Title	ナノ粒子の高分散担持による静電紡糸不織布の機能化と酵素固定化担体への応用
Author(s)	澤田, 光一
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/53957
rights	
Note	

ナノ粒子の高分散担持による静電紡糸不織布の機能化と酵素固定化担体への応用

平成 27 年 9 月

澤田　光一

ナノ粒子の高分散担持による静電紡糸不織布の機能化と酵素固定化担体への応用

博士（工学）論文提出先

大阪大学大学院基礎工学研究科

平成 27 年 9 月

澤田　光一

博士論文内容の要旨

静電紡糸不織布は，2000 年代におけるナノテクノロジーの勃興による開発競争とその進展とともに注目され，触媒または酵素や微生物などの生体触媒を多量に固定できる担体として盛んに研究が行われてきた．静電紡糸不織布は酵素固定化担体として主に 2 つの特徴から優れているとされている．1 つ目の特徴は，数十ナノメートルから数マイクロメートルと従来よりも微細な繊維から構成されるため，マイクロ粒子やマイクロファイバーよりも多くの酵素を担持することができる点である．2 つ目の特徴は流通反応器への適用が可能であることである．工業スケールでの物質生産プロセスにおいては生成物と酵素の分離が不要であること，高い生産速度が得られることから流通反応器を用いた連続反応プロセスが採用されることが多い．このような観点から静電紡糸不織布はナノ粒子と同等の触媒活性を発揮することができ，流通管型反応器への適用が可能である酵素固定化担体として盛んに研究が行われてきた．

静電紡糸不織布は水溶媒系または有機溶媒系の紡糸溶液を金属製の針から吐出しながら電圧を印加して紡糸することによって作製されるが，紡糸可能な溶液の最大供給速度が低いことが，不織布作製におけるボトルネックとなっている．通常，固定化触媒は担体を含め失活までのみの使用を想定されているが，静電紡糸不織布は生産性が低いため，触媒を大量に使用する応用は困難である．また，触媒の活性と寿命の向上が求められている．本研究では生体触媒である酵素の固定化に着目し触媒担持量に影響を与える繊維表面の細孔制御を検討した．さらに失活した酵素を簡便な方法により脱離することで担体としてリサイクルを可能にし，低生産性を補う技術の開発を検討した．

まず第 1 章では，静電紡糸不織布の特徴，ナノ粒子を担持した静電紡糸不織布の応用，既存のナノ粒子担持技術，固定化酵素技術と応用，本研究の目的と本論文の構成について述べた．

第 2 章では，ポリビニルアルコール(PVA) 静電紡糸不織布への酵素の固定化と流通反応系に関する検討を行った．PVA 静電紡糸は溶液組成に応じて紡糸効率が低いことが課題となっていた．そこで混和する溶媒を 10%まで混合し紡糸溶液の物性を制御することにより静電紡糸効率を飛躍的に向上することを示した．また，油脂工業において重要な酵素であるリパーゼを固定し静電紡糸効率の改善技術が悪影響を及ぼさないことを明らかにした．

次に第 3 章では，静電紡糸不織布への酵素の固定化量を飛躍的に向上するために多孔性の向上を検討した．第 2 章にて得られた知見に基づき直径 15 nm のシリカナノ粒子分散液の静電紡糸を行い鋳型としてメソ細孔を形成することで，1.33 cm^3/g と非常に高いメソ細孔容積をもつ静電紡糸不織布を開発した．

第 4 章では，さらに小さな 5 nm 以下の金ナノ粒子を静電紡糸不織布に高分散担持することを目指し，後処理によりナノ粒子を形成するその場合成を検討した．塩化金酸と高分子溶液を静電紡糸し紫外線照射により塩化金酸を還元することで，5 nm 以下の粒子径の金ナノ粒子を高分散担持した．また金ナノ粒子は 5 nm 以下の場合に高い触媒活性を示すことが報告されており，4-ニトロフェノールの還元反応において触媒活性をもつことが示された．さらに塩化金酸の濃度を 3-21%と増加した場合にも粒子径はほぼ一定に保つことができ，一定体積の不織布を用いて金の含有量と触媒活性の関係を評価したところ，金の含有量に比例して触媒体積あたりの触媒活性が増大することが実証された．

第 5 章では，酵素固定化担体として電気化学的にリサイクルすることのできる静電紡糸不織布の開発を検討した．まず無電解金メッキ法により静電紡糸不

織布へ金をメッキするために，触媒となる金ナノ粒子の担持を行った．次いで金メッキ不織布を作製し，自己組織化膜の形成と酵素固定化を行った．金メッキ不織布を金箔と比較した結果, 225 倍高い酵素活性を示し高い体積当たりの酵素活性を有することが明らかとなった．次に，自己組織化膜が電圧印加により脱離することを利用して金メッキ不織布からの酵素固定化自己組織化膜の脱離と新しい酵素の固定化を行うことにより不織布のリサイクルを検討した．電圧印加による脱離を酵素活性測定または X 線光電子分光法による表面解析から評価した結果，酵素タンパク質の脱離と固定が示唆され，担体としてリサイクル可能であることが明らかとなった. さらに流通管型反応系へ適用し連続反応を 7 日間行った．運転 7 日目においてそれぞれ 62.7%，58.5%の酵素活性を保持していた．金メッキ不織布は電圧印加によるリサイクルを行っても固定化酵素の安定性に悪影響は与えなかった.

最後に第 6 章にて，本研究の総括と今後の展開研究について提案を行った.

ナノ粒子の高分散担持技術を用いて静電紡糸不織布へ細孔を形成し，酵素固定化量を飛躍的に増大するために必要な材料の開発手法を提案した．さらに静電紡糸不織布の低生産性を補うための技術として失活した酵素タンパク質を簡便な手法により除去し担体をリサイクルする手法の開発に成功した.

目次

第 1 章　序論

1.1　静電紡糸不織布の特徴

静電紡糸不織布は，数ナノメートルから数マイクロメートルの繊維径とその 100 倍以上の長さを持つ繊維が 3 次元的にランダムに絡まりあった微細繊維の集合体である．従来のマイクロファイバー不織布と比較して，高い多孔性と体積基準の比表面積を有しており幅広い分野で注目されている（Reneker and Chun 1996; Li and Xia 2004; Greiner and Wendorff 2007)．紡糸溶液の吐出口を増やすことで大面積化が可能(Persano *et al.* 2013)であることから，工業的応用に向けて盛んに研究が行われてきた(Burger *et al.* 2006)．これまでに，ろ過膜(Gopal *et al.* 2006)，電子材料(Kim and Yang 2003; Song *et al.* 2004)，薬物送達材料(Chakraborty *et al.* 2009)，創傷被覆材料(Jin *et al.* 2013)，組織工学における足場材料(Hasan *et al.* 2014)，触媒担体材料(Prabu *et al.* 2014)としての応用が検討されている．

一般的に静電紡糸法とは，高分子溶液を針から吐出し数十 kV 程度の電圧を印加することで微細な繊維を得る乾式紡糸法である．針から吐出された高分子溶液に静電気力がかかり，それが溶液の表面張力を上回ると針の溶液の形状がテイラーコーンと呼ばれる円錐状に変化する．その後，コレクターに向かって噴射され大部分の溶媒が蒸発し，高分子が分岐，微細化しながら飛来することで微細な繊維を得ることができる．多種多様な材料を繊維化可能な汎用性の高い紡糸方法であり，繊維化できる材料として，合成高分子，天然高分子(Huang *et al.* 2004)，セラミック(Yu *et al.* 2011)，金属(Song *et al.* 2004)がある．静電紡糸法の課題は生産性が低いことであり（Persano *et al.* 2013)，この理由として，溶液の供給速度を遅くしなければならないこと，針が詰まるため連続的な紡糸が困難である（Li and Xia 2004; Jiang *et al.* 2013)ことが挙げられる．解決

策として，針の数を増やす手法，針を用いない手法(Niu and Lin 2012; Jirsak *et al.* 2010)が提案されてきた．

1.2　静電紡糸不織布へのナノ粒子の担持による機能化と応用

これまでナノ粒子は，科学と工学の両分野において盛んに研究され，電気化学(Zhu *et al.* 2011), 光学(Haynes and Van Duyne 2001), 触媒化学(Bell 2003), 生物学(Murphy *et al.* 2008)など多くの分野で注目されている．ナノ粒子は，微細な物理的性質を利用した応用と粒子自体の特異な化学的性質を利用した応用の 2 種類に大別される．ナノ粒子のもつ化学的または物理的機能を様々な材料に付与することにより新しい材料を開発することを目指し，多様な材料へのナノ粒子の担持が検討されてきた．例として，マイクロファイバー(Lu *et al.* 2007), メソポーラス材料(Linares *et al.* 2014)，マイクロゲル(Jones and Lyon 2003), リポソーム(Malam *et al.* 2009)，デンドリマー(Crooks *et al.* 2001)，炭素材料(Guo *et al.* 2010; Yu *et al.* 2014)が報告されている．近年，静電紡糸不織布がナノ粒子の担体として注目され盛んに研究が行われている．静電紡糸不織布に担持したナノ粒子の利用法は大別すると，(1) ナノ粒子の担持を用いた静電紡糸不織布表面への細孔形成，(2) ナノ粒子の触媒活性の利用の 2 つに分類される．前者にはナノ粒子の担持のみによる細孔形成とナノ粒子を鋳型とした細工お形成がある(Kanehata *et al.* 2007; Liu *et al.* 2013)．ナノサイズの細孔を持つ静電紡糸不織布は酵素などの触媒担体，水質浄化・大気浄化など環境浄化材としての応用において有用である．特に，酵素固定化において固定化量の増加，活性化，安定化に寄与し，触媒担体としての機能を向上する重要な役割を果たすことが報告されている(Kim *et al.* 2006)．ナノ粒子の物理的性質を利用した応用において，静電紡糸が可能である限り繊維中のナノ粒子の凝集は大きな問題とな

らないが，化学的性質を利用する応用においてはナノ粒子の凝集制御が重要となる. 後者の応用として, これまで Ni (Liu *et al.* 2009), Pd (Demir *et al.* 2004), Pt (Liu *et al.* 2011)，Ag (Shen *et al.* 2015)，Au (Fang *et al.* 2011)のナノ粒子を静電紡糸不織布に担持し，それぞれの触媒活性を利用した不織布型触媒(Fang *et al.* 2011)または不織布型電極(Liu *et al.* 2009; Huang *et al.* 2008)の開発が報告されている．静電紡糸不織布を担体として用いることで多数のナノ粒子を外部の分子と接触可能な状態で担持することができるため，体積当たりの触媒活性が非常に高い不織布型触媒または電極とすることができる．ナノ粒子が触媒する反応の例として，グルコースの酸化反応（Liu *et al.* 2009)，有機化合物の水素化反応（Demir *et al.* 2004)，ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド，過酸化水素センサーとしての応用(Huang *et al.* 2008)がある．さらに，ナノ粒子触媒の回収・再利用を容易に行うことが可能である(Fang *et al.* 2011; Wang *et al.* 2013)ことに加えて，流通管型反応器への適用が可能となるという利点がある．流通管型反応器を用いた連続反応プロセスは，工業スケールでの物質生産プロセスにおいて生成物と触媒の分離が不要であること，高い生産速度が得られることから積極的に採用が検討されている(Jas and Kirschning 2003; Wang *et al.* 2014).

1.3　既存の静電紡糸不織布へのナノ粒子担持技術

　静電紡糸不織布へのナノ粒子の担持については大別して 2 つの手法がある．(1)　溶液にナノ粒子を分散し, 紡糸することにより包括固定する手法（Wang *et al.* 2007; Shi *et al.* 2009)と，(2)紡糸後に繊維表面または内部にてナノ粒子を合成する手法である(Fang *et al.* 2011)．前者の手法においては，ナノ粒子を紡糸する溶液中に分散する必要があり，既存のナノ粒子のコロイド溶液を利用でき

る反面，静電紡糸により繊維外部または内部で凝集し個々の粒子の化学的性質が失われる可能性や繊維内部に包埋されることで外部の基質分子の拡散が困難になる可能性がある．そのため，ナノ粒子を触媒として使用することを想定した場合にはナノ粒子分散液の静電紡糸は適切ではない．後者においては，繊維化後にナノ粒子を合成するため，ナノ粒子の量と分散性は担体との相互作用の強さに依存する(Fang *et al.* 2011)．静電紡糸法は，多種多様な材料を繊維化可能であるため(Ramakrishna *et al.* 2006)，材料，溶媒，後処理法を選定することで，化学的または物理的手法を用いたナノ粒子の担持に適した官能基の導入することによってナノ粒子の分散性を制御することが可能である(Wang *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2011)．

1.4　酵素固定化静電紡糸不織布の開発と課題

固定化酵素は，水溶性のタンパク質である酵素の工業利用において酵素の回収・再利用を可能にするだけでなく，酵素の寿命，熱安定性，pH 安定性などを向上させるための重要な技術である(Mateo *et al.* 2007; Sheldon 2007)．酵素固定化担体として，これまでに微粒子が主に検討されてきた．例として，酸化鉄ナノ粒子(Johnson *et al.* 2008)，シリカ粒子(Wang and Caruso 2005)，高分子粒子(Ribeiro *et al.* 2004)が挙げられる．

しかしながら，微粉末状触媒は，連続反応系への適用が困難であり，通常は流動層反応器または粉流相反応器が用いられるが，これらの反応器を用いた場合には回収が容易ではないという課題があった．そこでナノ粒子と同等の触媒活性を発揮することができ，かつ流通管型反応器への適用が可能な静電紡糸不織布への酵素の固定化が盛んに検討されてきた(Xu *et al.* 2013; Wang *et al.* 2009; Wu *et al.* 2005; Wang *et al.* 2006)．

一方，酵素は室温，中性 pH のような穏和な条件で高い基質特異性と活性を示し，無機触媒では不可能な反応を進行する触媒として工業的に広く用いられている．工業利用における問題点として，タンパク質の変性による失活は避けられないため無機触媒と比較すると寿命が短いことが挙げられる．さらに，静電紡糸不織布は生産性が低いため，触媒を大量に使用する工業利用において酵素活性の喪失に伴って廃棄することは環境負荷が大きく好ましくない．そこで失活した酵素固定化静電紡糸不織布をリサイクルする技術の開発が求められている．これまでの研究において固定化酵素の効率化が検討されており，固定化技術の改善による酵素活性の向上，安定化による活性の長寿命化(Kim *et al.* 2006; Diaz and Balkus 1996)，pH 安定性，熱安定性の向上(Mateo *et al.* 2007))が検討されてきた．特に，静電紡糸不織布への酵素の固定化による固定化量の増加，安定性の向上が多く検討されてきたが，静電紡糸不織布の繊維表面には通常の紡糸では細孔は形成されないため，繊維表面または内部に細孔を形成することで更なる機能強化が期待された．そこで，本研究では酵素固定化担体としての応用を指向して繊維の表面に多数のメソ細孔構造をもつ静電紡糸不織布の調製法の開発を検討した．さらに，失活した酵素を静電紡糸不織布から除去し不織布をリサイクルする技術を開発することによって，静電紡糸不織布を酵素固定化担体とした生物反応工学プロセスの効率化を目指した．

1.5　本研究の目的と本論文の構成

本研究は，酵素固定化静電紡糸不織布を利用した効率的な生物反応工学プロセスの実現を目指して，前述の 2 つの手法により静電紡糸不織布へのナノ粒子の担持を行い酵素固定化量の増加を目的とした静電紡糸不織布への多孔質化と流通反応系に適用可能な酵素固定化静電紡糸不織布の新規なリサイクル手法の

開発を検討した．

本論文では，Fig. 1-1 のフレームワークに示すとおり，以下の構成で論ずる．

第 2 章では， 静電紡糸不織布の生産効率の向上に関する検討と流通反応系への応用を含む酵素固定化担体としての応用可能性について検討した．

第 3 章では，第 2 章にて得られた知見に基づき，ナノ粒子分散液の静電紡糸による静電紡糸不織布へのナノ粒子の担持を行った．担持したナノ粒子を鋳型として細孔を形成することで，メソ細孔を有する静電紡糸不織布の調製と評価を行った．

第 4 章では，静電紡糸不織布へのナノ粒子の高分散担持を目指して，その場合成によるナノ粒子の固定化を検討した．静電紡糸後に繊維上にて，ナノ粒子を光照射により合成し，高分散担持を検討した．合成条件を調整することでナノ粒子の大きさと分散性の制御を検討した．さらに，ナノ粒子を形成担持した静電紡糸不織布を 4-ニトロフェノールの還元反応に適用し触媒活性の評価を行った．ナノ粒子の大きさ，分散性の触媒活性への影響評価を検討した．

第 5 章では，その場合成によりナノ粒子を担持し無電解金メッキを実施することで静電紡糸不織布の構造と導電性を有する金メッキ不織布の調製を検討した．無電解金メッキ不織布に自己組織化膜を形成し，酵素を共有結合固定した．自己組織化膜が負電圧の印加によって電極表面から脱離する特性を利用して，酵素固定化自己組織化膜を静電紡糸不織布表面から脱離することにより，電気化学的にリサイクル可能な酵素固定化静電紡糸不織布の開発を行った．さらに，流通管型反応器を用いた連続反応系への適用可能性と安定性を評価した．

最後に，第 6 章にて本研究で得られた研究成果の総括と今後の展開研究への提案を述べた．

Part 1 Introduction of pre-synthesized nanoparticles into fibers

Chapter 2 Enhancement of electrospinability and application to enzyme immobilization

Chapter 3 Electrospinning of nanoparticle –suspending solution and fabrication of nanoporous fibrous mats

Part 2 Introduction of nanoparticles into fibers via in situ formation

Chapter 4 In situ formation of gold nanoparticles and expression of catalytic activity

Chapter 5 Electroless gold plating to electrospun fibrous mats and application to enzyme adsorption and desorption

Fig. 1-1 Framework of this study

第 2 章 静電紡糸不織布の生産効率の向上と固定化酵素への応用

2.1　緒言

酵素は，水溶性であるため回収が難しく工業プロセスにおいて経済的観点からしばしば適用が困難である．そこで酵素の回収・再利用を可能にするための技術として酵素固定化があり，各種担体への酵素の固定化技術は酵素の産業利用を可能にする重要な技術として盛んに研究が行われている(Sheldon and van Pelt 2013; Rodrigues *et al.* 2013)．第 1 章にて述べたように，静電紡糸不織布への固定化（Kim *et al.* 2006; Mateo *et al.* 2007; Garcia-Galan *et al.* 2011）は，固定化酵素量の向上，酵素の活性向上，安定化，基質の拡散抵抗の減少による活性向上が期待できる．静電紡糸法により比表面積，物質透過性の高い不織布を調製することができ，不織布の利点を生かした応用として管型流通反応器への応用が可能である（Wang *et al.* 2009; Sakai *et al.* 2008).

ポリビニルアルコール(PVA)は水溶性の合成高分子であり，静電紡糸不織布の材料として固定化酵素への応用に限らず，最も検討されている高分子の一つである(Sakai *et al.* 2008; Taepaiboon *et al.* 2006; Wang *et al.* 2012; He *et al.* 2009; Xu *et al.* 2013; Cao *et al.* 2012)．また PVA は単一での紡糸だけではなく紡糸が困難な材料，例えば薬剤(Taepaiboon *et al.* 2006)，天然高分子(Xu *et al.* 2013)，ナノ粒子(He *et al.* 2009)の補助紡糸材として検討されている．PVA 静電紡糸不織布の生産における課題として，供給される溶液の生産効率が低いことがあげられる．これは PVA 溶液の静電紡糸において溶媒として水が用いられるが(Taepaiboon *et al.* 2006; Li *et al.* 2013)，水は静電紡糸の溶媒として適していないためである．静電紡糸不織布の生産効率の高い有機溶媒を用いた高分子溶液は粘度，密度，表面張力が低いと報告されている(Pattamaprom *et al.* 2006).

それに対して，水は表面張力が大きく(72.9 mN/m)飽和蒸気圧が低く沸点は高いという特徴をもっており，これらの溶液の性質が生産効率が低い原因になっていると考えられた．前述のように生産効率の良い溶液の物性は報告されているが，溶液組成の制御による PVA 静電紡糸不織布の生産性の向上に関する検討はほとんど実施されていない．既報として，金属イオンの添加による導電性の向上や界面活性剤を用いた表面張力の低減による生産効率の向上が報告されている（Zhu *et al.* 2009; Yao *et al.* 2003）．本章では，*N,N*-ジメチルホルムアミド(DMF)を PVA 水溶液に添加することで PVA 静電紡糸不織布の生産性の向上を検討した．DMF は通常，生産効率の良いポリスチレン，ポリアクリロニトリルの静電紡糸において使用される極性の高い有機溶媒であり，水と比較して低い表面張力(35.2 mN/m)と飽和蒸気圧(2.7 mmHg，20˚C)，高い沸点(150˚C)を性質としている．DMF を添加することによって紡糸溶液の表面張力を低下し生産効率の向上を検討した．また PVA 静電紡糸不織布は，油脂工業において最も重要な酵素であるリパーゼ(Noureddini *et al.* 2005)の固定化担体として有用であると報告されている(Sakai *et al.* 2008; Wang and Hsieh 2008)．リパーゼは有機溶媒を用いた工業プロセスにおいて使用される酵素であり(Hasan *et al.* 2006)，エステル交換反応(Sakai *et al.* 2008)，エステル化反応(Hasan *et al.* 2006), アミノリシス反応(Badjic *et al.* 2001), アシル交換反応(Yagi *et al.* 1990), チオエステル交換反応(Weber *et al.* 2006)を触媒する．そこで，開発した DMF の添加による生産効率の改善に関する知見をもとにリパーゼ固定化 PVA 静電紡糸不織布の生産性の向上を検討することにより本手法の有用性を明らかにした．リパーゼを固定した PVA 静電紡糸不織布を有機溶媒中のエステル交換反応に適用し，酵素活性を測定することにより DMF 添加の影響を評価した．モデル反応として，イソオクタン中における(S)-グリシドールと酪酸ビニルから酪酸(S)グリ

シジルを生成する反応を検討した．また流通管型反応器へと適用し調製したリパーゼ固定 PVA 静電紡糸不織布の酵素活性の長期安定性を評価した.

2.2　実験

2.2.1　ポリビニルアルコール溶液の調製と静電紡糸

2.2.1.1　ポリビニルアルコール静電紡糸不織布の調製

PVA 粉末(Mw 146,000-186,000, Sigma-Aldrich)を蒸留水と混合し，120˚C にて 20 分間処理することで 15 wt% PVA 水溶液を調製した．既定量の DMF を PVA 水溶液に添加し，Table 2-1 に示す組成の PVA 溶液を調製した．静電紡糸は既報(Sakai et al, 2008)に従い行った．5 ml のプラスチックシリンジに溶液を充填し，シリンジポンプを用いて供給速度 1.5 mL/h にてステンレススチールの針(20G)から溶液を吐出し，任意の距離に設置した回転式金属ドラム(コレクター)に向けて任意の電圧にて紡糸した（Fig. 2-1）．特記がない場合には，針とコレクターとの距離，針への印加電圧はそれぞれ 15 cm，20 kV とし，コレクターは接地した．リパーゼ固定 PVA 静電紡糸不織布の調製においては，*Pseudomonas cepacia* 由来リパーゼ粉末を 1 wt%となるように各組成の PVA 溶液を調製し静電紡糸した．紡糸後の不織布を真空乾燥し残った溶媒を除去した．その後，-20˚C の冷凍庫にて保管した．不織布中のリパーゼ量は紡糸溶液中に含まれる PVA とリパーゼ粉末の割合から算出し 0.667 mg-protein/g-fiber であった．ファイバーの直径は，走査型電子顕微鏡(SEM，model S-2250N, Hitachi Ltd.)により観察, 撮影した写真から 100 本以上の異なる繊維を測定し算出した.

2.2.1.2　紡糸溶液の物性評価

溶液の粘度は粘度計(Model LVDV-E, Brookfield Corp.)を用いて測定した．表

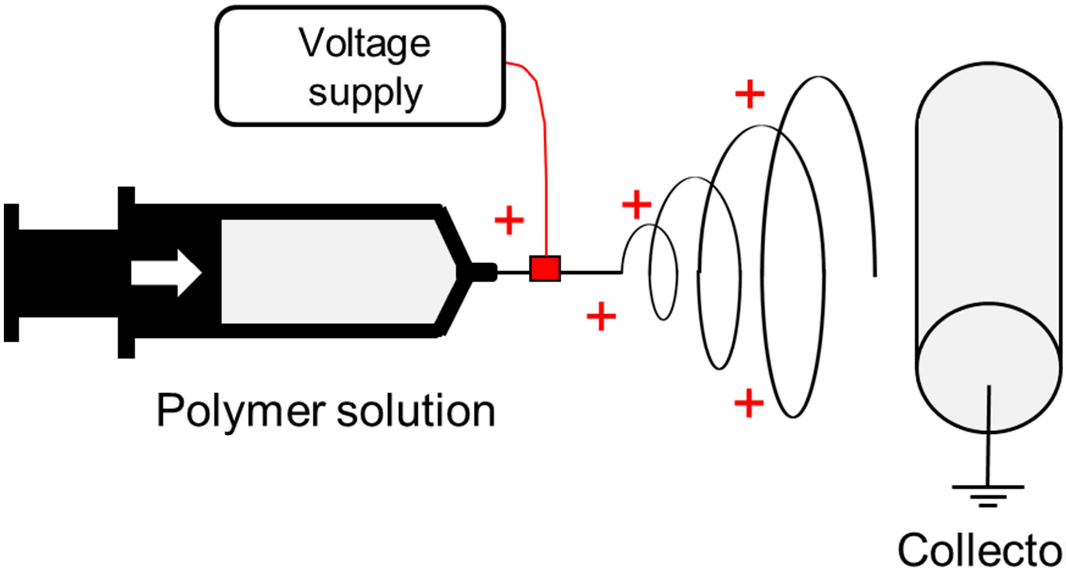

Fig. 2-1　Schematic illustration of electrospinning set-up used in this study.

Table 2-1 Compositions and properties of PVA aqueous solutions

Number of solvent sample	Concentration (wt%) PVA	DMF	Viscosity (Pa·s)[a)]	Surface tension (mN/m)
I	10.0	0	3.1	75±7.2
II	10.0	3.4	3.3	59±6.9
III	10.0	6.9	3.8	58±6.4
IV	10.0	10	4.3	59±3.0
V	10.3	0	3.9	ND

[a)] The standard deviations for the data were less than 0.1 Pa·s (n=3).

ND: not determined.

面張力はペンダントドロップ法(Fordham 1948; Stauffer 1965)により液滴 20 個を測定して求めた．溶液の温度は 25˚C として測定した．

2.2.1.3　生産効率の測定

PVA 静電紡糸不織布の生産効率は，30 分間の静電紡糸においてコレクターに捕集されなかった PVA 溶液の溶液量，つまり針とコレクターの間に落下した溶液または 5 分おきに針から拭き取った溶液を回収し，次式により算出した．

生産効率 (%) = 100×{[1-(紡糸されなかった紡糸溶液量) / (30 分間に吐出された紡糸溶液量)]}

2.2.2　リパーゼ固定化担体への応用

2.2.2.1　固定化リパーゼの酵素活性測定

PVA 静電紡糸不織布に固定したリパーゼの酵素活性を，エステル交換反応の反応初速度により評価した．(S)グリシドール(20 mM)と酪酸ビニル(300 mM)から(S)グリシジル酪酸をイソオクタン中で生成する反応において，触媒添加による反応開始後 2-20 分の転化率(転化率 30%以下)を測定し反応初速度を算出した．触媒は，リパーゼ固定化 PVA 静電紡糸不織布(リパーゼ 20 μg を含む不織布 30 mg)またはリパーゼ粉末(リパーゼタンパク質 20 μg を含む粉末 2.7 mg)を用いた．反応溶液量は 10 ml とし，反応容器は容積 20 ml の蓋のできるガラス容器を用いた．反応溶液はシェイキングインキュベーター(SI-300C, AS ONE Corp.)を用いて 35˚C にて 1400 rpm で撹拌し反応を進行させた．

2.2.2.2　流通管型反応器を用いた長期安定性評価

調製したリパーゼ固定化 PVA 静電紡糸不織布を流通管型反応器に適用し長期安定性を評価した. 不織布 14 mg を直径 2.0 mm のテフロンチューブに充填し, 反応温度はウォーターバスにより制御した. 基質溶液として(S)グリシドール(20 mM)と酪酸ビニル(300 mM)を含むイソオクタン溶液を線速度 5.4 mm/min にて 7 日間流通した．この線速度は出口転化率が 30%程度となるように設定した.

2.3　結果および考察

2.3.1　ポリビニルアルコール静電紡糸不織布の生産効率

既報(Taepaiboon *et al.* 2006; Son *et al.* 2005)の PVA 溶液の静電紡糸において，溶媒には水が用いられてきた．水のみを溶媒として用いた場合の生産効率は非常に低く，生産効率は 15%であった（Fig. 2-2)．そこで DMF を混合溶媒として添加することにより生産効率の向上を検討した結果，DMF を 3.4 wt%，6.9 wt%，10 wt%添加した場合に，水のみを使用した場合と同様に不織布が得られ(Fig. 2-3)，生産効率は 51%，68%，92%となり DMF の濃度に比例して生産効率は飛躍的に向上した. さらに高い DMF 濃度域での生産効率の変化を測定しようと検討したが，DMF 濃度を増加すると粘度が増加し，溶液が均一ではなくなったため 10 wt%を上限とした.

2.3.2　不織布の構造解析

不織布を SEM 観察し, さらに撮影した写真より不織布繊維の繊維径を測定した．Fig. 2-4 より印加電圧，電極間距離，PVA 濃度を変化せず，DMF の添加のみの効果により高い生産効率にて PVA 静電紡糸不織布を紡糸可能であることが示された．また DMF 濃度の増加に比例して不織布繊維の繊維径は増加した.

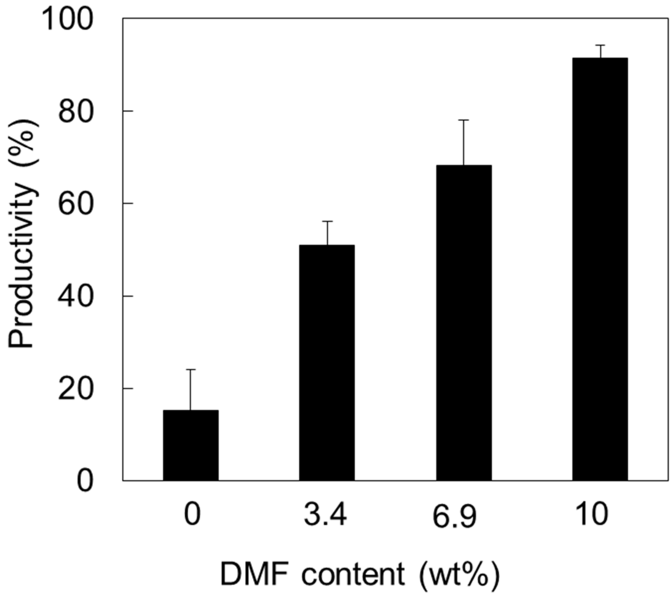

Fig. 2-2 Productivity of PVA fibers electrospun from 10 wt% PVA solutions containing DMF at 0, 3.4, 6.9 and 10 wt% . The bars represent standard deviations ($n = 3$).

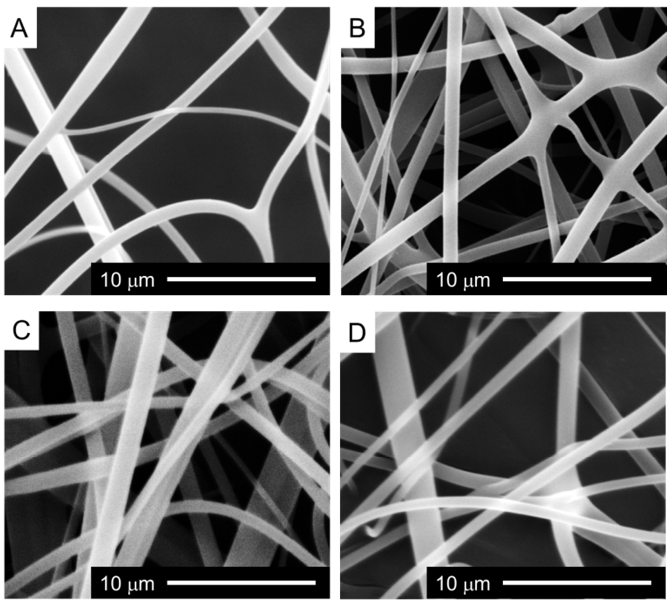

Fig. 2-3 SEM images of PVA fibers electrospun from 10 wt% PVA solutions containing DMF at 0 (A), 3.9 (B) and 10 wt% (C) under applied voltage of 20 kV, and DMF at 10 wt% under applied voltage of 30 kV(D).

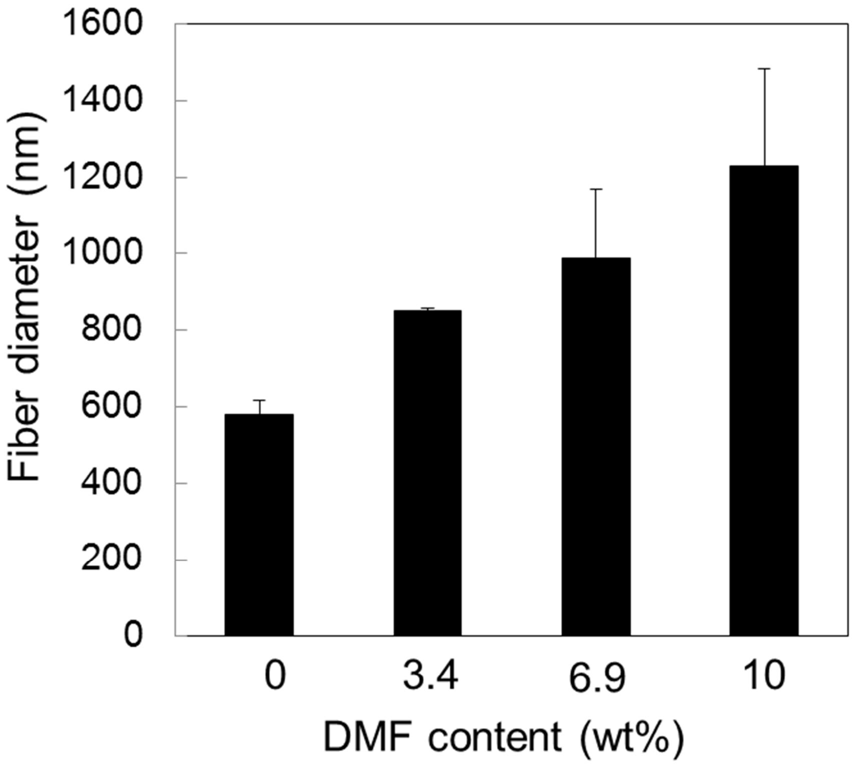

Fig. 2-4. Fiber diameters of PVA fibers electrospun from 10 wt% PVA aqueous solutions containing DMF at 0, 3.4, 6.9 and 10 wt%. The bars represent standard deviations ($n = 3$).

水のみを用いて紡糸した場合には580±38 nmであった繊維径は，DMFを10 wt%添加すると1230±254 nmに増加した．DMF濃度の増加にともなって繊維径は増加したが，繊維径は印加電圧により制御可能であることが知られており，DMFを10 wt%添加した場合に印加電圧を20 kVから30 kVに増大した結果，より細い(951±288 nm) 繊維を得ることができた．この結果から，印加電圧を制御することにより DMF を添加した場合も未添加時と同等の繊維径を有する繊維から構成される不織布を調製できることが明らかとなった．

2.3.3　紡糸溶液の物性評価

静電紡糸法において，溶液粘度と表面張力は紡糸に大きく影響を与える因子として知られている (Pattamaprom *et al.* 2006; Zhu *et al.* 2009; Yao *et al.* 2003)．DMFの混合によるPVA静電紡糸不織布の生産効率の向上について原因を議論するために，それぞれの溶液の粘度と表面張力を測定した．

結果として，溶液粘度はDMF濃度の増加とともに増加した．DMFを10 wt%含むPVA溶液の粘度(4.3 Pa·s)はDMFを含まない溶液の粘度(3.2 Pa·s)よりも36%高かった．これは，PVA の高分子鎖と DMF 分子との相互作用が水との相互作用よりも強いためであると考えられる．またDMFを3.4 wt%含むPVA溶液の表面張力(59 mN/m)は DMF を含まない溶液の表面張力(75 mN/m)よりも約20%低かった．これは，DMFの表面張力が低いためであると考えられる．さらにDMF濃度を増加した場合には表面張力の更なる低下は見られなかった．この結果より，粘度が生産効率の向上に寄与している唯一の因子であると考えられたため，DMF を添加した場合と同等の粘度をもつように PVA 濃度を調整し生産効率の測定を行うことで粘度と生産効率の関係を評価した．PVA 濃度を10wt%から10.3 wt%に増加し，生産効率を測定した結果，10.3 wt%PVA水溶

液の粘度は 3.9 Pa·s となり DMF 6.9 wt%と DMF10 wt%を含む PVA 溶液の粘度の間の値となった. しかしながら DMF を添加した場合と同等の粘度を有する 10.3 wt%PVA 水溶液の生産効率は 16%であり，DMF 6.9, 10 wt%添加した場合の生産効率 68%，92%の両方よりも大幅に低かった．これらの結果より，DMF の添加による生産効率の向上は表面張力の影響が大きく，DMF 濃度 3.4 wt%から 10 wt%に増加した場合の生産効率の増加に関しては溶液粘度の影響が大きいと考えられた．静電紡糸においては針先から溶液が吐出されある一定以上の電圧が印加されると溶液に付与された電気エネルギーが溶液の表面張力を上回ることによって，針先の溶液の形状がテイラーコーンと呼ばれる形状に変化することにより溶媒が蒸発し，高分子の繊維化が開始される(Reneker et al, 1996). 表面張力の低下による生産効率の向上は，表面張力の低下によりテイラーコーンを形成するために必要な電圧が低下したためであると考えられる(Pattamaprom *et al.* 2006; Yao *et al.* 2003; Koski *et al.* 2004).

2.3.4　リパーゼ固定化担体への応用

2.3.4.1　回分反応による活性評価

DMF を添加することで PVA 静電紡糸不織布の生産効率が飛躍的に増大することを示した．次にリパーゼを分散した PVA 溶液に DMF を添加して静電紡糸することによりリパーゼ固定化 PVA 静電紡糸不織布の調製を検討した．イソオクタン中にて(S)-グリシドールと酪酸ビニルより酪酸(S)グリシジルを生成するエステル交換反応を行い，反応初速度を測定することで固定化リパーゼの酵素活性を評価した.

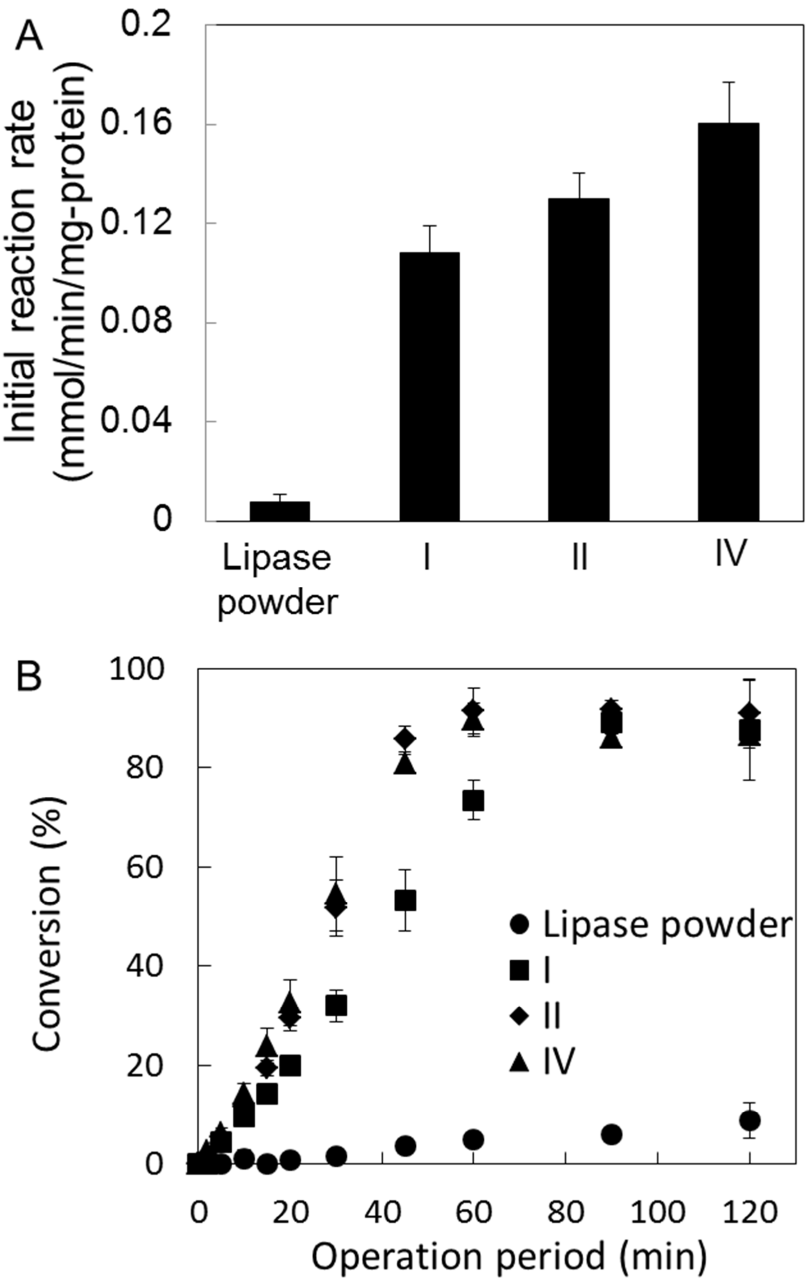

Fig. 2-5. Initial reaction rates (A) and time-conversion plots (B) of naked lipase (powder lipase), and immobilized lipase on PVA fibers electrospun from 10 wt% PVA aqueous solutions containing DMF at 0, 3.4 and 10 wt%. The numbers I, II and IV corresponds to the solvent samples denoted in Table 2-1. The bars represent standard deviations (n = 3).

結果として，DMF を添加せず水のみを用いて紡糸したリパーゼ固定化 PVA 静電紡糸不織布は，リパーゼ粉末を使用した場合の反応初速度と比較して 14 倍高い反応初速度を示した．この結果は，既報(Sakai *et al.* 2008)において Rhizopus oryzae 由来のリパーゼを水のみを溶媒として紡糸した PVA 静電紡糸不織布に固定化した場合と一致している．反応初速度の増加は，基質と酵素の拡散距離が短縮したこと，リパーゼが高分散固定化したことに起因すると考えられる．市販のリパーゼは，イソオクタンに不溶の安定剤に包括されており，直径約数十マイクロメートルの微粒子である．対して，PVA 静電紡糸不織布の場合は，リパーゼは PVA 溶液に溶解し，約 1 マイクロメートルの微細繊維に均一に分散し包括されるためより多くのリパーゼが基質分子と容易に接触できることから反応速度が向上すると考えられる(Sakai *et al.* 2008; Wang and Hsieh 2008)． DMF を 3.4，10 wt%含む溶液から調製したリパーゼ固定化 PVA 静電紡糸不織布は，水のみから調製した場合と比較してそれぞれ 1.2，1.5 倍の反応初速度を示した(Fig.2-5A)．DMF を用いて調製した固定化リパーゼを用いることで最大転化率に到達するまでの時間が短縮され(Fig. 2-5B)，DMF の使用の有無にかかわらず，最大転化率はいずれの場合も 85%程度であった．また DMF の使用により繊維径が増大したにもかかわらず反応初速度が有意に増加した結果は，基質と生成物の拡散抵抗が増加すると反応速度は低下するという予想(Wang *et al.* 2009; Huang *et al.* 2007)と矛盾していた．この矛盾は，2 つの理由によって説明できると考えられた．1 つ目の理由は，DMF と水の混合溶媒を用いたことで静電紡糸中に不均一な蒸発が起こり繊維に細孔が生成し，基質の拡散抵抗が低下することで反応速度が増加した可能性が考えられる．既報(Medeiros et al, 2008)によると，DMF を溶媒としたポリスチレン，ポリメチルメタクリレート，ポリ塩化ビニルの静電紡糸において，電極間の飛来中におけ

る相分離により細孔が生成すると考えられている. もう一つの理由として, DMF と接触することによってリパーゼが活性化した可能性が考えられる．DMF と接触し活性化したリパーゼが静電紡糸による瞬時の溶媒の蒸発によって固定化されたことが考えられる．Schrag らは(Schrag *et al.* 1997)，P. cepacia 由来のリパーゼは 1-プロパノールと接触することで活性化すると報告している.

2.3.4.2　流通管型反応器を用いた長期安定性評価

流通管型反応器を用いて DMF と水の混合溶媒系により調製したリパーゼ固定化 PVA 静電紡糸不織布の酵素活性の長期安定性を評価した. 結果を Fig. 2-6 に示す. 水のみを用いて調製した不織布と比較して DMF を添加することによる長期安定性への悪影響は確認されなかった．どちらの条件の不織布も測定期間中に急激な転化率の低下はなく, 1 日目を 100%とした場合に 8 日目には 10%低下したのみであった.

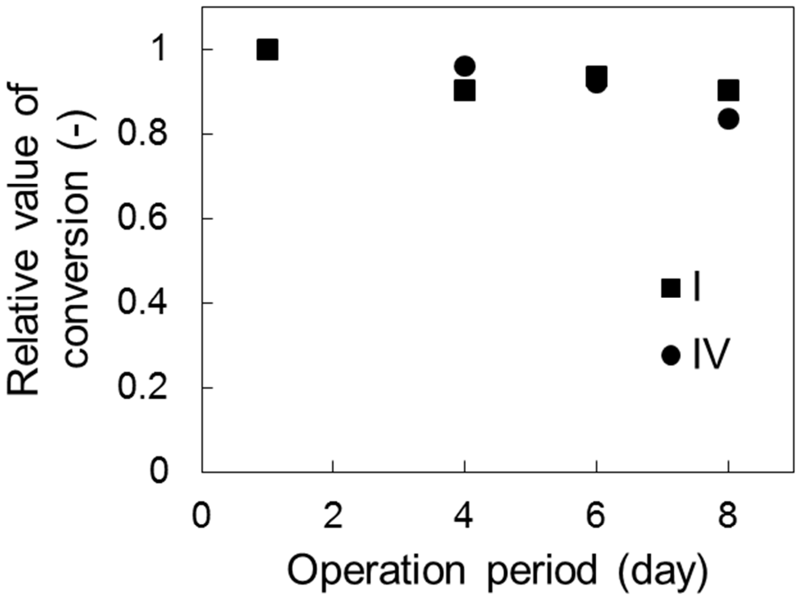

Fig. 2-6. Stability of catalytic activity of lipase encapsulated in PVA fibers electrospun from 10 wt% PVA aqueous solutions containing DMF at 0 and 10 wt%. The numbers I and IV correspond to the solvent samples denoted in Table 2-1.

2.4　結言

DMF と水の混合溶媒を PVA 溶液の静電紡糸に用いることで，生産効率の向上を検討し，以下の知見を得た．

(1)　水のみを溶媒とした場合に生産効率は 15%であったが，DMF を 10 wt%まで添加することで生産効率は 92%に向上した．

(2)　DMF 濃度の増加に伴って繊維径は増加したが, 印加電圧を増加することで繊維径を細くすることが可能であった．

(3)　DMF を用いて調製したリパーゼ固定化 PVA 静電紡糸不織布が水のみから調製した不織布と比較して 1.5 倍の反応初速度を示した．

(4)　管型反応器を用いた長期安定性評価において DMF を用いて調製したリパーゼ固定化 PVA 静電紡糸不織布は測定期間中に急激な転化率の低下はなく，8 日目には出口転化率が 10%低下したのみであった．

これらの結果より，DMF を混合溶媒として添加することにより PVA 静電紡糸不織布の生産性を向上することができることを示した．さらに，調製した静電紡糸不織布が有機溶媒中における酵素反応に適用可能なリパーゼ固定化担体として有用であることが実証された．

第 3 章 ナノ粒子分散液の静電紡糸とナノポーラス構造をもつ静電紡糸不織布の開発

3.1　緒言

多孔質材料は，触媒化学の分野で触媒の担持量や基質の拡散促進を目的として盛んに開発が行われている材料である．一般的に多くの材料において細孔構造の制御は困難であるが，比較的容易に様々な形状に加工することができさらに細孔制御が検討されている材料としてカーボン材料がある．カーボン材料は高い化学的または熱的安定性を有しており，触媒化学（Van de Vyver *et al.* 2012），エネルギーデバイス（Yan *et al.* 2006），センサー（Liu *et al.* 2009），環境浄化（Porada *et al.* 2012)の分野で盛んに研究が行われている．これまで開発されているカーボン材料の形状として，粉末（Sun and Li 2004），繊維（De Volder *et al.* 2013），薄膜（Novoselov *et al.* 2004)があげられるが，近年，静電紡糸法を用いて調製される微細なカーボンファイバー不織布が注目を集めている(Inagaki *et al.* 2012)．静電紡糸不織布の細孔構造は，大きな細孔（繊維間の空隙），マクロ細孔（>50 nm），メソ細孔（2-50 nm），ミクロ細孔（<2 nm)の 4 つに分類される（Inagaki *et al.* 2012)．それぞれの細孔は異なる用途に適した特徴を有している．触媒担体への応用において，繊維間の空隙と繊維表面のメソ細孔は重要であり，繊維間の空隙は繊維表面の細孔に担持された触媒へと基質を供給するための供給路となり，メソ細孔は触媒の担持量の増加と拡散距離の短縮に寄与すると報告されている．Wang ら(Wang and Caruso 2005)は 10-40 nm のメソ細孔をもつシリカ粒子にカタラーゼ，ペルオキシダーゼなどの酵素を固定化したところ，細孔を持たない粒子と比較して最大で 53 倍の重量の酵素を担持することが可能であったと報告している．静電紡糸不織布へのメソ細孔の

形成と制御を行う技術を開発することにより，高い体積基準の酵素活性を有する不織布型触媒の開発が期待される．

本章では，静電紡糸不織布へのナノ粒子の担持を通じたカーボンファイバー不織布へのメソ細孔の形成について検討した．これまでに報告されているカーボンファイバー不織布へのメソ細孔の形成法として，ポリアクリロニトリル(PAN)とポリメタクリル酸メチル(PMMA)を混合した静電紡糸不織布を焼成処理することにより平均 12 nm のメソ細孔を形成する手法が報告されている(Kim *et al.* 2007)．この手法はカーボンの前駆材料となる PAN と犠牲鋳型となる PMMA を静電紡糸し, 焼成することによって細孔構造を形成する手法であるが, 静電紡糸プロセスにおける紡糸可能性の観点から混合可能な PMMA の最大量に限界があるため，メソ細孔容積は約 0.5 cm^3/g と低く留まっている．

そこで本研究では，まず犠牲鋳型としてナノ粒子が焼結した静電紡糸不織布を調製し，カーボンを蒸着した後に鋳型を除去することによって，高いメソ細孔容積を有するカーボンファイバー不織布の調製を検討した．また調製される細孔の大きさをメソ細孔へと制御するために，直径 15 nm のシリカナノ粒子から構成される静電紡糸不織布を調製し鋳型として用いた．

3.2　実験

3.2.1　シリカナノ粒子分散ポリビニルアルコール紡糸溶液の調製と静電紡糸

Fig. 3-1 に本実験手順の概要図を示す．まず以下に記す方法で，犠牲鋳型となるシリカナノ粒子の不織布を調製するため，シリカナノ粒子を分散した高分子溶液の静電紡糸を行った．シリカナノ粒子の分散液を静電紡糸するための補助

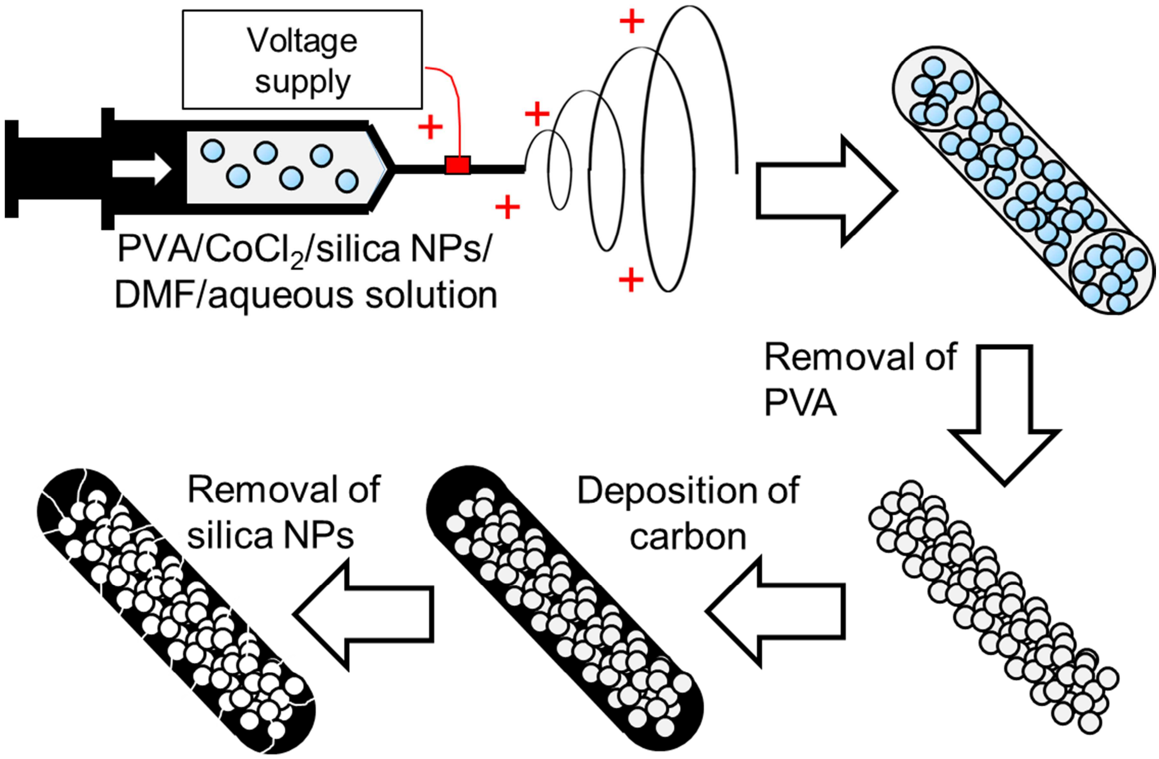

Fig. 3-1 Schematic illustration of procedure of stepwise fabrication of nanoporous carbon fibers by combination of electrospinnning, CVD reaction and phase separation.

剤として，ポリビニルアルコール（PVA)を使用した．まず PVA 粉末(Mw 146,000-186,000, Sigma-Aldrich)を蒸留水と混合し，120°C にて 20 分間処理することで 15 wt% PVA 水溶液を調製した．1 wt%塩化コバルト水溶液 3.9 g を撹拌しながら少しずつシリカナノ粒子分散液(Snowtex 30, Nissan chemical. Co.) 8.4 g に滴下した．塩化コバルトはカーボンの蒸着を促進するために混合した．シリカナノ粒子を含む塩化コバルト水溶液を PVA 水溶液 8.5 g と DMF1.7 g を混合し，第 2 章と同様の手法により静電紡糸した．5 ml プラスチックシリンジとステンレススチールの針(20G)を用いて電極間距離 15 cm，溶液の供給速度 2.0 ml/h，印加電圧 20 kV にて行った．

3.2.2　ナノ粒子を鋳型としたナノポーラス構造の形成

シリカナノ粒子を担持した静電紡糸不織布から PVA を除去するために，5˚C/min にて 500˚C まで昇温し，5 時間焼成した．次にカーボン蒸着をアルコールを用いた化学気相成長(CVD)法により行った．石英管（長さ 60 cm)の中に不織布を置き, メタノール溶液を通気した窒素ガスを 200 cm^3/min にて供給し 600˚C にて一定時間焼成することで CVD を行った．アセトンと蒸留水で不織布を洗浄し, 10 wt%水酸化ナトリウム水溶液に浸漬して 80˚C で 24 時間処理することにより，シリカナノ粒子の除去を行った．不織布を大量の蒸留水で洗浄後に凍結真空乾燥した．

3.2.3　TEM-EDX による構造解析

調製した不織布を蒸留水に分散し，TEM 用電子顕微鏡用グリッドに滴下，乾燥した．エネルギー分散型 X 線分析装置を備えた透過型電子顕微鏡(TEM-EDX, H-800EDX, Hitachi Co.)を用いて, 加速電圧は 200 kV にて不織布の構造観察と

元素分析を行った.

3.2.4　窒素吸着による細孔構造解析

不織布の細孔構造を窒素吸脱着等温線の測定により評価した．測定は，-196˚C にて自動ガス吸着量測定装置(Autosorb-1, Quantachrome)を用いて行った.比表面積と細孔容積はそれぞれ Brunauer-Emmett-Teller (BET)法, Brunauer-Joyner-Halenda (BJH)法により算出した.

3.2.5　シート抵抗測定による導電性評価

不織布へのカーボンの蒸着量を評価するために，シート抵抗測定により導電性を評価した．不織布を 1 辺 1 cm の正方形，平均厚み 35 mm に加工しガラス板上にて測定した．シート抵抗は抵抗測定器(RT-70V/RG-5, Napson Co.)を用いて四端子法により測定した.

3.2.6　ラマン分光分析

ラマン分光分析は，カーボン材料の結晶性を評価するために行われる分析法である．調製したカーボンファイバー不織布の結晶性を評価した．共焦点ラマン顕微鏡(HR-800，Horiba, Ltd.)を用い，レーザー波長 532 nm にてラマンスペクトルを測定した.

3.3　結果および考察

3.3.1　静電紡糸と TEM-EDX を用いた構造解析

塩化コバルトとシリカナノ粒子を含む PVA 静電紡糸不織布を調製した．静電紡糸後に白い不織布（Fig. 3-2(a)）が得られ，500˚C にて 5 時間焼成することで

薄い青色の不織布（Fig. 3-2(b)）が得られた．薄い青色は塩化コバルトが水和されていない状態で含まれていることを示している(Tsigara *et al.* 2007).

TEM 観察結果において PVA 除去後には，繊維の電子透過性が向上し繊維中の粒子の形状がより明確に観察された（Fig. 3-2(a), (b)）．この結果より，シリカナノ粒子が主な構成物であることが示唆された（Fig. 3-2(b)）．次に，CVD によるカーボンの蒸着を行った．CVD 後には TEM 観察において大きな構造変化は観察されなかった（Fig. 3-2(c)）が，不織布の色は白から黒へと変化した．この色の変化から不織布の内部または外部にカーボンが蒸着したことが示唆された．

さらに調製した不織布を水酸化ナトリウム水溶液に浸漬し 80˚C で 24 時間処理することで，内部に含まれるシリカナノ粒子を除去し，メソ細孔の形成を行った．結果として，水酸化ナトリウム処理後にも不織布の構造は保たれ（Fig. 3-2(d)），電子透過性の高い繊維と細孔構造が観察できた（Fig. 3-2(d)）．EDX により不織布の元素分析を行い，水酸化ナトリウム処理の影響を評価した．Fig. 3-3(a)-(f) に走査透過型電子顕微鏡（STEM）像と Si, Co の元素分析の結果を示す. CVD 後には Si のシグナルが強く検出されたことからシリカが多量に含まれることが確認された（Fig. 3-3(c)）. 水酸化ナトリウム処理後には Si シグナルはほぼ検出されなくなったこと（Fig. 3-3(d)）からシリカはほぼ残っていないことが示された．この結果は，シリカとカーボンの複合材料を 1M NaOH 水溶液にて 100°C にて処理することでほぼ全てのシリカを除去しナノポーラスカーボンを調製した結果(Jun *et al.* 2000)と一致する．一方，Co のシグナルは弱く，位置の特定，水酸化ナトリウム処理の影響を評価することは困難であった（Fig. 3-3 (e, f)）．これは，Co のナノ粒子が非常に微小である又は一部に凝集しているためであると考えられる.

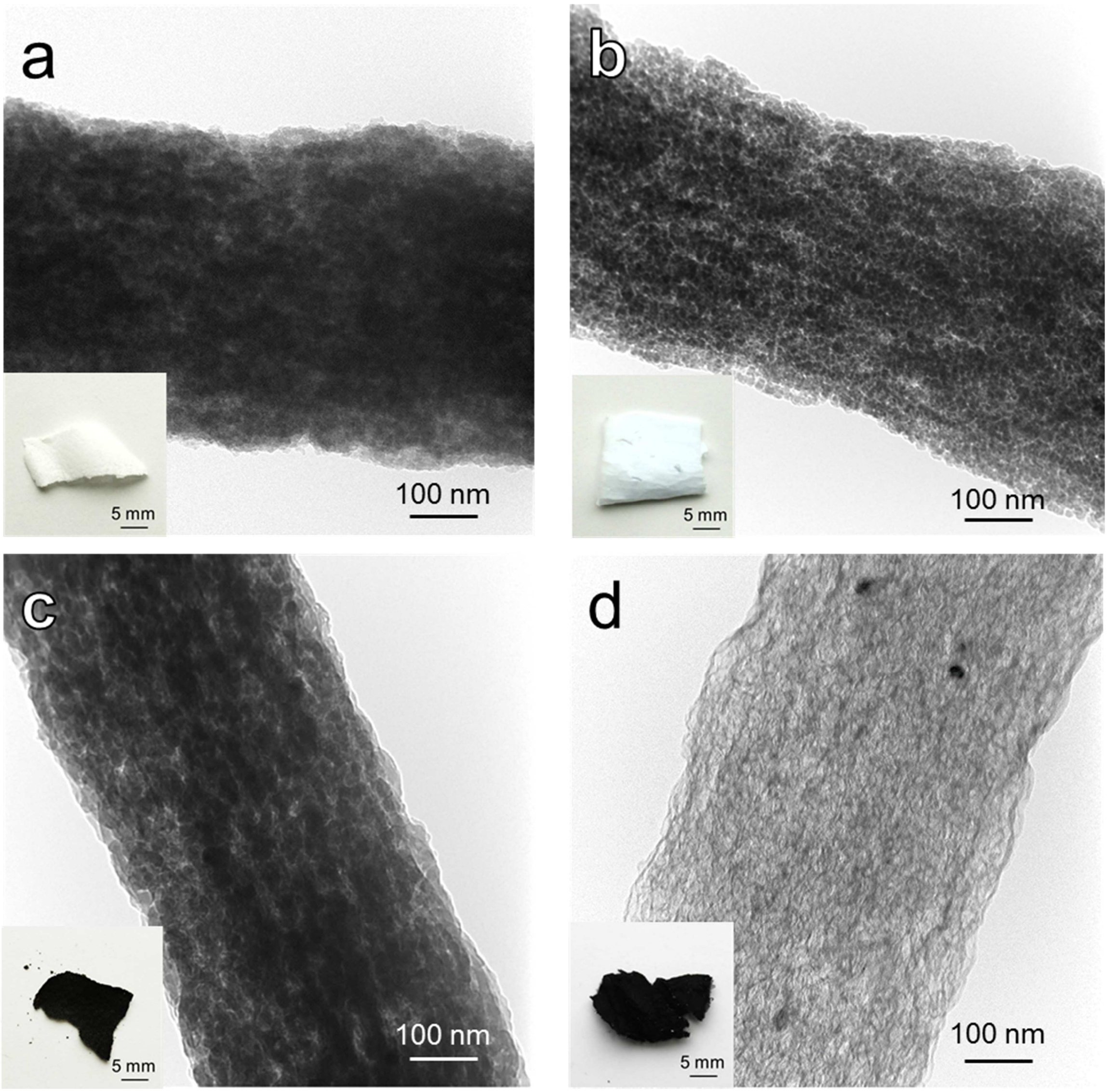

Fig. 3-2 Photographs and TEM images of the PVA/CoCl2/silica NP fibers as spun (a), after heat treatment at 500 °C for 5 h in air (b), after CVD reaction at 600°C for 24 h (c), and after NaOH treatment (d).

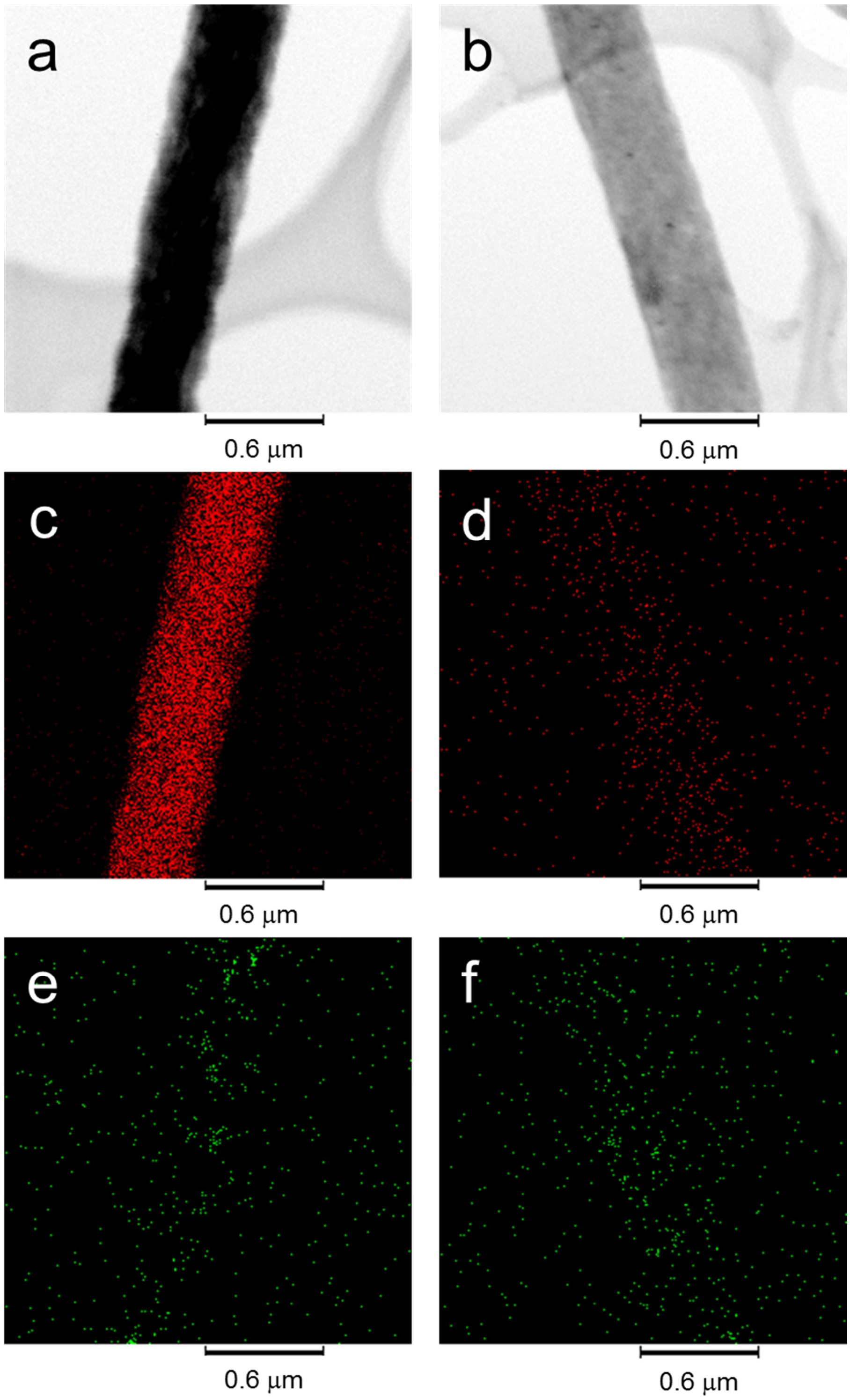

Fig. 3-3 STEM images (a, b) and element mapping by EDX spectroscopy of Si (c, d) and Co (e, f) of the fibers before and after NaOH treatment, respectively.

3.3.2　細孔構造解析

調製した不織布の細孔構造を窒素の吸脱着により評価した．Fig. 3-4 に CVD 後と水酸化ナトリウム処理後の不織布を用いて測定した窒素吸脱着等温線と細孔径分布を示す．水酸化ナトリウム処理後の不織布では，H1 型ヒステリシスループとともに IV 型の吸着等温線が得られた（Fig. 3-4(a)）．球形の細孔が多数焼結した構造体にて H1 型のヒステリシスループが得られたと報告されている (Kang *et al.* 2002)ことから，ナノ粒子を鋳型とした細孔の存在が示唆された．

また BJH 法により算出した細孔径分布より，水酸化ナトリウム処理後の不織布に多くのメソ細孔（2-50 nm）とマクロ細孔（>50 nm）が存在することが明らかとなった（Fig. 3-4(b)）．これは，複数のシリカナノ粒子が焼結し鋳型となって細孔を形成したためであると考えられる．窒素吸着法により測定した CVD 後と水酸化ナトリウム処理後の不織布の BET 表面積，細孔容積を Table 3-1 にまとめた．BET 表面積は水酸化ナトリウム処理により 4 倍に増加した．またメソ細孔容積は 0.26 から 1.33 cm^3/g へと増加した．得られたメソ細孔容積を既報 (Kim *et al*, 2007)と比較した結果，本章において調製した不織布は約 3 倍のメソ細孔容積を有していることが明らかとなった．さらに，Fig. 3-4(b)より細孔容積が 19 nm にて極大値を示していることから，粒子径 15 nm のシリカナノ粒子が鋳型となってメソ細孔が形成した可能性が示唆された．メソ細孔容積の増加に伴って全細孔容積も 0.37 から 1.67 cm^3/g と大幅に増加した．得られた不織布の全細孔容積は，ポリビニルピロリドン(PVP)を鋳型として PAN と混合し静電紡糸した不織布を焼成することによって調製したカーボンファイバー不織布の全細孔容積の 8.7 倍であった(Zhang *et al.* 2009)．これらの結果より，調製した不織布は非常に高い多孔性とメソ細孔容積を有することが明らかとなった．

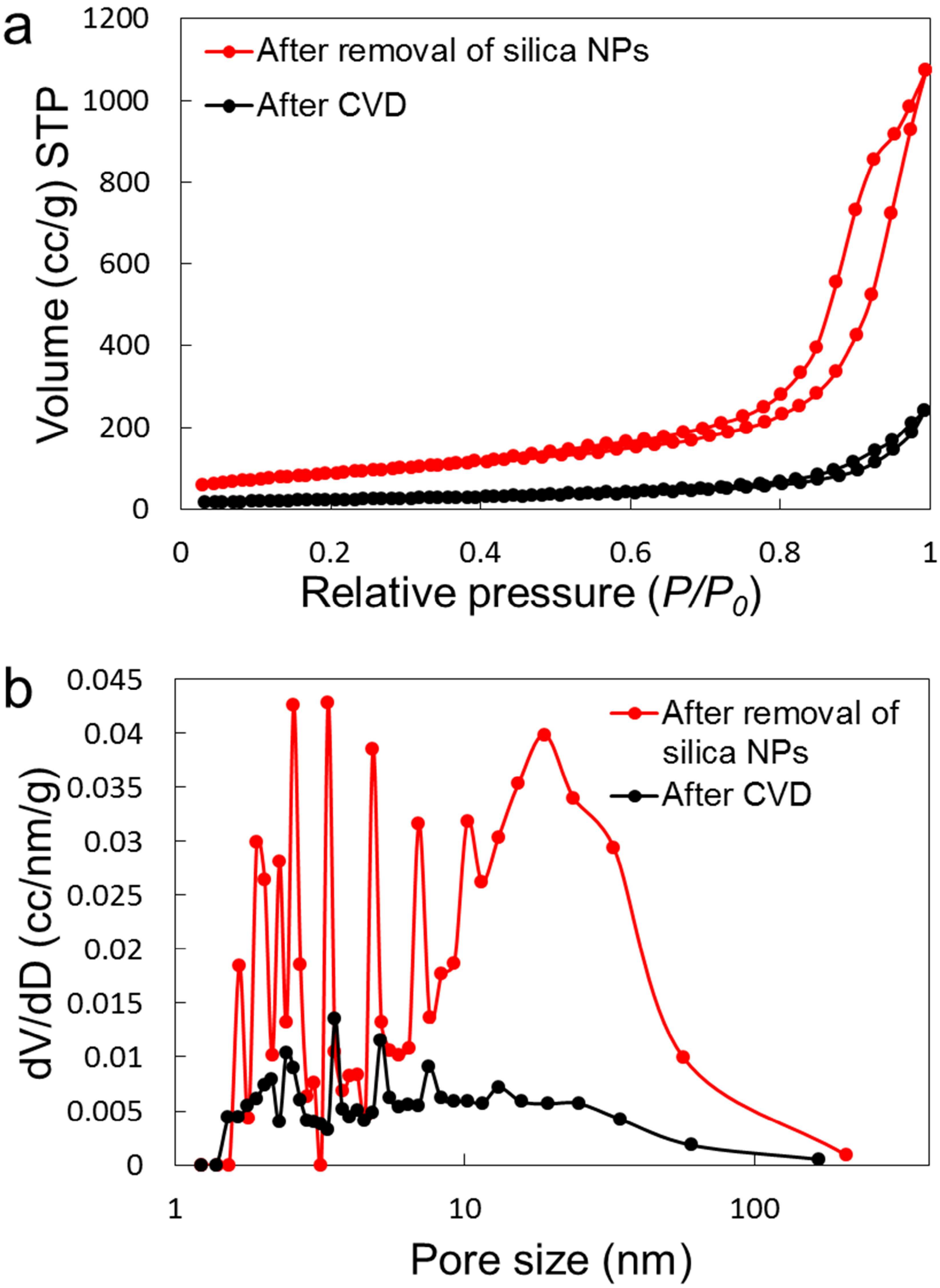

Fig. 3-4 Nitrogen adsorption/desorption isotherms (a), and pore size distributions (b) for the fibers after CVD reaction at 600°C for 24 h, and after NaOH treatment at 80°C for 24 h. STP, standard temperature and pressure (1 atm, 0°C).

Table 3-1 Surface area and pore volume distributions of the fibers

	S_{BET} (m^2/g)	V_{micro}[a] (cm^3/g)	V_{meso}[b] (cm^3/g)	V_{macro}[c] (cm^3/g)	V_{total} (cm^3/g)
Fibers after CVD	82	ND	0.26	0.11	0.37
Fibers after NaOH treatment	318	0.02	1.33	0.32	1.67

[a] Volume of micropores (<2nm). [b] Volume of mesopores (2-50nm). [c]Volume of macropore (>50 nm). ND: not detectable.

3.3.3　シート抵抗への CVD 時間の影響

CVD 後に得られる不織布の導電性を調べることによりカーボン蒸着の進行度を評価した．CVD 時間 15 分では，導電性は示さなかった．そこで反応時間を 1 時間まで延長したところ導電性を示し，シート抵抗は 477 ± 66.4 Ω/□ (n = 3) であった．さらに反応時間を 5 時間にすることで，抵抗値は 56.3± 1.47 Ω/□ (n = 3) に低下した. 反応時間を 24 時間とした場合は, 抵抗値は 35.1± 4.82 Ω/□ (n = 3) と 5 時間の場合と同等の値を示したことから，CVD を 5 時間行うことで繊維の内外を覆うために十分な量のカーボンが蒸着したと考えられた．これらの抵抗値は，既報(Inagaki *et al.* 2012)において調製されたカーボンファイバー不織布の抵抗値よりも高い．カーボン材料はその結晶構造の差異により導電体にも半導体にも成り得るとされており(Ebbesen *et al.* 1996)，CVD において原料，圧力，温度を制御することで電気的特性，結晶性を制御可能であることから(Kumar and Ando 2010)，本研究において蒸着したカーボンの結晶性や構造は CVD プロセスを最適化することで制御可能であると考えられる．

3.3.4　ラマン分光分析

カーボンの結晶性は，導電性や疎水性などに大きく影響する重要な性質である．Fig. 3-6 に CVD を 24 時間行い，水酸化ナトリウムを処理した後の不織布のラマン分光分析の結果を示す．1358 cm^{-1} と 1581 cm^{-1} のピークはそれぞれ D バンド，G バンドと呼称され，前者はグラファイトの結晶構造の欠陥構造に起因するピーク，後者はグラファイト様の結晶構造に起因するピークである (Robertson 2002). D バンドと G バンドの比（D/G 比）はカーボン材料の結晶性を評価する指標として用いられる（Ferrari and Robertson 2000）．調製した不織布の D/G 比は 1.02 となったことから，欠陥構造の多い非晶質なカーボンで

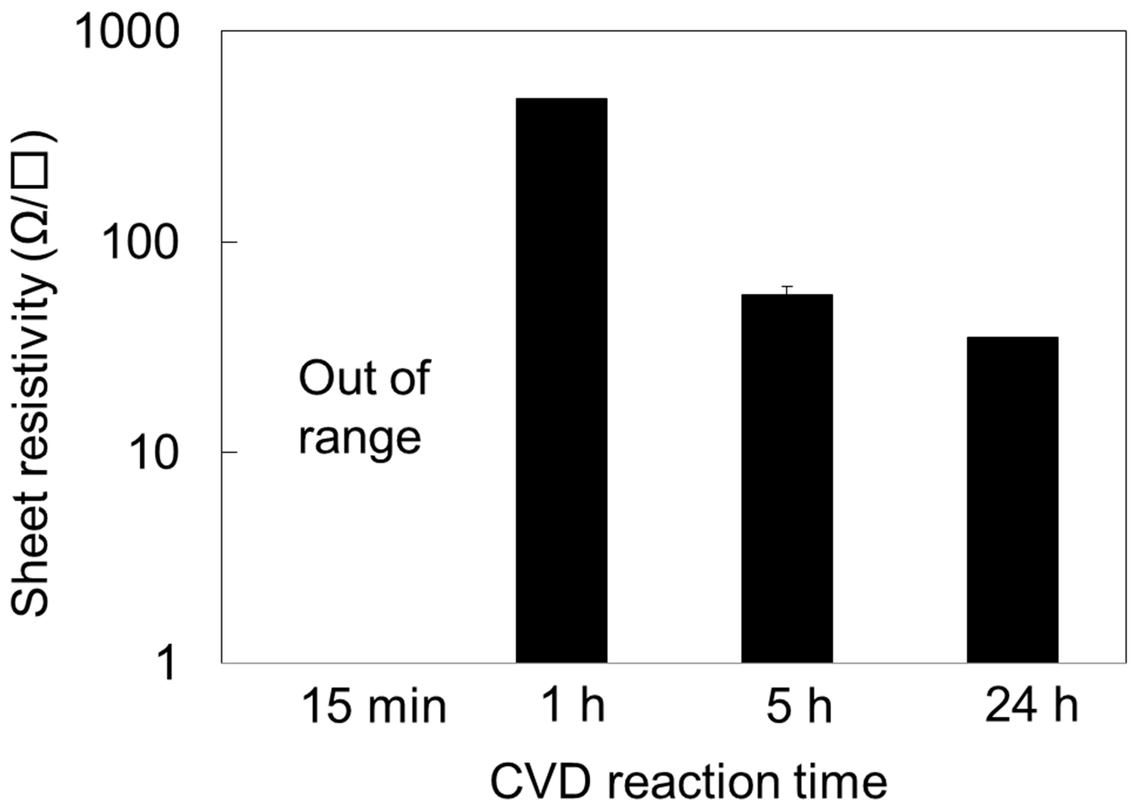

Fig. 3-5 Effect of CVD reaction time on sheet resistivity of the fibers after CVD reaction at 600°C for 24 h and NaOH treatment at 80°C for 24 h.

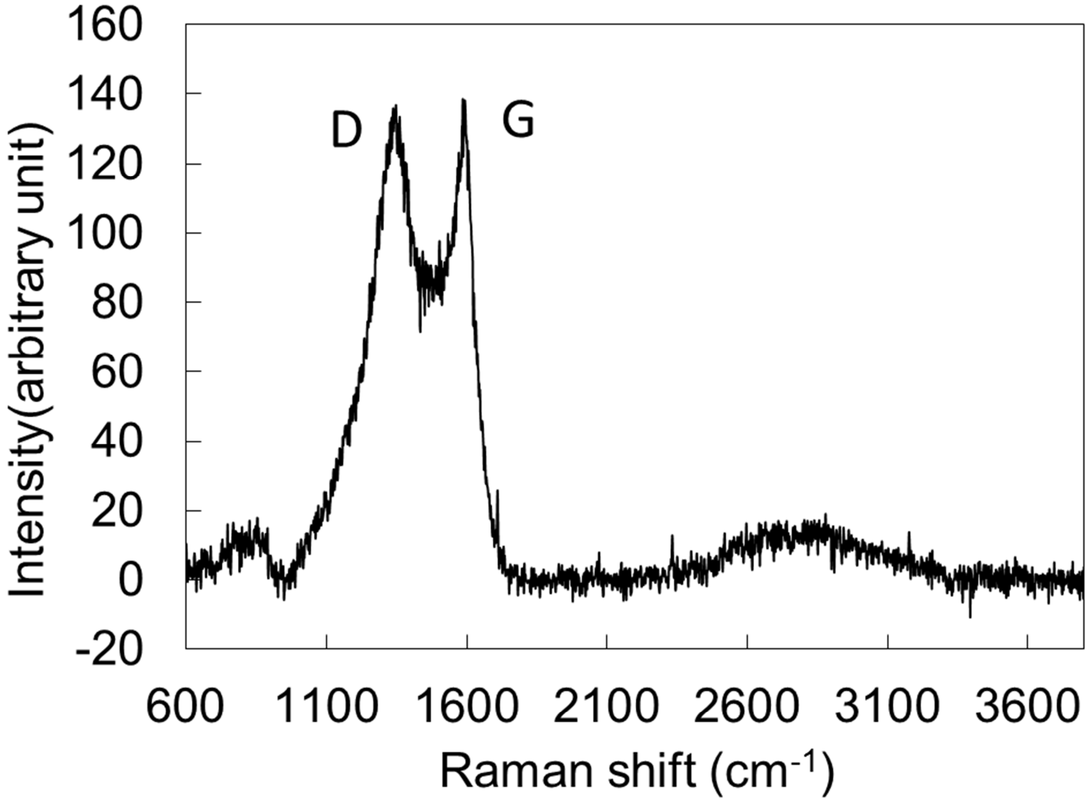

Fig. 3-6　Raman spectrum of the fibers after CVD reaction at 600°C for 24 h.

構成されることが明らかとなった.

3.4　結言

ナノ粒子を分散した PVA 溶液の静電紡糸と CVD を組み合わせてメソ細孔を有する静電紡糸不織布と同様の構造を有する不織布の調製を検討し，以下の知見を得た.

(1)　塩化コバルトとシリカナノ粒子を含む PVA 溶液を静電紡糸し，空気焼成により PVA を除去することで，シリカナノ粒子を主な構成物とする不織布を調製した.

(2)　さらに，CVD を 5 時間以上行うことにより，繊維の内外にカーボンを蒸着することで導電性を示すカーボンファイバー不織布を調製した.

(3)　調製した不織布から水酸化ナトリウムを用いてシリカを除去し，TEM 観察と窒素ガスの吸脱着により構造解析を行った結果，ナノポーラス構造を有するカーボンファイバー不織布の調製に成功した．メソ細孔容積は 1.33 cm^3/g，全細孔容積は 1.67 cm^3/g であった．調製したメソ細孔構造を多く有する不織布は，酵素の固定化担体として有用であると考えられる.

第 4 章 その場(in situ)合成した金ナノ粒子担持静電紡糸ファイバー不織布の触媒活性制御

4.1　緒言

特異な触媒活性を示す金属ナノ粒子として, 金ナノ粒子がある（Haruta *et al.* 1987; Haruta 1997）．金ナノ粒子の触媒活性はサイズに依存して，5 nm 以下の粒子が特に高い活性を示すと報告されている（Haruta 1997; Lopez *et al.* 2004)．金ナノ粒子を触媒として使用する場合には，回収，再利用を容易にするために固体表面への担持を行うことが求められる. そのため粒子径を 5 nm 以下に保ちながら固体表面に担持する技術の開発が求められてきた．近年，高い多孔性と物質透過性を兼ね備えた担体として静電紡糸不織布への金ナノ粒子の担持が盛んに検討されている（Fang *et al.* 2011; Kim and Ahn 2008; Wang *et al.* 2007; Zhu *et al.* 2012)．多孔性の高い静電紡糸不織布を担体として用いることにより触媒体積当たりの金ナノ粒子の触媒活性を飛躍的に向上することが可能になると考えられる(Fang *et al.* 2011; Anka *et al.* 2012)．金ナノ粒子の合成において 5 nm 以下の粒子径に抑えるためには，金原子と化学的に相互作用する官能基の利用が必要である．金原子と強く相互作用する官能基としてアミノ基(Fang *et al.* 2011)，シアノ基（Zhu *et al.* 2012)，チオール基（Jadzinsky *et al.* 2007)などが報告されている．そこでポリアクリロニトリル(PAN)はシアノ基を多数有しているおり，容易に静電紡糸され，500 nm 以下の直径の繊維から構成される不織布を調製することができることから微細な金ナノ粒子を担持可能な静電紡糸不織布材料として注目検討されている(Zhu *et al.* 2012; Anka *et al.* 2012)．第 1 章で述べたように，静電紡糸不織布へのナノ粒子の担持法は 2 つの方法に大別され，金ナノ粒子を分散した PAN 溶液を静電紡糸する手法と塩化金

酸を混合したPANを静電紡糸し不織布を調製した後に金ナノ粒子を合成するその場合成法の 2 種類がある．その場合成法においては静電紡糸の過程での凝集制御を考慮する必要がなく，PAN のシアノ基を用いて金ナノ粒子を分散担持可能であると報告されている（Zhu *et al.* 2012)．そこで本章では，その場合成法による金ナノ粒子のPAN静電紡糸不織布への高分散担持において合成法を制御することにより，粒子径，分散性，および触媒活性の制御を検討した．金ナノ粒子の合成法は，化学的または物理的手法により還元する方法が報告されており（Zhu *et al.* 2012; Anka *et al.* 2012)，本章では紫外線照射による合成を選択した．塩化金酸に波長 250-400 nm の紫外線を照射することにより金ナノ粒子が形成されると報告されている（Eustis *et al.* 2005)．複数の濃度の塩化金を含む PAN 静電紡糸不織布を調製し，紫外線の照射時間を変化することで紫外線照射によって形成する金ナノ粒子の制御を検討した．さらに，複数の濃度の塩化金酸を含む溶液を紡糸し，調製した金ナノ粒子担持不織布を触媒体積が一定となるように用いて 4-ニトロフェノール(4-NP)の還元反応を行うことにより触媒体積当たりの触媒活性を評価した（Fig. 4-1)．$NaBH_4$ の存在下における 4-NP の還元反応は，遊離または担持された貴金属ナノ粒子の触媒活性を定量的に評価するために用いられる反応であり，貴金属ナノ粒子が $NaBH_4$ と反応することでメタルハイドライドを形成し，4-NP が吸着することで金ナノ粒子表面の水素種と反応し還元されると考えられている（Wunder et al, 2010; Zhang et al, 2009; Liu et al, 2009; Guella et al, 2007; Kaufman et al, 1985)．この反応は分光光度計を用いて紫外可視吸収(UV-vis)スペクトルを測定することで容易にモニタリング可能であることが利点となっている．

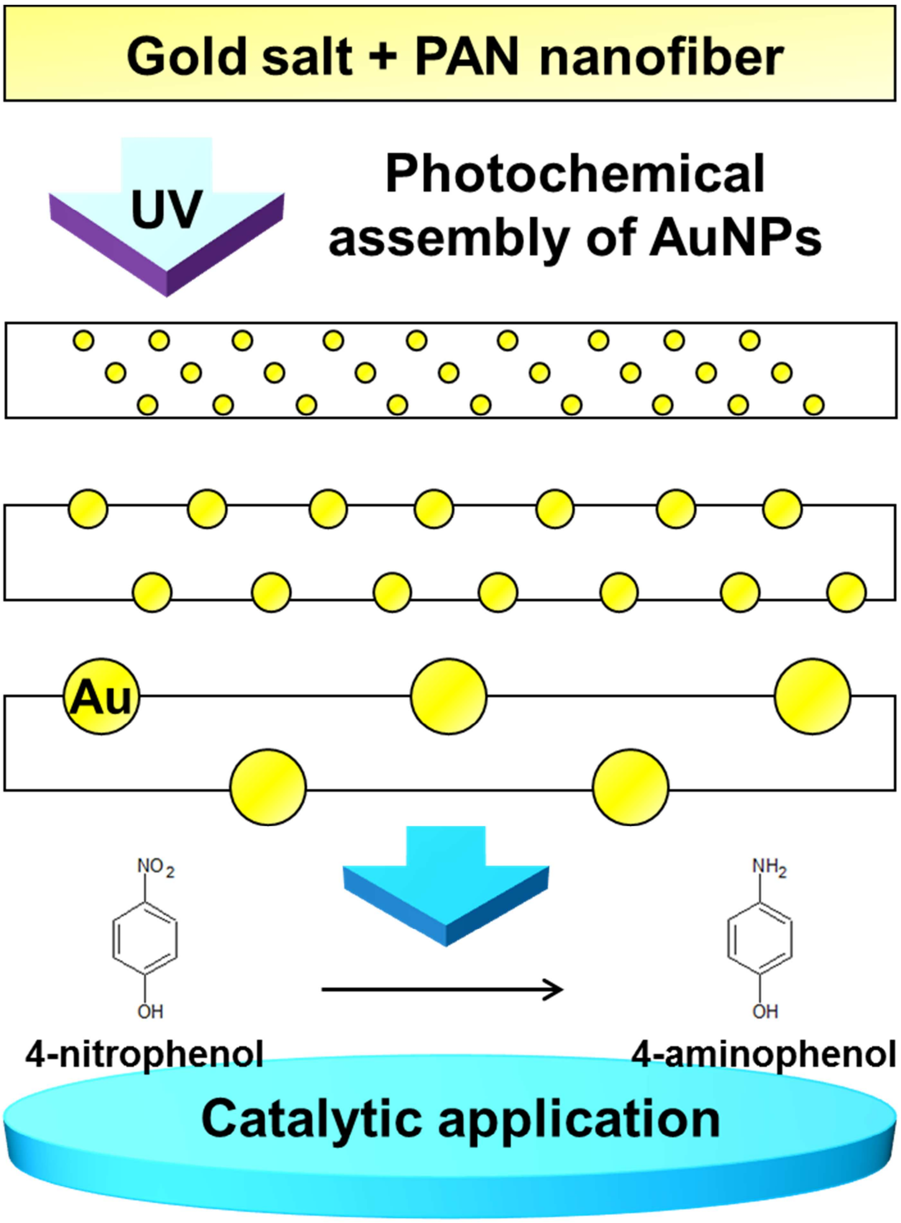

Fig. 4-1 Schematic illustration of in situ formation of gold nanoparticles in/on PAN nanofibers and catalytic applications.

4.2　実験

4.2.1　塩化金酸とポリアクリロニトリル混合溶液の静電紡糸と紫外線照射

まず PAN と塩化金酸を混合し紡糸溶液の調製を行った．PAN（Polysciences Inc., Mw 150, 000）を 14 wt%となるように DMF に分散し，50 ˚C にて透明になるまで加熱した. 塩化金酸四水和物粉末 (Kanto Chemical Corp.)を 1, 5, 10 wt%となるように DMF に溶解した．調製した PAN 溶液と塩化金酸四水和物溶液を混合して 1 時間室温にて撹拌した．調製した溶液を第 2 章で述べた手法と同様に静電紡糸した. 紡糸溶液を 5 ml のプラスチックシリンジに充填し，供給速度 2.0 ml/h にてステンレススチールの針(20G)から吐出し電圧 20 kV を印加することで静電紡糸し，距離 15 cm 離れたコレクターに捕集した．捕集した不織布は，真空乾燥を 48 時間行った後，冷蔵保存した．塩化金酸と PAN の混合溶液から調製した不織布を全溶質量中に含まれる金濃度をもとに Au3，Au13，Au21 と呼称した．不織布をピーク波長 253.7 ナノメートルの紫外線ランプ(UV-lamp GL15，Toshiba Corp.)から 60 cm 離れた場所に置き，室温にて 1，3，または 5 日間照射した．観察，触媒活性評価のために大量の水で洗浄した後，凍結真空乾燥した.

4.2.2　金ナノ粒子担持静電紡糸不織布の構造解析

紡糸後および紫外線照射後の静電紡糸不織布を走査型電子顕微鏡（S-2250N, Hitachi Ltd.), 電界放出形走査電子顕微鏡（FE-SEM, S-5000L, Hitachi Ltd.), および透過型電子顕微鏡（TEM，H-800，Hitachi Ltd.)を用いて観察した．TEM 観察により観察された金ナノ粒子の粒子径を測定した．5 枚以上の TEM 写真から 300 個以上の異なる粒子を測定することで決定した. 塩化金を含む PAN 溶液の静電紡糸において一部の塩化金が紡糸に伴って相分離しナノ粒子が形成され

ると報告されている(Marx *et al.* 2011)．紫外線照射による金ナノ粒子の形成のみを評価するために，紡糸後の不織布に存在していた粒子よりも大きな粒子径の粒子を全てのサンプルにおいて測定対象外とした．また金ナノ粒子の形成をUV-vis，X 線光電子分光（XPS)，X 線回折(XRD)スペクトルの測定により評価した．XPS スペクトルはアルミニウム Kα(1486.6 eV)を X 線源として測定した．

4.2.3　4-ニトロフェノールの還元反応における触媒活性評価

触媒活性評価を行うために，重量測定後に 30 分間超音波処理を行って不織布を水に分散した．反応液として 10 mM 4-NP (12.2 μl)，2 M $NABH_4$ (24.4 ml)，蒸留水（1.46 ml）を石英キュベット（1 cm)に添加し，さらに不織布分散液(150 μl)を添加することにより反応を開始した．水素化ホウ素ナトリウム（$NaBH_4$，Wako Pure Chemical Industries Ltd.)の存在下，4-NP (Wako Pure Chemical Industries Ltd.)から 4-アミノフェノール(4-AP)への還元反応を行い触媒活性を評価した(Fang *et al.* 2011; Koga *et al.* 2010; Chang and Chen 2009; Kuroda *et al.* 2009; Huang *et al.* 2009)．任意の時間経過後に分光光度計（V-630BIO，JASCO Co.)を用いて 200-500 nm の範囲にて反応液の UV-vis スペクトルを測定した．触媒量は触媒体積が一定となるように Au3，Au13，Au21 不織布のそれぞれについて 0.07，0.14，0.20 mg-fibers/ml とした．触媒体積は PAN と金の密度，それぞれ 1.18 g/cm^3，19.3 g/cm^3 から算出した．紫外線照射時間の影響評価には Au21 不織布を用いた．対照実験として金ナノ粒子を含まない不織布を用いた場合には同様に触媒体積が一定となるように触媒量は 0.048 mg-fibers/ml とした．

4.3　結果および考察

4.3.1　金ナノ粒子担持 PAN 静電紡糸不織布の調製と SEM 観察

塩化金酸と PAN の混合不織布を調製と紫外線照射による金ナノ粒子の形成を行った．紫外線照射による金ナノ粒子の担持は化学的手法と比較して，形成を制御可能である，廃液の処理が必要ないという利点がある(Sakamoto *et al.* 2009)．塩化金酸濃度，紫外線照射時間をパラメーターとして変化し，金ナノ粒子の形成制御を検討するため，まず塩化金酸と PAN の混合溶液の静電紡糸を行った．結果として，黄色の不織布が得られ(Fig. 4-2 (a))，SEM 観察より直径 300 nm 以下の微細な繊維で構成されていることが確認できた（Fig. 4-2 (c, d, e)）．塩化金の濃度を変化しても同等の繊維径の不織布が得られた．調製した不織布に紫外線を 1 日間照射した結果，不織布の色は紫色へと変化した(Fig. 4-2(b))．金ナノ粒子は，表面プラズモン共鳴現象により赤色や紫色を示す(Nath and Chilkoti 2002)．また FE-SEM により紫外線を 5 日間照射した Au13 不織布の表面を観察したところ，ナノ粒子の存在が多数観察された（Fig. 4-3）． Fig. 4-4 に Kurihara らによって提案されている塩化金への光照射による金ナノ粒子の直接形成機構を示す(Kurihara *et al.* 1983)．塩化金酸に含まれる Au^{3+}イオンが光照射により励起され不安定な Au^{2+}へと変化する．Au^{2+}が Au^{+}と Au^{3+}に不均一化した後，Au^{+}が光子を吸収することで還元され金ナノ粒子が形成されると考えられている（Eustis *et al.* 2005; Sakamoto *et al.* 2009）.

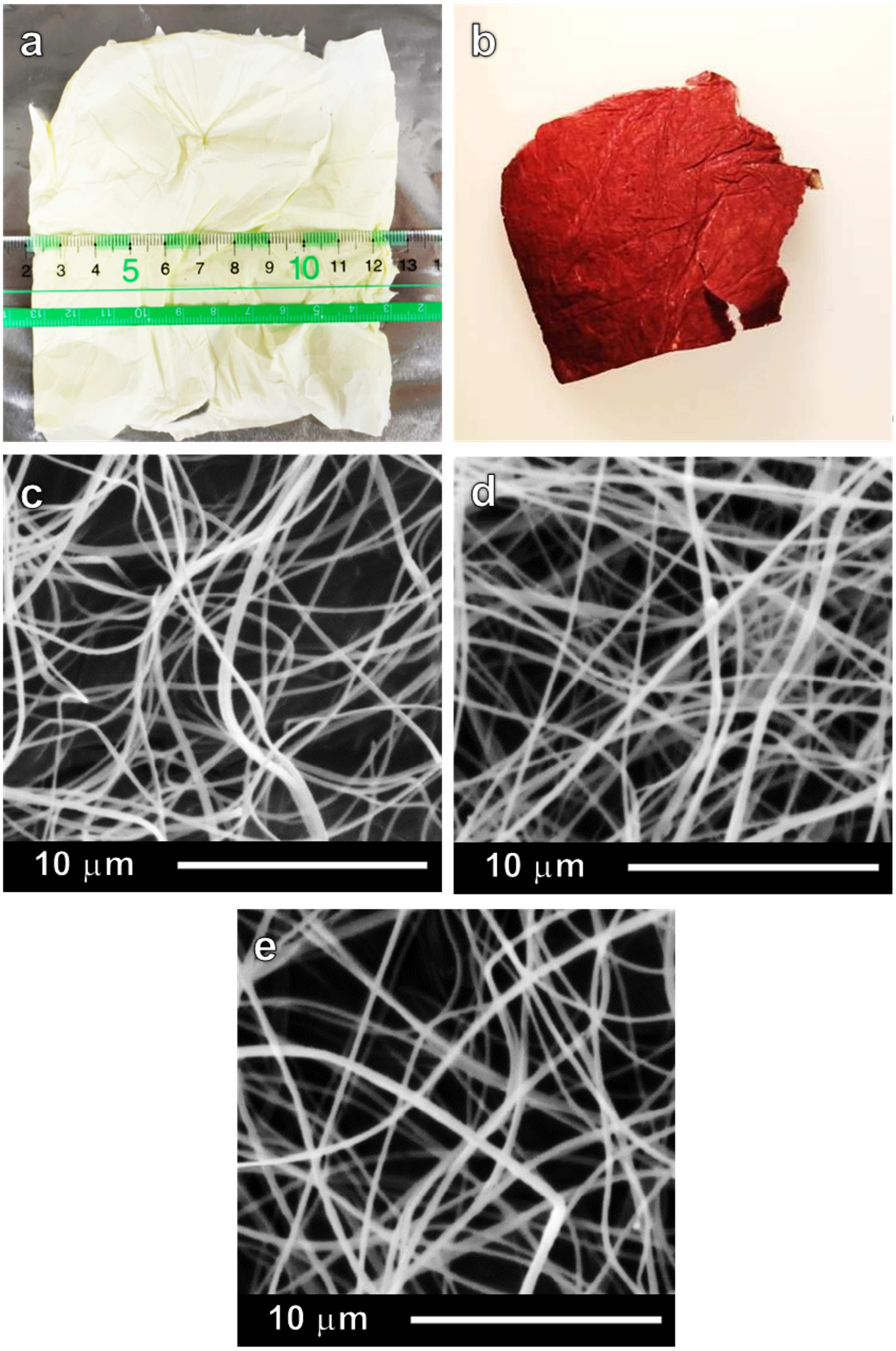

Fig. 4-2　Photographs of Au21 fibers before (a) and after (b) UV irradiation and SEM images of Au3(c), Au13(d), and Au21(e) fibers.

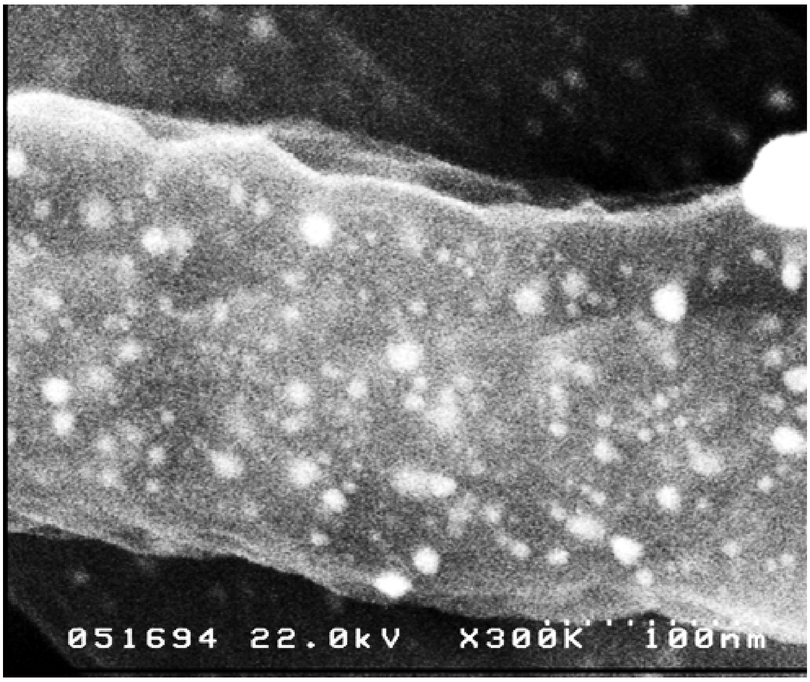

Fig. 4-3 FE-SEM image of Au13 fibers after UV irradiation for 5 days.

$$(HAu^{3+}Cl_4) \xrightarrow{h\nu} (HAu^{3+}Cl_4)^* \quad \text{Excitation}$$

$$(HAu^{3+}Cl_4)^* \rightarrow (HAu^{2+}Cl_3{\bullet\bullet\bullet}Cl) \quad \text{Reduction}$$

$$(HAu^{2+}Cl_3{\bullet\bullet\bullet}Cl) \rightarrow (HAu^{2+}Cl_3 + Cl) \quad \text{Dissociation}$$

$$2HAu^{2+}Cl_3 \rightarrow HAu^{3+}Cl_4 + HAu^{+}Cl_2 \quad \text{Disproportionation}$$

$$HAu^{+}Cl_2 \xrightarrow{h\nu} Au^0 + HCl + Cl \quad \text{Photoreduction}$$

$$nAu^0 \rightarrow (Au^0)_n \quad \text{Nanoparticle formation}$$

Fig. 4-4 Proposed mechanism of photochemical assembly of gold nanoparticles from gold salt.

4.3.2　金ナノ粒子担持静電紡糸不織布の TEM 観察と分光分析

紫外線照射により形成したナノ粒子の観察と粒子径測定を行うために，不織布の TEM 観察を行った．TEM 写真より塩化金酸と PAN の混合不織布に紫外線照射を行うことで微細な金ナノ粒子が形成され，粒子径は照射時間に伴って増大することが示唆された．また金ナノ粒子の粒子径を測定したところ，紫外線を 1，3，5 日間照射した場合の金ナノ粒子の粒子径は，それぞれ 2.7 ± 1.4，5.0 ± 1.4，5.2 ± 1.6 nm (n = 3)であった．この粒子径は既報において紫外線照射により得られた金ナノ粒子の粒子径(5.8 nm)よりも小さい(Anka *et al.* 2012)．この結果は, 既報において静電紡糸の際に不織布に微量に残存した DMF を除去せずに紫外線照射を行ったため，DMF が塩化金に保護配位したこと(Kawasaki *et al.* 2010)に起因すると考えられる．次に粒子径への塩化金濃度の影響について評価した．Au3，Au13，Au21 不織布に紫外線を 5 日間照射し TEM 観察により金ナノ粒子の粒子径を測定した．塩化金の濃度を増加すると金ナノ粒子の粒子径は大きくなることが予想されたが，4.8 ± 1.2，5.4±1.4，5.2±1.6 nm (n = 3)とほぼ一定であった．これは PAN に含まれるシアノ基の保護配位作用に起因すると考えられ，塩化金酸の濃度を増加することで一定の粒子径の粒子をより多く担持することができると考えられる．さらに TEM 観察により金の結晶格子が確認でき（Fang *et al.* 2011; Zhu *et al.* 2012)，XPS スペクトル，XRD スペクトル, UV-vis スペクトルからも金の結晶が生成したことが確認できた（Fig. 4-6).

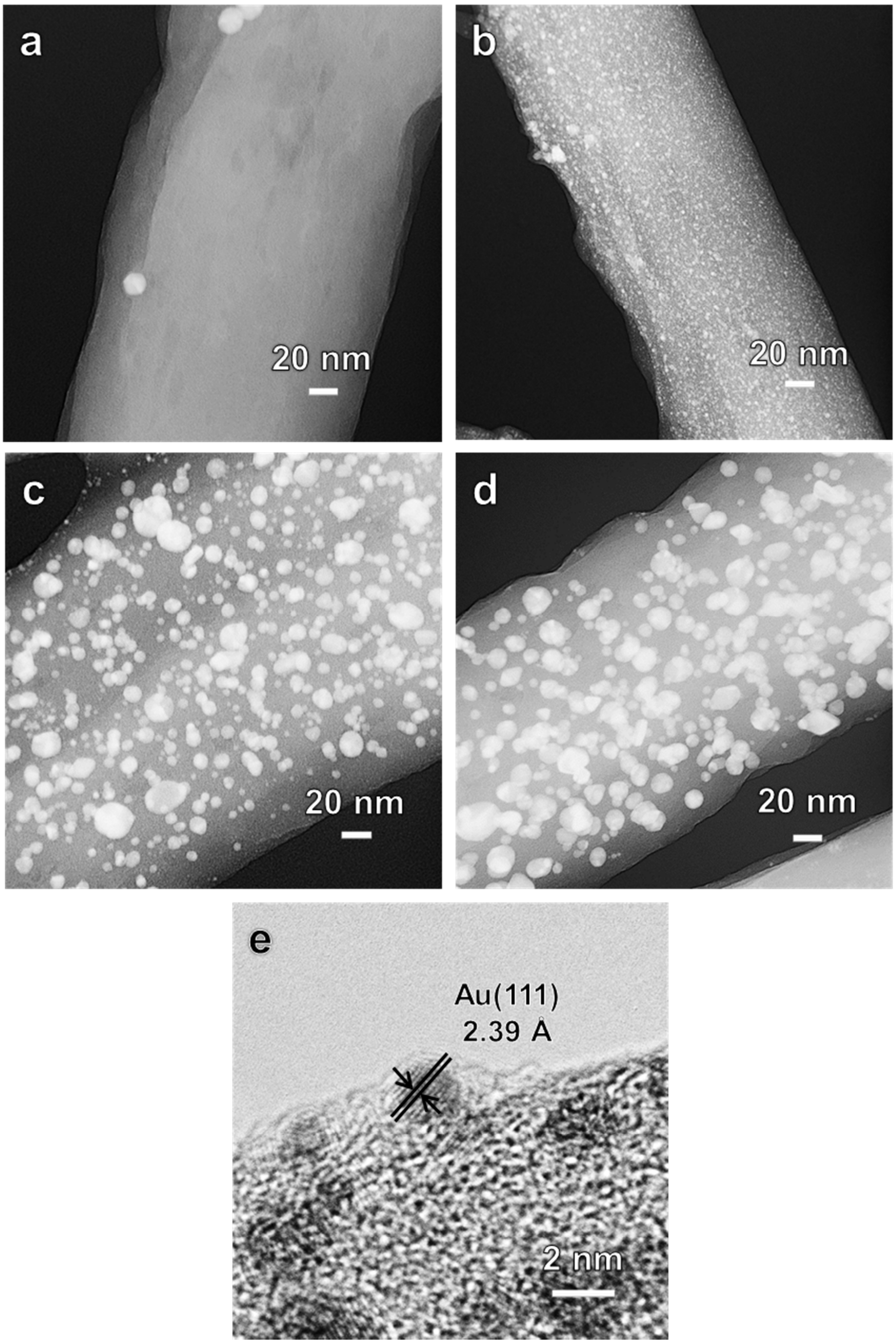

Fig. 4-5 TEM images of AuNPs in/on Au21 fibers prepared by UV irradiation for 0 (a) 1 (b), 3 (c), 5 (d) days. (e) High-resolution TEM image of AuNPs in/on Au21 fibers prepared by UV irradiation for 1day.

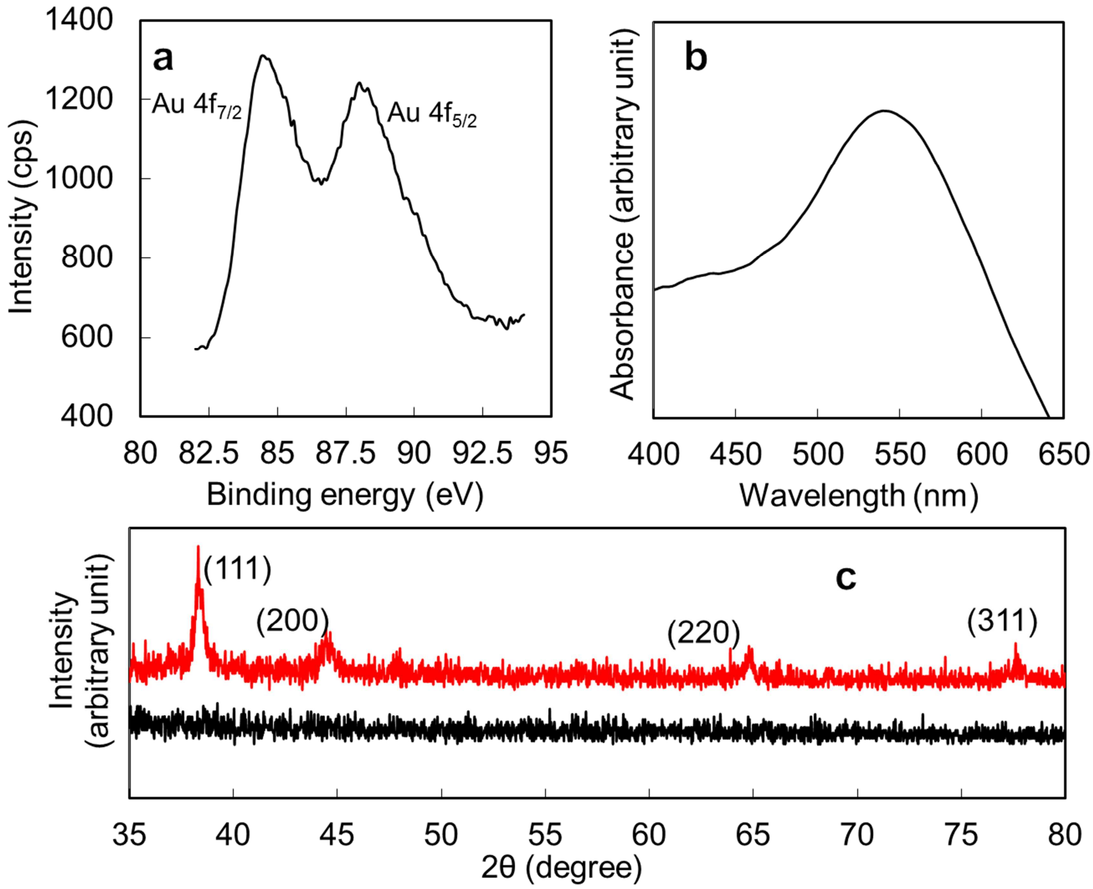

Fig. 4-6 (a)XPS spectrum of Au 4f, (b) UV-vis spectrum of AuNPs in/on Au21 fibers prepared by UV irradiation for 5 days. (c) XRD patterns of Au21 fibers before (black) and after UV irradiation for 5 days (red).

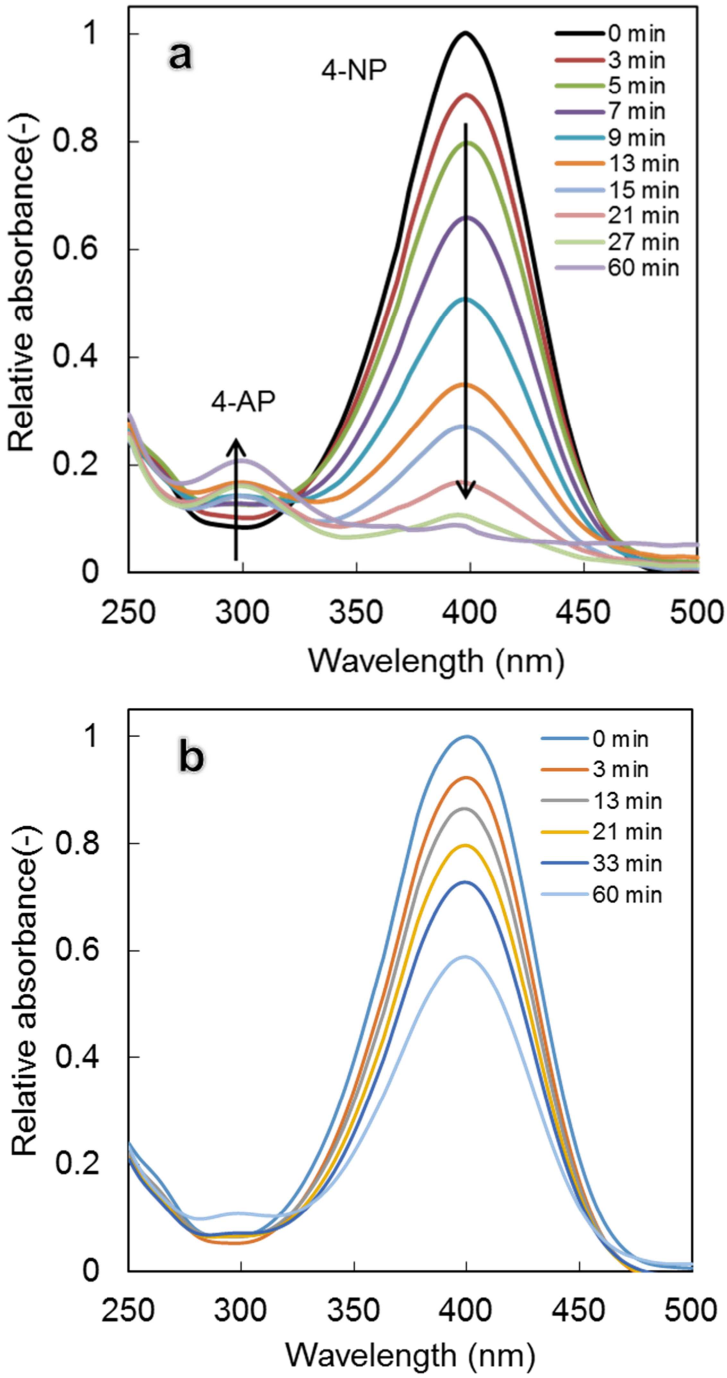

Fig. 4-7 UV-vis spectra of 4-NP aqueous solution catalyzed with the AuNPs in/on Au21 fibers prepared by UV irradiation for 5 days (a) and with bare PAN fibers free from AuNPs (b).

4.3.3　4-ニトロフェノールの還元反応における触媒活性評価

金ナノ粒子の触媒活性を 4-NP の還元反応を用いてモデル反応として評価した． Fig. 4-5 に反応液の UV-vis スペクトルの経時変化を示す．400 nm 付近のピークは 4-ニトロフェノレートイオンのピークである．金ナノ粒子を担持した不織布を添加した場合（Fig. 4-7(a)）には，金ナノ粒子を含まない不織布を添加した場合（Fig. 4-7(b)）よりも有意に速く 400 nm の吸光度が減少したことから，調製した金ナノ粒子担持不織布の触媒活性が確認できた．

4-NP の還元反応は二次反応であるが，$NaBH_4$ を過剰に添加することで擬一次反応として仮定することにより，4-ニトロフェノレートイオンのピークの経時変化から反応速度定数を求めることができる．そこで，Au3，Au13，Au21 不織布に対して紫外線を照射した不織布の反応速度定数を算出した．結果として，反応速度定数は金の濃度に比例して増加した(Fig. 4-8). Au21 を用いた場合の反応速度定数(4.0×10^{-3} s^{-1})は，Au3 を用いた場合の反応速度定数（1.1×10^{-3} s^{-1}）の約 4 倍であった．金ナノ粒子の粒子径が金の濃度に依存せず一定であったことから，塩化金の濃度を増加することでより多くの金ナノ粒子が担持されたことが明らかとなり，さらに，調製した不織布を触媒として反応器を構築することを想定すると金を高い濃度で含む不織布を用いることにより触媒充填層の体積を低減可能であることが示唆される．また，触媒回転頻度（TOF）と金の濃度の関係を評価した結果，TOF は金の濃度の増加と反比例した． Au21 を用いた場合の TOF は 5.4 h^{-1} であり，Au3 不織布を用いた場合の TOF (30 h^{-1}) の 1/5 であった．紡糸溶液中の塩化金の濃度を増加することにより，不織布に含まれる金の全物質量に対して繊維内部に包埋されるナノ粒子の量が増加し，触媒反応に関与する金の物質量が減少した可能性が示唆された．

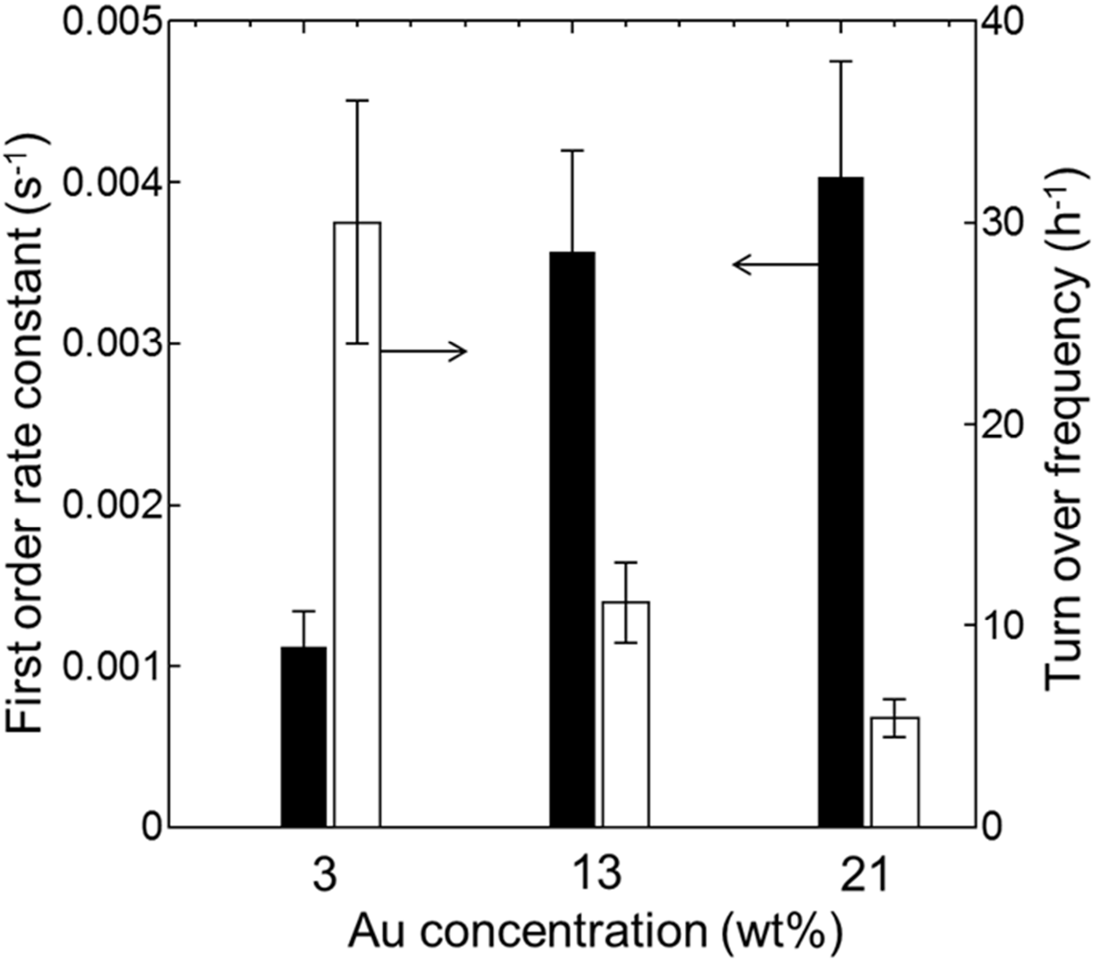

Fig. 4-8　Effect of Au concentration on first order rate constant and turn over frequency in reduction of 4-NP with $NaBH_4$ using Au3, Au13, Au21 fibers prepared by UV irradiation time for 5 days. The bars represent standard deviations (n = 3).

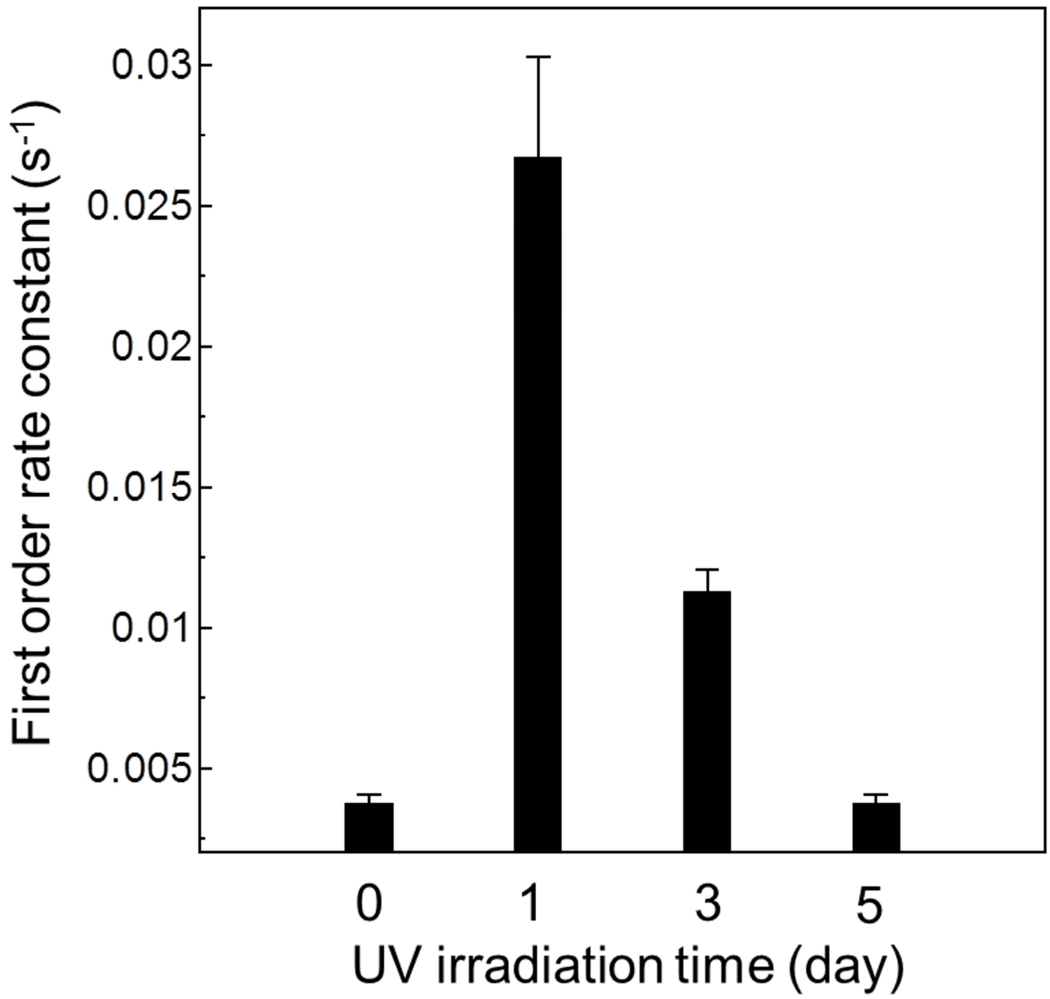

Fig 4-9 Effect of UV irradiation time on first order rate constant in reduction of 4-NP with AuNPs in/on Au21 fibers prepared by UV irradiation for indicated periods. The bars represent standard deviations (n = 3).

次に，Au21 不織布を用いて紫外線照射時間と反応速度定数の関係を評価した（Fig. 4-9）．紫外線の照射時間を 1，3，5 日と増加するにつれて反応速度定数は 2.7×10^{-2}，1.1×10^{-2}，$3.7 \times 10^{-3}\ s^{-1}$ と減少した．この変化を粒子径の変化と比較すると，照射時間 1 日間と 3 日間のサンプルでは反応速度定数と粒子径の間に反比例関係が見られたが，照射時間 3 日間と 5 日間の場合には粒子径は変化していないにもかかわらず，反応速度定数は大きく減少した．この原因は明らかではないが，可能性として TEM 観察による粒子径の測定精度に限界があり, 5 nm 以下の微細な粒子の絶対数が減少していた可能性が考えられる．また，紫外線の照射時間を 1，3，5 日と延長するにともなって金の物質量当たりの反応速度定数は，8.3×10^{-2}，3.4×10^{-2}，$11 \times 10^{-3}\ s^{-1}\ \mu mol\text{-}Au^{-1}$ となり TOF は 71，29，9.4 h^{-1} と変化した．この反応速度定数および TOF は，これまで報告されてきた様々な材料から調製した金ナノ粒子触媒と同等である（Table 4-1）．これらの結果より塩化金酸を含む PAN 静電紡糸不織布に紫外線を照射することにより，5 nm 以下の大きさの金ナノ粒子を担持することができ，調製した金ナノ粒子担持 PAN 静電紡糸不織布が金ナノ粒子触媒として機能することが実証された．

Table 4-1 Summary of reported AuNP catalysts and their catalytic activities of 4-NP reduction.

Entry	Supporting material	AuNP average size (nm)	Au based rate constant (s^{-1}▪μmol-Au^{-1})	TOF (h^{-1})	Ref.
1	Cellulose	< 5	1.0 ×10^{-2}	35	(Koga *et al.* 2010)
2	Chitosan	3.1	5.0 ×10^{-3}	50	(Chang and Chen 2009)
3	PMMA[a]	6.9	9.0 ×10^{-2}	89	(Kuroda *et al.* 2009)
4	PDMAEMA-PS[b]	4.2	2.3 ×10^{-3}	0.67	(Zhang *et al.* 2007)
5	α-Cyclodextrin	20	7.8 ×10^{-2}	34	(Huang *et al.* 2009)
6	PAN	4.7 - 5.2	8.3 ×10^{-2}- 11 ×10^{-3}	9.4 - 71	This study

[a]Poly(methyl methacrylate). [b]Poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) grafted onto solid polystyrene core.

4.4　結言

塩化金酸を含むPAN静電紡糸不織布において金ナノ粒子のその場合成を検討し，以下の知見を得た.

(1)　不織布中の金の濃度を 3，13，21%として紫外線照射 5 日間において得られる金ナノ粒子の粒子径への影響を評価した結果，粒子径は 4.8 ± 1.2，5.4±1.4，5.2±1.6 nm (n = 3)と大きな差異は見られなかった.

(2)　対して，紫外線照射時間を 1，3，5 日間として Au21 において得られる金ナノ粒子の粒子径への影響を評価した結果, 粒子径は 2.7 ± 1.4, 5.0±1.4, 5.2±1.6 nm (n = 3)と変化した.

(3)　4-NP の還元反応において，不織布質量中の金の濃度 3，13，21%に対して紫外線照射 5 日間において得られるそれぞれの反応速度定数を評価した結果, Au21 を用いた場合の反応速度定数は 4.0×10^{-3} s^{-1} であり, Au3 を用いた場合の反応速度定数（1.1×10^{-3} s^{-1}）の約 4 倍であった.

(4)　4-NP の還元反応において，触媒回転頻度（TOF）は，金の濃度の増加と反比例した．Au21 を用いた場合の TOF は 5.4 h^{-1} であり，Au3 を用いた場合の TOF（30 h^{-1}）の 1/5 であった．この結果より，金の濃度を増加することにより触媒として基質と接触可能な金ナノ粒子の数が減少していることが示唆された.

(5)　4-NP の還元反応において，触媒回転頻度（TOF）は，紫外線照射時間の増加と反比例した．この結果より，金ナノ粒子の粒子径の変化が触媒活性に影響していることが示唆された.

第 5 章 酵素固定化静電紡糸不織布の電気化学的リサイクルと流通管型反応器を用いた連続反応プロセスへの適用

5.1　緒言

酵素固定化は，酵素の工業利用において回収・再利用を可能にするだけでなく，酵素の寿命，熱安定性，pH 安定性などを向上させる重要な技術である．近年，酵素の担持量の向上を目的として微粒子への固定化が検討されてきた(Galliker *et al.* 2010; Garcia-Galan *et al.* 2011; Corman *et al.* 2010; Zhu *et al.* 2007; Jiang *et al.* 2005)．一方で，酵素を用いた生物反応工学プロセスにおいてもその他の反応工学プロセスと同様に効率的な連続反応系への適用が好まれる(Sakai *et al.* 2008; Wang *et al.* 2014)．しかし，微粒子担体の多くは流通反応系に適用できず流動層反応器，粉相流反応器などを用いた回分操作での利用に限定されている．そこで触媒を流通反応系へ適用可能にする繊維状担体として静電紡糸不織布が検討されてきた(Sakai *et al.* 2008; Wang *et al.* 2009; Xu *et al.* 2013)．一方で，酵素は立体構造変化などにより時間経過とともに機能を失う．固定化酵素は担体を含め失活までのみの使用を想定されているが，静電紡糸不織布は生産性が低いため（Jiang *et al.* 2013), 触媒を大量に使用する産業レベルでの応用は困難である．そこで本章では，失活した酵素を簡便な方法により脱離することで静電紡糸不織布のリサイクルを可能にし低生産性を補う技術の開発を検討した．

金表面においてチオールやジスルフィドを含む化合物が自己組織化単分子(SAM) 膜を形成することが知られている（Schlenoff *et al.* 1995; Love *et al.* 2005)．様々なチオール化合物を用いることにより任意の官能基を提示することができるため, SAM 膜上へのタンパク質(Sigal *et al.* 1996)や細胞の固定化(Luk *et al.* 2000)が検討されている．またチオールを用いて金表面上に形成した SAM 膜は負電圧を印加することにより電気化学的に脱離することが知られており (Tencer *et al.* 2013; Tencer and Berini 2008)，これまでに SAM 膜上に固定化したタンパク質（Balasubramanian *et al.* 2006; Mallon *et al.* 2010)や動物細胞の脱離（Zhu *et al.* 2008; Kakegawa *et al.* 2013)が報告されている．本章では，静電紡糸不織布に金メッキを行い，金表面上に形成した SAM 膜に酵素を固定化し，電気化学的な酵素固定化 SAM 膜の脱離を実施することで静電紡糸不織布のリサイクルを実証した．また，流通管型反応器を用いた連続反応系に適用し長期安定性の評価とリサイクルの影響評価を実施した．本手法の概念図を Fig. 5-1 に示す．モデル酵素および基質として *Trametes versicolor* 由来のラッカーゼと 2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸アンモニウム) (ABTS) を用いた．ラッカーゼは，フェノール類を酸化するフェノールオキシダーゼであり，2,4-ジクロロフェノールの分解（Xu *et al.* 2013)や多環芳香族炭化水素の除去（Dai *et al.* 2013)など水質浄化プロセスへの利用が検討されている．ABTS はラッカーゼの酵素活性を測定するための基質である（Xu *et al.* 2013)．金メッキ不織布にシステアミンを用いてアミノ末端 SAM 膜を形成し，グルタルアルデヒドにより酵素タンパク質を共有結合固定した．電気化学的リサイクルの評価として酵素の固定化，脱離，再固定後の不織布の酵素活性の測定，XPS による表面解析を実施した．金メッキ静電紡糸不織布の調製については，ポリスチレンと PAN の 2 種類の高分子の静電紡糸不織布への無電解金メッキを検討した．無電解金メッキ法は，固体表面に存在する金属の触媒活性を利用した金のコーティング法であり(Brown and Natan 1998; Brown *et al.* 2000)，無電解金メッキ不織布の開発と応用が注目されている(Han *et al.* 2006; Guo *et al.* 2008; Yadav and Balasubramanian 2015)．金メッキ不織布の応用例として酵素電極

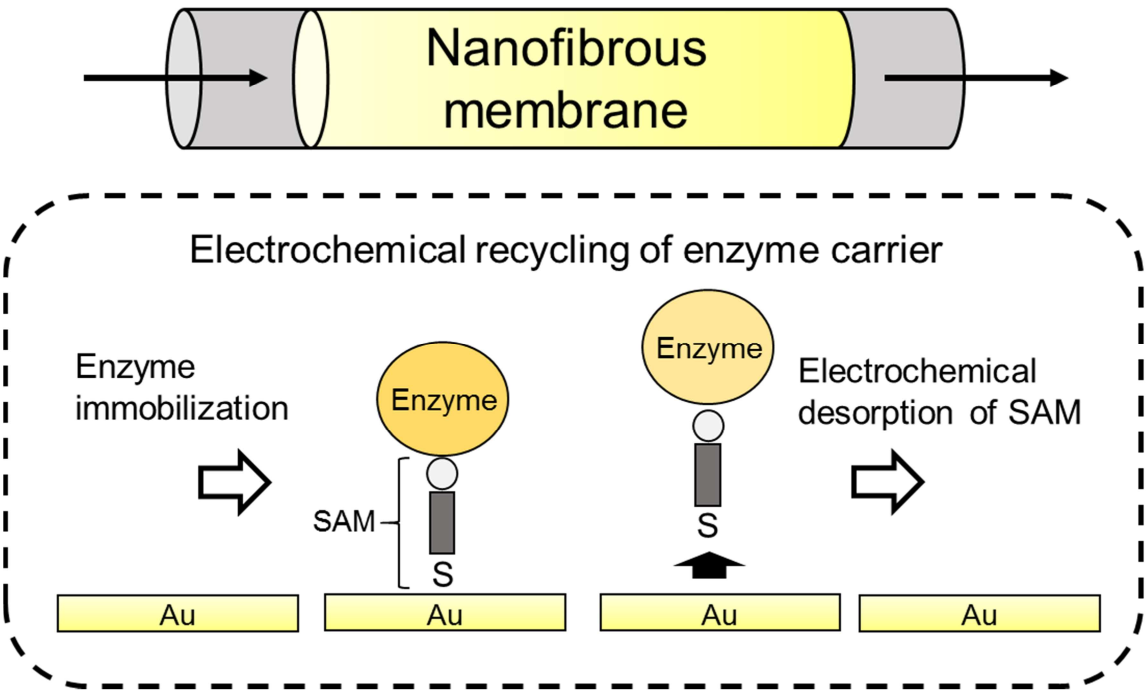

Fig. 5-1　Schematic illustration of electrochemical recycling of gold nanofibrous membrane as enzyme immobilizing carrier and application to flow-through reactor.

の電極部材(Marx *et al.* 2011)，メタノール酸化反応用触媒担体(Liu *et al.* 2010)としての応用が報告されている．

5.2　実験

5.2.1　静電紡糸不織布の無電解金メッキ

5.2.1.1　金ナノ粒子担持ポリスチレン静電紡糸不織布への金メッキと中空化

金メッキ不織布の調製を目的として，金ナノ粒子担持ポリスチレン静電紡糸不織布を調製した．まずポリスチレン（Mw 280, 000，Sigma-Aldrich）を DMF に 15 wt%となるように溶解した．次にポリスチレン溶液に塩化金酸四水和物を最終濃度 3 wt%となるように添加し 10 分間撹拌することで黄色の均一な溶液を調製した．調製した溶液を第 2 章と同様の手法により静電紡糸した．5 ml のプラスチックシリンジとステンレススチールの針(20G)を用いて電極間距離 12 cm，印加電圧 20 kV，溶液供給速度 2.0 ml/h とした．調製した不織布を真空乾燥した後，60 cm 離れた距離にてピーク波長 253.7 ナノメートルの紫外線ランプ(UV-lamp GL15，Toshiba Corp.)を用いて紫外線を 1 日間照射することにより金ナノ粒子を形成した．次に，ポリスチレン静電紡糸不織布に無電解金メッキを実施した．不織布(4 mg)を直径 25 mm のフィルターホルダーにセットし，0.1 mg/ml 塩化金酸四水和物と 0.02 mg/ml 塩酸ヒドロキシアミン水溶液を含む水溶液 600 ml を氷水にて冷却しながら 12 ml/min で不織布に 2 時間流通した．

次に，多孔性の向上を目的として，ポリスチレンの除去による繊維の中空化を検討した．無電解金メッキ後の不織布を蒸留水で洗浄した後，真空乾燥した．乾燥した不織布を空気中 180 °C にて 2 日もしくは 3 日間，または 350 °C もしくは 500 °C にて 2 時間焼成することでポリスチレンの除去を検討した．

5.2.1.2　金ナノ粒子担持ポリアクリロニトリル静電紡糸不織布への金メッキ

次に PAN 静電紡糸不織布への無電解金メッキについて検討した．第 4 章に示した手法を用いて金を 3 wt%含む塩化金酸と PAN の混合溶液(Au3)から不織布を調製した．既報(Guo *et al.* 2008)に基づいて PAN 静電紡糸不織布への無電解金メッキを行った．まず調製した Au3 不織布（7.5 mg)を直径約 4.0 cm の円形状に加工し減圧濾過器(KG-47, Advantec)に挿入した. 1mM $NaBH_4$ 水溶液 500 ml，0.02 mg/ml 塩酸ヒドロキシルアミン水溶液 1.0 L，0.2 mg/ml 塩化金酸四水和物と 0.02 mg/ml 塩酸ヒドロキシルアミンを含む水溶液 1.0 L を，溶液の黄色が消失するまで 5 回以上減圧濾過した．不織布を自然乾燥後，マイクロメーターを用いて厚みを測定した．電圧印加による SAM 膜の脱離を行うためには，不織布表面を十分量の金でコーティングし導電性を得る必要がある．そのため不織布の導電性をシート抵抗測定により測定した．シート抵抗測定器(RT-70V/RG-5, Napson Corp.)を用いて厚み 75 μm の金メッキ不織布のシート抵抗を測定した.

5.2.2　自己組織化膜へのラッカーゼの共有結合固定

調製した金メッキ不織布の比較対象として金箔（厚み 0.08 mm，Nilaco Corp.)を採用し，金メッキ不織布と金箔へラッカーゼの固定化を行った．まず，0.1M システアミン(Wako Pure Chem. Ind. Ltd.)を含む酢酸緩衝液(0.1M, pH5.0)に 3 時間浸漬し，アミノ末端 SAM 膜を形成した．蒸留水にて洗浄後，8%グルタルアルデヒド水溶液中，25°C で 1 時間浸漬した．もう一度水洗を行った後に，2.7 U/ml ラッカーゼを含むリン酸緩衝液(0.1M，pH7.0)に浸漬し，シェイキングインキュベーター(SI-300C, AS ONE Corp.)を用い 25˚C にて回転速度 700 rpm で撹拌した．1 時間経過後，4 ˚C にて 2 時間静置した．リン酸緩衝

液(0.1M，pH7.0)を用いて不織布または金箔を洗浄した．洗浄液からラッカーゼの酵素活性が検出されなくなるまで洗浄した．固定化したラッカーゼの量は遊離のラッカーゼの酵素活性を基準に算出した．

5.2.3　回分反応による酵素活性の測定

ラッカーゼ固定化金担体の酵素活性を ABTS の酸化反応を用いて測定した．30 mM ABTS を含む酢酸緩衝液(0.1M，pH 4.0) 5.0 ml に不織布，金箔，および遊離のラッカーゼ溶液を添加して反応を開始した．反応はシェイキングインキュベーターを用いて 25˚C にて 700 rpm で撹拌しながら進行させた．任意の時間で反応液 50 µl を分取し，リン酸緩衝液 60 µl と混合して分光光度計(UV2600，Shimadzu Corp.)を用いて 420 nm の吸光度を測定した．ABTS のモル吸光係数は 36000 l/(mol cm)とした．

5.2.4　流通管型反応器への適用

ラッカーゼ固定化金メッキ PAN 不織布を流通反応系へと適用した．不織布を直径 2.0 mm のテフロンチューブに充填しウォーターバスを用いて 25°C とした．基質溶液として 30 mM ABTS を含む酢酸緩衝液をシリンジポンプ(KDS230，KS Scientific Inc.)を用いて流速 1.5-15 ml/h にて供給した．任意の時間にて出口の溶液を回収し，A420 を測定した．流速と出口の転化率の影響を評価する試験においては，それぞれの流速において定常状態に達した後に出口転化率を測定した．

5.2.5　電圧印加によるラッカーゼの脱離

不織布をチタンメッシュで固定し-1200 mV を 1 時間保持した後，-1400 mV

から-200 mV まで電位を掃引した．電圧印加には，ECflontier 製のポテンショガルバノスタットを用い Ag/AgCl 電極と Pt 電極をそれぞれ参照電極, 対極とした三電極方式により実施した．電圧印加後に不織布をリン酸緩衝液で洗浄した．脱離の評価を酵素活性測定と XPS 分析により検討した．X 線源をアルミニウム Kα(1486.6 eV)とする XPS 測定器（Kratos Axis Ultra HAS, Kratos Analytical Ltd.)を用いて測定した．

5.2.6　流通管型反応器を用いた長期安定性評価とリサイクルの影響

ラッカーゼ固定化金メッキ PAN 不織布の酵素活性の長期安定性を流通管型反応によって評価した．流速 3.0 ml/h で 7 日間反応を継続した．8 日目にて反応を終了し，不織布を取り出し電圧印加により酵素を脱離した．電気化学処理を施した不織布に SAM の形成と新しく調製したラッカーゼ溶液を用いて固定化処理を行い，再度，流通反応を 7 日間継続して行った．溶液は毎日交換した．

5.3　結果および考察

5.3.1　静電紡糸不織布の無電解金メッキ

5.3.1.1　金ナノ粒子担持ポリスチレン静電紡糸不織布への金メッキと中空化

電気化学的にリサイクル可能な酵素固定化静電紡糸不織布を調製するために，ポリスチレン静電紡糸不織布への金メッキを検討した．まず静電紡糸により塩化金酸とポリスチレンからなる不織布を調製した（Fig. 5-2(a)). この不織布に紫外線を 1 日間照射することにより紫色の不織布が得られた(Fig. 5-2(b))．第 4 章で述べたように，紫色は金ナノ粒子の表面プラズモン吸収によると考えられ金ナノ粒子の形成が確認できた．次に無電解金メッキを施した結果，茶色の不織布が得られた(Fig. 5-2 (c))．SEM 観察(Fig. 5-2(d))により金メッキ前後の不織布

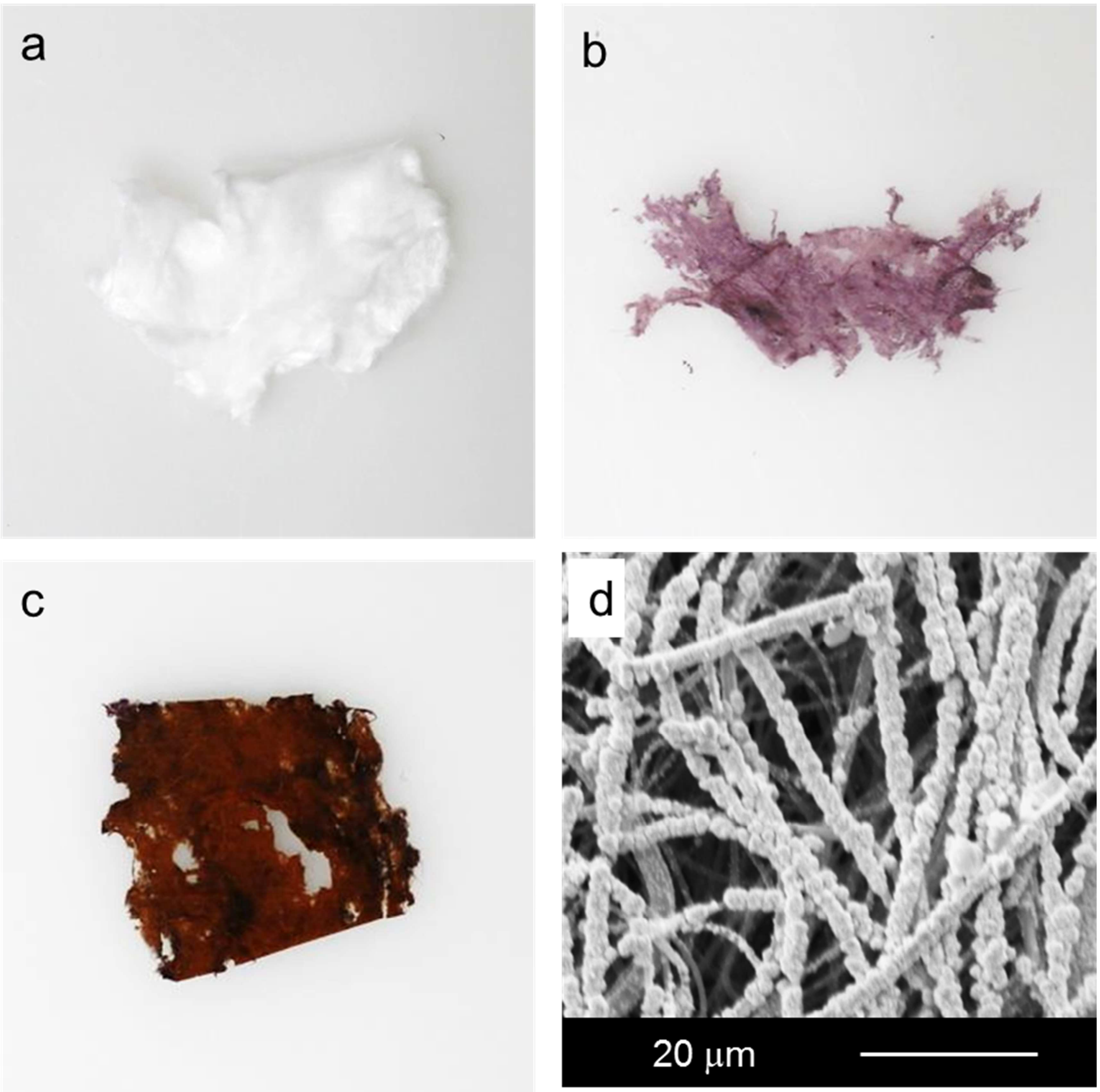

Fig. 5-2 Photographs and/or SEM image of fibrous membrane of electrospun polystylene fibers before (a), after UV irradiation (b), and electroless gold plating (c) (d).

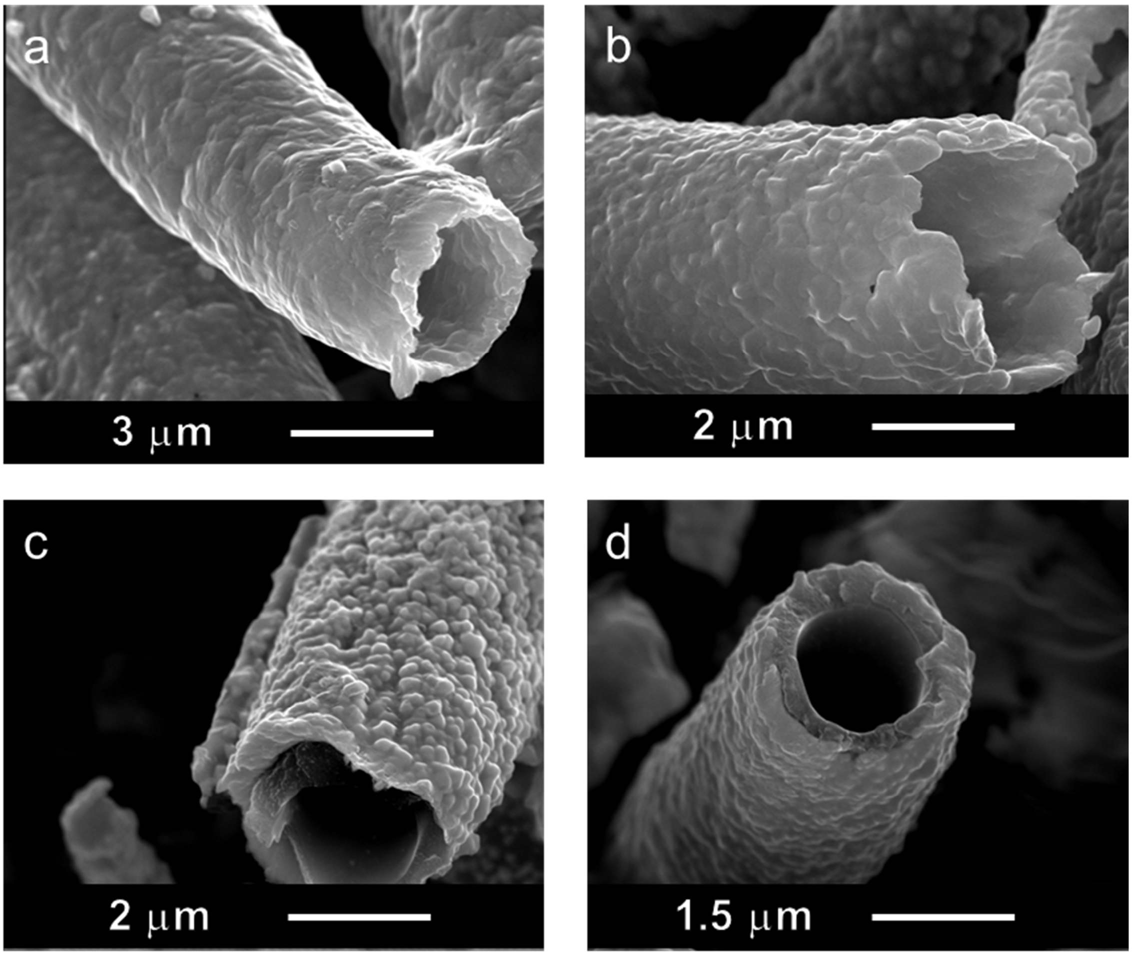

Fig. 5-3 SEM images of electroless plated polystylene fibers after calcination at 350 (a) or 500 °C (b) for 2h, and at 180 °C for 2 days (c) or 3 days (d). Bar in a, 3 μm; bars in b and c, 2 μm; and bar in d 1.5 μm.

繊維の繊維径を測定した結果，繊維径は金メッキ処理により 0.90 ± 0.33 μm から 1.49 ± 0.36 μm へと増加した．この結果より金メッキ層は約 300 nm の厚みであることが示唆された．この不織布を SEM 観察した結果，直径の繊維径を持つ不織布が得られた．ポリスチレンは空気中 200°C 付近で分解することが知られている(Malhotra *et al.* 1975)．金メッキポリスチレン不織布を空気中にて焼成することでポリスチレンを除去し中空化することにより多孔性の向上を検討した. 設定した各温度と時間にて焼成した不織布の SEM 観察写真を Fig. 5-3 に示す. それぞれ 350, 500 °C で 2 時間焼成した不織布では断面の写真より中空構造が観察された(Fig. 5-3(a) (b))．また 180°C で 2 時間した不織布(Fig. 5-3(c))でも中空構造が確認できたが，内部にポリスチレン由来の物質が残っている様子が断面の写真より観察された．3 時間焼成した不織布(Fig. 5-3(d))でも同様の物質が残っていることが確認でき，これはポリスチレンと金が化学的または物理的に相互作しているためであると考えられる.

5.3.1.2　金ナノ粒子担持ポリアクリロニトリル静電紡糸不織布への金メッキ

　次に, もう一つの候補材料として PAN 不織布への無電解金メッキを実施した. Fig. 5-4 に調製した金メッキ PAN 不織布の写真と SEM 写真を示す．黄色の不織布が得られ，SEM 写真より微細な繊維で構成されている様子が観察された. SEM 観察により金メッキ前後の不織布繊維の繊維径を測定した結果，繊維径は金メッキ処理により 243±38 nm (メッキ前, *n*>100)から 351±59 nm (メッキ後, *n*>100) へと増加した．この結果より金メッキ層は約 100 nm の厚みであることが示唆された．また金メッキポリスチレン不織布と比較して繊維径と金メッキ層の厚みはそれぞれ 0.24 倍，約 0.3 倍になった．この結果よりポリスチレンを用いた場合よりも高い多孔性を持つことが期待され，また静電紡糸不織布に

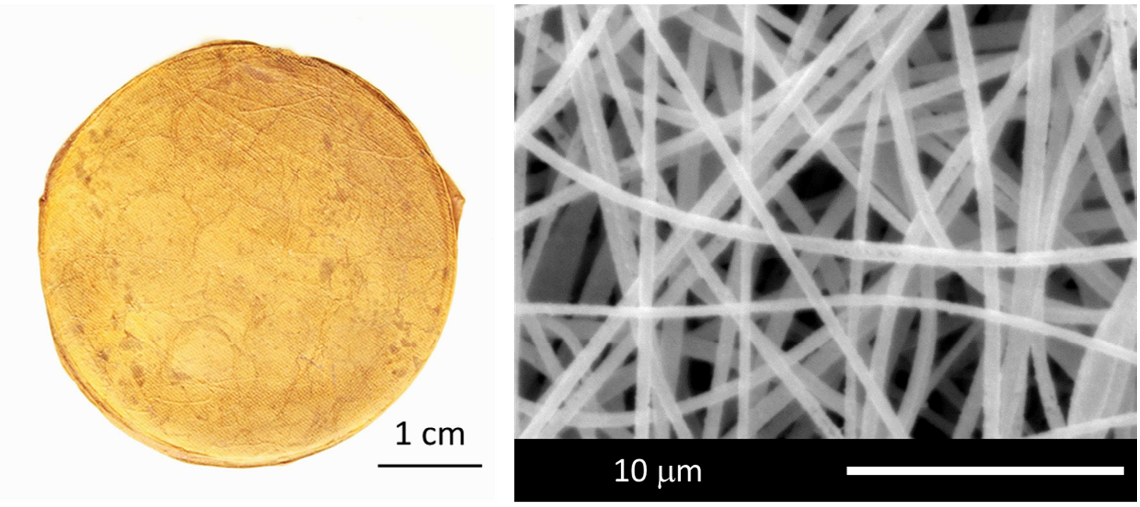

Fig. 5-4 Photographs and SEM image of PAN nanofibrous membrane after electroless gold plating.

対してより薄く金をコーティングできたことから，少量の金でメッキできることが明らかとなった．さらに電気化学的処理を行うために必要な導電性を評価するために金メッキ PAN 不織布のシート抵抗を測定した．金メッキ処理前には不導体であったが，メッキ後には $3.5×10^{-2}$ Ω/□と既報(Han *et al*, 2006)と同程度のシート抵抗値を示した．このことから調製した不織布が静電紡糸不織布の特異な多孔質構造と電気化学的処理を行うために必要な導電性を有していることが明らかとなった．次に調製した金メッキ PAN 不織布を用いて SAM 膜形成とラッカーゼの固定化を行い酵素活性の評価を検討した．

5.3.2　金メッキ静電紡糸不織布へのラッカーゼの固定化と回分操作

5.3.2.1　酵素活性の測定と金箔との比較

ラッカーゼ固定化金メッキ PAN 不織布の酵素活性を ABTS の酸化反応における反応初速度によって評価した．ラッカーゼ固定不織布を用いた反応における生成物濃度の時間変化を Fig. 5-5 に示す．不織布の多孔質構造が酵素固定化量に与える影響を評価するために，遊離のラッカーゼを用いた場合の反応初速度を基準としてラッカーゼ固定不織布と金箔を用いた場合の反応初速度からそれぞれの担体へのラッカーゼの固定化量を算出し比較した．結果として，金メッキ不織布，金箔へのラッカーゼ固定化量はそれぞれ 0.430 ±0.051 μg-protein/mm^3，0.504 ±0.118 ng-protein/mm^3 となり，静電紡糸不織布の多孔質構造が酵素の固定化量を飛躍的に増大することが示唆された．また金メッキ不織布(1.73 mm^3)と金箔(6.53 mm^3)の体積を測定し，体積当たりの酵素活性を測定した結果，不織布を用いた場合は 0.428 ±0.002 U/mm^3 となり，金箔を用いた場合($1.90 ±0.44×10^{-3}$ U/mm^3)の 226 倍となった．この結果より金メッキした静電紡糸不織布を担体として用いることで，固定化ラッカーゼの単位体積当

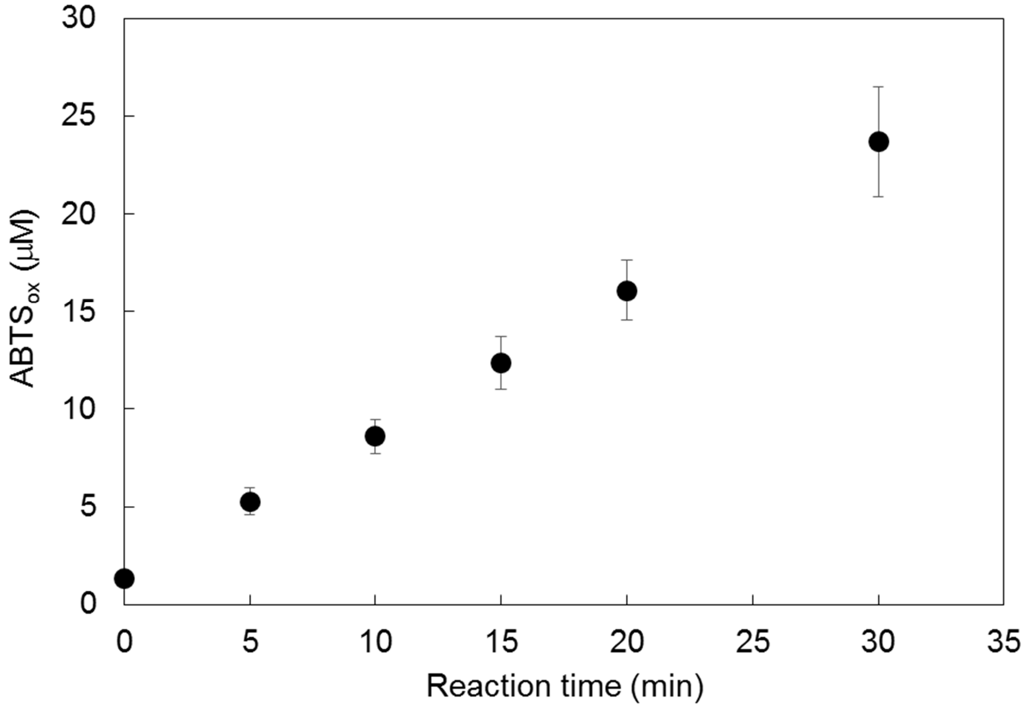

Fig. 5-5 Time course plots of ABTS concentration in batch reaction of ABTS oxidation catalyzed by laccase immobilized on gold nanofibrous membrane. Data represent mean and standard deviations ($n = 3$).

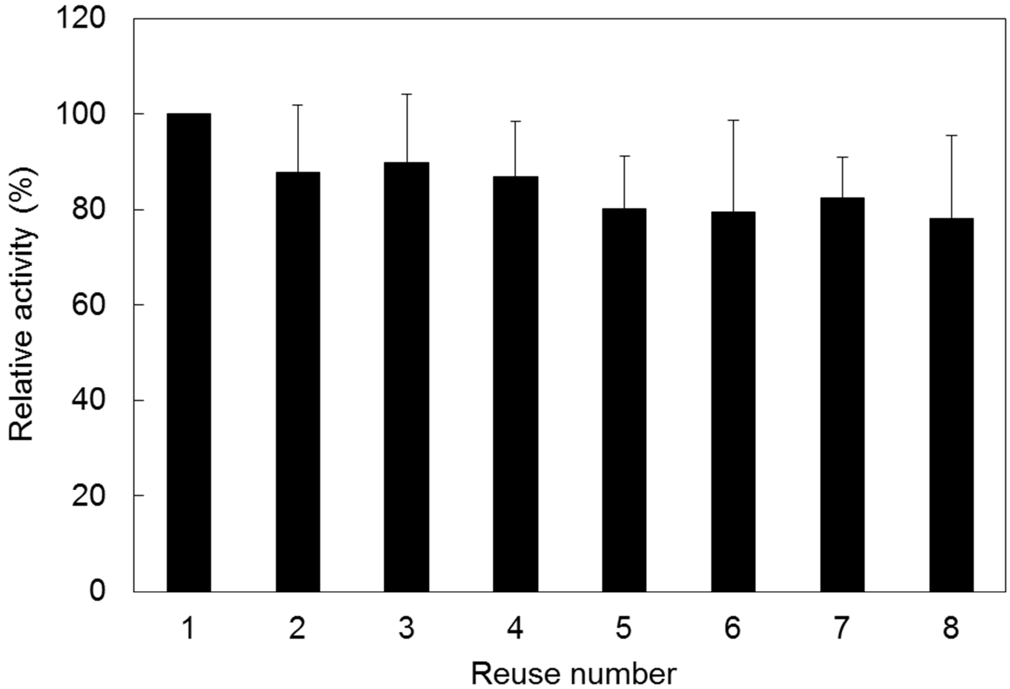

Fig. 5-6 Reusability of laccase immobilized gold nanofibrous membrane in batch reaction of ABTS oxidation. Data represent mean and standard deviations ($n = 3$). Relative activity was standardized by the activity at the first run.

たりの酵素活性が大幅に増大することが明らかとなった.

5.3.2.2　ラッカーゼ固定金メッキ静電紡糸不織布の再使用可能性

ABTS 酸化反応を回分操作により 8 回繰り返し行うことでラッカーゼ固定化金メッキ PAN 不織布の再使用可能性を評価した．結果を Fig. 5-6 に示す．5 回繰り返し反応を行った後には 80.2 ±4.3%の酵素活性を維持していた．また 8 回繰り返し後には 78.1±3.62%の酵素活性を維持していた．既報と比較した結果, 5 回使用後のラッカーゼ活性は, PAN 静電紡糸不織布(80%以下)(Xu et al, 2013), ココナッツ繊維(約 70%)(Cristovao et al, 2011)，メソポーラスカーボン(約 70%)(Liu et al, 2012)を担体とした場合と同等であった.

5.3.3　流通管型反応器を用いた連続反応プロセスへの適用

ラッカーゼ固定化金メッキ PAN 不織布の連続反応系への適用可能性を示すために流通管型反応器における使用を検討した．供給速度と出口液の相対転化率を調べた結果，流通速度を 1.5-15 ml/h と増加させるに伴って相対転化率は 100%から 23.4%と減少した(Fig. 5-7).

5.3.4　電圧印加による酵素の脱離と再固定

電圧印加前後のラッカーゼ固定化金メッキ PAN 不織布の酵素活性を測定することにより酵素固定化 SAM 膜の脱離と新しいラッカーゼの再固定を評価した. Fig. 5-8 に酵素固定化と脱離を 2 回繰り返し, それぞれの処理後の不織布の酵素活性を測定した結果を示す．1 回目の酵素固定化後の不織布の活性を 100%とし電圧を印加すると活性は 1.5±0.5%と大幅に低下した．電圧印加した後に SAM 膜形成とラッカーゼの固定化を再び実施した結果，酵素活性は 90.0±4.7%まで

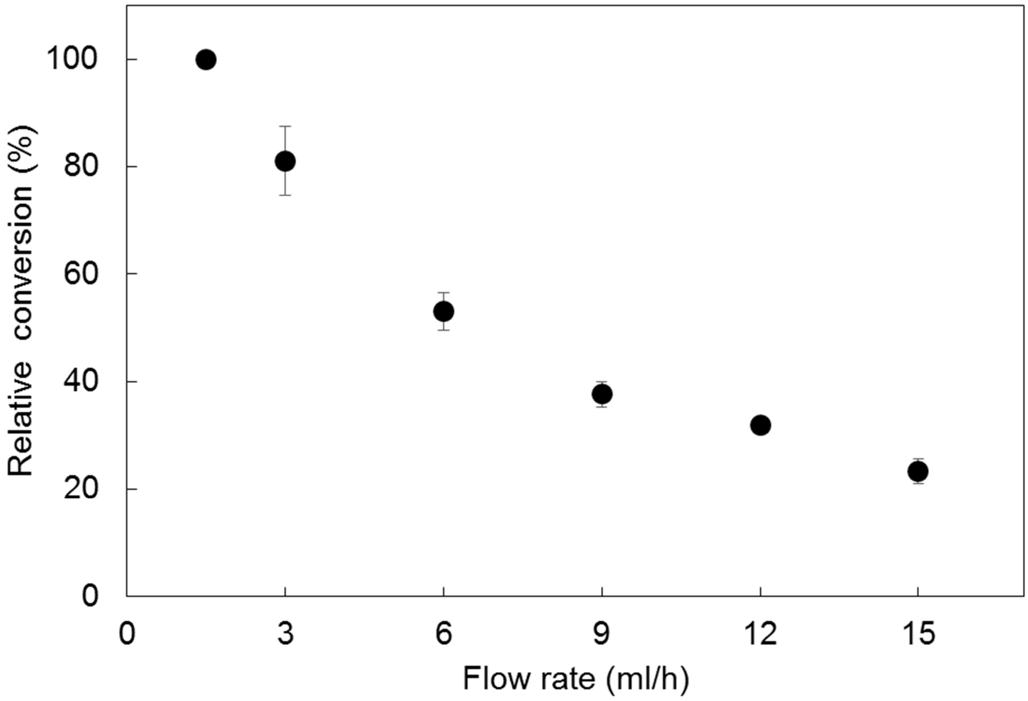

Fig. 5-7 Effect of feed flow rate on conversion of ABTS in flow-thorugh type reactor packed with laccase-immobilized gold nanofibrous membrane. Data represent mean and standard deviations ($n = 3$).

回復し，再び電圧を印加すると 1.0±0.5%まで低下した．再固定後の酵素活性が1 回目よりも 10%程度低下していることについて原因は不明であるが，電圧印加処理において部分的に不織布構造が変化した可能性や表面が汚染したことにより酵素の固定化量が減少した可能性が考えられる．次に XPS による表面解析を行い不織布表面におけるタンパク質の有無を評価した．タンパク質の定量法の１つとして窒素量を分析する手法が報告されてきた(McArthur et al, 2000; Ma et al, 2002)．そこで，XPS を用いて不織布表面の窒素量の測定を実施した．Fig. 5-9 に調製後，SAM 形成後，ラッカーゼ固定化後，電圧印加による脱離処理後の不織布の Au4f，C1s，および N1s の XPS スペクトルを示す．Au4f と N1s の強度比と Au4f と C1s の強度比を酵素固定化における指標として測定した結果，I_{N1s}/I_{Au4f} はそれぞれ 0.027，0.150，0.223，および 0.022 と変化した．また一方で I_{C1s}/I_{Au4f} は 0.051，0.246，0.420，および 0.044 と変化し，I_{N1s}/I_{Au4f} と同じ傾向を示した．SAM 膜形成処理により N1s と C1s のピーク強度が増加しているのは金表面に形成された SAM 膜を構成するシステアミン分子の存在を示しており，ラッカーゼ固定化による N1s と C1s のピーク強度の増加はタンパク質の存在を示している．電圧印加処理後の不織布の I_{N1s}/I_{Au4f} と I_{C1s}/I_{Au4f} のどちらのピーク比も SAM 形成前の値と同等であることから不織布表面から酵素固定化 SAM 膜が脱離したことが明らかとなった．

また，SAM 膜形成後とラッカーゼ固定化後の C1s と N1s のピークシフトについて考察した．酵素固定化により N1s ピークの結合エネルギーは 400.8 eV から 401.4 eV にシフトした．どちらのピークもアミノ基(399.4 eV)，アミド基(399.9 eV)由来のピークよりも高い結合エネルギーに検出された(Albrecht *et al.* 2003; Jansen and Vanbekkum 1995)．この結果は，ヒドロキシル基に結合した

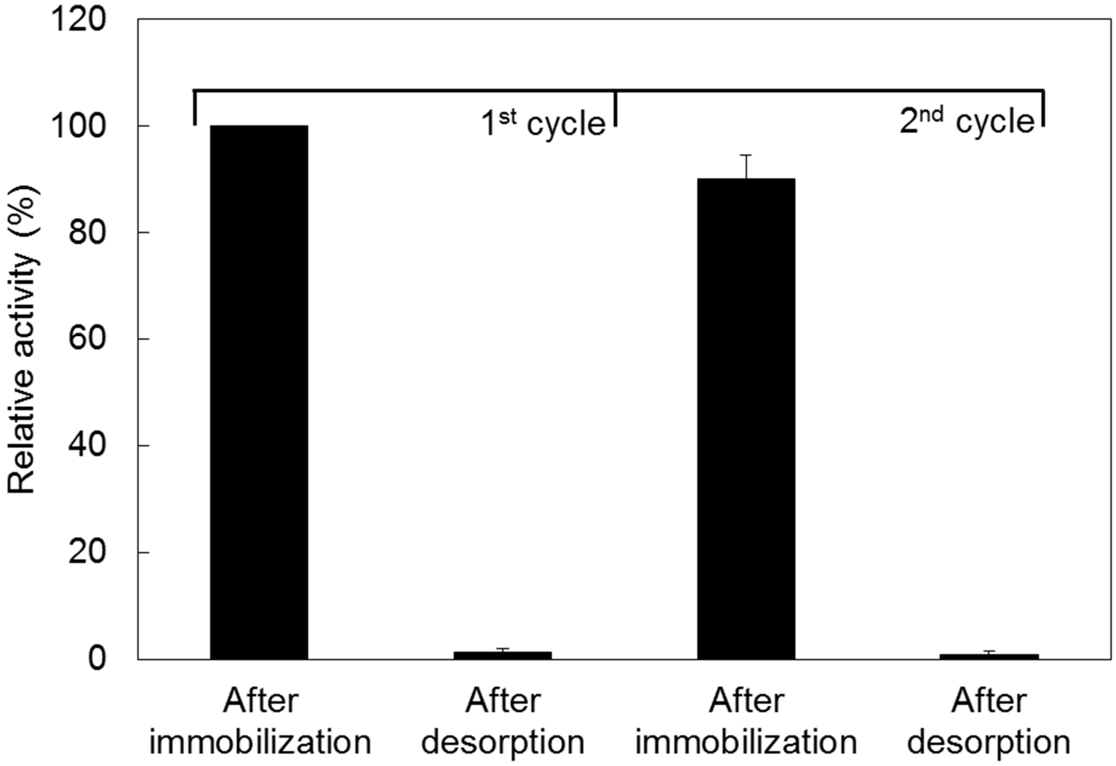

Fig. 5-8 Activities of laccase immobilized on gold nanofibrous membrane in batch ABTS oxidation during two cycles of immobilization and electrochemical desorption. Relative activity was standardized against activity after first immobilization of enzyme. Data represent mean and standard deviations ($n = 3$).

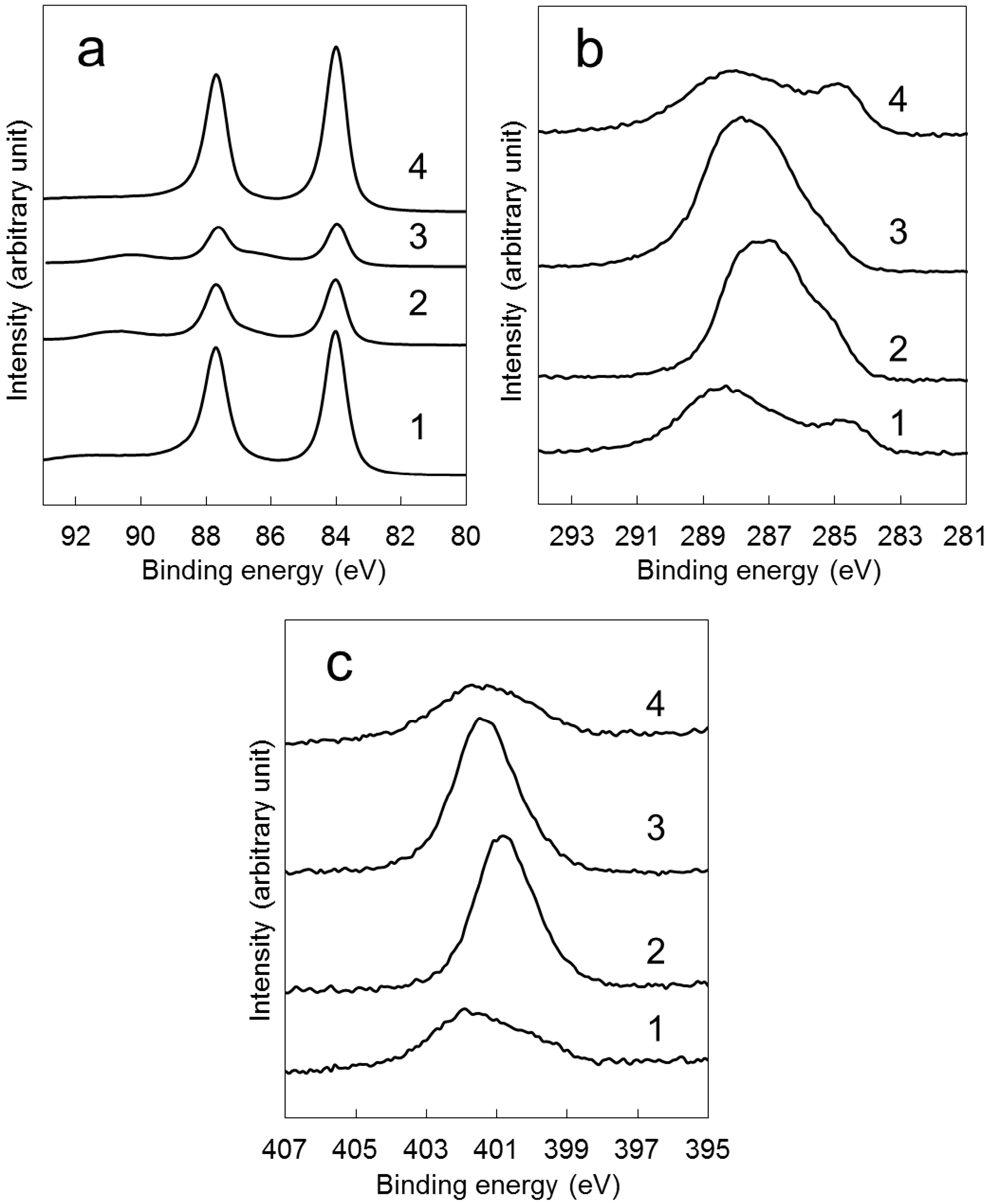

Fig. 5-9 High-resolution Au4f (a), C1s (b), and N1s (c) XP spectra of gold nanofibrous membrane. Numerals on lines: 1 = before SAM formation, 2 = after SAM formation, 3 = after enzyme immobilization, and 4 = electrochemical enzyme desorption.

窒素原子(N-OH)または酸化窒素化合物の窒素原子(N^+)由来のピークはそれぞれ400.4 eV, 402. eVに検出される(Losito *et al.* 2005)ことを考慮すると，金表面にヒドロキシルアミンが残存している可能性が考えられる．さらに，C1s のピークにおいても酵素固定化による結合エネルギーのシフトが検出された．窒素に結合している炭素原子(C-N)または硫黄原子に結合している炭素原子(C-S), およびカルボニル基の炭素原子(C=O)のピークは，それぞれ286.7 eV, 288.4 eVに検出されると報告されており(Biniak *et al.* 1997)，検出されたピークは287.2 eV および287.8 eVであったことから，それぞれのピークはシステアミン分子に存在する窒素に結合している炭素原子または硫黄原子に結合している炭素原子と酵素に存在するカルボニル基由来の炭素原子を示唆していると考えられる．

5.3.5　流通管型反応器を用いた長期安定性評価とリサイクルの影響

ラッカーゼを固定した不織布と電圧印加によりリサイクルし，再度，新しいラッカーゼを固定した不織布を流通反応系に適用し長期安定性の評価を行った．Fig. 5-10に出口における反応開始日の転化率を100%とした相対転化率の時間変化を示す．7日間の反応により相対転化率は100%から62.7 ±1.1%へと変化した．表面修飾を施したシリカゲルにラッカーゼを固定し，管型流通反応器を用いて長期安定性を評価したところ，18 日間活性が低下しなかったという報告(Rekuc *et al.* 2010)があり，さらに多孔質なセルロース担体にラッカーゼを固定し同様に管型流通反応器を用いて長期安定性を評価したところ, 100時間活性を維持したと報告されている(Rekuc *et al.* 2009)ため，表面の化学的または物理的性質を最適化することにより，ラッカーゼ固定金メッキ不織布の長期安定性を向上することができると考えられる．7日目にて反応を停止し，不織布からラッカーゼ固定SAM膜を脱離，SAM膜形成と新しいラッカーゼを固定し長期安定

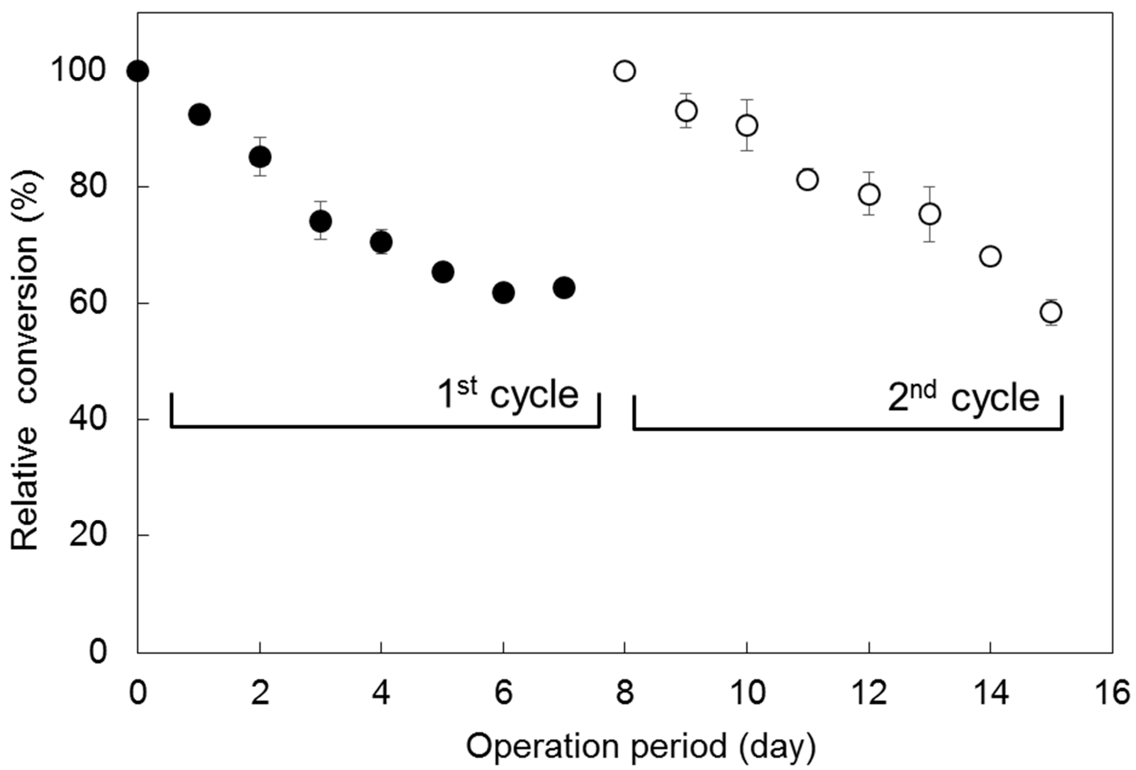

Fig. 5-10 Stability of laccase immobilized on gold nanofibrous membrane in flow-through reactor operated at feed flow rate of 3.0 mL/h. The membrane was removed from the reactor, and the enzyme on the membrane was detached by electrochemical treatment. Fresh enzyme was immobilized on the membrane, and the stability was tested again. The relative conversion was standardized against conversion on the first day in the first (●) and second (○) runs. Data represent mean and standard deviations (n = 3).

性を再び評価した. 相対転化率は 15 日目にて 58.5 ±2.3%となり 1 回目とほぼ同等の長期安定性を有していることから電気化学的にリサイクルした不織布に固定したラッカーゼが 1 回目と同様に共有結合固定されたことが確認された. これらの結果より，調製した金メッキ静電紡糸不織布は流通反応系に適用可能であり，電気化学的にリサイクル可能な酵素固定化担体であることが実証された.

5.4　結言

その場合成法により金ナノ粒子を担持した静電紡糸不織布に無電解金メッキを行い酵素固定化担体として検討することで以下の知見を得た.

(1)　塩化金酸とポリスチレンの混合溶液の静電紡糸，紫外線照射による金ナノ粒子形成，および無電解金メッキ法を行うことにより金メッキポリスチレン静電紡糸不織布の調製しポリスチレンの分解により中空化に成功した.

(2)　金メッキ PAN 静電紡糸不織布を調製し SAM 膜形成とラッカーゼの固定化を行い調製した金メッキ不織布固定ラッカーゼは，金箔固定ラッカーゼの 226 倍酵素活性を示した.

(3)　電気化学的処理による酵素固定化 SAM 膜の脱離を用いた金メッキ不織布のリサイクルを酵素活性測定と XPS スペクトル測定により検討した. 結果として，電圧印加により活性は 98.5%低下し，新しい酵素を固定化したところ 1 回目に得られた酵素活性の 90%が得られた. 電気化学処理による酵素固定化 SAM 膜の脱離により金メッキ不織布をリサイクル可能であることが実証された.

(4)　金メッキ不織布固定ラッカーゼを流通反応系に適用し長期安定性を評価した結果，メッキ後とリサイクル後の不織布に固定したラッカーゼは運転 7 日目にてそれぞれ 62.7%，58.5%の酵素活性を保持していた. 金メッキ不織布は電圧印加によるリサイクルを行っても固定化酵素の安定性に悪影響は与えなかった.

第 6 章　総括

6.1　本研究のまとめ

本研究では，静電紡糸不織布へのナノ粒子の高分散担持技術を用いて酵素を用いた生物反応工学プロセスへの応用を指向した新規な酵素固定化担体材料の開発を実施した．本章は，第 1 章から第 5 章にて得られた研究成果について総括した．

ポリビニルアルコール(PVA) 静電紡糸不織布への酵素の固定化と流通反応系に関する検討を行った．PVA 静電紡糸は溶液組成に応じて生産効率が低いことが課題となっていた．そこで混和する溶媒を 10%まで混合し紡糸溶液の物性を制御することにより静電紡糸不織布の生産効率を飛躍的に向上することに成功した．また，静電紡糸溶液に油脂工業において重要な酵素であるリパーゼを混合紡糸，固定することで，市販の粉末担体と比較して 14 倍と高い酵素活性を示すことを明らかにした. さらにリパーゼ固定静電紡糸不織布の活性を 1.5 倍に向上することに成功し，本手法の固定化酵素の調製における有効性を実証した．

次いで，静電紡糸不織布への酵素の固定化量を飛躍的に向上するための材料開発を行った．15 nm ナノ粒子を鋳型として 19 nm のメソ細孔を最も多く有するカーボンファイバー不織布の調製に成功した．先に得られた知見に基づきシリカナノ粒子を分散した PVA 溶液の静電紡糸によりシリカナノ粒子が焼結した繊維から構成される不織布を調製した後, 化学気相成長(CVD)法によりカーボンを蒸着した．そしてシリカを除去することによりメソ細孔を形成した．調製した不織布のメソ細孔容積は 1.33 cm^3 /g と従来報告されている多孔質繊維から構成される静電紡糸不織布の 2.8 倍であり, ナノ粒子を鋳型として用いることで従来よりも高いメソ細孔容積をもつ不織布材料の調製法を示した．

静電紡糸後にナノ粒子を形成するその場(in situ)合成を行い，静電紡糸不織布へのナノ粒子の高分散担持を検討した．塩化金酸と高分子溶液を静電紡糸し塩化金酸を還元することで，5 nm 以下の粒子径の金ナノ粒子を高分散担持することに成功した．また金ナノ粒子担持した静電紡糸不織布が 4-ニトロフェノールの還元反応において触媒活性をもつことを示した．さらに不織布に混合する塩化金酸の濃度を 3-21%と増加した場合にも 5 nm 程度の粒子径の金ナノ粒子が担持されていることを示した．一定体積の不織布を用いて金の含有量と触媒活性の関係を評価し，金の含有量を増加することで触媒体積あたりの触媒活性が増大することを示した．

金ナノ粒子を高分散担持した静電紡糸不織布に無電解金メッキを行い自己組織化膜の形成と酵素固定化を行った．金メッキ不織布を酵素固定化担体として金箔と比較した結果, 225 倍高い酵素活性を示したことから金メッキ不織布を酵素固定化担体とした場合に触媒体積当たりの酵素活性を増大できることを示した．さらに負電圧を印加することで自己組織化膜が脱離することを利用して金メッキ不織布からの酵素固定化自己組織化膜の脱離と新しい酵素の固定化を行うことにより不織布のリサイクルを実施した．電圧印加による酵素固定化自己組織化膜の脱離を酵素活性測定または X 線光電子分光法による表面解析から評価し，酵素タンパク質の脱離と固定が示唆され，担体としてリサイクル可能であることが実証された. また管型流通反応系へ適用し連続反応を 7 日間行った．運転 7 日目においてそれぞれ 62.7%，58.5%の酵素活性を保持していた. 金メッキ不織布は電圧印加によるリサイクルを行っても固定化酵素の安定性に悪影響は与えなかった.

6.2　今後の展開研究への提案

本研究では，生物反応工学プロセスへの応用を指向してそれぞれに適した静電紡糸不織布の開発と酵素固定化担体への応用を論じてきた．酵素反応を利用した物質生産プロセスへの応用を前提にメソ細孔構造を有するカーボンファイバー不織布の調製を論じてきたが，導電性材料への酵素固定化の応用として，グルコースなどの燃料を生体触媒によって分解し発電するバイオ燃料電池への応用が注目されている（Zebda *et al.* 2011）．メソ細孔を多数もつカーボンファイバー不織布は多量の酵素を固定化できるためこれらの生物電気化学分野に大きく貢献する新しい材料になりうると考えられる．一方，金メッキ不織布の電気化学的リサイクルに関して本研究では回分反応を主に評価し，流通反応器へと適用した場合には反応器から一度取り出して電気化学処理と洗浄を行うことによりリサイクルを行っていた．そこで次に流通反応器の触媒充填層に電圧を印加することが可能なシステムを構築することにより流通反応器から不織布を取り出す必要なく酵素の脱離と新しい酵素の固定化を行うことが可能となり，工業スケールの管型流通反応器において触媒層の充填交換操作を省略できると考えられる．また本研究で使用した無電解金メッキ法と調製される不織布の構造との関係については十分に検討が行われておらず，無電解金メッキ法の理解と制御を行い表面の細孔構造を制御することで酵素の活性，安定性の評価を検討すべきである．また，本研究では酵素を用いた流通反応系について論じたが，自己組織化膜へと固定可能な動物細胞，微生物，化学反応用の固体触媒を用いた流通反応系にも適用が可能であると考えている．

本研究手法の実施に向けて，以下の項目が具体的な課題として挙げられる．

(1)　生物電気化学分野において求められる物性を有するカーボンファイバー不織布の開発

(2)　流通反応器から触媒層を取り出さずに酵素の固定化と電気化学的リサイクルを行う手法の開発

(3)　無電解金メッキプロセスの理解に基づく表面構造の評価と制御

(4)　異なる酵素，動物細胞，微生物を固定化した場合の自己組織化膜の脱離プロセスの最適化

以上の課題を克服することにより，生物電気化学分野への応用において有用な物性をもつ静電紡糸不織布の開発と工業スケールでの酵素，動物細胞，微生物，および化学触媒を用いた物質生産プロセスにおいて有用な流通反応システムを開発することができると考えている．本研究手法を採用することによって連続的な電気エネルギー生産，医薬品生産，環境浄化などを行うことが可能となり，産業活動，医療，福祉，環境分野に貢献できると考えている．

引用文献

Albrecht W, Seifert B, Weigel T, Schossig M, Hollander A, Groth T, Hilke R. Amination of poly(ether imide) membranes using di- and multivalent amines. *Macromolecular Chemistry and Physics* **204**: 510-521 (2003).

Anka FH, Perera SD, Ratanatawanate C, Balkus KJ. Polyacrylonitrile gold nanoparticle composite electrospun fibers prepared by in situ photoreduction. *Materials Letters* **75**: 12-15 (2012).

Badjic JD, Kadnikova EN, Kostic NM. Enantioselective aminolysis of an alpha-chloroester catalyzed by Candida cylindracea lipase encapsulated in sol-gel silica glass. *Organic Letters* **3**: 2025-2028 (2001).

Balasubramanian S, Revzin A, Sirnonian A. Electrochemical desorption of proteins from gold electrode surface. *Electroanalysis* **18**: 1885-1892 (2006).

Bell AT. 2003. The impact of nanoscience on heterogeneous catalysis. *Science* **299**: 1688-1691 (2003).

Biniak S, Szymanski G, Siedlewski J, Swiatkowski A. The characterization of activated carbons with oxygen and nitrogen surface groups. *Carbon* **35**: 1799-1810 (1997).

Brown KR, Lyon LA, Fox AP, Reiss BD, Natan MJ. Hydroxylamine seeding of colloidal au nanoparticles. 3. Controlled formation of conductive Au films. *Chemistry of Materials* **12**: 314-323 (2000).

Brown KR, Natan MJ. Hydroxylamine seeding of colloidal Au nanoparticles in solution and on surfaces. *Langmuir* **14**: 726-728 (1998).

Burger C, Hsiao BS, Chu B. Nanofibrous materials and their applications. *Annual*

Review of Materials Research 36: 333-368 (2006).

Cao M, Cheng S, Zhou X, Tao Z, Yao J, Fan L-J. Preparation and surface-enhanced Raman performance of electrospun poly(vinyl alcohol)/high-concentration-gold nanofibers. *Journal of Polymer Research* **19**: 9810-9814 (2012).

Chakraborty S, Liao IC, Adler A, Leong KW. Electrohydrodynamics: A facile technique to fabricate drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* **61**: 1043-1054 (2009).

Chang Y-C, Chen D-H. Catalytic reduction of 4-nitrophenol by magnetically recoverable Au nanocatalyst. *Journal of Hazardous Materials* **165**: 664-669 (2009).

Corman ME, Oeztuerk N, Bereli N, Akgoel S, Denizli A. Preparation of nanoparticles which contains histidine for immobilization of Trametes versicolor laccase. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **63**: 102-107 (2010).

Cristovao RO, Tavares APM, Iraidy Brigida A, Loureiro JM, Boaventura RAR, Macedo EA, Coelho MAZ, Immobilization of commercial laccase onto green coconut fiber by adsorption and its application for reactive textile dyes degradation. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **72**: 6-12 (2011).

Crooks RM, Zhao MQ, Sun L, Chechik V, Yeung LK. Dendrimer-encapsulated metal nanoparticles: Synthesis, characterization, and applications to catalysis. *Accounts of Chemical Research* **34**: 181-190 (2001).

Dai Y, Niu J, Yin L, Xu J, Xu J. Laccase-carrying electrospun fibrous membrane for the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated water. *Separation and Purification Technology* **104**: 1-8 (2013).

De Volder MFL, Tawfick SH, Baughman RH, Hart AJ. Carbon nanotubes: present and future commercial applications. *Science* **339**: 535-539 (2013).

Demir MM, Gulgun MA, Menceloglu YZ, Erman B, Abramchuk SS, Makhaeva EE, Khokhlov AR, Matveeva VG, Sulman MG. Palladium nanoparticles by electrospinning from poly(acrylonitrile-co-acrylic acid)-$PdCl_2$ solutions. Relations between preparation conditions, particle size, and catalytic activity. *Macromolecules* **37**: 1787-1792 (2004).

Diaz JF, Balkus KJ. Enzyme immobilization in MCM-41 molecular sieve. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **2**: 115-126 (1996).

Ebbesen TW, Lezec HJ, Hiura H, Bennett JW, Ghaemi HF, Thio T. Electrical conductivity of individual carbon nanotubes. *Nature* **382**: 54-56 (1996).

Eustis S, Hsu HY, El-Sayed MA. Gold nanoparticle formation from photochemical reduction of Au^{3+} by continuous excitation in colloidal solutions. A proposed molecular mechanism. *Journal of Physical Chemistry B* **109**: 4811-4815 (2005).

Fang X, Ma H, Xiao S, Shen M, Guo R, Cao X, Shi X. Facile immobilization of gold nanoparticles into electrospun polyethyleneimine/polyvinyl alcohol nanofibers for catalytic applications. *Journal of Materials Chemistry* **21**: 4493-4501 (2011).

Ferrari AC, Robertson J. Interpretation of Raman spectra of disordered and amorphous carbon. *Physical Review B* **61**: 14095-14107 (2000).

Fordham S. On the calculation of surface tension from measurements of pendant drops. *Proceedings of the Royal Society of London Series a-Mathematical and Physical Sciences* **194**: 1-16 (1948).

Galliker P, Hommes G, Schlosser D, Corvini PFX, Shahgaldian P. Laccase-modified silica nanoparticles efficiently catalyze the transformation of phenolic compounds. *Journal of Colloid and Interface Science* **349**: 98-105 (2010).

Garcia-Galan C, Berenguer-Murcia A, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. *Advanced Synthesis & Catalysis* **353**: 2885-2904 (2011).

Gopal R, Kaur S, Ma Z, Chan C, Ramakrishna S, Matsuura T. Electrospun nanofibrous filtration membrane. *Journal of Membrane Science* **281**: 581-586 (2006).

Greiner A, Wendorff JH. Electrospinning: A fascinating method for the preparation of ultrathin fibres. *Angewandte Chemie-International Edition* **46**: 5670-5703 (2007).

Guo B, Zhao S, Han G, Zhang L. Continuous thin gold films electroless deposited on fibrous mats of polyacrylonitrile and their electrocatalytic activity towards the oxidation of methanol. *Electrochimica Acta* **53**: 5174-5179 (2008).

Guo SJ, Wen D, Zhai YM, Dong SJ, Wang EK. Platinum Nanoparticle Ensemble-on-Graphene Hybrid Nanosheet: One-Pot, Rapid Synthesis, and Used as New Electrode Material for Electrochemical Sensing. *ACS Nano* **4**: 3959-3968 (2010).

Han G, Guo B, Zhang L, Yang B. Conductive gold films assembled on electrospun poly(methyl methacrylate) fibrous mats. *Advanced Materials* **18**: 1709-1712 (2006).

Haruta M, Kobayashi T, Sano H, Yamada N. Novel gold catalysts for the oxidation of carbon monoxide at a temperature far below 0 ^{o}C. *Chemistry Letters* **16**: 405-408 (1987).

Haruta M. Size- and support-dependency in the catalysis of gold. Catalysis Today **36**: 153-166 (1997).

Hasan A, Memic A, Annabi N, Hossain M, Paul A, Dokmeci MR, Dehghani F, Khademhosseini A. Electrospun scaffolds for tissue engineering of vascular grafts. *Acta Biomaterialia* **10**: 11-25 (2014).

Hasan F, Shah AA, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and*

Microbial Technology **39**: 235-251 (2006).

Haynes CL, Van Duyne RP. Nanosphere lithography: A versatile nanofabrication tool for studies of size-dependent nanoparticle optics. *Journal of Physical Chemistry B* **105**: 5599-5611 (2001).

He D, Hu B, Yao Q-F, Wang K, Yu S-H. Large-scale synthesis of flexible free-standing SERS substrates with high sensitivity: electrospun PVA nanofibers embedded with controlled alignment of silver nanoparticles. *ACS Nano* **3**: 3993-4002 (2009).

Huang J, Wang D, Hou H, You T. Electrospun palladium nanoparticle-loaded carbon nanofibers and their electrocatalytic activities towards hydrogen peroxide and NADH. *Advanced Functional Materials* **18**: 441-448 (2008).

Huang T, Meng F, Qi L. Facile synthesis and one-dimensional assembly of cyclodextrin-capped gold nanoparticles and their applications in catalysis and surface-enhanced raman scattering. *Journal of Physical Chemistry C* **113**: 13636-13642 (2009).

Huang X-J, Ge D, Xu Z-K. Preparation and characterization of stable chitosan nanofibrous membrane for lipase immobilization. *European Polymer Journal* **43**: 3710-3718 (2007).

Huang ZM, Zhang YZ, Ramakrishna S, Lim CT. Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers. *Polymer* **45**: 5361-5368 (2004).

Inagaki M, Yang Y, Kang F. Carbon nanofibers prepared via electrospinning. *Advanced Materials* **24**: 2547-2566 (2012).

Jadzinsky PD, Calero G, Ackerson CJ, Bushnell DA, Kornberg RD. Structure of a thiol monolayer-protected gold nanoparticle at 1.1 angstrom resolution. *Science* **318**: 430-433 (2007).

Jansen RJJ, Vanbekkum H. XPS of nitrogen-containing functional-groups on activated carbon. *Carbon* **33**: 1021-1027 (1995).

Jas G, Kirschning A. Continuous flow techniques in organic synthesis. *Chemistry-a European Journal* **9**: 5708-5723 (2003).

Jiang DS, Long SY, Huang J, Xiao HY, Zhou JY. Immobilization of Pycnoporus sanguineus laccase on magnetic chitosan microspheres. *Biochemical Engineering Journal* **25**: 15-23 (2005).

Jiang G, Zhang S, Qin X. High throughput of quality nanofibers via one stepped pyramid-shaped spinneret. *Materials Letters* **106**: 56-58 (2013).

Jin G, Prabhakaran MP, Kai D, Annamalai SK, Arunachalam KD, Ramakrishna S. Tissue engineered plant extracts as nanofibrous wound dressing. *Biomaterials* **34**: 724-734 (2013).

Jirsak O, Sysel P, Sanetrnik F, Hruza J, Chaloupek J. Polyamic Acid Nanofibers Produced by Needleless Electrospinning. *Journal of Nanomaterials* **2010**: Article ID 842831 (2010).

Johnson AK, Zawadzka AM, Deobald LA, Crawford RL, Paszczynski AJ. Novel method for immobilization of enzymes to magnetic nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research* **10**: 1009-1025 (2008).

Jones CD, Lyon LA. Photothermal patterning of microgel/gold nanoparticle composite colloidal crystals. *Journal of the American Chemical Society* **125**: 460-465 (2003).

Jun S, Joo SH, Ryoo R, Kruk M, Jaroniec M, Liu Z, Ohsuna T, Terasaki O. Synthesis of new, nanoporous carbon with hexagonally ordered mesostructure. *Journal of the American Chemical Society* **122**: 10712-10713 (2000).

Kakegawa T, Mochizuki N, Sadr N, Suzuki H, Fukuda J. Cell-adhesive and cell-repulsive zwitterionic oligopeptides for micropatterning and rapid electrochemical detachment of cells. *Tissue Engineering Part A* **19**: 290-298 (2013.

Kanehata M, Ding B, Shiratori S. Nanoporous ultra-high specific surface inorganic fibres. *Nanotechnology* **18**: 1-7 (2007).

Kang S, Yu JS, Kruk M, Jaroniec M. Synthesis of an ordered macroporous carbon with 62 nm spherical pores that exhibit unique gas adsorption properties. *Chemical Communications*: 1670-1671 (2002).

Kawasaki H, Yamamoto H, Fujimori H, Arakawa R, Iwasaki Y, Inada M. Stability of the DMF-protected Au nanoclusters: photochemical, dispersion, and thermal properties. *Langmuir* **26**: 5926-5933 (2010).

Kim B-H, Yang KS, Ferraris JP. Highly conductive, mesoporous carbon nanofiber web as electrode material for high-performance supercapacitors. *Electrochimica Acta* **75**: 325-331 (2012).

Kim C, Yang KS. Electrochemical properties of carbon nanofiber web as an electrode for supercapacitor prepared by electrospinning. *Applied Physics Letters* **83**: 1216-1218 (2003).

Kim C, Jeong YIL, Ngoc BTN, Yang KS, Kojima M, Kim YA, Endo M., Lee JW. Synthesis and Characterization of porous carbon nanofibers with hollow cores through the thermal treatment of electrospun copolymeric nanofiber webs. *Small* **3**: 91-95 (2007).

Kim J, Grate JW, Wang P. Nanostructures for enzyme stabilization. *Chemical Engineering Science* **61**: 1017-1026 (2006).

Kim JK, Ahn H. Fabrication and characterization of polystyrene/gold nanoparticle composite nanofibers. *Macromolecular Research* **16**: 163-168 (2008).

Koga H, Tokunaga E, Hidaka M, Umemura Y, Saito T, Isogai A, Kitaoka T. Topochemical synthesis and catalysis of metal nanoparticles exposed on crystalline cellulose nanofibers. *Chemical Communications* **46**: 8567-8569 (2010).

Koski A, Yim K, Shivkumar S. Effect of molecular weight on fibrous PVA produced by electrospinning. *Materials Letters* **58**: 493-497 (2004).

Kumar M, Ando Y. Chemical vapor deposition of carbon nanotubes: A review on growth mechanism and mass production. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **10**: 3739-3758 (2010).

Kurihara K, Kizling J, Stenius P, Fendler JH. Laser and pulse radiolytically induced colloidal gold formation in water and in water-in-oil microemulsions. *Journal of the American Chemical Society* **105**: 2574-2579 (1983).

Kuroda K, Ishida T, Haruta M.. Reduction of 4-nitrophenol to 4-aminophenol over Au nanoparticles deposited on PMMA. *Journal of Molecular Catalysis a-Chemical* **298**: 7-11 (2009).

Li D, Xia YN. Electrospinning of nanofibers: reinventing the wheel? *Advanced Materials* **16**: 1151-1170 (2004).

Li X, Kanjwal MA, Lin L, Chronakis IS. Electrospun polyvinyl-alcohol nanofibers as oral fast-dissolving delivery system of caffeine and riboflavin. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **103**: 182-188 (2013).

Linares N, Canlas CP, Garcia-Martinez J, Pinnavaia TJ. Colloidal gold immobilized on mesoporous silica as a highly active and selective catalyst for styrene epoxidation with H_2O_2. *Catalysis Communications* **44**: 50-53 (2014).

Liu H, Cao C-Y, Wei F-F, Jiang Y, Sun Y-B, Huang P-P, Song W-G. Fabrication of macroporous/mesoporous carbon nanofiber using $CaCO_3$ nanoparticles as dual purpose template and its application as catalyst support. *Journal of Physical Chemistry C* **117**: 21426-21432 (2013).

Liu X, Li M, Han G, Dong J. 2010. The catalysts supported on metallized electrospun polyacrylonitrile fibrous mats for methanol oxidation. *Electrochimica Acta* **55**: 2983-2990 (2010).

Liu Y, Teng H, Hou H, You T. Nonenzymatic glucose sensor based on renewable electrospun Ni nanoparticle-loaded carbon nanofiber paste electrode. *Biosensors & Bioelectronics* **24**: 3329-3334 (2009).

Liu Y, Wang D, Xu L, Hou H, You T. A novel and simple route to prepare a Pt nanoparticle-loaded carbon nanofiber electrode for hydrogen peroxide sensing. *Biosensors & Bioelectronics* **26**: 4585-4590 (2011).

Liu Y, Zeng Z, Zeng G, Tang L, Pang Y, Li Z, Liu C, Lei X, Wu M, Ren P, Liu Z, Chen M, Xie G. Immobilization of laccase on magnetic bimodal mesoporous carbon and the application in the removal of phenolic compounds. Bioresource Technology 115: 21-26 (2012).

Lopez N, Janssens TVW, Clausen BS, Xu Y, Mavrikakis M, Bligaard T, Norskov JK. On the origin of the catalytic activity of gold nanoparticles for low-temperature CO oxidation. *Journal of Catalysis* **223**: 232-235 (2004).

Losito I, Malitesta C, De Bari I, Calvano CD. X-ray photoelectron spectroscopy characterization of poly(2,3-diaminophenazine) films electrosynthesised on platinum. *Thin Solid Films* **473**: 104-113 (2005).

Love JC, Estroff LA, Kriebel JK, Nuzzo RG, Whitesides GM. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chemical Reviews* **105**: 1103-1169 (2005).

Lu ZH, Eadula S, Zheng ZG, Xu K, Grozdits G, Lvov Y. Layer-by-layer nanoparticle coatings on lignocellulose wood microfibers. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **292**: 56-62 (2007).

Luk YY, Kato M, Mrksich M. Self-assembled monolayers of alkanethiolates presenting mannitol groups are inert to protein adsorption and cell attachment. *Langmuir* **16**: 9604-9608 (2000).

Malam Y, Loizidou M, Seifalian AM. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends in Pharmacological Sciences* 30: 592-599 (2009).

Malhotra SL, Hesse J, Blanchard LP. Thermal-Decomposition of Polystyrene. *Polymer* **16**: 81-93 (1975).

Mallon CT, De Chaumont C, Moran N, Keyes TE, Forster RJ. Electrochemical desorption of fibrinogen from gold. *Langmuir* **26**: 293-298 (2010).

Marx S, Jose MV, Andersen JD, Russell AJ. Electrospun gold nanofiber electrodes for biosensors. *Biosensors & Bioelectronics* **26**: 2981-2986 (2011).

Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology* **40**: 1451-1463 (2007).

McArthur SL, McLean KM, Kingshott P, StJohn HAW, Chatelier RC, Griesser HJ. Effect of polysaccharide structure on protein adsorption. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **17**: 37-48 (2000).

Medeiros ES, Mattoso LHC, Offeman RD, Wood DF, Orts WJ, Effect of relative humidity on the morphology of electrospun polymer fibers. *Canadian Journal of Chemistry* **86**: 590-599 (2008).

Murphy CJ, Gole AM, Stone JW, Sisco PN, Alkilany AM, Goldsmith EC, Baxter SC.

Gold nanoparticles in biology: beyond toxicity to cellular imaging. *Accounts of Chemical Research* **41**: 1721-1730 (2008).

Nath N, Chilkoti A. A colorimetric gold nanoparticle sensor to interrogate biomolecular interactions in real time on a surface. *Analytical Chemistry* **74**: 504-509 (2002).

Niu H, Lin T. Fiber Generators in Needleless Electrospinning. *Journal of Nanomaterials.***2012**: Article ID 725950 (2012)

Noureddini H, Gao X, Philkana RS. Immobilized Pseudomonas cepacia lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. *Bioresource Technology* **96**: 769-777 (2005).

Novoselov KS, Geim AK, Morozov SV, Jiang D, Zhang Y, Dubonos SV, Grigorieva IV, Firsov AA. Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science* **306**: 666-669 (2004).

Pattamaprom C, Hongrojjanawiwat W, Koombhongse P, Supaphol P, Jarusuwannapoo T, Rangkupan R. The influence of solvent properties and functionality on the electrospinnability of polystyrene nanofibers. *Macromolecular Materials and Engineering* **291**: 840-847 (2006).

Persano L, Camposeo A, Tekmen C, Pisignano D. Industrial Upscaling of Electrospinning and applications of polymer nanofibers: A review. *Macromolecular Materials and Engineering* **298**: 504-520 (2013).

Porada S, Weinstein L, Dash R, van der Wal A, Bryjak M, Gogotsi Y, Biesheuvel PM. Water desalination using capacitive deionization with microporous carbon electrodes. *ACS Applied Materials & Interfaces* **4**: 1194-1199 (2012).

Prabu M, Ketpang K, Shanmugam S. Hierarchical nanostructured NiCo2O4 as an efficient bifunctional non-precious metal catalyst for rechargeable zinc-air batteries.

Nanoscale **6**: 3173-3181 (2014).

Ramakrishna S, Fujihara K, Teo W-E, Yong T, Ma Z, Ramaseshan R. Electrospun nanofibers: solving global issues. *Materials Today* **9**: 40-50 (2006).

Rekuc A, Bryjak J, Szymanska K, Jarzebski AB. Very stable silica-gel-bound laccase biocatalysts for the selective oxidation in continuous systems. *Bioresource Technology* **101**: 2076-2083 (2010).

Rekuc A, Jastrzembska B, Liesiene J, Bryjak J. Comparative studies on immobilized laccase behaviour in packed-bed and batch reactors. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **57**: 216-223 (2009).

Reneker DH, Chun I. Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology* **7**: 216-223 (1996).

Ribeiro CC, Barrias CC, Barbosa MA. Calcium phosphate-alginate microspheres as enzyme delivery matrices. *Biomaterials* **25**: 4363-4373 (2004).

Robertson J. Diamond-like amorphous carbon. *Materials Science & Engineering* R-Reports **37**: 129-281 (2002).

Rodrigues RC, Ortiz C, Berenguer-Murcia A, Torres R, Fernandez-Lafuente R.. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chemical Society Reviews* **42**: 6290-6307 (2013).

Sakai S, Antoku K, Yamaguchi T, Kawakami K. Development of electrospun poly(vinyl alcohol) fibers immobilizing lipase highly activated by alkyl-silicate for flow-through reactors. *Journal of Membrane Science* **325**: 454-459 (2008).

Sakamoto M, Fujistuka M, Majima T. Light as a construction tool of metal nanoparticles: synthesis and mechanism. *Journal of Photochemistry and Photobiology C-Photochemistry Reviews* **10**: 33-56 (2009).

Schlenoff JB, Li M, Ly H. Stability and self-exchange in alkanethiol monolayers. *Journal of the American Chemical Society* **117**: 12528-12536 (1995).

Schrag JD, Li YG, Cygler M, Lang DM, Burgdorf T, Hecht HJ, Schmid R, Schomburg D, Rydel TJ, Oliver JD, Strickland LC, Dunaway CM, Larson SB, Day J, McPherson A. The open conformation of a Pseudomonas lipase. *Structure* **5**: 187-202 (1997).

Sheldon RA, van Pelt S. Enzyme immobilization in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews* **42**: 6223-6235 (2013).

Sheldon RA. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Advanced Synthesis & Catalysis* **349**: 1289-1307 (2007).

Shen L, Yu L, Wang M, Wang X, Zhu M, Hsiao BS. Green fabrication of Ag coated polyacrylonitrile nanofibrous composite membrane with high catalytic efficiency. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **15**: 5004-5012 (2015).

Shi W, Lu W, Jiang L. The fabrication of photosensitive self-assembly Au nanoparticles embedded in silica nanofibers by electrospinning. *Journal of Colloid and Interface Science* **340**: 291-297 (2009).

Sigal GB, Bamdad C, Barberis A, Strominger J, Whitesides GM. A self-assembled monolayer for the binding and study of histidine tagged proteins by surface plasmon resonance. *Analytical Chemistry* **68**: 490-497 (1996).

Son WK, Youk JH, Lee TS, Park WH. Effect of pH on electrospinning of poly(vinyl alcohol). *Materials Letters* **59**: 1571-1575 (2005).

Song MY, Kim DK, Ihn KJ, Jo SM, Kim DY. Electrospun TiO_2 electrodes for dye-sensitized solar cells. *Nanotechnology* **15**: 1861-1865 (2004).

Stauffer CE. Measurement of surface tension by pendant drop technique. *Journal of Physical Chemistry* **69**: 1933-1938 (1965).

Sun XM, Li YD. Colloidal carbon spheres and their core/shell structures with noble-metal nanoparticles. *Angewandte Chemie-International Edition* **43**: 597-601 (2004).

Taepaiboon P, Rungsardthong U, Supaphol P. Drug-loaded electrospun mats of poly(vinyl alcohol) fibres and their release characteristics of four model drugs. *Nanotechnology* **17**: 2317-2329 (2006).

Tencer M, Berini P. Toposelective Electrochemical desorption of thiol SAMs from neighboring polycrystalline gold surfaces. *Langmuir* **24**: 12097-12101 (2008).

Tencer M, Krupin O, Tezel B, Berini P. Electrochemistry of Au-SAM-protein stacks. *Journal of the Electrochemical Society* **160**: H22-H27 (2013).

Tsigara A, Mountrichas G, Gatsouli K, Nichelatti A, Pispas S, Madamopoulos N, Vainos NA, Du HL, Roubani-Kalantzopoulou F. Hybrid polymer/cobalt chloride humidity sensors based on optical diffraction. *Sensors and Actuators B-Chemical* **120**: 481-486 (2007).

Van de Vyver S, Geboers J, Schutyser W, Dusselier M, Eloy P, Dornez E, Seo JW, Courtin CM, Gaigneaux EM, Jacobs PA, Sels BF. Tuning the Acid/Metal balance of carbon nanofiber-supported nickel catalysts for hydrolytic hydrogenation of cellulose. *Chemsuschem* **5**: 1549-1558 (2012).

Wang J, Yao H-B, He D, Zhang C-L, Yu S-H. Facile fabrication of gold nanoparticles-poly(vinyl alcohol) electrospun water-stable nanofibrous mats: efficient substrate materials for biosensors. *ACS Applied Materials & Interfaces* **4**: 1963-1971 (2012).

Wang L, Wang S, Deng X, Zhang Y, Xiong C. Development of coconut shell activated carbon-tethered urease for degradation of urea in a packed bed. *ACS Sustainable*

Chemistry & Engineering **2**: 433-439 (2014).

Wang M-L, Jiang T-T, Lu Y, Liu H-J, Chen Y. Gold nanoparticles immobilized in hyperbranched polyethylenimine modified polyacrylonitrile fiber as highly efficient and recyclable heterogeneous catalysts for the reduction of 4-nitrophenol. *Journal of Materials Chemistry A* **1**: 5923-5933 (2013).

Wang Y, Hsieh YL. Immobilization of lipase enzyme in polyvinyl alcohol (PVA) nanofibrous membranes. *Journal of Membrane Science* **309**: 73-81 (2008).

Wang Y, Li Y, Sun G, Zhang G, Liu H, Du J, Yang S, Bai J, Yang Q. Fabrication of Au/PVP by electrospinning nanofiber composites by electrospinning. *Journal of Applied Polymer Science* **105**: 3618-3622 (2007).

Wang YJ, Caruso F. Mesoporous silica spheres as supports for enzyme immobilization and encapsulation. *Chemistry of Materials* **17**: 953-961(2005).

Wang YZ, Yang QB, Shan GY, Wang C, Du JS, Wang SG, Li YX, Chen XS, Jing XB, Wei Y. Preparation of silver nanoparticles dispersed in polyacrylonitrile nanofiber film spun by electrospinning. *Materials Letters* **59**: 3046-3049 (2005).

Wang Z-G, Wan L-S, Liu Z-M, Huang X-J, Xu Z-K. Enzyme immobilization on electrospun polymer nanofibers: An overview. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **56**: 189-195 (2009).

Wang Z-G, Wang J-Q, Xu Z-K. Immobilization of lipase from Candida rugosa on electrospun polysulfone nanofibrous membranes by adsorption. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **42**: 45-51 (2006).

Weber N, Bergander K, Fehling E, Klein E, Vosmann K, Mukherjee KD. Copolymeric polythioesters by lipase-catalyzed thioesterification and transthioesterification of alpha,omega-alkanedithiols. *Applied Microbiology and Biotechnology* **70**: 290-297

(2006).

Wu LL, Yuan XY, Sheng J. Immobilization of cellulase in nanofibrous PVA membranes by electrospinning. *Journal of Membrane Science* **250**: 167-173 (2005).

Xu R, Chi C, Li F, Zhang B. Laccase-polyacrylonitrile nanofibrous membrane: highly immobilized, stable, reusable, and efficacious for 2,4,6-trichlorophenol removal. *ACS Applied Materials & Interfaces* **5**: 12554-12560 (2013).

Xu R, Zhou Q, Li F, Zhang B. Laccase immobilization on chitosan/poly(vinyl alcohol) composite nanofibrous membranes for 2,4-dichlorophenol removal. *Chemical Engineering Journal* **222**: 321-329 (2013).

Yadav R, Balasubramanian K. Metallization of electrospun PAN nanofibers via electroless gold plating. *RSC Advances* **5**: 24990-24996 (2015).

Yagi T, Nakanishi T, Yoshizawa Y, Fukui F. The Enzymatic Acyl exchange of phospholipids with lipases. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **69**: 23-25 (1990).

Yan Y, Zheng W, Su L, Mao L. Carbon-nanotube-based glucose/O_2 biofuel cells. *Advanced Materials* **18**:2639-2643 (2006).

Yao L, Haas TW, Guiseppi-Elie A, Bowlin GL, Simpson DG, Wnek GE. Electrospinning and stabilization of fully hydrolyzed poly(vinyl alcohol) fibers. *Chemistry of Materials* **15**: 1860-1864 (2003).

Yu P-C, Yang R-J, Tsai Y-Y, Sigmund W, Yen F-S. Growth mechanism of single-crystal alpha-Al_2O_3 nanofibers fabricated by electrospinning techniques. *Journal of the European Ceramic Society* **31**:723-731 (2011).

Yu YY, Chen ZG, He SJ, Zhang BB, Li XC, Yao MC. Direct electron transfer of glucose oxidase and biosensing for glucose based on PDDA-capped gold nanoparticle modified graphene/multi-walled carbon nanotubes electrode. *Biosensors & Bioelectronics* **52**: 147-152 (2014).

Zebda A, Gondran C, Le Goff A, Holzinger M, Cinquin P, Cosnier S. Mediatorless high-power glucose biofuel cells based on compressed carbon nanotube-enzyme electrodes. *Nature Communications* **2**: Article number: 370 (2011).

Zhang M, Liu L, Wu C, Fu G, Zhao H, He B. Synthesis, characterization and application of well-defined environmentally responsive polymer brushes on the surface of colloid particles. *Polymer* **48**: 1989-1997 (2007).

Zhang Z, Li X, Wang C, Fu S, Liu Y, Shao C. Polyacrylonitrile and carbon nanofibers with controllable nanoporous structures by electrospinning. *Macromolecular Materials and Engineering* **294**: 673-678 (2009).

Zhang Z, Shao C, Zou P, Zhang P, Zhang M, Mu J, Guo Z, Li X, Wang C, Liu Y. In situ assembly of well-dispersed gold nanoparticles on electrospun silica nanotubes for catalytic reduction of 4-nitrophenol. *Chemical Communications* **47**: 3906-3908 (2011).

Zhu H, Du M, Zou M, Xu C, Li N, Fu Y. Facile and green synthesis of well-dispersed Au nanoparticles in PAN nanofibers by tea polyphenols. *Journal of Materials Chemistry* **22**: 9301-9307 (2012).

Zhu H, Yan J, Revzin A. Catch and release cell sorting: Electrochemical desorption of T-cells from antibody-modified microelectrodes. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **64**: 260-268 (2008).

Zhu X, Gao Q, Xu D, Shi X. Effect of interaction between hydroxyl group and high valence metal ion impurity on the electrospinnability of polyvinyl alcohols. *Journal of Applied Polymer Science* **113**: 143-149 (2009).

Zhu XJ, Zhu YW, Murali S, Stollers MD, Ruoff RS. Nanostructured reduced graphene oxide/Fe_2O_3 composite as a high-performance anode material for lithium ion batteries. *ACS Nano* **5**: 3333-3338 (2011).

Zhu Y, Kaskel S, Shi J, Wage T, van Pee K-H. Immobilization of Trametes versicolor laccase on magnetically separable mesoporous silica spheres. *Chemistry of Materials* **19**: 6408-6413 (2007).

発表報文リスト

本論文に関する報文

1. Enhanced productivity of electrospun polyvinyl alcohol nanofibrous mats using aqueous *N*, *N*-dimethylformamide solution and their application to lipase-immobilizing membrane-shaped catalysts

Sawada, K., Sakai, S., and Taya, M.

Journal of Bioscience and Bioengineering **114**: 204-208 (2012)

2. Electrospun polystyrene fiber-templating ultrafine gold hollow fiber production

Sakai, S., Kawa, S., Sawada, K., and Taya, M.

Gold Bulletin **46**: 97-101 (2013)

3. Polyacrylonitrile-based electrospun nanofibers carrying gold nanoparticles in situ formed by photochemical assembly

Sawada, K., Sakai, S., and Taya, M.

Journal of Materials Science **49**: 4595-4600 (2014)

4. Fabrication of ultrafine carbon fibers possessing a nanoporous structure from electrospun polyvinyl alcohol fibers containing silica nanoparticles

Sawada, K., Sakai, S., and Taya, M.

Journal of Nanomaterials **2014**: Article ID 487943, 6 pages (2014) doi:10.1155/2014/487943

5. Electrochemical recycling of gold nanofibrous membrane as an enzyme immobilizing carrier

   Sawada, K., Sakai, S., and Taya, M.

   Chemical Engineering Journal **280**: 558-563 (2015)

国際学会発表

1. Tailoring Gold Nanoparticles in Electrospun Poly(acrylonitrile) and Derived Carbon Fibers by Reduction of Enclosed Gold Salt

   Sawada, K., Sakai, S., and Taya, M.

   International Conference of Young Researchers on Advanced Materials, CM3-W-06, Singapore (2012)

2. Preparation of cobalt-embedded silica nanoparticulate electrospun fibers and carbon synthesis by alcohol CVD

   Sawada, K., Sakai, S., and Taya, M.

   The 6th International Workshop on Advanced Materials Science and Nanotechnology, NMD24, Vietnam (2012)

謝辞

本研究の遂行ならびに本論文の作成にあたり，終始，丁寧かつ適切なご指導・ご助言を賜りました大阪大学大学院基礎工学研究科・物質創成専攻化学工学領域　教授　田谷正仁先生に心から感謝の意を表します．また，学位論文の作成にあたり，懇切なご指導を賜りました大阪大学大学院基礎工学研究科・物質創成専攻化学工学領域　教授　平井隆之先生，西山憲和先生，発表会等で適切なご助言を賜りました大阪大学大学院基礎工学研究科・物質創成専攻化学工学領域　教授　馬越大先生，岡野泰則先生，實川浩一郎先生，中野雅由先生，松林伸幸先生に感謝の意を表します．

また，本研究を遂行するにあたり熱心かつ適切なご指導・ご助言を賜りました大阪大学大学院基礎工学研究科・物質創成専攻化学工学領域　准教授　境慎司先生，助教　尾島由紘先生，助教　劉楊先生に感謝の意を表します．事務手続きにてご尽力いただきました事務補佐員　莚田雅子様に感謝致します．様々なご意見，ご助言を賜りました田谷研究室の先輩諸氏に感謝の意を表します．

最後に，大学院にて研究を行う機会を与えてくださった両親に心から感謝の意を表します．