

R - (-) - マンデル酸生産リアクターの回収液からの電気透析による補酵素NADの分離回収及び菌体のコロイダルシリカ混合ゲルへの固定化

食品室 赤 嶺 欣 哉
梶 原 茂 *
細 野 邦 昭 **

1. 緒言及び目的

現在アミノ酸を初めとする各種の光学活性体が微生物・酵素を用いて生産されている。

R - (-) - マンデル酸は α -ヒドロキシカルボン酸の一つで、図1に示したセファロsporin系抗生物質(図1の(II))や肥満防止剤(図1の(III))の側鎖修飾剤として用いられ、その生産量は世界で年間約 1000 トンと推定されている。

現在、R - (-) - マンデル酸(図1の(I))は、ベンズアルデヒドと青酸を用いる化学合成でラセミ体を合成し、ついでそれを光学分割して製造されている。このほか、クロマトグラフィーやエステラーゼを利用する光学分割、化学的な不斉合成、さらに休止菌体によるベンゾイルギ酸(図1の(IV))の不斉還元を用いる方法¹⁾も発表されている。

この微生物酵素による方法を連続的に実施するためには、休止菌体固定化法の適用が考えられるが、菌体内の反応に組み込まれている還元型補酵素の再生を効率よく行うという見地から、純化した酵素系を再構成して、それを固定化する方法により、ベンゾイルギ酸からR - (-) - マンデル酸を生産する共役酸化還元反応のバイオリアクターが工業技術院微生物工業技術研究所で開発^{2) 3)}された。

この共役酸化還元反応(図2)によるR - (-) - マンデル酸の生産のプロセスには、3つの技術要素が含まれている。第1に主反応用酵素、第2にNADH再生反応用酵素、そして第3に、これらの共役酵素系の効率的な固定化である。

NADH再生反応酵素については、平衡がNADH生成に有利であること、副産物の二

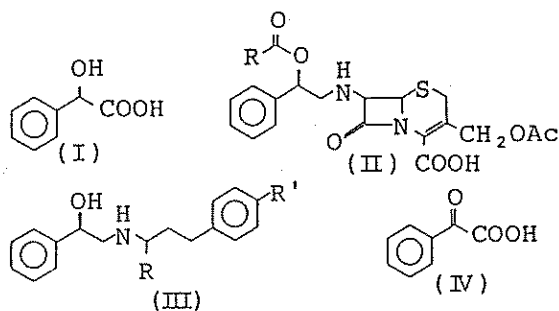


図1 R - (-) - マンデル酸とその関連物質の構造式

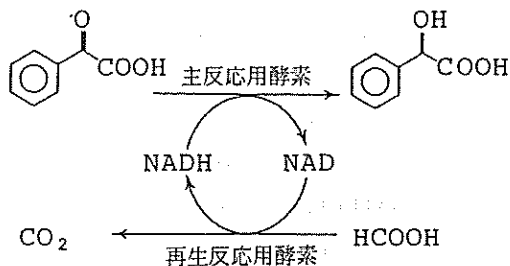


図2 共役酸化還元酵素反応によるR - (-) - マンデル酸の生産

* 工業技術院微生物工業技術研究所酵素工学研究室研究員

** 同 上 室長

酸化炭素がガスとして反応系から容易に除けることなどの点から、*Streptococcus faecalis* (以後FDHと略) が適当であるとされている。

主反応用ベンゾイルギ酸還元酵素 (以後BFRと略) 生産菌の選定は、土壌より分離したR-(−)-マンデル酸資化性菌6株、及び各種保存施設や微生物工業技術研究所における保存菌株の中から選出された微生物183株について調べたところ、*Streptococcus faecalis* IFO 12964株 (以後*S. faecalis* と略) が最も酵素生産能力の高いことが認められたので、本菌が酵素 (BFR) 生産用に選定された。

この共役酵素系の固定化にあたっては、補酵素 (NADH) というシャトルのやりとりがスムーズにいくように共役する複数の酵素が相対的に自由に運動でき、なおかつ系 (リアクター) の外には出ないように束縛されている状態にならなければいけないので巨大な空孔の中に酵素を保持する粉末分散型液滴包括固定化法 (図3) は、共役酵素系に適した方法である。

固定化酵素ゲルをカラムに充填し、0.1 M ベンゾイルギ酸、0.3 M ギ酸、0.3 mM NAD等を含む基質液を通液すると、きわめて効率よくR-(−)-マンデル酸に変換することが可能になった。しかし、基質液に補酵素NAD等を多量に用いるのでコスト的に問題がある。以上のことが微生物工業技術研究所で研究されてきたことである。

微生物の菌体固定化法としてアルギン酸カルシウムゲルによる固定化法があるが、多糖類のゲルには物理的強度が弱いという欠点がある。アルギン酸にコロイダルシリカを添加混合して作成したゲルは物理的強度の増大が図れ、そして固定化酵母ゲルの10%グルコース濃度におけるエタノール生産率はアルギン酸カルシウムゲルより、アルギン酸-コロイダルシリカ混合ゲルが高く、混合ゲルは牛血清アルブミンやγ-グロブリンの様なタンパク質を保持する能力があったと、Yaichi Fukushima etc⁴⁾は報告している。

今回微生物工業技術研究所での研修は、このR-(−)-マンデル酸生産バイオリアクターに関するいくつかの試験をおこなった。実習内容は以下の通りである。

- (1) バイオリアクター回収液からの電気透析による補酵素NAD (M. W. = 705.4) の分離回収 (NADの再利用目的のため)
- (2) 乳酸菌*S. faecalis* 及び酵母 *Candida sp.* N-17 (以後 *Candida sp.* と略) の菌体のアルギン酸とコロイダルシリカ混合ゲル⁴⁾への固定化。

このうちⅡについては群馬県工業試験場・木村紀久氏と共同で実施した。

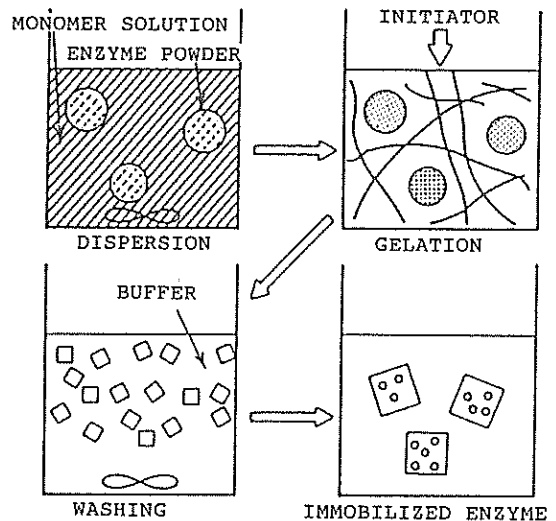


図3 粉末分散型液滴包括固定化酵素の調整法

2. 実習方法及び内容

2-1. バイオリクター回収液からの電気透析による補酵素NAD (M. W. = 705.4) の分離回収 (NADの再利用目的のため)

共役酸化還元反応によるR - (-) -マンデル酸の生産には、主反応で多量に補酵素としてNADHが用いられ、反応によりNADHがNADに変化する。また、NADH再利用のため、NADH再生反応により、FDHでNADがNADHに再生される。高価な補酵素NADを、バイオリクターの回収液から分離回収する目的で電気透析を行った。

(1) 装置及びカートリッジ

電気透析装置は卓上脱塩装置マイクロ・アシライザーS-1100 (旭化成工業株式会社) を用いた。イオン交換膜カートリッジ (旭化成工業株式会社製) は3層膜を4種類 (111, 121, 131)、及び4層膜を2種類 (1211, 1311) 用いた。

図4は電気透析装置に三層膜及び四層膜を用いたときの模式図である。膜には三桁の番号の三層膜と四桁の番号の四層膜がある。三層膜は、+電極から陽イオン透過性膜(百の位)、陰イオン透過性膜(十の位)及び陽イオン透過性膜(一の位)の順で並んだ構造になっている。四層膜は、+電極から陰イオン透過性膜(千の位)、陰イオン透過性膜(百の位)、陰イオン透過性膜(十の位)及び陽

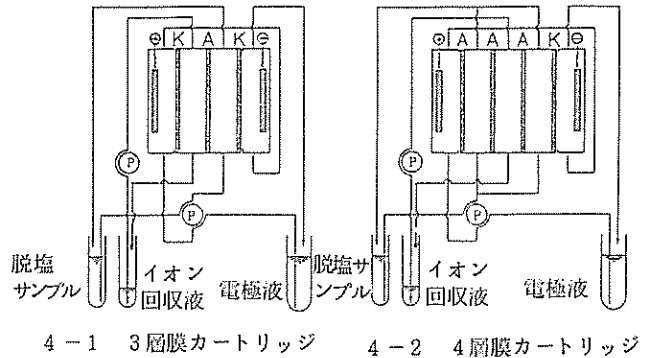


図4 透析用膜カートリッジの模式図

イオン透過性膜(一の位)の順で並んだ構造になっている。それぞれの位の数の大きさには、1から3までであるが数が大きくなるほど大きな分子が透過し易くなる。そして、脱塩サンプルはそれぞれの膜の十の位の陰イオン透過性膜と一の位の陽イオン透過性膜の間に供給され、透析される。

(2) 透析方法

イ. 電極液用チューブに電極液 (0.5 M NaNO₃) を20ml入れ、脱塩用チューブにバイオリクターの疑似回収液 (表1) を10ml入れ、イオン回収用チューブに脱イオン水を5ml入れ電気透析装置にセットした。

ロ. 電気透析装置のスイッチを入れ、電流値が0.02 Aになるまで透析を行った。

ハ. 電気透析の間、任意の時間に数回、脱塩用及びイオン回収用チューブからのサンプリグや各チューブの液量及び電流値を測定した。また、サンプリグ液のR - (-) -マンデル酸とNADの測定を行った。

ニ. NADとR - (-) -マンデル酸の分離能の良いイオン交換カートリッジを用いて、疑

表1 疑似回収液の組成

成分	濃度
R - (-) -マンデル酸	100 mM
NAD	300 μM
ギ酸ナトリウム	200 mM
炭酸カルシウム	100 mM
エチレンジアミン・2HCl	0.05M

似回収液を2倍の20mlにして電気透析を行った。そして、R - (-) -マンデル酸とNADの測定を行った。

(3) 分析方法

イ. R - (-) -マンデル酸の定量法

高速液体クロマトグラフィーにより測定を行った。分析条件は、使用カラムODS - 120 A (東ソー社製)を用い、カラム温度40°C、送液に13mMリン酸2水素アンモニウム、流速1 ml/min、UV検出器210 nmで測定を行った。

ロ. NADの定量法⁹⁾

表2の反応試薬を用い、30°Cに恒温した分光セル中で反応を行い、340 nmの吸光度変化を記録した。

まず、緩衝液(a) 2.89 mlと試料溶液 100 μlを反応セル中へ入れ混合し、吸光度を測定し、その吸光度をE1 (blank)とした。次にADH (b) 10 μlを加え、吸光度を測定し、その吸光度をE2 (反応終了時)とした。更にADH 10 μlを加え、吸光度を測定し、その吸光度をE3 (E3 - E2はADH 10 μl自体のOD)とした。

下記の計算式によりサンプル1 ml当りのNAD量を計算した。

$$c = 3.0 \cdot \{ (E2 - E1) - (E3 - E2) \} / (6.22 \cdot 1.0 \cdot 0.10)$$

(μ mole / ml sample)

2 - 2. 乳酸菌 *S. faecalis* と酵母 *Candida sp.* の菌体のアルギン酸ゲル及びアルギン酸-コロイダルシリカ混合ゲルへの固定化

(1) 菌体の培養

<*S. faecalis* IFO 12964の培養>

イ. *S. faecalis* を保存培地 (MRS培地) から白金線でとり、トマトジュースM-Co培地 (表

表3 *S. faecalis* 酵素生産用トマトジュースM-Co培地組成 (1リットル当り)

トマトジュース	1	缶
$\left[\begin{array}{l} \text{デルモンテトマトジュース缶 (195 g 入) を全量} \\ \text{遠心分離 (8000 r. p. m) した後、上澄み液を} \\ \text{吸引濾過 (東洋濾紙 No 7) して用いた} \end{array} \right]$		
ディフィコ バクト・トリプトン	10	g
ニッスイ マルトエキス	10	g
グルコース	10	g
CoSO ₄ · 7H ₂ O (最終pH 7.2)	0.1	g

表2 NADの定量に用いる反応試薬溶液

a : 75 mMピロホスフェイトセミカルバジド緩衝液

Na ₄ P ₂ O ₇ · 10H ₂ O	3.33 g	100 ml 当り
セミカルバジド塩酸	0.84 g	
グリシン	0.17 g	
エタノール	1.00 ml	
pH = 8.7 with 2 N NaOH		

b : アルコールデヒドロゲナーゼ

(ADH、ベーリンガー社製、酵母菌由来)]
(NH ₄) ₂ SO ₄ suspension, 20 μ/ml	

3) を 4 ml 入れた試験管に接種し、30°C で振盪培養した。

ロ、予備培養した種菌を全量、トマトジュース M-Co 培地約 650 ml を含む 5 l 容バツフル付三角フラスコ 3 本に接種し、30°C で振盪培養した。

ハ、20 時間後、遠心分離 (8000 r. p. m., 0°C) で集菌し、2 mMメルカプトエタノールを含む 15 mMリン酸緩衝液 (pH 6.3) で洗浄した。このときの菌体重量を計った。

< *Candida sp.* N-17 >

Candida sp. については表 4 のメタノール培地 1 l にて、30°C、4 日間振盪培養した。培養した菌体をそれぞれ遠心分離 (8000 r. p. m. × 15 分) により集菌した。この集菌した菌体を固定化に用いた。

(2) ゲルの調製

イ、A1 ゲル

2.0%アルギン酸ナトリウム溶液 50 ml に *S. faecalis* もしくは *Candida sp.* の菌体 0.5 g を懸濁した。その菌体懸濁液を 5% CaCl₂ 溶液 1 l に滴下してゲルビーズを調製し、5 時間ステアリングバーで攪拌しながら 5% CaCl₂ 溶液中で、ゲルを安定化させた。

ロ、AS ゲル

40%コロイダルシリカ溶液 (pH 7 に HCl で合わせる) 25 ml と 3%アルギン酸溶液 25 ml を混合し、そこへ、*S. faecalis* もしくは *Candida sp.* の菌体 0.5 g を懸濁した。その菌体懸濁液を 5% CaCl₂ 溶液 1 l に滴下してゲルビーズを調整し、5 時間ステアリングバーで攪拌しながら 5% CaCl₂ 溶液中で、ゲルを安定化させた。

(3) ゲルに固定化された菌体の確認

菌体を固定化した A1、及び AS ゲルをゲル崩壊防止のために 0.5% CaCl₂ を加えたそれぞれの培養液に移し、30°C で一晚培養した。*S. faecalis* を固定化したゲルでは乳酸の生成による pH の低下を *Candida sp.* を固定化したゲルでは、メタノールの資化性を測定した。

(4) 固定化菌体による R - (-) - マンデル酸及び NADH の生産

S. faecalis 固定化ゲルを 2% グルコース、0.4% NaCl、0.1% CaCl₂、及び 10 mM ベンゾイルギ酸の組成の培地 (pH 6.3) で 30°C で培養し、1 時間毎にサンプリングを行い、ベンゾイルギ酸の減少及び R - (-) - マンデル酸の増加を高速液体クロマトグラフィーで測定した。

一方、*Candida sp.* の固定化ゲルは、200 mM ギ酸ナトリウム及び 300 μM NAD の組成の培地で 30°C で培養し、1 時間毎にサンプリングを行い、NAD の減少を測定した。また、上記の培地の入っている石英セルにゲルビーズを 2 個入れ、セル用スターラーで攪拌しながら、NAD から NADH への変換の経時的変化を 340 nm の吸光度で測定した。

3. 結果及び考察

3-1. バイオリクターの回収液から電気透析による補酵素 NAD の分離回収 (NAD の再利用目的のため)

表 4 *Candida sp.* 用メタノール培地組成 (1 リットル 当り)

成分	重量 (g)
メタノール	10
硫酸アンモニウム	3
リン酸第 1 カリウム	2
硫酸マグネシウム	0.4
硫酸第 1 鉄	0.01
塩化カルシウム	0.01
ビオチン	10 μg
pH	5.8

電気透析に陽イオン交換膜と陰イオン交換膜を数枚組み合わせさせた6種類のカートリッジを用いた。バイオリクターの疑似回収液中のNADとR-(-)-マンデル酸の電気透析による濃度及び総量の変化、そして各チューブの容量変化、電流値の変化を測定した。カートリッジ111, 1211, 1311の結果を図5, 6に示した。この三種のカートリッジを用いた電気透析では、イオン回収側へのR-(-)-マンデル酸の移動がなく、NADとは分離しなかった。脱塩サンプルはカートリッジの1の番号についた陰イオン透過性膜(十の位)と陽イオン透過性膜の間に供給された。この1の番号の陰イオン透過性膜(十の位)を、R-(-)-マンデル酸及びNADは透過しなかった。

図7にカートリッジ131の結果を示した。カートリッジ131では、R-(-)-マンデル酸及び

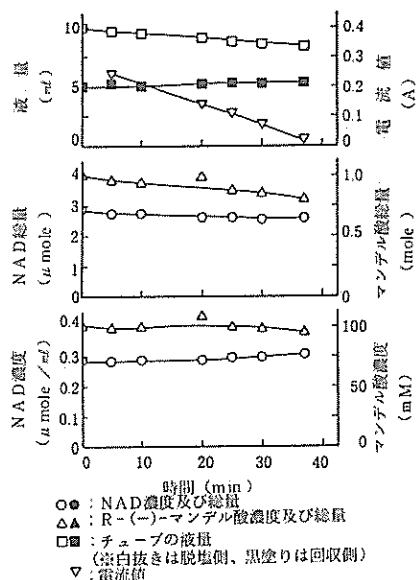


図5 電気透析時の各成分の濃度、総量及び電流値等の経時変化 (カートリッジ111)

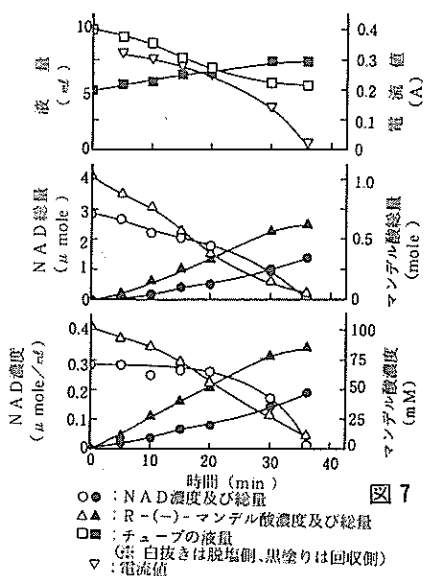


図7 電気透析時の各成分の濃度、総量及び電流値等の経時変化 (カートリッジ131)

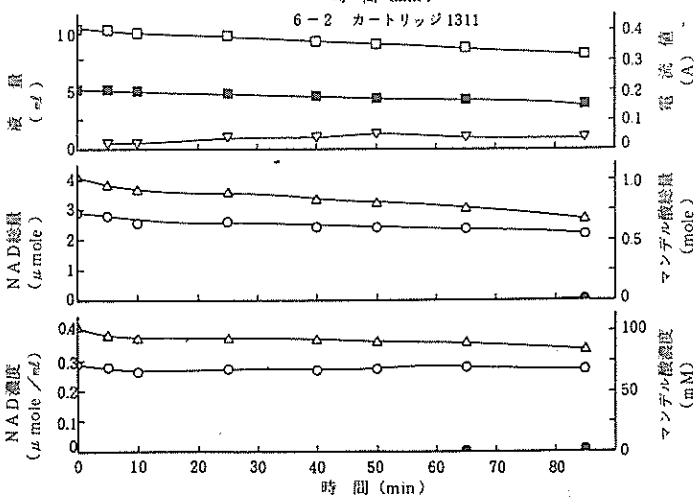
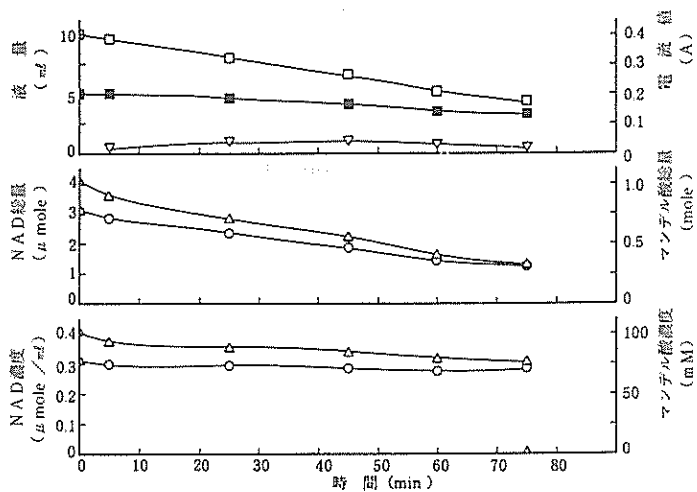


図6 電気透析時の各成分の濃度、総量及び電流値等の経時変化

NADが共にイオン回収側に移動してしまい分離しなかった。カートリッジ131の脱塩サンプルを供給する層の陰イオン透過性膜(十の位)の番号は3であり、3の陰イオン透過性膜(十の位)は、NAD等の大きな分子が透過することが認められた。

図8にカートリッジ121、221の結果を示した。カートリッジ121、221では、R-(-) -マンデル酸がイオン回収側に移動し、NADが脱塩側に残留したので分離することができた。カートリッジ121及び221の陰イオン透過性膜(十の位)の番号は2であり、2の陰イオン透過性膜は、R-(-) -マンデル酸は透過するがNAD程の大きさの分子は透過しないことが認められた。カートリッジ

121のR-(-) -マンデル酸回収率が57%及びNAD

D残留率が62%だった。カートリッジ221のR-(-) -マンデル酸回収率が58%でNAD残留率が61%だった。この6種類のカートリッジの中で、この二種類のカートリッジがR-(-) -マンデル酸とNADの分離に適したイオン交換膜の組合せのカートリッジであることが認められた。

今回の実験で四層膜を用いたのは、陰イオン透過性膜(十の位)と陽イオン透過性膜(一の位)間(脱塩サンプル室)からNAD以外の分子を二つの陰イオン透過性膜(百の位と十の位)間(イオン回収室)に透過させ、また、イオン回収室からは、R-(-) -マンデル酸だけを残し、更にR-(-) -マンデル酸より小さい分子のギ酸を陰イオン透過性膜(百の位)に透過させ、二つの陰イオン透過性膜(千の位と百の位)にはさまれた脱塩室に透過させ、R-(-) -マンデル酸だけを除いたNADを含む脱塩溶液を得ることが目的だったが、今回用いたカートリッジではR-(-) -マンデル酸だけを除いた脱塩溶液が得られなかった。

R-(-) -マンデル酸の回収率及びNAD残留率を増大させるために、脱塩側の液量を2倍にしてカートリッジ121、221を用い電気透析を行った結果を表5、図9に示した。カートリッジ121のR-(-) -マンデル酸回収率が71%に増え、透析前の脱塩側のR-(-) -マンデル酸濃度に比較して約1.8倍の濃度になり、NADの残留率も74%に増えた。カートリッジ221も121と同様にR-(-) -マンデル酸回収率が76%に増え、透析前の脱塩側のR-(-) -マンデル酸に比較して約1.7倍の濃度になりNAD残留率も74%に増えた。脱塩側の液量を増やすことにより、透析時間は延びるが、R-(-) -マンデル酸とNADの分離が良くなり、回収率及び残留率が増大しR-(-) -マンデル酸が濃縮した形で回収できるようになった。今後、電極液等の分離条件

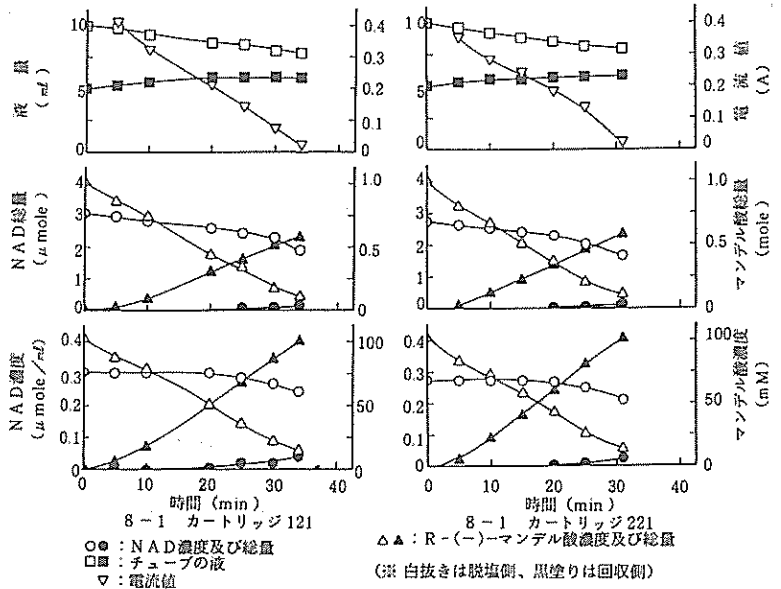


図8 電気透析時の各成分の濃度、総量及び電流値等の経時変化

表5 R - (-) - マンデル酸の回収率及びNADの残留率

		脱塩側10ml、イオン回収側5ml			脱塩側20ml、イオン回収側5ml			
		透析前	透析後	回収率 (残留率) (%)	透析前	透析後	回収率 (残留率) (%)	
1 2 1	NAD濃度 ($\mu\text{mole}/\text{ml}$)	IN	0.309	0.246	0.275	0.246		
		OUT	0.0	0.029	0.0	0.058		
	NAD量 μmole	IN	3.09	1.92	(62)	5.50	4.06	(74)
		OUT	0.0	0.17		0.0	0.47	
	マンデル酸濃度 (mM)	IN	103.3	15.5		98.0	18.8	
		OUT	0.0	101.2		0.0	173.0	
マンデル酸量 (m mole)	IN	1.03	0.12		1.96	0.31		
	OUT	0.0	0.59	57	0.0	1.40	71	
2 2 1	NAD濃度 ($\mu\text{mole}/\text{ml}$)	IN	0.275	0.212	0.285	0.256		
		OUT	0	0.024	0	0.058		
	NAD量 μmole	IN	2.75	1.67	(61)	5.70	4.22	(74)
		OUT	0	0.14		0	0.51	
	マンデル酸濃度 (μmM)	IN	102.5	14.7		103.2	17.7	
		OUT	0	102.0		0	178.9	
マンデル酸量 (m mole)	IN	1.02	0.12		2.06	0.29		
	OUT	0	0.59	58	0	1.57	76	

* IN: 脱塩用チューブ側 OUT: イオン回収用チューブ側

の検討を行えば、分離能が改善される可能性がある。そして、R - (-) - マンデル酸と共に回収されたNAD再生用基質である過剰なギ酸とR - (-) - マンデル酸の分離ができる膜の組合せのカートリッジを選択すれば、NADの再利用だけでなく、ギ酸の再利用も考えられるので、電気透析とバイオリクターをうまく組み合わせれば、効率よくバイオリクターでR - (-) - マンデル酸が生産できる可能性がある。

3 - 2. 乳酸菌 *S. faecalis* と酵母 *Candida sp.*

の菌体のアルギン酸カルシウムゲルとコロイダルシリカーアルギン酸混合ゲルへの固定化

(1) *S. faecalis* について

トマトジュースM-C₀ 培地2リットルで *S. faecalis* を培養した結果、菌体5.4g (湿重量) が得られた。50mlのA1コロイド及び50mlのASコロイドに0.5gずつ湿菌体を分散させ

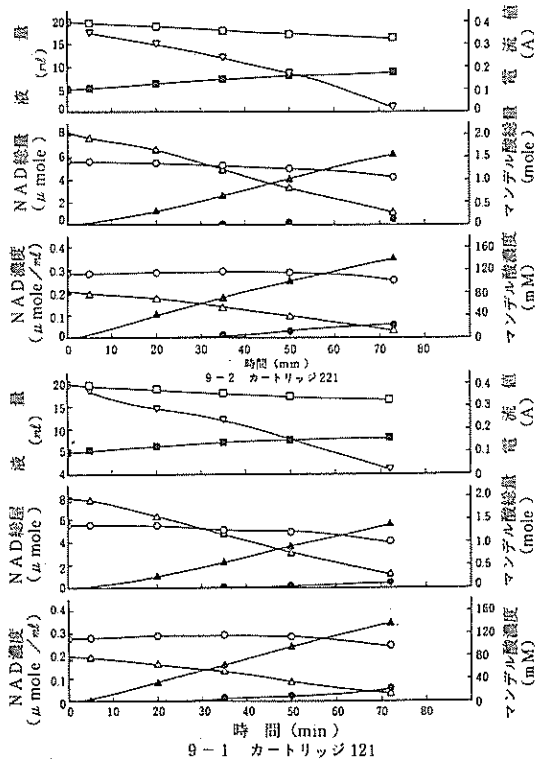


図9 電気透析時の各成分の濃度総量及び電流値等の経時変化

た。菌体を均一に拡散させた後、5%CaCl₂に滴下してゲルビーズを調製した。A Sコロイドはあまりにも粘性が高かったので、パスツールピペット用いての滴下操作ができなかったので、ガラス棒に伝わらせて滴下した。ゲル重量はA 1ゲルが28.4 g、A Sゲルが47.3 gであった。この2種のゲルをそれぞれトマトジュースM-Co培地(pH 7.2)に入れ、30°C、20時間培養したところ、pHはA 1ゲルが5.4、A Sゲルが4.7に低下していた。これは、*S. faecalis*が生育して乳酸菌を生成したためpHが低下したと考えられる。また、光学顕微鏡にて観察したところ、数多くの菌体がA 1及びA Sゲル共に保持されていた。

この2種のゲルを10mMベンゾイルギ酸を含む基質液に移して、30°CでR-(-) -マンデル酸の生産を行った。その時のベンゾイルギ酸の減少及びR-(-) -マンデル酸の増加を測定した結果、ベンゾイルギ酸は始め10mMあったのが、24時間後には、A 1ゲルで8.8 mM(消費率12%)、A Sゲルで9.1 mM(消費率9%)であった。また、R-(-) -マンデル酸は、A 1及びA Sゲルともに0.03 mMしか検出されなかった。しかし、理論的には、ベンゾイルギ酸1モルからR-(-) -マンデル酸1モルが生成するが、今回は、等量の生成が認められなかった。

このことについては様々な理由が考えられる。第一に生成したR-(-) -マンデル酸が菌体内に蓄積され菌体外に出ていかなかった。第二に、この実験では、基質のベンゾイルギ酸濃度が高すぎて、ベンゾイルギ酸からR-(-) -マンデル酸への変換システムがダメージを受けているのではないかということである。

(2) *Candida sp.* について

表4のメタノール培地1リットルで *Candida sp.*を培養した結果、菌体1.05 g(湿重量)が得られた。50mlのA 1コロイド及び50mlのA Sコロイド0.5 gずつ湿菌体を分散させた。菌体を均一に拡散させた後、5%CaCl₂に滴下してゲルビーズを調製した。ゲル重量はA 1ゲルが26.8 g、A Sゲルが34.7 gであった。この2種のゲルをそれぞれメタノール培地(pH 5.8)に入れ、30°C、20時間培養した。はじめ1%のメタノール培地がオートクレーブ滅菌後0.8%になり、さらにA 1ゲル培養後では0.70%、A Sゲル培養後0.74%にそれぞれ減少した。メタノールは0.8%からわずかの減少であるがゲルに固定化された酵母により資化された。資化量が少ないのは生育が遅い菌体を20時間しか培養を行わなかったため菌体濃度が低く充分資化されなかったと考えられる。また、光学顕微鏡にてA 1及びA Sゲルを観察したところ、数多くの酵母がゲルに保持されていた。

この2種のゲルをそれぞれ200 mMギ酸ナトリウム、300 μM NADを含む基質液に移して、30°Cで培養しNADからNADHへの変換が行われているか調べた。NADは培養5時間後にA 1ゲルで0.270 μmole/mlから0.251 μmole/mlに、A Sゲルで0.275 μmole/mlから0.251 μmole/mlにそれぞれ減少していた。しかし、セルにそれぞれのゲルビーズを2粒ずつ入れ、セル用スターラーで搅拌しながら、340 nmの吸光度でNADHを測定し、NADからNADHへの変化を経時的に測定したところ、共に吸光度に変化が認められなかった。これは、菌体内にNADが取り込まれても、NADHに変換されていないか、変換されたとしても菌体外に変換されたNADHが分泌されていないことを示している。このことは、*S. faecalis* におけるR-(-) -マンデル酸の場合と同様に、*Candida sp.*においても変換されたかNADHが菌体内に蓄積されていることが考えられる。

4. 要 約

6種類のイオン交換膜カートリッジの中で2種類のカートリッジがR-(-) -マンデル酸とNADを電気透析により分離することができた。121カートリッジはR-(-) -マンデル酸回収率が57%でNAD残留率が62%だった。221カートリッジはR-(-) -マンデル酸回収率が58%でNAD残留率が61%だった。脱塩側の液量を2倍にして電気透析を行うと、R-(-) -マンデル酸回収率及びNAD残留率を増すことができた。121カートリッジはR-(-) -マンデル酸回収率が71%になり、濃度としては約1.8倍に濃縮され、NAD残留率は74%に増大した。今後、電極液等の分離条件の検討を行えば、もっと効率よく分離できる可能性がある。そして、R-(-) -マンデル酸だけを回収できるイオン交換膜の組合せのカートリッジを選択すれば、NADの再利用だけでなく、NAD再生用基質であるギ酸の再利用も考えられるので、電気透析装置とバイオリクターをうまく組み合わせれば、NADやギ酸が再利用でき、効率よくR-(-) -マンデル酸が生産できるようになる。

S. faecalis を固定化したA1、ASゲルを用いてベンゾイルギ酸からR-(-) -マンデル酸への変換を行うと、ベンゾイルギ酸は消費されたが、R-(-) -マンデル酸は基質液にわずかししか検出されず、当量の生産が認められなかった。この理由の一つとして、生成したR-(-) -マンデル酸が菌体内に保持され、菌体外に出ていかなかったと考えられる。理由の二つ目として、基質液のベンゾイルギ酸濃度が高すぎて、ベンゾイルギ酸からR-(-) -マンデル酸への変換システムがダメージを受けているのではないかということである。

Candida sp. を固定化したA1、ASゲルを用いて、NADからNADHへの変換を行った。A1、ASゲルともNADの減少が認められた。しかし、A1、ASゲルとも、基質液中のNADHが、ほとんど認められなかった。これは、菌体外にNADHが出てきてないことを示している。このことは*S. faecalis* におけるR-(-) -マンデル酸の場合と同様に、*Candida sp.* においても生成したNADHが菌体内に蓄積されていることが考えられる。

今回の菌体を固定化したA1ゲルとASゲルによる物質変換の差異がバッチ法では認められなかった。

5. あとがき

本研究は昭和63年度中小企業大学校中小企業技術指導員養成課程6カ月コースの実修として工業技術院微生物工業技術研究所酵素工学研究室において行ったものである。

6. 参考文献

- 1) 濱口茂樹, 小倉正博, 長谷川淳三, 川原田肇, 渡辺清: 特開昭57-198096
- 2) 山崎幸苗, 梶原茂: *Bio Industry* 5, 261 (1988)
- 3) 前田英勝, 山崎幸苗, 大淵薫, 梶原茂: 不斉合成バイオリクター学会出版センター(1988)
- 4) Yaichi Fukushima, Katsutoshi Okamura, Kazutaka Imai, and Hiroshi Motai: *Biotechnol. Bioeng.* 32, 584 (1988)
- 5) M. Bradford: *Anal. Biochem.*, 72, 248 (1976)
- 6) Boehringer - Mannheim: *biochemica information* 1, 134 (1973)

編 集 沖縄県工業技術センター

発 行 沖縄県工業技術センター

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 12 番 2

T E L (098)929-0111

F A X (098)929-0115

U R L <https://www.pref.okinawa.lg.jp/site/shoko/kogyo/>

著作物の一部および全部を転載・翻訳される場合は、当センターに

ご連絡ください。