

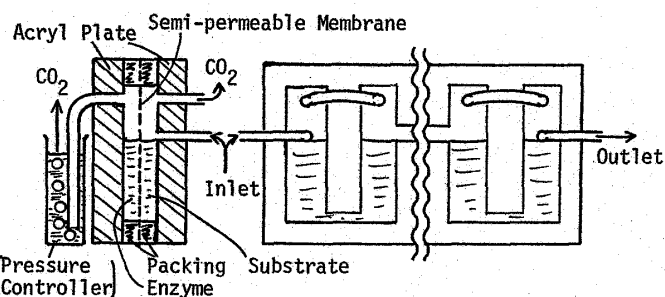
130

酵母の解糖系と *kinase* 系を利用する *Bioreactor* の開発 — ATP の連続再生 —
 (京大食工) ○ 浅田雅宣, 中西一弘, 松野隆一, 上久保 正
 (京大化研) 荻谷泰弘, (京大食研) 木村 光

1. 目的 固定化酵素・固定化微生物及び固定化細胞小器官を利用してエネルギー生産、さらに有用物質生産を行う *Bioreactor* が近年注目されている。^{1~3)} この *Bioreactor* を開発し、連続的に稼働させるためには、そのエネルギー供給体としての ATP を連続的に生産・再生する必要がある。演者らは、酵母乾燥菌体による *glucose* をエネルギー源とした高エネルギー化合物 ATP の蓄積反応を研究してきた。⁴⁾ その過程において、解糖系及び *kinase* 系の一連の酵素が反応液中に溶出されることを知り、⁵⁾ この粗酵素液を用いても *adenosine* 及び AMP が ATP に効率よくリン酸化され、かつ蓄積した ATP は長時間 (24 時間) *incubate* 後もわずかに分解されないことを見出した。したがってこの粗酵素液を連続反応の触媒に用いると、反応液の装置内滞留時間すなわち反応時間をコントロールすることが容易となる。この粗酵素液を用いる、半透膜を応用した連続反応装置を設計・製作し、*Bioreactor* の第一段階であるエネルギー生産・再生系として、連続的に *adenosine* のリン酸化を行い、諸条件・諸因子の検討を行った。またあわせて検討している光硬化性樹脂による酵母菌体の固定化と、⁶⁾ それを用いた連続 ATP 生産・再生についても報告する。

2. 方法 使用酵母は、市販圧搾パン酵母を *acetone powder* に調製して用いた。粗酵素液は、*glucose* 1 M, MgSO_4 20 mM, を含む 600 mM のリン酸 buffer (pH 7.3) に *acetone powder* を 150 mg/ml の割合で懸濁し、28°C にて 3.5 時間振盪後冷却遠心して得た。連続反応の標準基質溶液は、*glucose* 600 mM, MgSO_4 10 mM, *adenosine* 20 mM, NAD 1 mM, リン酸 buffer 600 mM (pH 7.3) である。連続反応装置は 8 槽から成り、各槽は図のように半透膜を介して 2 室に分れ (界面 4 cm × 2 cm 又は 8 cm × 2 cm), 片側の室に酵素液を入れ一種の固定化を行う。他方には基質溶液を連続供給し、膜を介して接触反応後排出させる。各槽とも両室の厚さは 2 mm である。半透膜として *Tisking* の透析 tube, *Biomed Instruments* 社の透析膜、さらに当研究室で調製した *collodion* 膜を用いた。

装置は PFR (*plug flow reactor*) と、1 段と 2 段の CSTR (*continuous stirred tank reactor*) とを製作し反応を行った。



Schematic diagram of continuous reaction apparatus.

本装置では、粗酵素液と基質溶液が半透膜を介して接触しているため、浸透圧差により酵素側の *volume* が増大する。しかし本反応では多量の炭酸ガスを発生するため、酵素側の上部にパイプをつなぎ炭酸ガス排出量を調節することによって、酵素側の圧力を上げ *volume* 増大を抑えた。反応は 28°C で行い、核酸関連物質の分析は PPC で分離後 UV 吸収を測定した。*glucose* は 3,5-dinitrosalicylic acid 法、又は *somogyi-nelson* 法にて、FBP (*fructose-1,6-bisphosphate*) は *Roe* 法にて定量し

シンポジウム (酵素工学)

た。また半透膜を通しての反応物質の透過速度が反応にどのような影響を及ぼすか知るために、半透膜における反応物の物質移動速度を非定常法にて測定した。

3. 結果 半透膜として *Visking tube* (膨潤時厚さ 150μ) を用いた場合は、PFRで滞留時間が12時間の時、総排出核酸関連物質のうちATPの割合は25~30%であった。諸条件を変えてもATPの収率向上は認められず、さらに *inosine*・IMP等の副産物の生成量が多かったため、反応槽における反応物の拡散抵抗の影響が考えられた。このため装置をPFRから1段のCSTR(反応液及び酵素液を高速で循環させる)に改め、連続反応を行ったがATPの収率向上は認められず、槽内の拡散抵抗による影響ではないことがわかった。一方半透膜内における反応物の物質移動速度を測定した結果、この *Visking* の膜内では、ATPに関して拡散係数 $1.188 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec}$ を得た。これは *free* のATPの値の約 $1/20$ であり、平衡濃度に達する時間も約7時間であることから、この膜内の物質移動抵抗が反応に大きく影響を及ぼしていることが明らかになった。次に *Biomed Instruments* 社の透析膜(膨潤時厚さ 30μ , MW 8000でカット)を本装置に用いた。この膜は *Visking* の膜よりも薄くて透過性がすぐれているため(NaClに関して約6倍)、PFRで滞留時間が9時間の時ATPの割合は40~50%であった。この状態は48時間まで続き、その後急激にATPの収率は低下した。さらに半透膜を検討した結果、ガラス板上で調製した *collodion* 膜(厚さ $30\sim 50\mu$) が *Visking* の膜に比較してNaClでは平均4.5倍透過性がすぐれていた。そこで本装置に用いて連続反応を行った結果、PFRで滞留時間が6, 9, 15, 18時間の時、それぞれATPの生成割合は30~35, 50~60, 70~75, 80~85%であった。このように *collodion* 膜を用いることにより、きわめて効率よく *adenosine* を連続的にATPにリン酸化することができたが、いずれの場合も42~48時間経過後、急激にATPの収率が低下した。また装置が1段と2段のCSTRの場合も連続反応を行ったが、同じ滞留時間のPFRと比較しても副産物の量が多くATPの収率も低かった。

本装置・本反応系におけるATPの連続生産・再生は、透過性のすぐれた半透膜を用いてPFRによって可能となったが、長期連続反応では48時間ほどで急速にATPの収率が低下するため、この原因と対策を検討中である。また現在は基質溶液中に添加して流しているNADを可溶性高分子担体に固定化し、酵素側に加えておくことも考えている。

一方、光硬化性樹脂による固定化酵母については、CMPと *choline* とからCDP-*choline* を生産する反応ではあるが *batch* 反応で良好な結果を得たので、本装置と同タイプの連続反応装置での応用を検討している。

- 1) Karen Joy Skinner, C & EN NEWS, 53, 22 (1975).
- 2) G. W. Pace et al., Biotech. Bioeng., 18, 1413 (1976).
- 3) H. Ochiai et al., Agric. Biol. Chem., 41, 721 (1977).
- 4) T. Tochikura et al., Amino Acid and Nucleic Acid, 29, 59 (1974).
- 5) A. Kimura et al., Agric. Biol. Chem., 39, 621 (1975).
- 6) S. Fukui et al., FEBS LETTERS, 66, 179 (1976).