

平成 25 年度
環境研究総合推進費補助金 研究事業
総合研究報告書

バイオマス・二酸化炭素を原料としたソーラー燃料・化成品
変換システムの構築に関する研究

(3K113016)

平成 26 年 3 月

大阪市立大学 天尾 豊

補助事業名 環境研究総合推進費補助金研究事業（平成 23 年度～平成 25 年度）

所管 環境省

国庫補助金 36,239,000 円（複数年度の総計）

研究課題名 バイオマス・二酸化炭素を原料としたソーラー燃料・化成品変換システムの構築に関する研究

研究期間 平成 23 年 6 月 1 日～平成 25 年 3 月 31 日

研究代表者名 天尾 豊（大阪市立大学）

研究分担者 永岡 勝俊（大分大学）

目次

総合研究報告書概要	1
本文	
1. 研究背景と目的	10
1.1 研究背景	10
1.2 研究目的	14
2. 研究方法	16
2.1 イオン液体を反応媒体としたセルラーゼによるセルロースの糖化反応	16
2.2 古紙由来セルロースの糖化反応	18
2.3 光合成類似色素分子複合化による光安定化	19
2.4 光合成類似色素分子複合化による光安定化及び人工補酵素分子の光還元	21
2.5 化学光量計を用いた量子収率計算法	22
2.6 白金微粒子の調製法	23
2.7 白金微粒子の水素発生活性測定法	25
2.8 ギ酸脱水素酵素を用いた二酸化炭素-ギ酸変換反応に有用な人工補酵素の開発	26
2.9 ギ酸脱水素酵素を用いた二酸化炭素-ギ酸変換反応の酵素反応速度論的解析	29
2.10 グルコース-グルコン酸変換と可視光駆動型水素生産・二酸化炭素還元系とを連結した反応システムの構築	29
2.11 セルロース糖化系と可視光駆動型水素生産・二酸化炭素還元系とを連結した反応システムの構築	31
3. 結果と考察	33
3.1 イオン液体を反応媒体としたセルラーゼによるセルロースの糖化反応	33
3.2 古紙由来セルロースの糖化反応	44
3.3 光合成類似色素分子複合化による光安定化	46
3.4 白金微粒子の水素生産活性評価	48
3.5 ギ酸脱水素酵素を用いた二酸化炭素-ギ酸変換反応に有用な人工補酵素の開発	50
3.6 ギ酸脱水素酵素を用いた二酸化炭素-ギ酸変換反応の酵素反応速度論的解析	53
3.7 グルコース-グルコン酸変換と可視光駆動型水素生産・二酸化炭素還元系とを連結した反応システム具現化への展開	60
3.8 セルロース糖化系と可視光駆動型水素生産系とを連結した反応システム具現化への展開	62
4. 結論	67
5. 参考文献	70
6. 研究発表	75
論文発表	
学会等発表	
7. 知的財産権の取得状況	77
研究概要図	78
英文概要	79

環境研究総合推進費補助金 研究事業 総合研究報告書概要

研究課題名： バイオマス・二酸化炭素を原料としたソーラー燃料・化成品変換システムの構築に関する研究

研究番号： 3K113016

国庫補助金清算所要額： 36,239,000 円（複数年度の総計）

研究期間： 平成 23 年 6 月 1 日～平成 26 年 3 月 31 日

研究代表者名： 天尾 豊（大阪市立大学）

研究分担者： 永岡 勝俊（大分大学）

研究目的

地球環境保全のためには、環境低負荷型エネルギー循環システムの構築や有害物質を有効利用する物質変換システムの開発が必須である。特に国連地球変動サミットで「日本は 2020 年までに 90 年比で 25%の温室効果ガスを削減する」と明言したことから、二酸化炭素の大幅な削減、低炭素燃料製造技術確立が早急に望まれる。本提案では、木材廃棄物に含まれるセルロースを中心としたバイオマスと二酸化炭素とを光エネルギーを駆動力として多角的にエネルギー、物質変換可能なシステムを構築する。具体的には、バイオマスと二酸化炭素からエネルギー（水素）源、燃料（メタノール）及び医薬品等に利用できる化成品（グルコン酸）を同時に獲得可能な系を構築し、二酸化炭素削減を視野に入れた有効利用と廃棄物処理を併せ持つ多機能システムへ展開する。本提案は重点テーマ②における「草木質系バイオマスエネルギー利用技術」へ大きく貢献できる。

研究方法

本提案は以下の四項目から構成される。

- ① 酵素・触媒によるセルロースの糖化、グルコース脱水素酵素による電子供与分子及びグルコン酸生成プロセス
 - ② 光合成色素分子と電子伝達分子で構成される光レドックス反応プロセス
 - ③ 白金微粒子による水素生産反応プロセス
 - ④ ギ酸・アルデヒド・アルコール脱水素酵素系による二酸化炭素のメタノールへの変換プロセス
- これらを連動させることによってセルロースと二酸化炭素から光エネルギーを駆動力として水素・メタノール・グルコン酸が同時に生産可能となる。

研究期間3年間で進めた研究方法の概要を以下に示す。

- ① 酵素・触媒によるセルロースの糖化、グルコース脱水素酵素による電子供与分子及びグルコン酸生成プロセス

本項目、主に固体酸触媒とイオン液体によるセルロースの糖化反応について検討した。具体的にはイオン液体 1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムクロリド (BminCl) と不溶性セルロース (古紙) を反応容器に入れ、触媒 Amberlyst-15 及び加水分解のための純水を加え、加水分解した。反応後、反応溶液を精製水で 100 ml に希釈し、遠心分離を行い高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いて上澄み液を分析した。セルロース転化率は HPLC を用いて定量した生成物収率の総和により算出した。さらに酵素セルラーゼを用いたセルロースの糖化反応についても検討した。

- ② 白金微粒子による水素生産反応プロセス

本項目では白金微粒子の調製、高分散化及び高活性化に関して研究調査した。クエン酸還元法で調製した白金微粒子をポリビニルアルコールを基盤とした水溶性高分子を加え、白金微粒子を高分子鎖に担持した(Pt-PVA)。さらにチオール基を有する界面活性剤(1-カルボキシドデカンチオール) (Pt-C₁₀SH)あるいはポリエチレングリコール (PEG-SH) (Pt-PEG-SH) を用い、チオール基と白金微

粒子との相互作用を利用した分散システムも検討した。さらに調製した白金微粒子の水素生産活性を調査した。

③ ギ酸脱水素酵素を用いた二酸化炭素-ギ酸変換反応に有用な人工補酵素の開発

昨年度は二酸化炭素を還元してギ酸を生成するギ酸脱水素酵素に対して効率的に作用する人工補酵素についてビオローゲン骨格にイオン性置換基を導入し、二酸化炭素-ギ酸変換反応について調べ、陽イオン性置換基の導入により酵素活性が向上することを見出している。さらに高機能な人工補酵素と期待される 2,2'-ビピリジン骨格を持つ人工補酵素を開発し、二酸化炭素からギ酸への変換反応系との関係について調べた。

バイオマスと二酸化炭素からエネルギー（水素）源、燃料（メタノール）及び医薬品等に利用できる化成品（グルコン酸）を同時に獲得可能な反応系構築への展開を視野にいれ以下に述べる2つのシステムについて検討した。

④ グルコース-グルコン酸変換と可視光駆動型水素生産・二酸化炭素還元系とを連結した反応システム具現化への展開

最初にグルコース-グルコン酸変換と可視光駆動型水素生産・二酸化炭素還元系とを連結した反応システムの構築について検討した。具体的には、グルコース脱水素酵素（GDH）によるグルコースのグルコン酸への変換反応とそれに伴う NADPH 再生系と光増感剤として水溶性ポルフィリン テトラフェニルポルフィリンテトラスルフォネート(TPPS)、電子伝達体としてメチルビオローゲン及び2種類の触媒・酵素、白金微粒子及びギ酸脱水素酵素からなる系である。さらに同時に生成するグルコン酸の定量も試みた。

⑤ セルロース糖化系と可視光駆動型水素生産・ギ酸生成系とを連結した反応システム具現化への展開

セルロース糖化系と可視光駆動型水素生産系とを連結した反応システムをより実用化するための反応装置を考案した。具体的にはセルロース糖化系（反応系①）と可視光駆動型水素生産系（反応

系②) とを送液ポンプで連結したものである。反応系①でセルロースを酵素またはルイス酸触媒で糖化し、生成したグルコースを反応系②に送り込み、可視光照射によって水素を生産する仕組みである。さらにこの系にギ酸脱水素酵素を共存させ水素生産と同時にギ酸生成反応を試みた。さらに同時に生成するグルコン酸の定量も試みた。

結果と考察

① 酵素・触媒によるセルロースの糖化、グルコース脱水素酵素による電子供与分子及びグルコン酸生成プロセス

Amberlyst-15 とイオン液体による古紙由来のセルロースの糖化反応について検討した。その結果、セルロース転化率 50%、グルコース収率 40%と結晶性セルロースを用いたときと同様に高い活性を示した。さらにセルラーゼを用いた水溶液系での古紙由来のセルロースの糖化反応についても達成できた。

② 白金微粒子による水素生産反応プロセス

化学修飾した白金微粒子の水素生産活性を基質として還元型メチルピオローゲンを用いて調査した結果、Pt-PVA の場合 $2.0 \times 10^{-8} \text{mol min}^{-1}$ 、Pt-C₁₀SH の場合 $3.5 \times 10^{-8} \text{mol min}^{-1}$ 、Pt-PEG-SH の場合 $1.8 \times 10^{-8} \text{mol min}^{-1}$ の水素がそれぞれ発生した。

一方、基質として NADH を用いた場合では、Pt-PEG-SH の場合のみ水素が発生した。水素発生量は $9.7 \times 10^{-9} \text{mol min}^{-1}$ であった。一方 Pt-PVA と Pt-C₁₀SH を用いた場合、水素は発生しなかった。

基質として還元型メチルピオローゲンを用いた場合では、Pt-C₁₀SH を用いたときが一番多くの水素が発生した。これは 10-カルボキシ-1-ドデカンチオールで白金微粒子を修飾することで、白金微粒子がより分散され水素発生活性が上昇し、水素発生につながったと考えられる。一方、基質として NADH を用いた場合では、Pt-PEG-SH を用いたときのみ水素が発生した。ポリエチレングリコールチオールで白金微粒子を修飾することで、白金微粒子の状態が変化して、従来使用することができなかった NADH が基質として使えるようになった。

③ ギ酸脱水素酵素を用いた二酸化炭素-ギ酸変換反応に有用な人工補酵素の開発

メチルピオローゲンを基盤とした人工補酵素及びさらに高機能な人工補酵素と期待される 2,2'-ビピリジン骨格を持つ人工補酵素を開発し、二酸化炭素からギ酸への変換反応系との関係について調べた結果、2,2'-ビピリジン骨格を持つ人工補酵素の方がメチルピオローゲンよりもギ酸生成量が増加することが分かった。さらにメチレン連鎖が 3 のものを用いるとギ酸生成量が最も多くなった。

この値は昨年度報告した陽イオン性置換基を導入したビオローゲン誘導体 ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{VCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$)よりも2倍高い値を示している。以上のことからそれぞれの人工補酵素の酸化還元電位に差がないことを考慮に入れると、本反応系でのギ酸生成量は人工補酵素の化学構造に依存しており、2,2'-ビピリジン骨格を持つ人工補酵素はギ酸脱水素酵素との相互作用が強くなり、二酸化炭素-ギ酸変換反応を加速させたと考えられる。さらにこれらの人工補酵素とギ酸脱水素酵素との相互作用を酵素反応速度論的な解析から明らかにした。

④ グルコース—グルコン酸変換と可視光駆動型水素生産・二酸化炭素還元系とを連結した反応システム具現化への展開

グルコース脱水素酵素 (GDH) によるグルコースのグルコン酸への変換反応とそれに伴う NADPH 再生系と光増感剤として水溶性ポルフィリン テトラフェニルポルフィリンテトラスルフォネート (TPPS)、電子伝達体としてメチルビオローゲン及び2種類の触媒・酵素、白金微粒子及びギ酸脱水素酵素からなる系について検討した結果、光照射時間とともに定常的に水素が発生した。光照射時間90分後で約 $4\ \mu\text{mol}$ の水素が発生した。また同時に光照射時間90分後で約 $20\ \mu\text{M}$ のギ酸が生成した。このことから可視光エネルギーを駆動力として二酸化炭素—ギ酸変換系と水素生産反応が同時に進行させることができた。さらに同時に生成するグルコン酸の定量にも成功した。

⑤ セルロース糖化系と可視光駆動型水素生産系とを連結した反応システム具現化への展開

セルロースの糖化反応 (反応①)

新聞紙由来のセルロースとセルラーゼをリン酸塩緩衝液 (pH 7) に加え、室温で攪拌してセルロースの糖化处理を行った結果、糖化处理後300分で、セルロースが分散した。さらに糖化液30mlを採取し NAD^+ と GDH を加え NADH 生成反応によりセルロースの糖化反応を追跡した結果、反応時間とともに NADH が生成した。これまで困難とされてきたセルロースの糖化を室温・常圧条件下で達成できた。

セルロース糖化液 - GDH - NAD^+ - MgChl-*a* - MV^{2+} -白金微粒子系での光水素生産反応 (反応②)

最後に、上述のように成功したセルロースの糖化液を原料とした水素製造反応について検討した。セルロース糖化液、GDH、MgChl-*a*、NAD⁺、MV²⁺及び白金微粒子を含む反応溶液を水素製造用反応容器に入れ、ハロゲンランプを用いて光照射した。その結果、光照射時間に対して定常的に水素が発生した。以上のことから、セルロース糖化液から光エネルギーを使って水素製造に成功した。さらにこの系にギ酸脱水素酵素を共存させることによって二酸化炭素からギ酸も同時に生成させることができた。加えて同時に生成するグルコン酸の定量にも成功した。

環境政策への貢献

地球環境保全のためには環境低負荷型エネルギー循環システムの構築や有害物質を有効利用するエネルギー変換システムの開発が必須である。中でも木材廃棄物等に含まれる多糖類のような未利用資源は大量に存在するため、これらを利用し、新規材料、エネルギー、燃料を生産できれば、廃棄物の処理にとどまらず、物質・エネルギー創製技術につながる。セルロースを中心としたバイオマスを基本原料として、新しいエネルギー源あるいは燃料電池の普及に伴い需要が増加する水素や医薬品で有用なグルコン酸を太陽光エネルギーを駆動力として作り出す。本提案で構築されたシステムは、未利用資源的な廃棄物や削減対象の温室効果ガスをターゲットにした学術的にも価値のある研究であることはいまでもなく、また廃棄物処理及び利用法として、バイオマスを余すところなく原料とし新規エネルギー・燃料・化成品を一つのシステムで同時に生産でき、かつこれまでの方法では高温・高圧下という外部エネルギーを投入しなければならなかった点を太陽光エネルギーで補う革新的な低炭素燃料生成技術への展開ができる。

一方、本システムは光エネルギーを利用して二酸化炭素をギ酸、ホルムアルデヒドを経由して最終的にメタノールという低炭素燃料に変換できるものである。一般的には二酸化炭素をメタノール燃料に変換する際には高温、高圧、水素ガスを利用するような膨大なエネルギーを投入して二酸化炭素を原料としており、真の二酸化炭素削減には結びついていない。これに対して本研究では投入するエネルギーを光エネルギーで補い、二酸化炭素を分子変換する反応を触媒する脱水素酵素を用いることにより、水素ガスも利用せず二酸化炭素をメタノールにまで変換できる。また必要に応じてギ酸やホルムアルデヒド合成で止めることも可能であり、特に近年水素のエネルギー貯蔵体とし

て有望なギ酸を二酸化炭素から水素を使わずに合成できるため、水素エネルギー安全に利用する低炭素社会を構築するといった大きなエネルギー・社会・環境的政策に寄与できるものである。

研究成果の実現可能性

本研究ではセルロースを中心とした草本系バイオマスを温和な条件下で糖化し、その糖化液と二酸化炭素とを原料とし人工光合成系と酵素・触媒とを利用することで、水素及びメタノール燃料を生産し、同時にグルコースから変換された化成品グルコン酸も獲得可能な多機能システムを構築するものである。現状ではセルロースの糖化液と二酸化炭素とを原料として光エネルギーを用いて水素とギ酸（メタノール生成のための中間分子）が生成するに至っている。今後3年後を目途にプロトタイプを、小規模（反応体積 1L 程度）なのものであれば5~7年後に実用化できると考えている。大阪市立大学に併設された人工光合成研究センターとタイアップして早期の実用化を実現する。

結論

研究期間3年間で、多糖類セルロースと二酸化炭素から生物工学的手法と光エネルギー利用により新規エネルギー源・燃料となる水素・メタノール生産反応系を確立し、システムの効率化プロセスへ展開する。具体的には、バイオマス利用の需要が高い古紙以外の不溶性セルロースの使用が可能な反応系を構築することを目的とし、反応収率も同様に、物質換算で不溶性セルロースの50%程度を水素に変換でき、なおかつ糖化したグルコースはすべてグルコン酸に変換可能な系の達成が最大かつ最終の成果目標とする。一方メタノール生産に関する目標値として、申請者の持つ技術シーズでは、二酸化炭素を原料として収率50%でメタノールが合成できている。さらに収率を80%まで向上させる。概算ではあるが、二酸化炭素20Lとし、反応収率を80%に設定し、1日あたり炭素換算で7.2g削減することができるシステムを目指した。

研究期間3年間でセルロース糖化系と可視光駆動型水素発生・二酸化炭素分子変換系とを連結した反応システム具現化に関する研究を進めた。具体的な研究成果として、イオン液体を用いたセルロースの糖化液と人工光合成系の連結反応による可視光駆動型水素・ギ酸生産系の構築について反応体積3mlレベルでの反応条件の検討、生成物である水素・ギ酸濃度の定量及び化成品として抽出したグルコン酸濃度の定量することができた。さらにセルロース糖化系と可視光駆動型可視光駆動

型水素発生・二酸化炭素分子変換系とを送液ポンプで連結した 500ml レベルの大容量型反応装置の開発に成功した。本システムでは反応収率は物質量換算で不溶性セルロースの約 30%程度を水素に、約 0.5%をギ酸に変換することができた。またセルロースの糖化に伴うグルコン酸の変換は 80%程度まで達成できた。今後カルシウムイオンの添加法でグルコン酸を回収するシステムを組み込むことにより、化成品回収プロセスを達成することができる。最後にセルロースから水素への物質変換効率は最終目標値の 6 割以上まで達成できたが、二酸化炭素-燃料（メタノール・ギ酸等）変換効率は最終目標値へ到達させるためには人工補酵素のさらなる機能化が必要であると考えられる。

研究期間 3 年の達成度としてシステム駆動原理は確立することができた。しかしながら二酸化炭素からメタノール生成プロセスの組み込み、木材チップなどの難溶性セルロースの原料としての利用までには至らなかった。今後セルロースの糖化プロセスの効率化を検討する必要がある。しかしながらセルロースの糖化プロセスと人工光合成系の連結による水素生産、二酸化炭素還元系を達成できたことは今後のバイオマス、二酸化炭素の活用、環境問題・エネルギー問題解決への新規な手法として活用できると期待される。

1. 研究背景と目的

1.1 研究背景

20世紀の科学技術の発展はめざましいものがあり、様々な機能を有する材料が作り出されてきた。しかしながらその一方で科学技術の発展と共に温室ガスなどによる地球環境汚染、大量の産業廃棄物処理および石油・石炭などの化石エネルギーの枯渇という重大な問題を次の世代のために早急に解決しなければならない。つまり21世紀は地球環境を保全し、次世代のエネルギーを開拓することが必要となる。地球環境保全のためには環境低負荷型エネルギー循環システムの構築や有害物質を有効利用するエネルギー変換システムの開発が必須である。特に次世代エネルギーとしては、原子力エネルギーが用いられており、火力発電に匹敵するほどの電力をまかなえるようになっている。しかしながら核燃料サイクル等問題を抱えている。そのような状況下で国連地球変動サミットで「日本は2020年までに90年比で25%の温室効果ガスを削減する」と明言したことから、二酸化炭素の大幅な削減、低炭素燃料製造技術確立が早急に望まれる。

環境問題・エネルギー問題を解決する上で重要なエネルギー源の1つとして産業廃棄物や木材廃棄物等の未利用資源が挙げられる。特に木材廃棄物に含まれるセルロースなどはバイオマスと呼ばれ、そのエネルギー利用が望まれている。バイオマスは燃焼させることによってエネルギーを得ることはできるが、カーボンニュートラルの概念があるものの燃焼に伴い二酸化炭素が発生するので地球環境問題を考慮に入れると可能な限り二酸化炭素の発生量の少ない方法が望ましいと言える。可視光を利用した光水素生産反応は、酸化チタンなどの

金属酸化物半導体を基盤にした機能性無機材料¹⁾および図1に示すような電子供与体(D)、光増感剤(P)、電子伝達体(C)および触媒で構成される4成分系が広く用いられてきた²⁾⁻⁴⁾。特に図1に示す反応系では水素発生用触媒として硫酸還元菌由来の酵素ヒドロゲナーゼや白金微粒子が広く用いられている。また太陽光の中でも分布強度の大きい可視光を効率よく吸収する化合物であるポルフィリンや緑色植物由来の光合成色素クロロフィルが光増感剤として有効である。金属酸化物半導体を基盤にした機能性無機材料を用いた光水素生産反応では、近紫外領域および可視光の短波長側の光を利用したものであり、太陽光の分布強度の強い可視光領域の光を有効に利用するには不十分である。一方4成分系光水素発生反応では、用いる光増感剤の種類によって太陽光に含まれる様々な波長の光を利用できる。例えば、光合成色素を光増感剤として用い、NADPHを電子供与体、メチルビオローゲン(MV²⁺)を電子伝達体、白金微粒子を触媒とした反応系では、クロロフィルの持つ600nm以降の近赤外領域の光を増感して水素を製造できる^{5),6)}。しかしながら4成分系光水素発生反応では、用いる電子供与体(D)が犠牲試薬として作用するため、反応は電子供与体が完全に消費された時点で停止してしまうという。この問題を解決し、4成分系光水素発生反応の特徴を活か

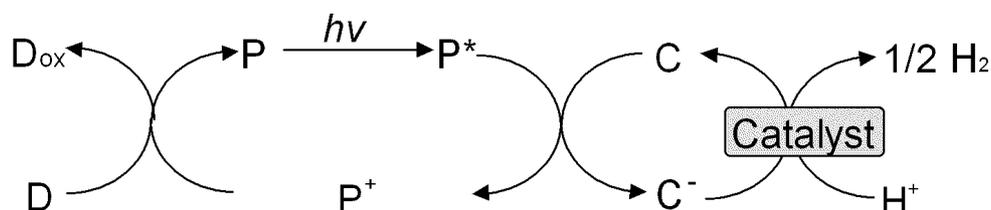


図1 電子供与体(D)、光増感剤(P)、電子伝達体(C)および触媒で構成される4成分系光水素生産反応

したシステムを構築するためには、例えば犠牲試薬として多糖類セルロースに代表されるバイオマスを利用することが1つの戦略となる。多糖類をどのように図1に示す光水素生産系の犠牲試薬として使えばよいかということになる。4成分系光水素発生反応において犠牲試薬として使っているNADHやNADPHの酸化還元反応による再利用とすれば良いということになる。多糖類をそれぞれグルコースのような単糖類に加水分解する酵素がある。例えばセルロースはセルラーゼ、デンプンはグルコアミラーゼという酵素によってグルコースに加水分解される。さらにグルコース脱水素酵素（GDH）を利用して、生成したグルコースとNAD⁺を反応させれば、NADHが生成する。生成したNADHは図1に示した光水素生産反応系の電子供与体として用いることができることになる。すなわち反応系全体としては、図

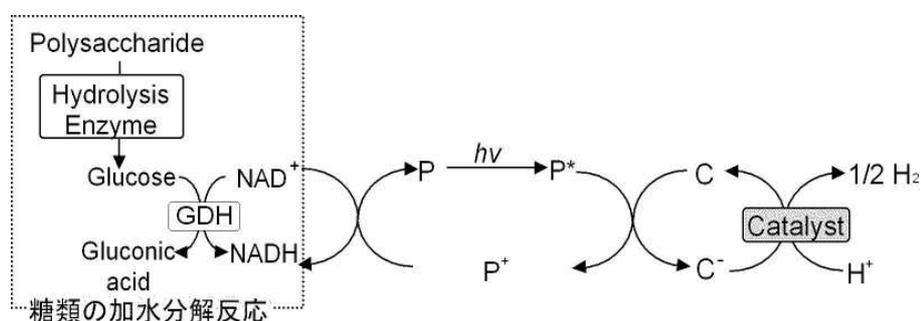


図2 糖類の加水分解反応を組み込んだ光駆動型水素生産反応

2に示すように多糖類を原料として、光エネルギーと各種酵素や触媒を用いることによって水素を獲得できることになる⁷⁾。

一方我々は、二酸化炭素を原料として有効に利用できる手法の開発として太陽光の分布強度が強い可視光領域の光を利用した二酸化炭素からの光化学的アルコール生産系の構築を目的とした反応系も構築している（文献番号40・41）。光エネルギーを利用した二酸化炭素

からのメタノール生成系は、図3に示すような電子供与体、光増感剤、電子伝達体および脱水素酵素(ギ酸脱水素酵素 FDH、アルデヒド脱水素酵素 AldDH、アルコール脱水素酵素 ADH)の6成分系からなる反応経路である。反応経路は光増感剤が光照射によって励起され、励起された光増感剤から電子が電子伝達体へ移動する。電子を受け取った電子伝達体は還元され、電子は還元された電子伝達体から脱水素酵素の作用により、二酸化炭素からギ酸、ホルムアルデヒド、メタノールの順に変換されるものである。

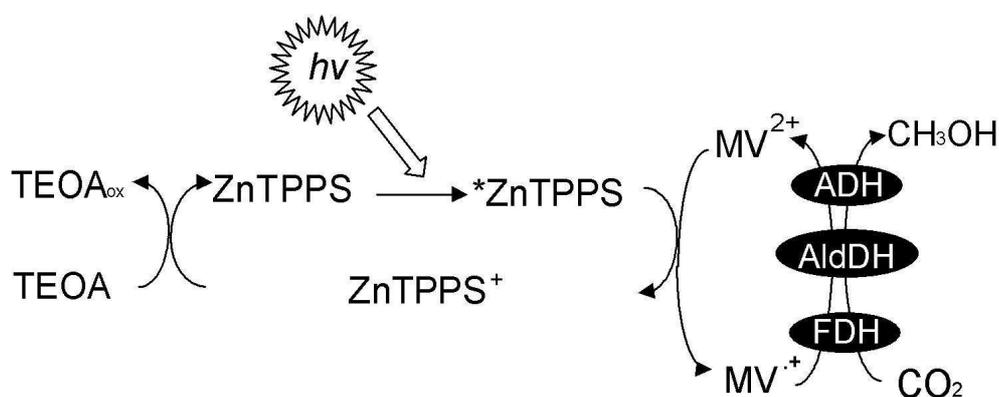


図3 TEOA-ZnTPPS-メチルビオローゲン(MV²⁺)-FDH-AldDH-ADH系による光駆動型二酸化炭素-メタノール変換反応

上記反応系を用いてこれまでに、光増感剤として水溶性陰イオン型亜鉛ポルフィリン 亜鉛テトラフェニルポルフィリンテトラスルフォナート(ZnTPPS)、電子伝達体としてメチルビオローゲン (MV²⁺)、電子供与体としてトリエタノールアミン(TEOA)、及び3種類の脱水素酵素を利用することによって、光照射により炭酸水素イオンからメタノールの合成に成功している(文献番号40・41)。また、3種類の脱水素酵素の代わりに白金微粒子を添加することで光エネルギーによる水素製造反応にも成功している(文献番号24-26)。

以上のような背景のもと、本提案では、図2及び3に示す反応系を連動させ、木材廃棄物に含まれるセルロースを中心としたバイオマスと二酸化炭素とを光エネルギーを駆動力として多角的にエネルギー・物質変換可能なシステムを構築する。具体的には、図4に示すようなバイオマスと二酸化炭素からエネルギー（水素）源、燃料（メタノール）及び医薬品等に利用できる化成品（グルコン酸）を同時に獲得可能な系を構築し、二酸化炭素削減を視野に入れた有効利用と廃棄物処理を併せ持つ多機能システムへ展開する。本提案は重点テーマ「草木質系バイオマスエネルギー利用技術」へ大きく貢献できる。

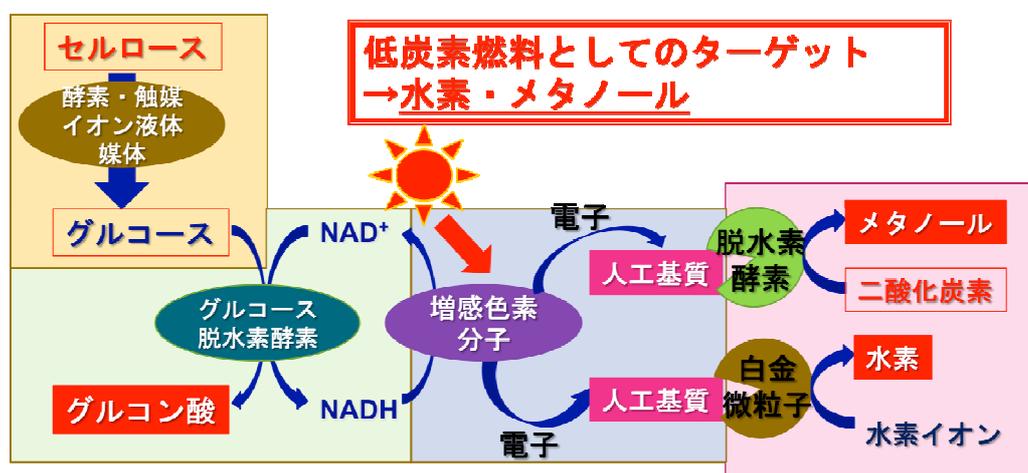


図4 バイオマス・二酸化炭素を原料としたソーラー燃料・化成品変換システムの概要

1.2 研究目的

上述のような研究背景のもと、木材廃棄物に含まれるセルロースを中心としたバイオマスと二酸化炭素とを光エネルギーを駆動力として多角的にエネルギー、物質変換可能なシステムを構築することは太陽光エネルギーを利用したエネルギー生産のみならずバイオマスや

二酸化炭素から有用物質生産・エネルギー貯蔵分子等が生産でき、未来型エネルギー創製システムにつながると期待できる。

本研究では、未来型エネルギー創製システムの基盤となる木材廃棄物に含まれるセルロースを中心としたバイオマスと二酸化炭素とを太陽光エネルギーを駆動力として用い、多角的なエネルギー・物質変換可能なシステムを構築することを目的とする。

2. 研究方法

本提案「バイオマス・二酸化炭素を原料としたソーラー燃料・化成品変換システム」を構築するために以下の四項目の研究を推進した。

- ① 酵素・触媒によるセルロースの糖化、グルコース脱水素酵素による電子供与分子及びグルコン酸生成プロセス
- ② 光合成色素分子と電子伝達分子で構成される光レドックス反応プロセス
- ③ 白金微粒子による水素生産反応プロセス
- ④ ギ酸・アルデヒド・アルコール脱水素酵素系による二酸化炭素のメタノールへの変換プロセス

これらを連動させることによってセルロースと二酸化炭素から光エネルギーを駆動力として水素・メタノール・グルコン酸が同時に生産可能となる。

研究期間内での各項目の詳細な研究方法を以下に示す。

2.1 イオン液体を反応媒体としたセルラーゼによるセルロースの糖化反応

本項目では、主に固体酸触媒とイオン液体によるセルロースの糖化反応について検討した。

反応経路は図 5 に示すとおりである。

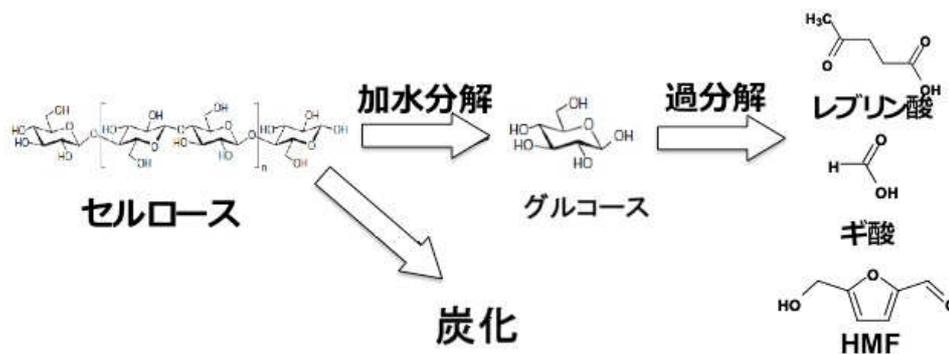


図 5 セルロースの分解反応スキーム

実験方法を以下に示す。具体的には図 6 に示すイオン液体 1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムクロリド (BminCl) 2.0g とセルロース 0.16g を反応容器に入れ、100°C で 30 分撹拌した。その後触媒 Amberlyst-15 (図 7) 0.112g 及び加水分解のための純水 0.107ml を加え、100°C で 60 分撹拌し、加水分解した。反応後、反応溶液を精製水で 100 ml に希釈した後、遠心分離し高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いて上澄み液を分析した。セルロース転化率は HPLC を用いて定量した生成物(グルコース、レブリン酸、ギ酸)収率の総和により算出した。また $ZrOSO_4$ を対照触媒として用いた。

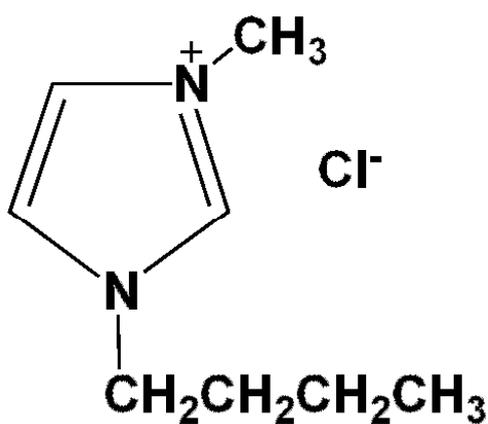


図 6 イオン液体 1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムクロリド (BminCl) の化学構造

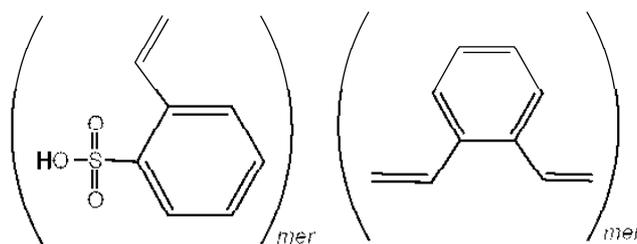


図 7 セルロース糖化触媒 Amberlyst-15 の化学構造

2.2 古紙由来セルロースの糖化反応

古紙由来のセルロース糖化反応については酵素セルラーゼ及び Amberlyst-15 を触媒として用いた 2 種類の反応系を検討した。

新聞紙由来のセルロース 5.0 g とセルラーゼ(1110 units)をリン酸塩緩衝液 (pH 7) に加え、室温で攪拌してセルロースを糖化处理した。さらに糖化液 30ml を採取し NAD⁺ と GDH を加え NADH 生成反応によりセルロースの糖化反応を追跡した。NADH 生成濃度は紫外可視吸収スペクトルを用い、340nm の吸光度変化とモル吸光係数を用いて算出した。反応スキームは図 8 に示すとおりである。

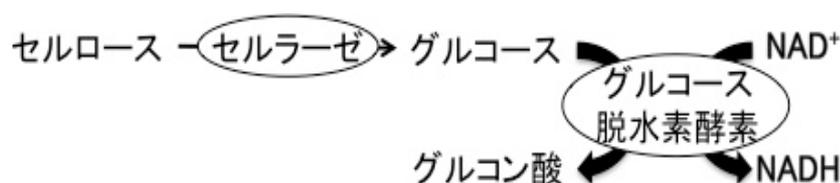


図 8 酵素反応を用いたセルロースの糖化反応と NADH 生成反応

上述 2.1 と同様に古紙由来のセルロースの糖化反応について、イオン液体を媒体とした反応系を試みた。イオン液体 BminCl 2.0g と不溶性セルロース（古紙）0.16g を反応容器に入れ、100℃で 30 分攪拌した。その後触媒 Amberlyst-15 0.112g 及び加水分解のための純水 0.107ml を加え、100℃で 60 分攪拌し、加水分解した。反応後の分析方法は上述の 2.1 と同様である。

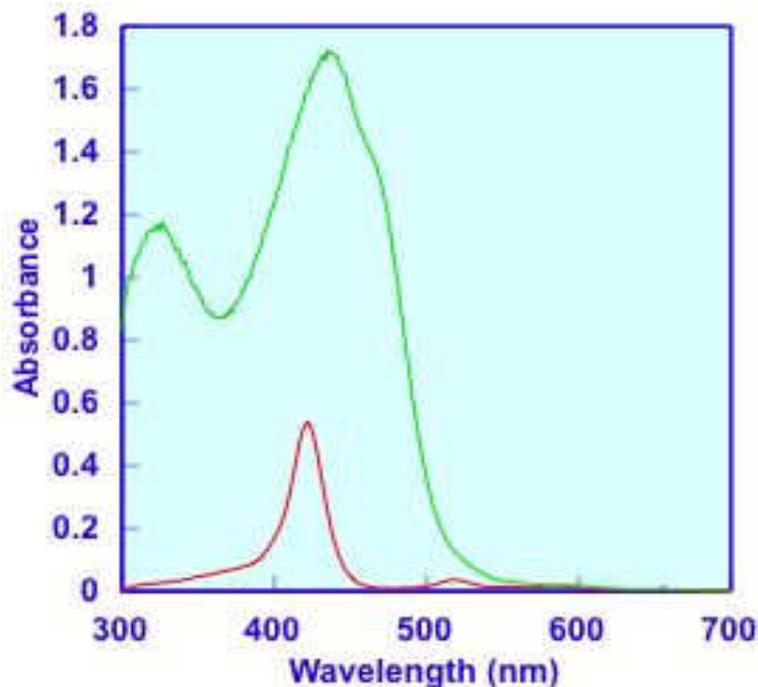


図 10 Cro/ZnTMPyP (緑) と ZnTMPyP (赤) の紫外可視吸収スペクトル

量の酢酸亜鉛を加え 60°C加熱攪拌した。反応溶液の吸収スペクトルを測定し、423 nm にある TMPyP の吸収極大が 452 nm にシフトするまで加熱攪拌した。その後、メタノールを蒸発させ、精製した ZnTMPyP を少量の水で溶解した。対イオンを p-トルエンスルホン酸から PF₆⁻にするために反応溶液にアンモニウムヘキサフルオロホスファートの水溶液を滴下した。吸引濾過によって沈殿物を回収した後、減圧デシケーターにて乾燥した。同モル等量のクロセチンと ZnTMPyP とをピロリン酸緩衝液中で混合することによってイオン結合により複合化した。以後複合化した材料を Cro/ZnTMPyP と略記する。

Cro/ZnTMPyP の光安定性に関する実験は以下の方法で行った。Cro/ZnTMPyP 4.0 μM をガラスセルと試験管が連結した反応管(体積約 15 ml)に入れ、全体積が 3ml になるようにピロリン酸ナトリウム緩衝液を加え、6 回凍結脱気した。反応条件 30°Cのもと 200 W ハロゲン

2.5 化学光量計を用いた量子収率計算法

量子収率決定のための化学光量計として鉄(III)のシュウ酸錯塩 トリオキサレート鉄(III)酸



カリウム $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{C}_2\text{O}_4)_3]$ を用いた。具体的な反応は以下のとおりである。

生成する Fe^{2+} を 2,2'-ビピリジンで赤色に呈色させ比色定量した。各波長における Fe^{2+} の量子収率を表 1 に示す。

表 1. トリオキサレート鉄(III)酸カリウム光量計の Fe^{2+} の量子収率($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{C}_2\text{O}_4)_3]=6\text{mM}$)

照射光波長 (nm)	Fe^{2+} の量子収率
254	1.23
297/302	1.24
313	1.24
365/366	1.21
404	1.14
436	1.11

量子収率の計算法は以下の式を用いた。

$$\text{量子収率} = \frac{\text{ある波長での光反応生成物の物質量}}{\text{ある波長での化学光量計からの光反応生成物の物質量}} \times \frac{1}{\text{その波長での化学光量計からの光反応の量子収率}} \times \frac{\text{その波長の光が試料物質によって吸収される割合}}{\text{その波長の光が化学光量計によって吸収される割合}}$$

具体的な反応方法を以下に示す。鉄(III)オキサラト化学光量計溶液に使用するトリス(オキサラト)鉄(III)酸カリウム3水和物($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{C}_2\text{O}_4)_3] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)は、硫酸アンモニウム鉄(III)12水和物を出発物質として合成した。 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{C}_2\text{O}_4)_3] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ を一定量正確に秤量し、0.1Nの硫酸で希釈して6.0mM溶液に調製し、これを標準の光量計溶液として使用した。化学光量計溶液をガラスセルと試験管が連結した反応管(体積約15 ml)に入れ、溶液の体積が3mlになるようにした。反応条件30°Cのもと200 Wハロゲンランプを用い、3 cmの距離から光を照射した。反応後2,2'-ビピリジンで赤色に呈色させ比色定量し、光量を算出した。

2.6 白金微粒子の調製法

白金微粒子を以下の方法で調製した。白金コロイドはヘキサクロロ白金(IV)酸六水和物をクエン酸三ナトリウム二水和物によって還元することで調製した。調製方法を以下に示す。丸底三口フラスコ内に480mlの蒸留水を加え、マントルヒーターを用いて1時間沸騰させた。ヘキサクロロ白金(IV)酸六水和物0.030g($M_w=517.90$ 、0.058mmol)を蒸留水に溶解し、30mlの塩化白金酸水溶液(0.38g-Pt/L)を調製し、フラスコ内に加え再び30分間沸騰させた。クエン酸三ナトリウム二水和物0.60g($M_w=294.10$ 、2.0mmol)を蒸留水に溶解し、60mlのクエン酸ナトリウム水溶液(1wt%)を調製し、フラスコ内に添加し、4時間還流した。使用した全て

の器具は、使用する前に硝酸を用いて洗浄した。調製した白金微粒子の濃度は分光光度計を用い、400nm における吸光度とモル吸光係数($\epsilon=2.3\times 10^3\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)から求めた。調製した白金微粒子分散液にポリビニルアルコールを基盤とした水溶性高分子を加え、白金微粒子を高分子鎖に担持した。白金微粒子修飾分子の化学構造を図 12 に示す。

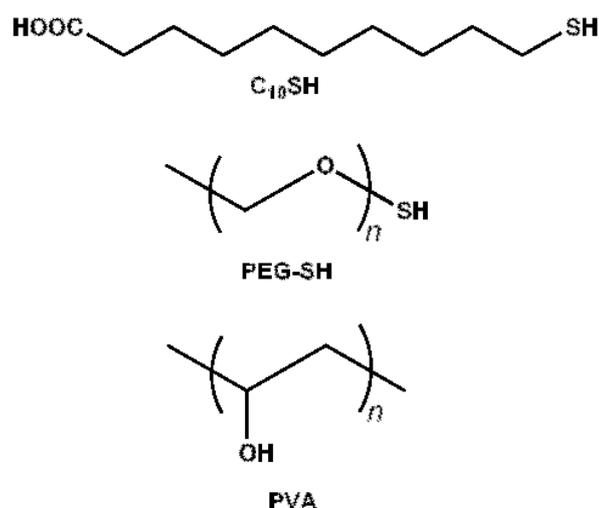


図 12 白金微粒子化学修飾用試薬

調製した白金微粒子分散液にポリビニルアルコールを基盤とした水溶性高分子を加え、白金微粒子を高分子鎖に担持した。さらにチオール基を有する界面活性剤（1-カルボキシドデカンチオール）あるいはポリエチレングリコール（PEG-SH）を用い、チオール基と白金微粒子との相互作用を利用した分散システムも検討した。以後白金微粒子をポリビニルアルコール（PVA）で分散したものを Pt-PVA、10-カルボキシ-1-ドデカンチオールで分散したものを Pt-C₁₀SH、ポリエチレングリコールチオールで分散したものを Pt-PEG-SH と定義する。

2.7 白金微粒子の水素発生活性測定法

次に調製した白金微粒子の水素生産活性を調査した。反応経路を図 13 に示す。具体的な



図 13 白金微粒子を用いた水素生産
反応経路

実験方法は以下の通りである。10mM のメチルビオローゲン 0.7ml とピロリン酸ナトリウムバッファー2.8ml を反応管に入れ、凍結脱気して、気相を窒素置換した。石英セルにヒドロサルファイトナトリウムを入れ、15 分間窒素ガスを流した。15 分後窒素ガスを流しながら、脱気したメチルビオローゲン溶液 2.4~2.6ml をシリンジで石英セルに加えた。最後に上記の方法で調製した白金微粒子をシリンジで 20 μ l 加え、恒温水槽内 30 $^{\circ}$ C で 10 分間反応させた。10 分後気相 0.1ml をガスタイトシリンジで採取しガスクロマトグラフ（島津製作所、GP-14 充填剤：活性炭、カラム：ステンレスカラム、検出器：熱伝対検出器 TCD、キャリアーガス：窒素、キャリアーガスの流量：24ml/min、カラム温度：80 $^{\circ}$ C、検出器温度：80 $^{\circ}$ C）で分析した。また、有用な水素生産用触媒である酵素ヒドロゲナーゼ等の基質となる NADH の利用の可能性についても検討した。反応条件は 10mM の NADH 0.7ml とリン酸塩バッファー2.8ml を反応管に入れ、凍結脱気して、気相を窒素置換した。石英セルに 15 分後窒素ガスを流しながら、脱気した NADH 溶液 2.4ml をシリンジで石英セルに加えた。最後に上記の方法で調製した白金微粒子をシリンジで 20 μ l 加え、恒温水槽内 30 $^{\circ}$ C で 10 分間反応させた。発生した水素の定量は前述の通りである。

2.8 ギ酸脱水素酵素を用いた二酸化炭素-ギ酸変換反応に有用な人工補酵素の開発

本項目では二酸化炭素の還元や化合物への取り込み能力を有する二酸化炭素固定化酵素を探索し機能を調べた。具体的には二酸化炭素を還元してギ酸を生成するギ酸脱水素酵素に対して効率的に作用する人工補酵素をビオローゲン骨格を基盤として合成し、二酸化炭素-ギ酸変換反応について調べた。合成した 4,4'-ビピリジン を基本骨格とした人工補酵素の化学構造を図 14 に示す。以後メチルビオローゲンを MV^{2+} 、1-メチル-1'-カルボキシメチル

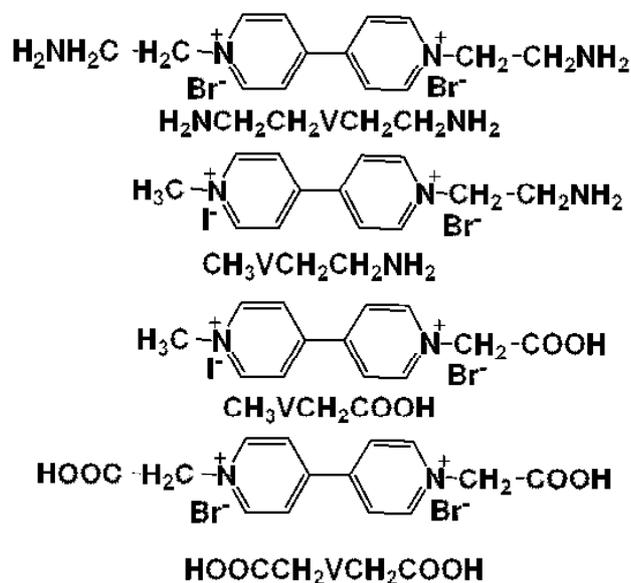


図 14 ビオローゲンを基本骨格とした人工補酵素分子の化学構造

-4,4'-ビピリジンを $HOOCCH_2-V-CH_3$ 、1,1'-ジカルボキシメチル-4,4'-ビピリジンを $HOOCCH_2-V-CH_2COOH$ 、1-メチル-1'-アミノエチル-4,4'-ビピリジンを $H_2NCH_2CH_2VCH_3$ 及び 1,1'-ジアミノエチル-4,4'-ビピリジンを $H_2NCH_2CH_2VCH_2CH_2NH_2$ とそれぞれ定義する。これら分子は以下の方法で合成した (図 15)。

最初に 4,4'-ビピリジンの 4 位の窒素をメチル化したヨウ化 1-メチル-4,4'-ビピリジニウム (VCH_3) を合成した。具体的には、4,4'-ビピリジン(0.16 mol)とヨウ化メチル(0.18 mol)

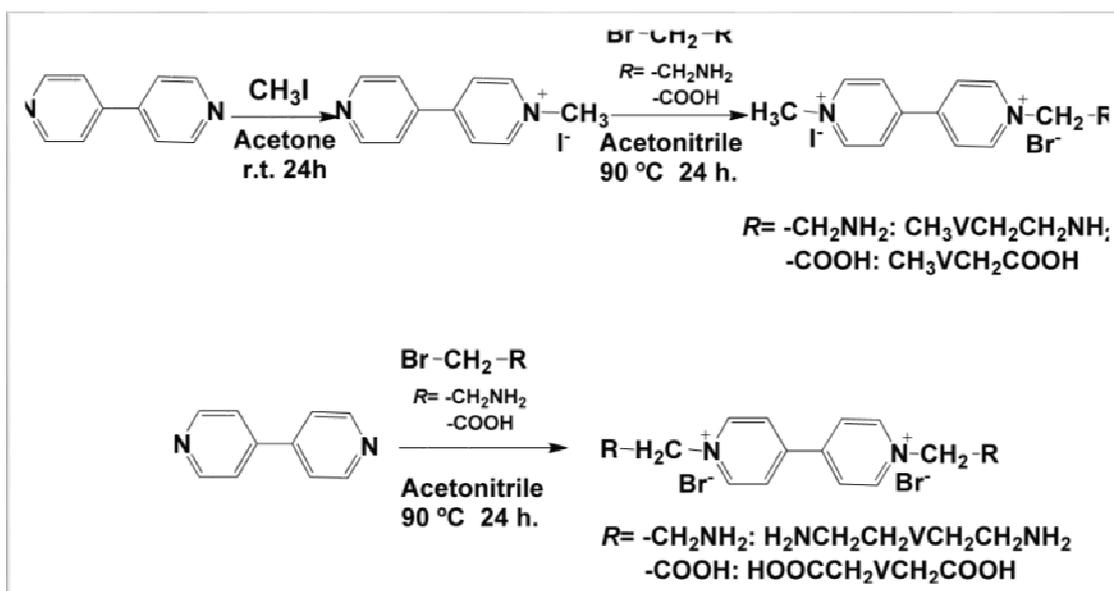


図 15 ビオローゲンを基本骨格とした人工補酵素分子の合成方法

とを 400ml のアセトンに溶解し、1 L のナス型フラスコ中、室温で攪拌しながら 24 時間反応させた。生成物 VCH₃ は黄色沈殿として得られた。吸引ろ過後、アセトンで洗浄し、エタノール - 水混合溶媒から再結晶した。

次に、HOOC-V-CH₃VCH₃ 及び H₂NCH₂CH₂VCH₃ の合成方法を示す。VCH₃ の 4' 位の窒素をそれぞれに対応するブロモアルカンを用いて四級化し、合成した。VCH₃(0.34 mmol) を 150 ml のアセトニトリルに溶解し、10 倍等量のブロモアルカンを加え、24 時間加熱還流した。生成物は黄色沈殿として得られた。吸引ろ過後、アセトニトリルで洗浄し、エタノールから再結晶した。

HOOCCH₂-V-CH₂COOH 及び H₂NCH₂CH₂VCH₂CH₂NH₂ は 4,4'-ビピリジン(0.34 mol) とそれぞれに対応するブロモアルカン(0.70 mol) とを 150 ml のアセトニトリルに溶解し、300 ml のナス型フラスコ中、室温で攪拌しながら 24 時間反応させた。生成物は黄色沈殿として得られた。吸引ろ過後、エタノール - 水混合溶媒から再結晶した。

さらに高機能な人工補酵素と期待される 2,2'-ビピリジン骨格を持つ人工補酵素を開発し、二酸化炭素からギ酸への変換反応系との関係について調べた。具体的な構造を図 16 に示す。

2,2'-ビピリジン骨格を持つ人工補酵素の合成方法を図 17 に示す。2,2'-ビピリジン(0.34 mol)とそれぞれに対応するジブromoアルカン(0.70 mol)とを 150 ml のアセトニトリルに溶解し、300 ml のナス型フラスコ中、100 °C で攪拌しながら 72 時間反応させた。生成物は黄色沈殿として得られた。吸引ろ過後、エタノール - 水混合溶媒から再結晶した。

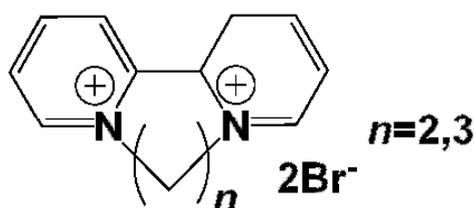


図 16 2,2'-ビピリジン骨格を持つ人工補酵素の構造

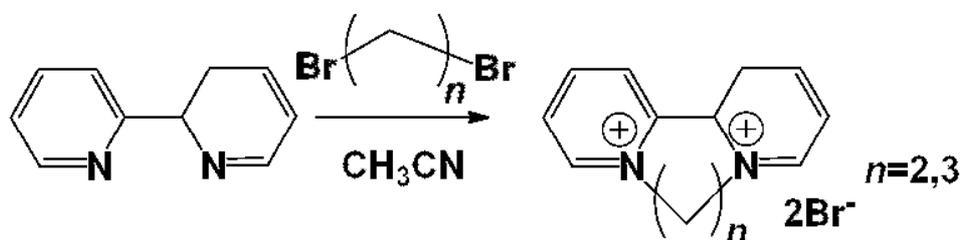


図 17 2,2'-ビピリジン骨格を持つ人工補酵素の合成スキーム

合成した人工補酵素分子の還元電位はサイクリックボルタモグラム（作用極：グラッシェーカーボン電極、対極：白金電極、参照極：銀塩化銀電極）を用いて測定した。

人工補酵素分子とギ酸脱水素酵素を用いた二酸化炭素-ギ酸の変換反応の条件は以下の通りである。十分に真空脱気し、気相を窒素置換した人工補酵素(2 mM)1.5 ml、FDH(10 units/ml)0.1ml を含む pH7.4 ピロリン酸ナトリウム緩衝液(50mM)2.0ml を二酸化炭素ガスを導

入しながら石英セル内でジチオン酸ナトリウム 100mg(5.7mmol)と混合し反応温度 30.5°C でインキュベーションした。反応開始から 1 分後のギ酸生成濃度をイオンクロマトグラフにより定量した。

2.9 ギ酸脱水素酵素を用いた二酸化炭素-ギ酸変換反応の酵素反応速度論的解析

上述 2.8 で合成した人工補酵素とギ酸脱水素酵素とを用いた二酸化炭素-ギ酸変換反応の酵素反応速度論的に解析した。具体的な実験方法を以下に示す。十分に真空脱気し、気相を窒素置換した人工補酵素 1.5 ml、FDH(10 units/ml)0.1ml を含む pH7.4 ピロリン酸ナトリウム緩衝液(50mM)2.0ml を二酸化炭素ガスを導入しながら石英セル内でジチオン酸ナトリウム 100mg(5.7mmol)と混合し反応温度 30.5°C でインキュベーションした。反応開始から 1 分後のギ酸生成濃度をイオンクロマトグラフにより定量し、反応初速度を見積もった。人工補酵素濃度に対して反応速度をプロットし、ミカエリス-メンテン型の酵素反応速度論を用い解析し、ギ酸脱水素酵素と人工補酵素との親和性に関して検討した。

2.10 グルコース—グルコン酸変換と可視光駆動型水素生産・二酸化炭素還元系とを連結した反応システムの構築

最初にグルコース—グルコン酸変換と可視光駆動型水素生産・二酸化炭素還元系とを連結した反応システムの構築を目指し、図 18 に示す反応について検討した。

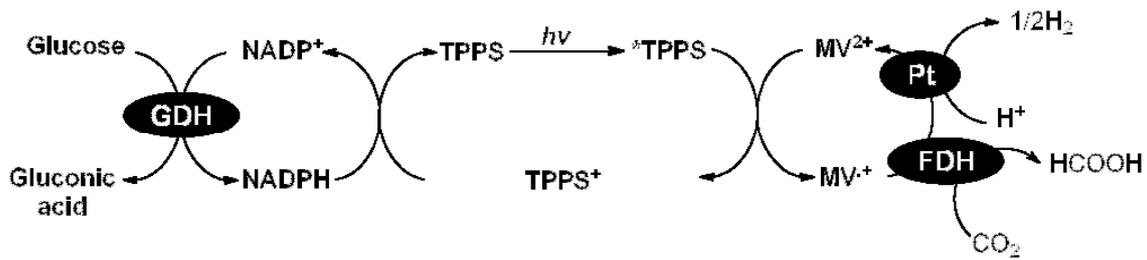


図 18 グルコース-グルコン酸変換と可視光駆動型水素生産・二酸化炭素還元系とを連結した反応システム

具体的には、グルコース脱水素酵素（GDH）によるグルコースのグルコン酸への変換反応とそれに伴う NADPH 再生系と光増感剤として水溶性ポルフィリン テトラフェニルポルフィリンテトラスルフォネート(TPPS)、電子伝達体としてメチルビオローゲン及び2種類の触媒・酵素、白金微粒子及びギ酸脱水素酵素（FDH）からなる系である。

実験条件は以下の通りである。グルコース（10 mM）、GDH（50 units）、NADP⁺（3.0 mM）、TPPS(300 μM)、メチルビオローゲン（0.4 mM）、ギ酸脱水素酵素（0.67unit）及び白金微粒子（5.0units）を含む 50mM 緩衝液（全体積 3mL）を凍結脱気し、気相に二酸化炭素ガスを導入した。30℃の恒温槽内でハロゲンランプ(200W)を光源として光照射し、一定時間ごとに反応溶液を採取し、ガスクロマトグラフ(島津製作所、GP-14 充填剤：活性炭、カラム：ステンレスカラム、検出器：熱伝対検出器 TCD、キャリアーガス：窒素、キャリアーガスの流量：24ml/min、カラム温度：80℃、検出器温度：80℃)により水素を、イオンクロマトグラフィーによりギ酸及びグルコン酸をそれぞれ定量した。なお緩衝液についてはピロリン酸ナトリウム緩衝液を用いた。

2.11 セルロース糖化系と可視光駆動型水素生産・二酸化炭素還元系とを連結した反応システムの構築

セルロース糖化系と可視光駆動型水素生産系とを連結した反応システムをより実用化するために図 19 に示すような反応装置を考案した。具体的にはセルロース糖化系（反応系①）と可視光駆動型水素生産・二酸化炭素還元系（反応系②）とを送液ポンプで連結したもので

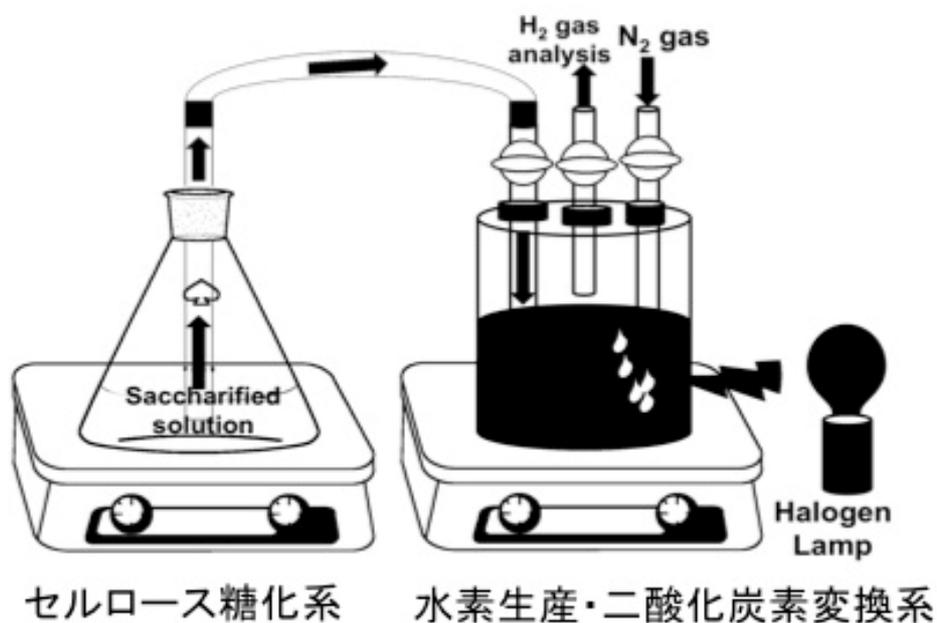


図 19 セルロース糖化系と可視光駆動型水素生産系とを連結した反応システム
ある。

反応系①でセルロースを酵素またはルイス酸触媒で糖化し、生成したグルコースを反応系②に送り込み、可視光照射によって水素及びギ酸を生産する仕組みである。

反応系①の条件は以下の通りである。新聞紙由来のセルロース 5.0 g とセルラーゼ(1110 units)をリン酸塩緩衝液 (pH 7) に加え、室温で攪拌してセルロースを糖化处理した。さらに糖化液 30ml を採取し NAD^+ と GDH を加え NADH 生成反応によりセルロースの糖化反応

を追跡した。NADH 生成濃度は紫外可視吸収スペクトルを用い、340nm の吸光度変化とモル吸光係数を用いて算出した（前述 2.2）。

セルロース糖化液 - GDH - NAD⁺ - MgChl-*a* - MV²⁺-白金微粒子・ギ酸脱水素酵素系での光水素・ギ酸生産反応（反応系①及び②連結系）の反応条件は以下の通りである。反応系①で生成したセルロース糖化液 10ml、GDH 5.0units、MgChl-*a* 11.2 μM、NAD⁺ 5.0mM、MV²⁺ 2.0mM、白金微粒子 5.0 units 及びギ酸脱水素酵素を水素・ギ酸製造装置に入れ、全体積が 270 ml になるように 50mM リン酸塩緩衝液(pH=7.0)を加え、10 分間窒素ガスで反応溶液をバブリングした。反応条件は 30°C である。光源には 250W ハロゲンランプを用いた。30 分毎に反応管内の気相 0.20ml をガスタイトシリンジにより採取し、ガスクロマトグラフィーに注入し 5 時間水素発生量を測定した。ガスクロマトグラフィー(島津製作所、GP-14 充填剤：活性炭、カラム：ステンレスカラム、検出器：熱伝対検出器 TCD、キャリアーガス：窒素、キャリアーガスの流量：24ml/min、カラム温度：80°C、検出器温度：80°C)に注入し 5 時間水素発生量を測定した。またイオンクロマトグラフィーによりギ酸及びグルコン酸を定量した。

3. 結果と考察

3.1 イオン液体を反応媒体としたセルラーゼによるセルロースの糖化反応

固体酸触媒とイオン液体によるセルロースの糖化反応について反応実験の結果を表 2 に示す。Amberlyst-15 を触媒に用いた場合、セルロース転化率 56%、グルコース収率 43% と高い活性を示したが、対照実験として ZrOSO₄ を触媒に用いた場合セルロースはほとんど転化されず Amberlyst-15 に比べ、活性は大幅に低下した。どちらの触媒も硫酸同様にスルホ基を有するが、スルホ基を有する構造が異なり、そのために活性に大きな差異が現れたと考えられる。

次に、BmimCl を加えずに、水溶媒で反応させたところ、Amberlyst-15、ZrOSO₄ ともに全くセルロースは転化されず、活性を示さなかった。Amberlyst-15 での BmimCl 有無での結果の比較により、セルロースが溶解し、触媒との接触効率が向上することが活性の発現に必須であることが分かった。

表 2. セルロースの加水分解反応によるセルロース転化率、グルコース生成収率

触媒	セルロース転化率 (%)	グルコース生成収率 (%)
Amberlyst-15	56	43
ZrOSO ₄	0.3	0.3

次にイオン液体を用いた糖化反応に関して触媒との接触効率向上について検討した。具体的には溶媒の検討、反応器の攪拌効率の改善を試みた。

BmimCl 以外のイオン液体の使用を試みようと、色々と既往の研究を調べたが、BmimCl 以外にセルロースを溶解可能な市販のイオン液体を見つけ出すことはできなかった。

金属製の攪拌器を用いていたが、金属が酸と反応し触媒に悪影響を及ぼすと考え、今年度より、特注のテフロン製の攪拌器を用いて実験を行ったが、金属製の攪拌器を用いた場合と活性は変わらなかった。

次に原料の混合比の最適化を検討した。イオン液体を用いた反応で高活性を示した Amberlyst-15 を触媒に用い、反応条件の最適化を検討した。

最初に水添加量、反応時間の影響について検討した。

Amberlyst-15 を用い、以下の条件で活性測定し、水添加量と反応時間が活性挙動に及ぼす影響を検討した。

実験条件は以下のとおりである。

- 触媒 : 0.112 g
- 水添加量 : 0~0.500ml
- セルロース : 0.16 g
- 反応温度 : 100 °C
- BmimCl : 2.0 g

水添加量が 0 ml(図 20)では反応時間 50 min でセルロース転化率 37%、グルコース収率 27% となり、ともに最大となった。60 min 以降は過分解が進行しグルコース収率が低下し始め、ヒドロキシメチルフルフラール (HMF) 収率が高くなった。この結果、水を加えなくても

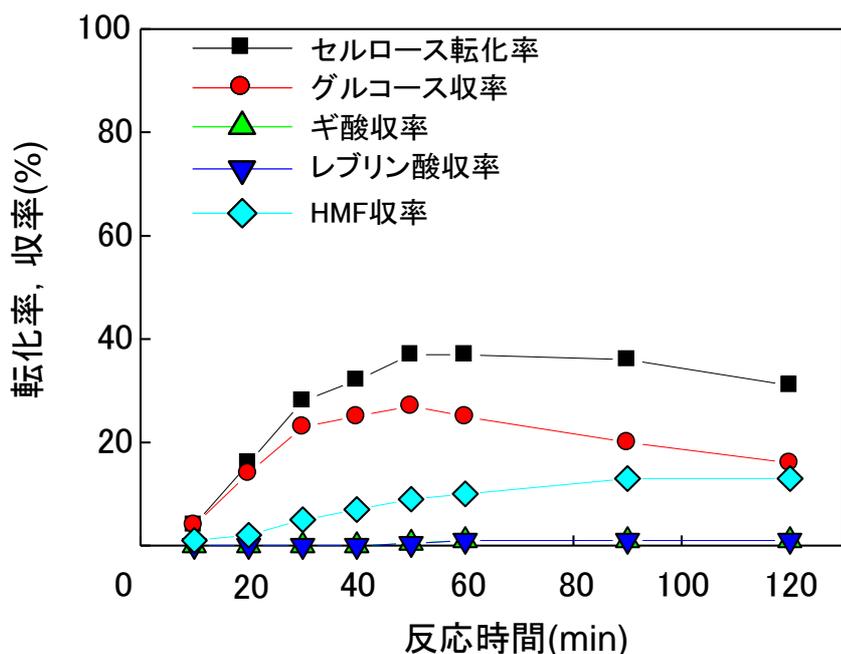


図 20 水無添加量条件下での反応生成物の経時変化

反応は進行することが分かった。これは、潮解性を持つ BmimCl が空気中の水分を取り込み加水分解されるためと考えられる。

水添加量が 0.107 ml(図 21)では、反応時間 60 min でセルロース転化率 56%、グルコース収率 43%となり、ともに最大となった。60 min 以降は過分解が進行しグルコース収率が低下し始め、HMF 収率が高くなった。この結果、水無添加条件(図 20 に比べ反応速度、活性ともに向上した。これは水を加えることにより、加水分解が進行しやすくなるためと考えられる。

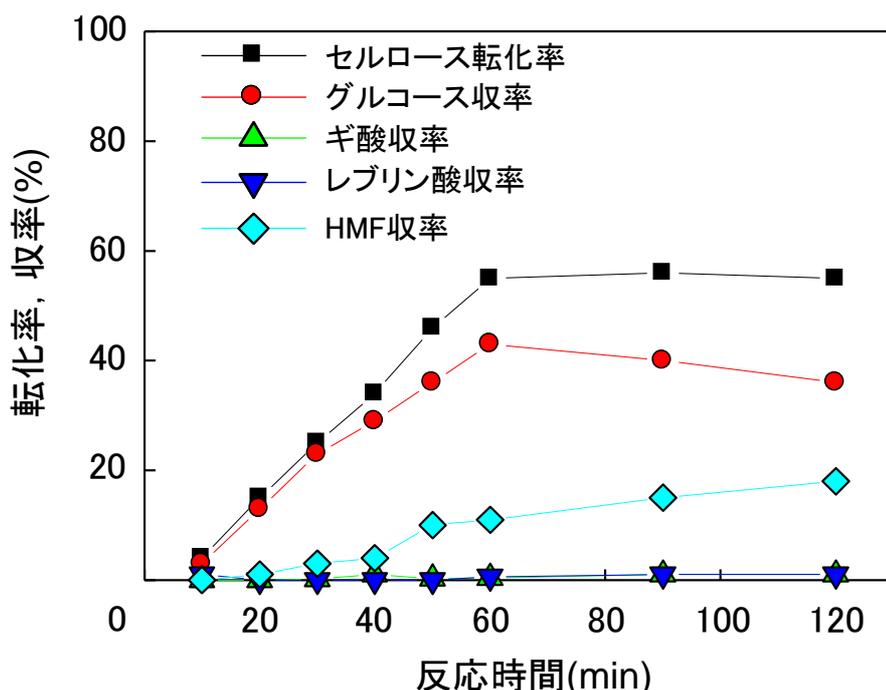


図 21 水添加量 0.107ml 条件下での反応生成物の経時変化

水添加量が 0.214 ml(図 22)では反応時間 90 min でセルロース転化率 53%、グルコース収率 43%となり、ともに最大となった。90 min 以降は過分解が進行しグルコース収率が低下し始め、HMF 収率が高くなった。この結果、水添加量 0.107 ml 時と同程度の活性を示したが反応速度は遅くなった。これは **BmimCl** 濃度の低下が原因であると考えられる。

水添加量が 0.500 ml(図 23)では反応時間 120 min でセルロース転化率 13%、グルコース収率 12%となり、ともに最大となった。この結果、水添加量 0.107 ml に比べ明らかに活性と反応速度が低下することが分かった。これは **BmimCl** の濃度の低下により、セルロースを溶解できず触媒との接触効率が低下したためであると考えられる。

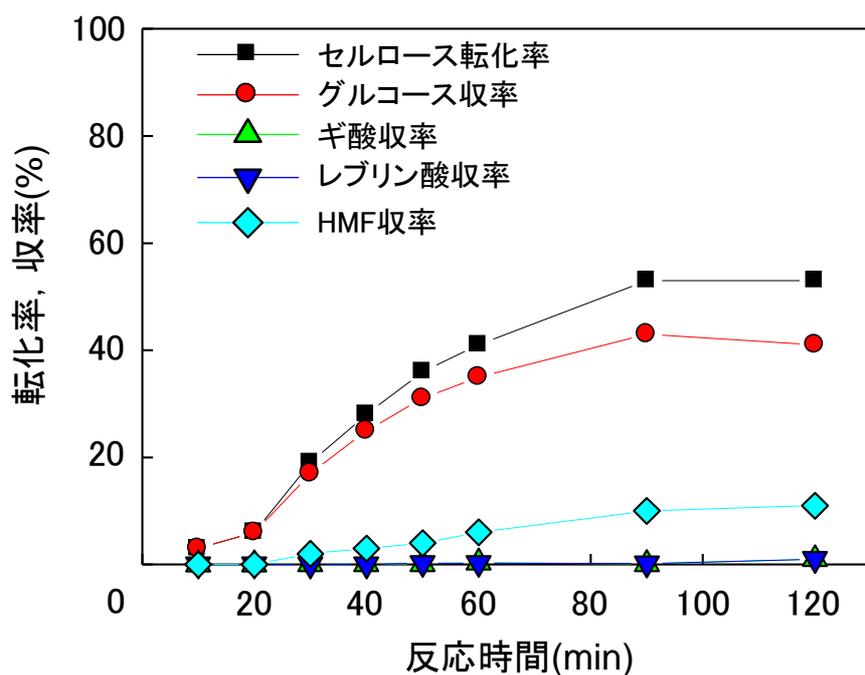


図 22 水添加量 0.214 ml 条件下での反応生成物の経時変化

以上よりセルロース転化率が 56% と最も高く、反応速度の速い水添加量 0.107 ml が水の最適添加量であると言える。

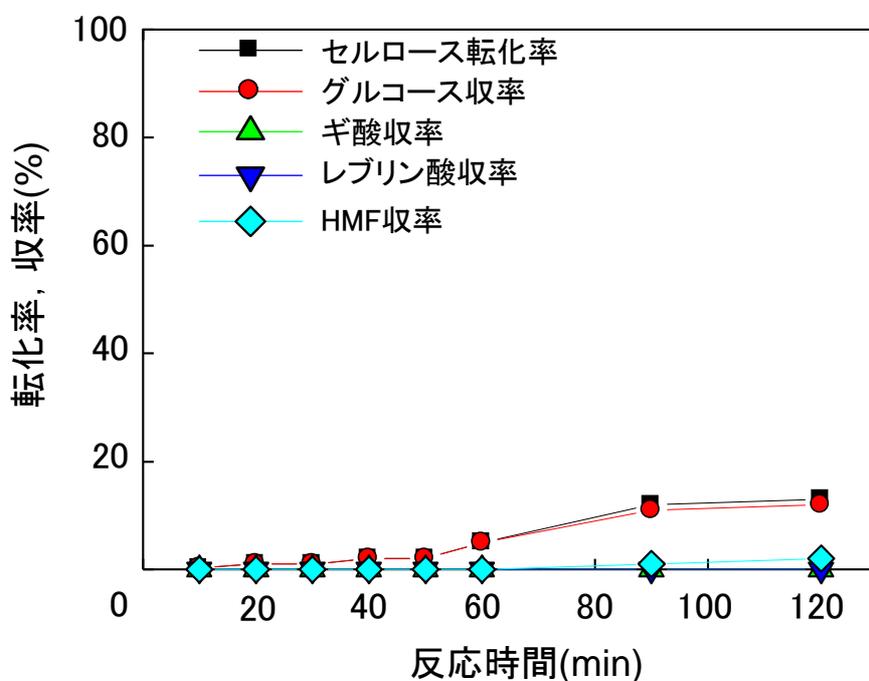


図 23 水添加量 0.500 ml 条件下での反応生成物の経時変化

水添加量が 0.107 ml 時にセルロース転化率が最大で 56%程度であった理由としては、HPLC でピークとしては現れるが多糖類であるため定量できないオリゴ糖の生成が考慮できていない、セルロースが分子内脱水により炭化し定量できていない、ギ酸・レブリン酸・HMF よりも更に反応が進行し分析できない過分解物を生成している、ことが考えられる。そこで、ピークとして現れているオリゴ糖の定量を試みることにした。

反応後、反応溶液を精製水で 100 ml に希釈し、遠心分離を行い上澄み液 4.85 ml と硫酸 0.15 ml を混合させ、100 °C で 180 min 希硫酸処理し、オリゴ糖をグルコースに分解しようと試みた。その結果、オリゴ糖は分解されたが、オリゴ糖だけでなく反応溶液中の未反応セルロースも希硫酸により分解されオリゴ糖のみを定量することができなかった。これは反応後溶液中に BmimCl に溶けたセルロースが存在しているためであり、BmimCl 存在時には別の定量方法を検討する必要がある。

Amberlyst-15 を用いた反応実験での反応温度の影響について検討以下の反応条件で検討した。

<実験条件>

- ・触媒 : 0.112 g
- ・水添加量 : 0.107ml
- ・セルロース : 0.16 g
- ・反応温度 : 120°C
- ・ BmimCl : 2.0 g

結果を図 24 に示す。反応時間 20 min でセルロース転化率 53%、グルコース収率 34%となり、ともに最大となった。反応温度 100 °C時と比べセルロース転化率の最大値は同程度の値を得ることができたが、グルコース収率の最大値は低くなり、HMF 収率が大幅に高くなった。

このことより反応温度を上げると、反応速度が速くなるが過分解まで同時に進行してしまうため、グルコースを選択的に得ることは適していないことが分かった。

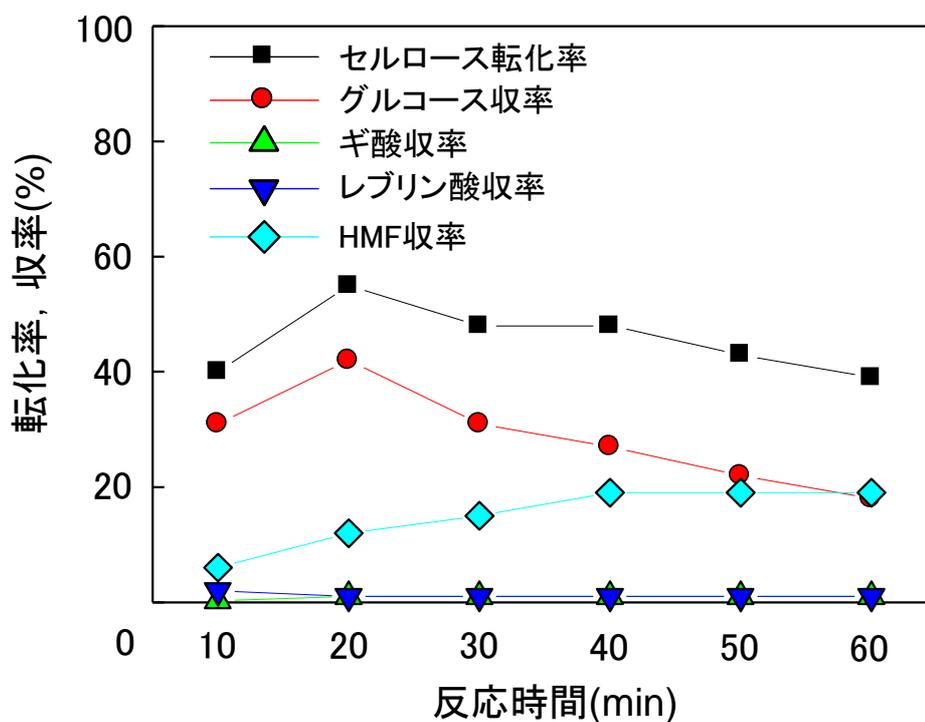


図 24 反応温度 120°Cでの反応生成物の経時変化

セルロースの加水分解は酸触媒でも進行するため、Amberlyst-15、以外にも表 3 に示すような種々の固体触媒でイオン液体を用いて反応実験を試みた。

<実験条件>

- ・触媒 : 0.112 g
- ・精製水 : 0.107 ml
- ・セルロース : 0.16 g
- ・反応時間 : 60 min
- ・反応温度 : 100 °C

結果を表 3 に示す。酸点を持つゼオライト、スピネル型酸化物、少量の金属担持でルイス酸性を発現する担持貴金属触媒を用いたが、全ての触媒がほとんど活性を示さなかった。したがって、Amberlyst-15 のみが高い活性を示す触媒であることが明らかとなった。そこで、最も高い活性を示した Amberlyst-15 の再利用実験について検討することにした。

表 3. 種々の固体触媒を用いたセルロース糖化反応の結果

触媒	セルロース 転化率 (%)	収率 (%)			
		グルコース	ギ酸	レブリン酸	HMF
Amberlyst-15	56	43	1	2	10
ZrOSO ₄	0.4	0.4	0	0	0
ZSM-5	0.7	0.7	0	0	0
Z-HB	0.7	0.7	0	0	0
SAPO	0.2	0.2	0	0	0
AlPO ₄	0	0	0	0	0
MgAl ₂ O ₄	0	0	0	0	0
NiAl ₂ O ₄	0	0	0	0	0
CoAl ₂ O ₄	0	0	0	0	0
CuAl ₂ O ₄	0	0	0	0	0
Rh/CeZrO ₂	0	0	0	0	0
Rh/TiO ₂	0	0	0	0	0
Rh/Al ₂ O ₃	0	0	0	0	0
Ru/CeO ₂	0	0	0	0	0

次にイオン性液体とセルロースを反応器にいれ 100°C で 30 min 攪拌を行い、その後触媒および加水分解用の水を加え 100°C で 60 min 加水分解反応を行った。反応後溶液を 100ml のメスフラスコで希釈し、遠心分離後の溶液の上澄み液を HPLC で分析した。反応後溶液中の触媒を精製水で洗浄しながら吸引ろ過し、70°C で一晩乾燥させて再度実験に使用した。

一回目の実験結果を図 25 に、再利用実験の結果を図 26 に示した。再利用実験は最も活性が高かった 60 min 反応後の触媒を再び用いて実験した。その結果、再利用実験ではセルロース転化率、グルコース収率ともに大幅に低下した。これは一回目の実験で Amberlyst-15 の構造が変化した、もしくは再利用方法に問題があったためと考えている。この点については今後の課題であると考ええる。

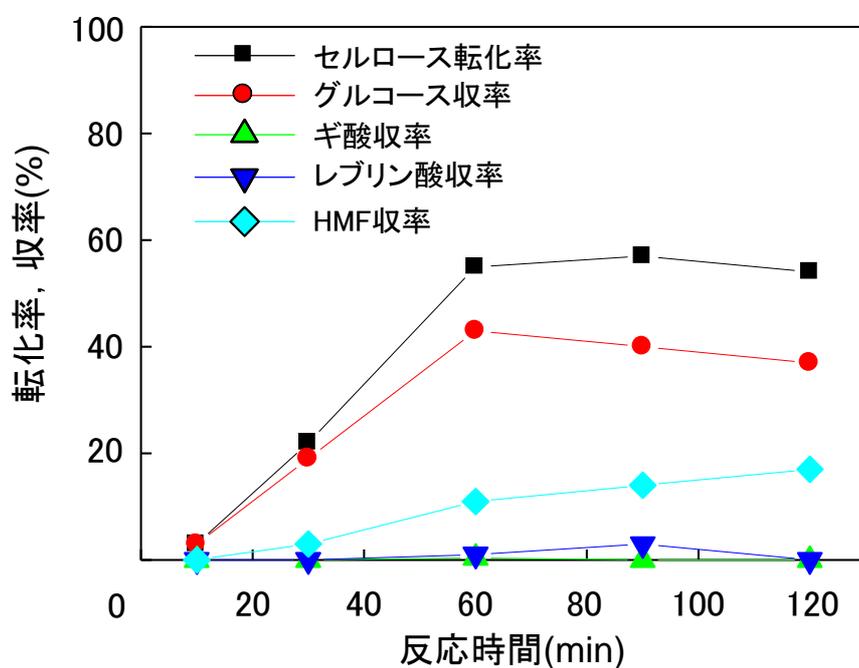


図 25 触媒再利用実験（1回目）の反応生成物の経時変化

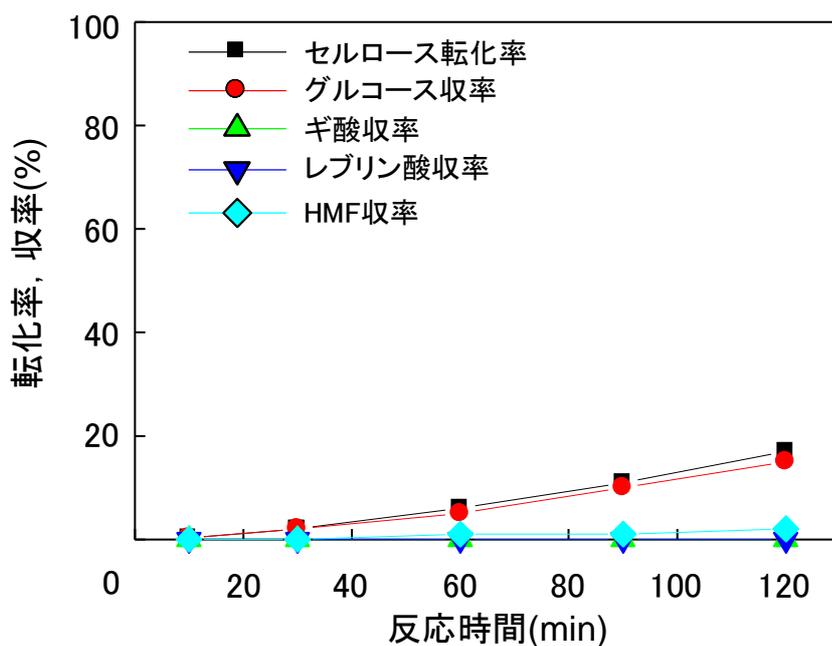


図 26 触媒再利用実験（2回目）の反応生成物の経時変化

以上の結果をまとめると、

(1) H_2SO_4 と同様の酸性質を固体表面で発揮するスルホ基を有する Amberlyst-15、 ZrOSO_4 を用いて実験を行ったところ、Amberlyst-15 のみがセルローズ転化率 56%と H_2SO_4 に匹敵する高い活性を示した。そのため、同じスルホ基であっても、構造の違いにより活性が全く異なることが示唆された。

(2) 触媒との接触効率を高めるためにいくつかの検討を行った。まず、溶媒については、BmimCl 以外に市販のイオン性液体を見出せなかった。攪拌棒の材質を金属から薬品耐性に優れるテフロンに変更したが活性の向上にはいたらなかった。Amberlyst: 0.112g、BmimCl: 2g の下で、水の添加量、反応時間、反応温度の影響について調べたところ、水添加量 : 0.107ml、

反応時間: 60min、反応温度: 100 °Cでグルコース収率が 56%に到達することが明らかとなった。

(3)種々の固体酸触媒を用い活性の比較をしたところ、Amberlyst-15のみが高い活性を示すことが明らかとなった。

(4)これまでの検討で最も高い活性を示した Amberlyst-15 で再利用実験を行った結果、活性は大幅に減少した。再利用実験法の確立が今後の大きな課題であることが分かった。

3.2 古紙由来セルロースの糖化反応

最初に酵素セルラーゼを用いた古紙由来セルロースの糖化反応の実験結果について述べる。

新聞紙由来のセルロース 5.0 g とセルラーゼ(1110 units)をリン酸塩緩衝液 (pH 7) に加え、室温で攪拌してセルロースの糖化処理を行った結果、糖化処理後 300 分で、セルロースが分散した (図 27)。



図 27 古紙由来セルロースの糖化処理過程

さらに糖化液 30ml を採取し NAD^+ と GDH を加え NADH 生成反応によりセルロースの糖化反応を追跡した結果、反応時間とともに NADH が生成した (図 28)。5 時間のインキュベーションで 3.0mM の NADH が生成した。これは、セルロースが糖化処理によりグルコースへ加水分解され、 NAD^+ と GDH の反応により NADH が生成したことを意味している。これまで困難とされてきたセルロースの糖化を室温・常圧条件下で達成できた。

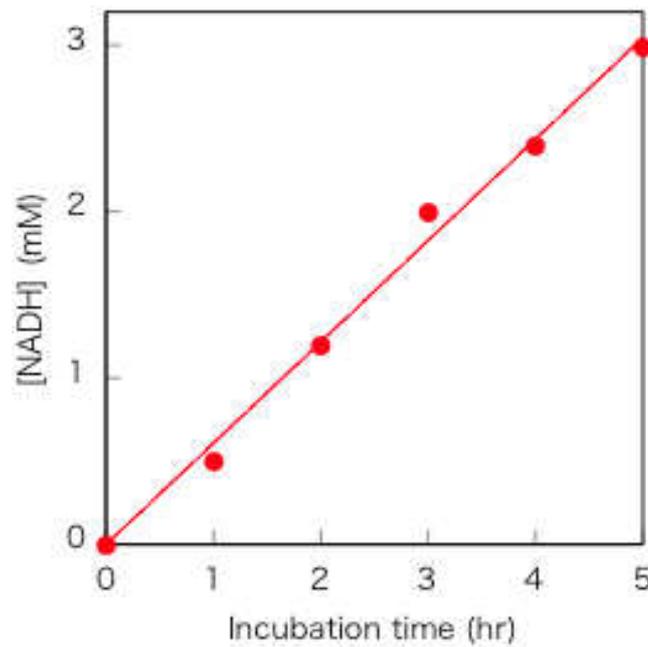


図 28 糖化液・NAD⁺及び GDH を用いた NADH 生成の経時変化

次に Amberlyst-15 とイオン液体による古紙由来のセルロースの糖化反応について検討した。その結果、セルロース転化率 50%、グルコース収率 40%と結晶性セルロースを用いたときと同様に高い活性を示したが、対照実験として ZrOSO₄ を触媒に用いた場合古紙由来のセルロースはほとんど転化されず Amberlyst-15 に比べ、活性は大幅に低下した。結晶性あるいは古紙由来のセルロースを用いた場合ではどちらの触媒も硫酸同様にスルホ基を有するが、スルホ基を有する構造が異なり、そのために活性に大きな差異が現れたと考えられる。

次に、BmimCl を加えずに、水溶媒で反応させたところ、Amberlyst-15、ZrOSO₄ とともに全く古紙由来のセルロースは転化されず、活性を示さなかった。結晶性セルロースを用いたときと同様に Amberlyst-15 での BmimCl 有無での結果の比較により、セルロースが溶解し、触媒との接触効率が向上することが活性の発現に必須であることが分かった。

3.3 光合成類似色素分子複合化による光安定化

最初に Cro/ZnTMPyP 中の ZnTMPyP の光安定性を調べるために、Cro/ZnTMPyP を含む溶液に可視光照射した。452 nm の吸収帯の減少は ZnTMPyP の分解を示しており、ZnTMPyP 単独では光照射時間とともに ZnTMPyP が分解されていることがわかった。光照射 90 分で約 60% の ZnTMPyP が分解していた。これに対して Cro/ZnTMPyP を含む溶液に可視光照射

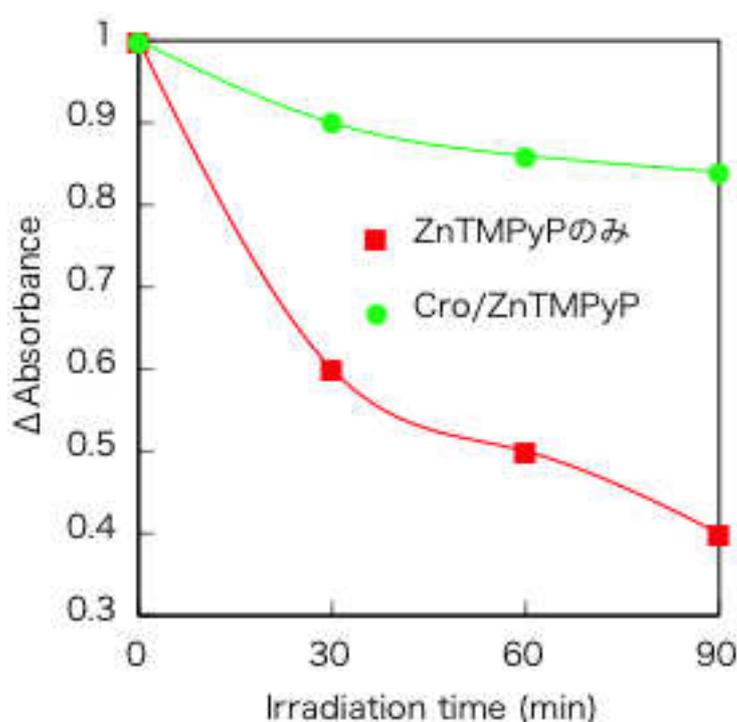


図 29 Cro/ZnTMPyP の光安定性評価

した場合には、約 16% の ZnTMPyP が分解された (図 29)。このことから Cro/ZnTMPyP では、ZnTMPyP の分解が飛躍的に抑制されることがわかった。これはクロセチン分子が ZnTMPyP の分解を進める短波長側の光を吸収し光学フィルターのよう役割を果たし ZnTMPyP の分解が飛躍的に抑制されているのではないかと考えられる。

次に Cro/ZnTMPyP を可視光増感材料として用いたメチルビオローゲンの光還元反応について検討した結果、Cro/ZnTMPyP を用いたときでは ZnTMPyP 単独で用いたときと比較して、メチルビオローゲンの光還元効率が飛躍的に向上することがわかった（図 30：光照射 90 分後で約 2 倍のビオローゲンを還元）。一方カロテノイド分子クロセチンを単独で用いた場合にはメチルビオローゲンは全く光還元されなかった。このことからクロセチンと ZnTMPyP とを静電的に複合化することで、光増感機能が向上することが明らかになった。最終的には化学光量計で計測した光量（90 分後 8.7 量 mol の光子数）を基にした光エネルギー変換効率は条件により 4.5% にまで向上した。

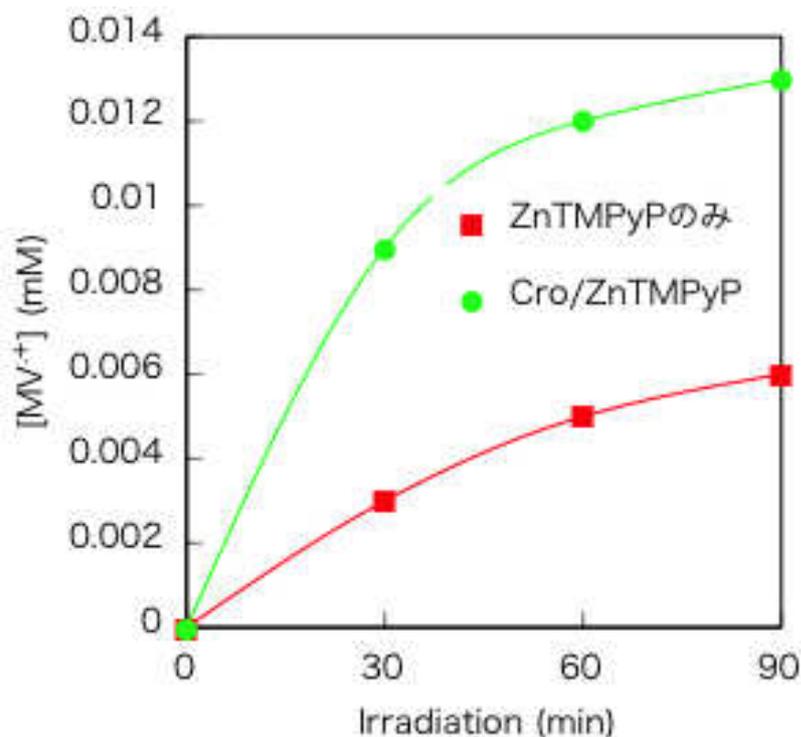


図 30 Cro/ZnTMPyP あるいは ZnTMPyP を用いたメチルビオローゲンの光還元反応の経時変化

3.4 白金微粒子の水素生産活性評価

クエン酸還元法で調製した白金微粒子の粒径を吸収スペクトルから見積もった結果、約 10 nm 程度であることがわかった (図 31)。白金微粒子は時間とともに凝集し水素発生触媒活性が低下することが知られている。そこで調製した白金微粒子分散液にポリビニルアルコールを基盤とした水溶性高分子を加え、白金微粒子を高分子鎖に担持した。その結果、高分子添加後も白金微粒子の粒径は変化せず、高分散状態を保っていることが明らかになった (図 32)。

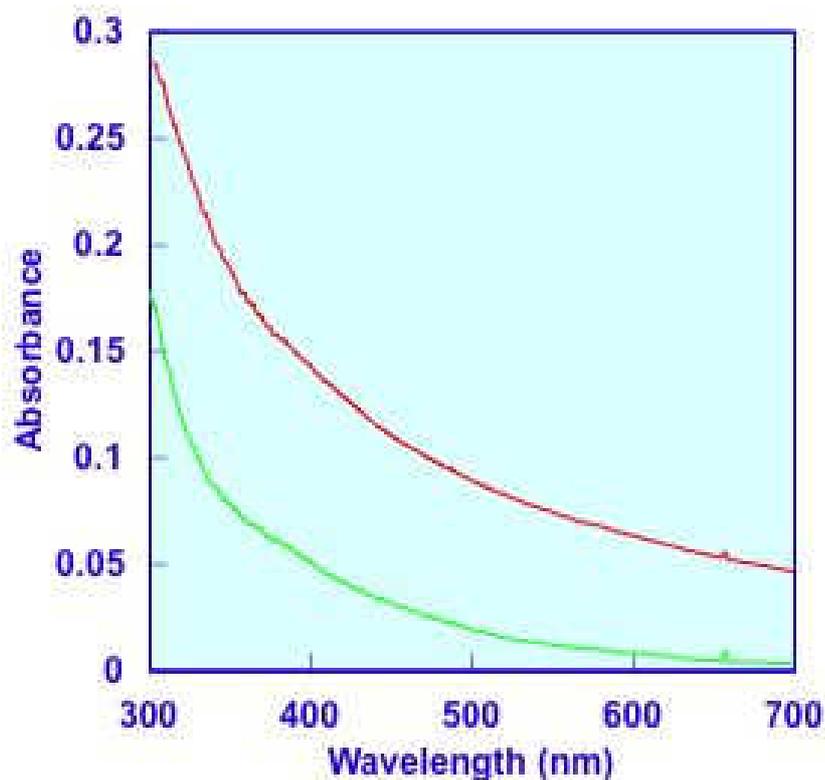


図 31 白金微粒子の紫外可視吸収スペクトル

赤：PVA 分散型白金微粒子、緑：クエン酸還元による未処理の白金微粒子

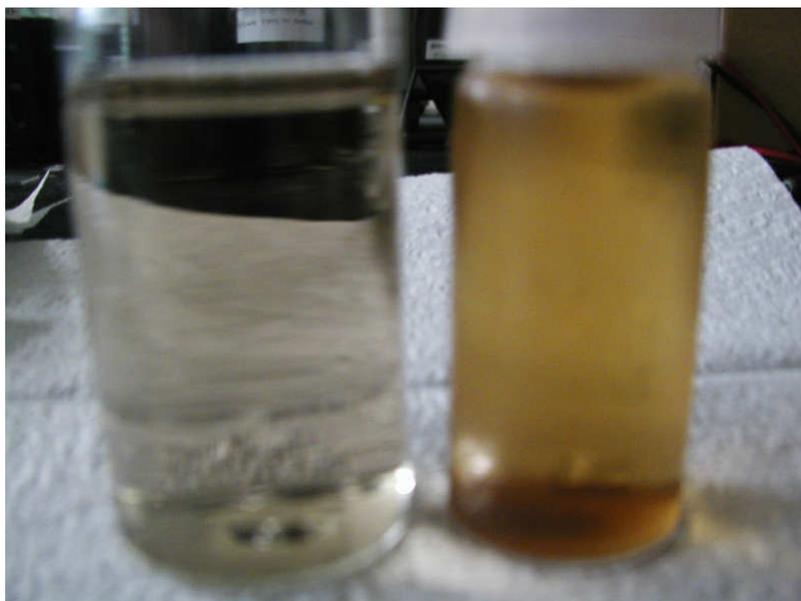


図 32 白金微粒子のイメージ画像

左：PVA 分散型白金微粒子、右：クエン酸還元による未処理の白金微粒子

次にそれぞれの白金微粒子の水素生産活性を調査した。石英セルにヒドロサルファイトナトリウムを入れ、窒素充填し、脱気したメチルビオローゲン溶液を加えると還元型メチルビオローゲン生成を示す青紫色になった。この溶液に上述のように調製した各種白金微粒子 20 μ l を加え、10 分間反応させた結果、Pt-PVA の場合 2.0×10^{-8} mol、Pt-C₁₀SH の場合 3.5×10^{-8} mol、Pt-PEG-SH の場合 1.8×10^{-8} mol の水素がそれぞれ発生した。

一方、基質として NADH を用いた場合では、Pt-PEG-SH の場合のみ水素が発生した。反応時間 10 分間での水素発生量は 9.7×10^{-9} mol であった。一方 Pt-PVA と Pt-C₁₀SH を用いた場合、水素は発生しなかった。

基質として還元型メチルビオローゲンを用いた場合では、Pt-C₁₀SH を用いたときが一番多くの水素が発生した。これは 10-カルボキシ-1-ドデカンチオールで白金微粒子を修飾することで、白金微粒子がより分散され水素発生活性が上昇し、水素発生につながったと考えら

れる。一方、基質として NADH を用いた場合には、Pt-PEG-SH を用いたときのみ水素が発生した。ポリエチレングリコールチオールで白金微粒子を修飾することで、白金微粒子の状態が変化して、従来使用することができなかった NADH が基質として使えるようになった。

以上の結果を表 4 にまとめた。

表 4. 各白金微粒子を用いた場合の水素発生活性の比較

白金微粒子	水素発生速度 ($10^{-8} \text{ mol min}^{-1}$)
Pt-PVA	0.20
Pt-C ₁₀ SH	0.35
Pt-PEG-SH	0.18

3.5 ギ酸脱水素酵素を用いた二酸化炭素-ギ酸変換反応に有用な人工補酵素の開発

合成した人工補酵素のサイクリックボルタモグラムから求めた還元電位を表 5 に示す。いずれの人工基質の場合でも還元電位は-0.60~-0.67V であり、従来人工補酵素として用いてきた MV²⁺とほぼ同じ値になった。このことから 4,4'-ビピリジンに置換基を導入しても酸化還元電位には大きな影響を与えないことが分かった。

次に人工補酵素とギ酸脱水素酵素を用いた二酸化炭素-ギ酸変換反応について反応開始 1 分後のギ酸生成濃度によって比較した結果を同じく表 5 に示す。MV²⁺を基準にして考えるとギ酸生成量は陽イオン性のアミノ基を付加した正電荷が多い H₂NCH₂CH₂VCH₃ 及び

$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{VCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ を用いたときに増加した。これに対して陰イオン性のカルボキシ基を付加した $\text{HOOCCH}_2\text{-V-CH}_3$ 、及び $\text{HOOCCH}_2\text{-V-CH}_2\text{COOH}$ を用いたときにはギ酸生成量は減少した。それぞれの人工補酵素の酸化還元電位に差がないことを考慮に入れると、本反応系でのギ酸生成量は人工補酵素の化学構造に依存しており、人工補酵素がより陽イオン性の化学構造を持つことによってギ酸脱水素酵素との相互作用が強くなり、二酸化炭素-ギ酸変換反応を加速させたと考えられる。

表 5. 人工補酵素分子の還元電位とこれを用いたギ酸生成量

人工補酵素	還元電位 (V)	ギ酸生成量 ($\mu\text{M min}^{-1}$)
$\text{HOOCCH}_2\text{-V-CH}_3$	-0.67	52.6
$\text{HOOCCH}_2\text{-V-CH}_2\text{COOH}$	-0.67	30.8
$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{VCH}_3$	-0.62	84.2
$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{VCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$	-0.60	102.8
MV^{2+}	-0.67	69.9

以上のように二酸化炭素を還元してギ酸を生成するギ酸脱水素酵素に対して効率的に作用する人工補酵素についてビオローゲン骨格にイオン性置換基を導入し、二酸化炭素-ギ酸変換反応について調べ、陽イオン性置換基の導入により酵素活性が向上することを見出した。

さらに高機能な人工補酵素と期待される 2,2'-ビピリジン骨格を持つ人工補酵素を開発し、二酸化炭素からギ酸への変換反応系との関係について調べた。

合成した人工補酵素のサイクリックボルタモグラムから求めた還元電位はいずれの人工補酵素の場合でも-0.65~-0.82V であり、従来人工補酵素として用いてきた MV²⁺とほぼ同じ値になった。

次に人工補酵素とギ酸脱水素酵素を用いた二酸化炭素-ギ酸変換反応について反応開始 1 分後のギ酸生成濃度によって比較した結果を表 6 に示す。化学的に人工補酵素を還元し、二酸化炭素存在下で FDH を用いたギ酸生成反応を調べた結果、いずれの人工補酵素を用いた場合でも、ギ酸が生成していることがわかった。結果を表 6 に示す。2,2'-ビピリジン骨格を持つ人工補酵素の方がメチルビオローゲンよりもギ酸生成量が増加することが分かった。さらにメチレン連鎖が 3 のものを用いるとギ酸生成量が最も多くなった。この値は陽イオン性置換基を導入したビオローゲン誘導体(H₂NCH₂CH₂VCH₂CH₂NH₂)よりも 2 倍高い値を示している。

表 6. 2,2'-ビピリジンを基盤とした人工補酵素分子の還元電位とこれを用いたギ酸生成量

人工補酵素	還元電位 (V)	ギ酸生成量 (μM min ⁻¹)
2,2'-ビピリジン (n=2)	-0.65	75.1
2,2'-ビピリジン (n=3)	-0.82	200.0
H ₂ NCH ₂ CH ₂ VCH ₂ CH ₂ NH ₂	-0.60	102.8
MV ²⁺	-0.67	69.9

以上のことからそれぞれの人工補酵素の酸化還元電位に差がないことを考慮に入れると、本反応系でのギ酸生成量は人工補酵素の化学構造に依存しており、2,2'-ビピリジン骨格を持つ人工補酵素はギ酸脱水素酵素との相互作用が強くなり、二酸化炭素-ギ酸変換反応を加速させたと考えられる。

3.6 ギ酸脱水素酵素を用いた二酸化炭素-ギ酸変換反応の酵素反応速度論的解析

合成した人工補酵素とギ酸脱水素酵素とを用いた二酸化炭素-ギ酸変換反応の酵素反応速度論的に解析した。最初に天然の補酵素である NADH を用いた場合の二酸化炭素-ギ酸変換



反応について調べた。ギ酸脱水素酵素は以下の反応の可逆的に触媒する酵素である。

本来ギ酸脱水素酵素はギ酸を二酸化炭素に変換する反応を触媒する酵素であり、二酸化炭素あるいは NADH が過剰に存在する場合にだけ二酸化炭素をギ酸に変換する反応を触媒する酵素である。

例えば二酸化炭素 (2.2mM)、NADH (2.2mM) 及び FDH (5.0 units) で構成される系で二酸化炭素からギ酸が生成する反応とギ酸 (2.2mM)、NAD⁺ (2.2mM) 及び FDH (5.0 units) で構成される系でギ酸から二酸化炭素が生成する反応 (同じ条件) を比較した結果を図 33 に示す。

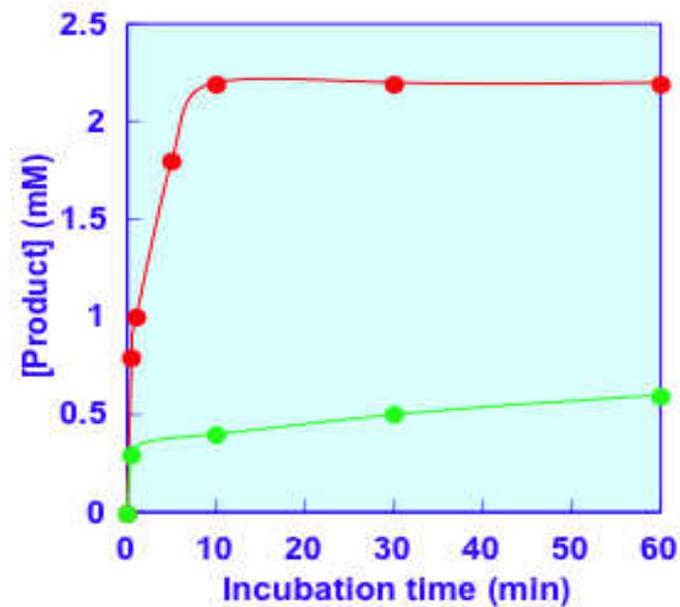


図 33 天然補酵素・ギ酸脱水素酵素を用いたギ酸-二酸化炭素（赤）及び二酸化炭素-ギ酸（緑）変換反応の経時変化

同じ条件で可逆反応の双方向の反応を調べた結果、天然の補酵素 NAD^+ あるいは NADH を用いた場合では、5 倍程度ギ酸から二酸化炭素が生成する反応が速いことが分かる。このことから光反応系でギ酸脱水素酵素を二酸化炭素-ギ酸変換反応に用いる場合には、5 倍程度速いギ酸から二酸化炭素生成反応を抑制する必要がある。

一方、本研究で標準の人工補酵素として用いてきたメチルビオローゲンの場合において同様の実験を試みた。具体的には二酸化炭素 (2.2mM)、メチルビオローゲン (4.4mM) 及び FDH (5.0 units) で構成される系で二酸化炭素からギ酸が生成する反応とギ酸 (2.2mM)、メ

チルビオローゲン (4.4mM)、還元剤ヒドロサルファイトナトリウム及びFDH (5.0 units) で構成される系でギ酸から二酸化炭素が生成する反応 (同じ条件) を比較した結果を図 34 に示す。

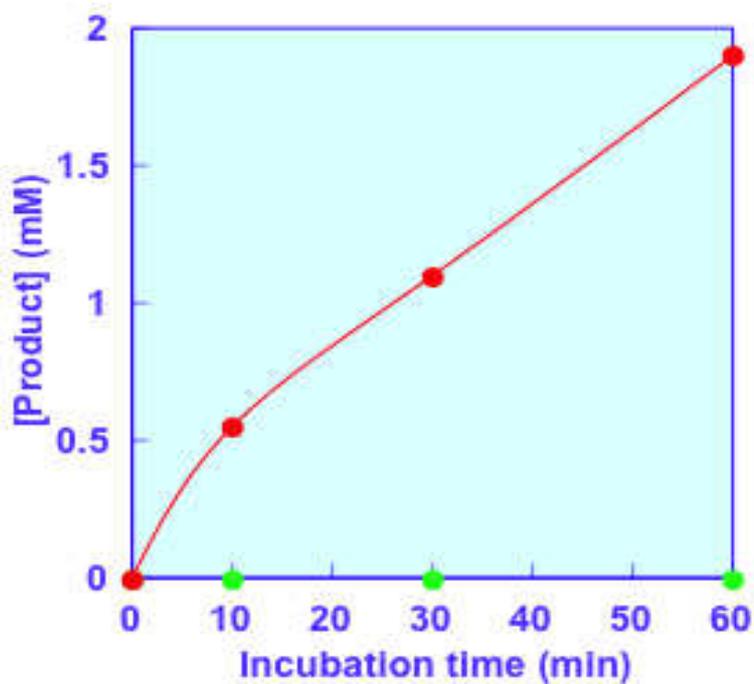


図 34 メチルビオローゲン・ギ酸脱水素酵素を用いたギ酸-二酸化炭素 (赤) 及び二酸化炭素-ギ酸 (緑) 変換反応の経時変化

同じ条件で可逆反応の双方向の反応を調べた結果、メチルビオローゲンを用いた場合では、ギ酸から二酸化炭素が生成する反応が一切進まないことが分かる。これに対して二酸化炭素からギ酸が生成する反応だけが進行し、NADH を用いた場合と比較して、この反応条件では約 4 倍程度反応速度が加速されることが分かった。メチルビオローゲンは上述のとおり光増感分子で容易に還元することができるため、二酸化炭素をメタノールに変換するための第一段階の二酸化炭素からギ酸への変換反応に適していることが明らかとなった。

そこで NADH 及びメチルビオローゲンを補酵素として用いた二酸化炭素-ギ酸変換反応の酵素反応速度論的な解析を試みた。具体的には人工補酵素濃度に対して反応速度をプロットし、ミカエリス-メンテン型の酵素反応速度論を用い解析し、ギ酸脱水素酵素と人工補酵素との親和性に関して検討した。結果を図 35 に示す。

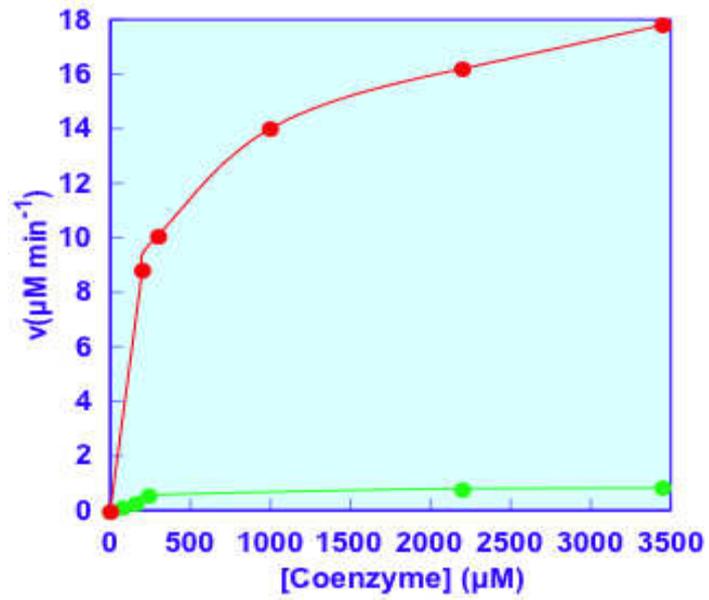
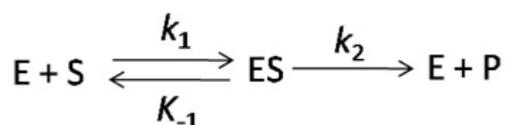


図 35 メチルビオローゲン(赤)及びNADH (緑) を補酵素として用いたギ酸脱水素酵素を触媒とした二酸化炭素-ギ酸変換反応のミカエリス・メンテンプロット

ミカエリス・メンテンプロットから明らかなようにメチルビオローゲンを補酵素として用いた場合には、NADH を用いた場合と比較して反応速度が飛躍的に加速していることが分かる。このプロットから以下の解析法を用いて反応速度パラメータを見積もった。

本反応がミカエリス・メンテン式に従うものとして、一般的な酵素反応では以下の式が成り立つ (E:酵素、S : 基質、P : 生成物、ES : 酵素基質複合体、k : 反応速度定数)。各要素



基質(S)

$$\frac{dc_s}{dt} = -k_1 c_E c_S + k_{-1} c_{ES}$$

酵素(E)

$$\frac{dc_E}{dt} = -k_1 c_E c_S + k_{-1} c_{ES} - k_2 c_{ES}$$

酵素・基質複合体(ES)

$$\frac{dc_{ES}}{dt} = k_1 c_E c_S - k_{-1} c_{ES} - k_2 c_{ES}$$

生成物(P)

$$\frac{dc_P}{dt} = k_2 c_{ES}$$

成分の反応速度も併せて示す。

ここで酵素基質複合体に対して定常状態近似を適用することによって以下の式が成り立

$$\frac{dc_{ES}}{dt} = k_1 c_E c_S - k_{-1} c_{ES} - k_2 c_{ES} = 0$$

つことになる。

この式からミカエリス定数 K_m が求まる。

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = \frac{c_E c_S}{c_{ES}}$$

ミカエリス定数 K_m は酵素基質複合体の解離のしやすさの度合いを示すものである。さらに、反応速度は以下の式で表すことができる（ミカエリス・メンテン式）。

$$v = \frac{V_{max} C_S^0}{K_m + C_S^0}$$

これらの式を用いて図 35 を解析した結果を表 7 に示す。

表 7. 反応速度パラメータ

補酵素	K_m	k_2 (nmol min ⁻¹ units ⁻¹)	V_{max} (μM min ⁻¹)
NADH	570	1.25	0.5
MV ²⁺	212	44.5	17.8

メチルビオローゲンを用いた場合では最大速度が 30 倍、生成物生成速度定数が 40 倍程度向上していることが分かる。またミカエリス定数も 40%程度低下していることから生成物生成速度が加速したものと推察される。

次に人工補酵素の中でギ酸脱水素酵素の活性化に有効であったビオローゲン誘導體 (H₂NCH₂CH₂VCH₂CH₂NH₂) について同様にミカエリス・メンテンプロット解析を進めた。結果を図 36 に示す。

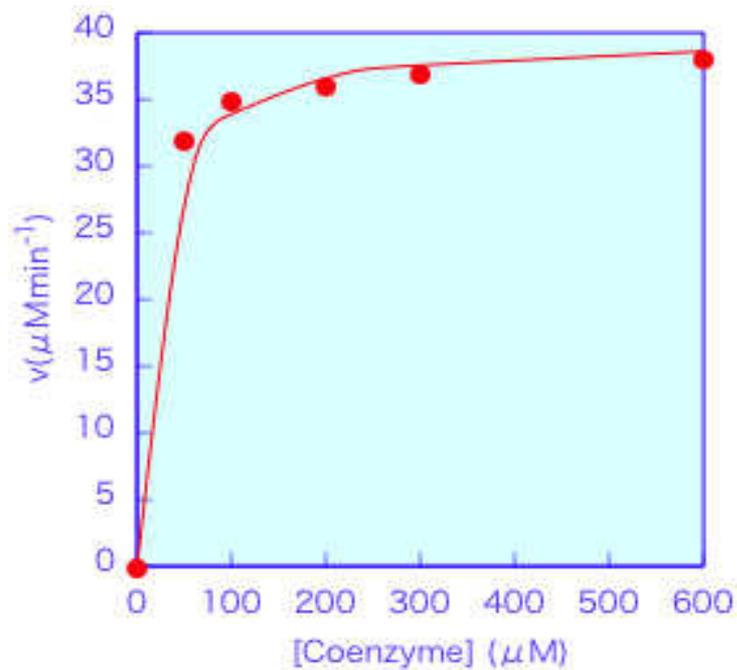


図 36 ビオローゲン誘導体($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{VCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$)を補酵素として用いたギ酸脱水素酵素を触媒とした二酸化炭素-ギ酸変換反応のミカエリス・メンテンプロット

上述の式を用いて図 36 を解析した結果、 $K_m=17.1$ 、 $k_2=99.2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ units}^{-1}$ 、 $V_{max}=39.7 \text{ in}$ 図エリス⁻¹となった。 K_m はメチルビオローゲンをを用いた場合と比較しても 1/12 程度小さくなった。これに対して、最大反応速度 V_{max} は 2 倍以上、ギ酸生成速度定数 k_2 も 2 倍以上大きくなった。このことは、人工補酵素が陽イオン性のアミノ基導入により、正電荷を多くもつことで FDH との相互作用が強くなったことを示している。

3.7 グルコース—グルコン酸変換と可視光駆動型水素生産・二酸化炭素還元系とを連結した反応システム具現化への展開

最初にグルコース脱水素酵素 (GDH) によるグルコースのグルコン酸への変換反応とそれに伴う NADPH 再生系と光増感剤として水溶性ポルフィリン テトラフェニルポルフィリンテトラスルフォネート (TPPS) を用いたメチルビオローゲンの光還元反応の連結について検討した。グルコース (10 mM)、GDH (50 units)、NADP⁺ (3.0 mM)、TPPS (300 μM) 及びメチルビオローゲン (0.4 mM) を含む 50mM 緩衝液 (全体積 3mL) を凍結脱気し、気相に二酸化炭素ガスを導入した。30°C の恒温槽内でハロゲンランプ (200W) を光源として照射した。照射時間に対する還元型メチルビオローゲンの経時変化を図 38 に示す。照射時間とともにメチルビオローゲンが還元された。照射時間 80 分後で約 1.3 μM のメチルビオロ

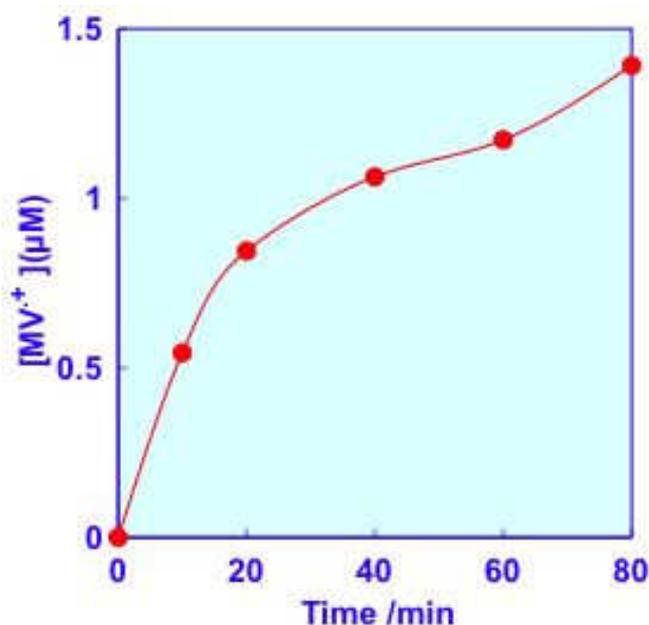


図 38 グルコース (10 mM)、GDH (50 units)、NADP⁺ (3.0 mM)、TPPS (300 μM) 及びメチルビオローゲン (0.4 mM) を含む 50mM 緩衝液 (全体積 3mL) によるメチルビオローゲンの光還元反応の経時変化

ーゲンが還元された。

次にグルコース脱水素酵素 (GDH) によるグルコースのグルコン酸への変換反応とそれに伴う NADPH 再生系と光増感剤として水溶性ポルフィリン テトラフェニルポルフィリン テトラスルフォネート(TPPS)、電子伝達体としてメチルビオローゲン及び2種類の触媒・酵素、白金微粒子及びギ酸脱水素酵素からなる系について以下の実験条件のもと検討した。グルコース (10 mM)、GDH (50 units)、NADP⁺ (3.0 mM)、TPPS(300 μM)、メチルビオローゲン (0.4 mM)、ギ酸脱水素酵素 (0.67unit) 及び白金微粒子 (5.0units) を含む 50mM 緩衝液 (全体積 3mL) を凍結脱気し、気相に二酸化炭素ガスを導入した。30°Cの恒温槽内でハロゲンランプ(200W)を光源として照射した。照射時間に対する水素生産の経時変化を図 39 に示す。照射時間とともに定常的に水素が発生した。照射時間 90 分後で約 4 μmol の水素が発生した。また同時に照射時間 90 分後で約 20μM のギ酸が生成した。このこと

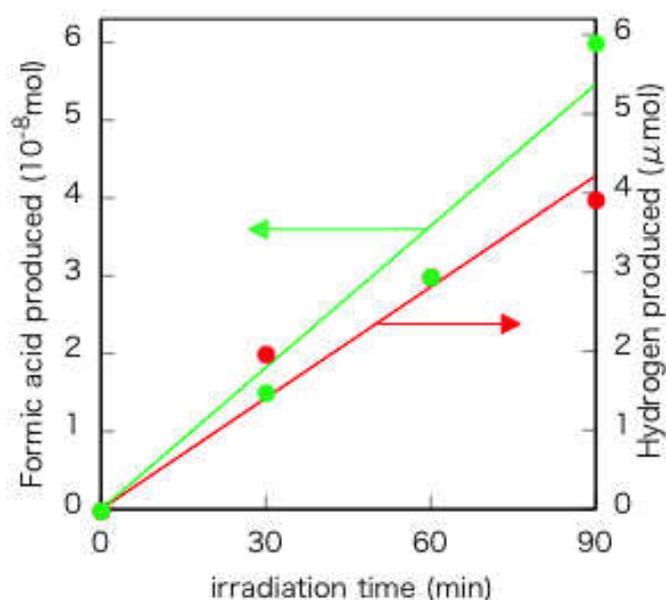


図 39 グルコース (10 mM), GDH (50 units), NADP⁺ (3.0 mM), TPPS(300 μM), メチルビオローゲン (0.4 mM), ギ酸脱水素酵素 (0.67unit) 及び白金微粒子 (5.0units) を含む 50mM 緩衝液 (全体積 3mL) による水素生産及びギ酸生成反応の経時変化

から可視光エネルギーを駆動力として二酸化炭素—ギ酸変換系と水素生産反応が同時に進行させることができた。

さらに同反応で生成したグルコン酸を定量した結果、反応時間 90 分で 8mM のグルコン酸が生成していた。つまりグルコースからグルコン酸の変換反応、すなわち NAD^+ から NADH への変換反応は非常に迅速に進行していることが示唆された。

3.8 セルロース糖化系と可視光駆動型水素生産系とを連結した反応システム具現化への展開

セルロースの糖化反応 (反応①)

新聞紙由来のセルロース 5.0 g とセルラーゼ(1110 units)をリン酸塩緩衝液 (pH 7) に加え、室温で攪拌してセルロースの糖化处理を行った結果、糖化处理後 300 分で、セルロースが分散した。さらに糖化液 30ml を採取し NAD^+ と GDH を加え NADH 生成反応によりセルロースの糖化反応を追跡した結果、反応時間とともに NADH が生成した。5 時間のインキュベーションで 3.0mM の NADH が生成した。これは、セルロースが糖化处理によりグルコースへ加水分解され、 NAD^+ と GDH の反応により NADH が生成したことを意味している。これまで困難とされてきたセルロースの糖化を室温・常圧条件下で達成できた (上述 3.2)。

セルロース糖化液 - GDH - NAD⁺ - MgChl-*a* - MV²⁺系でのメチルビオローゲンの光還元反応 (反応②)

最初にセルロース糖化液を原料としてメチルビオローゲンが光還元できるかどうかを検討した。セルロース糖化液 10ml、GDH 5.0units、MgChl-*a* 9.6 μM、NAD⁺ 5.0mM 及び MV²⁺ 2.0mM を含む反応溶液を反応容器に入れ、ハロゲンランプを用いて光照射した。還元型メチルビオローゲンの生成は紫外可視吸収スペクトルでのみ測定できるため、ここでは光照射前後での反応溶液の色変化で判断した。結果を図 40 に示す。

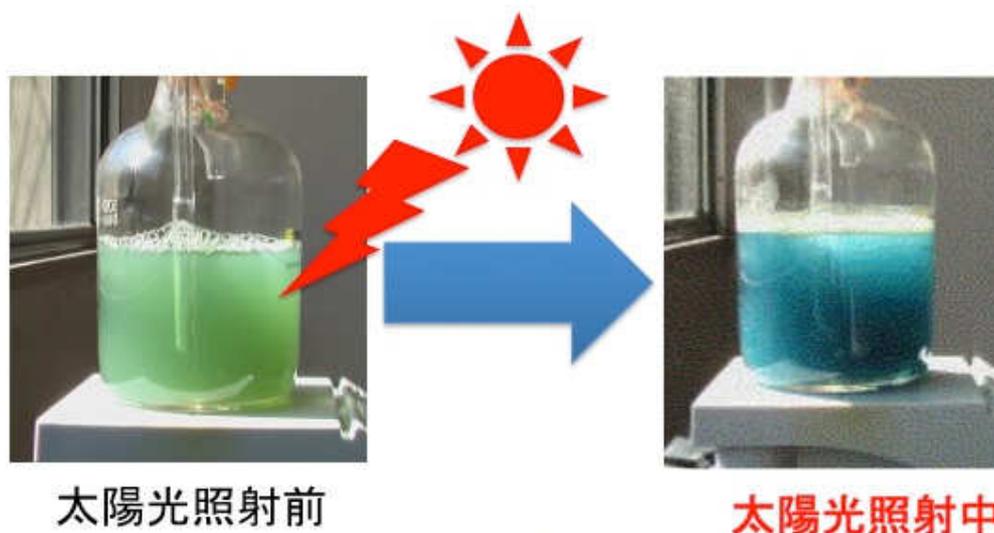


図 40 セルロース糖化液 10ml、GDH 5.0units、MgChl-*a* 9.6 μM、NAD⁺ 5.0mM 及び MV²⁺ 2.0mM を含む 50mM 緩衝液 (全体積 270 mL) によるメチルビオローゲンの光還元反応の経時変化

光照射前ではクロロフィル特有の緑色が強くでていますが、光照射を開始すると還元型メチルビオローゲン生成を示す青色に溶液が変化していることが分かる。本システムにおいて還元型メチルビオローゲンが生成することから水素発生触媒である白金微粒子や二酸

化炭素還元触媒であるギ酸脱水素酵素を添加することで、水素発生、ギ酸生成が期待できると考えられる。

セルロース糖化液 - GDH - NAD⁺ - MgChl-*a* - MV²⁺ - 白金微粒子系での光水素生産反応 (反応②)

次にセルロースの糖化液を原料とした水素製造反応について検討した。セルロース糖化液 10ml、GDH 5.0units、MgChl-*a* 9.6 μM、NAD⁺ 5.0mM、MV²⁺ 2.0mM 及び白金微粒子 5.0 units を含む反応溶液を水素製造用反応容器 (容器全体積 500ml) に入れ、ハロゲンランプを用いて照射した。その結果、照射時間に対して定常的に水素が発生した。結果を図 41 に示す。照射 5 時間後の水素発生量は約 24μmol であり、体積換算で約 0.55ml となった。

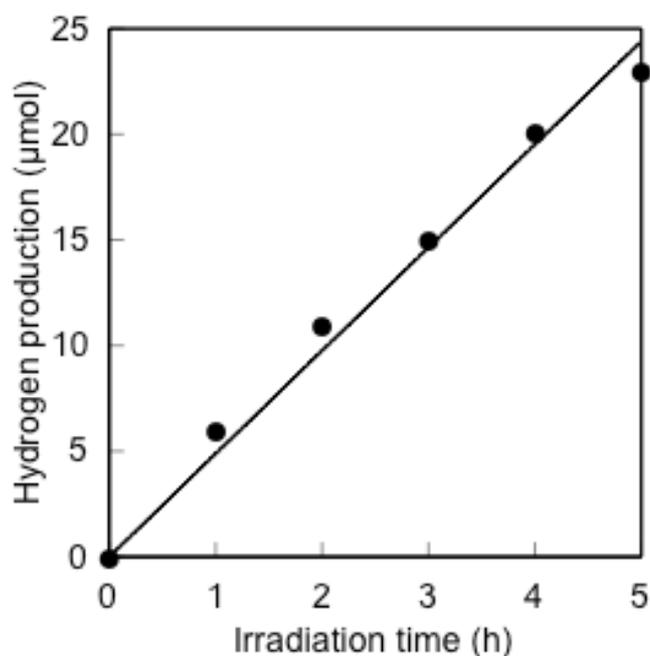


図 41. セルロース糖化液-GDH-NAD⁺ - MgChl-*a*-MV²⁺-白金微粒子系での光水素生産反応システムによる水素発生の経時変化

以上のことから、セルロース糖化液から光エネルギーを使って水素製造に成功した。

さらに光増感分子 $\text{MgChl-}a$ の濃度を $20 \mu\text{M}$ へ増加させることによって光照射 5 時間後の水素発生量は約 $35\mu\text{mol}$ まで向上させることができた。セルロース糖化液に含まれていた新聞紙由来のセルロースはグルコース換算で 2.7 mmol (セルロース $1\text{g}/300\text{ml}$) であるので光照射 5 時間でのセルロースから水素への変換率は 1.3% である。

さらにイオンクロマトグラフを用いてグルコン酸生成量を定量した結果、反応時間 5 時間で 1mM 生成していることが分かった。

以上のことからシステムを用いることによってセルロース糖化液から水素及びグルコン酸を同時に生成させられることが示唆された。

セルロース糖化液 - GDH - NAD^+ - $\text{MgChl-}a$ - MV^{2+} - 白金微粒子・ギ酸脱水素酵素系での光水素生産・ギ酸生成反応

最後にセルロースの糖化液を原料とした水素製造反応について検討した。セルロース糖化液 10ml 、GDH 5.0units 、 $\text{MgChl-}a$ $9.6 \mu\text{M}$ 、 NAD^+ 5.0mM 、 MV^{2+} 2.0mM 及び白金微粒子及びギ酸脱水素酵素をそれぞれ 5.0 units を含む反応溶液を 500ml 反応容器に入れ、ハロゲンランプを用いて光照射した。その結果、光照射時間に対して定常的に水素生産及びギ酸生成が観測された。光照射 5 時間後の水素発生量は約 $20\mu\text{mol}$ 、ギ酸生成量は $0.2\mu\text{mol}$ であった。上述 3.7 で示した結果とほぼ同様の生成比になった。

さらにイオンクロマトグラフを用いてグルコン酸生成量を定量した結果、反応時間 5 時間で 1mM 生成していることが分かった。

以上のことからシステムを用いることによってセルロース糖化液から水素・ギ酸及びグルコン酸を同時に生成させられることが示唆された。

4. 結論

研究期間 3 年間で、多糖類セルロースと二酸化炭素から生物工学的手法と光エネルギー利用により新規エネルギー源・燃料となる水素・メタノール生産反応系を確立し、システムの効率化プロセスへ展開する。具体的には、バイオマス利用の需要が高い古紙以外の不溶性セルロースの使用が可能な反応系を構築することを目的とし、反応収率も同様に、物質量換算で不溶性セルロースの 50%程度を水素に変換でき、なおかつ糖化したグルコースはすべてグルコン酸に変換可能な系の達成が最大かつ最終の成果目標とする。一方メタノール生産に関する目標値として、申請者の持つ技術シーズでは、二酸化炭素を原料として収率 50%でメタノールが合成できている。さらに収率を 80%まで向上させる。概算ではあるが、二酸化炭素 20L とし、反応収率を 80%に設定し、1 日あたり炭素換算で 7.2g 削減することができるシステムを目指した。

最終年度は、過去 2 年間で得られた研究成果を基盤として、セルロースと二酸化炭素を基本原料とし、光エネルギーを駆動力とした水素・メタノール・グルコン酸を生産できる「多機能型バイオマス利用技術」を確立する。さらにシステムの要素技術を最適化することで高効率なシステムへ展開する。具体的には平成 23・24 年度で確立したルイス酸触媒とイオン液体をベースとしたセルロースの糖化システムと糖化液からグルコン酸の回収システムを同一系とし、二酸化炭素を原料とした光駆動型水素・メタノール生成システムと連結し、本研究課題の最終型である「セルロースと二酸化炭素を基本原料とし、光エネルギーを駆動力とした水素・メタノール・グルコン酸生産系」の構築を達成する。不溶性セルロースの使用が可能な反応系を構築することを目的とし、反応収率は物質量換算で不溶性セルロースの 50%程度を水素に変換でき、なおかつ糖化したグルコースはすべてグルコン酸に変換可能な系の達成が最大かつ最終の成果目標とする。一方メタノール生産に関する目標値として、二

酸化炭素を原料として物質量換算で収率 80%まで向上させることとした。

最終年度は平成 23・24 年度で確立したセルロース糖化系と可視光駆動型水素発生・二酸化炭素分子変換系とを連結した反応システム具現化に関する研究を進めた。具体的な研究成果として、前年度までに進めてきたイオン液体を用いたセルロースの糖化液と人工光合成系の連結反応による可視光駆動型水素・ギ酸生産系の構築について反応体積 3ml レベルでの反応条件の検討、生成物である水素・ギ酸濃度の定量及び化成品として抽出したグルコン酸濃度の定量することができた。さらにセルロース糖化系と可視光駆動型可視光駆動型水素発生・二酸化炭素分子変換系とを送液ポンプで連結した 500ml レベルの大容量型反応装置の開発に成功した。本システムでは反応収率は物質量換算で不溶性セルロースの約 30%程度を水素に、約 0.5%をギ酸に変換することができた。またセルロースの糖化に伴うグルコン酸の変換は 80%程度まで達成できた。今後カルシウムイオンの添加法でグルコン酸を回収するシステムを組み込むことにより、化成品回収プロセスを達成することができる。最後にセルロースから水素への物質変換効率は最終目標値の 6 割以上まで達成できたが、二酸化炭素-燃料（メタノール・ギ酸等）変換効率は最終目標値へ到達させるためには人工補酵素のさらなる機能化が必要であると考えられる。

研究期間 3 年の達成度としてシステム駆動原理は確立することができた。しかしながら二酸化炭素からメタノール生成プロセスの組み込み、木材チップなどの難溶性セルロースの原料としての利用までには至らなかった。今後セルロースの糖化プロセスの効率化を検討する必要がある。しかしながらセルロースの糖化プロセスと人工光合成系の連結による水素生産、

二酸化炭素還元系を達成できたことは今後のバイオマス、二酸化炭素の活用、環境問題・エネルギー問題解決への新規な手法として活用できると期待される。

今後は反応後にどのような形で液体生成物を取り出すか等の課題もあるが、水素ガスを使わずに二酸化炭素を還元でき、エネルギーキャリア分子としての利用方法等環境・エネルギー分野で有効な活用方法が期待される。実用化に向けて図 42 に示すような反応プロセスを構築することが望まれる。

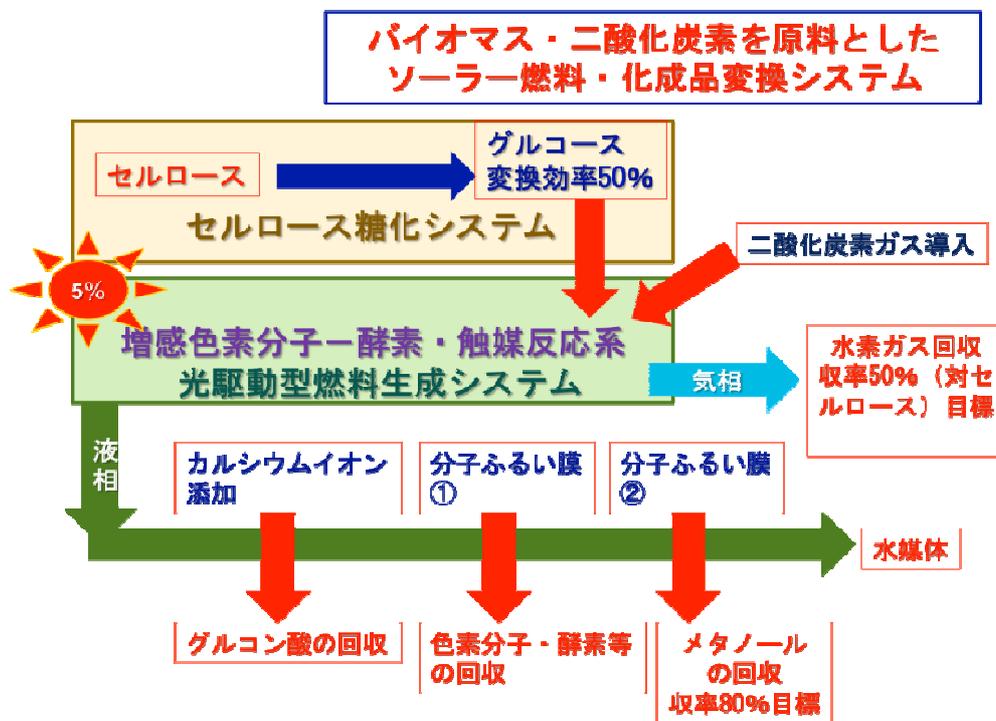


図 42 バイオマス・二酸化炭素を原料としたソーラー燃料・化成品変換システムの実用化へ向けたプロセス概念

5. 参考文献

人工光合成による水素生産反応に関する文献

1. J. Kiwi, K. Kalyanasundaram, M. Grätzel, *Struct. Bonding* **1982**, 49, 37.
2. L. A. Kelly, M.A.J. Rodgers, *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 6386 .
3. J.R. Darwent, P. Douglas, A. Harriman, G. Porter, M.C. Richoux, *Coord. Chem. Rev.* **1982**, 44, 93.
4. P.A. Brugger, P. Cuendet, M. Grätzel, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 2923.
5. I. Okura, *Coord. Chem. Rev.* **1985**, 68, 53.
6. I. Okura, *Biochimie* **1986**, 68, 189.
7. J. Kiwi, M. Grätzel, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 7214.
8. E. Greenbaum, R.R.L. Gullard, W.G. Gunda, *Photochem. Photobiol.*, **1983**, 37, 649.
9. Y. Amao, *Current Nanoscience* **2008**, 4, 45.
10. Y. Amao, I. Okura, “Sensitization by Metal Complexes Towards Future Artificial Photosynthesis” in Photocatalysis, Kodansha Springer, **2002**.
11. A.A. Krasnovski, G.P. Brin, U.V. Nikandrov, *Dokl. Acad. Nauk. SSSR.* **1975**, 228, 1214.
12. J.A.M. Smith, D. Mauzerall, *Photochem. Photobiol.*, **1981**, 34, 407.
13. I. Okura, N. Kim-Thuan, *J. Mol. Catal.*, **1979**, 6, 227.
14. G. McLendon, D.S. Miller, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1980**, 533.
15. A. Harriman, G. Porter, M.-C. Richoux, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.2*, **1981**, 77, 833.
16. I. Okura, M. Takeuchi, N. Kim-Thuan, *Photochem. Photobiol.*, **1981**, 33, 413.

17. I. Okura, M. Takeuchi, S. Kusunoki, S. Aono, *Inorg. Chim. Acta.* **1982**, 63, 157.
18. I. Okura, N. Kaji, S. Aono, T. Kita, A. Ymada, *Inorg. Chem.*, **1985**, 24, 451.
19. Y. Amao, I. Okura, *J. Mol. Catal. A. Chem.* **1996**, 105, 125.
20. Y. Amao, I. Okura, *J. Mol. Catal. A. Chem.* **1995**, 103, 1995 69.
21. Y. Amao, Y. Tomonou, I. Okura, *Solar Energy Materials & Solar Cells*, **2003**, 79, 103.
22. Y. Amao, Y. Tomonou, Y. Ishikawa, I. Okura, *Int. J. Hydrogen Energy*, **2002**, 27, 621.
23. T. Kamachi, T. Hiraishi, I. Okura, *Chem. Lett.*, **1995**, 33.
24. Y. Tomonou, Y. Amao, *Int. J. Hydrogen Energy*, **2004**, 29, 159.
25. Y. Tomonou, Y. Amao, *Biometals* **2002**, 15, 391.
26. Y. Tomonou, Y. Amao, *Biometals* **2003**, 16, 419.
27. N. Sugiyama, M. Toyoda, Y. Amao, *Colloids, Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2006**, 284-285, 384.
28. T. Itoh, A. Ishii, Y. Koderu, A. Matsushima, M. Hiroto, H. Nishimura, T. Tsuzuki, T. Kamachi, I. Okura, Y. Inada, *Bioconjugate. Chem.* **1998**, 9, 409.

人工光合成による二酸化炭素の光還元に関する文献

29. R. Obert, B. C. Dave, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 12192.
30. B. El-Zahab, D. Donnelly, P. Wang, *Biotech. Bioeng.*, **2007**, 99, 508.
31. D. Mandler, I. Willner, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1988**, 2, 997.

32. I. Willner, D. Mandler, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 1330.
33. I. Willner, N. Lapidot, A. Riklin, R. Kasher, E. Zahavy, E. Katz, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 1428.
34. I. Willner, I. Willner, N. Lapidot, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 6438.
35. M. Kodaka, Y. Kubota, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1999**, *2*, 891.
36. R. Miyatani, Y. Amao, *Biotechnol. Lett.*, **2002**, *24*, 1931.
37. R. Miyatani, Y. Amao, *J. Mol. Catal. B. Enzym.*, **2004**, *27*, 121.
38. R. Miyatani, Y. Amao, *J. Jpn. Petrol. Inst.*, **2004**, *47*, 27.
39. I. Tsujisho, M. Toyoda, Y. Amao, *Catal. Commun.*, **2006**, *7*, 173.
40. Y. Amao, T. Watanabe, *Chem. Lett.*, **2004**, *33*, 1544.
41. Y. Amao, T. Watanabe, *Appl. Catal. B. Environment.*, **2009**, *86*, 109.
42. T. Itoh, H. Asada, K. Tobioka, Y. Kodera, A. Matsushima, M. Hiroto, H. Nishimura, T. Kamachi, I. Okura, Y. Inada, *Bioconjugate Chem.*, **2000**, *11*, 8.
43. Y. Amao, M. Ishikawa, *Porphyryns*, **2004**, *13*, 19.
44. Y. Amao, M. Ishikawa, *J. Jpn. Petrol. Inst.*, **2007**, *50*, 272.
45. Y. Amao, M. Ishikawa, *Catal. Commun.*, **2007**, *8*, 423.
46. R. Miyatani, Y. Amao, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2004**, *3*, 681.

バイオマスを原料とした光水素生産反応に関する文献

47. V. Rustamov, K.M. Abdullayev, F.G. Aliyev, and V.K. Kerimov, *Int. J. Hydrogen Energy*, **1998**, 23, 649.
48. J. Woodward, M. Orr, K. Cordray and E. Greenbaum, *Nature*, **2000**, 405, 1014.
49. J. Woodard, S. M. Mattingly, M. Danson, D. Hough, N. Ward, and M. Adams, *Nature Biotechnol.*, **1996**, 14, 872.
50. Y. Amao, *Int. J. Mol. Sci.*, **2008**, 9, 1156.
51. 天尾 豊, ペトロテック, **2009**, 32, 323.
52. Y. Saiki and Y. Amao, *Bioconjugate Chem.*, **2002**, 13, 898.
53. M. Kobayashi, M. Yamamura, M. Akiyama, H. Kise, K. Inoue, M. Hara, N. Wakao, K. Yahara, and T. Watanabe, *Anal. Sci.*, **1998**, 14, 1149.
54. N. Wakao, N. Yokoi, N. Isoyama, A. Hiraishi, K. Shimada, M. Kobayashi, H. Kise, M. Iwaki, S. Itoh, S. Takaichi and Y. Sakurai, *Plant Cell Physiol.*, **1996**, 37, 889.
55. Y. Takeuchi and Y. Amao, *Bioconjugate Chem.*, **2003**, 14, 268.
56. N. Himeshima and Y. Amao, *Biotechnol. Lett.*, **2002**, 19, 1647.
57. N. Himeshima and Y. Amao, *J. Jpn. Petro. Inst.*, **2003**, 46, 259.
58. 天尾 豊, バイオサイエンスとインダストリー, **2009**, 67, 258.
59. N. Himeshima and Y. Amao, *Biotechnol. Lett.*, **2002**, 19, 1935.
60. N. Himeshima and Y. Amao, Y., *Energy Fuels*. **2003**, 17, 1641.

61. N. Himeshima and Y. Amao, *Green Chem.*, **2005**, 7, 742.

62. Y. Amao, T. Hirakawa, and N. Himeshima, *Catal. Commun.*, **2008**, 9, 131.

セルロースの糖化に関する文献

63. B. Wiredu, A. S. Amarasekara, *Catal. Commun.*, **2014**, 48, 44

64. K. M. Hello, H. R. Hasan, M. H. Sauodi, P. Morgen *Applied Catalysis A: General*, **2014**, 475,
226.

65. R. Kishor Pal, S. Chakraborty *Bioresource Technology*, **2013**, 148, 611.

66. T. H. Kim, K. K. Oh, H. J. Ryu, K-H. Lee, T. H. Kim *Renewable Energy*, **2014**, 65, 56.

67. Y. Liu, W. Xiao, S. Xia, P. Ma *Carbohydrate Polymers*, **2013**, 92, 218.

68. X. Meng, A. J. Ragauskas *Current Opinion in Biotechnology*, **2014**, 27, 150.

69. Z. Zhang, W. Wang, X. Liu, Q. Wang, W. Li, H. Xie, Z. K. Zhao *Bioresource Technology*, **2012**,
112, 151.

70. M. Monschein, C. Reisinger, B. Nidetzky *Bioresource Technology*, **2013**, 128, 679.

6. 研究発表

国際会議における発表

1. Yutaka Amao “ (Invited Lecture) Solar hydrogen production from cellulose with artificial photosynthesis system” 244th ACS National Meeting & Exposition - August 19-23, 2012, Philadelphia, PA
2. Yutaka Amao “ (Invited Lecture) Visible Light Induced Hydrogen Production from Cellulose with Enzymatic and Artificial Photosynthesis” 2014 International Conference on Hydrogen Production (ICH2P-2014) February 2-5, 2014, Fukuoka
3. Yutaka Amao, Yuka Sakai, Satomi Takahara “Solar Hydrogen Production from Cellulose Biomass with Enzymatic and Artificial Photosynthesis System” EHEC 2014 European Hydrogen Energy Conference March 12-14, 2014, Seville, Spain

国内学会における発表

1. 天尾 豊、坂井結香「人工光合成系による可視光駆動型セルロース-水素変換反応」
第32回水素エネルギー協会大会 2012年12月 広島

国際誌への投稿

1. Yutaka Amao "Solar hydrogen production from cellulose with artificial photosynthesis system"
Am. Chem. Soc. ,Div. Fuel Chem., 2012, 57(2), 883
2. Yutaka Amao, Yuka Sakai, Satomi Takahara “Solar Hydrogen Production from Cellulose Biomass with Enzymatic and Artificial Photosynthesis System in Aqueous Media” *International Journal of Hydrogen Energy*, in preparation.
3. Yutaka Amao, Yuka Sakai, Satomi Takahara “Solar Hydrogen and Formic acid Production from Biomass with Enzymatic and Artificial Photosynthesis System in Aqueous Media” *International Journal of Hydrogen Energy*, in preparation.

7. 知的財産権の取得状況

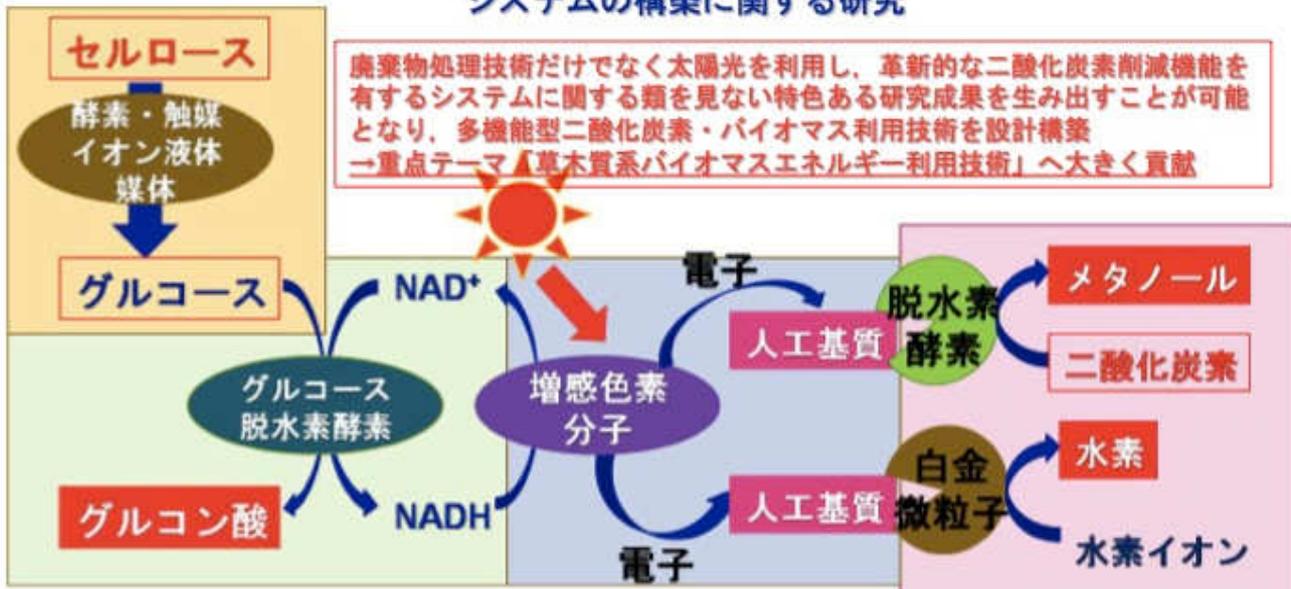
酸化還元酵素反応の制御及びその応用

出願番号： 特願2012-139887

出願日： 平成 24 年 6 月 21 日

8. 研究概要図

研究課題名
 バイオマス・二酸化炭素を原料としたソーラー燃料・化成品変換
 システムの構築に関する研究



9. 英文概要

Title “Development of solar fuel and chemical production system from biomass and carbon dioxide”

Principal Investigator: Yutaka Amao, Osaka City University

Co-Investigators: Katsutoshi Nagaoka, Oita University

[Summary]

In the environmental science and the energy source development, hydrogen gas production from renewable resources of timber waste, including cellulose, lignin, *etc.* is important. We have previously reported the enzymatic photoinduced hydrogen production from sucrose or maltose as the renewable bio-resources using the light-harvesting function of photosynthesis dye molecule such as Mg Chl-*a*. And the photoinduced hydrogen production from water-soluble methylcellulose using the light-harvesting function of Mg Chl-*a*, also has been accomplished. However, soluble cellulose derivative, methylcellulose is used as a renewable resource in this hydrogen production system. Thus, photoinduced hydrogen production from renewable resources of timber waste, including insoluble cellulose is not accomplished yet.

Photochemical and enzymatic fuel production from carbon dioxide based on the artificial photosynthesis system also has been accomplished. Thus solar hydrogen and fuel production from biomass and carbon dioxide will be accomplished by the combination of above two reaction system. In this work solar fuel and chemical production system from biomass and carbon dioxide by coupling the waste paper including cellulose biomass with cellulase and GDH, and hydrogen production with platinum colloid and enzyme with the function of carbon dioxide conversion via the photoreduction of MV^{2+} using the visible light-harvesting function of Mg Chl-*a* is developed.

Keyword: Artificial photosynthesis; Biomass; Solar fuel; Hydrogen; Carbon dioxide