

超臨界CO₂中での酵素反応による有用物質の合成

Organic synthesis by enzymes in supercritical CO₂

東京工業大学 大学院生命理工学研究科 講師 松田 知子
TOMOKO MATSUDA

Tokyo Institute of Technology, Department of Bioengineering, Associate Professor

1. はじめに

二酸化炭素は、常温常圧では気体であるが、温度を31度(臨界温度)以上とし、圧力を73気圧(臨界圧力)以上とすると、“超臨界流体”となる。超臨界CO₂は、図1に示すように、液体と気体の両方の性質を併せ持つ溶媒であり、高機能性溶媒として、様々な分野で利用されている。例えば、拡散性が高いことや物質を溶かすことができるため、コーヒー豆からのカフェインの抽出、ビール用のポップエキスの抽出、香料の抽出、クロマトグラフィー用の溶媒、染色、精密部品の洗浄等に用いられてきた。また、有機合成反応や高分子合成の溶媒や反応剤としても用いられている¹⁾。本研究では、超臨界CO₂中で酵素反応²⁾を行い、光学活性体等の有用物質を合成できたので、紹介したい。

2. 加水分解酵素を用いるラセミ体アルコールの速度論的分割反応—立体選択性の制御³⁾

加水分解酵素であるリパーゼは、図2(a)に示すように、自然界では脂肪酸エステルを加水分解する酵素である。ところが、水が少ない環境、つまり、有機溶媒中で用いると、その逆反応のエステル化反応を触媒する(図2(b))。アセチル化剤としては、vinyl acetateが頻繁に用いられている。基質のアセチル化と同時に生成するvinyl alcoholがacetaldehydeに変換されるため、生成したエステルの分解反応を防げるためである(図2(c))。本研究では、ラセミ体の二級アルコールを基質として用い、アセチル化反応を行った。*R*体と*S*体では反応速度が異なるため、どちらかをエステルに変換して逆側をアルコールのままで残す速度論的分割反応が可能である(図2(d))。

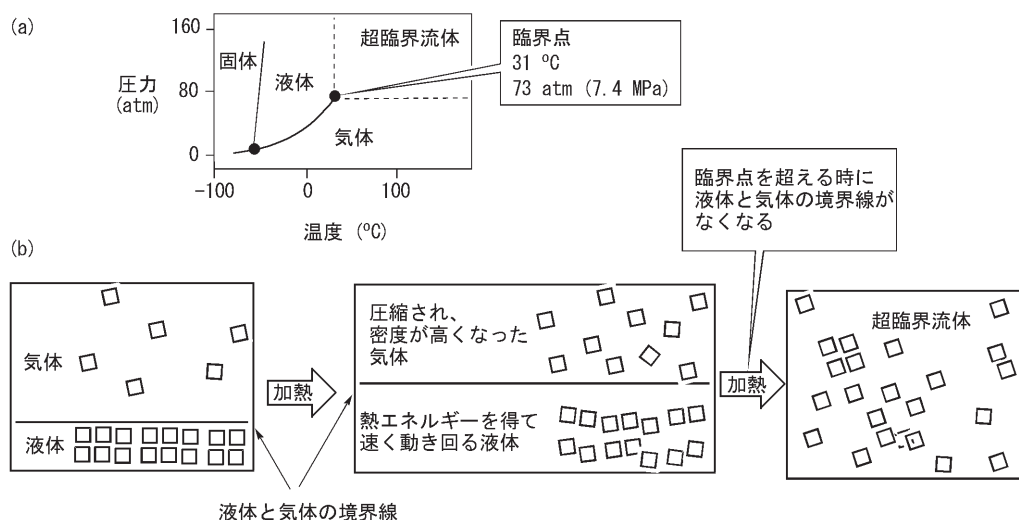


図1 (a) CO₂の相図 (b) 超臨界流体のイメージ(密閉された容器の中で液体を加熱すると、臨界温度で液相と気相の区別がなくなり、超臨界流体となる。)

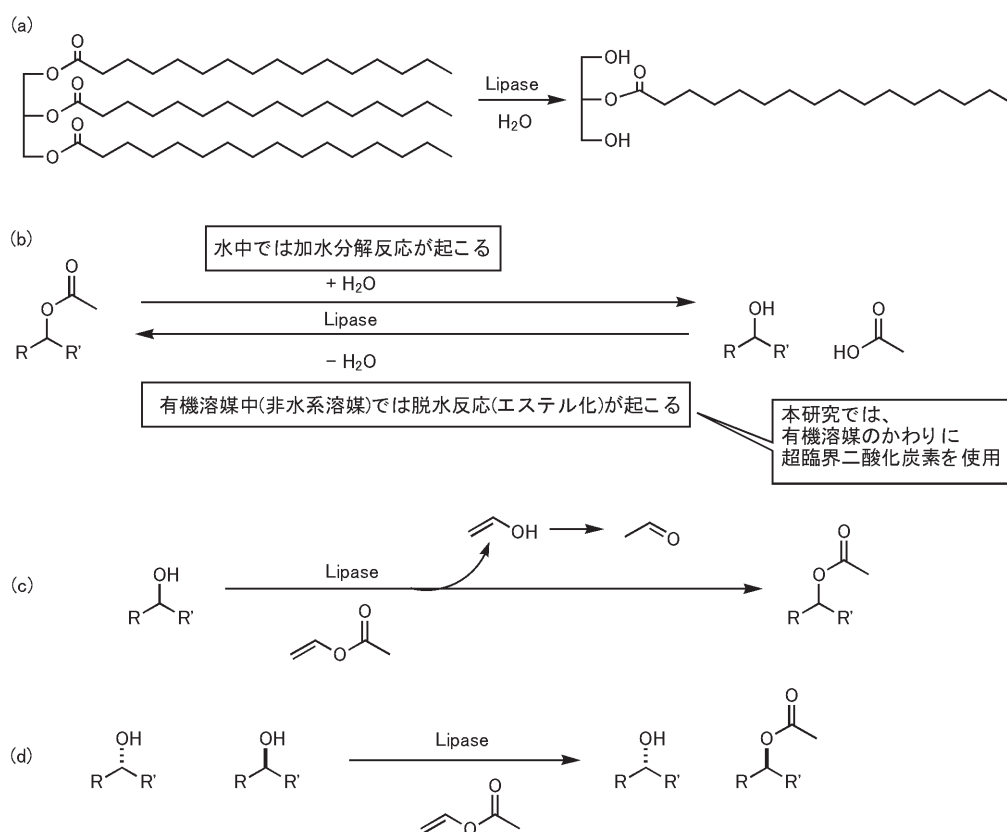


図2 (a) 自然界でのリパーゼの反応 (b) リパーゼの逆反応 (c) アセチル化剤として vinyl acetate を用いるアセチル化反応 (d) ラセミ体アルコールの速度論的分割反応

反応の立体選択性を示す尺度としては、反応が速い異性体と遅い異性体の反応速度の比である E 値を用いた。

リパーゼの反応を、有機溶媒中ではなく、超臨界CO₂で行った理由は、CO₂は、1) 安価であり、2) 無害であり、3) 地球上に多量に存在し、4) 反応終了後は常圧に戻すだけで生成物と簡単に分離でき、5) 拡散性が高いので反応速度が加速できるためである。さらに、超臨界CO₂は、その溶媒の性質を圧力や温度によって制御できる。超臨界流体は、図1(b)に示すように、気体のように密度が低い部分と液体のように密度が高い部分が混ざっている状態であるので、例えば、少し圧力を上げると、密度が高い部分が多くなり、その結果、溶解度や誘電率、拡散係数等の物理化学的な性質が大きく変化する。本研究では、反応溶媒として用いるCO₂の圧力や温度が、リパーゼの立体選択性におよぼす影響を調べた。有機溶媒の種類を変化させることにより、リパーゼの反応の溶媒効果を検討した例は多数ある。しかし、有機溶媒を用いる場合には、有機溶媒の種類を変化さ

せると、分子の形が変わるため、その影響までが出てしまう。一方、超臨界CO₂を用いると、分子の形は変化しない。さらに、有機溶媒の性質は連続的に変化させることは不可能である。例えば、ヘキサンをヘプタンにすると、炭素数は、6から7へと変化する。しかし、6.1や6.2の炭素数の化合物は存在しないため、その間がどのようなになっているのかは、調べることができない。ところが、超臨界CO₂を用いる場合には、圧力や温度は連続的に次第に変化させることができるので、立体選択性も連続的に変化させることができる。

図3に結果を示す。図3(a)に示すリパーゼの反応の立体選択性は、圧力や温度を変化させることにより連続的に変化した(図3(b,c))。ここで、超臨界CO₂を利用すると、圧力や温度により立体選択性を制御できることがわかった。また、その変化は、密度の変化(図3(d))とも関係深いことがわかった。ではなぜ、温度や圧力により超臨界CO₂の密度が変化すると、反応の立体選択性が変化するのか考察した。CO₂の酵素への吸着等による酵素の構造の微妙な変化が立体選択性に影響を与え

ているのではないかと考えているが、詳しくは現在検討中である。温度により立体選択性の制御に関しては、有機溶媒中のリパーゼの反応においても報告されており⁴⁾、

そこでの説明に用いられている絶対反応速度式を、超臨界CO₂中での反応を説明するためにも用いることができた(図3(e))。

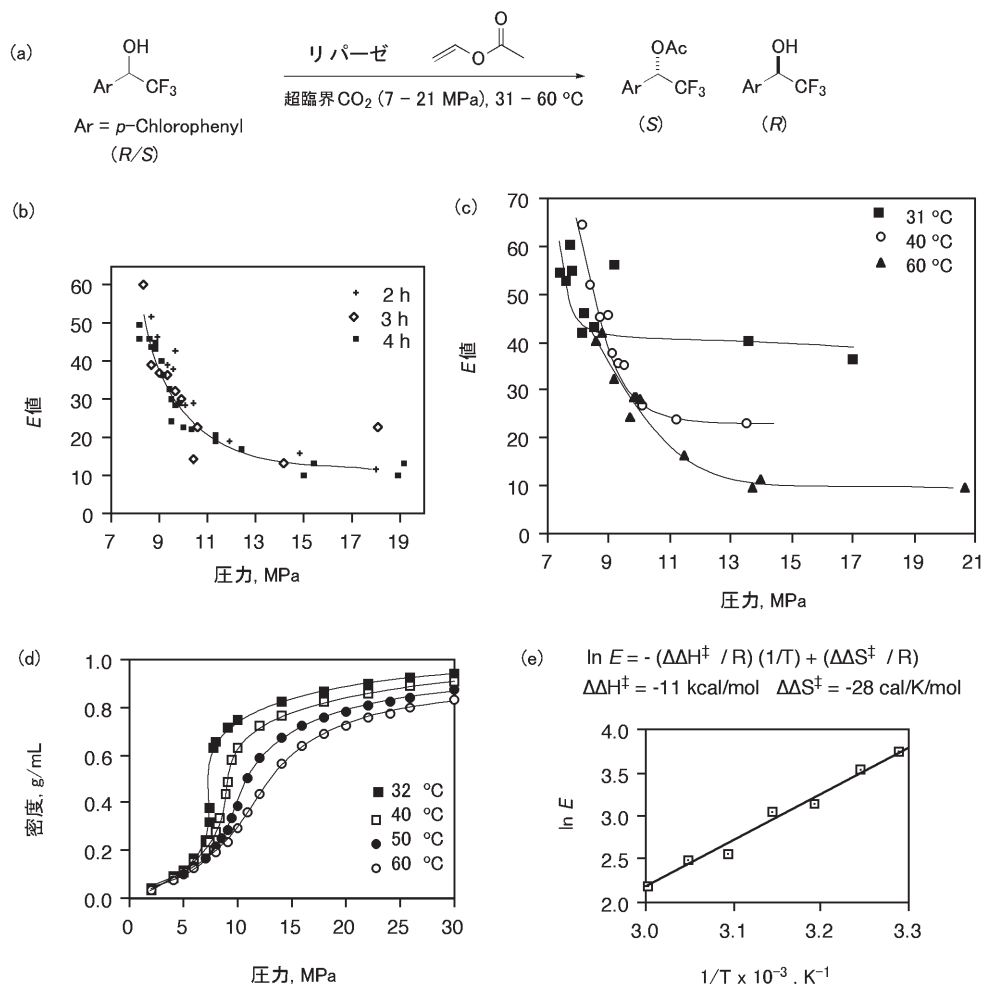


図3 超臨界CO₂中でのリパーゼによるフルオロアルコールの速度論的分割反応の立体選択性におよぼす圧力および温度の影響 (a) 反応スキーム (b) 55 °Cでの立体選択性におよぼす圧力の影響 (c) 様々な温度での立体選択性におよぼす圧力の影響 (d) CO₂の密度⁵⁾ (e) CO₂の密度一定条件下(0.75 g/mL)での立体選択性におよぼす温度の影響

3. 加水分解酵素を用いるラセミ体アルコールの速度論的分割反応—大量合成⁶⁾

超臨界CO₂を用いる反応では、高压容器を必要とするため、なるべく単位スペースあたりの収率が高い方が有利である。そのため、フロー系の反応を行った。反応には、*Candida antarctica*由来の固定化リパーゼであるNovozym435を用いた。この酵素は固定化されているので、反応管に簡単に充填できる。ラセミ体の基質をCO₂と酵素を充填した反応管へ送液することにより、生成物である光学活性化合物が連続的にしかもバッチ式に比べて高い効率(400倍)で得られることが

わかった(図4(a))。ラセミ体の1-phenylethanolとvinyl acetateを用いて反応を行ったところ、R体のアルコールが選択的にアセチル化され、S体は未反応であった(図4(b))。まずラセミ体のアルコールとvinyl acetateのモル比を1:0.5とし、反応を行った。結果を表1に示す。反応はスムーズに進行し、ほぼ定量的にR体のアセテートが高い光学純度で得られた。この時、立体選択性を示すE値は非常に高く、1800以上であった。反応条件を検討したところ、vinyl acetateを少過剰量用いることにより、収率を47%から50%へと向上させることが可能であり、R体のアセテートのみではなく、未反応のS体のアルコールも99%以上の不斉収率で得ることができ

た。vinyl acetateを大過剰に用いても、*S*体のアルコールの過剰反応は避けられた。また、圧力の検討により、9-20MPaの範囲で同様の結果が得られ、この反応は圧力に影響を受けないことがわかった。さらに、3日間の連続運転反応を行ったところ、図4(c)に示すように収率や立体選択性の低下は見られず、1.73gの固定化酵

素 (Novozym435) を用いて、221gのラセミ体のアルコールを99%ee以上の*S*体のアルコールおよび*R*体のアセテートへと変換できた。本反応の、基質特異性の検討を行ったところ、図4(d,e)に示すように、2-undecanolのような脂肪族や1-tetralolのような環状アルコールの速度論的分割反応にも成功した。

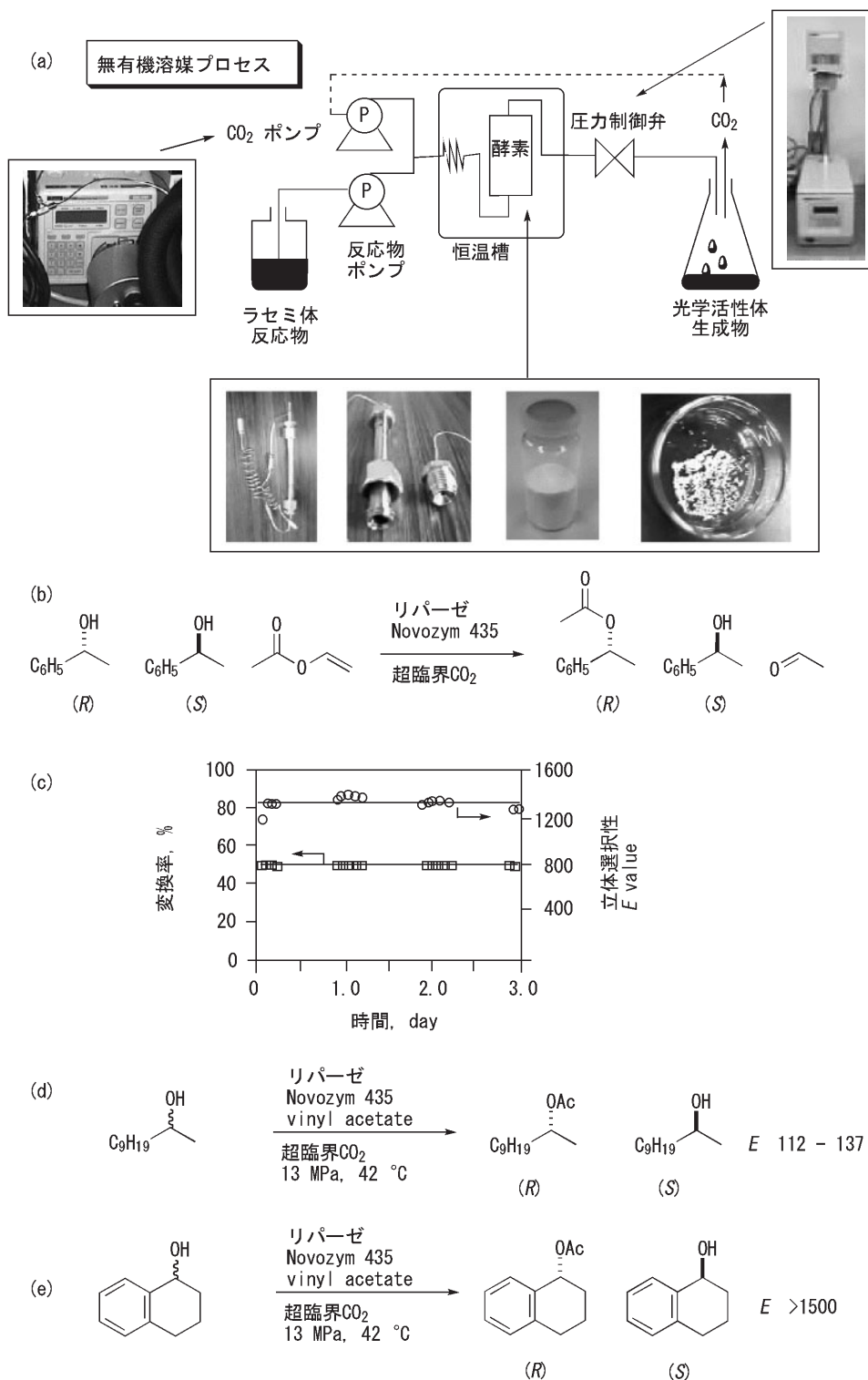


図4 (a) フロー系超臨界CO₂反応装置の概要 (b) 1-phenylethanolの速度論的分割反応 (c) 1-phenylethanolを基質とする3日間の連続運転反応 (d) 2-undecanolのフロー系速度論的分割反応 (e) 1-tetralolのフロー系速度論的分割反応

表1. 超臨界CO₂中でのリパーゼNovozymによるラセミ体1-phenylethanolのフロー系速度論的分割反応の条件検討

1-phenylethanol:vinyl acetate mol/mol	圧力 MPa	(S)-alcohol %ee	(R)-alcohol %ee	変換率 % ^d	E
1:0.50 ^a	13.0	89.6	99.7	47	1850
1:0.60 ^b	13.0	98.8	99.2	50	1240
1:1.30 ^c	12.9	>99.5	99.0	50	>1000
1:1.30 ^c	8.9	>99.5	99.0	50	>1000
1:1.30 ^c	20.0	>99.5	99.0	50	>1000

反応条件：42-43 °C, Novozym: 5.0 mL, 超臨界CO₂流速：1.5 mL/min, 1-phenylethanolの流速：0.050 mL/min (1-phenylethanolとvinyl acetateの混合物の流速：^a0.070 mL/min, ^b0.074 mL/min, ^c0.100 mL/min) ^d 1-phenylethanolを基準としたアセチル化体への変換率。

4. アルコール脱水素酵素によるケトンの不斉還元反応⁷⁾

チチカビ (*Geotrichum candidum* IFO5767) 由来のアルコール脱水素酵素はケトンの不斉還元反応を行うための触媒として有用であるが、超臨界CO₂が反応媒体として有望であることも分かった。一般に水中での反応では、水からの生成物の抽出が困難であるが超臨界CO₂中の反応では、分離の問題が解決できる。触媒としては、単離酵素ではなく、細胞を水と2-propanolの懸濁液とし、そこに吸水性ポリマーを加えることにより、ポリマー上に固定化、分散させたものを用いた。この反応により、初めてアルコール脱水素酵素が超臨界CO₂中で活性を示すことを見出した。また、様々な基質の還元反応は、非常に高い立体選択性で進行し、光学活性なアルコールが生成した。(表2)。

表2 チチカビによる超臨界CO₂中でのケトンの不斉還元

$\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{R}' \xrightarrow[\text{超臨界CO}_2 (10 \text{ MPa}, 35 \text{ }^\circ\text{C})]{\text{チチカビ固定化菌体}} \text{R}-\underset{\text{OH}}{\text{C}}-\text{R}'$			
生成物	収率 (%)	ee (%)	絶対配置
	51	>99	S
	81	>99	S
	53	>99	S
	11	97	S
	96	96	R
	22	>99	S
	61	>98	S
	96	-	-

5. 脱炭酸酵素によるCO₂の固定化反応(カルボキシル化反応)⁸⁾

脱炭酸酵素を超臨界CO₂中で用いると、その逆反応により、CO₂の固定化反応が開発できる。ここでは、*Bacillus megaterium* PYR2910由来の脱炭酸酵素を、超臨界CO₂層と水層の二層系の反応系で用いた。この酵素は、長澤らにより通常の条件において効率的にピロールのカルボキシル化反応を触媒し、ピロール-2-カルボキシレートに36g/L蓄積できることを見出されている。単離された酵素よりは細胞中に存在する酵素の方が安定

であるため、超臨界CO₂中の反応においては細胞そのものを用いた。その結果、脱炭酸酵素によるピロールのカルボキシル化反応が、超臨界CO₂中においても進行することを見出した(図5(a))。系内を0.1 MPa(常圧)に保つと反応はほとんど進行せず、10 MPaの方がはるかに速く進行した(図5(b))。圧力は臨界点付近以下の圧力で収率は最高となり、臨界圧力以上で減少した(図5(c))。水層のpHの低下や、基質と生成物の水層と超臨界CO₂層への分配等が原因であると考えられる。このシステムは他の脱炭酸酵素を用いたCO₂の固定化反応にも応用可能であり、今後のさらなる発展が期待される。

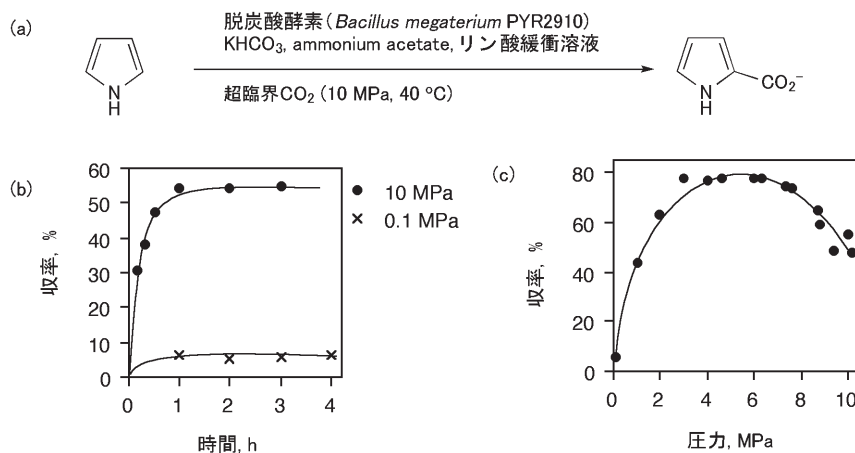


図5 (a) *Bacillus megaterium*による超臨界CO₂中でのピロールのカルボキシル化反応 (b) 経時変化 (c) 圧力の影響

6. まとめ

超臨界CO₂を利用したバイオプロセスの開発は、始まったばかりであり、超臨界流体の特徴を十二分に生かせる系を構築するには、多くの技術的改良および新しい反応の開発が必要である。今後、これらの研究開発が進めば、CO₂を用いた新規合成反応群が生み出されるだろう。最終的には、微生物や植物がCO₂をバランス良く循環させているように、人類も酵素を駆使することにより自然界に多量に存在するCO₂を用い、持続的社會を築けるようになることが期待される。

7. 謝辞

本研究を行うにあたり、龍谷大学理工学部原田忠夫教授に御指導頂き、感謝致します。また、本研究は龍谷大学理工学部原田研究室の卒業生の皆様との共同研究の結果であり感謝致します。また、3章のリパーゼによる光学活性体の大量合成は、碓屋隆雄教授、有田佳生氏、美澄幸弘博士、市川真一郎氏（東京工業大学）との共同研究であり、4章のアルコール脱水素酵素の反応は、中村薫助教授（京都大学）との共同研究であり、5章の脱炭酸酵素の反応は、長澤透教授（岐阜大学）との共同研究であり、ここに感謝致します。

文 献

1) For organic synthesis in scCO₂, see: P. G. Jessop, T. Ikariya, R. Noyori, *Nature*, 1994, **368**, 231; P. G. Jessop, T. Ikariya, R. Noyori, *Science*, 1995, **269**, 1065; P. G. Jessop, T. Ikariya, R.

Noyori, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 475; P. G. Jessop, W. Leitner, Eds. *Chemical Synthesis Using Supercritical Fluids*; Wiley-VCH: Weinheim, 1999; R. Noyori, T. Ikariya, In *Stimulating Concepts in Chemistry*; F. Vögtle, J. F. Stoddart, M. Shibasaki, Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 2000; pp 13_24; M. F. Sellin, I. Bach, J. M. Webster, F. Montilla, V. Rosa, T. Aviles, M. Poliakoff, D. J. Cole-Hamilton, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2002, **24**, 4569; W. Leitner, *Acc. Chem. Res.*, 2002, **35**, 746; J. M. DeSimone, *Science*, 2002, **297**, 799.

- For enzymatic reaction in scCO₂, see: T. Matsuda, T. Harada, K. Nakamura, T. Ikariya, *Tetrahedron: Asymm.*, 2005, **16**, 909; T. Mori, Y. Okahata, *Chem. Commun.*, **1998**, 2215; T. Mori, A. Kobayashi, Y. Okahata, *Chem. Lett.*, **1998**, 921; A. J. Mesiano, E. J. Beckman, A. J. Russell, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 623; Y. Ikushima, N. Saito, M. Arai, H. W. Blanch, *J. Phys. Chem.*, 1995, **99**, 8941.
- T. Matsuda, R. Kanamaru, K. Watanabe, T. Harada, K. Nakamura, *Tetrahedron Lett.*, 2001, **42**, 8319; T. Matsuda, R. Kanamaru, K. Watanabe, T. Kamitanaka, T. Harada, K. Nakamura, *Tetrahedron: Asymm.*, 2003, **14**, 2087.
- T. Sakai, I. Kawabata, T. Kishimoto, T. Ema, M. Utaka, *J. Org. Chem.* 1997, **62**, 4906; T. Sakai, T. Kishimoto, Y. Tanaka, T. Ema, M. Utaka, *Tetrahedron Lett.* 1998, **39**, 7881.
- T. Moriyoshi, T. Kita, Y. Uosaki, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 1993, **97**, 589.
- T. Matsuda, K. Watanabe, T. Harada, K. Nakamura, Y. Arita, Y. Misumi, S. Ichikawa, T. Ikariya, *Chem. Commun.*, **2004**, 2286.
- T. Matsuda, T. Harada, K. Nakamura, *Chem. Commun.*, **2000**, 1367; T. Matsuda, K. Watanabe, T. Kamitanaka, T. Harada, K. Nakamura, *Chem. Commun.*, **2003**, 1198.
- For carboxylation under ambient conditions, see: M. Wieser, T. Yoshida, T. Nagasawa, *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 4309; M. Wieser, N. Fujii, T. Yoshida, T. Nagasawa, *Eur. J. Biochem.*, 1998, **257**, 495; T. Yoshida, T. Nagasawa, *J. Biosci. Bioeng.*, 2000, **89**, 111; M. Wieser, T. Yoshida, T. Nagasawa, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2001, **11**, 179.
- T. Matsuda, Y. Ohashi, T. Harada, R. Yanagihara, T. Nagasawa, K. Nakamura, *Chem. Commun.*, **2001**, 2194.