

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24310052

研究課題名(和文) CO₂からメタノールを直接合成するカプセルリアクター型人工光合成システムの構築研究課題名(英文) Fabrication of Capsule Reactor Type Artificial Photosynthesis System for the Direct Formation of Methanol from CO₂

研究代表者

鈴木 昇 (SUZUKI, Noboru)

宇都宮大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40134259

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,300,000円

研究成果の概要(和文)：光エネルギーと酵素を利用した人工光合成システムが注目されている。本研究では、光触媒である亜鉛ポルフィリンを壁膜に固定し、コアに光に弱い酵素を内包したマイクロカプセル型反応容器を開発し、二酸化炭素からメタノールを合成することを最終目的として、カプセル調製法と酵素反応特性を検討した。その結果、アルギン酸と3-(2-アミノエチルアミノ)プロピルトリメトキシシランから酵素固定化率の高いカプセルの調製に成功し、カプセル中で二酸化炭素からギ酸の生成に成功した。さらに、 κ -カラギーナンとアミノプロピルトリエトキシシランから、繰り返し活性を保持するカプセルの調製に成功し、かつ少量のメタノール合成が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Photochemical enzymatic synthesis has received considerable attention for artificial photosynthesis. In this work, the preparation of novel photoactive organic-inorganic hybrid microcapsules with photosensitizer and enzyme for visible-light driven photoenzymatic synthesis was studied. In this system, light energy converts to chemical energy through a visible-light induced electron-transfer (ET) from excited zinc tetraphenyl-porphyrin (ZnTPP) located in a capsule shell to a redox enzyme inside the capsule with the assistance of methyl viologen (MV) as an electron mediator. Consequently, higher encapsulation yield of enzyme was achieved by alginate and 3-(2-aminoethylamino)propyltrimethoxysilane based capsules, and the formate was formed from carbon dioxide. Also, using κ -carrageenan and 3-aminopropyltriethoxysilane based capsules followed by the crosslinking with glutaraldehyde had the reusability and the experimental results suggested the formation of a small amount of methanol.

研究分野：工業物理化学

キーワード：人工光合成 マイクロカプセル 酵素 光触媒 電子伝達物質 二酸化炭素 メタノール

1. 研究開始当初の背景

光エネルギーを化学エネルギーに変換する光合成は、環境に調和した工業プロセスとして関心が高い分野である。光合成プロセスの一つに、光触媒と酵素の複合した電子伝達系がある。酵素は穏和な条件で反応が行えるほか生成物選択性が高いことから、電子伝達物質を介して光触媒と酵素を複合した反応系が検討されてきた⁽¹⁾。これまでに CO₂ や窒素の固定、メタノール合成、水素製造などの興味深い反応系が見出されたが、酵素は一般に光に弱いために工業プロセスへの応用が進んでいない。

我々は、電子伝達系の上述の問題が生じる理由は、光触媒と酵素を同一反応場で利用するために起きていることに着目した。この観点から、電子伝達系を構成する酵素だけを光から保護して「暗反応」として進行させるシステムを構築できれば良いとの着想に至った。これによって光エネルギーを利用して目的生成物を選択性良く合成できる人工光合成反応器システムの構築が可能になると期待される⁽²⁾。そこで、光を透過しない膜を有するマイクロカプセルの利用を考えた。光を透過しないカプセルで内部の酵素を保護し、かつ電子伝達物質を介してカプセル膜に固定化した光触媒と酵素を接続することで、光触媒と酵素をそれぞれ明反応と暗反応に分離して機能させる。さらに、カプセルを 2D 配列した平板型マイクロリアクターを構築できれば、受光面を大きくでき、温度制御やスケールアップが容易である等の利点がある。

2. 研究の目的

本研究では、図 1 に示すような 4 つの酵素 (ジアホラーゼ (DAH)、ギ酸脱水素酵素 (FDH)、アルデヒド脱水素酵素 (AldDH)、アルコール脱水素酵素 (ADH)) とニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD⁺/NADH) を内包したマイクロカプセルの作成を検討し、水不溶性の亜鉛ポルフィリン (ZnTPP) 光触媒で光励起した電子を 4 つの酵素反応に利用し、CO₂ を原料としてメタノールを生産する人工光合成カプセルを創製することを最終目標とした。

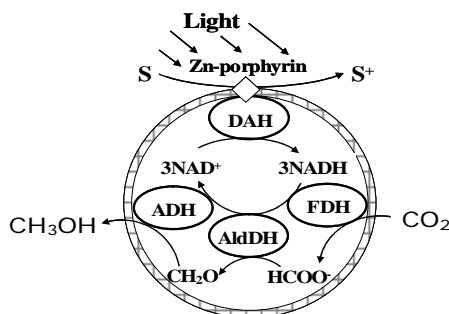


図 1 人工光合成カプセルの概念図

3. 研究の方法

(1) アルギン酸を用いたカプセルの調製と反応系を構成する各プロセス機能の確認

酵素を固定化するためのカプセルの壁膜材料としてアルギン酸系ゲルを検討し、酵素固定化率や壁膜からの酵素漏洩に関して検討した。また、カプセルに複数の酵素を固定化したときの各反応プロセスが十分に機能することの確認を行った。

(2) 高耐久性カプセルの調製とメタノール合成への利用

アルギン酸系カプセルでは、カプセル壁が比較的崩壊し易いことが判明し、その対策として -カラギーナン系のカプセルを調製し、その有効性を確認するとともに、メタノール合成反応に利用し、人工光合成プロセスへの適用可能性を検討した。

4. 研究成果

(1) 光触媒/アミノシラン-アルギン酸複合カプセル(P-AEAカプセル)調製方法

カプセル調製時のコア液として、7.5wt% polyvinylpyrrolidone (PVP), 0.1M の 3-(2-aminoethyl-amino)propyltrimethoxysilane (AAPTS), 0.05M 塩化カルシウム (CaCl₂) を含む 0.05M HEPES 溶液を調製した。光触媒としての亜鉛ポルフィリン (ZnTPP, 2mg) を懸濁して良く攪拌した 1(w/v)%アルギン酸ナトリウム水溶液 9ml にコア液を滴下し、開始から 6 分後にカプセル (P-AEA カプセル) を回収した。酵素のカプセルへの内包はコア液に予め酵素を添加することで行った。

その結果、P-AEA カプセルでは、FDH の固定化率が pH6~7 でほぼ 100% となり、アミノシラン-アルギン酸複合カプセルが優れた酵素固定化単体であることを確認した。

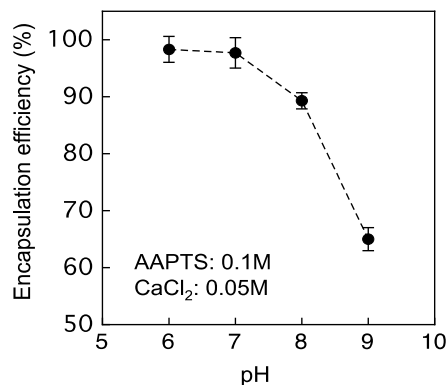


図 2 FDH 酵素固定化率の pH 依存性

(2) カプセル調製法の改良とメチルビオロゲンの還元

当初、光触媒/アミノシラン-アルギン酸複合カプセルを用い、電子伝達物質であるメチルビオロゲン (MV²⁺/MV⁺) を用いずに DAH の作用で、NAD⁺を NADH に還元することが可能であるとの結果を UV スペクトル分析で得たが、得られた NADH の活性が無いことから

種々検討し、最終的に NADH の 2 量体が得られていることを確認し、MV が必要であることが分かった。

そこで、カプセル調製法を含めて反応系の改良を検討し、界面活性剤である Tween20 を亜鉛ポルフィリン - アルギン酸ナトリウム溶液に予め加えてから、コア液を滴下することで新規の P-AEA カプセルを調製した。次に、石英セルにトリエタノールアミン (TEOA)、メチルピオロゲン酸化体 (MV^{2+}) 10mM を含む 0.05M HEPES 緩衝液 (pH7.0) 3mL と P-AEA カプセルを数個加え、この溶液に N_2 ガスを 1 時間通気した後にセルを密閉した。そして、赤外・紫外光のカットフィルターを設置した 150W キセノンランプで光照射を行った。その結果、還元体である MV^+ 特有の青色がカプセル内で確認され、かつカプセル外部にも青色が徐々に拡散した。したがって、カプセル膜に固定した ZnTPP が光触媒として機能することを確認することができた。

(3) 電極還元 MV^+ を用いた酵素反応による NADH およびギ酸の生成実験

MV^+ の濃度が低いと、本系での実験が十分に確認できない可能性があったため、電極還元で得た比較的高濃度の MV^+ を用いて NADH およびギ酸の生成実験を行った。石英セルにニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD^+) 1mM を含む 0.05M HEPES 緩衝液 (pH7) 1mL を調製し、DAH と FDH を内包した AEA カプセルを数粒加えた後、 CO_2 ガスを 1 時間通気した。次に、これに電極還元した MV^+ を加えた後セルを密閉し反応を開始させた。生成した NADH は UV-vis 分光光度計で 340nm の吸光度で測定した。生成したギ酸は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で測定した。結果を図 3 に示すように、NADH およびギ酸の濃度が時間とともに増加している。比較のため酵素なしの系でも実験し、NADH もギ酸も生成しないことを確認した。したがって、カプセルに内包した酵素反応プロセスが機能することを実証した。

(4) 人工光合成システムによる NADH およびギ酸生成実験

上記実験の成果を受けて、光触媒反応からギ酸生成反応までの一貫したプロセスによるギ酸生成実験を行った。石英セルに TEOA 0.3M, MV^{2+} 25mM を含む 0.1M HEPES 緩衝液 (pH7.0) 1mL を調整し、DAH 50 U/mL, FDH 20 U/mL を内包した P-AEA カプセルを数粒加えた。その後、溶液の脱気および CO_2 飽和溶液とするために CO_2 パージした。さらに、外気との接触を避けるため流動パラフィンで液面を覆った。次に、溶液を穏やかに攪拌しながら、赤外・紫外光カットフィルターを設置した 150W キセノンランプを用いて光照射を行った。ギ酸の生成は、この溶液から所定時間ごとに 50 μ L 採取し、1M HCl 10 μ L と良く混合させ遠心分離した後、親水性 PTFE シリンジ

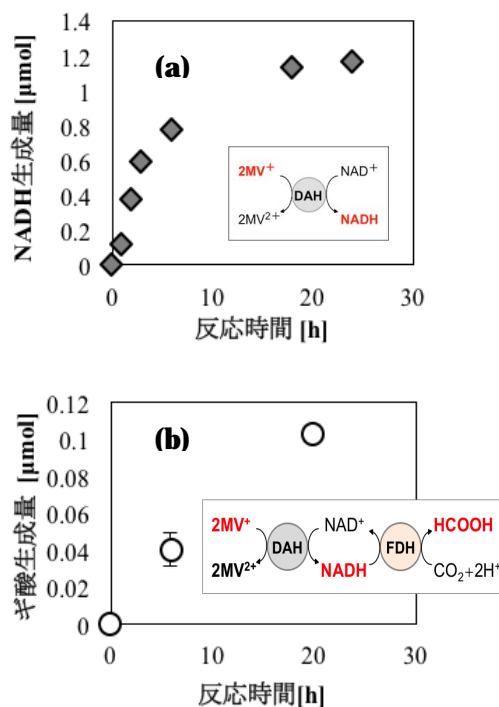


図 3 電極還元 MV^+ を用いた (a) NADH および (b) ギ酸生成実験

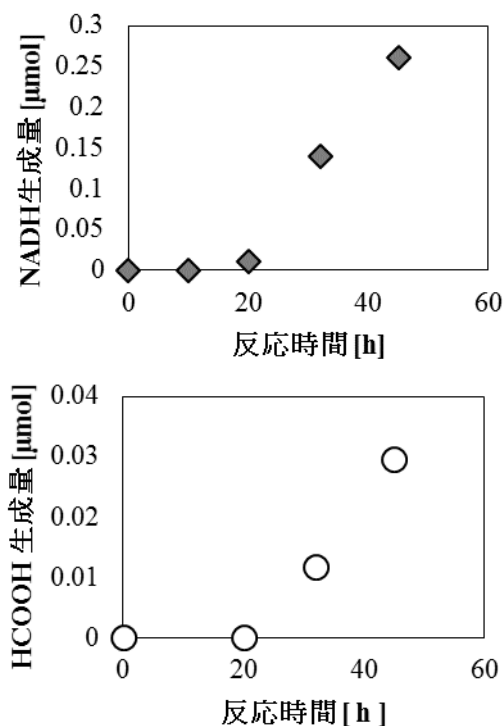


図 4 人工光合成システムにおける (a) NADH および (b) ギ酸生成実験

フィルターでフィルタリングしてから得られた溶液 20 μ L を HPLC に打ち込み、測定した。NADH の生成は、所定時間ごとに 100 μ L 採取し、5 倍希釈した溶液を UV-vis 分光光度計で 340nm の吸光度を測定した。結果を図 4 に示す。NADH およびギ酸の両者ともに、約 20 時間から生成し始め、更なる時間とともに

濃度が増加していることが認められた。このようなラグタイムの原因として、光照射からしばらくの間は、光還元で供給される MV⁺の生成量が十分でなく NADH 生成反応が遅いこと、および NADH がカプセル内部で生成し、膜を透過して溶液に拡散するまでに時間がかかること、さらにギ酸を触媒する FDH 酵素反応は、NADH がある程度生成しないと進行しないためと考えられる。

(5) α-カラギーナンとアミノプロピルトリエトキシシランを複合した新規有機/無機ハイブリッドカプセルの調製と酵素固定化

アルギン酸系カプセルにおいて、炭酸水素ナトリウムやカルシウムキレート剤溶液中でカプセル壁が崩壊（溶解）してしまうことから、より耐久性の高いカプセルの調製を目的として、α-カラギーナンに着目した。

FDH を 1.4U/mL になるように溶解した 1% (w/v) α-カラギーナン水溶液 0.4mL を調製し、この溶液 0.4mL をシリンジを用いて水 2.5mL、0.1M HCl 1.2mL、アミノプロピルトリエトキシシラン (APTES) 0.3mL を混合した溶液 4mL に滴下して A-Car カプセルを得た。次に A-Car カプセルを 0.25% (v/v) グルタルアルデヒド (GA) 水溶液 3mL に 20 分間浸漬させることでアミノ基同士を架橋した G-Car カプセルを得た。これら 2 種類のカプセルの FDH 活性をギ酸脱水素反応における正反応で確認した。その結果、両者で活性が確認されたが、A-Car カプセルでは、繰り返し実験で徐々に活性が低下し、これは酵素の漏えいであることが分かった。一方、G-Car カプセルでは、繰り返し実験で活性が低下しないことが確認されたが、反応速度が A-Car と比較して大きく減少することが分かった。これは、GA 架橋による壁膜の緻密化が基質拡散速度に影響を与えたためと考えられる。なお、α-カラギーナンと APTES からのカプセル調製は世界初である。

(6) α-カラギーナン/APTES 系有機/無機ハイブリッドカプセルを用いた CO₂ からのメタノール合成

FDH、AlcDH、ADH の 3 種の酵素を内包した G-Car カプセルを調製し、炭酸ナトリウムと 0.1M NADH を含む HEPES 緩衝液中に浸漬させ、CO₂ バブリングを十分に行った後に NADH 濃度を追跡し、酵素無しの反応系での濃度と比較した結果、NADH がかなり減少していることから、CO₂ からのメタノール合成の可能性を示唆した。これについては現在研究を進めている。

(7) 成果のまとめ

本研究では、最終目標であるリーフ型の人工光合成システムの構築まで至らなかったものの、カプセル型人工光合成反応器に関して多くの知見を得ることができた。その成果を簡潔にまとめると以下の通りである。

1) アルギン酸あるいは α-カラギーナンとアミノシラン系カップリング剤である APTES から、酵素固定化が可能なカプセルの調製に成功した。

2) ZnTPP 光触媒/メチルピオロゲン/ジアホラーゼ/ギ酸脱水素酵素系のアルギン酸系カプセル中で、二酸化炭素からギ酸の生成に成功した。

3) α-カラギーナンと APTES を複合した新規有機/無機ハイブリッドカプセルを世界で初めて調製し、その有効性を確認した。

<引用文献>

(1) D. Mandler, et al. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, (1988) 997.

(2) F. Kurayama, S. Suzuki, N. M. Bahadur, T. Furusawa, H. Ota, M. Sato, N. Suzuki, *Journal of Materials Chemistry*, **22**(30) (2012) 15405-15411.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

【解説】倉山文男, 古澤毅, 佐藤正秀, 鈴木昇, 有機-無機マイクロカプセルへの酵素等のナノ触媒の固定化, 化学工業, **66**(1) (2015), 46-50.

[学会発表](計 5 件)

太田元, 木藤潤成, 倉山文男, 古澤毅, 佐藤正秀, 鈴木昇: アミノシラン-アルギン酸複合カプセルの調製と光触媒/酵素複合系人工光合成への応用, 第 78 回化学工学会年会, 2013 年 3 月 17-19 日, 大阪大学(大阪府・豊中市) 倉山文男, 田村弘幸, 江田沙也加, 古澤毅, 佐藤正秀, 鈴木昇: 酵素を内包した有機-無機ハイブリッドビーズの新しい作成法, 第 79 回化学工学会年会, 2014 年 3 月 18-20 日, 岐阜大学(岐阜県・岐阜市).

F. Kurayama, H. Tamura, S. Miyamoto, K. Kimura, T. Furusawa, M. Sato, N. Suzuki, Preparation of photoactive organic-inorganic hybrid microcapsules with zinc porphyrin and enzyme, 2014 International Conference on Artificial Photosynthesis (ICARP2014), 2014 年 11 月 24-28 日, 淡路夢舞台国際会議場(兵庫県・淡路市)

田村弘幸, 倉山文男, 古澤毅, 佐藤正秀, 鈴木昇: 亜鉛ポルフィリン/酵素複合型マイクロカプセルを用いた人工光合成の検討, 化学工学会群馬大会, 2015 年 11 月 27-28 日, 桐生市市民文化会館(群馬県・桐生市)【特別賞受賞】

宮本翔, 田村弘幸, 倉山文男, 古澤毅,

佐藤正秀, 鈴木昇: -カラギーナンと
シランカップリング剤による新規カプ
セルの調製, 化学工学会第 81 回年会,
2016 年 3 月 13-15 日, 関西大学 (大阪
府・吹田市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 昇 (SUZUKI, Noboru)
宇都宮大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 4 0 1 3 4 2 5 9

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

佐藤 正秀 (SATO, Masahide)
宇都宮大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 1 0 2 6 1 5 0 4

古澤 毅 (FURUSAWA, Takeshi)
宇都宮大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号: 5 0 3 7 5 5 2 3

(4) 研究協力者

倉山 文男 (KURAYAMA, Fumio)