=シリーズテーマ=

有機溶媒系における酵素反応

有機溶媒中の酵素の活性に影響する諸因子	山根 恒夫	1103
酵素による有機溶媒系での糖転移反応・縮合反応	安井 恒男, 飯塚 佳恵	1107
プロテアーゼを用いる有機溶媒中でのペプチド合成	木村 幸敬, 松野 隆一	1111
酵素による有機溶媒中での光学分割	田中 渥夫, 川本 卓男	1115
酵素による有機溶媒系での有機合成	山田 靖宙, 仁平 卓也	1119

有機溶媒中の酵素の活性に影響する諸因子†

山 根 恒 夫

(名古屋大学農学部)

酵素反応や微生物反応を、有機溶媒中で実施すると、次のような利点がある⁽¹⁾。

- 1) 脂溶性基質の溶解度を高めることができる。
- 2) 熱力学的平衡を加水分解から合成へとシフトさせられる。
- 3) 水に依存する副反応を抑制できる。
- 4) 固定化はしばしば不要である(酵素は有機溶媒中では不溶である。したがって、単純な濾過によって回収できる)。
- 5) 固定化が望ましいときでも、担体表面上への単なる沈着で十分である。
- 6) 低沸点溶媒からの生成物の回収は容易である。
- 7) 酵素の熱安定性が向上する(高温での熱失活は水が関与している)。
- 8) 微生物汚染がない。

このように、有機溶媒中での生体触媒反応は、生体触

媒の利用の1つの拡大として、その利用価値を飛躍的に増大することになる。それゆえ、1980年代になって、多くの研究者が、有機溶媒中で活性を示す生体触媒の使用形態を開発してきた。これらをまとめると⁽²⁾、

- 1) 遊離状態で分子的に溶解させる(溶媒がグリセリンなどの場合)。
- 2) ポリエチレングリコールと共有結合させた誘導体として、あるいは適当な界面活性剤との複合体として、溶媒中に可溶化した状態。
- 3) 微粉末状に分散懸濁させた状態、あるいは分散が十分でない場合は適当な担体表面上に物理的に沈着させた状態。
- 4) 逆ミセルに閉じ込めた状態。
- 5) 多孔質担体の細孔内の水相中に酵素を存在させる。
- 6) 疎水性ゲルに包括固定化させる。
- 7) 酵素を含む微生物(湿潤あるいは乾燥)を分散懸濁させるか、適当な担体に保持して懸濁もしくは充填する。

以上のように多数の技術が知られているので、今日では、どのような酵素でも有機溶媒中で活性を発現させること

† Factors Affecting Activity of Enzyme in Organic Solvent.

Tsuneo YAMANE (Laboratory of Bioreaction Engineering, Department of Food Science and Technology, School of Agriculture, Nagoya University, Nagoya 464-01)

は可能であるといえよう。しかしながら、このような反応系を工業的に可能ならしめるためには経済性が重要であり、単に触媒活性があるというだけでなく、酵素は水溶液中におけると同程度か、望ましくはそれ以上に高活性を示すこと、および、十分長時間安定であること、の2点が強く望まれる。そのためには、有機溶媒中の酵素の活性や安定性に影響する諸因子を定量的に把握し、一般化しておくことが必要である。ここでは、先に述べた使用形態のうち最も簡単で、それゆえ工業の利用可能性が高い3)の使用形態について、著者らの研究を中心に、これら諸因子について述べることにする。

1. 有機溶媒の種類

今までにこの分野の研究に用いられた有機溶媒は、水との相互溶解性という観点から、表1のように分類されよう。1)の有機溶媒は脱水力が強いので、酵素に十分の結合水を保持させておくためには、有機溶媒の含有率を高くはできない。したがって、真の有機溶媒中の酵素反応とは程遠くなる。2)と3)とでは有機溶媒中の水の溶解度に大きな違いがあり、前者では10%以上となるものもある。生体触媒反応に対して、どのような有機溶媒を用いるのが良いかという問に対しては、一般化した法則はないのではないかと。Lillyによれば、適当な有機溶媒選択のための考慮すべき因子は、1)基質や生成物に対する溶媒としての能力、2)基質や生成物の分配係数、3)酵素に対する変性あるいは阻害性、4)人体に対する毒性、などである⁽³⁾。2)と関連して、Laaneらは、基質

の octanol-water 系の分配係数 P の対数、 $\log P$ を用いると、炭化水素のエポキシ化反応のデータがよく整理できると述べている⁽⁴⁾。このパラメータがどの程度一般性があるか不明である。また、高橋らは有機溶媒-水2相系におけるリパーゼによる油脂の加水分解率を研究し、溶媒の溶解度パラメーターと比較的良好な相関を認めている⁽⁵⁾。

2. 水分

有機溶媒中の酵素の反応特性は、反応系に含まれる微水分によって強く影響される。それゆえに、あえて微水有機溶媒という用語を提唱している次第である⁽⁶⁾。この点に関して多くの研究者は、単に反応系に加えた水分を変数としているが、より厳密には反応系における水の存在様式を考慮する必要がある。すなわち、酵素を含む微水溶媒中では次のように3つの異なる存在様式がある⁽⁷⁾。

(全水分) = (当該酵素分子に結合した水) + (不純物や担体に結合した水) + (溶媒中に遊離状態で溶解している水)

数式で表わすと、

$$C_{\text{water}}^{\text{total}} = y_{\text{ap}} C_{\text{ap}} + y_{\text{im}} C_{\text{im}} + C_{\text{water}}^{\text{free}}$$

ただし、 C_{ap} および C_{im} は当該酵素の濃度および不純物や担体の濃度であり、 y_{ap} および y_{im} は酵素(無水物) 1g 当りに結合している水のg数および不純物や担体(無水物) 1g 当りに結合している水のg数である。もちろん、酵素標品が高純度でかつ担体などを用いなく

表1 生体触媒反応に使用される主な有機溶媒

1) 水と混和する有機溶媒 methanol, ethanol, ethylene glycol, glycerol, <i>N,N</i> -dimethylformamide, dimethylsulfoxide, acetone, formaldehyde, dioxane, etc.
2) 水と混和しない有機溶媒 (括弧内の数字は水の溶解度 [g・l ⁻¹] とその値を示す温度) * alcohols (<i>n</i> -, <i>iso</i> -)propyl alcohol, (<i>n</i> -, <i>s</i> -, <i>t</i> -)butyl alcohol, (<i>n</i> -, <i>s</i> -, <i>t</i> -)amyl alcohol, <i>n</i> -octanol, etc. * esters methyl acetate, ethyl acetate (37.8, 40°C), <i>n</i> -butyl acetate, hexyl acetate, etc. * alkyl halides methylene chloride (2, 30°C), chloroform, carbon tetrachloride, trichloroethane (0.4, 40°C), etc. * ethers diethyl ether (12, 20°C), dipropyl ether, diisopropyl ether, dibutyl ether, dipentyl ether, etc.
3) 水に不溶な有機溶媒 (括弧内の数字は水の溶解度 [ppm] とその値を示す温度) * aliphatic hydrocarbons <i>n</i> -hexane (320, 40°C), <i>n</i> -heptane (310, 30°C), isooctane (180, 30°C), etc. * aromatic hydrocarbons benzene (1200, 40°C), toluene (880, 30°C), etc. * allycyclic hydrocarbons cyclohexane (160, 30°C), etc.

れば, $C_{im}=0$ である. 上式より, 水分(全水分)の影響は, 使用する酵素量や酵素標品の純度によって異なることが理解される. 自由水分と蛋白質結合水分の間には, ある種の吸着平衡関係が存在している. すなわち,

$$y_{ap} = a \text{ function of } (C_{\text{water}}^{\text{free}})$$

図1に, 著者らが調べた結果を概念的に示す. 水と混和する有機溶媒と, 水不溶性有機溶媒とでは, 上式の関数関係は大きく異なることがわかった⁽⁷⁾. 十分な活性を得るに必要最小限の結合水はいくらかという質問がよく寄せられるが, 酵素活性と水和量との関係は連続的に変化することを認識しておく必要がある.

3. 担体

高純度の酵素標品は有機溶媒中に均一には分散しにくい. たとえ巨視的に微粒子として分散しても, 粒内拡散が影響してすべての酵素が十分な活性を示さない. このような場合, 適当な多孔性担体の表面に物理的に吸着あるいは沈着させることが有効である. このとき, どのような担体を選ぶべきかが問題となる. Mattiasson らは, Chymotrypsin による *N*-acetyl phenylalanine と ethanol とからのエステル合成について種々な担体を調べている⁽⁸⁾. そして, これらの結果を統一的に整理するため, 担体の aquaphilicity なる概念を提出している. aquaphilicity とは (担体に吸着された水の量)/(有機溶媒中の遊離水量)である. aquaphilicity が低い担体ほど良好な結果を示している.

図1 有機溶媒中の蛋白質への水和水と遊離水との間の動的平衡および蛋白質と有機溶媒との間の水の等温吸着平衡 (概念図)⁽⁶⁾

酵素は, 担体表面に薄く沈着していることが望ましい. したがって, 固定化時の, 担体量/酵素量は十分とる必要がある. 図2に, セライトを担体として用いた著者らの結果を示す⁽⁹⁾.

4. pH

水溶液中の酵素反応では, 酵素は例外なく至適 pH を有している. 有機溶媒中ではどうか? この点に関しては Zaks と Klivanov らの興味ある研究がある. 彼らは, ある pH 値を持つ酵素水溶液を凍結乾燥して得た酵素粉末による有機溶媒中の反応では, pH は記憶されている (remember または memorize) と述べている⁽¹⁰⁾. 著者らは, この点について高純度リパーゼを用いて調べたが, pH を調節するために加えた無機塩類はむしろ反応を阻害した⁽¹¹⁾. すなわち, 何も加えない純水に酵素を溶解して得た水溶液を凍結乾燥した場合が最も高い活性を示した. 一般に無機塩類は有機溶媒中には溶解しないと考えられるので, 通常の濃度の緩衝液に酵素を溶解させ, その溶液を凍結乾燥して得られた粉末を有機溶媒中に分散させたときには, 酵素分子はきわめて多量の塩類分子にとり囲まれた状態となり, 阻害的に働くと考えられる. このように考えると, たとえ触媒活性に塩イオンが必要であっても, きわめて希薄な塩溶液中で酵素を凍結乾燥すべきであると思われる.

5. 酵素の純度および活性促進因子

有機溶媒中の酵素反応は多くの有機化学者も注目し, 彼らの研究報告も多数存在するが, 彼らがほとんどといってよいほど注意を払わない因子で, しかし, 実はきわめて重要な因子は, 使用する酵素の純度である. 著者が文献調査したところ, 有機溶媒中の酵素反応を主題とした研究報告で, 使用した酵素の純度を明記した報文はき

図2 酵素(高純度)単位量当りのセライト量対初速度の関係(ペンゼン中リパーゼによるラクトン化反応)⁽⁹⁾

図3 高純度リパーゼによるラクトン化反応に及ぼす各種添加物の影響
(高純度リパーゼ+添加物+セライトの水溶液を凍結乾燥した)
○, アラビトール; ●, ソルビトール; ●, エリスリトール; ●, ホスファチジルコリン; △, 対照(無添加); ▲, ラクトース; ▼, ポリビニールアルコール; □, デキストラン; ■, カゼイン; ×, 牛血清アルブミン。

わめて少ないことがわかった。この分野で注目された Klivanov 教授のグループの多数の報告を読んでも、純度については何も記載されていない。事実、この点に関して、酵素学者達から鋭い批判がなされているのである。前述したように、水分の影響は酵素標品の純度に依存するし、粗酵素を調製する際に含まれる多くの不純物は有機溶媒には溶解しないと考えられるから、不純な酵素標品を用いれば、酵素分子はそのまわりに依然として留まっているおびただしい量の不純物にとり囲まれていることになる。したがって、その活性は、それらの不純物の種類と量によって強く影響されることは十分想像がつく。工業的に利用する場合は、活性さえあれば不純な酵素標品を使用することで何らさしつかえないかも知れないが、学問的には高純度な(少なくとも SDS-PAGE で単一バンドを示す程度には純粋な)酵素標品を使用して実験をすべきであろう。著者らは、リパーゼによる分子内エステル合成反応で、高純度標品の場合、たとえセライトを用いて分散をよくしても、活性はきわめて低く、これにアラビトールやソルビトールなどのポリオールを加えて凍結乾燥すると、高い活性が得られることを知った(図3)⁽¹¹⁾。高純度酵素の場合は、適当な活性促進物質を加え、かつ適当な担体を用いて分散をよくした場合のみ十分な活性が得られるのではないかと考えている。

以上、有機溶媒中の酵素の活性に影響するいくつかの因子について述べた。多くの因子が影響するので、よく言われるように、しばしば研究者間でデータの一致をみないのは十分うなずけることである。

高純度酵素標品を用いた厳密な条件下での実験によるデータの蓄積が望まれる。

- (1) J. S. Dordick: *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 194 (1989).
- (2) 山根恒夫: 油化学, **36**, 761 (1987).
- (3) M. D. Lilly: *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **32**, 162 (1982).
- (4) C. Laane, S. Boeren, K. Vos and C. Veeger: *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 81 (1987).
- (5) 高橋 穰二: バイオインダストリー, **7**, 470 (1990).
- (6) T. Yamane: *Biocatalysis*, **2**, 1 (1988).
- (7) T. Yamane, Y. Kojima, T. Ichiryu and S. Shimizu: *Enzyme Eng.*, **9**, 282 (1988).
- (8) M. Reslow, P. Adlercreutz and B. Mattiasson: *Eur. J. Biochem.*, **172**, 573 (1988).
- (9) T. Yamane and H. Toda: unpublished data (1990).
- (10) A. Zaks and A. M. Klivanov: *J. Biol. Chem.*, **263**, 3194 (1988).
- (11) T. Yamane, T. Ichiryu, M. Nagata, A. Ueno and S. Shimizu: *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 1063 (1990).