酵素固定化用担体としてのテトラエトキシシランの ゲル状ガラス粒子の調製

(1983 年 6 月 1 日 受 理)

柄 谷 肇*・水 口 博 義・岡 正 太 郎

金属アルコキシドの一種であるテトラエトキシシランを加水分解して得られるゲル状化合物^{1)~4)}は通常のシリカゲルよりシラノール基の密度が大きく、酵素の固定化用担体として好適な特徴を有することを見いだした。とくにこの化合物のシラノール基を部分的にフッ素で置換したものはシラノール基の反応性、比表面積などの点で未置換のものより勝っており、酵素の固定化用担体としてすぐれた性能を有することがわかった。

ESCA による組成分析から、得られた化合物は含フッ素化合物であること、また、SEM による表面観察では多孔性であることが確かめられた。この含フッ素化合物 (120~200 メッシュ) を担体とし、共有結合法でグルコースオキシダーゼを固定化した。固定化酵素の活性は、フッ素未置換のものを担体としたときにくらべて約 8 倍であり、市販アミノシラン化ガラスに同手法で固定化したものにくらべても 2 倍以上の活性を示した。この固定化酵素は、 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pH 7 リン酸緩衝液中 4°C の保存条件下で、5 箇月以上経過後も初期の活性を維持した。

1 緒 言

最近、ガラス担体に固定化した酵素が、臨床検査^{5)~7)}、生化学などの分野における化学分析、あるいは工業用バイオリアクター⁸⁾などに応用されるようになってきた。

ガラス担体は剛性にすぐれ、細菌汚染による変質や変性が少なく、取り扱いが便利であるから、従来から広く用いられている有機系高分子の軟質担体より普及している。現在、通常のガラスを担体とする固定化酵素の製造は、ケイ酸ガラスの高温熔融、粉碎整形およびシラノール基の導入など複雑な過程を得たのち、カップリング試薬によって酵素を共有結合するという手法を用いている。しかし、従来法では、ガラス表面にシラノール基を導入させる操作が不可欠であり、しかも単位面積あたりのシラノール基の数が比較的少ない。したがって、酵素の固定量を多くして酵素活性を高くすることは困難である。

また、酵素固定化用担体としては多孔性で比表面積ができるだ

け大きいことが要求される。そのため、一般的にはガラスの表面をエッチングしたり、あるいはホウケイ酸ガラスを所望の大きさや形状に整形したのち、熱処理によって分相し、つづいて酸で可溶性相を溶出させて、多孔質ガラスを得ている⁹⁾が、これらの操作は複雑といわざるをえない。

著者らはテトラエトキシシランを加水分解して得られる三次元網状の高分子ゲル状化合物が比較的少量のシラノール基を含有していることに着目し、これを担体として簡便な前処理で少量の酵素を固定化できることを見いだした。さらに、このゲル状化合物を合成する過程で、適量のフッ化水素酸を作用させると、多孔性で表面積の大きい粒子が得られ、またシラノール基が部分的にフッ素で置換されるので、残存するシラノール基の反応性が高くなり、酵素の固定量がいちじるしく増大できることがわかったので報告する。

2 実 験

2.1 含フッ素ゲル状化合物の合成

テトラエトキシシランは和光純薬製特級試薬を用いた。その他の試薬はとくに指定しないかぎり市販特級試薬である。合成操作はつぎに示すとおりである。

室温において、テトラエトキシシラン 1 mol に対し、水、エタノールおよび 1 mol/l 塩酸(それぞれ 3.8, 3.6 および 0.28 mol)を順次混合し、はげしくかきまぜて均一なゾルにする。つぎにかきまぜをつづけながら、0.05 ないし 2.0 mol のフッ化水素酸を添加する。フッ化水素酸のモル数によってゲル化に要する時間が左右され、モル数が多いほどゲル化に要する時間は短くなる。

9) 近藤連一, “多孔材料”, 技報堂 (1973) p.265.

株式会社島津製作所中央研究所, 604 京都市中京区西ノ京桑原町

- 1) H. Dislich, *Angew. Chem.*, 83, 428(1971).
- 2) S. Sakka, K. Kamiya, *J. Non-Cryst. Solids*, 42, 403 (1980).
- 3) 神谷寛一, 作花済夫, 水谷通利, 窯協, 86, 552(1978).
- 4) 牧島亮男, 鉱物学雑誌, 14, 86(1980).
- 5) H. J. Kung, M. Stastny, *Clin. Chem.*, 20, 1018(1974).
- 6) J. Endo, M. Tabata, S. Okada, *Clin. Chim. Acta*, 95, 411(1979).
- 7) T. Murachi, Y. Sakaguchi, M. Tabata, M. Sugahara, S. Endo, *Biochimie*, 62, 581(1980).
- 8) G. W. Strandberg, K. L. Smiley, *Biotechnol. Bioeng.*, 14, 509(1972).

Fig. 1 ESCA spectrum of the partially fluorinated gel-like glass

HF/Si(OC₂H₅)₄=0.1(mole ratio at preparation), Scan speed : 1eV/s

(A) : Wide scan spectrum of the bulk state sample after Ar etched under vacuum

(B) : Extension of the each peak

a : Bulk state sample, b : Powder state sample

i : Immediately after reached vacuum, ii : After Ar etched

0.05 mol のフッ化水素酸を添加した場合、ゲル化時間は約1時間、2.0 mol で約1分であった。フッ化水素酸を添加しなくともゲル化は起こるが、それに要する時間は長く、数日間を要した。

つづいて、得られたゲル状物を 80°C の油浴上に置き、加水分解反応で生成したエタノール、水および残存する塩酸や未反応のフッ化水素酸を蒸発させ、多孔性ゲル状化合物を得た。これを粉碎、ふるいわけすることにより目的とする粒径の担体を得た。この担体を 300°C の電気炉で3時間熱処理し、残存するエタノールや酸などの不純物を完全に除去した。

2.2 アミノシランの導入

5 vol% の (3-アミノプロピル)トリエトキシシラン (以下 γ -APTES と略記する) (Aldrich 製, 特級試薬) 水溶液を 6 mol/l 塩酸で pH を 3 ないし 4 に調整し、この溶液をかきまぜながら、100 ml に対し含フッ素ゲル状化合物 5g の割合で加えた。このときシラノール基の解離によって pH が 3 以下に低下するが、ふたたび γ -APTES を溶液に加えて pH が 3 ないし 4 にたもたれるように調整した。これを丸底フラスコに移し、85°C の油浴上でゆるやかにかきまぜながら2時間還流をつづけたのち、汙過した担体を集め、水およびアセトンで十分洗浄し、未反応のアミノシラン化剤を除去した。さらに 120°C で2時間乾燥したのち、使用時までデシケーター内で保存した。

2.3 グルコースオキシダーゼ (GOD) の固定化

GOD (EC 1.1.3.4) は東洋紡製の *Aspergillus niger* 由来の grade II (101 IU/mg) を用いた。固定化はアミノシラン化担体 1g に対し、1000 IU の GOD をグルタルアルデヒド (和光純薬製一級試薬) を介して、常法¹⁰⁾にしたがって固定化した。

2.4 固定化率と酵素活性の測定

固定化率は固定化前の酵素溶液と固定化後の酵素溶液のタンパク量の差を Lowry 法¹¹⁾で求めて決定した。

活性の測定は β -D(+)-グルコース (半井化学製, 特級試薬)

を、0.1 mol $\cdot$ dm⁻³, pH 7 リン酸緩衝液に溶解して標準試験液とした。グルコースの濃度は 300 mg/dl (17 mmol $\cdot$ dm⁻³) である。固定化酵素 1g を標準試験液 11 ml とともに 28°C で5分間かきまぜ、メンブレンフィルターで汙過後、汙液の 10 ml を採取し、この汙液中の過酸化水素を滴水銀電極によるポーラログラフィー ($E_{1/2} = -0.85$ V vs. SSE) で測定し、活性を求めた。すなわち、グルコースは(1)式のように反応して過酸化水素を生成する。

したがって本法によって固定化された酵素の活性を、生成した過酸化水素の濃度から算出することができる。

2.5 物性評価のための機器

合成で得た化合物の物性は、ESCA, SEM, BET 法による比表面積測定および熱重量分析により評価した。ESCAによる表面化学分析は島津製 X 線光電子分析装置 ESCA 750 を用いて、化合物表面の組成や化学結合状態を評価した。表面からの厚さが 0 ないし 20 Å ぐらいの層については、直接 ESCA を観測した。さらに深部の観測には、アルゴンイオンビームで表面層を少しずつ削り取る手段を併用して 2000 Å ぐらいまでの層の詳細な組成分布を検討した。SEM による表面観察は島津製走査型電子顕微鏡 ASM-SX を使用した。表面観察法は試料を傾斜 (横 45°) する方法を採用した。熱重量分析は島津製熱重量分析装置 DT-30 を用いて、昇温速度 10°C/min で室温から 600°C までの温度範囲で行なった。比表面積の測定は島津製比表面積自動測定装置 2200-02 を用いて、BET の低温ガス吸着法 (1点法) で求めた。吸着ガスには窒素ガスを採用した。

3 結果と考察

3.1 物性評価

3.1.1 ESCA による評価: 図 1-(A) は真空度 8×10^{-6} Torr で塊状試料をアルゴンエッチング後、ワイドスキャンで調べた結

10) H. H. Weetall, *Methods Enzymol.*, 44, 134(1976).

11) 日本生化学会編, “生化学実験講座 5 酵素研究法 (上)”, 東京化学同人 (1975) p.27.

Table 1 The ratio of F_{1s} peak intensity against Si_{2p} peak intensity

Sample	F_{1s} measurement (eV)	Si_{2p} measurement (eV)	F_{1s}/Si_{2p}
Bulk	689.0	105.5	0.36
Powder	689.5	105.5	0.47

Fig. 2 SEM photographs of gel-like glass surface ($\times 20000$)

(A): Without HF, (B): $R=0.2$, (C): $R=1.0$
 $R=HF/Si(OC_2H_5)_4$, (mole ratio at preparation)

果である。これによって、フッ素の $1s$ 電子を検出し、共有結合しているフッ素の存在を確認した。分析条件はターゲット・マグネシウム、加速電圧 8 kV およびフィラメントは 30 mA であった。図1に現われているピークの結合エネルギーは、真の結合エネルギーのほかに化学結合による化学シフト、帯電によるシフト、測定誤差が含まれているので、それらを別々に求めて補正し、真の結合エネルギーを決定した。

また、図1-(B)はフッ素 $1s$ 、酸素 $1s$ 、炭素 $1s$ 、ケイ素 $2s$ およびケイ素 $2p$ 電子の拡大ピークを個々に調べた結果である。a は塊状試料、b は粒径が 200 メッシュ パスの粉末試料である。i は真空到達 ($8 \times 10^{-6}\text{ Torr}$) 直後に測定、ii は i を測定後アルゴンエッチングして測定した結果である。アルゴンエッチング条件は加速電圧 2 kV 、エミッション 30 mA 、時間は 15 分 間であった。

図1から明らかなようにアルゴンエッチング後もフッ素のピークは検出され、フッ素は表面だけではなく内部にも存在していることが確認された。図1においてアルゴンエッチング前に観察された炭素 $1s$ 電子ピークはゲル状化合物調整中に有機物が入り込まれたことが原因であると考えられる。また、a-iiにおいて炭素 $1s$ 電子のピーク強度が増大しているが、これはアルゴンエッチングにより炭素で汚染された層がその表面に形成されたためと考えられる。とくに炭素で汚染された層は a-ii においてフッ素 $1s$ 電子ピーク強度の低下の原因となったと考えられる。

図1において、ピーク強度は、それらの成分の含有量に比例すると考えられ、フッ素 $1s$ とケイ素 $2p$ 電子のピーク強度の比を計算すると表1のようにまとめられる。この数値はテトラエトキシシランとフッ化水素酸のモル比が 0.1 の場合である。これらの結果から、粉末試料の方が塊状試料よりもやや大きい値が得られたが大差はなくフッ素は表面だけでなく母体の中まで存在しているといえる。

表面のみにフッ素が含有されているとすれば、粉碎試料では粉碎面が増大するためフッ素 $1s$ /ケイ素 $2p$ のピーク強度比は減

少するはずであるにもかかわらず粉碎試料でピーク強度比は少しではあるが大きくなっている。また、アルゴンエッチングはかなり強力であるにもかかわらずフッ素 $1s$ ピークが消えていない。これらの考察から、得られた化合物は表面のみならず化合物全体が一種の含フッ素化合物であると判断できる。

3.1.2 SEM による評価：図2にゲル状ガラス表面の SEM 写真を示した。A はフッ素を置換導入しなかったものの SEM 写真である。B および C はフッ化水素酸のモル比が、それぞれ 0.2 および 1.0 で得られたものの SEM 写真である。これらの SEM 写真からフッ素を置換導入したものの方がその表面構造ははるかに複雑であることが明らかになった。フッ化水素酸の量と多孔度の関係はまだ定量的に把握していないが、合成時のフッ化水素酸のモル比によって、多孔度に変化をもたせることも可能であることがわかった。

3.1.3 熱重量分析：一般にシラノール基には孤立型シラノールと近接型シラノールが存在し、近接型シラノールは 200°C 以上 400°C 以下の加熱でもシロキサン結合を形成するが、孤立型シラノールは 600°C 以上加熱しなければシロキサン型にならないことが知られている¹²⁾。孤立型シラノールでは吸着水分量が少なく、立体的な規制も小さいので、近接型シラノールより孤立型シラノールは、カップリング試薬が導入しやすく、酵素の固定化に適していると考えられる。

そこで、本法で得られたゲル状化合物のシラノール基が孤立型か近接型であるのかを考察するため、吸着水分量、水分の放出温度範囲、あるいはシラノール基の縮合に関する知見を熱重量分析法を用いて実験的に検討した。

図3は種々のゲル状化合物の熱重量分析を行なった結果を示す。また、表2に各温度における質量の減少率を示した。質量の減少は、吸着水の放出およびシラノール基の縮合で生成する水の放出による。図3における 100°C 付近の吸熱ピークは吸着水の放

12) 奥山典生, 真鍋 敬, “巨大粒子のゲルパーミューションクロマトグラフィー”, 喜多見書房 (1980) p.85.

Table 2 The ratio(%) of decrease in mass at various temperature(°C)

Sample	Temp. (°C)					
	100	200	300	400	500	600
Without fluorinated	7.7	12.3	15.0	15.7	17.3	22.7
HF/Si(OC ₂ H ₅) ₄ =0.2	2.3	2.6	2.8	3.1	3.7	4.6
HF/Si(OC ₂ H ₅) ₄ =1.0	0.0	0.0	0.2	0.5	1.5	3.3

Fig. 3 Thermogravimetric (TG) and differential thermogravimetric (DTG) curves of gel-like glass without heat treatment at 300°C

- A: Partially fluorinated (HF/Si(OC₂H₅)₄=1, mole ratio at preparation)
 B: Partially fluorinated (HF/Si(OC₂H₅)₄=0.2, mole ratio at preparation)
 C: Not fluorinated

出によるものである。吸熱ピークの大きさはフッ素の割合が大きくなるほど逆に小さくなるのが観察される。これはゲル状化合物の吸着水分量に依存しており、フッ素置換量と吸着水分量は逆比例の関係にあるものと思われる。また、フッ素を置換導入しなかった化合物では100ないし250°Cに2個のなだらかな吸熱ピークが見られるが、この温度範囲ですでにシラノール基の縮合が生じているものと思われ、この傾向はフッ素置換量が大きいほど観察されにくくなる。シラノール基の縮合による吸熱ピークは400°C以降にも観察され、フッ素置換体ではこの付近のピークは比較的大きい。以上の結果から、フッ素置換体のシラノール基は孤立型が比較的優勢であると思われる。

表2によればテトラエトキシシランに対するフッ化水素酸の割合が1.0のとき加熱による水分減少率は非常に小さいことがわかる。すなわちシラノール基の孤立型がより優勢となるが、逆にシラノール基の数が大きく減少するため酵素の固定化ではかえって好ましくない。

3.1.4 固定化酵素の活性評価: 図4はテトラキシンランに対するフッ化水素酸の割合を種々変化させて得た担体に GOD を固定化し、 β -D(+)-グルコース濃度が 17 mmol $\cdot$ dm⁻³ (300 mg/dl) のときの比活性を調べたものである。ここで市販の酵素固定化用アミノアルキル化ガラス (Electro-Nucleonics 製, Aminopropyl-CPG, 粒径 120~200 メッシュ, 平均孔径 550 Å, 比表面

Fig. 4 Comparison of the activity of the immobilized glucose oxidase onto gel-like glass particulates (120~200 mesh), which was partially fluorinated

積 43 m²/g) に同一条件下で GOD を固定化したときの酵素活性を1とした。フッ化水素酸のテトラエトキシシランに対するモル比に対して酵素活性をプロットした場合、極大値をもつ二次曲線が得られた。

表3にそれぞれの担体 1g に対して GOD 10mg を固定化したときの固定化量, GOD 固定化担体 1g あたりの活性および固定化された GOD 1mg あたりの活性を示す。活性は市販担体の場合を1として求めた比活性である。GOD 固定化前の担体を固定化担体と同様に活性を評価し、それが0であることを確認した。また市販担体に固定化された GOD は 8.0mg であった。表3から、固定化された GOD 1mg あたりの活性はフッ素を部分的に置換導入して得た担体のときが、他のものに比べておよそ1.7倍大きいことがわかる。このことからフッ素を部分的に導入して得た担体では、活性が発現されやすい状態で GOD が固定化されているのではないかと考えられる。また固定化量が合成時のフッ化水素酸の量に大きく影響されることから、フッ化水素酸の量も重要な因子となることがわかる。

置換導入されたフッ素の効果として、結果的に孤立型が優勢なシラノール基を有する担体となること、またその電子求引性の誘起効果によってシラノール基の反応性が増大し、アミノシラン化剤などのカップリング試薬の導入が容易に行なわれることが考えられるが、その他の効果については検討中である。

3.2 多孔性組織の生成と比表面積

本法によって得られた固定化酵素の高い活性には、担体の特性が大きく寄与していると思われる。その要因のひとつとして、粒状担体の微細な多孔性構造があげられるが、これはテトラエトキシシランが加水分解してゲル状になる反応の速度に関与していると考えられる。したがって、その過程で添加されたフッ化水素酸

Table 3 Comparison of the quantity of the immobilized GOD, the ratio of activity per 1g of each carrier, which was immobilized GOD and per 1mg of immobilized GOD

Carrier, HF/Si(OC ₂ H ₅) ₄ (mole ratio at preparation)	Quantity of immobilized GOD (mg)	Ratio of the activity per 1g of each carrier	Ratio of the activity per 1mg of immobilized GOD
0	2.0	0.24	0.96
0.1	4.5	0.96	1.70
0.2	9.5	2.13	1.79
0.5	7.2	1.52	1.69

Table 4 Surface area of the gel-like glass carrier after aminosilanized (120~200 mesh)

Carrier, HF/Si(OC ₂ H ₅) ₄ (mole ratio at preparation)	0	0.1	0.2	0.5	1.0
Surface area (m ² /g)	304	501	355	205	116

が、多孔質の網状構造や細孔径の決定に寄与していると思われる。すなわち、既述のようにフッ化水素酸の添加は加水分解速度を左右し、比較的急速な加水分解によって、ゲル化がすすむ過程で生成したエタノールが残存する水や酸などとともにゲル化合物の内部に閉じ込められてしまい、後続する熱処理の過程で微細な多数の貫通孔を内部に残して逸散するために多孔性構造が生成するものと思われる。しかも、微細孔の広い表面積に既述のようなシラノール基が多数存在するために酵素の固定化率が高まるものと考察される。表4にアミノシラン化担体の比表面積を示す。

表4から、フッ化水素酸を用いて調製した担体ではそのモル比が大きくなると、比表面積は逆に小さくなることが観察される。表3に示した固定化された酵素量および固定化酵素の活性と比表面積との間に明確な相関は観察されないが、これには比表面積とともに置換導入されるフッ素の化学的な効果や細孔径についても考慮しなければならず検討中である。

3.3 担体の剛性

固定化酵素はカラムタイプで用いられることが多い。たとえば臨床検査用として連続流動方式の自動分析計に組み込まれたり^{6)13)~17)}、あるいは高速液体クロマトグラフィーのポストカラムとしての役割をになう¹⁸⁾¹⁹⁾。これらの通液系では固定化酵素に

わずかながらも圧力が掛かるので、担体の圧縮強度や固定化酵素に対する圧力の影響についても考慮しなければならない。粒径が120~200メッシュの固定化酵素をステンレススチールカラム(2mm i.d.×50mm)に充填し、0.6 ml/minの流速で0.5 mol·dm⁻³ pH 8 トリス-塩酸緩衝液を200時間以上通液したが、流速の変動および活性の失活は観察されなかった。すなわち、有機系高分子担体でとくに大きな問題となる圧縮強度についても問題となることはなかった。

石油化学への実用化研究なども行なわれているが²⁰⁾²¹⁾、これらの工業的な目的にも比較的簡便な操作で酵素を固定できる本法の担体が有利に適用できるものと思われる。

終りに本研究を行なうにあたり、実験の一部に御協力いただいた株式会社島津製作所技術研究本部試験センターの木村章三、藤原稔三両氏に謝意を表します。

- 13) H. J. Kunz, M. Stastny, *Clin. Chem.*, 20, 1018(1974).
- 14) J. N. Miller, B. F. Rocksand, D. T. Burns, *Anal. Chim. Acta*, 86, 93(1976).
- 15) J. N. Miller, B. F. Rocksand, D. T. Burns, *ibid.*, 93, 353(1977).
- 16) G. Johansson, L. Ogren, *ibid.*, 84, 23(1976).
- 17) L. D. Bowers, L. M. Canning, Jr., C. N. Sayers, P. W. Carr, *Clin. Chem.*, 22, 1314(1976).
- 18) K. Arisue, Z. Ogawa, K. Kohda, C. Hayashi, Y. Ishida, *Jpn. J. Clin. Chem.*, 9, 104(1980).
- 19) 長 敏夫, 吉田 滋, 広瀬信吾, 分析化学, 32, 6(1982).
- 20) S. L. Neidleman, *Hydrocarbon Process.*, 59, 135(1980).
- 21) 古橋敬三, 発酵と工業, 39, 1029(1981).

Preparation of Gel-like Glass Particulates from Tetraethoxysilane as a Carrier for Immobilization of Enzymes

Hajime KARATANI*, Hiroyoshi MINAKUCHI and Syotaro OKA

Central Research Laboratory, Shimadzu Corporation; Nishinokyo-kuwabaracho, Nakagyo-ku, Kyoto-shi 604 Japan

A gel-like glass material was prepared as a carrier for immobilization of enzyme by the hydrolysis of tetraethoxysilane. This material has a considerable amount of silanol group on its surface and can effectively fix many kinds of enzymes rather than the conventional amino-alkyl glass or silica gels. Furthermore, a chemical treatment, which was partially substituting the silanol groups on their surfaces for fluoride, brought an excellent capability as a carrier for immobilization of enzymes. According to the results of surface analyses using SEM and ESCA, it was confirmed that each particulate of the gel-like glass material (120~200 mesh) had a small porous surface and contained covalently bonded oxygen, silicon, fluoride and the

silanol groups.

After these particulates were aminosilanized by refluxing for 2 hours at 80°C with aqueous solution of (3-aminopropyl)triethoxysilane (pH 3~4), glucose oxidase was immobilized on their surfaces by coupling *via* glutaraldehyde. The activity of the immobilized glucose oxidase was about two times higher than that of the commercial available aminoalkyl glass at the same conditions. The immobilized glucose oxidase, fixed on this material, was able to be used effectively for the glucose determination. It maintained almost the same activities even after the storage of more than five months in 0.1 mol·dm⁻³-phosphate buffer solution (pH 7.0) at 4°C.