

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：33302

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510113

研究課題名(和文)有害化学物質吸着能と分解能をハイブリッド化した安全な多機能環境浄化材料の開発

研究課題名(英文)Development of a safe solid-state microorganism nano fiber polymer composite for decomposition of harmful chemicals

研究代表者

大澤 敏(Osawa, Satoshi)

金沢工業大学・バイオ・化学部・教授

研究者番号：50259636

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：有害物質分解能を有する安全な微生物である麹菌と申請者が発明したキトサンナノファイバーを複合化してホルムアルデヒド等の有害物質の浄化材料を作製した。その結果以下の知見が得られた。麹菌は、毒性が高いホルムアルデヒドに対して高い分解能を示した。キトサンを高圧水流で処理したキトサンナノファイバーを作製する手法を開発し、このペースト状ナノファイバーに麹菌胞子を添加して凍結乾燥することで、環境適合性と安全性を兼ね備えた複合物を得た。この複合物は、気相、液相でのホルムアルデヒドの分解を容易にし、麹菌の培地を加えることで100日以上浄化能を保持でき実用上有用な材料であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A very safe and environmentally friendly solid-state material for bioremediation was prepared using a combination of *Aspergillus oryzae*, a porous biodegradable polymer. The novel material was capable of decomposing 200 ppm formaldehyde solution to 0 ppm within 7 days. Degradation ability was prolonged by addition of yeast extract-peptone-dextrose (YPD) medium into the composite; 200 ppm formaldehyde was decomposed to 0 ppm over 8 additional decomposition cycles and 100 days. A unique mechanism is proposed where, during degradation, the solid-state composite provides nutrients to *A. oryzae*.

研究分野：環境学

科研費の分科・細目：環境技術・環境材料

キーワード：環境浄化材料 複合材料 ホルムアルデヒド ナノファイバー キトサン 生分解性高分子

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、醸造分野で古くから利用されている安全性の高い麹菌が低分子有機化合物を資化する能力に優れ、工場廃水に含まれるホルムアルデヒドや加熱飲料に微量に含まれる神経毒性のアクリルアミドなどに対しても分解能力を有することを見出していた。一方、生分解性高分子の機能化に関する研究過程で、微生物や細胞の接着・非接着が高分子表面の微細構造に強く依存し、特定の微細構造が微生物あるいは細胞を認識することを明らかにしていた。

そこで、本研究では、麹菌と生体適合性の高分子の複合化により、安全で実用上有用な環境浄化材料の作製を試みた。さらに研究者らが開発した、カニやエビ殻に含まれる難水溶性のバイオマス多糖であるキチン・キトサンをジェット水流でナノファイバー化した懸濁液を大量に製造する方法を用いれば麹菌付着能に優れた多孔質体が容易に成形できると考えた。この新素材は、ナノファイバー化により表面積が活性炭に匹敵するほど大きく、また懸濁液に培地成分や薬剤を任意に添加して多孔質体を成形できることから、薬剤や細胞を材料内に大量に保持できる組織再生用材料として開発したものである。

ここで発想を変えて、薬剤を有害化学物質に、細胞を麹菌に置き換えて見ると、有害物質の高い吸着性と、それを分解できる麹菌の住処としての機能を同時に持つ安全で高性能な環境浄化材料となりうると考え、本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

有害化学物質を分解する能力のある安全な麹菌と、化学物質に対する高い吸着能を有するキチン・キトサンナノファイバー（高分子多糖）を複合化することで工場廃水や飲料水から気相まで適用可能な多機能浄化材料を創成する。この目的のために以下の3点について研究を行った。

- ① 麹菌の有害物質分解能と有害物質耐性
- ② 微生物と生分解性高分子ナノファイバーとの複合化の最適方法の確立
- ③ 複合物の液相・気相における有害物質分解能

## 3. 研究の方法

### 1) 麹菌の有害物質分解能とその耐性

① 本研究に用いる菌体として *Aspergillus oryzae* RIB40 を用いた。*A. oryzae* は日本古来より麹菌として清酒、味噌などの醸造工程に利用されている真菌であり産業上極めて有用かつ安全性の高い微生物として認められている

使用培地として YPD 液体培地および PD 液体培地を用いた。培養した麹菌をホルムアルデヒド等の溶液に入れ、その濃度減少から分解性を評価した。

### ② 有害物質耐性確認試験

*A. oryzae* のホルムアルデヒド耐性試験を行い、最少発育阻止濃度 (MIC) を求めた。PDA 寒天培地を用い、添加する有害物質の濃度を可変して *A. oryzae* を寒天平板塗抹法で植菌し、30°C で4日間の静置培養後コロニーの有無を目視にて観察しその発育状況より MIC を評価した。

### 2) 麹菌/高分子複合担体の作製

#### ① 麹菌が付着する最適な微細構造

マイクロスケールの微細構造を付与した材料と多孔質体、ナノファイバー凍結乾燥体を作製し、5%YPD 液体培地 5 mL 中に *A. oryzae* の胞子を  $2 \times 10^6$  / mL 懸濁した培養液に浸漬させ、30°C で5日間の振とう培養にて行った。*A. oryzae* の付着性効果を確認するために、培養後の試料を走査型電子顕微鏡表面観察および振とう試験で最適な微細構造を求めた。

#### ② 麹菌/栄養源/高分子複合担体の作製

再利用化モデルをもとに、複合担体を作製した。基材となる生分解性高分子には PCL を用いた。PCL を用いた理由として、PBSA に比べて *A. oryzae* の顕著な分解性を有することから、再利用化モデルに挙げた基質の分解・栄養源取得を効果的に行えると考えた。作製方法として、YPD 培地 (Difco パウダー状) 40wt.% と PCL ペレットを 80°C で混練し、卓上テストプレス機でシート状にしたものに、*A. oryzae* の付着を高めるために 20  $\mu$ m のステンレスメッシュシートを 80° で溶融転写した YPD/PCL 複合体を作製した。この複合体に予め *A. oryzae* を付着させたものを麹菌/栄養源/PCL 複合体とした。ナノファイバー懸濁液に栄養源と麹菌胞子を加え凍結乾燥した後同様に複合状態を確認した。

### 3) 複合物の有害物質分解能評価

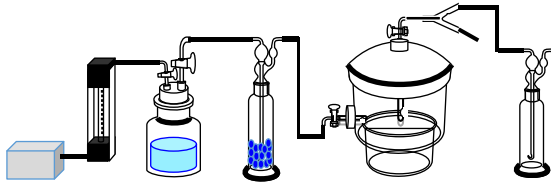
#### ① 液相中の分解性評価

所定の溶液濃度の有害物質、ホルムアルデヒド、アクリルアミド、ジオキサン、テトラヒドロフラン、ダイオキシン疑似物質 (RBBR) 等に複合物を浸漬させ、溶液中の濃度減少量から吸着分解率を求めた。

#### ② 気相中の分解評価

特に有害なホルムアルデヒドに対して気相中の吸着分解装置を作製した。ホルムアルデヒド溶液に空気を接触させ、デシケータ内で濃度と湿度を一定にした後、複合物を接触させ、その後の気相中

の濃度変化を測定した。(下図 1 参照)



#### 4. 研究成果

##### 1) 麹菌の有害物質分解能とその耐性

麹菌が分解可能な有害物質は、ホルムアルデヒド、ジオキサン、ギ酸、テトラヒドロフラン、アクリルアミド、等多種に及んだ。中でも最も有害性の強いホルムアルデヒドをターゲットに詳細な分解能を調べた。耐性濃度は 500 ppm 以上であり、環境排出基準の 2000 倍の 200 ppm のホルムアルデヒド溶液を 7 日間で 0 ppm まで浄化した。

##### 2) 麹菌と生分解高分子の複合法

麹菌と生分解性高分子の付着性を評価しその後、それらをナノファイバー多孔質体に応用した。図 2 に生分解性高分子多孔質体への麹菌の付着観察結果を示す。

| Size<br>Contents<br>of salt<br>(vol %) | Size               |                      |                           |
|--|--------------------|----------------------|---------------------------|
|  | Small<br>(20~53μm) | Middle<br>(53~106μm) | Large<br>(106μm and over) |
| 20%                                    |                    |                      |                           |
| 40%                                    |                    |                      |                           |
| 60%                                    |                    |                      |                           |

図 2 各種多孔質体への麹菌の付着

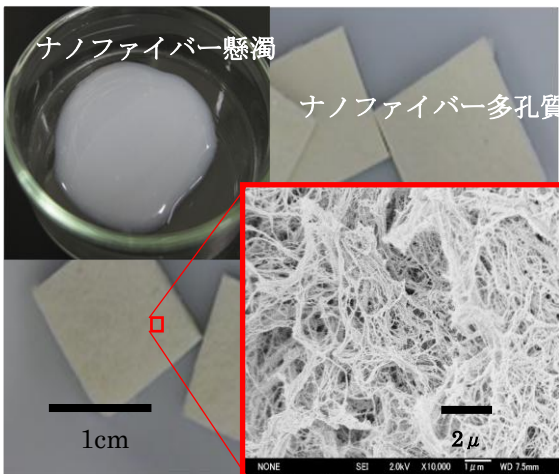


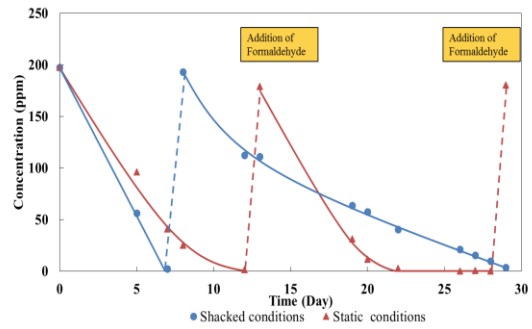
図 3 ナノファイバー懸濁液からの多孔質体の作製

空効率が 60% でかつ 20~50 μm の孔径を有する多孔質体への麹菌の付着が著しく強固であった。そこで、キトサンナノファイバー懸濁液から同様の形状の多孔質体を作製した。(図 3)

#### 3) 複合物の有害物質分解能評価

##### ① 液相中の浄化能

図 3 に示した麹菌/キトサンナノファイバー多孔質体を 200 ppm のホルムアルデヒド溶液に浸漬した場合の濃度変化を下図 4 に示した。



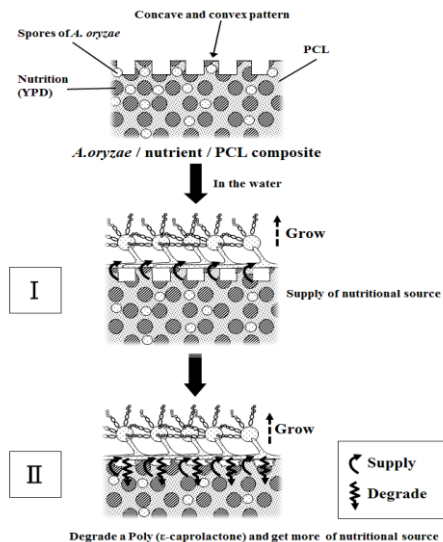
振とうした場合の方が静置した場合より解速度が速く 7 日後には濃度がゼロとなった。また、麹菌の菌体外酵素ではホルムアルデヒドは分解せず、菌体内酵素による分解、その後ギ酸に変換された後、デヒドロキナーゼによりギ酸も分解されることが分かった。したがって、麹菌が生育している間は浄化能が維持されることが分かった。他の有害物質も同様に分解が確認された。

##### ② 気相中の浄化

図 1 に示した気相分解装置で ~50 ppm のホルムアルデヒドの気体が得られた。気体の場合、24 時間後に濃度がほぼゼロとなった。気相での吸着に優位性が認められたが、その後の分解が律速であった。

##### ③ 長期使用可能な複合物の作製と浄化能

長期に麹菌を生育させるために麹菌の培地成分を多孔質体に混練した。その構造を下図 5 に示した。



麹菌/生分解性高分子複合物に培地と胞子を混練することで麹菌の長期生育が可能になる。この多孔質体の表面で麹菌が発芽して付着し、浄化を行い、生分解性高分子の分解と共に内部の培地成分が溶出し長期に麹菌を生育させることを可能にした。その結果、100日以上繰り返し、200ppmのホルムアルデヒド溶液の長期浄化が行えることが分かった。(下図6)

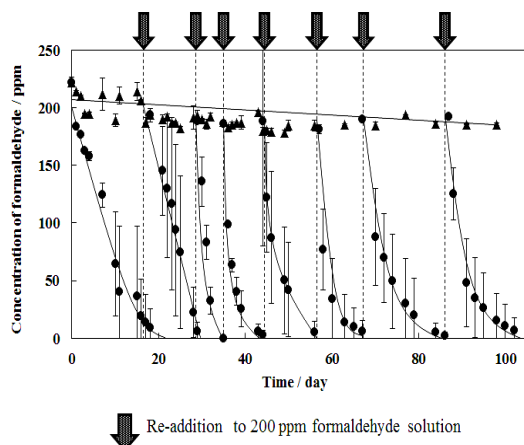


図6 培地を添加した複合物の浄化能

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

- ① Ikuhiro Tanida, Asami Sakaue, Satoshi Osawa, Development of a safe solid-state microorganism / biodegradable polymer composite for decomposition of formaldehyde, J. Polym. Environ., 査読有, DOI 10.1007/s10924-014-0644-0, 2014, pp1-7
- ② Yuki Yoshikawa, Takefumi Narita, Satoshi Osawa, A chitosan nanofiber suspension wound-healing dressing provides sustained release of a therapeutic agent, Kobunshi Ronbunshu, 査読有 Vol.70, No.11, 2013, pp.668-673
- ③ Ikuhiro Tanida, Yoshinari Moriguchi, Takefumi Narita, Shinnich Ohashi, Satoshi Osawa, Degradation of Formaldehyde and formic acid by *A.oryzae* immobilized on a micro-patterned surface of a biodegradable polymer, Kobunshi Ronbunshu, 査読有 Vol.70, No.9, 2013, pp.502-509
- ④ 尾関健二, 麹菌グルタミン酸デカルボキシラーゼ遺伝子の発現様式の検討, ビタミン, 査読有, Vol. 86, No. 9, 2012, pp. 508-514
- ⑤ 尾関健二, 麹菌が「国菌」として認識される必要性について、日本醸造協会誌、査読有、Vol. 106, No. 8, 2011, p505

〔学会発表〕(計6件)

- ① 北村龍一, 坂上朝美, 谷田育宏、堂本光子、佐野元昭、大澤 敏、キトサンと麹菌を複合化した安全な環境浄化材料による液相・気相における有害物質の分解、第65回日本生物工学会年次大会、2013年9月19日
- ② 赤木 優, 高田優有子、谷田育宏、大澤 敏、キトサンとHap-TiO<sub>2</sub>複合物による有害化学物質の吸脱着と分解性評価、第65回日本生物工学会年次大会、2013年9月19日
- ③ 尾関健二、麹菌アミノ酸トランスポーターの機能解析、日本農芸化学会、2013年3月25日
- ④ 高田優有子、吉田 宏司、大澤 敏、シクロデキストリンと酸化チタンを複合化した高分子多糖による有害物質の吸着と分解、第64回日本生物工学会年次大会、2012年10月25日
- ⑤ 坂上朝美、間井幸弘、谷田育宏、大澤 敏、菌/生分解性高分子複合多孔質体によるホルムアルデヒドの分解、第64回日本生物工学会年次大会、2012年10月25日
- ⑥ Kenji Ozeki, Development of acrylamide-free ready-to-drink coffee by *Aspergillus oryzae*, The 24th international conference on coffee science, 2012, November, 12

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: アクリルアミド分解性セルフクローニング麹菌

発明者: 尾関健二

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特許公開番号 2013-158289

出願年月日: 2013年08月19日

国内外の別: 国内

〔その他〕

新聞報道

2012年6月1日 除染フィルム開発に着手

北國新聞

2012年3月11日 自然から最新技術学ぶ

北國新聞

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

大澤 敏 (OSAWA Satoshi)

金沢工業大学・バイオ・化学部・教授

研究者番号: 50259636

(2) 研究分担者

尾関健二 (OZEKI Kenji)

金沢工業大学・バイオ・化学部・教授

研究者番号: 40410287