(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6081515号
(P6081515)
(45)発行日　平成29年2月15日(2017.2.15)　(24)登録日　平成29年1月27日(2017.1.27)

(51)Int.Cl.		F I	
C07C 215/40	(2006.01)	C07C	215/40
C12N 9/00	(2006.01)	C12N	9/00
C12N 9/28	(2006.01)	C12N	9/28
C12N 9/14	(2006.01)	C12N	9/14
C12N 9/02	(2006.01)	C12N	9/02

請求項の数 11　(全 83 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2015-81210(P2015-81210)
(22)出願日　平成27年4月10日(2015.4.10)
(65)公開番号　特開2016-41682(P2016-41682A)
(43)公開日　平成28年3月31日(2016.3.31)
審査請求日　平成28年5月13日(2016.5.13)
(31)優先権主張番号　特願2014-81483(P2014-81483)
(32)優先日　平成26年4月10日(2014.4.10)
(33)優先権主張国　日本国(JP)
(31)優先権主張番号　特願2014-166930(P2014-166930)
(32)優先日　平成26年8月19日(2014.8.19)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

特許法第３０条第２項適用　第４回アジア－太平洋国際ペプチドシンポジウム　第５０回ペプチド討論会　ＡＰＩＰＳ２０１３　講演要旨集（日本ペプチド学会、発行日：平成２５年１０月１０日）で発表

(73)特許権者　000114318
ミヨシ油脂株式会社
東京都葛飾区堀切４丁目６６番１号
(74)代理人　100093230
弁理士　西澤　利夫
(74)代理人　100174702
弁理士　安藤　拓
(72)発明者　金子　恒太郎
東京都葛飾区堀切４丁目６６番１号　ミヨシ油脂株式会社内
(72)発明者　金子　信裕
東京都葛飾区堀切４丁目６６番１号　ミヨシ油脂株式会社内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】イオン液体を用いた生体触媒溶液および生体触媒用溶媒を使用する方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

生体触媒の活性を保持した状態で使用するための生体触媒用溶媒であって、下記式（Ｉ）：

【化１】

$$N^{+}[R^{a}]_{n}[R^{b}]_{4-n} \qquad (I)$$

（式中、R^{a}はそれぞれ独立に、水酸基を１個以上有し、アルキル部位が炭素数１～１０の直鎖状もしくは分岐鎖状で、該アルキル部位が酸素原子を含んでいてもよいヒドロキシアルキル基、カルボキシ基を１個以上有し、アルキル部位が炭素数１～１０の直鎖状もしくは分岐鎖状で、該アルキル部位が酸素原子を含んでいてもよいカルボキシアルキル基、又は水酸基及びカルボキシ基を各々１個以上有し、アルキル部位が炭素数１～１０の直鎖状もしくは分岐鎖状で、該アルキル部位が酸素原子を含んでいてもよいヒドロキシカルボキシアルキル基を示し、R^{b}は水素原子を示す。ｎは１～４の整数を示す。）で表わされる第４級アンモニウムカチオン及びアニオンを含むイオン液体からなる生体触媒用溶媒と、生体触媒とを含む、生体触媒溶液。

【請求項２】

式（Ｉ）のｎが１～３の整数である請求項１に記載の生体触媒溶液。

【請求項３】

前記生体触媒用溶媒は、生体触媒の活性を保持した状態で保存することが可能な生体触

媒用溶媒である請求項２に記載の生体触媒溶液。
【請求項４】
イオン液体のアニオンが、ハロゲン系アニオン、硫黄系アニオン、リン系アニオン、シアン系アニオン、ホウ素系アニオン、フッ素系アニオン、窒素酸化物系アニオン、及びカルボン酸アニオンから選ばれる少なくとも１種であり、
生体触媒が酵素である請求項２に記載の生体触媒溶液。
【請求項５】
イオン液体のアニオンが、ハロゲン系アニオン、リン系アニオン、シアン系アニオン、ホウ素系アニオン、フッ素系アニオン、窒素酸化物系アニオン、及びカルボン酸アニオンから選ばれる少なくとも１種であり、
生体触媒が酵素である請求項２に記載の生体触媒溶液。
【請求項６】
イオン液体のアニオンが、カルボン酸アニオン、スルホン酸アニオン、及びリン酸アニオンから選ばれる少なくとも１種であり、
生体触媒が酵素である請求項４に記載の生体触媒溶液。
【請求項７】
イオン液体のアニオンがカルボン酸アニオンであり、
生体触媒が酵素である請求項４に記載の生体触媒溶液。
【請求項８】
イオン液体のアニオンがヒドロキシカルボン酸アニオンであり、
生体触媒が酵素である請求項４に記載の生体触媒溶液。
【請求項９】
前記生体触媒用溶媒は、ウレアーゼを３０．０～５０．０ｍｇ／ｍＬで溶解したときに温度２５℃で保存した場合、３０日後のウレアーゼの触媒活性保持率が９０％以上である請求項１から８のいずれかに記載の生体触媒溶液。
【請求項１０】
以下の工程を含む、生体触媒用溶媒を使用する方法：
請求項１から９のいずれかに記載の、生体触媒用溶媒と生体触媒とを含む生体触媒溶液を調製する工程；及び、
前記生体触媒溶液を調製した後、前記生体触媒を反応触媒に用いて、この生体触媒が特異性を持つ生化学反応に供する工程。
【請求項１１】
以下の工程を含む、生体触媒用溶媒を使用する方法：
請求項１から９のいずれかに記載の、生体触媒用溶媒と生体触媒とを含む生体触媒溶液を調製する工程；
前記生体触媒溶液を調製した後、前記生体触媒溶液を保存する工程；及び、
前記保存した後、前記生体触媒を反応触媒に用いて、この生体触媒が特異性を持つ生化学反応に供する工程。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、生体触媒の活性を保持した状態で溶解できる生体触媒用溶媒、及びその溶媒と生体触媒を含む生体触媒溶液に関するものである。
【背景技術】
【０００２】
酵素や酵母などの生体触媒は、温度、ｐＨ、溶媒又は分子間の静電気的な斥力等の影響により、分子の立体構造が壊れやすく、活性すなわち触媒能力が低下するものが多く、生体触媒を保存したり、生体触媒反応に利用したりする際、活性点の立体構造、アミノ酸残基の立体構造を保持する必要がある。生体触媒の長期保存方法としては、粉体状態での凍結乾燥法や、低濃度、極低温度条件下で溶液に溶解して保存する凍結保存法が知られてい

る。
【０００３】
一般的に、操作上の簡便さから溶液での保存が望ましいが、凍結保存法の場合、特殊な装置が必要となるとともに、凍結時に氷が生成するために生体触媒の立体構造を破壊してしまう問題、凍結した溶液を溶解して使用する際、生体触媒の構造が変化し活性が低下してしまう問題があり、更に、保存濃度は、例えばウレアーゼ、カタラーゼの場合、一般的に１～３ｍｇ／ｍＬ程度と低く、効率的な保存が困難である。
【０００４】
そうした生体触媒の失活を防ぎ、酵素の活性を維持するために、安定化剤を添加する試みがなされている。例えば、グリセリン、ソルビトールのような多価アルコールをウリカーゼの保存に使用する方法（特許文献１）、牛血清アルブミン及び糖類を、コレステロールオキシダーゼを含む溶液に添加するコレステロールオキシダーゼの安定化法（特許文献２）が提案されているが、これらの方法では、保存濃度、保存温度や保存期間に対する酵素活性の低下の問題があった。
【０００５】
また、イオン液体は、カチオンとアニオンからなる有機塩であり、一般的にはイミダゾリウム系カチオンや第４級アンモニウムカチオンと各種アニオンとから構成されたイオン液体が知られており、その構造的特徴から、様々な用途が検討されている。そうした中、イオン液体を酵素の反応溶液に添加もしくは溶媒として用いて、酵素の活性を保持することが報告されている（特許文献３，４、非特許文献１）が、溶解濃度、保存性に問題があった。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００６】
【特許文献１】特開平０６－７０７９８号公報
【特許文献２】特開平０８－１８７０９５号公報
【特許文献３】特開２００５－２７０００７号公報
【特許文献４】特表２００６－５１４８３２号公報
【非特許文献】
【０００７】
【非特許文献１】Ｂｉｏｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌｅｓ ２００５，６，１４５７－１４６４
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００８】
従来の生体触媒用溶媒は、生体触媒に対する溶解性並びにアミノ酸残基の立体構造の保持性に改善の余地があり、溶液中に高濃度で酵素を溶解し、長期間、より高い温度条件下において活性を保持する方法が求められている。
【０００９】
本発明は、以上の通りの事情に鑑みてなされたものであり、低温度から高温度、高濃度で生体触媒の活性を保持したまま液体中で溶解、そして、長期間保存が可能な、生体触媒用溶媒を提供することを課題としている。
【００１０】
また、そのような生体触媒用溶媒に生体触媒を溶解させた生体触媒溶液を提供することを課題としている。
【課題を解決するための手段】
【００１１】
前記の課題を解決するために、本発明の生体触媒用溶媒は、下記式（Ｉ）：
【００１２】

【化１】

$$N^{+}[R^{a}]_{n}[R^{b}]_{4-n} \qquad (I)$$

【００１３】

（式中、R^{a}はそれぞれ独立に、水酸基を１個以上有し、アルキル部位が炭素数１～１０の直鎖状もしくは分岐鎖状で、該アルキル部位が酸素原子を含んでいてもよいヒドロキシアルキル基、カルボキシ基を１個以上有し、アルキル部位が炭素数１～１０の直鎖状もしくは分岐鎖状で、該アルキル部位が酸素原子を含んでいてもよいカルボキシアルキル基、又は水酸基及びカルボキシ基を各々１個以上有し、アルキル部位が炭素数１～１０の直鎖状もしくは分岐鎖状で、該アルキル部位が酸素原子を含んでいてもよいヒドロキシカルボキシアルキル基を示し、R^{b}はそれぞれ独立に水素原子又は炭素数１～５の直鎖もしくは分岐のアルキル基を示す。ｎは１～４の整数を示す。）で表わされる第４級アンモニウムカチオン及びアニオンを含むイオン液体からなる。

【００１４】

本発明の生体触媒溶液は、前記の生体触媒用溶媒と、生体触媒とを含む。

【発明の効果】

【００１５】

本発明の生体触媒用溶媒によれば、生体触媒を高濃度で溶解し、その溶液中の生体触媒を、その活性を保持したまま、低温度から高温度、高濃度で溶解し、長期間保存することができる。

【発明を実施するための形態】

【００１６】

以下に、本発明について詳細に説明する。

【００１７】

本発明の生体触媒用溶媒は、無水イオン液体及び空気中の水分を吸収した含水イオン液体であってもよく、式（Ｉ）で表わされる第４級アンモニウムカチオン及びアニオンを含むイオン液体からなる。

【００１８】

式（Ｉ）において、第４級アンモニウムカチオンのR^{a}はそれぞれ独立に、水酸基を１個以上有し、アルキル部位が炭素数１～１０の直鎖状もしくは分岐鎖状で、該アルキル部位が酸素原子を含んでいてもよいヒドロキシアルキル基、カルボキシ基を１個以上有し、アルキル部位（カルボキシ基の炭素は含まない。）が炭素数１～１０の直鎖状もしくは分岐鎖状で、該アルキル部位が酸素原子を含んでいてもよいカルボキシアルキル基、又は水酸基及びカルボキシ基を各々１個以上有し、アルキル部位（カルボキシ基の炭素は含まない。）が炭素数１～１０の直鎖状もしくは分岐鎖状で、該アルキル部位が酸素原子を含んでいてもよいヒドロキシカルボキシアルキル基を示す。

【００１９】

ここで、アルキル部位が酸素原子を含む場合、該酸素原子は、例えば、アルキル部位にエーテル結合（－Ｏ－）、カルボニル基（－Ｃ＝Ｏ）、アルデヒド基（－ＣＨＯ）、又はエステル結合（－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－）を形成する。

【００２０】

式（Ｉ）におけるR^{a}のヒドロキシアルキル基としては、例えば、モノ、ジ、トリ、テトラ、ペンタ、ヘキサ、ヘプタ、又はオクタヒドロキシアルキル基、ヒドロキシアルコキシアルキル基、アルコキシヒドロキシアルキル基、ヒドロキシポリアルキレンオキシアルキル基等が挙げられる。

【００２１】

モノヒドロキシアルキル基としては、例えば、ヒドロキシメチル基、１－ヒドロキシエチル基、２－ヒドロキシエチル基、１－ヒドロキシプロパン－１－イル基、２－ヒドロキシプロパン－１－イル基、３－ヒドロキシプロパン－１－イル基、１－ヒドロキシプロパン－２－イル基、２－ヒドロキシプロパン－２－イル基、１－ヒドロキシブタン－１－イ

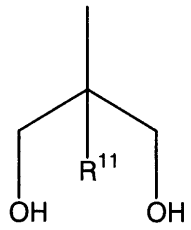
ル基、２－ヒドロキシブタン－１－イル基、３－ヒドロキシブタン－１－イル基、４－ヒドロキシブタン－１－イル基、１－ヒドロキシ－２－メチルプロパン－１－イル基、２－ヒドロキシ－２－メチルプロパン－１－イル基、３－ヒドロキシ－２－メチルプロパン－１－イル基、１－ヒドロキシブタン－２－イル基、２－ヒドロキシブタン－２－イル基、３－ヒドロキシブタン－２－イル基、４－ヒドロキシブタン－２－イル基、１－ヒドロキシ－２－メチルプロパン－２－イル基、５－ヒドロキシペンタン－１－イル基、６－ヒドロキシヘキサン－１－イル基、７－ヒドロキシヘプタン－１－イル基、８－ヒドロキシオクタン－１－イル基、９－ヒドロキシノナン－１－イル基、１０－ヒドロキシデカン－１－イル基等が挙げられる。これらのモノヒドロキシアルキル基の中でも、炭素数１～５のものが好ましく、炭素数１～３のものがより好ましい。

【００２２】

ジ、トリ、テトラ、ペンタ、ヘキサ、ヘプタ、又はオクタヒドロキシアルキル基としては、例えば、１，２－ジヒドロキシエチル基等のジヒドロキシエチル基；１，２－ジヒドロキシプロパン－１－イル基、２，３－ジヒドロキシプロパン－１－イル基等のジヒドロキシプロパン－１－イル基;１，２－ジヒドロキシプロパン－２－イル基、１，３－ジヒドロキシプロパン－２－イル基等のジヒドロキシプロパン－２－イル基；トリヒドロキシプロパン－１－イル基；トリヒドロキシプロパン－２－イル基；１，２－ジヒドロキシブタン－１－イル基、１，３－ジヒドロキシブタン－１－イル基、１，４－ジヒドロキシブタン－１－イル基、２，３－ジヒドロキシブタン－１－イル基、２，４－ジヒドロキシブタン－１－イル基、３，４－ジヒドロキシブタン－１－イル基等のジヒドロキシブタン－１－イル基；１，２，３トリヒドロキシブタン－１－イル基、１，２，４トリヒドロキシブタン－１－イル基、１，３，４トリヒドロキシブタン－１－イル基、２，３，４トリヒドロキシブタン－１－イル基等のトリヒドロキシブタン－１－イル基；テトラヒドロキシブタン－１－イル基；１，２－ジヒドロキシ－２－メチルプロパン－１－イル基、１，３－ジヒドロキシ－２－メチルプロパン－１－イル基、２，３－ジヒドロキシ－２－メチルプロパン－１－イル基等のジヒドロキシ－２－メチルプロパン－１－イル基；トリヒドロキシ－２－メチルプロパン－１－イル基；テトラヒドロキシ－２－メチルプロパン－１－イル基；１，２－ジヒドロキシブタン－２－イル基、１，３－ジヒドロキシブタン－２－イル基、１，４－ジヒドロキシブタン－２－イル基、２，３－ジヒドロキシブタン－２－イル基、２，４－ジヒドロキシブタン－２－イル基、３，４－ジヒドロキシブタン－２－イル基等のジヒドロキシブタン－２－イル基；１，２，３トリヒドロキシブタン－２－イル基、１，２，４トリヒドロキシブタン－２－イル基、１，３，４トリヒドロキシブタン－２－イル基、２，３，４トリヒドロキシブタン－２－イル基等のトリヒドロキシブタン－２－イル基；テトラヒドロキシブタン－２－イル基；１，３－ジヒドロキシ－２－メチルプロパン－２－イル基、１，３－ジヒドロキシ－２－エチルプロパン－２－イル基、１，３－ジヒドロキシ－２－ヒドロキシメチルプロパン－２－イル基；ジ、トリ、テトラ、又はペンタヒドロキシペンタン－１－イル基；ジ、トリ、テトラ、ペンタ、又はヘキサヒドロキシヘキサン－１－イル基；ジ、トリ、テトラ、ペンタ、ヘキサ、又はヘプタヒドロキシヘプタン－１－イル基；ジ、トリ、テトラ、ペンタ、ヘキサ、ヘプタ、又はオクタヒドロキシオクタン－１－イル基等が挙げられる。これらのヒドロキシアルキル基の中でも、水酸基を２～６個有する炭素数３～８の直鎖状のヒドロキシアルキル基や、次式で表わされる分岐鎖状のヒドロキシアルキル基が好ましい。

【００２３】

【化２】



【００２４】
（式中、R^{11}は水素原子、炭素数１～３の直鎖状のアルキル基、又は炭素数１～３の直鎖状のモノヒドロキシアルキル基を示す。）
これらのヒドロキシアルキル基の中でも、２，３－ジヒドロキシプロパン－１－イル基、１，３－ジヒドロキシプロパン－２－イル基、１，３－ジヒドロキシ－２－エチルプロパン－２－イル基、１，３－ジヒドロキシ－２－ヒドロキシメチルプロパン－２－イル基、ペンタヒドロキシヘキサン－１－イル基が好ましい。
【００２５】
式（Ｉ）におけるR^{a}のカルボキシアルキル基としては、例えば、上記において例示したモノ、ジ、トリ、テトラ、ペンタ、ヘキサ、ヘプタ、又はオクタヒドロキシアルキル基の水酸基をカルボキシ基に置換したものが挙げられる。
【００２６】
モノカルボキシアルキル基としては、例えば、カルボキシメチル基、１－カルボキシエチル基、２－カルボキシエチル基、１－カルボキシプロパン－１－イル基、２－カルボキシプロパン－１－イル基、３－カルボキシプロパン－１－イル基、１－カルボキシプロパン－２－イル基、２－カルボキシプロパン－２－イル基、１－カルボキシブタン－１－イル基、２－カルボキシブタン－１－イル基、３－カルボキシブタン－１－イル基、４－カルボキシブタン－１－イル基、１－カルボキシ－２－メチルプロパン－１－イル基、２－カルボキシ－２－メチルプロパン－１－イル基、３－カルボキシ－２－メチルプロパン－１－イル基、１－カルボキシブタン－２－イル基、２－カルボキシブタン－２－イル基、３－カルボキシブタン－２－イル基、４－カルボキシブタン－２－イル基、１－カルボキシ－２－メチルプロパン－２－イル基、５－カルボキシペンタン－１－イル基、６－カルボキシヘキサン－１－イル基、７－カルボキシヘプタン－１－イル基、８－カルボキシオクタン－１－イル基、９－カルボキシノナン－１－イル基、１０－カルボキシデカン－１－イル基等が挙げられる。これらのカルボキシ基含有アルキル基の中でも、炭素数１～５のものが好ましく、炭素数１～３のものがより好ましい。
【００２７】
式（Ｉ）におけるヒドロキシカルボキシアルキル基としては、例えば、上記において例示したジ、トリ、テトラ、ペンタ、ヘキサ、ヘプタ、又はオクタヒドロキシアルキル基の水酸基の一部をカルボキシ基に置換したものが挙げられる。
【００２８】
式（Ｉ）において、R^{b}はそれぞれ独立に水素原子又は炭素数１～５の直鎖状もしくは分岐鎖状のアルキル基を示す。アルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基、プロパン－１－イル基、プロパン－２－イル基、ブタン－１－イル基、２－メチルプロパン－１－イル基、ブタン－２－イル基、２－メチルプロパン－１－イル基、ペンタン－１－イル基、１－メチルブタン－１－イル基、２－メチルブタン－１－イル基、３－メチルブタン－１－イル基、１－エチルブタン－１－イル基、１，１－ジメチルプロパン－１－イル基、１，２－ジメチルプロパン－１－イル基、２，２－ジメチルプロパン－１－イル基が挙げられる。中でも、水素原子又は炭素数１～３のものが好ましく、水素原子、メチル基、エチル基がより好ましい。
【００２９】
式（Ｉ）において、ｎは１～４の整数を示し、１～３の整数であることが好ましい。

【００３０】
本発明に使用されるイオン液体のアニオンとしては、特に限定されるものではないが、例えば、ハロゲン系アニオン、硫黄系アニオン、リン系アニオン、シアン系アニオン、ホウ素系アニオン、フッ素系アニオン、窒素酸化物系アニオン、カルボン酸アニオン等が挙げられる。
【００３１】
前記ハロゲン系アニオンとしては、例えば、クロリドイオン、ブロミドイオン、ヨードイオン等が挙げられる。
【００３２】
前記硫黄系アニオンとしては、スルファートアニオン、水素スルファートアニオン、アルキルスルホナートアニオン（例えば、メタンスルホナート、エチルスルホナート、ブチルスルホナート、ベンゼンスルホナート、ｐ－トルエンスルホナート、２，４，６－トリメチルベンゼンスルホナート、スチレンスルホナート、３－スルホプロピルメタクリレートアニオン、３－スルホプロピルアクリレート等）、アルキルスルファートアニオン（例えば、メチルスルファートアニオン、エチルスルファートアニオン、ブチルスルファートアニオン、オクチルスルファートアニオン、２－(２－メトキシエトキシ)エチルスルファートアニオン等）等が挙げられる。
【００３３】
前記リン系アニオンとしては、ホスファートアニオン、水素ホスファートアニオン、二水素ホスファートアニオン、ホスホナートアニオン、水素ホスホナートアニオン、ホスフィナートアニオン、アルキルホスファートアニオン（例えば、ジメチルホスファート、ジエチルホスファート、ジプロピルホスファートアニオン、ジブチルホスファートアニオン等）、アルキルホスホナートアニオン（例えば、メチルホスホナートアニオン、エチルホスホナートアニオン、プロピルホスホナートアニオン、ブチルホスホナートアニオン、メチルメチルホスホナートアニオン等）、アルキルホスフィナートアニオン、ヘキサアルキルホスファートアニオン等が挙げられる。
【００３４】
前記シアン系アニオンとしては、例えば、テトラシアノボレートアニオン、ジシアナミド、チオシアネートアニオン、イソチオシアネートアニオン等が挙げられる。
【００３５】
前記ホウ素系アニオンとしては、例えば、テトラフルオロボレートアニオン、ビスオキサレートボラートアニオン、テトラフェニルボレートのようなテトラアルキルボレートアニオン等が挙げられる。
【００３６】
前記フッ素系アニオンとしては、ビス(フルオロスルホニル)イミドアニオン、ビス(パーフルオロアルキルスルホニル)イミドアニオン（例えば、ビス(トリフルオロメチルスルホニル)イミドアニオン、ビス(ペンタフルオロエチルスルホニル)イミド、ビス（ヘプタフルオロプロパンスルホニル）イミドアニオン、ビス(ノナフルオロブチルスルホニル)イミド等）、パーフルオロアルキルスルホナートアニオン（例えば、トリフルオロメタンスルホナートアニオン、ペンタフルオロエタンスルホナートアニオン、ヘプタフルオロプロパンスルホナートアニオン、ノナフラートアニオン、パーフルオロオクタンスルホーナートアニオン等）、フルオロホスファートアニオン（例えば、ヘキサフルオロホスファートアニオン、トリ(ペンタフルオロエチル)トリフルオロホスファートアニオン等)、トリス（パーフルオロアルキルスルホニル）メチドアニオン（例えば、トリス(トリフルオロメタンスルホニル)メチドアニオン、トリス（ペンタフルオロエタンスルホニル）メチドアニオン、トリス（ヘプタフルオロプロパンスルホニル）メチドアニオン、トリス（ノナフルオロブタンスルホニル）メチドアニオン等）、フルオロハイドロジェネートアニオン等が挙げられる。
【００３７】
前記窒素酸化物系アニオンとしては、例えば、硝酸アニオン、亜硝酸アニオンが挙げら

れる。

【００３８】

前記カルボン酸アニオンは、分子中に、少なくとも１個以上のカルボン酸アニオン（－ＣＯＯ⁻）を持つ有機酸アニオンであり、酸素原子、窒素原子、硫黄原子などのヘテロ原子を持つ官能基を含んでいても良い。特に限定されないが、カルボン酸アニオンとしては、例えば、飽和脂肪族カルボン酸アニオン、不飽和脂肪族カルボン酸アニオン、脂環式カルボン酸アニオン、芳香族カルボン酸アニオン、飽和脂肪族ヒドロキシカルボン酸アニオン、不飽和脂肪族ヒドロキシカルボン酸アニオン、脂環式ヒドロキシカルボン酸アニオン、芳香族ヒドロキシカルボン酸アニオン、カルボニルカルボン酸アニオン、アルキルエーテルカルボン酸アニオン、ハロゲンカルボン酸アニオン、アミノ酸アニオン等が挙げられる。

【００３９】

前記飽和脂肪族カルボン酸アニオンは、直鎖状又は分岐鎖状の脂肪族飽和炭化水素基と１個以上のカルボン酸アニオンからなり、炭素数１～２２が好ましい。具体的には、例えば、蟻酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸、カプロン酸、エナント酸、カプリル酸、ペラルゴン酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、ペンタデシル酸、パルミチン酸、マルガリン酸、ステアリン酸、ベヘン酸、イソ酪酸、２－メチル酪酸、イソ吉草酸、２－エチルヘキサン酸、イソノナン酸、イソパルミチン酸、イソステアリン酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、グルタル酸、アジピン酸、ピメリン酸、スベリン酸、アゼライン酸、セバシン酸等からプロトンが解離したアニオンが挙げられる。

【００４０】

前記不飽和脂肪族カルボン酸アニオンは、直鎖状又は分岐鎖状の脂肪族不飽和炭化水素基と１個以上のカルボン酸アニオンからなり、炭素数３～２２が好ましい。具体的には、例えば、アクリル酸、メタクリル酸、クロトン酸、パルミトレイン酸、オレイン酸、バクセン酸、リノール酸、リノレン酸、エレオステアリン酸、アラキドン酸、マレイン酸、フマル酸等からプロトンが解離したアニオンが挙げられる。

【００４１】

前記脂環式カルボン酸アニオンは、芳香族性を持たない飽和もしくは不飽和の炭素環と１個以上のカルボン酸アニオンからなり、炭素数６～２０が好ましい。中でも、シクロヘキサン環骨格を有する脂環式カルボン酸アニオンが好ましく、具体的には、例えば、シクロヘキサンカルボン酸、シクロヘキサンジカルボン酸からプロトンが解離したアニオンが挙げられる。

【００４２】

前記芳香族カルボン酸アニオンは、芳香族性を持つ単環又は複数の環と１個以上のカルボン酸アニオンからなり炭素数６～２０が好ましい。中でも、ベンゼン環骨格を有する芳香族カルボン酸アニオンが好ましく、具体的には、例えば、安息香酸、ケイヒ酸、フタル酸、イソフタル酸、テレフタル酸等からプロトンが解離したアニオンが挙げられる。

【００４３】

前記飽和脂肪族ヒドロキシカルボン酸アニオンは、直鎖状又は分岐鎖状の脂肪族飽和炭化水素基、１個以上のカルボン酸アニオン及び１個以上の水酸基からなり、炭素数２～２４が好ましい。中でも、１～４個の水酸基を有する炭素数２～７の飽和脂肪族ヒドロキシカルボン酸アニオンが好ましい。具体的には、例えば、グリコール酸、乳酸、タルトロン酸、グリセリン酸、ヒドロキシ酢酸、ヒドロキシ酪酸、２－ヒドロキシデカンサン酸、３－ヒドロキシデカン酸、１２－ヒドロキシステアリン酸、ジヒドロキシステアリン酸、セレブロン酸、リンゴ酸、酒石酸、シトラマル酸、クエン酸、イソクエン酸、ロイシン酸、メバロン酸、パントイン酸等からプロトンが解離したアニオンが挙げられる。

【００４４】

前記不飽和脂肪族ヒドロキシカルボン酸アニオンは、直鎖状又は分岐鎖状の脂肪族不飽和炭化水素基、１個以上のカルボン酸アニオン及び１個以上の水酸基からなり、炭素数３～２２が好ましい。具体的には、リシノール酸、リシノレイン酸、リシネライジン酸等か

らプロトンが解離したアニオンが挙げられる。

【００４５】

前記脂環式ヒドロキシカルボン酸アニオンは、芳香族性を持たない飽和もしくは不飽和の炭素環、１個以上のカルボン酸アニオン及び１個以上の水酸基からなり、炭素数６～２０が好ましい。中でも、１～４個の水酸基を有する６員環骨格の脂環式ヒドロキシカルボン酸アニオンが好ましく、具体的には、例えば、ヒドロキシシクロヘキサンカルボン酸、ジヒドロキシシクロヘキサンカルボン酸、キナ酸（１，３，４，５－テトラヒドロキシシクロヘキサンカルボン酸）、シキミ酸等からプロトンが解離したアニオンが挙げられる。

【００４６】

芳香族ヒドロキシカルボン酸アニオンは、芳香族性を持つ単環あるいは複数の環、１個以上のカルボン酸アニオン及び１個以上の水酸基からなり、炭素数６～２０が好ましい。中でも、１～３個の水酸基を有するベンゼン環骨格の芳香族カルボン酸アニオンが好ましく、具体的には、例えば、サリチル酸、ヒドロキシ安息香酸、ジヒドロキシ安息香酸、トリヒドロキシ安息香酸、ヒドロキシメチル安息香酸、バニリン酸、シリング酸、ピロトカテク酸、ゲンチジン酸、オルセリン酸、マンデル酸、ベンジル酸、アトロラクチン酸、フロレト酸、クマル酸、ウンベル酸、コーヒー酸、フェルラ酸、シナピン酸等からプロトンが解離したアニオンが挙げられる。

【００４７】

前記カルボニルカルボン酸アニオンは、分子内にカルボニル基を有する炭素数３～２２のカルボン酸アニオンであり、１～２個のカルボニル基を有する炭素数３～７のカルボニルカルボン酸アニオンが好ましい。中でも、$CH_3((CH_2)_pCO(CH_2)_q)COO^-$（ｐ及びｑは０～２の整数を示す。）で表わされるカルボニルカルボン酸アニオンが好ましい。具体的には、例えば、ピルビン酸等からプロトンが解離したアニオンが挙げられる。

【００４８】

前記アルキルエーテルカルボン酸アニオンは、ポリオキシエチレンアルキルエーテルカルボン酸アニオンを含む、分子内にエーテル基を有する炭素数２～２２のカルボン酸アニオンであり、１～２個のエーテル基を有する炭素数２～１２のアルキルカルボン酸アニオンが好ましい。中でも、$CH_3(CH_2)_rO(CH_2)_sCOO^-$（ｒ及びｓは０～４の整数を示す。）で表わされるアルキルエーテルカルボン酸アニオンが好ましい。具体的には、例えば、メトキシ酢酸、エトキシ酢酸、メトキシ酪酸、エトキシ酪酸等からプロトンが解離したアニオンが挙げられる。

【００４９】

前記ハロゲンカルボン酸アニオンとしては、炭素数２～２２のハロゲンカルボン酸アニオンが好ましい。具体的には、例えば、トリフルオロ酢酸、ペンタフルオロプロピオン酸、パーフルオロノナン酸等のフッ素置換のハロゲンカルボン酸等からプロトンが解離したアニオンが挙げられる。

【００５０】

前記アミノ酸アニオンとしては、特に限定されないが、グリシン、アラニン、グルタミン酸、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、イソロイシン、グルタミン、ヒスチジン、システイン、ロイシン、リシン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、セリン、トリプトファン、チロシン、メチオニン、バリン、サルコシン、アミノ酪酸、メチルロイシン、アミノカプリル酸、アミノヘキサン酸、ノルバリン、アミノ吉草酸、アミノイソ酪酸、チロキシン、クレアチン、オルニチン、オパイン、テアニン、トリコロミン、カイニン酸、ドウモイ酸、イボテン酸、アクロメリン酸、シスチン、ヒドロキシプロリン、ホスホセリン、デスモシン等からプロトンが解離したアニオンが挙げられる。

【００５１】

イオン液体は、広義には１００℃以下の融点である。本発明のイオン液体は、生体触媒を低温保存する際、溶解による変性の抑制、使用上の利便性から、より低温下で液状であることが望ましく、第４級アンモニウムカチオンの官能基や特性基及びアニオンの選択に

より、融点（凝固点）は好ましくは－５℃未満、特に好ましくは－１０℃未満である。また、イオン液体は有機塩の構造的特徴から不揮発性であり、生体触媒を保存する際、溶液の濃度変化が少なく、生体触媒の使用時における設定濃度の精度、保存濃度保持（活性保持）の面から利便性が高い。

【００５２】

本発明の生体触媒用溶媒は、カチオンの水素結合性官能基（水酸基、カルボキシ基、エーテル基、水素）が存在することにより生体触媒の溶解性を高め、水素結合性官能基ではないアルキル基のみで構成されたテトラアルキルアンモニウムカチオン、イミダゾリウム系イオン液体より、溶解性が高い。また、水素結合性官能基のみで構成されたカチオンを用いたり、アニオンに水素結合性官能基を付与させることより、更に生体触媒の溶解性を高めることができる。

【００５３】

水素結合性官能基が存在するアニオンとしては、特に限定されないが、アニオン部位に水素結合性の酸素原子を持つカルボン酸アニオン、スルホン酸アニオン、リン酸アニオンが望ましい。

【００５４】

本発明の生体触媒溶液は、上記の生体触媒用溶媒と、生体触媒とを含む。生体触媒を生体触媒用溶媒に溶解する方法は特に限定されるものではなく、液状の生体触媒用溶媒に適宜の方法によって生体触媒を添加することで溶解させることができる。

【００５５】

本発明のイオン液体は、例えば、次のようにして合成することができる。

【００５６】

式（Ｉ）のＲ^{a}がヒドロキシアルキル基、カルボキシアルキル基、又はヒドロキシカルボキシアルキル基でＲ^{b}が水素原子の化合物は次のようにして合成することができる。

【００５７】

式（Ｉ）のＲ^{a}、Ｒ^{b}に対応するヒドロキシ基を１個以上有するアルカノールアミン、カルボキシ基を１個以上有するアミノ酸、ヒドロキシ基及びカルボキシ基を各々１個以上有するアミノヒドロキシアルカン酸と、アニオンに対応する有機酸もしくは無機酸を、水や有機溶媒等の溶剤中で反応させる。または、式（Ｉ）のＲ^{a}、Ｒ^{b}に対応するヒドロキシ基を１個以上有するアルカノールアミン、カルボキシ基を１個以上有するアミノ酸、ヒドロキシ基及びカルボキシ基を各々１個以上有するアミノヒドロキシアルカン酸と、アルキレンハロヒドリン、モノハロアルキルカルボン酸、モノハロヒドロキシアルキルカルボン酸等の有機ハロゲン化合物とを溶剤中で反応させ、得られた化合物と、目的の化合物のアニオンに対応する有機酸もしくは無機酸とを水や有機溶媒等の溶剤中で反応させる。

【００５８】

式（Ｉ）で表わされる第４級アンモニウムカチオンに対応するヒドロキシ基を１個以上有するヒドロキシアルキル基で構成されているアルカノールアミン（例えば、モノ、ジ、トリアルカノールアミン、２－アミノ－１,３－プロパンジオール、２－アミノ－２－エチル－１,３－プロパンジオール、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、Ｄ－グルカミン等）又はカルボキシ基を１～８個有するカルボキシアルキル基で構成されているアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン酸、グルタミン酸等）又は水酸基及びカルボキシ基を各々１個以上有するアミノヒドロキシアルカン酸（例えば、３－アミノ－２－ヒドロキシプロピオン酸等）とアニオンに対応する有機酸もしくは無機酸を、水やアセトニトリル等の極性溶剤中で反応させる。反応温度と反応時間は原料の種類等にもよるが、例えば、室温下、１時間～１日程度で行うことができる。その後、溶剤を減圧留去し、必要に応じて精製することにより、目的のイオン液体を液状物として得ることができる。また等モルで反応させ、反応が完結した場合は精製工程も必要がなく、更に製造工程が簡素化できる。

【００５９】

式（Ｉ）のＲ^{a}がヒドロキシアルキル基、カルボキシアルキル基、又はヒドロキシカル

ボキシアルキル基で、R^bがアルキル基の化合物は、例えば、次のようにして合成することができる。

【００６０】

最初の工程として、式（Ｉ）の構造に対応するアルキレンハロヒドリン、モノハロアルキルカルボン酸などの有機ハロゲン化合物と、アルキルアミンとを、又はアルキルハライドなどの有機ハロゲン化合物と、アルカノールアミン、アミノ酸、アミノヒドロキシアルカン酸などのアミン系化合物とを、アセトニトリル等の溶媒中で反応させる。反応温度と反応時間は原料の種類等にもよるが、例えば、室温下、１日程度で行うことができる。反応後、析出した固体をろ別、洗浄した後、次の工程としてアニオン交換を行う。アニオン交換を行う際には、例えば、得られた反応物と式（Ｉ）のアニオンに対応する酸とを水中で反応させる。反応温度と反応時間は原料の種類等にもよるが、例えば、室温下、１日程度で行うことができる。あるいは、イオン交換樹脂等を用いることもできる。使用するイオン交換樹脂は、例えば、水処理用又は触媒用として市販されている強塩基性イオン交換樹脂が使用できる。

【００６１】

その後、水を減圧留去し、洗浄することにより、目的の化合物を得ることができる。

【００６２】

また、式（Ｉ）のR^aがモノヒドロキシアルキル基、カルボキシ基を２個以上有するカルボキシアルキル基、又は水酸基を２個以上有するヒドロキシアルキル基、モノカルボキシアルキル基で構成され、R^bが水素原子又は存在しない（ｎが４）化合物は、例えば、次のようにして合成することもできる。

【００６３】

式（Ｉ）で表わされる第４級アンモニウムカチオンの構造に対応させるべく、モノ、ジ、又はトリアルカノールアミンと、カルボキシ基を２個以上有するハロアルキルカルボン酸などの有機ハロゲン化合物とを、又はアミノモノ、ジ、又はトリアルカン酸と、アルキレンハロヒドリン等の有機ハロゲン化合物とを、水やアセトニトリル等の極性溶媒中で反応させる。反応温度と反応時間は原料の種類等にもよるが、例えば、室温下、１日程度で行うことができる。その後、反応物を洗浄し、式（Ｉ）で表わされる第４級アンモニウムカチオンとハロゲン化物イオンからなる化合物を得ることができる。更にハロゲン化物イオンから目的のアニオンにする場合はアニオン交換を行う。アニオン交換を行う際には、例えば、得られた化応物と、目的の化合物のアニオンに対応する有機酸もしくは無機酸とを水中で反応させる。反応温度と反応時間は原料の種類等にもよるが、例えば、室温下、１日程度で行うことができる。あるいは、強塩基性イオン交換樹脂等を用いて、水酸化物アニオンにアニオン交換した後に、更に目的の化合物のアニオンに対応する有機酸もしくは無機酸とアニオン交換することで目的のイオン液体を得ることができる。

【００６４】

また、式（Ｉ）のR^aがヒドロキシカルボキシアルキル基及び、ヒドロキシアルキル基又はカルボキシアルキル基で構成され、R^bが水素原子又は存在しない（ｎが４）化合物は、例えば、次のようにして合成することもできる。

【００６５】

最初の工程として、式（Ｉ）で表わされる第４級アンモニウムカチオンの構造に対応させるべく、水酸基及びカルボキシ基を各々１個以上有するアミノヒドロキシアルカン酸（例えば、３－アミノ－２－ヒドロキシプロピオン酸等）と水酸基を２個以上有するヒドロキシアルキルハライド又はカルボキシ基を２個以上有するハロアルキルカルボン酸とを水やアセトニトリル等の極性溶媒中で反応させる。反応温度と反応時間は原料の種類等にもよるが、例えば、室温下、１日程度で行うことができる。その後、反応物を洗浄し、式（Ｉ）で表わされる第４級アンモニウムカチオンとハロゲン化物イオンからなる化合物を得ることができる。更にハロゲン化物イオンから目的のアニオンにする場合はアニオン交換を行う。アニオン交換を行う際には、例えば、得られた化応物と、目的の化合物のアニオンに対応する有機酸もしくは無機酸とを水中で反応させる。反応温度と反応時間は原料の

種類等にもよるが、例えば、室温下、１日程度で行うことができる。あるいは、強塩基性イオン交換樹脂等を用いて、水酸化物アニオンにアニオン交換した後に、更に目的の化合物のアニオンに対応する有機酸もしくは無機酸とアニオン交換することで目的のイオン液体を得ることができる。

【００６６】

本発明の生体触媒用溶媒は、上記式（Ｉ）で表わされる第４級アンモニウムカチオン及びアニオンを含むイオン液体からなる。

【００６７】

生体触媒とは、生化学反応の触媒であり、本発明における生体触媒とは、生物由来の微生物や動植物細胞、組織及びそれら生物由来の酵素、更には、酵素の機能を持つ人工化合物や、天然にある酵素や生体分子に人工的な改変を加えて新しい性能を持たせた人工酵素などが含まれる。

【００６８】

酵素は、アミノ酸が一次元的に結合して一次構造をとるが、そのアミノ酸の配列状態と数によって、二次元以上の構造が決定される。これらの構造が各酵素特有な性質を決めている。

【００６９】

一次構造は、２０種のアミノ酸がペプチド結合により一次元に配列している。多くの酵素はアミノ酸が１００～３００個で構成され、アミノ酸の配列順序は、酵素の特性を決定させる一つの情報である。二次構造は、一次元配列全体の中である部分（複数）がαヘリックス、βシート、βターンなどの高次の規則的な構造をもつ。三次構造は、一次、二次構造が三次元的な立体構造をとる。この立体構造が酵素の反応触媒としての場である活性中心や、親水性部分・疎水性部分からなるアミノ酸残基の三次元構造などを決定し、一般的なタンパク質（構造タンパク質、輸送タンパク質、貯蔵タンパク質、収縮タンパク質、防御タンパク質、ホルモンタンパク質）にはない酵素等の生体触媒が持つ特異的な基質特異性、反応特異性を有する化学反応を発現する。四次構造は、三次元構造をとった酵素の複数分子からなる会合体である。つまり、酵素等の生体触媒は、タンパク質が持つ基質特異性に加えて、一次から四次構造による反応特異性を持ち、触媒反応に対する活性を保持するためには、一次、二次構造だけではなく三次、四次構造も保持することが重要である。

【００７０】

本発明の生体触媒用溶媒が適用可能な酵素としては、例えば、酸化還元酵素（オキシドレダクターゼ）、転移酵素（トランスフェラーゼ）、加水分解酵素（ハイドロラーゼ）、脱離酵素（リアーゼ）、異性化酵素（イソメラーゼ）、合成酵素（リガーゼ）等が挙げられる。

【００７１】

酸化還元酵素としては、例えば、グルコースオキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、グルコースデヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、フルクトースデヒドロゲナーゼ、グルコン酸デヒドロゲナーゼ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ、アミンデヒドロゲナーゼ、コハク酸デヒドロゲナーゼ、ｐ－クレゾールメチルヒドロキシラーゼ、ヒスタミンデヒドロゲナーゼ、フマル酸リダクターゼ、硝酸レダクターゼ、ヒ酸レダクターゼ、亜硫酸レダクターゼ、カタラーゼ、ペルオキシダーゼ、シトクロムＰ４５０等が挙げられる。

【００７２】

転移酵素としては、例えば、クエン酸シンターゼ、メチルトランスフェラーゼ、ホスホトランスフェラーゼ、グリシンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ、トランスケトラーゼ、アスパラギン酸トランスアミナーゼ、ヘキソキナーゼ、グリセロールキナーゼ、クレアチンキナーゼ、トランスアミナーゼ、トランスアシラーゼ等が挙げられる。

【００７３】

加水分解酵素としては、例えば、カルボキシルエステラーゼ、アセチルＣｏＡヒドロラーゼ、アルカリホスファターゼ、ホスホリパーゼ、アリールスルファターゼ、アミラーゼ

、グルコアミラーゼ、セルラーゼ、ＤＮＡグリコシラーゼ、トリプシン、キモトリプシン、ペプシン、ウレアーゼ、セリンプロテアーゼ、リパーゼ等が挙げられる。

【００７４】

脱離酵素としては、例えば、アルギン酸リアーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホケトケトラーゼ、クエン酸リアーゼ、ホスホピルビン酸ヒドラターゼ、トリプトファンシンターゼ、ペクチンリアーゼ、アスパラギン酸アンモニアリアーゼ、システインリアーゼ、アデニル酸シクラーゼ、フェロキラターゼ等が挙げられる。

【００７５】

異性化酵素としては、例えば、アミノ酸ラセマーゼ、酒石酸エピメラーゼ、グルコース－６－リン酸１－エピメラーゼ、マレイン酸イソメラーゼ、フェニルピルビン酸タウトメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、ホスホマンノムターゼ、チロシン－２、３－アミノムターゼ等が挙げられる。

【００７６】

合成酵素としては、例えば、チロシンｔＲＮＡリガーゼ、アセチルＣｏＡシンセターゼ、アスパラギンシンテターゼ、ＧＭＰ合成酵素、ピルビン酸カルボキシラーゼ、ＤＮＡリガーゼ等が挙げられる。

【００７７】

本発明の生体触媒用溶媒が適用可能な微生物としては、例えば、原核生物（細菌、放線菌、古細菌）、真核生物（カビ、酵母、キノコ、藻類、原生動物）等が挙げられる。動植物細胞としては、例えば、動物細胞、植物細胞、動物培養細胞、植物培養細胞等が挙げられる。

【００７８】

動植物由来の組織としては、例えば、動物組織、植物組織等が挙げられる。

【００７９】

酵素、酵母などの生体触媒は、温度、ｐＨ、溶媒又は分子間の静電気的な斥力等の影響により、分子の立体構造が壊れやすく、活性すなわち触媒能力が低下するものが多い。そのため、生体触媒の長期保存方法としては、粉体状態での凍結乾燥法や、低濃度、極低温度条件下で溶液に溶解して保存する凍結保存法が知られているが、凍結保存法の場合、特殊な装置が必要となるとともに、凍結した溶液を溶解して使用する際、生体触媒の構造が変化し活性が低下してしまうことが多く、更に、保存濃度が低く、効率的な保存が困難である。

【００８０】

酵素の溶解性を高めるためには、様々な要素を配慮する必要がある。例えば、酵素分子が持つ電荷で発生する斥力（クーロン相互作用）による酵素分子間の相互作用を酵素溶液中に塩等の添加で抑制し、単位体積中に、より多くの酵素分子を存在させること、また、酵素表面に多く存在する水酸基、カルボニル基、アミノ基等のアミノ酸残基と溶媒との親和性を高めることが重要である。

【００８１】

アニオン、カチオンとの塩構造からなるイオン液体は、酵素同士の分子間相互作用を抑制できるため、酵素の溶解性を高めることが期待されるが、従来知られているイミダゾリウム系、テトラアルキルアンモニウム系イオン液体は、酵素表面との親和性が低く、酵素に対する溶解性が低い。一方で、酵素表面の水酸基、カルボニル基、アミノ基等のアミノ酸残基と親和性がある水酸基を持つグリセリン、プロピレングリコール、グルコース、トレハロース等の多価アルコール系等の化合物は、酵素の分子間相互作用を抑制する効果が低く、酵素に対する溶解性が低い。更に、水酸基を持つイミダゾリム系イオン液体は、剛直な環構造を持つため、酵素に対する親和性が低いため、酵素に対する溶解性は低い。

【００８２】

これらに対して本発明の生体触媒用溶媒は、アニオン、カチオンの塩構造からなるイオン液体であるため、酵素の分子間相互作用を抑制することができ、また、カチオンに水素結合性官能基を有し、酵素表面の水酸基、カルボニル基、アミノ基等のアミノ残基との親

和性が高く、分子サイズが小さく、柔軟な構造により、高い溶解性が得られる。更に、アニオンにも水素結合性官能基を存在させることにより、より溶解性を高めることができる。

【００８３】

酵素活性の保存性には、酵素の立体構造を保持することが必要となる。一般的に、酵素はアミノ酸残基から発現する基質特異性、反応特異性を持ち、反応触媒として働く。基質特異性は、反応部位の立体構造とアミノ酸残基により、結合する基質の構造を認識、選択して、特定の基質のみ反応することをいう。反応特異性は、酵素が特定の化学反応しか触媒しないことをいい、反応部位の立体構造とアミノ酸残基並びに一部の酵素が持つ金属イオンが関与する。例えば、酸化還元酵素等の酵素内部に存在する金属イオンは、アミノ酸残基と３次元的に錯体形成して触媒作用を発現する。つまり、基質特異性、反応特異性、金属イオン等の失活は、アミノ酸残基の立体構造の崩壊が主要因である。そのため、酵素表面の親水性を発現する水酸基、カルボニル基、アミノ基等のアミノ残基と、活性部位の酵素内部の水酸基、カルボニル基、アミノ基等の親水性のアミノ酸残基及び疎水性官能基を有するアミノ酸残基を保護して、酵素の立体構造を保持することが重要となる。

【００８４】

従来、酵素の溶媒として使用されている水・バッファーは、酵素表面の親水性部位との親和性は高いが、基質特異性、反応特異性の発現する上で重要となる酵素内部の疎水性部位の立体構造を保護できず触媒活性を保持できない。安定化剤としてタンパク質であるウシ血清アルブミンの水溶液を用いる場合があるが、ＢＳＥ等の感染症の懸念があり、医療分野での使用が難しい。グリセリン、プロピレングリコール、グルコース、トレハロース等の多価アルコール系の安定化剤を用いた水溶液は、酵素表面の親水性部位とこれらの多価アルコールの水酸基と、活性点がある酵素内部の親水性並びに疎水性部位にそれぞれ多価アルコールの水酸基と疎水性のアルキル鎖と親和性があり、酵素の立体構造を保持できるが、その保存安定効果は低い。グリシン、リシン等の界面活性剤（アミノ酸）水溶液は、界面活性剤の疎水部位が酵素内部の疎水性領域にある疎水性アミノ酸残基と結合して、その疎水性領域は電荷が発生することで親水性となり、親水性の表面に移動するため、酵素の立体構造が崩れて失活する。更には、イオン液体として従来知られている水素結合性官能基を持たないイミダゾリウム系、テトラアルキルアンモニウム系等のイオン液体は、酵素表面及び内部の親水性のアミノ残基を保護できないため、酵素に対する保存性が低い。

【００８５】

これらに対して本発明の生体触媒用溶媒は、イオン液体構造中のカチオン、アニオンに持つ水素結合性官能基が、酵素表面、内部のアミノ酸残基の水酸基、カルボニル基、アミノ基等のアミノ酸残基と水素結合して保護する。更に、同時に内部の疎水性官能基を有するアミノ酸残基をイオン液体中のアルキル鎖の疎水性部位で保護することで、長期間、高濃度の条件下でも、酵素の立体構造を保持して触媒活性を維持することができる。

【００８６】

また、本発明の生体触媒用溶媒は、水素結合性官能基（水酸基、カルボキシ基、エーテル基、水素）を有するカチオンとアニオンの組み合わせからなり、その静電作用から水素結合性官能基を有する非イオン性化合物より、酵素の立体構造の保持性が高く、酵素の活性の保持性が高い。

【００８７】

また、本発明の生体触媒用溶媒は、分子サイズが小さく且つ柔軟な構造を有しているため、水酸基を含有しても、環状の剛直な構造のイミダゾリウム系イオン液体より、本イオン液体分子は複雑な立体構造の内部まで効率よく入り込み、立体的に歪むことなくアミノ酸残基を保護し、酵素の活性の保持性が高い。

【００８８】

酸化還元酵素は、基質から水素原子の移動、電子の移動、酸素原子の付加を行うことで、触媒作用を発現する酵素である。その多くは、酵素中の金属イオンの電子移動による価

数の変化によって、触媒作用を発現している。

【００８９】

転移酵素は、一方の基質から他方の基質へ原子団（官能基）を移動させる反応を触媒する酵素である。反応する基質中に存在する官能基にしか転移反応しないため、基質が適合できるための立体構造を保持することが特に重要となる。

【００９０】

加水分解酵素は、基質と水、酵素のアミノ酸残基中の水酸基等を反応させて、基質中の特定の結合を切断（加水分解）する酵素である。

【００９１】

脱離酵素は、基質分子から酸化や加水分解によらず、基質中の炭素－炭素、炭素－酸素などの結合を切断する酵素である。その多くは、金属イオンと基質が反応し、中間体を生成することで基質分子中の結合を切断させる。

【００９２】

異性化酵素は、基質を空間的な配置が異なる立体異性体へ変換させる酵素である。そのため、基質を結合させる酵素中のアミノ酸残基の立体構造が重要となる。

【００９３】

合成酵素は、ＡＴＰの加水分解エネルギーを利用して、基質と基質を結合させる酵素である。反応はＡＴＰと酵素中の特定のアミノ酸残基が結合した中間体を介して、２つの基質を反応させて目的物を生成させる。

【００９４】

つまり、いずれの酵素においてもアミノ酸残基、アミノ酸残基の立体構造もしくはアミノ酸残基と３次元的に錯体形成した金属イオンが重要であり、それらが酵素の活性を発現する。本発明の生体触媒用溶媒は、その構造的特徴により、アミノ酸残基もしくは錯体形成した金属イオンを保護して、生体触媒の活性を保持することを可能とする。

【００９５】

更に、本発明の生体触媒用溶媒は、熱（温度）、ｐＨ等の種々ある変性要因の中でも熱による変性を抑制することができる。熱によってアミノ酸残基間の水素結合が切断され、立体構造が崩壊して酵素は変性するが、本発明の生体触媒用溶媒は、酵素内部のアミノ酸残基とイオン液体中の水素結合性官能基との間に水素結合のネットワークを形成することにより、より強固に立体構造を保持して、熱変性を抑制する。つまり、本発明の生体触媒用溶媒は、一般的な酵素保存条件である－２０～５℃よりも高い室温の条件（２５℃）、酵素が失活する４０℃の促進条件においても、高い酵素濃度で長期間に渡り活性を保持し、溶解、保存することができる。

【００９６】

本発明の生体触媒用溶媒は、生体触媒に対して高い溶解性と高温条件下でも活性を保持することができるため、生体触媒の保存だけではなく、生体触媒反応における効率的な反応溶媒としても有用性が高い。

【００９７】

本発明の生体触媒溶液は、本発明の生体触媒用溶媒を含み、生体触媒溶液として使用する際、本発明の生体触媒用溶媒は、その構造上の特徴から高親水性で、生体触媒に対して親和性が高いため、本発明の生体触媒用溶媒を単独でもしくは、水や極性溶媒等の他の溶媒成分と混合して使用することが可能である。また、添加剤を加えて使用することもできる。

【００９８】

本発明において生体触媒の保存とは、特に限定されるものではないが、主に次のような条件を満足することを意味する。

【００９９】

本発明の生体触媒溶液における触媒活性保持率は、生体触媒の種類等にもよるが、例えば、ウレアーゼは３０．０～５０．０ｍｇ／ｍＬで溶解したときに温度２５℃で保存した場合、３０日後の触媒活性保持率を９０％以上、９０日後を４０％以上、１８０日後を７

％以上とすることができ、促進試験である４０℃で保存した場合、３０日後の触媒活性保持率を６０％以上、９０日後を１３％以上とすることができる。カタラーゼは２０．０〜５０．０ｍｇ／ｍＬで溶解したときに温度２５℃で保存した場合、３０日後の触媒活性保持率を９０％以上、９０日後を６８％以上とすることができ、促進試験である４０℃で保存した場合、３０日後の触媒活性保持率を９０％以上、９０日後を２９％以上とすることができる。ウレアーゼやカタラーゼの生体触媒溶液は、２０．０ｍｇ／ｍＬ以上の高濃度で生体触媒を溶解することができるが、このような高濃度であっても、上記のような高い触媒活性保持率での長期間の保存も可能である。アミラーゼは０．５〜２．０ｍｇ／ｍＬで溶解したときに温度２５℃で保存した場合、７日後の触媒活性保持率を９０％以上、２１日後を４５％以上とすることができ、促進試験である４０℃で保存した場合、７日後の触媒活性保持率を９０％以上、２１日後を１５％以上とすることができる。クエン酸シンターゼは５．０〜１０．０ｍｇ／ｍＬで溶解したときに温度２５℃で保存した場合、７日後の触媒活性保持率を８０％以上、２１日後を１１％以上とすることができ、促進試験である４０℃で保存した場合、７日後の触媒活性保持率を４５％以上、１４日後を１５％以上とすることができる。ヘキソキナーゼは１０．０〜６５．０ｍｇ／ｍＬで溶解したときに温度２５℃で保存した場合、２１日後の触媒活性保持率を１０％以上とすることができ、促進試験である４０℃で保存した場合、１４日後の触媒活性保持率を１９％以上とすることができる。アルギン酸リアーゼは１０．０〜３０．０ｍｇ／ｍＬで溶解したときに温度２５℃で保存した場合、６０日後の触媒活性保持率を２０％以上とすることができ、促進試験である４０℃で保存した場合、３０日後の触媒活性保持率を１３％以上とすることができる。ホスホグルコースイソメラーゼは１．５ｍｇ／ｍＬで溶解したときに温度２５℃で保存した場合、６０日後の触媒活性保持率を６１％以上とすることができ、促進試験である４０℃で保存した場合、２１日後の触媒活性保持率を１０％以上とすることができる。アセチルＣｏＡシンセターゼは１．５ｍｇ／ｍＬで溶解したときに温度２５℃で保存した場合、６０日後の触媒活性保持率を１０％以上とすることができ、促進試験である４０℃で保存した場合、１４日後の触媒活性保持率を２１％以上とすることができる。シトクロムＰ４５０は１．０ｍｇ／ｍＬで溶解したときに温度３℃で保存した場合、１４日後の触媒活性保持率を７％以上とすることができる。ここで生体触媒の立体構造と触媒活性の保持は、触媒反応の成否で確認することができる。

【０１００】

本発明の生体触媒溶液における生体触媒の保存濃度は、生体触媒の種類等にもよるが、例えば、ウレアーゼは１０ｎｇ／ｍＬ以上、カタラーゼは２０ｍｇ／ｍＬ以上、アミラーゼは０．５ｍｇ／ｍＬ以上、クエン酸シンターゼは５ｍｇ／ｍＬ以上、アルギン酸リアーゼは１０ｍｇ／ｍＬ以上、ホスホグルコースイソメラーゼ及びアセチルＣｏＡシンセターゼは１．５ｍｇ／ｍＬ以上、ヘキソキナーゼは１０ｍｇ／ｍＬ以上、シトクロムＰ４５０は１．０ｍｇ／ｍＬ以上とすることができる。

【０１０１】

生体触媒の保存期間は、生体触媒の種類等にもよるが、例えば３０日以上、更には６０日以上、更には９０日以上、更には１８０日以上とすることができる。

【０１０２】

生体触媒の保存温度については、本発明の生体触媒溶液は、例えば４０℃以下の範囲において、液状で長期間活性を保持したまま生体触媒を保存することができる。

【実施例】

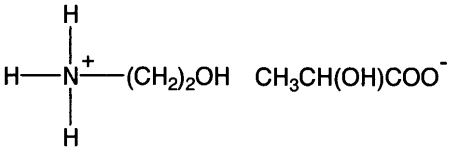
【０１０３】

以下に、実施例により本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。

＜実施例１＞　化合物１

【０１０４】

【化３】



【０１０５】

モノエタノールアミン（１０．００ｇ、０．１６ｍｏｌ）と乳酸（１４．７４ｇ、０．１６ｍｏｌ）を水中(１００ｍＬ)で、室温下、３時間反応後、水を減圧留去、洗浄することにより化合物１を得た。

FT－IR（KBr）：3392cm^{-1}：O－H伸縮振動　2950cm^{-1}：C－H伸縮振動　1579cm^{-1}：COO^{-}伸縮振動

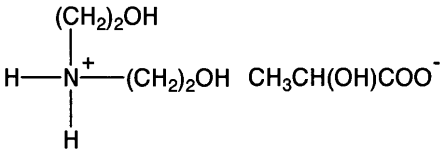
^{1}H－NMR (D_2O 400MHz): δ 1.24 (d, 3H, $C\underline{H_3}CH$), δ 3.01 (t, 2H, $N^{+}C\underline{H_2}CH_2OH$), δ 3.71 (t, 2H, $N^{+}CH_2C\underline{H_2}OH$), δ 4.00 (m, 1H, $CH_3C\underline{H}(OH)COO^{-}$).

^{13}C－NMR (D_2O 100MHz): δ 20.1 ($\underline{C}H_3CH$), δ 41.4 ($N^{+}\underline{C}H_2CH_2OH$), δ 58.3 ($N^{+}CH_2\underline{C}H_2OH$), δ 68.5 ($CH_3\underline{C}H(OH)COO^{-}$), δ 182.5 ($CH_3CH(OH)\underline{C}OO^{-}$).

＜実施例２＞　化合物２

【０１０６】

【化４】



【０１０７】

ジエタノールアミンと乳酸を用いて、実施例１と同様な合成方法及び配合比で化合物２を得た。

FT－IR（KBr）：3392cm^{-1}：O－H伸縮振動　2950cm^{-1}：C－H伸縮振動　1584cm^{-1}：COO^{-}伸縮振動

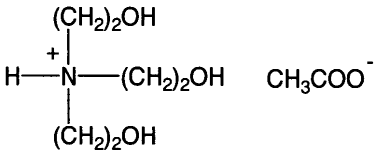
^{1}H－NMR (D_2O 400MHz): δ 1.26 (d, 3H, $C\underline{H_3}CH$), δ 3.13 (t, 4H, $N^{+}C\underline{H_2}CH_2OH$), δ 3.79 (t, 4H, $N^{+}CH_2C\underline{H_2}OH$), δ 4.02 (m, 1H, $CH_3C\underline{H}(OH)COO^{-}$).

^{13}C－NMR (D_2O 100MHz): δ 20.1 ($\underline{C}H_3CH$), δ 49.0 ($N^{+}\underline{C}H_2CH_2OH$), δ 56.9 ($N^{+}CH_2\underline{C}H_2OH$), δ 68.5 ($CH_3\underline{C}H(OH)COO^{-}$), δ 182.5 ($CH_3CH(OH)\underline{C}OO^{-}$).

＜実施例３＞　化合物３

【０１０８】

【化５】



【０１０９】

トリエタノールアミンと酢酸を用いて、実施例１と同様な合成方法及び配合比で化合物３を得た。

FT－IR（KBr）：3360cm^{-1}：O－H伸縮振動　2950cm^{-1}：C－H伸縮振動　1558cm^{-1}：COO^{-}伸縮振動

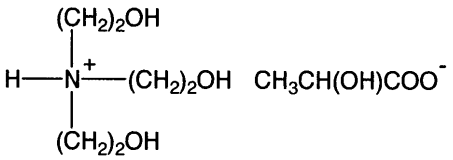
^{1}H－NMR (D_2O 400MHz): δ 1.84 (s, 3H, $C\underline{H_3}COO^{-}$), δ 3.31(t, 6H, $N^{+}C\underline{H_2}CH_2OH$), δ 3.85 (t, 6H, $N^{+}CH_2C\underline{H_2}OH$).

^{13}C－NMR (D_2O 100MHz): δ 23.3 ($\underline{C}H_3COO^{-}$), δ 55.4 ($N^{+}\underline{C}H_2CH_2OH$), δ 55.6 ($N^{+}CH_2\underline{C}H_2OH$), δ 181.4 ($CH_3\underline{C}OO^{-}$).

＜実施例４＞　化合物４

【０１１０】

【化６】



【０１１１】

トリエタノールアミンと乳酸を用いて、実施例１と同様な合成方法及び配合比で化合物４を得た。

FT－IR（KBr）：3313cm^{-1}：O－H伸縮振動　2939cm^{-1}：C－H伸縮振動　1591cm^{-1}：COO^{-}伸縮振動

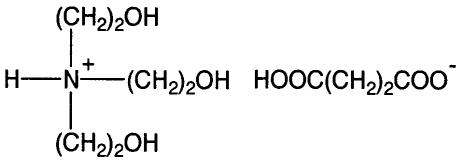
^{1}H－NMR（D_2O 400MHz）：δ 1.25（d，3H，$C\underline{H_3}CH$），δ 3.32（t，6H，$N^{+}C\underline{H_2}CH_2OH$），δ 3.86（t，6H，$N^{+}CH_2C\underline{H_2}OH$），δ 4.01（m，1H，$CH_3C\underline{H}(OH)COO^{-}$）.

^{13}C－NMR（D_2O 100MHz）：δ 20.1（$\underline{C}H_3CH$），δ 55.4（$N^{+}\underline{C}H_2CH_2OH$），δ 55.6（$N^{+}CH_2\underline{C}H_2OH$），δ 68.5（$CH_3\underline{C}H(OH)COO^{-}$），δ 182.5（$CH_3CH(OH)\underline{C}OO^{-}$）.

＜実施例５＞　化合物５

【０１１２】

【化７】



【０１１３】

トリエタノールアミンとコハク酸を用いて、実施例１と同様な合成方法及び配合比で化合物５を得た。

FT－IR（KBr）：3360m^{-1}：O－H伸縮振動　2939cm^{-1}：C－H伸縮振動　1714cm^{-1}：COOH伸縮振動　1563cm^{-1}：COO^{-}伸縮振動

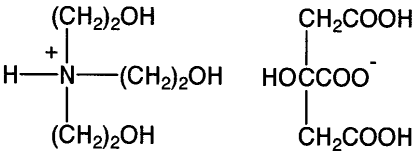
^{1}H－NMR（D_2O 400MHz）：δ 2.51（s，4H，$HOOC\underline{CH_2}\underline{CH_2}COO^{-}$），δ 3.22（t，6H，$N^{+}\underline{CH_2}CH_2OH$），δ 3.84（t，6H，$N^{+}CH_2\underline{CH_2}OH$）.

^{13}C－NMR（D_2O 100MHz）：δ 31.4（$HOOC\underline{C}H_2\underline{C}H_2COO^{-}$），δ 48.9（$N^{+}\underline{C}H_2CH_2OH$），δ 56.5（$N^{+}CH_2\underline{C}H_2OH$），δ 179.7（$\underline{C}OOH$，$\underline{C}OO^{-}$）.

＜実施例６＞　化合物６

【０１１４】

【化８】



【０１１５】

トリエタノールアミンとクエン酸を用いて、実施例１と同様な合成方法及び配合比で化合物６を得た。

FT－IR（KBr）：3313m^{-1}：O－H伸縮振動　2939cm^{-1}：C－H伸縮振動　1717cm^{-1}：COOH伸縮振動　1588cm^{-1}：COO^{-}伸縮振動

^{1}H－NMR（D_2O 400MHz）：δ 2.63（m，4H，$HOOC\underline{CH_2}C(OH)(COO^{-})\underline{CH_2}COOH$），δ 3.37（t，6H，$N^{+}\underline{CH_2}CH_2OH$），δ 3.84（t，6H，$N^{+}CH_2\underline{CH_2}OH$）.

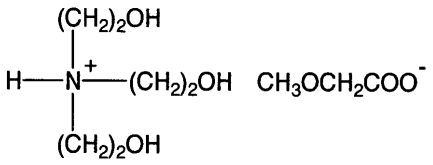
^{13}C－NMR（D_2O 100MHz）：δ 43.7（$HOOC\underline{C}H_2C(OH)(COO^{-})\underline{C}H_2COOH$），δ 55.0（$N^{+}\underline{C}H_2CH_2OH$

), δ 55.3 ($N^+CH_2\underline{C}H_2OH$), δ 73.8 ($HOOCCH_2\underline{C}(OH)(COO^-)CH_2COOH$), δ 174.8 ($HOO\underline{C}CH_2C(OH)(COO^-)CH_2\underline{C}OOH$), δ 178.7 ($HOOCCH_2C(OH)(\underline{C}OO^-)CH_2COOH$).

＜実施例７＞　化合物７

【０１１６】

【化９】



【０１１７】

トリエタノールアミンとメトキシ酢酸を用いて、実施例１と同様な合成方法及び配合比で化合物７を得た。

FT－IR（KBr）：3312m^{-1}：O－H伸縮振動　2950cm^{-1}：C－H伸縮振動　1593cm^{-1}：COO^-伸縮振動

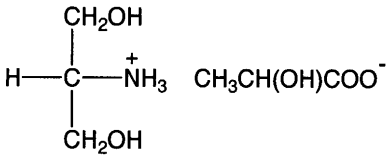
^1H－NMR (D_2O 400MHz): δ 3.28 (t, 3H, $C\underline{H_3}OCH_2COO^-$), δ 3.39 (t, 6H, $N^+C\underline{H_2}CH_2OH$), δ 3.78 (s, 2H, $CH_3OC\underline{H_2}COO^-$), δ 3.87 (t, 6H, $N^+CH_2C\underline{H_2}OH$).

^{13}C－NMR (D_2O 100MHz): δ 55.1 ($N^+\underline{C}H_2CH_2OH$), δ 55.3 ($N^+CH_2\underline{C}H_2OH$), δ 58.1 ($\underline{C}H_3OCH_2COO^-$), δ 71.2 ($CH_3O\underline{C}H_2COO^-$), δ 178.0 ($CH_3OCH_2\underline{C}OO^-$).

＜実施例８＞　化合物８

【０１１８】

【化１０】



【０１１９】

２－アミノ－１，３－プロパンジオールと乳酸を用いて、実施例１と同様な合成方法及び配合比で化合物８を得た。

FT－IR（KBr）：3231cm^{-1}：O－H伸縮振動　2972cm^{-1}：C－H伸縮振動　1571cm^{-1}：COO^-伸縮振動

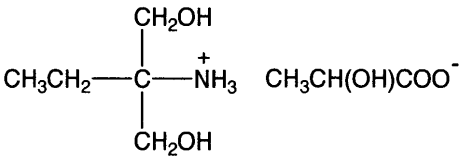
^1H－NMR (D_2O 400MHz): δ 1.17－1.24 (m, 3H, $C\underline{H_3}CH(OH)COO^-$), δ 3.22－3.27 (m, 1H, $CH_3C\underline{H}(OH)COO^-$), δ 3.55－3.71 (m, 1H, $HOCH_2C\underline{H}(N^+H_3)CH_2OH$), δ 3.97－4.02 (m, 4H, $HOC\underline{H_2}CH(N^+H_3)C\underline{H_2}OH$).

^{13}C－NMR (D_2O 100MHz): δ 20.0 ($\underline{C}H_3CH(OH)COO^-$), δ 53.9 ($HOCH_2\underline{C}H(N^+H_3)CH_2OH$), δ 59.3 ($HO\underline{C}H_2CH(N^+H_3)\underline{C}H_2OH$), δ 68.4 ($CH_3\underline{C}H(OH)COO^-$), δ 182.4 ($CH_3CH(OH)\underline{C}OO^-$).

＜実施例９＞　化合物９

【０１２０】

【化１１】

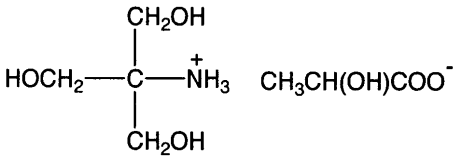


【０１２１】

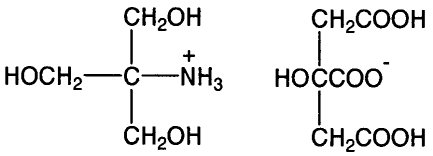
２－アミノ－２－エチル－１，３－プロパンジオールと乳酸を用いて、実施例１と同様な合成方法及び配合比で化合物９を得た。

FT－IR（KBr）：3231cm^{-1}：O－H伸縮振動　2937cm^{-1}：C－H伸縮振動　1571cm^{-1}：COO

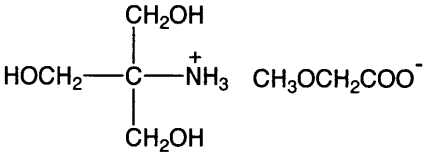
$^{-}$伸縮振動
^{1}H－NMR (D_2O 400MHz): δ 0.77－0.81 (m, 3H, $NH_3^+C(CH_2OH)_2CH_2\underline{CH_3}$), δ 1.17－1.24 (m, 3H, $\underline{CH_3}CH(OH)COO^-$), δ 1.51－1.57 (m, 2H, $NH_3^+C(CH_2OH)_2\underline{CH_2}CH_3$), δ 3.52 (s, 4H, $NH_3^+C(\underline{CH_2}OH)_2CH_2CH_3$), δ 3.94－3.99 (m, 1H, $CH_3\underline{CH}(OH)COO^-$).
^{13}C－NMR (D_2O 100MHz): δ 6.3 ($NH_3^+C(CH_2OH)_2CH_2\underline{CH_3}$), δ 20.0 ($\underline{CH_3}CH(OH)COO^-$), δ 23.5 ($NH_3^+C(CH_2OH)_2\underline{CH_2}CH_3$), δ 60.3 ($NH_3^+\underline{C}(CH_2OH)_2CH_2CH_3$), δ 61.0 ($NH_3^+C(\underline{CH_2}OH)_2CH_2CH_3$), δ 68.5 ($CH_3\underline{CH}(OH)COO^-$) , δ 182.4 ($CH_3CH(OH)\underline{C}OO^-$).
＜実施例１０＞　化合物１０
【０１２２】
【化１２】



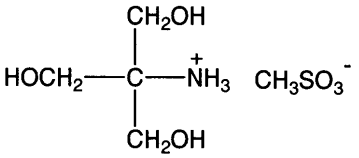
【０１２３】
　トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンと乳酸を用いて、実施例１と同様な合成方法及び配合比で化合物１０を得た。
FT－IR（KBr）：3228cm^{-1}：O－H伸縮振動　2935cm^{-1}：C－H伸縮振動　1571cm^{-1}：COO^{-}伸縮振動
^{1}H－NMR (D_2O 400MHz): δ 1.15－1.17 (m, 3H, $\underline{CH_3}CH(OH)COO^-$), δ 3.53 (s, 6H, $NH_3^+C(\underline{CH_2}OH)_3$), δ 3.91－4.11 (m, 1H, $CH_3\underline{CH}(OH)COO^-$).
^{13}C－NMR (D_2O 100MHz): δ 20.0 ($\underline{CH_3}CH(OH)COO^-$), δ 59.8 ($NH_3^+\underline{C}(CH_2OH)_3$), δ 60.7 ($NH_3^+C(\underline{CH_2}OH)_3$), δ 68.4 ($CH_3\underline{CH}(OH)COO^-$), δ 182.4 ($CH_3CH(OH)\underline{C}OO^-$).
＜実施例１１＞　化合物１１
【０１２４】
【化１３】



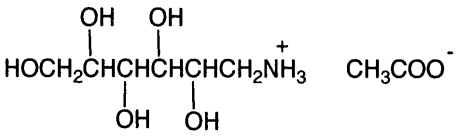
【０１２５】
　トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンとクエン酸を用いて、実施例１と同様な合成方法及び配合比で化合物１１を得た。
FT－IR（KBr）：3145cm^{-1}：O－H伸縮振動　2946cm^{-1}：C－H伸縮振動　1711cm^{-1}：COOH伸縮振動　1572cm^{-1}：COO^{-}伸縮振動
^{1}H－NMR (D_2O 400MHz): δ 2.58－2.75 (m, 4H, $HOOC\underline{CH_2}C(OH)(COO^-)\underline{CH_2}COOH$), δ 3.57 (s, 6H, $NH_3^+C(\underline{CH_2}OH)_3$).
^{13}C－NMR (D_2O 100MHz): δ 43.7 ($HOOC\underline{C}H_2C(OH)(COO^-)\underline{C}H_2COOH$), δ 59.2 ($NH_3^+\underline{C}(CH_2OH)_3$), δ 61.4 ($NH_3^+C(\underline{C}H_2OH)_3$), δ 73.8 ($HOOCCH_2\underline{C}(OH)(COO^-)CH_2COOH$), δ 174.8 ($HOO\underline{C}CH_2C(OH)(COO^-)CH_2\underline{C}OOH$), δ 178.6 ($HOOCCH_2C(OH)(\underline{C}OO^-)CH_2COOH$).
＜実施例１２＞　化合物１２
【０１２６】
【化１４】



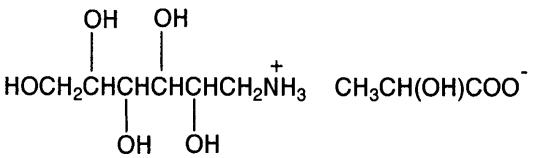
【０１２７】
　トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンとメトキシ酢酸を用いて、実施例１と同様な合成方法及び配合比で化合物１２を得た。
FT－IR（KBr）：3148cm^{-1}：O－H伸縮振動　2928cm^{-1}：C－H伸縮振動　1574cm^{-1}：COO^{-}伸縮振動
^{1}H－NMR（D_2O 400MHz）: δ 0.95（t, 3H, $C\underline{H_3}OCH_2COO^-$）, δ 3.48（s, 6H, $NH_3^+C(C\underline{H_2}OH)_3$）, δ 3.66（s, 2H, $CH_3OC\underline{H_2}COO^-$）.
^{13}C－NMR（D_2O 100MHz）: δ 14.0（$\underline{C}H_3O$）, δ 59.2（$NH_3^+\underline{C}(CH_2OH)_3$）, δ 61.3（$NH_3^+C(\underline{C}H_2OH)_3$）, δ 69.1（$CH_3O\underline{C}H_2COO^-$）, δ 178.1（$CH_3OCH_2\underline{C}OO^-$）.
＜実施例１３＞　化合物１３
【０１２８】
【化１５】



【０１２９】
　トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンとメタンスルホン酸を用いて、実施例１と同様な合成方法及び配合比で化合物１３を得た。
FT－IR（KBr）：3388cm^{-1}：O－H伸縮振動　2959cm^{-1}：C－H伸縮振動
^{1}H－NMR（D_2O 400MHz）: δ 2.72（s, 3H, $C\underline{H_3}SO_3^-$）, δ 3.65（s, 6H, $NH_3^+C(C\underline{H_2}OH)_3$）.
^{13}C－NMR（D_2O 100MHz）: δ 38.5（$\underline{C}H_3SO_3^-$）, δ 59.4（$NH_3^+\underline{C}(CH_2OH)_3$）, δ 61.4（$NH_3^+C(\underline{C}H_2OH)_3$）.
＜実施例１４＞　化合物１４
【０１３０】
【化１６】



【０１３１】
　Ｄ－グルカミンと酢酸を用いて、実施例１と同様な合成方法及び配合比で化合物１４を得た。
FT－IR（KBr）：3152cm^{-1}：O－H伸縮振動　2921cm^{-1}：C－H伸縮振動　1549cm^{-1}：COO^{-}伸縮振動
^{1}H－NMR（D_2O 400MHz）: δ 1.76（s, 3H, $C\underline{H_3}COO^-$）, δ 2.89－3.09（m, 2H, $HOCH_2(CH(OH))_3CH(OH)C\underline{H_2}NH_3^+$）, δ 3.47－3.68（m, 5H, $HOC\underline{H_2}(C\underline{H}(OH))_3CH(OH)CH_2NH_3^+$）, δ 3.86－3.90（m, 1H, $HOCH_2(CH(OH))_3C\underline{H}(OH)CH_2NH_3^+$）.
^{13}C－NMR（D_2O 100MHz）: δ 23.2（$\underline{C}H_3COO^-$）, δ 41.6（$HOCH_2(CH(OH))_3CH(OH)\underline{C}H_2NH_3^+$）, δ 62.6（$HO\underline{C}H_2(CH(OH))_3CH(OH)CH_2NH_3^+$）, δ 68.9－70.8（$HOCH_2(\underline{C}H(OH))_3\underline{C}H(OH)CH_2NH_3^+$）, δ 181.4（$CH_3\underline{C}OO^-$）.
＜実施例１５＞　化合物１５
【０１３２】
【化１７】



【０１３３】

Ｄ－グルカミンと乳酸を用いて、実施例１と同様な合成方法及び配合比で化合物１５を得た。

FT－IR（KBr）：3234cm^{-1}：O－H伸縮振動　2926cm^{-1}：C－H伸縮振動　1572cm^{-1}：COO^{-}伸縮振動

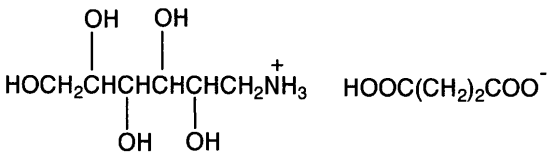
^{1}H－NMR（D_2O 400MHz）：δ 1.14（m，3H，$C\underline{H_3}CH(OH)COO^{-}$），δ 2.83－3.02（m，2H，$HOCH_2(CH(OH))_3CH(OH)C\underline{H_2}NH_3^{+}$），δ 3.45－3.66（m，5H，$HOC\underline{H_2}(C\underline{H}(OH))_3CH(OH)CH_2NH_3^{+}$），δ 3.81－3.85（m，1H，$HOCH_2(CH(OH))_3C\underline{H}(OH)CH_2NH_3^{+}$），δ 3.90－3.95（m，1H，$CH_3C\underline{H}(OH)COO^{-}$）.

^{13}C－NMR（D_2O 100MHz）：δ 20.1（$\underline{C}H_3CH(OH)COO^{-}$），δ 41.7（$HOCH_2(CH(OH))_3CH(OH)\underline{C}H_2NH_3^{+}$），δ 62.6（$HO\underline{C}H_2(CH(OH))_3CH(OH)CH_2NH_3^{+}$），δ 68.4（$CH_3\underline{C}H(OH)COO^{-}$），δ 68.9－70.9（$HOCH_2(\underline{C}H(OH))_3\underline{C}H(OH)CH_2NH_3^{+}$），δ 182.5（$CH_3CH(OH)\underline{C}OO^{-}$）.

＜実施例１６＞　化合物１６

【０１３４】

【化１８】



【０１３５】

Ｄ－グルカミンとコハク酸を用いて、実施例１と同様な合成方法及び配合比で化合物１６を得た。

FT－IR（KBr）：3177cm^{-1}：O－H伸縮振動　2925cm^{-1}：C－H伸縮振動　1709cm^{-1}：COOH伸縮振動　1551cm^{-1}：COO^{-}伸縮振動

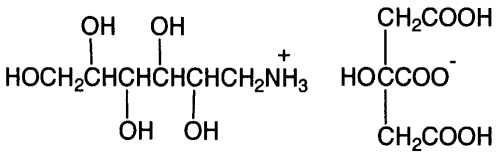
^{1}H－NMR（D_2O 400MHz）：δ 2.42（s，4H，$HOOCC\underline{H_2}C\underline{H_2}COO^{-}$），δ 2.89－3.08（m，2H，$HOCH_2(CH(OH))_3CH(OH)C\underline{H_2}NH_3^{+}$），δ 3.46－3.67（m，5H，$HOC\underline{H_2}(C\underline{H}(OH))_3CH(OH)CH_2NH_3^{+}$），δ 3.85－3.89（m，1H，$HOCH_2(CH(OH))_3C\underline{H}(OH)CH_2NH_3^{+}$）.

^{13}C－NMR（D_2O 100MHz）：δ 31.2（$HOOC\underline{C}H_2\underline{C}H_2COO^{-}$），δ 41.6（$HOCH_2(CH(OH))_3CH(OH)\underline{C}H_2NH_3^{+}$），δ 62.6（$HO\underline{C}H_2(CH(OH))_3CH(OH)CH_2NH_3^{+}$），δ 68.9－70.8（$HOCH_2(\underline{C}H(OH))_3\underline{C}H(OH)CH_2NH_3^{+}$），δ 179.6（$HOO\underline{C}CH_2CH_2\underline{C}OO^{-}$）.

＜実施例１７＞　化合物１７

【０１３６】

【化１９】



【０１３７】

Ｄ－グルカミンとクエン酸を用いて、実施例１と同様な合成方法及び配合比で化合物１７を得た。

FT－IR（KBr）：3226cm^{-1}：O－H伸縮振動　2931cm^{-1}：C－H伸縮振動　1711cm^{-1}：COOH伸縮振動　1575cm^{-1}：COO^{-}伸縮振動

^{1}H－NMR（D_2O 400MHz）：δ 2.66－2.83（m，4H，$HOOCC\underline{H_2}C(OH)(COO^{-})C\underline{H_2}COOH$），δ 2.90－3.10（m，2H，$HOCH_2(CH(OH))_3CH(OH)C\underline{H_2}NH_3^{+}$），δ 3.48－3.68（m，5H，$HOC\underline{H_2}(C\underline{H}(OH))_3CH(OH)CH_2NH_3^{+}$），δ 3.86－3.90（m，1H，$HOCH_2(CH(OH))_3C\underline{H}(OH)CH_2NH_3^{+}$）.

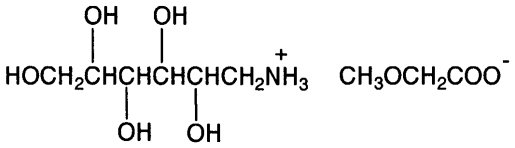
^{13}C－NMR（D_2O 100MHz）：δ 41.7（$HOCH_2(CH(OH))_3CH(OH)\underline{C}H_2NH_3^{+}$），δ 43.6（$HOO\underline{C}CH_2C(OH)(COO^{-})\underline{C}H_2COOH$），δ 62.6（$HO\underline{C}H_2(CH(OH))_3CH(OH)CH_2NH_3^{+}$），δ 68.9－70.8（$HOCH_2(\underline{C}H(OH))_3\underline{C}H(OH)CH_2NH_3^{+}$），δ 73.8（$HOOCCH_2\underline{C}(OH)(COO^{-})CH_2COOH$），δ 174.6（$HOO\underline{C}CH_2C$

(OH)(COO$^-$)CH$_2$<u>C</u>OOH), δ 178.6 (HOOCCH$_2$C(OH)(<u>C</u>OO$^-$)CH$_2$COOH).

＜実施例１８＞　化合物１８

【０１３８】

【化２０】



【０１３９】

Ｄ－グルカミンとメトキシ酢酸を用いて、実施例１と同様な合成方法及び配合比で化合物１８を得た。

FT－IR（KBr）：3174cm^{-1}：O－H伸縮振動　2924cm^{-1}：C－H伸縮振動　1577cm^{-1}：COO$^-$伸縮振動

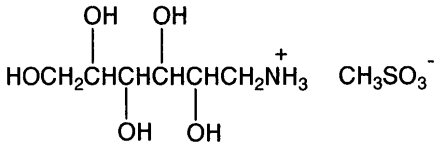
^{1}H－NMR (D$_2$O 400MHz): δ 2.89－3.09 (m, 2H, HOCH$_2$(CH(OH))$_3$CH(OH)C<u>H$_2$</u>NH$_3^+$), δ 3.20 (s, 3H, C<u>H$_3$</u>OCH$_2$COO$^-$), δ 3.48－3.69 (m, 5H, HOC<u>H$_2$</u>(C<u>H</u>(OH))$_3$CH(OH)CH$_2$NH$_3^+$), δ 3.72 (s, 2H, CH$_3$OC<u>H$_2$</u>COO$^-$), δ 3.86－3.90 (m, 1H, HOCH$_2$(CH(OH))$_3$C<u>H</u>(OH)CH$_2$NH$_3^+$).

^{13}C－NMR (D$_2$O 100MHz): δ 41.6 (HOCH$_2$(CH(OH))$_3$CH(OH)<u>C</u>H$_2$NH$_3^+$), δ 58.0 (<u>C</u>H$_3$OCH$_2$COO$^-$), δ 62.6 (HO<u>C</u>H$_2$(CH(OH))$_3$CH(OH)CH$_2$NH$_3^+$), δ 69.0－70.8 (HOCH$_2$(<u>C</u>H(OH))$_3$<u>C</u>H(OH)CH$_2$NH$_3^+$), δ 71.1 (CH$_3$O<u>C</u>H$_2$COO$^-$), δ 178.0 (CH$_3$OCH$_2$<u>C</u>OO$^-$).

＜実施例１９＞　化合物１９

【０１４０】

【化２１】



【０１４１】

Ｄ－グルカミンとメタンスルホン酸を用いて、実施例１と同様な合成方法及び配合比で化合物１９を得た。

FT－IR（KBr）：3388cm^{-1}：O－H伸縮振動　2959cm^{-1}：C－H伸縮振動

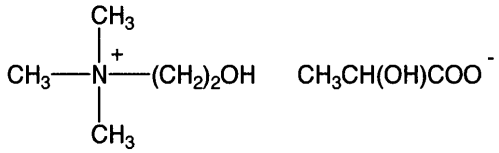
^{1}H－NMR (D$_2$O 400MHz): δ 2.71 (s, 3H, C<u>H$_3$</u>SO$_3$$^-$), δ 2.95－3.15 (m, 2H, HOCH$_2$(CH(OH))$_3$CH(OH)C<u>H$_2$</u>NH$_3^+$), δ 3.53－3.73 (m, 5H, HOC<u>H$_2$</u>(C<u>H</u>(OH))$_3$CH(OH)CH$_2$NH$_3^+$), δ 3.90－3.96 (m, 1H, HOCH$_2$(CH(OH))$_3$C<u>H</u>(OH)CH$_2$NH$_3^+$).

^{13}C－NMR (D$_2$O 100MHz): δ 38.5 (<u>C</u>H$_3$SO$_3$$^-$), δ 41.7 (HOCH$_2$(CH(OH))$_3$CH(OH)<u>C</u>H$_2NH_3^+$), δ 62.7 (HO<u>C</u>H$_2$(CH(OH))$_3$CH(OH)CH$_2NH_3^+$), δ 68.9－70.9 (HOCH$_2$(<u>C</u>H(OH))$_3$<u>C</u>H(OH)CH$_2NH_3^+$).

＜実施例２０＞　化合物２０

【０１４２】

【化２２】



【０１４３】

塩化コリンをイオン交換水に溶解し、ＯＨ型に置換したイオン交換樹脂（三菱化学(株)製ダイアイオン　ＳＡ１０Ａ）を充填したカラムに通液することによってコリンヒドロキシドを得た。得られたコリンヒドロキシド（８．６８ｇ、０．０７ｍｏｌ）と乳酸（６．

４５ｇ、０．０７ｍｏｌ）を水中で（１００ｍＬ）、室温下、３時間反応後、水を減圧留去、洗浄することにより化合物２０を得た。

FT-IR（KBr）：3464cm-1：O-H伸縮振動　2920cm-1：C-H伸縮振動　1570cm-1：COO-伸縮振動

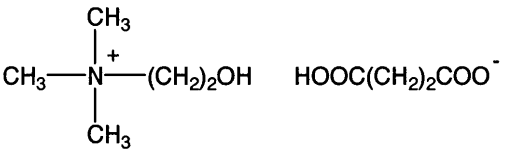
1H-NMR (D2O 400MHz): δ 1.30 (m, 3H, $C\underline{H_3}CH(OH)COO^-$), δ3.07 (s, 9H, $C\underline{H_3}N^+$), δ 3.38 (m, 2H, $C\underline{H_2}N^+$), δ 3.92 (m, 2H, $N^+CH_2C\underline{H_2}OH$), δ 3.96 (m, 1H, $CH_3C\underline{H}$).

13C-NMR (D2O 100MHz): δ 20.1 ($\underline{C}H_3CH(OH)COO^-$), δ53.9 ($\underline{C}H_3N^+$), δ 55.6 ($\underline{C}H_2N^+$), δ 68.4 ($N^+CH_2\underline{C}H_2OH$), δ 72.8 ($CH_3\underline{C}H(OH)COO^-$), δ 182.3 ($CH_3CH(OH)\underline{C}OO^-$).

＜実施例２１＞　化合物２１

【０１４４】

【化２３】



【０１４５】

塩化コリンとコハク酸を用いて、実施例２０と同様な合成方法及び配合比で化合物２１を得た。

FT－IR（KBr）：3177cm^{-1}：O－H伸縮振動　2925cm^{-1}：C－H伸縮振動　1709cm^{-1}：COOH伸縮振動　1551cm^{-1}：COO^-伸縮振動

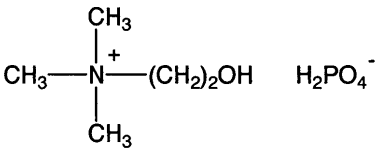
1H-NMR (D2O 400MHz): δ 2.43 (s, 4H, $HOOC\underline{CH_2}\underline{CH_2}COO^-$), δ3.07 (s, 9H, $C\underline{H_3}N^+$), δ 3.39 (m, 2H, $C\underline{H_2}N^+$), δ 3.93 (m, 2H, $N^+CH_2C\underline{H_2}OH$).

13C-NMR (D2O 100MHz): δ 30.8 ($HOOC\underline{C}H_2\underline{C}H_2COO^-$), δ53.9 ($\underline{C}H_3N^+$), δ 55.5 ($\underline{C}H_2N^+$), δ 67.4 ($N^+CH_2\underline{C}H_2OH$), δ 179.1 ($HOO\underline{C}CH_2CH_2\underline{C}OO^-$).

＜実施例２２＞　化合物２２

【０１４６】

【化２４】



【０１４７】

塩化コリンとリン酸を用いて、実施例２０と同様な合成方法及び配合比で化合物２２を得た。

FT-IR（KBr）：3464cm-1：O-H伸縮振動　2920cm-1：C-H伸縮振動

1H-NMR (D2O 400MHz): δ 3.08 (s, 9H, $C\underline{H_3}N^+$), δ 3.39 (m, 2H, $C\underline{H_2}N^+$), δ 3.93 (m, 2H, $N^+CH_2C\underline{H_2}OH$).

13C-NMR (D2O 100MHz): δ 53.9 ($\underline{C}H_3N^+$), δ 55.6 ($\underline{C}H_2N^+$), δ 67.4 ($N^+CH_2\underline{C}H_2OH$).

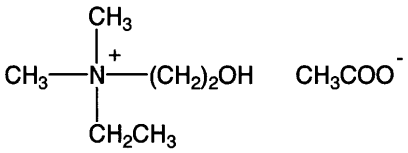
＜実施例２３～２７＞

化合物２３～２７は、特開２０１２－３１１３７号公報に記載の方法で合成した。

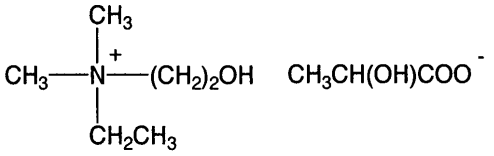
＜実施例２３＞　化合物２３

【０１４８】

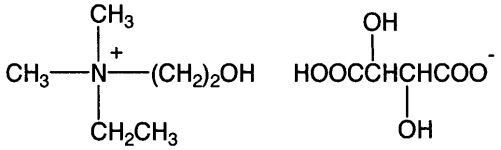
【化２５】



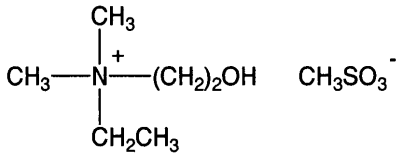
【０１４９】
＜実施例２４＞　化合物２４
【０１５０】
【化２６】



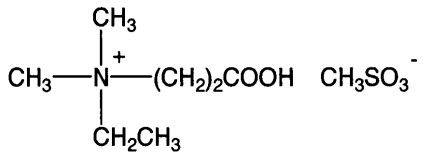
【０１５１】
＜実施例２５＞　化合物２５
【０１５２】
【化２７】



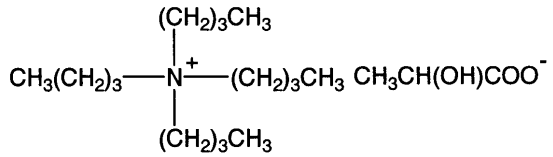
【０１５３】
＜実施例２６＞　化合物２６
【０１５４】
【化２８】



【０１５５】
＜実施例２７＞　化合物２７
【０１５６】
【化２９】



【０１５７】
＜比較例１＞　化合物２８：$Bu_4N^+CH_3CH(OH)COO^-$
【０１５８】
【化３０】



【０１５９】
テトラブチルアンモニウムブロミドをイオン交換水に溶解し、ＯＨ型に置換したイオン交換樹脂（三菱化学（株）製ダイアイオン　ＳＡ１０Ａ）を充填したカラムに通液することによってテトラブチルアンモニウムヒドロキシドを得た。得られたテトラブチルアンモニウムヒドロキシド（８．０５ｇ、０．０３ｍｏｌ）と乳酸（２．７０ｇ、０．０３ｍｍ

ｏｌ）を水中で（１００ｍＬ）、室温下、３時間反応後、水を減圧留去、洗浄することにより化合物２８を得た。下記の室温（－５，－１０℃）での性状、酵素溶解試験、酵素活性保持率の測定では、液状の１４％水溶液に溶解して評価した。

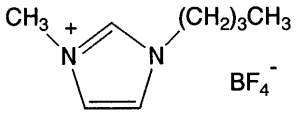
＜比較例２～５＞

化合物２９のイオン液体は和光純薬工業（株）、化合物３０～３２のイオン液体は関東化学（株）の試薬を用いた。

＜比較例２＞　化合物２９：ＢＭＩ－ＢＦ$_4$

【０１６０】

【化３１】

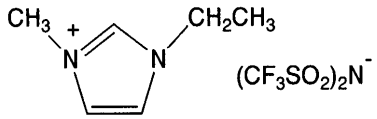


【０１６１】

＜比較例３＞　化合物３０：ＥＭＩ－ＴＦＳＩ

【０１６２】

【化３２】

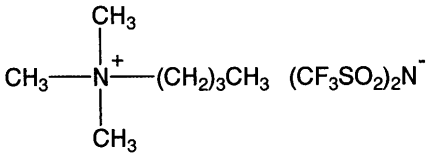


【０１６３】

＜比較例４＞　化合物３１：ＢＴＭＡ－ＴＦＳＩ

【０１６４】

【化３３】

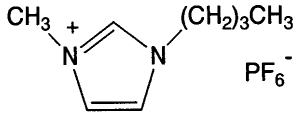


【０１６５】

＜比較例５＞　化合物３２：ＢＭＩ－ＰＦ$_6$

【０１６６】

【化３４】



【０１６７】

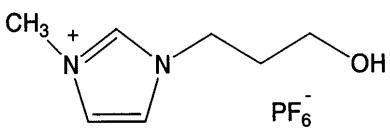
＜比較例６，７＞

化合物３３、３４のイオン液体は特表２００６－５１４８３２号公報に記載の方法に従って合成した。

＜比較例６＞　化合物３３：ＨＯＰＭＩ－ＰＦ$_6$

【０１６８】

【化３５】

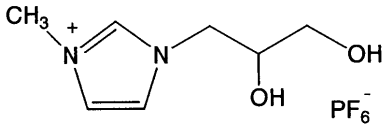


【０１６９】

＜比較例７＞　化合物３４：ＤＨＯＰＭＩ－ＰＦ$_6$

【０１７０】

【化３６】



【０１７１】

＜比較例８＞　化合物３５：グリセリン（１００％）

和光純薬工業（株）の試薬を用いた。

【０１７２】

＜比較例９＞　化合物３６：バッファー

バッファーとして、ウレアーゼ、カタラーゼ保存試験においては、水酸化ナトリウムでｐＨ調製したリン酸二水素カリウムの１０ｍＭ水溶液（リン酸緩衝液：ウレアーゼ：ｐＨ７．５、カタラーゼ：ｐＨ７．０）を用いた。また、ヘキソキナーゼ、アルギン酸リアーゼ保存試験においては、塩酸でｐＨ調製したトリスヒドロキシメチルアミノメタンの水溶液（トリス緩衝液：ヘキソキナーゼ：５０ｍＭ（ｐＨ８．５）、アルギン酸リアーゼ：２００ｍＭ（ｐＨ７．０））を用いた。また、シトクロムＰ４５０保存試験においては、水酸化ナトリウムでｐＨ７．４に調製したリン酸二水素カリウムの１００ｍＭ水溶液を用いた。

＜比較例１０＞　化合物３７：グリセリン水溶液

グリセリン（和光純薬工業（株））を水に溶解して１０ｍｇ／ｍＬに調製した。

＜比較例１１＞　化合物３８：グルコース水溶液

Ｄ（＋）－グルコース（関東化学（株））を水に溶解して１０ｍｇ／ｍＬに調製した。

＜比較例１２＞　化合物３９：ウシ血清アルブミン水溶液

アルブミン（牛由来、一般グレード、ｐＨ５．２：ナカライテスク（株））を水に溶解して１０ｍｇ／ｍＬに調製した。

＜比較例１３＞　化合物４０：リシン水溶液

Ｌ（＋）－リシン（和光純薬工業（株））を水に溶解して１０ｍｇ／ｍＬに調製した。

＜比較例１４＞　化合物４１：リシン、ウシ血清アルブミン水溶液

Ｌ（＋）－リシン（和光純薬工業（株））とアルブミン（牛由来、一般グレード、ｐＨ５．２：ナカライテスク（株））を重量比５４:４６の混合物を水で１０ｍｇ／ｍＬ水溶液に調製した。

＜比較例１５＞　化合物４２：アルギニン水溶液

Ｌ（＋）－アルギニン（和光純薬工業（株））を水に溶解して１０ｍｇ／ｍＬに調製した。

＜比較例１６＞　化合物４３：２０％グリセリン溶液

グリセリン（和光純薬工業（株））をｐＨ７．４に調製したリン酸二水素カリウムの１００ｍＭ水溶液に溶解して、２０％溶液に調製した。

【０１７３】

化合物１～３５のイオン液体の大気中もしくは合成中から起因する含水率は、カールフィッシャー法もしくは示差熱熱重量同時測定装置（ＴＧ／ＤＴＡ）で測定し、化合物１～３４については、水分量を一定にして（１４％±０．５％）、化合物の評価を行った。

【０１７４】

なお、下記に使用する酵素は、各種酵素の代表的な酵素として、それぞれ加水分解酵素のウレアーゼ（ナタ豆由来、和光純薬工業（株））、α－アミラーゼ（枯草菌由来、和光純薬工業（株））、酸化還元酵素のカタラーゼ（ウシ肝臓由来、和光純薬工業（株））、シトクロムＰ４５０（Ｈｕｍａｎ　ＣＹＰ３Ａ４ＬＲ　Ｅａｓｙ　ＣＹＰ　Ｂａｃｔｏｓｏｍｅｓ　日本農産工業（株））、転移酵素のクエン酸シンターゼ（ブタ心臓由来、SIGM

A-ALDRICH）、ヘキソキナーゼ（出芽酵母由来、SIGMA-ALDRICH）、脱離酵素のアルギン酸リアーゼ（フラボバクテリウム由来、SIGMA-ALDRICH）、異性化酵素のホスホグルコースイソメラーゼ、（ウサギ筋由来、SIGMA-ALDRICH）、合成酵素のアセチルＣｏＡシンセターゼを由来、（パン酵母由来、SIGMA-ALDRICH）を選定して用いた。

【０１７５】

上記の実施例、比較例の化合物を用いて、次の測定及び評価を行った。

１．凝固点の測定

化合物１～４２をスクリュー管に添加して、－５℃及び－１０℃に設定した低温恒温器に２４時間放置し、性状（液体、固体）を確認して凝固点を測定した（表１～３）。

【０１７６】

その結果、一般的な酵素の保存水溶液である化合物３６～４２（比較例９～１５）及びグリセリン（比較例８）は、＞－５℃の条件下で凝固したのに対して、化合物１～２７（実施例１～２７）は、－１０℃でも液状で流動性があり、本発明のイオン液体が低温安定性に優れていることをが示された。

２．酵素溶解試験

化合物１～３５（実施例１～２７、比較例１～８）のウレアーゼ、α－アミラーゼ、カタラーゼ、クエン酸シンターゼ、アルギン酸リアーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、アセチルＣｏＡシンセターゼ、ヘキソキナーゼ、シトクロムＰ４５０に対する溶解濃度を測定した。表１～３に示す含水率の化合物１～３５に、室温（２５℃）で各酵素を所定濃度添加し、混合後、溶解を目視にて判別した（表１～３）。

【０１７７】

本発明の生体触媒用溶媒は、ウレアーゼは１５ｍｇ／ｍＬ以上、カタラーゼは２０ｍｇ／ｍＬ以上、アミラーゼは０．５ｍｇ／ｍＬ以上、クエン酸シンターゼは５ｍｇ／ｍＬ以上、アルギン酸リアーゼは１０ｍｇ／ｍＬ以上、ホスホグルコースイソメラーゼ及びアセチルＣｏＡシンセターゼは１．５ｍｇ／ｍＬ以上、ヘキソキナーゼは１０ｍｇ／ｍＬ以上、シトクロムＰ４５０は１．０ｍｇ／ｍＬ以上溶解することができた。

【０１７８】

いずれの酵素に対しても、化合物１～２７（実施例１～２７）は、化合物２９～３４のジアルキルイミダゾリウム系イオン液体、水酸基を持つイミダゾリウム系イオン液体及び化合物２８のテトラアルキルアンモニウム系イオン液体より溶解性が高く、水酸基、カルボキシ基、水素等の水素結合性官能基を持つ第４級アンモニウムカチオンの本イオン液体の構造が酵素に対して高溶解性を示すことが確認された。また、実施例のイオン液体中においても、カチオンが水素結合性官能基とアルキル基からなる化合物２０～２７（実施例２０～２７）より、カチオンの官能基の全てが水素結合性官能基の化合物１～１９の方が、相対的に溶解性が高く、カチオンの水素結合性官能基（水酸基、カルボキシ基、水素）の存在により、酵素の溶解性が高められることが示唆された。

【０１７９】

一方で、同じカチオン内で比較した場合（化合物３⇔化合物４～７、化合物１４⇔化合物１５～１９、化合物２３⇔化合物２４～２６）、アニオンに水素結合性官能基（水酸基、カルボキシ基、エーテル基）があるイオン液体の方が酵素に対する溶解度は高く、アニオンへの水素結合性官能基の導入により溶解度を、更に高めることが可能であることを確認した。

【０１８０】

同じアニオンを持つ化合物２７より化合物２６、例えば、同じカチオンを持つ化合物１２，１３より化合物１０，１１、化合物２１，２２より化合物２０の方が、溶解性が高く、水素結合性官能基の中でも水酸基が酵素に対する溶解度を高める効果が高いことを示した。

【０１８１】

また、いずれの酵素においても、本発明の化合物１～２７は、３つの水酸基をもつ化合物３５のグリセリン（１００％）より、相対的に溶解度が高く、アニオン、カチオンとの

塩構造からなる本発明化合物の酵素分子間における相互作用の抑制効果が示唆された。

【０１８２】

さらに、ウレアーゼに対する無水イオン液体溶解濃度を測定した。

【０１８３】

まずは、表１～３に示す化合物１～３４を減圧脱水により無水物にして、目視で状態を確認した。化合物２２と２８の無水物は２５℃で固体であったのに対して、それ以外の化合物１～２１、２３～２７、２９～３４は、無水物でも液体であった。無水物において液体の化合物１～６，８～１１，１３，１５，１８，２０，２３，２４，２７，２９，３３，３４（実施例１～６，８～１１，１３，１５，１８，２０，２３，２４，２７，比較例２，６，７）に、室温（２５℃）でウレアーゼを所定濃度添加し、混合後、溶解性を目視にて判別した（表１～３）。

【０１８４】

その結果、系中に水が存在しない無水物でも、上記の含水イオン液体のカチオン、アニオンの構造と酵素に対する溶解性の間に同様な傾向を示すことを確認した。つまり、水の存在に関わらず本願イオン液体の構造が、酵素に対する高い溶解性を発現することが示唆された。

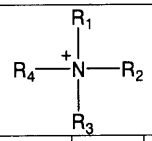
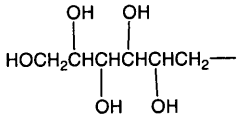
【０１８５】

【表１】

	化合物	R_1	R_2	R_3	R_4	X^-	水分量（wt%）	凝固点（℃）	溶解度（mg/mL） ウレアーゼ	ウレアーゼ（無水IL）	カタラーゼ	アミラーゼ	クエン酸シンターゼ	アルギン酸リアーゼ	ホスホグルコースイソメラーゼ	アセチルCoAシンセターゼ	ヘキソキナーゼ	シトクロムP450
実施例1	1	$(CH_2)_2OH$	H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	13.8	< −10	47.5	35.0	45.0	1.5	8.0	30.0	≧1.5	≧1.5	50.0	≧1.0
実施例2	2	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	13.9	< −10	47.5	35.0	45.0	1.5	8.0	30.0	≧1.5	≧1.5	50.0	≧1.0
実施例3	3	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	H	CH_3COO^-	14.2	< −10	45.0	20.0	40.0	1.0	6.0	20.0	≧1.5	≧1.5	50.0	≧1.0
実施例4	4					$CH_3CH(OH)COO^-$	13.9	< −10	50.0	40.0	50.0	2.0	10.0	30.0	≧1.5	≧1.5	65.0	≧1.0
実施例5	5					$HOOC(CH_2)_2COO^-$	14.1	< −10	50.0	30.0	50.0	1.5	10.0	25.0	≧1.5	≧1.5	50.0	≧1.0
実施例6	6					クエン酸	13.8	< −10	50.0	30.0	45.0	1.5	10.0	20.0	≧1.5	≧1.5	50.0	≧1.0
実施例7	7					$CH_3-O-CH_2COO^-$	14.0	< −10	47.5	—	40.0	1.5	8.0	20.0	≧1.5	≧1.5	50.0	—
実施例8	8	$H-C(CH_2OH)_2$	H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	14.2	< −10	47.5	40.0	45.0	2.0	8.0	25.0	≧1.5	≧1.5	50.0	≧1.0
実施例9	9	$CH_3CH_2-C(CH_2OH)_3$	H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	14.0	< −10	47.5	40.0	45.0	2.0	8.0	25.0	≧1.5	≧1.5	50.0	≧1.0
実施例10	10	$HOCH_2-C(CH_2OH)_3$	H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	14.0	< −10	50.0	40.0	50.0	2.0	10.0	30.0	≧1.5	≧1.5	65.0	≧1.0
実施例11	11					クエン酸	13.8	< −10	50.0	30.0	45.0	1.5	10.0	20.0	≧1.5	≧1.5	50.0	—
実施例12	12					$CH_3-O-CH_2COO^-$	13.9	< −10	47.5	—	40.0	1.5	8.0	20.0	≧1.5	≧1.5	50.0	—
実施例13	13					$CH_3SO_3^-$	14.0	< −10	50.0	20.0	40.0	1.0	5.0	25.0	≧1.5	≧1.5	50.0	≧1.0

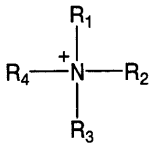
【０１８６】

【表２】

						X^-	水分量 (wt%)	凝固点 (℃)	溶解度(mg/mL)									
	化合物	R_1	R_2	R_3	R_4				ウレアーゼ	ウレアーゼ（無水IL）	カタラーゼ	アミラーゼ	クエン酸シンターゼ	アルギン酸リアーゼ	ホスホグルコースイソメラーゼ	アセチルCoAシンセターゼ	ヘキソキナーゼ	シトクロムP450
実施例14	14		H	H	H	CH_3COO^-	14.3	< −10	45.0	—	35.0	1.0	5.0	20.0	≧1.5	≧1.5	50.0	—
実施例15	15					$CH_3CH(OH)COO^-$	14.1	< −10	50.0	40.0	50.0	2.0	10.0	30.0	≧1.5	≧1.5	60.0	≧1.0
実施例16	16					$HOOC(CH_2)_2COO^-$	14.0	< −10	50.0	—	45.0	1.5	10.0	25.0	≧1.5	≧1.5	50.0	—
実施例17	17					クエン酸	14.0	< −10	50.0	—	47.5	1.5	10.0	20.0	≧1.5	≧1.5	50.0	—
実施例18	18					$CH_3-O-CH_2COO^-$	14.1	< −10	47.5	30.0	42.5	1.5	10.0	25.0	≧1.5	≧1.5	50.0	≧1.0
実施例19	19					$CH_3SO_3^-$	14.3	< −10	50.0	—	40.0	1.0	10.0	25.0	≧1.5	≧1.5	50.0	—
実施例20	20	CH_3	CH_3	CH_3	$(CH_2)_2OH$	$CH_3CH(OH)COO^-$	13.7	< −10	45.0	30.0	42.5	1.0	8.0	20.0	≧1.5	≧1.5	40.0	≧1.0
実施例21	21					$HOOC(CH_2)_2COO^-$	13.8	< −10	45.0	—	40.0	1.0	8.0	20.0	≧1.5	≧1.5	10.0	
実施例22	22					$H_2PO_4^-$	14.0	< −10	30.0	—	20.0	0.5	5.0	10.0	≧1.5	≧1.5	10.0	≧1.0
実施例23	23	CH_3	CH_3	CH_3CH_2	$(CH_2)_2OH$	CH_3COO^-	13.9	< −10	30.0	15.0	20.0	1.0	5.0	15.0	≧1.5	≧1.5	40.0	—
実施例24	24					$CH_3CH(OH)COO^-$	13.7	< −10	42.5	30.0	40.0	1.0	8.0	20.0	≧1.5	≧1.5	40.0	≧1.0
実施例25	25					酒石酸	13.9	< −10	50.0	—	45.0	1.0	8.0	20.0	≧1.5	≧1.5	10.0	—
実施例26	26					$CH_3SO_3^-$	14.3	< −10	45.0	—	40.0	1.0	8.0	20.0	≧1.5	≧1.5	10.0	—
実施例27	27	CH_3	CH_3	CH_3CH_2	$(CH_2)_2COOH$	$CH_3SO_3^-$	13.8	< −10	30.0	15.0	20.0	0.5	5.0	15.0	≧1.5	≧1.5	10.0	—

【０１８７】

【表３】

						X^-	水分量（wt%）	凝固点（℃）	溶解度（mg/mL）									
	化合物	R_1	R_2	R_3	R_4				ウレアーゼ	ウレアーゼ（無水IL）	カタラーゼ	アミラーゼ	クエン酸シンターゼ	アルギン酸リアーゼ	ホスホグルコースイソメラーゼ	アセチルCoAシンセターゼ	ヘキソキナーゼ	シトクロムP450
比較例1	28	Bu_4N^+	$CH_3CH(OH)COO^-$				14.0	＞25	1.0	—	＜0.1	＜0.1	＜0.1	1.0	＜0.1	＜0.1	＜0.1	＜1.0
比較例2	29	BMI-BF_4					14.0	＜−10	1.0	1.0	＜0.1	＜0.1	＜0.1	1.0	＜0.1	＜0.1	＜0.1	＜1.0
比較例3	30	EMI-TFSI					＜0.1	＜−10	1.0	—	＜0.1	＜0.1	＜0.1	1.0	＜0.1	＜0.1	＜0.1	—
比較例4	31	BTMA-TFSI					＜0.1	＜−10	1.0	—	＜0.1	＜0.1	＜0.1	1.0	＜0.1	＜0.1	＜0.1	—
比較例5	32	BMI-PF_6					＜0.1	＜−10	1.0	—	＜0.1	＜0.1	＜0.1	1.0	＜0.1	＜0.1	＜0.1	—
比較例6	33	HOPMI-PF_6					13.8	＜−10	15.0	10.0	10.0	0.1	1.0	2.5	1.0	1.0	1.0	＜1.0
比較例7	34	DHOPMI-PF_6					13.7	＜−10	15.0	10.0	10.0	0.1	1.0	5.0	1.0	1.0	1.0	＜1.0
比較例8	35	グリセリン(100%)					＜0.1	＞−5	10.0	—	20.0	0.5	5.0	5.0	1.0	1.0	1.0	＜1.0
比較例9	36	バッファー					—	＞−5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
比較例10	37	グリセリン水溶液					—	＞−5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
比較例11	38	グルコース水溶液					—	＞−5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
比較例12	39	ウシ血清アルブミン水溶液					—	＞−5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
比較例13	40	リシン水溶液					—	＞−5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
比較例14	41	リシン、ウシ血清アルブミン水溶液					—	＞−5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
比較例15	42	アルギニン水溶液					—	＞−5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

【０１８８】

３．酵素活性保持率の測定

表４～３２中の化合物に、それぞれウレアーゼ、カタラーゼ、α－アミラーゼ、クエン

酸シンターゼ、ヘキソキナーゼ、アルギン酸リアーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、アセチルＣｏＡシンセターゼを、表４～３１記載の酵素濃度で溶解して、一般的に、酵素を溶解、活性を保持する温度より高い２５℃及び、更に高温条件、また安定性の促進試験として４０℃の条件に設定した恒温器に放置した。また、安定性の特に低いシトクロムＰ４５０は、表３２記載の酵素濃度で溶解して、一般的にシトクロムＰ４５０の活性を保持する温度より高い３℃の条件に設定した恒温器に放置した。

【０１８９】

尚、設定濃度については、化合物１～３４はそれぞれの化合物の各酵素に対する最大溶解度に設定した。また、比較例の化合物３５～４２は、化合物１～２７（実施例１～２７）の各酵素に対する最大溶解度のうち、最も低い値に設定し、比較的温和な条件とした。所定期間、放置した後、各サンプルを採取して、下記方法を用いて、それぞれの化合物に溶解した酵素の活性保持率を測定して、各化合物の酵素における立体構造の保持性、安定化効果を確認した。

＜加水分解酵素：ウレアーゼの活性測定：表４～９＞

ウレアーゼの活性は、ウレアーゼの酵素反応によって、尿素から分解生成するアンモニウムイオンをインドフェノール法によって定量して測定した。

【０１９０】

まず、三角フラスコに１ｍＭの基質溶液（ｐＨ７．５の１０ｍＭリン酸緩衝液に基質となる尿素を溶解して調製）を１００ｍＬ取り、３０℃で約３０分間予備加温した。

【０１９１】

次に、表４～９中に記載の設定濃度及び温度で、所定期間放置したサンプル（化合物１～６，８～１１，１３，１５，１８，２０，２２～２４，２７～２９，３３～４２）を、酵素量が０．５ｍｇとなるように上記の基質溶液に加え、３０℃で６０分間反応させた。

【０１９２】

反応後、反応溶液を０．１ｍＬ採取し、直ちにフェノール溶液（イオン交換水にフェノール１０ｇとペンタシアノニトロシル鉄(III)酸ナトリウム５０ｍｇを溶解した後、イオン交換水で１０００ｍＬにメスアップして調製）２ｍＬと、次亜塩素酸ナトリウム溶液（イオン交換水に水酸化ナトリウム５ｇと５％の次亜塩素酸ナトリウム溶液８．４ｍＬを溶解した後、イオン交換水で１０００ｍＬにメスアップして調製）２ｍＬを加え、３７℃の恒温槽中で２０分間反応させた。

【０１９３】

この反応液の波長６３５ｎｍの吸光度（Ｖ－５５０：日本分光（株））を測定して得られたインドフェノール量からアンモニウムイオンの生成量を求めて、ウレアーゼ活性を算出した。アンモニウムイオンの定量は、０．１～３．０ｍＭの濃度範囲でアンモニウムイオン溶液を調製して、上記と同様にインドフェノール法で定量して得られた検量線を用いた。

【０１９４】

なお、酵素活性保持率の基準となる酵素活性の値は、次のように算出した。適正温度で保存したウレアーゼ粉末をバッファー（ｐＨ７．５の１０ｍＭリン酸緩衝液）に溶解して酵素濃度５０ｍｇ／ｍＬの酵素溶液を調製した。調製後、直ちにその溶液を、上記と同様に、酵素量が０．５ｍｇとなるように基質溶液に加え、酵素反応を行った後、インドフェノール法で定量したアンモニウムイオン量を基準として、酵素活性保持率を算出した。

【０１９５】

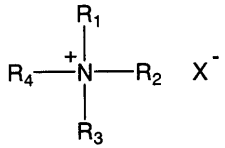
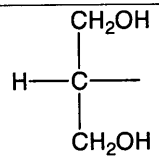
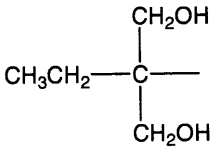
その結果を表４～９に示す。

【０１９６】

【表４】

【０１９７】

ウレアーゼ:25℃

	化合物	生体触媒用溶媒					水溶液濃度	酵素濃度(mg/mL)	酵素活性保持率(%)							
									保存期間							
		R_1	R_2	R_3	R_4	X^-			1日後	7日後	14日後	21日後	30日後	60日後	90日後	180日後
実施例1	1	$(CH_2)_2OH$	H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	47.5	99	98	97	93	93	83	83	25
実施例2	2	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	47.5	96	96	96	95	95	82	82	26
実施例3	3	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	H	CH_3COO^-	—	45	97	96	95	95	93	93	93	29
実施例4	4					$CH_3CH(OH)COO^-$	—	50	98	99	98	97	95	96	90	25
実施例5	5					$HOOC(CH_2)_2COO^-$	—	50	99	98	98	97	94	84	84	25
実施例6	6					クエン酸	—	50	99	97	95	97	93	82	82	30
実施例8	8		H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	47.5	96	96	96	96	95	83	83	27
実施例9	9		H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	47.5	98	98	98	95	93	82	82	25

【表5】

【0198】

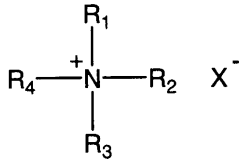
ウレアーゼ:25℃

	化合物	生体触媒用溶媒					水溶液濃度	酵素濃度(mg/mL)	酵素活性保持率(%)							
		$R_4-\overset{R_1}{\underset{R_3}{\overset{+}{N}}}-R_2$ X^-							保存期間							
		R_1	R_2	R_3	R_4	X^-			1日後	7日後	14日後	21日後	30日後	60日後	90日後	180日後
実施例10	10	$HOCH_2-C(CH_2OH)_2$	H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	50	98	100	98	96	94	93	90	27
実施例11	11					クエン酸	—	50	97	97	96	94	92	86	80	25
実施例13	13					$CH_3SO_3^-$	—	50	98	97	95	95	93	84	84	25
実施例15	15	$HOCH_2CH(OH)CH(OH)CH(OH)CH(OH)CH_2-$	H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	50	98	100	98	96	97	95	89	53
実施例18	18					$CH_3-O-CH_2COO^-$	—	47.5	99	99	96	96	94	88	88	31
実施例20	20	CH_3	CH_3	CH_3	$(CH_2)_2OH$	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	45	99	98	97	95	95	90	80	26
実施例22	22					$H_2PO_4^-$	—	30	97	98	97	96	93	91	86	25
実施例23	23	CH_3	CH_3	CH_3CH_2	$(CH_2)_2OH$	CH_3COO^-	—	30	99	96	95	95	95	90	90	28
実施例24	24					$CH_3CH(OH)COO^-$	—	42.5	97	95	94	94	91	88	88	27
実施例27	27	CH_3	CH_3	CH_3CH_2	$(CH_2)_2COOH$	$CH_3SO_3^-$	—	30	100	98	93	90	90	45	40	7

【表６】

【０１９９】

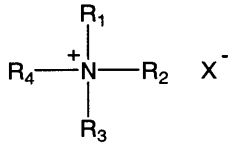
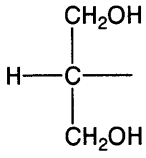
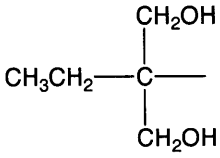
ウレアーゼ:25℃

	化合物	生体触媒用溶媒					水溶液濃度	酵素濃度 (mg/mL)	酵素活性保持率(%)							
									保存期間							
		R_1	R_2	R_3	R_4	X^-			1日後	7日後	14日後	21日後	30日後	60日後	90日後	180日後
比較例1	28	Bu_4N^+		$CH_3CH(OH)COO^-$			—	1	—	—	11	2	0	0	0	0
比較例2	29	BMI-BF_4					—	1	—	—	12	5	0	0	0	0
比較例6	33	HOPMI-PF_6					—	15	80	72	60	8	0	0	0	0
比較例7	34	DHOPMI-PF_6					—	15	85	78	60	22	0	0	0	0
比較例8	35	グリセリン					100%	30	100	88	80	19	18	0	0	0
比較例9	36	バッファー					10mM	30	100	96	93	91	88	0	0	0
比較例10	37	グリセリン水溶液					10mg/mL	30	100	97	90	87	79	0	0	0
比較例11	38	グルコース水溶液					10mg/mL	30	100	95	90	86	75	0	0	0
比較例12	39	ウシ血清アルブミン水溶液					10mg/mL	30	100	99	93	89	81	0	0	0
比較例13	40	リシン水溶液					10mg/mL	30	100	87	90	60	10	0	0	0
比較例14	41	リシン、ウシ血清アルブミン水溶液					10mg/mL	30	100	85	93	89	60	0	0	0
比較例15	42	アルギニン水溶液					10mg/mL	30	99	97	94	85	65	0	0	0

【表７】

【０２００】

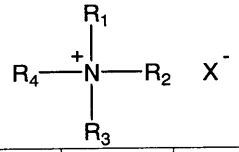
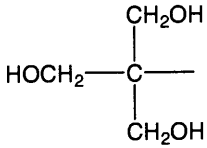
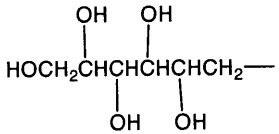
ウレアーゼ：40℃

	化合物	生体触媒用溶媒					水溶液濃度	酵素濃度 (mg/mL)	酵素活性保持率(%)						
									保存期間						
		R_1	R_2	R_3	R_4	X^-			1日後	7日後	14日後	21日後	30日後	60日後	90日後
実施例1	1	$(CH_2)_2OH$	H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	47.5	95	92	84	72	67	61	20
実施例2	2	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	47.5	92	90	82	73	68	61	16
実施例3	3	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	H	CH_3COO^-	—	45	97	91	81	75	72	65	18
実施例4	4					$CH_3CH(OH)COO^-$	—	50	93	91	80	76	75	65	24
実施例5	5					$HOOC(CH_2)_2COO^-$	—	50	97	92	81	75	70	61	20
実施例6	6					クエン酸	—	50	94	90	78	73	71	61	18
実施例8	8		H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	47.5	94	93	82	74	71	63	14
実施例9	9		H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	47.5	96	93	80	76	72	60	17

【表８】

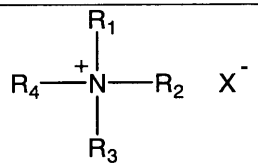
【０２０１】

ウレアーゼ：40℃

	化合物	生体触媒用溶媒					水溶液濃度	酵素濃度（mg/mL）	酵素活性保持率（%）						
									保存期間						
		R_1	R_2	R_3	R_4	X^-			1日後	7日後	14日後	21日後	30日後	60日後	90日後
実施例10	10		H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	50	96	84	80	76	75	68	20
実施例11	11					クエン酸	—	50	93	91	86	75	68	65	20
実施例13	13					$CH_3SO_3^-$	—	50	93	91	81	76	71	65	16
実施例15	15		H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	50	94	91	79	77	75	68	22
実施例18	18					$CH_3-O-CH_2COO^-$	—	47.5	97	91	83	74	71	66	19
実施例20	20	CH_3	CH_3	CH_3	$(CH_2)_2OH$	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	45	95	91	82	75	75	68	22
実施例22	22					$H_2PO_4^-$	—	30	95	90	74	68	64	62	19
実施例23	23	CH_3	CH_3	CH_3CH_2	$(CH_2)_2OH$	CH_3COO^-	—	30	94	90	81	76	70	64	14
実施例24	24					$CH_3CH(OH)COO^-$	—	42.5	93	92	78	70	65	61	13
実施例27	27	CH_3	CH_3	CH_3CH_2	$(CH_2)_2COOH$	$CH_3SO_3^-$	—	30	95	89	77	65	64	40	15

【表９】

ウレアーゼ:40℃

	化合物	生体触媒用溶媒					水溶液濃度	酵素濃度 (mg/mL)	酵素活性保持率(%)						
									保存期間						
		R_1	R_2	R_3	R_4	X^-			1日後	7日後	14日後	21日後	30日後	60日後	90日後
比較例1	28	Bu_4N^+ $CH_3CH(OH)COO^-$					—	1	—	—	11	0	0	0	0
比較例2	29	BMI-BF_4					—	1	—	—	12	0	0	0	0
比較例6	33	HOPMI-PF_6					—	15	55	30	18	5	0	0	0
比較例7	34	DHOPMI-PF_6					—	15	58	31	22	6	0	0	0
比較例8	35	グリセリン					100%	30	90	80	16	10	5	0	0
比較例9	36	バッファー					10mM	30	90	74	20	0	0	0	0
比較例10	37	グリセリン水溶液					10mg/mL	30	91	87	68	40	0	0	0
比較例11	38	グルコース水溶液					10mg/mL	30	94	90	68	40	0	0	0
比較例12	39	ウシ血清アルブミン水溶液					10mg/mL	30	90	87	67	50	30	0	0
比較例13	40	リシン水溶液					10mg/mL	30	92	92	15	0	0	0	0
比較例14	41	リシン、ウシ血清アルブミン水溶液					10mg/mL	30	90	87	40	0	0	0	0
比較例15	42	アルギニン水溶液					10mg/mL	30	96	92	28	19	0	—	—

【０２０２】

４０℃の条件の結果（表７～９）では、イミダゾリウム系イオン液体、テトラアルキルアンモニウム系イオン液体及び一般的な添加剤水溶液（化合物２８，２９，３３～４２）は、酵素濃度（１～３０ｍｇ／ｍＬ）が低いにも関わらず、３０日後には０～３０％、９０日後には０％の活性保持率に低下したのに対して、本発明の化合物１～６，８～１１，１

３，１５，１８，２０，２２～２４，２７（実施例１～６，８～１１，１３，１５，１８，２０，２２～２４，２７）は、高濃度条件下（３０～５０ｍｇ／ｍＬ）、３０日後には６４％以上、９０日後には１３％以上の活性保持率を示した。また、２５℃の条件（表４～６）では、３０日後、低濃度条件（１～３０ｍｇ／ｍＬ）の比較例１～２，６～１５の化合物２８，２９，３３～４２の活性保持率が０～８８％、９０日後には０％に対して、本発明の化合物は、高濃度条件下（３０～５０ｍｇ／ｍＬ）の３０日後において９０％以上、９０日後には４０％以上、１８０日後には７％以上の活性保持率を示した。つまり、高濃度、高温、長期間の条件下において、本発明の生体触媒用溶媒は酵素の活性を保持し、酵素の立体構造の高い保持性を有することが示唆された。

【０２０３】

また、本発明のイオン液体は、保存開始３０日後、２５℃で９０％以上、４０℃で６４％以上の活性を保持していたのに対して、水酸基を持つイミダゾリウム系イオン液体（化合物３３，３４）は、３０日後の活性保持率は２５℃、４０℃とも０％に低下した。つまり、カチオンがイミダゾリム系の場合、水酸基を有していても、カチオンの分子構造が環状構造で剛直なため、酵素内部のアミノ酸残基の立体構造の保持性が低いのに対して本発明の生体触媒用溶媒は、カチオンの分子サイズが小さく、柔軟な構造の４級アンモニウム系化合物であるため、酵素内部までアミノ酸残基を保護することができ、酵素の立体構造の高い保持性を有することが示唆された。

＜酸化還元酵素：カタラーゼの活性測定：表１０～１５＞

カタラーゼは過酸化水素を酸素と水素に分解する酵素である。その活性は、カタラーゼの反応基質である過酸化水素量を定量して測定した。

【０２０４】

まず、三角フラスコに１６ｍＭの基質溶液（ｐＨ７．０の１０ｍＭリン酸緩衝液に基質となる過酸化水素を溶解して調製）を１００ｍＬ取り、２５℃で約３０分間予備加温した。

【０２０５】

次に、表１０～１５中に記載の設定濃度及び温度で、所定期間放置したサンプル（化合物１～６，８～１１，１３，１５，１８，２０，２２～２４，２７，３３～４１）を、酵素量が０．５ｍｇとなるように上記の基質溶液に加え、２５℃で３０分間反応させた。

【０２０６】

反応後、チタン溶液（１ｇの酸化チタンと１０ｇの硫酸カリウムを１５０ｍＬの濃硫酸に溶解し、１８０～２２０℃で２～３時間加温した後、イオン交換水で１．５Ｌにメスアップして調製）２．５ｍＬを加えて反応を停止させた。この反応停止した溶液の４１０ｎｍの吸光度を測定し、過酸化水素量を定量して、カタラーゼ活性を算出した。過酸化水素量は１～１６ｍＭの濃度範囲の過酸化水素溶液（ｐＨ７．０の１０ｍＭリン酸緩衝液に過酸化水素を溶解し、所定の濃度となるように調製）から作成した検量線を用いて算出した。

【０２０７】

なお、酵素活性保持率の基準となる酵素活性の値は、次のように算出した。適正温度で保存したカタラーゼ粉末をバッファー（ｐＨ７．０の１０ｍＭリン酸緩衝液）に溶解して酵素濃度５０ｍｇ／ｍＬの酵素溶液を調製した。調製後、直ちにその溶液を、上記と同様に、酵素量が０．５ｍｇとなるように基質溶液に加え、酵素反応を行った後、上記と同様の方法で算出した過酸化水素量を基準として、酵素活性保持率を算出した。

【０２０８】

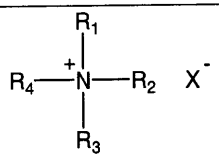
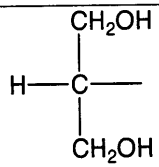
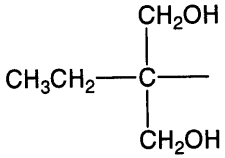
その結果を表１０～１５に示す。

【０２０９】

【表１０】

【０２１０】

カタラーゼ:25℃

	化合物	生体触媒用溶媒					水溶液濃度	酵素濃度 (mg/mL)	酵素活性保持率(%)						
									保存期間						
		R_1	R_2	R_3	R_4	X^-			1日後	7日後	14日後	21日後	30日後	60日後	90日後
実施例1	1	$(CH_2)_2OH$	H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	45	100	100	100	100	98	98	89
実施例2	2	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	45	100	100	100	100	98	92	85
実施例3	3	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	H	CH_3COO^-	—	40	100	100	100	100	98	98	94
実施例4	4					$CH_3CH(OH)COO^-$	—	50	100	100	100	100	100	92	85
実施例5	5					$HOOC(CH_2)_2COO^-$	—	50	100	100	100	100	91	90	80
実施例6	6					クエン酸	—	45	100	100	100	100	91	99	90
実施例8	8		H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	45	100	100	100	100	97	99	90
実施例9	9		H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	45	100	100	100	100	99	98	85

【表11】

【0211】

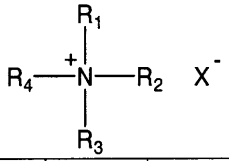
カタラーゼ:25℃

	化合物	生体触媒用溶媒					水溶液濃度	酵素濃度(mg/mL)	酵素活性保持率(%)						
		R_1	R_2	R_3	R_4	X^-			保存期間						
									1日後	7日後	14日後	21日後	30日後	60日後	90日後
実施例10	10	$HOCH_2-C(CH_2OH)_2-$	H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	50	100	100	100	100	100	97	90
実施例11	11					クエン酸	—	45	100	100	100	100	94	94	80
実施例13	13					$CH_3SO_3^-$	—	40	100	100	100	100	98	93	75
実施例15	15	$HOCH_2CH(OH)CH(OH)CH(OH)CH_2-$	H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	50	100	100	100	100	100	95	88
実施例18	18					$CH_3-O-CH_2COO^-$	—	42.5	100	100	100	100	98	99	89
実施例20	20	CH_3	CH_3	CH_3	$(CH_2)_2OH$	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	42.5	100	100	100	100	100	99	80
実施例22	22					$H_2PO_4^-$	—	20	100	100	100	100	96	96	90
実施例23	23	CH_3	CH_3	CH_3CH_2	$(CH_2)_2OH$	CH_3COO^-	—	20	100	100	100	100	98	92	82
実施例24	24					$CH_3CH(OH)COO^-$	—	40	100	100	100	100	98	91	82
実施例27	27	CH_3	CH_3	CH_3CH_2	$(CH_2)_2COOH$	$CH_3SO_3^-$	—	30	100	100	100	98	91	90	78

【表１２】

【０２１２】

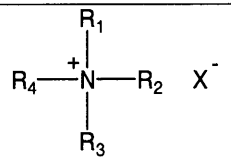
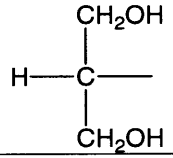
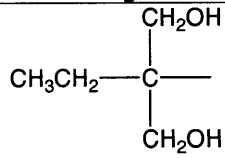
カタラーゼ：25℃

	化合物	生体触媒用溶媒					水溶液濃度	酵素濃度（mg/mL）	酵素活性保持率（%）						
									保存期間						
		R_1	R_2	R_3	R_4	X^-			1日後	7日後	14日後	21日後	30日後	60日後	90日後
比較例6	33	HOPMI-PF_6					—	10	100	100	93	92	88	78	66
比較例7	34	DHOPMI-PF_6					—	10	100	100	95	95	88	79	67
比較例8	35	グリセリン					100%	20	89	71	5	0	0	0	0
比較例9	36	バッファー					10mM	20	100	94	94	94	87	90	0
比較例10	37	グリセリン水溶液					10mg/mL	20	100	100	95	95	79	79	0
比較例11	38	グルコース水溶液					10mg/mL	20	100	100	94	92	88	90	0
比較例12	39	ウシ血清アルブミン水溶液					10mg/mL	20	100	100	97	95	89	88	0
比較例13	40	リシン水溶液					10mg/mL	20	100	100	97	90	87	87	0
比較例14	41	リシン、ウシ血清アルブミン水溶液					10mg/mL	20	100	100	95	90	87	89	0

【表13】

【0213】

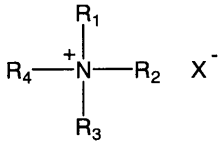
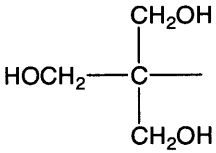
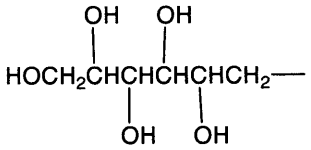
カタラーゼ:40℃

	化合物	生体触媒用溶媒					水溶液濃度	酵素濃度(mg/mL)	酵素活性保持率(%)						
									保存期間						
		R_1	R_2	R_3	R_4	X^-			1日後	7日後	14日後	21日後	30日後	60日後	90日後
実施例1	1	$(CH_2)_2OH$	H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	45	100	100	95	95	95	93	50
実施例2	2	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	45	100	100	99	96	96	96	57
実施例3	3	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	H	CH_3COO^-	—	40	100	100	97	97	97	90	38
実施例4	4					$CH_3CH(OH)COO^-$	—	50	100	100	100	95	93	88	40
実施例5	5					$HOOC(CH_2)_2COO^-$	—	50	100	100	97	95	90	80	59
実施例6	6					クエン酸	—	45	100	100	99	96	96	94	55
実施例8	8		H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	45	100	100	99	96	95	85	52
実施例9	9		H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	45	100	100	99	96	95	90	55

【表１４】

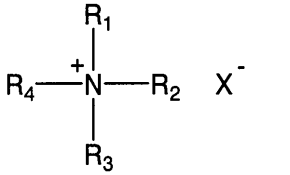
【０２１４】

カタラーゼ：40℃

	化合物	生体触媒用溶媒					水溶液濃度	酵素濃度 (mg/mL)	酵素活性保持率（%）						
									保存期間						
		R_1	R_2	R_3	R_4	X^-			1日後	7日後	14日後	21日後	30日後	60日後	90日後
実施例10	10		H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	50	100	100	100	96	95	95	48
実施例11	11					クエン酸	—	45	100	100	99	95	94	90	34
実施例13	13					$CH_3SO_3^-$	—	40	100	100	99	96	96	91	40
実施例15	15		H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	50	100	100	100	97	96	96	48
実施例18	18					$CH_3-O-CH_2COO^-$	—	42.5	100	100	99	99	99	98	49
実施例20	20	CH_3	CH_3	CH_3	$(CH_2)_2OH$	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	42.5	100	100	100	98	96	86	40
実施例22	22					$H_2PO_4^-$	—	20	100	100	96	96	93	88	30
実施例23	23	CH_3	CH_3	CH_3CH_2	$(CH_2)_2OH$	CH_3COO^-	—	20	100	100	95	95	94	90	35
実施例24	24					$CH_3CH(OH)COO^-$	—	40	100	100	99	98	95	90	40
実施例27	27	CH_3	CH_3	CH_3CH_2	$(CH_2)_2COOH$	$CH_3SO_3^-$	—	30	100	100	99	95	90	80	30

【表１５】

カタラーゼ：40℃

	化合物	生体触媒用溶媒					水溶液濃度	酵素濃度（mg/mL）	酵素活性保持率（%）						
									保存期間						
		R_1	R_2	R_3	R_4	X^-			1日後	7日後	14日後	21日後	30日後	60日後	90日後
比較例6	33	HOPMI-PF_6					—	10	100	100	92	90	80	60	24
比較例7	34	DHOPMI-PF_6					—	10	100	100	92	90	81	69	28
比較例8	35	グリセリン					100%	20	74	60	8	0	0	0	0
比較例9	36	バッファー					10mM	20	100	94	92	92	88	90	0
比較例10	37	グリセリン水溶液					10mg/mL	20	100	100	95	94	53	0	0
比較例11	38	グルコース水溶液					10mg/mL	20	100	100	95	10	0	0	0
比較例12	39	ウシ血清アルブミン水溶液					10mg/mL	20	100	100	94	93	87	84	0
比較例13	40	リシン水溶液					10mg/mL	20	100	60	6	6	5	0	0
比較例14	41	リシン、ウシ血清アルブミン水溶液					10mg/mL	20	100	93	24	9	3	0	0

【０２１５】

３０日後、本発明のイオン液体（化合物１～６，８～１１，１３，１５，１８，２０，２２～２４，２７）は、２５℃の条件（表１０～１２）で９１％以上、４０℃の条件（表１３～１５）で９０％以上の触媒活性を保持したのに対して、比較例６～１４（化合物３３～４１）は、２５℃で０～８９％、４０℃の条件で０～８８％となった。さらに、９０

日後、本発明のイオン液体は、２５℃の条件で７５％以上、４０℃の条件で３０％以上の触媒活性を保持したのに対して、比較例は、２５℃で０～６７％、４０℃の条件で０～２８％となり、本発明のイオン液体の優位性が示された。

【０２１６】

ウレアーゼ（表４～９）及びカタラーゼ（表１０～１５）に対して、例えば、分子中に２つ水酸基を持つ本発明のイオン液体（化合物２０，２４）と比較して、分子中に３つの水酸基を持つグリセリン１００％のサンプル（化合物３５）は、酵素活性保持率が低い傾向が認られた。つまり、酵素の立体構造を保持して、活性を維持するためには水酸基だけではなく、カチオン、アニオンから構成される塩構造も寄与することが示唆された。

＜加水分解酵素：アミラーゼの活性測定：表１６，１７＞

アミラーゼはデンプン中のアミロースやアミロペクチンを、単糖類であるブドウ糖や二糖類であるマルトースおよびオリゴ糖に変換する酵素である。その活性は、アミラーゼの反応基質であるでんぷんを定量して測定した。

【０２１７】

まず、三角フラスコに０．３％でんぷん溶液２５ｍＬと、０．５Ｍ酢酸ナトリウム緩衝液１０ｍＬと、イオン交換水１２．５ｍＬを加え、基質溶液を調製した。そして、この基質溶液を３７℃で約３０分間予備加温した。

【０２１８】

次に、表１６，１７中に記載の設定濃度及び温度で、所定期間放置したサンプル（化合物３～６，１０，１１，１３，１８，２２，２３，２７）を、酵素量が０．５ｍｇとなるように上記の基質溶液に加え、３７℃で３０分間反応させた。

【０２１９】

反応後、１Ｎの塩酸６ｍＬを加えて反応を停止させた。そして、０．５ｍＬのヨウ素溶液（１２０ｍｇのヨウ化カリウムと１２ｍｇヨウ素を１０ｍＬのイオン交換水に溶解して調製）を加えて、この溶液の７００ｎｍの吸光度を測定し、でんぷん量を定量して、アミラーゼ活性を算出した。でんぷん量は０．１～０．３％の濃度範囲のでんぷん溶液から作成した検量線を用いて算出した。

【０２２０】

なお、酵素活性保持率の基準となる酵素活性の値は、次のように算出した。適正温度で保存したアミラーゼ粉末をバッファー（ｐＨ６．５の１０ｍＭリン酸緩衝液）に溶解して酵素濃度０．５ｍｇ／ｍＬの酵素溶液を調製した。調製後、直ちにその溶液を、上記と同様に、酵素量が０．５ｍｇとなるように基質溶液に加え、酵素反応を行った後、上記と同様の方法で算出したでんぷん量を基準として、酵素活性保持率を算出した。

【０２２１】

その結果を表１６，１７に示す。

【０２２２】

【表１６】

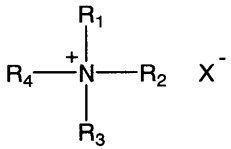
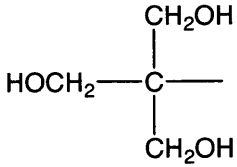
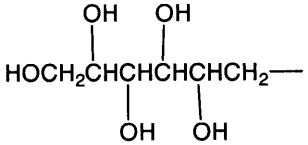
【０２２３】

アミラーゼ：25℃

	化合物	生体触媒用溶媒					水溶液濃度	酵素濃度(mg/mL)	酵素活性保持率(%) 保存期間			
		R_1	R_2	R_3	R_4	X^-			1日後	7日後	14日後	21日後
実施例3	3	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	H	CH_3COO^-	—	1.0	99	99	99	98
実施例4	4					$CH_3CH(OH)COO^-$	—	2.0	99	99	99	98
実施例5	5					$HOOC(CH_2)_2COO^-$	—	1.5	98	90	60	50
実施例6	6					クエン酸	—	1.5	99	95	65	54
実施例10	10	$HOCH_2-C(CH_2OH)_2-$	H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	2.0	95	93	90	58
実施例11	11					クエン酸	—	1.5	98	91	62	50
実施例13	13					$CH_3SO_3^-$	—	1.0	99	92	61	57
実施例18	18	$HOCH_2CH(OH)CH(OH)CH(OH)CH_2-$	H	H	H	$CH_3-O-CH_2COO^-$	—	1.5	99	95	68	60
実施例22	22	CH_3	CH_3	CH_3	$(CH_2)_2OH$	$H_2PO_4^-$	—	0.5	95	98	59	50
実施例23	23	CH_3	CH_3	CH_3CH_2	$(CH_2)_2OH$	CH_3COO^-	—	1.0	98	99	99	98
実施例27	27	CH_3	CH_3	CH_3CH_2	$(CH_2)_2COOH$	$CH_3SO_3^-$	—	0.5	95	98	56	45

【表１７】

アミラーゼ：40℃

	化合物	生体触媒用溶媒					水溶液濃度	酵素濃度(mg/mL)	酵素活性保持率(%)			
									保存期間			
		R_1	R_2	R_3	R_4	X^-			1日後	7日後	14日後	21日後
実施例3	3	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	H	CH_3COO^-	—	1.0	98	95	69	41
実施例4	4					$CH_3CH(OH)COO^-$	—	2.0	99	97	69	35
実施例5	5					$HOOC(CH_2)_2COO^-$	—	1.5	98	90	40	21
実施例6	6					クエン酸	—	1.5	98	91	47	18
実施例10	10		H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	2.0	95	96	70	38
実施例11	11					クエン酸	—	1.5	97	89	42	16
実施例13	13					$CH_3SO_3^-$	—	1.0	97	90	41	18
実施例18	18		H	H	H	$CH_3-O-CH_2COO^-$	—	1.5	98	92	48	21
実施例22	22	CH_3	CH_3	CH_3	$(CH_2)_2OH$	$H_2PO_4^-$	—	0.5	95	90	35	15
実施例23	23	CH_3	CH_3	CH_3CH_2	$(CH_2)_2OH$	CH_3COO^-	—	1.0	96	95	65	33
実施例27	27	CH_3	CH_3	CH_3CH_2	$(CH_2)_2COOH$	$CH_3SO_3^-$	—	0.5	96	95	49	18

【０２２４】

２１日後、本発明のイオン液体（化合物３～６，１０，１１，１３，１８，２２，２３，２７）は、２５℃の条件（表１６）で４５％以上、４０℃の条件（表１７）で１５％以上の触媒活性を保持した。

＜転移酵素：クエン酸シンターゼの活性測定：表１８，１９＞

クエン酸シンターゼはオキサロ酢酸＋アセチル補酵素Ａ＋Ｈ２Ｏ → クエン酸＋補酵素Ａ＋Ｈ＋の反応に寄与する酵素である。その活性は、反応によって生成する補酵素Ａを、ＤＴＮＢ（５，５'－ジチオビス－２－ニトロ安息香酸）と反応して得られる生成物を定量して測定した。

【０２２５】

まず、１０ｍＬのスクリュー管に０．２ｍＭオキサロ酢酸溶液（塩酸でｐＨ８．０に調製したトリスヒドロキシメチルアミノメタンの５０ｍＭ水溶液（トリス緩衝液）にオキサロ酢酸を溶解して調製）５０μＬ、０．２ｍＭアセチル補酵素Ａ溶液（イオン交換水にアセチル補酵素Ａを溶解して調製）３０μＬ、０．１ｍＭＤＴＮＤ溶液（ＤＴＮＤを０．１ｍＭとなるようにｐＨ８．０に調製した１Ｍトリス緩衝液で希釈して調製）１００μＬ、イオン交換水７７０μＬを加え、基質溶液を調製した。そして、この基質溶液を２５℃で約３０分間予備加温した。

【０２２６】

次に、表１８，１９中に記載の設定濃度及び温度で、所定期間放置したサンプル（化合物３～６，１０，１１，１３，１８，２２，２３，２７）を、酵素量が０．１ｍｇとなるように上記の基質溶液に加え、２５℃で３分間反応させた。

【０２２７】

反応後、ブランクとなる基質溶液と、反応溶液の４１２ｎｍの吸光度を測定し、補酵素ＡとＤＴＮＢから生じる生成物を下記式により定量した。

【０２２８】

濃度（Ｍ）＝（反応溶液の吸光度－ブランクの吸光度）／１３６００※

※モル吸光係数１３６００ Ｌ/（Ｍ・ｃｍ）

なお、酵素活性保持率の基準となる酵素活性の値は、次のように算出した。適正温度で保存したクエン酸シンターゼをバッファー（ｐＨ８．０に調製した１Ｍトリス緩衝液）に溶解して酵素濃度０．１ｍｇ／ｍＬの酵素溶液を調製した。調製後、直ちにその溶液を、上記と同様に、酵素量が０．１ｍｇとなるように基質溶液に加え、酵素反応を行った後、上記と同様の方法で算出した生成物量を基準として、酵素活性保持率を算出した。

【０２２９】

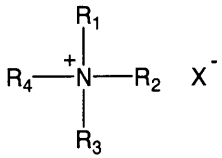
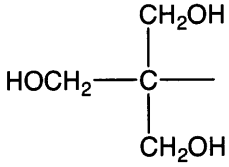
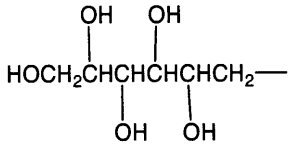
その結果を表１８、１９に示す。

【０２３０】

【表18】

【0231】

クエン酸シンターゼ:25℃

	化合物	生体触媒用溶媒					水溶液濃度	酵素濃度(mg/mL)	酵素活性保持率(%)			
									保存期間			
		R_1	R_2	R_3	R_4	X^-			1日後	7日後	14日後	21日後
実施例3	3	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	H	CH_3COO^-	—	6.0	95	90	35	13
実施例4	4					$CH_3CH(OH)COO^-$	—	10.0	96	90	42	15
実施例5	5					$HOOC(CH_2)_2COO^-$	—	10.0	94	88	30	12
実施例6	6					クエン酸	—	10.0	96	85	41	13
実施例10	10		H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	10.0	95	88	38	12
実施例11	11					クエン酸	—	10.0	95	85	32	13
実施例13	13					$CH_3SO_3^-$	—	5.0	96	85	38	14
実施例18	18		H	H	H	CH_3-O-CH_2COO^-	—	10.0	95	86	40	15
実施例22	22	CH_3	CH_3	CH_3	$(CH_2)_2OH$	$H_2PO_4^-$	—	5.0	94	84	35	11
実施例23	23	CH_3	CH_3	CH_3CH_2	$(CH_2)_2OH$	CH_3COO^-	—	5.0	96	89	40	16
実施例27	27	CH_3	CH_3	CH_3CH_2	$(CH_2)_2COOH$	$CH_3SO_3^-$	—	5.0	93	80	30	18

【表１９】

クエン酸シンターゼ：40℃

	化合物	生体触媒用溶媒					水溶液濃度	酵素濃度(mg/mL)	酵素活性保持率(%)		
		R_1	R_2	R_3	R_4	X^-			保存期間		
									1日後	7日後	14日後
実施例3	3	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	H	CH_3COO^-	—	6.0	72	56	18
実施例4	4					$CH_3CH(OH)COO^-$	—	10.0	72	52	20
実施例5	5					$HOOC(CH_2)_2COO^-$	—	10.0	68	50	19
実施例6	6					クエン酸	—	10.0	70	50	18
実施例10	10	$HOCH_2-C(CH_2OH)_2$	H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	10.0	71	51	21
実施例11	11					クエン酸	—	10.0	69	49	23
実施例13	13					$CH_3SO_3^-$	—	5.0	72	49	18
実施例18	18	$HOCH_2CH(OH)CH(OH)CH(OH)CH(OH)CH_2-$	H	H	H	$CH_3-O-CH_2COO^-$	—	10.0	69	48	15
実施例22	22	CH_3	CH_3	CH_3	$(CH_2)_2OH$	$H_2PO_4^-$	—	5.0	65	46	16
実施例23	23	CH_3	CH_3	CH_3CH_2	$(CH_2)_2OH$	CH_3COO^-	—	5.0	66	52	20
実施例27	27	CH_3	CH_3	CH_3CH_2	$(CH_2)_2COOH$	$CH_3SO_3^-$	—	5.0	64	45	20

【０２３２】

本発明のイオン液体（化合物３～６，１０，１１，１３，１８，２２，２３，２７）は、２５℃の条件（表１８）では、２１日後に１１％以上、４０℃の条件（表１９）では、１４日後に１５％以上の触媒活性を保持した。

＜転移酵素：ヘキソキナーゼの活性測定：表２０～２３＞

ヘキソキナーゼはＡＴＰの存在下、グルコースなどのヘキソースをリン酸化して、ヘキソース－６－リン酸とする反応に寄与する酵素である。その活性は、ヘキソキナーゼが分解したグルコースが、ＡＴＰと反応して生じたＮＡＤＰＨ（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型）を定量して測定した。

【０２３３】

まず、１０ｍＬのスクリュー管にｐＨ８．５の５０ｍＭトリス緩衝液０．６ｍＬ、１０ｍＭグルコース溶液０．３ｍＬ、ｐＨ７．０の４ｍＭ ＡＴＰ溶液、１０Ｕ／ｍＬ Ｇ６ＰＤＨ（グルコース６リン酸デヒドロゲナーゼ）溶液０．３ｍＬ、１ｍＭ ＮＡＤＰ（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸酸化型）溶液０．３ｍＬ、１０ｍＭ塩化マグネシウム溶液０．３ｍＬ、イオン交換水０．９ｍＬを加え、基質溶液を調製した。そして、この基質溶液を３７℃で約３０分間予備加温した。１０Ｕ／ｍＬ Ｇ６ＰＤＨは、Ｇ６ＰＤＨ １０００単位（Ｕ）（パン酵母由来、SIGMA-ALDRICH）をｐＨ８．０の１０ｍＭトリス緩衝液１００ｍＬで溶解して作成したものを用いた。

【０２３４】

次に、表２０～２３中に記載の設定濃度及び温度で、所定期間放置したサンプル（化合物３～６，１０，１１，１３，１８，２２，２３，２７，３５～４１）を、酵素量が０．０５ｍｇとなるように上記の基質溶液に加え、２５℃で１分間反応させた。

【０２３５】

反応後、ブランクとなる基質溶液と、反応溶液の３４０ｎｍの吸光度を測定し、ＮＡＤＰＨを下記式により定量した。

【０２３６】

濃度（ｍＭ）＝（反応溶液の吸光度－ブランクの吸光度）／６．２２※

※ＮＡＤＰＨの３４０ｎｍにおけるミリモル分子吸光係数（Ｌ/（ｍＭ・ｃｍ））

なお、酵素活性保持率の基準となる酵素活性の値は、次のように算出した。適正温度で保存したヘキソキナーゼをバッファー（ｐＨ８．５に調製した５０ｍＭトリス緩衝液）に溶解して酵素濃度１０．０ｍｇ／ｍＬの酵素溶液を調製した。調製後、直ちにその溶液を、上記と同様に、酵素量が０．０５ｍｇとなるように基質溶液に加え、酵素反応を行った後、上記と同様の方法で算出したＮＡＤＰＨ量を基準として、酵素活性保持率を算出した。

【０２３７】

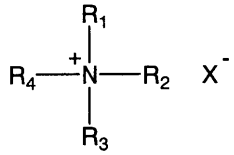
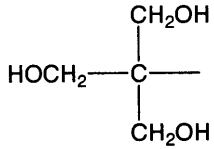
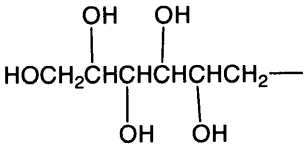
その結果を表２０～２３に示す。

【０２３８】

【表２０】

【０２３９】

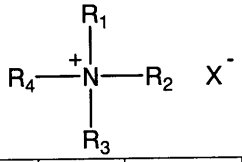
ヘキソキナーゼ:25℃

	化合物	生体触媒用溶媒					水溶液濃度	酵素濃度(mg/mL)	酵素活性保持率(%)			
									保存期間			
		R_1	R_2	R_3	R_4	X^-			1日後	7日後	14日後	21日後
実施例3	3	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	H	CH_3COO^-	—	50.0	100	64	57	10
実施例4	4					$CH_3CH(OH)COO^-$	—	65.0	94	62	57	16
実施例5	5					$HOOC(CH_2)_2COO^-$	—	50.0	95	64	53	10
実施例6	6					クエン酸	—	50.0	95	69	59	10
実施例10	10		H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	65.0	94	66	59	13
実施例11	11					クエン酸	—	50.0	93	62	56	10
実施例13	13					$CH_3SO_3^-$	—	50.0	100	62	56	11
実施例18	18		H	H	H	$CH_3-O-CH_2COO^-$	—	50.0	98	65	56	11
実施例22	22	CH_3	CH_3	CH_3	$(CH_2)_2OH$	$H_2PO_4^-$	—	10.0	83	76	55	11
実施例23	23	CH_3	CH_3	CH_3CH_2	$(CH_2)_2OH$	CH_3COO^-	—	40.0	94	70	55	10
実施例27	27	CH_3	CH_3	CH_3CH_2	$(CH_2)_2COOH$	$CH_3SO_3^-$	—	10.0	85	69	56	10

【表２１】

【０２４０】

ヘキソキナーゼ：25℃

	化合物	生体触媒用溶媒					水溶液濃度	酵素濃度（mg/mL）	酵素活性保持率（%）			
									保存期間			
		R_1	R_2	R_3	R_4	X^-			1日後	7日後	14日後	21日後
比較例8	35	グリセリン					100%	1.0	10	0	0	0
比較例9	36	バッファー					10mM	10.0	48	36	6	0
比較例10	37	グリセリン水溶液					10mg/mL	10.0	58	0	0	0
比較例11	38	グルコース水溶液					10mg/mL	10.0	39	35	5	0
比較例12	39	ウシ血清アルブミン水溶液					10mg/mL	10.0	58	31	1	0
比較例13	40	リシン水溶液					10mg/mL	10.0	4	0	0	0
比較例14	41	リシン、ウシ血清アルブミン水溶液					10mg/mL	10.0	1	0	0	0

【表22】

【0241】

ヘキソキナーゼ:40℃

	化合物	生体触媒用溶媒					水溶液濃度	酵素濃度(mg/mL)	酵素活性保持率(%) 保存期間		
		R_1	R_2	R_3	R_4	X^-			1日後	7日後	14日後
実施例3	3	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	H	CH_3COO^-	—	50.0	50	41	23
実施例4	4					$CH_3CH(OH)COO^-$	—	65.0	54	45	28
実施例5	5					$HOOC(CH_2)_2COO^-$	—	50.0	49	40	27
実施例6	6					クエン酸	—	50.0	49	38	24
実施例10	10	$HOCH_2-C(CH_2OH)_2$	H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	65.0	53	43	20
実施例11	11					クエン酸	—	50.0	53	49	29
実施例13	13					$CH_3SO_3^-$	—	50.0	50	40	20
実施例18	18	$HOCH_2CH(OH)CH(OH)CH(OH)CH_2-$	H	H	H	$CH_3-O-CH_2COO^-$	—	50.0	57	45	20
実施例22	22	CH_3	CH_3	CH_3	$(CH_2)_2OH$	$H_2PO_4^-$	—	10.0	53	45	22
実施例23	23	CH_3	CH_3	CH_3CH_2	$(CH_2)_2OH$	CH_3COO^-	—	40.0	51	39	19
実施例27	27	CH_3	CH_3	CH_3CH_2	$(CH_2)_2COOH$	$CH_3SO_3^-$	—	10.0	45	43	20

【表２３】

ヘキソキナーゼ：40℃

	化合物	生体触媒用溶媒						酵素濃度 (mg/mL)	酵素活性保持率（%）		
		R_1	R_2	R_3	R_4	X^-	水溶液濃度		保存期間		
		$R_4-\overset{R_1}{\underset{R_3}{\overset{+}{N}}}-R_2$ X^-							1日後	7日後	14日後
比較例8	35	グリセリン					100%	1.0	10	2	0
比較例9	36	バッファー					10mM	10.0	8	0	0
比較例10	37	グリセリン水溶液					10mg/mL	10.0	6	0	0
比較例11	38	グルコース水溶液					10mg/mL	10.0	2	0	0
比較例12	39	ウシ血清アルブミン水溶液					10mg/mL	10.0	9	0	0
比較例13	40	リシン水溶液					10mg/mL	10.0	16	7	0
比較例14	41	リシン、ウシ血清アルブミン水溶液					10mg/mL	10.0	12	5	0

【０２４２】

本発明のイオン液体（化合物３～６，１０，１１，１３，１８，２２，２３，２７）は、２５℃の条件（表２０，２１）では、２１日後、１０％以上の触媒活性を保持したのに対して、比較例８～１４（化合物３５～４１）では０％であった。また、４０℃の条件（表２２，２３）では、１４日後、本発明のイオン液体は１９％以上の触媒活性を保持したのに対して、比較例は０％となり、本発明のイオン液体の優位性が示された。

＜脱離酵素：アルギン酸リアーゼの活性測定：表２４～２７＞

アルギン酸リアーゼはアルギン酸を分解反応に寄与する酵素である。その活性は、アルギン酸リアーゼがアルギン酸を分解することにより生成する２重結合を有する糖が、２３５ｎｍに特異的な吸光度変化を示すことから、この生成物を定量して測定した。

【０２４３】

まず、１０ｍＬのスクリュー管に０．２％のアルギン酸水溶液１．０ｍＬ、ｐＨ７．０

の２００ｍＭトリス緩衝液０．５ｍＬ、イオン交換水０．５ｍＬを加え、基質溶液を調製した。そして、この基質溶液を２５℃で約３０分間予備加温した。

【０２４４】

次に、表２４～２７中に記載の設定濃度及び温度で、所定期間放置したサンプル（化合物３～６，１０，１１，１３，１８，２２，２３，２７，３５～４１）を、酵素量が０．０３ｍｇとなるように上記の基質溶液に加え、２５℃で５分間反応させた。

【０２４５】

反応後、ブランクとなる基質溶液と、反応溶液の２３５ｎｍの吸光度を測定し、生成物量を定量して、アルギン酸リアーゼ活性を算出した。生成物量は０．０１～０．２％の濃度範囲の溶液から作成した検量線を用いて算出した。

【０２４６】

なお、酵素活性保持率の基準となる酵素活性の値は、次のように算出した。適正温度で保存したアルギン酸リアーゼ粉末をバッファー（ｐＨ７．０の２００ｍＭトリス緩衝液）に溶解して酵素濃度１０．０ｍｇ／ｍＬの酵素溶液を調製し、調製後、直ちにその溶液を、上記と同様に、酵素量が０．０３ｍｇとなるように基質溶液に加え、酵素反応を行った後、上記と同様の方法で算出した吸光度を基準として算出した。

【０２４７】

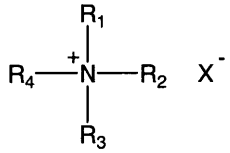
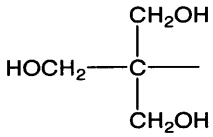
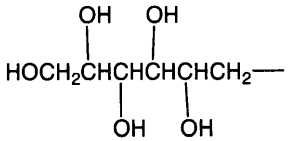
その結果を表２４～２７に示す。

【０２４８】

【表２４】

【０２４９】

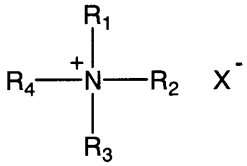
アルギン酸リアーゼ：25℃

	化合物	生体触媒用溶媒					水溶液濃度	酵素濃度 (mg/mL)	酵素活性保持率（%）					
									保存期間					
		R_1	R_2	R_3	R_4	X^-			1日後	7日後	14日後	21日後	30日後	60日後
実施例3	3	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	H	CH_3COO^-	—	20.0	100	100	100	100	100	44
実施例4	4					$CH_3CH(OH)COO^-$	—	30.0	100	100	100	100	100	100
実施例5	5					$HOOC(CH_2)_2COO^-$	—	25.0	100	100	100	100	100	24
実施例6	6					クエン酸	—	20.0	100	100	100	100	99	26
実施例10	10		H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	30.0	100	100	100	100	100	100
実施例11	11					クエン酸	—	20.0	100	100	100	100	94	35
実施例13	13					$CH_3SO_3^-$	—	25.0	100	100	100	100	100	34
実施例18	18		H	H	H	$CH_3-O-CH_2COO^-$	—	25.0	100	100	100	100	100	100
実施例22	22	CH_3	CH_3	CH_3	$(CH_2)_2OH$	$H_2PO_4^-$	—	10.0	100	100	100	100	100	24
実施例23	23	CH_3	CH_3	CH_3CH_2	$(CH_2)_2OH$	CH_3COO^-	—	15.0	100	100	100	100	98	20
実施例27	27	CH_3	CH_3	CH_3CH_2	$(CH_2)_2COOH$	$CH_3SO_3^-$	—	15.0	100	100	100	100	83	20

【表２５】

【０２５０】

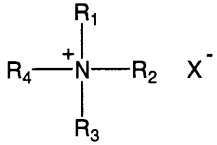
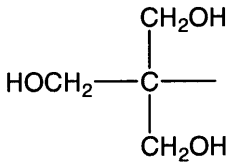
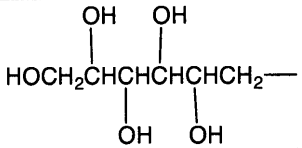
アルギン酸リアーゼ：25℃

	化合物	生体触媒用溶媒					水溶液濃度	酵素濃度（mg/mL）	酵素活性保持率（%）					
									保存期間					
		R_1	R_2	R_3	R_4	X^-			1日後	7日後	14日後	21日後	30日後	60日後
比較例8	35	グリセリン					100%	5.0	84	56	55	8	0	0
比較例9	36	バッファー					10mM	10.0	98	89	85	58	0	0
比較例10	37	グリセリン水溶液					10mg/mL	10.0	97	51	0	0	0	0
比較例11	38	グルコース水溶液					10mg/mL	10.0	97	85	0	0	0	0
比較例12	39	ウシ血清アルブミン水溶液					10mg/mL	10.0	84	68	0	0	0	0
比較例13	40	リシン水溶液					10mg/mL	10.0	85	70	0	0	0	0
比較例14	41	リシン、ウシ血清アルブミン水溶液					10mg/mL	10.0	84	61	53	0	0	0

【表２６】

【０２５１】

アルギン酸リアーゼ：40℃

	化合物	生体触媒用溶媒					水溶液濃度	酵素濃度 (mg/mL)	酵素活性保持率(%)				
									保存期間				
		R_1	R_2	R_3	R_4	X^-			1日後	7日後	14日後	21日後	30日後
実施例3	3	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	H	CH_3COO^-	—	20.0	72	53	34	34	23
実施例4	4					$CH_3CH(OH)COO^-$	—	30.0	95	64	35	35	14
実施例5	5					$HOOC(CH_2)_2COO^-$	—	25.0	72	54	35	34	18
実施例6	6					クエン酸	—	20.0	72	54	34	27	20
実施例10	10		H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	30.0	94	78	55	51	15
実施例11	11					クエン酸	—	20.0	71	53	36	34	20
実施例13	13					$CH_3SO_3^-$	—	25.0	70	50	35	35	14
実施例18	18		H	H	H	$CH_3-O-CH_2COO^-$	—	25.0	62	52	41	37	19
実施例22	22	CH_3	CH_3	CH_3	$(CH_2)_2OH$	$H_2PO_4^-$	—	10.0	72	54	38	35	15
実施例23	23	CH_3	CH_3	CH_3CH_2	$(CH_2)_2OH$	CH_3COO^-	—	15.0	74	56	35	30	13
実施例27	27	CH_3	CH_3	CH_3CH_2	$(CH_2)_2COOH$	$CH_3SO_3^-$	—	15.0	74	55	33	34	15

【表２７】

アルギン酸リアーゼ：40℃

	化合物	生体触媒用溶媒					水溶液濃度	酵素濃度（mg/mL）	酵素活性保持率（%）				
		R_1	R_2	R_3	R_4	X^-			保存期間				
									1日後	7日後	14日後	21日後	30日後
比較例8	35	グリセリン					100%	5.0	2	0	0	0	0
比較例9	36	バッファー					10mM	10.0	3	0	0	0	0
比較例10	37	グリセリン水溶液					10mg/mL	10.0	58	0	0	0	0
比較例11	38	グルコース水溶液					10mg/mL	10.0	63	1	0	0	0
比較例12	39	ウシ血清アルブミン水溶液					10mg/mL	10.0	60	0	0	0	0
比較例13	40	リシン水溶液					10mg/mL	10.0	1	0	0	0	0
比較例14	41	リシン、ウシ血清アルブミン水溶液					10mg/mL	10.0	1	0	0	0	0

【０２５２】

本発明のイオン液体（化合物３～６，１０，１１，１３，１８，２２，２３，２７）は、２５℃の条件（表２４，２５）では、６０日後、２０％以上の触媒活性を保持した。特に、化合物４，１０，１８は１００％の高い活性を保持した。これに対して、比較例８～１４（化合物３５～４１）は０％であった。また、４０℃の条件（表２６，２７）では、３０日後、本発明のイオン液体は１３％以上の触媒活性を保持したのに対して、比較例は０％となり、本発明のイオン液体の優位性が示された。

＜異性化酵素：ホスホグルコースイソメラーゼの活性測定：表２８，２９＞

ホスホグルコースイソメラーゼはグルコースをフルクトースへ変換する酵素である。そ

の活性は、ホスホグルコースイソメラーゼによって生成したフルクトース量を定量して測定した。

【０２５３】

まず、次の溶液を調製した。

【０２５４】

Ａ：２００ｍＭグルコース溶液

（ｐＨ７．２の２００ｍＭリン酸緩衝液９０ｍＬ、１００ｍＭ 硫酸マグネシウム溶液 １０ｍＬにグルコース溶解して作成）

Ｂ：２００ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．２）

Ｃ：５００ｍＭ過塩素酸水溶液

Ｄ：１．５％システイン水溶液

Ｅ：７０％ 硫酸水溶液

Ｆ：０．１２％カルバゾール－エタノール溶液

続いて、１０ｍＬのスクリュー管にＡを１．０ｍＬ採取して基質溶液とし、６０℃で約３０分間予備加温した。次に、表２８，２９中に記載の設定濃度及び温度で、所定期間放置したサンプル（化合物３～６，１０，１１，１３，１８，２２，２３，２７）を、酵素量が０．０３ｍｇとなるように上記の基質溶液に添加し、Ｂを１．０ｍＬ加え、６０℃で６０分間反応させた。反応後、Ｃを２．０ｍＬ加えて冷却し、５０ｍＬにメスアップした。そして、この溶液を１．０ｍＬ採取して、Ｄを０．２ｍＬ、Ｅを６．０ｍＬ加えて振り混ぜ、溶液を冷却後、Ｆを０．２ｍＬ加えて６０℃で１０分間反応させた。

【０２５５】

反応後、酵素溶液を添加せずに上記操作を行ったブランク溶液と、反応溶液の５６０ｎｍの吸光度を測定し、フルクトースを定量して、ホスホグルコースイソメラーゼ活性を算出した。フルクトース量は、酵素溶液を添加せずに、１～２００ｍＭの濃度範囲のフルクトース溶液（ｐＨ７．２の２００ｍＭリン酸緩衝液にフルクトースを溶解し、所定の濃度となるように調製）を用いて上記操作を行って測定した吸光度から作成した検量線を用いて算出した。

【０２５６】

なお、酵素活性保持率の基準となる酵素活性の値は、次のように算出した。適正温度で保存したホスホグルコースイソメラーゼをバッファー（ｐＨ７．２の２００ｍＭリン酸緩衝液）に溶解して酵素濃度１．５ｍｇ／ｍＬの酵素溶液を調製した。調製後、直ちにその溶液を、上記と同様に、酵素量が０．０３ｍｇとなるように基質溶液に加え、酵素反応を行った後、上記と同様の方法で算出したフルクトース量を基準として、酵素活性保持率を算出した。

【０２５７】

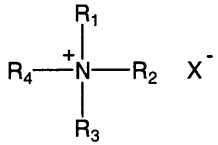
その結果を表２８，２９に示す。

【０２５８】

【表２８】

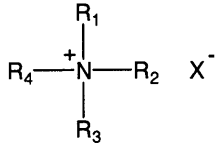
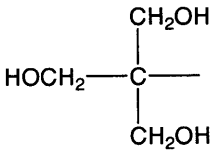
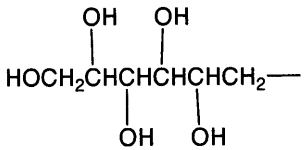
【０２５９】

ホスホグルコースイソメラーゼ：25℃

	化合物	生体触媒用溶媒						酵素濃度 (mg/mL)	酵素活性保持率（%）					
							水溶液濃度		保存期間					
		R_1	R_2	R_3	R_4	X^-			1日後	7日後	14日後	21日後	30日後	60日後
実施例3	3	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	H	CH_3COO^-	—	1.5	100	100	100	100	85	68
実施例4	4					$CH_3CH(OH)COO^-$	—	1.5	100	100	100	100	88	68
実施例5	5					$HOOC(CH_2)_2COO^-$	—	1.5	100	100	100	100	88	64
実施例6	6					クエン酸	—	1.5	100	100	100	100	90	69
実施例10	10	$HOCH_2-C(CH_2OH)_2$	H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	1.5	100	100	100	100	90	70
実施例11	11					クエン酸	—	1.5	100	100	100	100	86	66
実施例13	13					$CH_3SO_3^-$	—	1.5	100	100	100	100	88	70
実施例18	18	$HOCH_2CH(OH)CH(OH)CH(OH)CH_2-$	H	H	H	$CH_3-O-CH_2COO^-$	—	1.5	100	100	100	100	85	67
実施例22	22	CH_3	CH_3	CH_3	$(CH_2)_2OH$	$H_2PO_4^-$	—	1.5	100	100	100	100	86	63
実施例23	23	CH_3	CH_3	CH_3CH_2	$(CH_2)_2OH$	CH_3COO^-	—	1.5	100	100	100	100	91	75
実施例27	27	CH_3	CH_3	CH_3CH_2	$(CH_2)_2COOH$	$CH_3SO_3^-$	—	1.5	100	100	100	100	80	61

【表２９】

ホスホグルコースイソメラーゼ：40℃

	化合物	生体触媒用溶媒					水溶液濃度	酵素濃度 (mg/mL)	酵素活性保持率(%)			
									保存期間			
		R_1	R_2	R_3	R_4	X^-			1日後	7日後	14日後	21日後
実施例3	3	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	H	CH_3COO^-	—	1.5	100	70	40	11
実施例4	4					$CH_3CH(OH)COO^-$	—	1.5	100	73	48	10
実施例5	5					$HOOC(CH_2)_2COO^-$	—	1.5	100	74	48	12
実施例6	6					クエン酸	—	1.5	100	71	48	11
実施例10	10		H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	1.5	100	72	47	13
実施例11	11					クエン酸	—	1.5	100	66	39	10
実施例13	13					$CH_3SO_3^-$	—	1.5	100	63	45	15
実施例18	18		H	H	H	$CH_3-O-CH_2COO^-$	—	1.5	100	69	42	12
実施例22	22	CH_3	CH_3	CH_3	$(CH_2)_2OH$	$H_2PO_4^-$	—	1.5	100	70	43	10
実施例23	23	CH_3	CH_3	CH_3CH_2	$(CH_2)_2OH$	CH_3COO^-	—	1.5	100	72	45	11
実施例27	27	CH_3	CH_3	CH_3CH_2	$(CH_2)_2COOH$	$CH_3SO_3^-$	—	1.5	100	60	38	10

【０２６０】

本発明のイオン液体（化合物３～６，１０，１１，１３，１８，２２，２３，２７）は、２５℃の条件（表２８）では、６０日後に６１％以上、４０℃の条件（表２９）では、

２１日後に１０％以上の触媒活性を保持した。

＜合成酵素：アセチルＣｏＡシンセターゼの活性測定：表３０，３１＞

アセチルＣｏＡシンセターゼはＡＴＰのエネルギーを使い、補酵素Ａ（ＣｏＡ）と酢酸からアセチルＣｏＡを合成する反応を触媒する酵素である。その活性は、アセチルＣｏＡシンセターゼの反応基質である酢酸を定量して測定した。

【０２６１】

アセチルＣｏＡシンセターゼ活性測定にはＦ－キット酢酸（Ｒｏｃｈｅ）を用いた。溶液Ｉ（トリエタノールアミン緩衝液（ｐＨ８．４）、 Ｌ－リンゴ酸、塩化マグネシウム溶液）３００μＬ 、溶液II（ＡＴＰ、ＣｏＡ、ＮＡＤ溶液）６０μＬ 、溶液III（リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、クエン酸合成酵素溶液）３μＬ、イオン交換水、表３０，３１中に記載の設定濃度及び温度で、所定期間放置したサンプル（化合物３～６，１０，１１，１３，１８，２２，２３，２７）を、酵素量が０．０３ｍｇとなるように上記の基質溶液に加え、合計量を９００μＬとして、３０℃で約３０分間予備加温した。

【０２６２】

次に、１ｍＭ酢酸カリウム溶液を１００μＬ添加して３０℃で３０分間反応させた。

【０２６３】

反応後、酵素溶液を添加せずに上記操作を行ったブランク溶液と、反応溶液の３４０ｎｍの吸光度を測定し、酢酸を定量して、アセチルＣｏＡシンセターゼ活性を算出した。酢酸量は０．１～１ｍＭの濃度範囲の酢酸溶液から作成した検量線を用いて算出した。

【０２６４】

なお、酵素活性保持率の基準となる酵素活性の値は、次のように算出した。適正温度で保存したアセチルＣｏＡシンセターゼをバッファー（ｐＨ７．４の１００ｍＭリン酸カリウム緩衝液）に溶解して酵素濃度１．５ｍｇ／ｍＬの酵素溶液を調製した。調製後、直ちにその溶液を、上記と同様に、酵素量が０．０３ｍｇとなるように基質溶液に加え、酵素反応を行った後、上記と同様の方法で算出した酢酸量を基準として、酵素活性保持率を算出した。

【０２６５】

その結果を表３０，３１に示す。

【０２６６】

【表30】

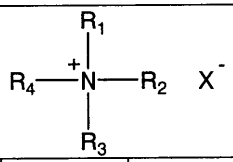
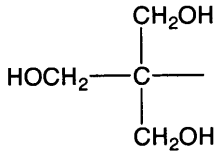
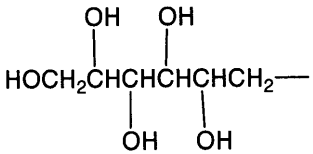
【0267】

アセチルCoAシンセターゼ：25℃

	化合物	生体触媒用溶媒					水溶液濃度	酵素濃度 (mg/mL)	酵素活性保持率(%)					
		R_1	R_2	R_3	R_4	X^-			保存期間					
									1日後	7日後	14日後	21日後	30日後	60日後
実施例3	3	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	H	CH_3COO^-	—	1.5	100	100	100	47	22	12
実施例4	4					$CH_3CH(OH)COO^-$	—	1.5	100	100	100	58	25	15
実施例5	5					$HOOC(CH_2)_2COO^-$	—	1.5	100	100	100	49	20	11
実施例6	6					クエン酸	—	1.5	100	100	100	50	25	13
実施例10	10	$HOCH_2-C(CH_2OH)_2$	H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	1.5	100	100	100	59	28	15
実施例11	11					クエン酸	—	1.5	100	100	100	49	21	11
実施例13	13					$CH_3SO_3^-$	—	1.5	100	100	100	51	25	10
実施例18	18	$HOCH_2CH(OH)CH(OH)CH(OH)CH_2-$	H	H	H	$CH_3-O-CH_2COO^-$	—	1.5	100	100	100	54	27	12
実施例22	22	CH_3	CH_3	CH_3	$(CH_2)_2OH$	$H_2PO_4^-$	—	1.5	100	100	100	48	18	10
実施例23	23	CH_3	CH_3	CH_3CH_2	$(CH_2)_2OH$	CH_3COO^-	—	1.5	100	100	100	55	25	16
実施例27	27	CH_3	CH_3	CH_3CH_2	$(CH_2)_2COOH$	$CH_3SO_3^-$	—	1.5	100	100	100	45	20	10

【表３１】

アセチルCoAシンセターゼ：40℃

	化合物	生体触媒用溶媒					水溶液濃度	酵素濃度(mg/mL)	酵素活性保持率(%)		
									保存期間		
		R_1	R_2	R_3	R_4	X^-			1日後	7日後	14日後
実施例3	3	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	H	CH_3COO^-	—	1.5	100	60	34
実施例4	4					$CH_3CH(OH)COO^-$	—	1.5	100	60	30
実施例5	5					$HOOC(CH_2)_2COO^-$	—	1.5	100	60	32
実施例6	6					クエン酸	—	1.5	100	60	31
実施例10	10		H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	1.5	100	62	31
実施例11	11					クエン酸	—	1.5	100	59	24
実施例13	13					$CH_3SO_3^-$	—	1.5	100	56	25
実施例18	18		H	H	H	$CH_3-O-CH_2COO^-$	—	1.5	100	64	28
実施例22	22	CH_3	CH_3	CH_3	$(CH_2)_2OH$	$H_2PO_4^-$	—	1.5	100	55	24
実施例23	23	CH_3	CH_3	CH_3CH_2	$(CH_2)_2OH$	CH_3COO^-	—	1.5	100	65	30
実施例27	27	CH_3	CH_3	CH_3CH_2	$(CH_2)_2COOH$	$CH_3SO_3^-$	—	1.5	100	55	21

【０２６８】

本発明のイオン液体（化合物３～６，１０，１１，１３，１８，２２，２３，２７）は、２５℃の条件（表３０）では、６０日後に１０％以上、４０℃の条件（表３１）では、１４日後に２１％以上の触媒活性を保持した。

＜酸化還元酵素：シトクロムＰ４５０の活性測定：表３２＞

シトクロムＰ４５０の活性は、シトクロムＰ４５０の酵素反応によって基質であるテストステロンから生成する６β－ヒドロキシテストステロンをＨＰＬＣによって定量して測定した。

【０２６９】

三角フラスコにｐＨ７．４の０．１Ｍリン酸カリウムバッファー８９０μＬと、３２００ｎｍｏｌ／ＬのテストステロンのメタノールＬ溶液を１０μＬ、３２００ｎｍｏｌ／ＬのＮＡＤＰＨ（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型）水溶液を１００μＬ加え、３７℃の恒温槽に入れて３分間予備加温した。

【０２７０】

次に、酵素量が１．０μｇとなるように、表３２に記載の設定濃度及び温度で所定期間放置したサンプル（化合物３～６，１０，１３，１５，１８，２０，２２，２９，３６，４３）を採取し、上記の基質溶液に加え、３７℃で３０分間反応させた。

【０２７１】

反応後、直ちに内部標準液（３２ｎｍｏｌ／Ｌの酢酸コルチゾン水溶液）１００μＬを加えた後、ボルテックスミキサーで撹拌し反応を止めた。そして、酢酸エチルを２ｍＬ加え、３０秒間ボルテックスミキサーで撹拌し、反応物を酢酸エチルに抽出させた。静置後、水層と酢酸エチル層に分離させ、酢酸エチル層を回収した。水層に酢酸エチル７５０μＬ加え、攪拌静置後、マイクロピペットを用いて酢酸エチル層を回収した。この操作を２回行い、回収した酢酸エチルを減圧留去し、留去後の化合物をＭｅＯＨで溶解して、ＨＰＬＣにて６β－ヒドロキシテストステロンを定量した。

【０２７２】

なお、酵素活性保持率の基準となる酵素活性の値は、次のように算出した。凍結保存したシトクロムＰ４５０を溶かした後、シトクロムＰ４５０用バッファーに素早く溶解して酵素濃度１．０ｍｇ／ｍＬの酵素溶液を調製した。調製後、直ちにその溶液を上記と同様に、酵素量が１．０μｇとなるように基質溶液に加え、酵素反応を行った後、ＨＰＬＣで定量した６β－ヒドロキシテストステロン量を基準として、酵素活性保持率を算出した。

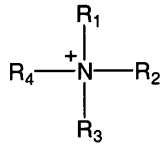
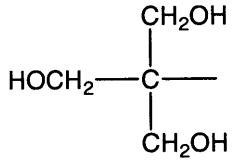
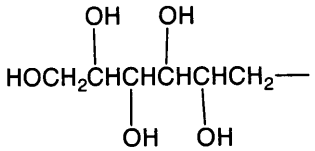
【０２７３】

その結果を表３２に示す。

【０２７４】

【表３２】

シトクロムP450：3℃

	化合物	生体触媒用溶媒					酵素濃度 (mg/ml)	酵素活性保持率(%)		
								保存期間		
		R_1	R_2	R_3	R_4	X^-		1日後	7日後	14日後
実施例3	3	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	H	CH_3COO^-	1.0	43	10	7
実施例4	4					$CH_3CH(OH)COO^-$	1.0	50	25	20
実施例5	5					$HOOC(CH_2)_2COO^-$	1.0	53	36	20
実施例6	6					クエン酸	1.0	41	24	13
実施例10	10		H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	1.0	34	18	12
実施例13	13					$CH3SO3^-$	1.0	31	14	9
実施例15	15		H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	1.0	28	20	15
実施例18	18					CH_3-O-CH_2COO^-	1.0	29	18	12
実施例20	20	CH_3	CH_3	CH_3	$(CH_2)_2OH$	$CH_3CH(OH)COO^-$	1.0	38	24	15
実施例22	22	CH_3	CH_3	CH_3	$(CH_2)_2OH$	$H_2PO_4^-$	1.0	48	36	20
比較例2	29	BMI-BF_4					1.0	45	12	6
比較例9	36	バッファー					1.0	40	18	6
比較例16	43	20%グリセリン溶液					1.0	45	20	6

【０２７５】

３℃で保存した結果（表３２）では、比較例（化合物２９，３６，４３）は、１４日後は６％以下の活性保持率に低下したのに対して、本発明の化合物（実施例３～６，１０，１３，１５，１８，２０，２２）は、１４日後は７％以上の活性保持率を示した。

【０２７６】

つまり、一般的な酵素に比べて安定性が特に低く、凍結保存が必要なシトクロムＰ４５

０であっても、本発明の生体触媒用溶媒は、酵素の立体構造の高い保持性を有することが示唆された。

４．－１０℃保存試験

カタラーゼを本発明のイオン液体（化合物４，１０，１５：実施例２８，２９，３０）に５０ｍｇ／ｍＬ、従来の安定化剤を溶解した水溶液（化合物３６～４１：比較例１７～２２）に２０ｍｇ／ｍＬの濃度に溶解して、－１０℃で設定した低温恒温器に２４時間放置した。本発明のイオン液体溶液は液性を保持したのに対して、化合物３６～４１の水溶液は凍結した。その後、２５℃の恒温器に放置して昇温して（化合物３６～４１の水溶液は溶解）、上記と同様にカタラーゼの活性を測定した。

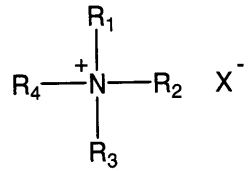
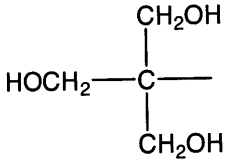
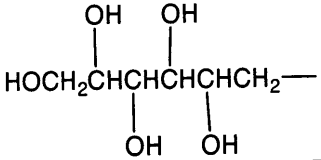
【０２７７】

その結果を表３３に示す。

【０２７８】

【表３３】

カタラーゼ：－10℃

	化合物	生体触媒用溶媒					水溶液濃度	酵素濃度 (mg/mL)	酵素活性保持率 (%) 1日後		
									保存温度		
		R_1	R_2	R_3	R_4	X^-			−10℃	25℃	40℃
実施例28	4	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	50	100	100	100
実施例29	10		H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	50	100	100	100
実施例30	15		H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	50	100	100	100
比較例17	36	バッファー					10mM	20	87	100	100
比較例18	37	グリセリン水溶液					10mg/mL	20	68	100	100
比較例19	38	グルコース水溶液					10mg/mL	20	88	100	100
比較例20	39	ウシ血清アルブミン水溶液					10mg/mL	20	87	100	100
比較例21	40	リシン水溶液					10mg/mL	20	13	100	100
比較例22	41	リシン、ウシ血清アルブミン水溶液					10mg/mL	20	0	100	100

【０２７９】

２５、４０℃で一日後の活性が１００％保持した化合物３６～４１の水溶液中のカタラーゼは、－１０℃で凍結、溶解するとの相変化を経た結果、酵素の立体構造が変化して失活した。一方、本発明の化合物４，１０，１５は－１０℃でも液状であり、その活性を１

００％保持し、保存が可能であった。つまり、一般的には保存温度はより低温の方が好ましいが、表１に示すように本発明のイオン液体は凝固点が－１０℃より低く、低温下でも液状であり、保存性が高く、使用上、利便性が高いことを確認した。

５．低濃度保存試験

サンプル（化合物４～６，１０，１８，２２，２３，２７，２９，３５～４０，４２）に濃度が１０μｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬとなるようにウレアーゼを溶解して、２５℃及び、４０℃に設定した恒温器に放置し、１８０日後、上記と同様にウレアーゼの活性を測定した。

【０２８０】

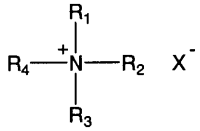
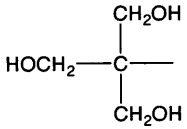
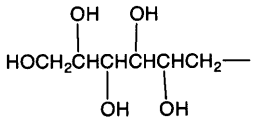
その結果を表３４～３７に示す。

【０２８１】

【表34】

【0282】

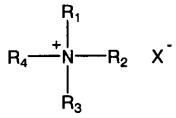
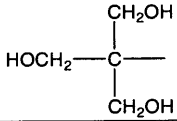
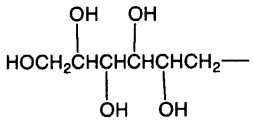
10μgウレアーゼ:25℃

	化合物	生体触媒用溶媒					水溶液濃度	酵素濃度(μg/ml)	酵素活性保持率(%)							
									保存期間							
		R_1	R_2	R_3	R_4	X^-			1日後	7日後	14日後	21日後	30日後	60日後	90日後	180日後
実施例4	4	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	10	100	100	100	100	96	74	69	35
実施例5	5					$HOOC(CH_2)_2COO^-$	—	10	100	100	100	100	96	71	66	40
実施例6	6					クエン酸	—	10	100	100	100	100	96	74	65	31
実施例10	10		H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	10	100	100	100	100	95	73	72	32
実施例18	18		H	H	H	$CH_3-O-CH_2COO^-$	—	10	100	100	100	100	98	75	72	39
実施例22	22	CH_3	CH_3	CH_3	$(CH_2)_2OH$	$H_2PO_4^-$	—	10	100	100	100	100	95	79	79	41
実施例23	23	CH_3	CH_3	C_2H_5	$(CH_2)_2OH$	CH_3COO^-	—	10	100	100	100	100	95	73	66	38
実施例27	27	CH_3	CH_3	C_2H_5	$(CH_2)_2COOH$	$CH_3SO_3^-$	—	10	100	100	100	100	96	74	66	40
比較例2	29	$BMI-BF_4$					—	10	100	100	100	100	95	71	45	0
比較例8	35	グリセリン					100%	10	100	100	100	100	95	72	46	8
比較例9	36	バッファー					10mM	10	100	100	100	100	97	73	59	20
比較例10	37	グリセリン水溶液					10mg/ml	10	100	100	100	100	96	73	46	9
比較例11	38	グルコース水溶液					10mg/ml	10	100	100	100	100	96	74	48	10
比較例12	39	ウシ血清アルブミン水溶液					10mg/ml	10	100	100	100	100	95	77	46	5
比較例13	40	リシン水溶液					10mg/ml	10	100	100	100	100	96	67	51	10
比較例15	42	アルギニン水溶液					10mg/ml	10	100	100	100	100	95	72	57	11

【表35】

【0283】

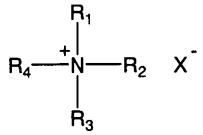
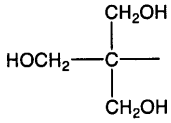
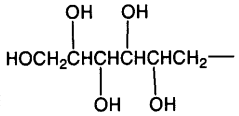
10μgウレアーゼ:40℃

	化合物	生体触媒用溶媒					水溶液濃度	酵素濃度(μg/ml)	酵素活性保持率(%)							
									保存期間							
		R_1	R_2	R_3	R_4	X^-			1日後	7日後	14日後	21日後	30日後	60日後	90日後	180日後
実施例4	4	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	10	100	100	100	100	78	53	44	7
実施例5	5					$HOOC(CH_2)_2COO^-$	—	10	100	100	100	100	73	49	40	5
実施例6	6					クエン酸	—	10	100	100	100	100	70	46	45	9
実施例10	10		H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	10	100	100	100	100	77	51	39	9
実施例18	18		H	H	H	$CH_3-O-CH_2COO^-$	—	10	100	100	100	100	71	53	41	10
実施例22	22	CH_3	CH_3	CH_3	$(CH_2)_2OH$	$H_2PO_4^-$	—	10	100	100	100	100	72	54	46	10
実施例23	23	CH_3	CH_3	C_2H_5	$(CH_2)_2OH$	CH_3COO^-	—	10	100	100	100	100	78	49	41	5
実施例27	27	CH_3	CH_3	C_2H_5	$(CH_2)_2COOH$	$CH_3SO_3^-$	—	10	100	100	100	100	68	51	42	5
比較例2	29	$BMI-BF_4$					—	10	100	100	100	100	74	27	11	0
比較例8	35	グリセリン					100%	10	100	100	100	100	69	30	21	0
比較例9	36	バッファー					10mM	10	100	100	100	100	68	35	13	0
比較例10	37	グリセリン水溶液					10mg/ml	10	100	100	100	100	71	23	21	0
比較例11	38	グルコース水溶液					10mg/ml	10	100	100	100	100	72	32	20	0
比較例12	39	ウシ血清アルブミン水溶液					10mg/ml	10	100	100	100	100	69	23	13	0
比較例13	40	リシン水溶液					10mg/ml	10	100	100	100	100	73	29	29	0
比較例15	42	アルギニン水溶液					10mg/ml	10	100	100	100	100	72	24	30	0

【表36】

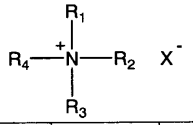
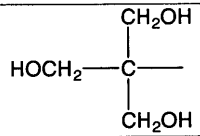
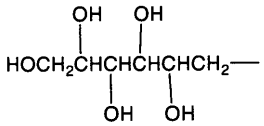
【0284】

10ngウレアーゼ:25℃

	化合物	生体触媒用溶媒					水溶液濃度	酵素濃度 (ng/ml)	酵素活性保持率(%)							
									保存期間							
		R_1	R_2	R_3	R_4	X^-			1日後	7日後	14日後	21日後	30日後	60日後	90日後	180日後
実施例4	4	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	10	100	100	100	100	96	72	69	39
実施例5	5					$HOOC(CH_2)_2COO^-$	—	10	100	100	100	100	96	80	64	43
実施例6	6					クエン酸	—	10	100	100	100	100	96	79	65	40
実施例10	10		H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	10	100	100	100	100	95	73	71	40
実施例18	18		H	H	H	CH_3-O-CH_2COO^-	—	10	100	100	100	100	98	83	68	45
実施例22	22	CH_3	CH_3	CH_3	$(CH_2)_2OH$	$H_2PO_4^-$	—	10	100	100	100	100	95	77	69	40
実施例23	23	CH_3	CH_3	C_2H_5	$(CH_2)_2OH$	CH_3COO^-	—	10	100	100	100	100	95	78	65	44
実施例27	27	CH_3	CH_3	C_2H_5	$(CH_2)_2COOH$	$CH_3SO_3^-$	—	10	100	100	100	100	96	76	68	41
比較例2	29	BMI-BF_4					—	10	100	100	100	100	95	62	50	0
比較例8	35	グリセリン					100%	10	100	100	100	100	95	72	72	12
比較例9	36	バッファー					10mM	10	100	100	100	100	97	66	68	25
比較例10	37	グリセリン水溶液					10mg/ml	10	100	100	100	100	96	74	72	13
比較例11	38	グルコース水溶液					10mg/ml	10	100	100	100	100	96	67	65	11
比較例12	39	ウシ血清アルブミン水溶液					10mg/ml	10	100	100	100	100	95	73	68	11
比較例13	40	リシン水溶液					10mg/ml	10	100	100	100	100	96	57	58	10
比較例15	42	アルギニン水溶液					10mg/ml	10	100	100	100	100	95	65	59	10

【表３７】

10ngウレアーゼ:40℃

	化合物	生体触媒用溶媒					水溶液濃度	酵素濃度 (ng/ml)	酵素活性保持率(%)							
									保存期間							
		R_1	R_2	R_3	R_4	X^-			1日後	7日後	14日後	21日後	30日後	60日後	90日後	180日後
実施例4	4	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	10	100	100	100	100	78	63	50	10
実施例5	5					$HOOC(CH_2)_2COO^-$	—	10	100	100	100	100	73	61	49	10
実施例6	6					クエン酸	—	10	100	100	100	100	70	69	50	9
実施例10	10		H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	10	100	100	100	100	77	65	49	11
実施例18	18		H	H	H	CH_3-O-CH_2COO^-	—	10	100	100	100	100	71	64	52	10
実施例22	22	CH_3	CH_3	CH_3	$(CH_2)_2OH$	$H_2PO_4^-$	—	10	100	100	100	100	72	67	52	12
実施例23	23	CH_3	CH_3	C_2H_5	$(CH_2)_2OH$	CH_3COO^-	—	10	100	100	100	100	78	65	52	11
実施例27	27	CH_3	CH_3	C_2H_5	$(CH_2)_2COOH$	$CH_3SO_3^-$	—	10	100	100	100	100	68	68	52	8
比較例2	29	BMI-BF_4					—	10	100	100	100	100	74	45	14	0
比較例8	35	グリセリン					100%	10	100	100	100	100	69	43	27	0
比較例9	36	バッファー					10mM	10	100	100	100	100	68	47	22	0
比較例10	37	グリセリン水溶液					10mg/ml	10	100	100	100	100	71	42	20	0
比較例11	38	グルコース水溶液					10mg/ml	10	100	100	100	100	72	45	26	0
比較例12	39	ウシ血清アルブミン水溶液					10mg/ml	10	100	100	100	100	69	49	21	0
比較例13	40	リシン水溶液					10mg/ml	10	100	100	100	100	73	42	25	0
比較例15	42	アルギニン水溶液					10mg/ml	10	100	100	100	100	72	44	30	0

【０２８５】

１０μｇ／ｍＬの結果（表３４，３５）では、比較例（化合物２９，３５～４０，４２

）は、１８０日後には、２５℃では２０％以下、４０℃では０％の活性保持率に低下したのに対して、本発明の化合物（実施例４～６，１０，１８，２２，２３，２７）は、１８０日後には、２５℃では３１％以上、４０℃では５％以上の活性保持率を示した。また、１０ｎｇ／ｍＬの結果（表３６，３７）では、比較例（化合物２９，３５～４０，４２）は、１８０日後には、２５℃では２５％以下、４０℃では０％の活性保持率に低下したのに対して、本発明の化合物（実施例４～６，１０，１８，２２，２３，２７）は、１８０日後には、２５℃では３９％以上、４０℃では８％以上の活性保持率を示した。つまり、生体触媒の保存濃度が極低濃度であっても、本発明の生体触媒用溶媒は酵素の活性を保持し、酵素の立体構造の高い保持性を有することが示唆された。

６．無水イオン液体保存性試験

無水イオン液体中のウレアーゼの保存性試験を、次のように実施した。まず、サンプル（化合物１～６，８～１１，１３，１５，１８，２０，２３，２４，２７，２９，３３～３５）をスクリュー管に入れ減圧脱水して無水イオン液体を作成し、そこに、表３８，３９中に記載の設定濃度となるようにウレアーゼを加えて溶解した。その後、それぞれのスクリュー管に水分が混入しないようにスクリュー管内を窒素置換し、密閉した。そして、２５℃及び４０℃に設定した恒温器中に放置し、上記と同様の方法でウレアーゼの活性を測定した。

【０２８６】

その結果を表３８，３９に示す。

【０２８７】

【表38】

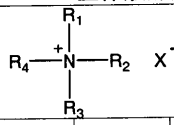
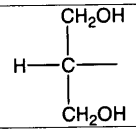
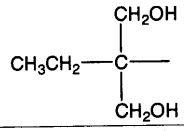
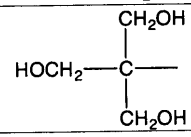
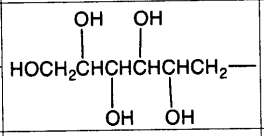
【0288】

無水イオン液体　ウレアーゼ:25℃

	化合物	生体触媒用溶媒					水溶液濃度	酵素濃度 (mg/ml)	酵素活性保持率(%)				
		R_1	R_2	R_3	R_4	X^-			保存期間				
									1日後	7日後	14日後	21日後	30日後
実施例1	1	$(CH_2)_2OH$	H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	35.0	98	98	96	95	95
実施例2	2	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	35.0	99	98	95	94	94
実施例3	3	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	H	CH_3COO^-	—	20.0	98	97	95	93	93
実施例4	4					$CH_3CH(OH)COO^-$	—	40.0	99	98	97	96	95
実施例5	5					$HOOC(CH_2)_2COO^-$	—	30.0	98	97	95	93	93
実施例6	6					クエン酸	—	30.0	98	97	95	93	92
実施例8	8	$H-C(CH_2OH)_2-$	H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	40.0	99	96	96	96	95
実施例9	9	$CH_3CH_2-C(CH_2OH)_2-$	H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	40.0	99	96	96	96	96
実施例10	10	$HOCH_2-C(CH_2OH)_2-$	H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	40.0	98	98	95	95	95
実施例11	11					クエン酸	—	30.0	98	98	96	95	94
実施例13	13					$CH_3SO_3^-$	—	20.0	97	95	93	93	90
実施例15	15	$HOCH_2CH(OH)CH(OH)CH(OH)CH_2-$	H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	40.0	97	95	95	93	90
実施例18	18					$CH_3-O-CH_2COO^-$	—	30.0	98	96	95	93	89
実施例20	20	CH_3	CH_3	CH_3	$(CH_2)_2OH$	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	30.0	99	96	94	94	94
実施例23	23	CH_3	CH_3	C_2H_5	$(CH_2)_2OH$	CH_3COO^-	—	10.0	99	97	96	93	92
実施例24	24					$CH_3CH(OH)COO^-$	—	30.0	99	96	96	93	92
実施例27	27	CH_3	CH_3	C_2H_5	$(CH_2)_2COOH$	$CH_3SO_3^-$	—	10.0	97	93	90	90	90
比較例2	29	BMI-BF_4					—	1.0	65	45	18	8	0
比較例6	33	HOPMI-PF_6					—	10.0	81	70	58	21	0
比較例7	34	DHOPMI-PF_6					—	10.0	85	73	62	25	0
比較例8	35	グリセリン					100%	10.0	98	90	81	49	20

【表３９】

無水イオン液体　ウレアーゼ:40℃

	化合物	生体触媒用溶媒					水溶液濃度	酵素濃度 (mg/ml)	酵素活性保持率(%)				
									保存期間				
		R_1	R_2	R_3	R_4	X^-			1日後	7日後	14日後	21日後	30日後
実施例1	1	$(CH_2)_2OH$	H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	35.0	94	91	85	75	70
実施例2	2	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	35.0	94	90	80	75	69
実施例3	3	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	$(CH_2)_2OH$	H	CH_3COO^-	—	20.0	92	89	75	73	68
実施例4	4					$CH_3CH(OH)COO^-$	—	40.0	95	93	80	78	70
実施例5	5					$HOOC(CH_2)_2COO^-$	—	30.0	95	92	80	80	73
実施例6	6					クエン酸	—	30.0	94	92	81	80	72
実施例8	8		H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	40.0	95	91	78	75	75
実施例9	9		H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	40.0	95	91	77	75	75
実施例10	10		H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	40.0	95	80	78	75	74
実施例11	11					クエン酸	—	30.0	94	92	84	80	69
実施例13	13					$CH_3SO_3^-$	—	20.0	92	88	77	70	70
実施例15	15		H	H	H	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	40.0	94	90	82	80	73
実施例18	18					$CH_3-O-CH_2COO^-$	—	30.0	93	90	82	80	70
実施例20	20	CH_3	CH_3	CH_3	$(CH_2)_2OH$	$CH_3CH(OH)COO^-$	—	30.0	94	89	83	83	75
実施例23	23	CH_3	CH_3	C_2H_5	$(CH_2)_2OH$	CH_3COO^-	—	10.0	92	88	79	70	68
実施例24	24					$CH_3CH(OH)COO^-$	—	30.0	91	90	75	71	65
実施例27	27	CH_3	CH_3	C_2H_5	$(CH_2)_2COOH$	$CH_3SO_3^-$	—	10.0	93	88	74	70	63
比較例2	29	$BMI-BF_4$					—	1.0	58	30	15	0	0
比較例6	33	$HOPMI-PF_6$					—	10.0	51	35	20	10	0
比較例7	34	$DHOPMI-PF_6$					—	10.0	55	42	25	15	0
比較例8	35	グリセリン					100%	10.0	89	77	20	15	10

【０２８９】

２５℃の結果（表３８）では、比較例（化合物２９，３３～３５）は、３０日後は２０％以下の活性保持率に低下したのに対して、本発明の化合物（実施例１～６，８～１１，１３，１５，１８，２０，２３，２４，２７）は、３０日後は８９％以上の活性保持率を示した。また、４０℃のの結果（表３９）では、比較例（化合物２９，３３～３５）は、３０日後は１０％以下の活性保持率に低下したのに対して、本発明の化合物（実施例１～６，８～１１，１３，１５，１８，２０，２３，２４，２７）は、３０日後は６３％以上の活性保持率を示した。つまり、水を含まない無水イオン液体であっても、本発明の生体触媒用溶媒は酵素の活性を保持し、酵素の立体構造の高い保持性を有することが示唆され

た。

【０２９０】

また、表４～９の含水イオン液体に保存したウレアーゼの結果と、表３８，３９の無水イオン液体の結果を比較すると、相対的に活性保持率は同等であることから、酵素の活性保持の効果は、水の存在に関わらず、イオン液体の構造に起因するものであると示唆された。

【０２９１】

一方で、４．－１０℃保存試験の結果から、イオン液体の相変化（固体から液体）が酵素の活性を失活させることを確認したが、イオン液体の生体触媒用溶媒の用途先によっては、含水物だけではなく無水物の形態での利用も想定され、その場合、相変化がなく、無水物で液体のイオン液体が望ましいと考えられる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
C12N 9/10	*(2006.01)*		C12N	9/10	
C12N 9/12	*(2006.01)*		C12N	9/12	
C12N 9/92	*(2006.01)*		C12N	9/92	
C07C 229/06	*(2006.01)*		C07C	229/06	
C07C 59/08	*(2006.01)*		C07C	59/08	
C07C 53/10	*(2006.01)*		C07C	53/10	
C07C 59/125	*(2006.01)*		C07C	59/125	A
C07C 59/265	*(2006.01)*		C07C	59/265	
C07C 309/04	*(2006.01)*		C07C	309/04	
C07C 55/10	*(2006.01)*		C07C	55/10	
C07C 59/255	*(2006.01)*		C07C	59/255	

特許法第３０条第２項適用　第４回アジアー太平洋国際ペプチドシンポジウム　第５０回ペプチド討論会　ＡＰＩＰＳ２０１３（ホテル阪急エキスポパーク）において平成２５年１１月６日～平成２５年１１月８日に発表
特許法第３０条第２項適用　第３５回日本バイオマテリアル学会大会予稿集（第３５回日本バイオマテリアル学会大会、発行日：平成２５年１１月２５日）で発表
特許法第３０条第２項適用　第３５回日本バイオマテリアル学会大会（タワーホール船堀）において平成２５年１１月２５日～平成２５年１１月２６日に発表

早期審査対象出願

(72)発明者　河合　功治
東京都葛飾区堀切４丁目６６番１号　ミヨシ油脂株式会社内

審査官　吉森　晃

(56)参考文献　特開２０１２－０３１１３７（ＪＰ，Ａ）
特開２０１２－０１２３１３（ＪＰ，Ａ）
欧州特許出願公開第０１９９５３０５（ＥＰ，Ａ１）
米国特許第０７７１３４６５（ＵＳ，Ｂ１）
Rodrigues, Joao V.; Prosinecki, Vesna; Marrucho, Isabel;, Protein stability in an ionic liquid milieu: on the use of differential scanning fluorimetry, Physical Chemistry Chemical Physics , ２０１１年, 13(30), 13614-13616
Curto, Vincenzo F.; Scheuermann, Stefan; Owens, Roisin M.;, Probing the specific ion effects of biocompatible hydrated choline ionic liquids on lactate oxidase biofunctionality in sensor applications, Physical Chemistry Chemical Physics, ２０１４年, 16(5), 1841-1849
Wuensch, Christiane; Schmidt, Nina; Gross, Johannes; Grischek, Barbara;, Pushing the equilibrium of regio-complementary carboxylation of phenols and hydroxystyrene derivatives, Journal of Biotechnology, ２０１３年, 168(3), 264-270
Devi, B. L. A. Prabhavathi; Guo, Zheng; Xu, Xuebing, Characterization of ionic liquid-based biocatalytic two-phase reaction system for production of biodiesel, AIChE Journal, ２０１１年, 57(6), 1628-1637
Kohlmann, Christina; Robertz, Nora; Leuchs, Susanne; Dogan, Zuebeyde;, Ionic liquid facilitates biocatalytic conversion of hardly water soluble ketones, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic , ２０１１年, 68(2), 147-153
Rodriguez, Cristina; de Gonzalo, Gonzalo; Fraaije, Marco W.;, Ionic liquids for enhanc

ing the enantioselectivity of isolated BVMO-catalysed oxidations, Green Chemistry, ２０１０年, 12(12), 2255-2260
Lourenco, Nuno M. T.; Monteiro, Carlos M.; Afonso, Carlos A. M., Ionic Acylating Agents for the Enzymatic Resolution of sec-Alcohols in Ionic Liquids, European Journal of Organic Chemistry, ２０１０年, (36), 6938-6943
de Souza, Ranyere Lucena; de Faria, Emanuelle Lima Pache;, Protic ionic liquid as additive on lipase immobilization using silica sol-gel, Enzyme and Microbial Technology, ２０１３年, 52(3), 141-150

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ０７Ｃ
Ｃ１２Ｎ　９／９６
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ（ＳＴＮ）