

機関番号：13102

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23246137

研究課題名(和文) 共鳴振動触媒素子によるマイクロリアクター内の液相反応の活性化

研究課題名(英文) Activation of catalyzed-liquid phase reactions in a microreactor by acoustic wave resonance oscillation

研究代表者

井上 泰宣 (Inoue, Yasunobu)

長岡技術科学大学・工学部・特任教授

研究者番号：30016133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 38,000,000円、(間接経費) 11,400,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロリアクター内の液相触媒反応の活性化を目的とし、強誘電体結晶による共鳴振動効果を固定化酵素の触媒反応に応用した。グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、D-およびL-アミノ酸オキシダーゼ酵素を強誘電体共鳴振動素子に固定化した後、設計製作したマイクロリアクターに組み込み、酵素触媒の活性変化を調べた。共鳴振動発生によりすべての固定化酵素において、その触媒活性が2～3倍増加すること、共鳴振動が反応の活性化エネルギーを減少させることを見出し、共鳴振動が反応基質と酵素間の相互作用を強め、活性化をもたらすことを明らかにし、固定化酵素の液相触媒反応の活性化にきわめて有用であることを結論した。

研究成果の概要(英文)：In aiming at establishing a method for the activation of catalyzed liquid-phase reactions, the acoustic wave resonance oscillation that can be generated on a ferroelectric crystal by rf electric power was applied to the catalytic reactions in a microreactor by the immobilized enzymes. In all the immobilized enzymes such as glucose oxidase, galactose oxidase, D- and L-amino acid oxidase, the remarkable catalytic activity enhancement was induced by the generation of resonance oscillation with considerable decreases in the activation energy of the reactions. The resonance oscillation was revealed to have the significant effects of strengthening the interactions between the enzymes and substrates, and it was concluded that the resonance oscillation is quite useful to activate the immobilized catalysts for liquid phase reactions.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・触媒・資源化学プロセス

キーワード：触媒・化学プロセス 表面・界面物性 マイクロリアクター 圧電効果 共鳴振動 固定化酵素 液総触媒反応 強誘電体

## 1. 研究開始当初の背景

液相の化学反応の制御は、工学的に最も重要な技術課題であり、そのためには触媒の作用を精緻にコントロールする触媒技術の確立が不可欠である。本研究者は、これまでに固体触媒にピエゾ現象によって生じる周期性の格子変位が固体触媒の機能に与える効果について調べてきた[1]。

図1に示すように、強誘電体結晶基板の両面に電極を取り付け、高周波電力を印加すると、強誘電体結晶に固有の周波数で共鳴振動が起こり、電極表面に周期性の格子変位が生じる。この共鳴振動による周期性の格子変位は、電極をPd金属触媒とした場合に、エタノール酸化反応に対する活性を約2000倍も増加させ、またCu触媒ではエタノール分解反応において、アセトアルデヒド生成活性にはほとんど影響を与えず、エチレン生成活性のみを促進させる選択的効果をもつことを見出してきた。また、こ

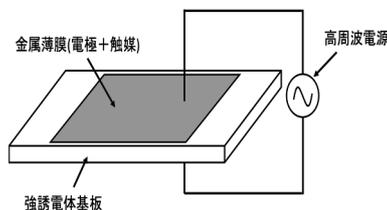


図1 共鳴振動触媒素子

の触媒作用の変化が、共鳴振動による周期性格子変位によって仕事関数等の固体表面の電子状態が変化することに起因することを明らかにしてきた[1]。

従来の共鳴振動効果を用いる研究は、金属および酸化物固体表面上での気体反応に限られ、液体反応については、これまでほとんど検討されていない。本研究者は、反応の液体層を著しく薄くしたマイクロリアクターのような狭空間反応場では共鳴振動効果が有用であることを見出した。例えば、ベンズアルデヒドとアセトフェノンからカルコンを得るアルドール縮合反応に対

して共鳴振動発生により固定化  $\text{Sc}(\text{OTf})_3$  酸触媒の活性は約8倍増加し、反応の活性化エネルギーは70%減少し、共鳴振動が固定化 Sc 触媒の液相反応に対し顕著な活性化をもたらすことを示してきた[2]。

## 2. 研究の目的

液相反応に対する固定化触媒の触媒作用を顕著に高める革新的な方法を開発することを目的とし、共鳴振動効果を応用し、固定化触媒による液相反応、特に固定化酵素による触媒反応を活性化させる方法を確立する研究を行った。

反応物や生成物と共に溶液に溶解した状態の酵素では回収が困難なため、基板に化学的・物理的結合によって固定化する不均一化が行われるが、固定化束縛により、酵素の柔軟性の喪失や超分子鎖の立体構造の変化等により、触媒機能が低下する問題が生じる。低下した固定化酵素の活性化は、工業的にも、学術的にも非常に重要である。

本研究では、固定化する酵素として、表1に示すように、タンパク質のみで構成されるガラクトースオキシダーゼ (GOD) 酵素、金属イオンを補酵素として含むガラクトースオキシダーゼ (GAD) 酵素、および立体選択性をもつ D-および L-やアミノ酸オキシダーゼ酵素(それぞれ D-AOD および L-AOD)を用いた。

## 3. 研究の方法

強誘電基板として、数 MHz の周波数領域に共鳴振動を発生するニオブ酸リチウム ( $\text{LiNbO}_3$ ) 単結晶で、表面に対して垂直方向の格子変位の共鳴振動モード (Thickness Extensional Resonance Oscillation: 以下 TERO と略記) を持つ z- $\text{LiNbO}_3$  (以下、z-LN と略記) および平行な共鳴振動モード (Thickness Shear Resonance Oscillation: TSRO) を持つ x- $\text{LiNbO}_3$  (x-LN) を用いた。さらに、数 kHz の低周波領域について、表面

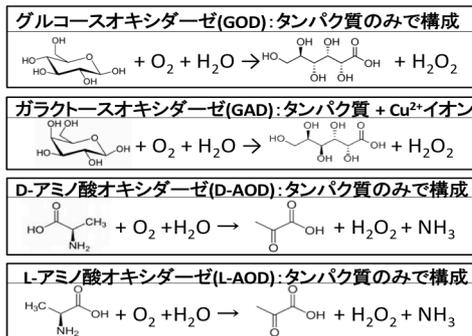


表1 本研究で使用した酵素と反応

に垂直な格子変位 TERO を発生するチタン酸ジルコン酸鉛 (Lead zirconate titanate, Pb(Zr, Ti)O<sub>3</sub>: PZT) 多結晶を用いた。

酵素の固定化には、シランカップリング共有結合法を用いた。基板電極表面の水酸基とシランカップリング剤とアルデヒドを反応させたのち、酵素のアミノ基を結合させて素子表面へ固定化した。

図2に設計製作したマイクロリアクターの模式図を示す。マイクロリアクターは、上部と下部パーツに分けられ、その内部に共鳴振動素子を挟み込む構造を持つ。酵素触媒反応においては、反応基質溶液を上部の導入口を通して流通させ、共鳴振動素子表面固定化した酵素に接触させ、酵素反応を進行させた。反応液相の厚みは、200 μmとした。表1に示した酵素反応では、いずれも生成物として過酸化水素を発生するので、単位時間あたりに生成する過酸化水素量を電気化学的方法により測定し、酵素活性を求めた。高周波電力を印加し共鳴振動を発生させ、活性変化を測定した。

#### 4. 研究成果

作製したマイクロリアクターの溶液内において、LiNbO<sub>3</sub>結晶基板では、7.2 MHz、また PZT 基板では 2.2 kHz の周波数の共鳴振動が発生できた。また、金属電極に対する固定化 GOD 酵素の活性序列は Cu>In>Mo>Ag>Au>Pt であり、以下の実験ではすべて Cu

を金属電極とした。

#### (1) LN 基板上的の共鳴振動効果 (MHz 領域)

強誘電体基板の振動モードが固定化 GOD 酵素の活性化に及ぼす効果を比較した。3W の高周波電力印加により、TERO の場合には、酵素活性は 2.5 倍増加したが、TSRO の場合では、活性増加は 1.1 倍程度に留まり、顕著な活性化は見られなかった。以後の研究では格子変位が表面に垂直な共鳴振動モー

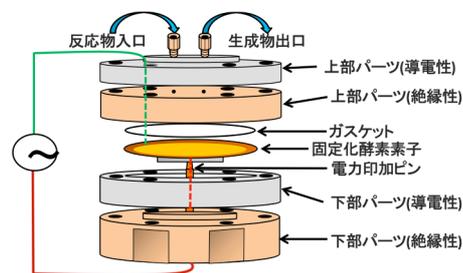


図2 製作した共鳴振動素子用マイクロリアクター

ドを用いた。

共鳴振動による酵素活性化の印加電力依存性を図3に示す。印加電力の増加とともに、活性化比 R (R = 共鳴振動状態での活性 / 共鳴振動が無い状態での活性) は顕著に増加し、6W 付近で活性化比の増加は緩やかな増加となり、それより高い印加電力では、ほぼ一定となった。気相反応に対する金属薄膜の活性に及ぼす共鳴振動の印加電力依存性では、低い印加電力では活性化は小さく、高い電力領域ほどその効果は大きくなる。この変化は、共鳴振動が金属触媒に電子的作用を与える機構に基づく[1]。従って、溶液-固定化酵素に見られた、これと逆の電力依存性は、共鳴振動が、電子的作用よりも、固定化酵素の超分子柔構造に影響を与える構造効果に基づくことを示している。

#### (2) PZT 基板上的の共鳴振動効果 (kHz 領域)

GOD 固定化 PZT 素子における共鳴振動効果を図4に示す。反応温度 300 K では共鳴

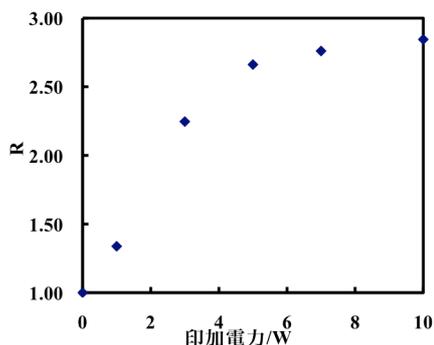


図3 共鳴振動による活性化効果の印加電力依存性

振動を発生させる前 (RO-off) の活性  $V_{\text{off}(1)}$  は平均  $1.5 \text{ nmol min}^{-1}$  に対し、共鳴振動を発生させた後 (RO-on) の活性  $V_{\text{on}}$  は平均  $3.3 \text{ nmol min}^{-1}$  となり、活性化比  $R$  は 2.2 となった。共鳴振動を停止した (RO-off) 場合に、増加した活性はほとんど減少せず、ほぼ維持された。再度の RO-on および RO-off において、ほぼ同じ変化を示した。一方、この活性化 GOD 酵素の状態は、グルコース反応基質を含まないリン酸緩衝液に接触させると徐々に消失し、その活性は共鳴振動発生前の水準にまで低下した。

固定化 GOD によるグルコース基質酸化反応の反応温度依存性から、反応の活性化エネルギーは、共鳴振動の無い状態では  $82.8 \text{ kJ/mol}$ 、共鳴振動状態では  $71.7 \text{ kJ/mol}$  と求められ、共鳴振動によって、活性化エネルギーは約 13% 減少した。

固定化 GOD 活性のグルコース基質濃度依存性を図 5 に示す。基質濃度が  $2.0 \text{ mM}$  までは、活性は急激な増加を示し、それ以上の濃度ではその増加は緩やかになり、 $8.0 \text{ mM}$  でほぼ飽和となった。活性化比  $R$  の値はグルコース基質濃度と共に増加したことから、共鳴振動による固定化 GOD 酵素の活性化には基質と酵素間の相互作用が深く関わっていることが示された。

LN (MHz 領域) と PZT (kHz 領域) の共鳴振動効果を比較すると、電力 3 W 印加に

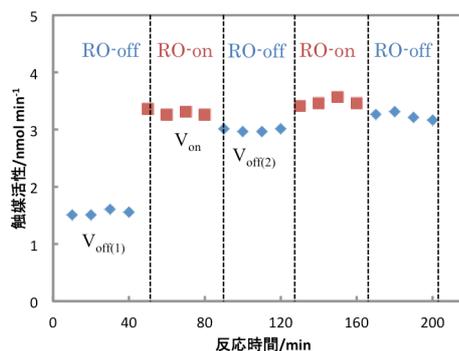


図4 共鳴振動による固定化GOD酵素活性の変化

おいて、活性増加比  $R$  はそれぞれ  $R=2.3$  と  $R=2.1$  となり、ほぼ同程度であった。

固定化 GOD 酵素の触媒作用に及ぼす共鳴振動効果の特徴は、顕著な活性増加および共鳴振動停止後の増加活性の維持である。この現象に関し、以下の因子が考えられる。

- (1) 共鳴振動によって発生した非定常音響流による基質流動拡散効果
- (2) 共鳴振動由来の超音波による局所高温・高圧 (キャビテーション) の発生
- (3) 溶液中の酵素の活性化
- (4) 共鳴振動によるシランカップリング固定化剤薄膜と酵素との相互作用の変化
- (5) 固定化酵素の活性化

活性化比  $R$  が共鳴振動状態で流量依存性を持たないことから、(1)の因子が活性を高めているとは考えられない。(2)および(3)に関しては、GOD 酵素が無い場合には酵素反応は進まないこと、および溶解状態の酵素に対しては共鳴振動による活性の増加は無いことから、この 2 つの因子は活性化に寄与していない。また、(1)~(3)の因子では酵素の活性化状態が共鳴振動を停止しても維持される現象を説明できない。(4)のシランカップリング剤薄膜と酵素との相互作用の変化に関しては、グルコース基質を含まない溶液で予め共鳴振動を与えても活性は増加しないこと、およびシランカップリング剤で酵素を固定化する段階で共鳴振動を与えても、酵素活性は変化しないことより、(4)の可能性も考えられない。従っ

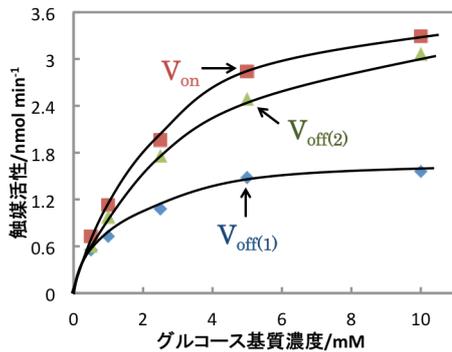
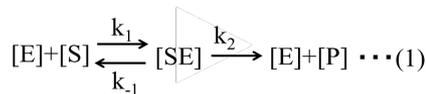


図5 固定化GOD酵素活性の反応基質濃度依存性

て、(5)の固定化酵素が直接共鳴振動を受けてグルコース反応基質存在下で活性化が起こるものと結論される。

酵素反応は以下(1)式で表せる。



ここで、[E]は酵素濃度、[S]は基質濃度、[SE]は中間体濃度、[P]は生成物濃度である。この反応機構に対する反応速度(活性)は、

$$V = V_{\max} [S] / (K_m + [S]) \cdots \cdots (2)$$

のミカエリス・メンテン式で与えられる。ここで、 $V_{\max}$ は、反応基質が無量大のときの反応速度であり、ミカエリス定数  $K_m$  は平衡定数の逆数に相当する酵素と基質の親和性を示す値であり両者の結合性の指標となる。ミカエリス・メンテン式から、Lineweaver-Burk プロットに変換し、ミカエリス定数  $K_m$  を求めると、共鳴振動の無い状態での  $K_m = 0.44 \text{ mM}$  から共鳴振動状態で  $K_m = 0.15 \text{ mM}$  へと顕著に減少した。 $K_m$  値は、酵素と基質間の相互作用が高まると減少することから、共鳴振動は酵素-基質間の相互作用を強める効果を持つことが分かる。このことから共鳴振動は固定化酵素の超分子鎖柔構造に対して、基質と酵素の特異的な複合体による活性構造の形成を促進し、活性化をもたらすものと考えられる。また、基質存在下に限り、共鳴振動の影響を受けた活性部位が保持されることは、酵素が固定化束縛状態にあるためとして理解される。

GOD の他に PZT 素子に固定化した GOD, D-AOD および L-AOD 酵素に対する共鳴振動効果をまとめて表 2 に示す。いずれの固定化酵素においても共鳴振動による活性化が見られ、共鳴振動停止後の活性  $V_{\text{off}(2)}$  はいずれの酵素も  $V_{\text{on}}$  と比較して僅かに減少したのみにとどまり、GOD の場合と同様にこれらの酵素においても不可逆的な活性増加となった。以上の結果より、(共鳴振動+固定化束縛状態の酵素+反応基質)条件での高活性発現と維持は、酵素の種類によらず成り立つものであり、共鳴振動による周期性格子変位が酵素の柔構造に変化を与え固定化酵素を活性化するという機構で説明される。

	GOD	GAD	D-AOD	L-AOD
酵素の特徴	タンパク質のみで構成	補因子Cuイオンを含む	タンパク質のみで構成	タンパク質のみで構成
固定化量/ $\mu\text{g}$	6.34	8.35	17.2	13.0
共鳴振動による活性化比R(300K)	2.2	1.8	1.7	2.0
共鳴振動停止後の増加活性の維持率/%	91	88	93	93
反応の活性化エネルギー(RO-off)/ $\text{kJ mol}^{-1}$	82.8	105	78.0	62.5
反応の活性化エネルギー(RO-on)/ $\text{kJ mol}^{-1}$	71.7	91.6	70.2	55.5
活性化エネルギーの減少率/%	13	13	10	11
$V_{\max}(\text{RO-off})/\text{nmol}$	1.8	1.1	0.62	0.35
$V_{\max}(\text{RO-on})/\text{nmol}$	4.1	2.4	1.2	0.85
$K_m(\text{RO-off})/\text{mM}$	0.44	1.0	6.1	20
$K_m(\text{RO-on})/\text{mM}$	0.15	0.41	2.2	6.1

表 2 固定化酵素に及ぼす共鳴振動効果のまとめ

固定化酵素に共鳴振動の周期的格子変位を与える本研究の手法により、固定化酵素を人為的に活性化させる方法が確立できた。この方法は、さらにどのような液相反応に対しても、固定化触媒の機能を顕著に高める方法に発展できるものと期待できる。

#### 文献

- [1] Y. Inoue, *Sur. Sci. Rep.*, **62**, 2007, 305-326.  
 [2] H. Nishiyama, R. Asari, Y. Inoue, *Phys.*

*Chem. Chem. Phys.*, **12**, 2010, 5970–597.

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Hiroshi Nishiyama, Masayuki Kazui, Yasunobu Inoue, Activation of immobilized glucose oxidase enzyme by acoustic wave resonance oscillation, *Chem. Lett.*, 査読有, **43**, 2014, 618–620.  
DOI:10.1246/cl.131218
- ② Hiroshi Nishiyama, Tomoya Watanabe, Yasunobu Inoue, Effects of acoustic wave resonance oscillation on immobilized enzyme, *Appl. Surf. Sci.*, 査読有, **294**, 2014, 66–70.  
DOI: 10.1016/j.apsusc.2013.12.016.

[学会発表] (計 8 件)

- ① 井上泰宣、西山洋、渡邊智也、共鳴振動による固定化酵素触媒の活性化の特異性とその機構、第 112 回触媒討論会 (A) 2013 年 9 月 18 日～9 月 20 日、秋田大学、手形キャンパス.
- ② H. Nishiyama, T. Watanabe, Y. Inoue, Activation of immobilized glucose and galactose oxidase enzymes by acoustic wave resonance oscillation, XI<sup>th</sup> European Congr. Catal., 2013 年 9 月 1 日～9 月 6 日、Intern. Congr. Center, Lyon, France.
- ③ Hiroshi Nishiyama, Tomoya Watanabe, Yasunobu Inoue, Immobilized Glucose Oxidase Enzyme by Acoustic Wave Resonance Oscillation, 23<sup>rd</sup> North American Catalysis Society Meeting, 2013 年 6 月 2 日～6 月 7 日、Galt House, Kentucky, USA.
- ④ Hiroshi Nishiyama, Ryuusuke Asari, Yasunobu Inoue, Activation of scandium(III) triflate catalyst coordinated on surface for aldol condensation by acoustic wave effects, 7<sup>th</sup> Intern. Symp. Acid-Base Catalysis, 2013 年 5 月 12 日～5 月 15 日、Garden City Shinagawa, Tokyo.
- ⑤ 渡邊智也、数井雅之、西山洋、松原浩、井上泰宣、共鳴振動効果による固定化酵素触媒の活性化、第 111 回触媒討論会 (B) 2013 年 3 月 25 日～3 月 26 日、関西大学 千里山キャンパス.
- ⑥ (招待講演) Yasunobu Inoue, Acoustic wave excitation of catalysis at surface, Intern. Workshop on Acoustic Activation of Surface Processes, 2013 年 1 月 09 日～1 月 12 日、Breckenridge, Colorado, USA.
- ⑦ 渡邊智也、数井雅之、西山洋、松原浩、井上泰宣、マイクロリアクター内でのグルコースオキシダーゼ固定化酵素触媒反応に及ぼす共鳴振動の効果、第 110 回触媒討論会 (A) 2012 年 9 月 24 日～9 月 26 日、九州大学工学部伊都キャンパス.
- ⑧ T. Watanabe, M. Kazui, H. Nishiyama, H. Matsubara, Y. Inoue, Effects of acoustic wave resonance oscillation on catalysis of immobilized glucose oxidase enzyme for glucose oxidation in a microreactor, Intern. Symp. Surf. Sci., 2011 年 12 月 13 日, Tower Hall Funabori Tokyo.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井上 泰宣 (INOUE, Yasunobu)  
長岡技術科学大学・工学部・特任教授  
研究者番号：30016133

### (2) 連携研究者

西山 洋 (NISHIYAMA, Hiroshi)  
東京大学・ARPCHEM 柏集中研・主幹研究員  
研究者番号：50303186