

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006 ～ 2008
 課題番号：18360397
 研究課題名（和文） 光学分割機能を組み込んだキラル合成用マイクロバイオリクターシステムの構築
 研究課題名（英文） Development of a micro-bioreactor system for chiral synthesis incorporated with a function of optical resolution
 研究代表者
 川上 幸衛（KAWAKAMI KOEI）
 九州大学・大学院工学研究院・教授
 研究者番号：70091345

研究成果の概要：メチル基含有マクロポーラスシリカモノリスの調製とリパーゼを含むブチル基含有シリカによる内部表面塗布からなる 2 段階ゾルーゲル法を利用して、リパーゼ固定化シリカモノリスを装填した高効率マイクロバイオリクターを開発した。有機溶媒中のグリシドールと酪酸ビニルのエステル交換に対する流通操作において、本固定化リパーゼは単なるシリカモノリス付着リパーゼより約 10 倍高い活性を示した。このモノリスバイオリクターに市販のキラルカラムを直列に結合し、基質溶液のパルス供給を行ったところ、ラセミ体エステルの光学分割が達成できることがわかった。また、一本のモノリスカラムにリパーゼとキラル分離剤を共固定化することにより、エステル合成と光学分割が同時進行する反応・分離一体型システム構築の可能性について検討した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2007 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2008 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	15,600,000	4,680,000	20,280,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：バイオリクター

1. 研究開始当初の背景

キラル医薬品の生産においては、リパーゼやプロテアーゼなどの有機溶媒中で機能する生体触媒を利用した光学分割や不斉合成が重要となる。この種のプロセスの特徴は高価で少量の基質原料および酵素を用いた高価な光学活性体の少量生産である。そのためには、必要なキラル化合物を必要な量、必要なときに必要な場所で生産可能とする高性能なミニもしくはマイクロバイオリクターの構築が要求される。

2. 研究の目的

アルキル基を有するゾルーゲルシリカへ

の酵素の包括は、固定化による操作性向上のみならず、エステル合成・交換活性ならびに熱安定性の顕著な増加をもたらし、優れた高性能固定化生体触媒を提供する。また、原料シランの選択次第では、内部空隙率 80%以上の無収縮でマクロポーラスなモノリス構造体を作製することができる。本研究では、まず、リパーゼの高活性化とモノリスの形成を両立させるために 2 段階ゾルーゲル法を用いて、高性能リパーゼ固定化シリカモノリスマイクロバイオリクターを開発することを目的とした。ついで、生成したラセミ体エステルのオンラインでの光学分割を図るため

に、マイクロバイオリアクターと光学分割カラムを直列結合した反応・分離逐次進行型、および一本のシリカモノリスにリパーゼとキラル分離試薬を共固定化した反応・分離同時進行型からなるクロマトグラフィックマイクロバイオリアクターシステムの構築を目指した。

3. 研究の方法

(1) MTMS 由来シリカモノリスの作製

室温にて、試験管中に MTMS と TMOS の 4:1 混合物、精製水、および低濃度塩酸を加え、激しく振盪して均一なゾルとし、リン酸緩衝液 (pH7.5) を加えて、全シランと水のモル比を 5:100 とした。次いで、内径 1.6 mm、長さ 10 cm の poly(ether ether ketone) (PEEK) チューブを試験管に入れ、内部をゾルで満たし、ゲル化を室温で 1 日間進行させ、生成したヒドロゲルに凍結乾燥を 1 日間施した。その結果、試験管と PEEK チューブ内に無収縮のキセロゲルが得られた。また、リン酸緩衝液にリパーゼを溶解して、MTMS 由来シリカモノリス固定化リパーゼを調製することもできる。

(2) BTMS 由来シリカ被覆リパーゼ固定化シリカモノリスの調製

上記と同じ手順で、所定量のリパーゼを溶解した BTMS と TMOS の 4:1 混合物を含むゾルをモノリスの空隙を満たす体積分量調製する。ただし、シリカ被覆量の効果を調べるために、シラン混合物と水のモル比を 0:100 から 2:100 まで変化させた。このゾルを先に作製した試験管内の MTMS 由来シリカモノリス (なかにシリカモノリス PEEK チューブが埋入) 中にゆっくりと注ぎ込む。この間、ゾルがモノリスの空隙内部に十分侵入するよう、ゲル化が起こる前に、減圧下頻りに脱気を繰り返す。その後、室温で 1 日間ゲル化を進行させ、さらに 1 日間凍結乾燥を行った。PEEK チューブを回収し、試験管内のゲルは砕いて粉末粒子とした後、飽和塩化リチウム水溶液を含むデシケータ中で 30°C の下、1 時間水和処理を施した (水分活量 0.11)。酵素含有率は 2.6~3.5% (w/w)、一本の PEEK チューブ内のシリカとリパーゼの全質量は 38~49 mg であった。モノリス PEEK チューブは流通反応実験に、粉碎粒子は回分懸濁反応実験に用いた。

(3) 流通シリカモノリスマイクロバイオリアクターの定常状態操作と回分反応実験

テスト反応として、イソオクタン中の 20 mM (S)-グリシドールと 0.4 M 酪酸ビニルのエステル交換を用いた。リパーゼ固定化シリカモノリスを含む PEEK チューブを HPLC ポンプに連結し、35°C の恒温槽中に浸し、基質溶液を 0.1~5.0 mL min⁻¹ の体積流量でリアクター入口に供給した。各流量における定常状態は出口生成物濃度が時間によらず一定になった

とき得られたものと判断した。回分反応実験は 35°C、1600 min⁻¹ 一定に保った振盪インキュベータ上にて、20 mL のガラスバイアル中で行った。各サンプルの分析はガスクロマトグラフ (島津 GC-14B) によった。

(4) キラルカラムとの結合によるラセミ体エステルの光学分割

図 1 に示すように、内径 4.6 mm x 長さ 40 cm のキラルカラム CHIRALPAK AD-H (ダイセル化学工業社製) をリパーゼ固定化シリカモノリスマイクロバイオリアクター (9.5 mg のリパーゼを含む内径 1.6 mm x 長さ 50 mm の PEEK チューブ) の後段に連結した。サンプルループと六方バルブからなるサンプルインジェクターをポンプとバイオリアクターの間に設置し、イソオクタンを 0.5 mL min⁻¹ の流量でリアクターに連続的に供給した。定常状態達成後、基質溶液 10 μL を六方バルブの切替えにより、サンプルループからリアクター入口に注入し、キラルカラムからの出口液中のエステル濃度を UV 検出器により測定した。また、リアクターからの出口液を 20 μL 毎に分取し、各分画中のラセミ体エステル濃度を HPLC により測定した。

4. 研究成果

(1) 2 段階ゾルーゲル法による高性能リパーゼ固定化シリカモノリスマイクロバイオリアクターの構築

前述の手順により無収縮シリカモノリスが容易に調製できる。このモノリス構造体の内部表面をリパーゼ固定化 BTMS 由来シリカで被覆することにより、活性化リパーゼ固定化シリカモノリスマイクロバイオリアクターを構築することを試みた。固定化リパーゼの活性に及ぼすシリカ被覆量の効果を、第 2 段階ゾルーゲル時の BTMS と TMOS の 4:1 混合物と水のモル比を変化させることにより検討した。図 2 に、このモル比を水の 100 mol 当たり、0 (未処理 MTMS 由来シリカモノリスへのリパーゼ付着) から 2 mol まで増加させた場合の (S)-グリシドールの反応率と W/v (装

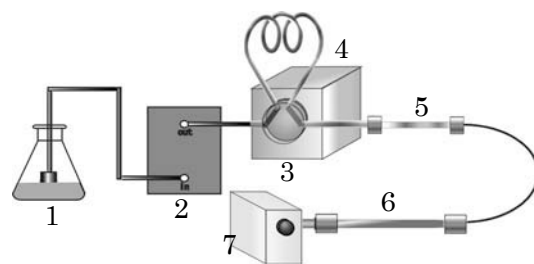


図 1 リパーゼ固定化シリカモノリスマイクロバイオリアクターとキラルエステル光学分割カラムの直列結合システムの概略図: 1. 基質溶液の貯槽, 2. HPLC ポンプ, 3. 六方バルブ, 4. サンプルループ, 5. リパーゼ固定化シリカモノリスバイオリアクター, 6. CHIRALPAK AD-H カラム, 7. UV 検出器。

埋りパーゼ質量/基質溶液の体積流量、 mg min mL^{-1}) の関係を示す。図 3 は、流通シリカモノリスバイオリクターおよび回分懸濁反応器におけるリパーゼ単位質量基準の反応初速度、ならびにシリカ被覆に伴う全モノリス質量増加に及ぼすモル比の効果を示す。総括の酵素活性はシラン量 (シリカ被覆量) の増加とともに増加し、水 100 mol 当たりシラン 1/3 mol で最大となった。これは、全モノリス質量の 14% の増加に相当し、未被覆 MTMS 由来シリカモノリス付着リパーゼより 10 倍以上高活性であった。シラン量をさらに増加すると酵素活性の低下が起った。これは過剰のゲルによる酵素分子の埋没あるいはモノリス空隙の閉塞によるものと考えられる。図 4 は、水 100 mol 当たり、シラン量 a) 0、b) 1/3、および c) 2 mol において調製されたシリカモノリス断面の SEM 写真を示す。モノリスは直径数 μm の球形シリカ粒子の凝集体からなり、基質溶液の流路となる数 μm の粒子間隙を有する (図 4a)。適量の BTMS 由来シリカは球形粒子の表面を被覆するに十分であるが (図 4b)、過剰量のシリカはモノリス内部の粒子間空隙を一部閉塞した (図 4c)。水 100 mol 当たり 2 mol のシランを用いたゾルーゲル被覆によっては、モノリス全質量は 40% 増加した。多くの条件下で、流通シリカモノリスバイオリクターは回分懸濁反応器より高い活性ならびに反応率を与えた。モノリス粉碎粒子はシリカ微粒子のクラスターからなり

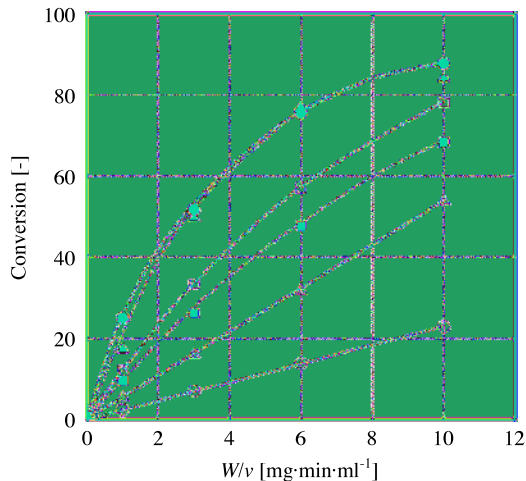


図 2 マイクロバイオリクター性能に及ぼすシリカモノリスのゾルーゲル被覆時の BTMS と TMOS の 4:1 混合物と水のモル比の効果: PEEK チューブのサイズ、内径 1.6 mm x 長さ 10 cm; リパーゼ質量, 1.17-1.41 mg; 酵素含有量, 2.6-3.5%; 基質溶液の体積流量, 0.12-1.2 mL min^{-1} . 水 100 mol 当たり BTMS と TMOS の 4:1 混合物のモル比: (○) 0:100*; (△) 1/6:100; (□) 2/9:100; (●) 1/3:100; (▲) 5/4:100; (■) 2:100. * 未処理 MTMS 由来シリカモノリス.

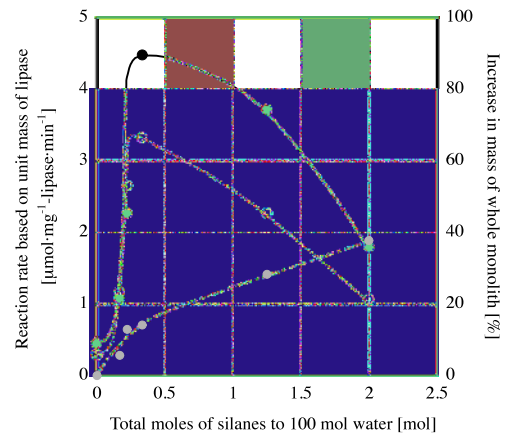


図 3 リパーゼ単位質量基準の反応初速度に及ぼすシリカモノリスのゾルーゲル被覆時の BTMS と TMOS の 4:1 混合物と水のモル比の効果. (●) 図 2 と同一操作条件下の流通シリカモノリスバイオリクター. (○) 回分懸濁反応器; リパーゼ質量, 2.5 mg; 酵素含有量, 2.6-3.5%; 液体積, 20 ml. (●) BTMS 由来シリカによるゾルーゲル被覆によって生じた全モノリスの質量増加.

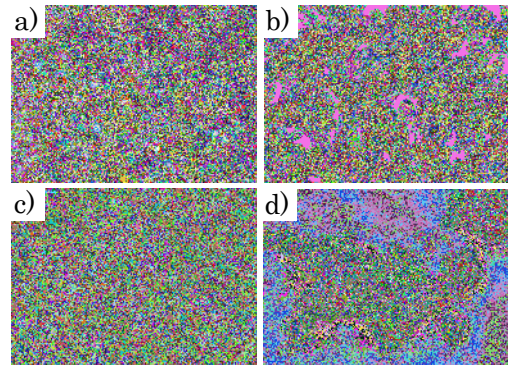


図 4 シリカモノリス断面の走査型電子顕微鏡写真. a) 未処理 MTMS 由来シリカモノリス, b) BTMS 由来シリカで被覆したシリカモノリス (シランと水のモル比, 1/3:100), c) BTMS 由来シリカで被覆したシリカモノリス (シランと水のモル比, 2:100), および d) シリカモノリスの粉碎粒子.

(図 4d)、懸濁液中では液本体と空隙内の液交換は起りにくい。反対に、流通シリカモノリスの場合、内部空隙への基質溶液の強制的な貫通が起る。つまり、シリカモノリスバイオリクターの優位性は、この空隙内貫通による固液接触効率の増大によるものと考えられる。

なお、MTMS 由来シリカモノリスにリパーゼを固定化した後、超臨界 CO_2 中に溶解した DMDMS と TMOS の混合シランと少量の水からのモノリスのゾルーゲル被覆も酵素活性の顕著な向上に非常に効果的なことがわかった。(2) リパーゼ固定化シリカモノリスバイオリ

リアクターと光学分割カラムの直列結合系

図1に示すように、マイクロバイオリアクターと光学分割カラムを直列に連結し、20 mM ラセミ体グリシドールのイソオクタン溶液をリアクターに連続的に供給して定常状態とした。0.4 M 酪酸ビニルのイソオクタン溶液 10 μ L をリアクター入口にパルス的に供給した。図5は、マイクロバイオリアクターおよびキラルカラムの各出口において現れる生成物エステル、R 体および S 体酪酸グリシジル濃度の過渡的時間変化を示す。バイオリアクターで生成したラセミ体エステルはキラルカラムにおいて概ね良好に分割されたことを示す。

以上要約すると、2段階ゾル-ゲル法を利用して高活性リパーゼ固定化シリカモノリスマイクロバイオリアクターを構築した。また、キラル分割カラムとの直列結合（反応・分離逐次進行）システムにおいて、ラセミ体エステル生成物のオンライン分割が可能であった。現在、リパーゼとキラル分離剤（多糖類カルバメート誘導体）を一本のシリカモノリス内に共固定化した反応・分離同時進行システムの可能性に関する検討を継続している。リパーゼ活性とキラル分離能をともに最大に発揮させるための調製条件の設定が重要課題となっている。

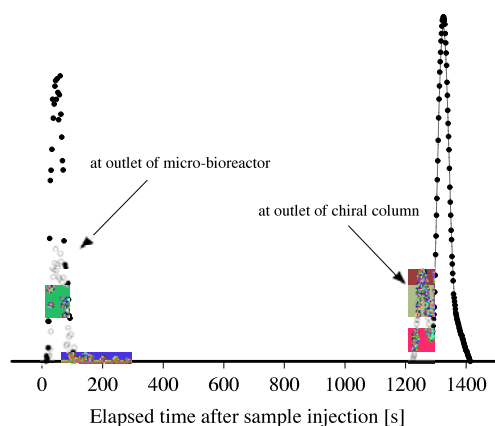


図5 リパーゼ固定化シリカモノリスマイクロバイオリアクター（長さ 5 cm, リパーゼ質量 9.5 mg）における (R, S)-酪酸グリシジルの生成とキラルカラム（長さ 40 cm CHIRALPAK AD-H）における (R)- および (S)-酪酸グリシジルへの光学分割。(○) (R)-酪酸グリシジル; (●) (S)-酪酸グリシジル。20 mM ラセミ体グリシドールを含むイソオクタン溶液を移動相として用い、0.4 M 酪酸ビニルを含むイソオクタン溶液 10 μ L をパルス的にマイクロバイオリアクター入口に注入した。

5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計 4 件)

- ① 川上幸衛、境慎司; 生体物質の機能発現に有効なゾル-ゲルシリカの新規応用, 化学工業, 57 巻 12 号, 43-47 頁, 2006. 12. 査読無
- ② Koei Kawakami, Daisuke Abe, Taiki Urakawa, Ayako Kawashima, Yasuhiro Oda, Ryo Takahashi, Shinji Sakai; Development of a silica monolith micro-bioreactor entrapping highly activated lipase and an experiment toward integration with chromatographic separation of chiral esters, *Journal of Separation Science*, Vol. 30, pp.3077-3084 (2007). 査読有
- ③ Koei Kawakami, Ryo Takahashi, Mozaffar Shakeri, Shinji Sakai; Application of a lipase-immobilized silica monolith bioreactor to the production of fatty acid methyl esters, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol. 57, pp.194-197 (2009). 査読有
- ④ Koei Kawakami, Taiki Urakawa, Yasuhiro Oda, Yoshio Iwai; Activation of lipase by sol-gel coating with hydrophobic alkyl-substituted silicates in supercritical carbon dioxide, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, in press. 査読有
〔学会発表〕(計 16 件)
- ① Koei Kawakami; Development and characterization of a lipase-immobilized silica monolith micro-capillary reactor prepared by using a two-step *in situ* sol-gel method, 6th European Symposium on Biochemical Engineering Science, 2006. 08.
- ② Koei Kawakami, Daisuke Abe, Taiki Urakawa, Shinji Sakai, Tsutomu Ono, Hiroyuki Ijima; Fabrication of a silica monolith micro-bioreactor entrapping highly activated lipase by a two-step sol-gel method, 17th International Congress of Chemical and Process Engineering, 2006. 08.
- ③ Koei Kawakami, Daisuke Abe, Taiki Urakawa, Shinji Sakai, Tsutomu Ono, Hiroyuki Ijima; Fabrication of a silica monolith micro-bioreactor entrapping highly activated lipase by a two-step sol-gel method, 19th International Symposium on Chemical Reaction Engineering, 2006. 09.
- ④ 浦川大樹、安部大輔、境慎司、小野勉、井嶋博之、川上幸衛; 二段階ゾル-ゲル法によるリパーゼ固定化シリカモノリスマイクロバイオリアクターの調製と特性, 化学工学会第 38 回秋季大会, 2006. 09.

- ⑤ Ayako Kawashima, Tsutomu Ono, Shinji Sakai, Hiroyuki Ijima, Koei Kawakami; Performance of a lipase-immobilized silica monolith micro-bioreactor prepared by a two-step sol-gel method, The 19th International Symposium on Chemical Engineering, 2006.12.
- ⑥ Koei Kawakami, Taiki Urakawa, Ayako Kawashima; Development and characterization of a lipase-immobilized silica monolith micro-capillary reactor prepared by using a two-step in situ sol-gel method, 1st International Congress on Green Process Engineering, 2007.04.
- ⑦ 織田康裕、境慎司、井嶋博之、川上幸衛; 超臨界二酸化炭素中におけるシリカ被覆リパーゼの調製と特性, 第4回化学関連支部合同九州大会, 2007.07.
- ⑧ Koei Kawakami, Shinji Sakai; Development of gel materials congruous with functional biological substances, The 1st International Symposium for Future Molecular Systems, 2007.10.
- ⑨ Ayako Kawashima, Taiki Urakawa, Shinji Sakai, Hiroyuki Ijima, Koei Kawakami; Development of a lipase-immobilized silica monolith micro-bioreactor accompanied by chromatographic separation of chiral esters, Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference, 2007.11.
- ⑩ 川島綾子、境慎司、井嶋博之、川上幸衛; リパーゼ固定化シリカモノリスの調製と反応-分離一体型システムの構築, 日本生物工学会九州支部長崎大会, 2007.12.
- ⑪ 高橋涼、川島綾子、境慎司、井嶋博之、川上幸衛; シリカモノリス固定化リパーゼによるトリグリセリドのメタノリシス, 第10回化学工学会学生発表会, 2008.03.
- ⑫ Koei Kawakami, Ryo Takahashi, Mozaffar Shakeri, Shinji Sakai; Application of a lipase-immobilized silica monolith bioreactor to production of fatty acid alkyl esters, 4th International Congress on Biocatalysis, 2008.09.
- ⑬ Koei Kawakami, Ryo Takahashi, Mozaffar Shakeri, Shinji Sakai; Alcoholysis of triglycerides in a silica monolith bioreactor entrapping highly activated lipase, 7th European Symposium on Biochemical Engineering Science, 2008.09.
- ⑭ 高橋涼、武井孝行、境慎司、井嶋博之、川上幸衛; リパーゼ固定化シリカモノリスバイオリアクターによるバイオディー

ゼルの生産, 化学工学会3支部合同姫路大会, 2008.11.

- ⑮ Ryo Takahashi, Takayuki Takei, Shinji Sakai, Hiroyuki Ijima, Koei Kawakami; Development of a lipase-immobilized silica monolith bioreactor and its application to the production of biodiesel, The 21st International Symposium on Chemical Engineering, 2008.12.

- ⑯ 高橋涼、武井孝行、境慎司、井嶋博之、川上幸衛; リパーゼ固定化シリカモノリスバイオリアクターの特性評価およびバイオディーゼル生産への応用, 化学工学会第74年会, 2009.3.

[図書] (計1件)

- ① 川上幸衛、境慎司、山口哲; ゼル-ゲルシリカのバイオ分野への新規応用, 「ゼル-ゲル法および有機-無機ハイブリッド材料-構造制御・高性能化とその応用」, 技術情報協会, 356-365頁, 2007.8.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計1件)

名称: 有機質粒子とポリメタロキサン系材料との複合体及びその製造方法

発明者: 川上幸衛ら他5名

権利者: 株式会社豊田中央研究所

種類: 特許公開

番号: 2007-191582

取得年月日: 2007年8月2日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://sirius.chem-eng.kyushu-u.ac.jp/>

<http://www.cstm.kyushu-u.ac.jp/gcoe/jpn/members/member.php?id=25>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川上幸衛 (KAWAKAMI KOEI)

九州大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号: 70091345

(2) 研究分担者

境 慎司 (SAKAI SHINJI)

九州大学・大学院工学研究院・助教

研究者番号: 20359938

(3) 連携研究者

岩井芳夫 (IWAI YOSHIO)

九州大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号: 80176528