

## 粒子間隙型メソ多孔体(IMS)を利用した酵素固定化担体の特性

\*富樫 秀彰<sup>1</sup>、小島 秀蔵<sup>1</sup>、田原 直樹<sup>1</sup>、江上 美紀<sup>2</sup>

奈良 貴幸<sup>3</sup>、小野 世吾<sup>3</sup>、関川 千里<sup>3</sup>、鈴木 洋平<sup>3</sup>、水上 富士夫<sup>3</sup>、角田 達朗<sup>3</sup>

<sup>1</sup>日揮(株)、<sup>2</sup>日揮触媒化成(株)、<sup>3</sup>産総研

〒311-1313 茨城県東茨城郡大洗町成田町 2205 電話: 029-267-0165

Fax: 029-267-0129 E-mail: togashi.hideaki@jgc.co.jp

酵素を用いた化学反応は、「反応工程が簡略化される」、「常温・常圧で反応が進む」、「副反応が少ない」等の利点により古くから注目されてきたが、産業的な利用分野は限定されていた。それは、酵素が「使い捨ての高価な触媒」であったこと、高温、有機溶媒、酸、アルカリなどに弱いことから、酵素の利点を活かすことができなかつたためである。そこで、酵素をナノスケールの小さな穴にはめ込み固定化することによって酵素の弱点を克服するメソ多孔体に着目し、新しいタイプのメソ多孔体である粒子間隙型メソ多孔体担体(IMS)を製作した。IMSは、様々な酵素を高い活性で固定化できるこれまでにない魅力的な酵素固定化担体であり、酵素の連続使用を可能とすることを確認した。すなわち、廃棄物を削減できると共にエネルギー消費が少ない製造を可能とすることにより、「グリーンサステナブルケミストリー」の実現にも貢献できるものである。

### 1. はじめに

従来の金属触媒、無機触媒とは異なり、生体触媒である酵素は、生体内で繰り返し広げられる基質特異性、反応特異性、立体特異性、位置特異性の高い反応を実現することから、医薬品の合成反応ルートの簡略化等に寄与することが期待されている。また、反応が水系、常温、常圧において比較的速く進行するという酵素反応の特性は、環境に対するインパクトが低くエネルギー消費の少ない社会の実現に必要な技術、すなわち、「グリーンサステナブルケミストリー」の確立に大いに貢献すると考えられている。しかしながら、溶媒に溶解した状態で使用される酵素は、基本的に使い捨てであるため、コストが高くなるケースが多い。また、必要な活性を維持できる環境範囲(温度やpH)が比較的狭く、非水系溶媒中や、酸性・アルカリ性条件下で不活性化しやすいといった問題がある。そのため、酵素が産業的に適用できる分野が、繊維、澱粉糖化、洗剤といった産業に限られていた。

酵素の弱点を克服する一手段として、酵素の固定化がある。酵素を固相担体上に安定して保持することができれば、繰り返し利用できる優秀な触媒となる。固定化の手法として、物理吸着、共有結合、静電的結合などの原理が利用され、酵素の種類や利用目的に合わせて最適な固定化担体を選択されている。

近年、メソポーラス材料といわれる新しい材料が

次々と開発されている。メソポーラス材料とは、約2~50ナノメートルの細孔(メソポーラス)を持つ材料で、タンパク質のような巨大な分子を細孔内へ導入することができる。細孔内に導入された酵素は、熱耐性や有機溶媒耐性が上昇することから、酵素固定化用担体としての利用が期待されている。しかしながら、現在までに報告されているメソポーラス材料は、その構造がアモルファスのシリカで構成されているものが多く、長期の利用に耐えるほどの機械的強度を付与するのが難しいという問題があった。そこで、(独)産業技術総合研究所、日揮触媒化成(株)、日揮(株)の三者は、機械的強度に優れ、高品質な細孔を提供するメソポーラスシリカの開発に着手した。

### 2. 結果と考察

#### (1) 粒子間隙型メソ多孔体担体

粒子間隙型メソ多孔体(IMS)は、直径数十ナノメートルの球状シリカナノ粒子が一次粒子として多数集まって、数マイクロメートルの二次粒子を形成した構造をしている(図1)。一次粒子の粒子間隙がメソポーラスを形成しており、その大きさは一次粒子の大きさで制御することが可能である。また、メソポーラスの細孔径が非常に均一であり、固定化される個々の酵素分子にたいして、同じ大きさの反応空間を等しく提供することができる。さらに、一般的なシリカ担体と同様に、

IMS担体表面には適当な官能基を付加することができる。細孔径と官能基の組み合わせによって、20種類程度のバリエーションを用意することができた。

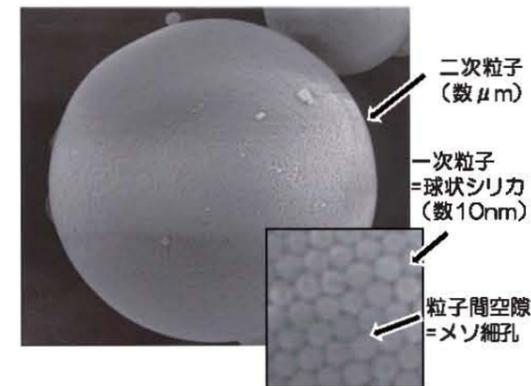


図1. IMS担体の電子顕微鏡写真

#### (2) 担体の汎用性

IMSへの酵素固定化において大きな要素となるのは、酵素の大きさ(分子量)と表面電荷(等電点)である。図2は、分子量や等電点が異なる酵素7種類に対して、最適なIMS担体(図中のIMS\*)をマッピングしたものであるが、酵素の大きさと等電点が近ければ、同じIMS担体が最適となる傾向があることがわかる。

従来、固定化酵素の作成にあたっては、酵素を固定化する担体の最適化に多くの労力がかかっていた。一般的に、最適な担体を選択するためには、多様な担体入手し試行錯誤を繰り返さなければならない。今回開発した酵素固定化用担体は、酵素の種類毎に担体の基本構成を改めることなく、細孔の大きさと表面処理の調整のみで多くの酵素に適用可能である。細孔の大きさや表面処理は、酵素の物性情報(分子量、等電点、疎水性など)をもとにして設計されるため、最適な担体を、少ない労力で決定することができる。

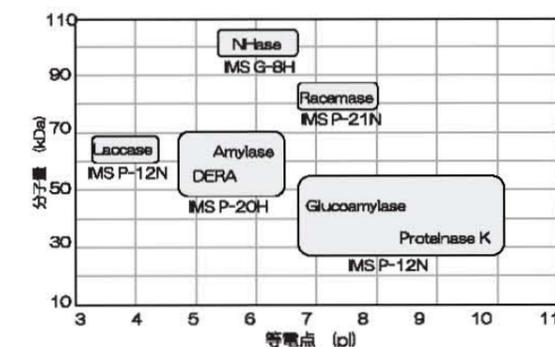


図2. 酵素とIMS担体のマッピング

#### (3) 安定性の改善

固定化した酵素が活性を維持しているかどうか、アラニンラセマーゼを固定化して評価を行った。アラニンラセマーゼは、アミノ酸であるアラニンをラセミ化する酵素で、D体⇄L体の反応を触媒する。ラセマーゼを、4または21ナノメートルの細孔を持つIMS担体に固定し、繰り返しラセミ化反応を行った時に、その活性の変化を測定した。(図3)

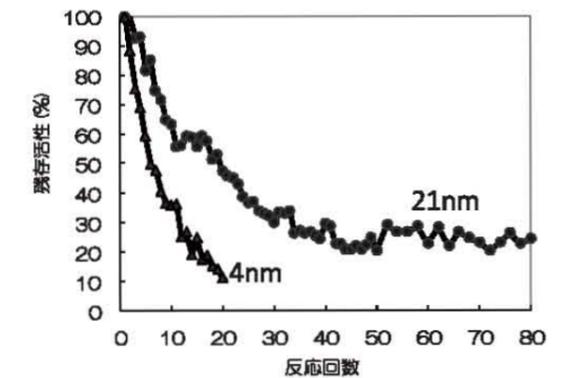


図3. ラセマーゼの繰り返し反応

使用した2種類のIMS担体の表面処理は同じであるが、その細孔径だけが異なっている。細孔径4ナノメートルのIMSに固定したラセマーゼの活性は、20回の反応後に10%まで低下する。一方、細孔径21ナノメートルのIMSに固定したラセマーゼは、40回の反応後も25~30%の活性を維持し、少なくとも80回まで安定した活性を示した。つまり、最適な大きさの細孔内に固定されたラセマーゼは、安定性が改善されること示している。安定性の改善は酵素の産業利用における経済性に直結する重要な要素である。

### 3. 今後の展望

今回我々が開発したIMS担体は、細孔径を厳密に制御することが可能であり、機械的な強度にも優れ、適当な官能基を選択することで幅広い酵素種に対応可能な酵素固定化担体である。また、産業的な利用を視野に入れたスケールでの大量生産が可能メソポーラス材料である点も重要である。

医薬中間体などのファインケミカルの生産や、エネルギー消費の少ない反応系の構築、あるいは対環境インパクトの大きい廃棄物の削減する手段として、酵素の利用に対する注目度は今後上がっていくことが予想され、本技術が貢献できる産業範囲はますます広くなるとを期待している。