

## 酸化反応プロセス代替バイオリアクター

## Bioreactor for Oxidation Processes

田 中 渥 夫\*

Atsuo Tanaka

## 1. はじめに

生物は様々な酸化還元反応を営んでいるが、これらの反応を触媒する酸化還元酵素には、酸化型ピリジヌクレオチド(ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド, NAD<sup>+</sup>:ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸, NADP<sup>+</sup>)を水素受容体としたり,逆に還元型ピリジヌクレオチド(NADH, NADPH)を水素供与体とするデヒドロゲナーゼ(脱水素酵素), 酸素を水素受容体とするオキシダーゼ(酸化酵素), 分子状酸素の基質への取り込みを触媒するオキシゲナーゼ(酸素添加酵素)など, 多種類のものがある。酸化還元酵素は多種多様な化合物を立体選択的, 位置選択的に酸化あるいは還元することができるので, 適当な酵素を選ぶことにより優れた酸化還元プロセスを組み立てることができる。

酵素を触媒とする生化学反応は, 高温高压を必要としないので所要エネルギーを大幅に節約できることや, 特定の構造の化合物の特定の部位に立体選択的に反応が起こるので副生成物が少なく, 反応収率の向上が期待できるなどの利点を有している。このような生化学反応を, 有用物質の生産, 様々な物質の分析や定量, 医療, 環境汚染物質の処理などに応用するシステムがバイオリアクター(広義)である。

しかしながら, 省資源, 省エネルギーをめざしたバイオリアクターにおいては, 触媒となる酵素をリアクター内に安定に保持しつつ, 連続あるいは繰り返し反応を行わせることが必要である。このようなバイオリアクターにおいては, リアクター内に酵素を保持しておくための固定化の技術が必須となる。固定化酵素を触媒として用いるシステムは狭義のバイオリアクターと称せられるが, 本項ではこの狭義のバイオリアクターを中心に, いくつかの生化学的酸化プロセスを紹介し

たい。

なお, 触媒としては酵素のみならず, 様々な酵素あるいは一連の酵素系を含んだ微生物菌体を用いることも多く, これらを総称して生体触媒と呼ぶ。

## 2. アルケンオキシドの生産

化学工業におけるバイオリアクターの応用に関して, わが国に最も大きなインパクトを与えたのは米国Cetus社が発表した酵素法によるアルケンのアルケンオキシドへの変換であろうと思われる。このプロセスは, 図-1に示すように3つのステップからなっている<sup>1)</sup>。すなわち, オキシダーゼによる過酸化水素の生成, アルケン, ハライドイオンおよび過酸化水素からハロペルオキシダーゼを触媒としたアルケンハロヒドリンの生成, およびハロヒドリンエポキシダーゼによるアルケンオキシドの生成, である。

オキシダーゼとしては, メタノールを基質としてホルムアルデヒドを生成する酵母のアルコールオキシダーゼ, D-グルコースを基質としてD-グルコソク(これはパラジウム触媒でD-フルクトースに還元される)を生成する糸状菌のピラノース-2-オキシダーゼ, D-グルコースを基質としてD-グルコノ- $\delta$ -ラクトン(これは水中で加水分解されてD-グルコン酸となる)を生成する糸状菌のグルコース-1-オキシダーゼなどを利用することができる。また, グルコース-1-オキシダーゼはD-グルコソクを基質として, D-2-ケトグルコン酸(塩酸存在下加熱してフルフラールに変換することができる)を生成するので, ピラノース

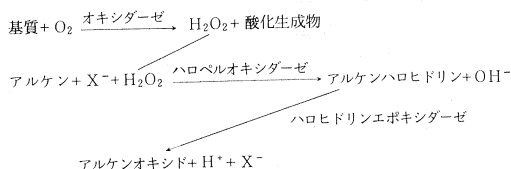


図-1 酵素法によるアルケンのエポキシド化<sup>1)</sup>

\* 京都大学工学部工業化学教室助教授  
〒606 京都市左京区吉田本町

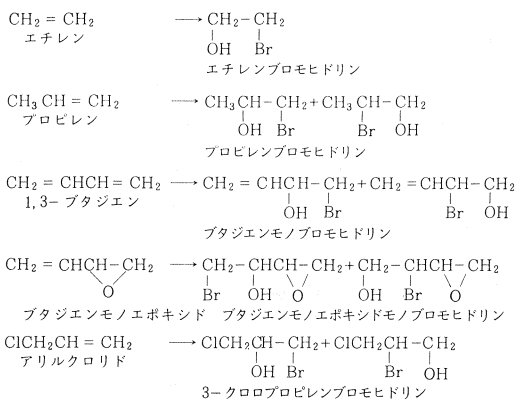


図-2 ハロペルオキシダーゼによるアルケンブロモヒドリンの生成<sup>1)</sup>

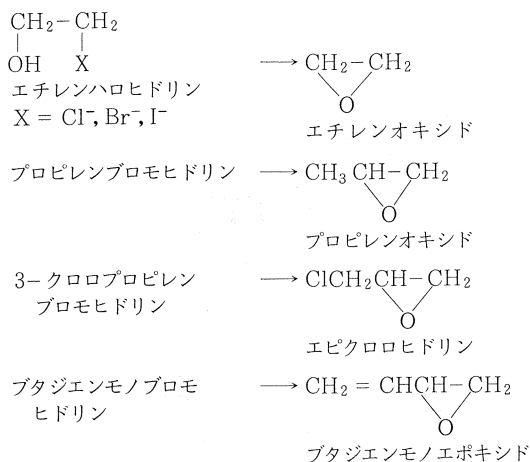


図-3 ハロヒドリンエポキシダーゼの触媒する反応<sup>1)</sup>

2-オキシダーゼと組み合わせて用いることも可能である。

ハロペルオキシダーゼとしては、Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup> を

活性化する糸状菌のクロロペルオキシダーゼや白血球のミエロペルオキシダーゼ、Br<sup>-</sup>とI<sup>-</sup>に作用するミルク中のラクトペルオキシダーゼや海藻中のプロモペルオキシダーゼ、I<sup>-</sup>のみを活性化する甲状腺や西洋ワサビのペルオキシダーゼがあるが、酵素の生産性の点でクロロペルオキシダーゼが最も優れている。このようなハロペルオキシダーゼは、様々なアルケン類をハロヒドリンに変換することができる(図-2)。

第三の反応を触媒するハロヒドリンエポキシダーゼは *Flavobacterium* 属細菌から得られ、図-3に示したように、種々のハロヒドリンからアルケンエポキシドを生成しうるが、このプロセスでは、酵素を精製することなく微生物菌体をそのまま触媒として用いている。

これら3つのステップを触媒する酵素あるいは菌体は、それぞれ様々な方法で固定化されている(表1)。固定化は酵素の安定性を高めるのに役立っているようである。

Cetus社のプロセスは現在までのところ工業化されていないが、その理由として、過酸化水素の安価な製造法が見つかっていないことが挙げられる。例えば、D-グルコースを基質としてD-グルコソンを得た場合、このD-グルコソンをD-フルクトースに変換しても、他の方法で得られるD-フルクトースに比べて価格が高くなり、市場価値はない。従って、エチレンオキシドやプロピレンオキシドのような低価格の製品を作るためには、きわめて安価な過酸化水素の供給法を確立することが必要である。

ハロヒドリンを経ることなく、アルケンを直接エポキシド化する方法もいくつか報告されている。例えば、細菌 *Pseudomonas oleovorans* の脂肪酸 ω-水酸化酵素系(ヒドロキシラーゼ、ルブレドキシシンおよびルブレドキシシンレダクターゼからなる)はオクタジエン

表1 アルケンオキシド生産プロセスに用いられた固定化生体触媒<sup>1)</sup>

生体触媒	固定化法	固定化担体
グルコース-1-オキシダーゼ	共有結合法	AH-セファロース 4B
ピラノース-2-オキシダーゼ	共有結合法	AH-セファロース 4B
ピラノース-2-オキシダーゼ	吸着法	松のおがくず
細胞破砕物 (ピラノース-2-オキシダーゼ)	包括法	ポリアクリルアミドゲル
クロロペルオキシダーゼ	イオン結合法	DEAE-セファデックス A50 ビーズ
プロモペルオキシダーゼ	共有結合法	多孔性ガラスビーズ
<i>Flavobacterium</i> sp. 菌体 (ハロヒドリンエポキシダーゼ)	包括法	ポリアクリルアミドゲル

からR型の7,8-エポキシ-1-オクテンを光学純度80%で生成する<sup>2,3</sup>). また, *Corynebacterium equi* がR型の1,2-エポキシヘキサデカンを<sup>4</sup>), *Mycobacterium* sp. がR型のプロピレンオキシド, 1,2-エポキシブタンおよびS型のエピクロロヒドリン(1-クロロ-2,3-エポキシプロパン)を生成することも報告されている<sup>5</sup>). メタンを利用して生育した細菌も, プロピレンなど短鎖のアルケンをエポキシ化することができる<sup>6,7</sup>).

古橋ら<sup>8,9</sup>) が単離した細菌 *Nocardia corallina* はエチレンからオクタデセンまでの1-アルケンをエポ

キシド化し, 1,2-エポキシテトラデカンの場合, その収量は60 g/lに達する. この菌をポリアクルアミドゲルに包括してプロピレンオキシドの生産に利用しているが, 100ml容の気泡塔を用いた連続生産システムでは約1 g/l/日の生産性しか得られず, ゲル中への酸素の拡散が律速となるため生産性が向上しないのであろうと考えられている.

### 3. ステロイドの変換

コレステロールオキシダーゼは, 血中のコレステロールを測定するための臨床検査用酵素として用いられ

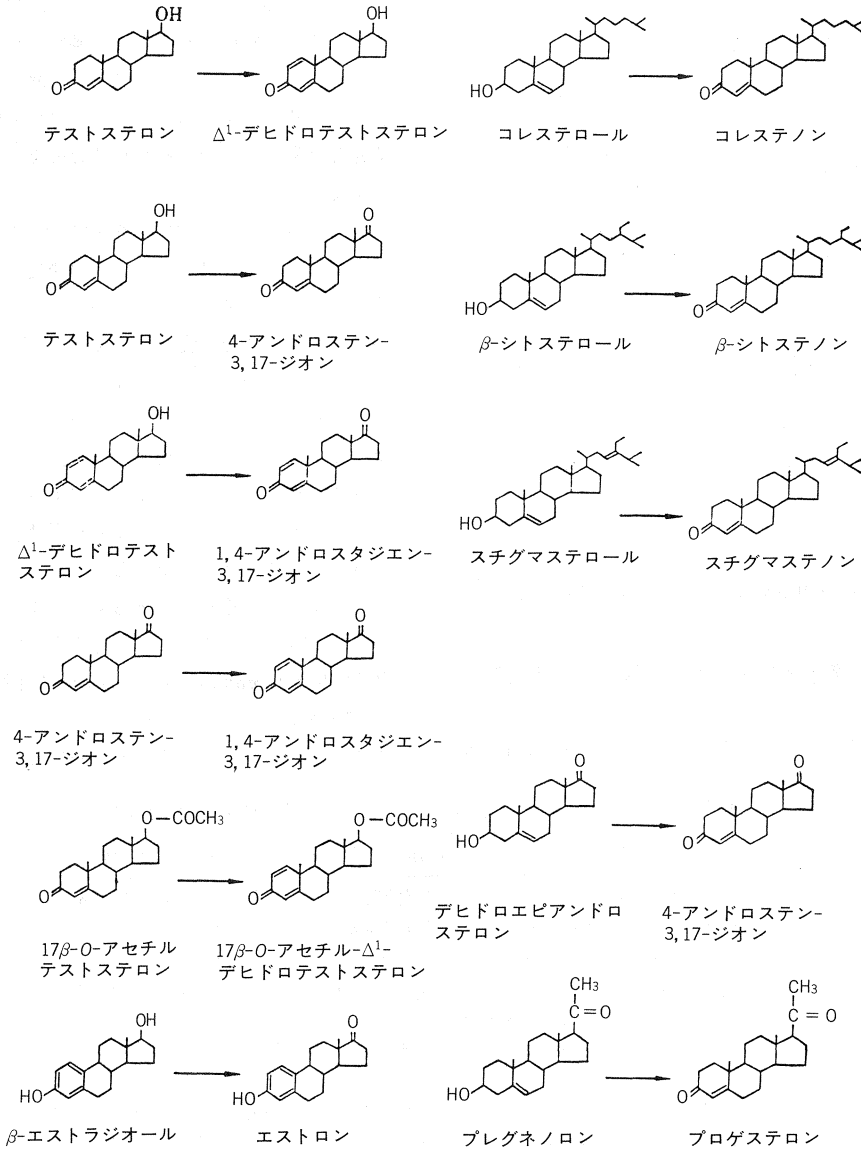


図-4 *Nocardia rhodocrous* の固定化菌体によって有機溶媒中で触媒されるステロイドの変換反応

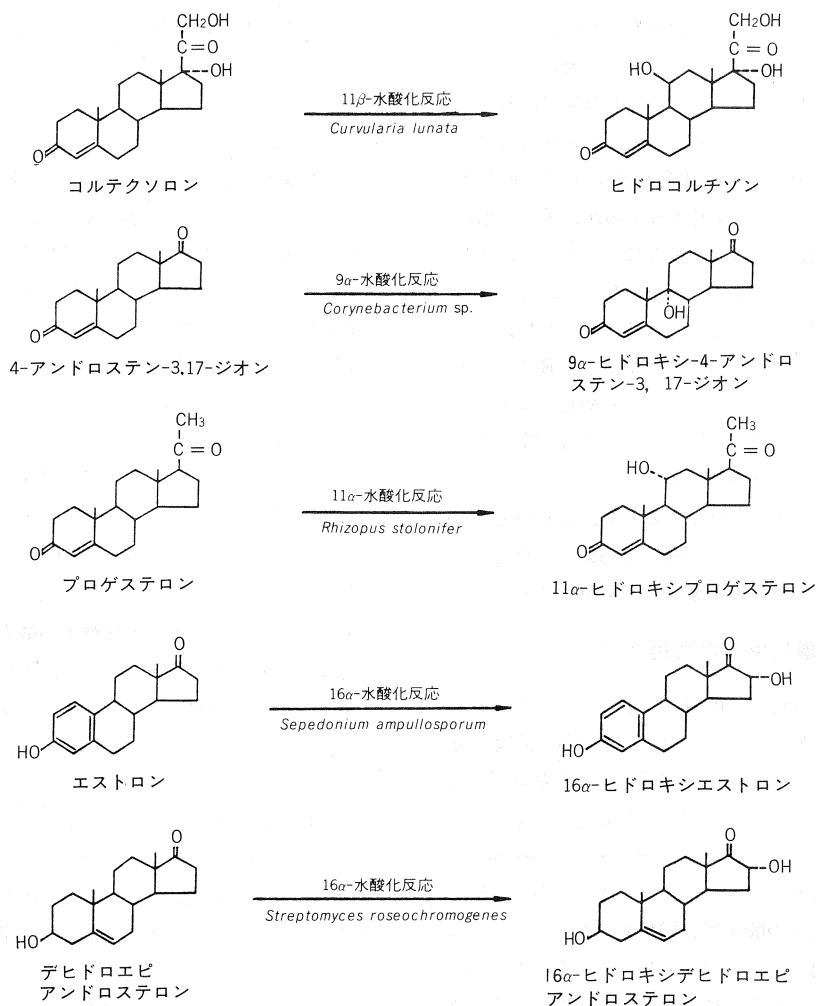
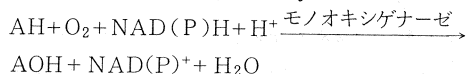


図-5 固定化微生物菌体によって触媒されるステロイド水酸化反応の例

るが、このようなステロイドを酸化しうる酵素を含有する微生物菌体は固定化生体触媒による脂溶性化合物変換のためのモデルシステムを構築するにあたって、重要な役割を演じてきた。例えば、細菌 *Nocardia rhodocrous* は 3 $\beta$ -ヒドロキシ- $\Delta^5$ -ステロイドを 3-オキソ- $\Delta^4$ -ステロイドに変換（例えばコレステロールのコレステノンへの変換）するだけでなく、 $\Delta^1$ -位脱水素反応（例えば 4-アンドロステン-3,17-ジオンの 1,4-アンドロスタジエン-3,17-ジオンへの変換）、17 $\beta$ 水酸基脱水素反応（例えばテストステロンの 4-アンドロステン-3,17-ジオンへの変換）をも触媒することができる（図-4）。これらの反応はすべて、固定化菌体を用いて有機溶媒中（例えばベンゼンと *n*-ヘプタンの混合液）で行うことができる。このような研究から、脂溶性化合物の生化学的変換には、化合

物の疎水性や溶媒の極性ととも、固定化に用いる担体の親水性-疎水性バランスが固定化生体触媒の活性や安定性に大きな影響を及ぼすことが明らかにされた<sup>10,11)</sup>。

ステロイドの生化学変換は、上述のような脂溶性化合物変換システムのモデルだけでなく、ステロイド医薬の合成に際しても重要なステップとなる。そのような例として、ステロイドの位置および立体選択的な水酸化反応を挙げることができる（図-5）<sup>10)</sup>。ステロイドの水酸化反応は、基質に酸素原子 1 つを導入するモノオキシゲナーゼ系によって触媒されるものと考えられるが、この際還元型ピリジンスクレオチド (NAD(P)H) の連続的な供給が必須となる。



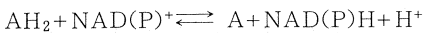
水酸化酵素系と NAD(P)H 供給酵素系とを組み合わせるのは今のところ困難であることから、両系を含有する微生物菌体を触媒として用いる方が有利である。

例えば、糸状菌 *Curvularia lunata* の菌糸はコレクソロン(ライヒスチン化合物 S) の 11 $\beta$ -位を水酸化してヒドロコルチゾンを生産するが、菌糸を遊離の状態では反応に使用すると菌糸の分解が起こり、水酸化活性は速やかに低下する。しかしながら、このような菌糸を均一に固定化することは難かしいため、糸状菌の胞子を固定化し、この固定化胞子を栄養培地中で培養することによって、ステロイド水酸化活性の高い固定化菌糸が得られている<sup>12)</sup>。このような固定化菌糸は、使用中に活性が低下した場合には再培養することによって活性化することができるため、きわめて有効な触媒となる。このように、酸化反応には生存している微生物の代謝活性を利用することも重要であろう<sup>13)</sup>。

#### 4. その他の酸化反応の利用<sup>14,15)</sup>

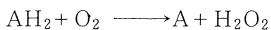
1982年に出版された「酵素ハンドブック」(丸尾文治, 田宮信雄監修, 朝倉書店)によれば、酸化還元酵素(オキシドレダクターゼ)として582種のもものが挙げられている。これらのすべてではないにしても、多くのものが酸化反応プロセス代替バイオリアクターの触媒素子として利用されうる可能性がある。また、酸化反応の多くが電子伝達系や酸化還元補酵素であるピリジヌクレオチド(酸化型および還元型)の再生系と共役していることを考えると、様々な酸化反応を行いうる微生物菌体の利用も重要なものとなる。

デヒドロゲナーゼは NAD(P)<sup>+</sup>を補酵素(あるいは補基質)として多くの化合物を酸化することができるが、現在のところ、バイオリアクターの素子としては、還元反応に必要な NAD(P)H の供給系として利用さ



れることが多い。このような例として、ギ酸を二酸化炭素に酸化するギ酸デヒドロゲナーゼやアルコールをアルデヒドに酸化するアルコールデヒドロゲナーゼがある。将来、水酸化反応に必要な NAD(P)H, とくに NADPH の再生に用いられる酵素の開発は重要なものとなる。

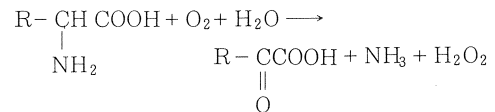
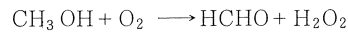
オキシダーゼは酸素を水素受容体として基質を酸化するとともに過酸化水素を生成する酵素である。従って、



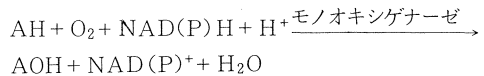
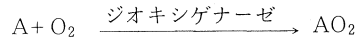
これらの酵素は酸素を指標とした物質測定に用いられることが多く、酸素電極と組み合わせた、いわゆる酵素

センサーの重要な触媒素子ともなる。このような酵素としては、グルコースオキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、L-アミノ酸オキシダーゼ、モノアミノオキシダーゼ、コリンオキシダーゼ、尿酸オキシダーゼ、ビルビン酸オキシダーゼ、グリセロリン酸オキシダーゼなどがあり、それぞれ薄膜状に固定化したのち酸素電極に装着され、センサーとして使用されている<sup>16,17)</sup>。

また、アルコールオキシダーゼを含有する酵母菌体を用いたメタノールのホルムアルデヒドへの酸化が注目を集めている<sup>18)</sup>。さらに、D-アミノ酸オキシダーゼあるいはL-アミノ酸オキシダーゼを利用した2-オキシ酸の生産も試みられている。

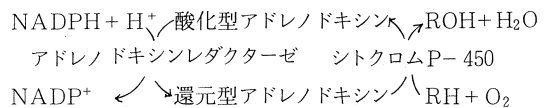


オキシゲナーゼには分子酸素の酸素原子2つを基質に導入するジオキシゲナーゼと、1つを導入するモノオキシゲナーゼがある。ジオキシゲナーゼのバイ



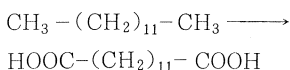
リアクターへの応用例はあまり知られていないが、芳香族化合物の生化学的変換などが今後さらに重要となる。

モノオキシゲナーゼは、すでに述べたアルケンオキシドの生成やステロイドの水酸化などに応用されている。動物の肝ミクロソームには、シトクロムP-450, アドレノドキシン, アドレノドキシンレダクターゼからなる水酸化系があり、外界から与えられた毒物の解毒に働くことから、様々な薬品による急性中毒の治療に役立てることが試みられている。例えば、適当なゲルやホローファイバーに包括したミクロソームを触媒素子とする人工肝臓の構築が考えられている。



*Pseudomonas* 属細菌では、先に述べたヒドロキシラーゼ, ルブレドキシンおよびルブレドキシンレダクターゼが水酸化酵素系として知られている。また酵母には、シトクロムP-450, NADPH-シトクロムP-450レダクターゼからなるアルカンや脂肪酸のメチル基

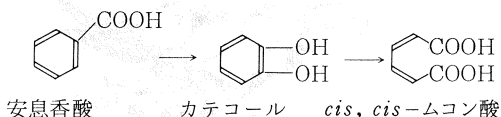
の水酸化酵素系が存在する。このような酵素系はアルカンからの二塩基酸の生産に利用しうる。固定化はされていないが、酵母 *Candida tropicalis* の菌体を用いた *n*-トリデカンからのブラシル酸の生産が日本鉱業㈱によって企業化されており<sup>19)</sup>、その他種々の二塩基酸の製造にも応用しうる。



## 5. 次世代産業基盤技術研究における酸化プロセスバイオリアクター

通産省工業技術院の次世代産業基盤技術研究の一つとしてバイオテクノロジーが取り上げられており、昭和56年度より10年計画で活動を開始しているが、ここでは組換え DNA 利用技術、細胞大量培養技術とともにバイオリアクターが主要な目標となっている。また、バイオリアクターのプロジェクトのなかには、還元型バイオリアクター (NAD(P)Hの供給システムとそれを利用した還元システムの構築) と酸化型バイオリアクターが含まれている。これらの研究の成果は、毎年開かれるシンポジウムにおいて報告されているが、<sup>20-22)</sup>ここに酸化型バイオリアクターに関する研究の概要をまとめてみる。なお、このグループには水素ガスと二酸化炭素からの酢酸の生産に関する研究も含まれているが、ここでは触れない。

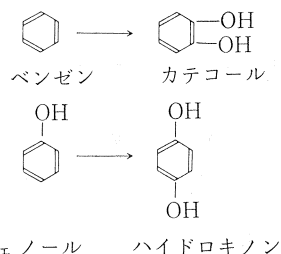
三菱化成工業㈱では、安息香酸やシクロヘキサンのような環式化合物、メタノールなどの安価な原料を利用して、有用な基礎化学製品を生産するバイオリアクターを構築するために研究を進めてきている。このなかで、安息香酸を基質として機能性樹脂等への用途が期待される *cis, cis*-ムコン酸を製造するためのバイオリアクターに力を入れ、土壌から単離した安息香酸資化菌株や保存菌株のなかから有力な菌株を選択するとともに、変異処理によって安息香酸からほぼ定量的に *cis, cis*-ムコン酸を生成する *Arthrobacter*



*sp.* の一変異株を得ている。増殖菌体を用いた反応系では、増殖および反応を阻害する安息香酸を少量ずつ逐次添加することによって、3日間の培養で約30g/ℓの *cis, cis*-ムコン酸が生産された。アルギン酸カルシウムで包括した菌体は、固定化しない菌体に比べて

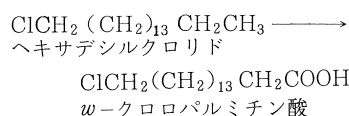
活性は低下するものの、再利用時には活性がほぼ維持されることが明らかにされている。

三菱瓦斯化学㈱では芳香族化合物の水酸化、特にベンゼンからのカテコール、フェノールからのハイドロキノンの生産を試みている。ブタン資化性細菌として



単離された *Mycobacterium sp.* は、菌体懸濁液にフェノールを逐次添加することにより、10時間で9.5g/ℓのハイドロキノンを蓄積した。さらに現在、ハイドロキノン耐性のある変異株が検索されつつある。

人工香料などの原料として利用される長鎖二塩基酸の *n*-アルカンからの工業的生産についてはすでにふれたが、花王㈱ではヘキサデシルクロリドのような、末端に置換基をもつ *n*-アルカンの未置換末端を酸化して、有用な二官能性の有機酸を生産しようとしている。土壌より分離された中等度好熱性細菌 *Mycobacter-*



*ium sp.* は低濃度ではあるが *w*-クロロパルミチン酸を生成するので、脂肪酸の  $\beta$ -酸化系を欠損した変異株の取得など、生産性の向上を旨とした育種が続けられている。

## 6. おわりに

以上、化学工業と関連が深いと思われるいくつかの生化学反応について述べてきた。固定化生体触媒を用いてこれらの反応系をバイオリアクターに組み込むためには、まだまだ解決しなければならない問題が山積している。より優れた生体触媒の取得はもちろんのことであるが、基質や生成物がガス状の化合物であったり、水に難溶性化合物であったりする場合が多い。また、基質や生成物が高濃度において微生物の生育や酵素反応を阻害することもある。酸化反応プロセス代替バイオリアクターの主目的は基礎化学製品の生産であると思われるから、反応速度が大きいことはもちろ

んのこと、高濃度の基質から高濃度の生成物を得ることが必須の条件となる。従って、今まで生化学反応で取り扱われなかったような反応条件下での操作が必要となり、一段と飛躍した概念に基づいたリアクターを構築しなければならないであろう。

これらのプロセスが省資源、省エネルギーの優れたプロセスとして化学工業に地位を占める日を期待したい。

#### 参 考 文 献

- 1) S. L. Neidleman; Hydrocarbon Processing(1980)135
- 2) S. W. May and B. J. Abbott; Biochem. Biophys. Res. Commun. **48** (1972) 1230
- 3) S. W. May and R. D. Schwartz; J. Amer. Chem. Soc. **96** (1974) 4031
- 4) H. Ohta and H. Tetsukawa; J. Chem. Soc. Chem. Commun. (1978) 850
- 5) A. Q. H. Habets- Crützen et al.; Enzyme Microb. Technol. **7** (1985) 17
- 6) C. T. Hou et al.; Appl. Environ. Microbiol. **38** (1979) 127
- 7) H. Dalton; Adv. Appl. Microbiol. **26** (1980) 71
- 8) K. Furuhashi et al.; Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **12** (1981) 46
- 9) 古橋; 発酵と工業 **39** (1981) 1029
- 10) 福井, 田中; 発酵と工業 **41** (1983) 552
- 11) 田中; バイオリアクターの応用技術, P. 233, シーエムシー (1986)
- 12) K. Sonomoto et al.; Appl. Environ. Microbiol. **45** (1983) 436
- 13) 田中; 化学と生物 **23** (1985) 112
- 14) 福井, 田中; バイオリアクター, 共立出版 (1986)
- 15) 福井三郎監修・編; バイオリアクター, 講談社サイエンティフィック (1985)
- 16) 福井, 田中; ビタミン **54** (1980) 467
- 17) 鈴木周一編; バイオセンサー, 講談社サイエンティフィック (1984)
- 18) 阪井, 谷; 日本発酵工学会大会要旨集(1985), P. 175
- 19) 植村; 発酵と工業 **43**(1985) 436
- 20) 第1回次世代産業基盤技術シンポジウムーバイオテクノロジー, 予稿集 (1983)
- 21) 第2回次世代産業基盤技術シンポジウムーバイオテクノロジー, 予稿集 (1984)
- 22) 第3回次世代産業基盤技術シンポジウムーバイオテクノロジー, 予稿集 (1985)

