

氏名 長谷川 友理
 学位(専攻分野) 博士 (農学)
 学位記番号 農博 第1093号
 学位授与の日付 平成12年3月23日
 学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
 研究科・専攻 農学研究科応用生命科学専攻
 学位論文題目 Continuous Production of Chiral Alcohol Using a Fluidized- or Fixed-bed Bioreactor with Immobilized Yeast Cells
 (固定化酵母を用いた流動層型または固定層型バイオリアクターによる光学活性アルコールの連続生産)

論文調査委員 (主査) 教授 松野隆一 教授 清水 昌 教授 井上國世

論文内容の要旨

本論文は、酵母の有する酸化還元反応触媒能を利用して光学活性物質を生産するための適切な反応条件の解明並びに流通式反応器による連続生産を目的とし、光学活性な化学合成原料物質のモデル物質として1-phenylethanol (1-PA)を取り上げ、立体選択的な酸化反応による(R)-1-PAの生産と不斉還元反応による(S)-1-PAの生産に関する研究の結果をまとめたもので4章よりなっている。

第1章では、酵母 *Pachysolen tannophilus* IFO 1007 及び *Hansenula capsulata* IFO 0974 がアセトフェノン (AP) と1-PAとの酸化還元反応を触媒する活性を有することを見出し、両菌体の基質及び生成物に対する耐性と反応至適条件を明らかにした。ついで、立体選択的な酸化反応では、空気中の酸素のほかには、酸化還元反応に関与する補酵素 NAD(P)⁺ の再生のためのエネルギー源を必要としないことに着目し、酸素の供給が容易な通気流動層型反応器を用いた固定化 *H. capsulata* によるラセミ体1-PAの立体選択的な酸化反応を行い、操作条件などから予測される反応率で(R)-1-PAの生産を達成した。また、連続操作中に固定化酵母の触媒能が低下したが、賦活操作を行うことにより活性が回復し、固定化酵母の繰り返し使用が可能であることを示した。

第2章では、不斉還元反応では補酵素 NAD(P)H の再生のためにエネルギー源を必要とするが、生成物の光学純度は反応率に依存しないことに着目し、エネルギー源としてグルコースを用いた AP の不斉還元反応による (S)-1-PA の連続生産について検討した。本反応では、空気中の酸素が混入すると逆反応(酸化反応)が起こり、高い反応率を達成することができないため、空気が混入しにくい固定層型反応器が優れていると予想された。しかし、通常の型式の固定層型反応器では、グルコースの代謝に伴って発生する CO₂ の気泡のため、効率的な操作が困難であったが、層高に比して塔径の大きい shallow-bed 型反応器を用いることにより、長期にわたり高い反応率を維持できることを示した。

第3章では、ベンゼン環上にクロル基を有する chloroacetophenone (Cl-AP) の不斉還元反応による、対応する S 体アルコール (Cl-1-PA) の生産を取り上げ、まず、固定化 *P. tannophilus* を用いて、クロル基の位置と反応速度の関係を検討した。o-Cl-AP がもっとも迅速に還元され、クロル基を有さない AP の約3倍の速度であることを示した。つぎに、反応液中の基質 (o-Cl-AP) とエネルギー源 (グルコース) のモル比が反応率に及ぼす影響について検討し、エネルギー源が枯渇したのちにも還元反応が進行することより、本菌体が培養過程で蓄積した物質をエネルギー源として利用していることが示唆された。さらに、それらのエネルギー源となる物質を消費させたのち、shallow-bed 型反応器を用いて、基質とエネルギー源のモル比及び平均滞留時間を系統的に変えて反応率を測定し、それを解析することにより、1 mol の o-Cl-AP を還元するのに必要なグルコース量は 1/7 ~ 1/10 mol で十分であることを明らかにした。

最終の第4章では、固定化 *P. tannophilus* を用いた o-Cl-AP の o-Cl-1-PA への不斉還元反応と、吸着性樹脂を用いた生

成物の吸着回収操作を組み合わせたシステムにより、生成物を効率的に回収するとともに、反応液使用量を低減する方法を提案した。*o*-Cl-1-PA の吸着回収には、Amberlite XAD 2000 が使用でき、本樹脂への吸着等温線は Langmuir 式で表現できることを示した。さらに、本樹脂を充填した固定層における破過時間と、供給液中の *o*-Cl-1-PA 濃度及び流速との関係を表わす線図を作成した。それに基づき、固定化 *P. tannophilus* を充填した shallow-bed 型反応器による *o*-Cl-AP の *o*-Cl-1-PA への不斉還元反応と、Amberlite XAD 2000 を充填した固定層吸着を組み合わせたシステムによる *o*-Cl-1-PA の生産を行い、本システムが少なくとも 22 日以上にわたり安定に操作できることを実証するとともに、反応液及びエネルギー源であるグルコースの使用量の大幅な低減を達成した。

論文審査の結果の要旨

酵母などが有する酸化還元反応に対する触媒能を利用した、医薬品合成などの原料となる光学活性物質 (building block) の生産は、反応段階が少なく、かつ適切な菌体の選択により、高い光学純度が得られる有望な方法であるが、生産性などに問題が残されている。そこで著者は、酵母を用いた立体選択的酸化反応または不斉還元反応により、光学活性な building block のモデル物質である 1-phenylethanol (1-PA) の連続生産について、操作条件及び反応器型式が反応効率に及ぼす影響について検討を加えた。成果として評価すべき点は次のとおりである。

1. 酵母 *Pachysolen tannophilus* IFO 1007 及び *Hansenula capsulata* IFO 0974 が、いずれもラセミ体 1-PA 中の (S)-1-PA を高い立体選択性でアセトフェノン (AP) に酸化する反応を触媒して (R)-1-PA を生産できること、及びその逆反応 (還元反応) により AP から高い光学純度の (S)-1-PA を生産できることを見出した。

2. 固定化 *H. capsulata* により、ラセミ体 1-PA 中の (S)-1-PA を立体選択的に酸化して (R)-1-PA を生産するには、通気流動層型反応器が適しており、さらに連続操作に伴う活性の低下に対して賦活操作を行うことにより、固定化菌体の繰り返し利用が可能であることを示した。

3. 固定化 *H. capsulata* を用いた AP の不斉還元反応による (S)-1-PA の生産について、空気中の酸素が混入し難く酸化反応が抑制できる、固定層型反応器の一種である shallow-bed 型反応器の有用性を示し、光学純度の高い (S)-1-PA を連続的に生産できることを検証した。

4. 固定化 *P. tannophilus* による *o*-chloroacetophenone (*o*-Cl-AP) の不斉還元反応により対応する S 体アルコール (*o*-Cl-1-PA) を生産する反応系について、補酵素 NAD(P)H を再生するためにエネルギー源として加えられるグルコースと基質 (*o*-Cl-AP) のモル比の影響について系統的な検討を行い、従来用いられているモル比に比べて極めて低いモル比である 1/7 ~ 1/10 で十分であることを明らかにした。

5. 生産性を改善する一つの方策として、固定化 *P. tannophilus* による *o*-Cl-AP の *o*-Cl-1-PA への不斉還元反応について、吸着操作による生成物の回収操作を組み合わせたシステムを提案し、長期間にわたる操作が可能であることを実証するとともに、生成物の高濃度回収と反応溶媒使用量の低減を達成した。

以上のように本論文は、固定化酵母を用いた立体選択的酸化反応及び不斉還元反応による光学活性アルコールの生産に対して、操作条件の確立と反応器型式の選定について新しい知見を得、固定化酵母を用いた光学活性アルコール生産の合理的な設計に道を拓いたもので、応用微生物学、生体触媒工学及び生物反応工学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。なお、平成 12 年 1 月 18 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。