

気相反応及び減水系反応における生体触媒の利用

平成26年

森川 豊

目 次

第1章 序章

- 1.1 バイオプロセスの産業利用
- 1.2 室内環境問題への生体触媒利用
- 1.3 植物性バイオマス利用への生体触媒利用
- 1.4 本論文の構成
- 1.5 参考文献

第2章 ホルムアルデヒド分解カビの同定と性能評価

- 2.1 はじめに
- 2.2 実験方法
- 2.3 実験結果及び考察
- 2.4 結言
- 2.5 参考文献

第3章 ホルムアルデヒド分解カビ *Paecilomyces variotii* 由来のアルコール酸化酵素の精製と性能評価

- 3.1 はじめに
- 3.2 実験方法
- 3.3 実験結果及び考察
- 3.4 結言
- 3.5 参考文献

第4章 固定化酵素を用いたホルムアルデヒド除去用バイオフィルタの開発

- 4.1 はじめに
- 4.2 実験装置及び実験方法
- 4.3 実験結果及び考察
- 4.4 結言
- 4.5 参考文献

第5章 酵素糖化を目的としたセルロース系バイオマスの連続粉碎

- 5.1 はじめに
- 5.2 実験装置及び実験方法
- 5.3 実験結果及び考察
- 5.4 結言

5.5 参考文献

第6章 セルロース系バイオマス由来の高濃度糖化液の取得

6.1 はじめに

6.2 実験方法

6.3 実験結果及び考察

6.4 結言

6.5 参考文献

第7章 終章

研究業績

謝辞

第1章 序章

1. 1 バイオプロセスの産業利用

動植物や微生物など、生物が有する優れた機能を産業に活用するバイオプロセスは、近年のものづくりには必要不可欠となっている。バイオプロセスは、酵素や細胞などが有する生物由来の反応を用いる為、その多くが低温の水系反応を用いる。そのため、生産工程は低エネルギー消費、低環境負荷、安全安心の確保などの要求に適応することができる。

バイオプロセスは、生物工学の発展に伴い応用する産業が広がっている。醸造等の食品産業や環境浄化関連では古くから用いられている。また、農産品の育種、改良や植物由来の有用物質生産などの分野においても応用されている。近年では、遺伝子工学や組織培養の進歩により、製薬、再生医療分野などにまで用いられ、バイオプロセスは次世代の産業を担う可能性が高く大変重要になっている。

バイオプロセスの効率化を図るためには、目的の反応を行う高性能な生体触媒を最適な方法で用いることが求められる。微生物を例にとると、核酸の分析に基づいた類推から、1 g の土壌の中には 13,000 種類の 10 億にも及ぶ膨大な数の細菌が存在するであろうといわれている (Gans *et al.*, 2005)。高性能な生体触媒は、新規な微生物のスクリーニングにより見出す可能性は十分にある。また、紫外線照射などによる変異株の作成や遺伝子工学の応用も進んでいる。

現状で最も利用例が多い微生物のバイオプロセスは、環境浄化と有用物質生産に大別できる。環境浄化の場合、自然界で分解者として生態系のバランスを取っている微生物の機能をそのまま応用している例が多く、排水処理やメタン発酵、及び堆肥製造などがある。有用物質生産の場合、アルコール、クエン酸などの有機酸やグルタミン酸などのアミノ酸、及びペニシリンなどの薬品といった微生物の代謝系を応用した非常に多くの生産物を得ることに活用されている。ここ数年は、脱石油製品化に向けたバイオマス利活用を目的とした糖類の生産や、バイオ燃料、バイオマス由来のプラスチック等の開発事例が多くみられる (Elliott 2004, Watanabe *et al* 2009)。

酵素や微生物などの生体触媒は、本来水溶液中に存在するため、上記の様な従来のバイオプロセスは、基質が水溶液として存在する反応に用いられることが多いため水を使用する反応系での産業化が行われてきた。疎水系の有機溶媒中での

酵素反応は、有機合成反応に関する事例と油の分解を除くとほとんどの場合溶媒として水溶液を用いる。

一方最近の研究で、酵素は周辺に微量な水分が存在すれば、酵素活性を失うことなく反応を触媒できることが解ってきた。実際に殺菌用 HEPA フィルタや空気清浄機用に開発した酵素フィルタなど、酵素固定化方法を用いた気相反応、微水系の反応系が実用化されつつある (Isomae, 2004、Takakura *et al.*, 2004)。

環境中に希薄な濃度で存在する空気室の汚染や、バイオエタノール生産の様に反応後に水を取り除く必要のあるプロセスでは多くの水を用いることは好ましくない。このような場合気相中の極微量の水を酵素近傍に集めて反応させる必要がある。例えば、固定化担体に吸水性を持たせたり、有機溶媒が多い減水系環境を用いたりすることで酵素近傍に基質と水が集まり濃縮される (Figure 1-1)。揮発性の基質の場合、気相中に存在する基質が対象になる。酵素が失活しない程度にまで減水させた系で酵素反応を実行すれば、バイオプロセスの応用範囲は大幅にこれまで以上に広がることになる。

1. 2 室内環境問題への生体触媒利用

室内、車内、学校や公共建築物などの居住空間に存在する化学物質の影響が原因でおこる健康被害はシックハウス症候群 (SHS : Sick House Syndrome)、シックカー症候群 (Sick Car Syndrome)、シックスクール症候群 (Sick School Syndrome)として社会問題となっている。SHS という言葉は 1970 年代にアメリカで使われ出したシックビル症候群が、化学物質過敏症と相まって使われ出したと言われる比較的新しい環境用語である。シックカー症候群やシックスクール症候群となるとさらに最近の問題になる。

SHS の原因は、住宅の問題、生活様式の問題、及び大気汚染の問題などがあるとされている。住宅の問題は、高气密化や高断熱化や新建材と言われる合板や集成材などに含まれる化学物質がある。また、生活様式の問題には、冷暖房器具の普及による換気回数の減少や、化粧品や防虫剤、その他スプレー剤などの化学物質を室内に持ち込むことがある。

SHS を引き起こす可能性がある化学物質は、主として揮発性有機化合物 (VOC) などとされる。厚生労働省は、SHS に関する検討会を設置し、住宅内の

空気質調査を元に、物質の人体に対する影響を考慮して 13 種類の揮発性有機化合物と総揮発性有機化合物（TVOC）とに関する、濃度指針値を示している（Table 1-1）。それに準拠する形で、自動車工業会から車内空間の指針値、文部科学省では学校内での指針値が出されている。また、2003 年に建築基準法が改正されるなど発生源に対する具体的な対策も取られている。

VOC の中でホルムアルデヒドは、目や鼻などの粘膜刺激性など人体への影響の強さと、製品や空間内での残留期間の長さから国内外で SHS 対策の最も重要な対象とされてきた。

ホルムアルデヒドは、家具や建材の接着剤、防腐剤など様々な用途で用いられ、居住空間内に持ち込まれている。接着剤の未反応物がゆっくりと放散し、体空気比重が 1.075 と重いことから空間内で滞留しやすく、長期にわたり問題となる。椅子や机などから簡単に放散しきらないために、現在でも、ホルムアルデヒドが原因で施行後の学校関連施設や家がすぐに使用できないといった問題がおきている。

ホルムアルデヒド対策は、建築基準法、JIS や JAS による接着剤、塗料や集成材の規格設定など発生源を抑えるもの、各種キャッチャー材開発による吸着によるもの、及び各種触媒等による分解によるものがある。空間内の残留期間が長いホルムアルデヒドの対策は、吸着再放散の無い分解除去が望ましく、様々な開発が行われている。各種のホルムアルデヒド分解方法は、電気や光のエネルギーを必要とし、分解基質も特定されないため有害物質を発生し二次汚染を引き起こすことが危惧されている。一方、生体触媒は反応に電気や光のエネルギーを必要とせず、二次汚染の危険性も低い。これらの理由から、バイオプロセスを用いた居住空間の安全性、快適性確保への開発が期待され、ホルムアルデヒド除去能を有する植物の利用や固定化生体触媒を用いた空気清浄機やマスクの利用に関する開発が行われている。

1. 3 植物性バイオマス利用への生体触媒利用

エネルギーや物質資源が少ないわが国では、太陽エネルギーを用いて有機物を合成できる植物性バイオマスの利活用は不可欠となっている。植物性バイオマスは、光合成により空気中の二酸化炭素を固定化するため、脱化石資源や地球温

暖化対策が望まれるなかカーボンニュートラルな素材としても注目されている。

木や草などの植物性バイオマスの主成分はセルロースである。セルロースは自然界で最も量が多い有機物であり、その構成成分は糖であるグルコースからできている。従来、セルロースからグルコースを得るプロセスには、硫酸などの鉱酸が用いられてきたが、環境汚染や中和に要するエネルギーの問題から、酵素を用いるバイオプロセスへの変換が行われている。

グルコースの利用にはバイオプロセスが不可欠であり、主としてバイオエタノールに代表されるエネルギー利用が世界的に行われている。また、アセトン・ブタノール発酵によるエネルギー、マテリアル利用の開発も古くから行われている。最近では、ポリエチレンやポリプロピレンへの変換、バイオビルディングブロックの生産など脱石油化によるマテリアル開発が将来にむけて行われている。

セルロース由来のグルコースを産業利用するためには、安価な石油化学製品と競争できるような低価格化が望まれている。製品製造に関する工程を粉碎、蒸気処理などの前処理工程、セルロースからグルコースを得る糖化工程、及びグルコースをエタノールなどの製品に加工する工程に大別すると、各工程においてバイオプロセスが関与する。エタノール生産を例にして酵素糖化を用いる場合、前処理工程と蒸留などの製品加工工程にエネルギーコスト削減効果が大きいとされている (Saga *et al.*, 2009)。水分量を減らして生産物濃度を高めることがコスト削減のためには極めて重要であり、セルロースの糖化を減水系で実行することで、高濃度の糖液を得ることができる減水系バイオプロセスの開発は大きな意義がある。

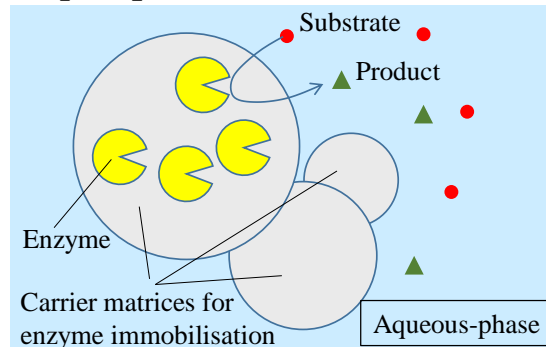
1. 4 本論文の構成

本研究は、気相反応あるいは減水系反応で構成されるバイオプロセスを用い、環境浄化と植物性バイオマス利用についての応用開発を試み、その有用性を示すことを目的とした。

本論文は7章からなり、1章は序章としてバイオプロセスと本研究背景を概説した。2章から4章では、新規に検索した微生物から取得した酵素を用い、固定化酵素を使った気相系反応でホルムアルデヒド除去に関する水処理と室内環境浄化用固定化酵素フィルタの有用性を示した。そして、5、6章では植物性バイ

オマス由来のセルロースから減水系反応で効率良くグルコースを得るバイオプロセスの有用性を示した。最後に7章として全体を総括した。

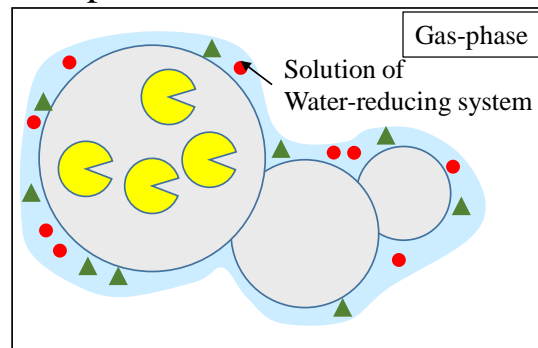
Liquid phase reaction (Conventional method)



Catalytic reaction is carried out with immobilized enzymes invested into an aqueous solution (aqueous-phase).

- Low enzyme concentration
- Low substrate and production concentration

Gas-phase reaction and water-reducing reaction



Catalytic reaction is carried out with immobilized enzymes invested into an water-reducing system or gas-phase.

- High enzyme concentration
- Low substrate and production concentration
- Evaporation of the aqueous solution is easy (Purification of the product is low-cost)
- Easy use of the volatile substrate

Figure 1-1 Benefits of gas-phase reaction and water-reducing reaction

Table 1-1 Materials that had been formulated a guideline value
(<http://www.nihs.go.jp/mhlw/chemical/situnai/hyou.html>)

Materials	guideline values for indoor air ¹	Indicators of toxicity	Enactment day
	[$\mu\text{g}/\text{m}^3$]		
Formaldehyde	100 (0.08ppm)	Irritation to the nasopharyngeal mucosa in human inhalation exposure test	1997.6.13
Acetaldehyde	48 (0.03ppm)	Effect on the nasal olfactory epithelium in the respiratory tract after exposure test of rat	2002.1.22
Toluene	260 (0.07ppm)	Effects on reproductive development and neurobehavioral function in human inhalation exposure test	2000.6.26
Xylene	870 (0.20ppm)	Effects on the central nervous system development of children born in a pregnant rat inhalation exposure test	2000.6.26
Ethylbenzene	3800 (0.88ppm)	Effects on the kidney and liver in inhalation exposure tests in rats and mice	2000.12.15
Styrene	220 (0.05ppm)	Effects on the liver and brain in inhalation exposure test in rats	2000.12.15
Paradichlorobenzene	240 (0.04ppm)	Effects on the kidney and liver in oral exposure test of beagle dogs	2000.6.26
Tetradecane	330 (0.04ppm)	Effects on the liver in rats oral exposure test of C8-C16 mixture	2001.7.5
Chlorpyrifos	1 (0.07ppb)	Morphological effects on the newborn brain and nerve development of the newborn by the mother rat oral exposure test	2000.12.15
	0.1 (0.007ppb) for infant		
Fenobucarb	33 (3.8ppb)	Effect on cholinesterase activity by oral exposure test in rats	2002.1.22
Diazinon	0.29 (0.02ppb)	Effects on red blood cells and plasma cholinesterase activity by rat inhalation exposure test	2001.7.5
Di-n-butyl phthalate	220 (0.02ppm)	Effect on structural abnormalities of the genital tract of the newborn due to oral exposure test of mother rats	2000.12.15
Di-2-ethylhexyl phthalate	120 (7.6ppb)	Histopathological effects on the testes by the oral exposure test in rats	2001.7.5

¹ In the case of 25 °C

1. 5 参考文献

Elliott DC., "Biomass, Chemicals from." In *The Encyclopedia of Energy*, vol. 1, 163-174(2004)

Gans, J., M. Wolinsky, and J. Dunbar, "Computational Improvements Reveal Great Bacterial Diversity and High Metal Toxicity in Soil", *Science*, Vol. 309(5739), 1387-1390(2005)

Isomae. K., "Green Technology Bactericidal Enzyme Filter", *BIOINDUSTORY*, 21 (10), 14-21(2004)

Saga K., S. Fujimoto, T. Yanagida, C. Tada, B. L. Yuriyivna, B. Elmer and T. Minowa, "Comparative Evaluation of Ethanol Production Process from Cellulosic Biomass with Different Pretreatment and Saccharification Method", *Jornal of Japan Society of Energy and Resources*, Vol30(2), 9-14(2009)

Takakura, A., D. Tanaka, Y. Nakajima, K. Miyazawa, N. Awazu, K. Asada and I. Kato, "Allergen Inactivating Filter Coated with Hyperthmostable Protease", *BIOINDUSTORY*, 21 (10), 7-13(2004)

Watanabe T., M. Samsuri, R. Amirta, N. Rhamawati, Syafwina, B. Prasetya, T. Tanabe, Y. Ohashi, T. Watanabe, Y. Honda, M. Kuwahara and K. Okano. "Lignin-degrading fungi as a biotechnological tool for biomass conversion", *J. of APPL. AND IND. BIOTEC. in TROPICAL REGION*, Vol. 2(2), 1-9(2009)

第2章 ホルムアルデヒド分解カビの同定と性能評価

2.1 はじめに

ホルムアルデヒドは、非常に安価な有機原材料として多くの産業で用いられている。例えば、尿素樹脂やメラミン樹脂などとして合板、集成材、パーティクルボード用の接着剤の他、壁紙用糊の防腐剤として家具や建材などがある。さらには、有機合成の原料や繊維の防縮、防しわ加工などにも利用されている。

ホルムアルデヒドは、 -21°C と低沸点で揮発しやすいために、通常は水溶液として取り扱われる。希薄な水溶液の状態でも、タンパク質構造を不可逆に変化させるために細胞毒性がある。また、揮発したホルムアルデヒドは目や呼吸器などの粘膜を刺激する。ホルムアルデヒドは、このような細胞に対する刺激性、毒性を利用してカビなどの微生物を死滅させる消毒剤として用いられる一方で、環境汚染物質として問題となっている。

ホルムアルデヒドの様に構造内に炭素を1つ含むC1化合物を唯一の炭素源として利用する微生物をメチロトロフ (methylotrophic microorganism) と言う。数種のメチロトロフの中でホルムアルデヒドを分解する、カビ (Sakaguchi *et al.*, 1975; Zhang *et al.*, 1999), 酵母 (Nakagawa, 2011; Yurimoto *et al.*, 2011) 及び、バクテリア (Goldberg *et al.*, 1976; Hirt *et al.*, 1978; Marx *et al.*, 2003; Mirdamadi *et al.*, 2003) の報告例がある。また、ホルムアルデヒドを含む排水処理や活性汚泥処理に微生物を応用した報告も見られる (Kato *et al.*, 1982; Zhang *et al.*, 1999; Glancer-Soljan, *et al.*, 2001; Yamazaki *et al.*, 2001)。微生物を用いたホルムアルデヒド分解は非常に有効な手段とされるが、ホルムアルデヒドには殺菌性が有るためカビの増殖限界は0.025%-0.1%とされてきた。

そこで本研究では、高濃度のホルムアルデヒドを分解できるカビを新規に取得し、それらのホルムアルデヒド分解特性について調べた。

2. 2 実験方法

2. 2. 1 試薬

ホルムアルデヒドはパラホルムアルデヒドを用いて調整した(Kato *et al.* 1982)。すなわち、パラホルムアルデヒド (0.5 g) を5 mLのイオン交換水と共に密閉したアンプルビンに投入し、110°Cで12-24 h加熱して溶解した。パーオキシダーゼは、シグマアルドリッチジャパン社より購入した。パラホルムアルデヒド、ニコチンアミドジヌクレオチド (NAD)、グルタチオン (GSH)、及びフェナジンメトサルフェート (PMS) は和光純薬工業社製を用いた。2,6-ジクロロフェノールインドフェノールナトリウム塩 (DCIP) は、ナカライテスク社製を用いた。その他全ての試薬は、市販品で可能な限り最高純度の物を用いた。

2. 2. 2 カビの分離同定と培養

ホルムアルデヒド耐性カビは、0.1%のホルムアルデヒドを含む基本培地による寒天平板培養により分離した。基本培地は、1.0 gグルコース、0.2 gNaNO₃、0.1 g K₂HPO₄、0.05 gMgSO₄·7H₂O、0.05 gKCl、0.001 gFeSO₄·7H₂Oおよび0.01 g酵母エキスを100 mLのイオン交換水に溶解し、pH6.0にして調整した。なお、ホルムアルデヒドは、揮発による濃度変化を避けるため、加熱殺菌した基本培地を冷却した後に投入した。

土壌および排水のサンプルをカビの分離に用いた。土壌サンプルは、各0.1 gを10 mLの滅菌水に投入した。1 mLの土壌入り滅菌水もしくは排水サンプルを各々シャーレの固体基本培地（寒天1.5%含む）上に投入した。寒天上のサンプルをコンラージ棒で塗り広げた後、30 °Cで1週間培養した。培養後、形成された様々なコロニーから1白金時ずつ固体基本培地に植菌し、再度同様に培養した。コロニーの選別と培養を数回繰り返した後、分離されたカビを形態観察と18S rDNAにより同定した。

同定した9株のホルムアルデヒド耐性カビを各々0.1-0.5%のホルムアルデヒドを含む液体の基本培地に投入し、ホルムアルデヒド分解活性について調べた。全てのカビを0.2%のホルムアルデヒドを含む固体基本培地で前培養した後に試験に供した。前培養したカビを管径18 mmの試験管中の基本培地5 mL (0.1-0.5%ホ

ホルムアルデヒド) に各々1白金時投入して植菌した。培養は30°C、180 rpmの条件で行った。なお、ホルムアルデヒド濃度はNash法 (Nash 1953) により測定した。

液体の基本培地中におけるカビの菌体増殖曲線を得るために、所定時間における200 mL三角フラスコ中の乾燥菌体重量を測定した。固体基本培地で前培養したカビを200 mL三角フラスコ中の基本培地100 mLに各々1白金時投入して植菌した。三角フラスコ中のカビは、30°C、180 rpmの条件で振とう培養した。各々のサンプリング時において三角フラスコ中のカビを14,000× gで15min間遠心分離し回収した。イオン交換水洗浄と遠心分離を3回行った後、105°Cで恒量まで乾燥したカビの重量を乾燥菌体重量とした。

2. 2. 3 無細胞抽出液

ホルムアルデヒド耐性カビを200 mL三角フラスコに入れた基本培地100 mLで培養した。培養条件を30°C、180 rpmとして、対数期が終了したところで菌体を減圧濾過回収した。回収した菌体を-30°Cで凍結し、カッターミル(大阪ケミカル社製 フォースミル)で破碎した。破碎した菌体を湿潤菌体重量の10倍の質量の0.2 Mリン酸カルシウム緩衝液(pH7.0)に浸漬した。浸漬液中の菌体の破片を4°Cの条件下において14,000× gで15 min間遠心分離を行い沈殿させた。得られた遠心上澄液を無細胞抽出液として回収した。なお、遠心上澄液中のタンパク質濃度は、牛血清アルブミンを標準に用いたLowry法 (Lowry *et al.* 1951) により定量した。無細胞抽出液は以下の酵素試験に用いた。

2. 2. 4 酵素試験

培地中の炭素源がホルムアルデヒド耐性カビIRI017株無細胞抽出液の酵素活性に及ぼす影響を調べた。酵素活性の測定には以下の手法を用いた。

NADリンク型ホルムアルデヒド脱水素酵素活性 (NAD-linked FADH)及びNADリンク型蟻酸脱水素酵素活性 (NAD-linked FDH) は、30°CにおいてNADH (モル吸光係数 $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) が生成する割合を340nmで測定した。測定に用いた反応液は、250 μmol リン酸カルシウム緩衝液 (pH8.0)、5 μmol NAD、5 mmolホルムアルデヒド (もしくは100 mmol蟻酸)、及び20 μL の無細胞抽出液を含む3 mLの溶液を用いた。

GSH依存型 (GSH-dependent) のNAD-linked FADH活性を測定する際には、10 mMのGSHを上記反応液に添加した。1ユニット(U)の酵素活性は、1 minに1 μmol のNADHを生成する触媒活性と定義した。

色素依存型のホルムアルデヒド脱水素酵素 (Dye-linked FADH) 活性は、30°CでDCIP (モル吸光係数 $\epsilon = 22,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) の減少を600 nmで測定して求めた。測定に用いた反応液は、250 μmol リン酸カルシウム緩衝液 (pH8.0)、0.149 μmol DCIP, 1 μmol PMS, 5 mmol ホルムアルデヒド、及び20 μL の無細胞抽出液を含む3mLの溶液を用いた。1ユニット(U)の酵素活性は、1 minに1 μmol のDCIPが減少する触媒活性と定義した。

ホルムアルデヒド酸化酵素 (FAOX) 及び蟻酸酸化酵素 (FOX) の基本的な測定は、クラーク電極(セントラル科学社製)を用いて、30°Cで酸素濃度を測定して行った。測定に用いた反応液は、リン酸カルシウム、5 mmol ホルムアルデヒドもしくは100 mmolの蟻酸、及び敵当量の無細胞抽出液を含む1.5 mLの溶液を用いた。1ユニット (U) の酵素活性は、1 minに1 μmol の酸素 (O_2) が減少する触媒活性と定義した。

なお、GSH-dependent、NAD-linked FADH活性のpH依存性を調べるために、以下の緩衝液を83 mM (250 μmol in 3 mL)リン酸カルシウム緩衝液 (pH8.0) の代わりに用いた。McIlvaine 緩衝液 (pH 4.0-6.0)、100 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0-8.0)、100 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 8.0-9.0) and 100 mM ホウ酸-NaOH 緩衝液 (pH 9.0-10.0)。

2. 2. 5 休止細胞によるホルムアルデヒド分解

0.1%ホルムアルデヒドを含む液体基本培地で培養後のカビの菌体を減圧濾過して回収した。回収した湿潤細胞0.5gを各々0.05%ホルムアルデヒドが入った100 mLの緩衝液[McIlvaine buffer (pH3.0-5.0)、100 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0-8.0) and 100 mM boric-NaOH buffer (pH9.0-10.0)]に投入し、一定温度下において180rpmで振とうした。所定時間後の緩衝液中のホルムアルデヒド濃度をNash法で測定して、休止菌体によるホルムアルデヒド分解活性を調べた。なお、対照には、121°Cで15 min加熱処理した菌体0.5 gを用いた。

2. 3 実験結果及び考察

2. 3. 1 カビの分離同定と培養

愛知県内で採取した170の土壌と排水サンプルに対し、数回の繰り返し寒天平板培養を行い、9株のホルムアルデヒド耐性カビを分離した (IRI001株、IRI004株、IRI007株、IRI008株、IRI009株、IRI013株、IRI016株、IRI017株、及びIRI020株)。寒天平板上における形態観察や光学顕微鏡観察の結果、IRI001株、IRI004株、IRI007株、IRI0013株、及びIRI020株は *Aspergillus* sp.、IRI008株及びIRI009株は *Botrytis* sp.、そしてIRI016株及びIRI017株は *Paecilomyces* sp.と同定した。

全てのカビが、グルコースを含む基本培地中で0.3-0.5%のホルムアルデヒドをほぼ完全に分解して増殖した (**Table 2-1**)。中でも、IRI017株は0.5%のホルムアルデヒドが含まれる培地中で増殖することができた。加藤ら (1982) の報告では、分離した酵母が炭素源としてグルコースを含む培地中で0.15-0.55%のホルムアルデヒドをほぼ完全に分解して増殖した。この報告の酵母と我々が分離したカビはほぼ同程度のホルムアルデヒド濃度での増殖能力を有した。IRI017株を18S rDNAによる解析を行い、*Paecilomyces variotii*.と同定した (**Figure 2-1**)。

Figure 2-2に *P. variotii* IRI017株の写真を示した。IRI017株は培地中のホルムアルデヒド濃度が最も高い状況で増殖したことから、様々なホルムアルデヒド濃度の基本培地条件下での細胞増殖曲線を調べた。**Figure 2-3**に示したとおり、培地中のホルムアルデヒド濃度の増加に伴い誘導期は長くなった。対数期は培地中のホルムアルデヒド濃度が0.3%以下になった頃から開始した。**Figure 2-3**に示すとおり、100 hを超えたところでほぼすべての試験区においてホルムアルデヒドは完全に分解した。なお、IRI017株は培地中にホルムアルデヒドのみを炭素源とした培地では増殖しなかった (データ示さず)。この結果は、加藤ら (1982) のホルムアルデヒド耐性酵母の報告と同様に、IRI017株はホルムアルデヒドの無毒化をしていることが示唆された。

Table 2-1. Effect of formaldehyde concentration on growth of fungus

Strains	Species	Formaldehyde ^{1,2} (%)
IRI001	<i>Aspergills</i>	0.35
IRI004	<i>Aspergills</i>	0.30
IRI007	<i>Aspergills</i>	0.45
IRI008	<i>Botrytis</i>	0.35
IRI009	<i>Botrytis</i>	0.40
IRI013	<i>Aspergills</i>	0.45
IRI016	<i>Paecilomyces</i>	0.40
IRI017	<i>Paecilomyces</i>	0.50
IRI020	<i>Aspergills</i>	0.45

1 Cultures were incubated at 30°C in basal medium.

2 Maximum concentration of formaldehyde in which fungi can grow.

AAAGATTAAG	CCATGCATGT	CTAAGTATAA	GCAATCTATA	CGGTGAAACT	GCGAATGGCT	60
CATTAAATCA	GTTATCGTTT	ATTTGATAGT	ACCTTGCTAC	ATGGATACCT	GTGGTAATTC	120
TAGAGCTAAT	ACATGCTGAA	AACCCCGACT	TCGGAAGGGG	TGTATTTATT	AGATAAAAAA	180
CCAATGCCCT	TCGGGGCTCC	TTGGTGATTC	ATAATAACTT	CACGAATCGC	ATGGCCTTGC	240
GCCGGCGATG	GTTCAATTCAA	ATTTCTGCCC	TATCAACTTT	CGATGGTAGG	ATAGTGGCCT	300
ACCATGGTGG	CAACGGGTAA	CGGGGAATTA	GGGTTGCGATT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA	360
ACGGCTACCA	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC	GACACGGGGA	420
GGTAGTGACA	ATAAATACTG	ATACAGGGCT	CTTTTGGGTC	TTGTAATCGG	AATGAGTACA	480
ATCTAAATCC	CTTAACGAGG	AACAATTGGA	GGGCAAGTCT	GGTGCCAGCA	GCCGCGGTAA	540
TTCCAGCTCC	AATAGCGTAT	ATTAAGTTG	TTGCAGTTAA	AAAGCTCGTA	GTTGAACCTT	600
GGGTCTGGCT	GGCCGGTCCG	CCTCACCGCG	AGTACTGGTC	CGGCTGGACC	TTTCCTTCTG	660
GGGAACCCCA	TGGCCTTAC	TGGCCGTGGC	GGGGAACCAG	GACTTTTACT	GTGAAAAAAT	720
TAGAGTGTTT	AAAGCAGGCC	TTTGCTCGAA	TACATTAGCA	TGGAATAATA	GAATAGGACG	780
TGTGTTCTA	TTTTGTTGGT	TTCTAGGACC	GCCGTAATGA	TTAATAGGGA	TAGTCGGGGG	840
CGTCAGTATT	CAGCTGTCAG	AGGTGAAATT	CTTGGATTTG	CTGAAGACTA	ACTACTGCGA	900
AAGCATTTCG	CAAGGATGTT	TTCATTAATC	AGGGAACGAA	AGTTAGGGGA	TCGAAGACGA	960
TCAGATACCG	TCGTAGTCTT	AACCATAAAC	TATGCCGACT	AGGGATCGGA	CGGTGTTTCT	1020
ATTATGACCC	GTTCCGCACC	TTACGAGAAA	TCAAAGTTTT	TGGTTCTGG	GGGGAGTATG	1080
GTCGCAAGGC	TGAAACTTAA	AGAAATTGAC	GGAAGGGCAC	CACAAGGCGT	GGAGCCTGCG	1140
GCTTAATTTG	ACTCAACACG	GGGAAACTCA	CCAGGTCCAG	ACAAAATAAG	GATTGACAGA	1200
TTGAGAGCTC	TTTCTTGATC	TTTTGGATGG	TGGTGCATGG	CCGTTCTTAG	TTGGTGGAGT	1260
GATTTGTCTG	CTTAATTGCG	ATAACGAACG	AGACCTCGGC	CCTTAAATAG	CCCAGTCCGC	1320
GTTTGCGGGC	CGCTGGCTTC	TTAGGGGGAC	TATCGGCTCA	AGCCGATGGA	AGTGC GCGGC	1380
AATAACAGGT	CTGTGATGCC	CTTAGATGTT	CTGGGCCGCA	CGCGCGCTAC	ACTGACAGGG	1440
CCAGCGAGTA	CATCACCTTG	ACCGAGAGGT	CTGGGTAATC	TTGTAAACC	CTGTGCTGCT	1500
GGGATAGAG	CATTGCAATT	ATTGCTCTTC	AACGAGGAAT	GCCTAGTAGG	CACGAGTCAT	1560
CAGCTCGTGC	CGATTACGTC	CCTGCCCTTT	GTACACACCG	CCCCTCGCTA	CTACCGATTG	1620
AATGGCTCAG	TGAGGCCTTC	GGAAGTGGCTC	AGGGGGGTTG	GCAACGACCG	CCCAGAGCCG	1680
GAAAGTTGGT	CAAACCTGGT	CATTTAGAGG	AAGTAAAAGT	CGTAACAAGG	TT	1732

Figure 2-1 18S rDNA sequences of strain IRI017

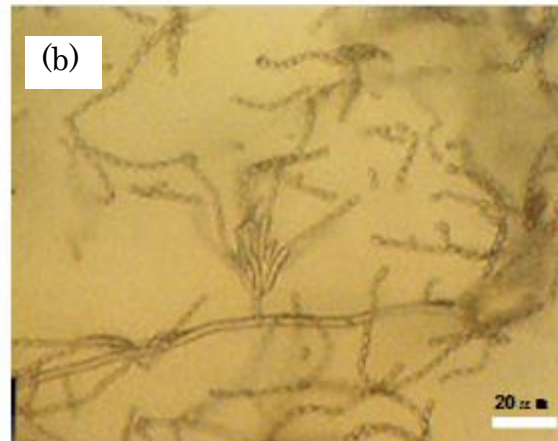


Figure 2-2 Culture plate of *Paecilomyces variotii* strain IRI017 grown on basal medium containing 0.2% formaldehyde and 1.0% glucose at 30°C for 4 d (a) and microphotograph of *P. variotii* strain IRI017 grown on basal medium containing 0.2% formaldehyde and 1.0% glucose at 30°C for 5 d (b).

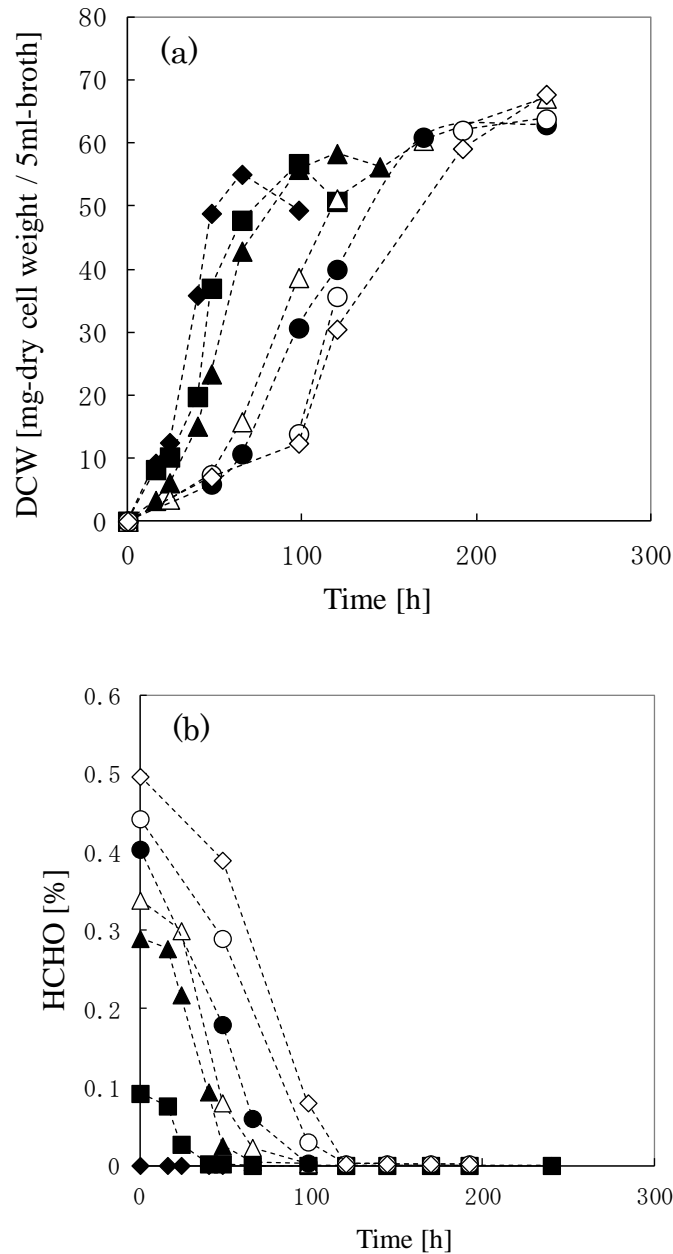


Figure 2-3 Time course of dry cell weight per unit volume (DCW) (a) and formaldehyde concentration (b) in culture of IRI017. Strain IRI017 was cultured on medium containing various concentrations of formaldehyde, after being cultured on basal medium containing 1.5% agar and 0.2% formaldehyde. The initial concentration of formaldehyde [%] was; 0 (◆) , 0.1 (■) , 0.3 (▲) , 0.35 (△) , 0.40 (●) , 0.45 (○) , 0.50 (◇) .

2. 3. 2 IRI017 株由来の無細胞抽出液の酵素活性

培地中の炭素源が無細胞抽出液の酵素活性に及ぼす影響を調べた。Table 2-2 に示すとおり、全ての無細胞抽出液においてGSH- dependent NAD-linked FADH活性の値は他の酵素活性より大きかった。IRI017株が1.0%グルコースと0.1%ホルムアルデヒドを培地炭素源として含む場合、最も高いFADH活性が得られた。IRI017株の無細胞抽出液において、他の脱水素酵素活性と酸化酵素活性があまり高くないことから培地中のホルムアルデヒドのほとんどがGSH- dependent NAD-linked FADHによって酸化されていると考えられた。GSH-dependent NAD-linked FADH活性はpH7.0-9.0の範囲で高い活性を示した (Figure 2-4)。

2. 3. 3 IRI017 株休止菌体によるホルムアルデヒド分解

休止菌体のホルムアルデヒド分解活性を調べるために、0.05%のホルムアルデヒドを含む緩衝液中 (pH3-10) にIRI017株の菌体を投入した。菌体投入後17 h後に、pH3-6の範囲において約40-55%のホルムアルデヒドが減少した (Figure 2-5)。pH7以上の試験区では、ホルムアルデヒド減少率が低下した。なお、対照に用いた熱処理菌体はpH7において約0.5%のホルムアルデヒドを減少した。熱処理菌体は酵素が失活していることから、吸着によるものと考えられた。

pH6のリン酸ナトリウム緩衝液中において、IRI017株の休止菌体は25℃の時に最も高いホルムアルデヒド減少率を示した (Figure 2-6)。20℃及び30℃では、休止菌体によるホルムアルデヒド減少率が25℃の時の50%以下に低下した。

実際の貧栄養排水を想定すると、休止菌体は0.1%以上の濃度のホルムアルデヒドを含む緩衝液中で使用される。25℃、pH6の条件下ではIRI017株の休止菌体によって、初期濃度0.10-0.42%のホルムアルデヒドが減少した (Figure 2-7)。およそ100 h後IRI017株の休止菌体は0.21%のホルムアルデヒドをほぼ完全に分解した (△、Figure 2-7)。また、およそ150 h後には0.26%以下のホルムアルデヒドをほぼ完全に分解した (◇、Figure 2-7)。

Table 2-2. Effect of carbon source on enzyme production in cell-free extracts of IRI017.

carbon source	Specific activity [$\mu\text{mol} / [\text{min} \cdot \text{mg-protein}]$]					
	GSH dependent NAD-linked FADH	GSH independent NAD-linked FADH	Dye-linked FADH	FAOX	NAD-linked FDH	FOX
0.1% Formaldehyde + 1.0% Glc.	1.68	0.06	0.00	0.01	0.11	0.01
1.0% Methanol + 1.0% Glc.	0.90	0.05	0.00	0.00	0.05	0.00
1.0% Methanol	0.28	0.03	0.00	0.04	0.27	0.03
1.0% Glc.	0.06	0.01	0.00	0.00	0.02	0.00

¹ The enzyme activity was measured at 5 mM substrate at 30°C, pH8.0.

² The enzyme activity was measured at 100 mM substrate at 30°C, pH8.0.

³ The enzyme activity was measured at 100 mM substrate at 30°C, pH4.5.

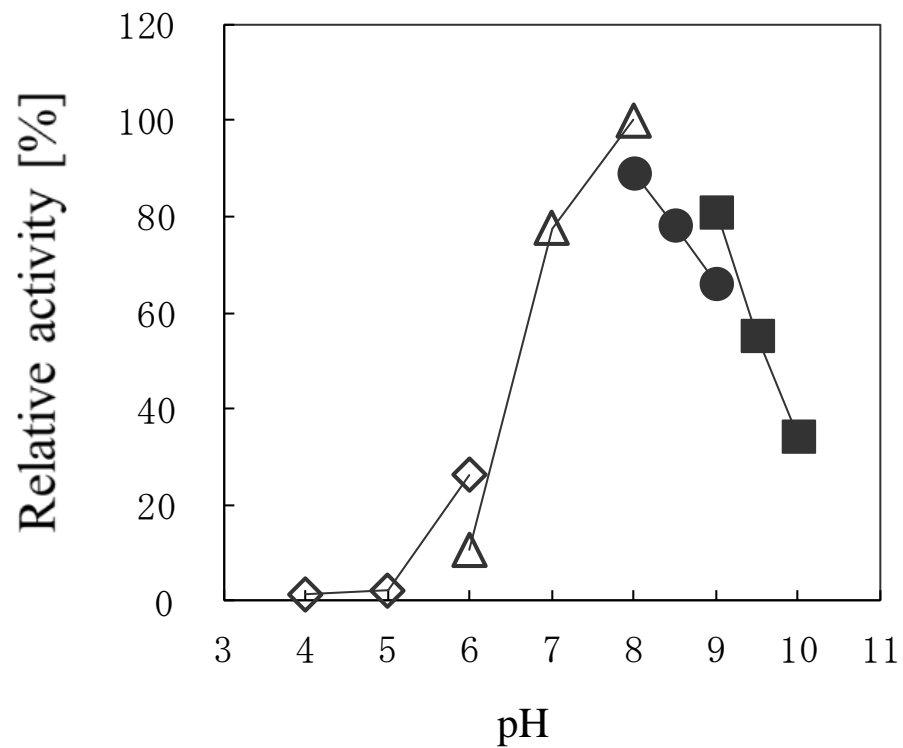


Figure 2-4 Effect of pH on activity of GSH dependent NAD-linked FADH. Enzyme activities were measured in various buffer solutions as follows: McIlvaine buffer (pH 4.0–6.0) (◇), 100 mM sodium phosphate buffer pH 6.0–8.0 (△), 100mM Tris-HCl buffer (pH 8.0–9.0) (●) and 100 mM boric acid-NaOH buffer (pH 9.0–10.0) (■).

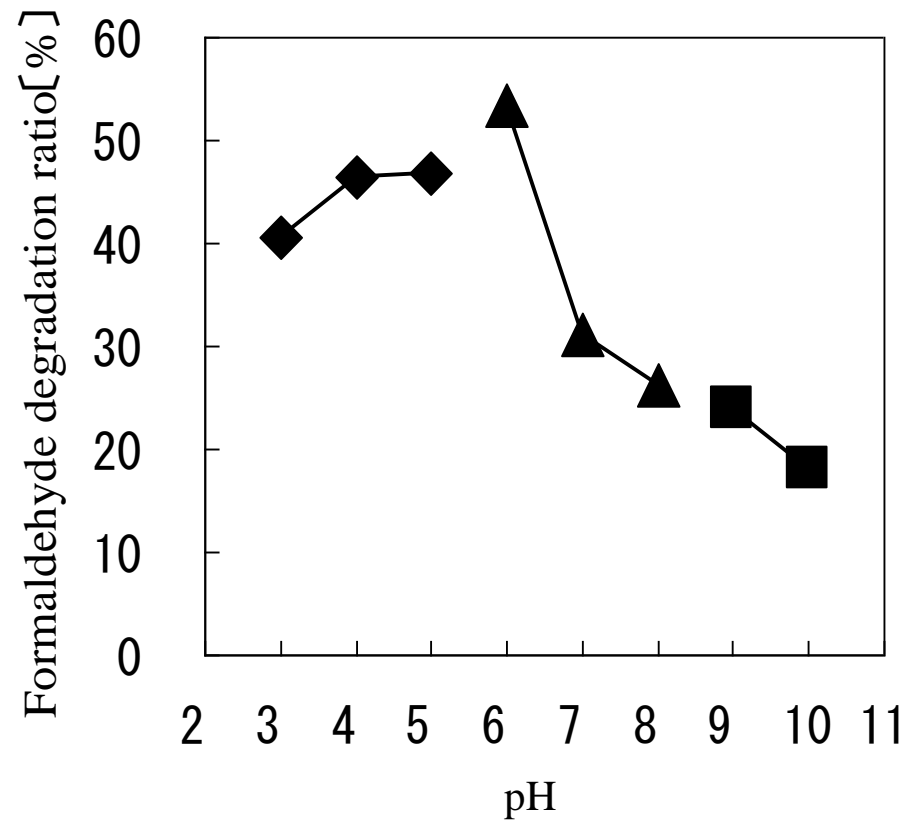


Figure 2-5 Effect of pH on formaldehyde degradation by resting cells of strain IRI017. A formaldehyde degradation test was carried out for 17 h at 30°C. Strain IRI017 cells were added to the buffers with various pHs: McIlvaine buffer (pH 3.0–5.0) (◆), 100 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0–8.0) (▲), and 100 mM boric acid-NaOH buffer (pH 9.0–10.0) (■). The formaldehyde degradation ratio was defined as the ratio of final formaldehyde concentration to initial formaldehyde concentration (0.05%) at 0h.

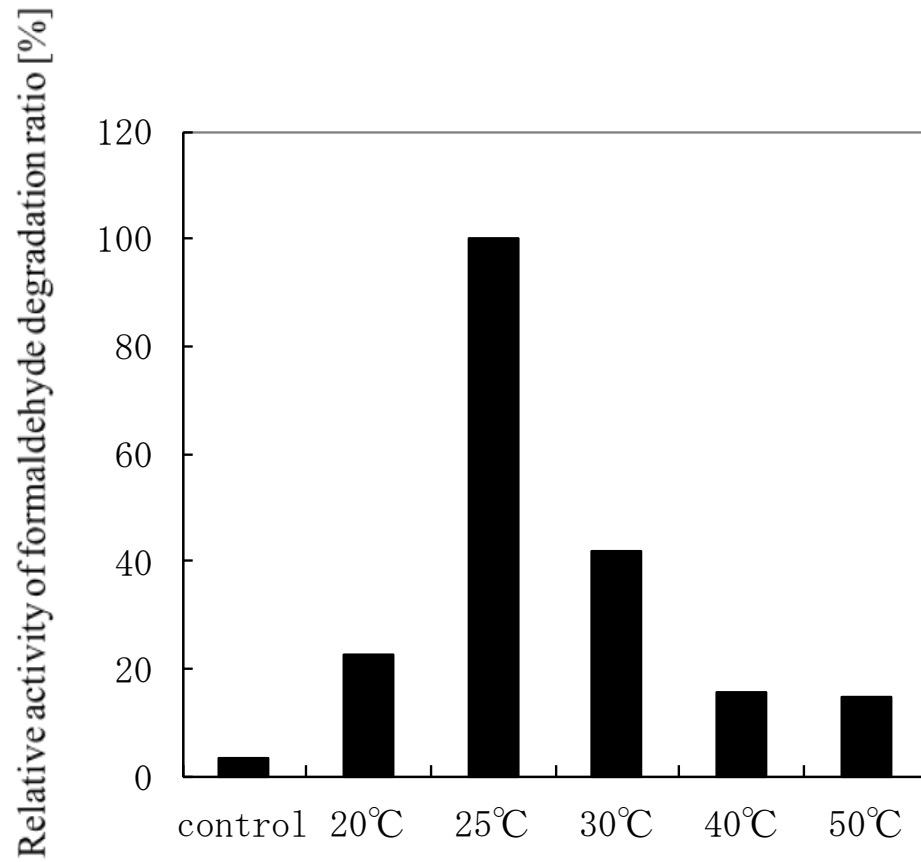


Figure 2-6 Effect of temperature on formaldehyde degradation by resting cells of strain IRI017. The formaldehyde degradation test was carried out for 36 h. Strain IRI017 cells were added to 100 mM sodium phosphate buffer (pH6.0) containing at initial 0.05% formaldehyde and incubated at various temperatures. Heat-treated cells (121°C, 15 minutes) were used as the control at 50°C. The activity of formaldehyde degradation at 25°C was defined as 100%

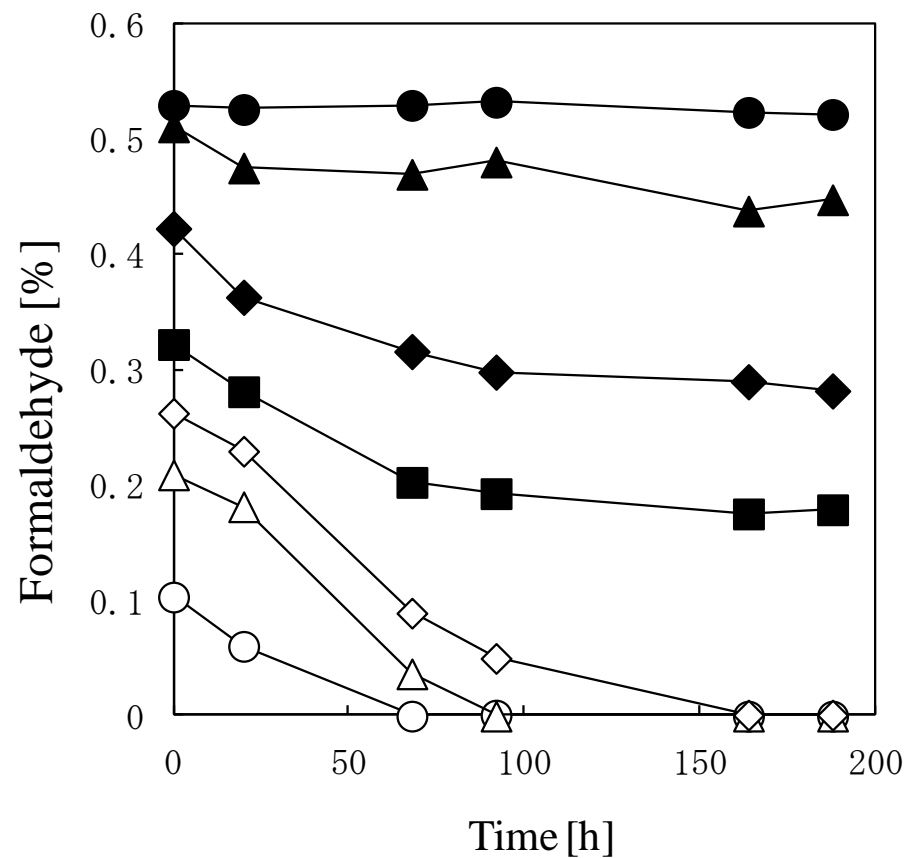


Figure 2-7 Time course of formaldehyde at various initial concentrations of formaldehyde. The formaldehyde degradation test was carried out at 25°C. Strain IRI017 cells were added to 100 mM sodium phosphate buffer (pH6.0) containing 0.10 (○), 0.21 (△), 0.26 (◇), 0.32 (■), 0.42 (◆), and 0.51% (▲) formaldehyde. The control (●) was sodium phosphate buffer containing 0.53% formaldehyde (no cells).

2. 4 結 言

ホルムアルデヒド耐性微生物の分離を行い、IRI001-020 までの 9 株の新規なカビを取得した。これら 9 株のカビは、培地中に含まれる 0.3-0.5%という非常に高濃度のホルムアルデヒドを分解して増殖した。IRI017 株は 9 株の中で最も高濃度の 0.5%ホルムアルデヒドをほぼ完全に分解した。18S rDNA 解析を行い、IRI017 株を *P. variotii* と同定した。

IRI017 株の無細胞抽出液は、高い NAD-linked GSH-dependent FADH 活性を示した。脱水素酵素は、培地中の炭素源の影響を大きく受けたことから、誘導酵素と考えられた。NAD-linked GSH-dependent FADH 活性は pH7-9 で高い活性を示した (Figure 2-4)。

IRI017株の休止菌体は、pH6のリン酸ナトリウム緩衝液に含まれる初期濃度 0.26%のホルムアルデヒドを25°Cの条件下で完全に分解した (Figure 2-5)。休止菌体の活性は無細胞抽出液のNAD-linked GSH-dependent FADH活性と異なるpHで高い値を示した。NAD-linked GSH-dependent FADHは菌体内酵素であり、休止菌体内部のpHを中性付近に維持する必要があるものと想定された。

IRI017株の無細胞抽出液には蟻酸脱水素酵素活性があった。ホルムアルデヒドは、これらの酵素により蟻酸を経て二酸化炭素にまで酸化されることが想定される。約8.7 mMのホルムアルデヒド(100 mL 緩衝液中の 0.26% ホルムアルデヒド)は、0.5 gの休止菌体でほぼ完全に分解される。これは、IRI017株の休止菌体は質量の半分以上の質量という非常に多くのホルムアルデヒドを分解することになる。

実際の紙加工会社から排出されるホルムアルデヒド濃度は1000 mg/Lを超える。世界保健機構 (WHO) は、排水のホルムアルデヒド濃度の許容値を0.9 mg/L以下と決めた。本研究では、分解後のホルムアルデヒドは検出下限値である0.1 mg/L以下にまで減少した。このことは、本研究の生分解システムが実際の排水処理に適した濃度まで分解できることを示している。

様々な多孔質ポリマー (Siddique *et al.*, 2009) や、浸漬膜タイプ (Zhang *et al.*, 1999) の固定化カビを用いた排水処理が行われている。これら手法を用いた IRI017株休止菌体によるホルムアルデヒド排水処理は、非常に有効であると考え

られる。Figure 2-7に示したとおり、湿重量0.5 gの休止菌体をホルムアルデヒドが入った100mLの緩衝液に投入された場合、0.03 g-formaldehyde/L/h (0.03 g-formaldehyde/5 g-cell/h) (Δ and \diamond 、Figure 2-7) の分解速度が得られる。また、IRI017株の増殖菌体を用いた場合、初発濃度が約0.3%において0.08 g-formaldehyde/L-broth/h (\blacktriangle 、Figure 2-3) のホルムアルデヒド分解速度が、培養16-40 hにおいて達成される。なお、上記の計算には平均乾燥菌体重量 (1.5 g-dry cell/L-broth) を用いた。

これらより、槽内に固定化IRI017株休止菌体1 Kg を設置した10 Lの反応槽に0.26% (2.6 g/L) のホルムアルデヒドを投入した場合を想定すると、およそ2 L/h の排水が無害化できる事になる。将来我々は、ホルムアルデヒドの長期分解試験を行って、実証したい。

2.5 参考文献

Glancer-Soljan, M., V. Soljan, T. L. Dragicevic and L. Cacic, “Aerobic Degradation of Formaldehyde in Wastewater from the Production of Melamine Resins” *Food Technol. Biotechnol.*, 39, 197–202 (2001)

Goldberg, I., J.S. Rock, A. Ben-Bassat and R.I. Mateles, “Bacterial Yields on Methanol, Methylamine, Formaldehyde, and Formate.” *Biotechnol. Bioeng.*, 18, 1657–1668 (1976)

Hirt, W., E. Papoutsakis, E. Krug, H. C. Lim and G. T. Tsao, “Formaldehyde Incorporation by a New Methyloph (L3).” *Appl. Environ. Microbiol.*, 36, 56–62 (1978)

Kato, N., N. Miyawaki and C. Sakazawa, “Oxidation of Formaldehyde by Resistant Yeasts *Debaryomyces vanriji* and *Trichosporon penicillatum*.” *Agric. Biol. Chem.*, 46, 655–661 (1982)

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, “Protein Measurement with the Folin Phenol Regent.” *J. Biol. Chem.*, 193, 265–275 (1951)

Marx, C. J., L. Chistoserdova and M. E. Lidstrom, “Formaldehyde- Detoxifying Role of the Tetrahydromethanopterin-Linked Pathway in *Methylobacterium extorquens* AM1.” *J. Bacteriol.*, 185, 7160–7168 (2003)

Mirdamadi, S., A. Rajabi, P. Khalilzadeh, D. Norozian, A. Akbarzadeh and F. A. Mohseni, “Isolation of Bacteria Able to Metabolize High Concentrations of Formaldehyde.” *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 1299–1301, (2003)

Nakagawa, T., “Regulation Mechanism of Methanol Metabolism in the Methylophic Yeast.” *Seibutsu-Kougaku Kaishi* (in Japanese), 90, 72–77 (2011)

Nash, T., “The Colorimetric Estimation of Formaldehyde by Means of the Hantzsh Reaction.” *Biochem. J.*, 55,416–421 (1953)

Sakaguchi, K., R. Kurane and M. Murata, “Assimilation of Formaldehyde and Other C1-Compounds by *Gliocladium deliquescens* and *Paecilomyces variotii*.” *Agric. Biol. Chem.*, 39, 1695–1702 (1975)

Yamazaki, T., W. Tsugawa and K. Sode, “Biodegradation of Formaldehyde by a Formaldehyde-Resistant Bacterium Isolated from Seawater.” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 91–93, 213–217 (2001)

Yurimoto, H, M. Oku and Y. Sakai, “Yeast Methylophony: Metabolism, Gene Regulation and Peroxisome Homeostasis.” *Int J Microbiol.* 2011, 101298 (2011)

Zhang, T., T. Kanki, T. Asano, and A. Toyoda, “Treatment Process of Wastewater Containing Formaldehyde by a Membrane Bioreactor.” *Kankyou Gijyutu* (in Japanese), 28, 125–129, (1999)

第3章 ホルムアルデヒド分解カビ *Paecilomyces variotii* 由来のアルコール酸化酵素の精製と性能評価

3.1 はじめに

アルコール酸化酵素 (AOX)は、メチロトロフ微生物がメタノールを資化する際に用いる初めの酵素であり、メタノールを唯一の炭素源とした際に誘導される。この酵素は、*Polyporus*、*Radulum*、*Poria*、*Candida*、*Hansenula* 及び *Pichia* といったリグニン分解担子菌類やメチロトロフ酵母に存在する (Kerwin and Ruelius 1969; Fujii and Tonomura 1972; Tani *et al.* 1972a; Janssen *et al.* 1975; Kato *et al.* 1976; Bringer *et al.* 1979; Couderc and Baratti 1980; Patel *et al.* 1981)。これら AOX については、酵素的にまた、遺伝的に広く特徴づけがなされてきた (Fujii and Tonomura 1972; Tani *et al.* 1972b; Kato *et al.* 1976; van Dijken *et al.* 1976; Couderc and Baratti 1980; Patel *et al.* 1981; Ledebøer *et al.* 1985; Koutz *et al.* 1989; Sakai and Tani 1992; and for a review, see Ozimek *et al.* 2005)。多くの AOX は、74–83 kDa というほぼ同質量のサブユニットから構成される 8 量体を成している。各々のサブユニットは補因子として非共有型の FAD を有している。AOX はメタノールと同様に低分子の 1 級アルコールを酸化する。AOX の多くは pH8-9 の範囲で高い活性を有し、pH6-10 という広い範囲で高安定性を示す。

AOX は *Cladosporium fulvum*、*Helminthosporium victoriae*、*Penicillium chrysogenum* といった子囊菌類中にも認められ (Segers *et al.* 2001、Soldevila and Ghabrial 2001、Holzmann *et al.* 2002)、メチロトロフ酵母の AOX と高い遺伝的な相同性を示す。一方で、AOX の構造は厳密には一致しない。例えば、*C. fulvum* の粗酵素液は AOX 活性を有し、その特徴はメチロトロフ酵母と大変類似している (Segers *et al.* 2001)。しかしながら、*Thermoascus aurantiacus* (Ko *et al.* 2005) を除いて、子囊菌類由来の精製 AOX に関する報告は無く、その精製酵素の構造はメチロトロフ酵素由来のものとは全く異なる。

AOX の基質特異性、広範囲の至適 pH 等の特性は産業利用においてとても有意義な特徴となる。例えば、AOX を用いたバイオセンサーは発酵などの食品製造、環境測定及び医療診断などで応用されている (Belghith *et al.* 1987; Barzana *et al.* 1989; Chen and Matsumoto 1995; Liden *et al.* 1998; for a review, see Azevedo *et al.* 2005)。さらに、ホルムアルデヒドを基質とする AOX は排水処理などへの応用も

期待されている (Sahm 1975)。ホルムアルデヒドは、工場や医療排水に含まれる他、内装材や家具などに用いられシックハウス症候群の原因物質として危惧されている。

電気エネルギーや有害な触媒を用いることなく、バイオプロセスを活用して環境中のホルムアルデヒドを除く技術はとても意義がある。我々は、愛知県の土壌や排水から、培地中に含まれる 0.45%濃度のホルムアルデヒドを分解するカビ *Aspergillus nomius* IRI013 株を分離し、蟻酸酸化酵素を取得した (Kondo *et al.* 2002)。

本研究では、取得したホルムアルデヒド分解カビの中で 0.5%という最も高濃度のホルムアルデヒドを分解する *Paecilomyces variotii* IRI017 株が有する AOX 活性を精製しその性質を調べた。

3. 2 実験方法

3. 2. 1 試薬類

メタノール、エタノール及びパラホルムアルデヒドは和光純薬工業社製を用いた。ホルムアルデヒド溶液はパラホルムアルデヒドを溶解して調整した。西洋わさび由来のパーオキシダーゼ (grade III) は東洋紡社製を用いた。カタラーゼ及び牛血清アルブミンは和光純薬工業社製を用いた。Qセファロース FF、SPセファロース FF 及びフェニルセファロース HP はファルマシアバイオテック社製を用いた。その他試薬は全て市販品の最高純度のものを用いた。

3. 2. 2 微生物及び培養条件

IRI017 株は顕微鏡による形態観察 (Udagawa 1978) および 18SrDNA による解析により同定した。遺伝子解析はテクノスルガラボ社に委託した。IRI017 株は 0.1%のホルムアルデヒドを含むツァペックドックス寒天培地のスラントで保存した。保存用のスラントから 1白金時量を 100 mL 容の三角フラスコ中のグルコース培地 30mL に植菌した。グルコース培地は、1%グルコース、0.2% NaNO₃、0.1% K₂HPO₄、0.05% MgSO₄·7H₂O、0.05% 塩化カリウム、0.001% FeSO₄·7H₂O、及び 0.01% 酵母エキスを溶解後に pH を 6.0 に調整し作成した。

グルコース培地で培養後、培地 30 mL ごと 500 mL 容の三角フラスコ中のメタ

ノール培地 270 mL に植菌した。メタノール培地はグルコースが 1%メタノールに置き換わる以外、他の成分濃度は全く同一とした。

30℃、180rpm の条件で振とう培養した。7 日間の培養後、菌体を減圧濾過回収し、試験に供するまで-60℃で冷凍保存した。メタノール資化性酵母 *Candida boidinii* (NBRC10240) も同様にメタノール培地で 3 日培養した。

3. 2. 3 酵素活性測定

AOX 活性の基本的な測定は、クラーク型酸素電極(セントラル科学社製)を用いて、30℃の反応液 1.5mL 中の酸素濃度を計測して行った。反応液は、0.625 mL の 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH8.0)、30 μ L の 1.0 M メタノール、イオン交換水及び敵当量の酵素を添加して 1.5 mL に調整した。なお AOX 活性 1 U は、1 μ mol の酸素を 1 min あたりに消費した際の酵素量と定義した。

酵素反応に伴う過酸化水素生成を基に AOX 活性 (Kondo *et al.* 2002) を測定する方法も酵素精製過程で用いた。酵素活性測定用の反応溶液 1.5 mL 中には、0.625 mL の of 0.2 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 8.0)、30 μ L の 1.0 M メタノール、0.2 mL の 3.75 mM 4-アミノアンチピリン、0.2 mL の 15 mM フェノール、15 U の西洋わさび由来のパーオキシダーゼ及び酵素溶液を混合させた。反応は 30℃で行い、505 nm の吸光度の増加により活性を測定した。

NAD リンク型の蟻酸酸化酵素 (FDH) 活性も以前の報告と同様の方法で行った (Kondo *et al.* 2002)。グルタチオン依存型のホルムアルデヒド脱水素酵素 (FADH) 活性は 10 mM のグルタチオンと 5 mM のホルムアルデヒドを蟻酸の代わりに用いて測定した。

3. 2. 4 AOX の精製

特に述べない限り、全ての操作は 4℃で行った。30.6 L の培地から約 113 g の湿重量の凍結菌体が回収された。凍結菌体を乳鉢中で海砂と共に乳棒で攪拌し、粉砕した。粉砕後の菌体を 113 mL の 10 mM リン酸カルシウム緩衝液 (pH8.0 緩衝液 A) 浸して抽出した。抽出液を 10,000 \times g で 15 min 遠心分離し、菌体の破砕物を沈殿、除去した。回収した遠心上澄液を粗酵素液とした。粗酵素液を硫酸アンモニウムで分画した。硫酸アンモニウム 60-90%画分における遠心分離の沈殿

を回収した。

回収した沈殿は、緩衝液 A に溶解しなかったので緩衝液 A を用いて透析を行った。透析物を Q セファロース FF カラム (75 mm×内径 25 mm) と SP セファロース FF カラム (75 mm×内径 25 mm) で構成されたクロマトシステムに投入した。カラム非吸着の AOX 活性画分を回収し、硫酸アンモニウムで濃縮した。濃縮後の酵素液をフェニルセファロース HP カラム (160 mm×内径 15 mm) のクロマトシステムに投入し、30-0% の硫酸アンモニウムを含む緩衝液 A で溶出し精製した。カラム精製後の活性溶液を限外濾過し、得られた精製 AOX 6.5 mL を -60°C で凍結保存した。

3. 2. 5 電気泳動

未変性タンパク質のポリアクリルアミドゲル電気泳動 (native-PAGE) を 7% のポリアクリルアミドゲルと移動相のトリス-グリシン緩衝液 (pH8.3) を用いて行った。電気泳動後、タンパク質をクマシーブリリアントブルー R-250 (CBB) で染色した。ゲル中で帯状になったタンパク質の AOX 活性測定は染色して行った。染色には、0.1 M リン酸緩衝液 (pH8.0)、1 mg/mL の o-ジアニシジン、5 mM メタノール及び 6 U/mL の西洋わさび由来のパーオキシダーゼを含む反応溶液を用いた。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を 10% のポリアクリルアミドゲルを用いた Laemmli (1970) らの方法により行った。

3. 2. 6 ゲル濾過

酵素の相対分子量をセファロース 6 HR10/30 カラム (ファルマシアバイオテック社製) を用いたゲル濾過により測定した。移動相には 0.15 M の塩化ナトリウムを含む 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) を用い流速を 0.4 mL/min とした。分子量マーカーには、*C. boidinii* 由来の AOX (600 kDa)、馬由来のフェリチン (450 kDa)、ウサギ由来のアルドラーゼ (158 kDa) 及び牛血清アルブミン (67 kDa) を用いた。

3. 2. 7 N 末端アミノ酸解析

SDS-PAGE 後の精製 AOX をポリフッ化ビニリデンの膜に転写した。その膜はタンパク質染色用の Ponceau S により染まり、タンパク質のバンドを切断できる。切断された膜中のタンパク質の N 末端アミノ酸をバイオロジカ社に依頼して解析した。

3. 2. 8 補因子解析

酵素の紫外可視吸光スペクトルを分光光度計 (V-550 ジャスコ社製) により測定した。さらに、その酵素を 3 min 煮沸後に遠心分離した上澄液を限外濾過 (cut off, 10,000) した後に分光解析した。ろ液の薄層クロマトグラフィー (TLC) をシリカゲル (60 F254 プレート、メルク社製) を用いて行った。展開相には n-ブタノール : 酢酸 : 水 = 3:1:1 を用いた。FAD、FMN 及びリボフラビン溶液を参照に用いた。フラビン含有スポットが UV 照射による蛍光発色により確認された。

3. 2. 9 分析方法

タンパク質濃度は牛血清アルブミンを標準に用いた Lowry 法 (1951) により測定した。ホルムアルデヒド濃度は Nash 法 (1953) により求めた。蟻酸濃度は Shim-pak SCR-102H カラム (島津製作所社製) と電気伝導度検出器 (島津製作所社製、CDD-6A) を用いた HPLC により測定した。

3. 3 実験結果及び考察

3. 3. 1 AOX の取得

第 2 章に記載のとおり、愛知県内の土壌試料から新規なホルムアルデヒド耐性カビ IRI017 株を取得した。IRI017 株は 1% グルコースを含む培地中で 0.5% のホルムアルデヒドをほぼ完全に分解した。この性質は、これまでに最も高いとされた 0.55% のホルムアルデヒド濃度環境下で増殖するメチロトロフ酵母とほぼ同等であった (Kato *et al.* 1982)。IRI017 株は顕微鏡による形態観察 (Udagawa 1978) 及び 18S rDNA による解析の結果 *P. variotii* と同定された。

IRI017 株は、培地中の炭素源を 0.1% ホルムアルデヒドもしくは 1.0% メタノールのみとした場合、ほとんど増殖しなかった。しかし、IRI017 株をグルコース含有培地で培養した後に、メタノール培地に移し替えて培養することで無細胞抽

出液には AOX が誘導された。

Table 3-1 に示すとおり、IRI017 株はメタノール含有培地に移しかえた 2 日後に増殖し 4 日後には AOX 活性が誘導された。そして、AOX 活性は 7-10 日後に最大値を示した。*P. variotii* IRI017 株はメタノールの有無に関わらずグルコース含有培地で十分に増殖したが、無細胞抽出液中の AOX 活性はグルコースの存在により低下した。また、メタノール含有培地中にシュークロースやグリセロールの様な他の炭素源が存在することは、同様に AOX 誘導の疎外となった。一方で、FADH、FDH 活性はホルムアルデヒドもしくはメタノールを培地に投入することで、グルコースの存在に関わらず高い値を示した(データは図示せず)。

Table 3-1. Time course of AOX production in *P. variotii* IRI017 grown on methanol.

Incubation time [days]	Specific activity [U / mg]	Total activity ¹ [U]	Total protein ¹ [mg]
0	0.00	0.00	0.53
2	0.00	0.00	4.54
4	0.06	0.28	4.67
7	0.11	0.42	3.91
10	0.11	0.47	4.52

Enzyme activity was measured by determination of hydrogen peroxide as described in Materials and methods.

¹ Data are expressed as values in the mycelium of *P. variotii* IRI017 obtained per 100 ml of culture broth.

3. 3. 2 AOX の精製

IRI017株由来のAOXは、QセファラオースにpH8.0において吸着しなかった。これは、メチロトロフ酵母のAOXが陰イオン交換樹脂に吸着するという既存の報告とは異なる結果となった (Tani *et al.* 1972a; Couderc and Baratti 1980)。AOX精製の概要を **Table 3-2** に示した。メタノール含有培地で培養した IRI017 株由来の AOX は、無細胞抽出液に対し収率 44% で 20 倍に精製された。精製した AOX の非活性は、30°C で 1.4 U/mL となった。なお、精製 AOX は native-PAGE 及び SDS-PAGE 上で単一バンドとなった (**Figure 3-1**)。

3. 3. 3 AOX の分子量及びサブユニット構造

変性させた AOX の SDS-PAGE 上での相対分子量は 73 kDa であった (**Figure 3-1**)。一方で、ゲル濾過における相対分子量は 450 kDa となった (**Figure 3-2**)。この結果は、AOX がほぼ同分子量を有する 6 つのサブユニットで構成されることを示唆している。AOX の N 末端アミノ酸解析の結果は TIPDEV DIII となり、*P. chrysogenum* (Holzmann *et al.* 2002)、*C. fulvum* (Segers *et al.* 2001)、*H. victoriae* (Soldevila and Ghabrial 2001)、*C. boidinii* (Sakai and Tani 1992) および *P. pastoris* (Koutz *et al.* 1989) 由来の AOX と非常に高い相同性が認められた。しかしながら、native-PAGE 上での活性染色を行ったところ、*C. boidinii* 由来の AOX に比べて IRI 017 株由来の AOX の移動度は小さかった。

Table 3-2. Purification of AOX from *P. variotii* IRI017.

Step	Total protein [mg]	Total activity [U]	Specific activity [U / mg]	Yield [%]	Purification [fold]
Cell extract	234.3	16.4	0.07	100	1
Ammonium sulfate	71.1	10.9	0.15	67	2
Q-Sepharose FF + SP-Sepharose FF	14.6	12.0	0.83	73	12
Phenyl-Sepharose HP	5.1	7.2	1.42	44	20

Enzyme activity was measured by determination of hydrogen peroxide.

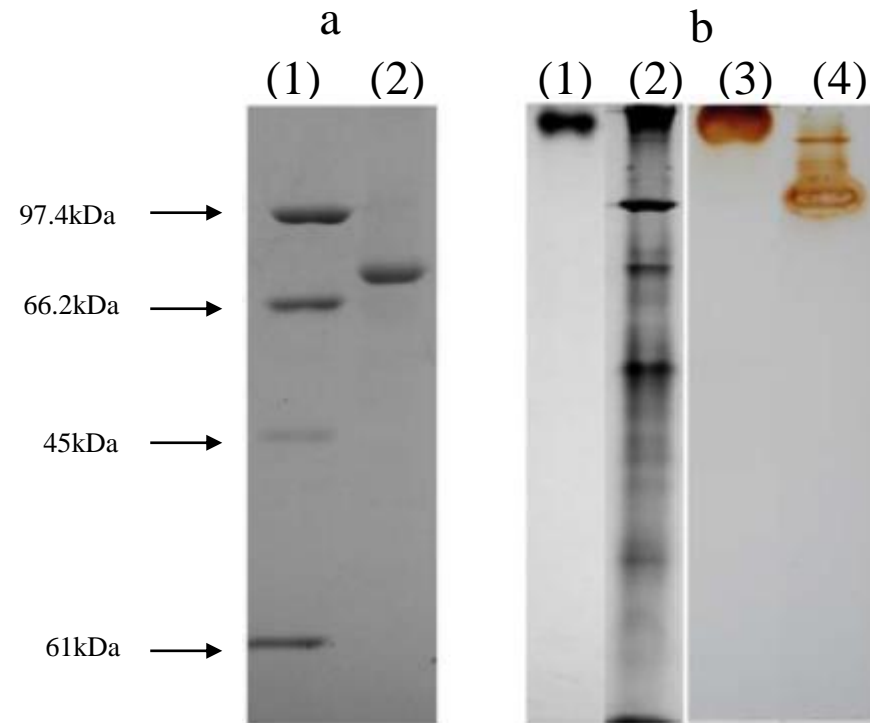


Figure 3-1. SDS-PAGE(a) and native-PAGE of purified AOX(b).

a Lane (1),molecular mass markers containing rabbit muscle phosphorylase (97.4 kDa), bovine serum albumin (66.2 kDa), egg white ovalbumin (45.0 kDa) and bovine carbonic anhydrase (31.0 kDa); lane (2), purified enzyme. The protein band was stained with CBB.

b Lanes (1)and (3);purified AOX; lanes (2) and (4): crude extract of *C. boidinii* NBRC10240 grown on methanol.

In lanes (1) and(2), the gel was stained with CBB. In lanes (3) and(4), AOX bands were visualized by active staining.

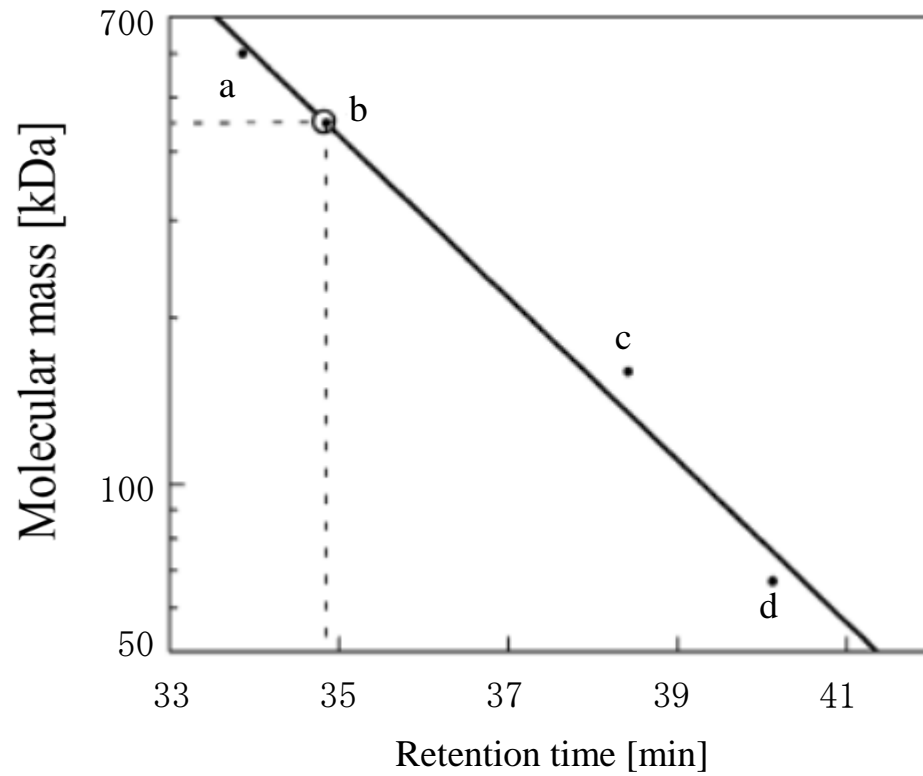


Figure 3-2 Molecular mass of AOX by gel filtration.

The position of purified AOX is shown by open circle.

Marker proteins (filled circles) are

a ; *C. boidinii* AOX (600 kDa), b: horse ferritin (450 kDa),

c: rabbit aldolase (158 kDa) and d: bovine serum albumin (67 kDa)

3. 3. 4 AOX の補因子解析

生成 AOX は黄色であった。未変性 AOX 溶液の吸光度測定を行った (**Figure 3-3**)。吸光スペクトラムは、主要な吸収ピークが 278、370、及び 400 nm 付近にショルダーを有する 459 nm に認められることから、FAD 含有物質と推定された (Tani *et al.* 1972b)。AOX にフラビン補因子が存在することは、煮沸したタンパク質を除いた後の限外ろ過試料の吸光度スペクトラムからも確認された (**Figure 3-3 inset**)。

遊離したフラビンをフラビンの標準試料と共に TLC に供した。遊離したフラビンの Rf 値は 0.07 であったが、リボフラビン、FMN 及び FAD の値は各々 0.56、0.31、及び 0.18 を示した。フラビンの標準試料を AOX と同一条件で煮沸した。煮沸後の標準試料は、TLC でスポットが確認できなかった。このことは、AOX は非共有結合のフラビンを有し、FAD、FMN、及びリボフラビンを有さないことを示唆した。

3. 3. 5 AOX 活性への pH と温度の影響

AOX は pH6-10 において高い活性を示した (**Figure 3-4(a)**)。また、AOX 活性は 30°C、60 min の保持条件において pH5-10 で高い安定性を示した (**Figure 3-4(b)**)。AOX の耐熱性試験では、50°C で 30 min 安定であった。AOX の活性は、50°C をこえると急激に低下し、60°C ではほぼ完全に活性が無くなった。

3. 3. 6 AOX の基質特異性と動態パラメータ

Table 3-3 に示すとおり、メタノールが最も良い AOX の基質であった。エタノールも同様に良い基質であった。メタノールを 100% とした場合、プロパノール及びホルムアルデヒドは、各々 33%、28% の活性値となった。一方で、アセトアルデヒドやプロピオンアルデヒドに対してはメタノールを 100% とした場合に 10% 以下の低い活性値となった。Lineweaver-Burk プロットよりメタノール、エタノール及びホルムアルデヒドの Km 値は、各々 1.9 mM、3.8 mM 及び 4.9 mM となった。

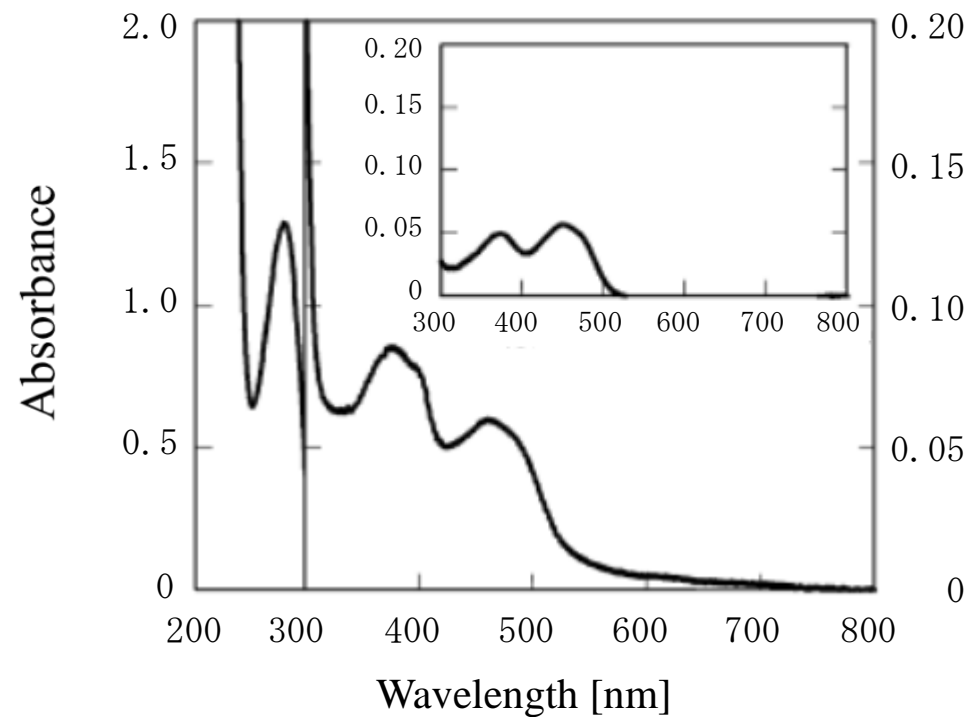


Figure 3-3 Absorption spectrum of purified AOX.

The concentration of the enzyme protein was 0.78 mg / ml in 0.1M sodium phosphate buffer (pH 8.0). The same buffer was used as a blank. The absorption spectrum was measured at room temperature. Inset is spectrum of flavin obtained after boiling the protein solution, centrifugation and ultra-filtration.

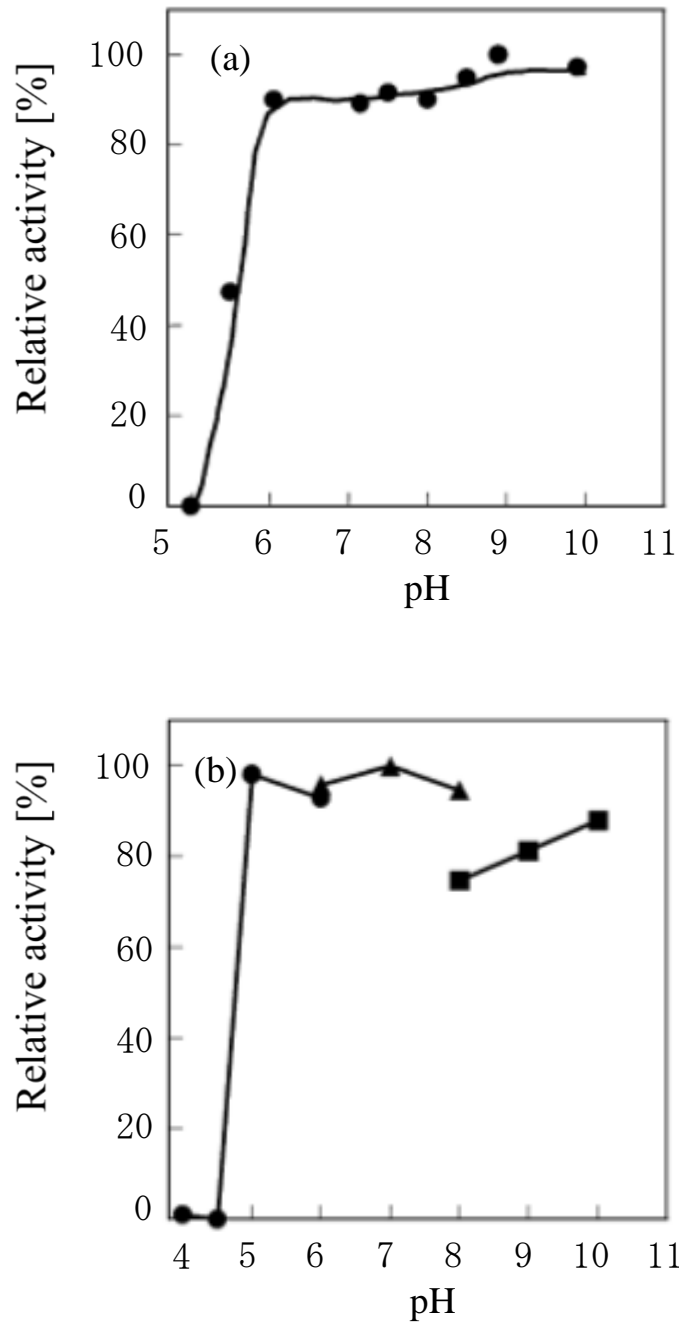


Figure 3-4 Effects of pH on activity and stability of AOX.

(a): The enzyme activity was measured under standard assay conditions in 0.1 M GTA buffer at various pH values. Relative activity is expressed as percentage of the maximum activity.

(b): The enzyme was preincubated at 30°C for 60 min in the following buffer: McIlvaine buffer (filled circle, pH 4–6), sodium phosphate buffer (filled triangle, pH 6–8) and boric acid–NaOH buffer (filled square, pH 8–10). The remaining activity was measured under standard assay conditions. Relative activity is expressed as percentage of the maximum activity

Table 3-3 Substrate specificity of AOX.

Compounds	Relative activity [%]
Methanol	100
Ethanol	106
n-Propanol	33
Formaldehyde	23
Acetaldehyde	4
Propionaldehyde	8

The compound tested was added to the assay mixture at a concentration of 20 mM. Enzyme activity was assayed under standard conditions.

3. 3. 7 AOX 活性に影響を及ぼす様々な物質

Table 3-4 に示すとおり、クロロメルクリ安息香酸及び塩化水銀 (II) は AOX 活性を阻害した。このことは、スルフィドリル基 (-SH) を有する酵素が触媒反応に不可欠となっていることを示す。o-フェナントロリン及びエチレンジアミン四酢酸の様なキレート化合物は AOX の活性阻害を引き起こさなかった。セミカルバジドやヒドラジンの様な、ヒドロキシルアミン及びカルボニル試薬は酵素活性に影響しなかった。

3. 3. 8 AOX によるホルムアルデヒド分解

Table 3-5 に示すとおり、AOX はホルムアルデヒドを蟻酸に酸化した。さらにカタラーゼを添加して過酸化水素を除くことで、AOX はホルムアルデヒドをさらに酸化した。このことは、酸化酵素反応によって生成する過酸化水素が、メチロトロフ酵母の報告と同様に IRI017 株由来の AOX 活性を疎外することを示した (Kato *et al.* 1976; Couderc and Baratti 1980)。

Table 3-4 Effects of various compounds on AOX activity.

Compound	Concentration [mM]	Remaining activity [%]
p-Chloromercuribenzoate	0.1	69
HgCl ₂	1.0	56
Iodoacetamide	1.0	129
Monoiodoacetate	1.0	93
Semicarbazide	1.0	102
Hydroxylamine	1.0	51
Hydrazine	1.0	104
EDTA	1.0	96
NaN ₃	1.0	89
o-Phenanthroline	1.0	125
CuSO ₄	1.0	100

The enzyme (7.8 µg) was preincubated with each inhibitor for 10 min at 30°C and then assayed under standard conditions.

Table 3-5 Enzymatic degradation of formaldehyde by AOX

Enzymes	Formaldehyde [mM]	Formic acid [mM]
Initial	2.0	0.0
AOX+catalase	1.2	1.0
AOX only	2.1	0.1
Catalase only	2.1	0.0
Enzyme free	2.2	0.0

AOX (4.5 μ g) and/or catalase (1140 U, 0.1 mg) were added to a solution containing 2.0 mM formaldehyde at pH 8.0 and incubated for 48 h at 30°C. Formaldehyde and formic acid in the solution were then measured.

3. 4 結 言

バクテリア及びメチロトロフ酵素由来の AOX に関する研究報告はあるが、*T. aurantiacus* (Ko *et al.* 2005)を除いて子囊菌類由来の AOX に関する報告例は無い。本研究では、*P. variotii* IRI017 株由来の AOX の精製を行い諸性質について調べた。取得した AOX はメタノールにより誘導され、FADH と FDH は共にメタノールとホルムアルデヒドにより誘導された。このことは、メチロトロフ酵母と同様に AOX がエネルギー生産系において FADH や FDH と共にメタノール代謝の初期段階に関わっているものと思われた。

AOX は、精製により無細胞抽出液から約 20 倍濃縮され 44%の活性を保持した。なお、精製酵素の比活性は 1.4 U/mg であった。精製 AOX の N 末端アミノ酸配列を調べたところ、酵素のサブユニットの分子量サイズはメチロトロフ酵母 (Kato *et al.* 1976; Couderc and Baratti 1980; Koutz *et al.* 1989; Sakai and Tani 1992) と類似していたが、タンパク質構造は異なっていた。すなわち、IRI017 株由来の AOX は 450 kDa の 6 つのサブユニットから構成されていたが、メチロトロフ酵母由来の AOX はおよそ 600 kDa のサブユニットから構成される 8 量体が報告されている。さらに、両 AOX はイオン交換樹脂への吸着性にも違いが認められた。

精製 AOX 及びその煮沸処理抽出物を分光分析することにより、非共有結合のフラビンが AOX に含まれることが示唆された。さらに TLC を行い、そのフラビンは FMN、FAD 及びリボフラビンとは異なることが分かった。そのフラビンは、メチロトロフ酵母由来の AOX と同様に FAD の改変により生成するものと思われた (Bystrykh *et al.* 1991)。

IRI017 株由来の AOX は、メチロトロフ酵母由来の酵素と基質特異性及び pH 安定性の値が類似していた。また、Km 値 (1.9 mM) に関しても同様に類似している酵素があった *C. boidinii* (Tani *et al.* 1972b; Sahm 1975)、*P. pastoris* (Couderc and Baratti 1980)、and *H. polymorpha* (van Dijken *et al.* 1976)。一方で、熱安定性 (50°C、30 min)についてはメチロトロフ酵母由来の酵素に比べ高い値となった (Kato *et al.* 1976、Segers *et al.* 2001、Ko *et al.* 2005)。

P. variotii IRI017 株由来の AOX の特徴は、これまで報告されたものに比べて広い至適 pH (6-10) と熱安定性が確認された。これらの性質は、環境中のホルム

アルデヒド分解除去など、産業用途への応用に有意義なものである。Table 3-5に示したとおり、ホルムアルデヒド酸化にはカタラーゼの共存が必要となる。産業利用には高価な精製 AOX ではなく安価な粗精製酵素を用いることが望ましい。

3.5 参考文献

Azevedo AM, Prazeres DM, Cabral JM, Fonseca LP, “Ethanol biosensors based on alcohol oxidase”. *Biosens Bioelectron* 21:235–247 (2005)

Barzana E, Klibanov AM, Karel M, “A colorimetric method for the enzymatic analysis of gases: the determination of ethanol and formaldehyde vapors using solid alcohol oxidase”. *Anal Biochem* 182:109–115 (1989)

Belghith H, Romette JL, Thomas D, “An enzyme electrode for on-line determination of ethanol and methanol”. *Biotech Bioeng* 30:1001–1005 (1987)

Bormann C, Sahn H, “Degradation of microbodies in relation to activities of alcohol oxidase and catalase in *Candida boidinii*”. *Arch Microbiol* 117:67–72 (1978)

Bringer S, Sprey B, Sahn H, “Purification and properties of alcohol oxidase from *Poria contigua*”. *Eur J Biochem* 101:563–570 (1979)

Bystrykh LV, Dijkhuizen L, Harder W, “Modification of flavin adenine dinucleotide in alcohol oxidase of the yeast *Hansenula polymorpha*”. *J Gen Microbiol* 137:2381–2386(1991)

Chen RLC, Matsumoto K, “Sequential enzymatic monitoring of glucose, ethanol and glutamate in bioreactor fermentation broth containing a high salt concentration by a multi-channel flowinjection analysis method”. *Anal Chim Acta* 308:145–151(1995)

Couderc R, Baratti J, “Oxidation of methanol by the yeast, *Pichia pastoris*. Purification and properties of the alcohol oxidase”. *Agric Biol Chem* 44:2279–2289 (1980)

Egli T, van Dijken JP, Veenhuis M, Harder W, Fiechter A, “Methanol metabolism in

yeasts: regulation of the synthesis of catabolic enzymes”. *Arch Microbiol* 124:115–121 (1980)

Fujii T, Tonomura K, “Oxidation of methanol, formaldehyde and formate by a *Candida species*”. *Agric Biol Chem* 36:2297–2306(1972)

Holzmann K, Schreiner E, Schwab H, “A *Penicillium chrysogenum* gene (aox) identified by specific induction upon shifting pH encodes for a protein which shows high homology to fungal alcohol oxidases”. *Curr Genet* 40:339–344 (2002)

Janssen FW, Kerwin RM, Ruelius HW, “Alcohol oxidase from Basidiomycetes”. *Methods Enzymol* 41:364–369 (1975)

Kato N, Omori Y, Tani Y, Ogata K, “Alcohol oxidases of *Kloeckera* sp. and *Hansenula polymorpha*. Catalytic properties and subunit structures”. *Eur J Biochem* 64:341–350 (1976)

Kato N, Miyawaki N, Sakazawa C, “Oxidation of formaldehyde by resistant yeasts *Debaryomyces vanriji* and *Trichosporon penicillatum*”. *Agric Biol Chem* 46:655–661 (1982)

Kerwin RM, Ruelius HW, “Production of alcohol oxidase by several *Basidiomycetes*”. *Appl Microbiol* 17:347–351 (1969)

Ko HS, Yokoyama Y, Ohno N, Okadome M, Amachi S, Shinoyama H, Fujii T, “Purification and characterization of intracellular and extracellular, thermostable and alkali-tolerant alcohol oxidases produced by a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus* NBRC 31693”. *J Biosci Bioeng* 99:348–353 (2005)

Kondo T, Morikawa Y, Hayashi N, Kitamoto N, “Purification and characterization of

formate oxidase from a formaldehyderesistant fungus”. *FEMS Microbiol Lett* 214:137–142 (2002)

Koutz P, Davis GR, Stillman C, Barringer K, Cregg J, Thill G, “Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes”. *Yeast* 5:167–177 (1989)

Laemmli UK, “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4”. *Nature* 227:680–685 (1970)

Ledeboer AM, Edens L, Maat J, Visser C, Bos JW, Verrips CT, Janowicz Z, Eckart M, Roggenkamp R, Hollenberg CP, “Molecular cloning and characterization of a gene coding for methanol oxidase in *Hansenula polymorpha*”. *Nucleic Acids Res* 13:3063–3082 (1985)

Liden H, Vijayakumar AR, Gorton L, Marko-Varga G, “Rapid alcohol determination in plasma and urine by column liquid chromatography with biosensor detection”. *J Pharm Biomed Anal* 17:1111–1128 (1998)

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ, “Protein measurement with the Folin phenol reagent”. *J Biol Chem* 193:265–275 (1951)

Nash T, “The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction”. *Biochem J* 55:416–421 (1953)

Ozimek P, Veenhuis M, van der Klei IJ, “Alcohol oxidase: a complex peroxisomal, oligomeric flavoprotein”. *FEMS Yeast Res* 5:975–983 (2005)

Patel RN, Hou CT, Laskin AI, Derelanko P, “Microbial oxidation of methanol: properties of crystallized alcohol oxidase from a yeast, *Pichia* sp”. *Arch Biochem Biophys* 210:481–488 (1981)

Sahm H, “Oxidation of formaldehyde by alcohol oxidase of *Candida boidinii*”. *Arch Microbiol* 105:179–181 (1975)

Sakai Y, Tani Y, “Cloning and sequencing of the alcohol oxidase-encoding gene (AOD1) from the formaldehyde-producing asporogeneous methylotrophic yeast”, *Candida boidinii* S2. *Gene* 114:67–73 (1992)

Segers G, Bradshaw N, Archer D, Blissett K, Oliver RP, “Alcohol oxidase is a novel pathogenicity factor for *Cladosporium fulvum*, but aldehyde dehydrogenase is dispensable”. *Mol Plant Microbe Interact* 14:367–377 (2001)

Soldevila AI, Ghabrial SA, “A novel alcohol oxidase/RNAbinding protein with affinity for mycovirus double-stranded RNA from the filamentous fungus *Helminthosporium (Cochliobolus) victoriae*. Molecular and functional characterization”. *J Biol Chem* 276:4652–4661 (2001)

Tani Y, Miya T, Nishikawa H, Ogata K, “The microbial metabolism of methanol. Part I. Formation and crystallization of methanol-oxidizing enzyme in a methanol-utilizing yeast, *Kloeckera* sp. No. 2201”. *Agric Biol Chem* 36:68–75 (1972a)

Tani Y, Miya T, Ogata K, “The microbial metabolism of methanol. Part II. Properties of crystalline alcohol oxidase from *Kloeckera* sp. No. 2201”. *Agric Biol Chem* 36:76–83 (1972b)

Udagawa S, “*Paecilomyces variotii* Bain”. In ed. Udagawa S, Tsubaki K, Horie Y, Miura K, Minoura K, Yamazaki M, Yokoyama T, Watanabe S (eds) *Kinrui Zukan*, Vol. 2, 3rd edn. Kodansha (in Japanese), Tokyo, pp 1074–1075 (1978)

van Dijken JP, Otto R, Harder W, “Growth of *Hansenula polymorpha* in a

methanol-limited chemostat. Physiological responses due to the involvement of methanol oxidase as a key enzyme in methanol metabolism". *Arch Microbiol* 111:137–144 (1976)

Veenhuis M, Zwart K, Harder W, "Degradation of peroxisomes after transfer of methanol-grown *Hansenula polymorpha* into glucose-containing media". *FEMS Microbiol Lett* 3:21–28 (1978)

第4章 固定化酵素を用いたホルムアルデヒド除去用バイオフィルタの開発

4.1 はじめに

建材、家具等に用いられる塗料や接着剤から放散される VOC（揮発性有機化合物）はシックハウス症候群の原因物質とされている（Hatano *et al.*, 2001, Matsumura *et al.*, 2011）。中でもホルムアルデヒドは、刺激性が強く製品残留期間が長いことから、WHO や厚生労働省により室内環境指針値が設けられており、室内環境からの除去が望まれている物質の一つである（WHO, 1987）。

室内環境中のホルムアルデヒド除去対策としては、炭化物等のホルムアルデヒド吸着剤を用いる方法や、光触媒などの触媒反応を用いてホルムアルデヒドを分解除去する方法が知られている（Nakajima *et al.*, 2005）。しかし、吸着剤を用いる方法は、吸着されたホルムアルデヒドが再放出する恐れがある（Tsuitsuimi *et al.*, 2005）。また、触媒を用いる方法は、不特定の物質反応を促進して、新たに生成した物質が有害となる可能性がある。このため、特定の分解反応を促進する、酵素や微生物などの生体触媒を用いる手法が検討されている（Estévez *et al.*, 2005, Jang *et al.*, 2005, Kimura *et al.*, 2001, Ohta, 1999, Okamoto *et al.*, 1999, Shinagawa *et al.*, 2006）。

VOC や異臭物質等の気体成分を分解するために生体触媒を用いる場合、生体触媒を樹脂や炭化物などの担体に固定化して用いる（Yamashita *et al.*, 1999）。担体に固定化することにより、水などに溶解するために取り扱いにくい生体触媒を大きな形状の担体として容易に取り扱えるようになる。また、担体の選択により生体触媒の耐久性や活性等の性質向上が図れることが知られている（Nagayama *et al.*, 2013）。さらに、室内環境の様な低濃度の基質を分解する場合、担体の吸着性能により、担体内部での基質を吸着濃縮する効果が期待される。低濃度で分解困難な基質が担体内部で濃縮されることにより、担体内部の酵素で分解し易くなると考えられる（Kimura *et al.*, 2001）。

そこで本研究では、ホルムアルデヒド分解能を有するアルコール酸化酵素（AOX）を用いたホルムアルデヒド除去剤の開発を行った。使用した AOX は第2、3章で述べた新規なホルムアルデヒド分解微生物 *Paecilomyces variotii* IRI017 株（Morikawa *et al.*, 2013）が生産する酵素であり、空気中の酸素を電子受容体とす

るため補酵素など高価な他の物質を改めて添加する必要がない。また、本酵素はアルコール酸化活性を有する AOX として精製されているが、酵素学的実験によりホルムアルデヒド酸化活性も持つ特異な酵素として同定されている (Kondo *et al.*, 2008)。

なお、AOX を固定化する担体には、細孔径制御や表面修飾が可能であるシリカゲルを用いた。シリカゲルの細孔径や表面アミノ基が AOX の固定化に及ぼす効果を検討した。さらに、固定化酵素を用いた空気清浄機用のフィルタを試作し性能評価を行い、ホルムアルデヒド除去用バイオフィルタへの可能性を調べた。

4. 2 実験装置及び実験方法

4. 2. 1 *Paecilomyces variotii* IRI017 株の培養および酵素の粗精製液の調製

試験に用いる酵素は、ホルムアルデヒド分解能を有する *P. variotii* IRI017 株を培養して得た (Morikawa *et al.*, 2013)。 *P. variotii* IRI017 株から、ホルムアルデヒドを基質とするアルコール酸化酵素を既報 (Kondo *et al.*, 2008) に準じて回収した。すなわち、メタノール 1% を添加した培地で培養した菌体を集菌、凍結後破砕した。破砕した菌体を同重量の 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH8.0) に懸濁し、濾紙で吸引濾過し、細胞破砕液とした。細胞破砕液を硫酸アンモニウムで塩析した後、透析し粗精製液として回収した。なお、粗精製液の活性測定は既報 (Morikawa *et al.*, 2013) に準じ、キノン生成に伴う 505 nm の吸光度の増加を測定し、単位時間あたりの吸光度増加から活性を求めた。

培養した *P. variotii* IRI017 株から得られた細胞破砕液は、0.01 U/ mg-protein の AOX 比活性値を示した。細胞破砕液を硫酸塩析後透析して回収した粗精製液は、細胞破砕液に対して約 8 倍の 0.08 U/mg-protein AOX 比活性値を示した。以下、特に述べない限り粗精製液を試験に供した。

4. 2. 2 酵素の固定化

固定化用の担体にはシリカゲル (富士シリシア化学株式会社製 CARIACT Q) を用いた (Asano *et al.*, 2004)。シリカゲル (SG) は、平均細孔径が 10 nm-50 nm の市販品に加え、富士シリシア化学株式会社において 80 nm 及び 100 nm を細孔容積が 1 mL/g となるように市販品と同様の方法で試作した (Table 4-1)。

なお、Figure 4-1 の構造イメージに示すとおり、1.70 mm-4.00 mm の SG 二次粒子 (Secondary particles) は、直径数 nm の骨格粒子 (primary particles) が形成する 3 次元構造体である。SG の平均粒子径 (average size of primary particles) は、骨格粒子の隙間径であり、測定には水銀圧入法 (Yokoyama *et al.*, 1987) を用いた。

アミノ基をシリカゲル表面に付ける場合、100 g のシリカゲルをトルエン 150 mL 中で 3-アミノプロピルトリエトキシシラン (ナカライテスク株式会社製) 2.5 mL と共に 80°C で 1 h 加熱して反応を行った。反応後、シリカゲルを濾過回収し、110°C で 12 h 減圧乾燥した。なお、表面がシラノール基のままのものを未処理品 (SG)、未処理品に 3-アミノプロピルトリエトキシシランをカップリング処理し

たものをアミノ処理品 (AminoSG) とした。

粗精製液 4 mL に対し、シリカゲル 1 g を投入し、4°C で 5 h 保持した。粗精製液が含浸したシリカゲルを濾過回収し、重量を測定した。さらに、50°C で恒量になるまで乾燥して酵素固定化乾燥シリカゲル (AOX-SG, AOX-aminoSG) を得た。SG に付着した粗精製液中のタンパク質量は Lowry 法で測定し、酵素吸着量の指標とした。

Table 4-1 Physical value properties of silica gels

No.	average pore size [nm]	pore volume [mL/g]	specific surface [m ² /g]	particle size [mm]
Q10	10	1	300	1.70 - 4.00
Q15	15	1	200	1.70 - 4.00
Q30	30	1	100	1.70 - 4.00
Q50	50	1	80	1.70 - 4.00
Q80	80	1	40	1.70 - 4.00
Q100	100	1	30	1.70 - 4.00

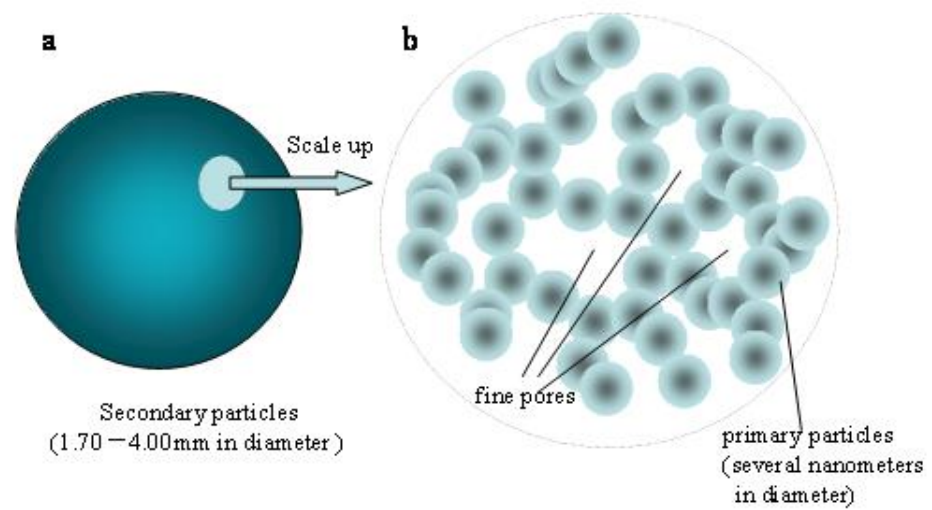


Figure 4-1 Image of silica gel structure

- a; secondary particle constituted by primary particles
- b; fine pores formed by primary particles

4. 2. 3 溶液中のホルムアルデヒド吸着および分解試験

酵素を固定化していないシリカゲル (SG, AminoSG) 各 1 g を、45.4 mg/L のホルムアルデヒド溶液 3 mL と混和し、30°C で 3 h 浸せきした。濾過によりゲルを除去した後の溶液中の残存ホルムアルデヒド濃度を Nash 法 (Nash, 1953) で測定し、吸着前のホルムアルデヒド濃度との差からゲルの吸着量を求めた。なお、対照はシリカゲルを投入しないホルムアルデヒド溶液のみとして、試験中にホルムアルデヒド液濃度 (45.4 mg/L) の変化がないことを確認した。

さらに、シリカゲルの吸着量より十分に多い 230 mg/L ホルムアルデヒド溶液 3 mL の入った容器に、固定化酵素シリカゲル (AOX-SG, AOX-aminoSG) を各 1 g 投入した。30°C で 3 h 浸せきした後に、溶液中のホルムアルデヒド濃度を測定した。酵素を固定化していないシリカゲルを用い、ホルムアルデヒド減少量の差から下式 (1) によりホルムアルデヒド分解活性を算出した。なお、1min に 1 µg のホルムアルデヒドを分解することを 1 U と定義した。ホルムアルデヒド溶液の分析は同様に Nash 法を用いた。

$$\text{Formaldehyde degradation activity (U/g-silica gel)} = ((\text{Amount of Formardehyde removal (AOX-SG, AOX-aminoSG)} (\mu\text{g}) - \text{Amount of Formardehyde removal (SG, AminoSG)} (\mu\text{g})) / (\text{weight of silica-gel (g)} \times \text{Reaction time (min)})) \quad (1)$$

4. 2. 4 固定化酵素によるガス中のホルムアルデヒド除去試験

Figure 4-2 にホルムアルデヒド分解試験装置の概略図を示した。容器 (**Figure 4-2 d**) に投入したホルムアルデヒド溶液に約 0.4 mg/L の空気を連続通気して、目的濃度のホルムアルデヒドガスを発生させた。なお、ホルムアルデヒド溶液は、パラホルムアルデヒド (和光純薬工業株式会社製) を加熱溶解して作成した。発生したホルムアルデヒドガスを乾燥空気と混合して湿度調整をした。湿度調整後のホルムアルデヒドガスをガラス製カラム (**Figure 4-2 f**, 内径 18 mm、長さ 50 mm) に通気した。ガラス製カラムに酵素固定化シリカゲル 5.0 g (かさ密度約 0.40 g/cm³) を入れ、カラム投入前とカラム通過後の捕集管装着場所 (**Figure 4-2 の g**) におけるホルムアルデヒド濃度を測定した。ホルムアルデヒド減少量の差から、固定化酵素のホルムアルデヒド分解活性を式 (1) により算出した。

また、式 (2) により 90 日間のホルムアルデヒド除去率を算出し、分解性能の耐久性を評価した。

$$\text{Formaldehyde removal ratio (\%)} = (1 - \text{Formaldehyde gas concentration after silica gel column aeration (ppm)} / \text{Formaldehyde gas concentration before silica gel column aeration (ppm)}) \times 100 \quad (2)$$

なお、ホルムアルデヒド除去率の耐久性評価には、市販のシリカゲルの中で最も細孔径が大きい (50 nm) ものをを用いた。ホルムアルデヒドガス濃度の分析は、固相捕集管 Sep-Pack DNPH-silica (日本ウォーターズ株式会社製) に捕集したホルムアルデヒドをアセトニトリルで溶出して試料を作成し、HPLC で測定した。なお、HPLC の構成は、脱気ユニット : DGU-14A、(株式会社島津製作所製)、送液ポンプ : LC-10ADvp (株式会社島津製作所製)、検出器 : SPD-M10Avp (株式会社島津製作所製)、分離カラム : LUNA 5 μ C18 (2) (5 μ m, 4.6 mmID \times 3 cm + 4.6 mmID \times 25 cm Phenomenex 製) 移動相 : アセトニトリル : 水 = 55:45 とした。また、分析条件は、移動相流量 : 1.0 mL/min、吸光度測定波長 : 360 nm、カラム温度 40°C で行った。

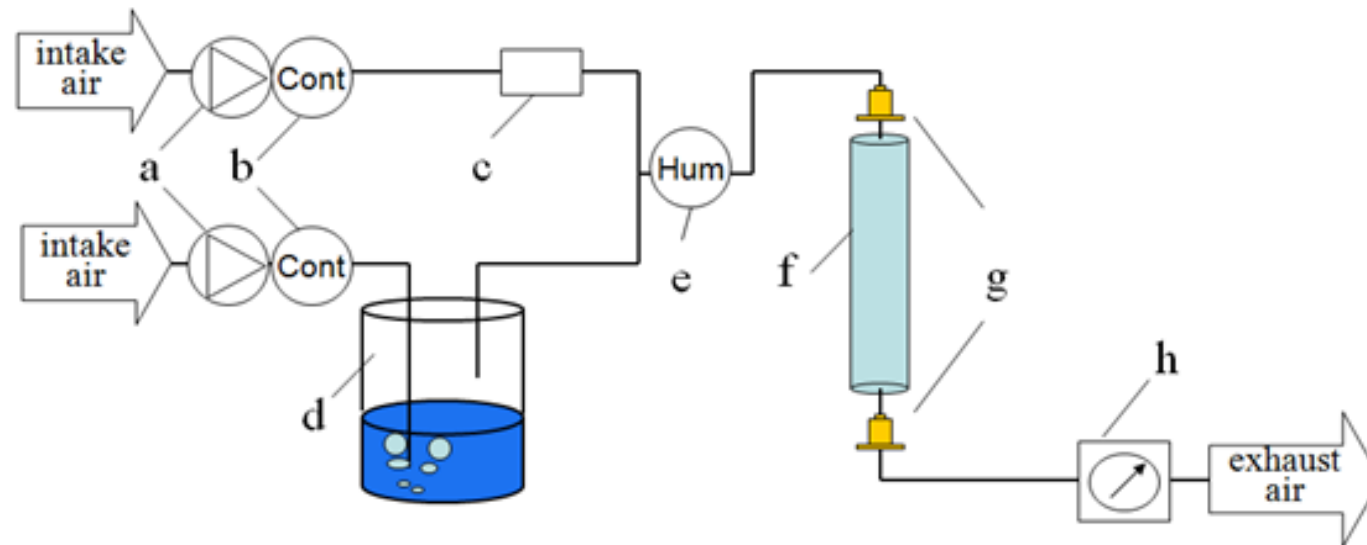


Figure 4-2 Schematic view of apparatus for formaldehyde degradation test

- a: air pump,
- b: mass flow controller,
- c: dehumidifier,
- d: reservoir tank for formaldehyde fluid,
- e: humidity instrumentation,
- f: column,
- g: solid phase extraction (only at the time of measurement),
- h: flow voltmeter

4. 2. 5 ホルムアルデヒド分解フィルタの試作とホルムアルデヒド除去性能

Figure 4-3 に、試作したホルムアルデヒド分解フィルタの写真と概念図を示した。フィルタの試作は、三喜ゴム株式会社において市販品製造方法に準じて行った。ペーパーハニカムコア 300 mm×160 mm×20 mm (960 cm³) に約 220 g の酵素未固定 (SG, AminoSG) あるいは酵素固定化シリカゲル(AOX-SG, AOX-aminoSG) を挿入し、全体をポリプロピレン製の不織布でサンドして作成した。なお、対照には活性炭と同一形状のペーパーハニカムコアによる市販品フィルタを用いた。

試作フィルタの一部 (幅 10 mm のハニカムの 1 セル、シリカゲル約 4.6 g) を切断し **Figure 4-2** に記載のホルムアルデヒド分解試験装置に装着した。1-3 L/ min の風量でホルムアルデヒドガスを通気した際の除去率を下式 (3) により算出した。

$$\text{Formaldehyde gas concentration after filter aeration (ppm)} / \text{Formaldehyde gas concentration before filter aeration (ppm)} \times 100 \quad (3)$$

さらに、試作フィルタを空気清浄機 (リコーエレメックス株式会社製 AIR MATE AD061K) に装着して、JEM1467 家庭用空気清浄機試験の初期脱臭性能試験に準じたホルムアルデヒドの初期の吸着除去性能評価を行った。1 m³ アクリルチャンバー内に空気清浄機を設置し密閉した後、ホルムアルデヒドガス (2 ppm 以上) を挿入した。その後、空気清浄機を稼働させ、チャンバー内部の濃度変化を所定時間毎に測定した。測定は室温とし、固相捕集管 Sep-Pack DNPH-silica に補足したホルムアルデヒドをアセトニトリルで溶出して試料を作成し、HPLC で測定した。

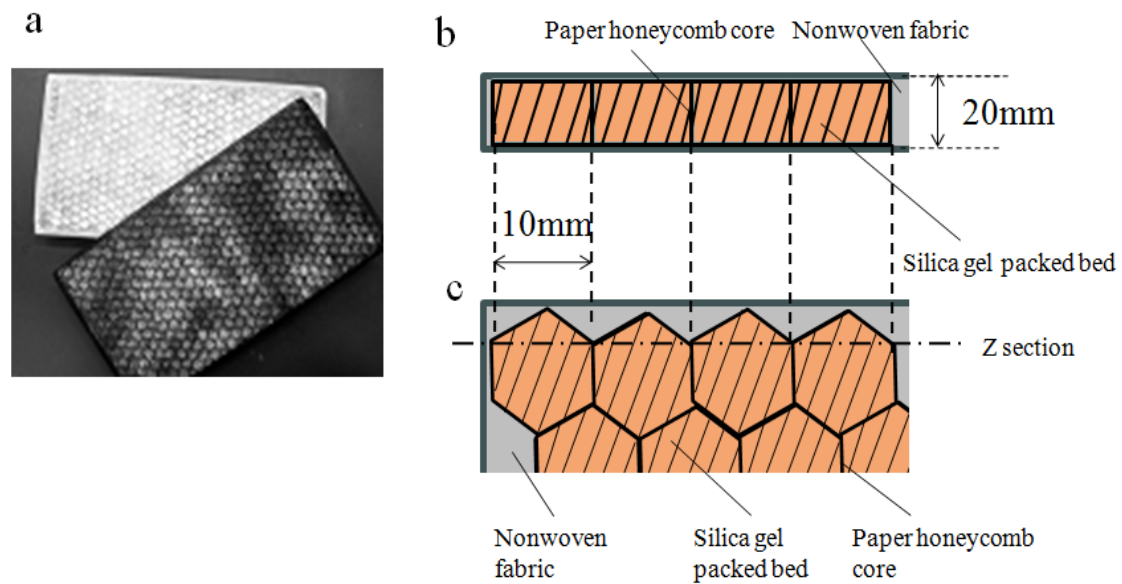


Figure 4-3 Photograph and Schematic view of formaldehyde decomposition filter

a: photograph of formaldehyde decomposition filter

b: schematic view of Z section

c: schematic view of top view

4. 3 実験結果及び考察

4. 3. 1 酵素の固定化

未処理及び 3-アミノプロピルトリエトキシシランをカップリングした平均細孔径 10 nm-100 nm シリカゲル (SG, aminoSG) 各 1 g に粗精製液を浸せきし、濾過したところ、ほぼ 1 mL の粗精製液が吸収され重量は 2 g となった。さらに、50°C で乾燥して酵素を吸着固定したシリカゲル (AOX-SG, AOX-aminoSG) を得た。濾液中のタンパク質量を分析したところ、シリカゲルの平均細孔径の増加に伴い、タンパク質吸着量が増加した (**Figure 4-4**)。平均細孔径 10nm 以下のシリカゲルでは液のタンパク質濃度が上昇した (図示せず) ことから、酵素サイズよりある程度の大きさの細孔径が必要であるものと考えられた。AOX-aminoSG では電氣的反発のためタンパク質固定化量が少なくなったものと思われる。

4. 3. 2 溶液中のホルムアルデヒド吸着および分解試験

Table 4-2 に、液中におけるシリカゲル (SG, AminoSG) のホルムアルデヒド吸着試験結果を示した。酵素の固定化と同様に浸せきさせたところ、ホルムアルデヒド溶液約 1 mL が 1 g のシリカゲルに吸収された。濾過液のホルムアルデヒド濃度は、SG ではシリカゲル投入時と変化なく (45 mg/L)、AminoSG では大きく減少した (3.7 mg/L)。シリカゲル 1 g 当たりのホルムアルデヒド吸着量はアミノ基の導入により 45 µg/g から 130 µg/g と増加したのは、表面電位が変化したためであると考えられた。

次に、酵素を含浸させて乾燥した酵素固定化シリカゲル (AOX-SG, AOX-aminoSG) でのホルムアルデヒド分解を検討した。**Figure 4-5** に溶液中におけるシリカゲルの平均細孔径とホルムアルデヒド分解活性の関係を示す。

Figure 4-4 と同様にシリカゲルの平均細孔径の増加に伴い、ホルムアルデヒド分解活性が増加した。AOX によるホルムアルデヒド分解が無い場合、シリカゲルの細孔径が小さい試験区では **Table 4-1** に示したとおり比表面積が大きくなり、シリカゲル単位重量当たりのホルムアルデヒド減少率が多くなると考えられた。しかし、**Figure 4-5** に示すホルムアルデヒド減少率は粗酵素液のタンパク質吸着割合に準じた右上がりのグラフとなった。ホルムアルデヒド分解は、粗精製液中の AOX が行うことから、**Figure 4-4** のタンパク質の吸着量は、粗精製液中の AOX

の吸着量がある程度示していることが確認できた。

一方で、Figure 4-4 とは異なり AOX-aminoSG が AOX-SG に比べ高い値を示した。平均細孔径 100 nm の AOX-aminoSG において、最大値 0.2 U/g-silica gel の分解活性が得られた。

これは、Table 4-2 に示した AOX-aminoSG の高いホルムアルデヒド吸着性能により、シリカゲル内の酵素付近に存在するホルムアルデヒド濃度が高くなったことが一因と考えられた。

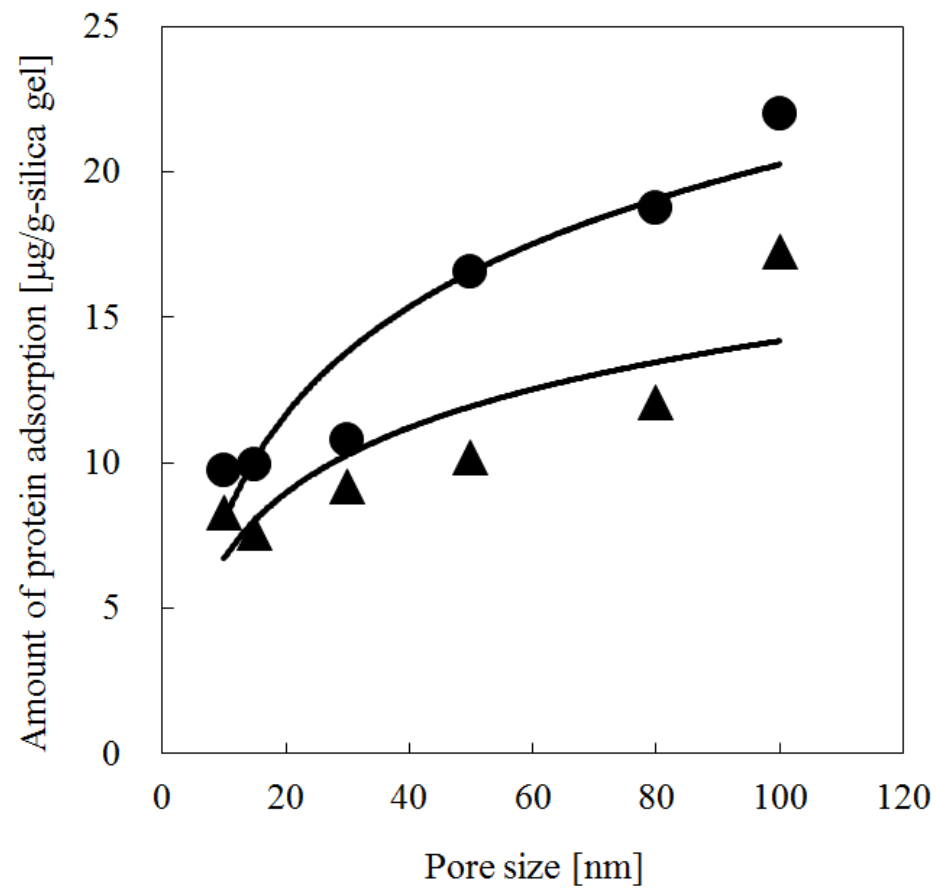


Figure 4-4 Relation between the amount of protein adsorption and the pore size of silica gels

● : SG ▲ : AminoSG

Table 4-2 Result of formaldehyde adsorption to silica gel.

Silica gel	Formaldehyde ^b in solution out of SG [mg / L]	Formaldehyde in inner SG [µg-HCHO / g-silica gel]
Control (no silica gel)	45.4	—
CARiACT Q50 (unprocessed)	45.4	45.4
CARiACT Q50 (coupling processed) ^a	3.7	128.8

a 3-aminopropyltriethoxysilane was used for the coupling agent.

b The 1 g of silica gel was dipped into 3 mL formaldehyde (45.4 mg/mL) fluid for 3 h.
After dipping, formaldehyde concentration was determined by Nash method.

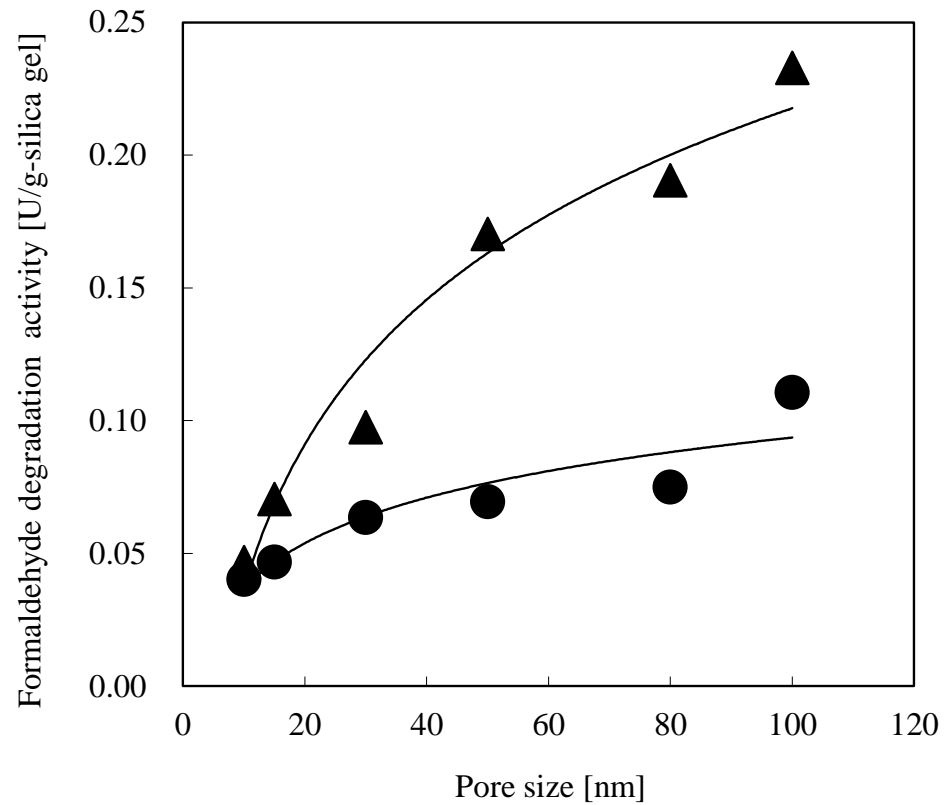


Figure 4-5 Relation between the AOX activity of immobilized enzyme from IRI017 and the pore size of silica gels

● : AOX-SG ▲ : AOX-aminoSG

4. 3. 3 ホルムアルデヒドガス分解試験

分解対象をホルムアルデヒドガスにすることで、固定化酵素の気中における分解活性を確認した (Figure 4-6)。様々な平均細孔径の未処理のシリカゲルを使って作製した AOX-SG をカラムに投入し約 10 ppm の高濃度のホルムアルデヒドガスを通じた。AOX-aminoSG はホルムアルデヒドの分解活性が高すぎるため本試験では用いなかった。

対照の酵素を固定化していないシリカゲルが吸着飽和になった後 (約 50 h 後) に測定を開始したところ、液中の反応 (Figure 4-5) と同様に細孔径の増加に対しホルムアルデヒド分解率も増加していた。一方で、分解活性は約 10 倍となった。ガス中と液中の物質の拡散速度の違いや、液中反応時の基質濃度変化など様々な要因が影響したものと考えられた。

0.4–0.5 ppm のホルムアルデヒドガスをカラムに連続で通気して、固定化酵素シリカゲルの耐久性評価試験を行った (Figure 4-7)。なお、ホルムアルデヒドガス濃度は、カラム投入前の捕集管装着場所 (Figure 4-2 の g) におけるホルムアルデヒド濃度の測定値であり、0.4-0.5 ppm となるようにホルムアルデヒド分解試験装置の容器 (Figure 4-2 の d) に含まれるホルムアルデヒド濃度を管理した。耐久性はホルムアルデヒド分解率がどのくらい持続するかで評価した。ガス中のホルムアルデヒドの分解率は式 (2) で評価した。

酵素を固定化していないシリカゲル (SG, AminoSG) に、湿度 90% 以上のホルムアルデヒドガスを連続通気したところ (Figure 4-7 △、▲) 試験開始から日を経る毎にホルムアルデヒド除去率は大きく減少し、SG は 10 日、AminoSG は 20 日以内に、投入濃度より高いホルムアルデヒドガスが検出された。これはシリカゲルに吸着したホルムアルデヒドが再放散したためと考えられる。

一方、同様のホルムアルデヒドガスを酵素固定化シリカゲル (AOX-SG, AOX-aminoSG) に通気したところ (Figure 4-7 ○、●)、ホルムアルデヒド除去率は 80% 以上の高い値で維持をした。中でも AOX-aminoSG を用いた系では、約 3 ケ月 (92 日) 間 91% 以上のホルムアルデヒド除去率を維持し続けた。なお、AOX-SG は 70 日を超えた後にホルムアルデヒド除去率が低下し、92 日後には 44% となった。さらに、AOX-aminoSG に対し、湿度 20% 以下のホルムアルデヒドガスを連続通気したところ (Figure 4-7 ■)、湿度 90% 以上の試験系とほぼ同様に約 3 ケ

月（90日）間90%以上のホルムアルデヒド除去率を維持し続けた。

AOX-SGがAOX-aminoSGに比べてホルムアルデヒド除去率が低下した理由には、ホルムアルデヒド分解活性が低いために（Figure 4-5）シリカゲル内のホルムアルデヒド濃度が高まり、AOXや共存する蟻酸酸化酵素（Morikawa *et al.*, 2013）が失活したこと、また、酵素失活により蟻酸が蓄積し、シリカゲル内のpHが低下したことなどが考えられた。

これらの結果より、多孔体のシリカゲルに吸着されたホルムアルデヒドは、シリカゲルに固定化されたAOXにより酸化分解し、高い除去率を維持したと考えられた。また、連続通気されたホルムアルデヒドはシリカゲル細孔内でガス拡散し、細孔内に保持されている微量の水に溶解込むことで酵素反応しており、これにより、低湿度環境でも固定化酵素の利用ができると考えられた。

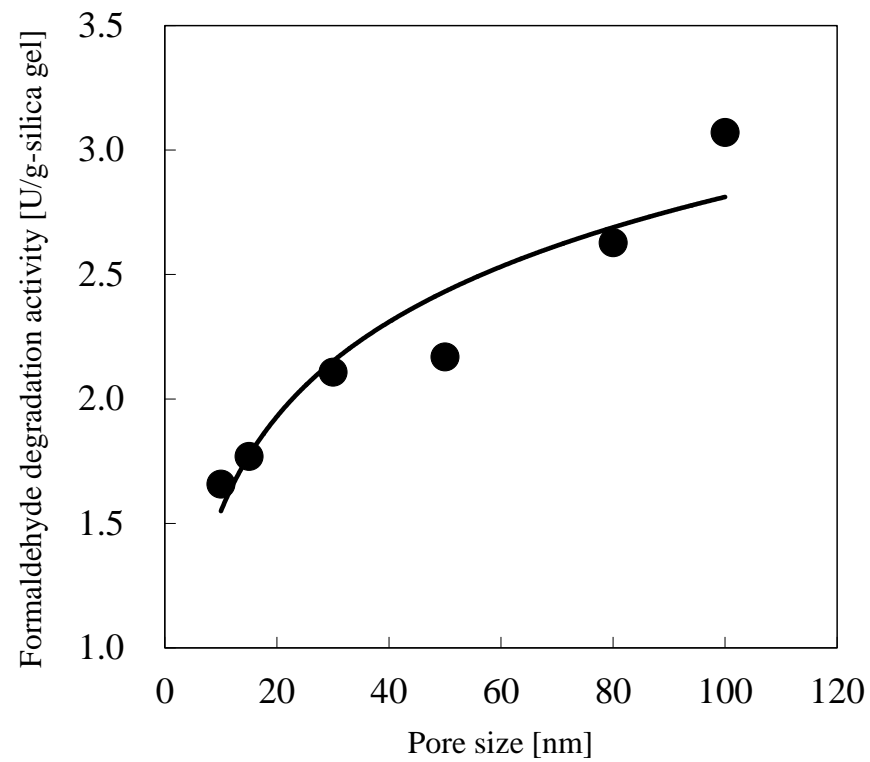


Figure 4-6 Relation between the AOX activity of immobilized enzyme from IRI017 and the pore size of AOX-SG (in gas phase)

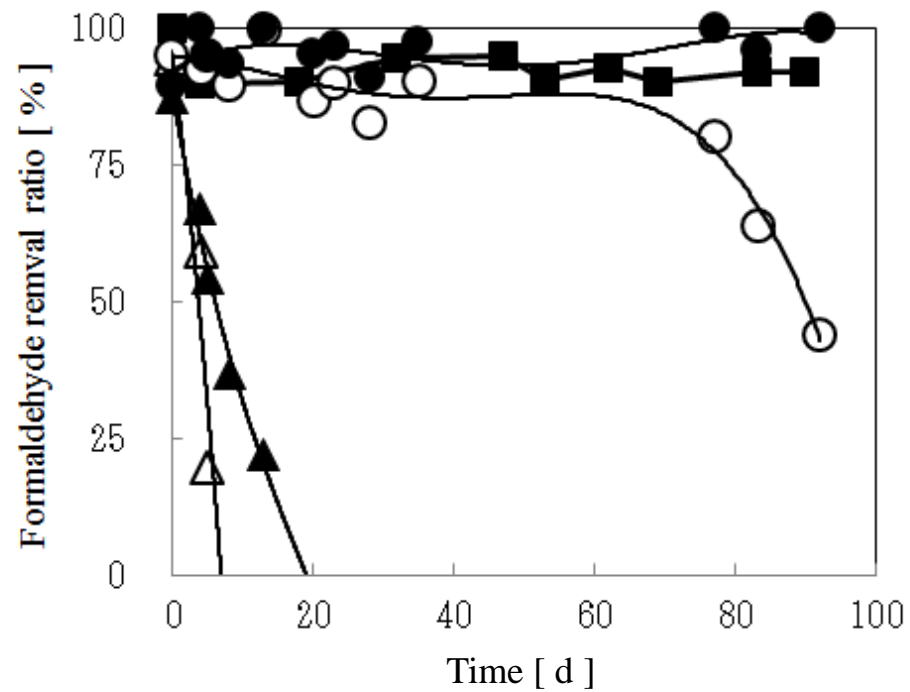


Figure 4-7 Change of the formaldehyde removal ratio by continuation gas aeration

- : AOX-SG (90% or more of humidity),
- : AOX-aminoSG (90% or more of humidity),
- : AOX-aminoSG (20% or less of humidity),
- △ : SG (90% or more of humidity),
- ▲ : AminoSG (90% or more of humidity)

4. 3. 4 試作ホルムアルデヒド分解フィルタの除去性能

平均細孔径 50 nm の酵素固定化シリカゲルを用いて試作したフィルタのホルムアルデヒド除去（脱臭）性能評価を行った。

AOX-aminoSG を用いた試作フィルタは、風量 1-3 L/min（空気清浄機で約 0.1-0.6 L/min）においてホルムアルデヒドガス（約 0.2 ppm）を 88%以上除去し、ほぼ市販品の活性炭フィルタと同等の性能を示した（**Figure 4-8**）。一方、AOX-SG を用いた試作フィルタは風量が増加するに従い除去率が減少した。

さらに、JEM1467 家庭用空気清浄機試験の初期脱臭性能試験に準じたホルムアルデヒドの初期の吸着除去性能評価を行った。1 m³ のアクリルチャンバー内のホルムアルデヒドガス濃度を 2 ppm 以上に設定し、1.5 L/min の風量で 3 h 空気清浄機を稼働した。未処理のシリカゲルを用いたフィルタは、試験開始前約 2.7 ppm のホルムアルデヒドを試験開始後徐々に減少したが、3 h 後約 1.8 ppm のホルムアルデヒドが残存した。この条件では、未処理の酵素固定化乾燥シリカゲルを用いたフィルタでは厚生労働省の室内環境指針値 0.08 ppm 以下に減少させることができなかった。一方、アミノ処理した酵素固定化シリカゲルを用いたフィルタは、酵素 AOX の有無によらず 3.0 ppm 以上のホルムアルデヒドを、初発の測定 の 20 min 時点ではほぼ 0.0 ppm に減少した。比較対照に用いた市販品の活性炭フィルタは、2 ppm のホルムアルデヒドを 20 min 後に 0.2 ppm に減少させ、3 h 後には約 0.08 ppm より少ない値となった。本研究で試作したアミノ基修飾シリカゲルは、市販品の活性炭フィルタに比べホルムアルデヒドの初期脱臭性能が 1.7 倍以上大きいことが確認された。

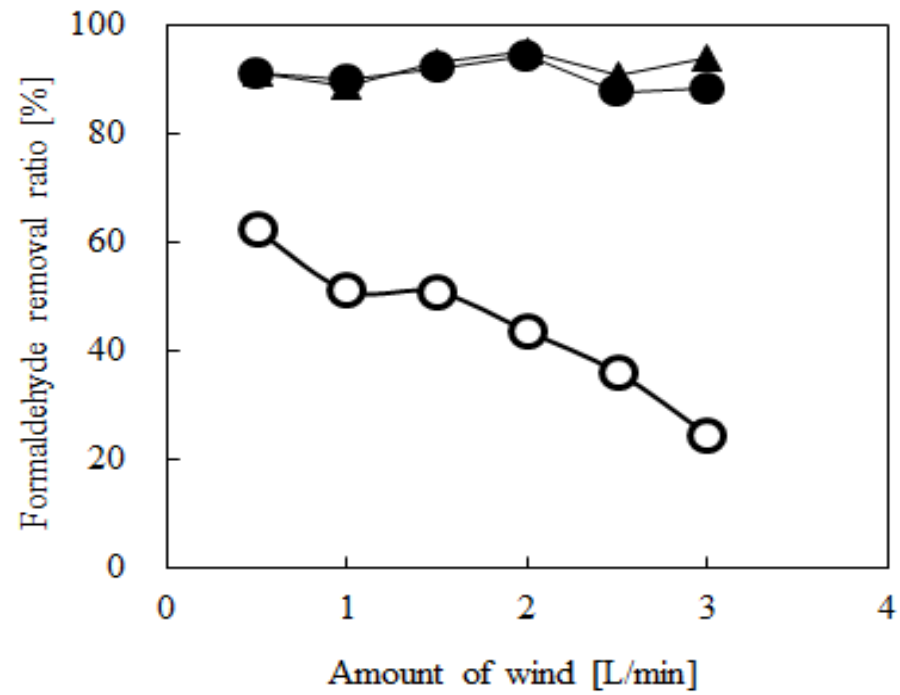


Figure 4-8 Formaldehyde extraction ratio of the filter in the various amounts of winds

○ : AOX-SG, ● : AOX-aminoSG ▲ : activated carbon (commercial item)

4. 4 結 言

本研究では、シックハウス症候群やシックカー症候群など室内環境汚染の原因物質とされるホルムアルデヒド除去用の酵素固定化乾燥シリカゲル担体を開発した。担体は、ホルムアルデヒド分解微生物 *P. variotii* IRI017 株から抽出した粗精製液を 10 nm-100 nm の細孔が異なるシリカゲルに固定化し調製した。シリカゲルの細孔径の違いによる酵素固定化担体の AOX 活性値への影響は大きく、今回は市販品の中で最も細孔径が大きい 50 nm を選択した。さらに、シリカゲルに 3-アミノプロピルトリエトキシシランをカップリングすることで、多孔質担体であるシリカゲルへのホルムアルデヒド吸着能が向上し、AOX 活性も大きくなった。開発した酵素固定化乾燥シリカゲル担体(AOX-aminoSG) を用いて、空気清浄機のフィルタを試作したところ、市販品の活性炭と同等のホルムアルデヒド吸着性能を有し、0.4 -0.5 ppm ホルムアルデヒドガスを連続で 90 日以上酵素により分解し続けた。分解性能は湿度 20%以下の状態でも同様な結果であり、国内の湿度環境で十分に機能することが確認された。IRI017 株の精製酵素によるホルムアルデヒド分解液には蟻酸が検出される。一方で、IRI017 株の粗精製液中には蟻酸酸化酵素活性があることから、ホルムアルデヒド酸化により発生する蟻酸の分解についても検討する必要がある。

4. 5 参考文献

Sano T., “Silica gel as a catalyst” “Syokubai tositeno sirikageru””, *PETROTEC*, 27, 132-136(2004)

Estévez E., María C., and V., C., Kennes, “Biofiltration of waste gases with the fungi *Exophiala oligosperma* and *Paecilomyces variotii*”, *Appl. Microbiol Biotech.*, 67, 563-568 (2005)

Jang H. J., M. Mitsuyo, and M., Shoda, “Performance of a Styrene-Degrading Biofilter Inoculated with *Pseudomonas* sp. SR-5”, *J. of Biosci. and Bioeng.*, 100, 297-302 (2005)

Kimura S., T. Hatakeyama, M. Yamaguchi, J. Arai, and M. Yamashita, “A Trial of Bioremediation Via Formaldehyde-utilizing Bacteria.” *Technical Report of IEICE*, 101, 17-24 (2001)

Kondo T., Y. Morikawa and N. Hayashi, “Purification and characterization of alcohol oxidase from *Paecilomyces variotii* isolated as a formaldehyde-resistant fungus” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 77, 995-1002(2008)

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, “Protein Measurement with the Folin Phenol Regent.” *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275 (1951)

Matsumura T. and Y. Morita, “The formaldehyde as indoor environment pollutant (1) — Physical and chemical property, production, application, source, standard and health effect— ” , *Indoor Environment*, 14, 35-41 (2011)

Morikawa Y., N. Hayashi, T. Kondo and N. Fukuda, “Isolation and Characteristics of a Formaldehyde-degrading Fungus” *J. of Chem. Eng. Jap.*, 46(5), 353–358 (2013)

Nagayama K., K. Kurio and K. Morita, “Reactivity of Immobilized Alcohol

Dehydrogenase Containing Polyvinyl Alcohol in a Gas Phase Bioreactor” *Kagaku Kogaku Ronbunshu*, 39, 368–371 (2013)

Nakajima D., K.Suzuki, S. G.oto, H. Yajima, T. Ishii, S. Yoshizawa, I. Watanabe and S. Sakai, “ The effect of carbonization temperature on the ability of charcoal to absorb mixed volatile organic compounds”, *J. Society of Indoor Env.*, 8, 9-14 (2005)

Nash, T., “The Colorimetric Estimation of Formaldehyde by Means of the Hantzshu Reaction.” *Biochem. J.*, 55,416-421 (1953)

Ohta Y., “Mechanism of Microbial Deodorization” *Bio Industry*, 16, 39-48 (1999)

Okamoto K., H. Yanase, “Biodegradation of VOC”, *J. Order Research and Eng.*, 30, 9-17 (1999)

Shinagawa E., H. Toyama, K. Matsushita, P. Tuttemwong, G. Theeragool, and O. Adachi, “A Novel Type of Formaldehyde-Oxidizing Enzyme from the Membrane of *Acetobacter* sp. SKU 14“, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 85-857 (2006)

Tsutsumi H., Y. Mihara, S. Ogawa, T. Hoshino, T. KUmagai, and K. Yokota, *Yakugaku Zasshi*, 125, 517-523 (2005)

World Health Organization (WHO): Air guideline for Europe, WHO regional publications, *EURO Reports and Studies* No.23 (1987)

Yamashita S. M. Kitagawa, “Elimination of Toluene from Off-Gases Using a Trickle Bed Biofilter System with Urethane Foam Microbial Carrier”, *J. Order Research and Eng.*, 30, 197-201 (1999)

Yokoyama S., Y. Wanibe, and H. Sakao, “Measurement of Pore Size and the

Distribution in Al₂O₃ – SiO₂ Bricks by the Mercury Penetration Method”, *The Iron and Steel Institute of Japan*, 73, 297-304 (1987)

第5章 糖化を目的としたセルロース系バイオマスの連続粉砕

5.1 はじめに

大気中の二酸化炭素濃度の増加は地球温暖化の原因とされている。植物由来のセルロース系バイオマス資源（以下、バイオマス資源）は、大気中の二酸化炭素濃度を増加させない、いわゆるカーボンニュートラルな資源である。このため、大気中の二酸化炭素濃度の増加防止対策としてバイオマス資源を活用する技術開発が盛んに行われている。

バイオマス資源は様々な成分からなる混合物であり、炭素は主にセルロースとして存在する。一般に、この様なセルロースを活用するためには、微粉化して表面積を大きくし、不純物の分離を容易にすると共に生体触媒（酵素）との接触回数を増やす必要がある。例えば、木材からセルロースを回収し活用するためには、振動ミルやカッターミルの様な粉砕が行われる(Fujimoto *et al.*, 2008, Hiden A. *et al.*, 2009, Kobayashi *et al.*, 2008, Sato *et al.*, 2004)。さらに、バイオマス中のセルロース繊維は強固な結晶構造を有するので、酵素加水分解などの糖化反応に供するためには、粉砕後のオートクレーブ等の装置による加圧熱水処理 (Kumagai *et al.*, 2008)、亜臨界水処理 (Matsunaga and Matsui, 2004, Nakata *et al.*, 2006, Saka and Ueno, 1999)。などの加熱・高圧処理を行いセルロースの繊維束を解したり膨潤化したりする。しかし、これらの方法でバイオマス資源を処理する場合は、バイオマスを粉砕する工程と加熱・高圧処理する工程とを各々別に設ける、いわゆるバッチ式処理が用いられており、エネルギー効率が悪いためバイオエタノールなど生産物のコスト高を招いている。

そこで本研究では、セルロース系バイオマス資源を原材料とするバイオエタノールなどの製品の低コスト化を目的に、バイオマス資源の加熱・高圧処理および粉砕を連続で行う装置の開発を試み、処理後のバイオマス資源の酵素糖化効率等の諸性質を調べた。

5. 2 実験装置及び実験方法

5. 2. 1 原材料及び試薬

セルロース系バイオマス試料には結晶性セルロースのセオラスTG（旭化成（株）製）および国産のスギを用いた。スギは振動ロッドミル粉砕の後、篩い分けし、500 μ mの篩目下の試料を用いた。

セルロース糖化用酵素には、セルラーゼA「アマノ」3、セルラーゼT「アマノ」4およびヘミセルラーゼ「アマノ」90（全て、天野エンザイム社製）を用いた。

5. 2. 2 粉砕装置及び粉砕条件

バイオマスの連続処理を行う為に、高圧湿式粉砕が可能な湿式ジェットミル(NV-200-D 吉田機械興業（株）製）の粉砕機構を用いた。**Figure 5-1**にシステムの概略図を**Figure 5-2**には、粉砕部の概略図を示した。

Figure 5-1 および **Figure 5-2 a** のとおり配管部に接続した粉砕部の細管を高圧で試料が通過する。粉砕部は、ステンレスおよび焼結ダイヤモンドで構成された2枚のディスクを合わせて出来ている。各々のディスクには、2つの穴と、その穴を繋ぐ1つの溝があり、2枚のディスクの溝を直行させる様に合わせる(**Figure 5-2 b, 5-2 c**)。粉砕部を通った試料は、管壁との接触による剪断力や溝接点で試料同士の衝突による衝撃力により微粉化されるものであり、送液用のポンプの連続運転により、粉砕部への試料の連続供給が可能である。

本研究では、この湿式ジェットミルの配管（粉砕部直前）の一部に加熱機構を設け、室温から453K(180°C)の加熱条件下で、加熱・加圧・粉砕の工程が連続で行うことができるように改造した後使用した。なお、処理時圧力が150 MPaとなるように、ポンプの試料送り速度を調整した。

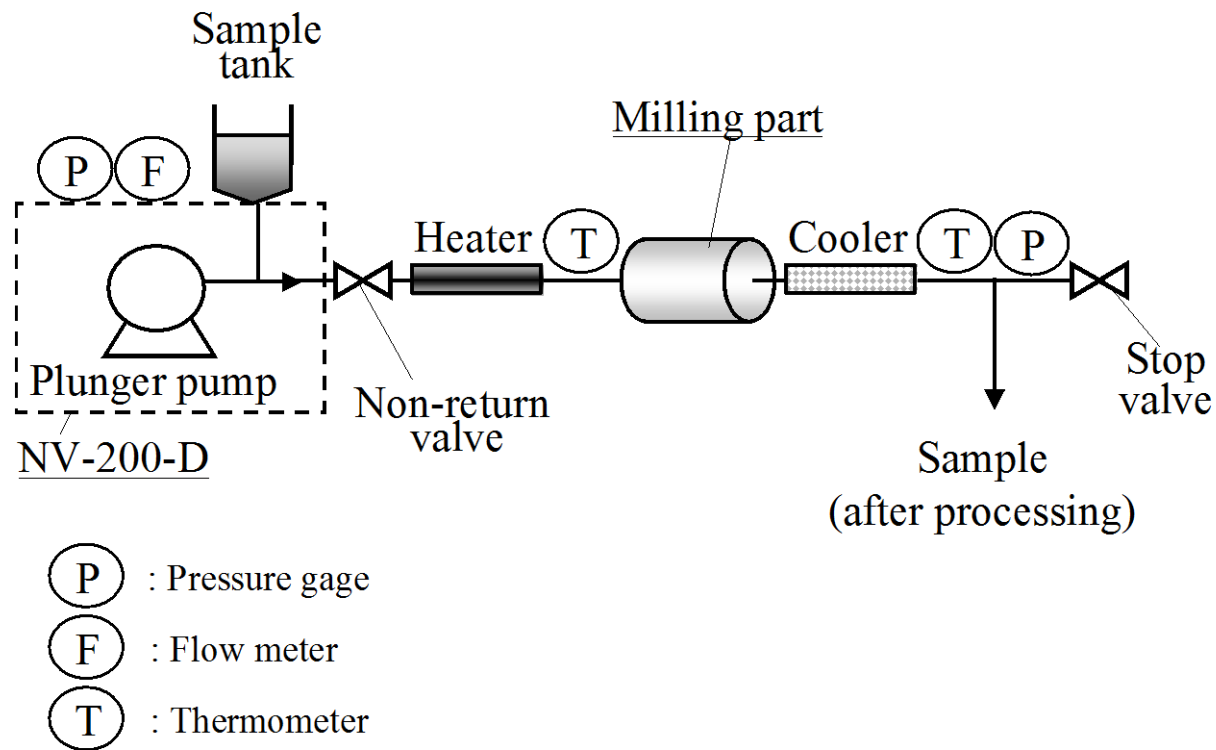


Figure 5-1 Schematic diagram of consecutive heating and hot high-pressure fluid mill system

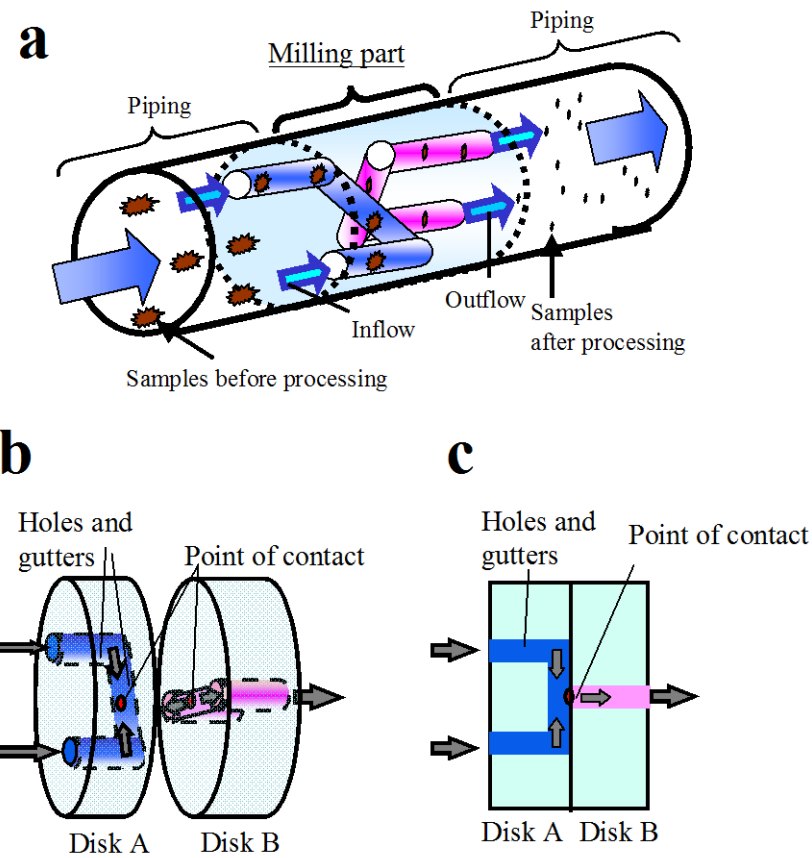


Figure 5- 2 Schematic diagram of the sample decomposing part

(a): sample flow in milling part and piping, (b): diagram of two disks,

(c): cross-section view of milling part

5. 2. 3 酵素糖化

リン酸 Na 緩衝液 (pH5.0) の入った三角フラスコに試料を投入し、394K (121°C) で 15 min 間殺菌処理した。冷却後、三角フラスコに酵素を無菌的に投入し、323K (50°C) の環境下において 180 rpm で振とう反応させた。なお、酵素量は試料 1 g あたり各 20 mg とした。

5. 2. 4 分析

水分は、試料を 378K (105°C) の環境に恒量になるまで放置し、減少した重量の割合から算出した。灰分は、試料を 823K (550°C) の環境に恒量になるまで放置し、減少した重量の割合から算出した。有機溶媒抽出分は、エタノール：ベンゼン=1：1 溶媒で試料から抽出された成分の重量から算出した。

ホロセルロース(グルコースのみが構成成分であるセルロースとグルコース以外の糖も構成成分に含むヘミセルロースの総称) の含量は、試料を酢酸溶液中で亜塩素酸漂白して得られた固形分の重量で求めた。リグニン含量は、ガラスフィルタで濾過回収した硫酸未分解成分の割合から求めた。 α -セルロースの定量はホロセルロースを水酸化ナトリウムでアルカリ処理し、ガラスフィルタで濾過回収した固形分の重量で求めた。グルコースの定量分析は、グルコース C II テストワコー (和光純薬工業社製) を用いて行った。全糖の分析はフェノール硫酸法を用いた。また、試料粒子径は粒度分布系 LS 13 320 (ベックマン・コールター社製) を用いて測定した。

セルロースの結晶化度は X 線回折装置 (電学理機(株)製 RINT2200/PC) の測定結果を基に算出した (Granja *et al.*, 2001) 観察は日立製作所社製 S-3000N を用いて行った。

5. 3 実験結果及び考察

5. 3. 1 原材料の成分分析及び電子顕微鏡写真

Table 5-1 にセオラス TG およびスギ粉碎物の諸性質を、**Table 5-2** にはスギの成分分析結果を記した。**Figure 5-3** にそれらの電子顕微鏡写真を示した。セオラス TG、スギは共に塊状の形状が観察された。

5. 3. 2 粉碎試験

室温および 453K (180°C) 加熱条件下で、粉碎・加熱・高圧処理を行った試料の平均粒子径を **Table 5-3** に示した。また、同様の処理を施した試料中のセルロースの結晶化度を **Table 5-4** に示した。なお、粉碎機条件 (粉碎用ノズル直径) を揃えるため、スギ試料は予め室温下で粉碎・高圧処理して平均粒子径を 386 μm から 35.7 μm に小さくして試験に供した。

加熱の有無に係わらず、1回の粉碎処理によりセオラス TG の粒子径は 74.4 μm から 13-14 μm 程度に減少した。スギにおいても、1回の粉碎処理により平均粒子径が小さくなった。一方、セルロースの結晶化度は処理前後で大きな変化は見られなかった。

両試料とも、未処理の場合は、イオン交換水に対する分散性が悪く、即時に沈降した。一方処理後は、室温および 453K (180°C) の処理温度に係わらず分散性が向上し沈降しにくくなった。**Figure 5-4** にイオン交換水に 1 wt% の割合で混合した未処理および 453K (180°C) 処理後の試料混濁液の写真を示した。

さらに、室温処理および 453K (180°C) 処理後のセオラス TG の凍結乾燥品を電子顕微鏡で観察した (**Figure 5-5**)。室温処理後の試料は、板状であったのに対し、453K (180°C) 処理後の試料は繊維状の形状も観察された。未処理のセオラス TG はブロック状であったことから (**Figure 5-3 a**)、未処理、室温処理さらには加熱処理の順に試料の表面積が大きくなっていることが示唆された。なお、スギの室温処理試料および 453K (180°C) 処理試料でもセオラス TG と同様な形状の変化が観察された (**Figure 5-6**)。

スギにおいても未処理の試料はブロック状であったことから (**Figure 5-3 b**)、セオラス TG と同様に未処理、室温処理さらには加熱処理の順に試料の表面積が大きくなっていることが示唆された。これは高温高圧下で粉碎処理することでリグニン等の脂溶性成分が抽出され、繊維状の微粉末になりやすくなったためと考

察される (Ando *et al.*, 2000)。なお、日本ベル株式会社製、BELSORP-mini を用いて両サンプルの BET 比表面積の測定を試みたが、多孔性材料でないため信頼できる値を得るには至らなかった。

Table 5-1 Characteristics of CEORUS-TG and sugi.

sample	Average particle [μm]	Christallinity [%]	Resolvable ¹ [water,oil]	specific gravity ¹ [g / cc]
CEORUS-TG	74.4	84.7	non-dissolution	0.3
sugi	386	50.5	—	—

¹ The Asahi Chemical Industry Co., Ltd. implementation result

Table 5-2 Chemical component of sugi (wet base)

Moisture	Ash	Organic solvent extractable matter ¹	Lignin	Holocellulose	α -cellulose
[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
8.4	2.1	2.6	22.3	60.7	31.9

¹ Ethanol : benzene = 1:2 for the organic solvent

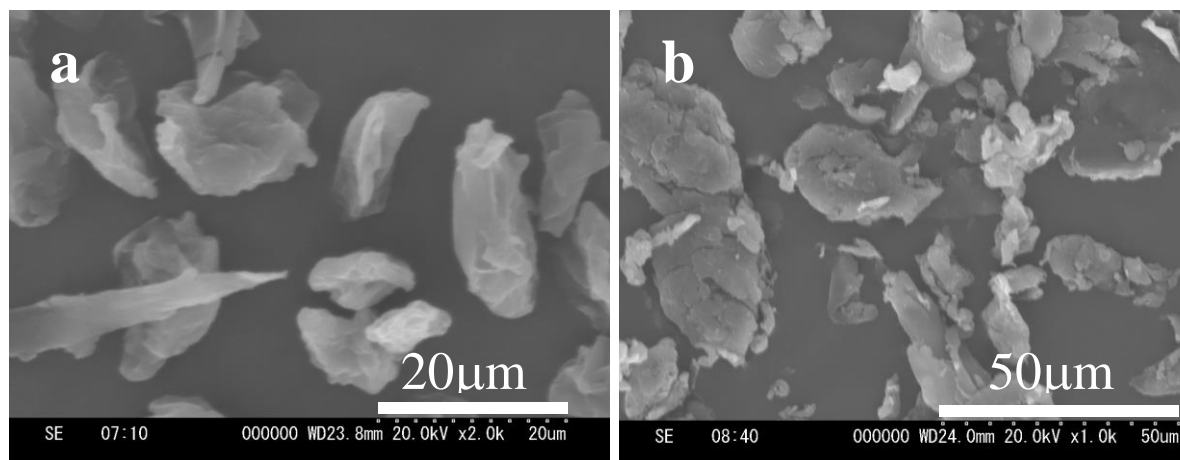


Figure 5-3 SEM micrographs of hydrothermal treated samples
(a): CEORUS-TG, (b): Sugi

Table 5-3 Average particle diameter of samples before and after
 pressurization hydrothermal processing by the fluid-energy-mill.

sample	Average particle diameter [μm]		
	before processing	processed at room temp ¹	processed at 180°C ¹
CEORUS-TG	74.4	14.1	13.2
sugi	35.7	31.0	30.4

¹ processing pressure was 150MPa.

Table 5-4 Christallinity of cellulose in samples before and after
 pressurization hydrothermal processing by the fluid-energy-mill.

sample	Christallinity [μm]		
	before processing	processed at room temp ¹	processed at 180°C ¹
CEORUS-TG	84.7	83.5	83.9
sugi	52.2	52.3	52.8

¹ processing pressure was 150MPa.

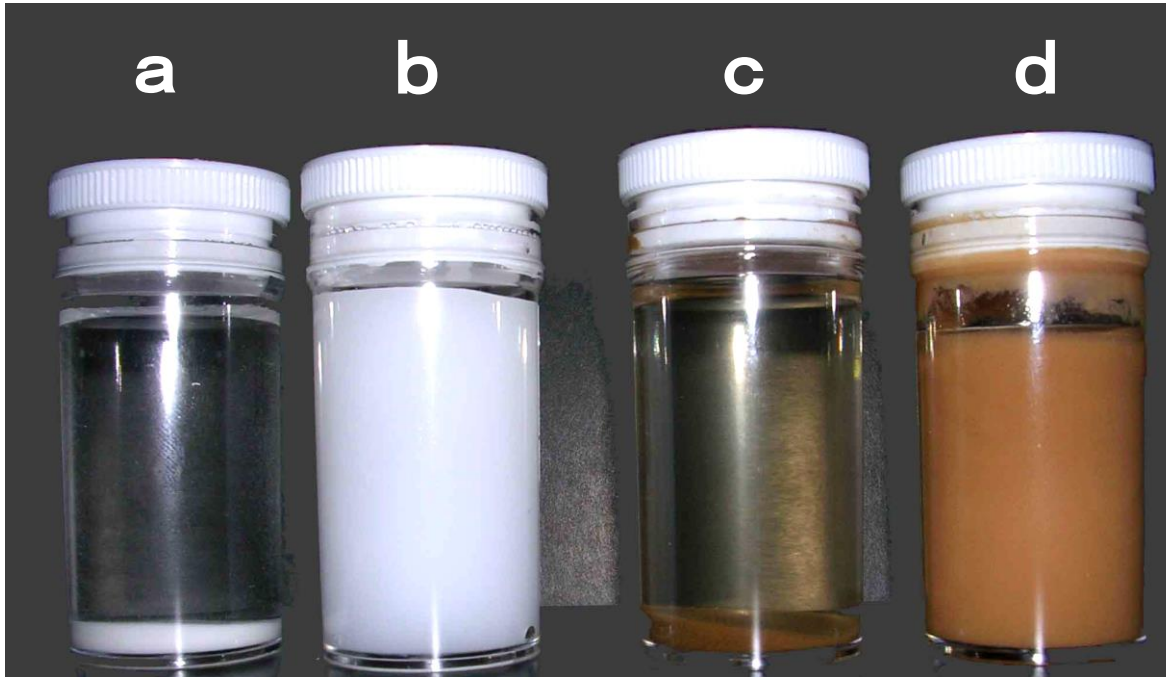


Figure 5-4 Micrographs of 1wt% samples (after 30 min of settling time)

(a): untreated CEORUS-TG,

(b): CEORUS-TG treated at 453K(180°C), 150MPa,

(c): untreated Sugi,

(d): Sugi treated at 453K(180°C), 150MPa

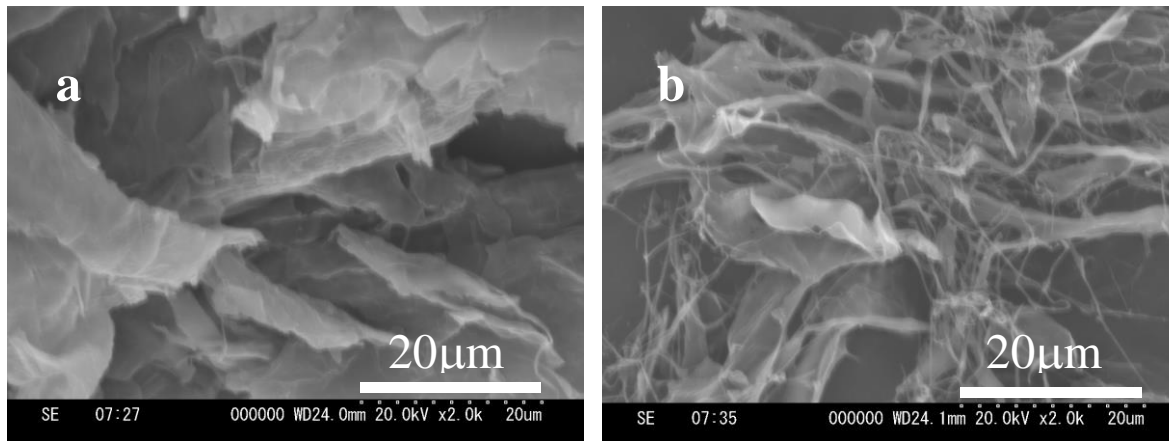


Figure 5-5 SEM micrographs of hydrothermal treated CEORUS-TG
(a): room temp.,150MPa, (b): 453K(180°C), 150MPa

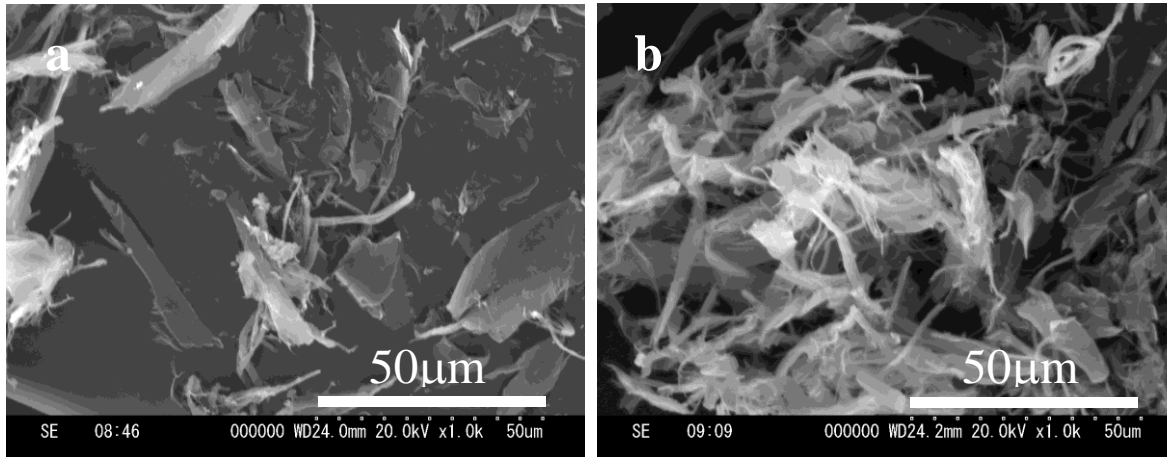


Figure 5-6 SEM micrographs of hydrothermal treated Sugi
(a): room temp.,150MPa, (b): 453K(180°C), 150MPa

5. 3. 3 酵素糖化

処理時間 10 h から約 82h において、それぞれ未加熱から 453K (180°C) までの加熱条件を変えて粉碎・加熱・高圧処理を行ったセオラス TG を酵素糖化した (**Figure 5-7**)。いずれの温度でも分解率は大きくなり、また、処理温度が高くなるにつれ、分解率が向上することがわかった。同じ酵素処理時間で評価しているので、木質資源利用で最も重要な酵素分解反応速度が向上していることを意味する。中でも、423K (150°C) 以上での粉碎処理を行った試料の糖化効率が大きくなり、453K (180°C) で約 80h 処理した場合は、未処理の試料の約 10% に比べ 49.7% と約 5 倍の分解率となった。これは高温高圧処理により、表面積の大きい繊維状微粉末になり、かつ分散性の高い親水性粉末になり酵素の分解を受けやすくなったためと考えられる。このような繊維状の粉碎は、湿式ディスクミルの様な剪断力が働く粉碎において観察されている (Hideno *et al.*, 2009)。

なお、スギにおいてもセオラス TG と同様に、処理温度が高くなるにつれ、分解率は向上した。**Figure 5-8** に室温処理および 453K (180°C) 処理を行ったスギを酵素糖化試験した際の 110h 後のホロセルロースおよび α -セルロースの分解率を示した。ホロセルロース分解率は、453K (180°C) 処理により約 2 倍に、 α -セルロース分解率は 3 倍以上に増加した。ホロセルロースの分解率そのものは α -セルロースの分解率より高かった。 α -セルロースはホロセルロースをアルカリ処理したときの不溶性成分であり、結晶性が高い。結晶セルロースとして使用したセオラスは α -セルロースを酸で部分的に解重合して精製したものである。したがって、ホロセルロースの分解率そのものが高いのは、結晶性が高く分解困難な α -セルロースに比べて結晶性が低いヘミセルロースが含まれているためであると考えられた。加熱処理による分解率の向上は α -セルロースの方が 3 倍と大きく、加熱処理はヘミセルロースより難糖化性の α -セルロースの糖化率に影響を及ぼした。

上記の様な 453K (180°C) の粉碎・加熱・加圧処理によるセオラス TG およびスギの酵素糖化率の向上は、繊維状の粉碎による表面積増加と水への分散性向上 (**Figure 5-4**) による酵素との接触効率の増加が主な原因と考えられた。今回試験に用いた装置は、バイオマス資源の粉碎・加熱・高圧処理が連続かつ単一の工程でできる効率のよい装置であり、様々なバイオマス利活用への応用が可能である。

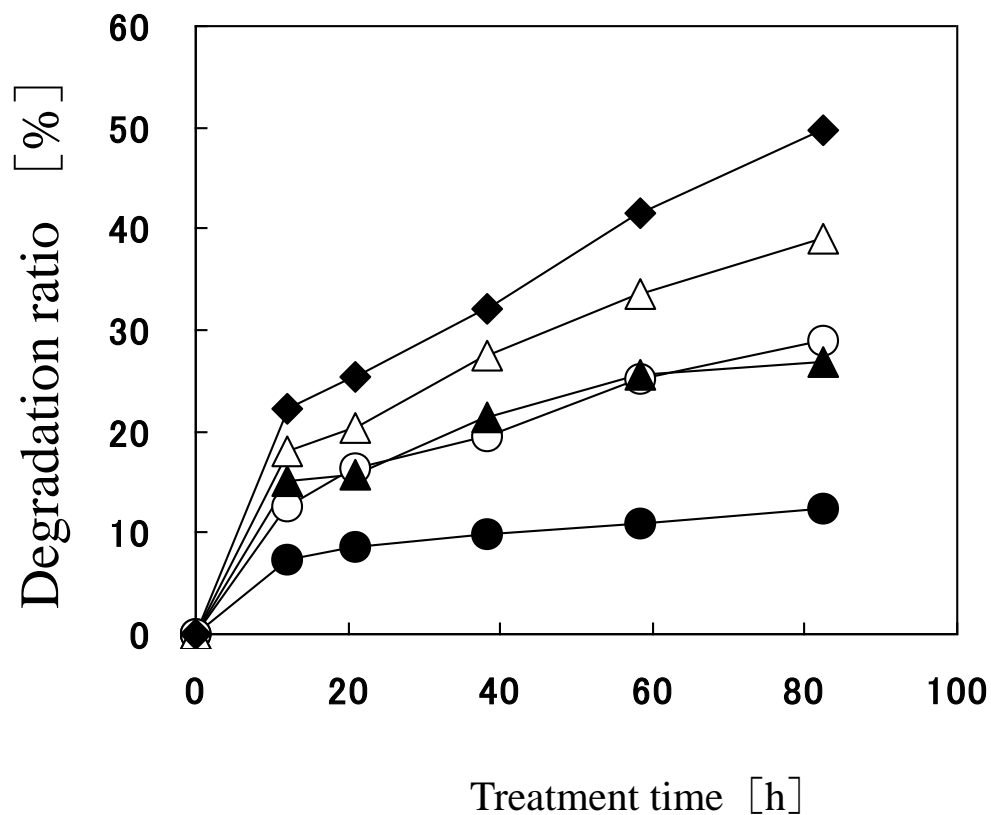


Figure 5-7 Enzymatic hydrolysis of CEORUS-TG treated at 150MPa and various heating conditions

Degradation ratio (%) = Glucoses content in liquid (kg) / Initiation CEORUS-TG amount (kg) \times 100

●: untreated, ▲: room temp., ○: 363K (90°C), △: 423K (150°C), ◆: 453K (180°C)

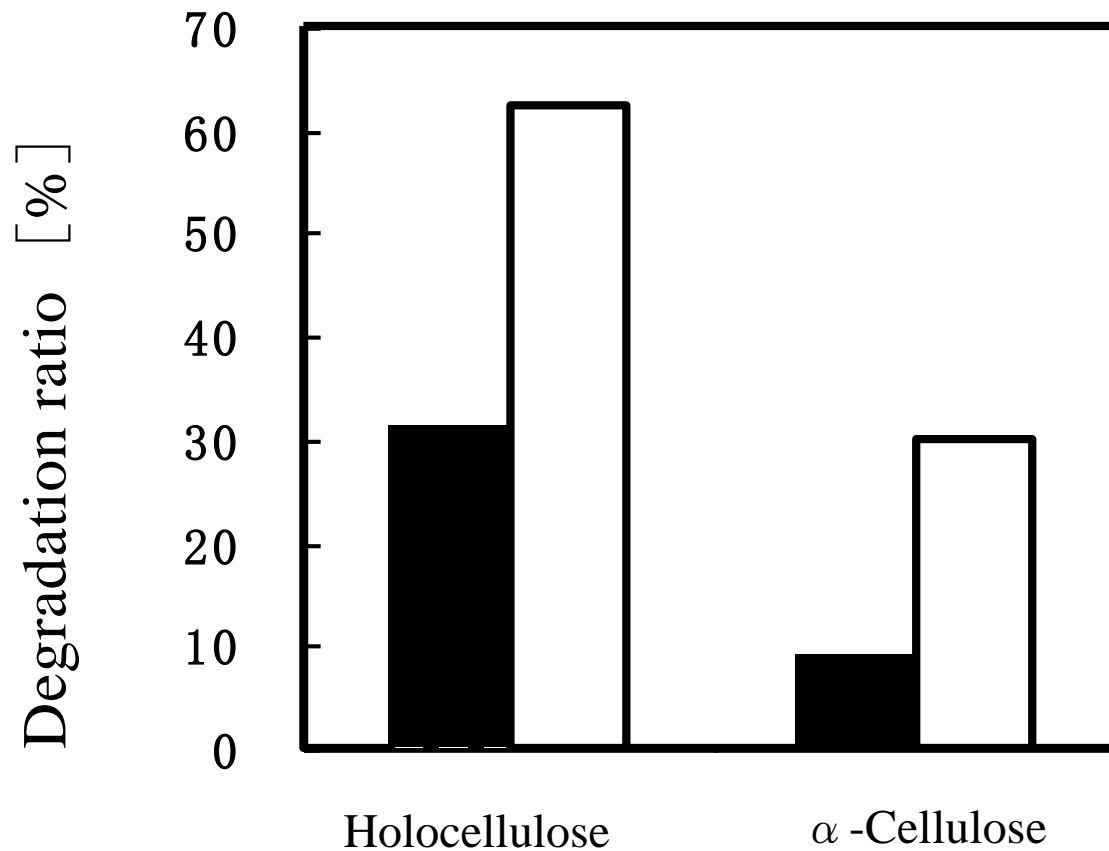


Figure 5-8 Enzymatic hydrolysis of Sugi treated in room temperature

(■) and 453K(180°C) (□) (after 110h enzymatic hydrolysis)

Holocellulose degradation ratio (%) = {Total sugar content in liquid (kg) /
Initiation holocellulose content (kg)} × 100

α -cellulose degradation ratio (%) = {Glucoses content in liquid (kg) / Initiation
α -cellulose amount (kg)} × 100

5. 4 結 言

本研究では、スギなどのセルロース系バイオマス資源から糖化酵素を利用してバイオエタノールを効率よく生産するための前処理方法（粉砕、蒸気処理）を検討した。従来セルロース系バイオマス資源の前処理は、加熱水蒸気処理および粉砕を各々バッチ処理で行うためにエネルギー効率が低い。そこで、加熱・高圧処理および粉砕を連続かつ、単一の工程で行う装置の開発を試みた。

本研究用に高圧湿式粉砕が可能な湿式ジェットミルの配管の一部に加熱機構を設け、バイオマスの粉砕・加熱・高圧の連続処理が可能となるように改良した装置を試作した。試作した装置を用いて、150 MPa の条件で処理を行ったセルロース系バイオマス資源は、加熱を行うことで分散性が向上した。処理時の加熱温度が高くなるほど、酵素糖化効率は高くなり 180℃加熱時には未加熱の 2-4 倍に向上した。

粉砕後の試料は加熱により 10-20nm の太さのファイバー形状になっていることを SEM および AFM の観察で確認した。ファイバー化は、水存在下での加熱によりセルロースマイクロフィブリル間の水素結合が緩み、さらに、ジェットミルの非常に大きな線流速により、配管との摩擦せん断力が大きくなりセルロースを裂くような効果を及ぼしたものと考察した。

なお酵素糖化効率の向上の要因は、先の分散性の向上とファイバー化による比表面積の向上が大きいと考えられた。連続処理により加熱はジェットミルのノズル部分のみとなり熱エネルギーが削減できる。さらに、粉砕後の試料形状により酵素糖化率の向上が達成された。

なお、今回試作した装置は有機溶媒でも使用できる。ファイバー形状への加工はセルロース系バイオマス資源を吸水させる程度の水量で可能である。これらの今回の結果は、次章（第 6 章）の有機溶媒中での糖化技術との併用化に繋がる可能性を示唆しており、今後一層の効率化に関する開発が期待できる。

5. 5 参考文献

Ando, H., I. Furukawa, Y. Kamino, T. Sakai, Y. Uemura, and Y. Hatate, "Decomposition Behavior of Plant Biomass Using Hot-Compressed-Water" *Kagoshimaken Kogyo Gijyutu Center Kenkyu Hokoku*, 14, 45–51 (2000).

Fujimoto, S., H. Inoue, S. Yano, T. Sakaki, T. Minowa, T. Endo, S. Sawayama and K. Sakanishi, "Bioethanol Production from Lignocellulosic Biomass Requiring No Sulfic Acid: Machanochemical Pretreatment and Enzymic Saccharification," *J. Jpn. Petrol. Inst.*, 51, 264–273 (2008)

Granja P. L., L. Pouysegu, M. Petraud, B. D. Jeso, C. Baquey, M. a. Barbosa, "Cellulose Phosphates as Biomaterials. I. Synthesis and Characterization of Highly Phosphorylated Cellulose Gels," *Appl. Polym. Sci.*, 82, 3341–3353 (2001)

Hideno A., H. Inoue, K. Tsukahara, S. Fujimoto, T. Minowa, S. Inoue, T. Endo and S. Sawayama, "Wet Disk Milling Pretreatment without Sulfuric Acid for Enzymatic Hydrolysis of Rice Straw," *Bioresour. Technol.*, 100, 2706–2711 (2009)

Kobayashi N., Y Ueda, Y. Ohshika, K. Mizuno, S. Tsukada, H. Kiyokawa, J. Kobayashi, S. Hatano, Y. Itaya and S. Mori, "Pulverization of Woody Biomass by a Continuous Vibration Mill," *Kagaku kougaku Ronbunshu*, 34, 161–167 (2008)

Kumagai S., M. Ota, H. Oka, N. Hayashi, N. Yamada and T. Sakaki, "Fraction and Solubilization of Cellulose in Rice Hulls by Hot-Compressed Water Treatment, and Production of Glucose from the Solubilized Products by Enzymatic Saccharification" *Kagaku kougaku Ronbunshu*, 34, 463–471 (2008)

Matsunaga M. and H. Matsui, "Super-Rapid Chemical Conversion of Sugi Wood by Supercritical and Subcritical Water Treatment," *Mokuzaigakkaishi*, 50, 325–332 (2004)

Nakata T., H. Miyahuji and S. Saka, "Bioethanol from Cellulose with Supercritical Water Treatment Followed by Enzymatic Hydrolysis," *Appl. Biochem. Biotech.*, 129–123, 476–485 (2006)

Sato T., N. Kobayasi, S. Hatano, Y. Itaya, S. Mori, T. Asano and E. Mizutani, "Pulverization of Ligneous Biomass by the Use of a Vibration Mill," *Kagaku kougaku Ronbunshu*, 30, 732–734 (2004)

Saka S. and T. Ueno, "Chemical Conversion of Various Celluloses to Glucose and Derivatives in Supercritical Water," *Cellulose*, 6 177–191, (1999)

第6章 セルロース系バイオマス由来の高濃度糖化液の取得

6.1 はじめに

稲わら、木材、農業系廃材などセルロースを含む生物資源（セルロース系バイオマス資源）は、脱石油化学社会の構築に貢献する素材として期待されている。セルロース系バイオマス資源は、気中の二酸化炭素を光合成により固定する、いわゆるカーボンニュートラルな素材とされ、近年の環境問題に対応可能な材料として利用促進が望まれている。

セルロース系バイオマス資源は、バイオプロセスの応用によりバイオエタノールなどの燃料のみならず、バイオビルディングブロックとしてマテリアル利用への期待も大きい (Elliott 2004, Watanabe *et al.* 2009)。現状、国内のセルロース系バイオマス資源は分散発生型であるために、収集に要するコストを要する。さらに、製品へ加工する際に要するコストにも課題があり、市場普及の大きな障害となっている。

例えば、セルロース系バイオマス資源からバイオエタノールを生産する目的で、酵素加水分解（糖化）をする場合、セルロース系バイオマス資源を多くのエネルギーを費やして微粉化した後、水に分散させて酵素反応を行う。酵素反応後に酵母を用いてアルコール発酵を行い、得られたアルコールを得るために不要な水を加熱して蒸留する。この蒸留エネルギーは全体の5割近くに達すると試算されている (Saga *e.al.*, 2008, Saga *et al.*, 2009)。

蒸留に多くのエネルギーを要する理由の一つには、酵素糖化工程において大量の水を投入することがあげられる。微粉化したセルロース系バイオマス資源は吸水性が良く少量の液では分散しにくいいため、少なくとも試料の10-20倍の水を加える（試料濃度5-10%程度）必要がある。この様に多くの水を加えるため、加水分解（糖化）によって得られる糖液の濃度は低くなる。その上、バイオ燃料用エタノールに糖を変換する発酵時に、炭素の一部が二酸化炭素になり減少するために、エタノール濃度は糖液よりさらに低濃度になる（水の割合が非常に多くなる）。

さらに、最終製品のアルコールに不要な水を入れることは装置の大型化を招いており、さらに不要な製造コストを掛けることになっている。そのため、反応系に投入する水の量を減らし、蒸留コスト及び装置コストを削減する技術が必要とされている。

そこで本研究では、疎水性有機溶媒中の酵素加水分解反応を応用した（概念図 **Figure 6-1**）。疎水性の有機溶媒中にごく微量の水を投入することで水溶性の酵素の周りに水が集まる。集まった水に基質の親水部が集積し基質濃度を高める効果が期待できる。さらには、加水分解生成物であるグルコースを抽出するために少量の水を投入し、従来の水系より高濃度の糖水溶液を取得する技術について検討した。

6. 2 実験方法

6. 2. 1 試料及び試薬

セルロース系バイオマス資源の試料には、国産のスギ、トマトの葉茎、及び結晶性セルロースのセオラス TG (旭化成ケミカルズ社製)を用いた。なお、トマトの葉茎及びスギは、乾式粉碎後に篩い分けを行い、45 μ m-90 μ m の分画サイズを用いた。セルロース糖化用酵素には、セルラーゼ A「アマノ」3、セルラーゼ T「アマノ」4、及びヘミセルラーゼ「アマノ」90（全て、天野エンザイム社製）を用いた。クエン酸、Na₂HPO₄、硫酸、フェノール、グルコース、n-ヘキサン、クロロホルム、及びトルエンは和光純薬工業社製を用いた。その他試験に用いた試薬は、可能な限り市販品の最高純度のものを用いた。

6. 2. 2 成分分析

ホロセルロースの定量は、試料を酢酸溶液中で亜塩素酸漂白して得られた固形分の重量で求めた。試料の α -セルロースの定量はホルセルロースをさらに水酸化ナトリウムを用いてアルカリ処理し、ガラスフィルタで濾過回収した固形分の重量で求めた。

試料の水分測定は 105 $^{\circ}$ Cの乾燥機を用いて行った。105 $^{\circ}$ Cで恒量になるまで乾燥した試料の重量を用い、以下の式により試料の水分を算出した。

試料の水分 (%) = (乾燥前の試料の重量(g) - 105 $^{\circ}$ Cで乾燥した試料の重量(g)) / (乾燥前の試料の重量(g)) \times 100%

グルコースの定量分析は、グルコース CII テストワコー (和光純薬工業社製)を用いて行った。全糖の分析はフェノール硫酸法を用いた。

なお、試料有機溶媒及び水の混合スラリーの体積膨張は、常温で 30 min 静置

した後のメスリリンダーの目盛を目視確認した。スラリーの粘度は 20℃の環境下で B 型粘度計を用いて測定した。

6. 2. 3 酵素糖化

各種疎水性有機溶媒の入ったガラス製容器に試料及び酵素を投入し、50℃の環境下において 180 rpm で振とう、加水分解反応させた。なお、酵素量は試料 1 g あたり各 20 mg とした。反応時に水を投入する場合は、pH5.0 の MacIlvain 緩衝液を用いた。反応後のガラス容器にイオン交換水を投入し、密栓後に強く攪拌し低分子の糖類を水に抽出させた。なお、比較対照のために MacIlvain 緩衝液のみを投入した系では、抽出用の水を改めて加えることなく、反応時の緩衝液をそのまま分析に用いた。

6. 2. 4 糖の抽出

反応後のガラス容器にイオン交換水を投入し、密栓後 1 min 強く攪拌し低分子の糖類を水に抽出させた。抽出に使用した水の量は試料 0.5 g に対し 2 mL とした。なお、反応時に水を投入した系では、抽出用の水量を減らし、反応時の水と抽出用の水が併せて試料 0.5 g に対し 2 mL となるように統一した。

6. 3 実験結果及び考察

6. 3. 1 スギ、トマト葉茎スラリーの体積変化と粘度

密閉容器中のスギ及びトマトの葉茎の粉碎品に MacIlvain 緩衝液及び各種有機溶媒を投入した。緩衝液はスギ及びトマトの葉茎に吸収され同量の有機溶媒を投入したものに比べ体積が増加した。有機溶媒にトルエン、酢酸メチルを用いた系では、体積は緩衝液が 2 倍ほど大きくなった。

各々の粘度を B 型粘度系で測定したところ、緩衝液を用いた試験区では 2,400-3,000 cP、トルエンを用いた試験区では 625-750 cP であり、緩衝液を使用した場合に比べ、有機溶媒を使用する事により粘度が低くなった。Figure 6-1 にスギ 2 g に対し緩衝液 9 mL 及びトルエン 9 mL を投入した場合の写真を示した。

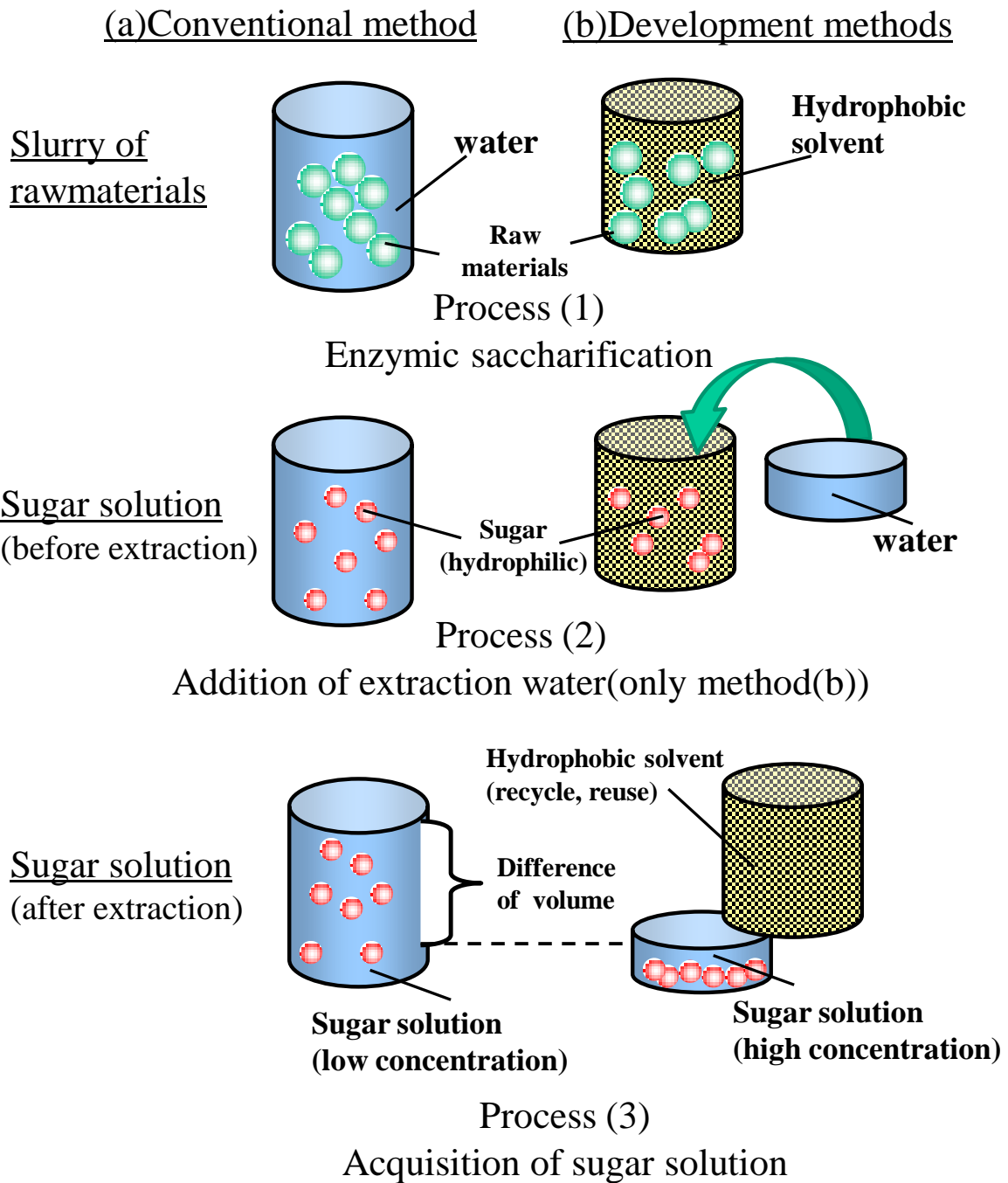


Figure 6-1 Image of acquisition of high concentrations sugar solution

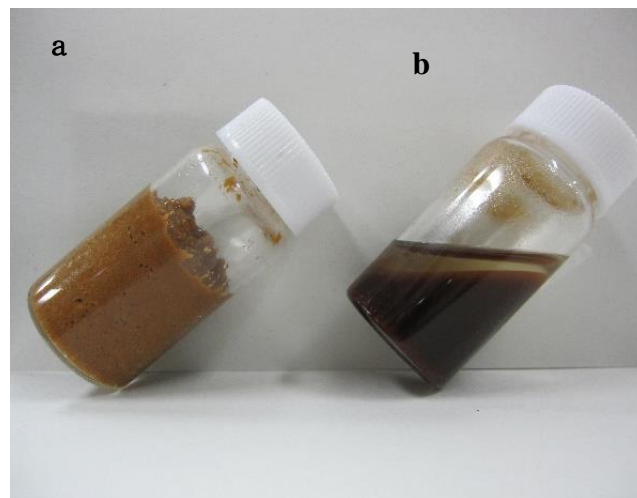


Figure 6-2 Picture of Sugi Slurry in the Buffer or Toluene

- a : Sugi 2g in the buffer 9g
(high viscosity, not move the liquid surface)
- b: Sugi 2g in the toluene 9g
(low viscosity, move the liquid surface)

6. 3. 2 各種有機溶媒中でのスギの糖化試験結果

pH5.0のMacIlvain緩衝液、酢酸メチル、n-ヘキサン、クロロホルム、及びトルエン中でスギを酵素糖化反応させた。また、容積比で緩衝液：有機溶媒=1:9の溶液中でも同様の試験を行った。用いたスギの水分は12.1%であった。3日間の酵素糖化により生成した全糖のうち、抽出した水及び未抽出で有機溶媒中に残った糖の割合を**Table 6-1**に示した。全ての系において、90%以上の糖が水に抽出された。反応溶媒に緩衝液：有機溶媒=1:9の混合液を用いた場合、水中に回収される糖の量が多くなった。

また、3日間反応後に抽出した水の全糖濃度**Figure 6-2**に示した。なお、有機溶媒を使用せずpH 5.0のMacIlvain緩衝液のみの試験区は、反応後に水を加えることなく緩衝液の糖濃度を測定した。緩衝液中の糖化に比べ、有機溶媒中で糖化反応して水抽出した試験区は、全て高い濃度の糖液が回収された。中でも、水：有機溶媒=1:9の溶液中で反応させた回収液の糖液濃度は高く、いずれの場合も、MacIlvain緩衝液のみの試験区の3.0 mg/mLに比べ約6倍の18 mg/mL以上になった。

Figure 6-3に、上記試験の際に回収された全糖量を示した。MacIlvain緩衝液中で酵素糖化した場合、30.2 mgの糖が回収された。容積比で緩衝液：有機溶媒=1:9の溶液中で試験を行った全ての場合において、酵素糖化で得られた糖の量が増加した。中でも、緩衝液：トルエン=1:9の試験区では、37.3 mgと糖の量が最も多く、MacIlvain緩衝液中の1.1倍となった。

6. 3. 3 各種有機溶媒中でのトマト葉茎の糖化試験結果

上記スギの試験と同様の試験方法で、トマトの葉茎を酵素糖化した。使用したトマトの葉茎に含まれる水分は8.7%であった。3日間反応後に抽出した水の全糖濃度を**Figure 6-4**に示した。なお、有機溶媒を使用せずpH5.0のMacIlvain緩衝液のみの試験区は、反応後に水を加えることなく緩衝液の糖濃度を測定した。

スギの場合と同様に、緩衝液中の糖化に比べ、有機溶媒中で糖化反応して水抽出した試験区は、全て高い濃度の糖液が回収された。中でも、水：有機溶媒=1:9の溶液中で反応させた回収液の糖液濃度は高く、n-ヘキサン、クロロホルム、及びトルエンを用いた場合、MacIlvain緩衝液のみの試験区の3.4 mg/mLに比べ

約 6 倍の 20 mg/mL 以上になった。

Figure 6-5 に、上記試験の際に回収された全糖量を示した。MacIlvain 緩衝液中で酵素糖化した場合、33.8 mg の糖が回収された。容積比で緩衝液：有機溶媒 = 1:9 の溶液中で試験を行った全ての場合において、酵素糖化で得られた糖の量が増加した。中でも、n-ヘキサン、クロロホルム、及びトルエンを用いた場合には、MacIlvain 緩衝液の 1.18 倍を超える 40 mg 以上の糖が得られた。

Table 6-1 Ratio of total sugar in extracted water and unextracted (remain the hydrophobic solvent).

	ratio of total suger[%]							
	methyl acetate only	n-hexane only	chloroform only	tolene only	methyl acetate + buffer ¹	n-hexane + buffer ¹	chloroform + buffer ¹	tolene + buffer ¹
in extracted water	94.2	95.4	90.2	92.8	94.5	97.9	95.6	97.7
unextracted ²	5.8	4.6	9.8	7.2	5.6	2.1	4.4	2.3

1 MacIlvain buffer (pH5.0) : hydrophobic solvent =1:9

2 raio of total suger in hydrophobic solvent

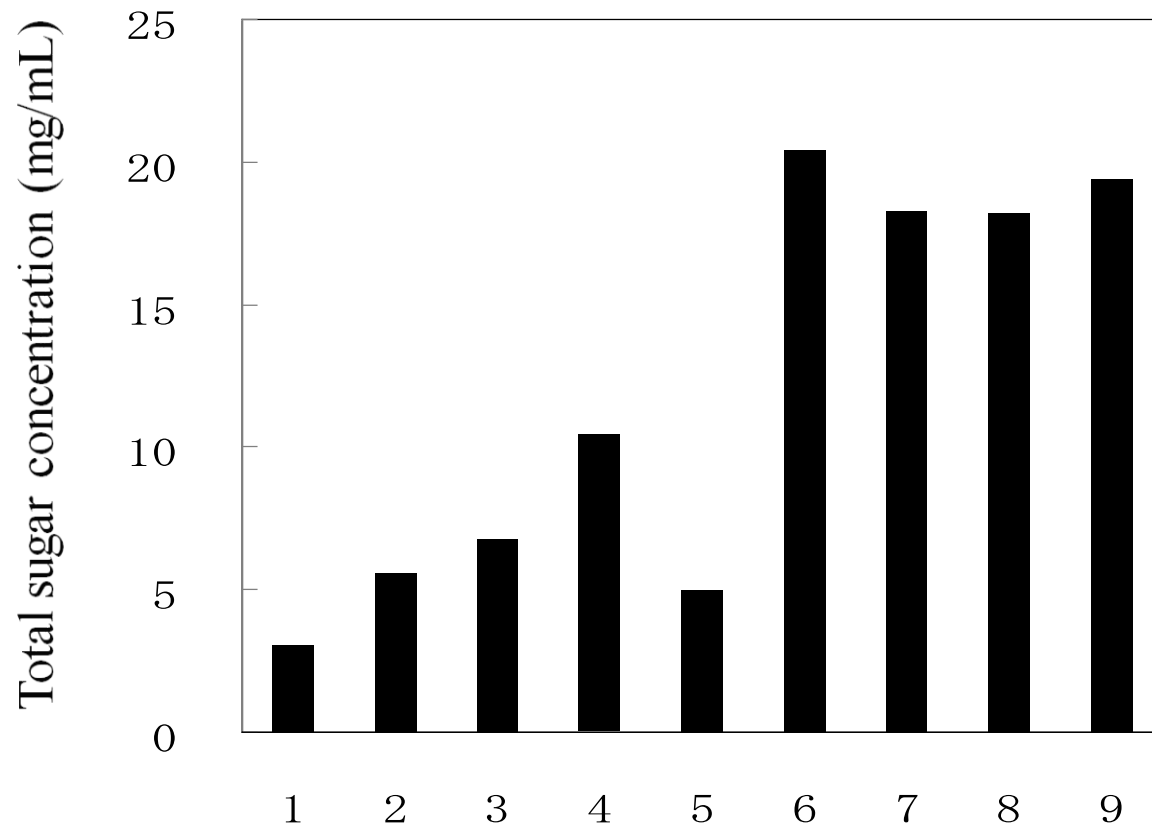


Figure 6-2 Total sugar concentration of extracted water from Sugi enzymatic saccharification solution in various hydrophobic solvents

1 MacIlvain buffer only, 2 methyl acetate only, 3 n-hexane only, 4 chloroform only, 5 toluene only, 6 MacIlvainbuffer: methyl acetate = 1:9, 7 MacIlvainbuffer: n-hexane = 1:9, 8 MacIlvain buffer : chloroform =1:9, 9 MacIlvainbuffer: toluene = 1:9

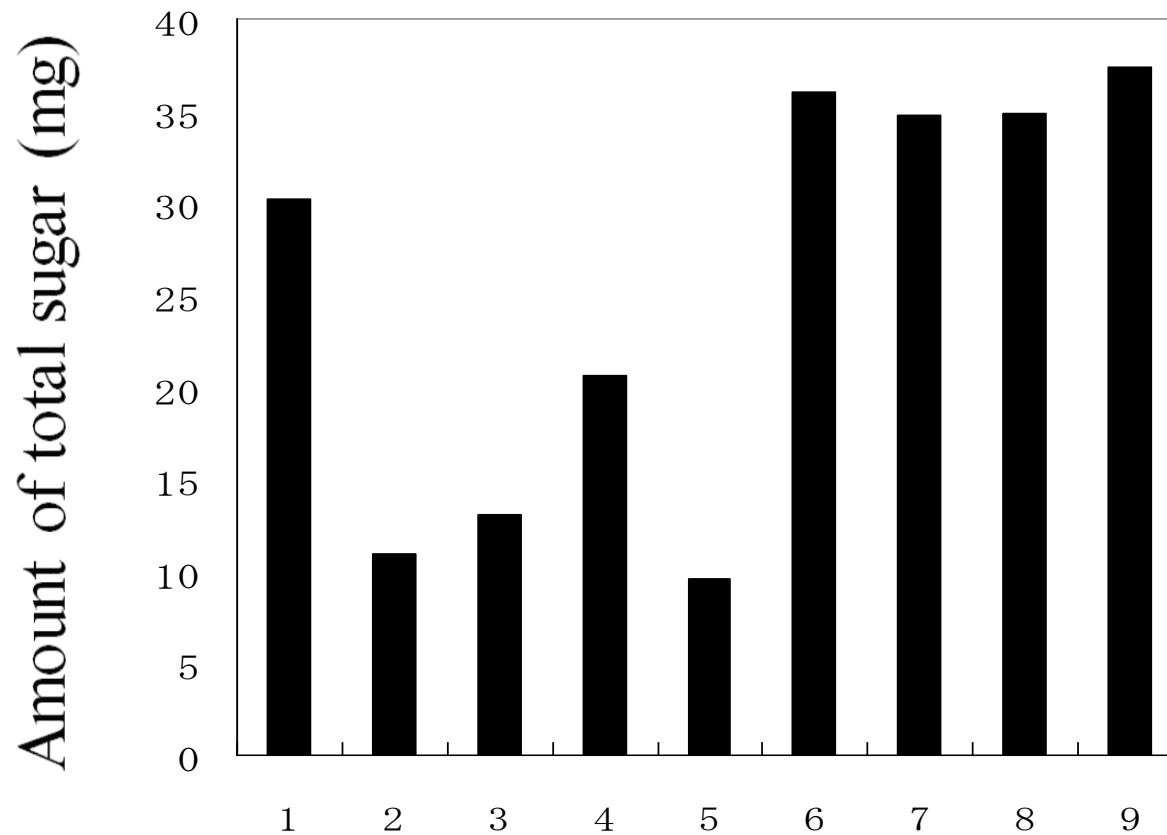


Figure 6-3 Amount of total sugar in extracted water from Sugi enzymatic saccharification solution in various hydrophobic solvents

1 MacIlvain buffer only, 2 methyl acetate only, 3 n-hexane only, 4 chloroform only, 5 toluene only, 6 MacIlvainbuffer: methyl acetate = 1:9, 7 MacIlvainbuffer: n-hexane = 1:9, 8 MacIlvain buffer : chloroform =1:9, 9 MacIlvainbuffer: toluene = 1:9

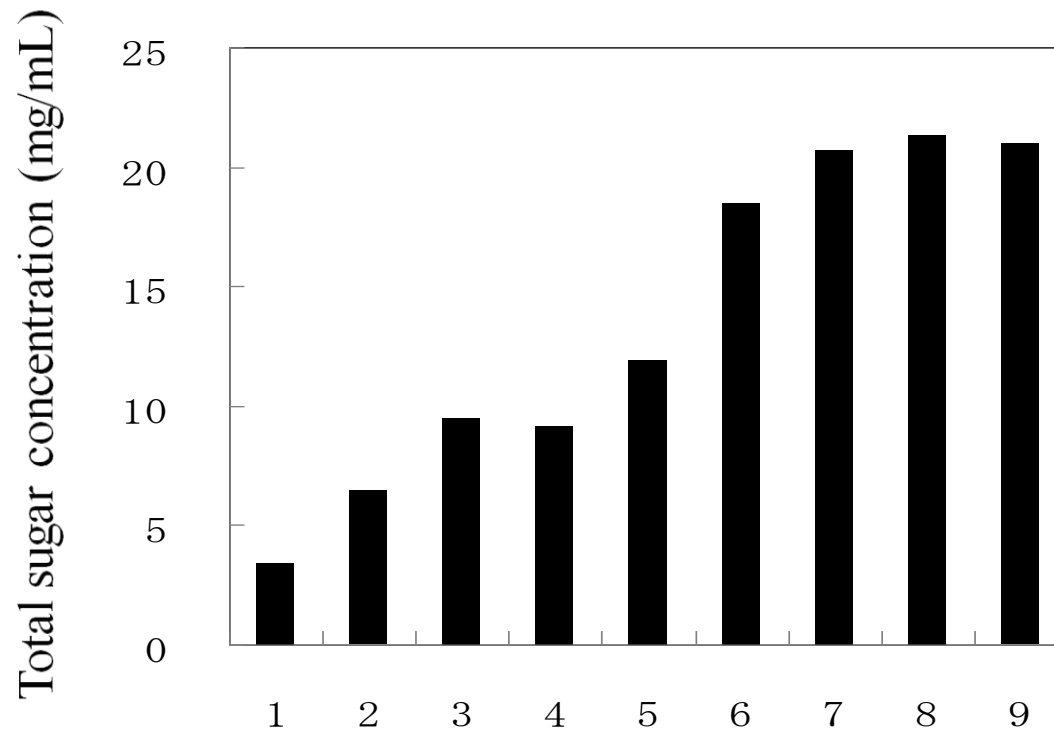


Figure 6-4 Total sugar concentration of extracted water from stem of tomato enzymatic saccharification solution in various hydrophobic solvents

1 MacIlvain buffer only, 2 methyl acetate only, 3 n-hexane only, 4 chloroform only, 5 toluene only, 6 MacIlvainbuffer: methyl acetate = 1:9, 7 MacIlvainbuffer: n-hexane = 1:9, 8 MacIlvain buffer : chloroform =1:9, 9 MacIlvainbuffer: toluene = 1:9

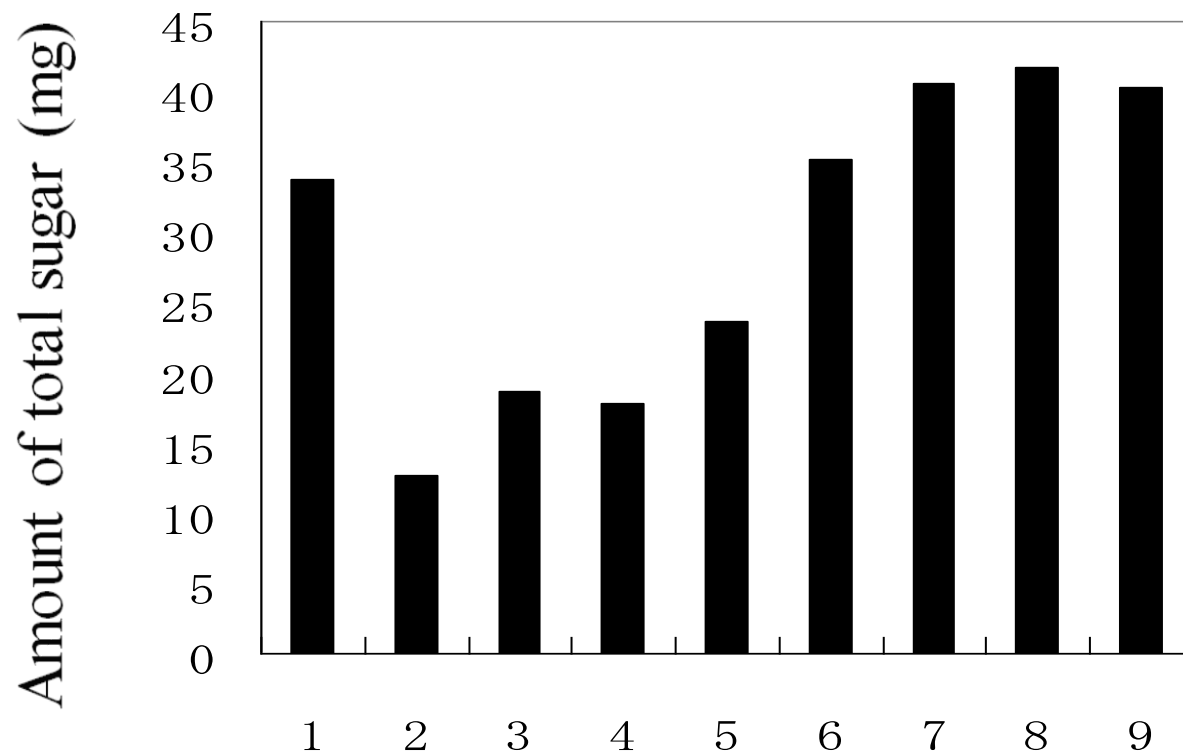


Figure 6-5 Amount of total sugar in extracted water from stem of tomato enzymatic saccharification solution in various hydrophobic solvents

1 MacIlvain buffer only, 2 methyl acetate only, 3 n-hexane only, 4 chloroform only, 5 toluene only, 6 MacIlvainbuffer: methyl acetate = 1:9, 7 MacIlvainbuffer: n-hexane = 1:9, 8 MacIlvain buffer : chloroform =1:9, 9 MacIlvainbuffer: toluene = 1:9

6. 3. 4 様々な水分量での結晶性セルロースの糖化試験結果

60°Cの恒温器中でセオラス TG を 58 h 減圧乾燥し、水分値を 4.11%とした。乾燥後のセオラス TG を MacIlvain 緩衝液とトルエンの比率を変えた様々な水分割合の溶液中で酵素糖化した。3 日間反応後に抽出した水中の全糖濃度を **Figure 6-6** に、分解率を **Figure 6-7** 示した。有機溶媒を用いた試験区の全糖濃度は、MacIlvain 緩衝液のみの試験区より全て高くなった。特に MacIlvain 緩衝液：トルエン=1.5：8.5 の試験区では最大値 30.1 mg を示した。また、トルエンのみの場合を除き、MacIlvain 緩衝液を添加した試験区では、分解率が大きく向上した。

さらに、同一の試験において全糖に含まれるグルコースについて分析を行った。グルコース濃度を **Figure 6-8** にグルコース量を元に算出した α -セルロース分解率を **Figure 6-9** に示した。抽出水のグルコース濃度はトルエンのみで反応を行った系以外は全て MacIlvain 緩衝液のみの試験区より高くなった。また、 α -セルロース分解率は全糖に比べ低くなったものの MacIlvain 緩衝液：トルエン=1.5：8.5 から 2.5：7.5 の割合で緩衝液を追加した試験区では分解率が MacIlvain 緩衝液のみの試験区より高くなった。低分子の糖ほど親水性になる傾向があることから、単糖のグルコース生産には水分の量が大きく影響したものと考えられた。また、水の分子量 18 に対し、グルコースの分子量は 180 と 10 倍大きい。今回の試験の様に数%の水分があれば、およそその 10 倍のグルコースが得られることになる。通常植物系バイオマス資源は 10%程度の水分を保有していることから、有機溶媒に添加する水分は特に必要とすることなく酵素糖化を行うことが出来る。

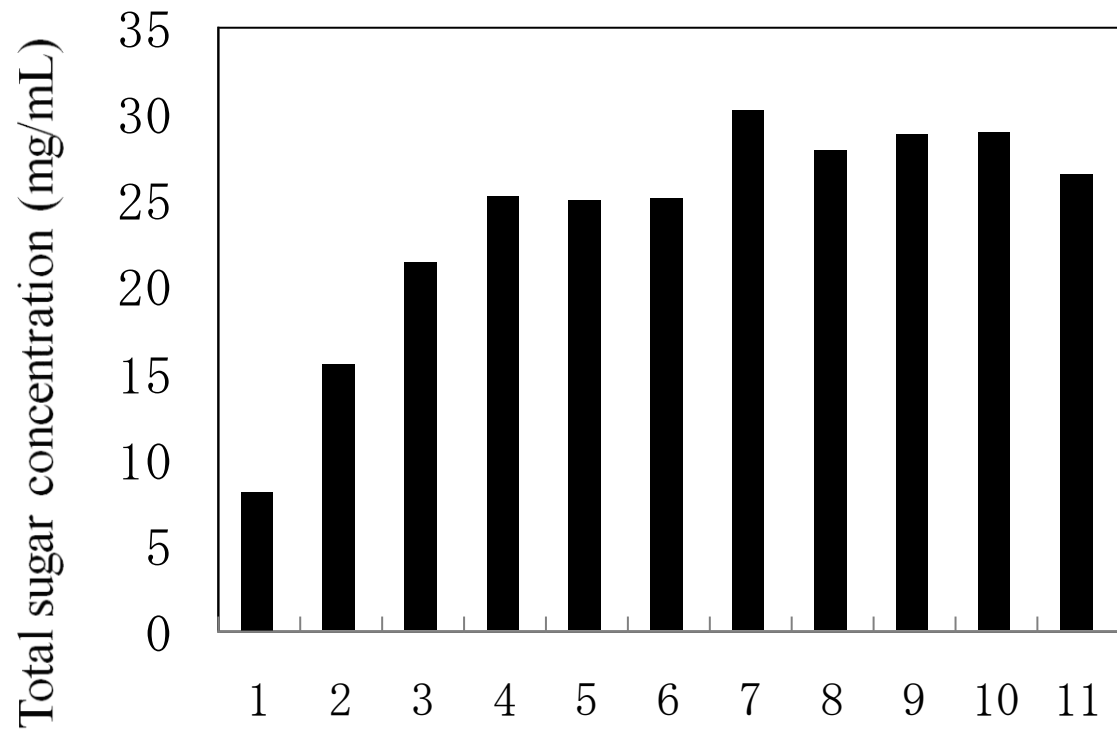


Figure 6-6 Total sugar concentration of extracted water from CEORUS-TG enzymatic saccharification solution in various solvent concentrations

1 MacIlvain buffer only, 2 toluene only, 3 MacIlvain buffer : toluene = 0.4 : 9.6, 4 MacIlvain buffer : toluene = 0.6 : 9.4, 5 MacIlvain buffer : toluene = 0.8 : 9.2, 6 MacIlvain buffer : toluene = 1.0 : 9.0, 7 MacIlvain buffer : toluene = 1.5 : 8.5, 8 MacIlvain buffer : toluene = 2.0 : 8.0, 9 MacIlvain buffer : toluene = 2.2 : 7.8, 10 MacIlvain buffer : toluene = 2.5 : 7.5, 11 MacIlvain buffer : toluene = 3.0 : 7.0

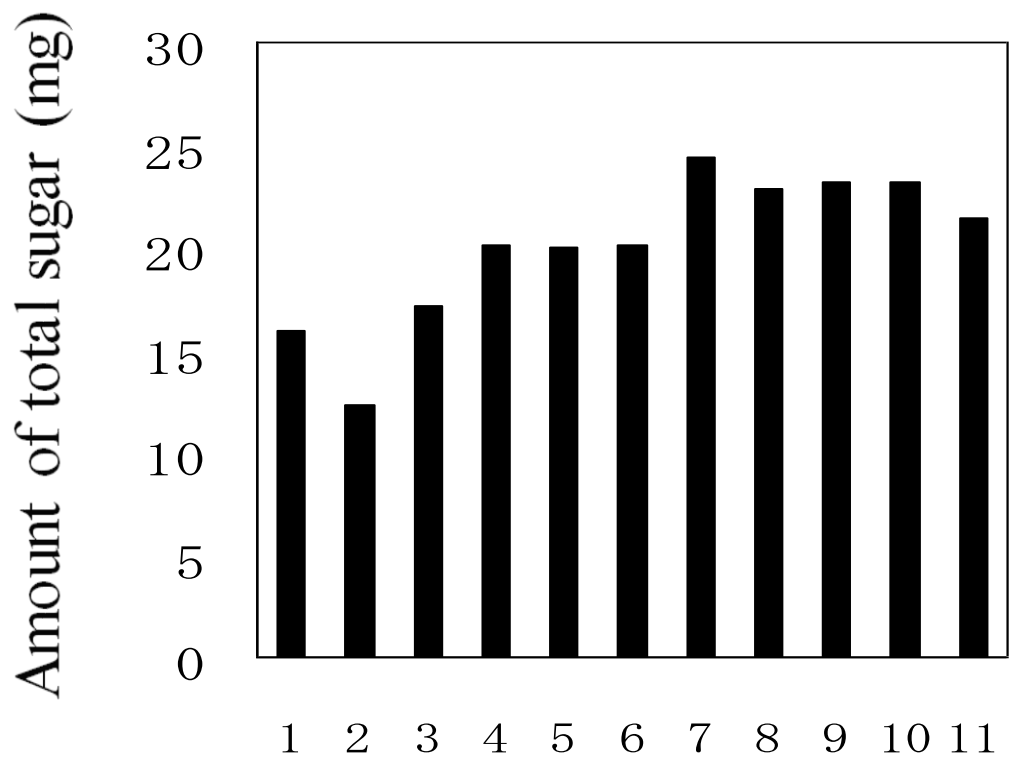


Figure 6-7 Amount of total sugar in extracted water from CEORUS-TG enzymatic saccharification solution in various solvent concentrations

1 MacIlvain buffer only, 2 toluene only, 3 MacIlvain buffer : toluene = 0.4 : 9.6, 4 MacIlvain buffer : toluene = 0.6 : 9.4, 5 MacIlvain buffer : toluene = 0.8 : 9.2, 6 MacIlvain buffer : toluene = 1.0 : 9.0, 7 MacIlvain buffer : toluene = 1.5 : 8.5, 8 MacIlvain buffer : toluene = 2.0 : 8.0, 9 MacIlvain buffer : toluene = 2.2 : 7.8, 10 MacIlvain buffer : toluene = 2.5 : 7.5, 11 MacIlvain buffer : toluene = 3.0 : 7.0

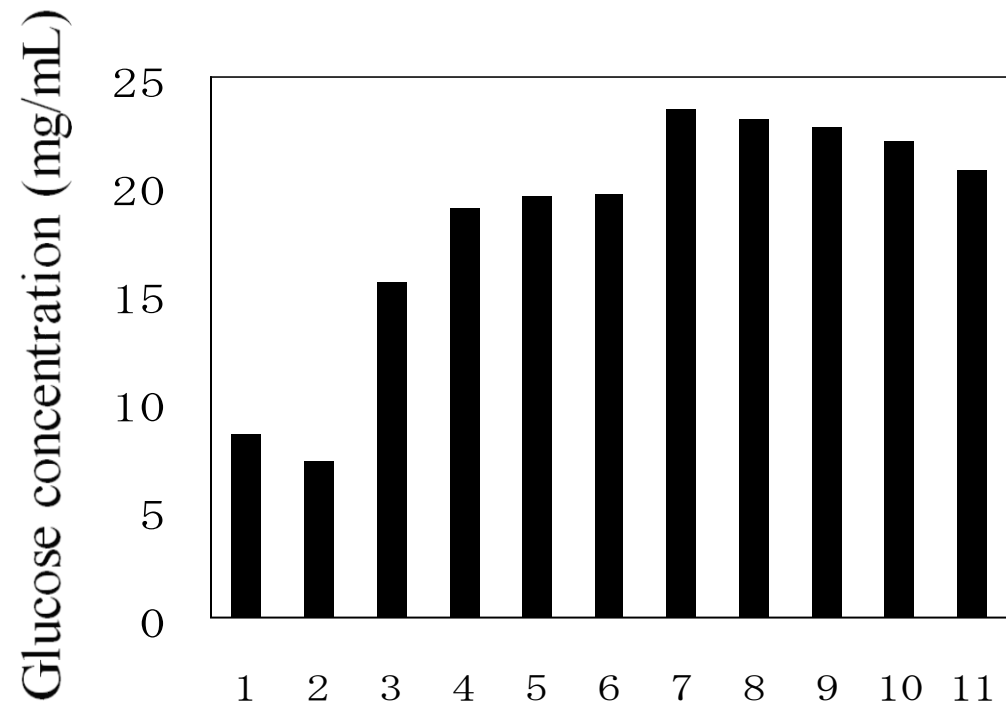


Figure 6-8 Glucose concentration of extracted water from CEORUS-TG enzymatic saccharification solution in various solvent concentrations

1 MacIlvain buffer only, 2 toluene only, 3 MacIlvain buffer : toluene = 0.4 : 9.6, 4 MacIlvain buffer : toluene = 0.6 : 9.4, 5 MacIlvain buffer : toluene = 0.8 : 9.2, 6 MacIlvain buffer : toluene = 1.0 : 9.0, 7 MacIlvain buffer : toluene = 1.5 : 8.5, 8 MacIlvain buffer : toluene = 2.0 : 8.0, 9 MacIlvain buffer : toluene = 2.2 : 7.8, 10 MacIlvain buffer : toluene = 2.5 : 7.5, 11 MacIlvain buffer : toluene = 3.0 : 7.0

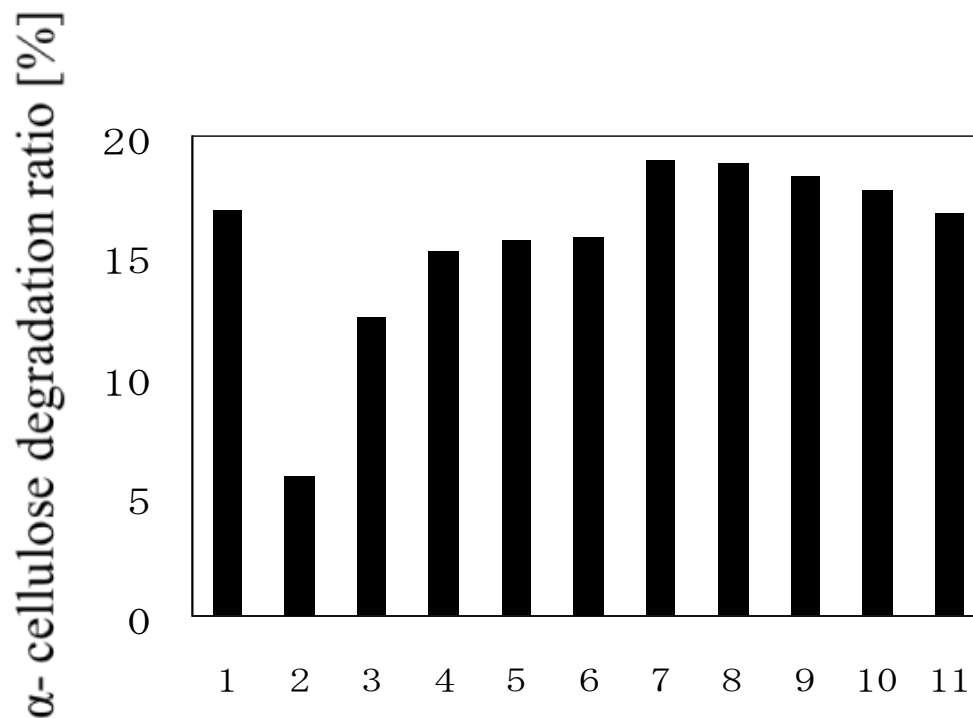


Figure 6-9 α-cellulose degradation ratio of CEORUS-TG enzymatic saccharification solution in various solvent concentrations

1 MacIlvain buffer only, 2 toluene only, 3 MacIlvain buffer : toluene = 0.4 : 9.6, 4 MacIlvain buffer : toluene = 0.6 : 9.4, 5 MacIlvain buffer : toluene = 0.8 : 9.2, 6 MacIlvain buffer : toluene = 1.0 : 9.0, 7 MacIlvain buffer : toluene = 1.5 : 8.5, 8 MacIlvain buffer : toluene = 2.0 : 8.0, 9 MacIlvain buffer : toluene = 2.2 : 7.8, 10 MacIlvain buffer : toluene = 2.5 : 7.5, 11 MacIlvain buffer : toluene = 3.0 : 7.0

6. 4 結 言

本研究は、セルロース系バイオマス資源を酵素糖化して得られる、グルコースなどの糖類を効率よく回収する技術開発について検討した。これまで、酵素糖化反応は水を溶媒とする条件下で行われるために、得られる糖液の濃度が非常に希薄な濃度になってしまう問題を抱えていた。疎水系溶媒を用いて酵素糖化反応に用いる水の量をごく少量にすることで、得られる糖液の濃度を向上させることは、エネルギーコストや装置規模の縮小に大いに貢献できる可能性がある。

水を少量用いる疎水系の有機溶媒中での酵素糖化（減水系の酵素反応）は、澱粉の酵素糖化を行う際に水を含有できるアルギン酸を用いた固定化酵素により酵素活性の低下を防ぐための検討（Morita *et al.*, 1992）や 20%以下の減水系でセルロース糖化速度の向上を達成した（Karube *et al.*, 1990）報告例が見られる。しかし、本研究の様に回収糖液濃度を向上させ、水を除くための蒸留コスト削減に注目した研究例は無い。

本研究で得られた結果では、セルロース系バイオマス資源の吸水膨潤性の違いから、トルエンや酢酸メチルなどの有機溶媒を用いることにより、酵素糖化反応時の試料の膨潤抑制（約 1/2）と粘度低下が可能となった。このことは、酵素糖化に用いる装置規模縮小及び攪拌装置のエネルギー低下に大きく貢献できる。さらに、少量の水により高濃度の糖液回収が可能となった（およそ 1/8）。

得られた糖は、発酵によりバイオエタノールに変換できる。共存する水の量が少ないことは、発酵槽、蒸留槽内の規模の縮小さらには蒸留コストの大幅な削減に繋がる可能性が大きい。これまでの研究では、エネルギーコストがバイオエタノールなどのコスト高になり、国内の普及を妨げてきた。本研究の減水系酵素反応の成果は、エネルギーコストの約 50%を占めると言われる蒸留にかかるエネルギーを大きく低減化できる可能性を有しており、今後のセルロース系バイオマス資源を活用した産業に大きく貢献できる可能性が期待される。

6. 5 参考文献

Elliott DC., "Biomass, Chemicals from." In *The Encyclopedia of Energy*, vol. 1, 163-174(2004)

Saga K., S. Yokoyama and K. Imou, "Net Energy Analysis of Bioethanol Production System form Rice Cropping", *Jornal of Japan Society of Energy and Resources*, vol.29(1), 31-35(2008)

Saga K., S. Fujimoto, T. Yanagida, C. Tada, B. L. Yuriyivna, B. Elmer and T. Minowa, "Comparative Evaluation of Ethanol Production Process from Cellulosic Biomass with Different Pretreatment and Saccharification Method", *Jornal of Japan Society of Energy and Resources*, Vol30(2), 9-14(2009)

Watanabe T., M. Samsuri, R. Amirta, N. Rhamawati, Syafwina, B. Prasetya, T. Tanabe, Y. Ohashi, T. Watanabe, Y. Honda, M. Kuwahara and K. Okano. "Lignin-degrading fungi as a biotechnological tool for biomass conversion", *J. of APPL. AND IND. BIOTEC. in TROPICAL REGION*, Vol. 2(2), 1-9(2009)

Morita T., M.Karube, "Production method of oligosaccharides by enzymatic degradation method of starch-containing materials", Japan Patent Kokai 2004-066094 (1992)

Karube M., E. Tamizawa, K. Hayade, K. Hayashi, "Enzymatic hydrolysis process of cellulose-containing materials" , Japan Patent Kokai 2002-222693 (1990)

第7章 終章

本論文では、近年の環境問題、安全安心問題に関わる産業創生に不可欠なバイオプロセスの中でも、気相及び減水系反応に関する研究について述べた。一般に酵素、微生物などの生体材料を触媒に用いるバイオプロセスは、多量に水を使用する水系反応が主流である。これら生体触媒を用いた様々な技術開発が行われる中、水をほとんど使用しない系で生体触媒反応が有効に働くことが見出され、より多くの産業に寄与する可能性が広がっている。

まず第1章は序章であり、バイオプロセスの有効性と気相及び減水系反応の可能性及び本研究の概要、目的について述べた。

第2章から第4章までは、気体の酸素を電子受容体として用いることが出来るオキシダーゼに注目し、居住空間の空気及び排水の汚染物質として分解除去が望まれるホルムアルデヒドを生体触媒で分解する研究を行った。

そのうち第2章では、愛知県の170ヶ所の土壌及び排水試料より新規に取得したホルムアルデヒド耐性カビについて調べた。取得した9株のホルムアルデヒド耐性カビの中でも、*P. variotii* IRI017株は最も高いホルムアルデヒド耐性を示したことから、その無細胞抽出液の諸性質と休止菌体によるホルムアルデヒド排水処理特性について調べた。その結果、IRI017株は殺菌性の高いホルムアルデヒドが0.5%という高濃度で含まれる培地中で増殖し、ほぼ完全に分解するという、これまでのカビでは報告の無い高い性能を有していることが分かった。さらにその休止菌体は0.03 g-formaldehyde/L/h (0.03 g-formaldehyde/5 g-cell/h) という、実産業で利用可能性のある高分解速度を有していることを示した。

第3章では、IRI017株由来のアルコール酸化酵素 (AOX) の精製を行い諸性質について調べた。AOXはエタノール、メタノール以外にもホルムアルデヒドを気質として酸化することを示した。また、AOXとして多くの研究が行われてきたメチロトロフ酵母由来の酵素と比較して、基質特異性やN末端アミノ酸、及び補因子などにおいて相同性が高いが、サブユニットが6量体であり (メチロトロフ酵母は8量体) 異なる点もあることが分かった。中でも、熱安定性と至適pHの広さにおいて優れており、産業への利用の可能性が大きいことを示した。

第4章では、IRI017株由来のAOXをシリカゲルに固定化した固定化酵素を作成し、空気清浄機用のフィルタを開発した。平均細孔径50 nmのシリカゲルの中で

もアミノ基修飾を行ったものを用いた固定化酵素は、高いAOX保持率とホルムアルデヒド分解活性を示した。この固定化酵素を用いた試作フィルタは湿度20%以下という、日本の冬の低湿度を想定した気相環境下でもホルムアルアルデヒドを連続分解することを示した。従来のホルムアルデヒド除去を目的とした固定化酵素開発例は、高価な補酵素を用いるホルムアルデヒド脱水素酵素によるものであったが、本研究の開発フィルタは電子受容体に気中の酸素を用いるため低コスト化の可能性が高い。また、光触媒など他の触媒に比べ基質特異性が高い酵素を用いるために想定外の反応による2次汚染の可能性が低く、さらには反応に電気エネルギーを要しないため、今後の産業利用へ期待されるものとなった。

第5章及び第6章では、セルロース系バイオマス資源からバイオエタノールを生産するバイオプロセスについて検討した。特に、バイオエタノール生産の課題となっている前処理・糖化工程と蒸留工程について効率化を行った。

第5章では、酵素糖化を目的としたセルロース系バイオマスの連続粉碎技術について検討した。従来、試料の蒸気処理及び微粉碎化をバッチ処理で行っていた前処理工程を高温、高圧の連続式のジェットミルに換えることで前処理効率の向上を図った。さらに、粉碎品が10-20nmのナノファイバー形状にまで加工できるために、基質のセルロースが高分散かつ高比表面積となり、酵素糖化効率が2-4倍向上することを示した。

第6章では、非水系の有機溶媒中での酵素反応を行い、セルロース系バイオマス由来の高濃度糖化液の取得を行った。バイオエタノール生産の50%を占めると言われる蒸留工程に持ち込まれる水の体積を減少させるために、有機溶媒中で酵素糖化を行い、微量の水で抽出する技術について検討した。その結果、有機溶媒系でも従来の水系に比べて若干高い酵素糖化率が得られ、回収する糖液は最大で1/8に減少することを示した。得られた結果は、装置の小規模化および蒸留コストの大幅削減に繋がることが示唆された。

今後、さまざまな分析、解析が急速に進む中、遺伝子関連技術や糖鎖関連技術さらには、動物細胞など微生物以外のバイオプロセスの開発が目覚ましく発展することが予想される。生体反応は、低温かつ有害性の低い物質を用いることが一般的である。親水性の高い生体材料を取り扱うバイオプロセスは水系反応を中心に産業利用が進んでいるが、本研究の様な気相や減水系でのプロセス開発が行わ

れることで、バイオプロセスがより一層多くの産業で活用されるようになることを期待する。

研究業績

発表論文

- 1 森川豊、近藤徹哉、林直宏、伊藤睦弘、高井健次
固定化酵素を用いたホルムアルデヒド除去用バイオフィルタの開発
化学工学論文集, (2014) 印刷中
- 2 森川豊、林直宏、近藤徹哉、福田徳生
Isolation and Characteristics of a Formaldehyde-Degrading Fungus
J. of Chemical Engineering of Japan, , **46** (5), 353-358 (2013)
- 3 森川豊、伊藤雅子、榎田慎一
加圧熱水処理型ジェットミルによるセルロース系バイオマス資源の連続粉碎
化学工学論文集, **36**(4), 259-263 (2010)
- 4 森川豊、木下ひろみ、朝日真澄、高須昭則、平林忠道
Tailor-Made Amphiphilic Biodegradable Polymer-Gels: 1. Gel Preparation via Controlled Ring-opening Polymerization Using Glucopyranoside As Initiator and Subsequent Coupling with α,ω -Bifunctional PEG
Polymer Journal **40**(3), 217-222 (2008)
- 5 近藤徹哉、森川豊、林直宏
Purification and characterization of alcohol oxidase from *Paecilomyces variotii* isolated as a formaldehyde-resistant fungus
Applied Microbiology and Biotechnology, **77**(5), 995-1002 (2007)
- 6 近藤徹哉、森川豊、林直宏、北本則行
Purification and characterization of formate oxidase from a formaldehyde-resistant fungus

国際学会

- 1 王小妹、平林大介、鈴木憲司、○森川豊、近藤徹哉、伊藤雅子
PVA テンプレート法によるモンモリロナイトの多孔質化と酵素担持の検討
R'09 Twin World Congress (2009) Nagoya/Japan and Davos/Switzerland

特許

- 1 高濃度糖化液の製造方法 特開 2011-205933
- 2 バイオマス粉碎方法及びバイオマス粉碎装置並びに糖類製造方法
特許第 5232976 号
- 3 ホルムアルデヒド除去剤及び除去方法 特許第 4374595 号
- 4 新規なホルムアルデヒド分解微生物及び当該微生物を用いたホルムアルデヒド
分解方法 特許第 3774774 号

その他

- 1 セルロース系バイオマス資源の利活用技術の開発
第 28 回 (平成 22 年度)「永井科学技術財団学術賞」, (2011)

謝辞

本研究の遂行、ならびに本論文をまとめるに際して終始親切なご指導ご鞭撻を賜りました名古屋大学大学院工学研究科化学・生物工学専攻 本多 裕之 教授に深く感謝の意をささげます。また、名古屋大学大学院工学研究科化学・生物工学専攻教授の飯島信司先生、堀克敏先生、同准教授の清水一憲先生、名古屋大学エコトピア科学研究センターの片山新太先生には、大変お忙しい中、学位論文の取りまとめにあたり有益なご助言をいただき感謝申し上げます。

さらには、本研究の遂行に際しシリカゲル、フィルタ及び粉碎装置の試作や試験実施で多大なる協力をいただきました、富士シリシア化学株式会社伊藤睦弘部長、三喜ゴム株式会社赤尾悟所長、高井健次所長、並びに吉田機械興業株式会社仲田信一郎参事、楳田慎一技術統括次長に深くお礼申し上げます。

最後に、あいち産業科学技術総合センターの、近藤徹弥主任研究員、伊藤雅子主任研究員、林直弘主任研究員、福田徳生主任研究員の皆様には、研究推進に際して適切なご助言、ご協力をいただき深くお礼申し上げます。