法が開発されているが、簡便かつ省エネルギー的調製法は多くない。

本研究では、マルチエマルションのある相を固体化し、他の相を除去することで微細な空間を発生させ、貫通型細孔を有する固体材料の開発を試みる。この手法の開発には、マルチエマルションの調製条件に関するこのエマルションの安定性などについての物理化学的検討が必要であるが、この方面での知見は未だ不十分である。

一方、本研究では、酵素の固定化法を種々検討する中で、O/W/O 型マルチエマルションを用いてポリマー担体に酵素を固定化した微粒子が、調製条件によって貫通型細孔を有することを偶然に見出した。この固定化酵素の調製法は、これまで報告されている酵素の固定化法のなかでも非常に簡便なものの一つで、しかも、繰り返し利用しても高い酵素活性を維持し、熱安定性にも優れていることが、リパーゼ 1 種類^[1]で見出された。さらに、本固定化酵素の調製時に、酵素とともに水相に糖を添加するだけで高い酵素活性が得られることが最近明らかになったが、この酵素の安定化機構についてはまだ明らかにされていない。

(2) 研究期間内に何をどこまで明らかにしようとするのか

(1) で述べた固定化酵素の酵素活性を指標に、固定化酵素の形態と機能に及ぼす微粒子形成操作の条件を明らかにする。とくに、O/W/O 型マルチエマルションの凍結乾燥による貫通型細孔を有する微粒子の調製法を確立し、マイクロリアクタでの応用について基礎的検討を行う。

(3) 本研究の学術的な特色及び予想される結果と意義

貫通型細孔を有する微粒子の簡便な調製法を開発し、さらに、この微粒子の元になる O/W/O 型マルチエマルションの調製条件を明らかにする。また、酵素を含む微粒子の形態上の特徴と酵素活性発現のメカニズムを、酵素、ポリマーおよび糖類との分子間相互作用などの点から説明できれば、新たな酵素の固定化法へつながることが予想される。これらのことから、広い表面積が期待できる貫通型細孔を有する微粒子形成操作とその応用について貢献できるものと考えられる。

2. 研究の目的

マルチエマルションの溶液構造を利用して、貫通型細孔を有する微粒子の新たな調製法を開発を行い、得られた微粒子の応用として固定化酵素への利用を試みる。すなわち、酵素、ポリマーおよび糖類を O/W/O 型マル

チエマルションの水相中に共存させ、これら 3 成分の液相系での特異的な分子間相互作用から形成されるナノ構造と、O/W/O 型マルチエマルションの持つマイクロ構造を、このマルチエマルションの凍結乾燥という簡便な方法によって保持させた微粒子を作製する。この微粒子の調製条件を種々検討することから、含有される酵素の機能を強化した微粒子を創製する。本研究で、微粒子の形態制御と機能強化を同時に達成する新しい微粒子形成操作を提案する。さらに、マイクロチャネル表面に酵素を固定化させたマイクロリアクタを開発するための基礎的検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 貫通型細孔を有する微粒子への酵素の固定化法と酵素活性の評価法

ホモジナイザーによって O/W/O 型マルチエマルションを調製した。この O/W/O 型マルチエマルションの水相に酵素 (リパーゼ、プロテアーゼ)、ポリマー (ポリエチレングリコール (PEG)、ペクチン) と糖類 (トレハロース、リビトール) を溶解させた。なお、ポリマーは酵素の固定化担体として用いた。凍結乾燥機でこの O/W/O 型マルチエマルションを凍結乾燥した。得られた白色粉末を有機溶媒で洗浄し、マルチエマルションの安定化のために用いた界面活性剤を除去し、乾燥した。このようにして得られた白色粉末を固定化酵素として用いた。

微粒子の形態上の特徴と O/W/O 型マルチエマルションの調製条件 (水相 pH、緩衝液の種類、ポリエチレングリコールの分子量や濃度、糖類の種類や濃度など) との関係明らかにするために、得られた微粒子を顕微鏡観察した。

貫通型細孔を有する微粒子の固定化酵素としての機能を、非水媒体中でのエステル合成反応の初速度を酵素活性の指標として用いることで評価した。恒温槽で反応温度を一定に保持されたバッチ式反応容器中の基質溶液に固定化酵素を投入し、時間ごとに反応液をサンプリングして、反応液中の生成物濃度をガスクロマトグラフで測定した。

(2) マイクロチャネル表面への貫通型細孔を有する固定化酵素の接着法と活性評価法

3D プリンタを用いて、一辺 1 mm の正方形の断面を有する長さ 75 mm のマイクロチャネル 8 本をポリ乳酸製プレート (長さ 75 mm × 幅 20 mm × 厚さ 2 mm) の表面に平行に並べた。マイクロチャネル 1 本あたり 10 wt% PEG エタノール溶液を 70 μ L ずつマイクロピペッターで均等に流し込み、酵素 (スプチリシン) が固定化された貫通型細孔を有する PEG 製微粒子を均等に添加し、マイクロチャネルに接着した。マイクロチャネル表面に接着された微粒子の形態を顕微鏡観察した。

脱水イソオクタンを溶媒とする基質溶液 30 mL が入ったバッチ式反応容器中に、酵素が

固定化されたプレート4枚を入れ、振とう恒温槽(37℃)で5時間振とう(150 r.p.m.)した。時間ごとに反応液をサンプリングし、反応液中の生成物濃度をガスクロマトグラフで測定し、マイクロチャンネルに接着した固定化酵素の活性を測定した。モデル反応としてエステル交換反応を用いた。

(3) ディップコーティング法によるプレート表面への固定化酵素の調製法と活性評価法

酵素(スブチリシン)とPEGをpH=7.5(酵素の最適pH)に調整したリン酸緩衝液に溶かして、スブチリシン含有20 wt% PEGリン酸緩衝液を調製した。この溶液を用いたディップコーティング法によって、3Dプリンタで作製されたポリ乳酸製のプレート(長さ25mm×幅11mm×厚さ2mm)表面に薄膜状固定化酵素を調製した。プレート表面に形成された薄膜の形態を顕微鏡で観察した。

基質溶液の入ったバッチ式反応容器中にこのプレートを入れ、3. (2)と同様に活性を測定した。

4. 研究成果

(1) 貫通型細孔を有する微粒子への酵素の固定化と有機溶媒中での活性

プロテアーゼの固定化と活性

プロテアーゼの一種であり、水溶性タンパク質に分類されるスブチリシン(Subtilisin Carlsberg 起源)を選択し、マルチエマルジョンを活用した貫通型細孔を有する微粒子の調製と、この微粒子の非水媒体中での酵素活性発現の可能性を検討した。その結果、有機溶媒中で酵素活性を発現する貫通型細孔を有する微粒子の調製に成功した。

また、この微粒子に固定化されたスブチリシンはリビトールや、トレハロースなどの添加によりさらに酵素活性が増大したのみならず、その活性を長時間維持できる可能性が明らかになった。さらに、スブチリシンを微粒子に固定化する際、糖としてキシリトールを添加することによって特異的な酵素活性が発現された。すなわち、この微粒子に固定化されたスブチリシンはキシリトールを添加しない場合に比べて酵素活性は低下したが、リビトールを添加した場合と同様に、特異的に酵素活性を増大するキシリトールの添加濃度の存在が見出された。

さらに、マルチエマルジョンの凍結乾燥による貫通型細孔を有する微粒子へのキモトリプシンの固定化、および有機溶媒中におけるこの微粒子中のキモトリプシンの酵素活性発現に成功した。

多孔質な微粒子、とくに貫通型細孔を有する微粒子の簡便な調製に、0/W/O型マルチエマルジョンの溶液構造とその処理(凍結乾燥など)を積極的に活用する点が、これまでにない本研究の独自のアプローチである。本研究で検討した0/W/O型マルチエマルジョンの

凍結乾燥による酵素を含む微粒子の作製法は、これまで報告されている酵素の固定化法の中では最も簡便なものの一つである。既に本研究室では、得られた本微粒子が高い酵素活性を繰り返し利用しても維持し、熱安定性にも優れていることが、リパーゼ1種類[引用文献]で見出されていたが、本研究によって、少なくともリパーゼとプロテアーゼの多くに適用可能な手法であることが示唆された。さらに、タンパク質の安定化に糖類(たとえばトレハロース)の添加が有効であることはよく知られているが、本微粒子の作製時に、酵素とともに糖類をO/W/O型マルチエマルジョンの水相に添加することにより高い酵素活性が得られることを発見した。

2成分のポリマーから成る貫通型細孔を有する微粒子の機械的強度の改善

これまで固定化担体としてポリエチレングルコールを主に用いてきたが、他のポリマーについての検討を行った。とくに、多糖類であるペクチンを用いてO/W/O型マルチエマルジョンを凍結乾燥させたところ、非水媒体に対する耐性とハニカム状の細孔を有する微粒子が得られた。しかし、有機溶媒中でのエステル合成をモデル反応とした酵素活性は、ガスクロ分析では検出できなかった。

そこで、担体としてポリエチレングリコールとペクチンの2成分を用い、マルチエマルジョンの調製の際に水相中のペクチンの添加量を調整したところ、ポロエチレングリコール製マイクロスフェアの機械的強度を増大させ、ペクチンを添加する前に比べて約9割の活性を示す貫通型細孔を有する微粒子状の固定化酵素を調製することができた。

今後、本研究で得られた基礎的な実験事実から、酵素、ポリマーおよび糖類の分子間相互作用によるナノレベルでの構造と微粒子の酵素機能との関連を比較検討し、これら微粒子の構造と機能との相関性についての情報を分類整理していくことで、酵素を含む系でのナノ材料の作製法について有益な指針が提供できるものと期待している。

(2) マイクロチャンネル表面への貫通型細孔を有する固定化酵素の接着と酵素活性

マイクロチャンネルに接着した貫通型細孔を有する微粒子をSEM観察したところ、表面との接着で一部形状を崩しているが、元の形状である多孔質の微粒子を確認することができた(図1)。この微粒子に固定化されたスブチリシンを用いたエステル交換反応での反応速度は38.0 mmol/h・g of STCであった。比較のため、スブチリシンが固定化された貫通型細孔を有する微粒子を粉末のまま用いてエステル交換反応を行ったところ、反応速度は46.3 mmol/h・g of STCであった。これらの結果より、マイクロチャンネル表面との接着部分に存在した微粒子内のスブチリシンが、マイクロチャンネル表面のポリエチレ

ングリコール製薄膜の中に取り込まれ、基質との接触が阻害されるようになったことが示唆された。

本研究において開発した酵素、ポリマーおよび糖類の分子間相互作用とO/W/O型マルチエマルジョンの溶液構造を利用した、貫通型細孔を有する微粒子の簡便な作製法は、生物機能を応用した有用物質生産や生体関連物質のセンサー機能を有する新しい材料の創製にもつながるものと期待される。

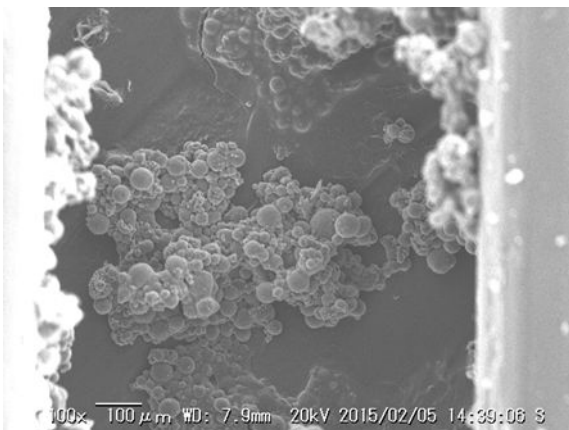


図1 マイクロチャネル表面に接着された微粒子状固定化酵素のSEM画像

(3) ディップコーティング法によるプレート表面への固定化酵素の調製と酵素活性

まず、マイクロバイオリアクターへの酵素の固定化法として、マイクロチャネル内への薄膜の形成に挑戦するための基礎的検討として、水溶性ポリマーの溶液を用いたディップコーティング法によるガラス板表面への薄膜形成を試みた。その結果、膜厚7~10μmの細孔を有する薄膜を形成することができた。

そこで、ディップコーティング法でプレート表面に調製された薄膜状固定化酵素を用いたエステル交換反応を行ったところ、反応速度は31.0 mmol/h・g of STCであった。

4.(2)で述べたように、スブチリシンが固定化された貫通型細孔を有する微粒子を粉末のまま用いてエステル交換反応を行った場合の反応速度は46.3 mmol/h・g of STCであった。また、薄膜のSEM観察では、薄膜内部まで発達した細孔は見られなかった。よって、薄膜表面の酵素のみが反応に寄与し、薄膜内部(とくにプレート側)の酵素は基質と接触することが困難な状態になっていることが示唆された。

今後、薄膜の多孔質化の条件を検討し、簡便なマイクロリアクタの実現を目指す。

<引用文献>

SAWAE, Hidekazu, SAKOGUCHI, Akihiro, NAKASHIO, Fumiyuki, GOTO, Masahiro, New Preparation Method for Native Lipase Immobilized in PEG Microsphere Using O/W/O

Emulsion for Synthesis of Flavor Ester in Anhydrous Isooctane, Proceedings of the 10th APCCChE 2004 Congress, CD On-line Number 827, 2004, 1-6

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

ICHIHARA, Miyuki, SAKOGUCHI, Akihiro, Effects of Sugar Addition on Enzymatic Activity of Immobilized Enzyme in PEG Microsphere Using O/W/O Emulsion, Proceedings of the 1st SOJO-UTP Joint Seminar on Nano and Bio Research, 査読無、1巻、2011、5-6

[学会発表](計2件)

迫口 明浩、藤田 信次、高橋 瑛紀、草壁 克己、マイクロチャネル表面のポリマー担体に酵素を固定化するための新しい方法の開発、化学工学会第80年会、2015年3月21日、芝浦工業大学 豊洲キャンパス(東京都江東区)

ICHIHARA, Miyuki, SAKOGUCHI, Akihiro, Effects of Sugar Addition on Enzymatic Activity of Immobilized Enzyme in PEG Microsphere Using O/W/O Emulsion, The 1st SOJO-UTP Joint Seminar on Nano and Bio Research, 2011年9月30日, Seri Iskandar, Perak (Malaysia)

6. 研究組織

(1)研究代表者

迫口 明浩 (SAKOGUCHI, Akihiro)

崇城大学・工学部・教授

研究者番号：30196141