含水塩を用いた無溶媒反応系での アスパルテーム前駆体の酵素合成

磯野康幸, 中嶋光敏*

Enzymatic Synthesis of Aspartame Precursor in Solvent-free Reaction System with Salt Hydrates

Yasuyuki Isono and Mitsutoshi Nakajima*

Dainichiseika Color & Chemicals Mfg. Co., Ltd., 1-9-4,
Horinouchi, Adachi-ku, Tokyo 123-8555

*National Food Research Institute, 2-1-12,
Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

Enzymatic synthesis of aspartame precursor, N-(benzyloxycarbonyl)-L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester (ZAPM) was successfully performed using molten N-(benzyloxycarbonyl)-L-aspartic acid (ZA) and L-phenylalanine methyl ester (PM) mixtures in the presence of salt hydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaCO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) without any liquid addition. The mixture composed of ZA, PM, salt hydrate and enzyme could be preserved under the dehydrate temperature of salt without ZAPM synthesis during one year, and available for ZAPM synthesis by control the temperature up to the dehydrate temperature on occasion. This storable mixture is considerable as a useful master powder for ZAPM synthesis.

(Received Jun. 25, 2002 ; Accepted Sep. 10, 2002)

アミノ酸系人工甘味料アスパルテーム (APM) は砂糖の約 200 倍の甘味を持つ低カロリー甘味料としてその市場規模は拡大傾向にあり¹⁾, 世界需要は 15000 トン程度と推定される²⁾. APM 前駆体のひとつである Z-アスパルテーム (ZAPM) の酵素合成法として, ベンジルオキシカルボニル化アスパラギン酸 (ZA) と L-フェニルアラニンメチルエステル (PM) を基質とした反応方法が知られている (Fig. 1). 本反応は加水分解酵素の逆反応を利用した脱水縮合反応であり, 収率を高めるためには

系内の水濃度および生産物濃度を低くするか, あるいは基質濃度を高くする必要がある. 水濃度を低下させる方法として, 有機溶媒の利用に関する多くの報告がある^{3)~5)}. しかし, この場合には基質, 酵素の有機溶媒に対する溶解性, 酵素の有機溶媒耐性などが問題となる. 一方, 高濃度基質溶液の利用について著者らはこれまで, 10~20 M の基質溶液を用いた ZAPM 酵素合成について検討し, 良好な結果が得られたことを報告した⁶⁾⁷⁾. 本報では, 更に水濃度を低下させ, 高濃度基質を反応系に導入するため, 含水塩を用いた無溶媒系酵素反応による ZAPM 合成について検討した. これは, 基質-酵素-含水塩から成る無溶媒基質混合物が加熱により容易に液状化することに着目し, 酵素反応への利用を試みたものである.

1. 実験方法

(1) 実験材料

基質は ZA (国産化学), PM (Aldorich Chem. Co. Ltd.) を用いた. 酵素はサーモライシン (E.C.3.1.1.3) として市販されているサモアーゼ C-160 (*Bacillus thermoproteolyticus* ROKKO 由来, 大和化成) を精製を加えずに用いた. 含水塩として $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaCO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (いずれも和光純薬) を用いた.

(2) 酵素合成試験

ZA 1.0 mmol, PM 1.0 mmol および所定量の含水塩 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 0~7.0 mmol, $\text{NaCO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$; 0~1.7 mmol, $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 0~2.0 mmol) を平底バイアル瓶に入れ, 50℃ で加熱し, 液状化させた. これに酵素 100 mg を加え, 50℃ で攪拌を行った. 反応液は逐次サンプリングし, 50% メタノールを加え, 反応停止および希釈をおこない, 0.45 μm メンブランフィルター (富士フィルム) にて濾過した後に, 反応液中の ZA, PM および ZAPM 濃度を HPLC により測定した.

(3) 長期保存試験

ZA 1.0 mol, PM 1.0 mol, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 4.0 mol および酵素 100 g をよく混合し, これをねじ口瓶に入れ 25℃ で保存した. 1 ヶ月おきに混合物を取り出し, (2) と同様の反応条件で, 酵素活性を測定した.

(4) 分 析

反応液の分析は HPLC システム (ポンプ : 880-PU, デガッサ : 880-51, オートサンプラー : 851-AS, カラム

大日精化工業㈱技術研究センター (〒123-8555 東京都足立区堀之内 1-9-4)

* 独立行政法人食品総合研究所 (〒305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12)

Fig. 1 Schematic illustration of ZAPM synthesis

オープン: TU-100, 日本分光) を用いて行った。カラムは Licrosorb RP-18 ($\phi 4.6 \times 250$ mm, 関東化学) を使用した。移動相 (0.01 M リン酸緩衝液 (pH 2.4)/アセトリル=6.5/3.5 (W/W)), 移動相流速 0.9 ml/min, カラム温度 50°C で溶離を行った。分析標品 ZAPM は APM (和光純薬) を Z 化試薬サンセーラ Z-DSP (三新化学工業) により Z 化し合成した。検出は UV 検出器 (875-UV, 日本分光), 検出波長 220 nm で行った。

2. 実験結果及び考察

(1) 酵素合成試験

Fig. 2 (a)-(c) に含水塩添加量が ZAPM 合成量に及ぼす影響について示した。転換率は反応 6 時間での値についての相対値である。X 軸はそれぞれ, Fig. 2 (a) では添加塩モル重量基準, Fig. 2 (b) では結晶水離水量基準, Fig. 2 (c) では pH* 基準で表してある。結晶水離水量は Table 1 に示した各塩の結晶水離水温度に基づき算出した⁸⁾。すなわち, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ および $\text{NaCO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ は, それぞれ 50°C では $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ および $\text{NaCO}_3 \cdot \text{OH}_2\text{O}$ となり, 両者ともその差分である $10\text{H}_2\text{O}$ が離水していると仮定した場合の離水量を示している。pH* は, ZA 1.0 mmol, PM 1.0 mmol および所定量の含水塩を混合した物を 50°C で液化させ, 水で 20 ml まで希釈後測定した pH の値で示している。ここで, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaCO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ とも弱酸-強塩基からなる塩であるため, 塩添加量の増加に伴い pH* は増加する。

$\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ は反応温度で離水がおこらない

Table 1 Dehydration temperature of crystal water⁸⁾

	Na_2HPO_4	Na_2CO_3	$\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$
H_2O	[°C]	[°C]	[°C]
12	< 35		< 60
10		< 32	
7	35.4	32-35	
6			60
2	48.4		
1		35<	
0	180<		200<

ため, 基質混合物は液化せず, ZAPM 合成も見られなかった。 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ および $\text{NaCO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 添加時には 50°C で基質混合物の液化が見られた。Fig. 2 (a) に示したように, 酵素活性に対する塩の添加量には最適値があり, 基質 1.0 mmol に対し $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ では 2.5 mmol 以上 (4.0 mmol で最適), $\text{NaCO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ では 1.0 mmol で約 90% の転換率が得られた。これを Fig. 2 (b) に基づき離水量の最適値に換算すると $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ で 900 mg, $\text{NaCO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ で 250 mg であった。添加水分量に対する酵素活性が Fig. 2 (b) のようなベル型を示す報告例は多い⁹⁻¹¹⁾。Hirata¹¹⁾ は酵素活性発現には酵素の水和が重要であることを示した。すなわち, 反応系の水分が低い領域では酵素の水和が不十分なために酵素活性 (ペプチド合成活性) が低く,

Fig. 2 Effect of salt hydrate addition on ZAPM synthesis

(a) The X-axis is based on the molar of salt hydrates, (b) The X-axis is based on amount of released water from salt hydrates, (c) The X-axis is based on the pH* value. The value of pH* means the pH value of the diluted reactant. Symbols: (○) Na₂HPO₄ · 12H₂O, (△) NaCO₃ · 10H₂O.

水分量が増加するにしたがい、酵素の水和が十分に行われ、酵素活性が増加する。しかし、過剰の水分添加は加水分解反応量の増加を招き、合成活性は低下する。酵素水和による活性の増加と過剰水分による加水分解量増加

とのバランスにより、酵素活性は最適水分量の存在するベル型の図を示す結果となる。

一方、Fig. 2 (c) に示したように、pH*の酵素活性に対する最適値はNa₂HPO₄ · 12H₂OおよびNaCO₃ · 10H₂Oの両者とも7.5とほぼ一致した。これは、酵素活性に対しpH*の寄与が大きいことを示唆している。しかし、反応時のpH環境とpH*との関係は本研究だけでは明確ではないため、更に検討を加える必要がある。

これまで、Vulfsonらのグループ¹²⁾¹³⁾は基質アミノ酸に少量の溶媒を加えることで液化が起こり、酵素を添加することでペプチド合成が可能であることを報告しているが、溶媒の存在が必要であった。Kuhlら¹⁴⁾¹⁵⁾は含水塩結晶水を用いたペプチド合成について報告しているが、やはり有機溶媒の存在が必須であった。Cervovsky¹⁶⁾は基質アミノ酸および含水塩を固相状態のまま攪拌し酵素反応をおこなっている。アミノ酸のモル比を1:2に設定することで、見かけ上高い転換率が得られている。本研究では、反応前は固相であるが、反応時には液化させるため、反応液の攪拌が容易であり、酵素と基質の接触も固相状態に比べ良好であるため、高い転換率が得られたと思われる。

(2) 長期保存試験

Fig. 3は保存試験の結果である。基質混合物保存前の酵素活性を100%とした相対活性についてみると、12ヶ月の保存期間を通し、酵素活性の低下は小さいと判断できた。また、固相状態でのZAPMへの転換はほとんど見られなかった。したがって、あらかじめ大量に調製した本混合物をマスターパウダーとして固相状態、離水温度以下で保存し、適宜必要量を取り出して酵素反応を行うシステムが可能となる。

プロテアーゼは粉末状で利用されることが多いが、この際、酵素粉末の煙霧により、喉や目などの粘膜に炎症を起こすことがある。本研究に用いた基質-酵素-含水塩混合物は加熱により容易に液化し酵素反応を開始する。本混合物をマスターパウダーとして大量に調製し、適宜必要量を取り出して利用することで粉末混合の作業を最小限とし、煙霧に晒される危険性を回避することが可能となる。

一般に酵素反応による物質生産では、反応直前に反応液を調製することが多いが、本研究で用いた反応組成物は加熱するだけで液化し反応を開始するため、マスターパウダーとしての調整が可能であり、作業性の向上、調製作業時の危険性の回避に寄与できると考えられる。

Fig. 3 Changes of enzymatic activity and ZAPM synthesis during reactant preservation

3. 要 約

含水塩存在下，無溶媒系でのアスパルテーム前駆体酵素合成を行なった。反応温度 50℃ で離水の起こる $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ および $\text{NaCO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ の存在下で酵素活性が見られ，高い ZAPM 転換率が得られた。また，塩の添加量は酵素活性に影響を与え，特に pH* が重要な要素と考えられた。一方，基質/酵素/含水塩混合物を粉末状態，離水温度以下で 12 ヶ月間の保存したところ，保存期間中の酵素反応はほとんど見られなかった，また，混合物を 1 ヶ月毎に取り出し，加温液化させ酵素活性を測定したところ，酵素活性の低下はほとんど見られなかった。

文 献

- 1) 半澤 敏，酵素法によるアスパルテームの生産，*Bioindustry*, **15**, 39-46 (1998).
- 2) Anonymous, 高甘味度甘味料の市場動向，月刊フードケミカル，46-53 (2000).
- 3) Miyanaga, M., Ohmori, M., Imamura, K., Sakiyama, T. and Nakanishi, K., Kinetics and equilibrium for thermolysin-catalyzed syntheses of depeptide precursors in aqueous/organic biphasic system., *J. Biosci. Bioeng.*, **90**, 43-51 (2000).
- 4) 磯野康幸，鍋谷浩志，中嶋光敏，酵素によるアスパルテーム前駆体合成に対する各種有機溶媒の影響，*日食工誌*, **42**, 920-925 (1995).
- 5) 平田 彰，平田 誠，遊離酵素を用いた抽出を伴うアスパルテーム前駆体合成における酢酸エステル系溶媒の影響化学工学論文集，**17**, 511-517 (1991).
- 6) Isono, Y. and Nakajima, M., Application of high concentrated substrate to enzymatic synthesis of aspartame precursor., *Food Sci. Technol. Res.*, **5**, 255-258 (1999).
- 7) Isono, Y. and Nakajima, M., Enzymatic peptide synthesis using microaqueous highly concentrated amino acids mixture., *Process Biochem.*, **36**, 275-278 (2000).
- 8) 玉虫文一ら編，「岩波理化学辞典」，第 3 版増補版，(岩波書店東京)，pp. 802, pp. 1322, pp. 1441 (1981).
- 9) Yamane, T., Kojima, Y., Ichiryu, T. and Shimizu, S., Biocatalysis in a microaqueous organic solvent., *Ann. NY Acad. Sci.*, **542**, 282-293 (1988).
- 10) Zaks, A. and Klivanov, M.A., The effect of water on enzyme action in organic media., *J. Biol. Chem.*, **263**, 8017-8021 (1988).
- 11) Hirata, H., Enzyme reaction in organic solvent., *Yukagaku*, **39**, 1003-1013 (1990).
- 12) Gill, I. and Vulfson, E.N., Enzymatic stnthesis of short peptides in heterogeneous mixtures of substrates., *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 3348-3349 (1993).
- 13) Lopez-Fandino, R., Gill, I. and Vulfson, E.N., Prptease-catalyzes stnthesis of oligopeptides in heterogeneous substrate mixtures., *Biotechnol. Bioeng.*, **43**, 1024-1030 (1994).
- 14) Kuhl, P., Eichhorn, U. and Jakubke, H.-D., Enzymatic peptide synthesis in microaqueous solvent-free system., *Biotechnol. Bioeng.*, **45**, 1024-1030 (1994).

-
- 276-278 (1995).
- 15) Kuhl, P., Halling, P.J. and Jakubke, H.-D., Chymotrypsin suspended in organic solvents with salt hydrates in a good catalyst for peptide synthesis from mainly undissolved reactants., *Tetrahedr. Lett.*, **31**, 5213-5216 (1990).
- 16) Cerovsky, V., Protease-catalysed peptide synthesis in solvent-free system., *Biotechnol. Tech.*, **6**, 155-160 (1992).
- (平成 14 年 6 月 25 日受付, 平成 14 年 9 月 10 日受理)
-