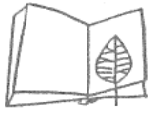


高分子膜と酵素固定化技術を利用するアミノ酸の光学分割



研究ノート

東 稔 節 治*

近年医薬品、食品や動物飼料の添加剤としてアミノ酸の需要が急速に伸びて来ている。アミノ酸の生産には化学合成法が主流を占めている。この場合にはアミノ酸のラセミ水溶液が得られ、これからL型アミノ酸を分離するのに、通常優先晶析法、液体クロマトグラフ法、醗酵や酵素を利用する生物化学的方法、ジアステレオマー塩を得る方法がある。これらの方法は操作も複雑であり、相変化を伴うことが多く、分離条件の決定が容易でない。

ラセミ溶液をアセチル化などによって誘導体とし、酵素によってL型アミノ酸誘導体を加水分解してL型アミノ酸とし、透過選択性をもつ高分子膜でアミノ酸誘導体とアミノ酸を分子径の差異で分離する方法は、相変化を伴わない省エネルギー法として注目されている。酵素の分離と再利用のために、多孔質高分子膜に酵素を固定化し、これと透過選択性膜を組合せてアミノ酸の光学分割を行なう方法は、経済的に実現しうるものであり、筆者らの研究室でここ数年來研究を進めて来た。この方法では透過流束とアミノ酸の分離効率を上げるため、溶液の圧力を上げ、圧力差を推進力とするため、分離に要するエネルギーも少なく、簡便な方法といえる。

1. 高分子膜によるアミノ酸の透過特性

これまでにクラウンエーテルのような包接作用と立体異性体への結合特異性をもつ化合物を多孔質膜に含浸させた機能膜によるアミノ酸の分離の研究や、高分子膜に β -シクロデキストリン基のような分子包接機能をもつ分子基を架橋した機能膜によるアミノ酸の透過機構を調べた

研究がなされている。しかしこのような機能膜では生産速度に対比しうる透過流束が濃度差を推進力とするため、極めて低く、また光学分割として分離度も余り期待されない。圧力差を推進力とする方式では耐圧性のある膜が必要となるが、この種の膜として荷電膜がとりあげられる。アミノ酸は両荷電性物質であり、その透過選択性は荷電膜のもつ特性によって制御できる。

荷電膜の透過流束と分離の目尺とする排除率SRは通常Spiegler-Kedemの関係式で与えられる。原溶液中の溶質濃度 C_r 、透過液中の溶液濃度 C_p とすると、排除率SRは次式で定義される。

$$SR = 1 - C_p / C_r \quad (1)$$

いま体積流束 J_v 、膜の反撥係数 σ 、膜における溶質透過係数 P_s とすると、SRは結果として次の式(2)で与えられる。

$$SR = \sigma(1-F) / (1-\sigma F), \quad (2)$$

$$F = \exp[-J_v(1-\sigma)/P_s]$$

排除率が1のとき、溶質は完全に膜で分離され、排除率が0のとき、溶質は何ら分離されない場合に当る。

アミノ酸について、アラニン、セリン、バリン、スレオニン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン(いずれもL型)の9種を採用して、アニオン交換膜(荷電密度0.9—1.6meq/g、含水率26—34wt%)について加圧下にて排除率と透過流束の関係を調べた。pHを変化させたところ、等電点では透過流速は最大となり、排除率は最小となった。pHが等電点以下ではアミノ酸はカチオンとなり、膜の正電荷による静電的反撥で排除される。等電点以上のpH領域では、負の荷電をもつアミノ酸の吸着量が増大し、膜の細孔内における分子摩擦に

*東稔節治 (Setsuji TONE), 大阪大学基礎工学部, 化学工学科, 反応システム工学講座, 教授, 工学博士, 工学修士, 化学反応工学, 化学分離工学

よる抵抗のため、SRは大きくなるものと考えられた。一方、アミノ酸の誘導体として、アセチルDL-メチオニン、アセチルDL-トリプトファンをアニオン交換膜でSRをpH7、温度37°C、圧力差4Kg/cm²で測定したところ、0.85~0.95の値をえた。一方、L-メチオニン、L-トリプトファンではSRの値は0.3~0.5となり、アニオン交換膜では、アミノ酸誘導体とL-アミノ酸との分離は可成り良好に行なえることが分かった。

溶質の透過機構についてはまだ明らかにされていないところが多いが、分離機構として膜の細孔と溶質分子の相互作用が大であると考え、分子の立体効果 $\sum E_s$ 、静電効果 $\sum \sigma^*$ とすると、溶質透過係数 P_s はこれらの線型和として表示でき、次式をえた。

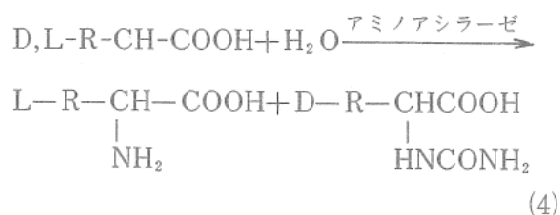
$$\ln P_s = \ln C^* + \rho^* \sum \sigma^* + \delta^* \sum E_s \quad (3)$$

膜の細孔が変化するとき、項 $\ln C^*$ で整理でき、アニオン交換膜の1例について、 $\ln C^* = -12.58$ 、 $\rho^* = -0.59$ 、 $\delta^* = 0.10$ をえた。

アニオン交換膜によるアセチルアミノ酸とL-アミノ酸混合物の分離では、pH領域として8~9の範囲が有効であることが分かった。

2. 酵素固定化膜の反応特性

アセチルL-アミノ酸は酵素アミノアシラーゼによって加水分解し、L-アミノ酸となる。この反応は次のようにかかる。



置換基 $R = \text{CH}_2\text{S}(\text{CH}_2)_2$ のとき、メチオニン及びその誘導体となる。アミノアシラーゼを多孔質膜へ固定化し、加水分解を行なうと、酵素の回収・再利用ができ、プロセスとして有利となる。

酵素の固定化は、1)吸着法、2)包括法、3)マイクロカプセル化、4)イオン交換法、5)架橋法、6)共有結合法、7)共重合法がある。

筆者らの場合は、高分子膜としてポリ塩化ビニル膜を作成した。この膜(PVC膜)にアミ

ノアシラーゼをpH7.5のリン酸緩衝溶液中で、4°C、24hr浸漬し、吸着法によって固定化した膜1g当り50~70mg酵素が担持され、また一週間水溶液中に放置しても酵素が溶離せず、安定であることが分かった。

酵素膜によるアセチルL-アミノ酸の加水分解速度をもとめたところ、pH7.5、37°Cでその値は最大となった。固定化することによって酵素の至適温度は50°Cとなり、熱的安定性が増大した。反応速度はミカエリス・メンテン機構で解析でき、反応速度式は次式で表示された。

$$v = V_m C_s / (K_m + C_s) \quad (5)$$

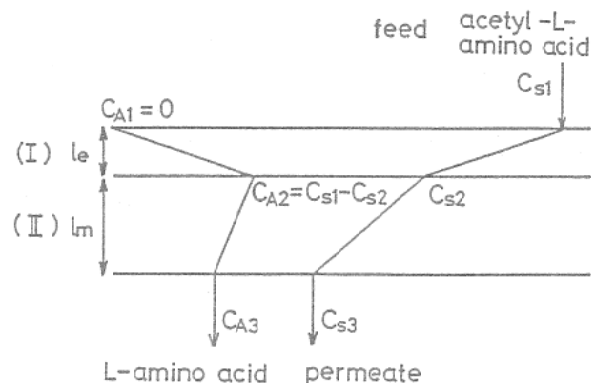
[mol・アセチルL-アミノ酸/l・s]

ここに V_m =最大反応速度、 C_s =アセチルL-アミノ酸濃度[mol/l]、 K_m =実験定数

3. 酵素膜と荷電膜の組合せによるアミノ酸の分離

多孔質PVC膜に固定化した酵素アミノアシラーゼによって溶液中のアセチルL-アミノ酸が加水分解され、L-アミノ酸となる。一方アセチルD-アミノ酸は加水分解されないでPVC膜内に存在するが、その下の荷電膜で反撥され、L-アミノ酸が荷電膜を透過する。

図1に示されよたようにPVC膜は(I)層(膜厚さ l_e)、荷電膜は(II)層(膜厚さ l_m)として組合せ、複合膜として構成した。加圧下では膜内の液流速 U_s は増大し、L-アミノ酸の分離は、膜の酵素反応速度と排除率SRによって支配さ



(I) enzyme membrane
(II) anion exchange membrane

図1 複合膜の溶質濃度分布

れる。

いま加水分解したアセチルL-アミノ酸が生成したL-アミノ酸の量と等しいと考えると、アミノ酸の膜境界面での濃度 C_{A_2} がアセチルL-アミノ酸の加水分解に対応する濃度 $C_{S_1} - C_{S_2}$ について、 $C_{A_2} = C_{S_1} - C_{S_2}$ とおける。SRは次式：

$$SR = 1 - C_{A_3} / (C_{S_1} - C_{S_2}) \quad (6)$$

で表わされるので、結果として次の関係をうる。

$$\ln \frac{C_{S_1}}{C_{S_1} - \frac{C_{A_3}}{1 - SR}} + \frac{1}{K_m} \cdot \frac{C_{A_3}}{1 - SR} = \frac{V_m \cdot l_e}{K_m \cdot U_s}$$

pH, 温度を変化させてえた実測値は式(7)で良好に説明できた。このことから光学分割の効率を高めるには、酵素の活性を大きくし、荷電膜の選択透過性を高くすることが必要であることが分った。荷電膜としては荷電基の種類と濃度、細孔の大きさ、含水率等の諸因子がその選択透過性を大きく変化させており、また研究室としてアニオン交換膜、カチオン交換膜、モザイク膜らの透過性膜を開発し、より優れた光学分割用の膜を研究している。

