

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：56401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23560953

研究課題名(和文) 減圧気相環境における固定化酵素によるクリーンバイオプロセスの開発

研究課題名(英文) Clean bioprocess design for immobilized enzyme reaction using a reduced pressure gas phase reactor

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、減圧気相環境において固定化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を行い、クリーンバイオプロセスを構築するための基礎指針を実験的に検討した。まず、減圧気相酵素反応を行うために閉鎖循環型リアクターを試作した。ついで、アルコール脱水素酵素の選定、固定化酵素の反応活性、立体選択性並びに反応収率に対する反応系内の絶対圧、水分濃度、基質濃度と反応温度の影響を明らかにした。また、固定化酵素の反応活性を速度論的に解析した。

研究成果の概要(英文)：The chiral alcohol production from ketone catalyzed by immobilized alcohol dehydrogenase has been effectively proceeded in a gas phase bioreactor under reduced pressure, which was investigated for obtaining fundamental knowledge of clean bioprocess. First, a closed-type circular reactor was made to perform reduced pressure gas phase reaction. Next, after screening of the alcohol dehydrogenase species for effective proceed of reaction, the activity, stereoselectivity and reaction yield of the immobilized enzyme were measured as functions of the absolute pressure, the water and substrate concentrations in the reactor and the reaction temperature. Also, the immobilized enzyme activity was kinetically evaluated.

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：減圧気相 酵素反応 固定化酵素 不斉合成 バイオリアクター

## 1. 研究開始当初の背景

気相媒体下における酵素反応は、有機溶媒また水溶媒を使用しないことから、基質や生成物の溶解性の問題が生じず、また反応終了後の生成物の分離コストを著しく低減できる。加えて、液相系と比較して物質の移動速度が大きくなることから反応装置の小型化を期待でき、さらに酵素（補酵素）の安定性が向上するなどの利点を有しており、新規な疎水性酵素反応として期待されている。

本法によるクリーンバイオプロセスの工業化にあたっては、物理化学的な面から基質の気化を容易にし、また高い物質移動をともなう生産効率の向上を目指した手法を積極的に考案する必要が生じていた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、減圧環境下における気相型固定化酵素反応を行い、本法が適する反応系のもと酵素の反応活性、立体選択性、反応収率に影響を及ぼす因子を実験的に考究し、本法によるバイオ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23年度

減圧気相リアクターの設計・作製  
モデル反応の検討  
反応基質の検討  
アルコール脱水素起源の検討  
固定化酵素担体の検討

### (2) 平成24年度

反応条件の検討

### (3) 平成25年度

反応条件の検討  
反応装置の基礎設計

## 4. 研究成果

### (1) 減圧気相リアクター

本研究では、減圧気相環境下での酵素反応を実施するために、ガラス製の閉鎖循環型リアクターを設計し、作製した（図1）。本装置は、循環ポンプにより反応系内を流通させることにより連続反応を可能とし、かつ六方バルブを付設したオンラインガスクロマトグラフィーによりキラル生成物/未反応物の自動分析が行える。

### (2) モデル反応

本研究では、減圧気相型酵素反応を検討するためのモデル反応として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への還元反応を選定した（図2）。キ

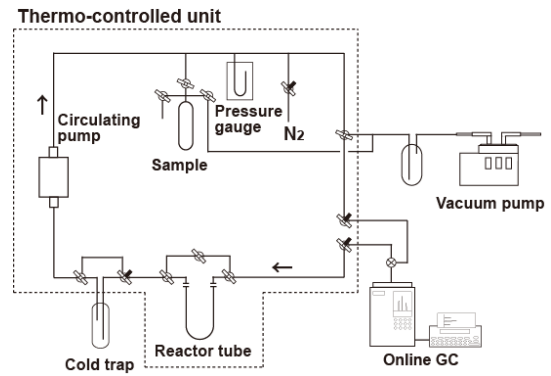


図1 閉鎖循環型リアクター

ラルアルコールは、医薬品合成の出発原料として重要な有機化合物である。

本モデル反応では、反応の進行のために補酵素の存在が不可欠であり、補酵素の酸化型から還元型への再生のために2-プロパノールを基質として用いることにより連続反応を可能にするものとした。

反応基質は主として4-メチル-2-ペンタノンを用い、減圧気相系での酵素反応の特性を評価した。一方、1-フェニルエタノンを基質として反応の進行を確認した。

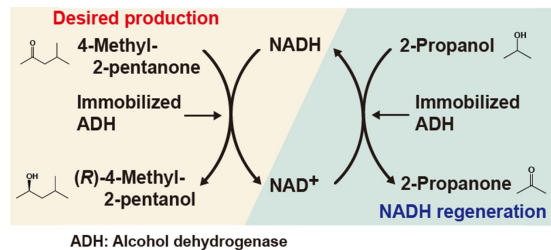


図2 本研究におけるモデル反応

### (3) アルコール脱水素酵素の選定

本研究では、4-メチル-2-ペンタノンの還元反応と2-プロパノールの酸化反応の両者に触媒活性を示すアルコール脱水素酵素を探索し、*Parvibaculum lavamentivorans* 起源で反応の進行を確認した。

### (4) 固定化酵素担体

本研究での閉鎖循環型リアクターにおいて、反応管内に酵素を微粉末状にて充填し気体を循環させると、充填層内で気体が偏流する傾向が確認できた。一方、非多孔性ガラス粒子（直径250-350 μm）を充填すると気体の偏流が生じないことが認められた。このため、非多孔性ガラス粒子（直径250-350 μm）表面に酵素と補酵素を物理的に担持し（図3）、これを固定化酵素として反応に供した。なお、固定化酵素は低温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調製した。

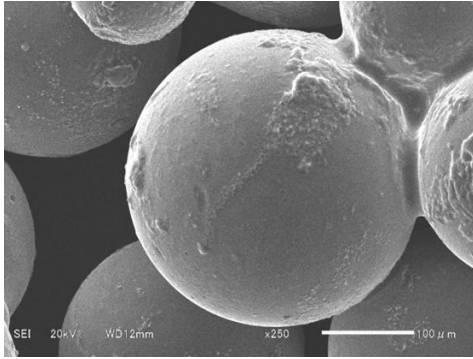


図3 固定化酵素 (SEM 写真)

(5) 反応条件の検討

本研究では循環ガス中の水分濃度と基質濃度の指標として熱力学的活性(式(1))を用い、実験結果を整理した。

Thermodynamic activity of compound =

$$= \frac{\text{Partial pressure of compound}}{\text{Partial pressure of compound at saturation}} \quad (1)$$

一方、固定化酵素の反応活性を初期反応速度、反応収率を24時間後の転化率を実測することにより評価した。

また、固定化酵素の立体選択性をエナンチオ過剰率( $ee_R\%$ ) (式(2))により評価した。本研究で用いた *Parvibaculum lavamentivorans* 起源のアルコール脱水素酵素は、R体を選択的に生成することができる。

Enantiomeric excess ( $ee_R\%$ )

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

まず、固定化アルコール脱水素酵素の初期反応速度、エナンチオ過剰率並びに24時間後の転化率に対する反応系内の絶対圧の影響を実測した(図4)。

初期反応速度は、反応系内の絶対圧213 hPaから1013 hPaの範囲において一定の値を示した。また、エナンチオ過剰率( $ee_R = 99\%$ )と24時間後の転化率も同様な傾向を示した。

これらの結果から、減圧気相環境下において固定化酵素は、標準大気圧下と同等の触媒能力を発揮することが認められた。

ついで、固定化アルコール脱水素酵素の初期反応速度、エナンチオ過剰率並びに24時間後の転化率に対する反応系内の熱力学的水分活性の影響を実測した(図5)。なお、本研究では反応系内の絶対圧347 hPaと1013 hPa(標準大気圧)の結果を比較した。また、反応器内に循環気体の凝縮が生じない、水分活性0.85以下の条件で実験を行った。

反応器内の絶対圧347 hPaの条件において、

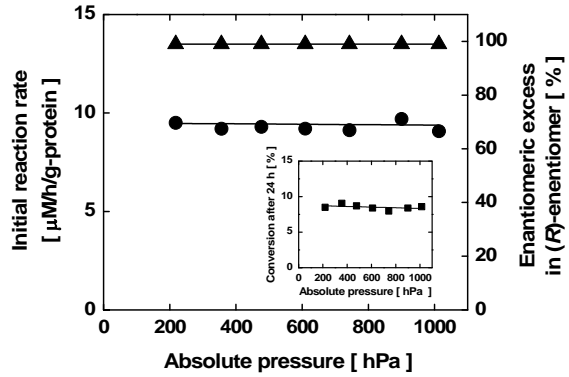


図4 初期反応速度(●)、エナンチオ過剰率(▲)並びに24時間後の転化率(■)に対する反応系内の絶対圧の影響

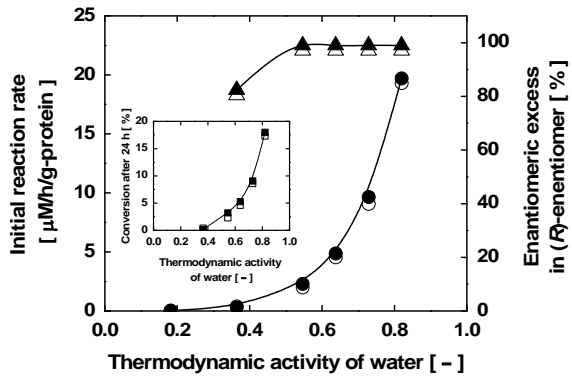


図5 初期反応速度(丸印)、エナンチオ過剰率(三角印)並びに24時間後の転化率(四角印)に対する反応系内の熱力学的水分活性の影響。絶対圧347 hPa: closed key、絶対圧1013 hPa: open key

初期反応速度と24時間後の転化率は、水分活性とともに指数関数的に増加した。一方、エナンチオ過剰率は、水分活性=0.55まで増加し、これ以上の水分活性の条件で一定の値( $ee_R = 99\%$ )を示した。絶対圧1013 hPaの結果と比較すると、初期反応速度、エナンチオ過剰率並びに転化率の水分活性依存性は、本質的に等しいことが認められた。

気相酵素反応において、酵素分子周囲の水和状態は、触媒能力に影響を与える重要な因子である。一般に、酵素の活性と立体選択性は、酵素の水和状態に起因した酵素のフレキシビリティの高まりとともに増加することが考えられている。減圧気相環境下における酵素の活性と立体選択性の変化は、このような水和状態の変化を反映しているものと推察される。

次に、固定化アルコール脱水素酵素の初期反応速度、エナンチオ過剰率並びに24時間後の転化率に対する反応系内の基質活性の影響を実測した。図6に反応系内の絶対圧314 hPaと1013 hPaにおける4-メチル-2-ペンタノンの熱力学的活性を指標とした際の結果を示す。両者の圧力条件下において、初期反応速度は、一般的な酵素反応と同様に4-メチル-2-ペンタノン活性とともに増加した。

表1 反応系内の絶対圧 347 hPa と 1013 hPa における速度定数 (最大速度、ミカエリス定数) の推算値

Kinetic parameters	Absolute pressure	
	347 hPa	1013 hPa
$V_{max}$ [ $\mu\text{M/h}\cdot\text{g}\cdot\text{protein}$ ]	25.4	25.4
$K_m$ , 4-methyl-2-pentanone [-]	0.2241	0.2221
$K_m$ , 2-propanol [-]	0.0216	0.0267

また、2-プロパノールの熱力学的活性を指標とした際も同様な傾向が得られた (図7)。

反応系内の絶対圧 314 hPa と 1013 hPa における速度定数 (最大速度、ミカエリス定数) を推算した結果を表1に示す。両者の圧力条件において、最大速度は等しく、一方ミカエリス定数は実用上等しい値が得られた。この推算した速度定数から、減圧気相環境下において固定化酵素固有の触媒活性は効果的に保持されることが示された。

熱力学的基質活性の実験範囲において、エナンチオ過剰率は一定の高い値 ( $ee_R = 99\%$ ) を示し、一方 24 時間後の転化率もほぼ一定の値を示した。これらの結果から、基質濃度が酵素の立体選択性や反応収率に影響を与えないことが認められた。

最後に、反応系内の絶対圧 347 hPa と 1013 hPa における固定化アルコール脱水素酵素の初期反応速度、エナンチオ過剰率並びに 24 時間後の転化率に対する反応温度の影響を実測した (図8)。なお、熱力学的水分活性と基質活性は、各温度条件において一定とした。また、本研究では反応系内での循環ガスの凝縮が見られない反応温度 313 K 以上において実験を行った。

両者の絶対圧条件において、初期反応速度、エナンチオ過剰率並びに 24 時間後の転化率は、反応温度とともに低下する傾向を示した。また、熱失活の活性化エネルギーを算出し、170 kJ/mol (314 hPa) と 175 kJ/mol (1013 hPa) を得た。

#### (6) 国内外における位置づけとインパクト

減圧環境下における気相型酵素反応は、更なる酵素利用の範囲の拡大に向け重要であり、本研究において医薬品や食品関連分野で関心が持たれているキラル化合物の合成を効果的に行えることを確認した。このような基礎研究は、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

気相型酵素反応は、常圧だけではなく、本研究を通じて減圧条件において効果的に進行することが認められた。今後の展望として、反応操作中に未反応物や生成物を液化する

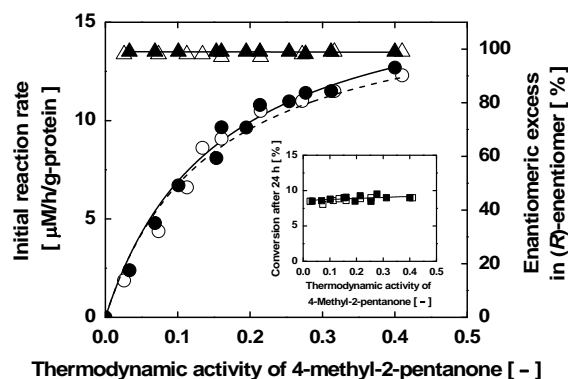


Figure 6: Initial reaction rate (circles), enantiomeric excess (triangles) and 24 h conversion (squares) versus thermodynamic activity of 4-methyl-2-pentanone. Absolute pressure 347 hPa: closed key, Absolute pressure 1013 hPa: open key.

図6 初期反応速度 (丸印)、エナンチオ過剰率 (三角印) 並びに 24 時間後の転化率 (四角印) に対する反応系内の熱力学的 4-メチル-2-ペンタノン活性の影響。絶対圧 347 hPa: closed key、絶対圧 1013 hPa: open key

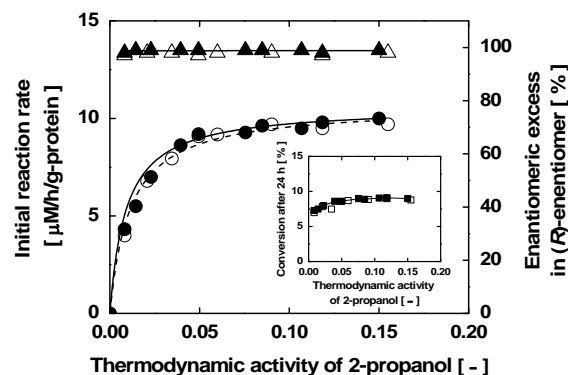


Figure 7: Initial reaction rate (circles), enantiomeric excess (triangles) and 24 h conversion (squares) versus thermodynamic activity of 2-propanol. Absolute pressure 347 hPa: closed key, Absolute pressure 1013 hPa: open key.

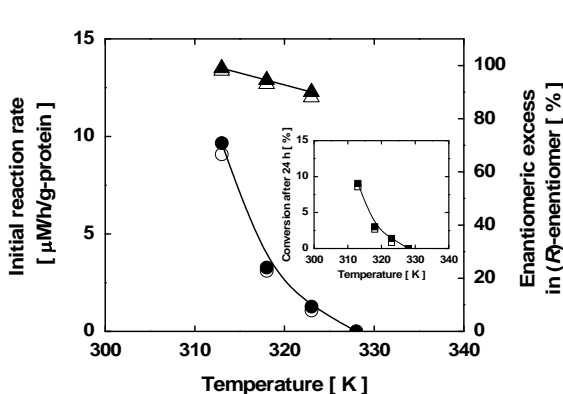


Figure 8: Initial reaction rate (circles), enantiomeric excess (triangles) and 24 h conversion (squares) versus temperature. Absolute pressure 347 hPa: closed key, Absolute pressure 1013 hPa: open key.

圧力スイングを適宜行い、酵素活性を損なわず、反応終了後の物質分離を効果的に行える反応システムの構築が期待される。

## 5 . 主な発表論文等

[学会発表](計3件)

Misaki Mizobuchi, Kazuhiro Nagayama,  
Immobilized enzyme reaction in gas phase  
reactor under reduced pressure, *Abstracts  
of the 15th Asian Chemical Congress*,  
2013, Green Synthesis & Catalysis  
溝渕美沙希、長山和史、減圧気相系にお  
ける固定化酵素の反応活性、化学工学  
会第45秋季大会、2013、要旨集 ZE2P08  
溝渕美沙希、長山和史、減圧環境下にお  
ける固定化酵素反応、化学工学会学生  
発表会(堺大会)、2014、要旨集 M117

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

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