

論文の内容の要旨

氏名：中山 良一

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題名：超音波の選択的照射による酵素反応の加速化と有機質資源の高度変換のプロセス構築

化石資源の大量消費によるエネルギー資源の枯渇と、消費時に排出される二酸化炭素等の温室効果ガスによる地球温暖化の懸念によって、従来の化石資源の代替としてバイオマス等の有機質資源の利用が注目されている。有機質資源から生産されるエネルギー源の主たるものとして、木質・草質セルロースを加水分解して得た糖質を発酵させることによるバイオエタノール、また、脂質資源を変換して得るバイオディーゼル等が検討されている。これらの有機質資源を変換するための従来法は強度の酸・塩基性を反応条件としており、変換プロセスの廃液処理の環境負荷の過大が指摘されるとともに、燃料製造後の分離精製プロセスの複雑性も工業化に向けた課題として指摘されている。

そこで、比較的温和な条件下で有機質資源の変換が可能な酵素を用いたプロセス構築が注目されている。持続的生産が可能な生物資源を利用することによって、将来的な枯渇の懸念が無く、また、酵素が有する触媒としての高度選択性によって副生産物の生成を最小限に抑制しつつ、環境負荷の軽減を図ることが出来る酵素反応の利用は大いに期待されている。しかしながら、酵素活性の最大発現を図りつつ、工業的規模の連続的かつ高効率の生産手段の確立のための課題は多い。

本研究の目的は、酵素を用いた有機質資源を高効率に変換する反応プロセスの構築を検討するに際し、化学的に残留成分の懸念が無い物理的手法を最大限に活用する立場から、超音波の選択的条件下での照射を試みると共に、酵素反応システムの新しい反応器設計に取り組み、速度論に立った解析によって、酵素反応の加速化と有機質資源の高度変換のプロセス構築を提案することである。

本研究の内容は三部によって構成されている。第一に有機質資源の中心的成分であるセルロースの酵素による分解反応を明らかにするため、水可溶性のセルロースを対象とした系で超音波照射の効果を速度論解析した。第二に水不溶性の草質セルロース資源の酵素分解における反応活性の加速化、並びに酵素の吸着挙動に対する超音波前処理の効果の検証を行った。第三に植物由来の油脂を原料とする溶液系を反応対象として、反応液循環を伴う二槽の反応器を効果的に組み合わせ、超音波の選択的な照射方法を提案し、バイオディーゼル製造に向けた有機質資源の高度変換プロセスの構築を行った。

1. 水可溶性セルロースを対象とした超音波前処理による酵素加水分解反応

1.1 研究背景と目的

有機質資源の有効な成分であるセルロースを酵素分解する反応の加速手段として、化学的第三成分の添加を伴わない物理的な手法を取り入れることは、工業的プロセスの簡易な具体化にとって重要である。第一部の目的は、基質に対する超音波照射を反応前処理として利用した加速効果を明らかにすることである。その基礎実験として、水に可溶性カルボキシメチルセルロース（CMC）を基質とし、反応速度論解析を行うことである。また、酵素として、起源の異なる *Aspergillus niger* 由来と *Trichoderma viride* 由来の酵素を用いて、両者を複合利用することで、各酵素の分解機構による違いを活かし、反応全体として高活性をもたらす両者の複合割合を見出すことである。

1.2 結果および考察

分子量の異なる CMC の分解活性に対する各酵素の作用機序の相違の影響を検討した。*T.viride* 由来を用いた場合には、CMC の分子量の差異によって反応活性の影響は見られなかった。一方、*A.niger* 由来では、分子量の大きな CMC に対する反応活性が高い結果を得た。水可溶性のセルロースによる酵素活性の相違は、各酵素の作用機序の相違に由来すると思われる。基質の分子量が分解反応の進行に伴って、低分子化する方向であることを考慮すると、セルロースの酵素分解では、両者を適切に複合させて活用することが効果的であることが示唆された。

次いで、*A.niger* 由来と *T.viride* 由来を反応系内に同時に共存させることによって、反応活性の最大化を図った。Michaelis-Menten の反応機構に基づく速度パラメーター（最大反応速度： V_{max} と Michaelis 定数： K_m ）を指標として、*A.niger* 由来の質量割合が 0.2~0.6 の間では K_m 値が低く、 V_{max} が高く維持された。これより、作用機序の異なる酵素の複合利用の有効性と、総括反応活性を最大化する条件が明らかとなった。

酵素反応の開始に先立って、基質(CMC)を含む水溶液に超音波照射を施すことによって、*A.niger* 由来を用いた系については、超音波未照射の系に比べて反応速度の加速が見られた。超音波による基質水溶液の前処理時間の影響について検討した結果、超音波照射時間の増大と共に反応速度の増大が認められ、照射時間が連続 180 秒で反応の加速の上限に達した。一方、*T.viride* 由来を用いた系では、超音波照射による顕著な反応の加速は見られなかった。

2. 草質セルロース資源の酵素分解における反応活性の加速化並びに酵素吸着挙動に対する超音波前処理の影響

2.1 研究背景と目的

石油燃料の代替の一種として、バイオエタノールが注目されている。その製造の過程では、セルロースを分解して糖を生成し、これより発酵過程を経てアルコールを製造するものである。天然資源においてセルロースはリグニン等の成分と複雑に複合して存在しており、リグニンの少ないセルロース資源は食料資源としても貴重である。そこで、食料と競合しない木質や草質などの非可食部を原料としたセルロース資源の利用が期待されており、本研究では、生育が早く、大量に生産できる草質セルロース系資源（ケナフ）の酵素分解を検討した。

第二部の目的は、基質として、ケナフの乾燥粉末を用い、酵素として *A.niger* 由来と *T.viride* 由来を用いて、基質を含む懸濁水溶液に、酵素反応に先立って超音波照射を行い、実際の水不溶性セルロース原料に対して、反応の加速効果の最大をもたらす条件を明らかにすることである。

本研究では、超音波照射（20kHz、200W）を室温下で 10 分間行った。照射後、酵素溶液を添加して加水分解反応（323K）を開始した。酵素反応進行中の超音波照射は行っていない。その反応液より所定時間毎にサンプルを分取し、熱失活により酵素反応を停止させ、反応系における最終生成物（グルコース）の生成量から反応活性を評価した。

2.2 結果および考察

前節の水可溶性セルロースの知見では、*T.viride* 由来の酵素の場合、反応速度の顕著な増大が認められなかったにもかかわらず、本節の水不溶性セルロース資源の場合では、二種の酵素（*A.niger* 由来と *T.viride* 由来）をそれぞれ単独で用いた場合、両者共に、超音波照射の前処理によって、反応速度の加速化が認められた。特に *A.niger* 由来の酵素で顕著な加速化が現れた。

また、基質の質量濃度を変化せて、速度パラメーターを求めた結果、超音波による前処理によって、酵素と基質の親和性が高まっていることが示唆された。水不溶性基質に関して、この点を検証するため、基質の表面状態を電子顕微鏡によって観察した。その結果、超音波を酵素反応に先立って行うことにより、ケナフの固体表面の夾雑物が取り除かれたことが確認され、セルロースの分子束が露出して酵素との接触性が改善されたことが示唆された。また、基質表面に対する酵素の吸着挙動を検証した結果、Langmuir 型の吸着平衡が確認され、平衡論解析によって、吸着パラメーター（最大吸着量、吸着定数）を算出した。これより、基質に超音波照射を行うことによって、二種の酵素の最大吸着量が増大する結果を得た。超音波照射による反応速度の加速効果は、基質表面に高密度に酵素が吸着することにより、溶液内に添加された酵素の多くが基質に直接作用することによって発現したことを明らかにした。

特に、*A.niger* 由来の酵素を用いた場合、吸着量が *T.viride* 由来に比較して著しく高く、反応活性もこれに対応して高い値を呈したと考えられる。

3. 超音波照射を伴う二槽循環型反応器によるバイオディーゼル燃料の生産

3.1 研究背景と目的

エネルギー源として直結する有機質資源として、バイオディーゼルの挙げることができる。原料自身がすでに液体油脂であることから、連続操作を行う際の取り扱いが容易であり、工業的生産に向いている。また、各種植物由来の油脂ばかりでなく、食品加工業から回収された天ぷら油等も反応原料として考えることができる。本研究の第一部並びに第二部では反応加速の物理的手段として超音波照射を前処理として用いているが、反応基質が溶媒に均一に可溶化している場合、反応の前処理として超音波を照射するのではなく、反応中に照射を実施しなければならない。しかしながら、超音波照射の直接被曝によって、酵素分子自身がダメージを受けることは従来から解決が求められており、均一相における酵素反応の加速に超音波を利用する新しい手法を開発しなければならない。そこで、本研究では、反応槽を二槽に分割して、一方の反応槽において反応中に超音波照射を実行しつつ、他方の反応槽においては超音波の直接被曝を避けることによって、酵素のダメージを抑制し、両方の反応槽を反応液が循環することにより、油脂からのバイオディーゼルの製造が連続的に実施できる高度変換プロセスを新規に提案し、これを検証することとした。

第三部の目的は、植物由来の油脂を原料として、酵素反応によってバイオディーゼルの製造を行うにあたり、反応液に超音波照射を行うことによって酵素反応の加速化を図ることである。この際、酵素分子の超音波の直接被曝を避けるとともに、超音波による反応加速を最大限享受できる有機質資源の高度変換のプロセスを構築し、その操作条件を明らかにすることである。

3.2 実験方法

本研究では生物資源由来の油脂（反応基質）として、植物油（菜種油）を使用し、工業レベルで用いられている酵素(Lipase)を可溶化して、均一な液相においてバイオディーゼル生成を行った。超音波照射槽はガラス製のフローセルを使用し、ホーン型の超音波照射装置を用いて反応中に超音波を連続的に照射した。一方、攪拌反応槽はガラス容器に Rushton タービン翼を用いて反応液を攪拌し、超音波の照射は行わなかった。二つの反応槽はチューブにより接続し、反応溶液をポンプによって反応進行中、常に反応液を循環させた。ポンプ送液量を変えることによって、各反応槽における反応液の滞留時間の変化させることができる。反応開始時に攪拌反応槽に植物油と所定量のメタノールを添加後、

Lipase 水溶液を加え、酵素反応（308K）を開始した。反応開始後に超音波照射槽を含むプロセス全体の反応液循環を開始させ、これと同時に超音波照射を開始して、反応中継続的に照射を行った。なお、油脂原料として、市販の菜種油を用いた。油脂の分解反応は逐次反応で進行し、最終生成物として脂肪酸メチルエステル FAME (fatty acid methyl ester) に注目した。なお、酵素は Callera Trans L™ (modified *Thermomyces lanuginosus* Lipase) を用いた。所定時間毎に攪拌槽から試料をサンプリングし、HPLC にて中間生成物並びに FAME の生成量を定量した。

3.3 結果および考察

二槽循環型反応器を用いた植物油（菜種油）からの Lipase によるエステル交換反応を行った結果、超音波照射を行うことで、最終生成物である脂肪酸メチルエステル(FAME)、並びに中間生成物の生成促進が確認された。脂肪酸メチルエステルの収率は超音波照射の有無に関わらず 90%に達したが、超音波照射を実施した方が、最終収率に到達する時間が短縮され、均一溶液系の酵素反応においても、超音波照射による酵素反応の加速効果が確認された。基質濃度を変えるためにヘプタンを不活性溶媒として添加し、基質濃度と初期反応速度の関係を求めた。基質濃度の増加に伴い、初期反応速度の増加が確認され、超音波照射を行った系が初期反応速度の増大が大きく現れた。速度パラメーターを速度論解析によって求めたところ、最大反応速度が超音波照射によって、2.3 倍の増大を呈した。

本研究の反応プロセスは二槽間の循環流速を変えることによって、酵素が超音波照射槽に留まる時間を選択的に制御することができる。酵素が超音波照射槽内に留まる平均滞留時間が短い程、反応活性が向上することが明らかとなった。これは酵素が超音波による直接被曝される時間が短くすることで酵素の高活性を維持しながら、持続的に連続反応を行う可能性を示したと言える。また、超音波出力を増大させることにより、加速効果を向上させる効果も確認された。これより、循環流速と超音波照射出力の最適化を図ることによって、工業的にも有望な脂質として存在する有機質資源の高度変換プロセスを実現することができる。

4. 本研究の総括

セルロース、並びに植物油脂等の有機質資源の有効利用を目指し、酵素を用いて高付加価値を有する物質に変換するプロセスを構築した。反応加速の手段として、化学的残留成分の懸念のない超音波照射を選択的にプロセスに取り入れることによって、反応活性の向上をもたらすことに成功した。その主な成果として、

- ①水可溶性セルロースの分子量の大きさにより酵素による分解反応活性に差異があることが認められた。起源の異なる二種の分解酵素を同時に複合利用することにより、分解反応速度が高められた。
- ②草質セルロースに対して、超音波前処理を施すことによって、特に *A.niger* 由来の酵素では反応活性の向上が認められた。速度パラメーターを算出するとともに、酵素の吸着特性を明らかにし、超音波照射によって、基質への直接的な酵素の吸着量の増大が反応加速をもたらしたことを明らかにした。
- ③植物油脂からのバイオディーゼル生産に向けて、二槽に分割した反応器を新規に提案し、超音波照射による反応加速を享受しつつ、酵素分子が超音波の直接被曝によるダメージを受けることなく酵素の高活性を維持することができるプロセスを構築した。

これら一連の超音波照射の選択的な利用を通じて、有機質資源の酵素を用いた高度変換プロセスの構築と工業的利用の可能性に有用な知見を得た。