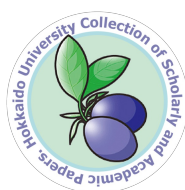




HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	多孔質ガラスの合成と生体触媒の固定化に関する研究
Author(s)	宇尾, 基弘
Degree Grantor	University of Tokyo
Degree Name	博士(工学)
Issue Date	1992-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/29722
Type	doctoral thesis
File Information	thesis.pdf



学位論文

多孔質ガラスの合成と
生体触媒の固定化に関する研究

1991 年 12 月

東京大学大学院工学系研究科

金属工学専攻

宇尾 基弘

目次

第1章 緒論

§ 1	生体触媒	1
1-1	生体触媒の歴史	1
1-2	生体触媒の特性と応用	2
1-3	生体触媒の固定化	3
§ 2	多孔質ガラス	7
2-1	はじめに	7
2-2	細孔により物質の分離を行うもの（分離膜）	9
2-3	細孔表面への吸着を利用するもの	13
2-4	細孔内部に他の物質を充填するもの	14
§ 3	本研究の目的	16
	参考文献	17

第2章 分相溶出法による多孔質ガラスの作製

§ 1	緒言	18
1-1	緒論	18
1-2	既往の研究（ $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3-\text{SiO}_2$ 系ガラスの分相及び溶出挙動）	18
1-2-1	原ガラス組成	18
1-2-2	分相過程	21
1-2-3	溶出過程	24
1-2-4	ハロゲンの添加による分相・溶出過程への影響	27
1-3	研究の目的	29
§ 2	実験方法	30
2-1	多孔質ガラスの合成	30
2-2	測定・分析	30
§ 3	結果及び考察	32
3-1	原ガラス及び多孔質ガラス中のハロゲン濃度	32
3-2	多孔質ガラスの細孔構造	33
3-3	熱処理温度と細孔構造の関係	33
3-4	熱処理時間と細孔構造の関係	38
3-5	ハロゲンの添加による不混和温度の変化	41
3-6	ハロゲンの添加による溶出挙動の変化	42
§ 4	小括	44
	Appendix Hallerの理論	45
	参考文献	49

第3章 水銀還元酵素の固定化と水銀センサーの作製	
§ 1 緒言	50
1-1 緒論	50
1-2 既往の研究（ガラス担体への酵素の固定化）	50
1-2-1 固定化担体	50
1-2-2 固定化方法	52
1-2-3 固定化酵素のpH－活性曲線	55
1-2-4 固定化酵素の温度－活性曲線	55
1-2-5 固定化酵素の安定性	55
1-2-6 固定化酵素の応用	59
1-3 水銀還元酵素（reduced NADP-mercuric ion oxidoreductase）	59
1-4 既往の研究（水銀の定量法）	61
1-4-1 放射化分析法	61
1-4-2 冷原子吸光法	62
1-4-3 ELISA法（Enzyme Linked Immunosorbent Assay）	62
1-5 研究の目的	63
§ 2 実験方法	64
2-1 水銀還元酵素の精製	64
2-2 酵素の固定法	64
2-3 固定化水銀還元酵素の活性測定	65
2-4 水銀センサーの作製	65
2-5 酵素サイクリング法による水銀センサーの増感	67
2-6 固定化酵素の作製	68
§ 3 固定化水銀還元酵素の特性に関する実験結果及び考察	69
3-1 固定化水銀還元酵素の活性	69
3-2 水銀還元酵素の速度論的定数	72
3-3 固定化酵素のpH依存性	72
3-4 固定化酵素の安定性	72
§ 4 結果及び考察（水銀センサー）	74
4-1 水銀還元酵素単独の水銀センサー	74
4-1-1 pHによるセンサーの感度変化	74
4-1-2 多孔質ガラス担体の影響	74
4-1-3 異種イオンに対する選択性及び阻害	76
4-2 酵素サイクリング法を用いた水銀センサー	76
4-2-1 pHによるセンサーの感度変化	76
4-2-2 固定化水銀還元酵素量とセンサーの感度の関係	76
4-2-3 酵素サイクリング法を用いた水銀センサーの選択性・阻害	79
4-3 他の分析法との比較	82
§ 5 小括	83
Appendix 酵素反応の速度論	84
参考文献	86

第4章	ゾルーゲル法による多孔質ガラスの合成と微生物の包括固定	
§ 1	緒言	89
1-1	緒論	89
1-2	既往の研究（ゾルーゲル法による多孔性非晶質材料の合成）	90
1-3	生体触媒としての微生物	92
1-4	固定化微生物	92
1-5	酵母の生活環	93
1-6	研究の目的	94
§ 2	実験方法	95
2-1	多孔質ゲルの合成	95
2-2	固定化微生物の作製	97
2-2-1	酵母の培養及び孢子形成	97
2-2-2	ゾルーゲル法による酵母孢子の固定化	97
2-3	分析	98
§ 3	結果及び考察	99
3-1	TMOS－塩酸系溶液からの多孔質ゲルの合成	99
3-1-1	多孔質ゲルの細孔構造と細孔分布曲線	99
3-1-2	出発溶液中のメタノール濃度と細孔径の関係	99
3-2	TMOS－PEG系溶液からの多孔質ゲルの合成	101
3-2-1	出発溶液組成と多孔体の細孔構造の関係	101
3-2-2	TG／DTAによるTMOS－PEG系多孔質ガラスの熱的挙動の分析	105
3-3	TMOS－PEG系多孔質ゲル中に固定化した酵母の活性	105
§ 4	小括	108
	参考文献	109
第5章	結言	110
	謝辞	113

第 1 章

緒 論

§ 1 生体触媒

1-1 生体触媒の歴史

人類は古くから無意識の内に微生物の発酵能力を利用してきた。洋の東西を問わず、神話の中には酒に関する記述がしばしば見られる。古くは紀元前3000年頃のバビロニア人がビールを作っていたことが知られており、日本でも古事記の中に米を温醸し酒を作ったと言う記述がある。また聖書の中にはパンや凝乳（ヨーグルト）に関する記述もあり、人類が紀元前から多種の微生物をうまく利用していたことが伺われる。これらはいずれも微生物の自然発酵を利用したものであり、自然発酵の典型的な例をワインや納豆の製造に見ることが出来る。ワインはぶどうの搾り汁がぶどう果実の皮に付着した多くのぶどう酒酵母（*Saccharomyces ellipsoideus*）により発酵することを利用しており、他の果実では酵母の数が少ないため正常な発酵が得られない。また納豆は大豆をわらで包むことにより、わらに付着した枯草菌の一種である納豆菌（*Bacillus natto*）の発酵能力を利用している。微生物の存在が知られるようになったのは17世紀後半であるから、人類はその存在を知る遙か以前から経験により微生物の発酵を実に巧妙に利用してきたことになる。

微生物を最初に発見したのはオランダのLeeuwenhock（1632～1723）であり、彼は自作の顕微鏡を用いて雨水や唾液の中に無数の微小な生物の存在を確認して、その結果を1683年にイギリス王立協会に報告している。しかしこれらの生物が果たす重大な役割について知られるのは19世紀になってからであった。発酵現象が微生物の働きによるものであることを実証したのがPasteur（1822～1895）である。Pasteurはアルコール発酵を起こす微生物（酵母）と酒を酸敗させる微生物（乳酸菌）が異なることを発見した。ほぼ同時期にKoch（1843～1910）は家畜の炭そ病菌を発見し、病気が微生物により引き起こされることを明らかにした。またKochはゼラチンの固体培地を用いた細菌の分離にも成功している。今日の微生物学はPasteurとKochの研究に端を発して、以前は経験に頼っていた発酵工業や医学の進歩に大きく寄与したことは言うまでもない¹⁾。

これらの微生物の働きが微生物内の酵素の働きによるものであることがわかったのは微生物の発見から一世紀以上も経過した後のことであった。最初に発見された酵素は胃液に含まれるペプシンである。18世紀後半のReaumurやSpallanzaniらの胃液の働きに関する研究からSchwanによりペプシンが発見されることになる。

酵素を“enzyme”と命名したのはドイツのKuhneである。enzymeは「酵母（zyme）の中に（en）ある」というギリシャ語に基づいて名付けられたものである。微生物の発酵作用と

酵素の触媒反応の関連を示したのはBuchnerである。Buchnerは酵母の抽出物を用いて細胞がなくても酵素の働きによって発酵が起こることを証明し、この研究により酵素の有用性が認識されることとなった。学問としての「酵素学」はBuchnerのこの研究に端を発している。以降、現在までに多数の酵素が発見され、単離されており、現在発見されている酵素は2000種類を超える。

酵素の反応機構が無機触媒と異なることは古くから知られていたが、FischerやHenriは酵素が酵素－基質複合体を形成すると言う考え方を提唱した。酵素の反応機構を理論的に解析したのはMichaelisとMentenである。Michaelisらは酵素－基質複合体の考え方を導入し、それまで知られていた酵素反応初速度の飽和現象などを理論的に説明し、酵素反応速度論の基礎を確立した²⁾。

今日では酵素学だけでなく、X線結晶解析技術や遺伝子工学の進歩にともない、酵素（タンパク質）の一次構造を解析する手法が確立され、一部の酵素については立体構造の解析も行われており、酵素の反応機構の解析が行われようとしている。

1-2 生体触媒の特性と応用

生体触媒による生化学反応は一般の化学触媒による反応に比べて以下のような利点を持っている。

- 1) 反応条件が温和なため、所要エネルギーが大幅に節減でき、装置の簡素化が可能になる
- 2) 基質特異性が厳密なため、種々の化合物の混在下でも目的とする化合物のみを反応させ得る
- 3) 反応の立体特異性や位置特異性を持つため副生産物が少なく、収率の向上が可能であり、そのため精製過程が簡略化でき、資源の有効利用が容易になる

近年、特に省資源、省エネルギー、環境汚染の防止が求められているが、先に述べたような特徴を持つ生化学反応は十分にこれらの目的に合致するものであり、そのため酵素を含めた生体触媒の工業への応用が各分野で検討されている。

生体触媒の代表例である酵素はタンパク質からなる触媒であり、次のような特徴を有している。

- 1) 常温、常圧、中性付近のpH領域といった温和な反応条件下での優れた触媒作用
 - 2) 基質に対する厳密な選択性（基質特異性）
 - 3) 反応の立体特異性
 - 4) 複雑な構造の基質分子の特定の部位にだけ反応を起こし得る位置特異性
- など、一般の化学触媒では到達し難い特性を持っている。

また微生物菌体や細胞内小器官（オルガネラ）は組織内に多段階の酵素系を有し、通常

の化学反応や単純な酵素反応では触媒不可能な複雑な反応を触媒し得るという利点を持つ。

これら生体触媒の物質識別能力を分析に利用したものが“バイオセンサー”であり、物質識別を含めた触媒反応を物質合成に利用したものが“バイオリアクター”でありTable 1-1, 1-2に示すように多くの生体触媒がバイオセンサー及びバイオリアクターに用いられている³⁾。

バイオセンサーの形態はFig. 1-1に示すようにトランスデューサー上に直接、生体触媒を保持するものと生体触媒を充填したカラムでの反応後に物理化学デバイスにより検出するものがある。またバイオリアクターはFig. 1-2に示すように生体触媒を充填したカラムを用いる連続方式と培養槽中に生体触媒を投入するバッチ方式がある。上記の用途において生体触媒は多くの場合、水に不溶性の担体に固定化した状態で用いられる。それは次のような理由による。

1-3 生体触媒の固定化

微生物学や生化学の進歩により微生物や酵素が広く工業に利用されるようになったが、多くの場合そのプロセスはバッチ式、すなわち基質溶液に生体触媒を投入し、反応後に除去する方法が取られてきた。この方法では生体触媒は唯一度の反応のみに利用され、たとえ反応後にその触媒能力が残っていても回収が困難なため再利用することはできない。特に酵素反応の場合、反応終了後の溶液中から酵素のみを変性させずに回収することは非常に困難であるため、実際には反応液中の酵素を変性・失活させて除去し反応生成物を分離している。すなわちバッチ式では酵素を一反応毎に捨てることになり酵素の精製に必要なコストを考えると、非常に不経済な使用方法と言わざるを得ない。

もし酵素の持つ特異的な触媒活性を保持したまま、安定な水に不溶性の酵素、すなわち「固定化酵素」を作ることができるならば上記のバッチ式の欠点の多くは解消され、特異性の高い生体触媒である酵素を一般の有機化学反応に用いられている固体触媒と同様に取り扱うことができ、酵素の利用方法として非常に有利である。

水に不溶性となった酵素が活性を有することはNelsonらによって1916年に初めて報告された。Nelsonらは骨炭に吸着されたインベルターゼが吸着された状態でももとの酵素と同等の活性を示すことを見いだした。またSumnerはウレアーゼをアルコールと食塩の存在下で不溶化させたものが酵素活性を示すことを報告している。酵素の有効利用を目的として積極的な酵素の固定化を最初に行ったのはGrubhoferらであると思われる。Grubhoferらはポリアミノスチレン樹脂をジアゾ化したものを担体としてカルボキシペプチダーゼ等を固定化することに成功している。Grubhoferらの研究以降多くの固定化酵素に関する研究が行われており、1969年には千畑らが固定化アミノアシラーゼを用いたDL-アミノ酸の光学分割の酵素反応の工業化に初めて成功している⁴⁾。

Table1-1 バイオセンサー（酵素センサー）の例

センサー	酵 素	固定化法	電気化学 デバイス	安定性 (日)	応答時間 (分)	測定範囲 (mg·l ⁻¹)
グルコース	グルコースオキシダーゼ	共有結合法	酸素電極	100	1/6	1~5×10 ²
エタノール	アルコールオキシダーゼ	架橋化法	酸素電極	120	1/2	5~10 ¹
ビルビン酸	ビルビン酸オキシダーゼ	吸着法	酸素電極	10	2	10~10 ¹
尿酸	ウリカーゼ	架橋化法	酸素電極	120	1/2	10~10 ¹
L-アミノ酸	L-アミノ酸オキシダーゼ	共有結合法	アンモニア ガス電極	70	—	5~10 ²
L-グルタミン	グルタミンナーゼ	吸着法	アンモニア イオン電極	2	1	10~10 ⁴
L-グルタミン酸	グルタメートデヒドロゲ ナーゼ	吸着法	アンモニア イオン電極	2	1	10~10 ⁴
L-アスパラギン	アスパラギナーゼ	包括法	アンモニア イオン電極	30	1	5~10 ¹
L-チロシン	L-チロシンデカルボキシ ラーゼ	吸着法	炭酸ガス電 極	20	1~2	10~10 ⁴
L-リシン	L-リシンデカルボキシラ ーゼ, アミノオキシダー ゼ	架橋化法	酸素電極	—	1~2	10 ¹ ~10 ⁴
L-アルギニン	アルギニンデカルボキシ ラーゼ, アミノオキシダー ゼ	架橋化法	酸素電極	—	1~2	10 ¹ ~10 ⁴
L-フェニルアラ ニン	L-フェニルアラニンアン モニアリアーゼ	—	アンモニア ガス電極	—	10	5~10 ²
L-メチオニン	メチオニンアンモニアリ アーゼ	架橋化法	アンモニア ガス電極	90	1~2	1~10 ¹
尿酸	ウレアーゼ	架橋化法	アンモニア ガス電極	60	1~2	10~10 ¹
コレステロール	コレステロールエステラ ーゼ	共有結合法	白金電極	30	3	10~5×10 ³
中性脂質	リパーゼ	共有結合法	pH電極	14	4	5~5×10
リン脂質	ホスホリパーゼ	共有結合法	白金電極	30	2	10 ² ~5×10 ³
モノアミン	モノアミノオキシダーゼ	包括法	酸素電極	7<	4	10~10 ²
ペニシリン	ペニシリナーゼ	包括法	pH電極	7~14	0.5~2	10~10 ¹

Table1-2 固定化生体触媒を用いたバイオリアクターの例

酵 素 ・ 微 生 物	応 用
ペプシン, キモシン, キモトリブシン, アルカリプロテアーゼ, レニンなど	凝乳カードの製造
プロナーゼ, キモトリブシン, 微生物プロテアーゼなど	タンパク加水分解物の製造
細菌プロテアーゼ	ブタ・インシュリンのヒト・インシュリンへの変換
<i>Escherichia coli</i>	グルタチオンの生産
酵 母	グルタチオンの生産
パニニン	ビールの濁りの除去
リパーゼ	動植物油の加水分解, 油脂の改質
ク	メントールの光学分割
ク	グリセリドの合成
<i>Aspergillus terreus</i>	イタコン酸の生成
エステラーゼ含有菌体	L-メントールの製造
カタラーゼ	過酸化水素の分解
リゾチーム, 微生物溶菌酵素	反応液, 空気などの殺菌
解糖系酵素, 酵母菌体	グルコースからのエタノールの生産, ビールの製造
酵 母	グルコースからのグリセロールの生産
<i>Gluconobacter oxydans</i>	グリセロールのジヒドロキシアセトンへの酸化
D-オキシニトラーゼ	光学活性 α -ヒドロキシニトリルの合成
<i>Claviceps purpurea</i>	アルカロイドの生産
<i>Brevibacterium</i> sp.	ニトリルのアミドへの変換
<i>Methylosinus</i> sp.	プロピレンオキシドの生成
<i>Mycobacterium</i> sp.	エチレンオキシドの生成
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	ブタノール-アセトン発酵
<i>Clostridium beijerinckii</i>	イソプロパノール-ブタノール-エタノール発酵
酵母 あるいは酵母 + 細菌	グルタチオンの生産
<i>Bacillus subtilis</i>	α -アミラーゼの生産
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	α -アミラーゼの生産
<i>Streptomyces fradiae</i>	プロテアーゼの生産
<i>Myxococcus xanthus</i>	プロテアーゼの生産

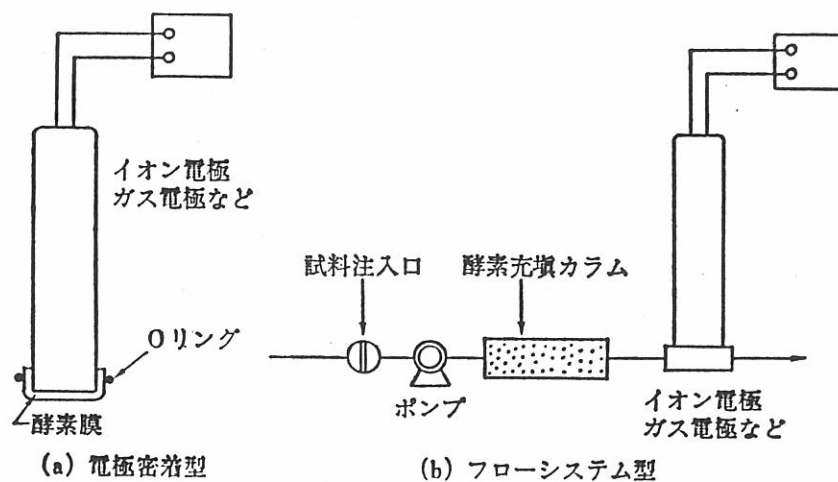


Fig.1-1 バイオセンサーの形式

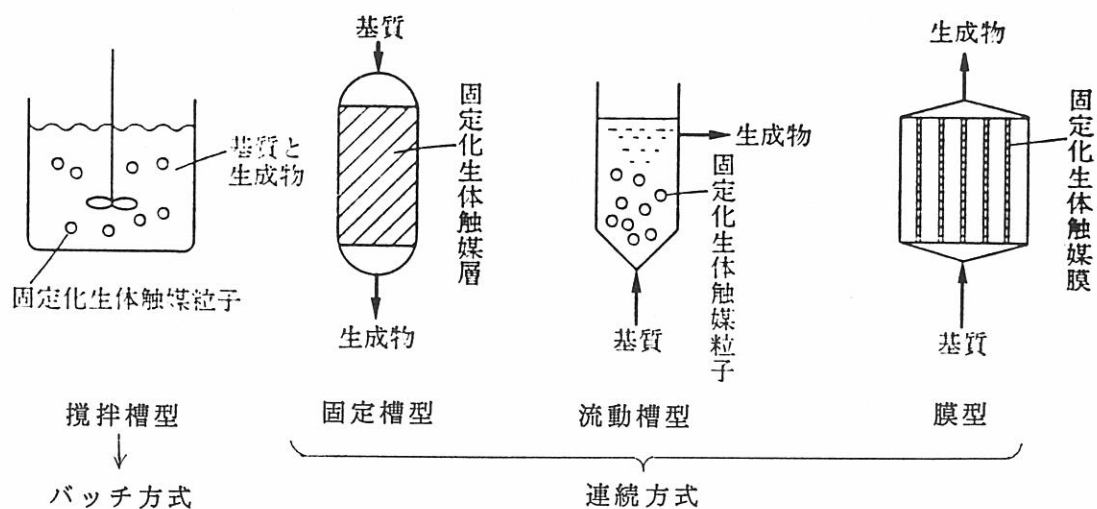


Fig.1-2 バイオリアクターの形式

酵素の固定化方法はこれまでに数多く開発されており、それらは次の三種類の方法に大別される。Fig. 1-3は固定化酵素の形態を模式的に示している。

(1)担体結合法：水不溶性の担体に酵素を結合させる方法

(2)架橋法：担体を使用せずに酵素を2個もしくはそれ以上の官能基を持つ試薬と架橋反応させて不溶化する方法

(3)包括法：酵素をゲルの微細な格子の中に包み込むか、半透性のポリマーの皮膜によって被覆する方法

各固定化方法の長所・短所を比較するとTable1-3のようになる。

担体結合法は最も古くから行われている酵素の固定化法であり、酵素と担体の結合様式によって物理的吸着法，イオン結合法，共有結合法に分類される。共有結合による固定化酵素の作製はTable1-3に示す様に固定化处理が複雑で、固定化時の酵素の失活が起こりやすいなどの欠点があるが、反面、安定した固定化酵素が得られた場合には酵素の担体からの脱離が少なく、酵素活性が長期間安定に保たれ熱的安定性も増加するなど他の固定化法にない長所を持っているため、固定化酵素の連続使用を考えた場合には有利な固定化法であると考えられる。

共有結合法で酵素を固定化するための担体としてはセルロース等の多糖類やポリビニルアルコール，ポリスチレン等の有機系担体と共に多孔質ガラスが広く用いられている。多孔質ガラスへの酵素・微生物の固定化は多孔質ガラスの開発元であるコーニング社のMasonやWeetallらによって始められており、有機系担体に固定化した物より安定な固定化酵素が得られることなどから、これまでに多数の酵素の固定化に関して報告が成されている。

§ 2 多孔質ガラス

2-1 はじめに

多孔質ガラスにはガラスの分相や結晶化を利用したものと発泡剤を使用して多孔質にしたガラスや、微細なガラス粒子を焼結したものがあるが、ここでは分相・結晶化を利用した多孔質ガラスの機能化について述べる。

多孔質ガラスは米国コーニング社により約40年前に開発された。このガラスを高温で処理し、無孔化したものは96%の高ケイ酸質で「バイコールガラス」の商標で知られている。一般に多孔質ガラスはガラスの分相または結晶化を利用し、一方の相を酸溶液などで溶出することにより得られる。代表的な多孔質ガラスとしてはホウケイ酸ガラスの分相現象を利用した「ポーラスバイコール」ガラスがありその工程はFig. 1-4のようになっている⁵⁾。

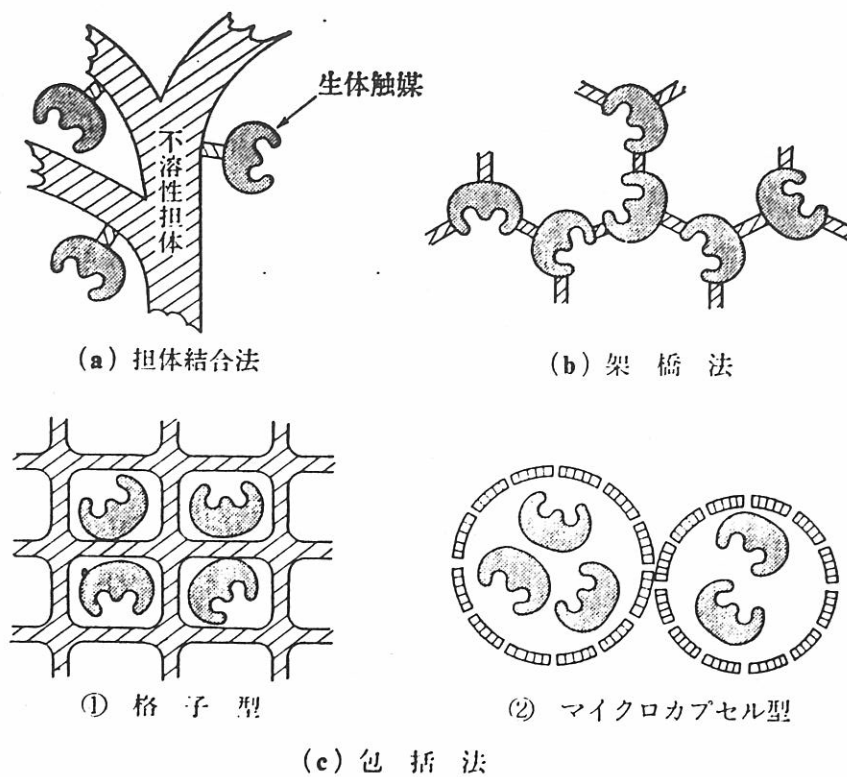


Fig.1-3 固定化生体触媒の模式図

Table1-3 生体触媒固定化法の長所と短所

性 質	固 定 化 法						
	担 体 結 合 法			架 橋 法	包 括 法		
	共有結合法	物理的吸着法	イオン結合法		格子型	マイクロカプセル	リボソーム
調製の難易	難	易	易	難	易	難	難
調製時の酵素の失活の可能性	大	小	小	大	小	大	小
結合力	強	弱	弱	強	強	強	中間
担体の再生	不可(可*)	可	可	一	不可	不可	不可
固定化対象の範囲	狭~中間	中間	中間	中間	広	広	広
固定化の価格	高	低	低	低	中間	中間	中間

原料となる SiO_2 （ケイ砂）, H_3BO_3 （硼酸）, Na_2CO_3 （ソーダ灰）を原料として通常の熔融プロセスにより $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3-\text{SiO}_2$ 系ガラスを作製し（Fig. 1-4(A））、これを成形した後に、組成に応じて $500^\circ\text{C} \sim 800^\circ\text{C}$ の範囲で熱処理を行うことにより、 SiO_2 を主成分とする相と $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3$ を主成分とする2相に分相させる（Fig. 1-4(B））。この分相ガラスを酸溶液に浸漬すると、 $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3$ 相が酸で溶出され、Fig. 1-4(C)のように SiO_2 骨格を持つ多孔質ガラスが得られる。

これまでに数多くの多孔質ガラスが知られており、代表的なものを以下に示す。

- 1) SiO_2 多孔質ガラス： $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3-\text{SiO}_2$ 系ガラスより得られ、前述のポーラスバイコールの他、比較的低 SiO_2 組成より得られるPPG多孔質ガラスがある
- 2) シラス多孔質ガラス⁶⁾：九州に広く分布するシラスに B_2O_3 , CaO 等を添加し分相を起こりやすくして得られる $\text{SiO}_2-\text{Al}_2\text{O}_3$ 系の多孔質ガラスである。
- 3) 多孔質ガラスセラミックス：熔融成形したガラスに熱処理を施し、可溶出の析出結晶を溶出処理して多孔体を得る。 $\text{TiO}_2-\text{SiO}_2$ 系⁷⁾, $\text{CaO}-\text{TiO}_2-\text{P}_2\text{O}_5$ 系⁸⁾等について研究されている。
- 4) ゼルーゲル法による多孔質ガラス：液相からのガラスの合成法であるゼルーゲル法によっても多孔質ガラスは作成可能であり、ケイ素アルコキシドと高濃度の酸⁹⁾または有機溶媒¹⁰⁾, 有機高分子¹¹⁾を用いて多孔質ガラスを作成する方法が報告されている。

多孔質ガラスの特徴として次のような点があげられる。

- 1) 細孔径を $40 \text{ \AA} \sim 10 \mu\text{m}$ の間で制御可能であり、シャープな細孔分布を持つ多孔体が得られる。
- 2) 比表面積を $\text{数 m}^2/\text{g} \sim \text{数百 m}^2/\text{g}$ の範囲で制御可能である。
- 3) SiO_2 骨格から成るため耐熱性があり、種々の有機溶媒や酸の影響を受けず、微生物にも侵されない。
- 4) 機械的強度に優れ、反応容器内での寸法安定性が高い。
- 5) 表面修飾が容易である。

これらの特徴から多孔質ガラスの応用は多岐に渡っており、それらは(1)細孔による物質の分離性を利用するもの (2)細孔表面への他の物質の吸着を利用するもの (3)細孔内部に他の物質を保持するもの の3種類に分類される。以下、それらの用途における多孔質ガラスの改良や応用について述べる。

2-2 細孔により物質の分離を行うもの（分離膜）

膜による気体や液体の分離は蒸留や深冷分離による方法に比べ、省エネルギーの面で優れており、装置や操作が簡便になるという利点があり、活発な研究が行われている。多孔

質ガラスの細孔は円筒状の細孔が絡み合った構造をしており、細孔径が極めて均一であることから分離膜として優れていると考えられる。

(1) 気体－気体分離

気体の分離精製は効率や省エネルギーの面から高温高压下で行われることが多く、分離膜は高温高压に加え、場合によっては腐食性の気体に曝されることになる。多孔質ガラスはこれらの過酷な条件下でも分離膜として使用可能と考えられる。また細孔径を制御することにより気体の分離性を制御することも可能である。Fig. 1-5に膜面積 43.5cm^2 、細孔径 $31\text{\AA}$ の多孔質ガラス中空糸モジュールを用いた場合の 160°C での H_2-CO 混合ガスの分離試験の例を示す¹²⁾。圧力 $50\text{kg}/\text{cm}^2$ で分離係数2.2が得られている。

また重油の脱硫処理の際などに生成される硫化水素を処理する上で、触媒を用いた反応により水素と硫黄に分解できれば、省資源の上からも環境汚染を防ぐ面からも有利となる¹³⁾。硫化水素は極めて腐食性が強く、この分解反応は $800\sim 850^\circ\text{C}$ 、 $2\sim 5$ 気圧の高温高压下で進むため、金属や有機系高分子膜は使用不可能であり、耐熱耐食性に優れた多孔質ガラス管が分離膜に使用されている。

(2) 液体－液体分離

多孔質ガラスは種々の有機溶媒に侵食されないことから、これらに含まれる物質の分離に使用することができる。Fig. 1-6はトルエンに溶解させたポリスチレンの分子量を多孔質ガラスを用いたクロマトグラフィーの結果を示す。このように多孔質ガラスを用いることにより、トルエンのように有機高分子を侵食する溶媒をクロマトグラフィーに使用することが可能になる⁵⁾。また酵素固定化技術を応用して多孔質ガラスをアフィニティークロマトグラフィー用担体に用いた例が報告されている¹⁴⁾。

宮崎県では焼酎の精製にシラス多孔質ガラスを利用しており、酒質低下の原因とされるフーゼル油の除去を行い、濾過後のフーゼル油の成分であるバルミチン酸、リノール酸濃度を濾過により大幅に低減出来ることが報告されている¹⁵⁾。

(3) 逆浸透膜

海水の脱塩法としては蒸留法、イオン交換法、逆浸透法などがあるが、中でも逆浸透法は装置の構造や省エネルギーの面で海水の脱塩または水の高純水化の方法として優れている。逆浸透法では海水にその浸透圧（約24気圧）以上の圧力をかけ、溶媒である水が半透膜を透過する現象を利用しており、半透膜としてはセルロースアセテート系の膜や中空繊維が用いられている。多孔質ガラスは圧力による変形がなく、海水に対して安定であり、透過流量が多い等の特徴から逆浸透法の分離膜に多孔質ガラスを用いる研究が行われている。牧島ら¹⁶⁾はFig. 1-7に示すように有機質の薄膜を塩水側に塗布した多孔質ガラス管を

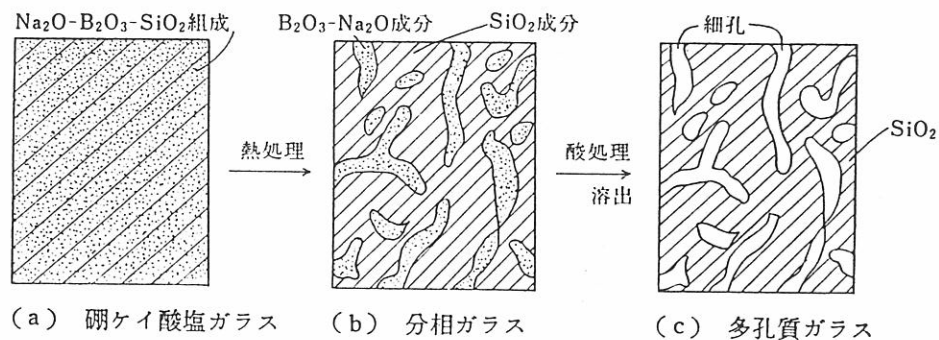


Fig.1-4 ポーラスバイコール型多孔質ガラスの製造工程

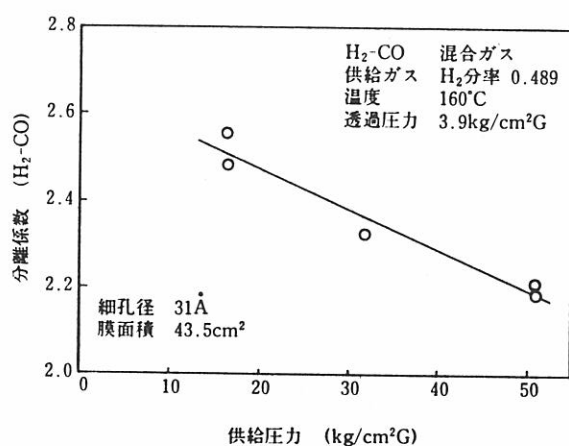


Fig.1-5 多孔質ガラス中空糸モジュールの混合ガス分離係数

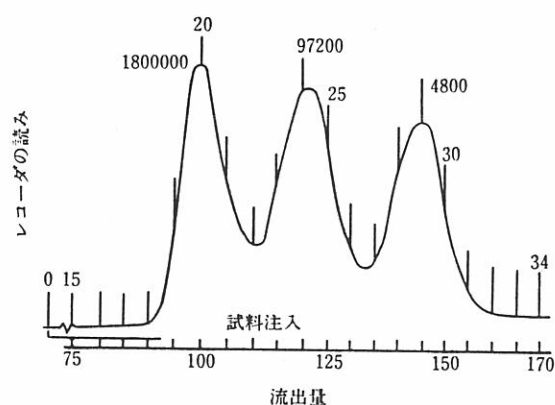


Fig.1-6 多孔質ガラスを使用したクロマトグラフィーによるトルエン中のポリスチレンの分子量決定

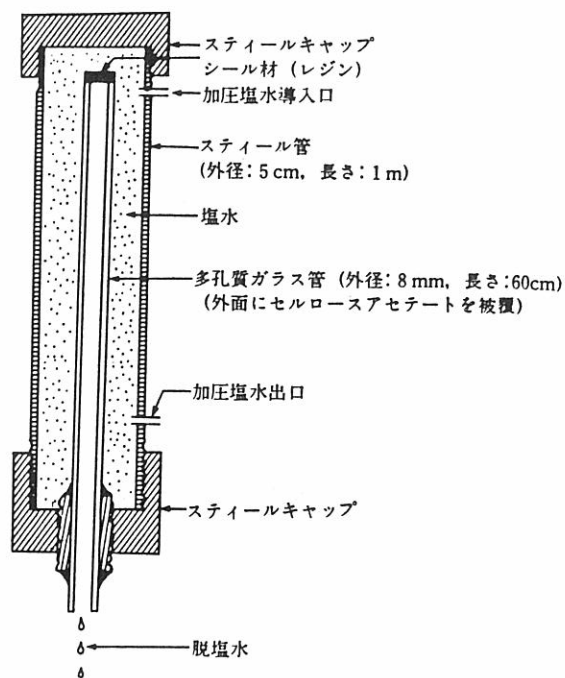


Fig.1-7 多孔質ガラス管を使用した逆浸透法による海水の脱塩装置

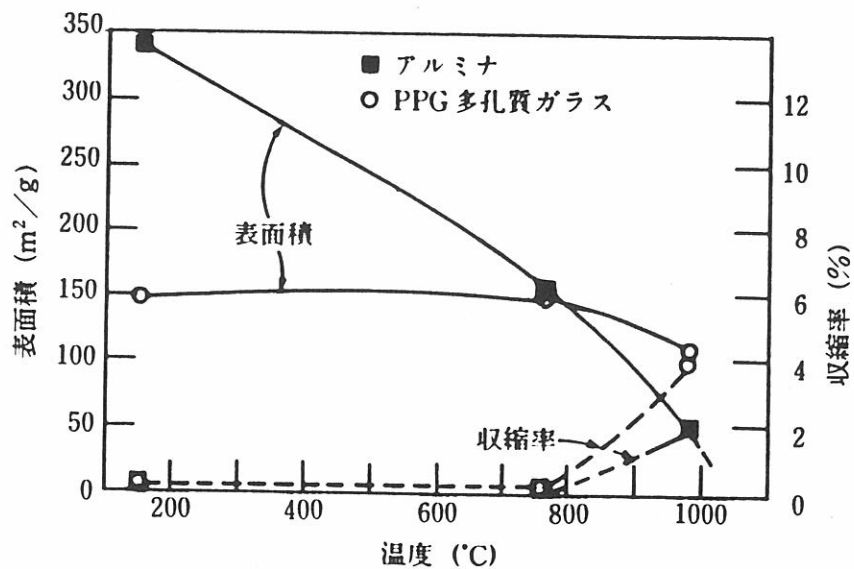


Fig.1-8 多孔質ガラスとアルミナの熱安定性の比較
(24時間加熱後)

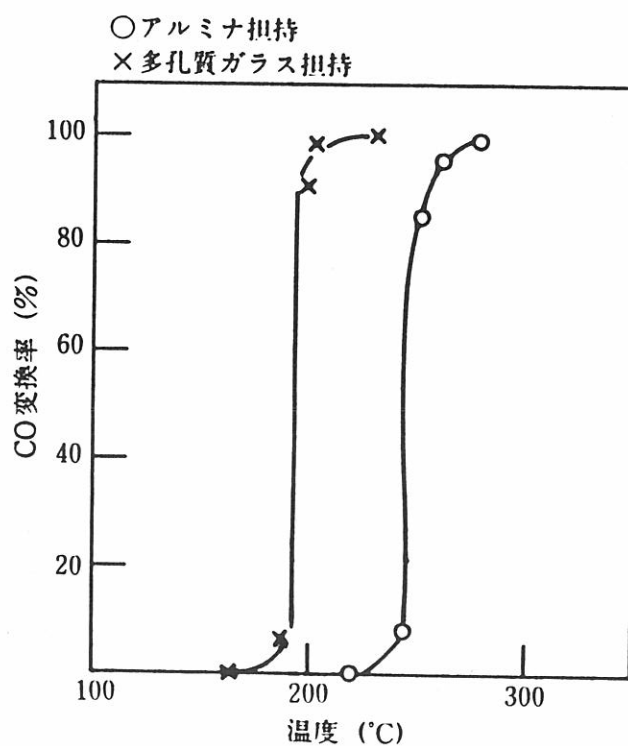


Fig.1-9 白金 (0.3wt%) を担持した多孔質ガラス
及びアルミナのCO酸化反応効率

用いることにより多孔質ガラスを単独で用いられるより高い脱塩率が得られることを報告している。

2-3 細孔表面への吸着を利用するもの

(1) 固定化酵素

酵素は微量で短時間に特異性の高い反応を進行させることから食品、薬品工業に利用されている。酵素は一般に水溶性であり、反応液に直接添加すると反応後に酵素を回収することが困難であることから、高価な酵素を有効に利用するため酵素を有機、無機担体に固定する研究が行われた。固定化酵素は以下のような利点を持っている。

(1) 酵素と生成物との分離が容易になり、また酵素の繰り返し使用が可能になる

(2) 反応の開始、停止を固定化酵素の添加、除去により容易に制御できる

(3) 固定化により酵素の安定性が増加する

多孔質ガラスは無機担体の代表的なものであり、固定化酵素の開発に大きな役割を果たしてきた。この分野に関しては第3章において詳細に述べる。

(2) 無機触媒担体

PPG型多孔質ガラスはその成分が98.6%SiO₂と高ケイ酸質であるため極めて耐熱性に優れており、また細孔容積も0.6cc/gと大きいことから自動車の排気ガス処理用の触媒担体に用いる研究が成されている¹⁷⁾。PPG多孔質ガラスの高温での安定性を示したのがFig. 1-8であり、多孔質アルミナセラミックスでは温度の上昇と共に収縮が見られるのに対し、PPG多孔質ガラスでは800℃までは比表面積、体積の減少は見られず、多孔体の構造が高温まで安定に保持されることがわかる。またPPG多孔質ガラスは熱膨張が小さいため熱衝撃に強いという特性を持っている。Fig. 1-9はPPG型多孔質ガラスと多孔質アルミナに0.3%の白金を担持した場合のCO酸化反応の反応率を示しており、PPG型多孔質ガラスの方が低温でCOの酸化反応が起こっている。このように多孔質ガラスは無機触媒担体としても優れていると考えられる。

(3) 湿度センサー

多孔質ガラスは数十～数百m²/gと比表面積が大きいため種々の気体の吸着能があり、水蒸気も良く吸収する。そのためポーラスバイコールガラスは別名“Thirsty glass”と呼ばれているほどである。そこで水蒸気の吸着によるLa₂O-TiO₂-V₂O₅系多孔質ガラス-セラミックス（細孔径50Å以下）のインピーダンスの低下から湿度を測定できること報告されている¹⁸⁾。

2-4 細孔内部に他の物質を充填するもの

(1) 放射性廃棄物の処理

高レベル放射性廃棄物の処理方法としてガラス固化法が検討されているが、その一つに多孔質ガラスに廃棄物を含浸させ、焼結、無孔化する方法が検討されている¹⁹⁾。Fig. 1-10のように多孔質ガラス粒内部に高レベル放射性廃液を含浸させ、900℃程度で焼結すると表面にSiO₂層が形成され、放射性廃棄物の溶出を抑えることが可能となる。

(2) 半導体ドーピングガラス

ゾルーゲル法により作製された非常に小さな細孔を持つ多孔性ゲルは細孔内に侵入した気体や液体と反応する。野上²⁰⁾はFig. 1-11のようにシリコンエトキシドと酢酸カドミウムを用いたゾルーゲル法によりCdO-SiO₂系多孔質ガラスを作製し、これにH₂Sガスを流すとガラス中のCdイオンと反応し、細孔内に50・程度の均一な大きさのCdS微結晶が生成する。このCdS微結晶は量子サイズ効果により高い非線形性を示すことから波長変換材料などへの応用が考えられる。

多孔質ガラス内に半導体をドーピングする方法としては、この他にセレン及びテルルを高圧でポーラスバイコールに含浸させた例が報告されている²¹⁾。

多孔質ガラスは当初に石英ガラスを製造するための中間産物として得られていたが、その多孔体としての特性に注目されはじめ、分離膜のように多孔体を単独で使用する用途から、酵素や半導体等の機能を持った他の物質と組み合わせることで広範囲に使用されるようになっていく。また多孔質ガラス自体も最初に研究されたNa₂O-B₂O₃-SiO₂系以外の多種のガラスから作製されるようになっており、それに伴って細孔径や化学的な性質も用途に応じたものが開発されるようになっており、今後さらに応用範囲が広がることが期待されている。

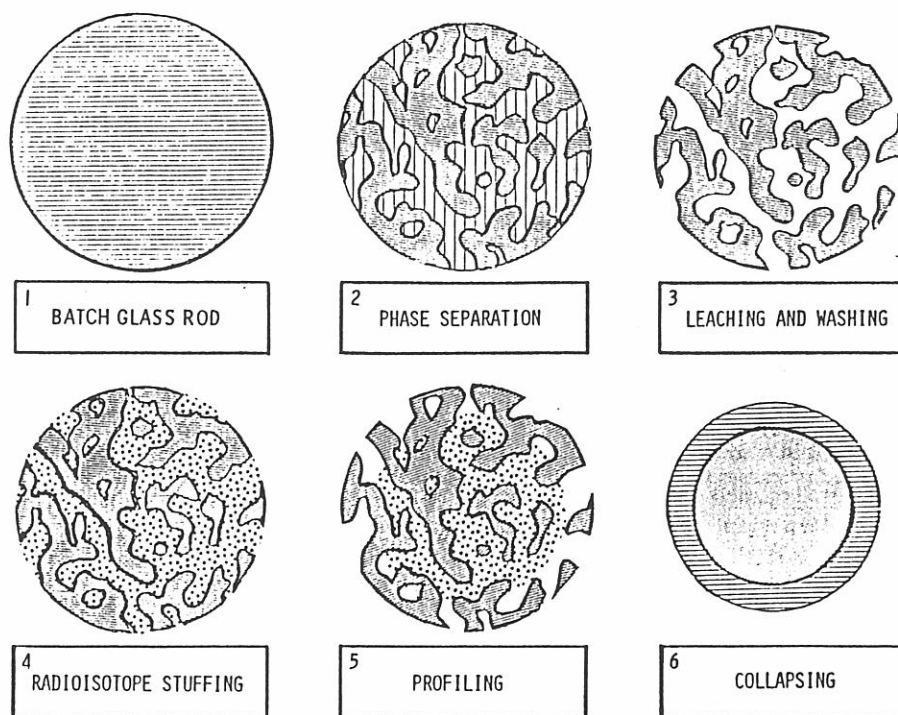


Fig.1-10 多孔質ガラスを用いた放射性廃棄物の処理方法

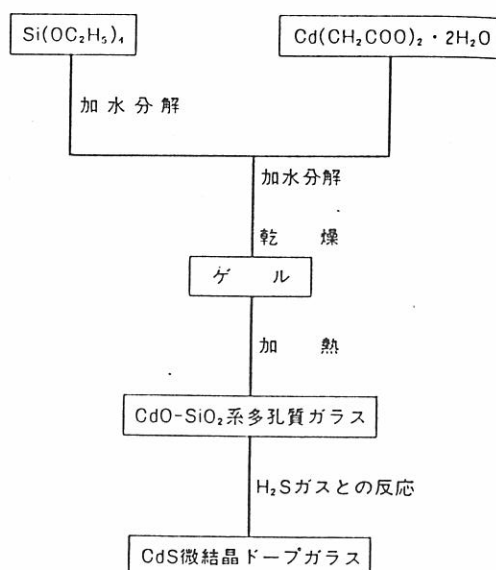


Fig.1-11 CdS 微結晶ドーブシリカガラスの作製

§ 3 本研究の目的

前述のように多孔質ガラスは幅広い分野に応用されており生体触媒の固定化用担体としても古くから用いられている。特にポーラスバイコール型多孔質ガラスであるControlled Porous Glass (CPG) は酵素の固定化及びアフィニティークロマトグラフ用の代表的な担体として数社から生産され、広く用いられている。

本研究においては、生体触媒の固定化を念頭に置き、二種類の方法で作成した多孔質ガラスの特性を評価し、生体触媒として酵素及び微生物の固定化を行った。その内容は以下の通りである。

多孔質ガラスの作成については典型的な多孔質ガラスの作成法である $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3-\text{SiO}_2$ 系ガラスの分相・溶出による方法とゾルーゲル法による方法を試みた。 $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3-\text{SiO}_2$ 系ガラスについてはこれまでに報告の少ない低 SiO_2 組成のPPG型多孔質ガラスの作成について、特にハロゲンの添加が分相及び溶出に及ぼす効果について検討を行った。またゾルーゲル法による多孔質シリカの合成についてはテトラメトキシラン系の出発溶液を用いて、合成条件とゲルの構造の関係を調べた。

$\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3-\text{SiO}_2$ 系ガラスより作成した多孔質ガラスの固定化担体への応用として水銀還元酵素を種々の方法で固定化し、固定化水銀還元酵素の特性を評価すると共に、本固定化酵素を用いた水銀センサーを作成した。

ゾルーゲル法による多孔質シリカの特徴である低温合成の利点を生かして、ゲル化過程で微生物を包括固定することを固定化することを試みた。

参考文献

- 1) 西山隆造 : 応用微生物の基礎知識 (オーム社)
- 2) 大西正健 : 酵素科学 (啓学出版)
- 3) 福井三郎 編 : バイオリアクター (講談社サイエンティフィク)
- 4) 千畑一郎 編 : 固定化生体触媒 (講談社)
- 5) 牧島亮男 : 機能性ガラス入門 (アグネ), P. 99
- 6) 中島忠夫, 黒木裕一 : 日本化学会誌, 8 (1981) P. 1231
- 7) T. Kokubu and M. Yamane : J. Mat. Sci., 20 (1985) P. 4309
- 8) H. Hosono, Z. Zhang and Y. Abe : J. Am. Ceram. Soc., 72 [9] (1989) P. 1587
- 9) H. Kozuka and S. Sakka : Chem. Lett. (1987) P. 1971
- 10) 中西和樹, 曾我直弘 : 日本セラミックス協会 1990年年会講演予稿集, P. 554
- 11) 中西和樹, 曾我直弘 : 日本セラミックス協会 1989年第2回シンポジウム講演予稿集, P. 236
- 12) 吉留 浩 : 化学工学, 48 (1984) P. 562-565
- 13) 亀山哲也 : 硫酸と工業, (1978) P. 103-112
- 14) P. J. Robinson, P. Dunnill and M. D. Lilly : Biochim. Biophys. Acta, 242 (1971) P. 659
- 15) 中島忠夫, 清水正高, 富山典孝 : S P G 研究論文集, (1989) P. 169
- 16) A. Makishima and J. D. Mackenzie : 窯業協会誌, 83 [10] (1975) P. 507
- 17) T. P. Kobylinski, J. J. Hammel and H. E. Swift : Ind. Eng. Chem., Prod. Res. Dev., 14 [3] (1975) P. 147-150
- 18) Y. Shimizu, H. Okada and H. Arai : J. Am. Ceram. Soc., 72 (3) (1989) 436-440
- 19) J. H. Simmons : Nature, 278 (1979) 1979-4 P. 729
- 20) 野上正行 : 化学工業, 41 [8] (1988) P. 711
- 21) C. A. Huber and T. E. Huber : J. Appl. Phys., 64 [11] (1988) P. 6588

第 2 章

分相溶出法による多孔質ガラスの作製

§ 1 緒言

1-1 緒論

ガラスの分相現象は古くから知られており、結晶化とともにガラスを失透させる原因となる。 $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3-\text{SiO}_2$ 系ガラスは分相現象を示す代表的なガラスであり、Fig. 2-1のように広い組成範囲で分相が起こることが知られている。Fig. 2-1¹⁾の分相領域では $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3$ rich相と SiO_2 rich相の2相に分相が起こるが、 $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3$ rich相は耐化学性に乏しいため、この相のみを酸溶液で溶出することにより、微細な細孔を有する SiO_2 に富んだ多孔質ガラスが得られる。Fig. 2-2²⁾は多孔質ガラスの製造工程を示している。

バイコールガラスはこの多孔質シリカガラスを1000℃程度で焼成し、無孔化したガラスであり、その組成は96～98% SiO_2 であるため石英ガラスに近い性質を示す。バイコールガラスの製造には種々の工程が必要にはなるが石英ガラスのように高温を必要としないため安価である。このためバイコールガラスは石英ガラスの代替品として広く用いられている³⁾。

バイコールガラスの製造過程で得られる微細な細孔を有する多孔質ガラスは、当初バイコールガラスのための中間産物でしかなかったが、その細孔を吸着体や触媒の担体として利用出来ることが知られてから「ポーラスバイコール」ガラスとして広く利用されるようになった。ポーラスバイコールやその他の多孔質ガラスの利用については第1章に述べた通りである。

1-2 既往の研究 ($\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3-\text{SiO}_2$ 系ガラスの分相及び溶出挙動)

1-2-1 原ガラス組成

Hallerら¹⁾は $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3-\text{SiO}_2$ 系ガラスの約100組成について不混和温度を決定し、その結果からFig. 2-1のような不混和温度線図を作成した。

$\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3-\text{SiO}_2$ 系ガラスから得られる多孔質ガラスとしては先述のポーラスバイコールガラスと、それより低 SiO_2 組成の原ガラスから得られるPPG型多孔質ガラスの二種類がある。PPG型多孔質ガラスはHammel⁴⁾らにより開発されたポーラスバイコール型より低シリカ組成の $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3-\text{SiO}_2$ 系ガラスより得られ、その原ガラス組成はFig. 2-1に示した通りである。両者の特徴を比較したのがTable 2-1である。特にPPG型多孔質ガラスがポーラスバイコール型に比べて優れているのは、原ガラスの熔融温度が低く、溶出処理を熱水で行えるため製造コストを低減でき、気孔率が最大0.6cc/gと大きくできる点である。

$\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3-\text{SiO}_2$ system

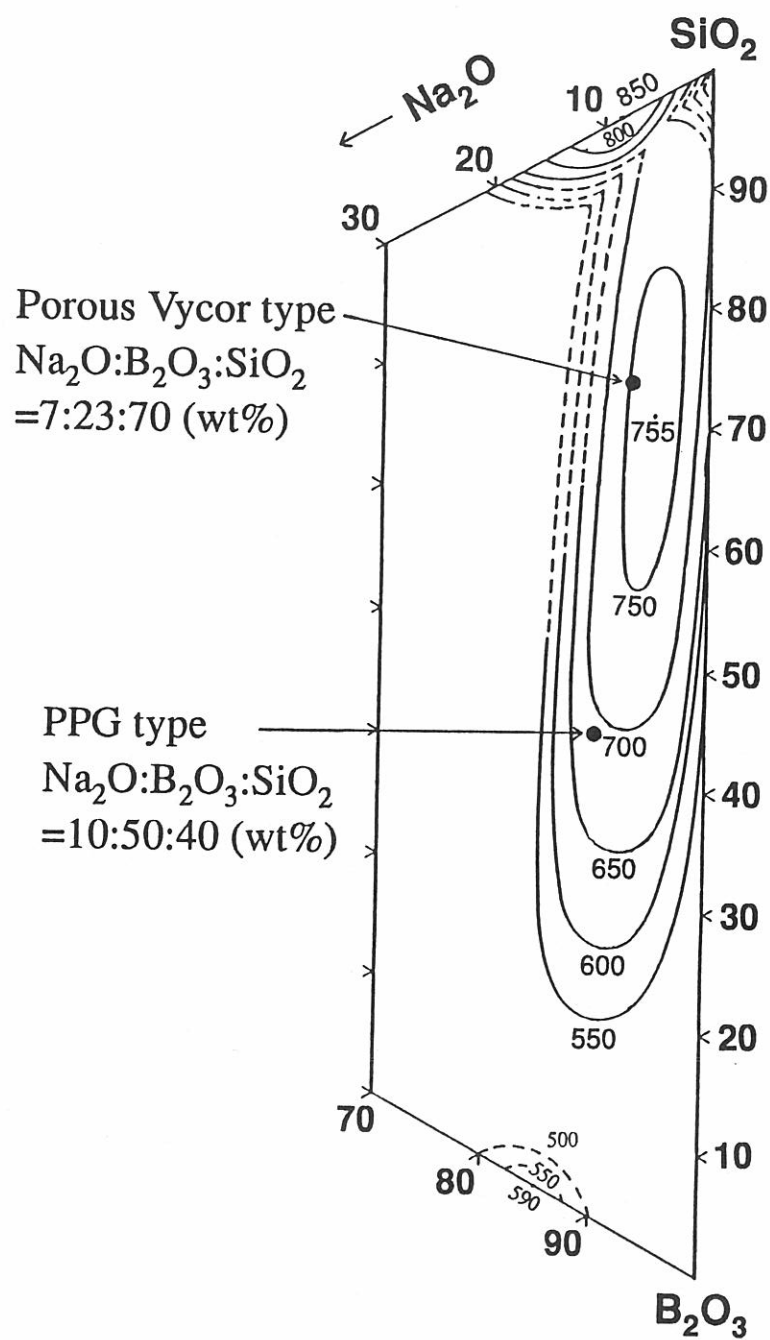


Fig. 2-1 $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3-\text{SiO}_2$ 系の分相領域

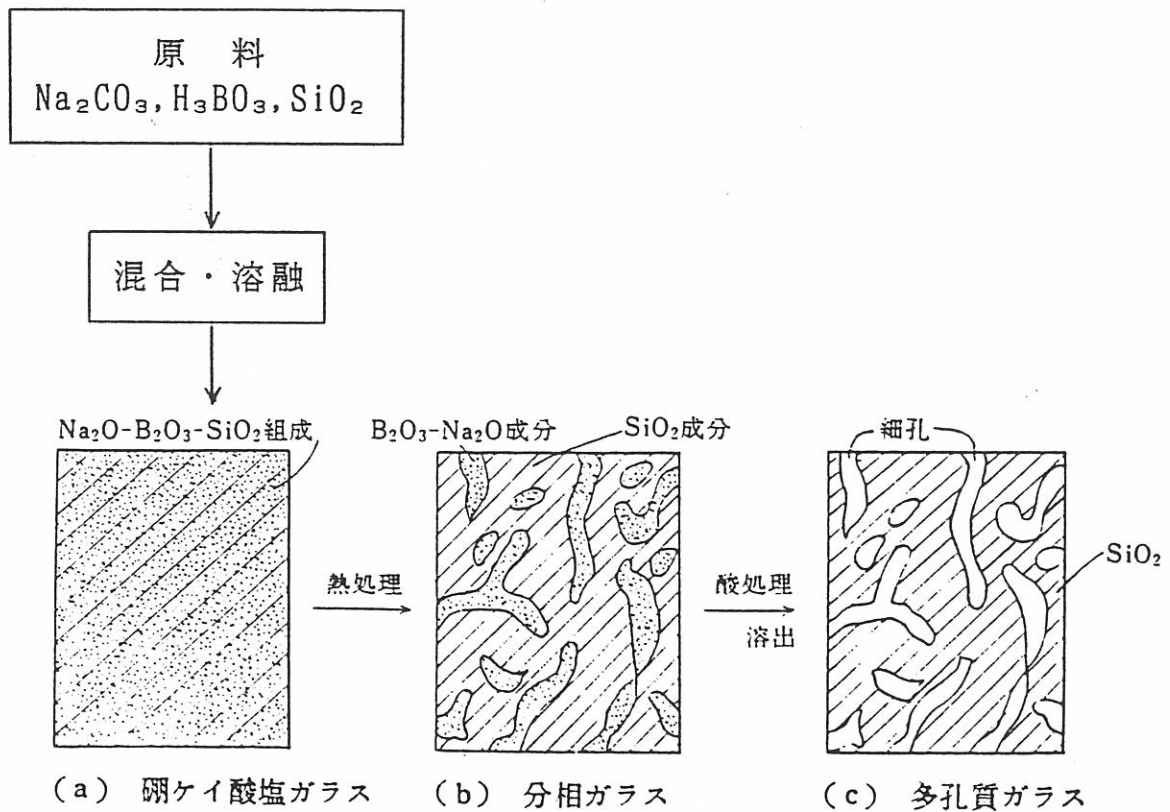


Fig. 2-2 多孔質ガラスの製造方法

Table 2-1 ポーラスバイコール型とPPG型の比較

	Porous Vycor型	PPG型
原ガラス組成	$\text{Na}_2\text{O}:\text{B}_2\text{O}_3:\text{SiO}_2$ =7:23:70(wt%)	$\text{Na}_2\text{O}:\text{B}_2\text{O}_3:\text{SiO}_2$ =10:50:40(wt%)
原ガラス溶融温度	約1400℃	約1200℃
溶出処理液	90℃の酸溶液	90℃の熱水
多孔体の組成	96% SiO_2	99% SiO_2
気孔率	0.1~0.3cc/g	0.1~0.6cc/g
溶液・塩の再利用	不可	可

1-2-2 分相過程

ソーダボロシリケート系ガラスの熱処理過程ではスピノーダル分解による $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3$ 相と SiO_2 相への相分離が最初に起こり、引き続いて両相の成長が起こる。

スピノーダル分解は自由エネルギーの組成変化 (d^2G/dc^2) が負の場合に、微細な濃度ゆらぎが系の自由エネルギーを低下させるため連続して相分離が起こる現象であり、核生成・成長による分相が液滴状の生成相を形作るのに対し、スピノーダル分解による分相では分離した相が絡み合い構造を示すのが特徴である。Cahnら⁵⁾はシミュレーションにより組成ゆらぎによるスピノーダル分解が絡み合い構造の二相を形成することを示している。

スピノーダル分解による原ガラスの相分離は短い時間で起こるとされ、その後の熱処理過程では分相構造の再編が進行し、細孔構造が肥大すると考えられている。

Haller⁶⁾は分相構造の再編を理論的に考察し、バイコール型に近い $6\text{Na}_2\text{O} \cdot 25.6\text{B}_2\text{O}_3 \cdot 68.4\text{SiO}_2$ (wt%) 組成において、実際に熱処理温度と熱処理時間と細孔構造の関係を調べて理論との一致を見ている。Hallerは $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3-\text{SiO}_2$ 系ガラスにおける可溶出相及びシリカ相の絡み合い構造を球状粒子の連結したモデルを用いて記述し、シリカ相の溶解・析出のメカニズムと分相構造の変化の関連を導出し、Table2-2に示すような結果を得た。Hallerの理論の詳細は本章末のAppendixに記した。

Haller⁶⁾は熱処理時間が細孔径に及ぼす影響を実際に測定し、Fig. 2-3のように比表面積が $t^{-1/2}$ に比例することを示した。Table2-2のモデルを用いれば、比表面積の $t^{-1/2}$ 依存性から「溶解→bulk拡散→析出」による微細構造の再編において拡散よりも表面反応が律速していると推測されるとしている。

また熱処理温度を変化させることにより、構造の再編速度 $1/A^2 t$ がFig. 2-4のようにArrhenius型の温度依存性を示すことも報告している（下式）。

$$1/A^2 t = K \cdot \exp(-E/RT) \quad \dots (2-1)$$

但し A : 比表面積	K : 比例定数
T : 熱処理温度	t : 熱処理時間
R : 気体定数	E : 活性化エネルギー

Fig. 2-4から求めた見かけの活性化エネルギーの値は40kcal/molであり、この値は拡散または流動過程の値に相当すると報告している。

Table 2-2 SiO₂の拡散状態による比表面積の時間依存性
(after W.Haller⁶⁾)

Transport mode	Decrease in surface area
Volume diffusion:	
(a)Fast diffusion across small distances.	
Process at interfaces is rate-controlling step.	$A \cdot t^{-1/2}$
(b)Mass transfer across interfaces is rapid.	
Slow diffusion across large distances is rate-controlling step.	$A \cdot t^{-1/3}$
Surface diffusion:	
(c)Fast diffusion across small distances.	
Vacancy formation is rate-controlling step.	$A \cdot t^{-1/3}$
(d)Rapid vacancy formation.	
Slow diffusion across large distances is rate-controlling step.	$A \cdot t^{-1/4}$

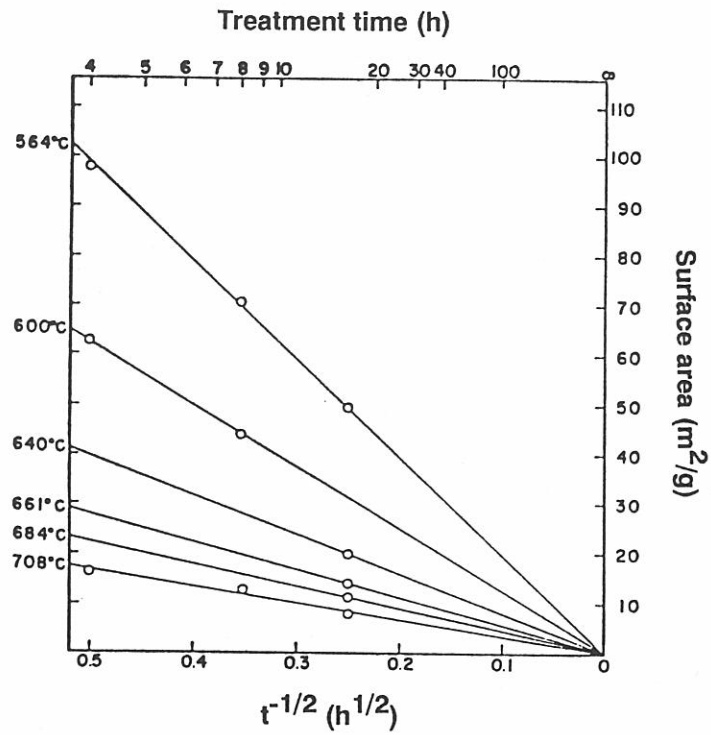


Fig.2-3 ポーラスバイコール型多孔質ガラスにおける比表面積の熱処理時間依存性

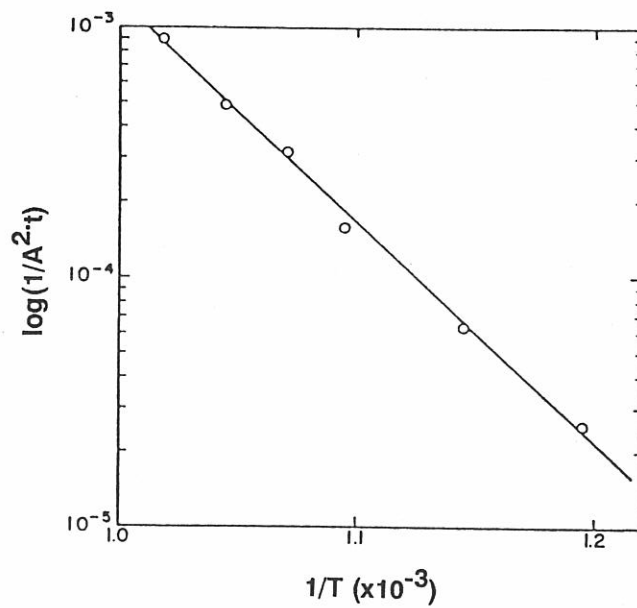


Fig.2-4 分相構造の再編速度 ($1/A^2t$) と熱処理温度の関係

中島ら⁷⁾は“SPG”と呼ばれるシラスを主原料として得られる多孔質ガラスについて、Haller⁶⁾と同様に熱処理条件がガラスの分相に及ぼす影響を調査している。中島らは 6.3 Na₂O・23.5B₂O₃・50.0SiO₂・4.2Al₂O₃・16.0CaO (wt%) の組成について、細孔半径と熱処理条件の関係を報告している。Hallerの結果と比較するため、中島らは以下のように(2-1)式を細孔半径と熱処理時間の関係に置き換えている。

$$A = 2V / r \quad \dots (2-2)$$

但し V : 細孔容積, r : 細孔半径

Hallerによる(2-1)式及び(2-2)式より、熱処理条件と細孔半径の関係は(2-3)式のように得られる。

$$r^2 = 4K \cdot V^2 \cdot t \cdot \exp(-E / RT) \quad \dots (2-3)$$

熱処理温度' T 'を一定とすると、(2-4)式のように細孔半径は熱処理時間の平方根に比例すると考えられ、中島らの実験においても同様の関係が得られている。

$$r = K' \cdot t^{1/2} \quad \dots (2-4)$$

また、熱処理時間' t 'を一定にすると(2-3)式より、

$$r^2 = K'' \cdot \exp(-E / RT) \quad \dots (2-5)$$

となり、中島らは6.3Na₂O・23.5B₂O₃・50.0SiO₂・4.2Al₂O₃・16.0CaO (wt%) の組成で、分相の見かけの活性化エネルギーを143.2kcal/molと報告している。

1-2-3 溶出過程

多孔質ガラスの溶出速度は組成、熱処理温度、処理液の種類など多くの要因に依存し、その速度は約1mm/day程度のゆっくりしたものであり、これが多孔質ガラスのコストを高めている。そこで溶出速度を高める必要がある。

牧島ら⁸⁾はPPG組成の $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3-\text{SiO}_2$ 系ガラスに V_2O_5 , P_2O_5 , MoO_3 , WO_3 等の第四酸化物を添加し、溶出速度への影響を報告している。Fig. 2-5は1, 5, 8wt%の V_2O_5 を含むガラスの溶出時の重量減少を示しており、 V_2O_5 の増加(A→D)に伴い溶出速度には大幅に増加している。例えば8% V_2O_5 では溶出速度は4倍に増加している。 P_2O_5 , MoO_3 , WO_3 も同様に溶出速度を上昇させた。

Fig. 2-6は5% V_2O_5 , MoO_3 , WO_3 を含むPPGガラスの熱水中への可溶出相の溶解速度を調べた結果であり、ソーダボレートガラス(PPGガラスの可溶出相と同組成)の溶解度はFig. 2-6の(A)に示されており、 V_2O_5 , MoO_3 , WO_3 を添加したものより低いことがわかる。

分相ガラスの溶出速度に大きな影響を与える因子としては次の二つが考えられる。

(1)可溶性ソーダボレート相の溶解度 (2)第二相の大きさ

牧島らはソーダボレートガラスの水への溶解度は一般に純 B_2O_3 ガラスより低いことから、前述の V_2O_5 , MoO_3 等の第四酸化物の添加による溶出速度の向上は、ほう酸異常の傾向が抑制され純 B_2O_3 ガラスのような本来のほう酸の構造を維持させて、これが水への高い溶解度を示す原因となると推測している。

Chaowuら⁹⁾はバイコール型及びPPG型に近い組成に V_2O_5 濃度を添加し、その細孔構造と溶出過程に及ぼす影響を検討しており、両組成に於て V_2O_5 の添加により細孔構造が大きくなっていることが報告されている。この原因についてはChaowuらは V^{5+} のイオン強度が Si^{4+} のそれと同様でありsodium-borateと SiO_2 骨格の親和性が減少することから分相の駆動力が増加し、さらにガラスの粘度を下げることから分相が促進されるためであるとしている。 V_2O_5 の溶出速度に及ぼす影響については $9.80\text{Na}_2\text{O} \cdot 41.18\text{B}_2\text{O}_3 \cdot 49.02\text{SiO}_2$ (mol%) 組成に於て V_2O_5 及び P_2O_5 の添加効果を調べており、牧島らと同様に V_2O_5 , P_2O_5 による溶出速度の向上が報告されているが、Chaowuらは V_2O_5 の効果についてほう酸異常の抑制によるものではなく、 $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3$ 相の溶出は拡散律速であり、 V_2O_5 の添加効果は骨格及び空隙のサイズを増大させ、空孔内への SiO_2 ゲルの析出を抑制することにあるとしている。その理由としては以下の二点を上げている。

- (1) B^{3+} は V^{5+} よりイオン強度が強いため、 B^{3+} が BO_4 四面体から BO_3 に変化する割合は少なく、僅かな V_2O_5 の添加でほう酸異常が抑制出来るとは考えにくい
- (2) P_2O_5 を $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3$ 系ガラスに添加するとboron-phosphateを形成することが知られており、この場合 BO_3 三角形は BO_4 四面体に変化する。(その割合は V_2O_5 添加時より多い)にもかかわらずChaowuらの結果では僅かな P_2O_5 の添加で溶出、溶解速度とも向上した。

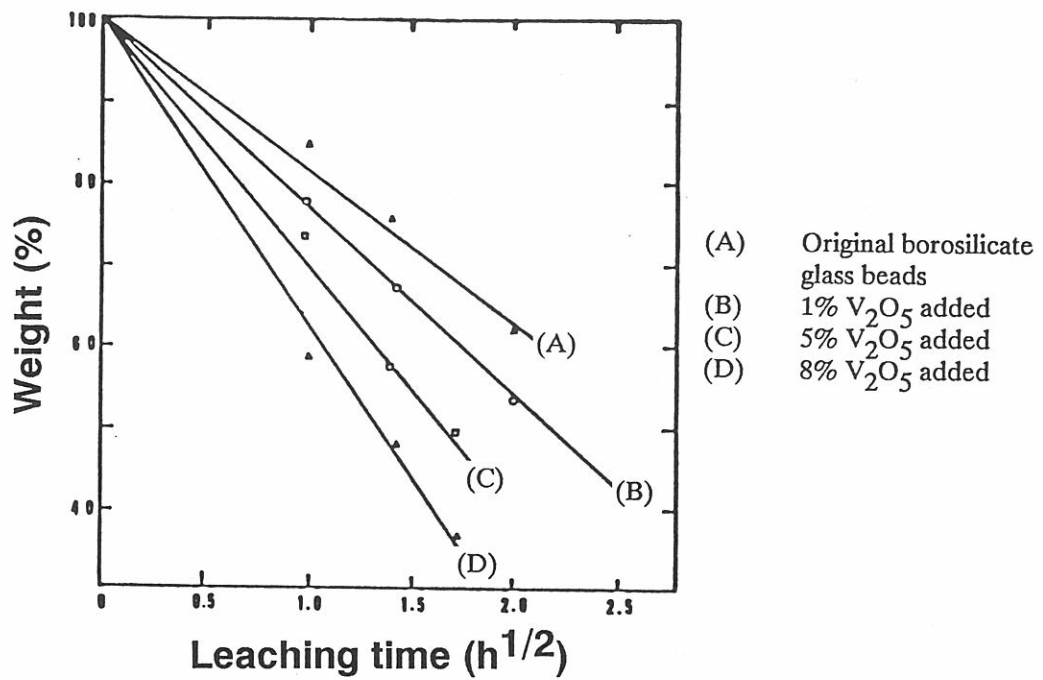


Fig.2-5 V_2O_5 添加によるソーダボロシリケートガラスの溶出速度の変化 (90℃ 熱水中)

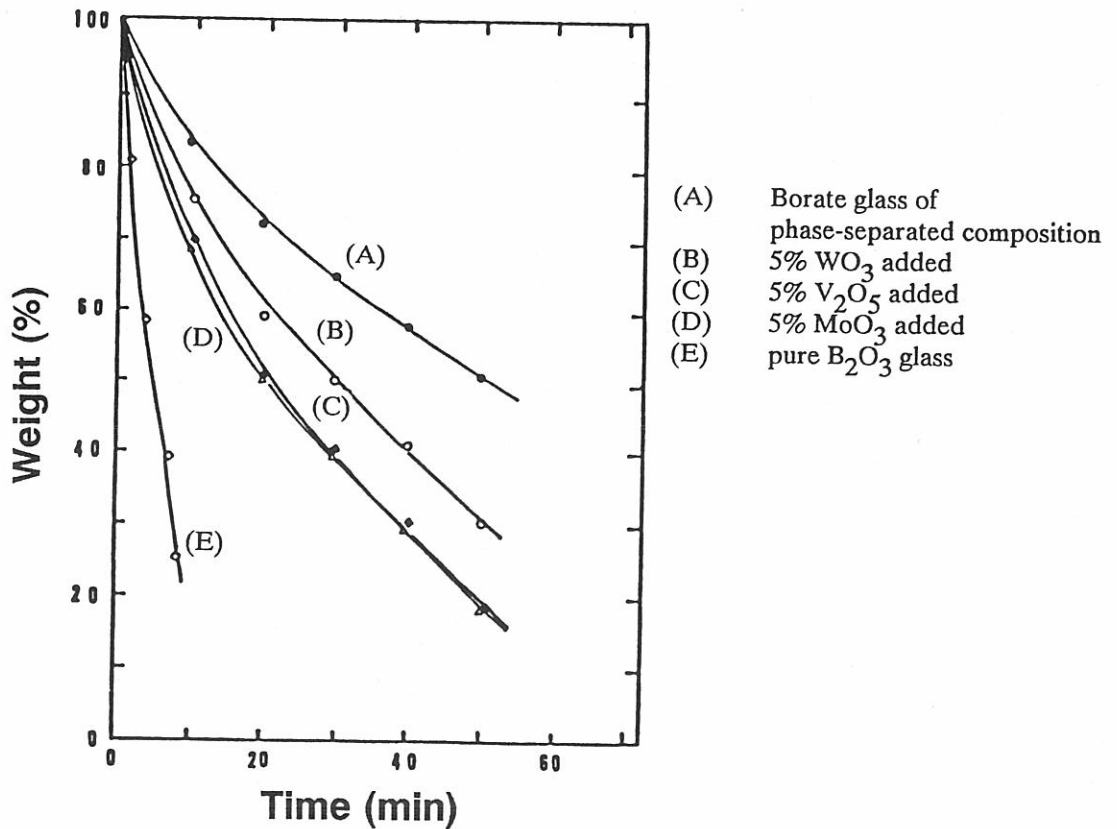


Fig.2-6 添加酸化物によるソーダボレートガラスの溶解速度の変化 (90℃ 熱水中)

1-2-4 ハロゲンの添加による分相・溶出過程への影響

牧島らやChaowuらの研究は $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3-\text{SiO}_2$ 系ガラスへの第四酸化物の添加効果に関するものである。これに対し、同系ガラスに対する異種アニオンの添加を行った報告は田草川ら¹⁰⁾によるもののみである。田草川ら¹⁰⁾はバイコール型ソーダボロシリケートガラスに0～3.1wt%のふっ素をフッ化ナトリウムの形で添加し、ふっ素が分相・溶出過程に及ぼす影響を報告している。ふっ素を添加して作成した多孔質ガラスはふっ素を含まない試料と同様にスピノーダル分解様の絡み合い構造を示した。またふっ素の添加により不混和温度が数度上昇した。

多孔質ガラスの組成はふっ素の有無に関わらず $\text{SiO}_2=94\text{wt}\%$, $\text{Na}_2\text{O}=0.5\text{wt}\%$ であり、2.62wt%のふっ素を含んだ原ガラスから作成した多孔体中のふっ素は0.3wt%であり、大部分のふっ素は溶出処理によって除去されていることが分かった。

Fig. 2-7は500℃で100時間の熱処理を施した試料の細孔分布曲線を示している。ふっ素濃度が0, 1.0, 2.8wt%と増加するにつれ細孔径も3.0, 9.5, 10.5nmと増加しており、ふっ素の添加が細孔径の増大に効果があることが報告されている。田草川らはふっ素の添加効果について、アルカリボレートガラスの赤外吸収スペクトルの調査から、ふっ素がB-F結合を作り、これが粘度を下げ B_2O_3 -rich相の界面エネルギーを上げるため、不混和相は大きくなりその表面積を下げるためと推測している。

また、田草川らはふっ素の添加が分相ガラスの溶出過程に及ぼす影響も報告しており、Fig. 2-7と同一の試料の溶出処理時の気孔率、比表面積の経時変化はFig. 2-8のようになり、ふっ素を添加した試料ではふっ素を含まない試料に比べて短い時間で密度が一定値に達する、即ち溶出が完了している。

以上のようにふっ素の添加はバイコール型ソーダボロシリケートガラスの分相を促進し、細孔構造を大型にすると共に、溶出処理に要する時間を短縮させることが知られている。

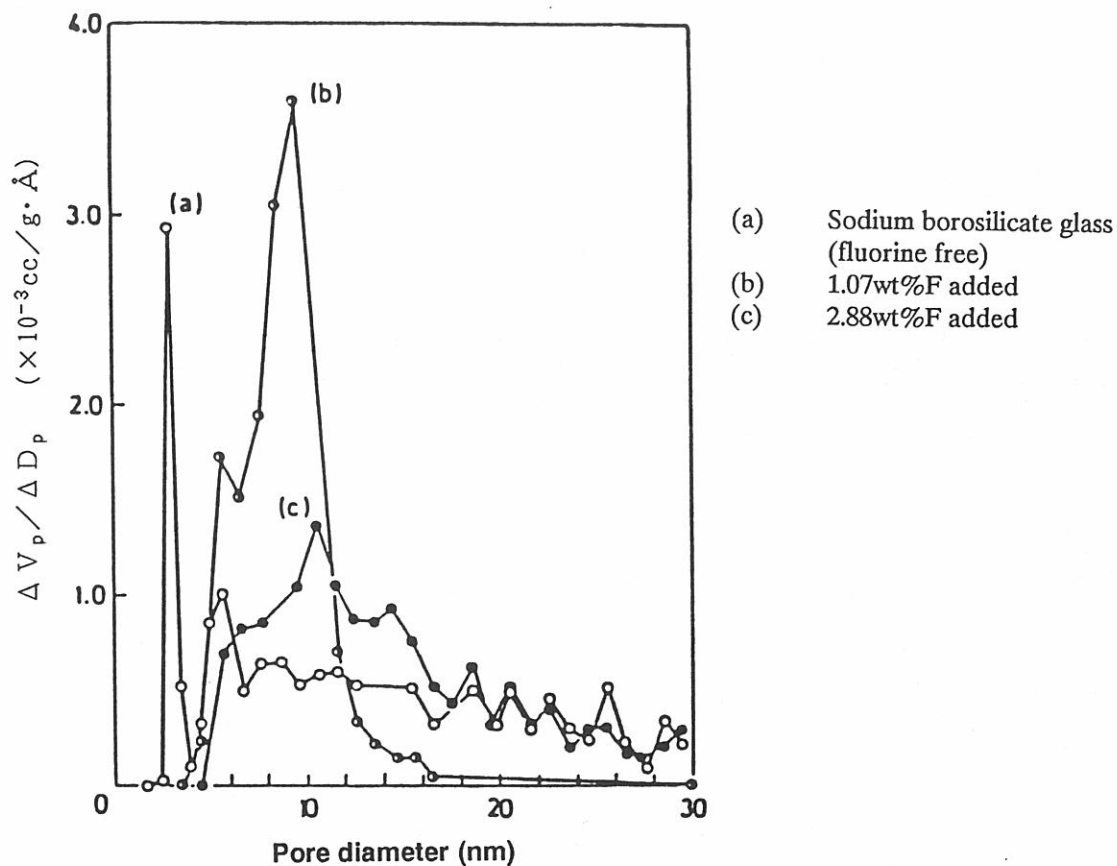


Fig.2-7 ふっ素添加による多孔質ガラスの細孔分布曲線の変化

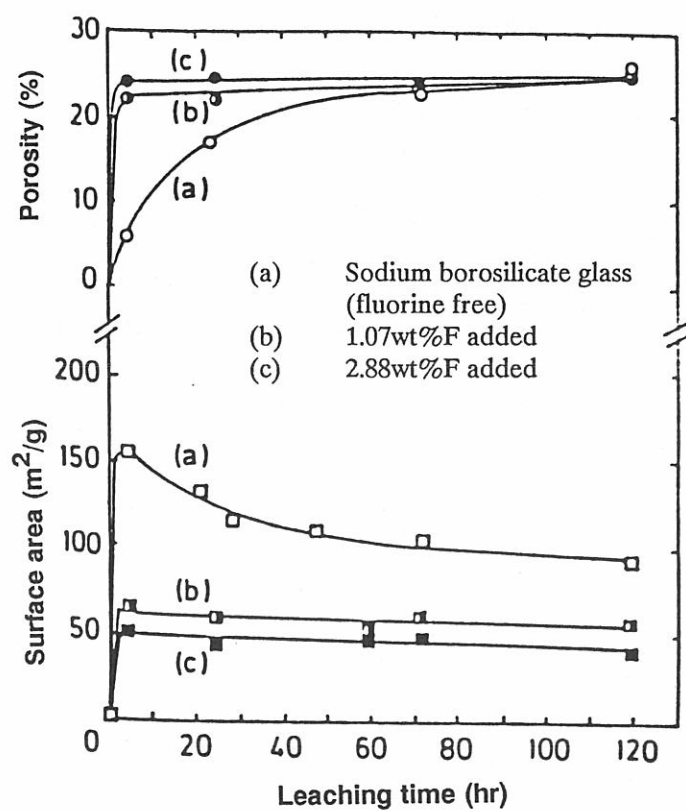


Fig.2-8 ふっ素添加による溶出挙動の変化
 (92~95°C 1NH₂SO₄aq.)

1-3 研究の目的

先に述べたようにPPG型多孔質ガラスはポーラスバイコール型多孔質ガラスに比べ、気孔率が高いため液体の浸透性がよいので酵素固定化用担体として適していると考えられる。田草川らはポーラスバイコール組成の $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3-\text{SiO}_2$ 系ガラスに対し、ふっ素を添加することにより分相が促進され細孔構造が大型化し、溶出時間が短縮されることを報告している。

そこで本研究では分相・溶出時間の短縮に効果が期待されるハロゲン $10\text{Na}_2\text{O}\cdot 50\text{B}_2\text{O}_3\cdot 40\text{SiO}_2$ (wt%)組成 (PPG型) の原ガラスに添加し、ふっ素, 塩素, 臭素の添加が分相過程や溶出過程及び得られる多孔質ガラスの細孔構造に及ぼす効果について調べた。

§ 2 実験方法

2-1 多孔質ガラスの合成

原ガラスの合成にはTable2-3に示す試薬を用いた。

Table2-3 原ガラス作成に使用した試薬

ほう酸ナトリウム・無水 ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$)	関東化学	鹿特級
酸化ほう素・無水 (B_2O_3)	関東化学	鹿特級
二酸化けい素・無水 (SiO_2)	守随彦太郎商店	特級
ふっ化ナトリウム (NaF)	レアメタリック	99.99%
塩化ナトリウム (NaCl)	富田製薬	99.5%
臭化ナトリウム (NaBr)	関東化学	鹿特級
一酸化コバルト (CoO)	添川理化学	99.9%

原ガラスの合成は $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, B_2O_3 , SiO_2 を $\text{Na}_2\text{O}:\text{B}_2\text{O}_3:\text{SiO}_2=10:50:40$ (wt%) かつ全量30gとなるよう秤量・混合し、白金坩堝中で1400℃において40分間熔融した後、グラファイト坩堝に鑄込み、成形した。ハロゲンを添加する際にはF, Cl, Brが1wt%または2wt%となるよう、 $\text{NaO}_{0.5}$ を NaX (X:F, Cl, Br) で置換する形で原料試薬を調整した。また熱水溶出時の指標とするため、各試料に全量の約0.1wt%の CoO を添加した。ハロゲンを添加した試料では熔融中のハロゲンの揮散を抑えるため炉内にアルゴンを流しながら熔融を行った。得られた原ガラスはアルミナ坩堝内に保持して熱処理を施した。熱処理温度は500℃～600℃とし、熱処理時間と細孔構造の影響を調べる際には580℃で処理を施した。熱処理時間は24時間～240時間とし、熱処理温度の影響を調べる際には48時間の処理を施した。熱処理後、分相した試料を2mm～5mm厚に切断し、95℃の蒸留水（約200ml）に24時間浸漬し溶出処理を行った。溶出後の試料は140℃の乾燥器中で2時間乾燥し多孔質ガラス試料を作成した。

2-2 測定・分析

上記の方法で合成した試料について以下の測定を行った。

(1) 細孔分布

測定はカルロ・エルバ社製水銀圧入式ポロシメーター220型により行った。

(2)比表面積

比表面積（BET比表面積）はマイクロメリティックス社製アキュソープ2100-02型比表面積測定装置を用いてBET法により求めた

測定は約0.1 g の試料をセルに投入し、約140℃で12時間以上真空脱気処理を行い、吸着成分を除去した後行った。

(3)SEM観察

SEM観察は日立製S-2500を用いて、加速電圧：10～20kV，ワーキング・ディスタンス：10～15mmの条件下で行った。

(4)原ガラス，多孔質ガラス中のハロゲン濃度

ガラス中のハロゲン濃度はイオン電極法を用いて以下の手順により行った。

①原ガラスの場合は約0.1 g，多孔質ガラスの場合は約0.5 g の試料（＜150mesh）を秤り取り、適量の水酸化ナトリウムを加え約20mlの蒸留水に溶解する。

②ふっ素分析の場合は硝酸，塩素及び臭素分析の場合はほう酸を用いてpHが7程度になるよう中和し、全量を250mlとする。

③試薬特級NaF, NaCl, NaBrを蒸留水に溶解して作製した標準液で補正した堀場製イオンメーターM-8を用いて各ハロゲン濃度を測定する。

またハロゲンを添加した試料の不混和温度を下記の方法で決定した。

Composition1～6の各試料約1gをアルミナボート上に保持して所定温度の炉内に12時間以上保持し、熱処理後各試料を水冷し試料の透光性を目視で確認した。熱処理温度を690℃から720℃まで5℃間隔で昇温し、熱処理後の試料全体が透明になった温度を不混和温度とした。

§ 3 結果及び考察

3-1 原ガラス及び多孔質ガラス中のハロゲン濃度

作成した原ガラスはハロゲンを含まない試料（Composition 1）、ハロゲンを添加した試料（Composition 2～6）の6種類である。各々のハロゲンの添加量及び溶融によるガラス作成後の試料中ハロゲン濃度をTable2-4に示す。ハロゲンを添加した場合には試料の溶融は炉内にアルゴンを流しながら行ったが、溶融によるハロゲンの揮散が見られた。溶融後のハロゲン濃度から計算したガラス組成はTable2-5のようになる。

Table2-4 原ガラス中のハロゲン濃度

Composition	Halogen	Before melting	After melting
1	---	-----	-----
2	F	1.0wt%	0.85wt%
3	F	2.0wt%	1.30wt%
4	Cl	1.0wt%	0.54wt%
5	Cl	2.0wt%	0.88wt%
6	Br	2.0wt%	1.30wt%

Table2-5 原ガラス組成

Composition	Na ₂ O	B ₂ O ₃	SiO ₂	NaX	NaX (mol%)
1	10.0	50.0	40.0	---	---
2	8.6	49.7	39.8	1.9 (NaF)	2.9
3	7.8	49.6	39.7	2.9 (NaF)	4.3
4	9.5	49.8	39.8	0.9 (NaCl)	1.0
5	9.2	49.7	39.7	1.4 (NaCl)	1.6
6	9.4	49.4	39.5	1.7 (NaBr)	1.1

一方、多孔質ガラス中のハロゲン濃度に関しては試料溶解の際に使用した水酸化ナトリウム及び中和の際に使用したほう酸からのハロゲンの混入が無視できないレベルであるため、

正確な値を求める事が困難であったが、ハロゲンの種類によらず0.1wt%以下であった。これより大部分のハロゲンは分相により可溶出相である $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3$ 相に含まれており、熱水溶出処理の際に除去されている事がわかった。

3-2 多孔質ガラスの細孔構造

ハロゲンを含まない組成 (Composition 1) 及びハロゲンを添加した組成 (Composition 3, 5, 6) の試料を580℃で48時間の熱処理を施し、熱水溶出して作成した多孔質ガラスの細孔構造をSEMで観察した結果をFig. 2-9に示す。ハロゲンを添加した試料でもハロゲンを含まないものと同様に、スピノーダル分解によるものと思われる SiO_2 骨格の絡み合い構造が観察された。

3-3 熱処理温度と細孔構造の関係

F, Cl, Brを添加した試料 (Composition 3, 5, 6) を500℃～600℃で48時間熱処理した場合の細孔分布曲線の変化をFig. 2-10に示す。いずれの試料も単一の鋭いピークを示しており、熱処理温度の上昇と共に細孔径が増大している。

Fig. 2-11はハロゲンを含まない試料 (Composition 1) 及びフッ素を添加した試料 (Composition 2, 3) に関して、熱処理温度による細孔径及び比表面積の変化を示している。熱処理温度が500℃から600℃に上昇するにつれ、細孔径が増大し、比表面積は減少しており熱処理温度の上昇による細孔構造の大型化が見られる。

また、ハロゲンを含まない試料 (Composition 1) に比べてフッ素を添加した試料 (Composition 2, 3) の方が細孔径が大きく、比表面積は小さいことから、フッ素の添加により分相の促進され、細孔構造が大型化したことが考えられる。Table 2-6はComposition 1～6について各温度で48時間の熱処理を施した試料の細孔径及び比表面積である。Table 2-6よりフッ素及び塩素を添加した試料でハロゲンを含まない試料より細孔構造が大きくなっており、ハロゲン添加による分相促進の効果は細孔径の小さいものほど大きい。またフッ素及び塩素量が多くなるほどこの傾向が顕著になっている。細孔構造に対する臭素の効果は他のハロゲンほどは見られていない。

ハロゲンを含まない試料及びフッ素を添加した試料について、Fig. 2-12に示すような比表面積の熱処理温度依存性から(2-1)式を用いて分相の見かけの活性化エネルギーを求めた。その結果、Composition 1～3の試料について以下の値が得られた。

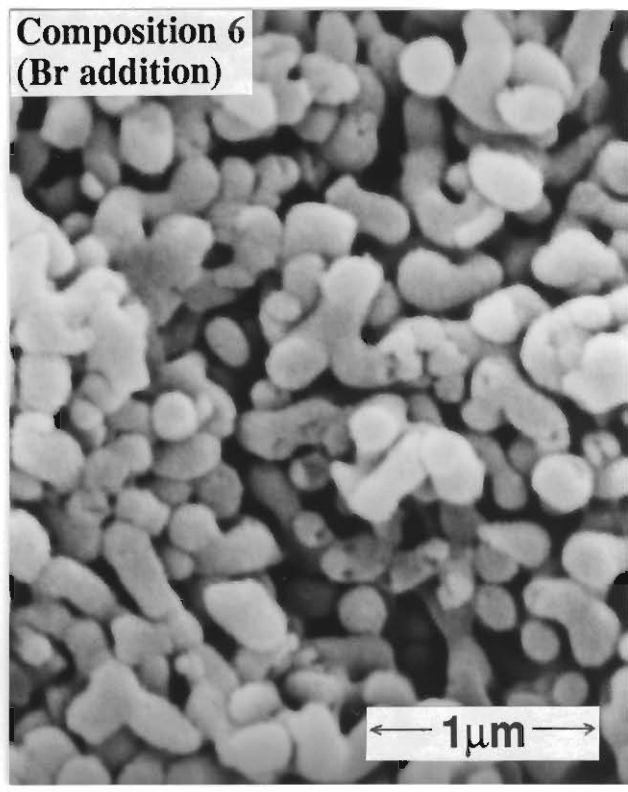
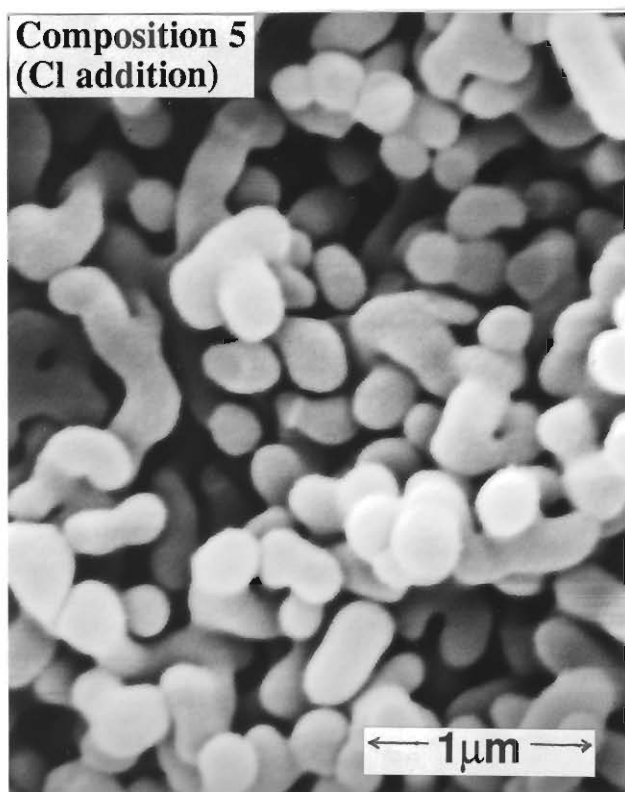
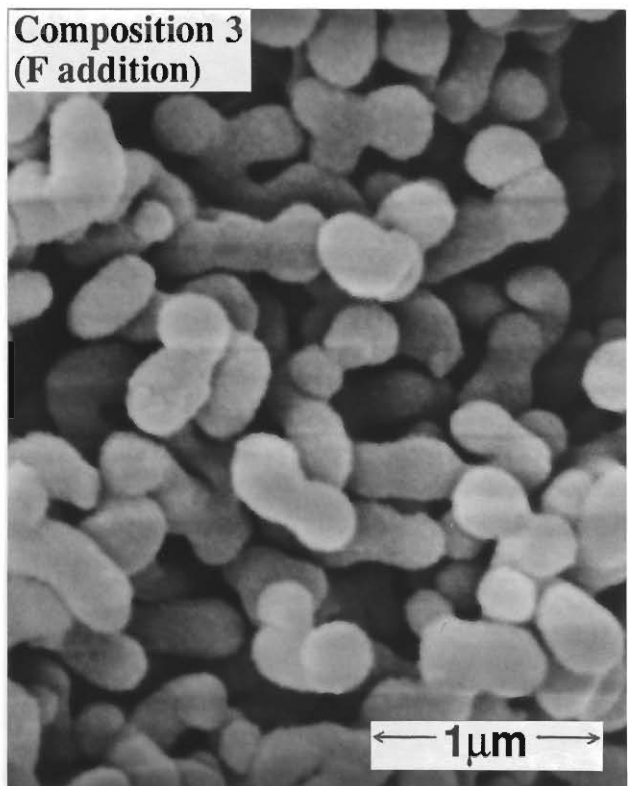
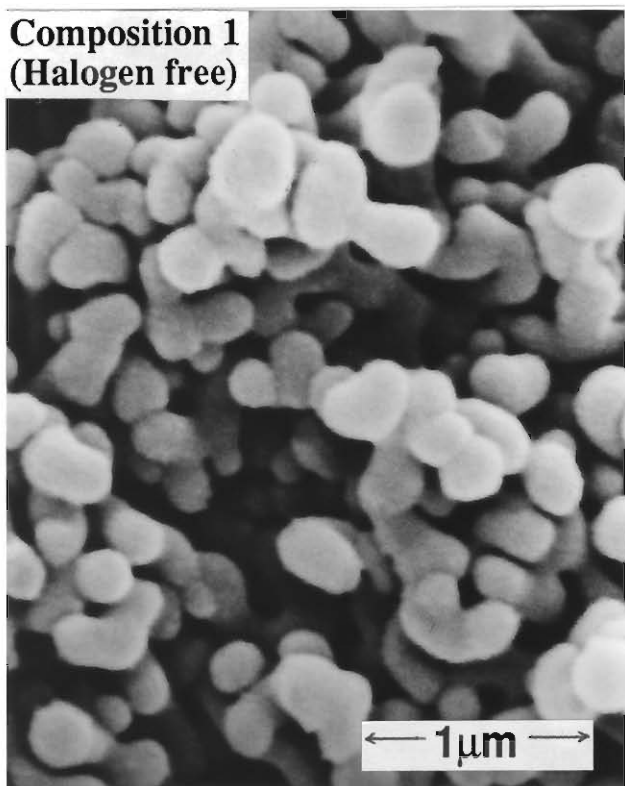


Fig. 2-9 PPG型多孔質ガラスのSEM像

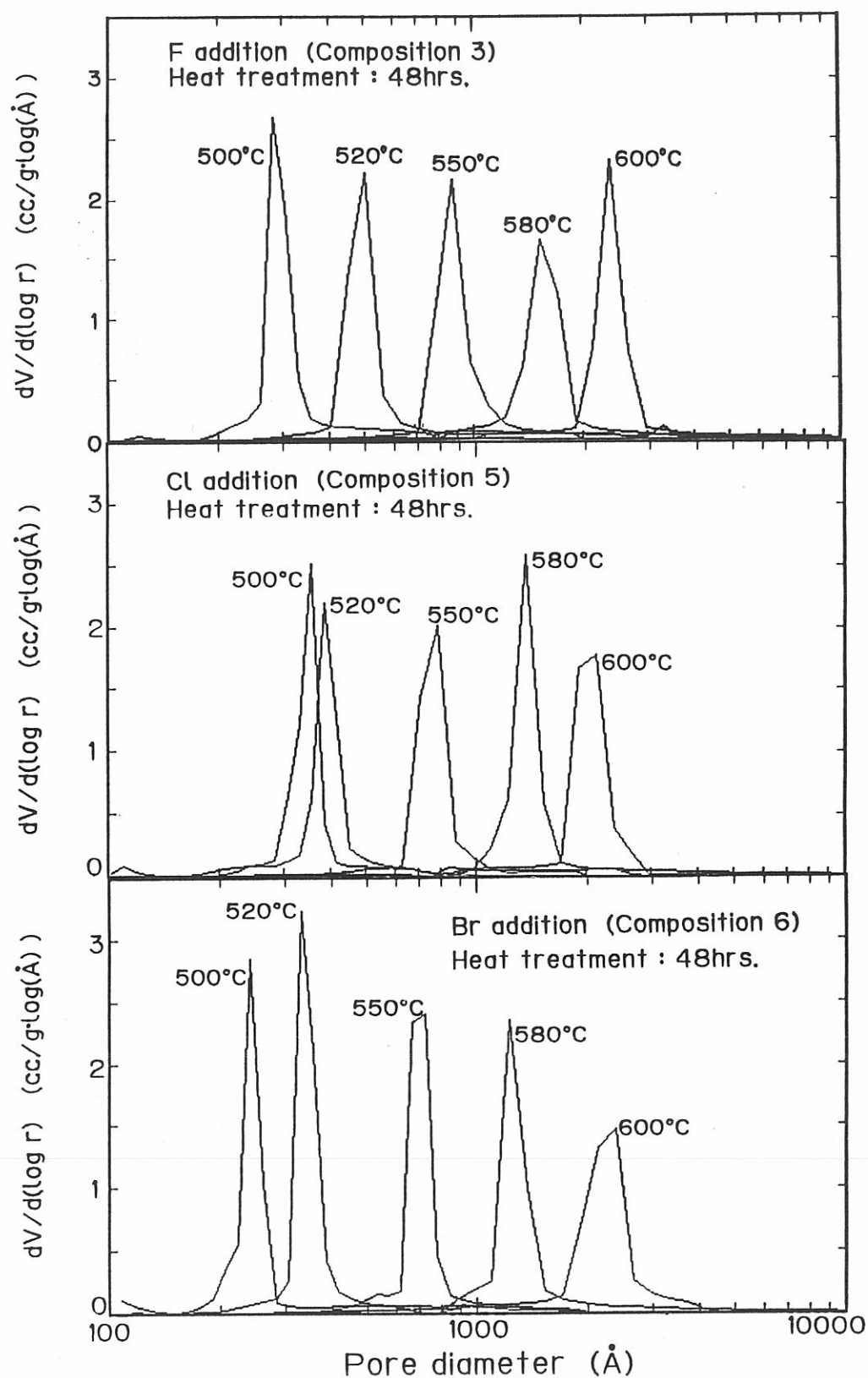


Fig.2-10 F,Cl,Brを添加して作成した多孔質ガラスの細孔分布曲線

Table 2-6 熱処理温度による多孔体の細孔径と比表面積の変化

Composition of mother glass	Condition of heat treatment	mean pore diameter (・)	specific surface area (m^2/g)
1	500°C × 48hrs.	260	81.4
	520°C × 48hrs.	358	59.4
	550°C × 48hrs.	800	32.6
	580°C × 48hrs.	1320	29.1
	600°C × 48hrs.	2634	22.1
2	500°C × 48hrs.	294	70.4
	520°C × 48hrs.	462	60.6
	550°C × 48hrs.	846	36.8
	580°C × 48hrs.	1562	23.9
	600°C × 48hrs.	2150	20.7
3	500°C × 48hrs.	352	68.7
	520°C × 48hrs.	560	52.8
	550°C × 48hrs.	988	32.4
	580°C × 48hrs.	1574	20.6
	600°C × 48hrs.	2388	17.9
4	500°C × 48hrs.	246	
	520°C × 48hrs.	420	
	550°C × 48hrs.	794	
	580°C × 48hrs.	1400	
	600°C × 48hrs.	2102	
5	500°C × 48hrs.	382	
	520°C × 48hrs.	562	
	550°C × 48hrs.	800	
	580°C × 48hrs.	1464	
	600°C × 48hrs.	1994	
6	500°C × 48hrs.	292	
	520°C × 48hrs.	366	
	550°C × 48hrs.	714	
	580°C × 48hrs.	1162	
	600°C × 48hrs.	2064	

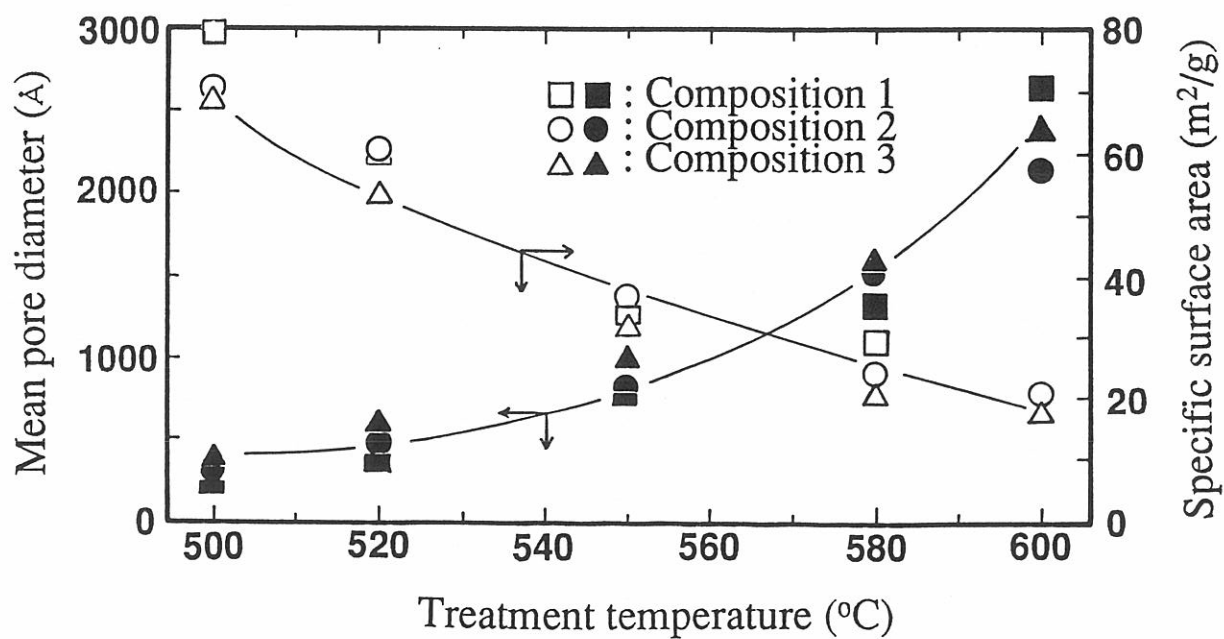


Fig.2-11 熱処理温度と多孔体の細孔径及び比表面積の関係

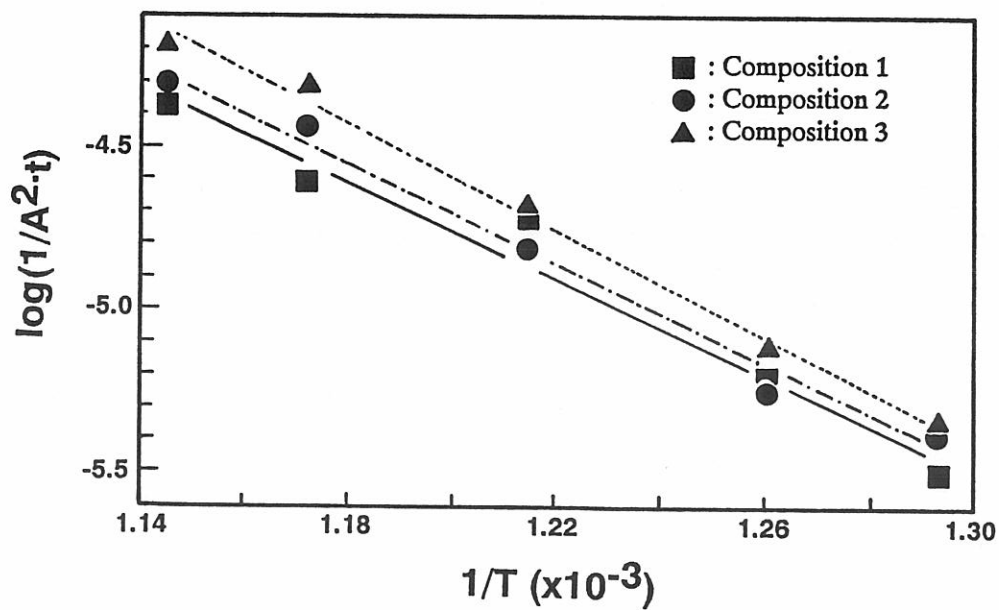


Fig.2-12 多孔体の比表面積の熱処理温度依存性

Composition 1 : $E = 14.9 \pm 1.7$ (kcal/mol)

Composition 2 : $E = 15.3 \pm 1.0$ (kcal/mol)

Composition 3 : $E = 16.4 \pm 0.7$ (kcal/mol)

ふっ素の有無による活性化エネルギーの変化は特に見られず、各組成で15～16kcal/molであった。分相の見かけの活性化エネルギーに関する報告としては、先述のHaller⁶⁾及び中島ら⁷⁾の報告の他、数種の組成について報告されている。

Haller⁶⁾ : $6\text{Na}_2\text{O} \cdot 25.6\text{B}_2\text{O}_3 \cdot 68.4\text{SiO}_2$ (wt%)

$E = 40\text{kcal/mol}$

江口ら¹¹⁾ : $8\text{Na}_2\text{O} \cdot 22\text{B}_2\text{O}_3 \cdot 70\text{SiO}_2$ (wt%)

$E = 62\text{kcal/mol}$

Hammel¹²⁾ : $13\text{Na}_2\text{O} \cdot 11\text{CaO} \cdot 76\text{SiO}_2$ (wt%)

$E = 95\text{kcal/mol}$

中島ら⁷⁾ : $6.3\text{Na}_2\text{O} \cdot 23.5\text{B}_2\text{O}_3 \cdot 50.0\text{SiO}_2 \cdot 4.2\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 16.0\text{CaO}$ (wt%)

$E = 143\text{kcal/mol}$

$\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3-\text{SiO}_2$ 系の分相の活性化エネルギーは CaO や Al_2O_3 を含んだ組成に比べ小さい値を示しているが、本実験で得られた値はHallerがバイコール型の組成について求めた活性化エネルギーの値よりさらに小さい。この相違については活性化エネルギーが $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3$ 相中の SiO_2 の拡散に起因するものであるならば、PPG組成の $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3$ 相はバイコール型に比べて SiO_2 成分に乏しいため粘性が低くなり、これが分相の見かけの活性化エネルギーの低減に寄与していると考えられる。

3-4 熱処理時間と細孔構造の関係

Fig. 2-13及びTable 2-7はふっ素を添加した試料 (Composition 2, 3) を550℃で24～120時間熱処理下試料の細孔径及び比表面積を示している。熱処理時間の増加と共に細孔径が増大し、比表面積は減少しており、熱処理時間が長くなると共に細孔構造が大きくなっていることが分かる。

原ガラスの熱処理時間の増加に伴う多孔質ガラスの細孔構造の変化は SiO_2 骨格の再溶解・拡散に伴う分相構造の再編によると考えられる。本章1-2-2でも記したように、Hallerはポーラスバイコール型の多孔質ガラスにおいて、比表面積は $t^{-1/2}$ に比例して減少することを示している (Fig. 2-3)。

本実験における多孔体の細孔半径、比表面積の時間変化を対数プロットしたのがFig. 2-14

Table2-7 熱処理時間による多孔体の細孔径と比表面積の変化

Composition of mother glass	Condition of heat treatment	mean pore diameter (・)	specific surface area (m^2/g)
2	550°C × 24hrs.	614	49.6
	550°C × 48hrs.	846	36.8
	550°C × 72hrs.	920	35.7
	550°C × 96hrs.	1056	33.6
	550°C × 120hrs.	1084	28.4
	550°C × 240hrs.	1590	24.0
3	550°C × 24hrs.	682	42.7
	550°C × 48hrs.	988	32.4
	550°C × 72hrs.	1076	30.6
	550°C × 96hrs.	1156	31.8
	550°C × 120hrs.	1312	25.8
	550°C × 240hrs.	1752	20.8

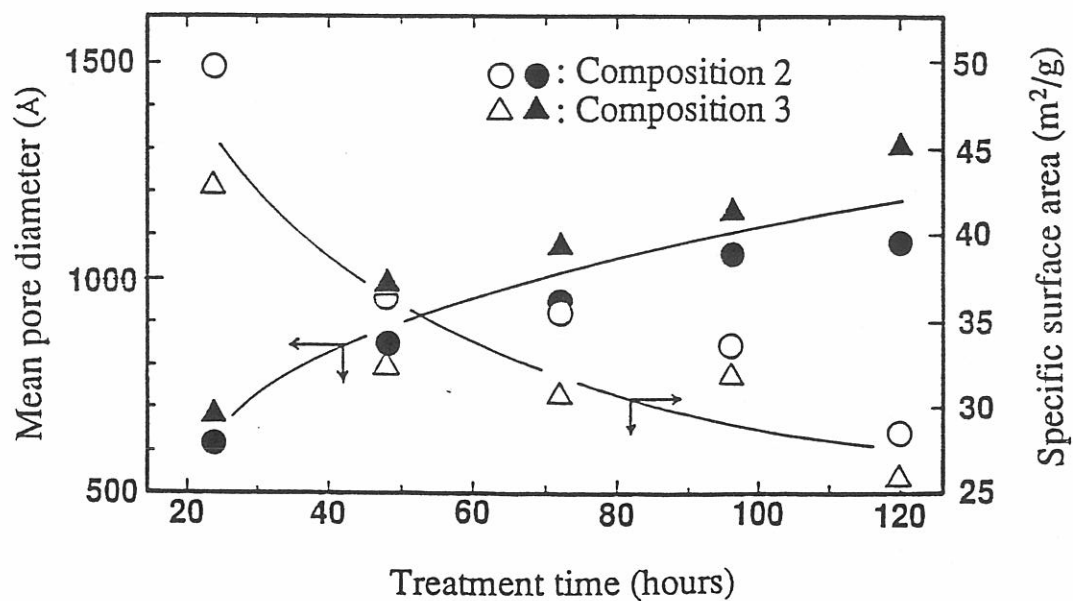


Fig.2-13 熱処理時間と多孔体の細孔径及び比表面積の関係

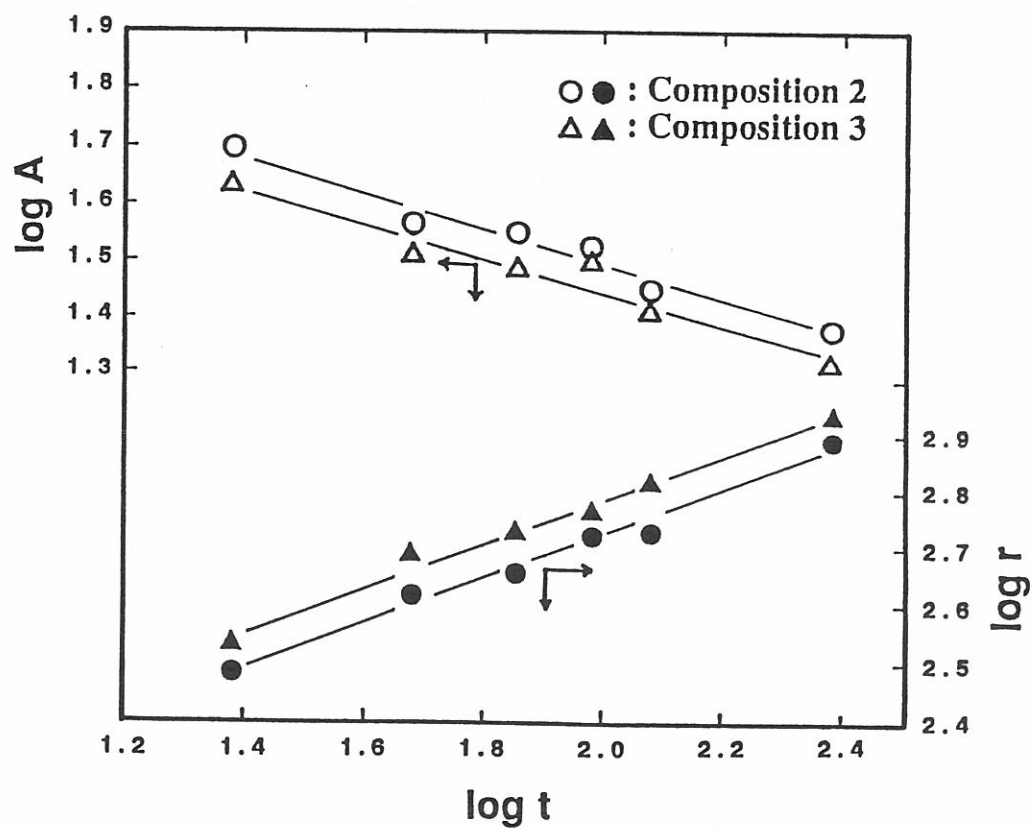


Fig.2-14 多孔体の細孔半径(r)及び比表面積(A)の熱処理時間(t)による変化

であり、それぞれ(2-6), (2-7)式のような熱処理時間依存性が得られた。

$$\text{比表面積 'A'} \propto t^{-0.3} \quad \dots (2-6)$$

$$\text{細孔半径 'r'} \propto t^{0.4} \quad \dots (2-7)$$

Hallerの結果 (Fig. 2-3) はTable2-2(a)のケースに相当するが、本実験結果は(b)のケースに相当すると考えられる。このような分相構造再編のメカニズムの相違は本実験で得られる分相状態はHallerの組成に比べて大きいと、拡散パスがHallerの場合に比べて長くなるためと考えられる。

また細孔が円筒モデルにより表されるならば、細孔容積一定の条件下では(2-2)式より熱処理条件によらず比表面積は細孔半径に逆比例するはずである。本実験結果では細孔容積 'V' は熱処理条件によらず約55%と一定であるが、(2-6), (2-7)式では細孔半径と比表面積が異なる時間依存性を示しており、比表面積と細孔半径の間に逆比例の関係が成り立っていない。この相違については本実験組成では細孔構造を表現するモデルとして円筒モデルが適当ではないためと考えられる。

3-5 ハロゲンの添加による不混和温度の変化

Composition 1~6の組成に対して不混和温度を測定したところ、Table2-8のような結果が得られた。ハロゲンを含まない $10\text{Na}_2\text{O} \cdot 50\text{B}_2\text{O}_3 \cdot 40\text{SiO}_2$ (wt%) 組成では不混和温度は690℃であり、この値はFig. 2-1のHallerらの結果と一致している。ふっ素の添加により不混和温度は数℃程度上昇しており、田草川ら¹⁰⁾のバイコール組成での結果と同様であった。また塩素及び臭素の添加により不混和温度は690℃から720℃まで上昇した。これよりハロゲンの添加、特に塩素及び臭素の添加は本実験組成において不混和温度を高めることが分かった。

Table2-8 ハロゲンを添加した組成の不混和温度

組成	不混和温度
Composition 1	690℃
Composition 2	695℃
Composition 3	695℃
Composition 4	710℃
Composition 5	720℃
Composition 6	710℃

3-6 ハロゲンの添加による溶出挙動の変化

ハロゲン添加による熱水溶出時の溶出速度の変化を調べるため、 $580^{\circ}\text{C} \times 48$ 時間の熱処理を施した試料を $20\text{mm} \phi \times 2\text{mm}$ 厚に切断し、 95°C の熱水中で1～6時間溶出した際の重量減少率の経時変化をFig. 2-16に示す。

ハロゲンを含まない試料 (Composition 1) では約6時間で重量減少率が55%に達し、溶出が完了していることが分かる。これに比べてハロゲンを含むその他の試料はより大きな溶出速度を示している。特に塩素を添加した場合 (Composition 5) にはハロゲンを含まない試料に比べ約1/2の時間で溶出が完了しており、塩素の添加が溶出速度の向上に最も効果があることが分かった。Composition 1と5の細孔径は $1320 \cdot$ 及び $1464 \cdot$ であり、このような溶出速度の向上はハロゲンの添加による細孔径の増大のみによるとは考えられず、可溶出相である $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3$ 相の溶解速度がハロゲンの添加により変化していることが推測される。

そこで分相後の可溶出相に相当する $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3$ 系ガラスにハロゲンを添加した場合の熱水中への溶解速度変化を測定した。ハロゲン添加量は $5.2\text{mol}\%$ 一定とし、ハロゲン相互の添加効果の比較を行った。その結果、Fig. 2-17に示すようにハロゲンを添加した $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3$ 系ガラスの溶解速度が向上しており、その効果は塩素及び臭素を添加した試料で顕著にみられており、この傾向はFig. 2-16の溶出速度の結果と一致する。ハロゲン添加による分相ガラスの溶出速度の向上は、主に可溶出相である $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3$ 相にハロゲンが含まれることにより $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3$ 相の溶解速度が向上することによると考えられる。

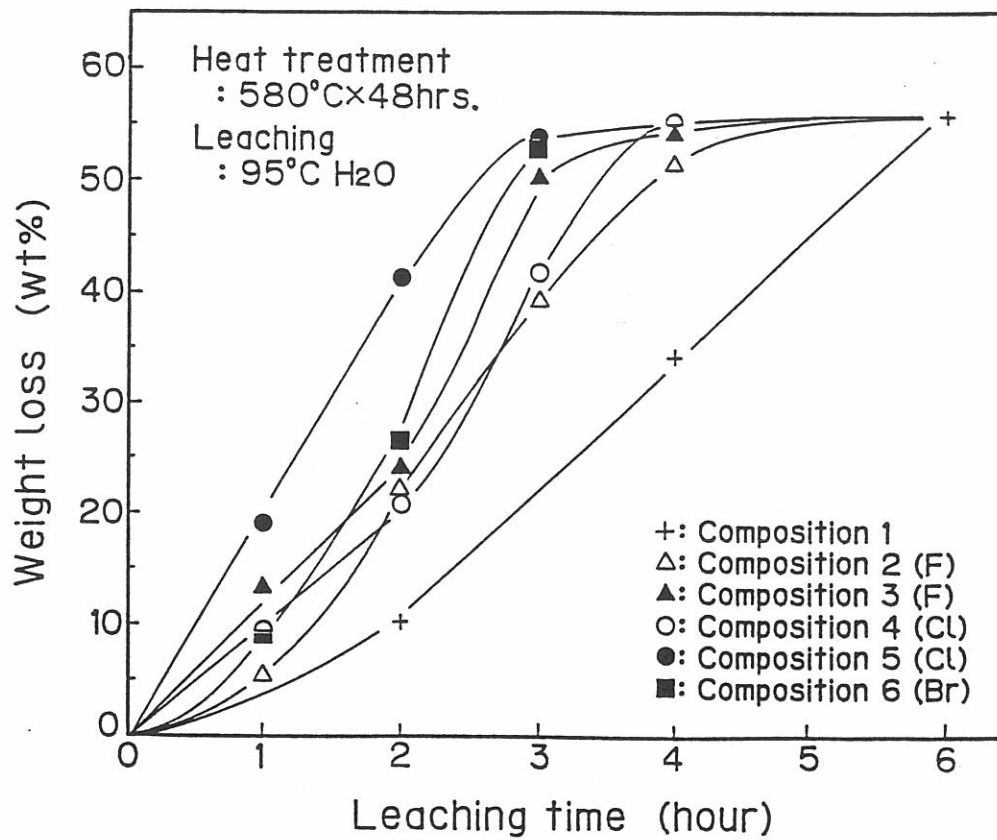


Fig.2-15 熱水溶出時の重量減少率 (95°C 熱水中)

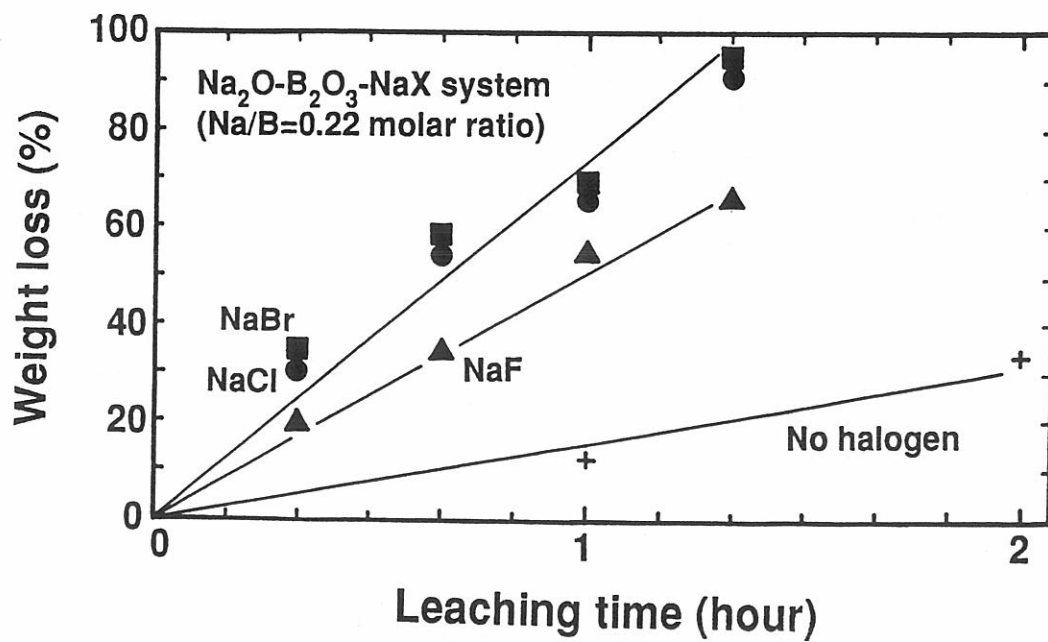


Fig.2-16 Na₂O-B₂O₃-NaX(X:F,Cl,Br)系ガラスの溶解速度 (95°C 熱水中)

§ 4 小括

ソーダボロシリケートガラスの分相及び溶出過程に及ぼすハロゲンの添加効果について以下の知見を得た。

1) $10\text{Na}_2\text{O} \cdot 50\text{B}_2\text{O}_3 \cdot 40\text{SiO}_2$ 組成に F, Cl, Br を添加した原ガラスより鋭い細孔分布を持つ多孔質ガラスが得られた。熱処理温度を 500°C から 600°C の間で、熱処理時間を 24 時間から 240 時間の間で変化させることにより、得られる多孔質ガラスの細孔径を約 $300 \cdot \sim 2500 \cdot$ の範囲で制御し得ることが分かった。

2) ハロゲンを添加することにより、分相が促進され、ハロゲンを添加しない場合に比べ同じ熱処理条件で大きな細孔構造を持つ多孔質ガラスが得られた。ハロゲンによる分相の促進はふっ素及び塩素の場合に特に効果がみられた。

3) ハロゲンを添加した試料の不混和温度はふっ素の添加により数 $^\circ\text{C}$ 、塩素、臭素の添加により約 30°C 上昇することが分かった。

4) ハロゲンの添加により熱水溶出処理に要する時間を短縮できることが判明した。その効果は塩素を添加した場合に強く、塩素を 0.88wt% 添加した試料ではハロゲンを含まない試料の $1/2$ 以下の時間で溶出処理が完了した。またハロゲンによる溶出時間の短縮は添加されたハロゲンが可溶出相である $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3$ 相に存在し、 $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3$ 相の熱水への溶解速度が増加することによることが分かった。

第2章 Appendix

Hallerの理論⁶⁾

単位体積中にN個の半径rの球体がランダムに存在するとき、接触する球の平均個数 n_{av} は半径2r内の空間に他の球の中心が存在する確率より(2A-1)式のように求められる。

$$n_{av} = 4\pi (2r)^3 / 3 = 32\pi r^3 / 3 \quad \dots (2A-1)$$

ここで、体積 v_i の球を任意の位置に置くとすると、既に占有されている部分以外に置かれる場合のみ球が占有する体積を増加させる。そこで増加する体積は $v_i (1 - V_a)$ となる。但し、 V_a は実際に球によって占められている体積分率を表す。1つの球による体積の増加分 $dV_a / dN = v_i (1 - V_a)$ となり、これを積分すると

$$V_a = 1 - \exp(-v_i N) \quad \dots (2A-2)$$

$$\text{or } N = -\ln(1 - V_a) / v_i \quad \dots (2A-3)$$

上式は単位体積中に存在するN個の球(体積 v_i)が重なり合って分散相の総体積を成すことを示している。

◎ V_a が小さいときには(2A-3)式は(2A-4)式のようになる。

$$N = V_a / v_i \quad \dots (2A-4)$$

これは即ち球の重なり合いの無い場合に相当している。

(2A-1), (2A-3)式及び $v_i = 4\pi r^3 / 3$ より(2A-5)式が得られる。

$$n_{av} = -8 \ln(1 - V_a) \quad \dots (2A-5)$$

近接する球の個数nの分布としてポワソン分布($P_n = (n_{av}^n / n!) \exp(-n_{av})$)を仮定すると(2A-5)式より次式が得られる。

$$P_n = \{ [-8 \ln(1 - V_a)]^n / n! \} \cdot (1 - V_a)^8 \quad \dots (2A-6)$$

(2A-6)式を図示したのがFig. 2A-1であり、ある V_a の値の時、近接する粒子数nが0, 1, 2...である球の割合を示している。(分散相の体積 V_a が増えるにつれ、球同士の接触が増えることがわかる。例えば $V_a = 0.2$ では $n = 1, 2$ の粒子が各25%で $n = 0, 3, 4...$ の粒子は少ないが、 $V_a = 0.5$ では $n = 4, 5, 6$ のものが各20%弱ある。)

$V_a = 1/3$ では平均接触個数 $n_{av} = 3.2$ で、他の球と接触せず独立しているものは全体の僅か4%にすぎない。これが $V_a = 1/2$ では $n_{av} = 5.5$ で $n = 0$ のものは0.4%となる。

この図より粒子密度が高くなるにつれ粒子はnetwork的構造を示すと考えられる。

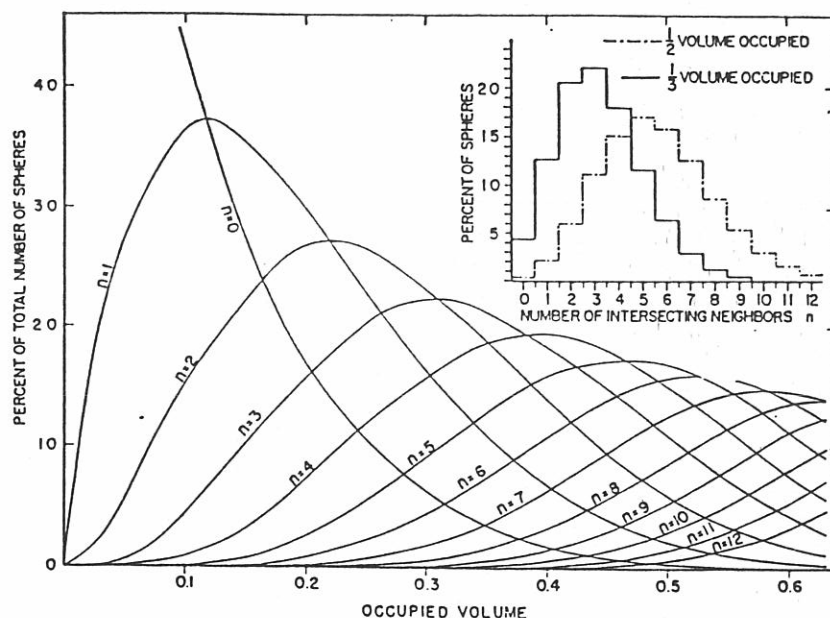


Fig. 2A-1 分散相の体積 V_o による接触粒子数 n の分布の変化

上記の関係から粒子径と界面積の関係を導くことが出来る。まず球の重なり合いを無視すると N 個の球の表面積は $N \cdot 4\pi r^2$ となり、分散相の外側にある粒子表面積 $A_v = N \cdot 4\pi r^2 (1 - V_o)$ となる。

これを(2A-3)式に代入すると $v_i = 4\pi r^3 / 3$ より

$$A_v = (3/r) (V_o - 1) \ln (1 - V_o) \quad \dots (2A-7)$$

◎ V_o が小さいときには(2A-7)式は(2A-8)式のようなになる。

$$A_v = (3/r) V_o \quad \dots (2A-8)$$

これは球の重なり合いがない場合に当たる。

多くの場合、平均粒子径の増大は小さい粒子から大きい粒子への物質の拡散により、この場合、平滑な粒子の表面は凸であり絡み合っている部分が凹となる。微細構造の再編はこの凸面から凹面への物質移動によると考えられる。

水銀圧入により測定したシリカrich相の体積分率は 0.50 ± 0.03 であり、値のばらつきは熱処理条件によらない。→熱処理条件による比表面積の変化は分散相配置によるもの

半径 r_1, r_2 の球（粒子）の個数を N_1, N_2 とし、球の全体積 V を一定とすると、(2A-4)式より

$$\text{球の個数 } N = 3V / (4\pi r^3)$$

$$dN / dr = -9V / 4\pi r^4 \quad \dots\dots \text{粒子数の増加率}$$

ここで ($dN \times$ 球の体積) = 半径が dr だけ変化したときの移動すべき体積 V_T

$$\therefore \frac{dV_T}{dr} = - \frac{9V}{4\pi r^4} \cdot \frac{4}{3} \pi r^3 = - \frac{3V}{r}$$

これを時間微分にすると

$$dV_T / dt = (dr / dt) (3V_a / r) \quad \dots (2A-9)$$

凸型の表面から凹型の一方向の拡散を仮定すると(2A-10)式が得られる。

$$dV_T / dt = (D_v \Delta C / p) A_v \quad \dots (2A-10)$$

但し、 D_v : 拡散係数 ΔC : 凹凸面間の濃度差 (体積換算)

p : 拡散パス長 A_v : 単位体積中の界面積

【仮定】

◎定常状態では溶解，拡散，析出速度は等しい

◎溶解速度は球表面（凸面）での平衡溶解度 (S_+) と表面から離れた所での濃度 (C_+) の差に比例

◎析出速度は析出面（凹面）での S_- と C_- の差に比例

以上の仮定のもとで溶解及び析出サイトにおける反応の速度定数を各々 l, m とすると界面反応の物質収支の式は(2A-11)式で表される。

$$l (S_+ - C_+) = D_v \Delta C / p = m (C_- - S_-) \quad \dots (2A-11)$$

ここで、 $S_+ - S_- = \Delta S$, $C_+ - C_- = \Delta C$ とすると

$$\Delta S - \Delta C = D_v \Delta C (l^{-1} + m^{-1}) / p$$

$$\Delta C = \frac{p}{p + D_v (l^{-1} + m^{-1})} \Delta S \quad \dots (2A-12)$$

S_+, S_- を半径 r_+, r_- の球上の溶解度とするとKelvinの式より

$$l \ln (S_+ / S_0) = 2M \gamma / r R T \rho$$

但し、 γ : 界面エネルギー M : 分子量 ρ : 密度

S_0 : 平行な界面上の溶解度

S_+ と S_0 の差が小さい場合は

$$S_+ - S_0 = S_0 \cdot 2M \gamma / r R T \rho$$

同様に、 $S_+ - S_- = -S_0 \cdot 2M\gamma / rRT\rho$ より

$$S_+ - S_- = \Delta S = S_0 \cdot 4M\gamma / rRT\rho \quad \dots (2A-13)$$

(2A-13), (2A-12), (2A-7)式を(2A-10)式に代入し、

$$\frac{dV_T}{dt} = \left[\frac{p}{D_v} + l^{-1} + m^{-1} \right]^{-1} \cdot \frac{1}{r^2} \cdot \frac{S_0 \cdot 12M\gamma (V_a - 1) \ln(1 - V_a)}{RT\rho} \quad \dots (2A-14)$$

拡散パス p が非常に小さいとすると

$$\frac{dV_T}{dt} = \frac{1}{r^2} \cdot \frac{S_0 \cdot 12M\gamma (V_a - 1) \ln(1 - V_a)}{(l^{-1} + m^{-1}) RT\rho} \quad \dots (2A-15)$$

(2A-15)式の dV_T / dt を(2A-9)式に代入し、積分し、 $t = 0$ における粒子径が r_i に比べて非常に小さいとすると

$$r^2 = t \left[S_0 \cdot 8M\gamma (V_a - 1) \ln(1 - V_a) / V_a (l^{-1} + m^{-1}) RT\rho \right] \quad \dots (2A-16)$$

また、(2A-7)式を用いて(2A-16)式を比表面積 A_v で表すと

$$A_v^2 = [9RT\rho (l^{-1} + m^{-1}) \cdot V_a (V_a - 1) \ln(1 - V_a) / 8S_0 M\gamma] / t \quad \dots (2A-17)$$

→ 比表面積は時間の $-1/2$ 乗に比例

拡散パスが長く、溶解、析出サイト数 l, m が多い場合には(14)式より

$$dV_T / dt = D_v \cdot S_0 \cdot 12M\gamma (V_a - 1) \ln(1 - V_a) / p r^2 RT\rho \quad \dots (2A-18)$$

(2A-7)式を代入し p が r と同程度として積分すると、比表面積は時間の $-1/3$ 乗に比例

輸送メカニズムが表面拡散の場合、物質移動速度は（サイトの周）×（数）に比例する。
短距離を速く拡散する場合には、比表面積 A は $t^{-1/3}$ に比例し、長距離を遅く拡散する場合には、比表面積 A は $t^{-1/4}$ に比例する。

参考文献

- 1) W. Haller, D. H. Blackburn, F. E. Wagstaff and R. J. Charles : J. Am. Ceram. Soc., 53 (1970) 34-38
- 2) 牧島亮男 : 機能性ガラス入門 (アグネ)
- 3) 土橋正二 : ガラスの化学 (講談社)
- 4) J. J. Hammel and T. Allersma : U. S. Pat. 3, 843, 341 (1974)
- 5) J. W. Cahn : J. Chem. Phys., 42 (1965) 93-99
- 6) W. Haller : J. Chem. Phys., 42 (1965) 686-693
- 7) 中島忠夫, 黒木裕一 : 日本化学会誌, 8 (1981) 1231-1238
- 8) A. Makishima, J. D. Mackenzie, J. J. Hammel : J. Non-Cryst. Solids, 31 (1979) 377
- 9) Z. Chaowu and Y. Ruilin : J. Non-Cryst. Solids, 112 (1989) 244-250
- 10) N. Takusagawa, K. Yamamoto and K. Kitajima : J. Non-Cryst. Solids, 95-96 (1987) 1055
- 11) 江口清久, 田坂賢次, 垂水修二 : 窯業協会誌, 77 (1969) 301
- 12) J. J. Hammel : J. Chem. Phys., 46 (1967) 2234-2244

第 3 章

水銀還元酵素の固定化と水銀センサーの作製

§ 1 緒言

1-1 緒論

タンパク質からなる触媒である酵素は、

- 1) 常温，常圧，中性付近のpH領域といった温和な反応条件下での優れた触媒作用
- 2) 基質に対する厳密な選択性（基質特異性）
- 3) 反応の立体特異性
- 4) 複雑な構造の基質分子の特定の部位にだけ反応を起こし得る位置特異性

など、一般の化学触媒では到達し難い特性を持っており、第 1 章で述べたように分析や有用物質の生産など広分野に応用されている。

通常、酵素を用いた物質生産においては酵素は溶液状態で用いられ、反応はバッチ式で行われる。そのため酵素は各バッチの反応毎に生成物と分離され捨てられることになり、高価な酵素の使い方としては非常に不経済と言わざるを得ない。そこで酵素を不溶性担体に固定化した固定化酵素を用いて、酵素を繰り返し使用することが検討されている。

固定化担体の中でも多孔質ガラスは酵素の固定化担体として古くから用いられており、固定化方法や固定化酵素の特性について、これまでに多くの報告が成されている。

1-2 既往の研究（ガラス担体への酵素の固定化）

1-2-1 固定化担体

多孔質ガラスはその広い比表面積や耐化学性から酵素固定化用の担体やアフィニティークロマトグラフィー用の担体として古くから用いられてきた。特にポーラスバイコールガラスは“Controlled Porous Glass (CPG)”という名称で開発元のコーニング社等から市販されているため、容易に入手可能であることがCPGが担体としてよく用いられている一つの理由であろう。

Table3-1はこれまでに報告されている多孔質ガラス及びガラスビーズに固定化された酵素を示しており、酸化還元や加水分解に関与する酵素が主に固定化されている。Table3-1に示された酵素の固定化に用いられた担体は先に述べたCPGが多いが、多孔質ガラス表面に ZrO_2 をコーティングしたものも同様に用いられている。

Table3-1 多孔質ガラスに固定化された酵素

酵素名	酵素コード	文献番号
lactoperoxidase	EC1.??	1, 2
sulfhydryl oxidase	EC1.??	3, 4
alcohol dehydrogenase	EC1.01.01.01	5, 6
glucose oxidase	EC1.01.03.04	7, 8, 9, 10
galactose oxidase	EC1.01.03.09	11
xanthine oxidase	EC1.01.03.22	12
L-amino acid oxidase	EC1.04.03.02	13
lipoamide dehydrogenase	EC1.06.04.03	14
urate oxidase	EC1.07.03.03	12
catalase	EC1.11.01.06	7, 15
hydrogenase(A.eutrophus H-16)	EC1.12.01.02	16
hydrogenase(C.pasteurianum)	EC1.18.03.01	18
mercuric reductase	EC1.16.01.01	17
1,4- α -glucan phosphorylase	EC2.04.01.01	19
nuclease P1	EC3.01.??	20
steroid esterase	EC3.01.??	21
lipase	EC3.01.01.03	22
alkaline phosphatase	EC3.01.03.01	23
amylase	EC3.02.01.01	24
β -amylase	EC3.02.01.02	25
glucoamylase	EC3.02.01.03	24, 26, 27, 28, 29, 30
cellulase	EC3.02.01.04	31
β -galactosidase	EC3.02.01.23	32, 33, 34
β -fructofuranosidase(invertase)	EC3.02.01.26	1, 35
β -glucuronidase	EC3.02.01.31	36, 37
amyloglucosidase	EC3.02.01.33	15, 38
naringinase	EC3.02.01.40	39, 40
leucise aminopeptidase	EC3.04.11.??	41, 42
aminopeptidase M	EC3.04.11.??	42
aminopeptidase P	EC3.04.11.09	43
aminopeptidase(Clostridial)	EC3.04.11.13	43
chymotrypsin	EC3.04.04.05	34
chymotrypsin	EC3.04.21.01	44, 45
protease (pancreatic)	EC3.04.21.??	13
protease (B.subtilis)	EC3.04.21.14	46
papain	EC3.04.22.02	47
urease	EC3.05.01.05	48, 49, 50, 51
aminoacylase	EC3.05.01.14	52
carbonic anhydrase	EC4.02.01.01	53
poly(methoxygalacturonide)lyase	EC4.02.02.10	54
glucose isomerase	EC5.03.01.05	55, 56

1-2-2 固定化方法

酵素の固定化方法は数種類の方法が考案されているが、最も一般的に使用されているのは、多孔質ガラスを γ -aminopropyltriethoxysilane (γ -APTES) で表面処理し作製したアルキルアミノガラスをグルタルアルデヒドで活性化し酵素を固定化する方法である。この方法はアルキルアミノガラスをグルタルアルデヒド溶液に浸漬し、その後酵素溶液を加えるだけで比較的高い固定化率が得られるので、特殊な装置や試薬を使わずに簡単に酵素を固定することが出来る。また四塩化チタン (TiCl_4) によりガラス表面を活性化する方法も簡便な固定化法として多く用いられている。アルキルアミノガラスをさらに表面処理する方法としては塩化ニトロベンゾイルによりアリルアミノ化する方法や、無水コハク酸によりカルボキシル化する方法などがある。これらの固定化法は表面処理が複雑ではあるが、多くの酵素において固定化後の活性が高く経時変化も少ないため、有用な固定化法とされている。特殊な固定化法としてはBraunら²³⁾ がテトラエトキシランを用いたゾルーゲル法によりアルカリフォスファターゼをゲル中に包括固定している。この方法は担体の表面処理等複雑な操作を要しないが、酵素が失活する可能性が高く、担体が多孔性でないため固定化した酵素が有効に利用されない等、欠点が多く一般的な固定化法とは言えない。

Lappiら¹⁸⁾ はガラスビーズ上にFig. 3-1のような四種類の方法でClostridium由来のヒドロゲナーゼを固定化し、その活性及び安定性を比較している。Table 3-2は固定化法による酵素の固定量 (mg) 及び固定化酵素の活性 ($\mu\text{mole H}_2/\text{min}$) を示しており、固定化酵素のTotal activityではグルタルアルデヒドで固定化した場合が最も高い。但し、固定化量を考慮にいった比活性ではグルタルアルデヒド及びコハク酸誘導体に固定化したヒドロゲナーゼが同じ値を示している。Fig. 3-2は固定化酵素活性の経時変化を示しており、空気雰囲気下で保存した場合には固定化していない酵素 (図中soluble) は数分で活性を失っているのに対し、固定化した場合にはいずれも失活速度が低下していることが分かる。特にコハク酸誘導体に固定した場合には4日保持した後も固定化直後の約70%の活性を示しており、安定性が著しく向上している。Lappiらの結果では同ヒドロゲナーゼのガラス上への固定化にはコハク酸誘導体 (カルボキシル誘導体) を用いるのが活性、安定性の面で最適と考えられる。この例のように固定化方法により固定化酵素の特性は大きく影響されるので固定化方法の検討は非常に重要であるが、Lappiらのように数種の固定化法について検討を行ったものは少ない。

Table3-2 固定化法によるヒドロゲナーゼ活性の変化

Immobilization Methods	Protein Added (mg)	Activity Added ($\mu\text{molH}_2/\text{min}$)	Protein unbound	Total Activity bound	Specific Activity
diazo	20	420	<0.4	12.6	0.63
glutaraldehyde	20	420	<0.4	26.0	1.3
alkylamine-carbodiimide	20	420	3.3	8.5	0.51
succinyl-carbodiimide	20	420	11.4	11.1	1.3

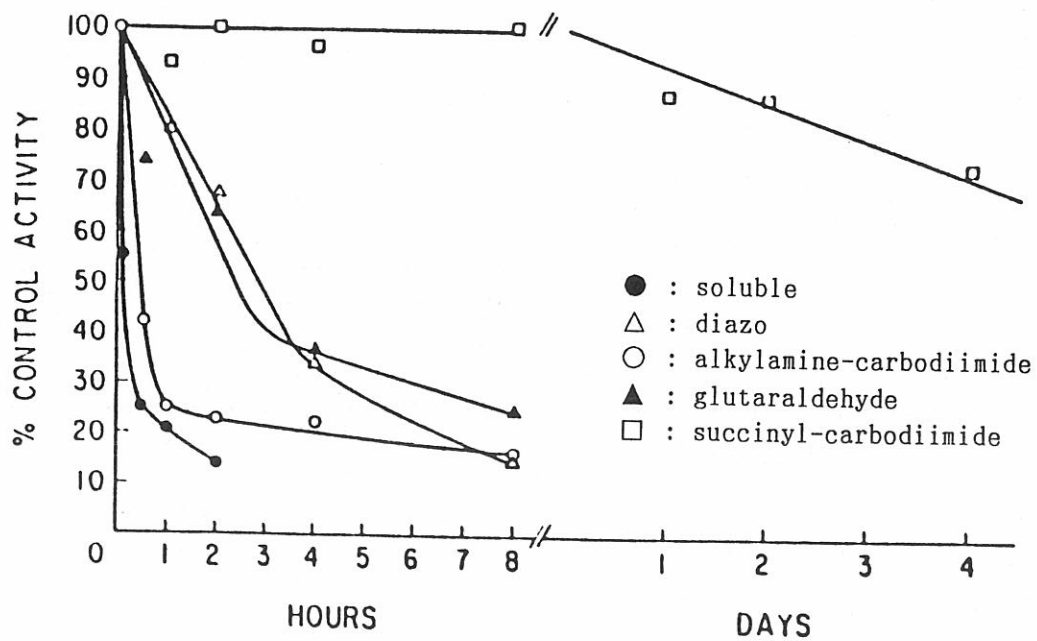


Fig.3-2 固定化法によるヒドロゲナーゼの安定性の変化

1-2-3 固定化酵素のpH－活性曲線

酵素の活性はpHにより変化し、各酵素に特有の最適pHがある。固定化処理は多くの場合、最適pHをシフトさせ、またはpH－活性曲線を変化させる。Table3-3は固定化によるpH依存性の変化についての報告をまとめたものである。多くの場合、最適pHがアルカリ側にシフトしており、最適pHが酸性よりにシフトした例は少ない。またpH－活性曲線全体が固定化により広がる現象も報告されている。Fig. 3-3(a)はpH－活性曲線の形状が変化せず、最適pHがシフトした例であり、Fig. 3-3(b)はpH－活性曲線が変形（broadening）した例である。

このような固定化による酵素活性の最適pHのアルカリ側へのシフトは、多孔質ガラス担体表面の修飾基が持つ荷電により固定化酵素領域のpHが外部溶液のpHより酸性となり、そのため実際の酵素反応は反応液のpHより酸性側で進行することになり、見かけ上最適pHがアルカリ性に移動するものと考えられている。但し、電氣的に中性のポリアクリルアミドゲルで酵素を包括法で固定した場合にも最適pHの移動が起こることがあり、このような酵素活性のpH依存性の変化についてはさらに検討が必要である。

1-2-4 固定化酵素の温度－活性曲線

酵素の反応機構は酵素自身即ちタンパク質の立体構造に大きく依存している。酵素の触媒作用が無機触媒のそれと大きく異なる点は、酵素活性が温度の上昇によって酵素の立体構造が崩れる温度域では活性が低下する事にある。固定化操作は担体と酵素間の結合が酵素の立体構造をある程度制約するため、遊離酵素に比べて高温でも立体構造が保たれ、活性を示す場合がある。Table3-4は多孔質ガラスに固定化した酵素活性の温度依存性の変化に関する報告であり、多くの場合、酵素の温度－活性曲線が高温側に移動することが報告されている。Fig. 3-4は1,4- α -glucan phosphorylaseを多孔質ガラス上に固定化した場合の温度－活性曲線の変化を示しており、アゾ結合により固定化した場合に温度特性の向上が見られる。酵素も構造変化が起こらない限りは通常の触媒と同様に高温ほど反応速度は大きくなるため、固定化により酵素が熱的に安定化されることは酵素の利用上望ましいことである。多孔質ガラス担体は有機系担体と比べて熱的に安定であり、固定化酵素を高温で使用する場合には適当な担体となり得る。

1-2-5 固定化酵素の安定性

固定化酵素は熱的に安定になるだけでなく、常温での長期間の保持に対しても酵素単独の状態より安定になる。Fig. 3-2に示したLappiら¹⁸⁾の結果は、適正な固定化処理により酵素の安定性が向上する典型的な例である。Masonら³⁵⁾は固定化担体による酵素の安定性の変化について興味深い報告をしており、多孔質ガラスとセルロースに同じアゾ結合により

Table3-3 固定化による酵素の最適pH及びpH-活性曲線の変化

酵素名	固定化 方法	最適pH soluble→immobilized	pH-活性曲線
hydrogenase ¹⁶⁾	G. A.	---	shift(アルカリ)
phosphorylase ¹⁹⁾	G. A.	5.8 → 6.5	変化なし
〃	Azo	5.8 → 6.7	〃
glucoamylase ²⁷⁾	G. A.	4.3 → 5.0	変化なし
〃	Azo	4.3 → 5.0	broadening
β -galactosidase ³²⁾	G. A.	3.5 → 4.0	---
β -galactosidase ³³⁾	G. A.	5.9 → 6.0	変化なし
invertase ³⁵⁾	Azo	3.5 → 4.0	broadening
naringinase ⁴⁰⁾	G. A.	5.0 (変化なし)	broadening
leu. aminopeptidase ⁴²⁾	Azo	7.3 (変化なし)	変化なし
aminopeptidase M ⁴²⁾	Azo	7.5 (変化なし)	変化なし
aminopeptidase P ⁴³⁾	G. A.	8.3 → 8.2	変化なし
aminopeptidase ⁴³⁾	G. A.	8.2 (変化なし)	変化なし
chymotrypsin ⁴⁴⁾	Azo	8.0 → 10.0	---
protease ⁴⁶⁾	G. A.	7.3 → 7.5	broadening
〃	Azo	7.3 → 7.5	broadening
papain ⁴⁷⁾	G. A.	6.5 → 7.5	---
〃	Azo	6.5 → 7.5	---
〃	Suc	6.5 → 7.0	---
urease ⁴⁹⁾	G. A.	---	broadening
urease ⁵⁰⁾	G. A.	7.6 (変化なし)	shift(アルカリ)
urease ⁵¹⁾	Azo	(6.4~7.6)→6.0	---
aminoacylase ⁵²⁾	G. A.	8.5 → 8.6	変化なし
carbonic anhydrase ⁵³⁾	G. A.	---	shift(酸性)
poly(methoxy- galacturonide)lyase ⁵⁴⁾	M. L.	5.2 → 6.2	---

G. A. : グルタルアルデヒドで活性化した多孔質ガラスへの固定化

Azo : 多孔質ガラスのアリルアミノ誘導体へアゾ結合により固定化

M. L. : TiSO₄を用いた "Metal Link Method" による固定化

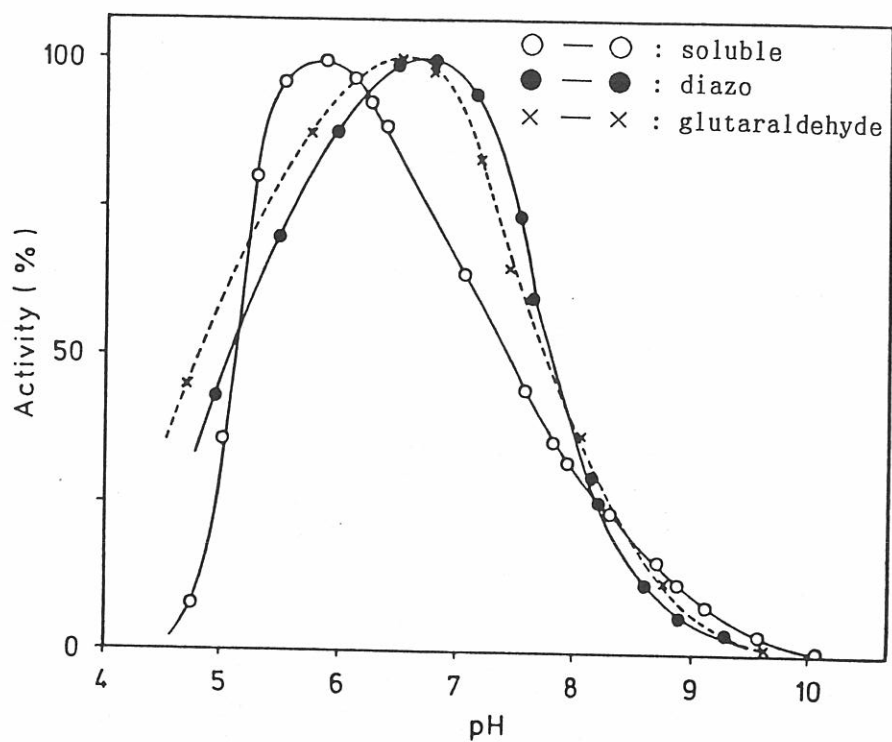


Fig.3-3(a) 固定化処理により酵素の最適pHがシフトする例
(1,4- α -glucan phosphorylase)

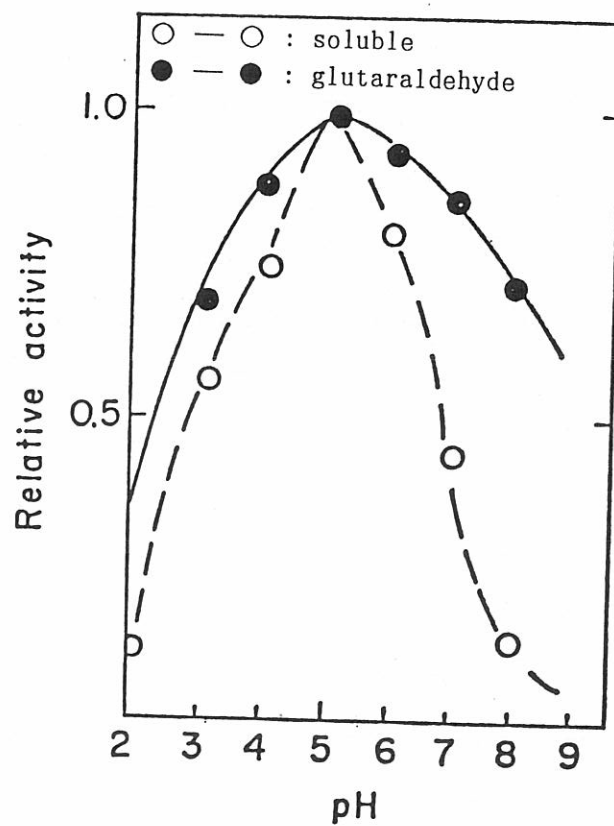


Fig.3-3(b) 固定化処理により酵素のpH-活性曲線が変形する例
(naringinase)

Table3-4 固定化による酵素の温度-活性曲線の変化

酵素名	固定化方法	最適温度 soluble→immobilized	温度-活性曲線
hydrogenase ¹⁶⁾	G. A.	40℃ (変化なし)	broadening
phosphorylase ¹⁹⁾	G. A.	40℃ (変化なし)	broad (高温)
"	Azo	40℃ → 45℃	shift (高温)
glucoamylase ²⁷⁾	Azo	53℃ → 60℃	変化なし
invertase ³⁵⁾	Azo	54℃ → 44℃	sharpening
naringinase ⁴⁰⁾	G. A.	40℃ → 55℃	変化なし
protease ⁴⁶⁾	G. A.	55℃ (変化なし)	変化なし
"	Azo	55℃ (変化なし)	変化なし
urease ⁵⁰⁾	G. A.	50℃ → 55℃	broad (高温)
glucose isomerase ⁵⁶⁾	Azo	80℃ (変化なし)	broadening

G. A. : グルタルアルデヒドで活性化した多孔質ガラスへの固定化

Azo : 多孔質ガラスのアリルアミノ誘導体へアゾ結合により固定化

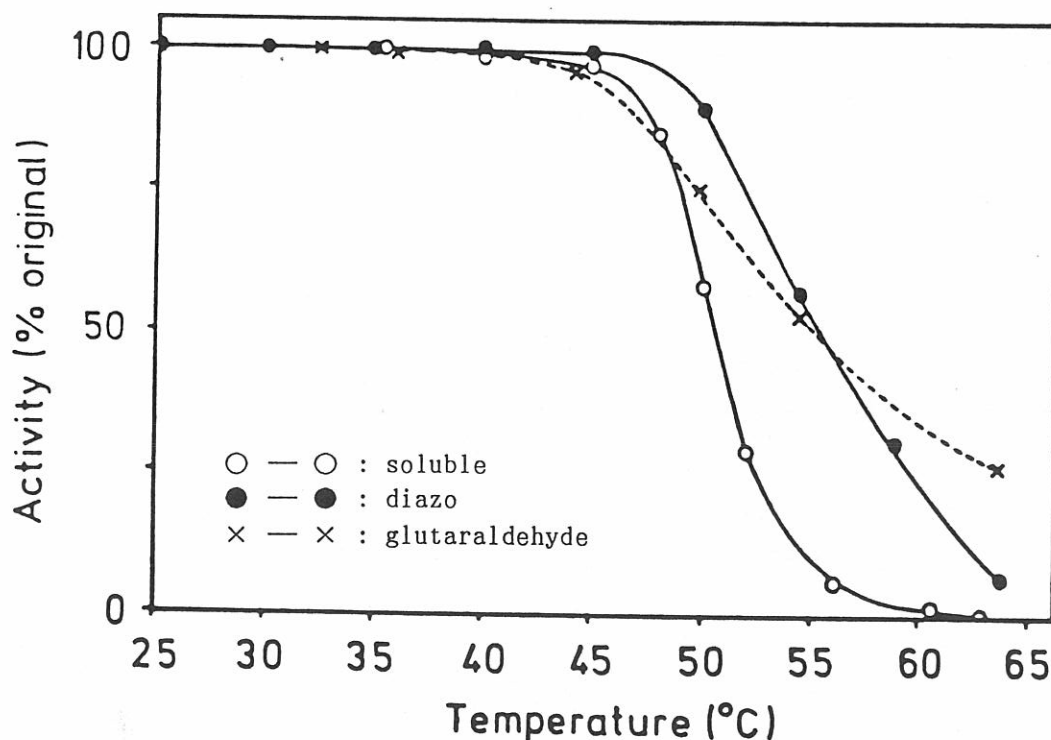


Fig.3-4 固定化による1,4- α -glucan phosphorylaseの温度-活性曲線の変化

固定したインペルターゼの活性の経時変化についてFig. 3-5のような結果を得ている。この場合、23℃でショ糖の加水分解を連続的に行わせており、セルロースに固定化したインペルターゼは10日程度で失活しているが、多孔質ガラスに固定化すると約1ヶ月間、初期の活性を保持している。このように同じ固定化法で担体による安定性の違いが現れる理由については不明である。

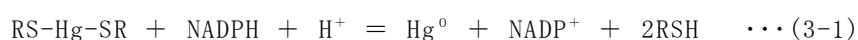
1-2-6 固定化酵素の応用

固定化酵素の応用に関する研究の多くは酵素反応を用いた物質生産を考慮したものである。例えばYokoteら⁵²⁾は固定化アミノアシラーゼを用いたDL-アミノ酸の連続分割に関して報告しており、Leeら²⁶⁾は固定化グルコアミラーゼを用いた澱粉から連続的にグルコースを生産する方法について報告している。固定化酵素を物質生産に用いた場合、連続操作が可能になる上、酵素をその活性が低下するまで使用できるので製造コストが低減できるという利点がある。千畑⁵⁷⁾は溶液状態及び固定化状態の酵素を用いた場合の製造コストをアミノアシラーゼを用いるL-アミノ酸製造の原価の例で比較している。Fig. 3-6のように固定化酵素を用いた場合には製造原価が溶液状態の酵素を用いる従来法の約60%に抑えられており、固定化酵素を用いた連続法での製造原価の低減は主にアミノアシラーゼ消費量の低減と連続法を用いることによる人件費の低減によることがわかる。

また多孔質ガラスに固定化した酵素をセンサーに応用した例も報告されている^{13), 37), 45)}。例えばMasciniら¹³⁾は固定化したL-アミノ酸オキシダーゼ及びプロテアーゼとアンモニア電極を用いたタンパク質濃度の測定装置について報告している。

1-3 水銀還元酵素 (reduced NADP-mercuric ion oxidoreductase)

水銀及びその化合物は多くの生物に有害であるが、一部の微生物 (Thiobacillus ferrooxidans, Pseudomonas aeruginosa 等) は水銀イオンの存在下でも生存が可能である。これら水銀耐性の微生物はその細胞内に水銀イオンを金属水銀に還元し、無害化する酵素、即ち水銀還元酵素 (EC1.16.1.1) を保有している。Foxら⁵⁸⁾はPseudomonas aeruginosaから水銀還元酵素を単離し、その触媒作用を調べた。水銀還元酵素は(3-1)式のようにdimercaptide (RS-Hg-SR) として存在する水銀イオンを還元する。



この反応において電子供与体として働くNADPH (ニコチンアデニンジヌクレオチドリン酸) は生体内で

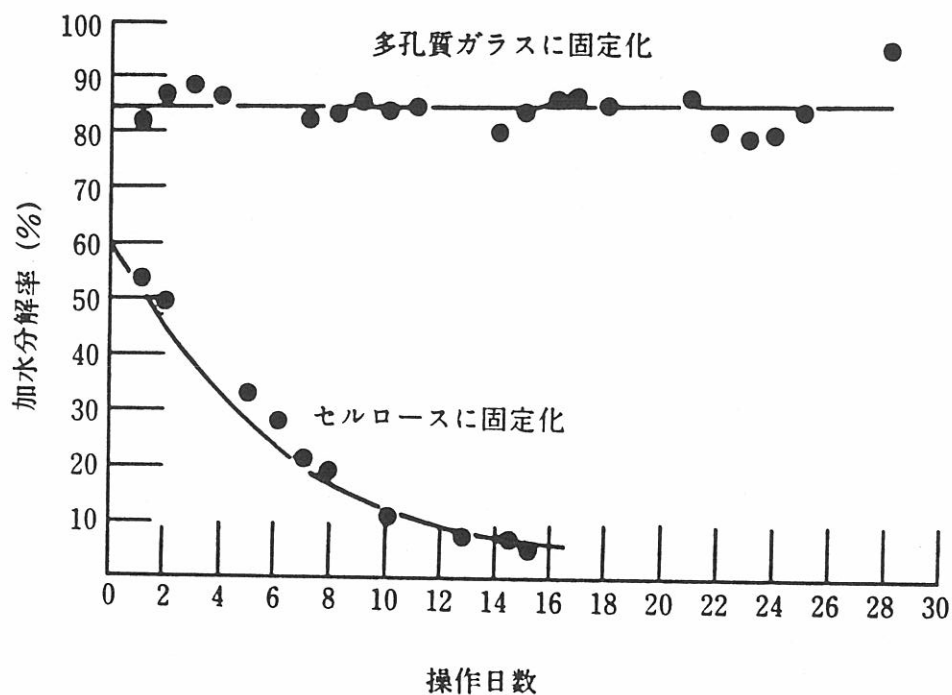


Fig.3-5 担体による固定化インペルターゼの安定性の変化

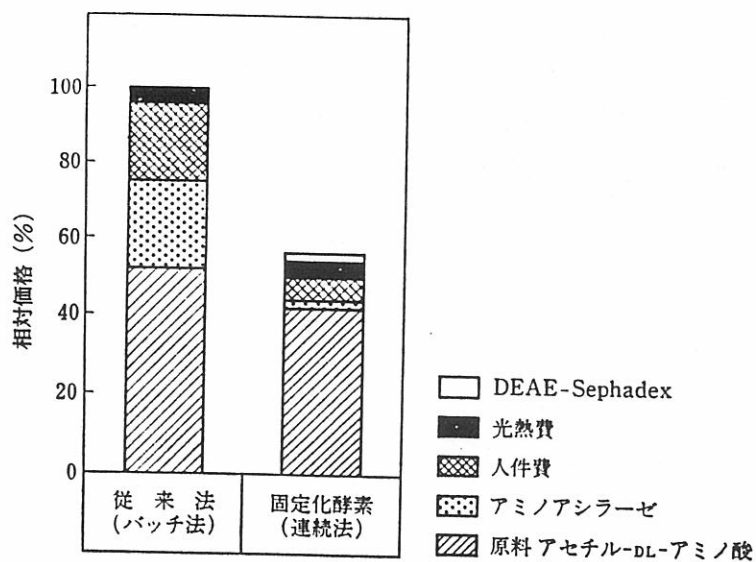


Fig.3-6 アミノアシラーゼを用いるL-アミノ酸製造原価の比較

多くの酸化還元反応に寄与する補酵素である。(3-1)式の反応から分かるとおり、本酵素による水銀の還元反応は水銀イオンとNADPHが1:1で反応することにより起こる。そこで反応に伴うNADPHの濃度変化を測定することで水溶液中の水銀イオン濃度を測定することが可能であると考えられる。Table3-5は水銀還元酵素の特性値を示している。

Table3-5 水銀還元酵素の特性値

分子量	: 58,727	(塩基配列より)
補欠分子族	: FAD	(フラビンアデニンジヌクレオチド)
最適pH	: 7.0~7.2	
最適塩濃度	: 0.4~0.5M	
K_m (for $HgCl_2$)	: $10.2 \mu M$	
K_m (for NADPH)	: 約 $3 \mu M$	
V_{max}	: 596 min^{-1}	

1-4 既往の研究（水銀の定量法）

水銀及びその化合物は多くの場合強い毒性を有することから、水銀の分析法、特に環境中の微量水銀の分析法に関して多くの研究がなされている。

古くから知られている方法としては、以下のような方法がある。

- (1)重量法：水銀イオンを硫化物、塩化物またはキレートなどにして沈澱させて測定する。
- (2)吸光光度法：水銀イオンとジチゾンとのキレートを490~510nmで比色定量する。
- (3)容量法：水銀イオンを含む溶液をEDTAやチアン酸カリウムで適定する。

これらの方法はいずれも簡単な装置で測定可能であるが、微量分析が困難であり妨害物質の影響を受け易いことが欠点である。

微量水銀の分析法としては現在、放射化分析法、冷原子吸光法が用いられており、新しい微量分析法として酵素免疫測定法が開発されている。以下にこれらの方法について述べる。

1-4-1 放射化分析法^{5,9)}

元素を高エネルギーの核粒子、 γ 線で照射すると放射性核種が生成し、この壊変速度及び壊変により発生する放射線の種類・エネルギーは核種に特有のものであるので、発生する放射線を測定することにより核種を特定することが可能である。また試料を放射化する

条件が同じであれば生成放射線量は分析対象の核種の量に比例する。現在、種々の放射化法の中で最もよく用いられているのは原子炉を用いる熱中性子放射化分析法である。放射化分析法は一般に検出感度が高く、目的元素の状態によらず同一の感度が得られ、異種元素の影響を受けにくいという利点がある。水銀の放射化分析においては、試料を熱中性子照射し ^{197}Hg から放射される 0.07MeV の γ 線を測定する。非破壊放射化分析は 1ppm 程度の水銀の検出感度を持っているが、破壊放射化分析では試料を放射化した後、水銀を濃縮して放射能強度を測定するため微量分析に適している。

欠点としては、測定に原子炉という特殊な装置が必要であるため一般性に欠ける点がある。

1-4-2 冷原子吸光法^{5,9)}

水銀イオンを塩化スズで還元し、気化した水銀原子蒸気中に 253.7nm の水銀共鳴吸収スペクトル線を通して、その吸収強度を測定することにより水銀を定量する方法である。通常の原子吸光法と異なるのは目的物質の気化にバーナーを使わず、室温で水銀を気化させる点であり、それゆえ本方法は冷原子吸光法 (Cold Vapor Atomic Absorption) と呼ばれる。炎を使わないので吸収強度が安定するため高感度であり、異種元素の妨害も受けないので現在水銀の分析法として最も広く用いられている。但し、水銀を気化させるための前処理が必要であるため連続測定に向かず、塩化スズや水銀蒸気の安全性などの問題もある。

1-4-3 ELISA法 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

近年、Wylieら^{6,10)}は酵素免疫測定法を用いて微量試料中の微量水銀を検出する方法を報告している。この方法ではBSA-グルタチオン化合物で処理したマイクロプレートに数百 μl の塩化水銀溶液 ($0.2\sim 200\text{ppbHg}$) を加え、BSA-グルタチオンと水銀を反応させた後、このプレートにBSA-グルタチオン- HgCl_2 に対するモノクローナル抗体 (マウス由来) を加え、さらに抗マウス μ 鎖抗体とペルオキシダーゼの複合体を加える。このマイクロプレートを洗浄した後、ペルオキシダーゼの基質を加え、 405nm の吸光度の変化から水銀濃度を測定する。Fig. 3-7は試料溶液の水銀濃度と吸光度の変化の関係を示しており、水銀濃度が $0.5\sim 10\text{ppb}$ の範囲で直線関係が得られている。

ELISA法は冷原子吸光法と同程度の感度を有しており、原子吸光が少なくとも数十 ml の試料量を必要とするのに対し、ELISA法では数百 μl の試料で分析が出来るため微量試料中の微量水銀の分析に適していると考えられる。また、特殊な装置も必要とせず分析手順も比較的簡単であることから新しい微量水銀の定量方法として期待されている。

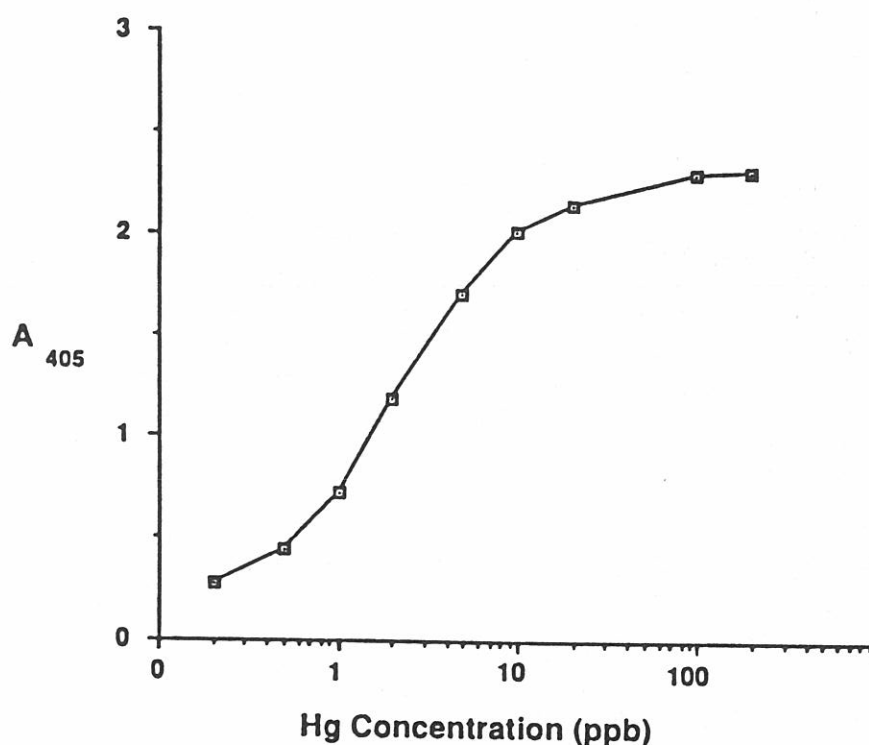


Fig. 3-7 ELISA法による水銀の測定結果

1-5 研究の目的

水銀及びその種々の化合物は微量でも生体に対し毒性を示すことから、現在環境中に排出された微量水銀の検出方法が求められている。微量水銀の分析法として現在用いられている冷原子吸光法やELISA法はいずれも試料の前処理を必要とするため、連続測定には向かない。

そこで本研究は、水銀還元酵素を本論文第2章で述べたPPG型多孔質ガラスに種々の方法で固定化し、固定化水銀還元酵素の特性を評価し、安定な活性を示す固定化法について検討すると共に、水溶液中の水銀イオンを連続的かつ簡便に測定するための方法として、多孔質ガラスに固定化した水銀還元酵素を用いて、水銀センサーを作製しその特性を評価する事を目的とした。

§ 2 実験方法

2-1 水銀還元酵素の精製

トランスポゾンTn501由来の水銀還元酵素構造遺伝子を含む、*Eschericia coli*プラスミドで形質転換した*E. coli*からFoxら^{5,8)}の方法で水銀還元酵素を精製した。本研究においては水銀還元酵素は同和鉱業株式会社より提供された。

2-2 酵素の固定法

水銀還元酵素の固定は多孔質ガラス表面にアミノプロピル基を導入したアルキルアミノガラスに以下の(1)～(4)に示す4種類の方法で行った。

アルキルアミノガラスは粉碎した多孔質ガラスを80℃の5(w/v)% γ -aminopropyltriethoxysilane (γ -APTES) – トルエン溶液50ml中で24時間還流し、トルエンで数回洗浄後、室温で真空乾燥して得た。

(1) グルタルアルデヒドによる固定

アルキルアミノガラス10mgを1mlの5(w/v)%グルタルアルデヒド–100mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)中で室温で1時間反応させた後、蒸留水およびリン酸ナトリウム緩衝液で洗浄し、10 μ M水銀還元酵素溶液 100 μ lを添加し、4℃に18時間保持し酵素を固定した。

(2) アリルアミノ誘導体へのアゾ結合による固定

アルキルアミノガラス1gを68℃の5(w/v)%p-塩化ニトロベンゾイル、10(v/v)%トリエチルアミン–クロロフォルム溶液50ml中で18時間還流し、クロロフォルムで数回洗浄後、室温で真空乾燥してアリルニトロ誘導体を得た。これを0.5M NaHCO₃–0.1M Na₂S₂O₄ (pH8.5) 水溶液10ml中で37℃×1時間反応させた後、5(w/v)%Na₂S₂O₄水溶液10ml中で100℃×20分反応させ、蒸留水で数回洗浄し、さらにエタノールで洗浄後、室温で真空乾燥しアリルアミノ誘導体を得た。

アリルアミノガラス約10mgを10mgNaNO₂+1ml 4N HCl水溶液中で4℃×1時間反応させ、冷蒸留水で数回洗浄し、(1)と同様の手順で酵素を固定した。

(3) カルボキシル誘導体への固定

アルキルアミノガラス1gを0.2g無水コハク酸水溶液7.0ml中で4℃×5時間保持する。この間、20%NaOH溶液でpH6.0に調整する。反応後、蒸留水で洗浄し、更にエタノールで洗浄後、室温で真空乾燥し、カルボキシル誘導体を得た。

サクシニルガラス10mgに10 μ M水銀還元酵素－100mMリン酸ナトリウム緩衝液 100 μ lを加え、直後1mgのカルボジイミド（粉末）を添加し、4℃で18時間反応させ、酵素を固定化した。

(4)アルキルアミノガラスへの固定

アルキルアミノガラス10mgに10 μ M水銀還元酵素－100mMリン酸ナトリウム緩衝液100 μ lを加え、直後1mgのカルボジイミド（粉末）を添加し、4℃で18時間反応させ、酵素を固定化した。

固定化処理後の溶液は遠心分離により多孔質ガラス担体と上澄みを分離し、上澄みに含まれる残留水銀還元酵素量を455nmの吸光度（ $A_{455}=6.2\text{mM}^{-1}$ ）より測定し、多孔質ガラス上に固定化された酵素量を算出した。酵素を固定化した多孔質ガラスはpH7.0の100mMリン酸ナトリウム緩衝液で数回洗浄した後、三等分し、活性測定に供した。

2-3 固定化水銀還元酵素の活性測定

1～3×10⁻¹⁰ moleの水銀還元酵素を固定化した多孔質ガラス担体 約4mgを全量1mlの下記の測定系に加え、30℃、攪拌下で5分間反応させた。

緩衝液 pH7.0の100mM リン酸ナトリウム溶液

基質 100 μ M HgCl₂ , 200 μ M NADPH

SH試薬 2mM 2-Mercaptoethanol

反応後の溶液は遠心分離により固定化酵素を除去した後、溶液の340nmにおける吸光度から溶液中のNADPH濃度の変化を測定した。以上の測定を同一固定化酵素に対し3回行い、固定化酵素の反応速度の平均値から固定化水銀還元酵素の活性を評価した。

2-4 水銀センサーの作製

多孔質ガラスのアリルアミノ誘導体に固定化した水銀還元酵素を用いてフローシステムにより水銀センサーを作製した。Fig. 3-8は本実験で使用した水銀センサーの流路図を示している。Fig. 3-8のフローシステムではNADPH及びシステアミンを含むTris-H₂SO₄緩衝液及び試料溶液をペリスタルティック・ポンプを用いて流量が各々0.2ml/分、0.8ml/分となるよう送液・混合し、30℃に保持した固定化酵素カラムに供給した。固定化酵素カラム内で反応した溶液をフローセルに送液し、蛍光光度法により溶液中のNADPH濃度を測定した。NADPHの蛍光測定に使用した装置及び測定条件は以下の通りである。

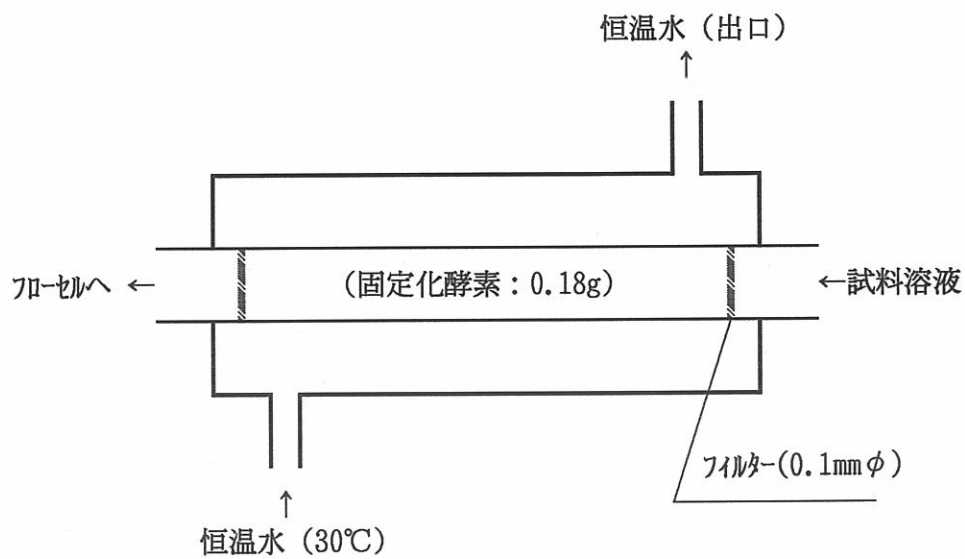
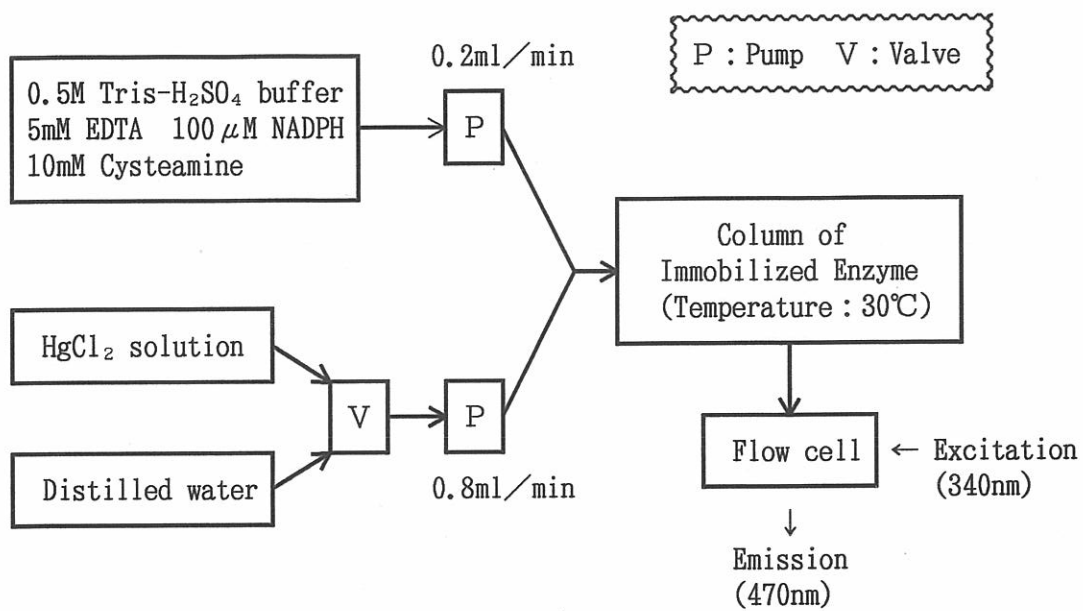


Fig. 3-8 水銀センサーのフローシステムと固定化酵素カラム断面

蛍光分光光度計：島津製RF-5000

励起波長：340nm（バンド幅：10nm）

蛍光波長：470nm（バンド幅：5nm）

蛍光強度測定：2秒間隔で一試料につき3分以上測定し時間平均から評価

測定系

緩衝液：0.5M トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン (Tris) -H₂SO₄ buffer, pH7～8.5

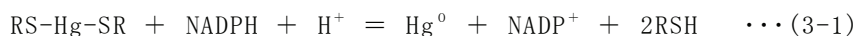
基質：100 μM NADPH, 0～20 μM HgCl₂

SH試薬：10mM Cysteamine

（他に 5mM EDTAを含む）

2-5 酵素サイクリング法による水銀センサーの増感

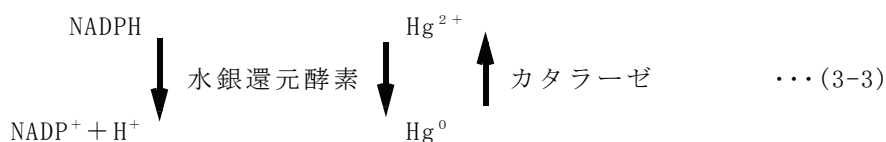
水銀還元酵素による反応では(3-1)式のように水銀イオンとNADPHが1:1で反応するため、(3-2)式の様に酸化されるNADPH量と還元される水銀量は等しい。そのため水銀の検出限界はNADPHに対する検出感度により規定される。



$$\Delta[\text{NADPH}] = \Delta[\text{Hg}^{2+}] \quad \cdots(3-2)$$

そこで水銀還元酵素を用いた水銀センサーの感度をさらに向上させるため、以下の方法を用いた。

カタラーゼが金属水銀を2価水銀イオンに酸化する働きがあることがOgataら^{6 1)}やHurshら^{6 2)}により報告されている。そこで(3-3)式の様に、水銀還元酵素により還元されて生成した金属水銀をカタラーゼにより再酸化すると、(3-4)式のように水銀イオンより過剰のNADPHが消費されるためセンサー感度の向上が期待される。



$$\Delta[\text{NADPH}] \cong \alpha \cdot \Delta[\text{Hg}^{2+}] \quad (\alpha > 1) \quad \cdots(3-4)$$

2-6 固定化酵素の作製

水銀還元酵素及びカタラーゼは多孔質ガラスのアリルアミノ誘導体に固定化した。多孔質ガラスは粒径1mmφ以下に粉碎し、粒径が0.212~0.3mmφ, 0.3~0.5mmφ, 0.5~0.7mmφ, 0.7~1mmφの四種類の担体を用いて、本章2-2と同様の方法でアリルアミノ誘導体とした。水銀還元酵素のみを固定化する場合には適当な粒径の多孔質ガラス担体0.18gをジアゾ化し、水銀還元酵素を固定し、カラムに充填した。また水銀還元酵素とカタラーゼを同時に固定化する場合には0.18gの担体を90mgに二分し、それぞれに水銀還元酵素とカタラーゼを混合した後、両者を混合しカラムに充填して用いた。

固定化酵素カラムはアクリル製の内径3mmφ, 長さ50mmのチューブを用い、チューブ外部に恒温水を流すことによりカラム内部を30℃に維持した。

§ 3 固定化水銀還元酵素の特性に関する実験結果及び考察

3-1 固定化水銀還元酵素の活性

多孔質ガラスへの水銀還元酵素の固定化法及び多孔質ガラス担体の細孔径の水銀還元酵素の固定化率への影響をFig. 3-9に示す。アルキルアミノガラスに水銀還元酵素を脱水縮合により結合する方法も試みたが、この方法では十分な固定量が得られなかったため、アミノプロピル基上にリジンを付加することにより充分な酵素固定量を得た。Fig. 3-9ではグルタルアルデヒドで処理した多孔質ガラス及びアリルアミノ誘導体に固定化した場合にほぼ100%の固定化率が得られているが、カルボキシル誘導体及びリジンで処理した担体では添加した酵素の50%以下の固定化率となっている。

担体の細孔径と酵素の固定化率の関係では、細孔径が小さい方が担体の比表面積は大きくなるので、酵素が固定化されるサイトも上昇することが予想される。Fig. 3-9ではグルタルアルデヒドで処理した場合及びアリルアミノ誘導体に固定化した場合には細孔径の増大と共に固定化率がやや低下する傾向が見られる。カルボキシル誘導体及びリジンで処理した担体に固定化した場合には細孔径と固定化率の間に特に関係はみられなかった。

多孔質ガラスへの水銀還元酵素の固定化法及び多孔質ガラス担体の細孔径の固定化水銀還元酵素の活性への影響をFig. 3-10に示す。Fig. 3-10における相対活性は等量のsolubleの水銀還元酵素に対する相対値で評価した。

この結果、多孔質ガラスのアリルアミノ誘導体及びカルボキシル誘導体に固定した場合に特に固定化酵素の活性が高く、溶液状態の酵素の20%～30%の活性を示している。また細孔径の大きい担体に固定した場合の方が見かけ上活性が高い傾向がみられる。

ゾルーゲル法により作製した多孔体は表面のシラノール基の密度が通常の分相溶融法による多孔質ガラスと比べて高いため、酵素の固定化に適していると考えられている。そこでPPG型多孔質ガラスとテトラメチシラン-メタノール塩酸溶液からゾルーゲル法により合成した多孔体に固定化した水銀還元酵素の活性を比較した結果がFig. 3-11である。細孔径及び気孔率はそれぞれ、PPG型多孔質ガラスが2000 Å、55%、またゾルーゲル法による多孔体が2800 Å、70%であった。PPG型多孔質ガラスのコハク酸誘導体に固定化した酵素の活性が高いが、これを除く他の固定化法においては担体による固定化酵素活性の差は特に見られていない。この原因としてはゾルーゲル法による多孔質ゲルは600℃で焼成し、さらにγ-APTESで表面処理したため、ゲルの表面状態による影響が現れないためと考えられる。また固定化酵素の活性には担体の細孔構造や気孔率より細孔径が大きく影響すると考えられる。

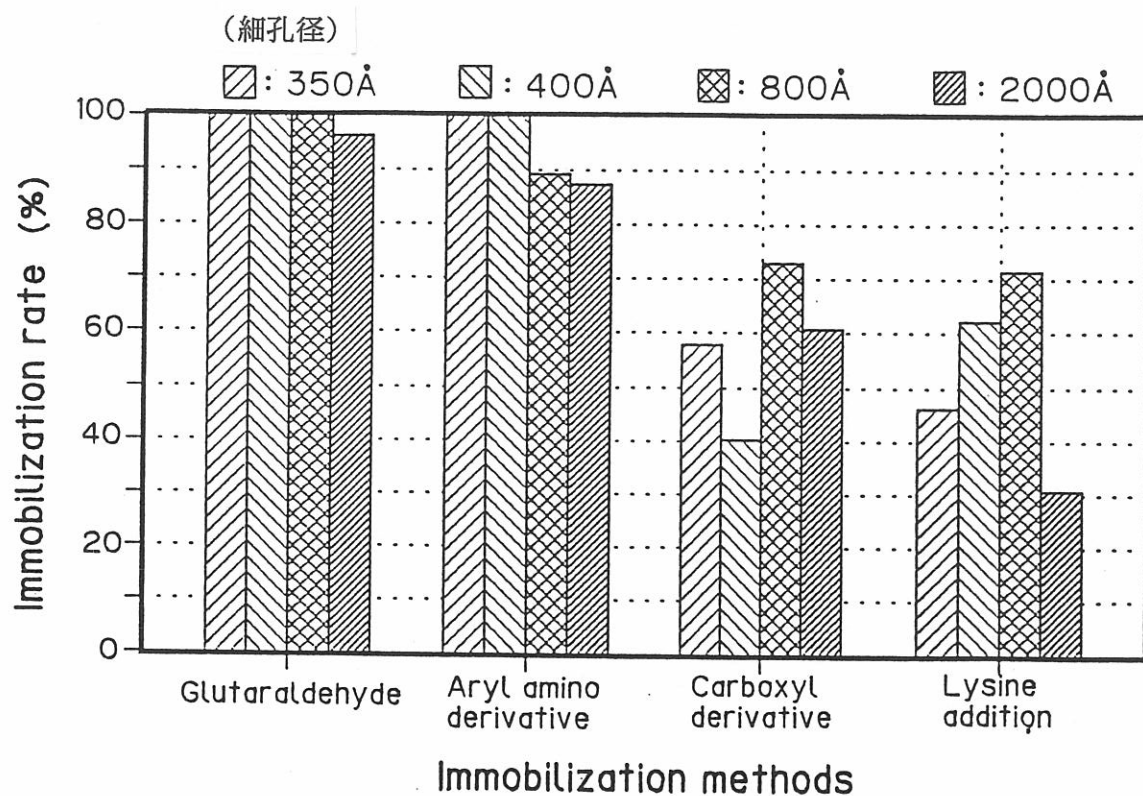


Fig.3-9 水銀還元酵素に対する固定化法と酵素固定化率の関係

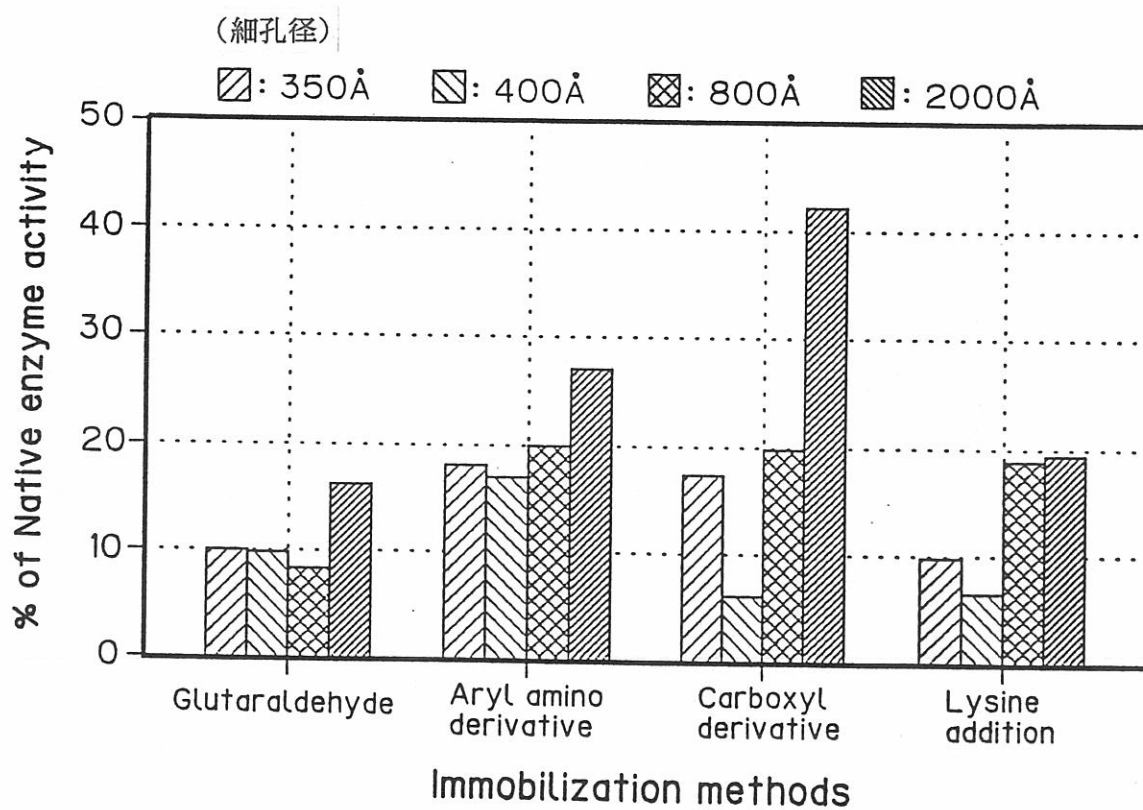


Fig.3-10 固定化法及び担体の細孔径と固定化水銀還元酵素の関係

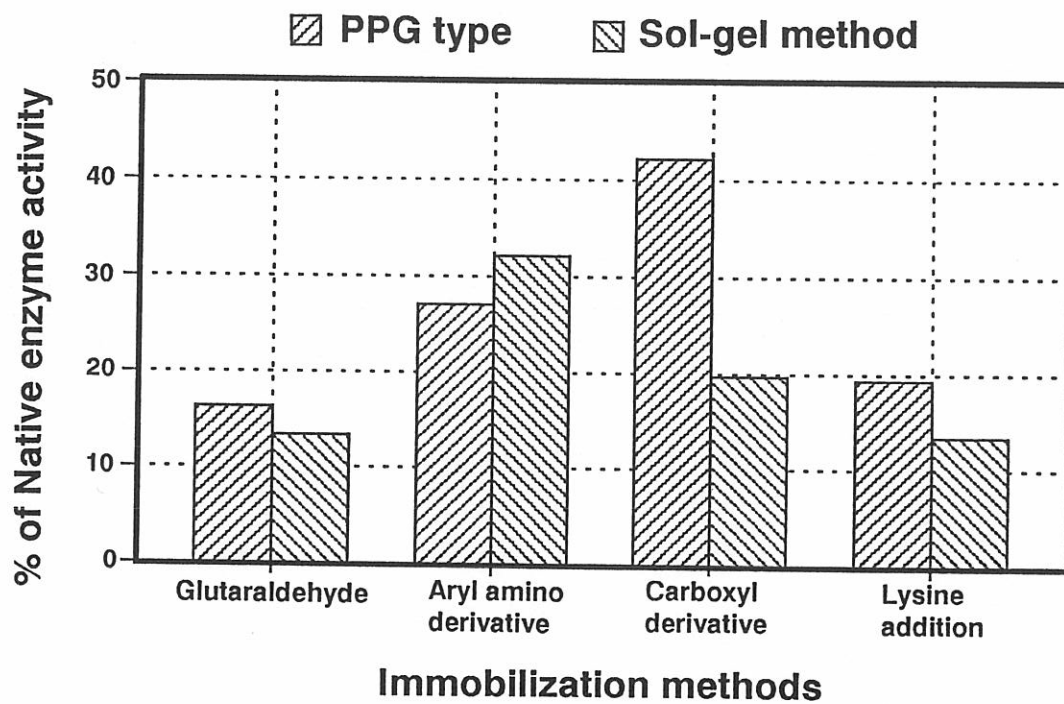


Fig.3-11 多孔質担体による固定化酵素活性の比較

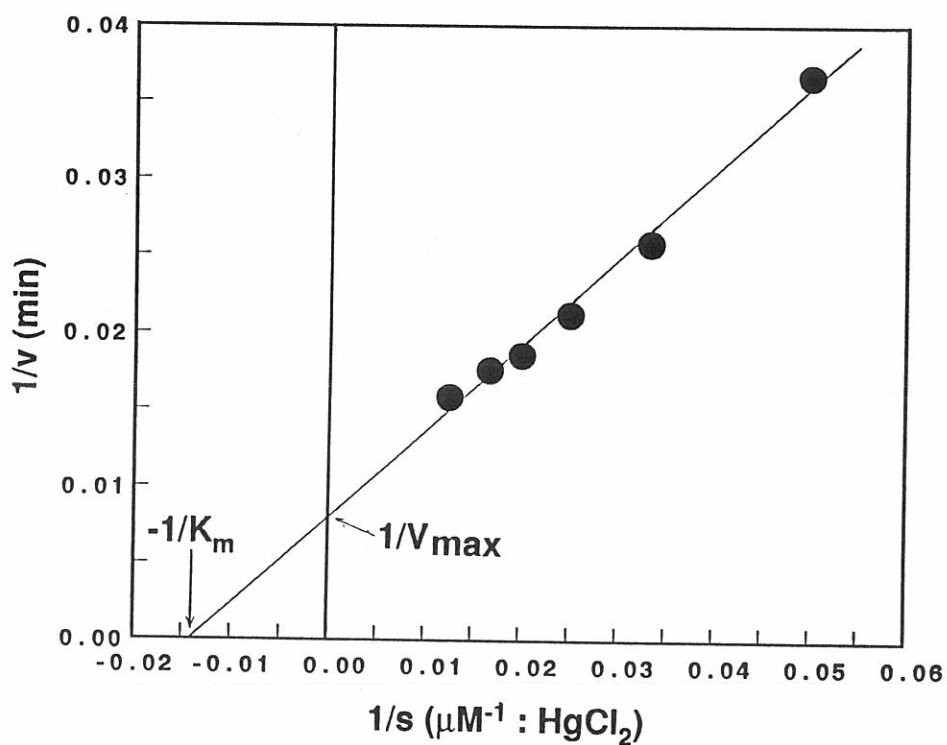


Fig.3-12 固定化水銀還元酵素における基質 (HgCl_2) 濃度と反応速度の関係 (Lineweaver-Burkプロット)

3-2 水銀還元酵素の速度論的定数

アリルアミノ誘導体に固定化した水銀還元酵素について、 HgCl_2 濃度を $20\ \mu\text{M}$ から $80\ \mu\text{M}$ の間で変化させ、基質濃度と反応速度の関係をLineweaver-Burkプロットで示したのがFig. 3-12である。担体は細孔径 $3700\ \text{\AA}$ の多孔質ガラスのアリルアミノ誘導体であり、Fig. 3-10において直線の傾き及びY切片から求めた最大反応速度 $V_{\max}$ とミハエリス定数 K_m は以下の通りであった。各定数の導出については本章末のAppendixに記した。

$$\begin{array}{ll} \text{固定化水銀還元酵素} : V_{\max} = 130\ \text{min}^{-1}, & K_m = 70\ \mu\text{M} \\ \text{soluble} \quad \quad \quad : V_{\max} = 596\ \text{min}^{-1}, & K_m = 10.2\ \mu\text{M} \end{array}$$

固定化後の酵素の最大反応速度は溶液状態の約20%であり、ミハエリス定数は溶液状態の5倍の濃度であった。固定化により $V_{\max}$ 及び K_m が変化した原因としては、固定化による酵素の一部が失活したことや細孔内部の基質の拡散が固定化酵素全体の反応を律速していることなどが考えられる。

3-3 固定化酵素のpH依存性

アリルアミノ誘導体、カルボキシル誘導体（細孔径 $2000\ \text{\AA}$ ）に水銀還元酵素を固定化し、リン酸ナトリウム緩衝液、Tris-HCl緩衝液を用いてpHを5.5～9.2の間で変化させ、固定化水銀還元酵素活性の変化を調べた結果、Fig. 3-13に示すように固定化酵素の最適pH=7.5であり、solubleの状態では最適pH=7.0～7.2であることから固定化により最適pHがややアルカリ側にシフトしていることがわかる。本章1-2-3にも記した通り、多孔質ガラスに酵素を固定化した場合には多くの場合、最適pHがアルカリ側にシフトしており、本実験結果も同様の傾向を示している。

また固定化によるpH-活性曲線の変化は水銀還元酵素については見られなかった。

3-4 固定化酵素の安定性

アリルアミノ誘導体、カルボキシル誘導体（細孔径 $400\ \text{\AA}$ ， $2000\ \text{\AA}$ ）に水銀還元酵素を固定化し、 30°C の恒温器中で保持し固定化酵素活性の経時変化を測定した結果をFig. 3-14に示す。カルボキシル誘導体に固定化した場合は約1週間で完全に失活しているが、アリルアミノ誘導体では29日後も初期の活性の80～90%を維持している。solubleの水銀還元酵素では 30°C で1ヶ月保持すると約50%に活性が低下することから、固定化による水銀還元酵素の安定化がみられる。

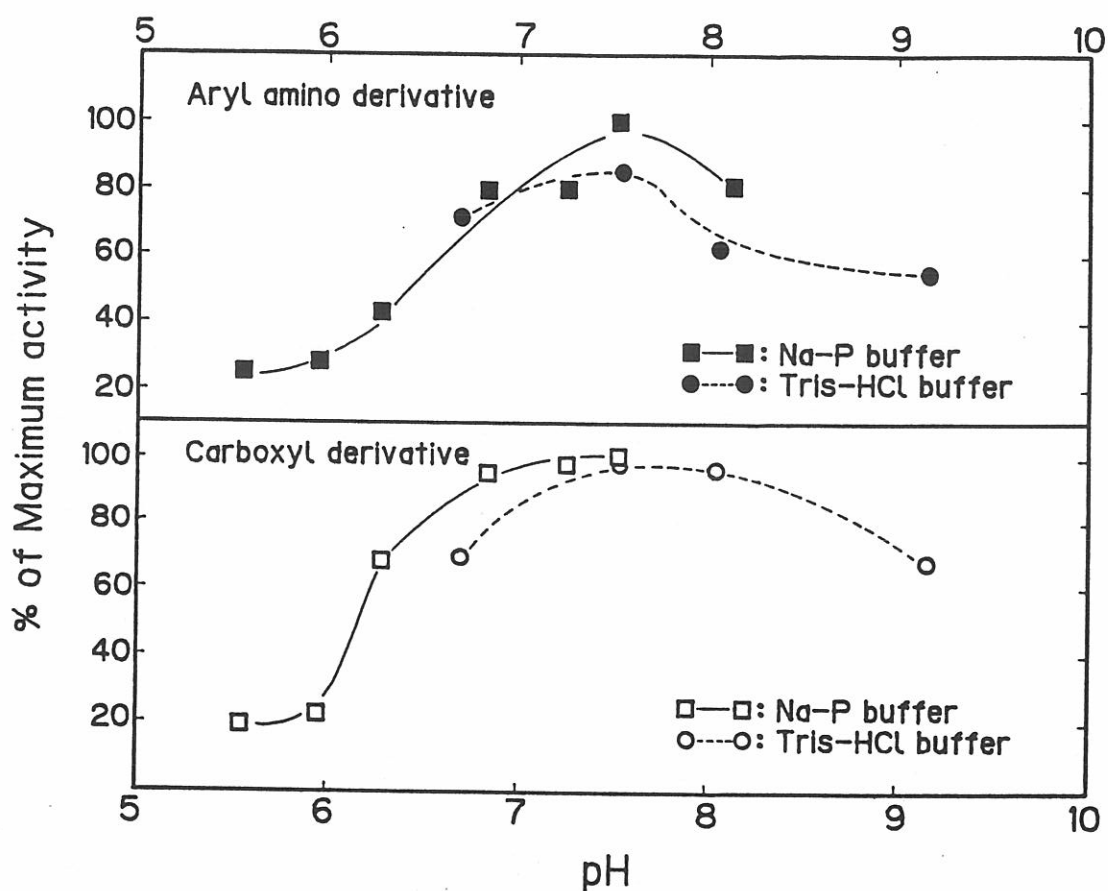


Fig.3-13 固定化水銀還元酵素のpH-活性曲線

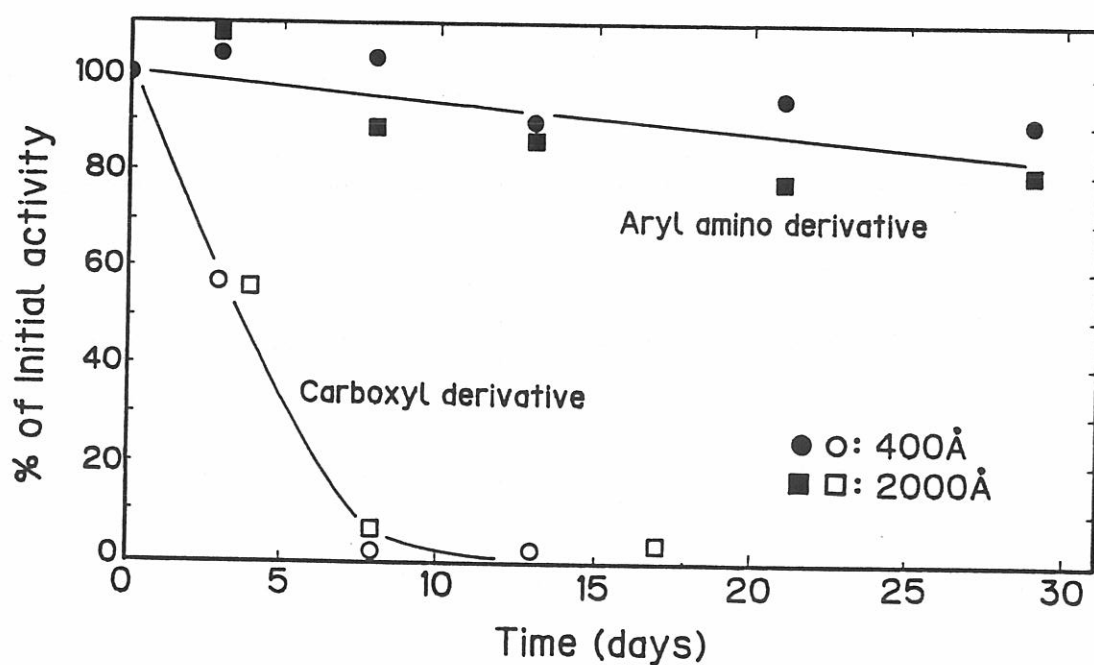


Fig.3-14 固定化水銀還元酵素の安定性 (30°C, pH7.0で保持)

§ 4 水銀センサーに関する結果及び考察

4-1 水銀還元酵素単独の水銀センサー

4-1-1 pHによるセンサーの感度変化

水銀センサーに使用する緩衝液の種類及びpHを変化させた場合のセンサーの感度変化をFig. 3-15に示す。固定化水銀還元酵素量は 6×10^{-9} moleであり、粒径 $0.2 \sim 0.3 \text{ mm } \phi$ の担体を用いている。緩衝液には 0.5 M のTris- H_2SO_4 、Tris-HCl及びリン酸ナトリウム緩衝液を用いて、pHを $7.1 \sim 8.5$ の間で変化させた。Fig. 3-15の縦軸は蛍光強度の減少量、即ちセンサーの感度を表しており、これより本水銀センサーの感度は、Tris系の緩衝液においては $\text{pH} = 7.5$ 付近で最大となっている。このpHの値は固定化水銀還元酵素の最適pHと同じであり、妥当な結果である。緩衝液の影響ではTris- H_2SO_4 緩衝液を用いた場合に感度が高く、リン酸ナトリウム緩衝液では感度の低下がみられる。固定化水銀還元酵素の活性の面では緩衝液による大きな差はないが、水銀センサーにおいてFig. 3-15の様な大きな差が生じたのは、リン酸ナトリウム緩衝液中で溶液中のNADPHが不安定になったためと考えられる。

4-1-2 多孔質ガラス担体の影響

Fig. 3-16は水銀還元酵素を粒径 $0.2 \text{ mm } \phi \sim 1 \text{ mm } \phi$ の多孔質ガラスに固定化した場合のセンサーの感度変化を示している。測定は $\text{pH} 7.5$ のTris- H_2SO_4 緩衝液を用い、 30°C で行った。固定化水銀還元酵素量は担体の粒径によらず 6×10^{-9} moleとした。

図中縦軸は蛍光強度の減少量をNADPH濃度の変化に換算して示している。同じ水銀濃度と比較すると、担体の粒径の低下と共にNADPHの減少量が増大し、センサーとしての感度が向上していることがわかる。

図中の直線は試料溶液中の全ての HgCl_2 が固定化酵素により還元された場合のNADPHの消費量を示しているが、担体の粒径が $0.5 \text{ mm } \phi$ 以下では $5 \mu \text{ M}$ 以下の HgCl_2 が酵素により完全に還元されていることが分かる。即ち、粒径が小さいほど固定化酵素カラム内での水銀の還元反応が起こり易く、見かけ上、同一水銀濃度でもNADPH消費量が増えている。これは固定化された水銀還元酵素の内、カラム内で反応に寄与するものが多孔質ガラス担体の表面近傍に固定化されたものであるため、担体の粒径が小さいものほど水銀還元反応に寄与する酵素量が増えるためと考えられる。

Fig. 3-16より粒径 $0.2 \text{ mm } \phi \sim 0.3 \text{ mm } \phi$ の担体を用いた場合に $0.5 \sim 8 \mu \text{ M HgCl}_2$ の範囲で水銀濃度とNADPHの蛍光強度の変化量の間に直線関係がみられ、最少 $0.5 \mu \text{ M}$ (0.1 ppm)の水銀イオンを定量可能であることが分かった。

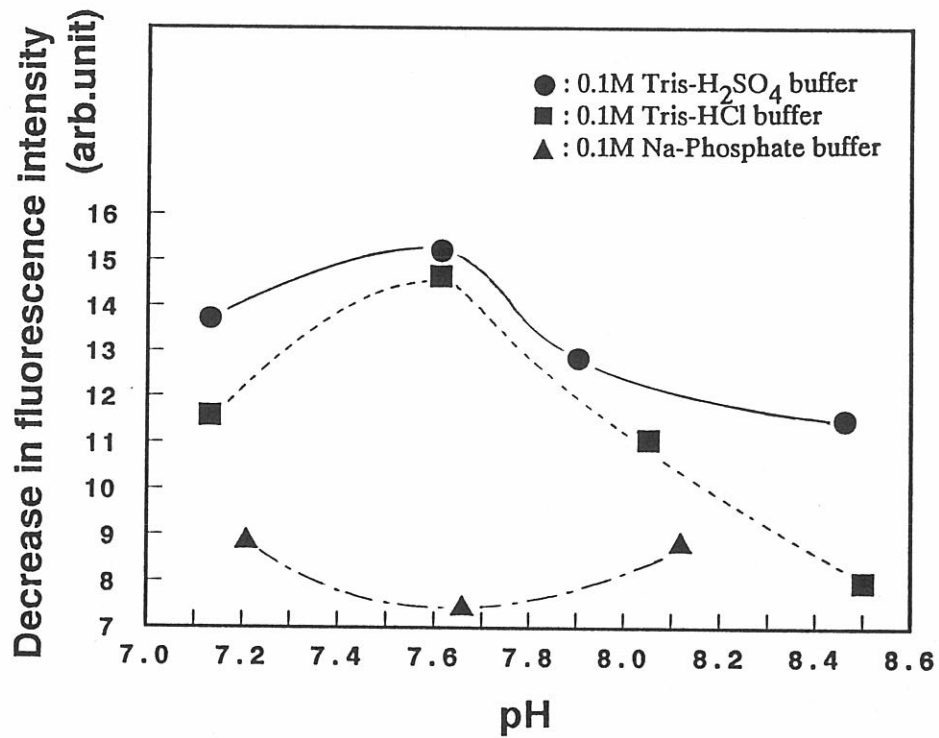


Fig.3-15 pH及び緩衝液による水銀センサーの感度変化
 (水銀還元酵素単独の場合)

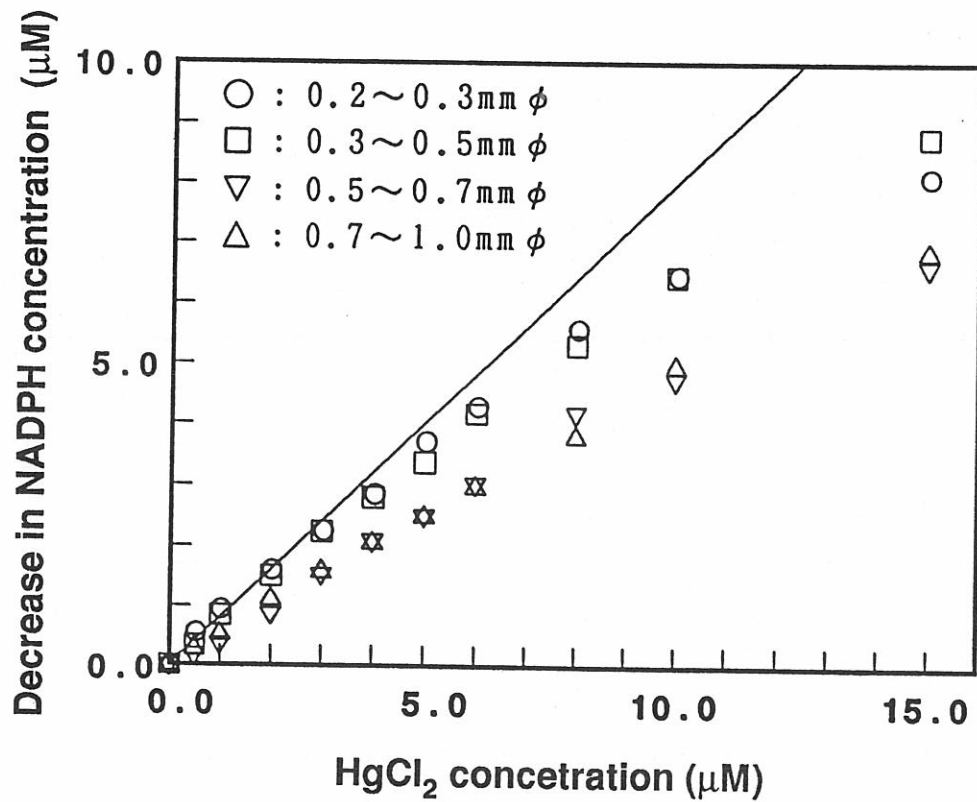


Fig.3-16 多孔質ガラス担体の粒径が水銀センサーの感度に及ぼす影響

4-1-3 異種イオンに対する選択性及び阻害

水銀センサーに対して要求されるのは検出感度だけでなく、水銀以外のイオンに対して反応せず、水銀イオンと他のイオンの混在下でも正しい水銀濃度を指示することである。

本水銀センサーの異種イオンに対する選択係数をTable3-7に示す。Fig. 3-17はTable3-7の結果を図示したものである。選択係数は同じ濃度の水銀イオンと異種イオンに対する本水銀センサーの感度比であり、これが高いほどそのイオンに対し反応しにくい事になる。これらの結果より本水銀センサーは Fe^{3+} に強く影響され、 Cu^{2+} , Pb^{2+} に影響を受けるが、その他のイオンに対しては十分な選択性を有していることが分かる。

銀イオン (Ag^+) は水銀還元酵素の働きを不可逆的に阻害すると考えられ、水銀センサーは銀イオンと接触した後はその感度を失うことが分かった。

Table3-8は水銀イオンと異種イオンが共存した場合のセンサーの感度の変化を塩化水銀のみが存在する場合のセンサーの感度を100として表している。 Cu^{2+} , Fe^{3+} は本センサーを著しく阻害し、 Cu^{2+} はセンサーの感度を低下させ、一方 Fe^{3+} はセンサーの感度を見かけ上増加させることが分かった。その他のイオンに関しては本センサーを阻害しないことが分かった。

4-2 酵素サイクリング法を用いた水銀センサー

4-2-1 pHによるセンサーの感度変化

水銀還元酵素単独のセンサーと同様にTris-HCl, Tris- H_2SO_4 緩衝液及びリン酸ナトリウム緩衝液を用いて溶液のpHが水銀センサーの感度に及ぼす影響を調べた結果がFig. 3-18である。Tris- H_2SO_4 緩衝液を用いた場合に感度が高く、リン酸ナトリウム緩衝液で感度が低下するのは水銀還元酵素単独のセンサーの場合 (Fig. 3-15) と同様であるが、酵素サイクリング法を用いた場合にはpHが高くなるほど感度が向上しており、本実験ではpH=8.5のTris- H_2SO_4 緩衝液を用いた場合に最も感度が高くなった。このようなpH依存性の変化は水銀還元酵素だけでなくカタラーゼの水銀酸化反応の最適pHの影響が加わったためと考えられる。

この結果から以降の実験は最大感度が得られるpH=8.5のTris- H_2SO_4 緩衝液を用いて行った。

4-2-2 固定化水銀還元酵素量とセンサーの感度の関係

カタラーゼの固定量を約6mg一定とし、水銀還元酵素量を 6.0×10^{-9} から 28.8×10^{-9} moleに増加させた場合の感度変化をFig. 3-19に示す。水銀還元酵素の固定化量が増加するにつ

Table3-7 水銀センサーの選択性

異種イオン	Fe^{3+}	Cu^{2+}	Pb^{2+}	Ag^+	Mn^{2+}
選択係数	78	400	590	700	2200

Cd^{2+}	Zn^{2+}	Mg^{2+}	NH_4^+	Ca^{2+}
1600	3600	6800	6800	∞

Table3-8 異種イオンと水銀イオンの共存による水銀センサーの阻害

異種イオン	塩化水銀濃度	センサー感度
Cu^{2+} 20 μM	3 μM	60
〃 20 μM	5 μM	50
〃 50 μM	3 μM	28
〃 50 μM	5 μM	44
Fe^{3+} 50 μM	5 μM	131
〃 100 μM	5 μM	160
Zn^{2+} 1mM	5 μM	96
Ca^{2+} 1mM	5 μM	100
Pb^{2+} 1mM	5 μM	100
Cd^{2+} 1mM	5 μM	102
Mg^{2+} 1mM	5 μM	102
Mn^{2+} 1mM	5 μM	104
NH_4^+ 1mM	5 μM	102

(異種イオンが存在しない場合の感度を100とする)

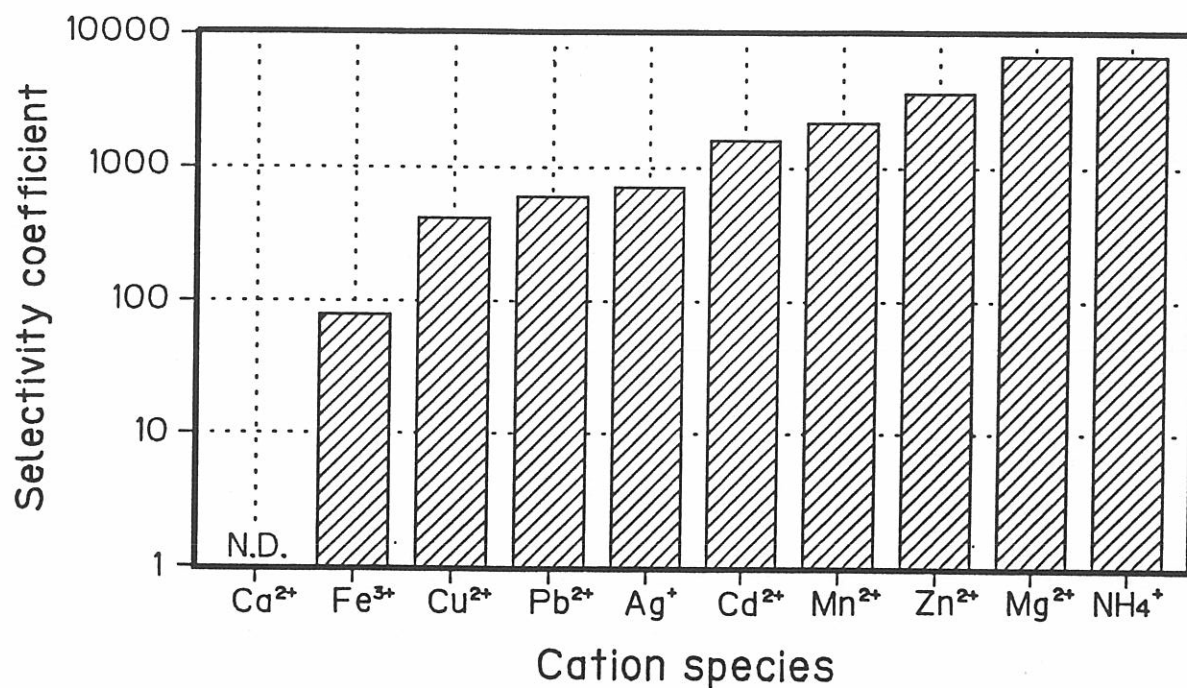


Fig.3-17 水銀センサーの異種イオンに対する選択係数
(水銀還元酵素単独の場合)

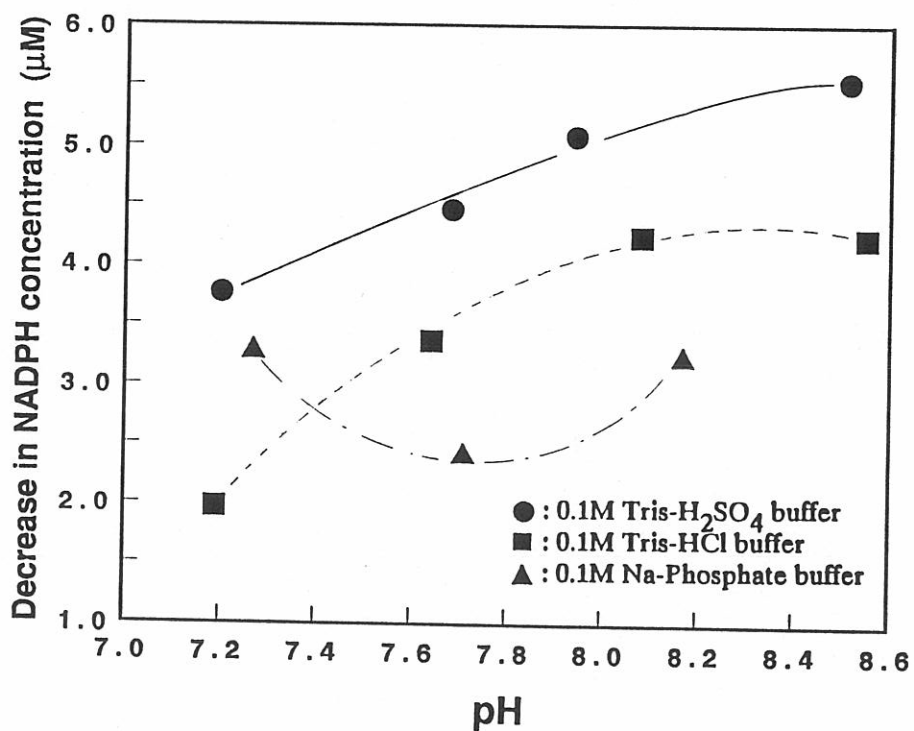


Fig.3-18 pH及び緩衝液による水銀センサーの感度変化
(酵素サイクリング法を用いた場合)

れ、NADPHの消費量が増加し、センサーの感度が向上していることが分かる。これは水銀還元酵素量の増加と共に、カタラーゼにより再酸化された水銀イオンの還元反応の速度が見かけ上向上し、酵素サイクリング反応が起こり易くなったためと考えられる。

図右下の実線はNADPHと HgCl_2 が1/1で反応した場合のNADPHの反応量を示しており、水銀還元酵素単独では HgCl_2 とほぼ等モル量のNADPHが消費されているのに対し、カタラーゼを用いた場合には過剰量のNADPHが消費されており、サイクリング反応の効果がみられる。

水銀還元酵素及びカタラーゼを飽和量（各々 2.66×10^{-8} mole, 8.0mg）固定化した固定化酵素を用いて測定した結果がFig. 3-20である。カタラーゼ量がFig. 3-19の場合より増加した事でさらに感度が向上し、最少 $0.03 \mu\text{M}$ HgCl_2 （6ppbHg）まで測定可能となった。

測定誤差については、ポンプの脈動や励起光強度の変動等が誤差の原因として考えられ、Fig. 3-20に示した測定では、測定誤差は溶液中水銀濃度に影響されず、NADPH濃度に換算して約 $0.06 \mu\text{M}$ であった。水銀濃度が最も低い場合（ $0.03 \mu\text{M}$ ）で誤差は14%となり、十分な精度を有していると考えられる。

水銀の一般的な分析法である冷原子吸光法と比較すると、測定限界の水銀濃度は原子吸光法の十倍程度であるが、試料量が5ml程度と少ないため試料中の水銀量としては同等の感度が得られることが分かった。

4-2-3 酵素サイクリング法を用いた水銀センサーの選択性・阻害

Table3-9は酵素サイクリング法を用いた水銀センサーの異種イオンに対する選択性を示しており、水銀還元酵素単独の場合（Table3-7）と比較すると、各イオンに対する選択性が向上していることがわかる。これは酵素サイクリング法により水銀イオンに対する感度が向上したためと考えられる。

Table3-10はTable3-8と同様に異種イオンの阻害を示している。 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} の影響は水銀還元酵素単独のセンサーの場合と同様であるが、その影響はやや小さくなっている。その他のイオンの影響は逆に酵素サイクリング法を用いることにより強くなっていることが分かる。

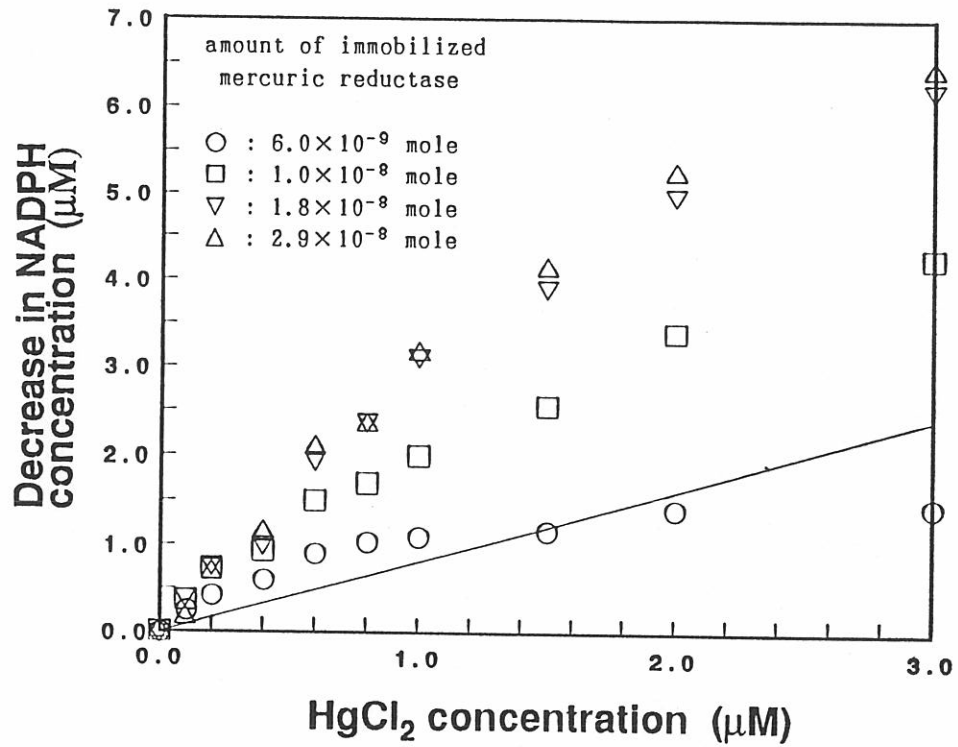


Fig.3-19 固定化水銀還元酵素量による水銀センサーの感度変化
(固定化カタラーゼ量：約6mg)

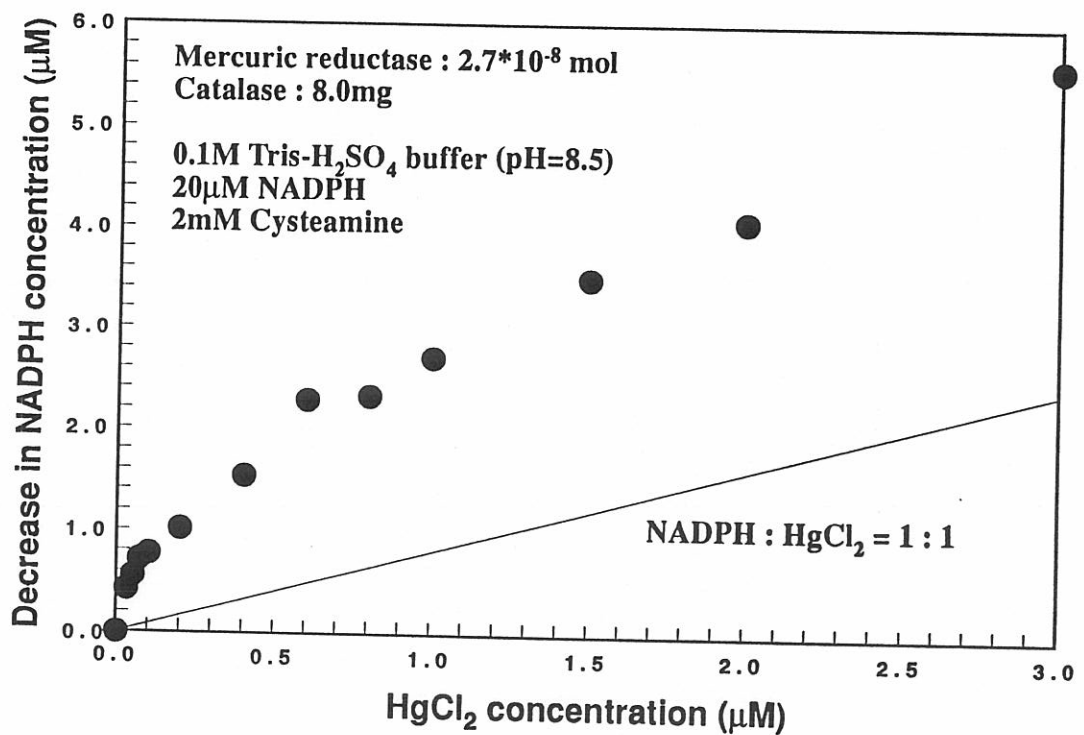


Fig.3-20 酵素サイクリング法を用いた水銀センサーの測定例

Table3-9 酵素サイクリング法を併用した水銀センサーの選択性

異種イオン	Fe^{3+}	Cu^{2+}	Mn^{2+}	Pb^{2+}	Cd^{2+}
選択係数	150	1400	7100	8500	8500

Zn^{2+}	Mg^{2+}	NH_4^+	Ca^{2+}
9800	32000	64000	130000

Table3-10 異種イオンと水銀イオンの共存によるセンサーの阻害
(酵素サイクリング法を併用した場合)

異種イオン	塩化水銀濃度	センサー感度
Cu^{2+} 20 μM	0.5 μM	89
〃 20 μM	1 μM	89
〃 50 μM	0.5 μM	78
〃 50 μM	1 μM	61
Fe^{3+} 20 μM	0.5 μM	121
〃 20 μM	1 μM	106
〃 50 μM	0.5 μM	200
〃 50 μM	1 μM	122
Zn^{2+} 1mM	1 μM	100
Ca^{2+} 1mM	1 μM	100
Pb^{2+} 1mM	1 μM	95
Cd^{2+} 1mM	1 μM	130
Mg^{2+} 1mM	1 μM	60
Mn^{2+} 1mM	1 μM	120
NH_4^+ 1mM	1 μM	140

(異種イオンが存在しない場合の感度を100とする)

4-3 他の分析方法との比較

水銀還元酵素を用いた水銀センサーと他の水銀測定法の特徴を比較したのがTable3-11である。

Table3-11 水銀センサーと他の水銀測定法の比較

	分析限界	試料量	分析操作	連続測定
冷原子吸光法	1ppb	10ml以上	要予備処理	通常不可
E L I S A	0.5ppb	0.1ml	複雑	不可
水銀センサー	6ppb	約5ml	単純	可

分析限界では水銀センサーは他の2方法に比べて劣るが、次の点で水銀センサーの方が優れていると考えられる。

①試料の予備処理を全く必要としない。

②分析操作は単純であり、熟練を必要としない。

→他の方法は数段階の分析手順があり、正確な分析には熟練を要する

③特殊な分析装置や試薬を必要としない。

→冷原子吸光法は大型で高価な装置を必要とする上、有毒な塩化スズを使用するため廃液処理を要する。

ELISAは特に分析装置を必要としないが、酵素－抗体複合体という特殊な試薬を必要とする。

④連続測定が可能であるため、工場廃液などの連続モニタリングに適する。

§ 5 小括

水銀還元酵素をPPG型多孔質ガラスに種々の方法で固定化し、固定化水銀還元酵素について以下の知見を得た。

- 1) 固定化酵素量はグルタルアルデヒドで活性化した多孔質ガラス、及びアリルアミノ誘導体に固定化した場合に高いことが分かった。固定化酵素活性の点では、多孔質ガラスのアリルアミノ誘導体及びカルボキシル誘導体に水銀還元酵素を固定した場合に特に活性が高く、両者とも溶液状態の酵素の20%以上の活性を示した。また細孔径が大きいほど見かけの酵素活性が上昇する傾向が見られた。
- 2) 多孔質ガラスのアリルアミノ誘導体及びカルボキシル誘導体に固定化した水銀還元酵素の最適pHは7.5で、溶液状態の同酵素の最適pH (7.0~7.2) よりややアルカリ側にシフトすることがわかった。
- 3) 固定化酵素の30℃における活性の経時変化を測定した結果、カルボキシル誘導体に固定化した場合には約1週間で失活したが、アリルアミノ誘導体に固定化した場合、30℃で29日間保持した後にも酵素活性の低下は見られず、固定化によって酵素が安定化することがわかった。
- 4) 以上の結果から多孔質ガラスに水銀還元酵素を固定化する場合には、アリルアミノ誘導体にアゾ結合により固定化する方法が酵素活性、安定性とも優れていることが分かった。

また、水銀還元酵素を用いてフローシステムにより水銀センサーを作製し、以下の知見を得た。

- 1) 多孔質ガラスのアリルアミノ誘導体に固定化した水銀還元酵素を用いて作製した水銀センサーにより $0.5\mu\text{M}$ (0.1ppmHg) 以上の水銀が測定可能であった。また、カタラーゼによる酵素サイクリング法を用いることにより感度を向上させることが可能であり、 $0.03\mu\text{M}$ (6ppbHg) 以上の水銀イオンを検出可能であることが分かった。
- 2) 本水銀センサーは Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ag^{+} 以外のイオンに対しては充分な選択性を有していることがわかった。
- 3) 水銀の一般的な分析法である冷原子吸光法と比較して、測定限界は原子吸光法と比較して十倍程度であるが、試料量が5ml程度と少ないため水銀量として同等の感度を得られることが分かった。

第3章 Appendix

酵素反応の速度論^{6,3)}

酵素の関与する反応では基質濃度の増加にともない反応速度が飽和するという現象がみられる。これが酵素反応の特徴であり、通常の化学反応のように「n次反応」と表すことはできない。

このように反応初速度が基質濃度に対して飽和する現象を「酵素－基質複合体」の形成を考慮して定式化したのがMichaelisとMentenである。



ここでE：酵素，S：基質，P：生成物，ES：酵素－基質複合体である

反応の初期に於いては $P + E \rightarrow ES$ の逆反応は無視できるので、この場合の反応速度及び最大反応速度（全ての酵素が基質と結合しているときの反応速度）は(3A-2), (3A-3)式のように表せる。

$$V = k_2 \cdot [ES] \quad \cdots (3A-2)$$

$$V_{max} = k_2 \cdot [E_t] \quad \cdots (3A-3)$$

E_t は反応系の全酵素量を示しており、(3A-4)式で表せる。

$$[E_t] = [E] + [ES] \quad \cdots (3A-4)$$

ここで、酵素－基質複合体“ES”の生成について考える。ESの生成速度 v_f ，消失速度 v_d はそれぞれ(3A-5), (3A-6)式のように表せる。

$$\begin{aligned} v_f &= k_1 [E][S] \\ &= k_1 ([E_t] - [ES])[S] \end{aligned} \quad \cdots (3A-5)$$

$$\begin{aligned} v_d &= k_{-1}[ES] + k_2[ES] \\ &= (k_{-1} + k_2)[ES] \end{aligned} \quad \cdots (3A-6)$$

定常状態では $[ES]$ の変化が0、即ち $v_f = v_d$ なので

$$k_1 ([E_t] - [ES])[S] = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad \cdots (3A-7)$$

ここで

$$\frac{[S]([E_t] - [ES])}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_m \quad \cdots (3A-8)$$

(3A-8)式の定数 K_m はMichaelis定数と呼ばれる。 K_m を用いると $[ES]$ は次式で表せる。

$$[E S] = \frac{[E_t][S]}{K_m + [S]} \quad \cdots (3A-9)$$

(3A-9)式に(3A-2), (3A-3)式を代入すると、

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad \cdots (3A-10)$$

さらに(3A-10)式の逆数をとると(3A-11)式になる。

$$1/V = (K_m/V_{max}) (1/S) + (1/V_{max}) \quad \cdots (3A-11)$$

(3A-11)式はLineweaver-Burkの式と呼ばれ、 $1/V$ と $1/S$ をプロットすることにより、傾きから K_m/V_{max} 、Y切片から $1/V_{max}$ が求められる。

Michaelis定数 K_m のもつ意味については、(3A-10)式に $V = V_{max}/2$ を代入すると $K_m = [S]$ となることから、

K_m = 反応速度が最大反応速度の半分になるときの基質濃度
と定義される。 K_m は各酵素に特有の定数であり、各酵素の基質への親和性を示しており、この値が小さいほど基質への親和性は大きい。

参考文献

- 1) D. Thornton, A. Francis and D. B. Johnson : Biochem. Soc. Trans., 2(1974)137-139
- 2) D. B. Johnson and D. Thornton : Biochem. Soc. Trans., 2(1974)494-495
- 3) V. G. Janolino and H. E. Swaisgood : Biotechnol. Bioeng., 24(1982)1069-1080
- 4) H. E. Swaisgood and V. G. Janolino, H. R. Horton : AIChE Symp. Ser., 74(1978)25-30
- 5) N. Kelly, A. Flynn and D. B. Johnson : Biotechnol. Bioeng., 19(1977)1211-1213
- 6) H. Ooshima, Y. Genko and Y. Harano : Biotechnol. Bioeng., 23(1981)2851-2862
- 7) M. T. Atallah, B. P. Wasserman and H. O. Hultin : Biotechnol. Bioeng., 18(1976)1833-1837
- 8) M. K. Weibel and H. J. Bright : Biochem. J., 124(1971)801-807
- 9) B. J. Rovito and J. R. Kittrell : Biotechnol. Bioeng., 15(1973)143-161
- 10) Md. M. Hossain and D. D. Do : Biotechnol. Bioeng., 27(1985)842-851
- 11) S. K. Dahodwala, A. E. Humphrey and M. K. Weibel : Biotechnol. Bioeng., 18(1976)987-1000
- 12) D. B. Johnson and M. P. Coughlan : Biotechnol. Bioeng., 20(1978)1085-1095
- 13) M. Mascini and R. Giardini : Anal. Chim. Acta, 114(1980)329-334
- 14) W. H. Scouten, H. Knowles Jr., L. C. Freitag and W. Iobst : Biochim. Biophys. Acta., 482(1977)11-18
- 15) Md. M. Hossain and D. D. Do : Biotechnol. Bioeng., 31(1988)730-736
- 16) T. J. Deloggio and D. J. Graves : Biotechnol. Bioeng., 32(1988)295-300
- 17) M. Uo, M. Numata, M. Suzuki, E. Tamiya, I. Karube and A. Makishima : to be published on J. Ceram. Soc. Japan
- 18) D. A. Lappi, F. E. Stolzenbach, N. O. Kaplan and M. D. Kamen : Biochem. Biophys. Res. Commun., 69(1976)878-894
- 19) F. Wengenmayer, D. Linder and K. Wallenfels : Biotechnol. Bioeng., 19(1977)1387-1403
- 20) K. Rokugawa, T. Fujishima, A. Kuninaka and H. Yoshino : J. Ferment. Technol., 58(1980)509-515
- 21) M. J. Grove, G. W. Strandberg and K. L. Smiley : Biotechnol. Bioeng., 13(1971)709-711
- 22) M. Norin, J. Boutelje, E. Holmberg and K. Hult : Appl. Microbiol. Biotechnol., 28(1988)527-530
- 23) S. Braun, S. Rappoport, R. Zusman, D. Avnir and M. Ottolenghi : Materials Letters, 10(1990)1-5
- 24) G. I. Kvesitadze and M. Sh. Dvali : Biotechnol. Bioeng., 24(1982)1765-1772

- 25) P. Germain and R. R. Crichton : J. Chem. Tech. Biotechnol., 41(1988) 297-315
- 26) D. D. Lee, Y. Y. Lee, P. J. Reilly, E. V. Collins Jr. and G. T. Tsao : Biotechnol. Bioeng., 18(1976) 253-267
- 27) D. R. Marsh, Y. Y. Lee and G. T. Tsao : Biotechnol. Bioeng., 15(1973) 483-492
- 28) J. M. S. Cabral, J. M. Novais and J. P. Cardoso : Biotechnol. Bioeng., 26(1984) 386-388
- 29) F. Toldra, N. B. Jansen and G. T. Tsao : J. Chem. Tech. Biotechnol., 40(1987) 275-284
- 30) L. Gaoxiang, H. Jiayu, K. Xiufen and Z. Shuzheng : Applied Biochem. Biotechnol., 7(1982) 325-341
- 31) K. Shimizu and M. Ishihara : Biotechnol. Bioeng., 29(1987) 236-241
- 32) M. J. Byrne and D. B. Johnson : Biochem. Soc. Trans., 2(1974) 496-497
- 33) D. A. Cowan, R. M. Daniel, A. M. Martin and H. W. Morgan : Biotechnol. Bioeng., 26(1984) 1141-1145
- 34) P. J. Robinson, P. Dunhill and M. D. Lilly : Biochim. Biophys. Acta, 242(1971) 659-661
- 35) R. D. Mason and H. H. Weetall : Biotechnol. Bioeng., 14(1972) 637-645
- 36) C. Clifford and D. B. Johnson : Biotechnol. Bioeng., 22(1980) 2441-2442
- 37) L. L. Klopff and T. A. Nieman : Anal. Chem., 57(1985) 46-51
- 38) H. H. Weetall, N. B. Havewala, H. M. Garfinkel, W. M. Buehl and G. Baum : Biotechnol. Bioeng., 16(1974) 169-179
- 39) A. Manjon, J. L. Iborra, J. L. Gomez, E. Gomez, J. Bastida and A. Bodalo : Biotechnol. Bioeng., 30(1987) 491-497
- 40) N. H. Park and H. N. Chang : J. Ferment. Technol., 57(1979) 310-316
- 41) S. W. Sae : Biotechnol. Bioeng., 16(1974) 275-277
- 42) G. P. Royer and J. P. Andrews : J. Biol. Chem., 248(1973) 1807-1812
- 43) G. Fleminger and A. Yaron : Biochim. Biophys. Acta, 743(1983) 437-446
- 44) J. B. Jones and D. H. Pliura : Can. J. Chem., 59(1981) 2921-2925
- 45) A. Miyabayashi, M. Reslow, P. Adlercreutz and B. Mattiason : Anal. Chim. Acta, 219(1989) 27-36
- 46) R. D. Mason, C. C. Detar and H. H. Weetall : Biotechnol. Bioeng., 17(1975) 1019-1027
- 47) H. H. Weetall and R. D. Mason : Biotechnol. Bioeng., 15(1973) 455-466
- 48) R. K. Owusu, M. J. Trewhella and A. Finch : Biochim. Biophys. Acta, 830(1985) 282-287
- 49) M. B. F. Martins, M. E. M. Cruz, J. M. S. Cabral and J. F. Kennedy : J. Chem. Tech. Biotechnol., 39(1987) 201-213
- 50) H. Nakano, S. Takenishi and Y. Watanabe : Kagaku to Kogyo, 61(1987) 114-116
- 51) H. H. Weetall and L. S. Hersh : Biochim. Biophys. Acta, 185(1969) 465-468

- 52) Y. Yokote, M. Fujita, G. Shimura, S. Noguchi, K. Kimura and H. Samejima : Agr. Biol. Chem., 39(1975)1545-1552
- 53) A. L. Crumbliss, K. L. McLachlan, J. P. O'Daly and R. W. Henkens : Biotechnol. Bioeng., 31(1988)796-801
- 54) W. H. Hanisch, P. A. D. Rickard and S. Nyo : Biotechnol. Bioeng., 20(1978)95-106
- 55) Y. Y. Lee, A. R. Fratzke, K. Wun and G. T. Tsao : Biotechnol. Bioeng., 18(1976)389-413
- 56) G. W. Strandberg and K. L. Smiley : Biotechnol. Bioeng., 14(1972)509-513
- 57) 千畑一郎 編 : 固定化生体触媒 (講談社)
- 58) B. Fox and C. T. Walsh : J. Biol. Chem., 257(1982)2498-2503
- 59) 喜田村正次, 近藤雅臣, 瀧澤行雄, 藤井正美, 藤木素士 : 水銀 (講談社サイエンティフィック)
- 60) D. E. Wylie, L. D. Carlson, R. Carlson, F. W. Wagner and S. M. Schuster : Anal. Biochem., 194(1991)381-387
- 61) M. Ogata and H. Aikoh : Biochem. Pharmacology, 33(1984)490-493
- 62) J. B. Hursh, S. P. Sichak and T. W. Clarkson : Pharmacology & Toxicology, 63(1988)266-273
- 63) E. L. Smith, R. L. Hill, I. R. Lehman, R. J. Lefkowitz, P. Handler and A. White (訳者 鈴木旺ら) : 生化学 (I) (廣川書店)

第 4 章

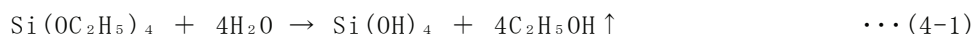
ゾルーゲル法による多孔質ガラスの合成 と微生物の包括固定

§ 1 緒言

1-1 緒論

近年、新しいガラスの製造法として注目されているゾルーゲル法は、金属の有機及び無機化合物の溶液をゲルとして固化し、ゲルを乾燥・加熱し酸化物固体を作成する方法である。ゾルーゲル法による無機材料の合成は1946年のDislichのケイ酸エステルの加水分解によるゲルの作製に始まり、1970年代になってDislich及びMazdiyasniらのゾルーゲル法によるガラスや焼結多結晶体の合成に関する研究をきっかけとして現在のように盛んに研究が行われるようになった¹⁾。

現在、広く用いられている金属アルコキシド溶液を用いたゾルーゲル法ではアルコキシドの加水分解反応と脱水縮合反応によりゲル化が進行する。例えば、テトラエトキシシランを原料としたときの加水分解・脱水縮合反応はそれぞれ(4-1)、(4-2)式で示される。



(2)式の脱水縮合反応の結果得られるシリカゲルは内部に溶媒や水を含み多孔性であるため、これを加熱し乾燥・焼成することによりシリカガラスが得られる。

このようなゾルーゲル法がガラスの合成法として現在広く研究されているのは次のような理由による²⁾。

- (1) 比較的低温でガラスを合成することができるため、ガラス内部に種々の物質を包括することが可能である。
- (2) 原料の高純度化が可能であり、坩堝などからの汚染が無いため、高純度で均質なバルク体が比較的容易に得られる。
- (3) 従来の高温合成法では得られない新しい組成のガラスが得られる可能性がある。
- (4) ゲル化が進行する過程で種々の形状に成形することが容易であるため、特にコーティングやファイバーの作製が容易である。

このようなゾルーゲル法の特徴を利用して、高温熔融法では合成不可能な機能性有機分子をガラス中に分散させた機能性有機無機複合体が合成されている。例えばPHB (Photo Chemical Hole-burning) 効果³⁾やフォトクロミック効果⁴⁾を示す有機色素を非晶質シリカ中に分散させた光メモリー用材料や非線形光学効果を示す有機色素をドーピングした光機能性

材料⁵⁾等が合成されている。

本論文の第2章で $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3-\text{SiO}_2$ 系ガラスの分相現象を利用した多孔質ガラスの合成法について述べたが、ゾルーゲル法によっても多孔性非晶質材料が得られることが報告されている。ゾルーゲル法による多孔質材料は従来の方法で得られる多孔質材料とは異なった細孔構造を持つことが考えられ、その合成法と併せて新たな分野への応用が期待される。

1-2 既往の研究（ゾルーゲル法による多孔性非晶質材料の合成）

ゾルーゲル法による多孔質材料の合成法については原料としてシリコンアルコキシドと高濃度の酸を用いる方法とシリコンアルコキシド-有機溶媒または有機高分子の混合溶液でみられる分相現象を利用する方法が報告されている。

幸塚ら⁶⁾はシリコンアルコキシドを高濃度の酸触媒により急速にゲル化させることにより多孔性シリカゲルが得られることを報告している。幸塚らはシリコンアルコキシド、 H_2O 、アルコール、酸の混合溶液から得られるゲルの微細構造と出発溶液組成の関係を報告しており、テトラメトキシラン、水、メタノール、塩酸を用いて細孔径が数 μm の多孔質ゲルが得られることを報告している。またシリコンアルコキシドのリガンドが大きくなるにつれゲルの細孔構造が小さくなることが知られている。

中西、曾我らはシリコンアルコキシドと有機溶媒または有機高分子系を用いることにより、ミクロンオーダーの連続貫通孔を持つ SiO_2 非晶質体が得られることを報告している。中西らはテトラメトキシラン（TMOS）-ホルムアルデヒド系⁷⁾、テトラエトキシラン（TEOS）-ポリアクリル酸（HPAA）系⁸⁾、TMOS-ポリスチレンスルホン酸ナトリウム（NaPSS）系⁹⁾及びTEOS-ポリエチレングリコール（PEG）系¹⁰⁾についてミクロンオーダーの細孔径を持つ多孔質ゲルを作成し、また出発溶液組成によりその細孔径を制御し得ることを報告している。

TMOS-NaPSS系についてはNaPSS濃度及びゲル化時の温度を変化させることにより、Fig. 4-1のように細孔径が0.1~100 μm の広い範囲で変化すること、またTEOS-PEG系でも同様にPEG濃度及び分子量を変化させることにより、Fig. 4-2のように細孔径を0.1~10 μm の範囲で変化させ得ることを報告している。

このようなシリコンアルコキシド-有機高分子系で見られる分相現象については、ゲル化の進行にともない生成したシリカ重合体と有機高分子を含む溶媒とのスピノーダル分解により形成された分相構造がゲル化により固定されるためであり、出発溶液中の有機高分子や水の濃度により得られるゲルの細孔構造が異なるのはシリカ重合体と有機高分子を含む溶媒との間の相溶性やゲル化の速度が影響されるためと推測している。Fig. 4-1においてゲル化温度が40℃から60℃に上昇するにつれ細孔径が小さくなっているのは、温度の上昇によりシリカ重合体と溶媒の相溶性が向上したためと考えられる。

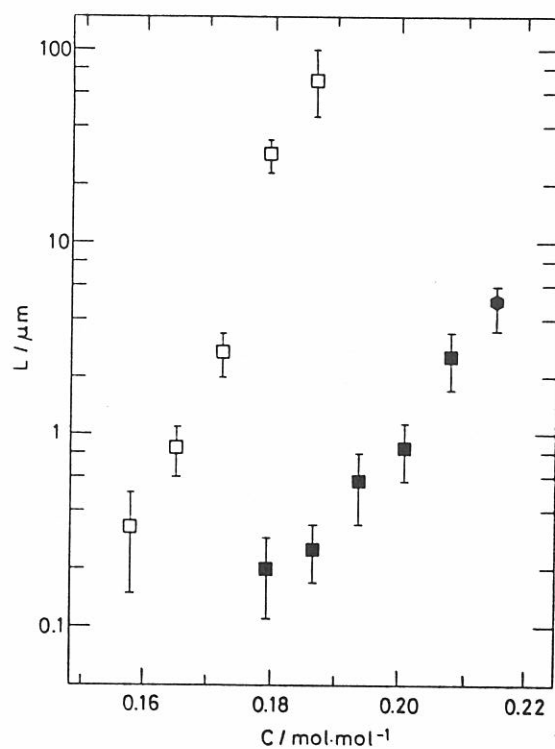


Fig.4-1 TMOS-NaPSS系ゾル溶液から得られる多孔質ゲルの細孔径とNaPSS濃度の関係

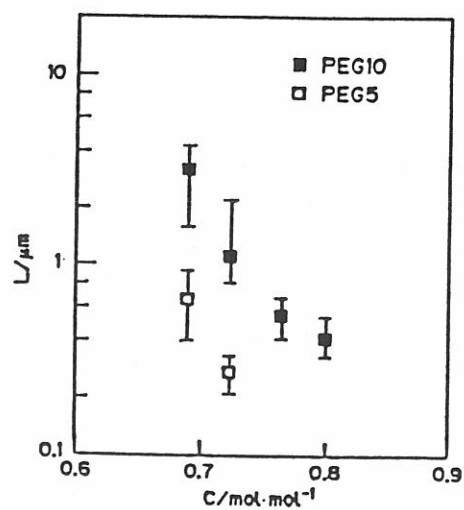


Fig.4-2 TMOS-PEG系ゾル溶液から得られる多孔質ゲルの細孔径とPEG濃度の関係

1-3 生体触媒としての微生物

微生物菌体は複雑な多段階の反応を触媒する酵素系を有しており、それ自体が一種のバイオリアクターであると言える。生きている微生物菌体は自己の生命維持のために様々な反応を行って種々の物質を生産している。人類は古くから“発酵”の形でこの微生物の能力を利用しており、現在ではエタノール、核酸、アミノ酸など多くの物質が生産されている¹⁾。各種抗生物質や酵素はそのほとんどが微生物に由来する物であり、この点でも微生物の能力が重要視されている。

微生物の利用は大きく分けて、代謝生成物を単離して利用するもの、微生物の発酵作用を利用するもの、微生物の生成する酵素を利用するものの3種類に大別される。代謝生成物を単離して利用するものには飲料用アルコール・有機酸・アミノ酸の発酵や抗生物質の製造などがある。この他、ビタミンや核酸なども微生物の発酵を利用して製造されている。微生物の発酵作用は食品工業に広く利用されており、酒類、味噌、醤油、乳製品など多くの食品が微生物の発酵を利用して製造されている。また微生物は酵素源としても重要であり、特に近年の遺伝子操作技術の進歩により特定の酵素の構造遺伝子を他の微生物に組み込むことが可能になっており、この点でも酵素源としての微生物の有用性が増している。

1-4 固定化微生物

微生物による有用物質の生産や化学物質の検出においては、酵素の場合と同様に不溶性担体への固定化が重要となる。現在の発酵工業では多くの場合、原料と共に微生物を培養槽に投入し目的とする生成物を反応後に単離する方法が取られているが、固定化微生物を利用する事により連続的な生産が可能になるのみならず、微生物の分離が不要になりプロセスを簡素化出来るという利点もある。

微生物の固定化は有機高分子を用いた包括法によるものが一般的であり、この方法に使用される有機高分子素材としては、ポリアクリルアミドゲル、 κ -カラギーナン、アルギン酸ゲル、光硬化性樹脂、コラーゲン、ウレタンポリマー、セルロース繊維等が用いられている¹¹⁾。

微生物の固定化においては、多くの場合その微生物は死滅する。しかし微生物菌体内の特定の酵素反応を利用する場合には微生物自身が増殖する必要はなく、必要とする酵素活性が安定に保たれていればよい。しかし発酵により得られる多くの有用物質は多段階の酵素反応に加え、ATPや補酵素類の再生系など複雑な酵素反応により生産される場合がほとんどである。このような反応経路を酵素を用いて工業的に構築することは事実上不可能である。そこで微生物を生存状態で担体に固定化し、栄養源を供給することによって増殖を伴った状態で利用することが必要となる。このような固定化微生物は「固定化増殖微生物」

(Immobilized growing cells) と呼ばれる¹¹⁾。

Wadaら¹²⁾はκ-カラギーナン中にSaccharomyces sp.を包括固定し、その固定化及び増殖の状態を電子顕微鏡で観察しており、酵母の増殖によって担体であるκ-カラギーナゲルの表面に亀裂が生じ酵母が流出することを報告している。

またKierstanら¹³⁾はSaccharomyces cerevisiaeをアルギン酸カルシウムゲルに包括固定することにより固定化増殖酵母を得られることを報告している。

上記のように有機高分子ゲル内に微生物を包括固定した場合には、担体であるゲルの強度の不足から、Wadaら¹²⁾の報告のように増殖によるゲルの損傷は避けられないと考えられる。

固定化担体の強度や耐化学性の点ではガラスやセラミックスのような無機担体は有機高分子ゲルより優れている。Bandyopadhyayら¹⁴⁾らは多孔質ガラスを用いて、また岩崎ら¹⁵⁾は多孔性アルミナセラミックスにZygosaccharomyces rouxiiを吸着固定することにより固定化増殖酵母を作製できることを報告している。これらの方法は多孔性の担体の細孔内に微生物を含浸させる方法であるため、あらゆる微生物を生存状態で固定することが可能であるが、反面、大量の菌体を固定することが困難であり、菌体に流出が容易に起こるという欠点もある。

上記の方法とは異なる新しい固定化法として、Carturanら¹⁶⁾はテトラエトキシシラン (TEOS) を用いてゲル化過程で酵母の固定化を試み、固定化後も酵母細胞内のインペルターゼ活性が保たれることを報告している。Carturanらの方法ではTEOSの毒性等から酵母は死滅した状態で固定されており、担体も多孔性ではない等の問題もあるが、一般に金属アルコキシドを用いたゾルーゲル法から得られるゲルは有機高分子ゲルに比べて強度が高いため、前述の有機高分子ゲルのように酵母の増殖による担体の破損は少ないと考えられ、新しい固定化微生物の作製法として注目すべき方法である。

1-5 酵母の生活環

Saccharomyces cerevisiaeでは通常、栄養的に分裂している細胞は二倍体である。つまり1個の細胞は父型と母型に由来する2組の染色体を保持している。Saccharomyces酵母の分裂は出芽によって行われるが、核分裂は一般の真核細胞とほぼ同じ有糸分裂によって行われ、細胞周期にみられる種々の出来事も高等生物のそれと同じである。（但し核分裂に際して染色体の出現は認められない）

栄養的に増殖しているS. cerevisiaeの二倍体細胞は栄養、特に窒素源や発酵性の糖が欠乏してくると孢子形成を始める。人工的には糖や窒素源を欠乏させた酢酸塩を含んだ培地に移すことにより孢子形成を誘起することができる。

この酵母に孢子は“子のう孢子”と呼ばれ、栄養細胞内に形成される。減数分裂により一つの子のう(ascus)の中には4個の一倍体の孢子(a型, α型 各2個)ができる。このa, αは接合型と呼ばれ高等生物の性に相当するものであり、第3染色体上にある対立遺伝子

によって決定される。 a 、 α の胞子は発芽すると、それぞれ a 、 α の一倍体の栄養細胞を生じる。原則として a と α の胞子間または栄養細胞間でのみ接合が起こる。接合の結果、接合子ができ、これから二倍体の栄養細胞が発芽してくる¹⁷⁾。

一般に胞子を形成する微生物は胞子の状態では耐環境性が高く、高温、乾燥、酸等に耐えられる。ゾルーゲル法により微生物を固定化するためには、

(1)耐酸性、アルコール耐性

(2)ゲル体を強化するための乾燥に対する耐性

等が要求され、これらの条件を満たすのは極限環境下で生存する特殊な微生物を除けば胞子のみである。

そこで本実験では酵母を胞子状態でゾル溶液に加え、ゲル化過程で多孔質ゲルを形成すると同時に酵母を包括固定することを試みた。

1-6 研究の目的

低温合成というゾルーゲル法の特徴は生体触媒の固定化にも最適であり、本論文第3章で述べたような酵素の固定化においても、ガラス作製後に酵素の固定化処理を施すのではなく、ゾルーゲル法によるゲル合成時に酵素や微生物などを包括し固定化し得る可能性がある。

本研究では金属アルコキシドを用いて多孔質シリカを得ることを目的とし、出発溶液組成を変化させることにより、多孔体の細孔構造を制御することを目的とした。実験を行うに当たっては、テトラメトキシシラン-塩酸系を用いる方法と、テトラメトキシシラン-ポリエチレングリコール系を用いる方法の2種類を試み、出発溶液組成が多孔質ゲルの細孔構造に及ぼす影響を調べた。また多孔質ゲルの微生物固定化担体としての応用を考え、微生物に対する毒性が比較的小さいと考えられるTMOS-PEG系を用いて胞子形成させた酵母をTMOS-PEG溶液中に分散し、ゲル化過程で固定化した固定化酵母を作成することを目的とした。

§ 2 実験方法

2-1 多孔質ゲルの合成

(1) TMOS－塩酸系

出発溶液の組成が $\text{TMOS}:\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}:\text{HCl}=1:1.53:1\sim 2:0.4$ （モル比）となるよう、TMOS、MeOH、塩酸を100mlビーカー中で混合し、60℃に保持した。ゲル化後、室温で約1週間乾燥させた後、600℃で1時間焼成し、多孔体を作製した。

(2) TMOS-PEG系

出発溶液の基本組成を $\text{TMOS}:\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}:\text{PEG}=1:11:2:0.7$ （モル比）とし、PEG濃度、 H_2O 濃度、 H_2SO_4 濃度を変化させ、得られる多孔体の細孔構造の変化を調べた。本論文では出発溶液組成の表記は、例えば $[\text{TMOS}]:[\text{H}_2\text{O}]:[\text{MeOH}]:[\text{PEG}]=1:11:2:0.7$ （モル比）で1N H_2SO_4 溶液を用いた場合に次のように表すことにする。

$\text{M}(1, 11, 2)0.7\text{Px } 1\text{N}$ （PEGの分子量が20000, 50000の場合：x = 2, 5）

(1) PEG濃度の影響：Series A

$[\text{TMOS}]:[\text{H}_2\text{O}]:[\text{MeOH}]=1:11:2$ （モル比）で一定とし、PEG濃度を0.5～1.0の間で変化した。硫酸は1規定溶液の状態で加えた。

(2) H_2O 濃度の影響：Series B

$[\text{TMOS}]:[\text{MeOH}]:[\text{PEG}]=1:2:0.7$ で一定とし、 H_2O （1N H_2SO_4 溶液）濃度を5～15の間で変化した。

(3) H_2SO_4 濃度の影響：Series C

$[\text{TMOS}]:[\text{H}_2\text{O}]:[\text{MeOH}]:[\text{PEG}]=1:11:2:0.7$ で一定とし、0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1の各規定度の硫酸溶液を用いることにより、触媒である H_2SO_4 濃度を変化させた。

また各実験においてPEGとして分子量が20,000及び50,000の二種類のものを用い、PEG分子量の細孔構造に及ぼす影響についても調べた。但し、PEG濃度はエチレングリコール単量体とTMOSのモル比で評価した。Table4-1は各出発溶液の組成範囲を示している。

出発溶液の調整は所定組成になるよう水、硫酸、メタノールを混合した溶液に所定量のポリエチレングリコールを100ccビーカー内で混合し、60℃においてPEGを溶解させた後にTMOS 5mlを添加、攪拌し、均一な溶液とした。その後、ビーカーをポリエチレンフィルムで密封し、40℃の恒温器内に保持しゲル化を行わせた。ゲル化の確認は目視により行い、ビーカーを傾けた際にゾル溶液の流動が見られなくなった時点でゲル化とした。ゲル化後、水による溶媒、PEGの溶出処理を40℃で約10日間行い、150℃～200℃で乾燥して多孔性ゲルを得た。

上記のゲル合成に使用した試薬をTable4-2に示す。

Table4-1 TMOS－PEG系出発溶液の組成

Composition	TMOS	H ₂ O	MeOH	PEG	Catalyst
	(molar ratio)				
Series A	1	11	2	0.5～1.0	1N H ₂ SO ₄ aq.
Series B	1	5～15	2	0.7	1N H ₂ SO ₄ aq.
Series C	1	11	2	0.7	0.005N～1N H ₂ SO ₄ aq.

Table4-2 多孔性ゲル作成に用いた試薬

オルトケイ酸メチル	:	東京化成 (T0588)	
メタノール	:	守随彦太郎商店	特級
硫酸	:	守随彦太郎商店	特級
塩酸	:	守随彦太郎商店	特級
ポリエチレングリコール	:	分子量20,000	和光純薬
		分子量50,000	和光純薬

2-2 固定化微生物の作製

2-2-1 酵母の培養及び胞子形成

実験には *Saccharomyces cerevisiae* (IAM4512) を用いた。酵母の培養はTable4-3に示す YEPD培地を用い、500mlバッフル付三角フラスコ中で30℃において48時間振盪培養した¹⁸⁾。

Table4-3 YEPD培地組成

Yeast Extract (DIFCO)	:	10 g
Bacto Peptone (DIFCO)	:	20 g
Glucose	:	20 g
蒸留水	:	1000ml

培養後、菌体を遠心分離（2000rpm×10分）し無菌蒸留水で数回洗浄した後、2wt%酢酸カリウム溶液中で48時間振盪培養し胞子形成させた。胞子形成した菌体は上記と同様にして無菌蒸留水で洗浄し胞子浮遊液を得た。

浮遊液中の胞子数は酵母細胞壁分解酵素（Zymoliasse20T：キリンビール製）により酵母細胞壁を溶解し、胞子を分散させた溶液を希釈し、YEPD寒天培地に接種し30℃で1～2日培養し形成されたコロニー数をカウントして算出した¹⁹⁾。

2-2-2 ゼルーゲル法による酵母胞子の固定化

酵母胞子の固定においては、TMOSに予め少量のH₂O及びMeOHを加え、20℃で24時間加水分解した後、胞子浮遊液を加えた。加水分解溶液の組成及び最終組成はTable4-4の通りである。

胞子浮遊液中の胞子数は約 5×10^7 個/ml（10vol%）であり、胞子浮遊液添加時には胞子の体積を考慮して本来のH₂O量の1.1倍の胞子浮遊液を添加した。

Composition A, B になるよう胞子浮遊液を添加した試料及び対照としてComposition C になるよう無菌蒸留水を加えた試料の3種類を作成し、ゲル化後、試料を数mm程度に粉砕し無菌蒸留水で数回洗浄した後に150ml YEPD培地を含む300mlバッフル付三角フラスコに移し、30℃, 70rpmで10日間振盪培養した。培養中は1日間隔で各培地を滅菌したピペットで1ml採取し、グルコース定量に供した。

実験においては加水分解溶液の調整以降の全ての操作を0.5%逆性石鹼液を噴霧し滅菌したグローブボックス内で行った。また器具、培地はオートクレーブ中で121℃×20分の高圧蒸気滅菌を行った。

Table4-4 加水分解溶液組成及び胞子浮遊液添加後の最終組成

CompositionA : (加水分解時)	M(1, 2, 2)0.7P2 0N + 胞子浮遊液 15mol/molTMOS
(最終組成)	M(1, 17, 2)0.7P2 0N
CompositionB : (加水分解時)	M(1, 2, 1)0.5P2 0.1N + H ₂ O 3mol/molTMOS + 胞子浮遊液 6mol/molTMOS
(最終組成)	M(1, 11, 1)0.5P2 0.02N
CompositionC : (加水分解時)	M(1, 2, 2)0.7P2 0N + H ₂ O 15mol/molTMOS
(最終組成)	M(1, 17, 2)0.7P2 0N

2-3 分析

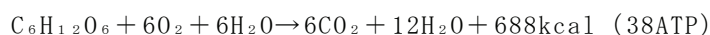
(1) 多孔質ゲルの細孔径測定及び熱分析

細孔径4 μ m以下の試料については水銀圧入法（Carlo Erba製水銀圧入式ポロシメーター220型）により，細孔径が数 μ m以上の試料については水銀圧入法による測定が不可能なため、SEM観察（日立製S-2500）により細孔径を測定した。また一部の試料についてゲル体の示差熱分析(DTA)及び熱重量分析(TG)の測定を理学電気製TAS-100により行った。

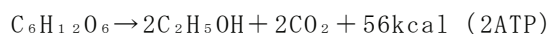
(2) 固定化酵母の活性測定

酵母はグルコースやショ糖（サッカロース）を有酸素または無酸素で分解してエネルギーを得る。その反応は以下の通りである。

呼吸

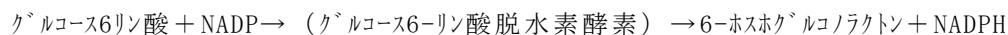
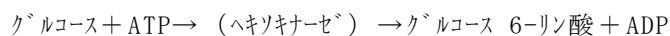


無酸素呼吸（アルコール発酵）



従って、培地中のグルコース量の減少から固定化した酵母の活性を評価できる。

本実験ではグルコースの定量は酵素法によりベーリンガーマンハイム山之内製Fキットを用いて行った。本分析法では下記の反応を用いる。



NADPはニコチナミドアデニンジヌクレオチドリン酸と呼ばれ、多くの酸化還元に関与する酵素の補酵素として生体内で重要な働きをする。本測定法ではNADPがグルコース6-リン酸脱水素酵素の補酵素であり、脱水素反応によりNADPが還元され、340nmに強い吸収を持つNADPHを生成することから、340nmにおける吸光度（ $A_{340} = 6.2 / 1mM \text{ NADPH}$ ）からグルコース量を算出した。

§ 3 結果及び考察

3-1 TMOS-塩酸系溶液からの多孔質ゲルの合成

3-1-1 多孔質ゲルの細孔構造と細孔分布曲線

Fig. 4-3はTMOS-塩酸系溶液からの多孔質ゲルのSEM像を示す。一般にゾルーゲル法で作製した多孔体はゲル粒子が凝集したものが多く、本実験ではFig. 4-3のように絡み合い構造をもつ試料が得られた。Fig. 4-4は同様の方法で作成した多孔質ゲルの細孔分布曲線を示しており、1000 Å～2000 Åに細孔径が集中しており、ゾルーゲル法による多孔体としては鋭い細孔分布を持つ試料が得られた。

TMOS-塩酸系の出発溶液の合成においてはTMOSを混合した直後に加水分解反応による発熱が見られ、溶液調整後、数分でゲル化が完了した。Fig. 4-3のような多孔質のゲルが得られた原因としては、TMOSの加水分解と脱水縮合反応が急激に進行するため、ゲル内部の溶媒を保持したままシリカの重合が起こり、ゲル化によってその構造が保持されたためと考えられる。

3-1-2 出発溶液中のメタノール濃度と細孔径の関係

出発溶液中のメタノール濃度をTMOSに対しモル比で1～2の間で変化させた場合のメタノール濃度と細孔径の関係をFig. 4-5に示す。メタノール濃度がTMOSに対しモル比で1.6から1.9に増加するに従って細孔径が約1000 Åから約10000 Åに増大している。多孔体の気孔率は約60～70%であり、出発溶液組成との関係はみられなかった。

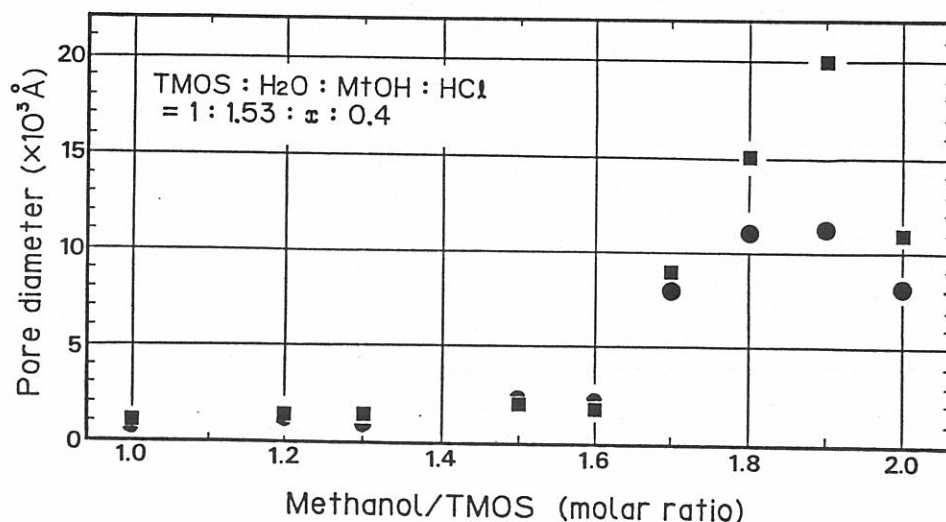


Fig. 4-5 メタノール濃度と多孔質ゲルの細孔径の関係

(■・・・ピーク値 ●・・・平均細孔径)

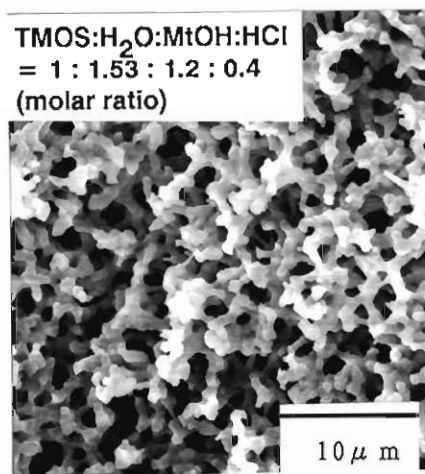


Fig.4-3 TMOS-塩酸系溶液から合成した多孔質ゲルのSEM像

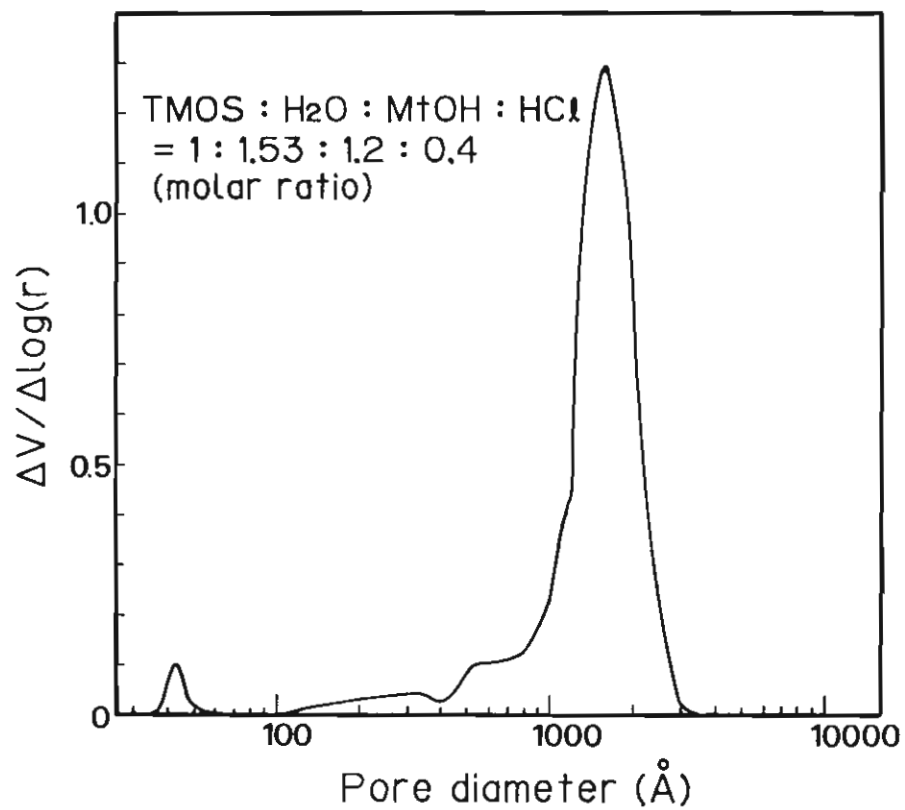


Fig.4-4 TMOS-塩酸系溶液から合成した多孔質ゲルの細孔分布曲線

3-2 TMOS-PEG系溶液からの多孔質ゲルの合成

3-2-1 出発溶液組成と多孔体の細孔構造の関係

Fig. 4-6はTMOS:H₂O:MeOHを1:11:2（モル比）とし、PEG濃度を0.6～0.9（mol/molTMOS）の間で変化させ、また分子量20,000及び50,000のPEGを用いて作成した多孔質ゲルのSEM像である。PEG濃度が増加するにつれ、細孔構造がミクロンオーダーの独立孔から絡み合い構造に変化し、細孔径も小さくなっていることが分かる。これはシリカの重合に伴ってゾル溶液の安定性が低下し液-液相分離が起きる過程で、シリカリッチ相が相分離後速やかにゲル化すると絡み合い構造のゲル体になり、巨視的に相分離が進行してからゲル化した場合には独立孔からなる細孔構造を持つものと考えられる。また分子量50,000のPEGを用いて作成したゲルの方が細孔構造がやや大きくなる傾向が見られる。

Fig. 4-7はPEG濃度と多孔体の細孔径の関係を示しており、PEG濃度が0.5から1.0（mol/molTMOS）に増加するに従って細孔径が約10 μmから0.1 μmに減少している。中西ら¹⁰⁾はTEOS-PEG系に関して同様の実験を行っており、Fig. 4-8と本実験結果を比較すると、細孔径とPEG濃度の関係及び細孔径の絶対値ともよく一致している。またPEGの分子量が20,000及び50,000の場合にはそれぞれPEG濃度が0.85, 1.1以上の試料では透光性で緻密なゲル体が生成した。またPEG分子量の影響についてはSEM観察でも見られた通り、分子量の大きいPEGを用いると細孔径も大きくなっている。

Fig. 4-9はH₂O濃度と細孔径の関係を示しており、H₂O濃度が5から15（mol/molTMOS）に増加するに伴い細孔径が増大している事がわかる。

PEG濃度及びH₂O濃度を変化させた場合にはゲル化時間の変化が少なく、細孔構造の変化はPEG及びH₂O濃度の変化ゾルに伴うゾル溶液の相溶性の変化によるものと考えられる。

また出発溶液中のH₂SO₄濃度を変化させた場合の細孔径に及ぼす影響をFig. 4-10に示すが、触媒であるH₂SO₄濃度の減少に伴い細孔径が急激に減少しており、PEGの分子量が20,000及び50,000の場合にそれぞれH₂SO₄濃度が0.05N, 0.001N以下の試料で透光性で緻密なゲル体が生成した。触媒であるH₂SO₄濃度によりゲル化時間は大きく変化し、本実験の組成範囲内ではH₂SO₄濃度が減少するとゲル化時間が短くなる傾向が見られ、H₂SO₄濃度による多孔体の細孔構造の変化は分離したシリカ重合相のゲル化速度が大きく影響するものと考えられる。

以上の結果からTMOS-PEG系において出発溶液組成（PEG濃度及び分子量、H₂O濃度、H₂SO₄濃度）を変化させることにより、生成する多孔性ゲルの細孔径を約0.1 μmから約10 μmの広い範囲で制御することが可能であることがわかった。

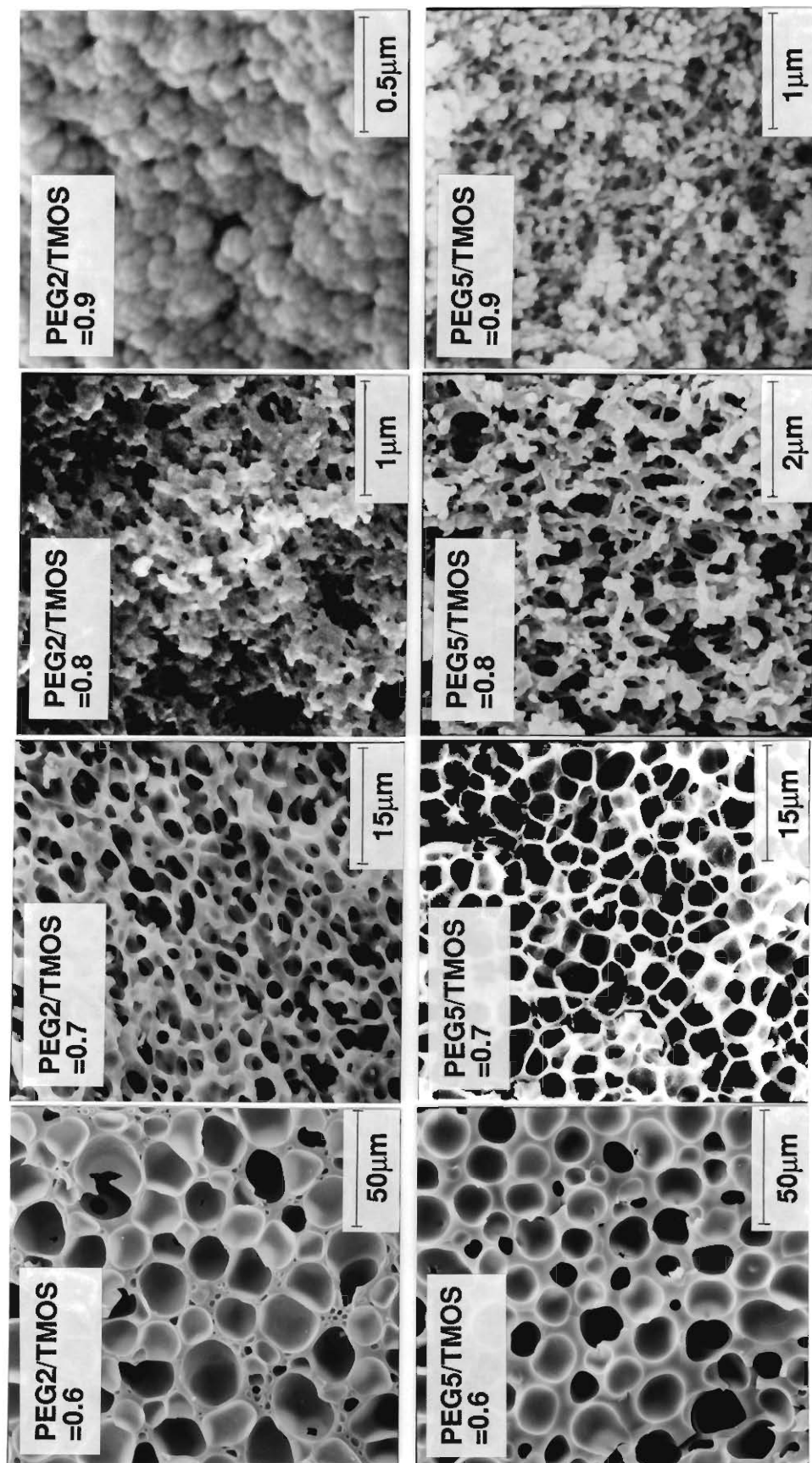


Fig.4-6 TMOS-PEG系ゾル溶液から得られる多孔質ゲルのSEM像
(PEG濃度及び分子量による細孔構造の変化)

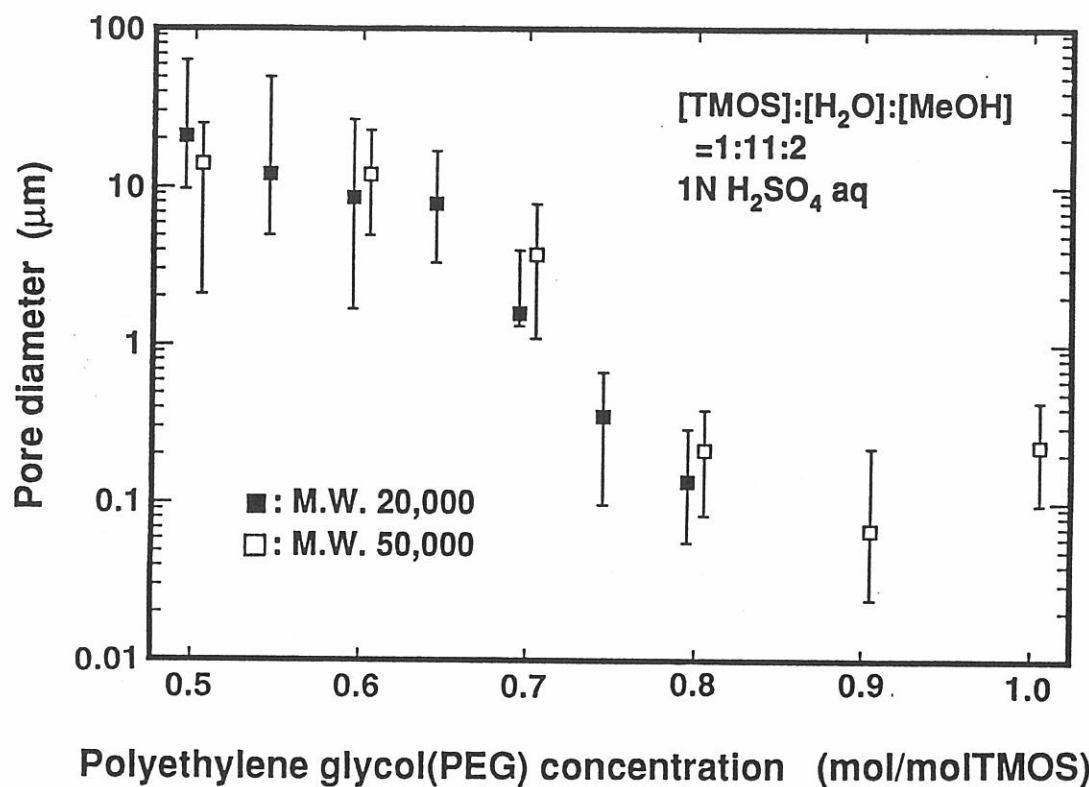


Fig.4-7 TMOS-PEG系溶液から合成した多孔質ゲルの細孔径と出発溶液中のPEG濃度の関係

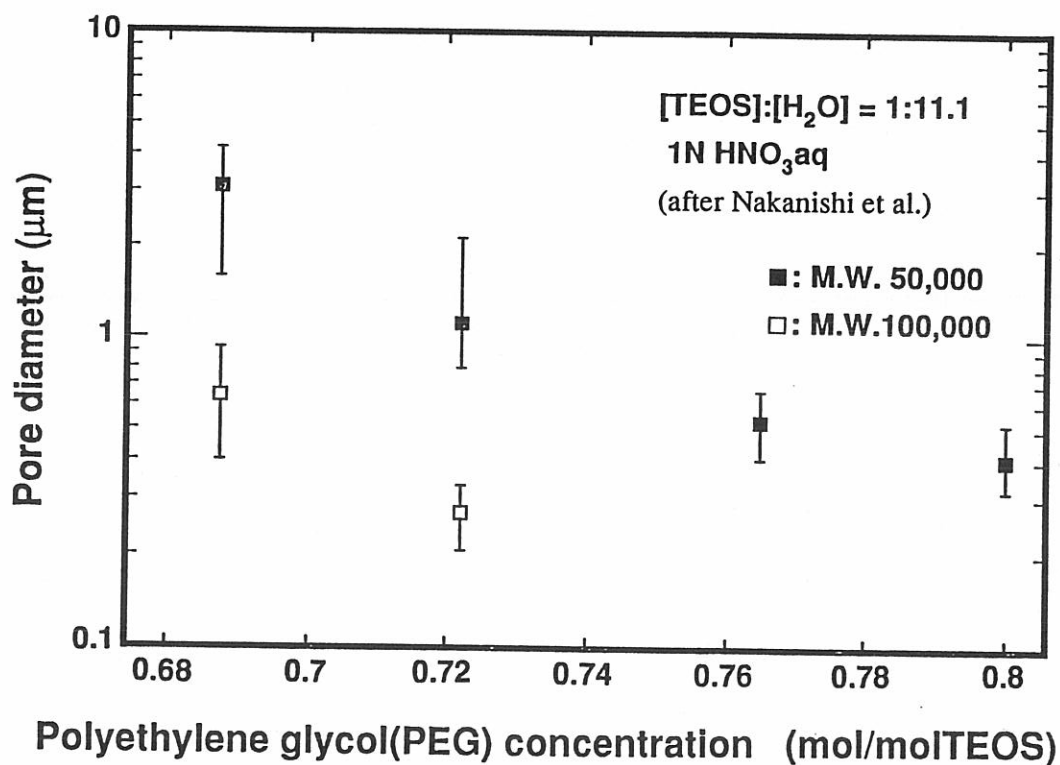


Fig.4-8 TEOS-PEG系溶液から合成した多孔質ゲルの細孔径と出発溶液中のPEG濃度の関係 (中西ら¹⁰⁾)

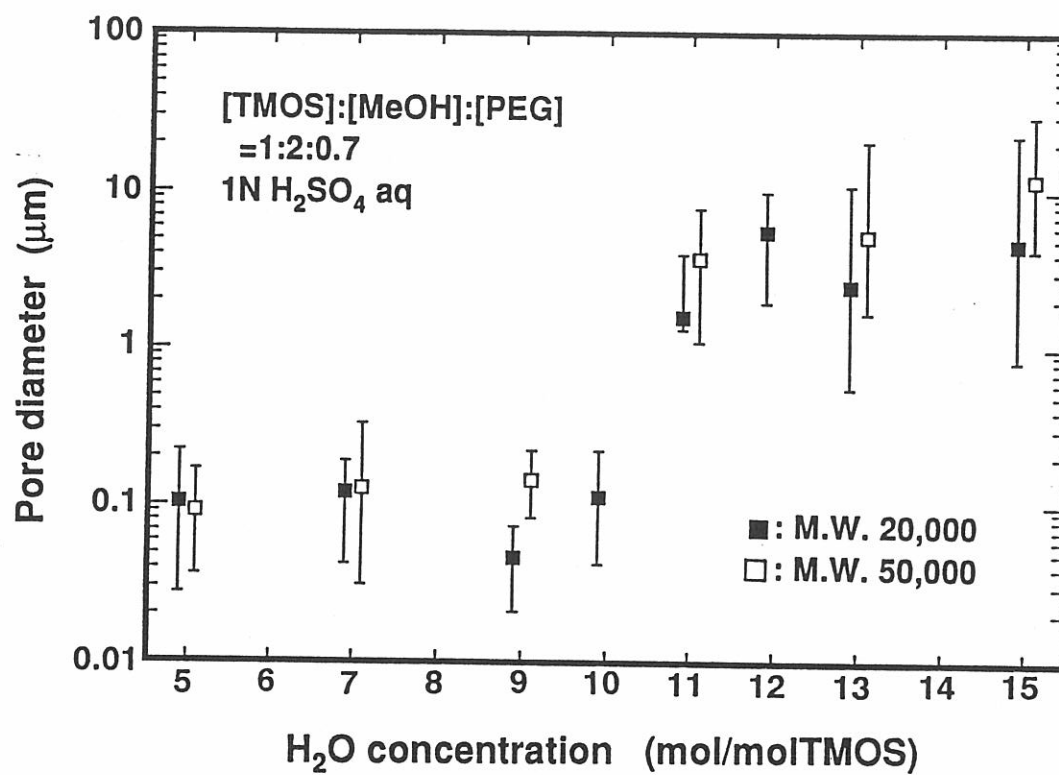


Fig.4-9 TMOS-PEG系溶液から合成した多孔質ゲルの細孔径と出発溶液中のH₂O濃度の関係

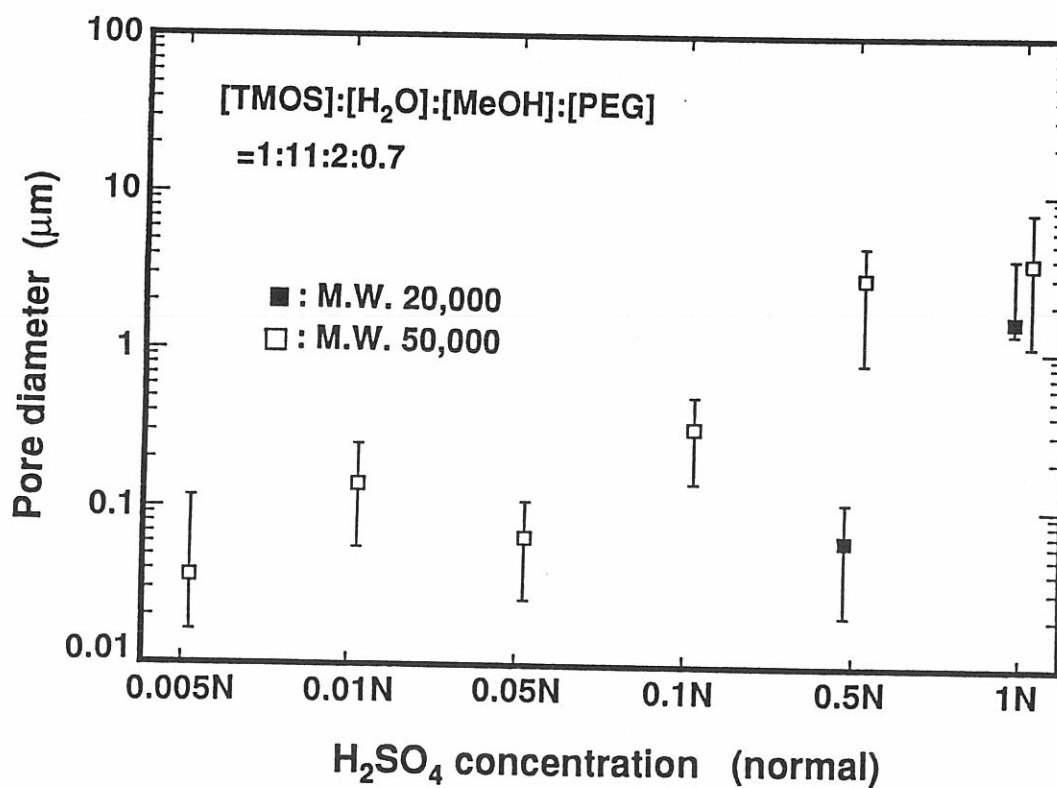


Fig.4-10 TMOS-PEG系溶液から合成した多孔質ゲルの細孔径と出発溶液中のH₂SO₄濃度の関係

3-2-2 TG/DTAによるTMOS-PEG系多孔質ガラスの熱的挙動の分析

多孔性の乾燥ゲル体へのPEGの残留を調べるため示差熱/熱重量分析を行った。

測定は出発溶液組成がM(1, 11, 2)0.7P2の白色で多孔性のものと、組成がM(1, 11, 2)0.9P2の透光性で緻密な試料の2種類について行い、その結果をFig. 4-11に示す。

いずれの試料でも100℃以下での吸熱と200℃～250℃での発熱によるピークが見られ、それに伴う重量減少が観察される。大田ら²⁰⁾はTEOS-PEG系の緻密なゲル体についてのTG/DTA分析について報告しており (Fig. 4-12)、本研究における結果とそのピーク温度、形状とも一致している。100℃以下の吸熱ピークは細孔内に物理的に吸着した水の蒸発によるもので、200℃～250℃で見られる発熱ピークはSiO₂骨格に結合し残留しているPEGの燃焼によるものと考えられる。

2種類の測定結果を比較すると緻密なゲル体 (M(1, 11, 2)0.9P2) では多孔性の試料に比べ、水の蒸発による吸熱は少なく、一方PEGの燃焼による発熱が多く見られる。この結果は多孔性のゲルに比べ緻密なゲルでは吸着水が少なく、一方溶出されないPEGが多く残っていることを考えると妥当であるといえる。

3-3 TMOS-PEG系多孔質ゲル中に固定化した酵母の活性

YEPD培地中のグルコース量の経時変化をFig. 4-13に示す。酵母をComposition A, Bに固定化した場合ともグルコース量は連続的に減少している。同時に作成したComposition Cの酵母を含まない多孔質ゲルを培地に加えた場合はグルコース量に変化は見られない。これより、Fig. 4-13に見られる培地中グルコースの減少は系外から混入した微生物によるものではなく、ゲル中に固定された酵母胞子がゲル化後に発芽し活性を示したものと考えられる。

また、10日培養後に各培地を1ml採取し、YEPD寒天培地に接種したところ、固定化酵母を加えた試料 (Composition A, B) を接種した培地には無数のコロニーが見られ、多孔質ゲル担体から酵母の流出が起こっていることがわかった。一方、Composition Cの多孔質ゲルを加えた培地からは全くコロニーが形成されず、系外からの汚染がないことが確認された。Fig. 4-14は酵母を固定化したゲルの断面をSEM観察したものであり、ゲルの細孔内に数μmの酵母と思われる粒子が観察され、酵母がゲルの細孔内に固定化されていると考えられる。

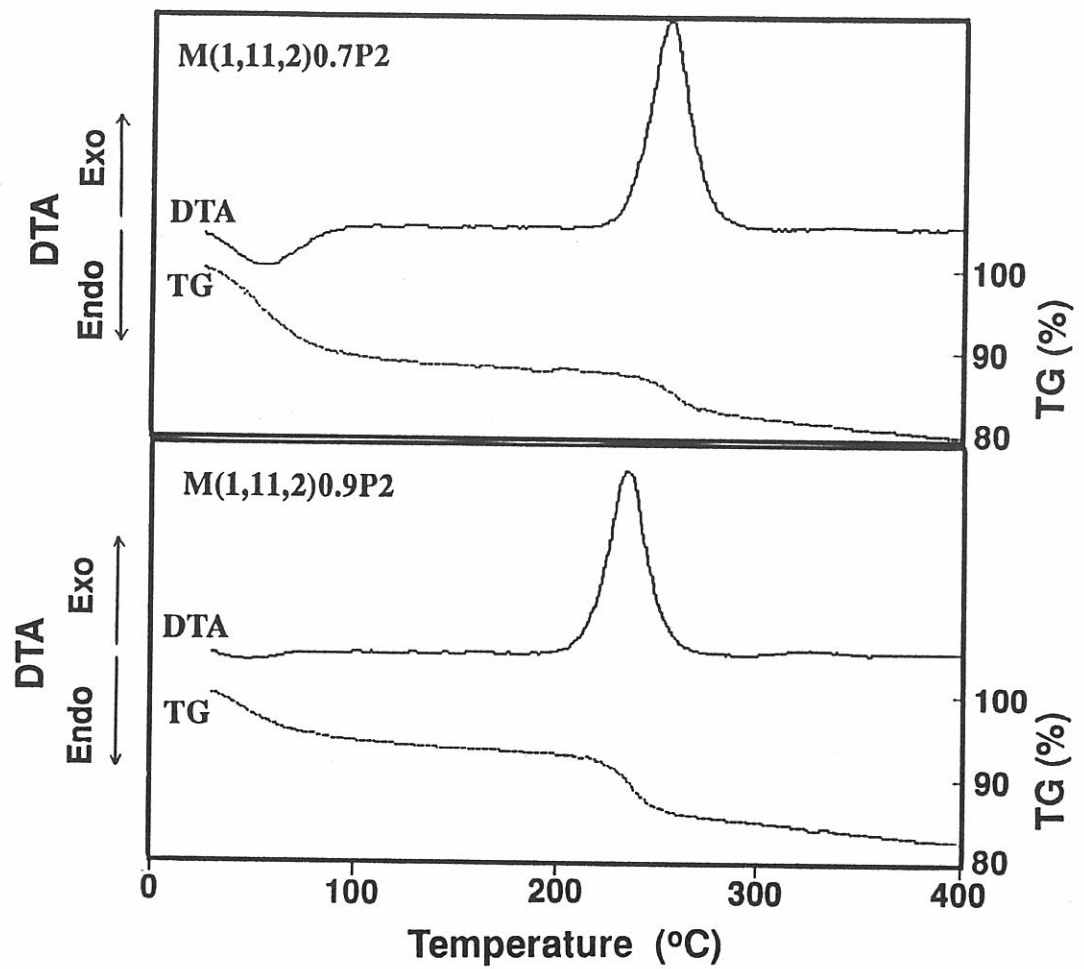


Fig.4-11 多孔質ゲルのTG/DTA曲線

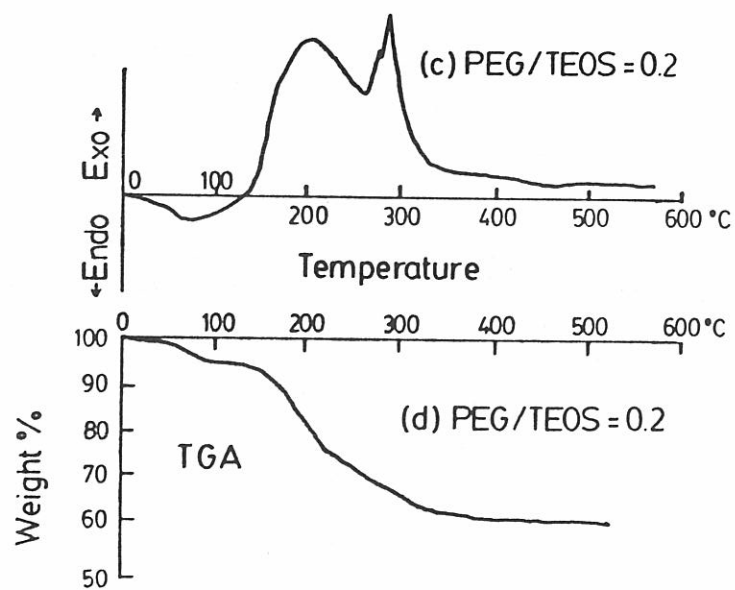


Fig.4-12 TEOS-PEG系溶液から得られる緻密なバルク体のTG/DTA曲線

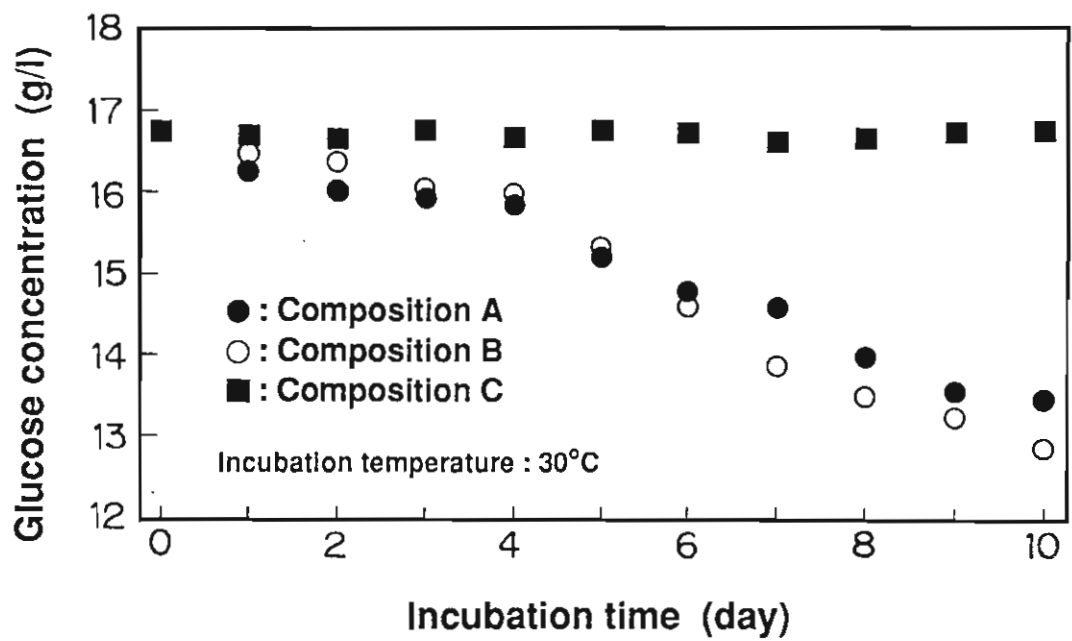


Fig.4-13 固定化酵母を含むYEFD培地中のグルコース濃度の経時変化

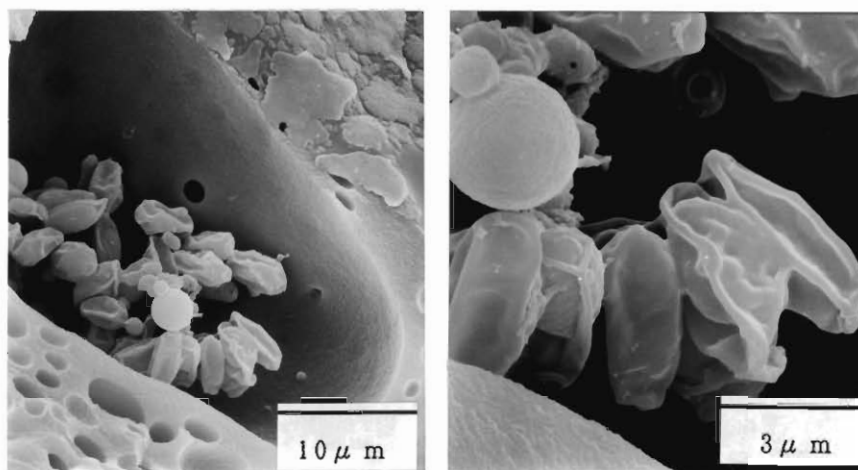


Fig.4-14 固定化酵母のSEM像

§ 4 小括

以上の実験結果からTMOS－塩酸系及びTMOS－PEG系を用いたゾルーゲル法による多孔質ガラスの作成に関して次の知見を得た。

- 1) TMOS－塩酸系において出発溶液中のメタノール量を変化させることにより、細孔径が約1000～約10000 Åの絡み合い構造を持つ多孔体が得られることがわかった。
- 2) TMOS－PEG系において出発溶液組成（PEG濃度及び分子量，H₂O濃度，H₂SO₄濃度）を変化させることにより、生成する多孔性ゲルの細孔径を約0.1 μ mから約10 μ mの広い範囲で制御することが可能であることがわかった。
- 3) 得られた多孔性ゲルのTG／DTA測定を行ったところ、PEGの燃焼によると思われる発熱が観察され、多孔性ゲル中のPEGは完全には溶出しておらず、SiO₂骨格に結合し残留している可能性があることがわかった。

また、TMOS－PEG系ゾル溶液を用いたゾルーゲル法による微生物の包括固定に関して次の知見を得た

- 4) TMOS－PEG系の多孔質ゲル作成の過程において酵母を孢子状態で包括固定し、固定化後培地中で酵母を発芽させることにより、酵母を活性な状態で多孔質ゲル中に包括固定することが可能であることがわかった。

参考文献

- 1) 作花 済夫 : ゼルーゲル法の化学 (アグネ承風社)
- 2) 牧島 亮男 : 機能性ガラス入門 (アグネ)
- 3) A. Makishima and T. Tani : J. Am. Ceram. Soc., 69(1986)C72-4
- 4) D. Levy, S. Einhorn and D. Avnir : J. Non-Cryst. Solids, 113(1989)137-145
- 5) 那須 弘行 : セラミックデータブック, (1990)315-320
- 6) H. Kozuka and S. Sakka : Chem. Lett., (1987)1791-1794
- 7) 梶 弘典, 中西 和樹, 曾我 直弘 : 日本セラミックス協会 1990年年会講演予稿集 P. 555
- 8) K. Nakanishi, Y. Sagawa and N. Soga : J. Non-Cryst. Solids., 134(1991)39-46
- 9) K. Nakanishi, N. Soga : J. Am. Ceram. Soc., 74(1991)2518-30
- 10) 小村 浩史, 中西 和樹, 曾我 直弘 : 日本セラミックス協会 1989年第2回シンポジウム講演予稿集 P. 238
- 11) 千畑 一郎 編 : 固定化生体触媒 (講談社)
- 12) M. Wada, J. Kato and I. Chibata : J. Ferment. Technol., 58(1980)327
- 13) M. Kierstan and C. Bucke : Biotechnol. Bioeng., 16(1977)387
- 14) K. K. Bandyopadhyay and T. K. Ghose : Biotechnol. Bioeng., 24(1982)805-15
- 15) 岩崎 賢一, 上野 信幸 : 日本セラミックス協会学術論文誌, 98(1990)P. 1186
- 16) G. Carturan, R. Campositrini, S. Dire, V. Scandi and E. De. Alteriis : J. Mol. Catal., 57(1989)L13-L16
- 17) 柳島 直彦 : 酵母の生物学 (東京大学出版会)
- 18) 西山 隆造 : 応用微生物の基礎知識 (オーム社)
- 19) 微生物研究法懇談会 (編) : 微生物学実験法 (講談社)
- 20) 大田 陸夫, 渡辺 厚志, 福永 二郎, 吉田 直次郎 : 日本セラミックス協会学術論文誌, 97(1989) P. 213

第 5 章

結 言

本研究においては生体触媒の固定化に適した多孔質ガラスを作成し、生体触媒として酵素及び微生物の固定化を行い、各々について以下の知見を得た。

第 2 章においては多孔質ガラスの代表的な作成法であるソーダボロシリケートガラスの分相溶出による方法について、PPG型と呼ばれる $10\text{Na}_2\text{O}\cdot 50\text{B}_2\text{O}_3\cdot 40\text{SiO}_2$ (wt%) 組成においてハロゲンの添加が本組成のガラスの分相及び溶出過程に及ぼす影響について検討し、以下の知見を得た。

1) $10\text{Na}_2\text{O}\cdot 50\text{B}_2\text{O}_3\cdot 40\text{SiO}_2$ 組成に F, Cl, Br を添加した原ガラスより鋭い細孔分布を持つ多孔質ガラスが得られた。熱処理温度を 500°C から 600°C の間で、熱処理時間を 24 時間から 240 時間の間で変化させることにより、得られる多孔質ガラスの細孔径を約 $300\text{ \AA}$ ～ $2500\text{ \AA}$ の範囲で制御し得ることが分かった。

2) ハロゲンを添加することにより、分相が促進され、ハロゲンを添加しない場合に比べ同じ熱処理条件で大きな細孔構造を持つ多孔質ガラスが得られた。ハロゲンによる分相の促進はふっ素及び塩素の場合に特に効果がみられた。

3) ハロゲンを添加した試料の不混和温度はふっ素の添加により数 $^\circ\text{C}$ 、塩素、臭素の添加により約 30°C 上昇することが分かった。

4) ハロゲンの添加により熱水溶出処理に要する時間を短縮できることが判明した。その効果は塩素を添加した場合に強く、塩素を 0.88wt% 添加した試料ではハロゲンを含まない試料の $1/2$ 以下の時間で溶出処理が完了した。またハロゲンによる溶出時間の短縮は添加されたハロゲンが可溶出相である $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3$ 相に存在し、 $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3$ 相の熱水への溶解速度が増加することによることが分かった。

即ち、原ガラスへのハロゲンの添加は分相・溶出の両過程を促進し、多孔質ガラスの製造に有効であることが分かった。

第 3 章においては水銀還元酵素を第 2 章で検討した PPG 型多孔質ガラスに種々の方法で固定化し、固定化水銀還元酵素について以下の知見を得た。

1) 固定化酵素量はグルタルアルデヒドで活性化した多孔質ガラス、及びアリルアミノ誘導体に固定化した場合に高いことが分かった。固定化酵素活性の点では、多孔質ガラスのアリルアミノ誘導体及びカルボキシル誘導体に水銀還元酵素を固定した場合に特に活性が高く、両者とも溶液状態の酵素の20%以上の活性を示した。また細孔径が大きいほど見かけの酵素活性が上昇する傾向が見られた。

2) 多孔質ガラスのアリルアミノ誘導体及びカルボキシル誘導体に固定化した水銀還元酵素の最適pHは7.5で、溶液状態の同酵素の最適pH (7.0~7.2) よりややアルカリ側にシフトすることがわかった。

3) 固定化酵素の30℃における活性の経時変化を測定した結果、カルボキシル誘導体に固定化した場合には約1週間で失活したが、アリルアミノ誘導体に固定化した場合、30℃で29日間保持した後にも酵素活性の低下は見られず、固定化によって酵素が安定化することがわかった。

4) 以上の結果から多孔質ガラスに水銀還元酵素を固定化する場合には、アリルアミノ誘導体にアゾ結合により固定化する方法が酵素活性、安定性とも優れていることが分かった。

また、水銀還元酵素を用いてフローシステムにより水銀センサーを作製し、以下の知見を得た。

1) 多孔質ガラスのアリルアミノ誘導体に固定化した水銀還元酵素を用いて作製した水銀センサーにより0.5 μ M (0.1ppmHg) 以上の水銀が測定可能であった。また、カタラーゼによる酵素サイクリング法を用いることにより感度を向上させることが可能であり、0.03 μ M (6ppbHg) 以上の水銀イオンを検出可能であることが分かった。

2) 本水銀センサーは Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ag^{+} 以外のイオンに対しては充分な選択性を有していることがわかった。

3) 水銀の一般的な分析法である冷原子吸光法と比較して、測定限界は原子吸光法と比較して十倍程度であるが、試料量が5ml程度と少ないため水銀量として同等の感度が得られることが分かった。

第4章においては多孔質シリカの新しい作成法として注目されているゾルーゲル法において、TMOS-塩酸系及びTMOS-PEG系を用いたゾルーゲル法による多孔質ガラスの作成法とゾルーゲル法による酵母の包括固定による固定化酵母の作成について以下の知見を得た。

1) TMOS-塩酸系において出発溶液中のメタノール量を変化させることにより、細孔径が約1000~約10000 Å の絡み合い構造を持つ多孔体を得られることがわかった。

2) TMOS-PEG系において出発溶液組成 (PEG濃度及び分子量, H_2O 濃度, H_2SO_4 濃度) を変化

させることにより、生成する多孔性ゲルの細孔径を約 $0.1\mu\text{m}$ から約 $10\mu\text{m}$ の広い範囲で制御することが可能であることがわかった。

3)得られた多孔性ゲルのTG/DTA測定を行ったところ、PEGの燃焼によると思われる発熱が観察され、多孔性ゲル中のPEGは完全には溶出しておらず、 SiO_2 骨格に結合し残留している可能性があることがわかった。

4)微生物に対する毒性の少ないと考えられるTMOS-PEG系ゾル溶液を用いたゾルーゲル法による微生物の包括固定に関しては、TMOS-PEG系の多孔質ゲル作成の過程において酵母を孢子状態で包括固定し、固定化後培地中で酵母を発芽させることにより、酵母を活性な状態で多孔質ゲル中に包括固定することが可能であることがわかった。

以上のように分相溶出法及びゾルーゲル法により合成された多孔質ガラスは、その細孔構造に応じて、酵素や微生物の固定化担体として利用可能であることが分かった。

謝 辞

本研究を行うに当たり、常に適切な御指導を賜りました牧島亮男教授、軽部征夫教授に心より感謝いたします。また、しばしば貴重な御助言を賜りました佐野信雄教授、佐久間健人教授、月橋文孝助教授に深く感謝いたします。研究を進めるに当たって常に相談にのって頂きました井上博之助手、森田一樹助手、しばしば有益な御助言を頂きました民谷栄一助教授、鈴木正康助手、遠藤英明博士、横山憲二博士、本論文第3章の共同研究者であり、酵素及び微生物に関する実験について御指導頂きました同和鉱業株式会社中央研究所の沼田雅彦氏、細孔分布測定において多大な協力を頂きました無機材質研究所の小谷和夫氏に深く感謝いたします。

さらに本論文第2章の共同研究者である山鹿勇次郎氏、第4章の共同研究者である山下恭子氏に感謝の意を表すとともに、本研究を行うに当たって協力して下さいました曾我公平氏をはじめとする牧島研究室の皆様に厚く御礼申し上げます。

1991年12月20日

宇尾 基弘