総 説

生化学反応の特徴と
バイオリアクター

松野 隆一・中西 一弘

京都大学農学部食品工学科
(京都市左京区北白川追分町)Factors Affecting the Performance
of Bioreactors

Ryuichi MATSUNO and Kazuhiro NAKANISHI

Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Kyoto University
(Oiwakecho, Kitashirakawa, Sakyo-ku, Kyoto)

固定化生体触媒を反応素子として利用するバイオリアクターの特性、あるいは設計に関する基本的事項を固定化酵素自体と反応器の面に分けて概観した。前者に関しては活性、安定性に及ぼす固定化方法、物質移動、微小環境、固定化による酵素分子の修飾等の影響について示した。後者に関しては反応器の種類とその特徴について触れた後、バイオリアクターの設計に際して反応器、反応条件の選択がいかに重要であるかを例を示しながら論じた。

1 結 言

高等動植物から微生物に至るすべての生物の細胞がその生命を維持し増殖生長を続ける過程においては、酸化還元、転移、分解、光学分割、異性化、合成等ありとあらゆる種類の化学反応が起こっているが、これらの多様な化学反応はそれぞれ異なった生体触媒、すなわち酵素により常温常圧という温和な条件の下で極めて効率良く営まれている。すなわち生体細胞は高度に省エネルギー化、効率化された一大化学工場とみなすことができる。またそこで使用される酵素は触媒として完璧にまで無駄の無い形に設計されており、その高い触媒能と特異性は化学触媒では到底得難いものである。人類は昔からこの生体触媒の特性を有用物質の生産のために活用して来た。例えば食品に関連しては、有史以前よりビール、ワイン、チーズの生産等数々の発酵が行われ、近年に至っては酵素（アミラーゼ）を用いたデンプンよりのグルコース、マルトースの製造等が実施されている。一方医薬品工業においては放線菌による抗生物質の生産等を挙げることができる。この様な物質の生産、変換に使用される反応器は“反応特異性が高く、高能率の触媒である酵

素又は複合酵素系としての微生物を用いる反応器”と定義される広義のバイオリアクターに属する。しかしながらこの種のバイオリアクターでは直径 50 Å 程度の小さな酵素分子や、 μm オーダーの微生物菌体を反応液から分離して再使用することは極めて困難であった。この難点を克服するために 1960 年代になって酵素を粒径数十 μm 以上の不溶性担体（固定化担体）に固定化する方法が開発され、更に近年微生物菌体や細胞オルガネラの固定化も可能となった。この固定化技術の出現により酵素や微生物菌体の繰り返し使用、連続反応が可能となり、その結果一躍生化学反応装置としてのバイオリアクターが体系化されるに至った。すなわちこの固定化生体触媒を使用する狭義のバイオリアクターは“高性能、高反応特異性を持った酵素、微生物菌体を繰り返し又は連続使用する反応器”^{1),2)}と定義される。狭義のバイオリアクターに関しては膨大な数の研究報告がなされており、既に固定化アミノアシラーゼによる L-アミノ酸の製造等 7~8 種類の有用物質生産プロセスにおいて実用化されている。バイオリアクターには更に狭義にエネルギー生成系や酸化還元系と共役した反応系を組み込んだ複合酵素系の反応器 という 定義もある^{1),2)}。これは ATP（アデノシン三リン酸）や NADH（還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド）の再生系を組み込んだ反応器で、それらが分解又は酸化される際に放出されるエネルギーを使用して、自由エネルギー消費を伴う合成反応、還元反応を行い、付加価値の高い物質を生産する反応器であり、この実用化への道が開かれれば、生体触媒利用の途がさらに広がるものと考えられる。

さて固定化生体触媒をバイオリアクターの反応素子として使用し、効率の良い反応プロセスを構築、あるいは

表-1 種々の固定化法と担体

生体触媒	固定化法	担体	結合の種類
酵 素	担体結合法		
	物理吸着法	シリカゲル アルミナ 活性炭 セラムック 合成樹脂	物理吸着
	イオン結合法	デキストラン セルロース アガロース系のイオン交換体 合成イオン交換樹脂	静電氣的相互作用
	共有結合法	デキストラン セルロース アガロース系の多糖ゲル 多孔性ガラス	化学結合
	包括法		
微生物菌体 細胞オルガ ネラ植物細胞	モノマー法	ポリアクリルアミド	化学結合
	プレポリマー法	光硬化性樹脂 ウレタン樹脂	
	ポリマー法	カラギーナン アルギン酸 寒天	
	マイクロカプセル 橋かけ法	ナイロン皮膜等 酵素同士を多官能試薬で橋かけ	
	包括法	カラギーナン アルギン酸 光硬化性樹脂 ポリアクリルアミドゲル セラムック 合成樹脂	

設計する場合には固定化触媒自体の設計と用いる反応装置の設計という二つの面に関して十分な配慮が必要である。本稿ではこれら設計に際して必要な基礎的事項、あるいはその特性を生化学反応の特徴と関連付けながら紹介する。

2 固定化生体触媒の特性

2.1 固定化方法³⁾

酵素の固定方法は大きく分けて担体結合法、包括法、橋かけ法の三つがある。いずれの場合も本来の目的である反応液との分離等のハンドリングを良くするために通常数十 μm 以上の粒子、あるいは膜状の固定化触媒が作られている。

表-1 に主な固定化方法と担体、特徴等をまとめて示す。この中でバイオリアクターの実用に適した方法としては固定化酵素の場合では主として物理吸着法、イオン結合法、プレポリマー包括法が挙げられる。物理吸着法、イオン結合法では比較的硬い担体を選択することが可能である。またこれらの方法では酵素は比較的弱い力

で担体と結合しているため、高い活性収率が得られる反面酵素が漏れやすいという欠点がある。酵素の脱離を防ぐために酵素を担体に吸着あるいは包括した後グルタルアルデヒド等の2官能基を持った試薬により橋かけ処理する方法が採られている。プレポリマー法では重合時の熱やラジカルの発生が少ないために温和な条件で酵素をそのままの状態に固定化することができる⁴⁾。なお、モノマーを重合する方法においても固定化時の酵素の失活を少なくするために放射線照射による低温重合法⁵⁾が開発されている。

微生物菌体、細胞オルガネラ、植物細胞等は酵素に比較して著しく大きいために適用される固定化法も限定される。現在、最もよく用いられている方法は包括法である。特にカラギーナン⁶⁾、アルギン酸⁷⁾、光硬化性プレポリマーによるゲル等が優れている。この方法の欠点であるゲルの機械的強度、耐熱性を高くするために硬化剤による処理が行われている。数 μm 以上の孔径をもつ合成樹脂やセラミックス等も担体として注目され始めている。

2.2 固定化酵素の活性に及ぼす因子

一般に生体触媒（以下特に断らない限り酵素に着目）は固定化されることにより、多かれ少なかれ元の遊離酵素とは違った性質を示す。簡単のためによく知られているミハエリス-メンテン型の反応について考える。溶液中の遊離酵素による反応は次式で示される。

液本体では流体の混合が充分行われており基質濃度は場所によらず一定である。しかし液本体で見られる渦は境膜、担体内部には届かない。酵素は担体中に均一に分布している。

図-1 固定化酵素担体界面近傍の様子⁸⁾

$$v = \frac{k_2 E_0 C_m}{K_m + C_m} = \frac{V_{\max} C_m}{K_m + C_m} \quad (1)$$

ここで k_2 , K_m , $V_{\max}$ は遊離酵素の最大速度定数, ミハエリス定数, 最大速度であり, E_0 , C_m はそれぞれ溶液中の酵素濃度, 基質濃度を示す。後述する様に酵素を担体に固定化すると担体内の酵素分子表面近傍の微小環境, 固定化による酵素分子の化学修飾等の影響により, k_2 , K_m の値が変化するので反応速度式は式(2)で表される。通常反応型式そのものが変化することはない。

$$v^* = \frac{k_2^* E_0' C}{K_m^* + C} = \frac{V_{\max}^* C}{K_m^* + C} \quad (2)$$

ここで E_0' は固定化酵素単位体積当たりの酵素濃度, C は担体内の局所的な基質濃度である。* 印は固定化による変化を表す。更に固定化酵素は通常ハンドリングを容易にするために元の酵素自体の大きさの数倍以上になっているので基質の担体内拡散の影響も考慮しなければならない。本節ではこれらの因子について述べる。

2・2・1 物質移動の影響 図-1 に固定化酵素担体界面近傍の様子を示す⁹⁾。液本体中では混合が充分に行われているので, 基質濃度 (C_m) は一定である。一方, 固定化酵素担体表面近傍にはこの混合の影響が及ばない境界膜が形成されるので, 基質はこの境界膜を分子拡散により通過し (外部拡散), 担体表面に到達する。ここで基質は分配係数 $K = C_s^*/C_s$ で定義される分配比で担体内表面に分配される。更に基質は担体内の間げきを分子拡散により移動 (内部拡散) し, 同時に固定化されている酵素により反応を受けるので, その結果担体内に 図-1 に示す様な濃度こう配が形成される。外部拡散の反応速度に及ぼす影響は物質移動係数により評価されるが⁹⁾, 反応器内液本体のかくはんが充分強い, 流速が大きい時は無視することができる。内部拡散の影響は固体触媒反応の解析と同様, 有効係数 (η) で整理されている。 η は固定化酵素の実際の反応速度と担体内部でも担体表面濃度 C_s 。

反応速度式が生成物阻害型である場合 k_2^* , K_m^* に対して見かけの値を使用しなければならない^{9), 10)}

図-2 固定化酵素の有効係数 η と ϕ_M 及び C_s/K_m^* との関係¹⁰⁾

で反応が起こると仮定して得られる仮想的な反応速度の比として定義され, 酵素がどのくらい有効に使われているかの尺度となる。 η に対する理論解は反応と担体内での基質, 生成物の拡散を考慮した物質収支式を解くことにより得られる。図-2 に反応速度式がミハエリス-メンテン型で, $K=1$ の場合の板状固定化酵素に対する解を示すが¹⁰⁾, 他の反応速度式の場合や $K \neq 1$, あるいは板状以外の形状に対しても解かれている¹¹⁾。 η は Thiele modulus $\phi_M = y_R (k_2^* E_0' / D_s K_m^*)^{1/2}$ と C_s/K_m^* の関数として表される。ここで D_s は担体内の基質の拡散係数である。 ϕ_M は反応速度 ($k_2^* E_0' / K_m^*$) の拡散速度 (D_s / y_R^2) に対する相対的な割合を示すパラメーターであり, ϕ_M が大きくなり拡散が固定化酵素の見掛けの反応速度を支配するようになる (拡散律速) と η が低下する。逆に, ϕ_M が小さくなるか C_s/K_m^* の値が大きくなると反応律速に近づき $\eta=1$ となる。従って固定化酵素の最大速度 $V_{\max(\text{app})}$ は $V_{\max}^*$ に一致する。一方ミハエリス定数 $K_{m(\text{app})}$ は拡散抵抗の影響を受け, ϕ_M が増加すると K_m^* よりも著しく大きくなる。

生成物阻害がある場合は (図-2 において K_m^* が負の場合), 拡散抵抗の増加により担体内部の生成物濃度が上昇するために η は著しく低下する。この様に物質移動の影響は固定化酵素の反応速度を低下させる傾向にあるが, 基質阻害型の反応⁹⁾ あるいは逐次反応¹²⁾ においては逆に拡散抵抗の存在により反応速度を高くすることが可能である。

2・2・2 固定化による速度パラメーターの変化

$k_2^* E_0'$, K_m^* 値は固定化酵素をすりつぶして $\eta=1$ の条件で得られる $V_{\max(\text{app})}$ と $K_{m(\text{app})}$ の値から求めることができる。すなわち $V_{\max(\text{app})}$, $K_{m(\text{app})}$ はそれぞれ $k_2^* E_0' / (V_{\max}^*)$, K_m^* / K に相当する。 $k_2^* E_0'$, K_m^* の値に及ぼす因子としては a) 固定化時の酵素失活, b) 立体障害, c) 担体内微小環境の変化, d) 固定化による酵素分子の化学修飾が挙げられる。a) に関しては酵素の失活は all or none であるので $V_{\max}^*$ は低下するが K_m^* 値は変化しない。高分子基質の場合は基質が活性部位に近づき難くなるので K_m^* 値も変化する (b)。この立体障害の影響を除くために酵素分子と担体構成成分の間に適当な長さのスペーサーを入れることもある。酵素をイオン交換体に固定化した時は担体内部の pH が溶液中の値とは異なる。通常 K_m^* , $V_{\max}^*$ 値は担体内部の pH に相当する溶液中での値を示すと考えられる。担体内部の pH は Donnan の膜平衡式により近似的に推算される^{13, 14)}。

d) の例では, 活性部位の周辺が固定化により修飾されて pK が変化し, pH のシフトが起こったり, 修飾によりコンホメーションの凍結が起こりアロステリック性を示さなくなる場合がある¹⁵⁾。

図-3 種々の物質のデキストランゲル中での拡散係数と分配係数の関係⁹⁾

2.2.3 分配係数 基質の担体に対する分配係数 K は主に a) 担体のマクロな物理的な構造, b) 静電氣的相互作用, c) 親水性あるいは疎水性相互作用 によって影響を受ける。a) の場合は担体構成成分と基質の化学的相互作用の少ない場合で、担体内の網目構造や基質の大きさに依存する。b) の場合は基質と担体のイオンの相互作用の場合で、同符号の場合はお互いに反発するので K が減少し、その結果 $K_{m(app)}$ は増加する。逆に異符号の場合は $K_{m(app)}$ は低下する^{18), 19)}。プレポリマー法による固定化においては、プレポリマーの疎水性あるいは親水性度を変化させることにより担体の疎水性度をコントロールできる。例えばステロイドの変換反応においては担体が疎水性の場合に低い $K_{m(app)}$ が得られ、反応が効率良く行われた⁴⁾。

2.2.4 基質の拡散係数 Thiele modulus 中の D_s の合理的な推算法は確立されていない。測定法は大別して4つの方法があるが、詳細については総説¹⁷⁾を参照していただきたい。図-3 は種々の拡散物質のデキストランゲル中での拡散係数の測定結果を示す⁹⁾。 D_s と分子拡散係数の比が、 K に対してプロットしてある。拡散物質とデキストランゲルとの相互作用は小さいので K は担体構成成分による立体障害の程度を表す。 K によって D_s/D_m がよく相関されているからゲル中での D_s の低下の原因は主として拡散物質の移動が網目構造に妨げられるために起きると考えられる。アクリルアミドゲル中ではゲル構造の違いのため、 D_s の変化は異なった挙動を示す¹⁷⁾。

2.2.5 η 値の推算 ϕ_M 中のパラメーター、 γ_R , D_s , k_2E^* , K_m^* と K の値を何らかの方法で推算することができれば η 値が図-2 より算出され、机上の計算により固定化酵素の活性をコントロールできることになる。この試みは低分子基質で、固定化担体为非イオン性の場

合には成功しているが¹⁸⁾、高分子基質や担体がイオン性の場合には検討の余地が残されている。

2.2.6 担体内酵素分布 以上の取り扱いでは担体内で酵素分布は均一であると仮定したが、固定化法によっては必ずしも均一とは限らないので注意を要する¹⁹⁾、²⁰⁾。一方、酵素を担体内で適当に分布させたり⁹⁾、種類の異なった酵素を場所を変えて固定化することにより²¹⁾、更に効率の良い目的に合致した固定化酵素の設計も可能である。固定化増殖菌体では増殖と酸素の担体への拡散速度のバランスに従って、自然に菌体が担体表面に集中してくるようになる²²⁾。

2.3 安定性に及ぼす因子

バイオリクターが実用化されるか否かはその反応素子である固定化生体触媒の安定性にかかっている。事実工業化されたプロセスではいずれの場合もその反応の半減期は数か月以上に達している。安定性に及ぼす因子としては物質移動、固定化方法、担体の種類等が考えられる。

2.3.1 物質移動の影響 一般的に固定化酵素の失活速度は内部拡散の影響が大きくなる程小さくなる。すなわち未失活な状態での η が小さい程酵素は安定化される。これは前節で述べたように未失活な状態では担体粒子表面近傍の酵素のみ有効に使われ、失活が進むに従って内部の酵素も反応にあずかるようになるために生じる見かけの現象である。失活速度が一次反応で表される場合、固定化酵素の見掛けの失活速度定数 $k_{d(app)}$ は内部拡散の影響により $\sqrt{k_d^*}$ の値に近づく。ここで k_d^* は拡散の影響のない場合の固定化酵素の失活速度定数である。酵素が安価な場合には、この現象を有効に利用して操作安定性を増すことができる。基質濃度が高くなると酵素は基質の保護効果により安定化される場合が多いが、拡散抵抗による安定化の効果は減少する²³⁾。

2.3.2 固定化方法の影響 ここでは拡散の影響がない場合の固定化酵素の安定性に及ぼす固定化方法の影響について述べる。酵素は固定化されることにより安定性が増加する場合が多く、最近ではその安定化の機構を探る研究も行われている²⁴⁾。包括法ではゲル濃度が高くなると安定化される場合が多い。ポリメタクリレートゲル包括法により固定化されたトリプシン²⁵⁾はゲル濃度が25%以上になるとゲル中の酵素の拡散係数の著しい低下により自己消化の現象が全くみられなくなる。さらにゲル濃度を高くすると(40%以上)単分子的な熱失活も抑えられるが、これは酵素分子とゲル構成成分間の相互作用の効果により(多点結合)、酵素分子のゆらぎが減少するためであると推論されている。一方、イオン結合法、物理吸着法では逆に相互作用が強過ぎて、安定性が低下する場合もある。更に前者では担体内の pH 変化の影響も考慮しなければならない。共有結合法の場合は酵素を

その本来のコンホメーションを変化させない様に担体と多点結合させると堅い構造となり、その結果著しく安定化される場合がある。Martinek らはこのスキームのもとに共有結合法^{26), 27)}、包括法 (前述)²⁸⁾、分子内橋かけ法²⁹⁾における安定化の方策について検討を行った。共有結合法では多点結合のされ方に分布が生じることが明らかにされている³⁰⁾。そのために遊離酵素の熱失活過程は一次反応で表せるのに固定化すると一次反応に従わなくなる。

セファロース CL-4B に共有結合された α -キモトリプシンやグルコアミラーゼの熱失活実験の結果は、熱失活の活性化自由エネルギーがガウス分布すると仮定したモデルにより定量的に説明された³¹⁾。

κ -カラギナンに包括された *Brevibacterium flavum* の場合³²⁾ フマラーゼの様な膜酵素の安定性は増加するが、この機構も多点結合によるものと同一と考えられている。

長時間反応を行う場合は酵素の担体からの漏れ、脱離も重要な因子である。吸着法、包括法、イオン結合法では、担体中の酵素濃度は外液酵素濃度との平衡関係により支配されるので、連続的に基質を流すと酵素は多かれ少なかれ担体より脱離することになる。共有結合法においても、加水分解により酵素と担体との結合が切れることが知られている。

3 反応器の特性

3.1 プラグフロー型 (PFR) と完全混合型反応器 (CSTR)

連続反応操作を行う際の反応器としてプラグフロー型 (Plug flow reactor; PFR) と完全混合槽型 (Continuous

表-2 固定化生体触媒の工業的利用例³⁶⁾

固定化生体触媒	用 途	工業化開始の時期
固定化アミノアシラーゼ	DL-アミノ酸の光学分割	1969 年
固定化 <i>Escherichia coli</i> (アスパルターゼ)	L-アスパラギン酸の製造	1973
固定化ペニシリンアミダーゼ	6-アミノペニシリン酸の製造	1973
固定化グルコースイソメラーゼ	異性化糖液の製造	1973
固定化 <i>Brevibacterium ammoniagenes</i> (フマラーゼ)	L-リゴ酸の製造	1974
固定化ラクターゼ	低乳糖乳の製造	1977
固定化 <i>Pseudomonas dacunhae</i> (L-アスパラギン酸 β -脱炭酸酵素)	L-アラニンの製造	1982

stirred tank reactor; CSTR) があるが、これらは基質の反応器内での滞留時間分布、言い換えると混合状態に関して両極端を示す反応器である。すなわち PFR では理想的な場合、反応器内での基質の混合が全くないので、基質濃度は反応器入口から出口に向かって順次低下し、生成物は逆に増加する。一方、CSTR では充分な混合が起こっているため、反応器内の基質、生成物濃度は一様である。

3.2 種々の反応器

図-4 に実際に固定化生体触媒に対して用いられている種々の反応器を、装置内の混合の度合いを示す尺度となるペクレ数 [$Pe = D_L / (Zu)$ 、ここで D_L : 装置内の混合拡散係数、 Z : カラム長、 u : 線速度] のおおよその値によって並べてある。CSTR, PFR を両極端として、固-液系流動層、液-気-固三相流動層、膜型反応器、回転円盤型反応器がその中間に位置している。基質阻害が強くない限りは、反応器内の混合が少ない程、固定化触媒単位体積当たりの反応速度は増加するので効率が良い。粘性の高い基質溶液には反応器内の混合による若干の効率の低下を犠牲にしても圧力損失が大きにならない流動層を利用するのが有効である。回転円盤型や三相流動層

は基質の一つや生成物が気体の場合に適する³³⁾。この例としてポリアクリルアミド固定化 *Pseudomonas ovalis* によるグルコン酸の製造や固定化酵母によるエタノールの生産等がある³³⁾。膜型反応器はリパーゼの様に疎水性膜に強く吸着する酵素を使用する場合や、酵素の固定化が困難な場合、あるいは補酵素を必要とする複合酵素系の反応の場合に使用される。基質の膜透過速度を高めるため、膜の両側の圧力を交互に上げ下げする方法 (プレッシャースイング法³⁵⁾) も考案さ

S: 基質, P: 生成物, E: 固定化酵素または酵素溶液
(A) 完全混合槽型反応器 (CSTR) (B) 中空糸膜型反応器³⁴⁾ (C) 三相流動層反応器³³⁾
(D) 回転円盤型反応器³³⁾ (E) 流動層型反応器 (F) 中空糸膜型反応器³⁴⁾
(G) プラグフロー型反応器 (充てん層, PFR)

図-4 バイオリクターとして使用される種々の反応器³³⁾

れている。

4 反応の特徴と反応器の選択

固定化生体触媒をバイオリアクターの反応素子として用い、効率の良いバイオリアクターを設計するには個々の酵素、微生物反応の特徴を十分に把握した後、それに最適な反応器の選択、反応条件の設定を行わねばならない。

4.1 工業化された例の場合

表-2 に示す既に工業化されている7種類の反応プロセスにおいても³⁶⁾、その研究段階において、固定化法のみならず反応器、反応条件等の選択に関して数多くの検討が行われている³⁷⁾。世界最初の工業化例である固定化アミノアシラーゼによるDL-アミノ酸の光学分割においては、反応器の選択、反応条件の設定に関して種々の反応工学的な検討がなされた。固定化 *Escherichia coli* によるL-アスパラギン酸の製造においては基質へのMn²⁺等の二価金属イオンの添加と固定化法の改良により、連続反応時の活性半減期が飛躍的に延びたことが成功の主因であった。また、このプロセスでは酵素反応により生じる反応熱を調節するために多段式、放熱型のカラムを使用している。固定化ラクターゼによる牛乳中のラクトースの分解反応ではカラムの微生物汚染を避けるために低温(5°C)で反応を行い、定期的にカラムを洗浄するという方策をとっている³⁸⁾。固定化 *Pseudomonas dacunhae* によるL-アスパラギン酸からのL-アラニンの反応においては、最大の問題であった反応に伴うCO₂ガス発生に基づくpH変化を加圧反応装置を用いることにより抑えることが可能となった。

また、工業化の寸前にある固定化(増殖)酵母によるグルコースからのエタノールの製造においては、高濃度の糖による菌体の増殖阻害を少なくするために循環法、多段供給法等の方法が試みられている³⁷⁾。

研究室レベルでの実験例においても個々の生化学反応に適した反応条件の選択により、バイオリアクターの性能が著しく改良された例がある。また、この観点から反応装置に関して種々の提案がなされている。以下にこれらの例を示す。

4.2 固定化ラクターゼによるラクトースの加水分解—PFRとCSTRの操作安定性の違い—

Duolite ES-762 に固定化した *Bacillus circulans* 起源のラクターゼにより4.56%ラクトース溶液の連続加水分解を40°C、pH 6.0で行った³⁹⁾。図-5(下図)にPFRによる実験結果を示す。図よりわかるように活性が日とともに低下している。しかし14日目よりバッファによる洗浄と反応を繰り返すと、洗浄の度に活性が回復することから先の活性の低下は不可逆的でないことがわかる。この奇妙な現象の起こる原因を検討したとこ

上図：完全混合槽型反応器
下図：フラグフロー型反応器、…はバッファによる洗浄期間を示す。

図-5 固定化ラクターゼによるラクトースの連続加水分解反応³⁹⁾

ろ、副反応として起こる転移作用によって生成するオリゴ糖にあることがわかった。バッチ反応によるとオリゴ糖はラクトースの加水分解率が30~50%付近で最も蓄積し、反応終期に再び加水分解されることがわかっている。操作を安定に行うにはオリゴ糖の生成しない条件を選ばよいため、まず高分解率で行うことを考える。しかし、PFRでは反応器出口で高分解率にしても、カラムの途中にオリゴ糖が蓄積し活性を下げる。それではCSTRではどうであろうか。CSTRは反応効率は悪いが、反応器内で濃度が均一になっているから、高分解率にさえしておけば、オリゴ糖のレベルを低く保てる。図-5(上図)はCSTRによる結果であるが予想通り操作は安定で、活性の低下は認められない。

4.3 酵母の解糖系酵素群及びキナーゼを用いたアデノシンよりのATPの連続再生—生成物リサイクル膜型PFR—

酵母より抽出した解糖系酵素群及びキナーゼを用い膜型PFRにてグルコースをエネルギー源としてアデノシンよりATPを連続再生した⁴⁰⁾。本系には少なくとも14の酵素が含まれるが、反応の中間生成物がそれらの熱失活に対し保護作用を示すことがわかった。又、本系の反応をスムーズに進行させるには、反応初期に最終生成物であるATPや中間生成物であるフラクトース二リン酸(FBP)等の高エネルギー化合物がある濃度以上含まれていなければならないこともわかった。PFRを採用しているので反応器入口には中間生成物がなく、酵素の保護や、必要濃度以上の高エネルギー化合物の確保ができない。このような場合、反応器の出口あるいは中間から生成物又は中間生成物を抜き出し、反応器入口に再循環させると、操作の安定性に著しい効果がある⁴⁰⁾。

4.4 セルラーゼによる結晶セルロースの加水分解—他反応器との組み合わせによる反応率向上への試み—

図-6 ペプチド合成反応に対する種々の反応器⁴¹⁾ 上図はバッチ反応，下図は連続反応のための反応方式を示す。

不溶性の基質セルロースとセルラーゼの反応においては、セルラーゼがセルロース繊維の表面に結合するばかりでなく、内部までもに拡散し吸着し加水分解を行う。また可溶性の生成物が反応を著しく阻害し、セルロースからの酵素の脱着を促進する⁴¹⁾。セルラーゼが不溶性基質に吸着することから、一種の固定化酵素と見なすことができ、連続反応を行うことが可能であるが分解率を高めると、生成物により反応速度が低下するばかりでなく酵素の脱着も起こる。もし、生成物を基質として利用する第二の反応器との間に反応液を高速で循環させることができれば、セルラーゼ反応の生成物濃度を低く保つことができ、反応速度、酵素の脱着防止の両面での解決が計れる⁴²⁾。

4.5 プロテアーゼによるペプチド合成—有機溶媒による抽出反応器—

プロテアーゼ（サーモライシン）の加水分解反応の逆反応を利用してペプチドを合成する反応に対して、高い合成収率が得られ、しかも反応の連続化に適した反応器の検討を行った。この観点から a) 遊離酵素を水相に封じ込め、水不溶の有機溶媒を添加してエマルション状態で反応を行う二相系での反応⁴³⁾や固定化酵素を用い、b) バッファー中、c) 二相系、d) 有機溶媒中で行う方式が考えられた⁴⁴⁾ (図-6)。d) の方式も担体内（水が存在する）を水相と考えると二相系反応に相当する。a), c), d) の方式において高い収率が得られた。また、これらの方式では反応をスムーズに行うためには基質、生成物の二相間の分配、分配に基づく pH 変化を十分に把握することが重要である。

4.6 固定化グルコースイソメラーゼによるグルコースの異性化—分離装置との組み合わせ—

フラクトース含量がグルコースより上回る高果糖異性化糖は、グルコースイソメラーゼの反応の平衡がフラクトース濃度：グルコース濃度が 1:1 であるからどうしても分離操作と組み合わせて製造しなければならない。分離操作に伴う生成物の希釈をできるだけ抑えるべく、イソメラーゼカラムを組み込んだ擬似移動層型製造装置が考案されている⁴⁵⁾。

5 結 言

以上述べてきた様にバイオリアクターの設計に関しては固定化酵素自体の設計とそれを用いる反応器の設計という 2 つの面があるが、いずれについても過去 20 年間のデータの

蓄積の結果、その基本的事項に関してはかなり体系化されてきた。一方、生化学反応は実に多種多様であり、又そこに関与する酵素の性質に関しても未知な点が多い。バイオリアクターの設計に際してはまず生化学反応と関与する酵素の性質を十分に把握した上で体系化されている反応工学の手法を適用することが肝要である。

(昭和 59 年 6 月 20 日受理)

文 献

- 1) 福井三郎, 山根恒夫 “B. アトキンソン著, バイオリアクター—微生物生化学反応器” の訳者のはしがき, 産業図書 (1977)
- 2) 今堀和友, 発酵と工業, **35**, 3 (1977)
- 3) 千畑一郎, 土佐哲也, “酵素工学”, 福井三郎, 千畑一郎, 鈴木周一編, 東京化学同人 (1981) p. 157
- 4) 田中渥夫, 園元謙二, 細胞工学, **2**, 360 (1983)
- 5) I. Kaetsu, M. Kumakura, M. Yoshida, *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 679, 847, 863 (1979)
- 6) I. Takata, T. Tosa, I. Chibata, *J. Solid-Phase Biochem.*, **2**, 225 (1977)
- 7) 福島 達, 村山浩司, 藤原康昌, 平岩章良, 山出和弘, 日本醗酵学会要旨集, (1980) p. 133
- 8) 松野隆一, 中西一弘, 細胞工学, **2**, 343 (1983)
- 9) 松野隆一, “固定化酵素” 千畑一郎編, 講談社サイエンスフィク (1974) p. 225
- 10) G.W. Roberts, C.N. Satterfield, *Ind. Eng. Chem. Fundam.*, **4**, 228 (1965)
- 11) 山根恒夫, “生物反応工学” 産業図書 (1980)
- 12) K. Mosbach, B. Mattiasson, *Acta Chem. Scand.*, **24**, 2093 (1970)
- 13) L. Goldstein, Y. Levin, E. Katchalski, *Biochemistry*, **3**, 1913 (1964)
- 14) S. Adachi, Y. Kawamura, K. Nakanishi, R. Matsuno, T. Kamikubo, *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 1707 (1978)

- 15) C.A. Enns, W. W.-C. Cham, *J. Biol. Chem.*, **253**, 2511 (1978)
- 16) C.W. Wharton, E.M. Crook, K. Brocklehurst, *Eur. J. Biochem.*, **6**, 565 (1968)
- 17) 松野隆一, 中西一弘, 化学工学, **43**, 283 (1979)
- 18) K.F. Nigan, S.H. Lin, *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 1623 (1976)
- 19) S.W. Carleysmith, P. Dunnli, M.D. Lilly, *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 735 (1980)
- 20) S.W. Carleysmith, H.B. L. Eames, M.D. Lilly, *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 957 (1980)
- 21) 日比野健, 崎山高明, 中村厚三, 矢野俊正, “日本農芸化学会講演要旨集”, (1982) p. 336
- 22) M. Wada, J. Kato, I. Chibata, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **8**, 241 (1979)
- 23) S. Moriyama, S. Kataoka, K. Nakanishi, R. Matsuno, T. Kamikubo, *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 2737 (1980)
- 24) A.M. Klibanov, *Anal. Biochem.*, **93**, 1 (1979)
- 25) K. Martinek, A.M. Klibanov, V.S. Goldmacher, A.V. Tchernysheva, V.V. Mozhaev, I.V. Berezin, B.O. Glotov, *Biochim. Biophys. Acta*, **485**, 13 (1977)
- 26) K. Martinek, A.M. Klibanov, V.S. Goldmacher, I.V. Berezin, *Biochim. Biophys. Acta*, **485**, 1 (1977)
- 27) V.P. Torchilin, A.V. Maksimenko, V.N. Smirnov, I.V. Berezin, A.M. Klivanov, K. Martinek, *Biochim. Biophys. Acta*, **567**, 1 (1979)
- 28) V.P. Torchilin, A.V. Maksimenko, V.N. Smirnov, I.V. Berezin, A.M. Klivanov, K. Martinek, *Biochim. Biophys. Acta*, **522**, 277 (1978)
- 29) V.P. Torchilin, A.V. Maksimenko, V.N. Smirnov, I.V. Berezin, K. Martinek, *Biochim. Biophys. Acta*, **568**, 1 (1979)
- 30) A.-C. Koch-Schmidt, K. Mosbach, *Biochemistry*, **16**, 2101, 2105 (1977)
- 31) Y. Kawamura, K. Nakanishi, R. Matsuno, T. Kamikubo, *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 1219 (1981)
- 32) 土佐哲也 “酵素工学研究会第9回講演会” (1982) p. 10
- 33) 福島 達, “酵素工学”, 福井三郎, 千畑一郎, 鈴木周一編, 東京化学同人 (1981), p. 285
- 34) 楠浩一郎, “酵素工学”, 福井三郎, 千畑一郎, 鈴木周一編, 東京化学同人 (1981), p. 309
- 35) S. Frusaki, T. Miyauchi, *J. Chem. Eng. Japan*, **14**, 479 (1981)
- 36) 土佐哲也, 細胞工学, **2**, 353 (1983)
- 37) 千畑一郎, 土佐哲也, “固定化酵素” 福井三郎, 千畑一郎, 鈴木周一編, 東京化学同人 (1981), p. 373
- 38) M. Pastore, F. Morisi, A. Viglia, *J. Daily Sci.*, **57**, 269 (1974)
- 39) K. Nakanishi, R. Matsuno, K. Torii, K. Yamamoto, T. Kamikubo, *Enzyme Microb. Technol.*, **5**, 115 (1983)
- 40) M. Asada, K. Yamamoto, K. Nakanishi, R. Matsuno, A. Kimura, T. Kamikubo, *Eur. J. Appl. Microb. Biotechnol.*, **12**, 198 (1981)
- 41) 谷口正之, 中村弘子, 田中三男, 松野隆一, 上久保正, “日本醗酵工学大会要旨集” (1982) p. 250
- 42) 上久保正, 松野隆一, 化学工学, **47**, 291 (1983)
- 43) 松野隆一, 中西一弘, 上久保正, 浅田雅宣, “化学工学協会秋季大会講演要旨集”, (1982) p. 110
- 44) 中西一弘, 松野隆一, 上久保正, “日本農芸化学会大会講演要旨集”, (1983) p. 480
- 45) K. Hashimoto, S. Adachi, H. Noujima, Y. Ueda, *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 2371 (1983)