総合論文**超臨界メタノールのミクロな溶媒物性とメチル化反応への応用**

佐 古 猛

静岡大学 工学部 物質工学科 (〒432-8561 静岡県浜松市城北 3-5-1)

512.6 K の臨界温度と 8.09 MPa の臨界圧力を越えた超臨界メタノールは、将来の化学反応プロセスにおける有望な溶媒である。この流体は温度と圧力を操作することにより、従来の液体溶媒よりもずっと広範囲かつ連続的に溶媒物性を変えることが出来ると共に、溶媒和構造を容易に制御可能なので、高い反応速度と反応選択性を同時に実現することが可能である。

今回の総説では、亜臨界～超臨界メタノールのミクロな溶媒物性の温度および圧力依存性、溶媒物性と反応性の関係について簡単に説明し、その後、超臨界メタノールを用いる高選択的で触媒不要の芳香環のメチル化、N-メチル化、O-メチル化、ケトンからのアセタール合成について説明する。

(連絡者：佐古 猛) Vol.1, No.4, 381 (2001)

総合論文**超臨界流体中での酵素反応**

生 島 豊

産業技術総合研究所 超臨界流体研究センター

超臨界流体は圧縮性の媒体を臨界温度および臨界圧力以上にしたときの流体であり、超臨界流体を酵素反応に適用することによってさまざまな利点が生じる。生成物による溶媒汚染の心配がない上、超臨界流体の低粘度、低表面張力、高拡散性は溶質の物質移動を容易にし、拡散律速反応の速度を促進することができる。また、超臨界流体の種々の溶媒特性は、その圧力、温度を変えることによって連続的に制御できるので、溶媒自身の化学構造の変化に起因した酵素活性の低下も改善できる。酵素活性は、酵素の水分含有量、表面形態、溶媒、基質、生成物の性質に左右される。超臨界流体はこのように酵素へ直接的な影響を与えるほかに、溶媒の誘電率、溶解度パラメーターのような物理的性質も非共有結合的相互作用に微妙な影響を与える。近年、分光学的手法や計算機シミュレーション法により、臨界点付近で溶解した溶質分子の近傍領域で水素結合のような化学的相互作用が特異的に変化することが見い出されており、このような観点から生体触媒反応についても検討がなされた結果、超臨界流体中での酵素構造の2次構造変化が反応性の変化と密接に結びついていることが明らかになった。

(連絡者：生島 豊) Vol.1, No.4, 385 (2001)

総合論文**超臨界二酸化炭素を用いた重合反応**

大 竹 勝 人

物質工学工業技術研究所化学システム部超臨界流体工学グループ (〒305-8565 茨城県つくば市東 1-1)

二酸化炭素は、超臨界条件においてヘキサン等の無極性溶媒と比較的類似した特性を持っているとともに、地球上に天然にほぼ無尽蔵に存在するために安価であり、毒性がきわめて低くかつ不燃性であり安全である。そのため、現在の工業プロセスにおける揮発性有機溶媒使用削減の動きを受け、代替溶媒としての利用が試みられるようになってきている。本総説では、最近の超臨界二酸化炭素を溶媒とした、種々のポリマー合成反応に関する研究について概説した。

(連絡者：大竹勝人) Vol.1, No.4, 395 (2001)

超臨界流体中の酵素反応

Enzymatic Processes in Supercritical Fluids

生島 豊

産業技術総合研究所 超臨界流体研究センター

〒983-8551
仙台市宮城野区苦竹 4-2-1

Yutaka IKUSHIMA

National Institute of Advanced Science and Technology

4-2-1 Nigatake, Miyagino-ku, Sendai 983-8551

Abstract: Considerable attention has been directed to enzymatic processes in supercritical fluids (SCFs) for theoretical and industrial applications. SCFs have unique physicochemical properties that are readily altered through changes in pressure and temperature, especially in the near-critical region and such changes may lead to different reactivities in enzymatic processes. SCFs as reaction media may result in better mass-transfer properties compared to liquids. Increased flow rate was found to promote reaction speed and water-content, choice of cosolvent and SCFs were found to have strong effect on enzymatic reaction rates with consequent effect on solvation state of substrate, product or even enzyme. In the near-critical region not only reaction rate, but stereoisomerism were noted to be improved. In the near-critical region, local density and composition of solution underwent considerable change, and occasionally solute-solvent clustering was found to affect reactivity. The effects of this formation on reactions were thus examined at the molecular level and those of the conformation of active enzymes on reactivity were elucidated. SCFs in the near-critical region may be considered to activate the enzymes by altering their characteristic structures and, thus a stereoselective mechanism would appear operative.

Key words: Supercritical fluids, Enzyme, Water-content, Cosolvent, Near-critical region

1 はじめに

超臨界流体を反応媒体とする有機化学反応においてはプロセス上の利点に加え、超臨界流体の臨界点付近で反応速度や選択性の著しい変化が報告され、大いに注目を集めている。超臨界流体は、圧縮性の媒体を臨界温度および臨界圧力以上にしたときの流体であり、その性質は気体と液体の間にある (Table 1 参照)。たとえば、密度は液体に近いが、粘性、拡散性は気体に近い。近年、分

光学的手法や計算機シミュレーション法により、臨界点付近で溶解した溶質分子の近傍領域で水素結合のような化学的相互作用が特異的に変化することが見い出されており¹⁾、このようなマイクロ因子が化学反応性、活性錯合体構造に影響を及ぼすことが報告され²⁾、溶媒あるいは溶質分子との関係も分子スケールで検討されている³⁾。同様な観点から、生体触媒を用いた反応についても、分光学的な解析も含めさまざまな検討がなされており、超臨界二酸化炭素中での酵素構造の2次構造変化が反応性の変化と密接に結びついていることが報告された⁴⁾。しかし、系が複雑な上、反応条件が高圧下ということから、その詳細はまだ十分に解明されていないのが現状である。本稿では、新たな展開を見せている超臨界流体中での酵素反応についてその現状と可能性について報告する。

2 超臨界流体の反応媒体としての特徴

生体内での代謝反応の多くは、酵素によって促進され

Table 1 Comparison of Physical Properties.

Property	Gas	Supercritical	liquid
Density (kg/m ³)	1	200~900	1000
Viscosity (Pa·s)	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵ ~10 ⁻⁴	10 ⁻³
Diffusion coefficient (m ² /s)	10 ⁻⁵	10 ⁻⁷ ~10 ⁻⁸	<10 ⁻⁹
Heat conduction (W/mK)	10 ⁻³	10 ⁻³ ~10 ⁻¹	10 ⁻¹

連絡者: 生島 豊

る。これらの酵素が有する著しい化学選択性、立体選択性は工業用触媒として非常に有望である。しかし、酵素が作用する場のほとんどは水溶液中である。それでも、有機溶媒中での酵素反応の検討も多くなされており、これによって、脂溶性基質が関与する有機化学反応を酵素を触媒として行えるだけでなく、生成物の回収を容易にしたり、反応器の微生物汚れの防止にも有効である。このことは、たとえば、薬品類、光学活性物質、特殊ポリマーの製造といった工業分野への展開を可能にする。

これに対して、超臨界流体は特別な非水系溶媒とみなすことができる。超臨界流体を酵素反応に適用することによってさまざまな利点が生じる。生成物による溶媒汚染の心配がない上、超臨界流体の低粘度、低表面張力、高拡散性は溶質の物質移動を容易にし、拡散律速反応の速度を促進することができる。また、超臨界流体の種々の溶媒特性は、その圧力(温度)を変えることによって連続的に制御できるので^{1a)}、溶媒自身の化学構造の変化に起因した酵素活性の低下⁵⁾を改善できる可能性もある。

非水系雰囲気下での酵素活性は酵素の水分含有量、表面形態、溶媒、基質、生成物の性質に左右される。酵素表面の水は、微視的には酵素活性を保持している表面残基間の非共有結合相互作用の維持に働いている。すなわち、水分量に対する酵素活性には最適値があり、低すぎれば結合水量が少なくなり酵素構造を阻害するし、多くなれば酵素分子の凝集が起こり、脂溶性基質に接する部分の表面積が減少し、酵素活性の低下につながる。溶媒はこのように酵素へ直接的な影響を与えるほかに、溶媒の誘電率、溶解度パラメーターのような物理的性質も非共有結合的相互作用を微妙に変化させ、結果的に酵素活性にも影響を与える。通常の溶媒を用いても、このような物理的特性はその溶媒種を変えることによってある程度連続的に制御できるが、溶媒の化学構造の変化は如何ともしがたく、これに起因して酵素活性に大きな変化が生じることが考えられる。この点、超臨界流体は溶媒種を変えることなく、温度、圧力といった操作因子だけでその特性を連続的に制御できることから、溶媒種に起因した酵素活性の変化の可能性は低い。

超臨界流体中の酵素反応は様々な反応系に適用されてきた⁶⁻¹⁴⁾。有機溶媒中に比較して反応速度が増大することは、超臨界流体中での水の溶解度の増加⁴⁾や基質溶解度の増大⁸⁾に起因すると考えられた。また、超臨界流体中での酵素活性の低下も、減圧過程¹⁵⁾で観察されている。溶媒としての超臨界二酸化炭素の広範な使用例はそのコスト、無毒性からも当然と考えられるが、二酸化炭素分子は酵素表面のアミノ基と結合しカルバミン酸塩を生成しやすく、様々な影響を与える可能性がある。すな

わち、二酸化炭素は単なる溶媒流体として働くのではなく、酵素(タンパク質)を化学的に変える働きも有することを考慮しなければならず^{2,4,16,17)}、二酸化炭素以外の流体への適用も試みられている^{18,19)}。

3 超臨界流体中での基質と水の溶解度

生体触媒反応への超臨界流体の適用に際しては、使用する成分の相挙動に関する広範な知見が必須である。超臨界流体の相挙動への熱力学的モデルの適用はいろいろ検討されているが、データ数の不足からこの手法だけでは超臨界流体中での生体高分子の複雑な挙動を予測することは困難である。これに対して、Chrastil²⁰⁾によって提案された半経験式(1)により生体高分子の超臨界流体中への溶解度のある程度推測することが可能である。

$$C = d^k \exp(a/T + b) \quad (1)$$

ここで、Cは超臨界流体中での基質濃度、dは超臨界流体の密度、Tは温度(K)、a, b, kはフィッティングパラメーターである。

水については、加水分解反応の反応物であることから、酵素の触媒活性にも影響を及ぼすので、他の生成物や基質同様、超臨界流体中の水の溶解度を把握することは重要である。しかし、水分量は酵素分子上で単分子層を形成する程度で十分かもしれないが、酵素の乾燥を防止する上で、酵素と接触する流体は水を含まなければならない。流体と酵素担体の間の水分量の平衡については各系で異なることが予想され、例えば、固定化リパーゼと超臨界二酸化炭素の間の水分平衡が測定され、リパーゼはおよそ8%の水分を含むことが示されているが、この水分量を維持するためには超臨界二酸化炭素は10 MPa, 40℃で0.3%の水分を含まなければならないことが明らかになった。超臨界二酸化炭素中での水の溶解度を(1)式で推算した結果、実験結果²¹⁾と良く一致し、温度、圧力に強く依存することが分かった。このことは、超臨界二酸化炭素-水の混合系が、hydrolase 酵素によって触媒される加水分解反応や合成反応に適した反応媒体となり得ることが示された。加えて、ヘキサン中の水の溶解度は40℃常圧下で0.878 Mであるのに対し、超臨界二酸化炭素中のそれは100倍も大きいことから、超臨界二酸化炭素中では固定化酵素の湿潤化も防止できる。

一方、超臨界二酸化炭素へのステアリン酸の溶解度は非常に小さく、ヘキサンのそれにくらべて1/100以下であるが、このような場合については共溶媒を添加することによってある程度改善される。もちろん、事前に共溶媒の反応性への影響を調べることは不可欠である。これについて、例えば oxidase 酵素によるコレステロールの

酸化反応では反応速度に共溶媒効果が著しく影響することが報告されており²²⁾, この原因としてコレステロール分子の凝集によるローカル濃度の増加が考察された。

4 超臨界流体中の酵素の安定性

高压による酵素の変性によって, その活性が減少する場合があるが, 超臨界流体の圧力はそれほど極端に大きいわけではないので, 酵素の活性に対する影響は小さいと考えられている。圧力効果については後述するが, その他にも二酸化炭素の水和酵素への吸着による pH 変化や, 減圧操作に伴うガスの爆発的な放出が酵素活性に影響を及ぼすことが考えられる。いずれにしても, 高压の二酸化炭素雰囲気下での酵素の安定性は超臨界二酸化炭素中での生体触媒反応にとって必須な知見である。

ribonuclease と lysozyme のオリゴマー化とフラグメント化は高压の窒素中でも超臨界二酸化炭素中でも, 加熱することによって起こる²³⁾。これに対して, 超臨界二酸化炭素に対する水, エタノールの共溶媒添加効果について, 種々の酵素についてその残存活性を調べたところ, Table 2 に示したように, リパーゼを除いてほとんどその影響がないことが明らかになった²⁴⁾。リパーゼについては, 6%エタノールの添加によって活性が80%も減少した²⁴⁾。自身の重さの5倍の結合水を有している *Rhizopus deleamar* リパーゼを超臨界二酸化炭素中に1~12時間放置したところ, 活性の減少は, Fig. 1 に示したように温度によって異なるが, 昇圧により一様に増大した²⁵⁾。しかし, 低含水量のリパーゼは超臨界二酸化炭素中に154時間放置した後でも, その酵素活性の98%を維持できた^{25b)}。いままでの多くの報告が, 超臨界二酸化炭素中での酵素安定性は水分含有量に顕著に影響されることを報じている。上記のような酵素活性の減少は, 酵素結合水に溶解していた二酸化炭素分子の急激な放出の結果引き起こされるタンパク質分子の構造変化に起因す

Table 2 Effect of SCCO₂ Treatment on Enzymatic Activity^a.

Enzyme ^b	Residual activity (%)			
	CO ₂	CO ₂ + ethanol ^c (3%)	CO ₂ + ethanol ^c (3%)	CO ₂ + water ^c (0.1%)
α-Amylase	94	96	93	105
Glucoamylase	102	96		105
β-Galactosidase	98	98		93
Glucose oxidase	97	93	101	99
Glucose isomerase	102	95		97
Lipase	96	88	82	106
Thermolysin	101	96		102
Alcohol dehydrogenase	97	87		94
Catalase	90	96		92

^aTreatment conditions : 35°C, 200 atm, 1 h (Ref. 24).

^bWater content of the enzyme preparations was 5–7% (wt/wt)

^cSCCO₂ containing ethanol (3 or 6%), or water (0.1%), was used.

Fig. 1 Effect of Pressure on Stability of Free Lipase in SCCO₂ at (a) 35°C, (b) 50°C.

Pressure: ●, 0.1 MPa; ▲, 14.7 MPa; ■, 29.4 MPa (Ref. 25 a).

るものと推測された¹⁵⁾。

超臨界二酸化炭素中でのいくつかの合成樹脂吸着剤の形態変化が, 吸着物の顕著な容積変化によってもたらされることが報告されている²⁶⁾。そのような形態変化は固定化酵素活性の減少に至るので, 二酸化炭素の吸収による膨潤や高分子化は酵素固定化用樹脂の選択の際に考慮されるべきであろう。

5 酵素への圧力効果

超臨界流体中での生体触媒反応は高压下で行われることから, 高压の超臨界流体中での反応速度の解析を遷移状態理論により検討される場合がある。

遷移状態理論によれば, 反応速度定数 k は, ボルツマン定数 k_B , プランク定数 h , ガス定数 R によって (2) 式であらわされる。

$$k = r(k_B T/h) \exp(-\Delta G^\ddagger/RT) \\ = r(k_B T/h) \exp((\Delta S^\ddagger/RT) \exp(-\Delta H^\ddagger/RT)) \quad (2)$$

ここで, $\Delta G^\ddagger$, $\Delta S^\ddagger$, $\Delta H^\ddagger$ はそれぞれ, 遷移状態活性化自由エネルギー, エントロピー, エンタルピーである。 r は遷移係数で, 通常 1 である。モル濃度に基づく場合は $\Delta G^\ddagger$ と活性化体積 $\Delta V^\ddagger$ の関係は次式であらわされる。

$$(\delta \ln k / \delta P) = -\Delta V^\ddagger / RT + \beta_0 \Sigma v_i \quad (3)$$

ここで, v_i は化学量論数, β_0 は溶媒の圧縮係数である。たとえば, 超臨界エチレン中でのエチレンの高分子化反応において従来にない反応性が得られたが, 溶媒の臨界点付近で活性錯合体の部分モル体積が非常に大きな負の値を有することが判明した²⁷⁾。

同様に, 酵素反応における圧力効果は, 触媒過程における体積変化 $\Delta V^\ddagger_c$, 結合過程における体積変化 $\Delta V^\ddagger_b$ の二つの部分からなる活性化体積 $\Delta V^\ddagger$ を考慮すること

によって決定される²⁸⁾。

$$\Delta V\ddagger = \Delta V\ddagger_c + [K_m / (K_m + C)] \Delta V\ddagger_b \quad (4)$$

ここで、 C と K_m は、それぞれ基質濃度、ミカエールメンテン定数である。反応の自由エネルギー変化が考慮されるなら、活性化体積 $\Delta V\ddagger$ の温度、圧力依存性は(5)式であらわされる。

$$\Delta V = \Delta V\ddagger_c + \Delta\beta(P - P_0) + \Delta\alpha(T - T_0) \quad (5)$$

体積変化 $\Delta V\ddagger_c$ と $\Delta V\ddagger_b$ は、proteases 酵素について 200 MPa の圧力まで測定されている²⁹⁾が、双方の体積変化が負の値を示す場合は、その反応は高圧下で反応速度が増大する傾向を示す。

また、一定温度での圧力の増加は、流体の密度と溶解力の増大につながることから、生成速度の増加をもたらすが、とりわけ、臨界点付近ではこの傾向が顕著である。しかし、超臨界流体中の酵素反応では活性化体積が測定されていないことから、反応速度定数に対する圧力効果を予測することは困難である。

酵素の不活性化につながるタンパク質の変性は、温度だけでなく圧力によっても影響を受ける可能性がある。しかし、超臨界流体中で使用される圧力範囲は、水溶液中でタンパク質の変性を引き起こすような圧力に比べてかなり低いので、超臨界状態でタンパク質の変性作用をそれほど懸念する必要はない。

6 超臨界流体中での酵素反応

超臨界流体を使った生体触媒反応の最初の報告は、1985～1986 年にかけての Nakamura^{25a)}、Hammond⁶⁾、Randolph⁹⁾らによる。当初の研究は超臨界流体中での酵素反応の可能性を探る研究であったが、その後バッチ式、あるいは連続式の反応装置による広範な研究が行われている。

超臨界流体の種類によってその極性が異なることから、

ら、各反応について最適な超臨界溶媒を選択する必要があると生じてくるかもしれない。

さらに反応速度に影響を及ぼす因子として、水分含有量が考えられる。例えば、乾燥した超臨界二酸化炭素を媒体として用いたコレステロール酸化反応においては、超臨界二酸化炭素が水分を含んだ固定化 oxidase 中を通ると、反応速度は連続的に減少するが、新たに超臨界流体中に水分を導入すると、その活性は再び増加してくる¹¹⁾。このことは、コレステロールに酵素が結合する過程が酵素活性に必須であり、酵素が乾燥している状態ではこの過程が抑制されることを示唆している。一般的な傾向として、乾燥酵素を用いると反応開始時の速度は増大する。さらに、リパーゼによるエステル化反応やアルコール分解反応において、超臨界二酸化炭素中の水分量の最適値が測定され、ミリスチン酸のエステル化反応やエタノール分解反応については 0.1～0.2% の水分量が適当であることが報告された。しかし、水分量は基質によって変化するとも考えられ、実際にノニルアルコールと酢酸エチルのアルコール分解反応においては、最適水分量を得ることはできなかった。

超臨界二酸化炭素中で酵素活性を最大にするためには、超臨界二酸化炭素は 0.1～0.3% 程度の水分量を含むべきという考えがある³⁾。しかし、過剰な水は基質分子の酵素活性サイトへの接近の妨げになり、結果的に熱力学的な平衡に良い結果をもたらさない。かくて、超臨界二酸化炭素中の水分量を都合良くコントロールすることが望ましく、反応を効率的に進行させる上でも、たとえば、バッチ操作のエステル化反応で生じた水は系外に除去されなければならない。

また、水分含有量は、物質移動、拡散速度の他に、酵素、基質、生成物の水和状態にも影響を与える。Fig. 2 は加水分解速度、及びエステル化反応速度に及ぼす水分

Fig. 2 Effect of Water Content on the Initial Rate of (a) Acidolysis, (b) Hydrolysis in SCCO_2 or n-Hexane (Ref. 30). The substrate concentration is 5 g L^{-1} each for Triolein and stearic acid. (Water content is expressed as percentage weight/weight SCCO_2 or n-hexane.)

量の効果を示した³⁰⁾。超臨界二酸化炭素中では水分量の増加とともに双方の反応速度は増大したが、これはヘキサン中に比べて、超臨界二酸化炭素中には多くの水が溶解できるためと考えられた。また、超臨界二酸化炭素中で subtilisin 酵素によって触媒されたエステル交換反応の反応速度は、アセトンやピリジンのような有機溶媒中に比べて大きいことが報告されているが、この原因として物質移動や拡散速度の影響が推測された³¹⁾。

物質移動効果には外部物質移動と内部物質移動がある。外部物質移動は反応混合物と、酵素或いは担体表面の間で起こる。外部境界膜による物質移動抵抗は流量に依存し、液体中での外部拡散は液流速が 1 cm/s のときのみ速度律束になる。一方、内部拡散は酵素担体内の細孔内で起こり、流速に依存しない。内部拡散は酵素活性が大きい上、基質濃度が小さく、酵素担体粒子が大きい場合に速度律束になることが知られている¹³⁾。内部拡散は、通常は外部拡散に比べて、より大きく反応速度を支配する因子であるが、反応速度に対する外部拡散律束はカラムに充填した酵素を用いて流速の関数として測定されているのに対して、内部拡散については超臨界流体中ではその影響はまだ十分に解明されていない。oxidase によるコレステロールの酸化反応速度への流速の影響が 0.5~3 cm/s の範囲で検討されているが¹¹⁾、流速の増加

につれて反応速度も増大した。この結果について、この流速の範囲内では酵素へのコレステロールの拡散が反応律束にならないと考察したが、リパーゼ酵素によるアルコール分解反応では異なる結果が得られた。すなわち、isoamyl acetate の生成速度は、流速 0.3~1.3 cm/s の範囲で、流速の増加とともに直線的に増加し、流速の 1 次関数で表されたことから、その反応速度は外部物質移動によって制限されるものとされた。

超臨界二酸化炭素中での反応速度が外部物質移動によって制限されるなら、反応速度はカラム中の流速を増すことによって増大するが、最適流速に関する報告例は現在までのところ少ない。流速については、一般的にその流速を速くすれば、反応速度は増大する傾向にある。

超臨界二酸化炭素に加える共溶媒の種類によっても反応速度が影響されることも報告されている。超臨界二酸化炭素中での cholesterol oxidase による酸化反応のターンオーバー数は、水溶液中のそれよりも大きい、同時にそのターンオーバー数は共溶媒の種類によって大きく変化した¹¹⁾。ESR による in situ 測定の結果、共溶媒の添加が基質分子の凝集効果に影響を与えることが明らかになったが、このことは、基質分子の吸着と脱離過程における水分量の効果が、基質と酵素分子間の相互作用に関係していることを示唆した。

Fig. 3 Schematic Describing the Effect of Pressure on Molecular Weight Distribution during Enzyme-catalyzed Polymerizations in Supercritical Fluids.

6・1 ポリマー合成

最近、酵素によってさまざまなポリマーを合成する試みに注目が集まっている³²⁾。しかし、通常の有機溶媒中でのポリマー合成では、その分子量や分子量分布を制御することは難しい。一方、超臨界流体中では溶質の溶解度は、圧力によって制御できるので、溶けることのできるポリマー鎖は圧力によって制御可能である。それゆえ、ポリマー合成に必要な触媒が溶解しないなら、ポリマー鎖長の生長はそのポリマーが溶解できなくなる圧力で終了する。また、その分子量は圧力を増加することによって制御可能である。Fig. 3 にこの超臨界流体中でのポリマー合成の工程をまとめて示した。

Fig. 4 Extraction of Poly (1, 4-Dibutyl Adipate) in Supercritical Carbon Dioxide at 50 °C.

Table 3 Effect of Pressure on Molecular Weight and Dispersity during Lipase-catalyzed Polymerization of Bis(2, 2, 2-Trichloroethyl)adipate and 1, 4-Butanediol in Supercritical Fluoroform

Pressure, psi	Maximum molecular weight of the soluble polymer	Average molecular weight and dispersity of the soluble and dispersity of polymer	average molecular weight and dispersity of the precipitated polymer
900	987	937 (1.07)	1020 (1.02)
1600	1424	1037 (1.11)	1677 (1.03)
2400	2586	1371 (1.18)	2774 (1.03)
3000	2849	1762 (1.23)	3357 (1.05)

Reaction performed in same equipment as described in Figure 1. Polymer products recovered by flashing off fluoroform and the separated by extraction in the SEE with fluoroform (minimum extraction pressure was 1200 psi).

Fractionated samples were then analyzed by gel permeation chromatography.

本工程のキーポイントは分子量に依存して物質を分離することのできる超臨界流体の特性にある。そこで、Fig. 4 に超臨界二酸化炭素による、平均分子量 10000、多分散性 3.66 の poly(1,4-dibutyl adipate) の抽出結果を示した。抽出圧力が増加するに連れて、抽出されたポリマーの分子量も増大することが分かる。Table 3 は酵素による上述のポリマー合成がフルオロフォルム中では圧力の調整によって制御できることを示している。分散性は圧力増加の間は低い、平均分子量は徐々にであるが大きくなっている。このような単分散ポリマーは一定の鎖長のポリマー合成に有効である。分子量 9000 以上の単分散ポリエステルは工業的にも重要であることから、超臨界流体中での検討が一層必要と考えられる。

6・2 溶媒効果

溶媒の物理的特性が酵素活性にどのような影響を与えるか重要な問題である。酵素は水には溶けるが、有機溶媒のように極性の低い超臨界流体中にはほとんど溶けることがなく、このような不均一系反応では反応速度の点で改善が望めないかもしれない。しかしながら、超臨界流体の特性の高拡散性、低粘性に起因して、溶媒、あるいは基質の酵素活性サイトへの移動が容易になると考えられる。一方、不均一系でも、超臨界流体の溶媒特性は圧力によって大きく変化するので、酵素や基質の溶媒効果、あるいは酵素構造そのものが変化し、反応性に变化をもたらす可能性がある。Clark らは、溶媒の誘電率

Fig. 5 The Effect of Pressure on Initial Rate of the Lipase-catalyzed Alcoholysis of Methacrylate (20 mM) by 2-Ethyl Hexanol (20 mM) in Fluoroform.

を1~10に変化させてタンパク質のたわみ性が変化することを報告している¹⁸⁾。フルオロフォルムの誘電率は500~5000 psiの圧力変化で1~8に変化するが、Fig. 5に示したようにリパーゼによるエステル交換反応の活性が圧力によって大きく変化する。過剰の水の添加によって活性が減少することから、この原因は水の溶解度起因していないと考えられた。また、プロパンやヘキサン中では圧力を変えてもその活性は変化しなかったことから、圧力によるものでもないことが明らかになった。さらに、溶媒の誘電率が互変異性にも影響を与えることが報告されている¹⁹⁾。*Subtilisin carlsberg* 或いは *Aspergillus* プロトアーゼによる N-acetyl-(L or D)-enylalanine ethyl ester とメタノールの反応において、フルオロフォルムの誘電率の変化によって互変異性の変化が生じる。この結果を Fig. 6 に示した。また、*Subtilisin carlsberg* によるエステル交換反応においても圧力依存性が観察され、基質特異性や不斉選択性の変化が報告されている³³⁾。

最近、酵素の表面を脂質分子で被覆し疎水化した修飾酵素を用いることにより、極性の低い超臨界流体中でも均一反応系を構築できることが明らかになり³⁴⁾、エステル化、エステル交換反応、配糖化反応が効率良く進むことが示された。Fig. 7 に修飾 β -ガラクトシターゼを用いた配糖化反応に及ぼす圧力効果を示した。すなわち、40℃で二酸化炭素の臨界圧力以上の 100 atm まで昇圧す

Fig. 6 The Effect of Pressure on Enantioselectivity for the Reaction between N-Acetyl-(L or D)-Phenylalanine Ethyl Ester (20 mM) and Methanol (1 M) Catalyzed by *Aspergillus Protease* and *Subtilisin Carlsberg* at 50℃.

Fig. 7 Effect of (a) Changing Temperature at 150 atm and (b) Changing Pressure at 40℃ on the Initial Rate of Transgalactosylation.

ると、修飾酵素は超臨界相に溶解し均一系を形成することにより、酵素分子、基質分子の物質移動が容易になり反応速度は10倍以上に増加した。

6.3 臨界点近傍での反応特異性

6.3.1 エステル合成反応

Table 4 に超臨界二酸化炭素中での *Candida cylindracea* (CCL) リパーゼによるシトロネロールとオレイン酸のエステル化反応において、異なる温度、圧力下で生成する oleic acid, 3,7-dimethyl-6-octenyl-ester (以後、エステル生成物 1 と呼ぶ。)の光学純度を示した⁷⁾。なお、oleic acid 3,7-dimethyl-6-octenyl-ester が唯一のエステル生成物である。光学純度 $[\alpha]_D$ は、 $[\alpha]_D = \alpha / (C \times l)$ から決定した。ここで、 α は比旋光度、 C は濃度、 l は光路長である。Table 4 より明らかなように、エステル生成物 1 の光学純度は著しく反応条件に依存し、特に 8.41 MPa, 304.1 K では 98% e.e. に達し、(S)-(–)-

Table 4 Reaction Rate, Optical Purity, and Yield of Product for the Esterification of (±)-Citronellol and Oleic Acid in SC-CO₂.

Pressure (MPa)	Temperature (K)	Reaction rate ^{a)} $\mu\text{mol h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{cat}^{-1}$	$[\alpha]_D$	Optical purity ^{b)} (% e.e.)
7.58	308	3.08	-0.45	23.4
8.41	308	8.58	-0.08	4.1
10.15	308	10.18	-0.04	2.1
15.03	308	13.94	-0.04	2.1
19.03	308	15.81	0.00	0.0
8.41	304	9.27	-1.90	98.9
8.41	313	6.27	-0.04	2.1

a) μmol of oleic acid 3,7-dimethyl-6-octenyl ester formed.

b) Determined by dividing $[\alpha]_D$ observed by $[\alpha]_D - 1.92$ for the ester formed from (S)-(–)-citronellol and oleic acid at 353 K in the presence of concentrated sulfuric acid.

エステル生成物 1 をほぼ立体選択的に合成できた。しかし、上述の反応条件より温度、圧力がわずかに異なる条件下では、その選択性はほとんど失われることが分かった。同様な反応を水飽和シクロヘキサン中で行ったが、立体選択性は全く得られなかった。また、以前に報告された³⁵⁾ CCL を用いた水飽和シクロヘキサン中での 5-フェニル吉草酸とシトロネロールのエステル化反応においても、そのような立体選択性は得られなかった。

Fig. 8 に温度 308.1 K, 圧力 6.86~24.50 MPa での n-吉草酸とシトロネロールのエステル化反応における n-valeric acid 3,7-dimethyl-6-octenyl ester (以後、エステル生成物 2 と呼ぶ。) を生成する反応速度を示した^{7,37)}。興味深い圧力依存性を示し、反応速度は臨界点付近での 7.55 MPa で最大値 282.1 $\mu\text{mol h}^{-1}/\text{g}$ -酵素に達し、その後圧力の増加と共に著しく減少した。このように超臨界流体中での酵素反応においては、速度の単調な圧力依存性は報告されていた^{10,11)} が、特定の圧力下で最大値を有するのは初めての知見である。

Fig. 8 に併せて超臨界二酸化炭素の Kamlet-Taft の α 値を示した。なお、超臨界二酸化炭素の Kamlet-Taft の α 値については、以前に高圧 UV/Vis 装置を用いて溶バトクロミズム法により推算した^{1a)}。低圧下では溶バトクロミズムプローブ分子が溶解しないため、Kamlet-Taft の α 値を測定できなかったが、低圧二酸化炭素はほぼ不活性気体であるので、 α 値をゼロと仮定しても妥当と考えられた。図より Kamlet-Taft の α 値の圧力依存性はエステル化反応速度のそれと極めて似ていることが分かる。 α 値は超臨界二酸化炭素の電子受容力の大きさを表す指標であることから、その効果が反応速度の増大を引き起こしたと推測された。

臨界点付近で基質のローカル濃度が増大する可能性も

Fig. 8 The Rate of Esterification between n-Valeric and Citronellol Catalyzed by *Candida cylindracea* in SC- CO_2 (●) and the α -Value of SC- CO_2 (○) as a Function of Pressure at a Temperature of 308.2 K.

示唆されており^{1c,36)}、本研究でも酵素活性点での反応物のローカル濃度の増大が反応促進効果を引き起こしている可能性が考えられる。

6.3.2 酵素活性とコンフォメーション変化

Fig. 9 に 304.1 K で昇圧した際の ZnS 板上の CCL 膜の重量 (W) に換算したときの重量変化率 ($\Delta W/W$) と CCL 1 分子に対する二酸化炭素分子数 (N_{CO_2}/N_E) を示した。この図より、上記の立体選択性を示した圧力範囲とほぼ同じ 8 MPa 付近で顕著な重量増加が観測されたが、他の圧力範囲ではそれは急激に失われた。このことは CCL 分子上で二酸化炭素分子が凝集し、CCL と二酸化炭素分子との相互作用が著しく増大することを示唆しており、新たに凝集しクラスターを形成してくる二酸化炭素分子数は CCL 1 分子あたり、3000 以上にも達した^{4,38)}。

Fig. 10 に超臨界二酸化炭素中での CCL 膜の IR スペクトルの強度変化とエステル合成反応における光学純度の圧力依存性を示した。2860 cm^{-1} と 2963 cm^{-1} は C-H 伸縮振動、1722 cm^{-1} と 1760 cm^{-1} は C=O 伸縮振動の吸収波数である。7.5~8.5 MPa の範囲で 2860 cm^{-1} , 2963 cm^{-1} , 1722 cm^{-1} , 1760 cm^{-1} の吸収強度が著しく増大することが分かる。このことは、酵素表面にエステル種あるいは R-CONH 種のようなものが新たに生成してきたことを示唆している。 α -ヘリックス構造の吸収強度が減少したことから、二酸化炭素分子が α -ヘリックス構造のアミノ酸のアルキル基間の相互作用に影響し、アミノ酸間をリンクさせる可能性が推測された。また、昇圧・減圧過程 (6.86 MPa→19.10 MPa) での各圧力での吸収スペクトルに差がなかったことから、超臨界二酸化炭素中では CCL 構造が圧力により可逆的に変化することも

Fig. 9 Pressure-dependence of Change of Weight of CCL Film at Pressure of 6.86~19.12 MPa at 304.1 K. $\Delta W/W$ represents changes in weight of CCL film relative to the initial value.

Fig. 10 Changes of Intensities of Absorption Bands at 1722 ($\triangle$, $\blacktriangle$), 1760 ($\diamond$, $\blacklozenge$), 2963 ($\square$, $\blacksquare$), and 2860 cm^{-1} (∇ , $\blacktriangledown$), during Upward (Open Symbols) and Downward (Filled Symbols) Pressure Cycles (6.86–19.12–6.86 MPa) and of Percent e.e. ($\times$) of (S)–(–)-Oleic Acid 3, 7-Dimethyl-6-Octenyl Ester during the Esterification from Oleic Acid, and ($\pm$)–Citronellol.

明らかになった。このような報告例はほとんどない。さらに、光学純度が著しく増大する圧力範囲はCCLの2次構造変化が生じたそれと一致し、立体選択性の発現は酵素の2次構造変化と密接に関係していることが分かった⁴⁾。

X線回折法によりCCL構造が明らかにされた³⁹⁾が、最も特徴的な点は疎水のポリペプチド鎖が活性点を“蓋”のように覆ってクローズ化されている点である。さらに、その蓋構造の動き(回転)によりオープン構造が生成すると、それとともない活性点付近の疎水性表面の増加、2次構造のrefoldingによりフレキシブルに変位⁴⁰⁾、リパーゼ活性は α -ヘリックスの“蓋”構造の動きに密接に関係していることに注目が集まっている⁴¹⁾。IRデータから、臨界点付近でのCCLの2次構造変化が、蓋構造の α -ヘリックスの部分が激しい動きを伴って振動していることが考えられる。超臨界二酸化炭素は疎水性化合物と強い相互作用を有することから、蓋構造の α -ヘリックスを形成するアミノ酸のアルキル基同士が二酸化炭素分子との相互作用により、蓋構造を形成するアルキル鎖からなる疎水種同士が活性点の周りで表面に突き出たような形を取り、そのためトンネル構造の入り口をブロックしていた蓋構造がオープン化され、結果的に基質分子の活性点への近接が容易になったと推測された。また、臨界点付近での二酸化炭素とCCL分子間の強い相互作用が、トンネル構造に脂肪酸を押し込むことに都合よく働いたとも考えられる。臨界点付近では二酸化炭素がCCL活性化のトリガーとして働き、立体選択性を発現させるものと推察した。

7 おわりに

超臨界流体中で多くの生体触媒反応が検討されてきた。超臨界流体を反応媒体とすることにより、温度、圧力のみで物理化学的な溶媒特性を制御することが可能であり、水や有機溶媒の代替溶媒として、また気体、液体につぐ第三の溶媒として注目されている。温度、圧力によって基質分子、生成物、さらには酵素分子の溶媒和状態が変化することから、反応速度や選択性の向上をもたらす可能性も大きく、酵素反応の新しい反応場として有望である。今後、超臨界状態、とりわけ臨界点付近での反応性や反応機構を明らかにすることにより、さらなる展開が期待できる。

文 献

- 1) a) Ikushima, Y., Saito, N., Arai, M., and Arai, K., (1991) *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **64**, 2224; b) Ikushima, Y., Saito, N., Arai, K., and Arai, M., (1992) *Ind. Eng. Chem. Res.*, **31**, 568; c) Ikushima, Y., Saito, N., and Arai, M., (1993) *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **66**, 1817; d) Ikushima, Y., Hatakeda, K., Saito, N., and Arai, M., (1998) *J. Chem. Phys.*, **108**, 5855; e) Ikushima, Y., Saito, N., and Arai, M., (1998) *J. Phys. Chem. B*, **102**, 3029.
- 2) a) Sun, Y.-P., Fox, M.A., and Johnston, K.P., (1992) *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 1187; b) Chialvo A.A., and Debenedetti, P.G., (1992) *Ind. Eng. Chem. Res.*, **31**, 1391.
- 3) a) Ikushima, Y., Sato, O., and Yokoyama, T., (1998) *J. Org. Chem.*, **64**, 9100; b) Ikushima, Y., Sato, O., Hatakeda, K., and Arai, M., (1999) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **38**, 2910; c) Ikushima, Y., Hatakeda, K., Sato, O., and Arai, M., (2000) *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 1908; d) Kawanami, H., and Ikushima, Y., (2000) *Chem. Commun.*, 2089.
- 4) Ikushima, Y., Saito, N., Arai, M., and Blanch, H.W., (1995) *J. Phys. Chem.*, **99**, 8941.
- 5) 森俊明, 岡畑恵雄, (1999) 化学と工業, **52**, 1502.
- 6) Randolph, T.W., Blanch, H.W., Prausnitz, J.M., and Wilke, C.R., (1985) *Biotechnol. Lett.*, **7**, 325.
- 7) Ikushima, Y., Saito, N., Yokoyama, T., Hatakeda, K., Ito, S., Arai, M., and Blanch, H.W., (1993) *Chem. Lett.*, 109.
- 8) Ikushima, Y., Saito, N., and Arai, M., (1993) *J. Chem. Eng. Jpn.*, **29**, 551.
- 9) Hammond, D.A., Karel, M., Klibanov, A.M., and Krukonis, V.J., (1985) *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **11**, 393.
- 10) Erickson, J.C., Schyns, P., and Cooney, C.L., (1990) *AIChE J.*, **36**, 299.
- 11) Randolph, T.W., Blanch, H.W., and Prausnitz, J.M., (1988) *AIChE J.*, **34**, 1354.
- 12) Nakamura, K., (1990) *TIBTECH*, **8**, 288.
- 13) Altonen O., and Rantakyla, M., (1991) *CHEMTECH*, 240.
- 14) Mesiano A.J., and Beckman, E.J., and Russell, A.J., (1999) *Chem. Rev.*, **99**, 623.
- 15) Kasche, V., Schothauer, R., and Brunner, G., (1988)

- Biotechnol. Lett.*, 10, 569.
- 16) Kamat, S., Barrera, J., Beckman, E.J., and Russell, A.J., (1992) *Biotech. Bioeng.*, 40, 158.
 - 17) Chulalsanukul, W., Condoret, J.-S., and Combes, D., (1993) *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 691.
 - 18) Affleck, R., Xu, Z.-F., Suzawa, V., Focht, K., Clark, D.S., and Dordick, J.S., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89, 1100.
 - 19) Russell, A.J., Beckman, E.J., and Chaudhary, A.K., (1994) *CHEMTECH*, 33.
 - 20) Chrastil, J., (1982) *J. Phys. Chem.*, 86, 3016.
 - 21) Wiebe, R., and Gaddy, V.L., (1941) *J. Am. Chem. Soc.*, 63, 475.
 - 22) Randolph, T.M., Clark, D.S., Blanch, H.W., and Prausnitz, J.M., (1988) *Science*, 239, 387.
 - 23) J.K.P. Weder, Z. (1980) *Lebensm. Unters. Forsch.*, 17, 95; (1984) *Food Chemistry*, 15, 175.
 - 24) Taniguchi, M., Kamihara, M., and Kobayashi, T., (1987) *Agric. Biol. Chem.*, 51, 593.
 - 25) a) Nakamura, K., Chi, Y., Yamada, Y., and Yano, T., (1986) *Chem. Eng. Commun.*, 45, 207; b) Nakamura, K., "Bioproducts and Bioprocesses", Springer-Verlag, New York (1989), p. 257.
 - 26) King, J.W., Eissler, R.L., and Friedlich, J.P., "Supercritical Fluid Extraction and Chromatography, ACS Symp. Ser., 366, Am. Chem. Soc. (1988), p. 63.
 - 27) Ehrlich, P.J., (1971) *Macromol. Sci. Chem. A* 5, 1259.
 - 28) Morild, E., (1981) *Adv. Protein Chem.*, 34, 91.
 - 29) Kunugi, S., and Fukuda, M., (1985) *Seibutsu Butsuri (Biological Physics)*, 25, 192.
 - 30) Chi, Y.M., Nakamura, K., and Yano, T., (1988) *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1541.
 - 31) Pasta, P., Mazzola, G., Carrea, G., and Riva, S., (1989) *Biotechnol. Lett.*, 11(9), 643.
 - 32) a) Dordick, J.S., Beckman, E.J., and Chaudhary, A.K., (1994) *CHEMTECH*, January p. 33; Dordick, J.S., (1992) *Trends Biotechnol.*, August 10, p. 287.
 - 33) Kamat, S.V., Beckman, E.J., and Russell, A.J., (1993) *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 8845; (1995) *Crit. Rev. Biochem.*, 15, 41.
 - 34) a) Mori, T., Kobayashi, A., and Okahata, Y., (1998) *Chem. Lett.*, 921; b) Mori, T., and Okahata, Y., (1998) *Chem. Commun.*, 2215.
 - 35) Sonomoto, K., and Tanaka, A., (1988) *An. N.Y. Acad. Sci.*, 542, 235.
 - 36) Ellington, J.B., and Brennecke, J.F., (1993) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1094.
 - 37) Ikushima, Y., Saito, N., Hatakeda, K., and Sato, O., (1996) *Chem. Eng. Sci.*, 51, 2817.
 - 38) Ikushima, Y., (1997) *Adv. Colloid Interface Sci.*, 71-72, 259.
 - 39) Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J.D., and Cygler, M., (1994) *Protein Sci.*, 3, 82.
 - 40) Grochulski, P., Bouthlillier, F., Kazalaukas, R.J., Serreqi, A.N., Scharag, J.D., Ziomek, E., and Cygler, M., (1994) *Biochemistry*, 33, 3494.
 - 41) Schrag, J.D., Li, Y., Wu, S., and Cygler, M., (1991) *Nature*, 351, 761.