

# 固定化酵素によるフロー反応

2020年10月27日



**東洋電化工業株式会社**

TOYO DENKA KOGYO CO.,LTD.

その生産、酵素を使ってみませんか？

固定化酵素を使ったフロー反応の設計

固定化酵素を使った生産での使用例

1. トヨナイト固定化酵素の特長
2. トヨナイト固定化酵素の使用方法
3. テスト用ミニカラム作製
4. カラム連続反応の検討
5. 反応装置のスケールアップ、固定化酵素の回収方法
6. 東洋電化工業(株)ご紹介

# トヨナイト固定化酵素の特長

# トヨナイト固定化酵素の特長

## くり返し使用

酵素が不溶化  
分離回収が容易

## 酵素安定性向上

固定化により  
酵素構造を保護

## カラム連続反応 ができる

形状変化がほとんどない

## 反応後の工程 を簡便化

酵素が離脱・流出しない

工業化スケールアップにつなげる  
実験手法を紹介します。

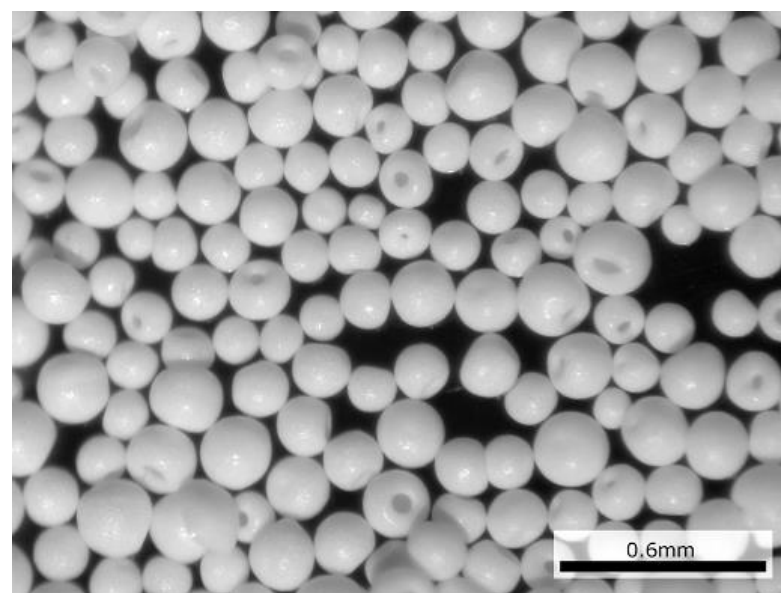
# トヨナイト担体の性質

セラミックスでできている

	トヨナイト	無機系	樹脂系
材質	多孔質セラミックス	活性白土	ポリアクリル系 スチレン系等
酵素との 結合様式	物理吸着	物理吸着	共有結合 イオン結合
修飾官能基	対応可能	—	エポキシ基 アミノ基等
粒子サイズ ( $\mu\text{m}$ )	100~300	20~4000	150~1200

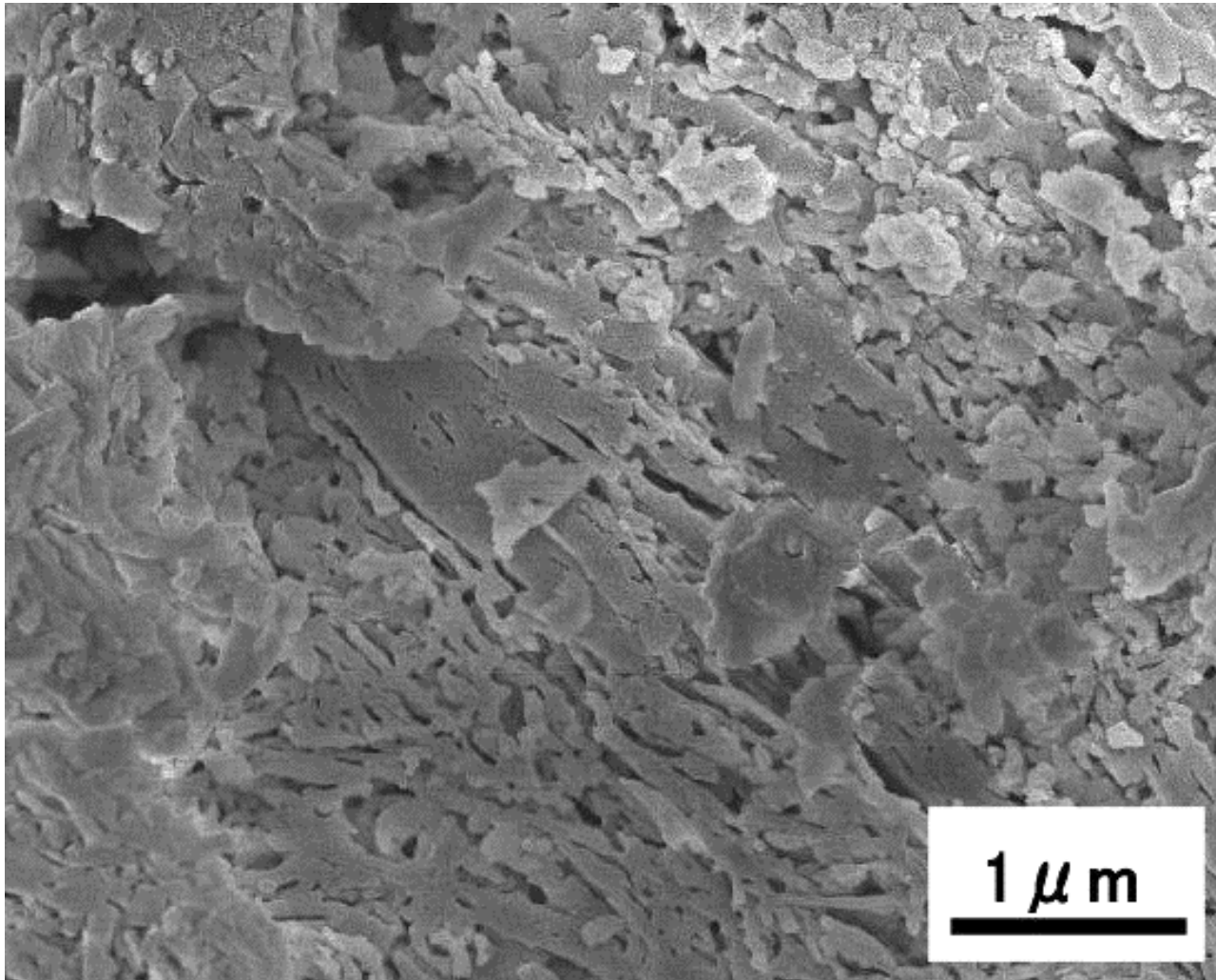
有機溶媒使用可能

膨潤・脆化しない



トヨナイトは平均粒径 $155\mu\text{m}$ の粒状のセラミックスです。

乾燥状態での流動性は良く、粉立ちはほとんどありません。

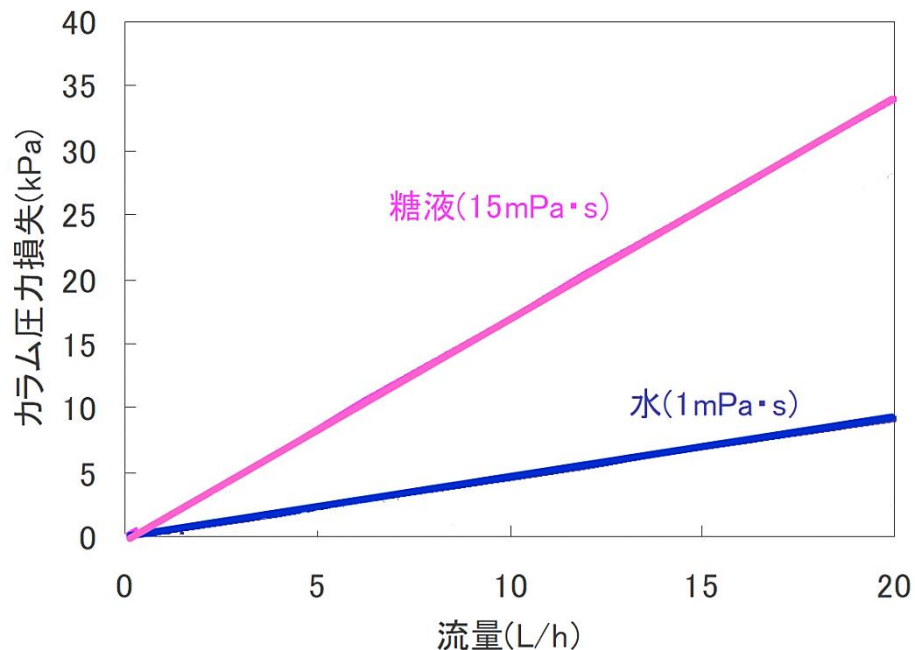


オープンポアが無数に存在し、酵素の固定化に寄与します。



# トヨナイトの機械的性質

トヨナイトの圧力損失評価



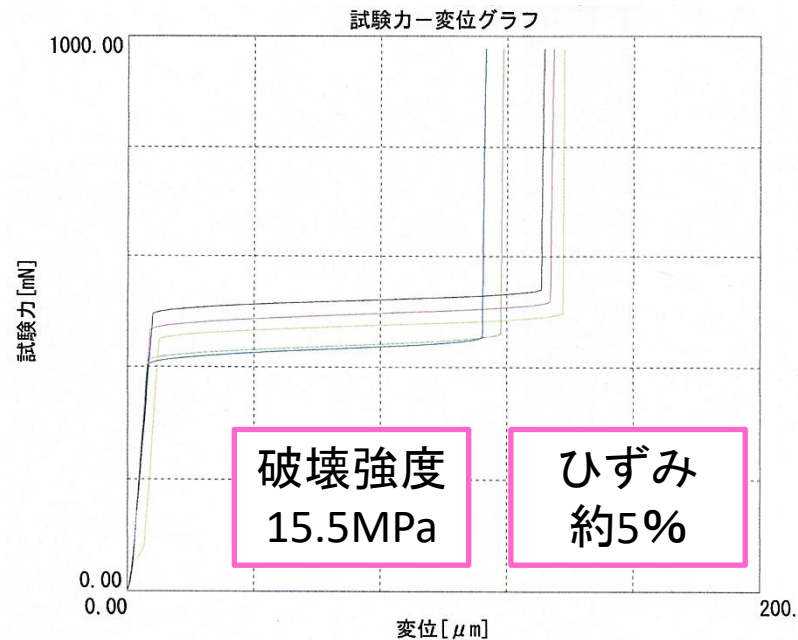
高粘度液を圧送

流量を変動



圧力損失がほとんどない

トヨナイトの圧縮変形評価



トヨナイトはコンクリート同等の固さ

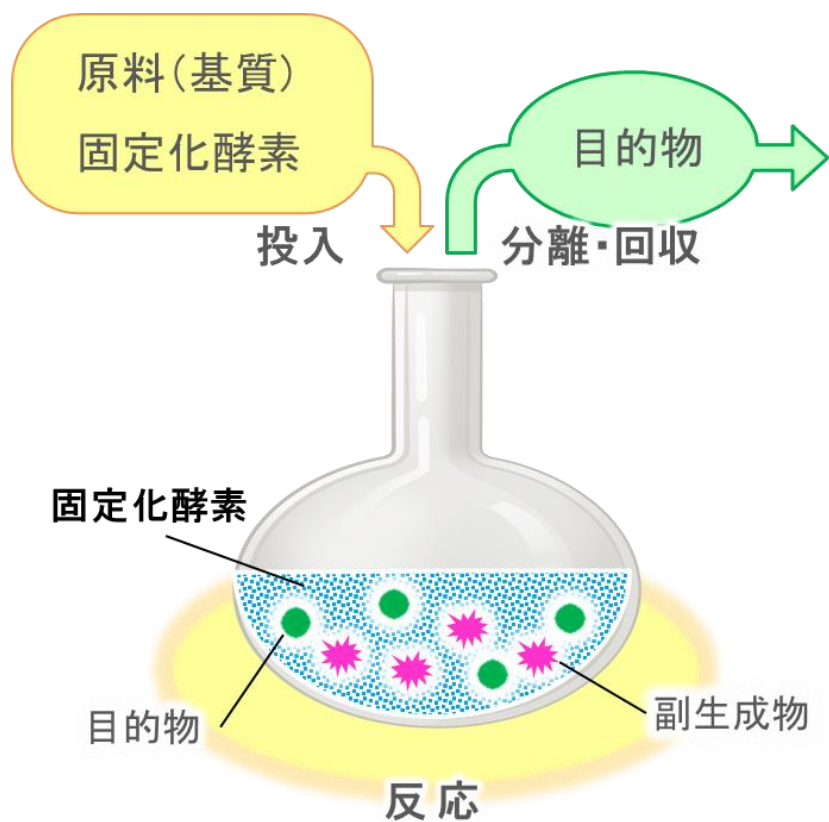


圧縮による変形がほとんどない  
変形による流路変化が生じない

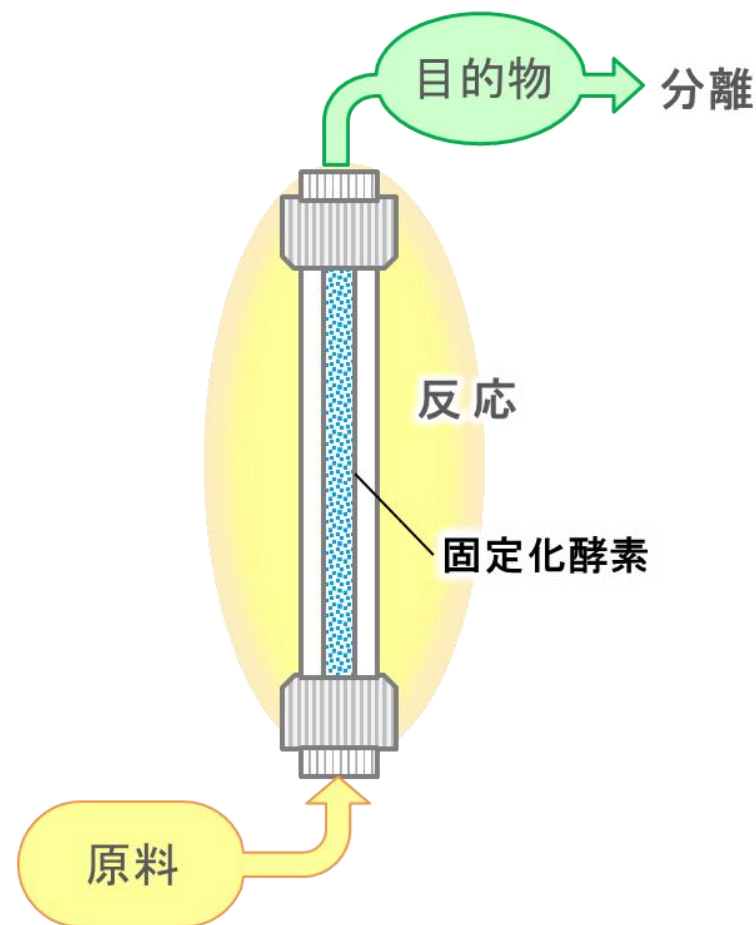
# トヨナイト固定化酵素の 使用方法

# 固定化酵素の使用シチュエーション

## バッチ反応法



## フロー反応法



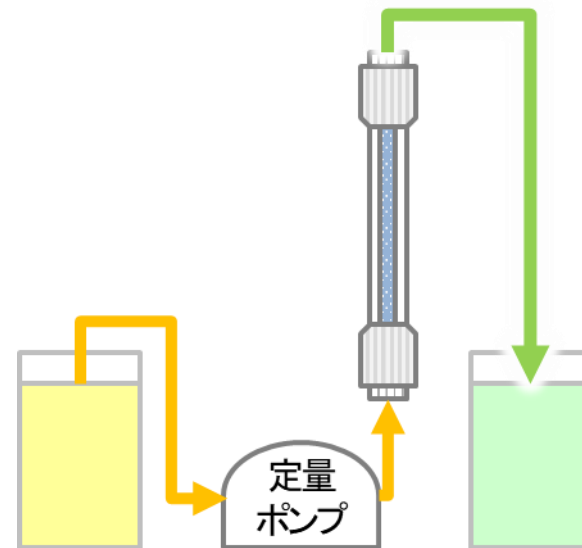
## バッチ反応



フロー反応  
設計

- 基質量、液量
- 反応時間
- 反応率

## フロー反応

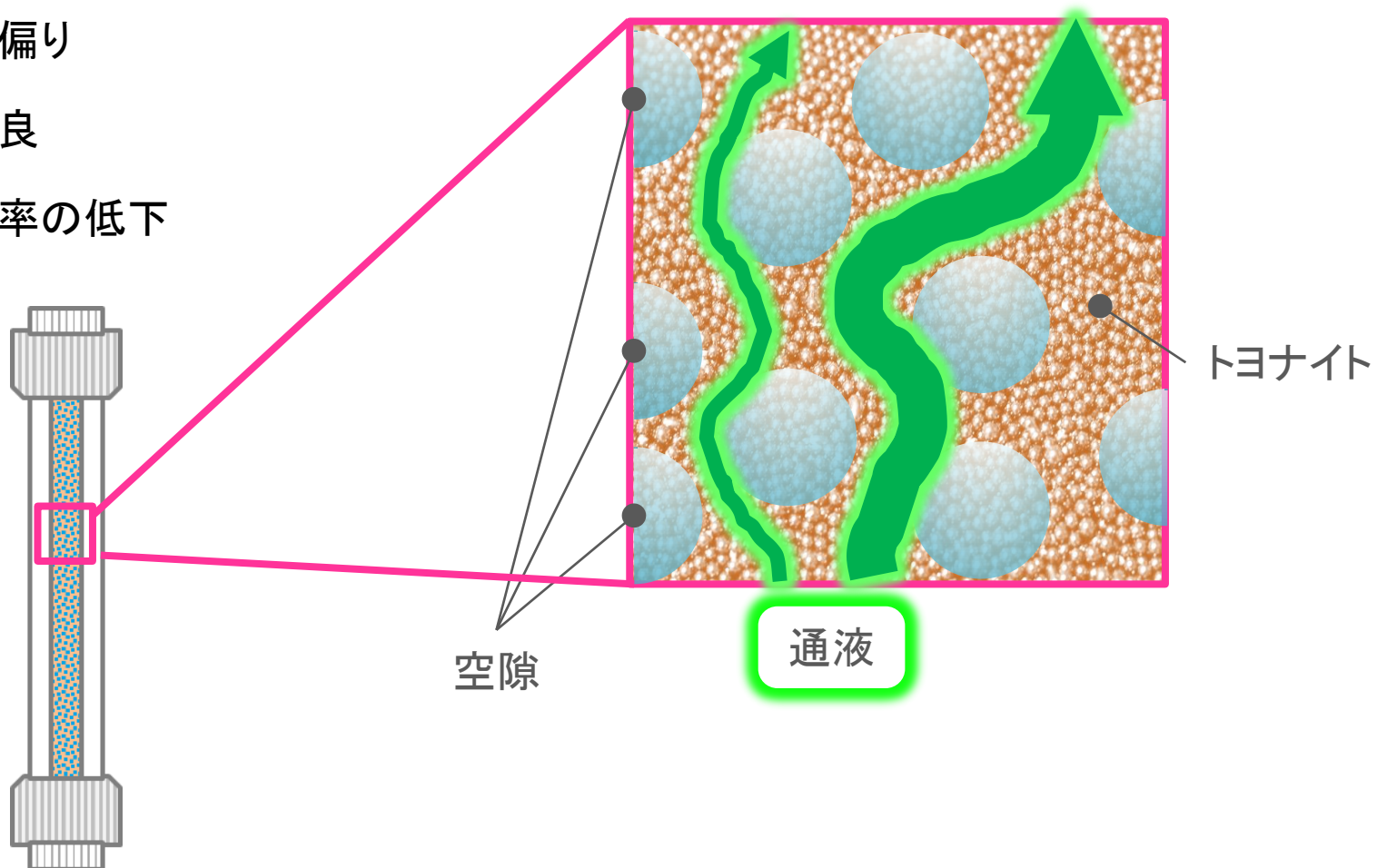


- 線速度(流量)
- 反応率


# テスト用ミニカラム作製

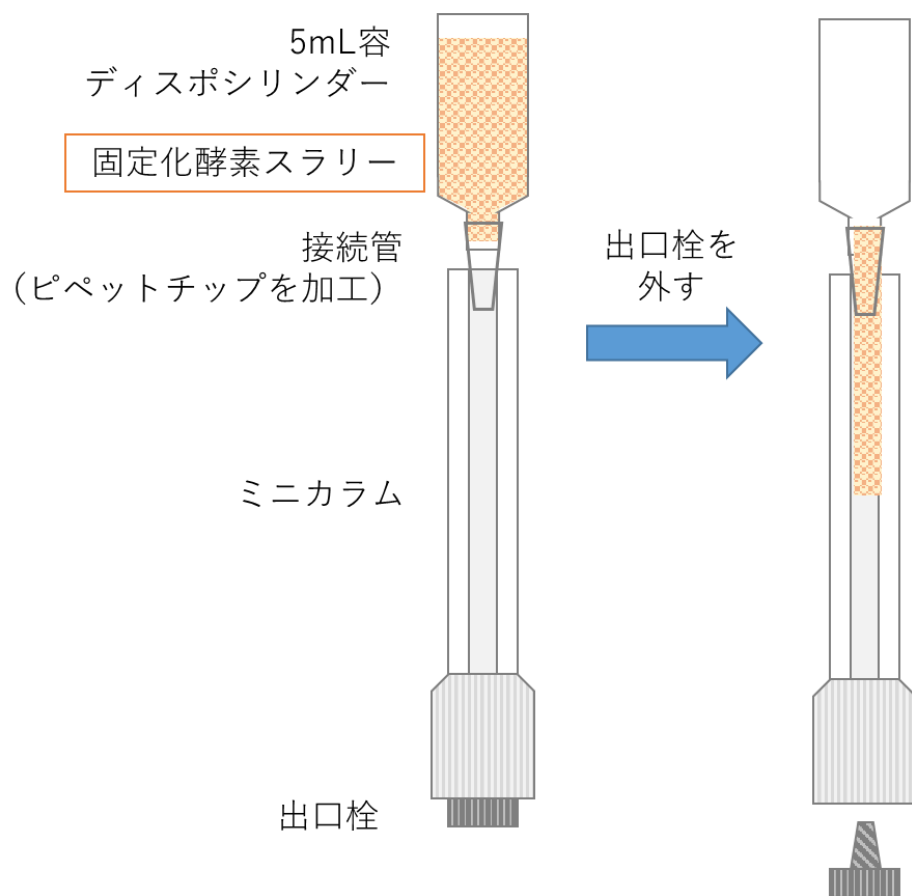
- カラム内に空隙を残さない
- 空気残留による影響

- 流路の偏り
- 接触不良
- 反応効率の低下



# 固定化酵素のミニカラムへの充填

溶媒に懸濁した固定化酵素スラリー  
自重を利用した自然落差法 





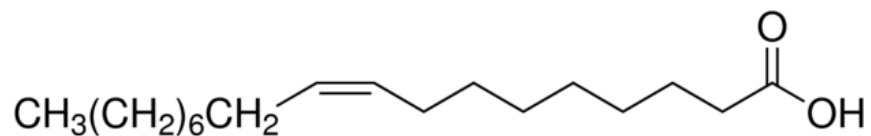
# フロー反応の検討手順

エステル合成反応

加水分解反応

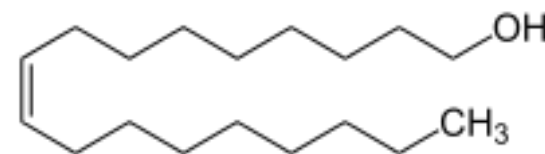


# エステル合成反応式



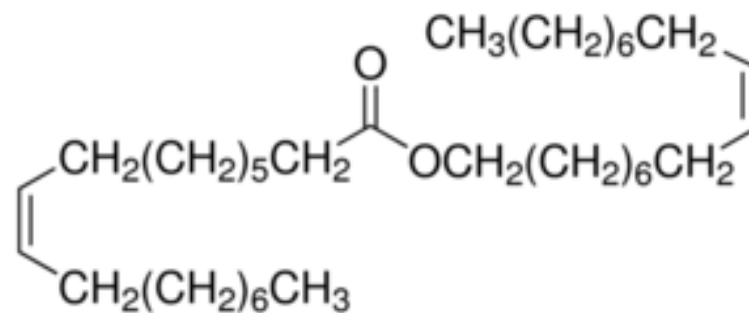
オレイン酸

+



オレイルアルコール

Lipase、40°C



+ H<sub>2</sub>O

オレイン酸オレイル

# エステル合成 Step①

## ① バッチ 小スケールテスト

### 反応手順

1.5mL容 マイクロチューブ

オレイン酸 0.002mol

オレイルアルコール 0.002mmol

n-ヘキサン 1.2mL

固定化リパーゼ 0.1g

Lipase: *Candida antarctica*, B 由来

ボルテックス混合

40°C 静置反応

TLC評価・・・オレイン酸オレイル



固定化酵素で反応が進むことを確認

# エステル合成反応 Step②

## ● バッチ反応をミニカラムへ転換

バッチ	
固定化リパーゼ	0.1g
オレイン酸	0.002mol
オレイルアルコール	0.002mol

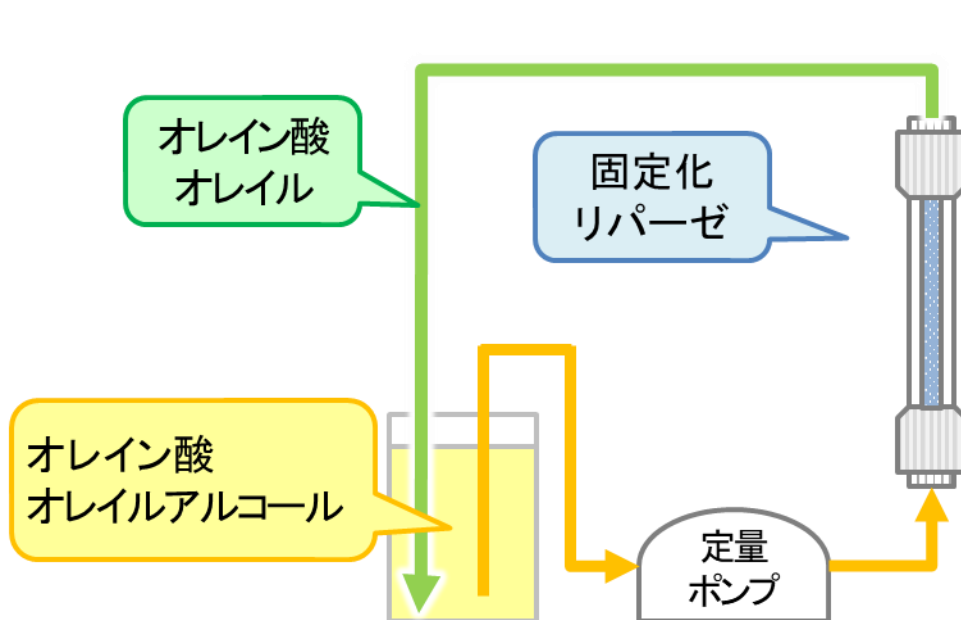


カラム	
内径	3mm
長さ	100mm
容積	0.7mm <sup>3</sup>
固定化酵素	0.6g
オレイン酸	同量mol
オレイルアルコール	
空隙※	0.4mL
※トヨナイト固定化酵素の場合	

# エステル合成反応 Step②

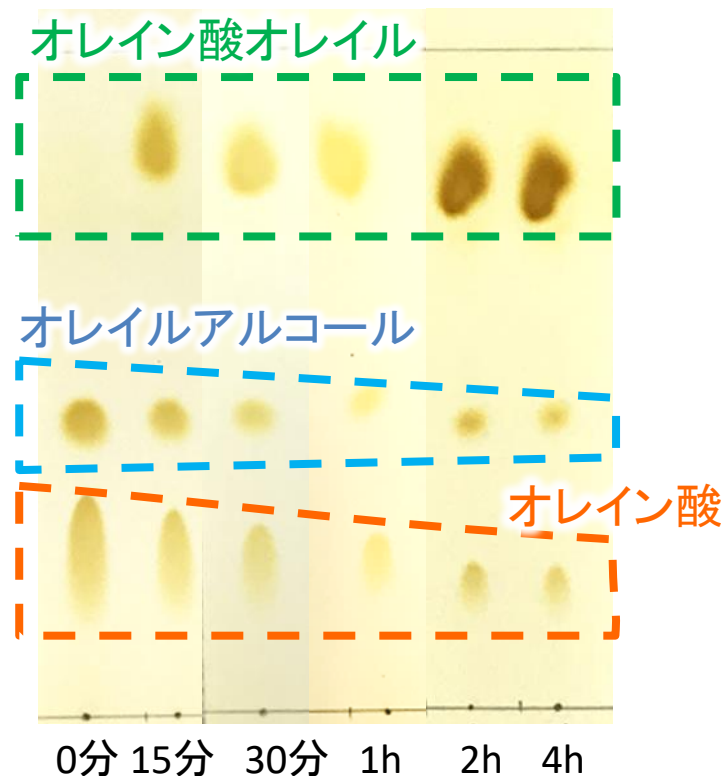
## ● ミニカラムフロー循環反応

一定流量で循環時間を反応時間として検討



基質配合	オレイン酸	0.012mol
	オレイルアルコール	0.012mol
	n-ヘキサン	7.2mL
	固定化リパーゼ	0.6g
	流量	1.0mL/分

### TLC評価



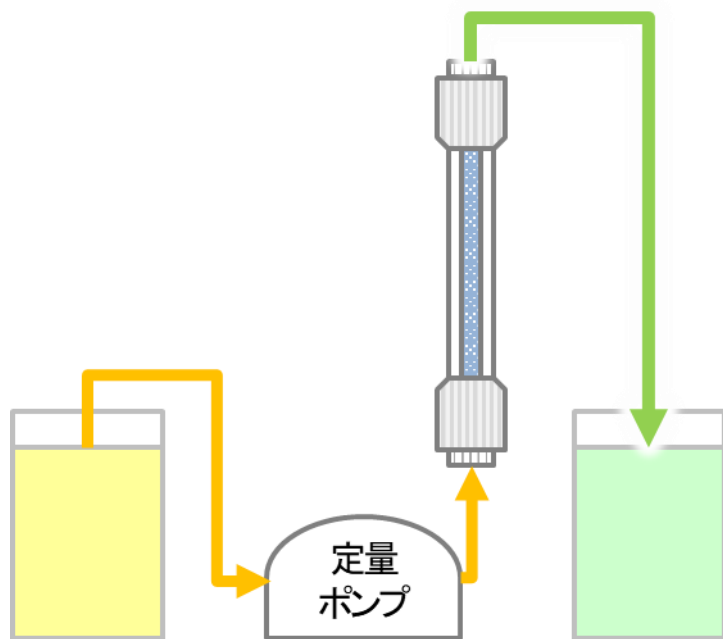
2時間以降 反応性に変化がない

# エステル合成反応 Step③設計

## ● ワンパス反応の設計

カラム滞留時間を1時間で設計

→ 循環1時間と同じ結果が得られるか？



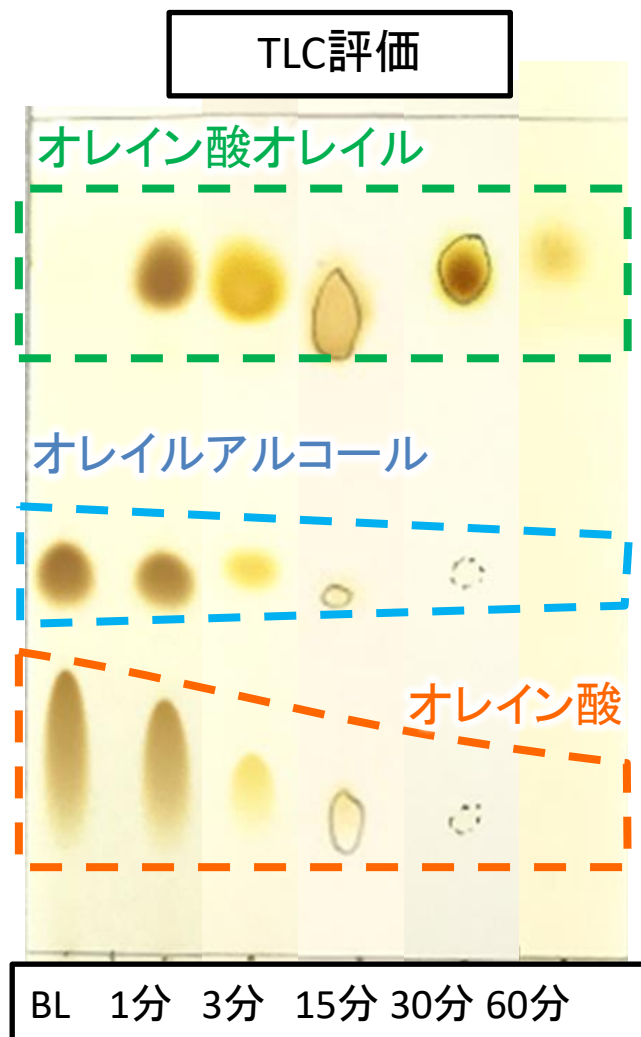
基質配合	オレイン酸	0.03mol
	オレイルアルコール	0.03mol
	n-ヘキサン	20mL
	固定化リパーゼ	0.6g

カラム内滞留時間	線速度 (mm/分)	流量 (mL/分)
60分	1.7mm/分	0.007
30分	3.3mm/分	0.013
15分	6.7mm/分	0.030
3分	33.3mm/分	0.127
1分	100mm/分	0.420

※カラム：内径φ3mm、長さ100mm

# エステル合成反応 Step③結果

## ● ワンパスフロー反応の設計 滞留時間ごとの反応性評価



基質がほぼ全量消費

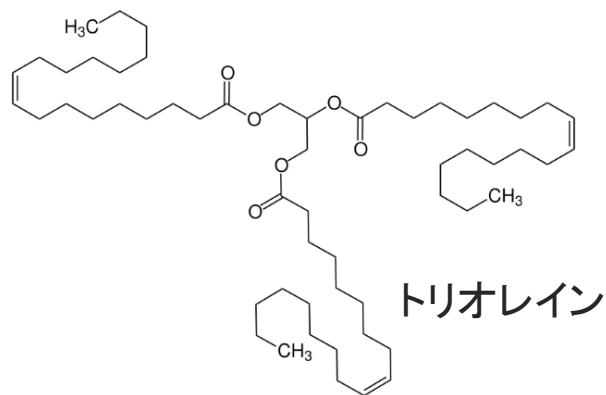
ワンパス設計で反応は十分進行する

フロー循環より反応性が向上

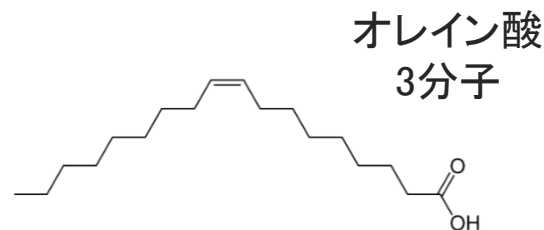
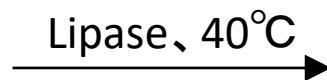
# フロー反応の検討手順

## 加水分解反応

# 加水分解反応式



どのように供給するか？



基質液: トリオレイン 0.4mmol/mL 溶液

トリオレイン 8.55g

水飽和ヘキサン 25mL

基質液調製

水飽和ヘキサン調製

ノルマルヘキサン 100mL に 0.1M-PB(pH7.0) 10mL 加え、激振1時間して一晩静置



# 加水分解反応 Step①

## ①バッチ 小スケールテスト

### 反応手順

1.5mL容 マイクロチューブ

基質液 1mL

(トリオレイン 0.4mmmol)

固定化リパーゼ 0.5g

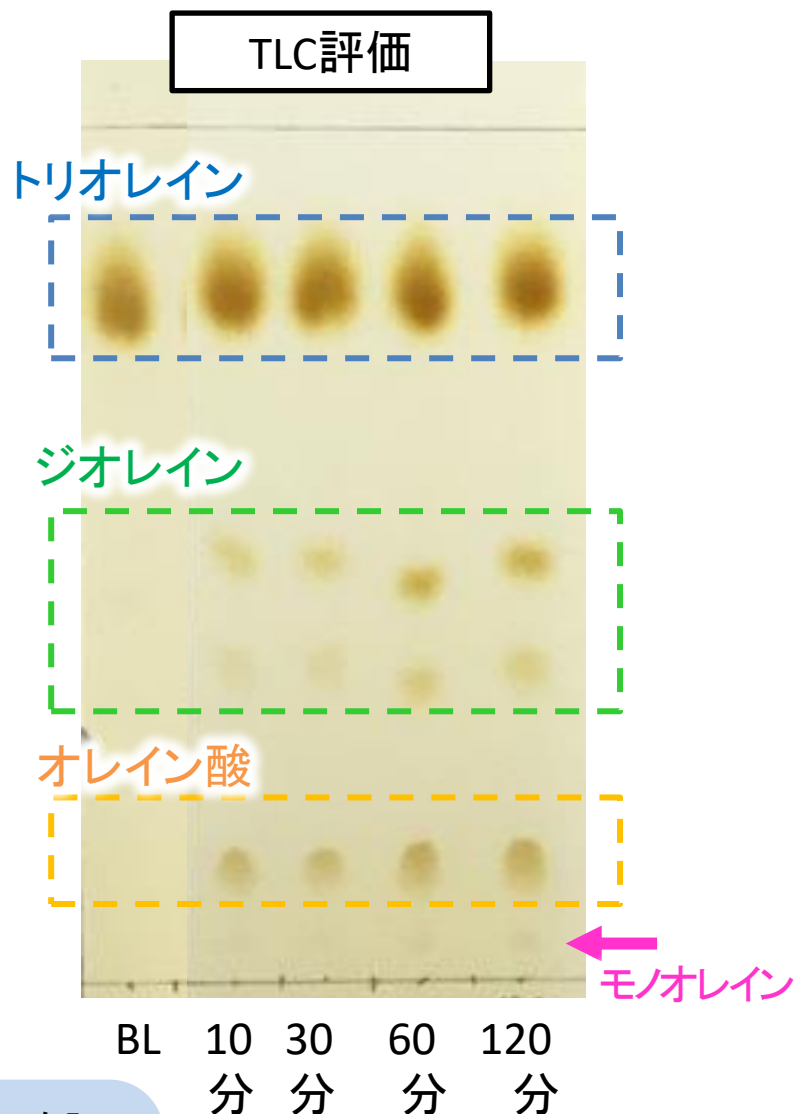
Lipase: *Candida rugosa* 由来

ボルテックス混合

40°C 静置反応

10分、30分、60分、120分

TLC評価



固定化酵素で反応が進むことを確認

# 加水分解反応 Step②

## ● バッチ反応をミニカラムへ転換

バッチ	
固定化酵素	0.5g
基質液 (トリオレイン)	1mL 0.4mmol

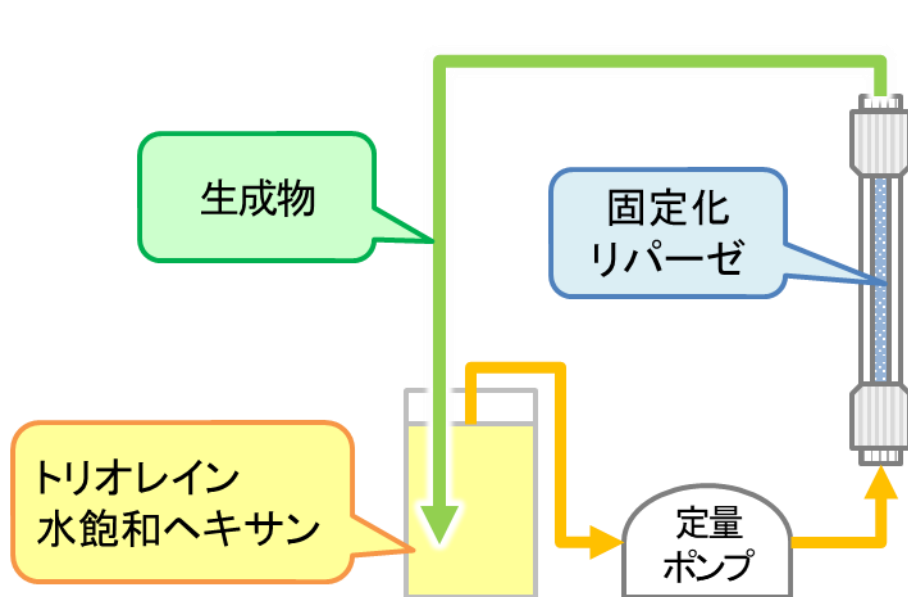


カラム	
内径	3mm
長さ	100mm
容積	0.7mm <sup>3</sup>
固定化酵素	0.9g
基質液 (トリオレイン)	1.8mL 0.72mmol
空隙※	0.4mL
※トヨナイト固定化酵素の場合	

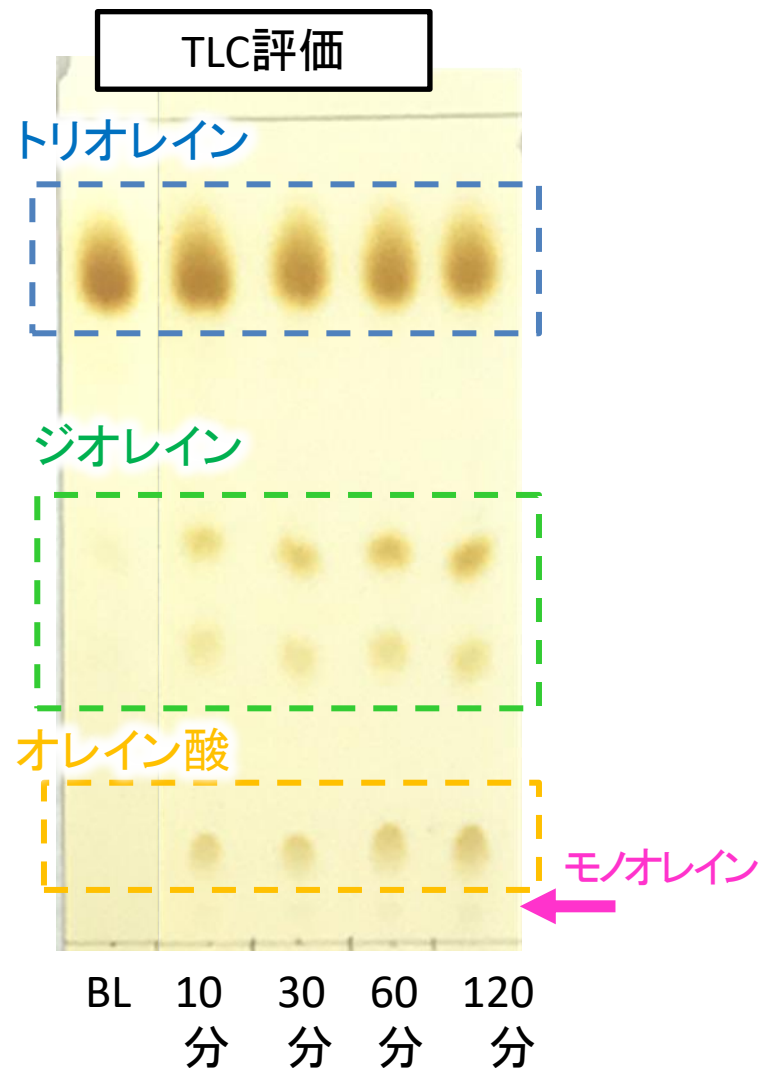
# 加水分解反応 Step②

## ● ミニカラムフロー循環反応

一定流量で循環時間を反応時間として検討



固定化リパーゼ	0.9g
基質液 (トリオレイン)	1.8mL 0.72mmol)
ポンプ流量	0.5mL/分

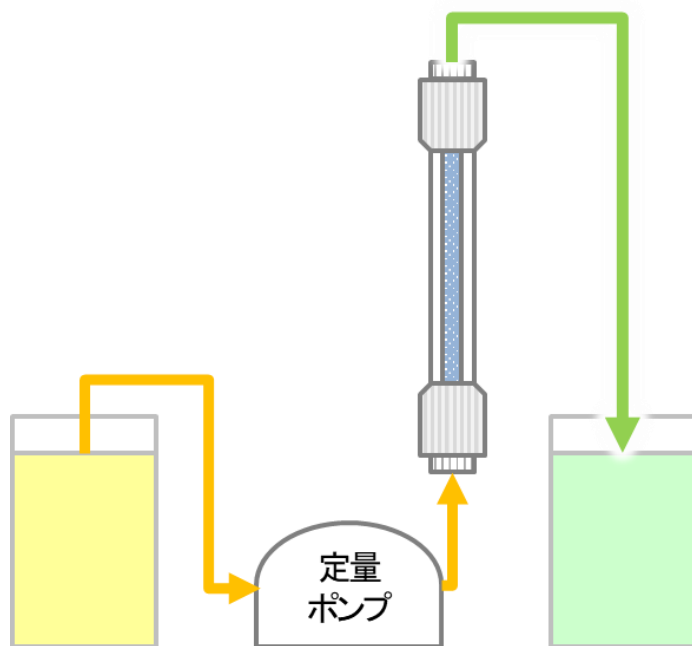


# 加水分解反応 Step③

## ③ ワンパス反応の設計

カラム滞留時間・30分で設計

→ 循環30分と同じ結果が得られるか？



カラム内滞留時間	線速度 (mm/分)	流量 (mL/分)
30分	3.3mm/分	0.013
15分	6.7mm/分	0.030
7分	14.3mm/分	0.063

0.4mmol/mL トリオレイン	十分量
固定化リパーゼ	0.9g

# 加水分解反応 Step④

## ● ワンパスフロー反応の設計 滞留時間ごとの反応性評価



生成物のバンドの出現が大きい

ワンパス設計で反応は十分進行する

フロー循環より反応性が向上

- トヨナイトの細孔に酵素が固定され、酵素濃度が高い状態
- 酵素に必要な水もトヨナイトに保持されている
- 有機溶媒中であって効率良く酵素反応が進む

トヨナイトの特性がフロー反応に適した反応性に寄与している

## ポイント

- 小スケールのバッチ反応で、反応条件を検討
- カラム循環テストではバッチ反応との違いを確認
- ワンパスフロー反応のデータをスケールアップに活用できる

### 反応に伴って生じる現象への対応

加水分解反応で生じるpHの低下への対応 ➡ 緩衝効果を付与

エステル合成で生じるH<sub>2</sub>Oの対応 ➡ 副生成物を除去して反応平衡を制御

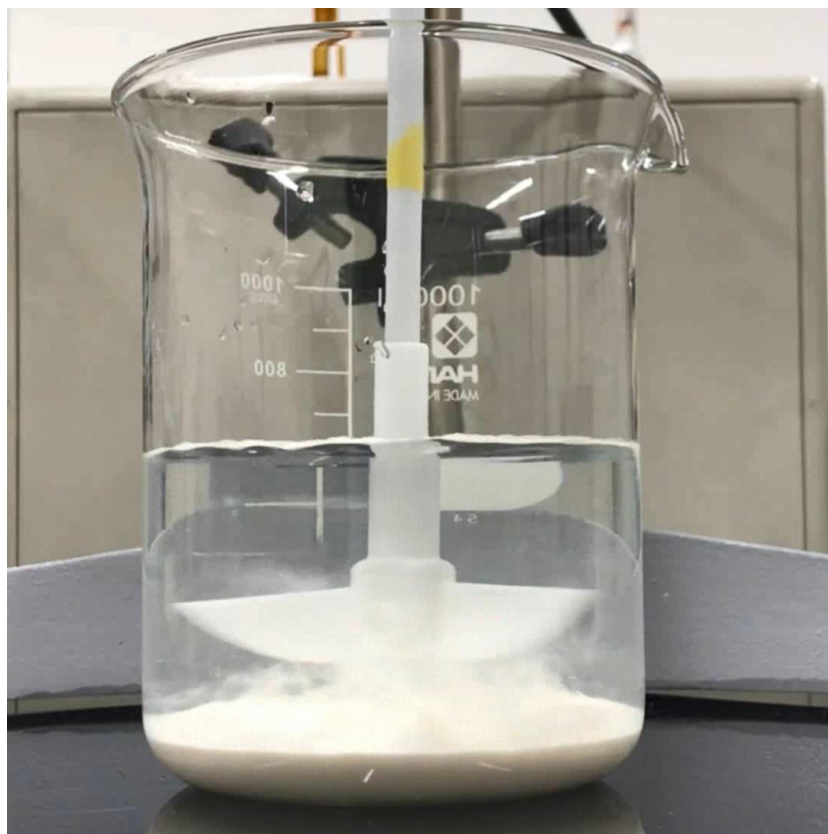
# 固定化酵素の回収方法 反応装置のスケールアップ



# トヨナイト固定化酵素の回収

- トヨナイトは比重2.6で、沈降が速い
- トヨナイトに起因する目詰まりがほとんど生じない

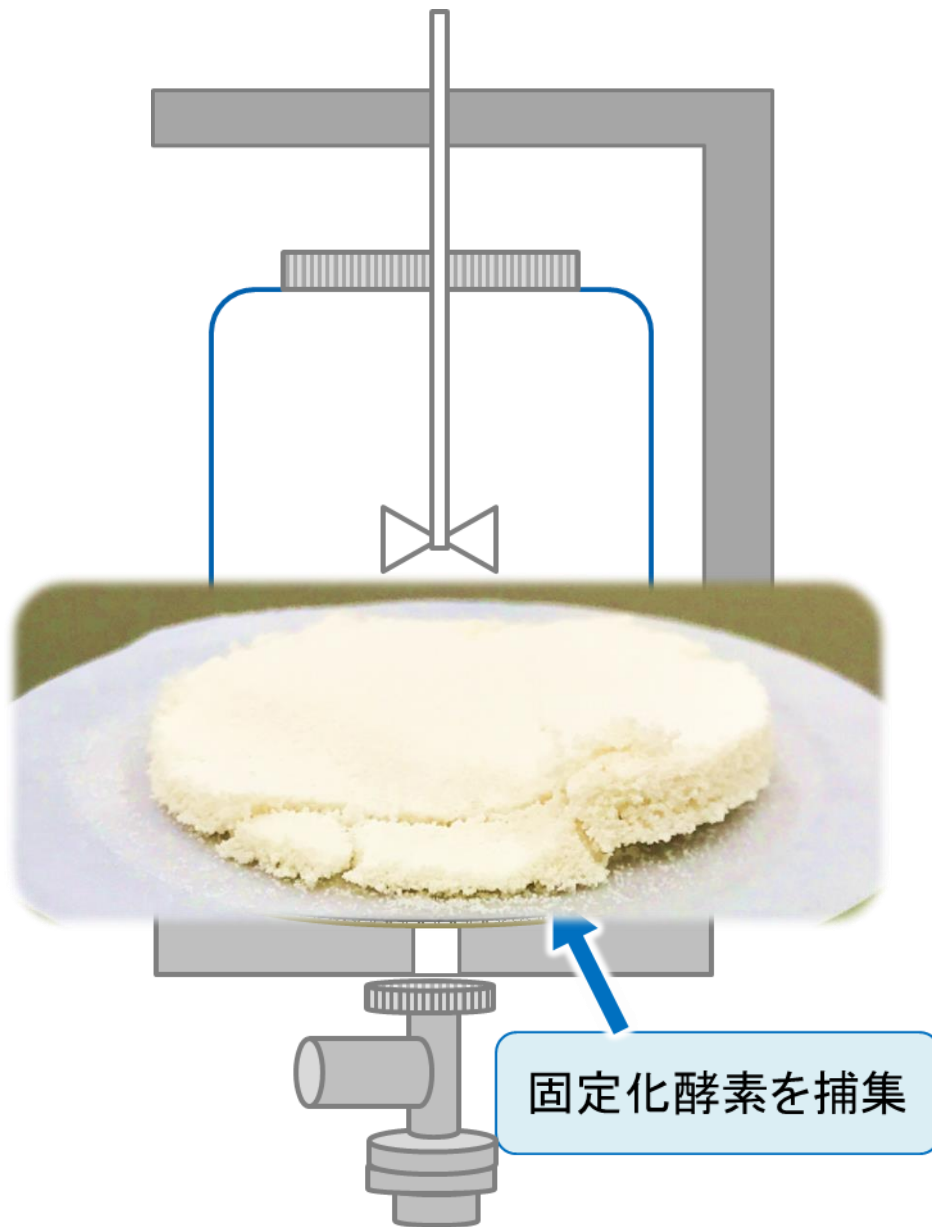
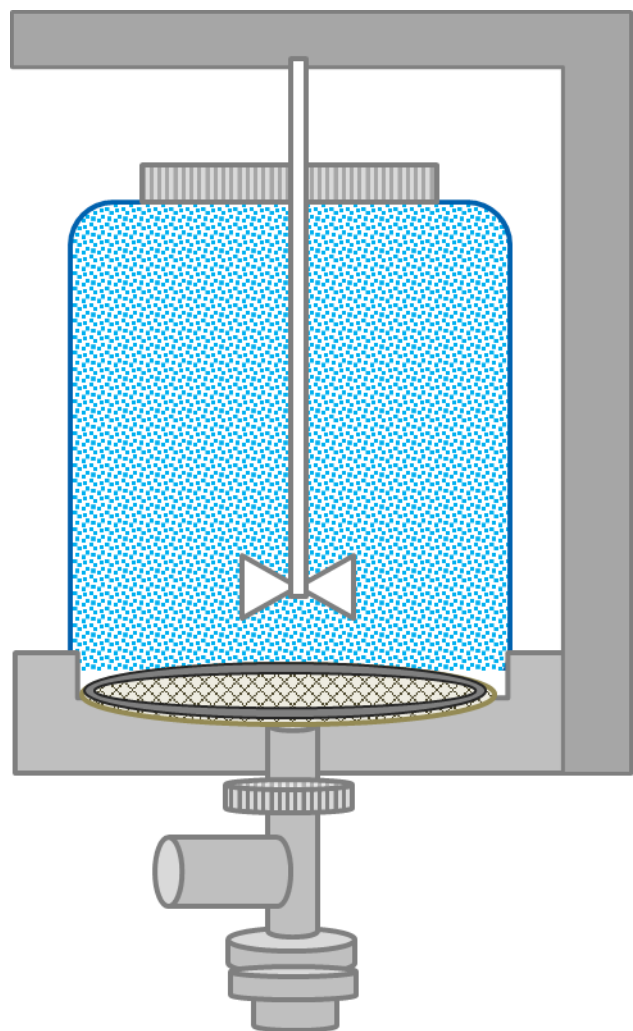
▶ 【攪拌と沈降】



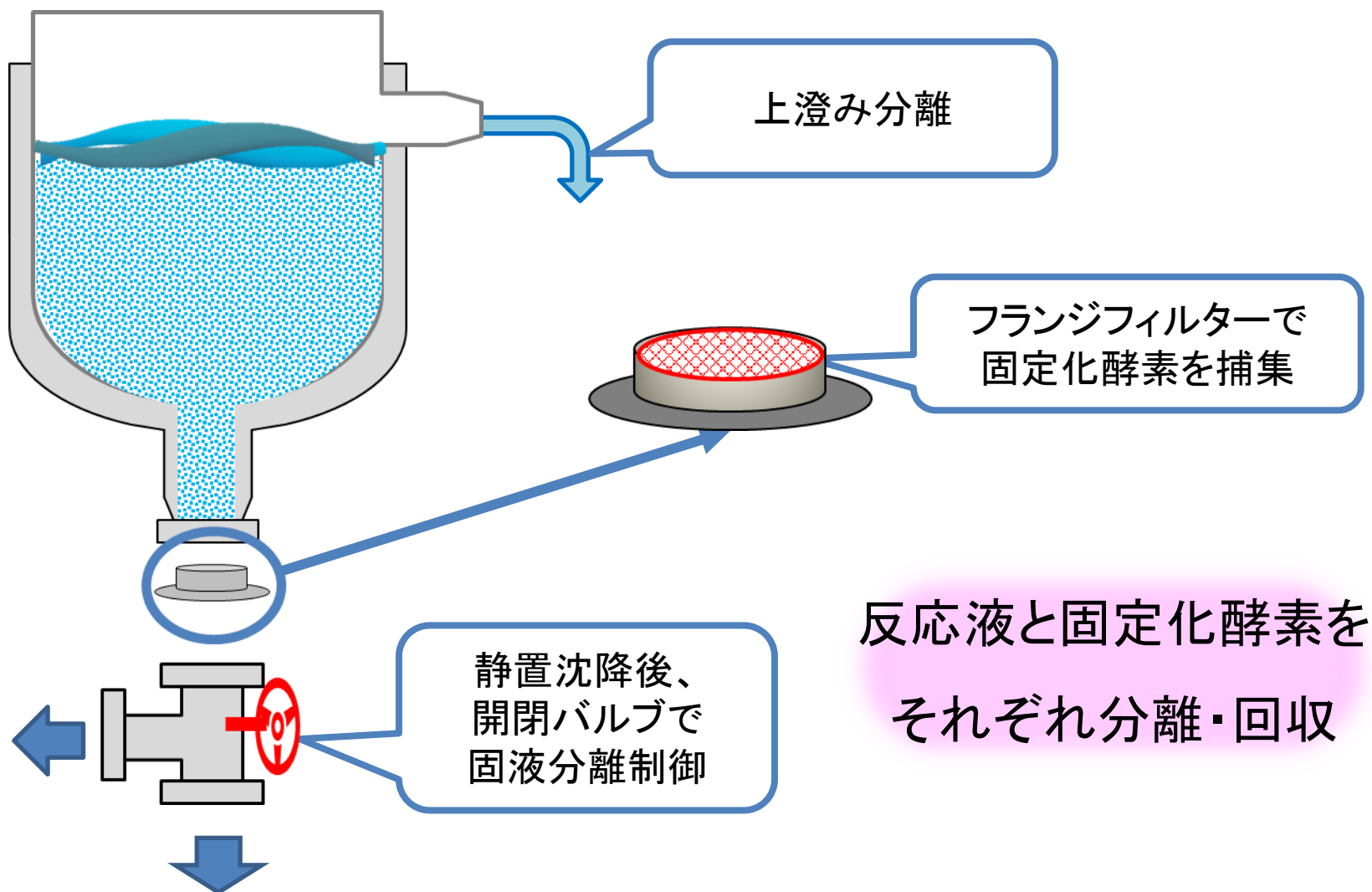
▶ 【吸引ろ過】



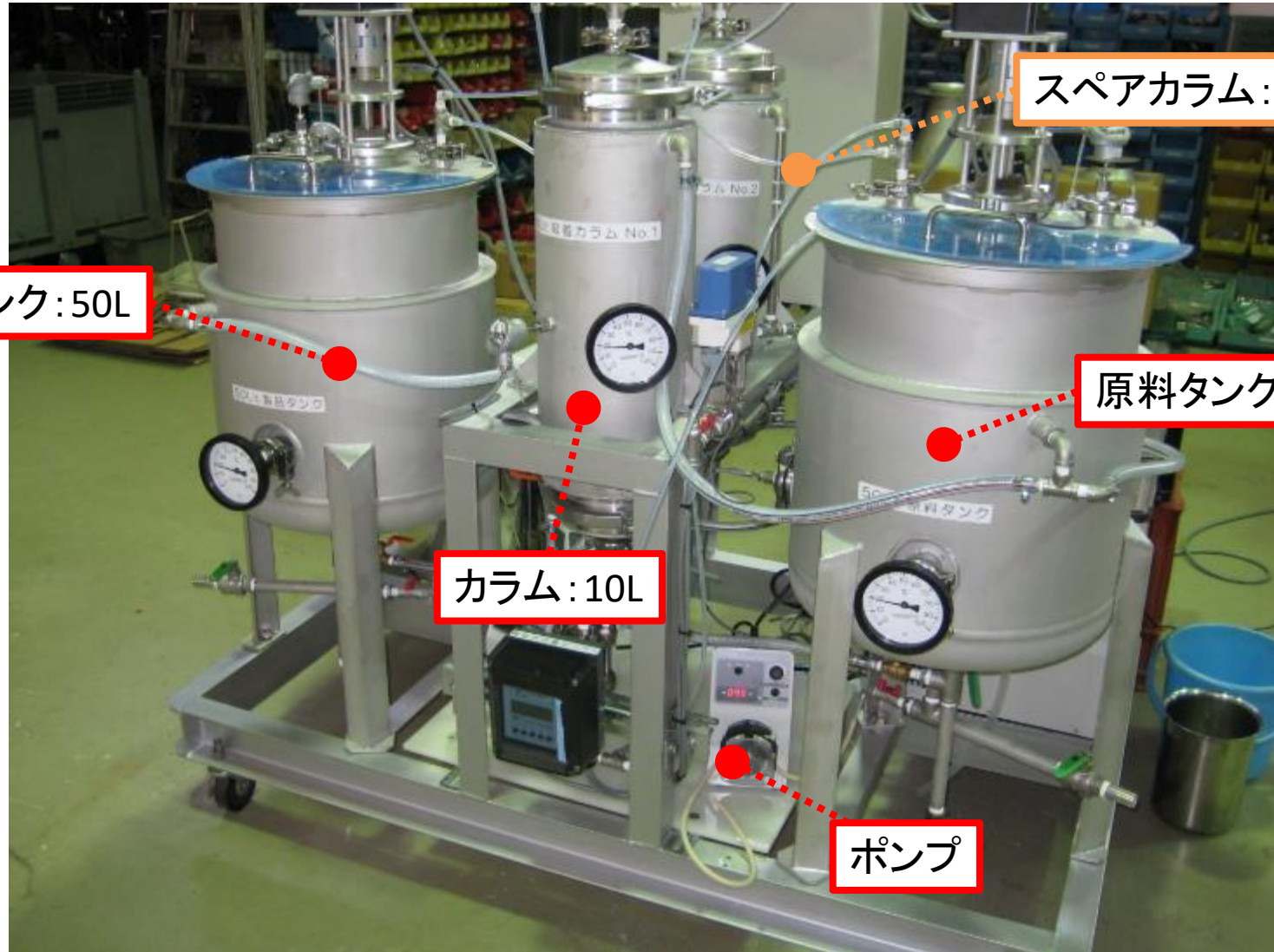
## ◆ 容器の底面に留める



## ◆ 容器構造、配管、パーツの組み合わせ



# 10リットル フロー反応装置



製品タンク: 50L

スペアカラム: 10L

原料タンク: 50L

カラム: 10L

ポンプ



# 10リットルカラム部分



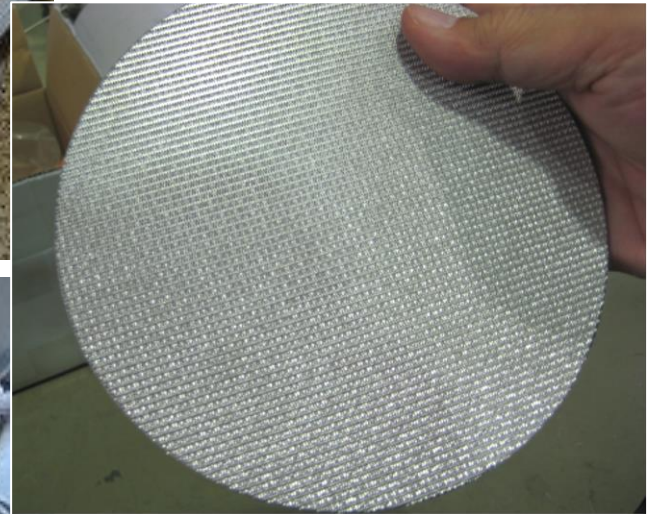
温度管理  
ジャケット構造



上部フタ部分



充填状態

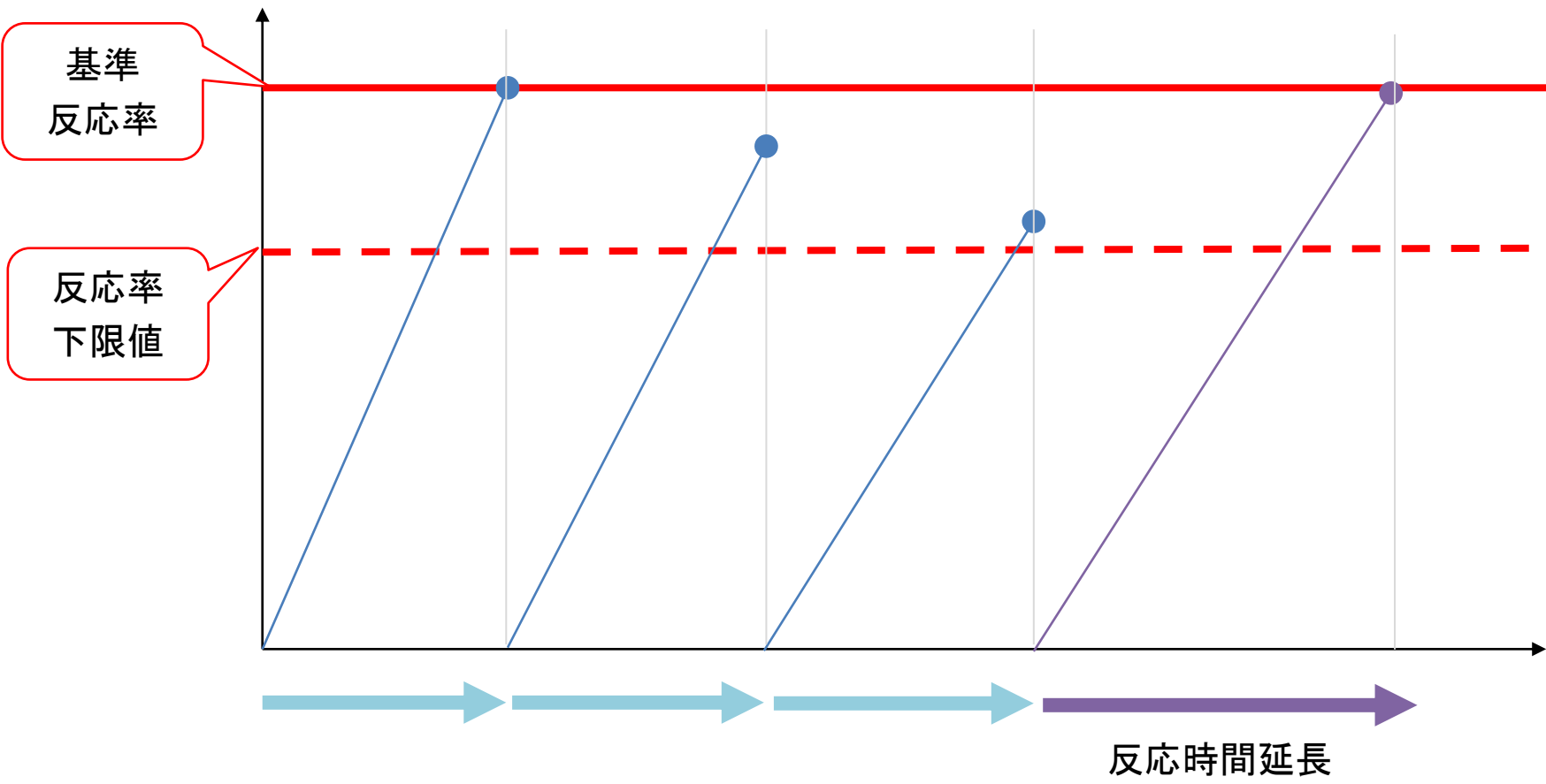


上部・底部フィルター

# 反応率低下の対応

# 反応率低下への対応案 ①

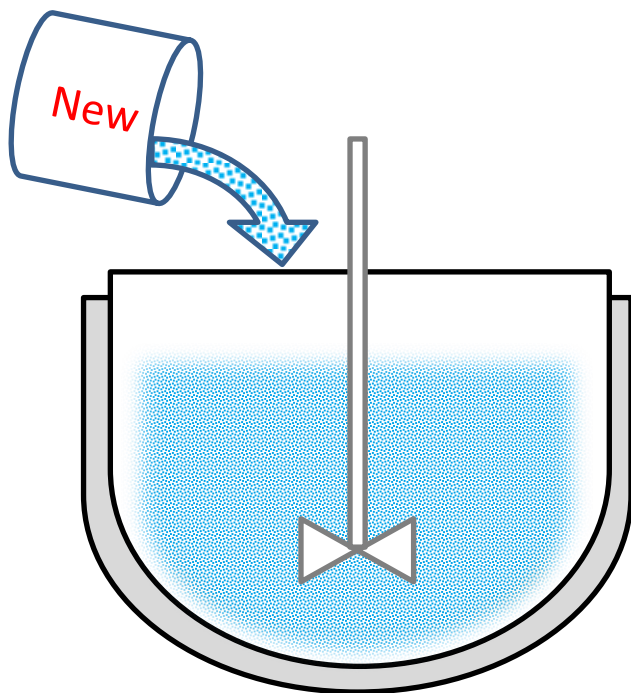
## ① 反応時間延長



# 反応率低下への対応案 ②

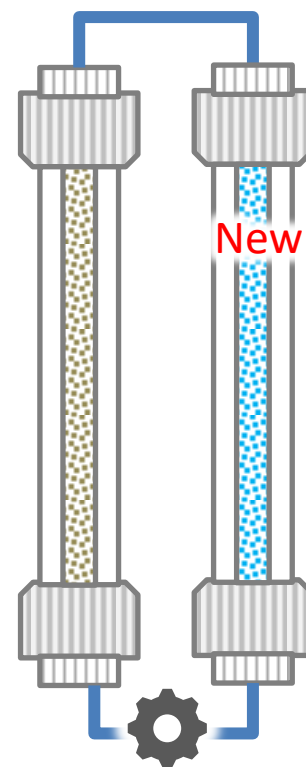
## ② 固定化酵素交換

バッチ反応法



反応を停止しなければならない

フロー反応法



反応を止めずに切り替えができる



- 固定化酵素はフロー反応に使用できる
- フロー反応により、反応効率の向上が期待できる
- 合成・分解のどちらも有機溶媒中で反応可能



実験室サイズ



工業生産サイズ

# 東洋電化工業株式会社 ご紹介

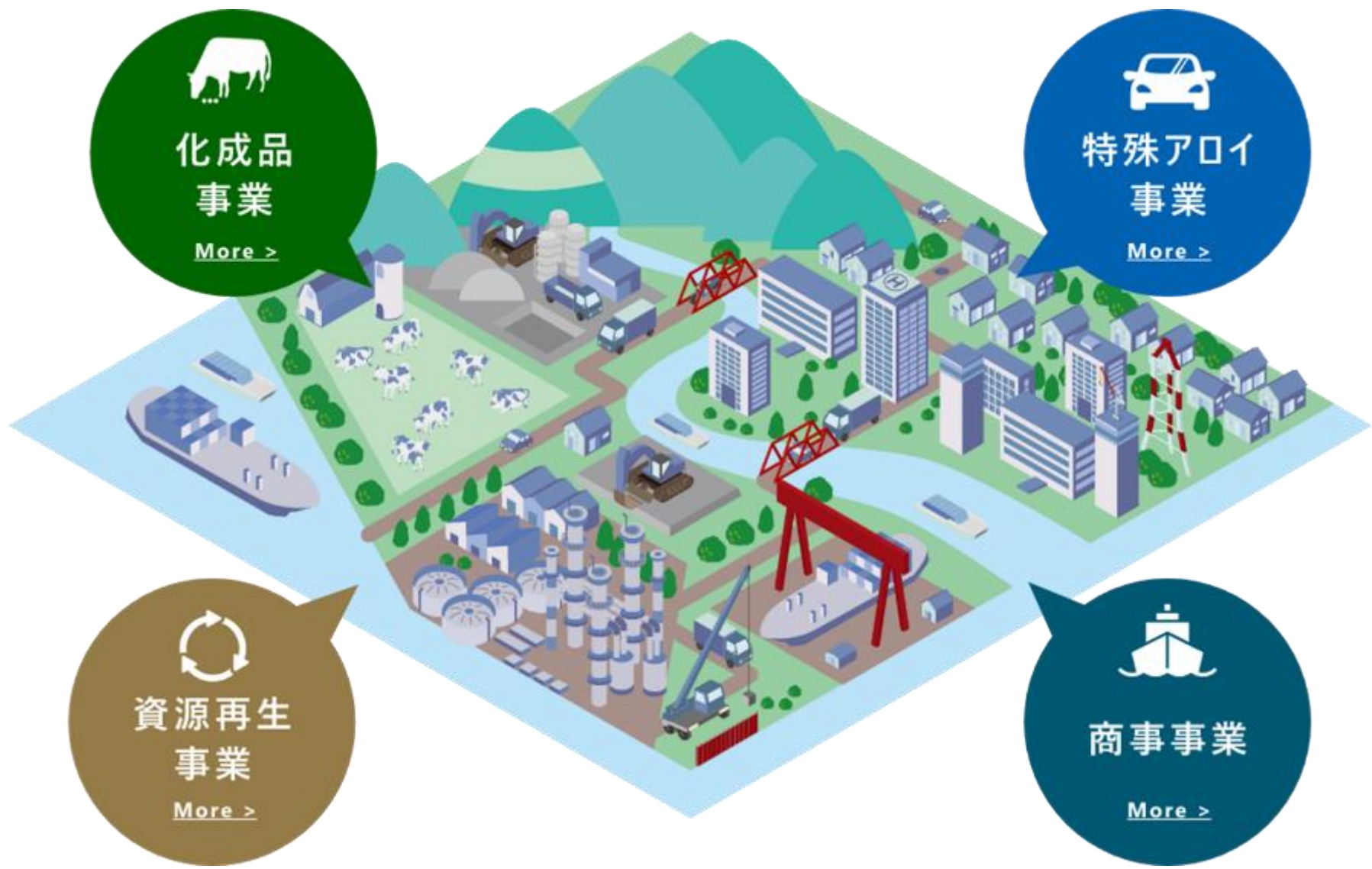
# 会社紹介



社名	東洋電化工業株式会社
本社所在地	高知県高知市萩町2-2-25
代表者	代表取締役社長 入交 建太
設立	1919年(大正8年)4月8日







化成品  
事業

[More >](#)



特殊アロイ  
事業

[More >](#)



資源再生  
事業

[More >](#)



商事事業

[More >](#)

## 無機粉体の合成・製造

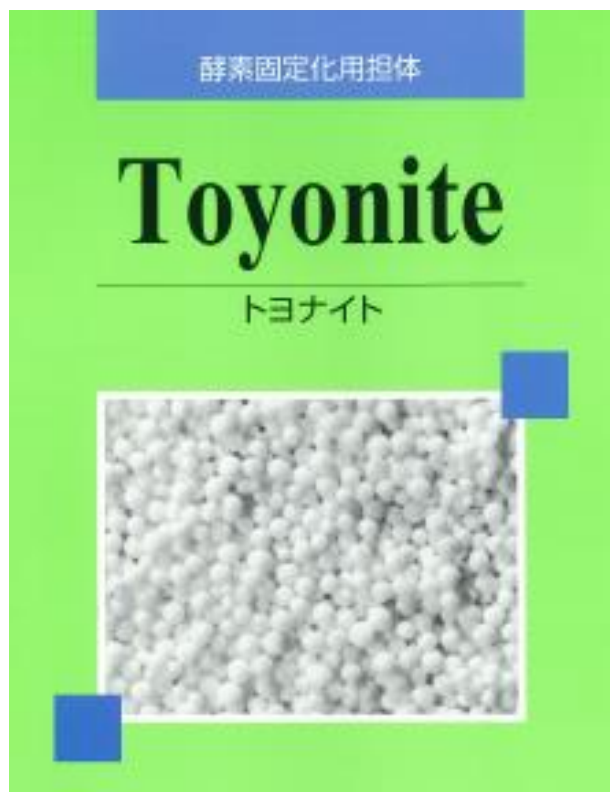
カーバイド、リン酸カルシウム、炭酸カルシウム、鉄・非鉄合金



## 熱処理技術

大型・小型電気炉、石灰炉、ロータリーキルン

## 酵素固定化用担体「トヨナイト」を開発



ご清聴ありがとうございました

素材に命を吹き込む

 **東洋電化工業株式会社**  
TOYO DENKA KOGYO CO.,LTD.

<https://www.toyodenka.co.jp/index.html>