

機関番号：14501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21860059

研究課題名（和文） イオン液体と微生物をハイブリッド化した新規生体触媒材料の開発

研究課題名（英文） Development of novel hybrid biocatalyst composed of ionic liquid and microorganism.

研究代表者

中島 一紀 (NAKASHIMA, Kazunori)

神戸大学・自然科学系先端融合研究環重点研究部・助教

研究者番号：50540358

研究成果の概要（和文）：新たな溶媒であるイオン液体と微生物を複合化した新たなハイブリッド生体触媒を開発し、バイオ燃料の製造に応用した。まず、イオン液体の有用性を確認するために、リパーゼ発現細胞触媒を用いたバイオディーゼル燃料生産においてイオン液体の効果を調査したところ、イオン液体添加系では生産性が大きく増加した。また、重合基を導入したイオン液体を微生物固定化担体に修飾した細胞触媒ではバイオディーゼル燃料の生産性が向上した。

研究成果の概要（英文）：Novel hybrid biocatalyst has been developed composed of ionic liquids and microorganism for biofuel production. In biodiesel fuel production catalyzed by lipase-expressing whole-cell biocatalysts, addition of ionic liquid to the reaction mixture greatly enhanced the productivity of biodiesel fuel. Furthermore, modification of polymerized ionic liquid to cell immobilization matrix improved the biodiesel fuel production.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,080,000	324,000	1,404,000
2010 年度	980,000	294,000	1,274,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,060,000	618,000	2,678,000

研究分野：生物化学工学

科研費の分科・細目：生物機能・バイオプロセス

キーワード：イオン液体、微生物、生体触媒、バイオディーゼル、固定化

1. 研究開始当初の背景

生体触媒（酵素、微生物）の特異な物質変換能力を利用したバイオプロセスは、温和な条件でかつ高い選択性が得られるという工業的利点を有するため、古くから食品・医薬品・汎用化学品製造分野において極めて重要な技術として利用されてきた。反応溶媒に着目してみると、1980年代中頃を中心に有機溶媒中酵素反応に関する研究が網羅的かつ詳細に行われてきた。一方、2000年に入っ

た、イオン液体と呼ばれる新たな溶媒が一躍脚光を浴び、生体触媒反応の新媒体としての可能性が調査され始めた。生体触媒反応にイオン液体を用いる利点としては、(i)糖やアミノ酸といった極性の生体関連化合物を容易に溶解できる(water-like)、(ii)非水溶媒であるため酵素的合成反応が可能である(organic solvent-like)、(iii)イオン液体を構成するカチオンとアニオンの種類を変えることで溶媒のデザインが可能である(ion-like)、といった

ことが挙げられ、従来の反応溶媒とは全く異なる種類の次世代型溶媒である。

これまでに申請者らはイオン液体と酵素を複合化した新たなバイオハイブリッド材料を開発している (Nakashima et al. *Org. Biomol. Chem.*, 7 (11), 2353-2358 (2009))。これはイオン液体に重合性官能基を導入してイオン液体自体をポリマー化し、そのポリマーゲル中に酵素を封入した新たなバイオ複合材料である。

2. 研究の目的

本研究では、この新たな展開としてイオン液体ポリマーゲルに微生物 (whole-cell 触媒) を固定化した新規ハイブリッド生体触媒材料の開発を行う。単離酵素において高い活性が得られた本固定化法を複数の酵素が協同的に機能している細胞触媒に応用することで、より高活性で高機能の生体触媒材料の創製を目指す。特に、化石燃料の代替として期待されているバイオディーゼル (BDF) 生産において生体触媒として利用されている糸状菌をターゲット微生物とし、これらを固定化した生体触媒材料を開発する。

3. 研究の方法

(1) イオン液体を用いた BDF 生産

リパーゼ高発現糸状菌 *Aspergillus oryzae* を whole-cell 触媒とした大豆油からの BDF 生産において、イオン液体の添加の効果を調査した。糸状菌 *Rhizopus oryzae* (w-ROL)、および *Fusarium heterosporum* リパーゼ (r-FHL)、*Candida antarctica* 由来リパーゼ B (r-CALB)、*Aspergillus oryzae* 由来 mono-diglyceride リパーゼ (r-mdIB) をそれぞれ発現する *A. oryzae* を遺伝子組み換えにより調製した (表 1)。これらの糸状菌を固定化担体 BSPs と共に培養することで菌体の固定化を行った。

表 1. 用いた whole-cell 触媒

Whole cell 触媒	宿主	保持するリパーゼ	位置特異性
w-ROL	<i>R. oryzae</i>	<i>R. oryzae</i> リパーゼ	1,3 位特異的
r-FHL	<i>A. oryzae</i>	<i>Fusarium heterosporum</i> リパーゼ	1,3 位特異的
r-CALB	<i>A. oryzae</i>	<i>Candida antarctica</i> リパーゼ B	非特異的
r-mdIB	<i>A. oryzae</i>	<i>A. oryzae</i> モノ-ジグリセリドリパーゼ	モノ-ジグリセリド特異的

whole-cell 触媒と大豆油、メタノール、水、イオン液体を混合し、30°C、250 rpm で振とうすることで大豆油のメタノリシス反応を行った。系に添加するイオン液体は 1-ethyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ([Emin][BF₄])、1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ([Bmin][BF₄])、1-ethyl-3-methylimidazolium trifluoromethylsulfonate ([Emin][TfO]) (図 1) の 3 種類を用いた。一定時間ごとにサンプリ

ングを行い、ガスクロマトグラフィーにより BDF (脂肪酸メチルエステル) 生成量を定量した。

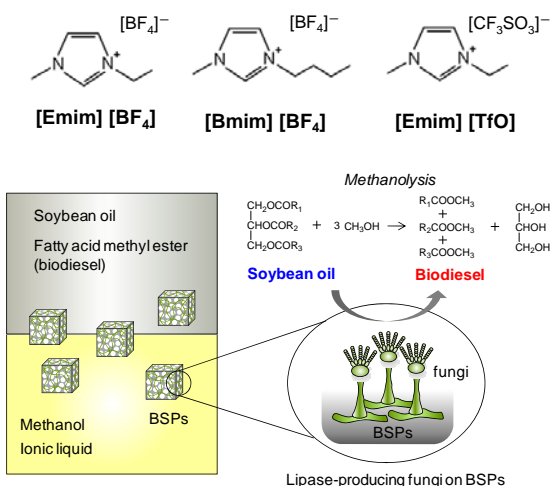


図 1. イオン液体と whole-cell 触媒を用いた BDF 生産システム

(2) イオン液体-微生物ハイブリッド触媒

微生物固定化担体にイオン液体を修飾するために、重合性イオン液体 1-vinyl-3-ethylimidazolium bromide ([Vemim][Br]) を既報に従い合成した (Nakashima et al. *Org. Biomol. Chem.*, 7(11), 2353-2358 (2009))。

合成した重合性イオン液体 [Vemim][Br]、架橋剤 *N,N*-メチレンビスアクリルアミド、開始剤 APS をリン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解した。この水溶液に微生物固定化担体 (BSPs) を加え、重合促進剤 TEMED を添加し、25°C で 2h 攪拌することにより、イオン液体の重合および BSPs へのイオン液体ポリマーの修飾を行った。修飾した BSPs は数回脱イオン水で洗浄し、一部は LiTf₂N を用いて修飾したイオン液体のアニオンを Br- から Tf₂N- に置換した。

作製したイオン液体修飾 BSPs を共存下リパーゼ高発現 *A. oryzae* を培養することで whole-cell 触媒を固定化し、イオン液体-微生物ハイブリッド触媒を作製した (図 2)。

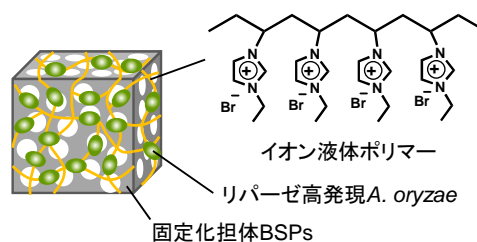


図 2. イオン液体-微生物ハイブリッド触媒

4. 研究成果

(1) イオン液体を用いた BDF 生産

種々の whole-cell 触媒を用いて各イオン液体中でメタノリス反応を行った結果を図 3 に示す。まず、イオン液体を含まない系ではほとんど BDF が生産されなかった。これはエステル交換反応に 4 モル当量という高濃度のメタノールを用いているため whole-cell 触媒中のリパーゼが失活したと考えられる。一方、イオン液体共存系では w-ROL によって非常に高い BDF 生産性が達成された。これはイオン液体がメタノールのリザーバー相として働き、反応系中のメタノール濃度が低濃度に保たれ酵素の失活が抑制されたためであると推察される。また、イオン液体共存下においても、whole-cell 触媒中のリパーゼは十分に触媒機能を発現することが示された。

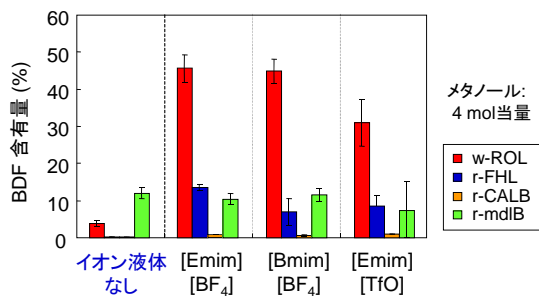


図 3. BDF 生産におけるイオン液体の添加効果

次に、イオン液体共存系、非共存系においてメタノール濃度の影響を調査した (図 4)。イオン液体非共存系では、メタノール濃度の増加とともにリパーゼ活性が低下していき、メタノール/油比が 4 のときには BDF 生産量はほとんど生産されなかった。一方、イオン液体共存系では、メタノール濃度とともに BDF 生産量が増加し、イオン液体非共存系ではリパーゼが失活したと考えられるメタノール/油比 4 のときに最も高い BDF 生産性が得られた。イオン液体の共存によりメタノールが徐々に供給されたため、高濃度のメタノール存在下でもリパーゼ触媒が失活しなかったためと推察される。

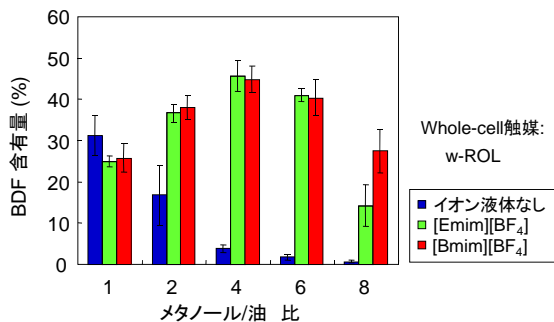


図 4. メタノール濃度の影響

イオン液体の添加により、whole-cell 触媒による BDF 生産が飛躍的に向上することが明らかとなった。ところが、whole-cell 触媒 w-ROL はイオン液体共存下に長期間さられることにより、徐々に失活していくことが分かった。そこで、イオン液体中での whole-cell 触媒の安定性を向上させるため、グルタルアルデヒド (GA) 架橋を行った。GA はタンパク質中の 1 級アミンと反応することによりタンパク質同士を架橋し、酵素の安定性を向上させることが知られている。未処理と GA 架橋した w-ROL をイオン液体 [Bmim][BF₄] 中で 72 時間、30°C でインキュベートし、その後 whole-cell 触媒の残存活性を調査した。その結果、GA 処理により whole-cell 触媒のイオン液体中での安定性が向上することが明らかとなった (図 5(A))。また、BDF 生産における whole-cell 触媒のリサイクル性を調査した結果、GA 処理によってリサイクル性も向上することが分かった (図 5(B))。

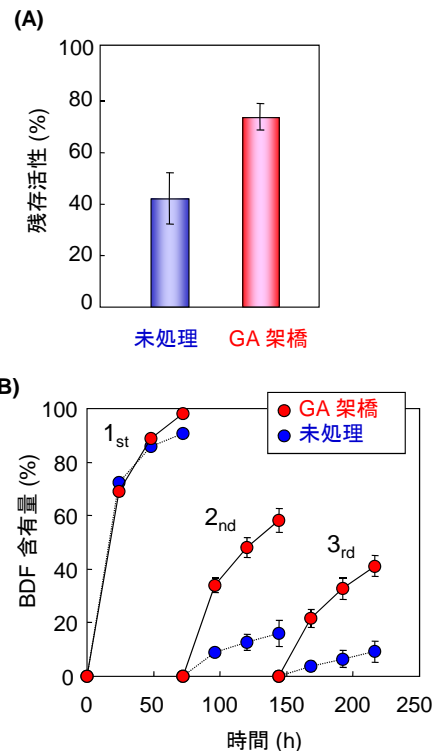


図 5. GA 架橋の影響

(A) イオン液体中での安定性
(B) リサイクル性

(2) イオン液体-微生物ハイブリッド触媒

前述の検討により、whole-cell 触媒を用いた物質生産プロセスにおいてイオン液体の効果が示された。これまでに、イオン液体を溶媒として生物反応プロセスに用いた研究はあるが、イオン液体と微生物をハイブリッド化した生体触媒材料は報告されていない。そこで、イオン液体の新たな展開として、イ

オン液体と微生物を複合化したハイブリッド生体触媒の創製を試みた。本研究の魅力的な点として以下のことが挙げられる。

(A)イオン液体を溶媒として用いずとも、微生物の細胞近傍にイオン液体様の反応環境を付与できる。

(B)微生物固定化担体のデザインが可能である。(b-1) ターゲットの微生物に最適な担体をオーダーメイドで作製できる。(b-2) ゲル内に取り込まれる基質の選択性をスイッチングが可能。(b-3) 担体に刺激応答性などの機能性を付与できる。

(C)固定化された微生物の安定性・リサイクル性の向上および新機能発現が期待される。

特に(B)についてはイオン液体の最大の特徴である「溶媒のデザインが可能」という特徴を引き継いだものであり、本研究で開発する新規材料は「微生物固定化担体のデザインと機能付加が可能である」という点が最大の魅力である。

まず、イオン液体を微生物固定化担体に修飾するために、イオン液体のポリマー化を検討した。側鎖に重合基(ビニル基)を有するイオン液体[Veim][Br]を合成し、BSPs存在下で重合することにより、BSPsにイオン液体ポリマーを修飾した。修飾後のBSPsをFT-IRを用いて測定したところ、修飾前には見られなかった新たなピークが観測された(図6)。しかし、イオン液体ポリマーではポリイミダゾリウムに由来する2800および3300cm⁻¹付近のピークが現れることが報告されており(*J. Polym. Sci. A*, 42, 208 (2004))、本研究ではそれとは異なるピークが検出された。この詳細な理由については現在のところ明らかとなっていない。

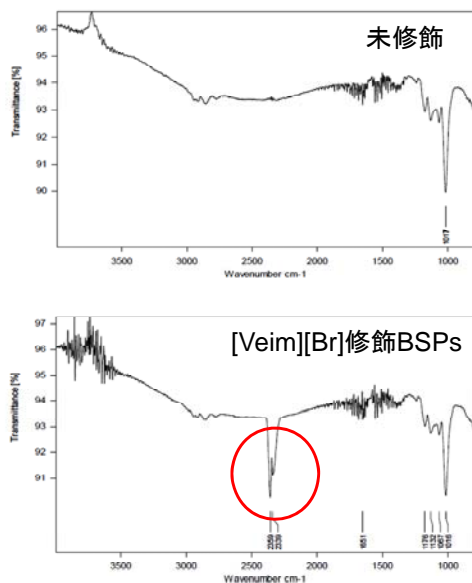


図6. イオン液体ポリマー修飾前後でのFT-IRスペクトルの変化

また、作製したイオン液体-微生物ハイブリッド触媒のBDF生産能を調査したところ、[Veim][Br]修飾体では向上は見られなかったが、[Veim][Tf₂N]修飾体では若干の生産量増加が見られた(図7)。

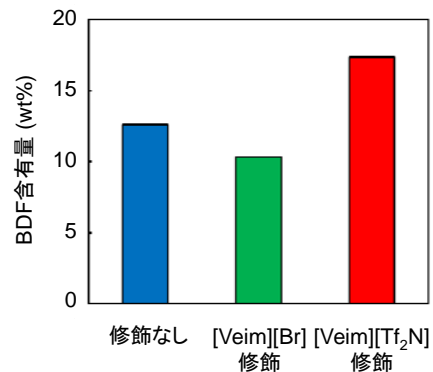


図7. イオン液体-微生物ハイブリッド触媒によるBDF生産

本手法ではイオン液体ポリマーをBSPsの表面に物理的に修飾しているため、担体からの脱離が起こる可能性が考えられる。そこで、より強固で安定的な修飾を目指し、共有結合的なイオン液体ポリマーの修飾を試みた。担体表面に水酸基(OH基)を持つポリビニルホルマール製のBSPsを用い、塩化アクリロイルによりOH基にビニル基を修飾した(図8)。その後、担体表面のビニル基とともに重合性イオン液体を重合し、共有結合的に修飾した。得られた担体を用いてwhole-cell触媒を固定化し、BDF生産に用いたが活性の向上は見られなかった。菌体の固定化量や担体表面のリパーゼの構造状態など、更なる調査が必要である。

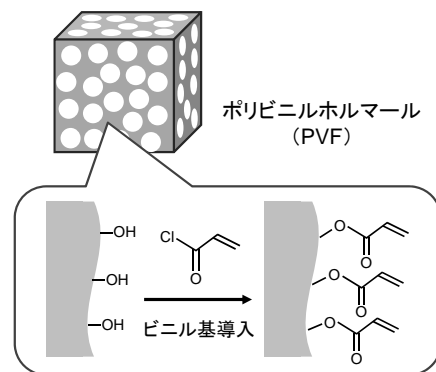


図8. 担体表面への重合基の導入

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)

①S. Arai, K. Nakashima, T. Tanino, C. Ogino, A. Kondo, H. Fukuda, “Production of Biodiesel Fuel from Soybean Oil Catalyzed by Fungus Whole-cell Biocatalysts in Ionic Liquids” *Enz. Microb. Technol.*, **46** (1), 51-55 (2010). 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 一紀 (NAKASHIMA, Kazunori)
神戸大学・自然科学系先端融合研究環重点
研究部・助教
研究者番号：50540358

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者