

溶解および固定化した西洋ワサビペルオキシダーゼを用いる o-フェニレンジアミンから 2,3-ジアミノフェナジンへの反応速度*

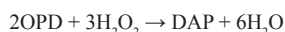
諸 岡 成 治 **
山 中 貴 之 **
山 崎 吉 一 **
重 松 幹 二 **
郭 師 ***
今 任 稔 彦 ***

Reaction rates of *o*-phenylenediamine to 2,3-diaminophenazine by soluble and immobilized horseradish peroxidase

Shigeharu MOROOKA**, Takayuki YAMANAKA**, Yoshikazu YAMASAKI**,
Mikiji SHIGEMATSU**, Shuai GUO*** and Toshihiko IMATO***

Summary

Reaction of *o*-phenylenediamine (OPD) to 2,3-diaminophenazine (DAP), catalyzed by horse radish peroxidase (HRP), was studied with a view to determining H_2O_2 concentration in microchannel-type analytical devices.



DAP was produced quantitatively, and was measured spectrophotometrically after quenching with H_2SO_4 . Initial formation rates of DAP were determined as functions of concentrations of HRP, H_2O_2 and OPD, and reactor flow types. No effects were found for OPD concentration, and the data were correlated using the Michaelis-Menten equation:

$$r_{\text{init}} = \frac{k_r c_{\text{HRP}} c_{\text{H}_2\text{O}_2}}{K_M + c_{\text{H}_2\text{O}_2}}$$

where the concentrations are expressed in mmol L^{-1} , based on the mixture volume prior to H_2SO_4 quenching, and $k_r = 2.7 \times 10^4 \text{ min}^{-1}$ and $K_M = 0.37 \text{ mmol L}^{-1}$.

A series of conditions were applied to immobilize HRP on magnetic poly(lactic acid) particles (micromod) of 35 and 103 μm in diameter. The reactivity of the HRP-immobilized particles was dependent on reaction conditions and repetition of reactions. A comparison between typical reaction rates for dissolved and immobilized HRPs suggested that the amount of immobilized HRP was of the order of 10 ng per 1 mg for the 103- μm particles.

Key Words : horseradish peroxidase, *o*-phenylenediamine, 2,3-diaminophenazine, hydrogen peroxide, magnetite, poly(lactic acid), immobilization, reaction rate

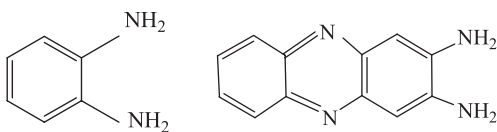
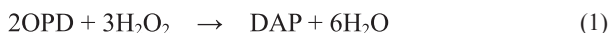
* 平成 24 年 5 月 31 日受付

** 化学システム工学科

*** 九州大学大学院化学システム工学専攻

緒 言

酵素などの生体触媒は、穏和な条件で高い選択率で反応を促進するため、バイオリアクターやバイオセンサーに応用されている。西洋ワサビペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase, HRP) は代表的な酸化酵素であり研究例が多い (Veitch, 2004)。本研究では、 H_2O_2 で *o*-フェニレンジアミン (*o*-phenylenediamine, OPD) を酸化して 2,3-ジアミノフェナジン (2,3-diaminophenazine, DAP) を生成する反応を取り上げる。



OPD 1 mol について H_2O_2 1.5 mol が消費され、DAP 0.5 mol が生成する。HRP が存在しない条件でも OPD は酸化されるが、 H_2O_2 が希薄であれば、DAP はほぼ定量的に生成する (Liu *et al.*, 2006; Fornera *et al.*, 2010)。DAP は酸性で 492 nm (Soh *et al.*, 2002) に吸収があるので、光学の検出が容易である。

酵素と基質と溶液の状態での反応させる方式は反応条件の最適制御が容易であるが、反応後に酵素を回収することが難しい。そのため、均一液相での反応は酵素の消費をもたらす、高価な酵素を用いる場合は経済的でない。これに対し、酵素を不溶性の担体に固定化する方式では、酵素を流出させないことが可能である。Poulsen *et al.* (2007) は、ポリアクリルアミド粒子に HRP を固定化し、 H_2O_2 とグアイアコールの反応速度を測定した。Qiu *et al.* (2010) は、ナノポーラス銅電極に HRP を固定化した。Vojinović *et al.* (2007) らは、HRP を多孔質ガラスに固定化して水処理へ応用した。Cho *et al.* (1983) は HRP を多孔質ガラスに固定化し、アンペロメトリーによって H_2O_2 を検出する系を構築した。

粒子を小さくすれば操作の途中で流失する可能性が増すが、マグネタイト微粒子は磁性を有しているので、微小な粒子であっても磁力によって生成物と分離できる (Dalal *et al.*, 2007; Aguilar-Arteaga *et al.*, 2010)。Won *et al.* (2010) は、 Fe_2O_3 を包含したメソポーラスシリカに HRP を固定化し、電極面上に塗布して H_2O_2 センサとして使用した。Rossi *et al.* (2004) は大きさが 20 nm の Fe_2O_3 粒子を合成し、グルコースオキシダーゼを固定化した。この粒子は、グルコースセンサとして 3 か月以上安定であった。Saidman *et al.* (2006) は、HRP を均一水溶液に溶解した場合と磁性粒子に固定化した場合について、アニリンの除去特性を比較した。Gao *et al.* (2007) は Fe_3O_4 粒子自体が HRP と同様の機能を有することを示した。

Yang *et al.* (2009) は、カルボキシル基剤でコーティングした磁性粒子に HRP を固定化し、 H_2O_2 の検出を行った。

Guo *et al.* (2012) は、アルキルフェノールエトキシレート類 (APnEOs) の抗体を Fe_3O_4 含有ポリ乳酸粒子に固定化した。このような粒子はマイクロ空間に保持することも可能であり (Roman-Gusetu *et al.*, 2009)、遠心力で送液をする CD 型の流路 (Duffy *et al.*, 1999; Yamasaki *et al.*, 2010) に保持すれば、ポンプを使用しない流れ分析に応用できる。

本研究では、HRP を用いた反応 (1) を応用するため、回分式と連続式の 2 つの異なる反応形式で、均一水溶液で反応速度を測定する。さらに、マグネタイト微粒子をポリ乳酸で複合化した粒子を用いて、1-エチル-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (EDC) あるいは N-ヒドロシスクシンイミド (NHS) を用いる縮合反応によって HRP を固定化する。HRP 固定化粒子の反応速度と溶液中での反応速度を比較して、HRP の有効固定化量を推算する。

2. 試薬および担体粒子

本実験で用いた主な試薬を以下に示す。いずれもアルミフویلで遮光し、冷暗所に保存した。

- リン酸緩衝剤 (PBS) ; 脱気精製水を用いて濃度 $1/15 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7.0~7.2) に調製した。磁性粒子 (ポリ乳酸) を活性エステル化した後のブロッキング処理に用いる場合は、Tween 20 (Sigma-Aldrich) を体積で 0.1% となるように添加した。
- トリス塩酸緩衝剤 (tris) ; 脱気精製水を用いて濃度 1 mol L^{-1} (pH 8.0) に調製し、ブロッキング処理にのみ用いた。
- McIlvaine 緩衝液 (McIlvaine) ; クエン酸一水和物 ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) とリン酸二水素ナトリウム 12 水和物 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) を脱気精製水に溶解し、クエン酸一水和物を加えて pH = 5.5 に調整した。
- 西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP, 和光純薬工業, 約 40.2 kg mol^{-1}) ; 粉末を秤量して PBS で希釈した。均一相反応の場合は $0.05 \sim 0.2 \text{ mg L}^{-1}$, 固定化を行う場合は常に 1 g L^{-1} の溶液とした。
- 過酸化水素 (H_2O_2) ; 局方品を脱気精製水で所定の濃度に希釈した。濃度は、紫外可視分光光度計 (UV-1700, Shimadzu) を用いて波長 254 nm で測定した。
- o*-フェニレンジアミン (*o*- $\text{C}_6\text{H}_4(\text{NH}_2)_2 \cdot 2\text{HCl}$, OPD, タブレット 1錠は $\text{OPD} \cdot 2\text{HCl}$ を 13 mg 含む) ; タブレットを PBS で希釈し、 $0.3 \sim 7.2 \text{ mmol L}^{-1}$ とした。
- N-ヒドロキシコハク酸イミド ($\text{C}_4\text{H}_5\text{NO}_3$, NHS) ; PBS で 0.10, 0.20 および 0.40 mol L^{-1} に希釈し、磁性粒子 (ポリ乳酸) の活性エステル化に用いた。
- 1-エチル-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイ

ミド ($C_8H_{17}N_3 \cdot HCl$, EDC, 東京化成) ; PBCで 0.10, 0.40および0.80 mol L⁻¹に希釈し, 磁性粒子 (ポリ乳酸) の活性エステル化に用いた.

- ・酵素固定化用の磁性ポリ乳酸粒子 (PLA-Particles, micromod Partikeltechnologie, マグネタイト微粒子とポリ乳酸の複合球体, 高分子末端は-COOH, 粒子密度は $1.3 \times 10^3 \text{ kg m}^{-3}$, 懸濁液中の粒子濃度は 10 mg mL⁻¹) ; 粒子の性状をFigure 1に示す. 膨潤粒子の平均直径は35 μm および103 μm であった. 破片状の粒子も含まれていたが磁性が弱く, 洗浄時に流出した.

3. 均一水溶液における反応速度

3.1 DAP 濃度

pH = 5.5 の McIlvaine 緩衝液あるいは pH = 7.2 の PBS 緩衝液を 5 mL, 0.10 mg L⁻¹ の HRP を 10 mL, 0.7 ~ 6 mmol L⁻¹ の H₂O₂ を 5 mL, 0.3~0.9 mmol L⁻¹ の OPD を 5 mL, 攪拌しながら順に加えた. OPD を加えたときを反応開始時間とし, 60 min 後に 1.7 mol L⁻¹ の H₂SO₄ を 2 mL 加えて反応を停止させ, 紫外可視分光光度計 (UV-1700, Shimadzu) を用いて, 波長 491 nm で混合液中の DAP の吸光度を測定した. なお, OPD を加えないときの吸光度の変化は無視可能であった. Figure 2 に混合前の OPD 濃度を 0.60 mmol L⁻¹ としたときの, 混合前の H₂O₂ 濃度と H₂SO₄ を加えた後の DAP 吸光度の関係を示す. 混合前の H₂O₂ 水溶液の濃度が 1.5 mmol L⁻¹ 程度とすると, 吸光度はほぼ一定値となった. このことは, H₂O₂ によって OPD が消費され, DAP が生成したことを示す.

Figure 3 は, DAP の生成量が OPD の 1/2 であるとして計算した DAP 濃度 (H₂SO₄ を加えた後の溶液の体積基準) と吸光度の関係を示す. モル吸光係数 ϵ は次式となった.

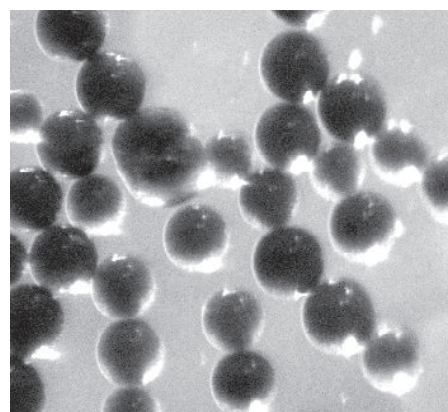
$$\epsilon = 3.4 \times 10^4 \sim 3.7 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \quad (2)$$

3.2 反応速度測定

HRP の活性は回分式および連続式で測定した.

<回分式> 体積 50 mL のサンプル瓶に, McIlvaine 緩衝液 5 mL, HRP 溶液 (濃度 0.05~0.2 mg L⁻¹) 10 mL, H₂O₂ 溶液 (濃度 0.28 ~ 1.5 mmol L⁻¹) 5 mL, OPD 溶液 (濃度 1.8 ~ 7.2 mmol L⁻¹) 5 mL を順に入れた. このとき HRP, H₂O₂, OPD の濃度の一つを変え, 残りの濃度を一定として実験した. 混合溶液は 23 ~ 24°C に保ちながらスターラーで攪拌した. OPD 溶液を添加した時間を反応開始時間とし, 所定の時間後に 1.7 mol L⁻¹ の H₂SO₄ を 2 mL 添加し, 反応を停止させた. 得られた DAP 溶液の濃度は分光光度計で測定した.

<連続式> Figure 4 に概略を示す. McIlvaine 緩衝



100 μm

Figure 1. Magnetic poly(lactic acid) particles (average diameter = 103 μm) used for HRP immobilization.

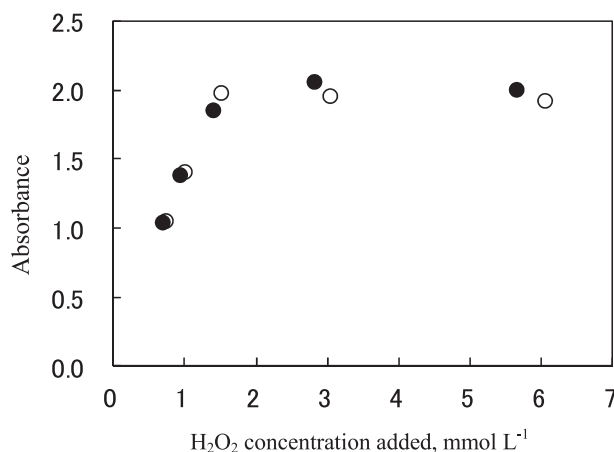


Figure 2. Relationship between DAP absorbance and H₂O₂ concentration added in the solution
 Reaction conditions; McIlvaine buffer (pH = 5.5) 5 mL, HRP (0.10 mg L⁻¹) 10 mL, H₂O₂ 5 mL, OPD (0.60 mmol L⁻¹) 5 mL, reaction time = 60 min, quenched with H₂SO₄ (1.7 mol L⁻¹) 2 mL.
 Open and closed circles shows reproducibility tests by different experimenters..

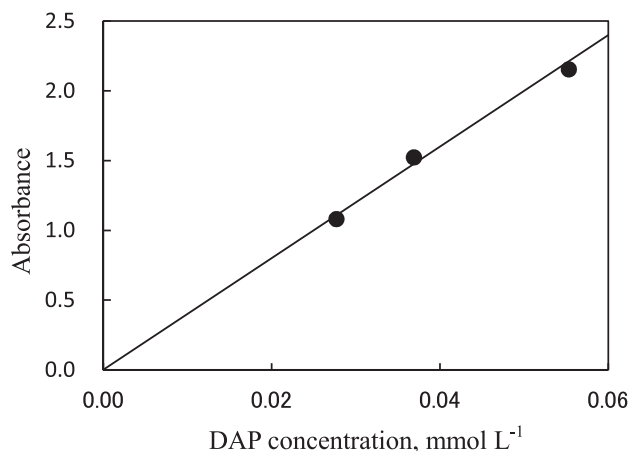


Figure 3. Relationship between absorbance and DAP concentration in case of McIlvaine buffer. DAP concentrations were calculated on basis of volume after addition of H₂SO₄.

液 (pH = 5.5) を 1, HRP 溶液 (濃度 0.1 mg L^{-1}) を 2, H_2O_2 溶液 (濃度 0.67 mmol L^{-1}) を 1 の割合で混合 (溶液 1) してガラス製シリンジに入れた. また, OPD 溶液 (濃度 3.6 mmol L^{-1}) (溶液 2) を別のガラス製シリンジに入れた. シリンジポンプを用いて, 溶液 1 : 溶液 2 を 4:1 の流量比 (回分式と同じ濃度) で流し, ジョイントで合流させ, 内径 1 mm, 長さ 20 cm のテフロン製細管で反応させた. 排出液は 1.7 mol L^{-1} の H_2SO_4 と混合 (混合比は回分式と同じ) し, 反応を停止させた. ジョイントで合流した後に反応管を通過する時間を反応時間とし, 流量で調節した. 反応は $23 \sim 24^\circ\text{C}$ で行った.

なお, H_2SO_4 を添加することで溶液中の各成分は希釈されるが, 以下に記す DAP 濃度および初期 DAP 生成速度は, H_2SO_4 を添加する前の溶液の体積基準に換算している.

3.3 結果ならびに考察

Figure 5 は, 回分式反応において, McIlvaine 緩衝液 5 mL, HRP 溶液 (濃度 0.10 mg L^{-1}) 10 mL, H_2O_2 溶液 (濃度 1.5 mmol L^{-1}) 5 mL, OPD 溶液 (濃度 3.6 mmol L^{-1}) 5 mL を混合したときの, 反応時間と生成した DAP 濃度との関係を示す. DAP 濃度は時間とともに増加し, やがて一定値となった. さらに, H_2O_2 濃度の影響を調べるために, 混合前の H_2O_2 溶液の濃度を 0.29 mmol L^{-1} , 0.77 mmol L^{-1} として反応実験を行った結果を Figure 6 に示す. DAP 濃度と時間の関係から初期 DAP 生成速度を計算し, 混合前の H_2O_2 溶液の濃度との関係を求めると Figure 7 が得られた.

反応溶液の体積の影響を調べるために, McIlvaine 緩衝液 1 mL, HRP 溶液 (濃度 0.10 mg L^{-1}) 2 mL, H_2O_2 溶液 (濃度 1.5 mmol L^{-1}) 1 mL, OPD 溶液 (濃度 3.6 mmol L^{-1}) 1 mL を混合して反応実験を行った. その結果, 混合比が同じであれば, 反応溶液の体積は影響しないことを確認した.

さらに, McIlvaine 緩衝液 5 mL, HRP 溶液 (濃度 0.050 , 0.10 , 0.20 mg L^{-1}) 10 mL, H_2O_2 溶液 (濃度 0.59 mmol L^{-1}) 5 mL, OPD 溶液 (濃度 3.6 mmol L^{-1}) 5 mL を混合して, 反応時間と生成した DAP 濃度との関係を調べ, Figure 8 に示す結果を得た. Figure 9 のように, 初期 DAP 生成速度は HRP の濃度に比例した.

ついで, McIlvaine 緩衝液 5 mL, HRP 溶液 (濃度 0.1 mg L^{-1}) 10 mL, H_2O_2 溶液 (濃度 0.35 mmol L^{-1}) 5 mL, OPD 溶液 (濃度 1.8 , 3.6 および 7.2 mmol L^{-1}) 5 mL を混合して, 反応時間と生成した DAP の濃度との関係を調べた. Figure 10 に示すように, 加えた OPD の濃度は初期 DAP 生成速度に影響を及ぼさなかった.

また, 原料の濃度ならびに反応時間を同じにして回分式と連続式で実験を行ったところ, 生成した DAP 濃度に差がなかった (Figure 11).

以上の実験において得られた初期 DAP 生成速度 ($\text{mmol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$) は, 次に示す Michaelis-Menten 式によって整理した. 各濃度 (mmol L^{-1}) は H_2SO_4 を添加する前の混合溶液の体積に基づいている.

$$r_{\text{init}} = \frac{k_r c_{\text{HRP}} c_{\text{H}_2\text{O}_2}}{K_M + c_{\text{H}_2\text{O}_2}} \quad (3)$$

ここに, $k_r = 2.7 \times 10^4 \text{ min}^{-1}$, $K_M = 0.37 \text{ mmol L}^{-1}$ となった. Figure 12 に示すように, 初期 DAP 生成速度の実測値と Equation (3) から算出した値はほぼ一致している.

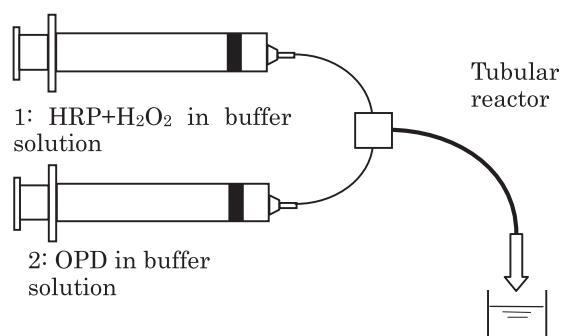


Figure 4. Schematic flow diagram of tubular reactor.

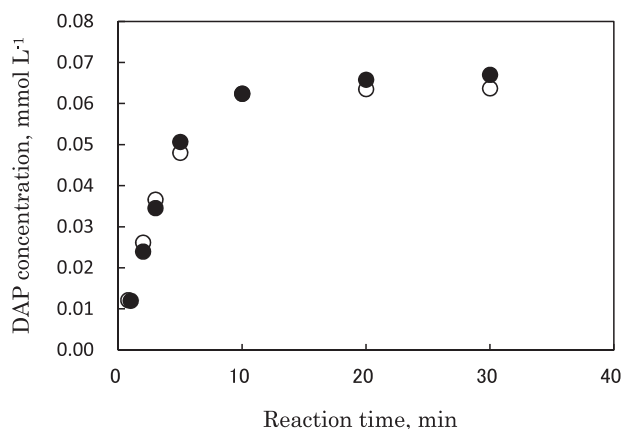


Figure 5. Effect of reaction time on DAP concentration formed. Reaction conditions; McIlvaine buffer (pH = 5.5) 5 mL, HRP (0.10 mg L^{-1}) 10 mL, H_2O_2 (1.5 mmol L^{-1}) 5 mL, OPD (3.6 mmol L^{-1}) 5 mL, quenched with H_2SO_4 (1.7 mol L^{-1}) 2 mL. Open and closed circles shows reproducibility tests by different experimenters.

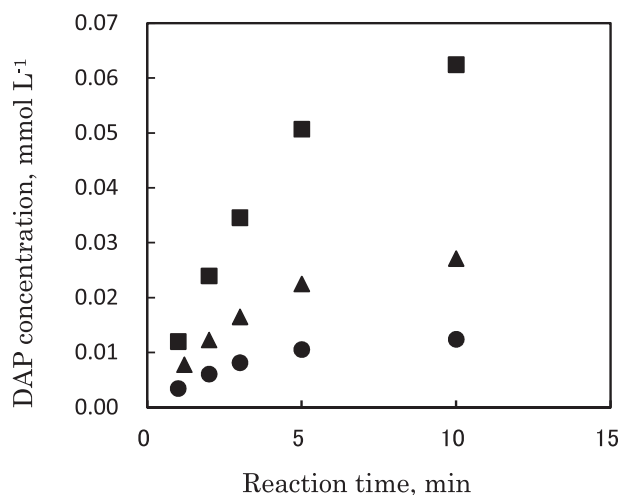


Figure 6. Effects of reaction time and H_2O_2 concentration on concentration of DAP formed.
 Reaction conditions; McIlvaine buffer (pH = 5.5) 5 mL, HRP (0.10 mg L^{-1}) 10 mL, H_2O_2 5 mL, OPD (3.6 mmol L^{-1}) 5 mL, quenched with H_2SO_4 (1.7 mol L^{-1}) 2 mL. H_2O_2 concentration in the 5-mL solution added. ● 0.29 mmol L^{-1} , ▲ 0.77 mmol L^{-1} , ■ 1.5 mmol L^{-1} .

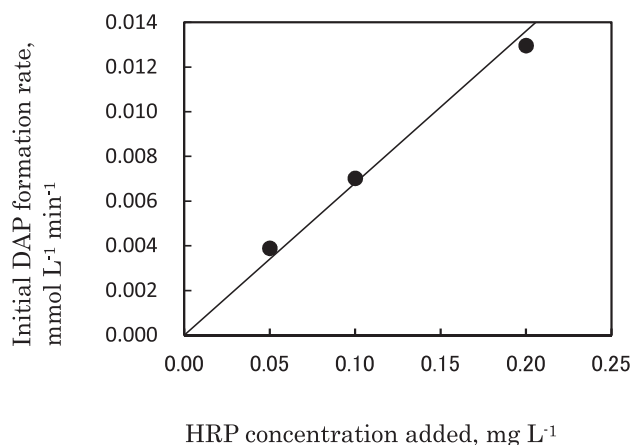


Figure 9. Effect of HRP concentration added on initial DAP formation rate.
 Reaction conditions are shown in Fig. 8.

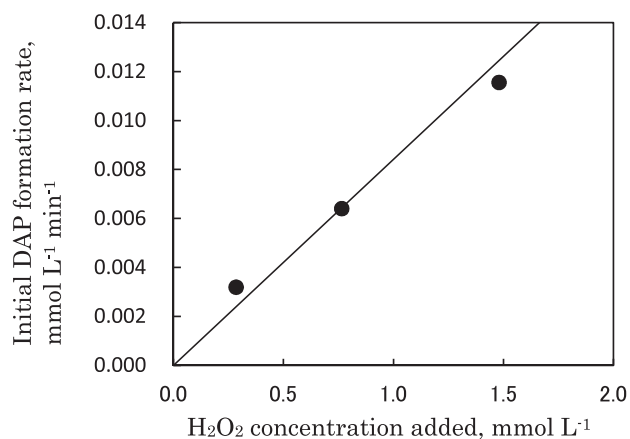


Figure 7. Effect of H_2O_2 concentration added on initial DAP formation rate.
 Reaction conditions are shown in Fig. 6.

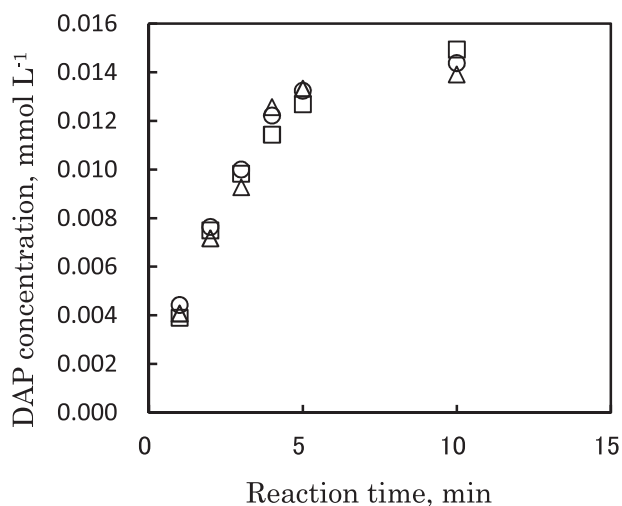


Figure 10. Effects of reaction time and OPD concentration on DAP concentration formed.
 Reaction conditions; McIlvaine buffer (pH = 5.5) 5 mL, HRP 10 mL, H_2O_2 (0.35 mmol L^{-1}) 5 mL, OPD 5 mL, quenched with H_2SO_4 (1.7 mol L^{-1}) 2 mL. OPD concentration in the 5-mL solution added. □ 1.8 mmol L^{-1} , ○ 3.6 mmol L^{-1} , △ 7.2 mmol L^{-1} .

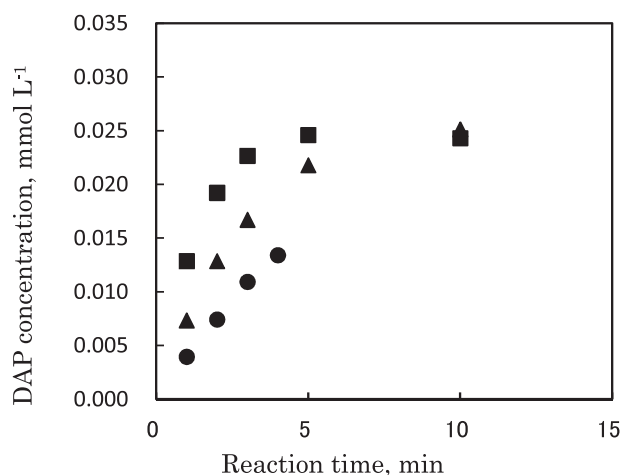


Figure 8. Effects of reaction time and HRP concentration on concentration of DAP formed.
 Reaction conditions; McIlvaine buffer (pH = 5.5) 5 mL, HRP 10 mL, H_2O_2 (0.59 mmol L^{-1}) 5 mL, OPD (0.59 mmol L^{-1}) 5 mL, quenched with H_2SO_4 (1.7 mol L^{-1}) 2 mL. HRP concentration in the 10-mL solution added. ● 0.050 mg L^{-1} , ▲ 0.10 mg L^{-1} , ■ 0.20 mg L^{-1} .

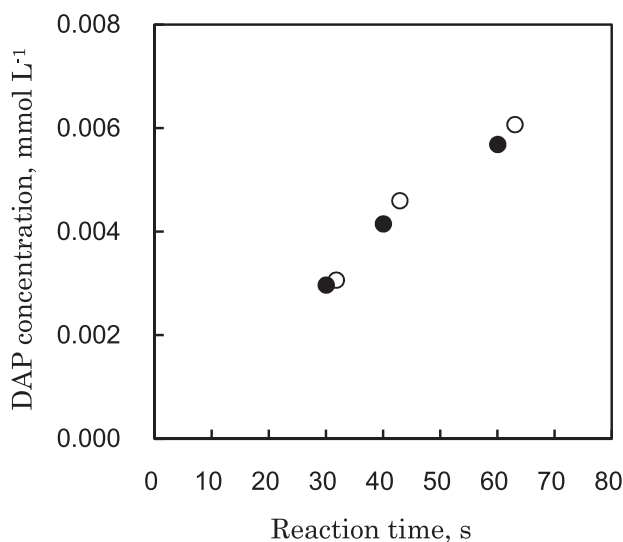


Figure 11. Comparison of DAP concentrations formed between batch and continuous flow reactors. ● = batch reactor, ○ = continuous flow reactor.

Reaction conditions for batch reactor; McIlvaine buffer (pH = 5.5) 5 mL, HRP (0.1 mg L⁻¹) 10 mL, H₂O₂ (0.67 mmol L⁻¹) 5 mL, OPD (3.6 mmol L⁻¹) 5 mL, quenched with H₂SO₄ (1.7 mol L⁻¹) 2 mL. Feeds to continuous reactors were maintained at the same flow rate ratios as above.

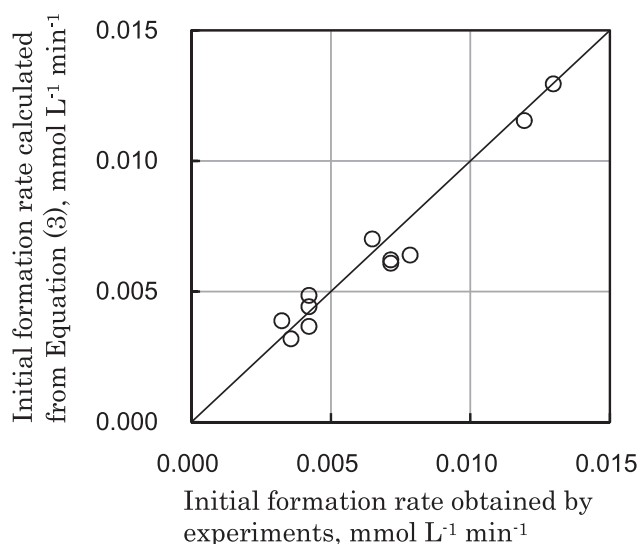


Figure 12. Comparison of initial DAP formation rates between experiments and correlation.

4. HRP の固定化と反応特性

4.1 固定化および反応速度の測定

HRP の固定化は、Figure 13 に示す混合法と 2 段階法で行った。

混合法： 50 mL サンプル瓶に、磁性ポリ乳酸粒子を含む懸濁液 0.5 mL (粒子 5 mg) を採取し、PBS 緩衝液 (pH = 7.2) で 3 回洗浄した。粒子の流出はサンプル瓶の底部に磁石をあてることで防止した。所定量の NHS, EDC, および 1 mg mL⁻¹ の HRP を混合した溶液 (この混合液を Solution A とする) を粒子懸濁液に加え、25°C の恒温槽で所定時間振とうし、HRP を固定化した。粒子は PBS 緩衝液 (pH = 7.2) で 4 ~ 5 回洗浄した後、同緩衝液を 0.5 mL 添加した。ついで、HRP の非特異的な吸着を防ぐため、ブロッキング溶液 (Solution B とする) を加え、恒温槽中 25°C で所定時間振とうし、未反応の活性エステル基をカルボキシル基へと戻した。粒子は PBS (pH = 7.2) で 4 ~ 5 回洗浄し、同緩衝液を 0.5 mL 加えて冷暗所で保存した。

2 段階法： 所定量の NHS および EDC を混合した溶液 (この混合液を Solution C とする) を粒子懸濁液に加え、25°C の恒温槽で所定時間振とうして活性エステルを生成させた。ついで HRP 溶液 (Solution D とする) を加えて 25°C で所定時間振とうし、HRP を固定化した。さらに、混合

法と同じ方法でブロッキング処理、洗浄処理を行った。

固定化 HRP の反応は回分式均一相反応の方法に準じて測定した。体積 50 mL のサンプル瓶に、HRP を固定化した粒子 5 mg を含む PBS 緩衝液 0.5 mL, OPD 溶液 (濃度 3.6 mmol L⁻¹) 4 mL, H₂O₂ 溶液 (濃度 5.6 ~ 6.1 mmol L⁻¹) 0.5 mL を順に入れた。溶液は 24°C で 5 分間振とうした。ついで、磁石で磁性粒子を保持しながら反応溶液を分離し、1.7 mol L⁻¹ の H₂SO₄ を 4.5 mL 入れた容器に移して反応を停止させた (反応条件は、後述の Table 3 のセル C2 ~ C18 に示す)。生成した DAP の濃度は、均一相反応のときと同様に分光光度計で測定した。また、HRP 固定化粒子を入れずに同じ手順の実験を行って、DAP 濃度を分光光度計で測定し、粒子が存在するときの DAP の生成量から差し引き、真の DAP 濃度を得た。HRP 固定化粒子を用いた反応実験を繰り返すときは、粒子に PBS 緩衝液を加えて振り混ぜて洗浄し、次の反応に供した。

なお、直径 d_p の粒子中を基質が拡散するとき、中心の濃度が表面濃度の 80% 程度となる時間 t_m は次式で表される (Crank, 1980)。

$$4D_m t_m / d_p^2 \approx 0.25 \quad (4)$$

液体中の基質の拡散係数は $D_m = 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-2}$ の桁である。膨潤粒子中の拡散係数を液体中の 1/10 と見なして $10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-2}$ と仮定し、 $d_p \approx 1 \times 10^{-4} \text{ m}$ とすると、拡散に要する時間は以下となる。

Table 1 Conditions for immobilization. Volume of initial particle suspension = 0.5 mL, including 5 mg of particles.

Case	Particle diameter, μm	Conc. of NHS soln. added, mol/L	Volume of NHS soln. added, mL	Conc. of EDC soln. added, mol/L	Volume of EDC soln. added, mL	Conc. of HRP soln. added, mg/mL	Volume of HRP soln. added, mL	Total volume for immobilization, mL	Time period of immobilization, min	Volume of blocking soln., mL		Time period of blocking, min	Key
										Reactant A		Reactant B	
1	103	0.20	4		0	1	4	8.5	30	5		30	○
2	103	0.20	4		0	1	4	8.5	60	5		30	●
3	103	0.20	2	0.8 resv.	2	1	4	8.5	30	5		30	△
4	103	0.20	2	0.8 new	2	1	4	8.5	30	5		30	□
5	103	0.20	1	0.8 new	1	1	2	4.5	60	5		30	◆
6	103	0.20	2		0	1	2	4.5	60	5		30	▲
7	35	0.40	4		0	1	4	8.5	30	4		30	◇

$$t_m \approx 0.25d_p^2 / (4D_m) \approx 6\text{s} \quad (5)$$

実際の反応は数 10 s 以上の時間が必要であるので、粒子内の拡散係数は律速とならない。

4.2 固定化条件と反応速度の関係

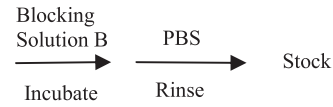
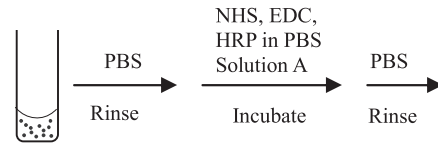
混合法による固定化反応の条件を Table 1 に示す。また、Case 1 から Case 7 までの条件で生成した DAP の濃度を Figure 14 に示す。

Case 1 では、NHS のみ使用して活性化し、固定化時間は 30 min とした。なお、各回の反応が終了した後、粒子は PBS 緩衝液中で 15 min 振り混ぜて洗浄した。Case 2 では、NHS のみ使用して活性化し、固定化時間は 60 min とした。各回の反応が終了した後、粒子は PBS 緩衝液中で 30 s 振り混ぜて洗浄した。Case 1 は、Case 2 よりも固定化の反応時間が長いので活性が高かったが、各回の反応後に行った 15 min の洗浄によって、活性が徐々に低下した。従って、Case 3 以降は各回の反応後の洗浄時間を 30 s とした。

Case 3 では、活性化剤として NHS と EDC を混合して使用した。NHS と EDC は同等の効果であった。しかし、EDC の活性は時間とともに劣化することがある。そこで Case 4 では新規に調製した EDC を使用した。その結果、初回の反応の転化量が多くなったが、反応を繰り返すと保存した EDC を使用したときと同等となった。Case 5 は、新規に調製した EDC を用いて EDC と NHS の混合比を変化させて活性化した場合、Case 6 は NHS のみを使用して活性化した場合である。これらの結果は、NHS の濃度が高いほど、同じ濃度では NHS と EDC の濃度が等しいときに固定化がより進行したことを示す。これらの結果から、EDC と NHS の同時添加、EDC 単独添加、NHS 単独添加による活性エステルの生成反応は、Figure 15 のように推定される。

もし、HRP が粒子の表面のみに固定化されていれば、

(a) Mixed reaction



(b) Two-step reaction

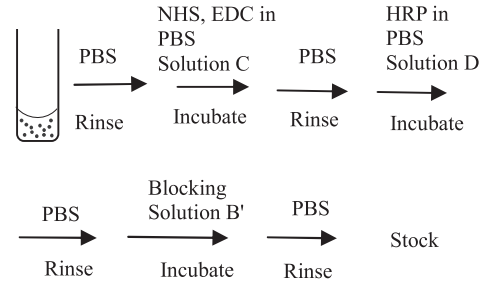


Figure 13. Immobilization of HRP on magnetic particles.

固定化量は d_p^{-1} に比例する。粒子の内部に均一に固定化されていれば、固定化量は粒子の質量で決まり、 d_p に無関係となる。Cases 1 ~ 6 と Case 7 との比較から、粒子が小さくなると DAP の生成量が増したが、 d_p^{-1} に比例するほどではなかった。従って、HRP は粒子内部まで均一に固定化されているとは言えない。

Table 2 には、2 段階法による固定化条件を示す。また、これらの条件で生成した DAP の濃度を Figure 16 に示す。Figure 14 と比べて大きな差はなかった。

Table 2 Conditions for immobilization.
Volume of initial particle suspension = 0.5 mL, including 5 mg of particles.

Case	Particle diameter, μm	Conc. of NHS added, mol/L	Volume of NHS sol. added, mL	Conc. of EDC soln. added, mol/L	Volume of EDC soln. added, mL	Total volume for activation, mL	Time period of activation, min	Conc. of HRP soln., mg/mL	Volume of HRP soln. added, mL	Time period of immobilization, min	Volume of blocking soln., mL	Time period of blocking, min	Key
8	103	0.10	2	0.40	2	4.5	15	1.0	4.0	30	4	30	\triangle
9	103	0.40	2	0.40	2	4.5	30	1.0	4.0	30	4	30	\diamond
10	103	0.40	2	0.10	2	4.5	60	1.0	4.0	30	4	30	\blacksquare

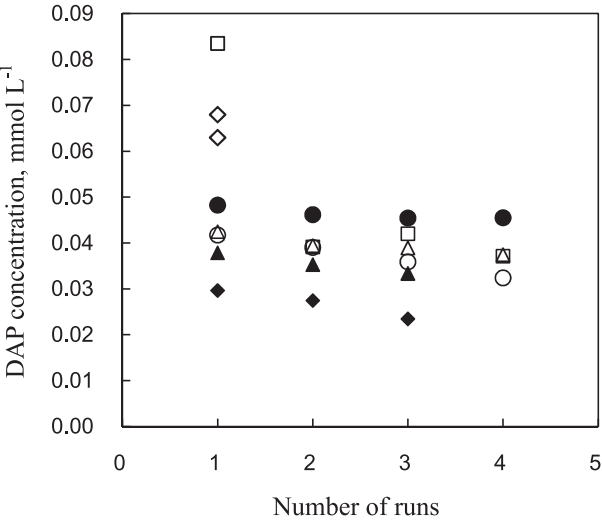


Figure 14. Effect of repeated reaction runs on concentration of DAP formed.
Keys are shown in Table 1.

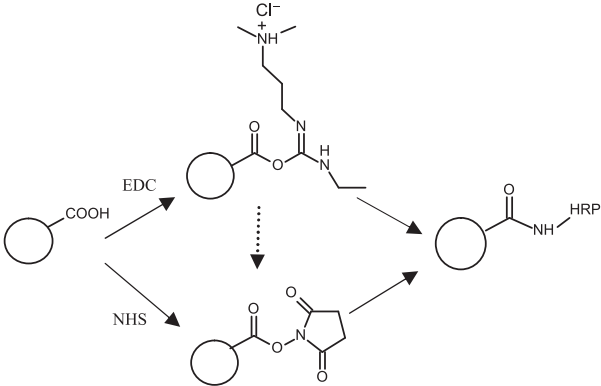


Figure 15. Assumed reaction schemes.

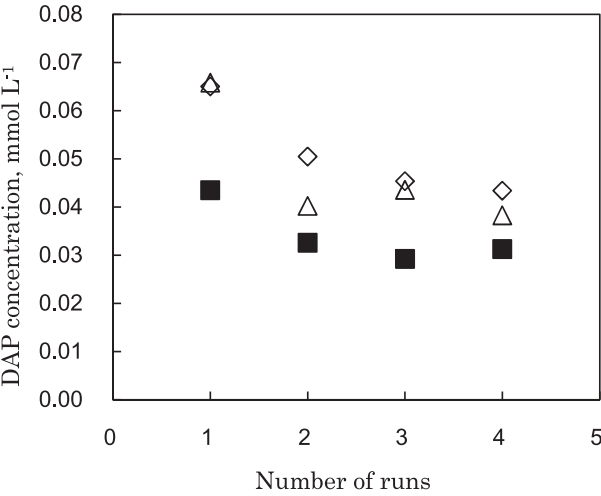


Figure 16. Effect of repeated reaction runs on concentration of DAP formed.
Keys are shown in Table 2.

4. 3 固定化量の推定

Table 3 Amount of HRP immobilized on particles. Particle diameter = 103 μm .

C1	Item	Calculation	Value
C2	Molecular mass of HRP, g mol^{-1}		4.0E+04
C3	Molecular mass of OPD 2HCl, g mol^{-1}		1.8E+02
C4	Molar absorptivity (base 10), $\text{L mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$		33.8
C5	K_m in Eq.(3), mmol L^{-1}		0.37
C6	k_r in Eq.(3), min^{-1}		2.7E+04
C7	Volume of suspension, mL		0.50
C8	Mass of particles in suspension, mg		5.0
C9	Volume of H_2O_2 soln. added, mL		0.50
C10	Conc. of H_2O_2 solution added, mmol L^{-1}		5.8
C11	Volume of OPD soln. added, mL		4.0
C12	Conc. of OPD soln. added, g L^{-1}		0.65
C13	Conc. of OPD soln. added, mmol L^{-1}	$\text{C12} \times 1000 / \text{C3}$	3.6
C14	Total volume of solution, mL	$\text{C7} + \text{C9} + \text{C11}$	5.0
C15	Init. conc. of H_2O_2 in reactor, mmol L^{-1}	$\text{C9} \times \text{C10} / \text{C14}$	0.58
C16	Init. conc. of OPD in reactor, mmol L^{-1}	$\text{C11} \times \text{C13} / \text{C14}$	2.9
C17	Volume of H_2SO_4 added, mL		4.5
C18	Total volume after H_2SO_4 addition, mL	$\text{C14} + \text{C17}$	9.5
C19	Net absorbance of DAP after H_2SO_4 addition		0.7
C20	Conc. of DAP after H_2SO_4 addition, mmol L^{-1}	$\text{C19} / \text{C4}$	0.021
C21	Conc. of DAP before H_2SO_4 addition, mmol L^{-1}	$\text{C18} \times \text{C20} / \text{C14}$	0.039
C22	Initial DAP formation rate, $\text{mmol L}^{-1} \text{min}^{-1}$	$\text{C21} / \text{C14}$	0.0079
C23	HRP conc. calculated from Eq.(3), mmol L^{-1}	$(\text{C5} + \text{C15}) \times \text{C22} / (\text{C6} \times \text{C15})$	4.8E-07
C24	Amount of HRP estimated, mmol	$\text{C14} \times \text{C23} / 1000$	2.4E-09
C25	Mass of HRP estimated, mg	$\text{C2} \times \text{C24}$	9.6E-05
C26	Mass of HRP immobilized per 1 mg of particles, ng	$\text{C25} \times 1000000 / \text{C8}$	19

HRP を固定化した粒子を用いて反応 (1) を行ったときの初期 DAP 生成速度を r_{ini} とすると, HRP が溶液内に均一に溶けていると見なした濃度は次式となる.

$$c_{\text{HRP}} = \frac{r_{\text{ini}} (K_M + c_{\text{H}_2\text{O}_2})}{k_r c_{\text{H}_2\text{O}_2}} \quad (6)$$

Figures 14 と 16 に示すように, 反応時間 $\Delta t = 5 \text{ min}$ で生成する DAP の濃度は高々 0.05 mol L^{-1} で, 当初の OPD 量に比べて十分に小さい. 従って, 反応時間 5 min の反応は初期反応と見なすことができる. そこで, 初期 DAP 生成速度は次式で表される.

$$r_{\text{ini}} \approx \frac{\Delta c_{\text{DAP}}}{\Delta t} \quad (7)$$

Equation (7) を Equation (6) に代入して, 反応液が均一であると仮定したときの HRP の濃度 c_{HRP} を求める. これを, 粒子に固定化されている HRP 質量に換算する. Table 3 に, 代表的な実験条件下での概算を示す. 直径 $103 \mu\text{m}$ の粒子 1 mg に固定化された HRP は, およそ 20 ng であった.

Guo *et al.* (2012) は, 本実験と同様な条件で APnEO 抗体を固定化し (ポリ乳酸粒子の平均直径 $100 \mu\text{m}$, 固定

化の APnEO 抗体濃度 1000 ppm), ついで HRP をラベルした APnEO を結合させて結合量を測定した. 粒子 1 mg 当たり APnEO 抗体が約 0.75 ng 固定化できたと報告している. 固定化量はタンパクの性質によって異なるが, 本実験で得られた固定化量は Guo *et al.* (2012) の値よりも大きかった. このことは, Guo *et al.* (2012) と同様な使用目的に適合する酵素固定化粒子が, 本実験の固定化条件によって調製できることを示す.

5. 結言

HRP を用いて, OPD と H_2O_2 から DAP を生成する反応について実験的な検討を行った. まず, 均一系反応において DAP の初期生成速度に及ぼす HRP と基質濃度の影響を調べ, Michaelis-Menten 式を用いて整理した. 同じ反応条件で, 回分式均一系反応と連続式均一系反応の結果を比較し, DAP の初期生成速度に影響がないことを示した.

ついで, マグネタイト粒子を含むポリ乳酸粒子に HRP を固定化した. この粒子は磁場を掛けることで必要な場所に保持することができた. 固定化反応は, 活性エステル化および固定化の条件を変えて行った. HRP を固定化した粒子を用いて DAP の初期生成速度を測定

し、均一系反応で得られた速度式を適用して固定化した HRP の量を算出した。その結果、直径 103 μm の粒子 1 mg に、HRP がおよそ 20 ng 固定化されていることが分かった。

謝 辞

本研究にあたり、大瀬戸 裕司、加藤 裕明、平野 康太、山下 航希、山下 真人、横溝 恭平、松岡 達哉、久保 晴喜、庄野 佑輔の諸君の尽力を得た。

引用文献

- Aguilar-Arteaga, K., J.A. Rodrigues, E. Barrado, Magnetic solids in analytical chemistry: A review, *Anal. Chim. Acta*, Vol.674, pp.157-165, 2010.
- Cho, T., S. Yoshida, S. Hirose, Detection system of hydrogen peroxide by immobilized peroxidase-amperometry (in Japanese), *Jpn. Soc. Anal. Chem.*, Vol.32, pp.6-10, 1983.
- Crank, J., "The Mathematics of Diffusion," 2nd ed., Oxford University Press, New York, 1980.
- Dalal, S., M.N. Gupta, Treatment of phenolic wastewater by horseradish peroxidase immobilized by bioaffinity layering, *Chemosphere*, Vol.67, pp.741-747, 2007.
- Duffy, D.C., H. L. Gillis, J. Lin, N.F. Sheppard, Jr. G. J. Kellogg, Microfabricated centrifugal microfluidic systems: Characterization and multiple enzymatic assays, *Anal. Chem.*, Vol.71, pp.4669-4678, 1999.
- Fornera, S., P. Walde, Spectrophotometric quantification of horseradish peroxidase with *o*-phenylenediamine, *Anal. Biochem.*, Vol.407, pp.293-295, 2010.
- Gao, L., J. Zhuang, L. Nie, J.B. Zhang, Y. Zhang, N. Gu, T.H. Wang, J. Feng, D.L. Yang, S. Perrett, X. Yan, Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles, *Nature Nanotech.*, Vol.2 (9), pp.577-583, 2007.
- Guo, S., K. Nakano, H. Nakajima, K. Uchiyama, A. Hemmi, Y. Yamasaki, S. Morooka, R. Ishimatsu, T. Imato, Chemiluminescence immunoassay for a nonionic surfactant using a compact disc-type microfluidic platform, *Pure Appl. Chem.*, in press, 2012.
- Liu, H.F., Z.Y. Wang, Y.W. Liu, J. Xiao, C.X. Wang, Enthalpy change and mechanism of oxidation of *o*-phenylenediamine by hydrogen peroxide catalyzed by horseradish peroxidase, *Thermochimica Acta*, Vol.443, pp.173-178, 2006.
- Poulsen, A.K., A.M. Scharff-Poulsen, L.F. Olsen, Horseradish peroxidase embedded in polyacrylamide nanoparticles enables optical detection of reactive oxygen species, *Anal. Biochem.*, Vol.366, pp.29-36, 2007.
- Qiu, H.J., L. Lu, X.R. Huang, Z.H. Zhang, Y.B. Qu, Immobilization of horseradish peroxidase on nanoporous copper and its potential applications, *Biosource Technol.*, Vol.101, pp.9415-9420, 2010.
- Roman-Gusetu, G., K.C. Waldron, D. Rochefort, Development of an enzymatic microreactor based on microencapsulated laccase with off-line capillary electrophoresis for measurement of oxidation reactions, *J. Chromatogr.A*, Vol.1216, pp.8270-8276, 2009.
- Rossi, L.M., A.D. Quach, Z. Rosenzweig, Glucose oxidase-magnetite nanoparticle bioconjugate for glucose sensing, *Anal. Bioanal. Chem.*, Vol.380, pp.606-613, 2004.
- Saidman, S., E.H. Rueda, M.L. Ferreira, Activity of free peroxidase, hematin, magnetite-supported peroxidases and magnetite-supported hematin in the aniline elimination from water-UV-vis analysis, *Biochem. Eng. J.*, Vol.28, pp.177-186, 2006.
- Soh, N., H. Nishiyama, K. Mishima, T. Imato, T. Masadome, Y. Asanao, Y. Kurokawa, H. Tabei, S. Okutani, Spectrophotometric determination of carp vitellogenin using a sequential injection analysis technique equipped with a jet ring cell, *Talanta*, Vol.58, pp.1123-1130, 2002.
- Veitch, N.C., Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme, *Phytochemistry*, Vol.65, pp.249-259, 2004.
- Vojinović, V., R.H. Carvalho, F. Lemos, J.M.S. Cabral, L.P. Fonseca, B.S. Ferreira, Kinetics of soluble and immobilized horseradish peroxidase-mediated oxidation of phenolic compounds, *Biochem. Eng. J.*, Vol.35, pp.126-135, 2007.
- Won, Y.H., D. Aboagye, H.S. Jang, A. Jitianu, L.A. Stanciu, Core/shell nanoparticles as hybrid platforms for the fabrication of a hydrogen peroxide biosensor, *J. Mater. Chem.*, Vol.20, pp.5030-5034, 2010.
- Yamasaki, Y., A. Kariyasaki, S. Morooka, Transportation of liquid by centrifugal force in CD-type microchannel (in Japanese), *Fukuoka Univ. Review Technological Sciences*, Vol.85(Sept.), pp.17-29, 2010.
- Yang, X.Y., Y.S. Guo, Z.H. Mei, Chemiluminescent determination of H_2O_2 using 4-(1,2,4-triazol-1-yl)phenol as an enhancer based on the immobilization of horseradish peroxidase onto magnetic beads, *Anal. Biochem.*, Vol.393, pp.56-61, 2009.