

内3-11

早稲田大学大学院理工学研究科

# 博士論文概要

## 論文題目

A CHEMICAL ENGINEERING STUDY  
ON BIOCATALYSTS AND THEIR  
APPLICATION TO BIOPROCESSES

(生体触媒とそのバイオプロセスへの応用に関する化学工学的研究)

申請者

平田 誠

MAKOTO HIRATA

応用化学専攻・化学工学研究

平成 3 年 11 月

近年、遺伝子工学や蛋白質工学の発達とともに微生物のスクリーニング、変異、育種や酵素の精製、改質、大量生産に関する技術が確立しつつあり、今後のバイオプロセスの発展に期待が持たれている。しかしながら、現在のバイオプロセスは、未だ古くより用いられている発酵法が主流であり、コモディティーケミカルなどの化学法による生産法が確立したプロセスへの導入例はまれである。これは、生化学法が常温・常圧の温和な条件で合成可能であるなどの原理的に優れる面を有する反面、取り扱いの困難さや反応速度を高めることの困難さなどを有することに由来する。このような問題点を克服するためには、生体触媒の特性を十分に把握し、その特性を有効に活用する技術が重要であり、このための周辺的技術の開発およびバイオリアクターの高効率化が望まれている。

これらの観点から本論文では、①微生物・酵素の特性解明、②微生物特性自動収集システムの開発および③高機能バイオリアクターの開発を柱として研究し、生体触媒をバイオプロセスへ応用する際の基礎的技術の確立を主たる目的とした。それぞれの研究においては工学的意義を高めるために、①光感応性微生物・酵素、②汎用発酵プロセスおよび③アスパルテーム前駆体合成反応を対象とした。

本論文は全10章で構成され、研究対象により3部に分類した。以下にその概要を示す。

序章では、バイオプロセスの中核をなすバイオリアクターの開発に関する研究を整理し、生体触媒の特性に応じたバイオプロセスの開発により高効率化が可能であるという具体例を示し、また、アスパルテーム合成に関して商業化されている技術と酵素法によるアスパルテーム前駆体合成に関する既往研究を整理することにより本研究の目的・意義を明確にした。

第1部においては、光に感応してニトリル水和活性を変化させるという未だ例を見ない性質を有する微生物 *Rhodococcus* sp. H-771 とこれより分離精製した酵素ニトリルヒドラーゼをとりあげ、これら生体触媒の特性を解明した。

第1章では、光感応性微生物と粗抽出液の光感応性を解明した。本微生物のニトリル水和活性は暗放置により不活性化し、光により活性化する。ここでは、不活性化と活性化は可逆的であること、不活性化現象が酸素要求性で温度に依存すること、嫌氣的暗放置において活性はほとんど変化しないが光照射により15%程度失活することなどを明らかにした。また粗抽出液の特性も検討し、不活性化現象および光失活はみられないが、光活性化は起こることなどを明らかにした。

第2章では、光感応性微生物からの酵素ニトリルヒドラーゼの分離精製法を確立し、本酵素の諸特性を解明した。ニトリル水和反応を触媒するニトリルヒドラーゼの単離に成功し、分子量 6 kDa で2つのサブユニットから成ること、1分子当たり2個の鉄原子を有すること、本酵素単独で光活性化することなどを明らかにした。また、活性型で放置した場合と不活性型で放置して反応直前に活性

化した場合とでは後者の方が安定性が高く極めて高い活性が得られることを明らかにし、不活性型酵素は活性部位がなんらかの形で保護されていることが推察された。さらに活性型酵素を用いて酵素としての諸特性を検討し、基質特異性に関してはクロロアセトニトリルに対し高い活性を示すこと、金属イオンの影響に関してはカドミウム、鉛イオンにより50%失活するという特異的性質を有することなどを明らかにした。

第3章では、光感応性酵素の補酵素と光受容体を解明した。ここでは紫外可視吸収光、蛍光、円偏光二色性、アクションスペクトルなどの光学的分析により、活性化の際にコンフォメーション変化をとともなうこと、特異な構造を持つ2つの非ヘム鉄、補酵素ピロロキノリンキノン(PQQ)様化合物およびトリプトファンが光感応性に関与していることなどを明らかにし、さらにここで不活性型酵素のトリプトファンが290 nm付近の紫外光を受容してそのエネルギーを非ヘム鉄に受け渡すことにより光活性化が引き起こされているという機構を提案した。

第2部においては、バイオプロセスの例として最も汎用性の高い発酵プロセスをとりあげ、この高度自動化を検討した。省労力・短時間でかつ熟練者の知識・経験などに基づく判断に依存せずに遺伝子操作・変異などで生み出された無数の新菌株の諸特性把握を可能とするため、ラボスケールで特性データを自動的に収集するシステムの開発を究極の目標とし、ここで予測される様々な異常に対処する培養操作支援システムを開発した。特に診断に柔軟性を持たせるため、本システムには従来具体的な研究例・開発例の無い人工知能(AI)を適用した。

第4章では、微生物の特性データを自動的に収集するインテリジェント発酵システムを提案した。本システムは、ロボットにより培養操作を行う工場、プロセス総合的異常診断用エキスパートシステムを備えたコントローラ、プロセス設計用エキスパートシステムを備えたデータサーバ、データベースにより構成される。このようなシステムの開発により微生物の特性把握からそれに応じた効率的プロセスの設計までの一連の自動化ができる可能性を示した。

第5章では、上記の提案に基づき、発酵プロセス異常診断用エキスパートシステムを開発した。ここではAIを利用して診断に必要な知識を組み込んだ信頼性の高い診断法を開発し、温度・pH・溶存酸素制御系の診断用エキスパートシステムを構築した。さらに機器の故障などの典型的異常に関して診断を実行し、システムの妥当性を確認した。

第3部においては、ペプチドの酵素合成の例として代表的なアスパルテーム前駆体(Z-L-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル)の合成をとりあげ、高機能なバイオリアクターを開発した。これとともに最適制御などにおいて必要となる酵素合成反応の解析に関し、信頼性・実用性の高い速度論的・平衡論的解析法を提案した。

第6章では、生成物分離を伴うバイオリアクターによるアスパルテーム前駆体

の効率的連続合成法を提案した。抽出および沈殿生成によるアスパルテーム前駆体の分離に適した有機溶媒を選定し、従来より使用されている酢酸エチルは酵素反応を阻害するなどの問題を有することを明らかにするとともに、酢酸ブチルはそれらの問題を克服できることを明らかにした。この知見に基づき、酢酸ブチルを生成物抽出だけでなく基質供給にも使用した操作法による反復回分合成を行い、抽出の応用により遊離酵素を容易に再利用できることを示した。

第7章では、遊離酵素を連続的に用いてアスパルテーム前駆体を連続合成するバイオリアクターを開発した。上記の有機溶媒から基質を供給する操作法を応用し、ベンチスケールの塔型バイオリアクターによる連続合成を試みたところ、遊離酵素を用いて100時間にわたる安定操作が可能であった。ここでは塔内水相へ脈動を付加することにより偏流を防止し、効率よく反応および抽出を行い、収率100%を達成することができた。

第8章では、アスパルテーム前駆体酵素合成における反応速度の新規解析法を確立した。Theorell-Chance機構およびCompulsory-orderシステムに基づくモデルを用いて迅速平衡解析により反応速度式を提出し、さらに反応の経時変化に関する実験結果よりこれらの式における速度定数および解離定数を提出した。また解析結果より従来の速度解析に使用されている初速度について考察し、本系においては反応開始とともに反応速度が急激に低下するため、従来法では厳密な初速度の測定が不可能であることを明らかにし、ここで示した初速度測定によらない解析法の有用性を示した。

第9章では、アスパルテーム前駆体酵素合成における生成物・アミン基質複合体生成平衡の解析法を確立した。本反応において生成物がアミン基質との1:1複合塩沈殿として得られることを確認し、その複合体生成平衡に関する詳細機構モデルを提案し、生成物のみかけの溶解度から解析式中の複合体の生成定数、解離定数、非イオン性分子飽和濃度の値を求めた。本解析により生成物の溶解度をpHおよびアミン基質濃度の関数として表すことを可能とした。さらに溶液中の複合体の濃度について考察し、通常の酵素反応条件下においては溶液中に複合体がかなりの濃度で存在することを見出し、酵素反応等に大きく影響していることが示唆された。さらに本解析法が反応速度、収率の改善のために適用可能であることだけでなく、今後はジアステレオマー法による光学分割への応用などへ発展し得る可能性を示した。

以上、生体触媒の諸特性の解明、バイオプロセスの高度制御、高機能バイオリアクターの開発に関して本論文において得られた数々の知見や手法は今後のバイオプロセスの発展に寄与するところが極めて大きいものと信ずる。