

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：15501

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2018～2023

課題番号：17KK0124

研究課題名（和文）酵素・固体触媒によるカスケード反応を実現する機能性ナノ材料の創成

研究課題名（英文）Design of hybrid particles with solid catalyst and enzyme for cascade catalytic reactions

研究代表者

石井 治之（Haruyuki, Ishii）

山口大学・大学院創成科学研究科・准教授

研究者番号：80565820

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,600,000円

渡航期間： 5ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究では固体触媒・酵素を組み合わせた反応プロセスの構築の可能性を検証するため研究を行った。まず、紫外・可視スペクトルのモニタリング技術により金ナノ粒子の生成過程や各種触媒反応を迅速に評価できる手法を開発した。この中で、金ナノ粒子触媒は、酵素が失活するような厳しい条件においてもその機能を維持することがわかった。省エネルギーでグリーンな金マイクロチューブを自発形成させる技術を見出した。ナノ粒子集積体では困難であるセンチメートルスケールの長さで、金マイクロチューブの作製に成功した。この金マイクロチューブに、他の酵素・固体触媒を共存・担持させることでカスケード反応を実現できる触媒材料創成が期待できる

研究成果の学術的意義や社会的意義

触媒試験の迅速評価および金マイクロチューブの作製法は、従来よりも効率的なプロセスであり、波及できれば触媒およびナノ粒子集積体の研究分野の発展が期待できる。特に、金マイクロチューブの作製法はただ静置するだけの手法であり、エネルギーおよびコストのかからない新たなグリーンな手法と考える。

研究成果の概要（英文）：GNPs are one of typical functional nanoparticles with unique features contributing to the development of nanoparticle-based technologies in optical, electric, and catalytic applications. One of our works is colorimetric observation of fast reactions related to GNPs, such as GNP syntheses and catalytic reactions by GNPs. GNPs also show the catalytic activities both of oxidations and reductions and, thus, the colorimetric catalytic reactions are useful for evaluation of their activities. We have achieved to monitor the above reactions by a diode-array spectrophotometer. Furthermore, we have found a new technique fabricating GNP-assembled microtube, in which no energy is needed during spontaneous formation of the microtube. These results can contribute to the understanding of GNP catalyst as substitution of functional enzymes and also to the development of mixed system of GNPs and enzymes

研究分野：化学工学、材料科学

キーワード：金ナノ粒子 金マイクロチューブ 触媒反応 グリーンケミストリー

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

酵素は温和な条件で有機合成や材料合成を効率的に行うことができ、環境低負荷な工業プロセスを実現するために適した触媒である。しかしながら、酵素自体が高価である、失活しやすいことなど、改良すべき課題も多い。これに対し固体触媒の分野では、固体触媒をナノサイズ化したナノ粒子を用いた研究が広く行われている。触媒ナノ粒子は高い表面積に起因する優れた触媒能が期待でき、近年では酵素と同様の各種酸化・還元反応を触媒することが報告されている。触媒ナノ粒子はまた、担持や集積させることでそのリサイクル性能を著しく向上させることができるため、ナノ粒子を集積した材料設計も重要である。

2. 研究の目的

本研究では酵素および触媒ナノ粒子による触媒反応プロセスの開発を目指す。例えば、温和な条件で新たな材料創成となる反応プロセスの構築や、酵素や酵素と似た触媒能を示す金属ナノ粒子などの触媒能を組み合わせた反応プロセスの実現の可能性を検証するため研究を行う。本研究では特に、触媒試験実施例が多い金ナノ粒子に着目した。金ナノ粒子の合成手法や触媒試験だけでなく、新たな金ナノ粒子集積体の作製について検討した。また、金ナノ粒子の合成および触媒試験においては、各反応中の紫外・可視スペクトルのモニタリングを行い、比色分析における新たな手法の検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 金ナノ粒子の合成

Frens によるクエン酸還元法 [1] をそのまま再現する形で次のとおり実験を行った。HAuCl₄水溶液をホットスターラー上で液温が 98℃以上になるまで攪拌しながら加熱後、クエン酸三ナトリウム (CitNa₃) 水溶液を添加して 30 分反応させた。没食子酸 (GA) 還元法では、GA と NaOH を同濃度溶解した水溶液を用いて同様に実験を行った。また化学還元法では、NaBH₄水溶液を用いて同様に実験を行った。場合により、ポリアリルアミン塩酸塩 (PAH) 存在下で合成を行った。

(2) 金ナノ粒子内包メソポーラスシリカ粒子の合成

金ナノ粒子の合成およびメソポーラスシリカ被覆を逐次的に行う手法により、次の通り粒子合成を行った。セチルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB) 水溶液に HAuCl₄水溶液を添加し、所定の塩基性条件に調整した NaBH₄水溶液を添加した。その後すぐにシリカ源と EtOH を混合させた溶液を添加し反応を一晩以上継続させた。生成粒子は遠心洗浄後、550℃ 4 時間の条件で焼成し CTAB を除去した。

(3) 金ナノ粒子の触媒試験

酸化および還元反応における比色反応を紫外・吸収スペクトルをモニタリングすることで金ナノ粒子の触媒活性を評価した。酸化反応では、過酸化水素 (H₂O₂) 存在下で行った。これはペルオキシダーゼなど酵素触媒において、基質として H₂O₂が広く用いられるからである。触媒試験においては、幅広い pH で各種基質を用いて実験を行った。還元反応では、金属ナノ粒子の還元触媒試験で一般的な 4-ニトロフェノール(4NP)の 4-アミノフェノール (4AP) への変換反応を用いた。NaBH₄存在下で 4NP を添加し実験を行った。各種反応で得た紫外・可視スペクトルの基質・生成物のピーク量の変化から反応量および反応速度を評価した。

(4) 金マイクロチューブの作製

合成した金ナノ粒子分散液を紫外・可視スペクトル測定用の角型セルに移した後、そのまま数週間以上静置した。その後分散液中に形成した金ナノ粒子の集積体をステンレスメッシュ上に取り出し観察・評価を行った。

4. 研究成果

(1) 金ナノ粒子生成過程の観察

本研究ではダイオードアレイ型の紫外・可視分光光度計 (Specord S600) を用いて、紫外・可視スペクトルのモニタリングを行った。従来の分光光度計と比較すると、Specord S600 におけるスペクトル取得速度が著しく早く、0.5 秒間隔で紫外・可視スペクトルを取得可能である。図 1 に各還元法の合成結果および合成時のスペクトルの時間変化を示す。クエン酸還元法で得た金ナノ粒子の形状は球状あるいは楕円状で、その粒径とともに Frens の報告 [1] と同様の結果であった。没食子酸還元法では、金ナノ粒子は多角形状でその粒径はクエン酸還元法より大きかった。これらの条件において、Specord S600 装置内の石英セル中でも同様の合成を行い、紫外・可視スペクトルの時間変化を測定した。クエン酸還元法では、反応開始 30 秒を過ぎたあたりで 500~600 nm あたりの強度が上昇しはじめた。反応 48 秒でブロードであったピーク (580 nm) は、次第にブルーシフトし 80 秒では 539.5 nm でシャープなピークとなった。これに対し、没食子酸還元法では、還元剤添加直後から金ナノ粒子のプラズモンピークを観測した。僅かではある

ものの、ピーク波長は反応 1 秒後 538 nm から 6 秒で 540.5 nm にレッドシフトした。したがって、クエン酸還元法に比べ GA(NaOH) 還元法の金ナノ粒子の生成は早く、また各還元法の間で生成メカニズムが異なる可能性が示唆された。これは紫外・可視スペクトルを秒単位で取得できるダイオードアレイ型の分光光度計を用いることで明らかにできたと言える。

没食子酸還元法で観察した粒子生成中のプラズモンピークのレッドシフトは、生成した金ナノ粒子核が分散性を保ったままその粒径を増大させたためと考える。一方、クエン酸還元法ではクエン酸濃度を変えた条件においても、粒子生成中にプラズモンピークはブルーシフトした。これより、没食子酸還元法におけるメカニズムと異なることがわかる。Pong らの報告[2]を参考にすると、クエン酸還元法の場合、生成した金ナノ粒子核が（線状）凝集体の状態から粒子成長し、ある段階で個々のナノ粒子に分散するとされる。本研究においても同様のメカニズムであると予想できる。

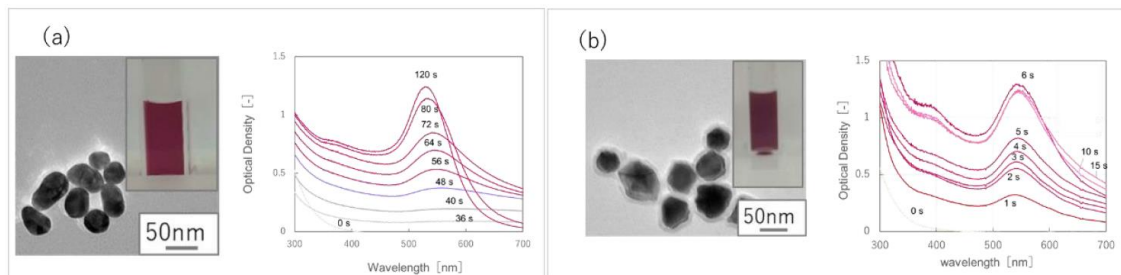


図 1. 金ナノ粒子の透過型電子顕微鏡 (TEM) 画像真と分散液の写真、合成時の UV-Vis スペクトルの時間変化測定結果。(a)クエン酸還元法、(b)没食子酸還元法。[HAuCl₄]=0.29 mM, [還元剤]=0.38 mM。

(2) 金ナノ粒子内包メソポーラスシリカ粒子の合成と評価

図 2 に生成粒子の TEM 画像を示す。図のコントラスト差より、ほぼ全てのシリカ粒子に金ナノ粒子が内包されていた。内包された金ナノ粒子の粒径は 10~20 nm 程度であり、粒子全体の直径は 40~50 nm 程度であった。この粒子粉末の細孔特性について BELSORP MAXG を用い、窒素吸脱着試験を行った。図中央の窒素吸脱着等温線の結果より、IV型を示しメソ孔の存在が示された。得た等温線より細孔径分布を BJH 解析により求めると、2.6 nm に細孔ピークが存在していた。したがって、目的通り金ナノ粒子のメソポーラスシリカの被覆に成功した。簡易的な触媒試験 (4-NP 還元能) においても、この粒子は触媒能を示したことから、シリカシェルは反応物質を透過するのに十分な大きさであることを確認できた。このシリカシェルはまた酵素あるいは別の固体触媒ナノ粒子の担体としても機能することが期待できる。

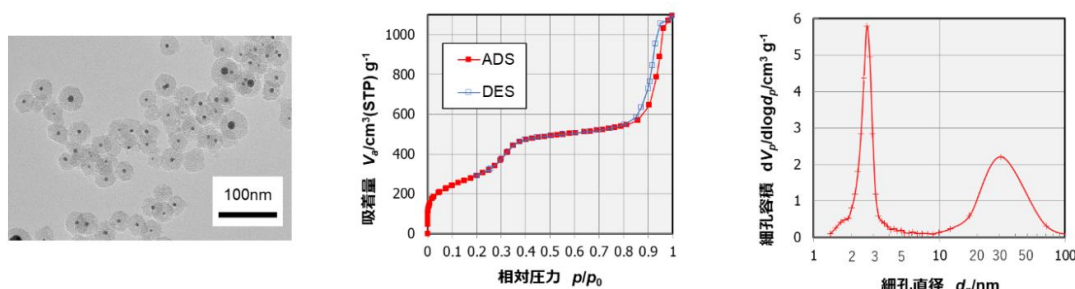


図 2. 生成粒子の TEM 画像、窒素吸脱着等温線、BJH 解析結果。

(3) 金ナノ粒子の触媒活性評価

本研究の触媒試験の特徴は、ダイオードアレイ型の紫外・可視分光光度計 (Specord S600) を用いた、紫外・可視スペクトルのモニタリングである。図 3 に測定データ解析の流れを示す。まず、測定時間分の数十に及ぶすべてのスペクトルデータを CSV ファイルに変換し、Microsoft Excel ソフトのマクロ機能を利用し、紫外・可視スペクトルの時間変化グラフならびに着目するピークの時間変化のグラフを自動的に作成する。これにより、触媒試験データを迅速に目的データとして出力し、評価可能である。なお図 3 は、ABTS 酸化反応の初速度の解析例を示す。

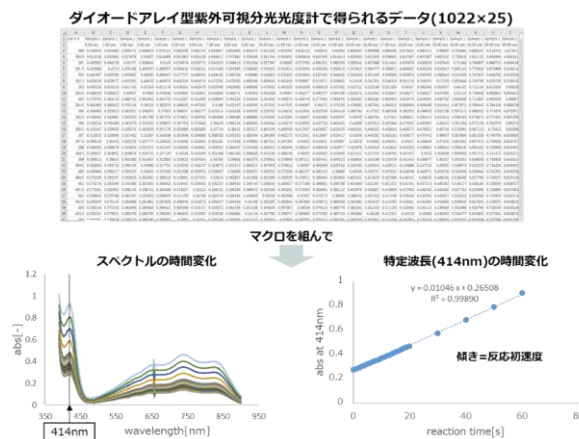


図 3 触媒試験におけるデータ解析の流れ

[還元触媒試験]

化学還元法で得た金ナノ粒子を触媒として 4NP の還元反応を行った結果を図 4 に示す。基質に対して、数十分の 1 程度の濃度で触媒を添加した場合、1 min の反応で NP の吸収ピーク 400 nm は 70 程度まで減少し、310 nm 付近の アミノフェノールの吸収ピーク は時間とともに上昇した。反応 10 min 後には実験前は黄色であった反応溶液が完全に透明になった。これより還元反応が速く進行していることがわかる。また 4NP 濃度は指数関数的に減少しており、これは本反応が擬一次反応であるためである。また、触媒量を数倍にした場合および小粒径な金ナノ粒子を同量添加した場合は、反応がより速く進行したことを確認した。したがって、本手法により、秒単位で変化する速い反応においても紫外・可視スペクトルを取得しながら迅速に触媒能を評価できることがわかった。

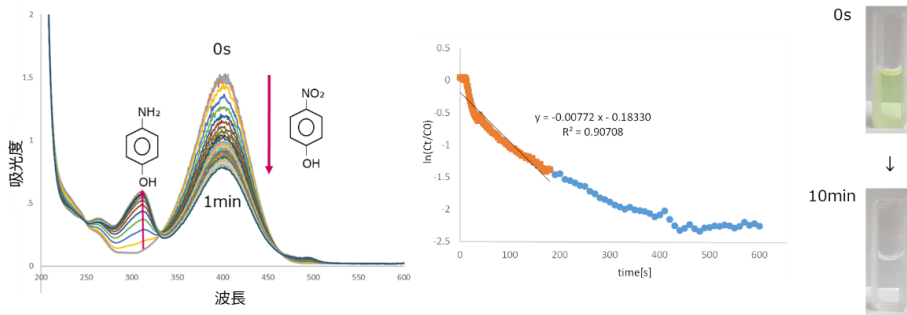


図 4. 4NP の還元反応

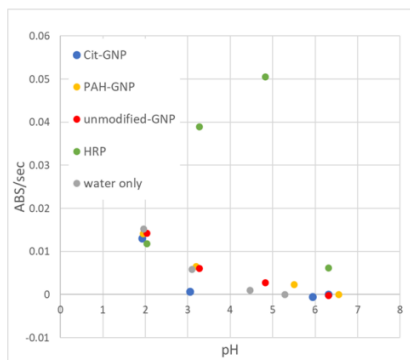


図 5 ABTS 酸化反応における各触媒の活性の pH 依存性。[H₂O₂]=100 mM

[酸化触媒試験]

緑色に発色する ABTS を用いて図 3 のとおり触媒試験を行った。この場合、ABTS の酸化生成物のピーク吸光度 (414 nm) の時間変化量を初速度として定義した。図 5 に触媒反応の pH 依存性を示す。西洋わさび由来のペルオキシダーゼ (HRP) は酸性から中性に pH が上昇するほど、活性が上がるのに対し、金ナノ粒子の場合は pH 4 より小さい pH 条件でのみ触媒能を示した。酸性条件かつ mM オーダーの H₂O₂濃度条件では HRP の活性は低下しているが、それでも金ナノ粒子触媒に比べ高い活性を示していることがわかる。ここで、H₂O₂添加前に基質である ABTS と触媒を水媒体中で 1 時間共存させた条件で実験をおこなった。その結果を表に示す。化学還元法で合成した 2 つの金ナノ粒子 (PAH-GNP, unmodified-GNP) の場合は共存しない条件より、共存した場合の方が活性の上昇を確認した。これに対し、酵素 HRP の場合は ABTS 共存により活性が大きく低下した。この実験は触媒が基質と長時間存在する条件を想定して行っている。したがって、特定の条件ではあるものの、この結果は金ナノ粒子の安定性が HRP より優れていることを示唆している。

以上より、ダイオードアレイ型の紫外・可視分光光度計を用いて固体触媒の触媒能を迅速に定量的に評価できる手法を開発できた。また、金ナノ粒子の触媒能は酵素に劣るものの、酵素が失活する条件でも活性を維持できる条件があることがわかった。これは固体触媒と酵素による逐次反応を構築する上で重要な知見と考える。

表 反応前の ABTS 共存による触媒活性 (初速度) の変化。[H₂O₂]=10 mM

触媒	Standard	ABTS incubation	変化率(%)
Cit-GNP	0.00075435	0.00094745	25.6
PAH-GNP	0.00655225	0.0151829	131.7
unmodified-GNP	0.0060799	0.0141081	132.0
HRP	0.03902825	0.0163526	-58.1
water only	0.00591285	0.0118371	100.2

(4) 金マイクロチューブ (AuMT) の自発形成プロセスの発見と構造評価

クエン酸還元法で合成した金ナノ粒子 (図左の TEM 画像) の分散液を 85 日まで実験室内で静置した。静置開始後、黒い線状の生成物を 12 日後に確認し、その生成物は日を追うごとに徐々に成長した。この生成物は金ナノ粒子同士が凝集を起こした場合の生成物とは明らかに異なった。この生成物をステンレスメッシュ (SM) 上に取り出し、走査型電子顕微鏡 (SEM) により構造を評価した (図)。線状構造体は SM 上を覆うように数マイクロメートルの太さの線状構造が複数重なっていて、また断面から内部が空洞の中空構造である事が示唆された。エネルギー分散型蛍光 X 線分析 (EDX) により、この線状構造体は Au、C 原子で主に構成されていた。さらに、SEM 画像内の線状構造体上の粒状物質のサイズは、TEM 観察時の金ナノ粒子とほぼ同粒径である事から、金ナノ粒子した集積したものであることを確かめた。よって、形成した線状構造体は金ナノ粒子がマイクロチューブ状に集積した AuMT であると同定した。

この AuMT の成長プロセスはこれまで報告がなく、また各種金ナノ粒子でも同様に AuMT を作成することができ興味深い (特許出願済)。従来は、成長した菌体などのテンプレート (鋳型) を金ナノ粒子に添加することで作製している。本手法がこれら従来の手法と大きく異なるのは、室温や湿度など制御することなくただ室内で放置すればいい点、センチメートルサイズの大きさまで成長させることができる点である。テンプレートを準備して AuMT を作製する手法では、テンプレートを準備する時間に加え、温度・湿度制御をはじめ消費コスト・エネルギーがかかる。これに対し、本手法はただ室内に放置するだけでコストは何も必要としない。原料とする金ナノ粒子分散液さえ準備すれば、あとは各種エネルギーを一切必要としないグリーンかつほぼコストがかからない手法である。また、本手法では AuMT が多発することなく 1 か所から自発形成させることができるプロセスのため、大きな AuMT (集合体) を作成できる。ナノ粒子を目に見えるサイズまで集積させることは一般的に難しいことを考えると、この手法は新しいナノ粒子集積プロセスを提案したと考える。

また、AuMT をナノ粒子材料の観点から考えると、優れた導電性を持つ電気材料やナノ粒子が高濃度で集積した高性能触媒への応用が想定される。特に本研究の目的に照らし合わせると、ナノ粒子が高濃度で集積しかつ、表面の凹凸があり高比表面積であることから、触媒として魅力的な材料であると考えられる。本報告の(3)で述べた結果を考慮すると、局所的な触媒濃度を急激に高めることができ、また他の酵素や金属ナノ粒子を共存あるいは担持させることでカスケード反応を完遂できる触媒材料の創成が期待できる。

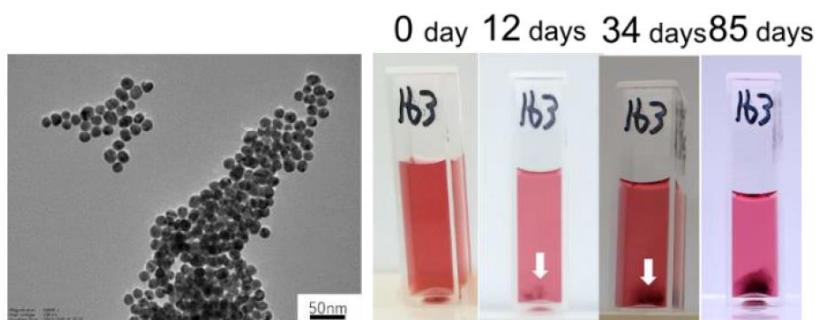


図 GNP の (左) TEM 画像および (右) 分散液内での線状構造体の形成・成長の様子。
[HAuCl₄]= 0.29 mM、[CitNa₃]=0.77 mM。

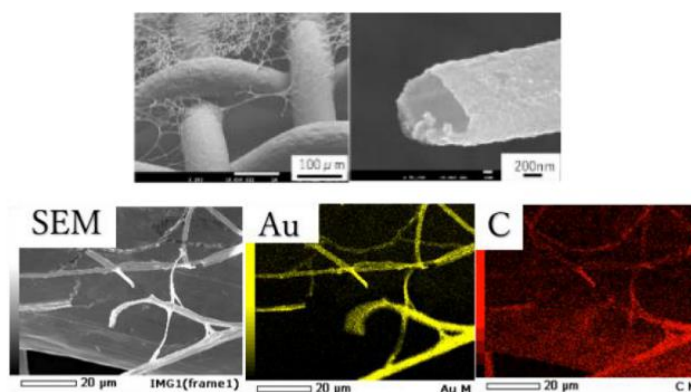


図 線状構造物の (上段) SEM 画像および (下段) 元素分析結果

<引用文献>

1. G.Frens, Nature Phys. Sci. 241, 20-22 (1973)
2. B.Pong et al., J. Phys. Chem. C 111(17) 6281-6287 (2007)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計20件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 ○石井治之
2. 発表標題 環境に優しいナノ粒子材料の開発プロセス
3. 学会等名 令和4年度中四国熱科学・工学研究会研究討論会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ○Haruyuki Ishii
2. 発表標題 Simple syntheses and assemblies of gold nanoparticles
3. 学会等名 Global Virtual Summit on Nanoscience & Nanotechnology（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉原雅人、幡井和哉、○石井治之
2. 発表標題 環境低負荷な金ナノ粒子材料開発プロセスの検討（ポスター）
3. 学会等名 山口大学研究推進体「先端的計測・分析基盤技術の創出」×「文化・芸術まで科学する物質構造解析研究」×物質構造解析研究会 ジョイントセミナー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ○石井治之
2. 発表標題 環境に優しく簡便な金ナノ粒子材料開発プロセス（ポスター）
3. 学会等名 化学工学会 中四国支部産学合同コロキウム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ○松田啓太郎、石井治之
2. 発表標題 各種メソポーラスシリカ粒子への発光体フリーでの蛍光付与 (ポスター)
3. 学会等名 化学工学会 中四国支部産学合同コロキウム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ○松田啓太郎、石井治之
2. 発表標題 オレイン酸ナトリウムを用いた中空メソポーラスシリカ粒子の形態制御 (ポスター)
3. 学会等名 化学工学会第53回秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ○葛谷和弘、石井治之
2. 発表標題 ZnOナノ粒子を複合化したプラスチックフィルムの作製 (ポスター)
3. 学会等名 化学工学会第53回秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ○吉原雅人、幡井和哉、石井治之
2. 発表標題 クエン酸修飾金ナノ粒子分散液中の三次元構造体の自発形成 (ポスター)
3. 学会等名 化学工学会第53回秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉原雅人、幡井和哉、Peter Walde、○石井治之
2. 発表標題 植物に含まれる有機化合物を用いた金ナノ粒子材料開発
3. 学会等名 第6回ナノ材料科学・応用研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 ○國貞明里、石井治之
2. 発表標題 金ナノ粒子触媒の簡便な評価法の開発
3. 学会等名 第25回化学工学会学生発表会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 ○幡井和哉、吉原雅人、石井治之
2. 発表標題 金属ナノ粒子水分散液中でのナノ粒子マイクロチューブの作製
3. 学会等名 第25回化学工学会学生発表会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Haruyuki Ishii
2. 発表標題 Handling of nanoparticle dispersions for novel material designs
3. 学会等名 Materials Info 2021 (3rd Virtual Congress on Materials Science & Engineering) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉原雅人、石井治之
2. 発表標題 植物に含まれる有機化合物を用いた金ナノ粒子合成における粒子生成過程の考察
3. 学会等名 第24回化学工学会学生発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松田啓太郎、石井治之
2. 発表標題 アニオン性界面活性剤を用いたメソポーラスシリカ粒子の形態制御
3. 学会等名 第24回化学工学会学生発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Haruyuki Ishii
2. 発表標題 Facile syntheses of functional nanoparticles via environmentally-friendly processes
3. 学会等名 International Conference on Engineering and Industrial Technology (ICEIT 2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Haruyuki Ishii
2. 発表標題 A rapid-time colorimetric assay for understanding catalytic activities of metal nanoparticles
3. 学会等名 Symposium on "Engineering Science of Bimolecular and Membrane Systems (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 富尾哲也、Peter Walde、石井治之
2. 発表標題 金ナノ粒子触媒による液相酸化反応の比色分析法の開発
3. 学会等名 化学工学会 第51回秋季大会 (2020)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Haruyuki Ishii
2. 発表標題 How to effectively employ surfactants for environmentally-friendly productions of functional particles
3. 学会等名 3rd Symposium of Blue Energy Center for SGE Technology (BEST) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井治之
2. 発表標題 界面活性剤集合体を利用した機能性微粒子合成の新展開
3. 学会等名 第 13 回中四国若手 CE 合宿 (化学工学会中国・四国支部) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井治之
2. 発表標題 機能性ナノ粒子の環境低負荷型合成法の開発
3. 学会等名 化学工学会第 8 5 年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 金マイクロチューブの製造方法	発明者 石井治之、吉原雅人	権利者 山口大学
産業財産権の種類、番号 特許、特開2023-128963	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

山口大学 大学院創成科学研究科 (工学部循環環境工学科) 石井研究室 http://141.kankyo.yamaguchi-u.ac.jp

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
スイス連邦共和国	ETH Zurich			
スイス連邦共和国	ETH Zurich			