

機関番号：56401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：20560733

研究課題名(和文) 気相相媒体における固定化酵素反応プロセスの構築

研究課題名(英文) Fundamental process design for immobilized enzyme reaction in a gas/solid bioreactor

研究代表者

長山 和史(NAGAYAMA KAZUHITO)

高知工業高等専門学校・物質工学科・准教授

研究者番号：00270364

研究成果の概要(和文)：本研究は、気相媒体下において固定化ケトン還元酵素(アルコール脱水素酵素)を触媒としたケトンからキラルアルコールの生産のための連続的な反応プロセスを実験的に検討した。本法に適する反応実験装置の設計を行い、ついで反応活性が最大に発揮される固定化酵素の調製条件(減圧度、緩衝液 pH、緩衝液濃度)並びに反応条件(供給ガス中の水分濃度、反応温度)を明らかにした。また、本法に適する反応系や酵素を合わせて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The chiral alcohol production from ketone catalyzed by immobilized ketoreductases (alcohol dehydrogenases) has been investigated in a gas-solid bioreactor. As fundamental design of continuous reaction process, the conditions for immobilized enzyme preparation as functions of the reduced pressure degree, the buffer pH as well as the buffer concentration and for reaction as functions of the water concentration and the temperature were optimized. Also, the optimal reaction systems and enzyme sources for the gas phase reaction were investigated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物化学工学

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：気相媒体、酵素反応、ケトン還元酵素、立体選択性、バイオリクター

1. 研究開始当初の背景

疎水媒体下において固定化酵素を利用する研究が展開しており、エステル合成やペプチド合成などの反応プロセスを設計するうえでの操作因子が把握されるに至り、基礎研究の成果が実用化に生かされる段階にある。しかしながら、目的とする反応系によっては、酵素や補酵素の活性劣化、基質の溶解度、有機溶媒の使用など克服すべき課題が多い。工業的な反応操作への酵素の応用にあたって

は、目的とする反応系に適する反応媒体を適宜検討する必要がある。

気相媒体中における固定化酵素反応は、固液相系と比較して物質移動抵抗の低減により反応速度が向上し、反応装置のスケールを最小限に留めることが可能である。また、極少量の水分の存在下でのみ安定な酵素に対して有用であり、かつ揮発性基質の使用や有機溶媒の使用が適さない反応操作への応用が期待できる。

しかしながら、国内において気相媒体下での固定化酵素反応を検討している研究グループはなく、本法に積極的に着手し、新たな酵素反応の手法を工学的な側面から考究する必要が生じていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、気相媒体下における固定化酵素反応を実験的に考究し、本法が適する反応系のもと酵素の反応活性、安定性、特異性並びに生産性に影響を及ぼす操作条件を明確にし、本法による反応プロセスを構築するための基礎指針を確立することである。

3. 研究の方法

本研究の目的を達成するために実施した各年度における研究方法を次に示す。

(1) 平成20年度

反応実験装置の設計・作製
モデル反応の選定
固定化酵素の調製条件の基礎検討
反応条件の基礎検討

(2) 平成21年度

モデル反応の選定
固定化酵素の調製条件
反応条件の検討

(3) 平成22年度

酵素起源の選定
反応条件の検討
反応装置の基礎設計

4. 研究成果

(1) 連続反応システム

本研究では、連続反応が可能であり、かつキラル生成物/未反応物のガスクロマトグラフィーによるオンライン分析が行える反応装置を設計し、作製した(図1)。

本装置は、連続流通型の反応装置であり、供給ガス中に所定量の基質と水を含むための気液平衡ユニットと反応ユニットから構成されており、各ユニットを個別に温度制御することが可能である。なお、供給ガスはマスフロー流量計により制御した。

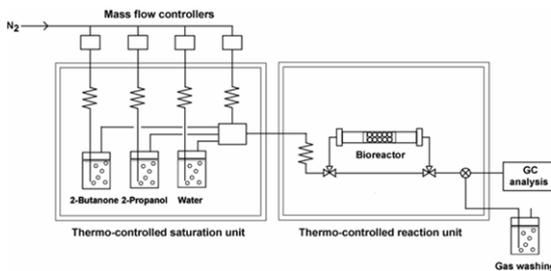


図1 連続流通型反応装置

(2) モデル反応

本法が適する反応操作としてケトンから医薬品合成の出発原料として重要であるキラルアルコールの生産を選定した(図2)。

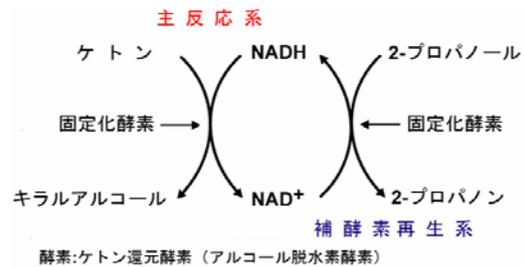


図2 モデル反応

また、反応の進行とともに消費される補酵素(NADH)の再生反応を2-プロパノールを基質として同時に行い、連続反応を可能にするものとした。

反応基質として2-ブタノン、4-メチル-2-ペンタノンと1-フェニルエタノンをを用い、次項に示す酵素にて反応の進行を確認した。

本研究では、2-ブタノンをを用いて、以下の研究を行った。

(3) 酵素の選定

ケトン活性を示すアルコール脱水素酵素を幅広く探索し、(ダイセル化学工業(株))、ADH HI-1 ((株)耐熱性酵素研究所)と *Parvibaculum lavamentivorans* 起源(Sigma社)で反応の進行が認められた。

本研究では、Chiralscreen®E031 を用いて、以下の研究を行った。

(4) 固定化酵素の調製条件

固定化担体として非多孔性ガラス粒子(直径250-350 μm)を用い、減圧環境下において酵素(補酵素)水溶液と担体の懸濁液から水分を除去することにより固定化酵素を調製した。この手法により調製された固定化酵素は、ガラス粒子の表面に酵素と補酵素が物理的に析出した様態であることが確認された(図3)。

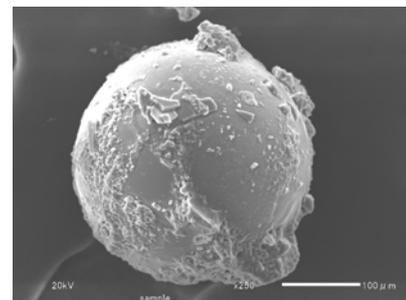


図3 固定化酵素 (SEM 写真)

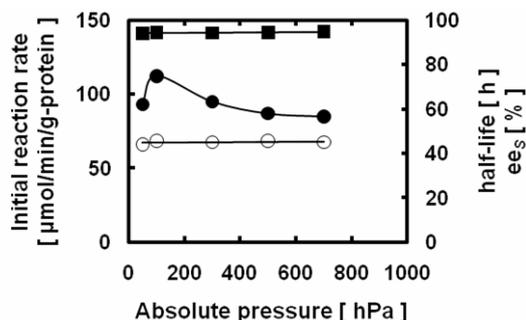


図4 固定化酵素の初期反応速度、半減期、エナンチオ過剰率に対する固定化酵素調製時の減圧の影響

固定化酵素の調製時の減圧条件が反応活性、安定性並びに立体選択性に与える影響を実測した(図4)。なお、本研究では固定化酵素の反応活性の指標として初期反応速度(Initial reaction rate)、また安定性の指標として半減期(half-life)を求め、一方立体選択性をエナンチオ過剰率(ee_s %) (式(1))により評価した。本研究で用いた酵素は、*S*体を選択的に生成することができる。

Enantiomeric excess (ee_s %)

$$= \frac{[(S)\text{-}2\text{-Butanol}] - [(R)\text{-}2\text{-Butanol}]}{[(S)\text{-}2\text{-Butanol}] + [(R)\text{-}2\text{-Butanol}]} \times 100 \quad (1)$$

初期反応速度は、絶対圧 100 hPa を最大値として変化する傾向が認められた。一方、固定化酵素の半減期とエナンチオ過剰率は実験範囲において一定の値を示した。

反応活性、安定性並びに立体選択性に対する固定化酵素の調製時の緩衝液 pH の影響を実測した(図5)。初期反応速度は、緩衝液 pH 7.0 を最大値として変化し、一方半減期とエナンチオ過剰率はほぼ一定値を示した。

反応活性、安定性並びに立体選択性に対する固定化酵素の調製時の緩衝液濃度の影響を合わせて実測した(図6)。初期反応速度は、緩衝液濃度 50 mM を最大値として変化し、一方半減期とエナンチオ過剰率も同様の变化を示した。

以上の結果より、気相媒体下における固定化酵素による立体選択的な反応操作では、高効率な物質生産を実現するために最適な固定化酵素の調製条件が存在することが明らかとなった。

(5) 反応条件

供給ガス中の水分濃度が反応活性、安定性並びに立体選択性に与える影響を実測した(図7)。なお、本研究では供給ガス中の水分濃度の指標として水分活性(式(2))、を用い、実験結果を整理した。

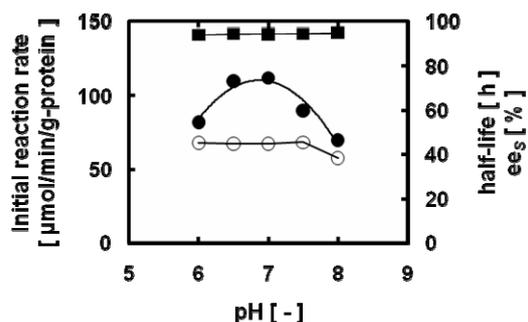


図5 固定化酵素の初期反応速度、半減期、エナンチオ過剰率に対する固定化酵素調製時の緩衝液 pH の影響

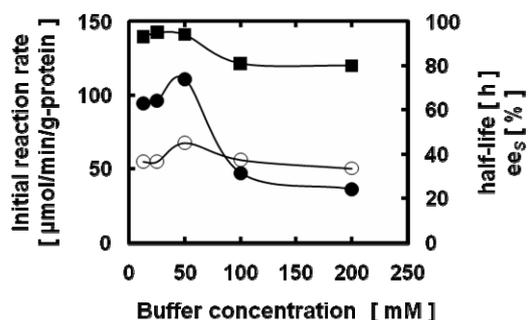


図6 固定化酵素の初期反応速度、半減期、エナンチオ過剰率に対する固定化酵素調製時の緩衝液濃度の影響

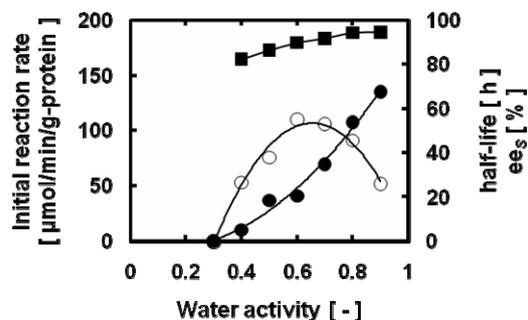


図7 固定化酵素の初期反応速度、半減期、エナンチオ過剰率に対する供給ガス中の水分活性の影響

Water activity =

$$= \frac{\text{Partial pressure of water}}{\text{Partial pressure of water at saturation}} \quad (2)$$

初期反応速度は、水分活性が 0.3 以上の領域で発現し、水分活性とともに増加した。一方、半減期は水分活性とともに増加し、 $a_w = 0.6$ で最大値に達し、高い水分活性条件で減少する傾向を示した。これより、本法において水分活性は、固定化酵素の反応活性と安定性の両者に影響を及ぼし、最適な生産性を検討するための重要な操作因子であることが

示された。一方、エナンチオ過剰率は、水分活性とともに増加し、水分活性 0.9 の条件で約 95% に達することが認められた。実測されたエナンチオ過剰率が水相系と等しいことから、気相媒体下における反応操作において酵素の立体選択性が維持されることが認められた。

反応活性、安定性並びに立体選択性に対する反応温度の影響も合わせて実測した (図 8)。初期反応速度は、反応温度とともに増加した後、343 K で実測されなかった。ここで、水相系における固定化酵素の至適温度 (303 K) と比較すると、気相媒体下における反応活性に対する至適温度は少なくとも 30 K 向上することが認められた。一方、半減期は反応温度とともに低下する傾向を示した。反応温度の設定にあたっては、固定化酵素の反応活性と安定性の両者を加味した反応プロセスの設計が重要であることが示された。エナンチオ過剰率に関しては、反応温度とともに僅かに低下する傾向を示した。

以上の結果より、気相媒体下における固定化酵素による立体選択的な反応操作では、高効率な物質生産を実現するために反応条件として供給ガス中の水分濃度と反応温度を詳細に設定する必要性が生じることが明らかとなった。

(6) 国内外における位置づけとインパクト

気相媒体下における固定化ケトン還元酵素による連続的な立体選択的反応は、これまで国内外で行われておらず、本研究の成果の対外的な位置づけと関連分野の研究者へのインパクトは高いと考えられる。

(7) 今後の展望

気相媒体中での固定化ケトン還元酵素を用いる反応操作の効率化に向けて、減圧気相環境に着目し、高い基質濃度条件のもと優れた生産性を実現する反応条件を検討することを今後の展望として挙げるができる。

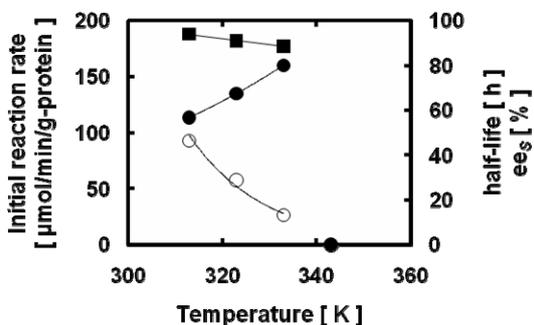


図 8 固定化酵素の初期反応速度、半減期、エナンチオ過剰率に対する反応温度の影響

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 3 件)

- ① Kazuhito Nagayama, Antje C. Spiess, Jochen Büchs, Gas phase enantioselective reduction catalyzed by immobilized ketoreductase: Effects of water activity and reaction temperature, *Biochem. Eng. J.*, 査読有, VOL. 52, 2010, 301-303
- ② Kazuhito Nagayama, Antje C. Spiess, Jochen Büchs, Immobilization conditions of ketoreductase on enantioselective reduction in a gas/solid bioreactor, *Biotechnol. J.*, 査読有, VOL. 5, 2010, 520-525
- ③ Kazuhito Nagayama, Antje C. Spiess, Jochen Büchs, Enzyme immobilization conditions on enantioselective conversion in a gas/solid bioreactor, *J. Biosci. Bioeng.*, 査読有, VOL. 108, 2009, S100

[学会発表] (計 5 件)

- ① 長山和史、芝 勇斗、志和美咲、山本紗妃、A. C. Spiess、Jochen Büchs、気相バイオリアクターにおける連続ケトン還元反応、化学工学会第 76 回年会、A302、2011 年 3 月 24 日、東京
- ② Kazuhito Nagayama, Antje C. Spiess, Jochen Büchs, Immobilized ketoreductase reduction in gas phase bioreactor, Abstracts of the 13th Asia Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress, 2009, 10249, 2010 年 10 月 6 日、台湾
- ③ Kazuhito Nagayama, Antje C. Spiess, Jochen Büchs, Enzyme immobilization conditions on enantioselective conversion in a gas/solid bioreactor, Asia Pacific Biochemical Engineering Conference 2009, EP-P3, 2010 年 11 月 27 日、神戸
- ④ 長山和史、A. C. Spiess、Jochen Büchs、気相系における固定化酵素反応、化学工学会第 41 回秋季大会、Q206、2009 年 9 月 17 日、広島
- ⑤ 長山和史、気体中で進行する固定化酵素反応、第 51 回中国四国産学連携化学フォーラム (ポスター発表)、2009 年 8 月 29 日 1、高知

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長山 和史 (NAGAYAMA KAZUHITO)
高知工業高等専門学校・物質工学科・
准教授
研究者番号：00270364