—総 合 論 文—

酵素法による DL-パントラクトンの工業的光学分割法

(2001 年 8 月 30 日受理)

清水 昌*・森川 忠則†・新田 一誠†・坂本 恵司†・和田 浩一†

D-パントラクトン(D-PL)は, B 群ビタミンの D-パントテン酸や D-パンテノール, D-パンテテイン, コエンザイム A の合成に重要なキラルビルディングブロックである. D-PL の製造は, これまで, 化学的合成法により得たラセミ体混合物をキラルアミンによるジアステレオマー塩生成を含む複雑な光学分割法により行われてきた. D-パントテン酸製造におけるこの光学分割プロセスを回避あるいは改良するため, 立体選択的な酵素反応の導入を検討した. すなわち, この目的に利用できる幾つかの反応を微生物に探索し, ラクトン環の 2 位 OH 基の立体を認識して分子内エステル結合を不斉加水分解し, DL-PL を D-パント酸と L-PL に分割できる反応が *Fusarium* 属および類縁糸状菌に広く分布することを発見した. 本反応に関与する新規酵素“ラクトナーゼ”の諸性質を解明するとともに, 本酵素を高活性で含む *Fusarium oxysporum* の菌体をアルギン酸カルシウムで包括固定化することによって酵素の安定化と再利用を図り, 180 回以上の繰り返し使用を可能にした. これにより, 常温, 中性付近の温和な条件下に, 副生物をほとんど伴わず, 30–35% の DL-PL をほぼ定量的に分割できる実用的方法が確立された. 本酵素的光学分割法は, 1999 年より 3000 t/y 規模(D-パントテン酸カルシウム換算)で工業化され, 従来法に比し, 経済性のみならず環境調和型の点でも優れた生産法であることが明らかとなっている.

1 はじめに

酵素は, 高い選択性と触媒能を有し, 微生物を供給源として容易に得られることから, 近年, 医薬品, その中間体, 化成品などの有用物質生産において, コスト面で化学合成法を凌駕し, 実生産に利用される例が急速に増えつつある¹⁾²⁾. また, 一般的に温和でクリーンな反応が可能であり, 生産プロセスを環境調和型にできることから, ますます広くその意義と重要性が認識されるようになってきている^{3)–5)}. 本稿では, 酵素法による有用物質生産に関する研究の一環として, 京都大学大学院農学研究科と富士薬品工業㈱の共同研究のもとに展開してきた D-パントテン酸の新しい製造法の開発について紹介する.

2 従来のパントテン酸製造法とその問題点^{6)–8)}

D-パントテン酸およびその誘導体(Fig. 1)は, 医薬品, 食品および飼料添加物, 化粧品などとして広い用途がある. 特に, D-

本総合論文は日本化学会平成 12 年度(第 49 回)化学技術賞受賞業績内容に対し, まとめたものである.

業 績: 新規な酵素法による D-パントラクトンの工業生産

受賞者: 清水 昌・森川忠則・新田一誠・坂本恵司・和田浩一

京都大学農学研究科応用生命科学専攻, 606-8502 京都市左京区北白川追分町

† 富士薬品工業株式会社, 933-8511 高岡市長慶寺 530

Fig. 1 Chemical structures of D-pantolactone, D-pantothenic acid and related compounds.

パントテン酸カルシウムについては, 富士薬品工業㈱, F. Hoffmann-La Roche(スイス), BASF(ドイツ)などにより年間約 6000 t 規模の生産が行われている. いずれの化合物も D-パント酸(D-PA)に由来する不斉中心を有し, 工業的な合成は, イソブチルアルデヒド, ホルマリン, 青酸塩からの DL-パントラクトン(DL-PL)の合成とその光学分割および D-PL と β -アラニン(あるいはその誘導体)のアミド縮合の 3 段階よりなる方法によって行われている(Fig. 2). 合成経路の key 化合物である D-PL の製造は, これまで古典的なジアステレオマー塩形成による光学分割法

Fig. 2 Chemical synthesis process for D-pantothenic acid.

Fig. 3 Possible microbial transformation routes to D-pantolactone or related compounds.

Reaction ⑨ is a base-catalyzed spontaneous hydrolysis. Reaction ⑪ is a chemical reaction.

Abbreviations used: PL; pantolactone, PA; pantoic acid, KPL; ketopantolactone, KPA; ketopantoic acid, KPAA; ketopantothenic acid, PaA; pantothenic acid, CN; pantonitorile, AD; pantoamide.

により行われてきた。この方法は、分割剤であるキラルアミンの合成も含め、かなりは複雑で、抜本的な改良が期待されていた。

3 パントラクトンの光学分割プロセスへの微生物反応の導入

3.1 プロセスデザイン²⁾⁻⁹⁾

著者らは、この光学分割工程を回避あるいは改良するため、立体選択的な酵素反応を導入した合成経路について検討を行った。合成経路の設計に当たって留意したことは、利用しうる安価な出発基質の選定とそれぞれの基質に対応する不斉の導入反応の想定

であり、問題を解決できそうな幾つかの酵素反応が考えられた (Fig. 3)。これらは、大別すると、以下の5種類に分類できる。

- 1) DL-PL の合成経路の中間体からの不斉変換
- 2) プロキラルなカルボニル体の不斉還元
- 3) L-PL の立体反転
- 4) PL の不斉加水分解
- 5) 2 位の OH 基を修飾した PL 誘導体の不斉加水分解

1)では Fig. 2 のアルドール体からシアノヒドリン体への変換を不斉シアノヒドリン化反応(オキシニトリラーゼ反応)で置き換える、あるいは、Fig. 3 に示したように、シアノヒドリン体の 2

Table 1 Properties of carbonyl reductases purified from various microorganisms obtained through the screening

	Polyketone reductase (<i>C. parapsilosis</i>)	Polyketone reductase (<i>M. ambigua</i>)	KPA reductase (<i>P. maltophilia</i>)	K-PaOEt ^{a)} reductase (<i>C. macedoniensis</i>)	L-PL dehydrogenase (<i>N. asteroides</i>)
Native M_r	37000	56000	116000	45000	600000
Subunit M_r	41600	27000	30500	42000	42000
$s_{20, w}$ (S)	4.8	—	7.75	—	—
pI	6.3	6.4	3.5	5.5	4.3
Absorption maximum/nm	278	276	276	278	276, 370, 456
E (1%)	8.3	—	20.0	—	—
COOH amino acid	—	—	Phe	Thr	—
K_m /mM	0.33 (KPL)	0.71 (KPL)	0.40 (KPA)	2.50 (K-PaOEt)	26.8 (L-PL)
V_{max} (μ mol/min/mg)	481 (KPL)	541 (KPL)	1310 (KPA)	120 (K-PaOEt)	—
Cofactor	NADPH	NADPH	NADPH	NADPH	FMN
Optimum pH	7.0	6.0	6.0	6.5	9.0–9.5
Optimum temperature/°C	40	40	37	40	40
pH stability	6.0–7.5	5.5–7.0	6.0–10	4.5–10.5	9.0–10
Thermal stability	42% (40 °C, 10 min)	75% (45 °C, 10 min)	90% (60 °C, 10 min)	100% (55 °C, 10 min)	60% (45 °C, 10 min)
Inhibitor	Quercetin	Quercetin	—	—	—
Reaction mechanism	—	—	Ordered Bi-Bi	—	—
Enzyme formation	Constitutive	Constitutive	Constitutive	Constitutive	Inducible
Reaction in Fig. 3	⑧	Reverse of ⑦	⑩	⑫	⑦
Reference	12	13	14	15	16

a) K-PaOEt: ethyl *N*-(4-hydroxy-3,3-dimethyl-2-oxobutyl)- β -alaninate.

位 OH 基の立体を認識した不斉加水分解反応(ニトリラーゼ反応, 反応①, ②), 同様な不斉水和反応(ニトリルヒドラーゼ反応, 反応③, ④), アミド体の不斉加水分解(アミダーゼ反応, 反応⑤, ⑥)などが考えられる。

2)では, プロキラルなケトパントラクトン(KPL)あるいはその誘導体を合成し, これを酵素的な還元によってD-PL あるいはその誘導体へ選択的に変換する(反応⑧, ⑩, ⑫)。

3)は, みかけ上の立体反転でL-PL を酸化して KPL とし, これを不斉還元によってD-PL にする方法である(反応⑦→⑧または⑦→⑨→⑩)。

4)は, ラクトン環自体のエステル結合を不斉加水分解し, ラセミ体ラクトンを酸とラクトンとして分割するものである(反応⑬, ⑭)。

5)では, リパーゼなどによる不斉加水分解で, DL-PL の 2 位 OH 基をエステル化し, これを立体選択的に加水分解する。

理論的には用いた基質のすべてが目的のD体生成物となる不斉シアノヒドリン化, 不斉還元, 立体反転が有利な反応である。しかし, いずれの場合も問題解決のためには, 幾つかの解決すべき点がある。1)ではシアノヒドリン体が不安定で2位 OH 基の保護が必要となる。2)および5)では基質の合成が問題になる。すなわち, 不斉還元では, ケトン体基質の新しい合成法の開発や還元反応へのエネルギー供給系の構築が必要となり, リパーゼによる不斉加水分解では通常の化学的分割法(ジアステレオマー法)で用いるDL-PL をさらに修飾する必要がある。また, 3)および4)ではDL-PL をそのまま反応の基質として使用できる利点はあるが, 前者では反応は二段階になる。一方, 反応自体について考えると, リパーゼによる反応以外は十分な情報がないか, あるいは全く知られておらず, 想定した反応が起こるか否かが不明である。また, 3)や5)などでは不斉加水分解がD体に特異的でないと必要とするD体の光学純度を高く保つことは困難である。

3.2 有用反応の探索と評価

上記の考察を基に, 理論収率と基質調製の容易さを考慮して, 著者らは2), 3), 4)の反応について広く微生物界に探索することにした。結果的には, 想定したすべての反応が実際に起こることが確認でき, 例えば, KPL やケトパント酸(KPA)の不斉還元(反応⑧および⑩)では, それぞれ *Candida parapsilosis*, *Agrobacterium* sp. の菌体をそのまま触媒的に用いると約100–120 g/Lの基質がほぼ定量的にD-PL またはD-パント酸(D-PA)へ変換できること, 立体反転では, *Nocardia asteroides* の菌体を触媒的に用いると反応⑦の立体選択的酸化反応が可能なこと, この酸化反応は反応⑧あるいは反応⑩の不斉還元反応と連結できることが示された(詳細は文献9)に述べた。同文献中の引用文献とともに参照のこと)。また, ラクトン環の加水分解反応もD-PL に特異的なもの(反応⑬)¹⁰⁾, L-PL に特異的なもの(反応⑭)¹¹⁾, いずれも存在することが明らかとなった。Table 1 および Table 2 にスクリーニングで得たそれぞれの反応に関する高活性菌から精製・単離した酵素の諸性質, Table 3 に実験室レベルで最適化した反応条件下での生産量などを示した。

反応が単純で効率よく進行すること, 従来のジアステレオマー法の基質がそのまま利用でき, プロセス的にも光学分割段階のみを酵素法で置換するものであり, 従来法からの転換が容易なことなどを考慮し, 著者らは最終的に PL の不斉加水分解, すなわち, ラクトナーゼ反応を選択し, さらに検討を進めた。以下に, その概略を述べる。

3.4 ラクトナーゼ活性菌のスクリーニング

スクリーニングは, 研究室保存菌の洗浄菌体とDL-PL(または, D-PL, L-PL)をトリス緩衝液(pH 7.4)中で反応させ, pH の低下をみる方法を試みた。加水分解が起こると分子内エステル結合が切れるので酸が生じ, したがって, pH が低下するという原理に基づく極めて単純なスクリーニングである。pH 低下が観察され

Table 2 Properties of microbial lactonases obtained through screening

	<i>F. oxysporum</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>A. calcoaceticus</i> F46	<i>S. commune</i>
Native M_r	125000	62000	55000	158000
Subunit M_r (SDS-PAGE)	63000	26500	30000	74500
Number of subunits	2	2	2	2
Substrate specificity [K_m (mM) / V_{max} (μ mol/min/mg)]				
Hydrolysis				
D-Pantolactone	123/653	no activity	no activity	157/23.6
L-Pantolactone	no activity	3.59/13.7	no activity	no activity
D-Galactono- γ -lactone	23/1300	no activity	no activity	15/73.4
L-Mannono- γ -lactone	3.6/1440	no activity	no activity	76/28.7
Dihydrocoumarin	6.3/2800	2560/7.74 $\times 10^4$	0.801/4760	9.0/1.1
Homogentisic-acid lactone	2.5/257	4.35/1.83 $\times 10^4$	0.560/0.963	no activity
2-Coumaranone	8.7/701	455/1.52 $\times 10^4$	0.761/8.04	10/0.72
3-Isochromanone	4.4/6.88	1.43/2.37	no activity	4.6/0.11
Lactonization				
D-Pantoic acid	9.1/103	no activity	no activity	nd
D-Galactonic acid	52.6/216	no activity	no activity	nd
Optimum pH (hydrolysis)	7–7.5	8.5	7.0	7.0
Optimum temperature (hydrolysis)	50 $^{\circ}$ C	45 $^{\circ}$ C	30 $^{\circ}$ C	30 $^{\circ}$ C
pH stability (30 $^{\circ}$ C, 30 min)	5.0–10	> 5.0	> 5.0	> 5.0
Thermal stability ^{a)}	< 50 $^{\circ}$ C (pH 7.4, 20 min)	< 50 $^{\circ}$ C (pH 7.4, 20 min)	< 75 $^{\circ}$ C (pH 7.0, 30 min)	< 50 $^{\circ}$ C (pH 7.4, 30 min)
Inhibitors	chelating reagents, L-pantolactone, Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+}	chelating reagents, Fe^{2+} , Pb^{2+} , Sn^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+}	diisopropyl phosphofluoridate, phenylmethanesulfonyl fluoride, Hg^{2+} , Fe^{3+}	chelating reagents, Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{3+}
Responsible reaction in Fig. 3	⑬	⑭	—	⑬
Reference	10	11	17	18

a) Enzymes retained 100% activity under the conditions with the indicated pHs or temperatures.

Table 3 Several microbial reactions useful for D-pantolactone production^{a)}

Method	Substrate/Product	Reaction in Fig. 3	Microorganism	Yield /g L ⁻¹	Yield /mol %	Optical purity of product/% ee	Reference
Reduction	KPL/D-PL	⑧	<i>C. parapsilosis</i>	85	94	93	19
	KPA/D-PA	⑩	<i>Agrobacterium</i> sp.	119	90	> 98	20
	KPaAet/PaAet	—	<i>C. macedoniensis</i>	78	97	> 98	21
	KPaCN/PaCN	—	<i>S. salmonicolor</i>	48	96	94	22
Inversion	DL-PL/D-PL	⑦⑧	<i>N. asteroides</i> / <i>C. parapsilosis</i>	80	99	82	23
	DL-PL/D-PA + D-PL	⑦⑨⑩	<i>N. asteroides</i> / <i>Agrobacterium</i> sp.	79	98	83	24
	DL-PL/D-PA + D-PL	⑦⑨⑩	<i>R. erythropolis</i>	18	91	94	25
Hydrolysis	DL-PL/D-PA + L-PL	⑬	<i>F. oxysporum</i>	340	98	98	26

a) Value based on D-PL in a racemic mixture.

た反応液については、HPLC 法で生成 PA 量とその光学純度を測定した。市販のリパーゼやエステラーゼにはラクトン環の開裂活性は認められず、約 700 種の菌株をテストした結果、カビや細菌にこの種の開裂活性の存在が明らかとなった (Table 4)²⁷⁾。

D-PL に特異的な反応 (Fig. 3 反応⑬) を行う微生物は *Fusarium* 属および分類学的に近縁の糸状菌 (*Gibberella*, *Cylindrocarpum* など) に高頻度で見いだされた。一方、L-PL に選択的な加水分解反応 (Fig. 3 反応⑭) は酵母や細菌に比較的広く分布することも判明した。前述したように、実際に必要なものは光学純度の高い D 体なので、DL-PL 中の D-PL を開環する方が実用的に有利である。なぜなら、加水分解率 (理論値, 50%) と無関係に、開環した D-PL すなわち D-PA を回収すれば理論的には D-PA の光学純度を 100% に保つことができるからである (Fig. 4a)。一方、L-PL を開環すると残った L-PL を含む基質から D-PL を回収せねばならず、L-PL を完全に開環加水分解しない限り高い光学純度

の D-PL が得られない (Fig. 4b)。

最も高い加水分解活性を示し、かつ最も高い光学純度の D-PA を与えることのできる菌株として選定した *Fusarium oxysporum* AKU3702 を用いて反応条件の設定を行った。このラクトン環不斉加水分解反応は可逆的であり、反応液の pH が 6 以上の条件ではラクトン環の開環反応が主体であり、pH 6 以下では閉環反応が主体である。DL-PL の光学分割はこれらの正逆いずれの反応によっても効率よく行えるが、開環反応の方が反応速度が速く、より高い基質濃度にも対応できる^{26)–28)}。開環反応での問題点は、生成物である PA による反応液の pH 低下に起因する反応速度の低下、および、これを中和するためのアルカリによるラクトン環の非酵素的加水分解に基づく生成物の光学純度の低下である (Fig. 5)。したがって、反応液は厳密に pH 7 付近に保つ必要がある。中和剤として用いるアルカリはアンモニア水が最適で、DL-PL の非酵素的加水分解を最小限に抑制でき、生成物の光学

Table 4 Stereoselective hydrolysis of DL-pantolactone by microorganisms^{a)}

Strain	Degree of hydrolysis /%	Optical purity of PA formed /% ee
D-PL-specific		
<i>Fusarium oxysporum</i> AKU3702	20.0	91.7
<i>Fusarium anguoides</i> AKU3703	19.5	85.0
<i>Fusarium solani</i> AKU3710	14.9	81.1
<i>Gibberella fujikuroi</i> AKU3802	10.0	68.0
<i>Gibberella fujikuroi</i> AKU3805	11.9	72.0
<i>Serratia plymuthicum</i> AKU62	9.85	13.8
<i>Penicillium notatum</i> AKU3406	7.22	58.3
<i>Penicillium chrysogenum</i> AKU3407	6.89	51.4
<i>Penicillium lilacinum</i> AKU3414	8.98	67.0
<i>Caldariomyces fumago</i> AKU3910	8.08	51.6
<i>Schizophyllum commune</i> AKU5035	8.26	63.8
<i>Schizophyllum</i> sp. AKU5041	6.80	56.8
<i>Schizophyllum commune</i> AKU5044	13.3	85.8
L-PL-specific		
<i>Achromobacter polymorph</i> AKU122	2.57	16.4
<i>Bacillus thuringiensis</i> AKU238	2.96	14.3
<i>Bacillus brevis</i> AKU248	2.77	13.8
<i>Agrobacterium radiobacter</i> AKU302	6.12	39.9
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> AKU305	9.72	56.2
<i>Agrobacterium radiobacter</i> AKU306	9.23	57.0
<i>Agrobacterium radiobacter</i> AKU308	14.4	77.6
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> AKU314	7.32	20.1
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> AKU315	4.68	48.3
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> AKU316	14.6	75.8

a) See refs. 10, 11, 25 for details.

Fig. 4 Stereoselective hydrolysis of pantolactone by microbial lactonases.

純度を高く保って, 反応を効率よく進行させることができる. 例えば, 400–700 g/L の DL-PL 水溶液中に直接 *F. oxysporum* の菌体を加えて 30 °C で反応を行うと, 反応はほぼ定量的に進行し,

Fig. 5 Effect of pH on the stereoselective hydrolysis of pantolactone by *F. oxysporum* mycelia.

D- or L-PL (20 mg) was incubated with washed mycelia of *F. oxysporum* (20 mg) and the buffer (0.9 mmol) indicated in a total volume in 2.0 mL for 1 h at 30 °C. The buffers used were, Δ : MES/NaOH, $\square$: PIPES/NaOH, and $\circ$: Tris-HCl. See ref. 27 for details.

Fig. 6 Time course of DL-pantolactone hydrolysis by *F. oxysporum* mycelia.

Insert shows reaction conditions. DL-PL conc. $\circ$: 400 mg/mL, $\bullet$: 700 mg/mL. See ref. 26 for details.

24 時間後には, 光学純度 96–98% ee の D-PA が得られる. 未反応の L-PL は何ら変化を受けずそのまま反応液中に残存する (Fig. 6). このように高濃度の DL-PL を短時間で効率よく分割できることが示され, 本ラクトナーゼ反応の高い実用性が明らかとなった^{3)5)26)29)–31)}.

4 *Fusarium oxysporum* のラクトナーゼの諸性質¹⁰⁾³⁰⁾³²⁾³³⁾

上記の不斉加水分解反応を触媒する酵素は, *F. oxysporum* の菌体から結晶状に単離された. 酵素の諸性質は Table 2 に要約した. 本酵素は, 分子量 125000 の二量体であり, サブユニット当

たり約 1 mol の Ca を含み, 3 種の分子量約 2000 のマンノースを主体とする糖鎖がサブユニットの 4 か所のアスパラギン残基に結合している. 酵素分子中に占める糖の割合は約 15% である. Ca は酵素活性の発現と酵素の安定化に関与している (Table 5). エンド- β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ H によってすべての糖鎖を除去した酵素 (分子量 52000 $\times$ 2) は, 未処理の酵素と比較して, 比活性, 基質特異性, 反応の至適 pH には著しい変化は認められなかったが, 酸性域 (pH 2–5) および高温 (50–60 °C) に

おける安定性や有機溶媒に対する安定性が低下した. したがって, これらの糖鎖も Ca 同様酵素の安定化に寄与しているものと思われる. また, 脱糖鎖された酵素では, 各基質に対する K_m 値が上昇することも認められた.

本酵素は, D-PL 以外に種々のアルド酸ラク톤を可逆的に加水分解する. D-ガラクトノラクトン, L-マンノノラクトン, D-グルノラクトンなどは, 本酵素のよい基質である. 一方, これら基質の対掌体である L-PL, L-ガラクトノラクトン, D-マンノノラクトン, L-グルノラクトンは加水分解を受けず, 加水分解を拮抗的に阻害する. 基質となったラクトンの構造上の共通点としては, Haworth の投影式で表した場合, 2 位の OH 基が下向きになっていることである (Table 6). この 2 位の OH 基を立体選択的に認識できるという性質が, 本酵素の DL-PL の光学分割への利用を可能にしているといえる. また, ジヒドロクマリンなどの芳香族ラクトンも本酵素のよい基質となる. この場合, 反応は非可逆的に進行する. 以上の結果は, 本酵素が新規なラクトノヒドrolラーゼであることを示唆している.

著者らは, 上記の *F. oxysporum* 由来の酵素以外に D-PL に特異的な酵素および L-PL に特異的な酵素を *Shizophilum commune*¹⁸⁾ および *Agrobacterium tumefaciens*¹¹⁾ からそれぞれ精製・単離し, これらについても諸性質を明らかにしている (Ta-

Table 5 Effects of Ca^{2+} , D-pantoic acid and D-pantolactone on the stability of the enzyme^{a)}

Addition	Relative residual activity / %		
	50 °C	55 °C	60 °C
None	100	75	6
D-PA (10 mM) + D-PL (10 mM)	87	5	0
Ca^{2+} (1 mM)	100	76	10
D-PA (10 mM) + D-PL (10 mM) + Ca^{2+} (1 mM)	100	100	75

a) Enzyme was treated for 30 min at pH 7.4 with the additions indicated.

See ref. 10 for details.

Table 6 Substrate specificity of the enzyme^{a)}

Substrate (150 mM)	Relative hydrolyzing activity / %	K_m / mM	Substrate (150 mM)	Relative hydrolyzing activity / %	K_m / mM
100	3.6		16.4	—
D-Galactono- γ -lactone			α, β -Glucooctanoic- γ -lactone
128	23		39.0	2.5
L-Mannono- γ -lactone			D-Ribono- γ -lactone
167	29		117	377
D-Gulono- γ -lactone			D-Erythrono- γ -lactone
59.4	118		107	—
D-glycero-D-gulo-Heptono- γ -lactone			D-Glucono- δ -lactone
132	167		48.3	120
D-glycero-L-manno-Heptono- γ -lactone			D-Pantolactone		

a) See ref. 10 for details.

ble 2 参照).

5 実生産への適用⁷⁾²⁹⁻³¹⁾³⁴⁾

上記の反応条件の検討および酵素の基本的な性質の解明で得られた結果に基づいて、実用レベルでの光学分割法の開発に取り組んだ。

F. oxysporum の菌体による分割反応の主たる問題点は、反応終了後の回収菌体を再度反応に供した場合、活性の劣化が著しく 10 回程度の繰り返し使用しかできないこと、反応液の攪拌によりせん断された菌糸の混入による反応液の混濁などであった。これらの問題点を改善するため、菌体の固定化を試みた。種々の固定化法をテストし、最終的にアルギン酸カルシウム包括固定化法を採用した。本固定化法は、固定化による酵素活性の歩留まりがよく、繰り返し使用後の活性の劣化が極めて少ないことなど目的にかなったものであった。

実際の光学分割は、固定化菌体を触媒とし、30–35% DL-PL 水溶液を基質として行う。反応は回分式で、1 バッチ当たり 21 時間の反応後、反応液の汜過および再度新しい基質溶液の注入を

行い、同様の反応を繰り返す。結果は Fig. 7 のように、180 回 (180 日) 以上にわたって高い加水分解率 (40–50%) と高い光学純度 (93–98% ee) を保って反応が行える。アルギン酸カルシウムで固定化した菌体が長期間安定に使用できるのは、先述のように Ca および基質 (D-PL) と生成物 (D-PA) により酵素が安定化されることが主因と考えられる (Table 5 参照)。180 回繰り返し使用後の固定化菌体は反応初回時の約 60% の活性を有していた。この残存活性の低下は、反応速度の低下、すなわち、目標の加水分解率を得るための反応時間の増大と相関していた。また、長期の繰り返し使用後もゲルの物理的変化や崩壊は認められなかった。したがって、本酵素的分割法は、高価な分割剤の使用や工程の複雑さで問題の多い従来法に比して単純であり、実用性が極めて高いといえる。

Fig. 8 に、従来の分割剤を用いる分割法とラクトナーゼによる酵素的分割法のプロセスフローを比較した。従来法における分割剤による DL-PL のジアステレオマー塩生成、それに続くはん雑な結晶化および固液分離、分割剤の回収などの段階は酵素法ではすべて省略されており、きわめて単純なものとなっている。また、

Fig. 7 Repeated batch hydrolysis of DL-pantolactone by *F. oxysporum* mycelia entrapped with calcium alginate gels. Insert shows reaction conditions.

Chemical resolution

Enzymatic resolution

Fig. 8 Comparison of chemical and enzymatic methods for the optical resolution of pantolactone.

Fig. 9 Comparison of environmental items in the chemical and enzymatic resolutions of pantolactone.

Fig. 9 に示すように、実生産において従来法と比較すると、排水量、BOD、無機塩副生、有機溶剤の使用量、エネルギー使用量において大幅な低減が可能になっている。

6 おわりに

本稿では、分子内エステル結合に特異的に作用し、これを立体選択的に加水分解する新規な微生物酵素“ラクトナーゼ”の発見と本酵素反応を利用した DL-PL の工業的光学分割法の開発に至る経緯を述べた。富士薬品工業㈱では、1999 年より本酵素の光学分割法により約 3000 t/y 規模(D-パントテン酸カルシウム換算)の生産が行われている。

これまで、ラクトナーゼについてはほとんど報告がなく、合成や分割に使う場合にもリパーゼが対象となっていた。このような観点からも、今後、ラクトナーゼがキラルテクノロジーのための新しい酵素として利用の場を広げることが期待される。例えば、本稿で述べた *Fusarium* のラクトナーゼはさまざまなブチロラクトン類の光学分割にも利用できることがすでに示されており、また、著者らが新たに細菌に見いだしたラクトナーゼ(ジヒドロクマリンヒドロラーゼ)は、2 位の立体を認識しかつメチルエステル特異的な加水分解反応を触媒することから、不斉加水分解や位置特異的な加水分解に利用できることが示されている¹⁷⁾³⁴⁾。このように、有用物質生産への応用を視野に入れた“ラクトナーゼ”のライブラリーの構築とその利用が進みつつあり、今後の展開が期待される。

最後に、本研究開発を遂行するにあたり、終始多大のご指導、ごべんたつをいただきました京都大学名誉教授、山田秀明先生に心から感謝いたします。また、本成果は、京都大学大学院農学研究科発酵生理及び醸造学研究室および富士薬品工業㈱の多くの方々の協力により達成されたものであり、ご協力いただいた共同研究者、関連部門の皆様にも深く感謝いたします。

- 1) H. Yamada, S. Shimizu, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **27**, 622(1988).
- 2) S. Shimizu, J. Ogawa, M. Kataoka, M. Kobayashi, *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, **58**, 46(1997).
- 3) 清水 昌, 化学と生物, **35**, 211(1997).

- 4) J. Ogawa, S. Shimizu, *Trends Biotechnol.*, **17**, 13(1999).
- 5) 清水 昌, 触媒, **43**, 190(2001).
- 6) S. Shimizu, H. Yamada, “Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors”, ed by E. J. Vandamme, Elsevier, London(1989), p. 199.
- 7) S. Shimizu, M. Kataoka, “Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation”, ed by M. C. Flickinger, S. W. Drew, John Wiley & Sons, New York(1999), p. 1923.
- 8) S. Shimizu, “Biotechnology”, ed by G. Reed, H.-J. Rehm, Wiley-VCH, Weinheim(2001), Vol. 10, p. 319.
- 9) H. Yamada, S. Shimizu, *Bioproducts Bioprocesses*, **2**, 123, (1993).
- 10) S. Shimizu, M. Kataoka, K. Shimizu, M. Hirakata, K. Sakamoto, H. Yamada, *Eur. J. Biochem.*, **209**, 383(1992).
- 11) M. Kataoka, J. Nomura, M. Shinohara, K. Nose, K. Sakamoto, S. Shimizu, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 1255(2000).
- 12) H. Hata, S. Shimizu, S. Hattori, H. Yamada, *Biochim. Biophys. Acta*, **990**, 175(1989).
- 13) S. Shimizu, S. Hattori, H. Hata, H. Yamada, *Eur. J. Biochem.*, **174**, 37(1988).
- 14) S. Shimizu, M. Kataoka, M. C. M. Chung, H. Yamada, *J. Biol. Chem.*, **263**, 12077(1988).
- 15) M. Kataoka, Y. Doi, T.-S. Sim, S. Shimizu, H. Yamada, *Arch. Biochem. Biophys.*, **294**, 469(1992).
- 16) M. Kataoka, S. Shimizu, H. Yamada, *Eur. J. Biochem.*, **204**, 799(1992).
- 17) M. Kataoka, K. Honda, S. Shimizu, *Eur. J. Biochem.*, **267**, 3(2000).
- 18) 片岡道彦, 野村淳一, 能勢 陽, 清水 昌, 日本生物工学会大会講演要旨集, **1997**, 160.
- 19) H. Hata, S. Shimizu, H. Yamada, *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 3011(1987).
- 20) M. Kataoka, S. Shimizu, H. Yamada, *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 177(1990).
- 21) M. Kataoka, S. Shimizu, Y. Doi, H. Yamada, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 3595(1990).
- 22) M. Kataoka, S. Shimizu, Y. Doi, H. Yamada, *Biotechnol. Lett.*, **12**, 357(1990).
- 23) S. Shimizu, S. Hattori, H. Hata, H. Yamada, *Enzyme Microb. Technol.*, **9**, 411(1987).
- 24) M. Kataoka, S. Shimizu, H. Yamada, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **110**, 155(1991).
- 25) S. Shimizu, S. Hattori, H. Hata, H. Yamada, *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 519(1987).
- 26) M. Kataoka, K. Shimizu, K. Sakamoto, H. Yamada, S. Shimizu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **44**, 333(1995).
- 27) M. Kataoka, K. Shimizu, K. Sakamoto, H. Yamada, S. Shimizu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **43**, 974(1995).
- 28) M. Kataoka, K. Shimizu, K. Sakamoto, H. Yamada, S. Shimizu, *Enzyme Microb. Technol.*, **19**, 307(1996).
- 29) S. Shimizu, M. Kataoka, *Enzyme Engineering*, **13**, 650(1996).
- 30) S. Shimizu, M. Kataoka, “Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation”, ed by M. C. Flickinger, S. W. Drew, John Wiley & Sons, New York(1999), p. 1571.
- 31) 坂本恵司, 森川忠則, ファインケミカル, **29**, 49(2000).
- 32) M. Kobayashi, M. Shinohara, C. Sakoh, M. Kataoka, S. Shimizu, *Proc. Natl. Acad. U. S. A.*, **95**, 12787(1998).
- 33) M. Kataoka, K. Yamamoto, S. Shimizu, M. Ohta, A. Kita, Y. Higuchi, K. Miki, *Acta Crystallogr.*, **D54**, 1432(1998).
- 34) S. Shimizu, M. Kataoka, *J. Biotechnol.*, (2001) in press.

Biocatalytic Optical Resolution of DL-Pantolactone on an Industrial Scale

Sakayu SHIMIZU*, Tadanori MORIKAWA†, Kazumasa NITTA†,
Keiji SAKAMOTO† and Koich WADA†

*Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University;
Kyoto-shi 606-8502 Japan*

†Fuji Chemical Industries; Takaoka-shi 933-8511 Japan

We succeeded in introducing an enzymatic step for the production of D-pantolactone (D-PL), a chiral building block for the commercial production of a vitamin, D-pantothenic acid. The process involves stereoselective hydrolysis step with a novel fungal enzyme "lactonohydolase" as the catalyst for the resolution of DL-PL. The enzyme isolated from *Fusarium oxysporum* specifically hydrolyzes D-PL to D-pantoic acid (D-PA); thus DL-PL is easily separated into D-PA and L-PL.

When 700 g/L aqueous solution of DL-PL was incubated with the fungal mycelia as the catalyst, D-PL in the racemic mixture was almost completely hydrolyzed to D-PA (96%ee). The mycelia were immobilized into calcium alginate gels for the practical purpose. When the gels were incubated in 350 g/L aqueous solution of DL-PL for 21 h at 30 °C with automatic pH control (pH 7.3), 80–100% of the D-PL was hydrolyzed. The resultant D-PA in the reaction mixture had a high optical purity (93–98%ee) and the L-PL remaining was unmodified. After 180 reaction cycles (i. e., 180 days), the gels retained about 60% of their initial activity.

Based on these results, we started the commercial production of D-PL since 1999, through which it has been shown that the present process is highly satisfactory not only in economic aspect but also in environmental one (water, –49%; CO₂, –30%; BOD, –62%; compared with the former chemical resolution method).

~~~~~