チタニアと生体触媒（酵素）を複合した CO₂固定用機能性粒子の創製

Novel Intelligent Particle Design for CO₂ Fixation Using
TiO₂ Combined with Biocatalyst

01112

研究代表者 創価大学工学部環境共生工学科 助教授 松 山 達 Tatsushi Matsuyama

共同研究者 創価大学工学部環境共生工学科 教 授 山 本 英 夫 Hideo Yamamoto

A CO₂ fixation system in which a photocatalysis in a light stage is separated from a biocatalysis in a dark stage can be expected to perform highly selective production through the use of light-energy without denaturation of enzyme due to light irradiation.

To realize the concept as particle design, an electron-transfer system which combines semiconductor photocatalyst particles (TiO₂) with two biocatalysts was proposed. In this study, formate dehydrogenase (FDH) was used as a catalyst of CO₂ fixation. Methyl viologen (MV), NAD⁺ and diaphorase were used to mediate electron-transfer from TiO₂ to FDH.

To confirm the feasibility of the electron-transfer system, the kinetics of the photocatalytic reaction side of the system was studied with time course of the reduction of MV²⁺ by TiO₂ particles under UV-irradiation. It was found that MV⁺ production depends on the concentrations of MV²⁺ and TiO₂, and the initial rates can be described by Langmuir-Hinshelwood expression.

Experiments in a batch operation showed that the total system works, and both concentrations of MV and NADH affected the rate of CO₂ fixation. In the new photo-bioreactor system with a ceramic membrane inserted between TiO₂ particles and the two enzymes, it was shown that the CO₂ fixation progressed although the intensity of light is high enough to degrade enzyme's activities. From these results, it was indicated that the proposed system works without denaturation of enzyme due to light irradiation. Next, to immobilize the biocatalytic reaction side of the system, NAD⁺-bonded gel beads with entrapped FDH and DAH were prepared by allowing droplets of sodium-alginate solution containing FDH, DAH and polymerized NAD⁺ fall into a CaCl₂ solution. Activity of the beads was confirmed as the internal electron-transfer from formate to MV²⁺. Therefore, it was found that the coupled reaction of FDH and DAH was successfully immobilized in the gel beads.

研究目的

TiO₂に代表される半導体光触媒粒子は、光のエネルギーを利用して直接CO₂を還元・固定化できることから盛んに研究されている。その中でも幾つかの半導体粒子は、強い酸化力を有するため、水を電子供給源として利用できるという利点がある。しかしながら、

得られる生成物はメタンや蟻酸、または酢酸などの混合物であり、その生成物選択性に乏しいという問題点がある¹⁾。一方、CO₂を人工的に固定化する新しい方法の一つに生体触媒（酵素）の利用が期待されている。例えば、蟻酸脱水素酵素（FDH）は通常酸化型のNAD⁺の存在下で（HCOOH→CO₂+2H⁺）の反応を触媒するが、還元型のNADHの過剰存在下ではこの

Fig. 1 Concept of the novel particle design separating a photocatalytic and biocatalytic reaction with the photocatalyst layer (shell of the capsule).

逆反応を触媒するので、 $(\text{CO}_2 + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{HCOOH})$ の反応により、 CO_2 を蟻酸に転換できると期待される。しかしながら、このような酵素を人工光合成反応の触媒として利用しようとする場合、酵素は光に弱く、長時間光照射を継続するとその活性が失われてしまうという問題点がある^{2,3)}。

そこでもし、半導体の光触媒反応と酵素反応を電子伝達物質を介して複合し、これら2種類の触媒反応をそれぞれ光照射場（明反応）と暗所（暗反応）に分離して機能させることができれば、光エネルギーを反応の駆動力として生成物を選択性良く合成できる人工光合成システムが可能になると期待できる。

以上のような観点に立脚して、本研究では、酵素を内包したマイクロカプセル粒子の表面（カプセルの殻の中）に光触媒粒子を担持することで、カプセル表面（明反応）で光エネルギーを化学エネルギーに変換し、それに続く酵素反応をカプセル内部（暗反応）で行わ

せることで反応が進行する機能性粒子（マイクロリアクター）の創製を目的としている（Fig. 1）。このように設計することで、粒子内部に固定した酵素の光による失活を防ぐことが可能になると期待される。

この構想を実現するために、半導体光触媒粒子と酵素を複合した反応系（電子伝達系）を構築した。構築しようとしている電子伝達系の反応模式図をFig. 2に示す。光触媒として TiO_2 粒子、 CO_2 固定化反応を担う触媒としてFDHを用いた。また TiO_2 と酵素をつなぐ電子伝達物質にはメチルビオローゲン（MV）を用いた。しかしながら、このFDHはMVに感受性がなくNAD（H）依存であるため⁴⁾、NAD（H）とMVの間を触媒する酵素としてジアホラーゼ（DAH）を介して系を構成した。この電子伝達系の特徴は、水と CO_2 をそれぞれ電子と炭素の供給源として蟻酸を合成できるところにある。また本系はNAD（H）の再生反応を利用しているため、他のNAD依存の酵素を利用することも可能であると期待される。

本研究では、本電子伝達系を構成する TiO_2 の光触媒反応について速度論的な検討を行い、また電子伝達系反応が進行するかを回分式で調べた。次に、電子伝達系を構成する明反応部（ TiO_2 光触媒反応）と暗反応部（酵素反応）をセラミック膜で隔てた新規な人工光合成反応器を構築し、上述したコンセプトで電子伝達系が機能するかを調べた。さらに電子伝達系の暗反応部をゲル粒子に固定化するために、 NAD^+ を架橋剤を用いてアルギン酸ナトリウムに共有結合させ、これを用いて2つの酵素を固定化したアルギン酸カルシウムゲル粒子を作成し、電子伝達系の暗反応部を粒子内部で発現可能であるかを調べた。

Fig. 2 Schematic diagram of the novel electron-transfer system with mediator

Fig. 3 Time course of MV^+ production by TiO_2 particles under UV-irradiation

研究成果の概要

1. 電子伝達系の明反応部を構成する TiO_2 粒子の光触媒活性の検討

電子伝達系の明反応部を構成する TiO_2 粒子による MV^+ 生成反応について検討した。結果をFig. 3に示す。 MV^{2+} 濃度または TiO_2 濃度が高くなるにつれて MV^+ の生成速度および到達する（飽和した）濃度が大きくなった。ここで TiO_2 光触媒反応に関わる化学平衡によって、 MV^+ 生成が飽和しているのであれば、 TiO_2 濃度を増加させても到達する MV^+ 生成濃度は変わらないはずである。しかしながら、 TiO_2 濃度の増加に伴って、到達する MV^+ 生成濃度も変化していることから、 TiO_2 光触媒反応とは関係なく起こる MV^+ が消失する反応経路が存在し得ることが示唆された。

また MV^+ 生成が TiO_2 表面反応であると仮定して、その初速度に対してLangmuir-Hinshelwood式の適用を試みた。 MV^{2+} の還元反応が、反応基質の触媒表面への吸脱着平衡が常に成立し、吸着濃度に対して一次で反応するというLangmuir-Hinshelwood機構に従うとすると、その反応速度 v は次のように書くことができる。

$$V = \frac{kK[MV^{2+}][TiO_2]}{1 + K[MV^{2+}]} \quad (1)$$

ここで、 k は単位 TiO_2 濃度あたりの TiO_2 表面反応の見かけの速度定数、 K は MV^{2+} の TiO_2 表面への吸着平

衡定数である。この式を変形すると次式が導かれる。

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{kK[TiO_2]} \cdot \frac{1}{[MV^{2+}]} + \frac{1}{k[TiO_2]} \quad (2)$$

これらの式中の $[MV^{2+}]$ の値が、反応の初期段階においては、系内に投入した $[MV^{2+}]$ に等しいとすると、(2)式より、初速度の逆数に対して投入 MV^{2+} 濃度の逆数をプロットすれば直線関係が得られることになる。そこで、 TiO_2 濃度を一定にして、投入 MV^{2+} 濃度を変化させて光触媒反応実験を行なった時の初速度の逆数 ($1/v_0$) を投入 MV^{2+} 濃度の逆数 ($1/[MV^{2+}]$) に対してプロットを行なった。その結果をFig. 4に示

Fig. 4 $1/v$ vs. $1/[MV^{2+}]$ plots using the results shown in Fig. 3(A)

Fig. 5 Initial rate of the production of MV^+ as a function of the concentration of MV^{2+}

(A) Effect of concentrations of MV on formate production by the electron-transfer system

(B) Effect of concentrations of $NADH$ on formate production by the electron-transfer system

Fig. 6 Time course of formate production by the electron-transfer system

した。グラフからプロットが全体的には良い直線性を有していることが分かる。(2) 式より、このプロットの傾きと切片から、 TiO_2 表面反応の見かけの速度定数 k および吸着平衡定数 K を見積もり、(1) 式に援用

して得られる理論線を各条件での初速度の実測値とともに重ねてプロットしたものをFig. 5に示した。データから得られた k および K を用いて描いた理論線が、実験で得られた初速度とよく一致していることが分かる。これらの結果から、反応のごく初期の段階における MV^{2+} の還元反応では、Langmuir-Hinshelwood機構で説明されるような、 TiO_2 表面に吸着した MV^{2+} の濃度に対して一次で反応するような機構が支配的に起こっているものと考えられる。

2. 本電子伝達系の検討

TiO_2 粒子による MV^+ 生成反応では、 TiO_2 濃度の増加に伴って（飽和した） MV^+ 生成量、すなわち MV^{2+} が MV^+ に変換される量が増加した。一方、仕込み MV^{2+} 量に対する MV^+ 生成量の割合は、 MV^{2+} 濃度の増加に伴わずほぼ一定であることが確認された。そこでFig. 3の結果から MV^{2+} が全て MV^+ に変換されると予想される TiO_2 濃度においてFig. 2に示した電子伝達系の反応パフォーマンスを回分式で調べた。 MV^{2+} または $NADH$ 濃度を変化させた時の蟻酸生成の経時変化をFig. 6に示す。いずれの条件においても蟻酸は経時的に生成され、電子伝達系が機能することが確認できた。Fig.6(a)から分かるように、 MV^{2+} 濃度の増加に伴って、蟻酸生成速度がほぼ直線的に増加している。このことから、 TiO_2 光触媒反応で生成した MV^+ を利用して、後続の酵素共役反応が進行していることがわかる。また $NADH$ 濃度を変化させた時 (Fig.6(b)), 3 mM以降で蟻酸生成速度が一定となる傾向が見られた。このことから、本実験範囲で $NADH$ 濃度は3 mM程度で蟻酸生成を触媒するFDHの最大速度で反応が進行することがわかった。

3. 二重管型反応器への電子伝達系の適用（新規な人工光合成反応器の提案）

次に、電子伝達系を構成する光触媒（ TiO_2 光触媒反応）と生体触媒（酵素反応）を分離して機能することを、セラミック膜を内管に装填した二重管型反応器 (Fig. 7) に電子伝達系を組み込むことで検討した。ここでは、セラミック膜で電子伝達系の光触媒反応と酵素反応を隔てることで、セラミック膜の細孔構造のために光は透過できず、電子伝達物質のような低分子は通過できるため、電子伝達系を光照射場（セラミック

Fig. 7 The photo-bioreactor separating a photocatalytic reaction and biocatalytic reaction with ceramic filter

膜外側)と暗所(セラミック膜内側)に分離することができる。尚、今回の実験の目的は、提案した人工光合成システムが構築可能であることを検討することにあるので、 TiO_2 の光触媒反応は水よりも酸化されやすい犠牲剤(エタノール)を電子供給源として MV^+ の

生成を行い、一方、酵素は遊離の状態セラミック膜内管に供給した。実験結果をFig. 8に示す。横軸は照射時間、縦軸は蟻酸濃度である。照射開始から10分まで(図中I)は TiO_2 粒子の懸濁した1 M エタノール水溶液を外管に留めたまま送液はおこなわず、照射10分後から外管と内管に各溶液の送液を開始した。図中IIの時間で、2つの溶液の混合溶液が反応器内管側に満たされた。この時から混合溶液のサンプリングを開始した。その結果、各溶液が反応器に連続的に供給され続けている間(図中III)、蟻酸濃度が徐々に増加し定常状態に達した。酵素は500W 高圧水銀ランプの光によってすぐに変性・凝集を起こしてしまうことが実験によって確かめられている。したがって、このように照射が継続されている間に蟻酸が生成して蓄積しているということは、セラミック膜内管を移動する酵素が光によって変性していないことを示している。この結果より、本研究で提案した光触媒粒子と酵素を分離した人工光合成システムが有効に機能していることが示された。また本運転条件では、酵素溶液を連続的に供給し続ければ、約0.4mM程度の蟻酸を連続的に得られることがわかった。今後は、暗反応部を構成する酵素(共役)反応系を担体に固定化し、反応器の反応パフォーマンスを検討していく。

4. FDH/ NAD^+ /DAH固定化酵素粒子の作成

これまでの検討によって、電子伝達系の光触媒反応

Fig. 8 Irradiation time course of formate production by the photo-bioreactor

と酵素反応を分離した状態で機能させることが可能であることを実験的に確かめることができた。従って、目的とする機能性粒子を創製するための次の段階として、電子伝達系の酵素反応部位（酵素共役系）を1個粒子で発現させることを試みた。ここで、酵素共役系が長時間連続的に機能する粒子を創製するためには、構成するFDH、DAH及びNAD（H）の全てを（単一担体内に）固定した固定化酵素粒子を作製する必要がある。この場合、2つの酵素反応をつなぐNAD⁺が比較的低分子であるため、通常用いられる包括法等の酵素固定化法ではNAD⁺が担体内から漏出してしまふ。一般に、2つ以上の酵素反応を利用した共役反応系を固定化酵素として利用しようとする場合、NAD⁺を高

分子化させるという手法がこれまでの研究で採られている。本系においてもNAD（H）を継続的に利用する為にはNAD（H）を高分子化する必要がある。そこでアルギン酸ナトリウムにNAD⁺を結合試薬（EDC）を用いて結合させたアルギン酸NAD⁺（Alg-NAD⁺）を調製した。反応模式図をFig. 9に示す。このような反応で合成したAlg-NAD⁺と2つの酵素の溶解した溶液をノズルからCaCl₂溶液に滴下することでゲル状の固定化酵素粒子を作成した。得られた固定化酵素を用いてMV⁺生成反応を行わせたところ、反応の進行が確認できた。Fig.10はMV⁺生成が確認された際に撮影した固定化酵素粒子である。写真から分かるように、MV⁺の特徴的な色である青が粒子のみを着色してい

Fig. 9 The reaction scheme for the coupling of NAD⁺ with alginate

Fig. 10 Photograph of MV⁺ Production by NAD⁺-bonded Gel Beads

る。このことから2つの酵素を用いた共役反応がAlg-NAD⁺を利用して進行していることが確認できた。従って今後は、アルギン酸ポリマーに架橋されたNAD⁺量を測定し、目的の電子伝達系反応(CO₂固定化反応)の反応条件を検討していく。

今後の研究の見通し

本研究では、酵素を内包したマイクロカプセル粒子の表面(カプセルの殻の中)に光触媒粒子を担持することで、カプセル表面(光照射場)で光エネルギーを化学エネルギーに変換し、後続の生体触媒反応をカプセル内部(暗所)で行わせることが可能な機能性粒子(マイクロリアクター)を創製することを目的として、これを実現するためにTiO₂光触媒反応と酵素反応を電子伝達物質を介して複合した電子伝達系を構築し、この電子伝達系が実際に機能することを実験的に検証した。さらに、セラミック膜を内管に装填した二重管型反応器を構築し、電子伝達系の光触媒反応と酵素反応をセラミック膜で隔てることで、それぞれの反応を光照射場と暗所に分離して装置を運転したところ、光による酵素の失活を招くことなく反応が進行していることが実験的に確認できた。従って、我々の提案する人工光合成システムが有効であることが確かめられた。今後は、電子伝達系を構成する暗反応部(酵素共役反応系)を固定化酵素として本リアクター・システムに組み込み、反応パフォーマンスを検討していく。また今回の検討では、水よりも酸化されやすいエタノールを電子供給源として検討したが、さらに水を電子供給源とした人工光合成反応器構築の可能性についても検討する必要がある。この場合、光触媒反応部の反応速度が遅くなるため、さらに反応条件の詳細な検討を行っていかなくてはならない。これについては現在、本電子伝達反応の最適化を行うために、それぞれの触媒反応の速度論的な解析を現在進めているところである。

さらに、本研究の目的である機能性粒子を創製するための前段階として、電子伝達系を構成する酵素共役

反応系を1個粒子で発現させることを試みた結果、FDH, DAH, NAD⁺を粒子内部で固定化することに成功した。従って、今後は、本研究で提案した人工光合成反応器への適用を行うとともに、二重管ノズルを用いてTiO₂粒子を殻とするマイクロカプセル型固定化酵素粒子の創製に展開していく予定である。

我々の提案する人工光合成システムは、従来から検討されている光触媒と生体触媒を用いた電子伝達系のように同一反応場で反応を進行させるのではなく、電子伝達系を保存したままで光触媒にのみ光を照射し、後続の酵素反応は「暗反応」として進行させる点に特徴がある。本システムの実現可能性を確認するために検討した電子伝達系は、光を利用して水とCO₂から蟻酸を合成できる。またNAD(H)の再生プロセスを有している。このことは、例えば、本系にさらに2つのNAD(H)依存酵素(ホルムアルデヒド脱水素酵素、アルコール脱水素酵素)を組み込むことで、CO₂と水のみを原料としてメタノールを生成させるような電子伝達系も実現可能であると期待できる。またCO₂固定化に留まらず、光エネルギーを反応の駆動力として様々な酵素を用いた合成反応を進行させ得ることが期待される。

参考文献

- 1) T. Inoue, A. Fujishima, and K. Honda, *Nature*, 277, 637-638 (1979)
- 2) D. Madndler and I. Willner, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 805-811 (1986)
- 3) S. Kuwabata, K. Nishida, R. Tsuda, H. Inoue, and H. Yoneyama, *J. Electrochem. Soc.*, 141, 1498-1503 (1994)
- 4) J. S. Blanchard and W. W. Cleland, *Biochemistry.*, 19, 3543-3550 (1980)

本助成金による主な発表論文

Advanced powder technology に掲載予定