

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成10年度博士課程進学
氏名 中谷 英樹
指導教官 田之倉 優

論文題目

超臨界二酸化炭素の溶媒特性の解析とその酵素反応への応用

有機溶媒のもたらす環境、人体への悪影響を考慮し、現在、超臨界流体 (SCFs) はその代替溶媒として大きな関心を集めている。特に、超臨界二酸化炭素 (SCCO₂) は臨界温度、臨界圧力が共に低い値であるため、比較的穏和な条件で操作ができ、さらに、化学的に不活性な天然溶媒として、食品や医薬品の生産プロセスへの利用が期待されている。本論文は SCCO₂ の抽出溶媒、酵素反応溶媒としての可能性について検討することを目的とし、SCCO₂ の溶媒特性の解析、SCCO₂ 中における酵素反応特性の解析、およびその油脂改変への応用について論じたものである。

1. 非水系酵素反応溶媒の溶媒指標¹⁾

有機溶媒中における酵素活性と溶媒指標との関係について、比誘電率 (ϵ_r)、極性指標 $E_T(30)$ などの溶媒特性に比べ、 $\log P$ (溶媒の水と 1-octanol への分配比の常用対数値) が最も相関性が高いことが知られている。そこで、これまで求められていなかった SCCO₂ の $\log P$ 値を求め、SCCO₂ の酵素反応溶媒としての指標を明らかにすることを試みた。 $\log P$ を 1-octanol および水へ

の CO₂ 溶解度の比として近似し、CO₂ への 1-octanol の溶解度を測定し、これに Peng-Robinson 状態方程式を用いた高圧気液平衡推算法を適用し、1-octanol への CO₂ 溶解度を求め、水への CO₂ 溶解度は文献値を用い、これらの比を計算することで SCCO₂ を含む高圧 CO₂ の $\log P$ 値を算出した。50°C、3.0～11.8MPa における高圧 CO₂ の $\log P$ 値は圧力上昇に伴い、0.9 から 2.0 と増加しより疎水的となり、有機溶媒ではベンゼンやフェノールに近い値となった。次に、種々の有機溶媒に対する水の溶解度を $\log P$ に対してプロットしたところ、良好な負の相関が見られたが、一方、CO₂ は圧力の上昇と共に $\log P$ および水の溶解度は共に上昇したため、正の相関を示し、この CO₂ の相関線は高圧においては有機溶媒の負の相関線に近づく傾向が見られた。

以上により、SCCO₂ は $\log P$ より判断し、比較的親水的であることが明らかとなり、さらに、圧力変化により極性や水の溶解度を変化させることができるため、ユニークな抽出溶媒、反応溶媒としての応用可能性が示された。

2. 超臨界 CO₂ への溶質溶解度²⁾

SCFs の物質溶解能力は有機溶媒と比較し、一般的に低いことが知られており、これは SCCO₂ 中における酵素反応や抽出操作を行う際に考慮すべき重要な点である。そこで、lipase の基質として考えられる脂肪酸、脂肪酸エステル、油脂等の溶解度を実測し、さらに、それらの推算方法の確立を試みた。40°C、12.3～22.1MPa で SCCO₂ へのベヘン酸(BA)及びベヘン酸エチル(EB)の溶解度を実測したところ、BA と EB の溶解度には約 1000 倍の差があり、エステル化によって大きく溶解度が増加することが明らかとなった。さらに、測定データをいくつかの推算式で相関してみたところ、高沸点化合物である BA、EB は Flory-Huggins 式を用いて正則溶液理論を補正した式により最も良好に相関されることが明らかとなった。特に、BA の溶解度はこれまで広く用いられていた Chrastil の経験式による既報結果とは大きく異なっており、この傾向は低圧側でより顕著であり、ステアリン酸に関しても同様な傾向を見ることができた。さらに、この式を用い、高級飽和脂肪酸については、分子量によって溶解度を予測することが可能となった。

3. 非水系における酵素活性と酵素反応¹⁾

SCCO₂ 中における酵素反応特性を明らかにするため、SCCO₂、ベンゼン、ヘキサン中における酵素の安定性、反応活性の測定を行った。酵素には固定化 lipase (EC. 3. 1. 1. 3; *Mucor miehei* 由来)を用いた。まず、SCCO₂ (60°C、13.5MPa) 中における本酵素の残存活性の経時変化を調べたところ、4hr 経過後も活性は 80%以上残存し、圧力依存性については測定した全ての圧力範囲(0.1～15MPa)で 30min 後も活性はほとんど低下しないことが分かった。さらに、水分濃度依存性を調べたところ、水が溶解度以下の場合、活性は 80%近く維持されるものの、溶解度を越えると活性が急激に低下するとが示され、これは

溶け残った水相中に CO_2 が溶解し、酵素周辺の pH が低下したためと推測された。以上により、 SCCO_2 中において lipase は水の溶解度以下であれば、反応性、安定性に関してほとんど問題がないことが明らかとなった。

次に、 SCCO_2 および有機溶媒中での lipase の酵素反応特性を明らかにするため、高压 CO_2 、ヘキサン、ベンゼン中で lipase によるステアリン酸(SA)のエタノールによるエステル化反応およびその逆反応であるステアリン酸エチル(ES)の加水分解反応を行った。エステル化反応においては SCCO_2 中における反応速度は臨界圧力以下でヘキサンおよびベンゼン中における値よりも低くなったが、9MPa 以上になると、反応速度がこれらと比べはるかに高くなった。一方、加水分解反応においては全ての圧力範囲でヘキサンおよびベンゼン中の値に比べて反応速度が高く、特に、6.8MPa 付近では反応速度は極大値を示した。

4. 二酸化炭素の臨界点付近における酵素反応特性

SCCO_2 中における酵素反応速度の圧力依存性を、特に、 CO_2 の臨界点付近の挙動に着目し、前項と同様な系で検討を行った。SA、ES の初濃度をそれぞれ 22.6mM、水分を 9.17mM としたところ、SA のエステル化反応速度は、全ての測定温度(31-60°C)で圧力の上昇とともに単調に増加した。これは圧力の上昇に伴って、 CO_2 の疎水性が上昇し、SA の溶解度が上昇したためであると考えられた。これに対して、ES の加水分解反応速度は測定した全ての温度条件で 6.8MPa 付近にピークが観測された。このピークは圧力上昇に伴う疎水性の増大、モル基準での希釈効果、さらに、酵素と基質との接触効果の増大などの複合的な要因によるものと考えられた。そこで、このピークに着目し、50°C で ES、水分濃度を変化させ、圧力依存性を求めたところ、ES 濃度が溶解度以下(2.4、8.0mM)で、十分な水分濃度(24、31mM)のとき、10MPa 付近にピークが観察された。さらに、温度を 40、50、60°C と変化させ、ES 濃度、水分濃度がそれぞれ 8.0、24mM の条件で圧力依存性を調べたところ、ピーク圧力値は温度の上昇と共に高くなり、気液平衡線の延長線上に沿って変化した。この延長線上では SCCO_2 の密度ゆらぎが最大となることが報告されており、 CO_2 と酵素活性部位が相互作用し、反応が活性化されたものと思われた。このように加水分解反応で気液平衡線の延長線上で反応速度が最大となることは、今後、 SCCO_2 中における酵素反応のメカニズム解析およびその応用において重要な意味を有する。

5. 超臨界 CO_2 中における油脂の改質とその反応系の検討^{3,4)}

SCCO_2 中における酵素反応の応用として、食品、医薬品分野で乳化剤、機能性油脂として注目されているモノ、ジグリセリドの合成系の検討を行うため、50°C でトリオレイン(TO)を出発物質とするグリセロリシス、エタノリシス、加水分解反応の3つの反応系での反応速度の比較を試みた。この結果、加水

分解に対する反応速度が最も高いことから、lipase は SCCO₂ 中ではエタノールやグリセリンよりも水に対する親和性が最も高いことが分かった。さらに、T0 の加水分解反応速度の水分濃度依存性を調べたところ、水分濃度の上昇と共に、反応速度は上昇し、24、34mM では、10MPa 付近にシャープなピークが観察された。これは前項と同様に CO₂ の気液平衡曲線の延長線上の点であった。

次に、油脂の物性変換を目的として、T0 の脂肪酸または脂肪酸エチルによるエステル交換反応について検討した。50℃、15MPa で T0 の BA または EB によるエステル交換反応の経時変化を測定したところ、エステル交換反応速度は基質として BA よりも溶解度が 1000 倍高い EB を用いた方が高く、本反応系においては基質として脂肪酸よりもその脂肪酸エチルを用いた方が有利であることが示された。また、SA または ES と T0 とのエステル交換速度は 5.9MPa で反応速度が最大を示し、加水分解反応の場合と同様なピークが観測された。

以上、溶媒指標としての $\log P$ を算出することによって、SCCO₂ は溶媒としては比較的親水的であることが分かった。さらに、SCCO₂ は温度、圧力の制御により極性や水の溶解度を変化させることができることから、ユニークな抽出溶媒、反応溶媒としての可能性が示された。SCCO₂ 中で lipase は水の溶解度以下でほぼ安定であり、酵素反応溶媒として機能しうることが分かった。そこで、lipase の SCCO₂ 中における反応特性について検討した結果、エステル化反応では圧力の上昇とともに反応速度は単調に増加したが、加水分解反応では超臨界領域において気液平衡線の延長線上で反応速度が最大となることが観察され、臨界点付近の密度ゆらぎや基質溶解度が SCCO₂ 中の酵素反応に強く影響を及ぼすことが明らかとなった。さらに、機能性油脂の生産や油脂物性変換を目的として、SCCO₂ 中における lipase による加水分解反応やエステル交換反応などについて、その反応条件の検討を試みた。

以上の知見は今後の SCCO₂ を用いた酵素反応のメカニズム解析や食品、医薬品分野での SCCO₂ の抽出・反応溶媒としての応用に向けて、大きく寄与するものと思われる。

- 1) Nakaya, H., O. Miyawaki, K. Nakamura, *Enzyme Microb. Technol.*, in press.
- 2) 中谷英樹, 宮脇長人, 中村厚三, 化学工学論文集, **25**, 237-239, 1999
- 3) Nakaya, H., O. Miyawaki, K. Nakamura, *Biotechnol. Tech.* **12**, 881-884 (1998).
- 4) Yoon, S. H., H. Nakaya, O. Ito, O. Miyawaki, K. H. Park and K. Nakamura, *Biosci. Biotech. Biochem.* **62**, 170-172, (1998)