

架橋剤を利用したセンサー機能材料担持シートの作製

—酵素のセルロースへの担持条件の最適化—

八塚 愛実*¹ 大橋 俊平Production of sensing material-supported sheet using cross-linking agent
-Optimization of enzyme-supporting condition to cellulose-

YATSUZUKA Manami and OHASHI Syunpei

近年、紙を基板に用いたマイクロ流体センサーチップが注目を集めており、研究が盛んに行われている。尿試験紙等の現状の紙基板センサーは、センサー材料が固定化されていないため精度が低いという課題が存在する。そこで、架橋剤である塩化シアヌル、グルタルアルデヒドを利用して、センサー機能材料の1つである酵素のセルロース繊維への担持条件の検討を行ったところ、5%(w/w)水酸化ナトリウム処理により塩化シアヌルを結合させ、さらにグルタルアルデヒドを添加したものが最も酵素担持量が多くなることがわかった。

キーワード：機能紙、酵素、センサー、架橋剤

はじめに

近年、機能性を有する紙の開発が盛んに行われており、またその中でも、紙を基板に用いたマイクロ流体センサーチップについて特に注目が集まっている¹⁾²⁾。マイクロ流体センサーチップとは、ごく少量(数 μ l)の試料で定量分析や多項目の診断が可能なデバイスであり、途上国における医療診断や環境測定用途を想定し、開発が進められている。尿試験紙等、紙を基板に用いたセンサーはすでに存在するが、試料(尿、血液等)の必要量が多いことや、酵素や色素等のセンサー機能材料は紙に浸み込んでいるだけであり、試料液中への漏出等が起きるため、精度が低く半定量しか行えないといった課題を有している²⁾。また、紙を基板とするマイクロ流体センサーチップの精度を高めるため、紙上における流路形成技術に関する研究¹⁾²⁾は多く行われているものの、機能性材料の漏出防止等に関する研究はあまり行われていない。

一方、塩化シアヌルは、現在セルロース繊維の染色に主に用いられている反応染料の反応基の基本構造であり³⁾、セルロースの表面活性化剤として古くから研究されている³⁾⁴⁾。また、グルタルアルデヒドについては、タンパク質の分子間架橋を形成させる性質を有していることが知られている⁵⁾⁶⁾。本研究では、これら2種を架橋剤として利用し、センサー機能を有する材料である酵素と紙を結合させることによる漏出の少ない担持方法の検討を行ったので報告する。

実験方法

1. 実験試料

基材として用いるセルロース繊維として定性ろ紙(アドバンテック東洋(株) No.131)を用いた。架橋剤には塩化シアヌル(和光純薬工業(株)、以下 CyCl) および 25%(w/w)グルタルアルデヒド溶液(和光純薬工業(株)、以下 GA)、センサー機能を有するモデル材料としてカタラーゼ、ウシ肝臓由来(和光純薬工業(株))を使用した。その他試薬についてはすべて試薬特級のものを使用した。

2. 架橋剤(CyCl)結合試験および結合量の評価

(1) 架橋剤(CyCl)結合試験

* 1 (現)繊維産業技術センター

この研究は、「架橋剤を利用したセンサー機能を有するシートの開発」の予算(紙産業技術センター)で実施した。

セルロースと CyCl の反応および CyCl が結合したセルロースとカタラーゼの反応をそれぞれ図 1、2 に示す。

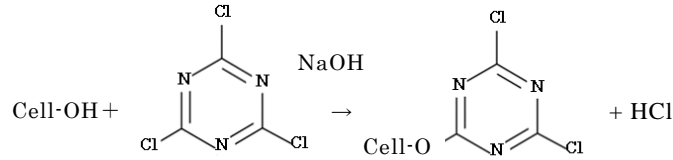


図 1 CyCl とセルロースの反応

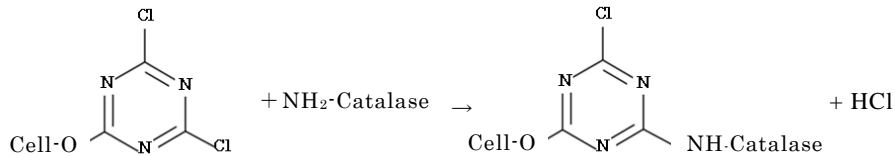


図 2 CyCl 結合セルロースとカタラーゼの反応

セルロース中の水酸基が CyCl の複素環を求核攻撃することによって置換反応が起き、セルロースと CyCl が結合する。セルロースと結合した CyCl は、アミノ基や水酸基等の求核剤とさらに反応し、これによりカタラーゼが担持される。

架橋剤 (CyCl) の結合は、定性ろ紙 1 g を 5～15%(w/w)の水酸化ナトリウム水溶液 (以下 NaOH と表記) 20ml に 15 分間浸漬させたのちに、5%(w/v)CyCl/アセトン溶液 20ml に浸漬時間を 5～60 分と変化させ、反応させた。反応終了後、アセトンで 2 回洗浄、蒸留水で pH がほぼ中性になるまで洗浄した。最後にアセトンで洗浄し、室温にて乾燥させた。

(2) 架橋剤(CyCl)結合量評価

(1)で得られた試料について、フーリエ変換赤外分光光度計 (サーモフィッシャーサイエンティフィック(株) Nicolet 6700、以下 FT-IR) および低真空走査型電子顕微鏡 (日本電子(株) JSM-5510LV、元素分析部: アメテック(株) EDAX Genesis、以下 SEM-EDS) による測定を実施し、CyCl が結合されているかどうか確認を行った。

さらに、アミノ基を有する酸性染料 (C.I. Acid Red 37) を用いた染色試験により担持量評価を行った。染料の染着量は、紫外可視分光光度計 (日本分光(株) V-570) を用いて反射率 R を測定し、Kubelka-Munk 関数 $K/S = (1-R)^2/2R$ により K/S 値を求めることで評価した (K: 媒体の吸収係数 S: 散乱係数)。

3. 機能的材料担持試験

2. において各条件で得られた CyCl 結合ろ紙について、機能的材料であるカタラーゼの担持試験を常法により実施した⁵⁾⁶⁾。試験については、GA 未添加の系と添加の系について行った。それぞれの系におけるカタラーゼ担持模式図を下に示す (図 3、4)。未添加の系については、4 mg/ml カタラーゼ水溶液 (pH 4～7 の緩衝液に溶解) 15ml に CyCl 結合ろ紙 0.6g を浸漬させ、25℃下において 24 時間振とうし、反応させた。また、添加系については、未添加系と同条件で試験を開始し、2 時間後に 25%(w/w)GA 溶液を 150 μl 加え、さらに 22 時間反応させた。

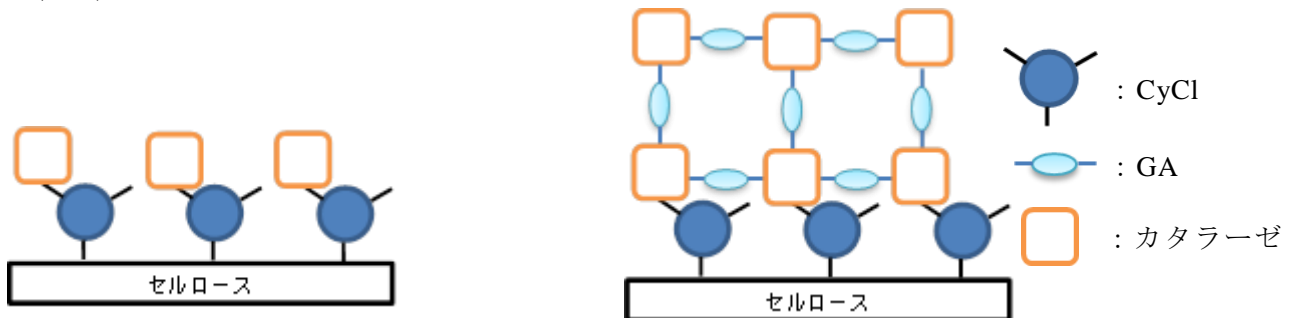


図 3 GA 未添加系カタラーゼ担持模式図 図 4 GA 添加系カタラーゼ担持模式図

4. 機能的材料担持量評価および機能的性評価

3. で得られた機能的材料担持ろ紙について、機能的材料の担持量および機能的性の評価を行った。

(1)カタラーゼ担持量評価

カタラーゼは鉄を含む酵素である。よって原子吸光分光光度計（(株)日立ハイテクノロジーズ Z-2000）により試料中の鉄を定量する方法⁶⁾により、試料に担持されているカタラーゼの定量を行った。

3. で得られた各試料 0.4g(風乾重量)に対し、有機物を分解するため以下の処理を行った。95%(w/w)硫酸 4ml で溶解し、黒色の粘度の高い溶液を得た。そこに 30%(w/w)過酸化水素溶液 3ml をゆっくりと滴下し、少し黄味がかかった透明の溶液を得た。これを 20ml に定容し、定量測定用の試料とした⁶⁾。

検量線作成のために鉄標準液（ナカライテスク(株)）を 0.25ppm、0.5ppm、1ppm に希釈し、カタラーゼ溶液は 0.5mg/ml、1.0mg/ml、1.5mg/ml のものを調製した。

また、超音波処理によるカタラーゼ脱着の影響を調べるために、各試料 0.4g（風乾重量）を 20ml の蒸留水に浸漬し、超音波洗浄機（BRANSON 製 B2200）を用い、室温にて 1 時間超音波洗浄を行った。蒸留水でさらに 2 回洗浄後、同様にカタラーゼの定量を行った。

(2)機能性評価

カタラーゼは次の反応を触媒する酵素である。 $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
セルロースへの担持により、この機能が失われていないか確認するために、以下の測定を実施した。

(a)カタラーゼ活性測定

3. で用いたカタラーゼの上記の反応における酵素活性を測定した⁷⁾。pH7 の 0.05mol/l リン酸緩衝液（以下 A 液）を用いて 30%(w/w)過酸化水素溶液を希釈し、およそ 0.2%(w/w)の過酸化水素溶液を得た（以下 B 液）。また、カタラーゼを同様に A 液で希釈し、0.008mg/ml 濃度の溶液を得た（以下 C 液）。室温下で、A 液 2.0ml に B 液 1.0ml を加えたものを対照とし、B 液 1.0ml に C 液 2.0ml を加え、240nm における吸光度の経時変化を測定し、1 分間当たりの吸光度変化を求めた。

(b)カタラーゼ担持ろ紙活性測定

3. で得られたカタラーゼ担持ろ紙のうち最もカタラーゼ担持量の多い試料について、活性を測定した。B 液を A 液で 3 倍希釈したもの 5.0ml に試料 10mg を添加し、240nm における吸光度の経時変化を測定し 1 分間当たりの吸光度変化を求めた。また、担持試験に用いた定性ろ紙についても同様に測定を実施した。

結果と考察

1. 架橋剤(CyCl)結合試験および結合量評価

CyCl は塩素を含むため、SEM-EDS により、CyCl を結合させた試料の塩素マッピングを行った。結果の一部を図 5 に示す。繊維上に粉体等の反応残留物等は見られず、塩素は繊維状に均一に分布していた。

浸漬させる NaOH 水溶液濃度を 5、12、15%(w/w)と変化させ、CyCl（CyCl 溶液浸漬時間 30 分）を結合させた試料の FT-IR 測定結果を図 6 に示す。5%NaOH 処理試料において、740~780 cm^{-1} 間に複数、1540 cm^{-1} 、1610 cm^{-1} 、1700 cm^{-1} の CyCl 由来のピークが観測された。NaOH 水溶液濃度が高くなると、

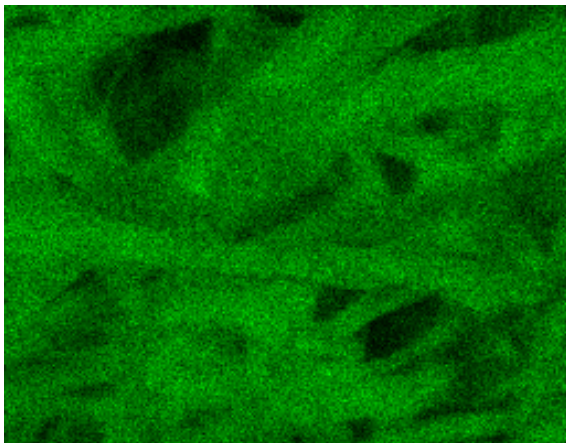


図 5 5%(w/w)NaOH 処理、CyCl 溶液浸漬時間 60 分 塩素マッピング結果

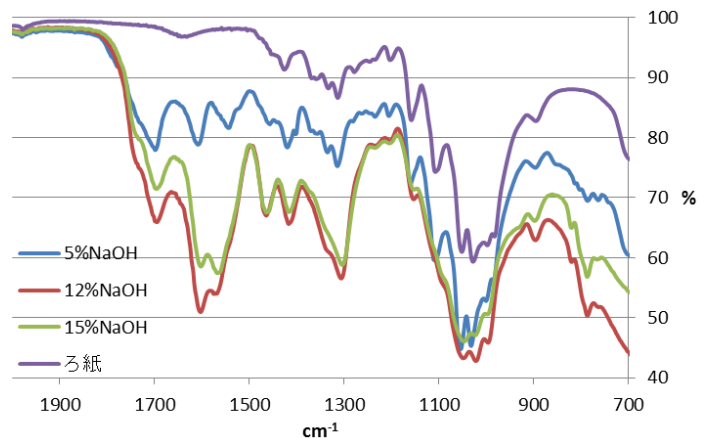


図 6 NaOH 濃度の CyCl 由来ピークへの影響

740~780 cm^{-1} 間に複数あったピークは、785 cm^{-1} と 820 cm^{-1} の 2 本のピークへと変化し、新たに 1450 cm^{-1} にピークが出現した。さらに、1540 cm^{-1} 、1610 cm^{-1} のピークの相対強度が大きくなったことから、NaOH 濃度が高くなるにつれ、CyCl 結合量は増加していると考えられる。

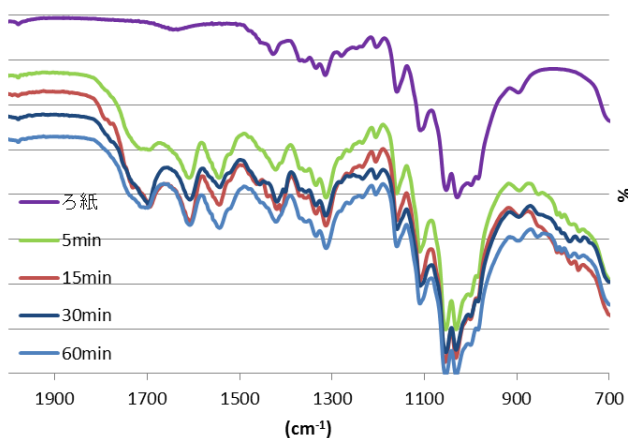


図 7 5 % (w/w) NaOH 水溶液処理試料の CyCl 溶液浸漬時間の FT-IR スペクトルへの影響

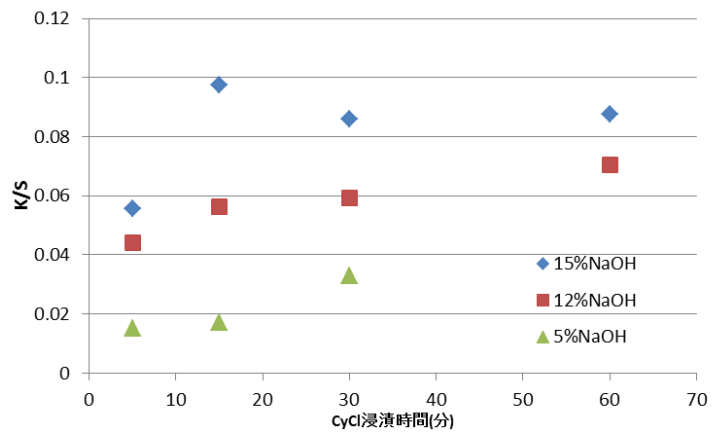


図 8 NaOH 濃度および CyCl 溶液浸漬時間の K/S への影響

NaOH 水溶液濃度変化に加え、CyCl 溶液への浸漬時間も変化させ、11 種類の試料を作製した。得られた CyCl 結合ろ紙について、FT-IR 測定及びアミノ基を有する酸性染料 (C.I. Acid Red 37) を用いた染色試験を行った。

FT-IR 測定結果の一部を図 7 に示す。5 % (w/w) NaOH 水溶液処理試料について、CyCl 溶液への浸漬時間を 5 分、15 分、30 分、60 分と変化させたところ、浸漬時間 5 分の試料について 1700 cm^{-1} のピークが比較的弱い様子が観察されたが、その他の CyCl 由来ピークについて大きな変化は見られなかった。その他の試料についても、柴田らによって報告³⁾されたような、CyCl 溶液処理時間を長くすることによる特定の CyCl 由来ピーク強度が低下する現象は確認されなかった。

酸性染料によって染色した各試料については、反射率 R を測定し、K/S 値を求めた (図 8)。酸性染料は、通常セルロースを染色できないものであるが、CyCl を結合させることにより、CyCl と染料中のアミノ基とが反応し、染色することが可能となる。K/S 値は色の濃さを表現する値であり、K/S 値が大きいほど色が濃い、つまり多くの染料を担持している、それゆえより多くの CyCl が結合されていると解釈できる。図 8 より、全体の傾向として、NaOH 濃度が高くなるに伴い、K/S 値も増加し、また、CyCl 溶液浸漬時間が長くなるにつれて、K/S 値も増加することがわかった。FT-IR 測定結果 (図 7) からは読み取れなかったが、NaOH 溶液濃度を高くし、CyCl 溶液浸漬時間を長くすれば、より多くの機能性材料を担持できる可能性があると考えられる。しかし 15% NaOH 処理試料については CyCl 浸漬時間 30 分と 60 分の K/S 値にほとんど差がないことから、30 分で CyCl の結合量は飽和していると推測される。

2. 機能性材料担持試験

作製した CyCl 結合ろ紙のうち、NaOH 濃度は 5、12、15% (w/w)、CyCl 溶液への浸漬時間 30 分の 3 種類を用い、pH 6 において、カタラーゼ担持試験を実施した。試験後の試料の写真の一部を示す。



写真 1 5 % NaOH GA 添加

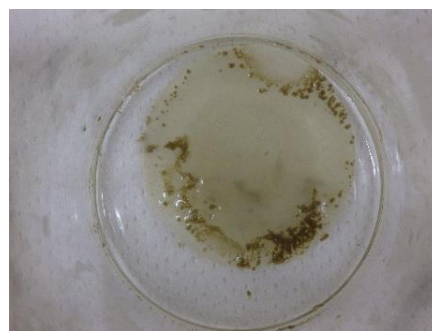


写真 2 12% NaOH GA 添加

GA 未添加系においては、どの試料においてもカタラーゼ由来の沈殿等は観察されなかった。GA 添加系においては、5 % NaOH 処理試料には同様にカタラーゼ由来の沈殿等は見られなかったが (写真

1)、その他の試料についてはCyCl結合ろ紙と反応しなかったカタラーゼ同士がGAにより架橋され、析出したものが試料に付着している様子が確認された(写真2)。

また、カタラーゼ担持試験後の残液を観察したところ(写真3)、GA未添加系において、5%NaOH処理試料の残液の色が他のものよりも薄くなっている様子が確認された。さらに、GA添加系においては、5%NaOH処理試料の残液は沈殿等見られずほぼ透明であったが、その他の残液においては、沈殿が生じている様子が観察された。

反応後、乾燥させた5%NaOH GA添加試料の写真を下に示す(写真4)。カタラーゼ水溶液と同等の色相に着色している様子が観察された。また、各試料について、デジタルマイクロスコープ(株式会社キーエンス VHX-100)により拡大して観察を行ったところ(写真5)、5%NaOH GA添加の試料は均一にカタラーゼが担持されていると考えられるが、その他の試料については、沈殿物が表面に付着している様子が確認された。この沈殿物は、セルロースと未反応のカタラーゼ同士がGAにより架橋されたものと推察される⁶⁾。以上のことより、どちらの系においても、5%NaOH処理試料が、最もカタラーゼの担持効率がよいと考えられる。

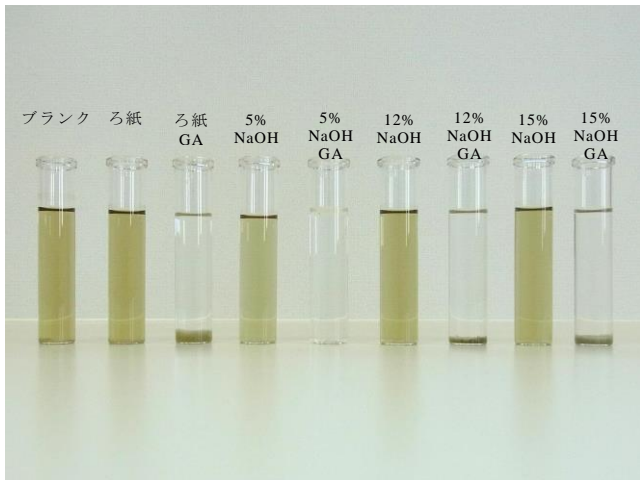


写真3 カタラーゼ担持試験後残液

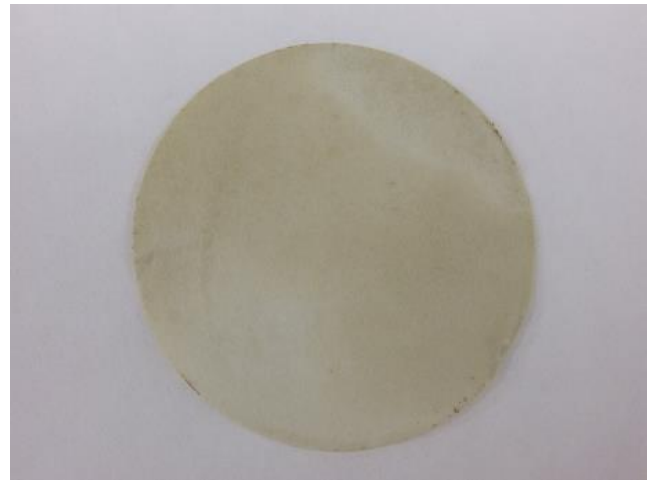


写真4 5%NaOH GA添加試料

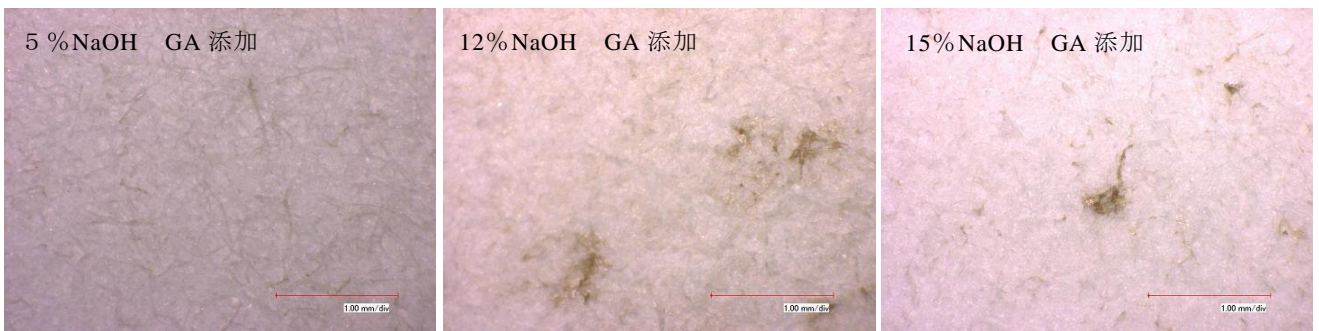


写真5 アルカリ法によるカタラーゼ担持ろ紙のデジタルマイクロスコープ観察画像

3. 機能性材料担持量評価および機能性評価

(1)カタラーゼ担持量評価

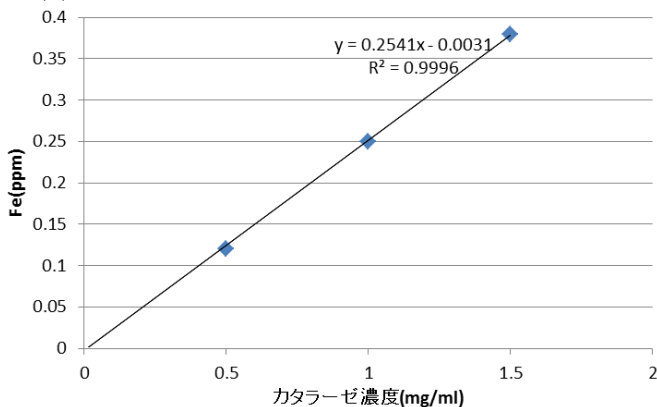


図9 カタラーゼ溶液中の鉄定量結果

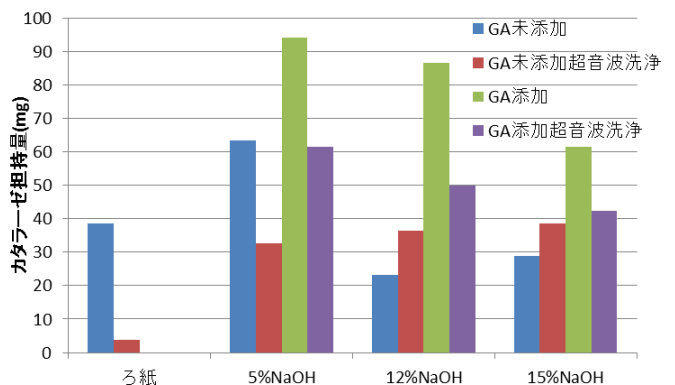


図10 各試料1gあたりのカタラーゼ担持量

原子吸光分析によってカタラーゼ担持量を定量可能かどうかを確認するために、まず濃度既知のカタラーゼ溶液の測定を行った。得られた結果より（図 9）、カタラーゼ濃度と鉄濃度の間に良好な線形相関を確認することができた。

試料の測定結果を図 10 に示す。2. で予想した通り、作製した試料において、GA 添加系の 5%NaOH 処理試料が最もカタラーゼ担持量が多いことが分かった。この結果は、1. の 15%NaOH 処理試料が最も多く酸性染料を染着できたという結果とは相反する。その要因としては、以下の 2 つが考えられる。まず、CyCl は求核剤によって置換反応するが、各求核置換反応は段階的に複素環に残っている塩素原子の反応性を低下させることが知られている⁸⁾。柴田らの報告³⁾から、セルロースと反応した時点で、残存塩素原子が 2 つのものと、残存塩素原子 2 つのうち 1 つが NaOH 水溶液中の水や、隣接する Cell-O と反応した結果、1 つとなったものの両方が混在しており、NaOH 水溶液濃度が高いほど、また、CyCl 溶液への浸漬時間が長いほど残留塩素が 1 つとなる傾向にあると考えられる。次に、酸性染料とカタラーゼは分子量や 1 分子中のアミノ基の数が大きく異なっていることから、セルロースと結合したそれぞれの残留塩素数の CyCl との反応性も異なる可能性がある。これらのことによって、1. の結果との差異が生じていると考察される。

また、GA の添加は、どの試料においてもカタラーゼ担持量の向上に非常に有効であることが分かった。超音波洗浄によるカタラーゼ担持量の減少率については、GA 未添加系の 5%NaOH 処理試料においては 50%であったが、GA の添加により減少率が 35%となったことから、カタラーゼの脱着の抑制にも GA の添加は有効であると考えられる。なお、GA 未添加系の 12%NaOH 処理試料および 15%NaOH 処理試料については、超音波洗浄後の方がカタラーゼ担持量が多い結果となった。試料を観察したところ、カタラーゼ由来の着色に濃淡が見られたことから（写真 6）、カタラーゼが均一に担持されていない可能性があると考えられる。また、GA 添加系紙試料については、試料の湿潤強度不足により、試験後の洗浄時に破損したため、測定できなかった。しかし、反応残液にカタラーゼ由来と思われる沈殿が多く生じていることから、ほとんどセルロースへ担持されていないと考えられる。



写真 6 12%NaOH 処理 GA 未添加試料写真

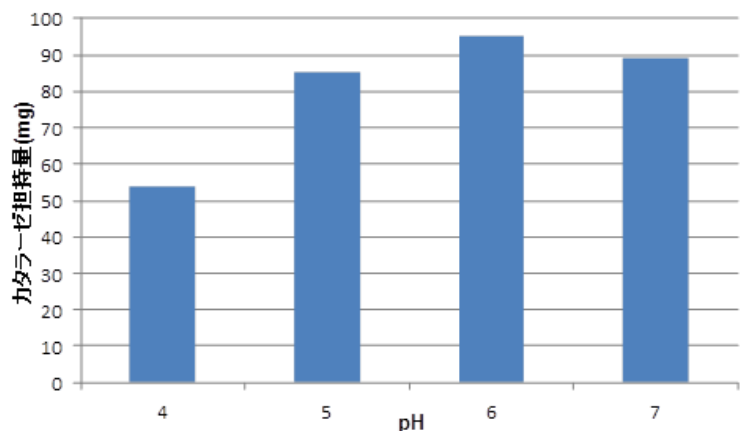


図 11 各 pH における試料 1 g あたりのカタラーゼ担持量

pH 変化がカタラーゼ担持量にどのように影響を与えるかについて調べるため、これまでの結果、最もカタラーゼ担持量の多かった条件（GA 添加 5%NaOH 処理）で、カタラーゼ水溶液の pH を 4～7 に変化させ、担持試験を行った。その結果、pH 6 における担持量が最も多くなった（図 11）。一般的に酵素はそれぞれに最適 pH を有しているが、恐らくは担持においても pH が影響すると思われる。

(2)機能性評価

それぞれの酵素活性測定の計算は次の式により行った。

$$\text{Unit/mg} = (\Delta A_{\text{test}} - \Delta A_{\text{control}}) \times 1/0.0436 \times \text{総液量 (ml)} \div \text{酵素重量 (mg)}$$

ΔA_{test} : 試験区の 1 分当たりの吸光度変化、 $\Delta A_{\text{control}}$: 対照区の 1 分当たりの吸光度変化

1/0.0436 : 過酸化水素のミリモル吸光係数

(a)カタラーゼ活性評価

担持試験に用いたカタラーゼ溶液の活性を表 1 に示す。

表1 カタラーゼ活性評価結果

	Abs/240nm (0s)	Abs/240nm (60s)	ΔA	Unit/mg
対照	0.855	0.855	0	-
0.008mg/ml カタラーゼ溶液	0.611	0.031	0.580	2.49×10^3

(b)カタラーゼ担持ろ紙活性評価

3.(1)において最もカタラーゼ担持量の多かった GA 添加 5%NaOH 処理試料 10mg の活性を表 2 に示す。なお、試料 10mg 中に担持されているカタラーゼ重量は図 10 より 0.868mg と算出された。

表2 カタラーゼ担持ろ紙活性評価結果

	Abs/240nm (60s)	Abs/240nm (240s)	ΔA	Unit/mg
対照	0.863	0.863	0	-
カタラーゼ担持ろ紙 10 mg	0.859	0.834	0.833×10^{-2}	1.11

表3 定性ろ紙活性評価結果

	Abs/240nm (60s)	Abs/240nm (240s)	ΔA	Unit/mg
対照	0.848	0.848	0	-
定性ろ紙 10 mg	0.852	0.861	-0.003	-

表 1、2 より、ろ紙に担持することでカタラーゼの活性は低下することが分かった。活性低下の理由としては、担持により基質である過酸化水素との接触効率が低下したことが挙げられる。さらに、前述のとおり（実験方法 4.(2)）、カタラーゼが触媒する反応は酸素が発生する。反応時の様子を観察したところ、カタラーゼ担持ろ紙表面が微細な酸素の気泡に覆われていた。酸素の気泡によって基質である過酸化水素と効率よく接触できなかつたことも酵素活性測定結果に影響していると考えられる。この事象を考慮すると、実際のカタラーゼ担持ろ紙におけるカタラーゼ活性は測定結果より高いと推測される。また、定性ろ紙について同様に測定を実施した結果（表 3）、定性ろ紙自体には活性がないことが確認された。

ま と め

1. 2種類の架橋剤（塩化シアヌル、グルタルアルデヒド）を利用して、センサー機能材料の1つである酵素（カタラーゼ）を担持することができた。
2. セルロースへの塩化シアヌルの結合量は、反応に用いる水酸化ナトリウムの濃度および塩化シアヌル溶液への浸漬時間に比例して多くなることが分かった。
3. 5%(w/w)水酸化ナトリウム溶液で塩化シアヌルを結合させた試料に最も多くカタラーゼが担持された。グルタルアルデヒドを添加することにより、カタラーゼの担持量が増加し、またカタラーゼの脱着が抑制されることも分かった。
4. 塩化シアヌル、グルタルアルデヒドの2種類の架橋剤を利用してセルロース上に担持されたカタラーゼは、酵素活性の低下がみられるものの、失活しないことが分かった。

文 献

- 1) Andres W. Martinez, Scott T. Phillips, and George M. Whitesides: Diagnostics for the Developing World: Microfluidic Paper-Based Analytical Devices, Anal. Chem.82, p3-10 (2010).
- 2)前島健人,江前敏晴,磯貝明,鈴木孝治,チツテリオダニエル:印刷ペーパーエレクトロニクス:紙とインクジェットプリンターで作るマイクロ流体ヘルスケアチップ,機能紙研究会誌 No.51, p35-44, (2012).
- 3)柴田佐和子,上甲恭平:綿繊維固定化塩化シアヌルの活性塩素の反応特性,繊維学会誌 Vol.69, No12,

p240-244 (2013).

4) 檜垣誠司, 森本聡, 長賀部令, 上甲恭平: キチン・キトサンを用いたセルロース繊維機能化に関する研究, 平成 14 年度中小企業技術開発産学官連携促進事業 成果普及発表会テキスト (2002).

5) K. Opwis, D. Knittel, T. Bahners : Contact Angle, Wettability and Adhesion, Vol4, p447-460 (2006).

6) K. Opwis, D. Knittel : Quantitative analysis of immobilized metalloenzymes by atomic adsorption spectroscopy, Anal. Bioanal. Chem, 380, p937-941 (2004).

7) 和光純薬工業(株) : カタラーゼ. ウシ肝臓由来 試薬添付文書

8) 五井満寛 : 塩化シアヌル誘導体の反応性について(第 1 報), 有機合成化学協会誌, Vol. 18 No. 5, p 327-331 (1960).