

酵素反応によるアセトアルデヒドの効率的生産

Efficient production of acetaldehyde using enzymatic reaction

○鹿島康浩、岩田英之、種子田艶、田中寿枝、四方孔 (株)耐熱性酵素研究所
 O, Yasuhiro KASHIMA, Hideyuki IWATA, Koh SHIKATA, Tsuya TANEDA, Hisae TANAKA
 Thermostable Enzyme Laboratory Co.,Ltd.

バイオマスからエタノールを生産するためには、バイオマスを糖化する工程と、エタノールを生産する微生物を用いて糖化されたバイオマスをエタノール発酵する工程が必要である。エタノールを生成する微生物は、11個の一連の酵素反応を経てグルコースからエタノールへの変換を行っている。エタノール発酵においてエタノールが蓄積する、エタノールを生成する微生物の活性が損なわれるため、高濃度のエタノールを製造できないという欠点がある。そこで、これらの一連の酵素反応を行うシステムを構築できれば、上記のような微生物を利用するバイオマスエタノールの製造方法の欠点が解消できると期待される。

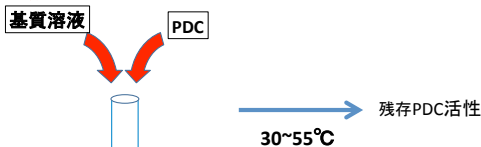
しかしながら、この酵素反応を工業的に実施するには、大きな問題点がある。即ち、アセトアルデヒドには、酵素を失活させる性質があるため、生成したアセトアルデヒドが蓄積すると、酵素反応が進行しなくなるという欠点があり、酵素反応によるピルビン酸からアセトアルデヒドの生成を効率的に実施できないのが現状である。さらに、木材等のセルロース系バイオマスでは、セルラーゼの反応性の低さから高濃度の糖質を得ることが困難であるため、バイオマスエタノールの製造原料として使用するには、得られた糖液(水溶液)の濃縮が必須である。しかしながら、このような糖液の濃縮には、多大なエネルギーを要するため、効率的なエタノール生産が困難になるという問題点がある。そこで、低濃度のピルビン酸から、濃縮された状態のアセトアルデヒドを製造できる方法が開発できれば、セルロース系バイオマスを利用したバイオマスエタノールの製造における従来技術の欠点を克服することもできる。

そこで、耐熱性酵素を用いたバイオマスの効率的利用方法を確立する一環として、反応蒸留法によるアセトアルデヒドの効率的生産方法について検討した。

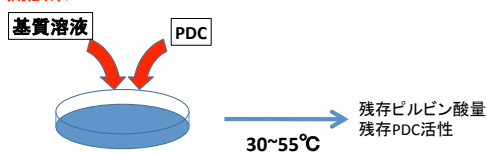
実験方法

10 ml の基質溶液 (10 mM ピルビン酸ナトリウム、0.1 M 酢酸ナトリウム (pH6.0)、5 mM MgCl₂、0.1 mM Thiamine pyrophosphate) に耐熱性ピルビン酸デカルボキシラーゼ (PDC) を加え、30°C、40°C、50°C、55°Cにて10分間インキュベートした。

閉鎖系



開放系



残存ピルビン酸量

50 mM MOPS (pH6.5)、0.2 mM NADH、LDH + 反応溶液 → NADHの消費量を測定することにより、残存ピルビン酸量を測定。

残存PDC活性

10 mM ピルビン酸ナトリウム、0.1 M 酢酸ナトリウム (pH6.0)、5 mM MgCl₂、0.1 mM Thiamine pyrophosphate、alcohol dehydrogenase (yeast) + 反応溶液 → NADHの減少速度を測定することにより、残存PDC活性を測定。

考察

ピルビン酸デカルボキシラーゼによるピルビン酸からの脱炭酸反応によってアセトアルデヒドを生成する反応を、閉鎖系及び開放系にて行った。閉鎖系では酵素活性の増大(反応温度の上昇)によって残存酵素活性が減少していくのに対して、開放系では逆に残存酵素活性が上昇した。特に50°C以上での反応で酵素の失活がほとんど観察されず、温度の上昇に伴って、沸点の低いアセトアルデヒド(20°C)が反応系から効率的に留去されているためであると考えられる。酵素反応を反応温度及び圧力雰囲気が下記の式を満たす環境下で行うことにより、効率的にアセトアルデヒドを溜居することができると考えられる。

$$\log_{10} P \leq 7.0565 - 1070.6 / (t + 206.2)$$

$$P: \text{圧力雰囲気 (mmHg)} \quad t: \text{反応温度 (°C)}$$

酵素反応を用いた反応蒸留法は、耐熱性の高い酵素(耐熱性酵素)を用いた場合にのみ行える方法であり、さまざまな揮発性物質の酵素による高効率生産に利用可能である。

結果1. 酵素反応後の残存ピルビン酸量

残存ピルビン酸量は、反応温度に依存して減少しており(図1)、ピルビン酸からPDCの脱炭酸反応によりピルビン酸の減少分のアセトアルデヒドが生成しているものと考えられる。

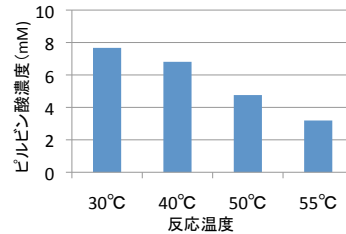


図1. 各温度におけるPDCによる酵素反応後の残存ピルビン酸量

結果2. 閉鎖系におけるPDC反応後反応溶液中の残存PDC活性

反応温度の上昇に伴って、反応溶液中の残存PDC活性の減少が認められた(図2)。反応温度による熱変性と共にピルビン酸から生成されたアセトアルデヒドによる酵素に対するダメージがあるものと考えられる。

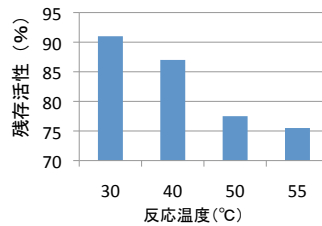


図2. 閉鎖系における各反応温度における反応溶液中のPDCの残存活性

結果3. 開放系におけるPDC反応後反応溶液中の残存PDC活性

反応温度の上昇に伴って、反応溶液中の残存PDC活性の上昇が認められた(図3)。酵素反応によって生成したアセトアルデヒドが反応液中から蒸発・除去されることによって、酵素へのダメージが減少したためであると考えられる。

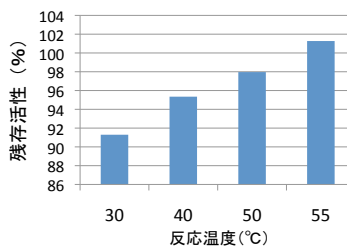


図3. 開放系における各反応温度における反応溶液中のPDCの残存活性