

ポリチオフェン誘導体を利用した酵素電極の電気化学的特性

桑原敬司*, 近藤みずき, 下村雅人

長岡技術科学大学 生物系 (〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1)
*kuwataka@vos.nagaokaut.ac.jp

Electrochemical properties of enzyme electrodes fabricated with a polythiophene derivative

Takashi KUWAHARA, Mizuki KONDO and Masato SHIMOMURA

Department of Bioengineering, Faculty of Engineering, Nagaoka University of Technology
(1603-1, Kamitomioka-machi, Nagaoka 940-2188, Japan)

(Received July 13, 2009; Accepted July 28, 2009)

Abstract

Enzyme-immobilized electrodes were fabricated with the conducting films of a polythiophene derivative having carboxyl groups. The conducting films were prepared by electrochemical copolymerization of 3-methylthiophene and thiophene-3-acetic acid, and redox enzymes were immobilized covalently by the condensation reaction with the carboxyl groups on the films. The electrochemical properties of the enzyme-immobilized electrodes were investigated in connection with the polymerization condition. The glucose oxidase-immobilized electrode showed a significant oxidation current in the presence of glucose. The oxidation current was found to increase with an increasing amount of the charge passed through during the electrochemical polymerization. This result was attributed to an increase in the surface area of the polymer film due to the formation of a fibrous structure, which was considered to facilitate the bioelectrochemical reaction on the electrode. The glucose oxidase-immobilized anode and the bilirubin oxidase-immobilized cathode were applied to a glucose / oxygen fuel cell, and the power output of 0.35 mW/cm² was obtained.

Key Words: Biofuel Cell, Enzyme Electrode, Conducting Polymer, Polythiophene

1. はじめに

酵素電極は生体触媒である酵素を電気化学反応系に適したバイオ素子であり、バイオ燃料電池やバイオセンサーへの応用を検討されている[1-3]. 酵素電極は酵素による基質の酸化 (もしくは還元) 反応によって生じた電子を電気化学系に取り込むことにより、電流を与えることが可能

である. この電流を基質の検出などに利用したものがバイオセンサーであり、電気エネルギーの生産に利用したものがバイオ燃料電池である.

酵素電極は電極とその表面に固定化された酸化還元酵素から構成されている. 電極としては主に金や白金、カーボンなどが用いられており、酸化還元酵素としてはグルコースオキシダーゼ (GOx) やアルコールデヒドロゲナーゼ、

乳酸オキシダーゼ, ラッカーゼなどがそれぞれ目的とする基質に対応させて利用されている[4-7].

酵素を電極に固定化する手法としては電極に直接吸着する方法やカーボンペーストなどを用いて包括する方法が知られている. しかしながら, これらの方法にはそれぞれ酵素の固定化量の増加や基質と反応しやすい位置で固定化することが難しいという問題点がある. そこで, 酵素固定化担体を利用して電極上への酵素の固定化が行われるようになった. 酵素固定化担体は酵素を電極上へ安定かつ選択的に固定化する目的で使用されており, 官能基を有するポリマーや自己組織化単分子層が頻繁に利用されている[8,9]. さらに, 機能性を有する固定化担体として, 酸化還元部位を有するポリマーや導電性ポリマーなどが検討されている[10,11].

酵素固定化担体はその酵素固定という役割のため, 基本的に酵素と電極の間に存在する. したがって, 酵素固定化担体の利用は必然的に酵素から電極までの距離を大きくし, 酵素-電極間の電子移動を妨げてしまう. 電子移動の妨害は酵素電極によって得られる電流の大きさに強く影響を及ぼす. 特にバイオ燃料電池では電池の発電性能に直接影響するため重要な問題となる. すなわち, 酵素固定化担体の高機能化は酵素電極の開発において重要な位置づけにあるといえる.

酵素固定および酵素-電極間の電子移動に着目した酵素固定化担体として上記の酸化還元部位を有するポリマーや導電性ポリマーがある. 特に導電性ポリマーはモノマーを選択することでカルボキシル基のような酵素固定に有用な官能基を容易に導入することが可能であり, さらにその一番の特性である導電性を有することから, 酵素-電極間の電子伝達にも有効に働く. また, すでに多くのモノマー分子が開発されており, その組み合わせによってポリマーの性質を容易に変化させることが可能なことや, 電解重合法により複雑な形状や大面積もしくは小面積の電極も簡便に修飾できるといった多くの利点を持つ.

我々はこれまで, 3-メチルチオフェン(3MT)およびチオフェン-3-酢酸(T3A)の電解共重合により得られる導電性コポリマーが GOx を利用した酵素電極の酵素固定化担体

として有用であることを報告した[12]. このコポリマーは 3MT に由来する高い導電性を有し, さらに, T3A の持つカルボキシル基を利用することによって, 共有結合を介して酵素をその表面に固定化することも可能である.

また, 導電性ポリマーは同一のモノマーから重合されたものであっても, 重合条件, 例えば重合溶媒や支持電解質, 重合電位によってその性質や形状が変化するという極めて興味深い特徴を示す. 酵素固定化担体である導電性ポリマーの性質の変化は酵素電極の性能に影響することから, その影響を明らかにすることはたいへん重要である. 上記のコポリマーについても, カーボンペーパーを電極担体として電解重合を行った際の通過電荷量が電極表面積に影響し, それに伴って酵素触媒電流の大きさが変化することが明らかとなっている[13].

本論文では金の平板電極上に合成した 3MT/T3A コポリマーの重合条件, 特に電解重合時の通過電荷量が酵素電極の電気化学的特性に与える影響について述べた. 3MT/T3A コポリマーは重合時の通過電荷量の増加に伴って表面形状の変化を示したが, その形状変化が酵素触媒電流に及ぼす効果を検討した. 3MT/T3A コポリマーを用いて作製したアノードおよびカソードを利用したグルコース燃料電池の発電性能への影響についても調べた.

2. 実験

2.1. 試薬および装置

GOx (EC 1.1.3.4, from *Aspergillus species*, 154 U/mg)は東洋紡 (株) から購入した. ビリルビンオキシダーゼ(BOx, EC 1.3.3.5, from *Myrothecium verrucaria*, 28 units/mg)は SIGMA Chem. Co.から購入した. 3MT および過塩素酸テトラエチルアンモニウムはナカライテスク (株) から, T3A は東京化成工業 (株) から入手した. D-グルコースは和光純薬工業 (株) から購入した. N,N,N',N' -テトラメチル-*p*-フェニレンジアミン(TMPD)は SIGMA Chem. Co., そして 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)アンモニウム塩(ABTS)は Aldrich Chem. Co.から入手し, 電子伝達メディエータとして利用した. 酵素固定のための

縮合剤として用いた 1-シクロヘキシル-3-(2-モルフォリノエチル)カルボジイミド(CMC)および高分子電解質膜である Nafion 112 (厚さ 0.002 inch) は Aldrich Chem. Co. から入手した. その他の試薬や溶媒は特級もしくは分析用のものをそのまま用いた. すべての水溶液は純水生成装置から得た水を用いて調製した.

電解重合および電気化学的な測定はポテンシオスタット/ガルバナスタット(北斗電工, HA-150G)およびパイポラクターロンアンペアアワーメーター(北斗電工, HF-203D), ファンクションジェネレーター(北斗電工, HB105A)を用いて行った. 電気化学測定には一般的な三電極セルを用い, 飽和カロメル電極(SCE)および白金板をそれぞれ参照電極および対向電極として使用した. 作用電極には測定対象として金電極上を修飾した電極を使用した.

2.2. 酵素電極の作製

酵素電極は 3MT/T3A コポリマーを酵素固定化担体として用いて作製した. 本研究では様々な重合条件により 3MT/T3A コポリマーを合成し, その性質の変化が酵素電極の電気化学的特性に与える影響を検討したが, 代表的な重合条件を以下に示した. 酵素固定に関しても, GOx を使用した場合について示した.

まず, 0.45 M の 3MT および 0.05 M の T3A, 0.10 M の過塩素酸テトラエチルアンモニウムを含むアセトニトリルに金電極(作用面積 $0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$)を浸漬し, +2.2 V vs. SCE の電圧を印加することによって 3MT/T3A による電極表面の修飾を行った. 3MT/T3A 修飾電極はモノマーや弱く吸着したコポリマーを除くために蒸留水で洗浄した. 次に, 0.5 mg/mL の GOx および 24 mg/mL の CMC を含む水溶液中に修飾電極を室温で 1 時間浸すことによって酵素電極(GOx 電極)を得た. 酵素電極は蒸留水で洗浄した後, 測定に使用するまでは 0.10 M リン酸緩衝液(pH 7.0)に浸して 4°C で保存した.

2.3. 電極の電気学的な評価

作製した 3MT/T3A コポリマー膜の電気化学的な活性の評価は 1 mM の $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (モル比で 1:1)

を含む 0.10 M リン酸緩衝液(pH 7.0)中でのサイクリックボルタンメトリによって行った. 測定は初期印加電位を -0.05 V とし, -0.05 V から +0.40 V までの範囲を 10 mV/s で掃引することによって行った.

修飾電極の表面状態の観察は重合および洗浄後, 真空乾燥を行った修飾電極について SEM (日本電子(株), JSM-6301F)を用いて行った. 観察の際にはイオンスパッタリング装置(日本電子(株), JFC-1500)を用いて 100 Å の金薄膜を修飾電極表面に蒸着した.

酵素電極の電気化学特性は, 作製した酵素電極を作用極とし, 基質および電子伝達メディエータ(GOx の場合は 0.10 M D-グルコースおよび 1 mM TMPD)を含む 0.10 M リン酸緩衝液(pH 7.0)中でサイクリックボルタンメトリを行うことによって評価した. 電位の掃引範囲は -0.20 V から +0.20 V, 初期印加電位は -0.20 V, そして掃引速度は 5 mV/s とした.

2.4. 発電性能の評価

作製した酵素電極を利用したバイオ燃料電池の発電性能の評価は自作のテストセルを用いて行った. GOx 電極をアノードとして, BOx 電極をカソードとして用いた. テストセルは高分子電解質膜(Nafion 112)によって分離された二つの槽からなっており, それぞれの槽にアノードおよびカソードを配置して測定を行った. 各槽の容積は直径 20 mm および深さ 45 mm であり, 測定の際にはアノード槽には 0.10 M グルコースおよび 1 mM TMPD を含む 0.10 M リン酸緩衝液(pH 7.0)を 10 mL, カソード槽には 1 mM ABTS を含む酸素飽和 0.10 M リン酸緩衝液(pH 7.0) 10 mL を満たした. カソード槽に関しては測定中も BOx の基質となる O_2 を外部から供給し続けた. 電池出力は両極間に任意の電位差を与えた際に流れる電流の値を読み取り, それぞれの値を積算することによって求めた.

3. 結果および考察

3.1. 3MT/T3A コポリマーを固定化担体とする酵素電極

Figure 1 に酵素電極の作製方法を示した. 金の平板電極

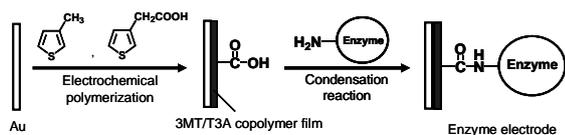


Figure 1 Preparation method of enzyme electrode.

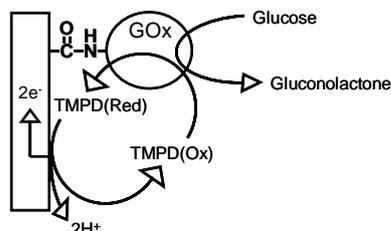


Figure 2 Bioelectrocatalytic reaction of GOx-electrode.

をチオフェン誘導体の電解重合によって修飾した後、共有結合を介して酵素をその表面に固定化した。本研究で利用したチオフェンの誘導体である 3MT および T3A は、それぞれ、チオフェン環の 3 位にメチル基とカルボキシメチル基を有している。以前の研究で 3MT と T3A が 9:1 の割合で重合したコポリマーを利用した酵素電極が最も高い酵素触媒電流を示したことから、本研究でも同様の組成を採用した[12].

Figure 2 に示すように今回作製した酵素電極系では、電解溶液に溶解させた電子伝達メディエータを介して、グルコース酸化反応により生じた電子をコポリマー修飾電極へ伝達する方法を用いた。電子伝達メディエータとして使用した TMPD は、以前の研究でメディエータとして十分な機能を有していることが確認できているため使用した。また、本研究で電子伝達メディエータを電解溶液に溶解させて使用した理由は、化学修飾等による 3MT/T3A コポリマーの性質の変化や固定化した電子伝達メディエータの性質が電極性能を抑制することを避けるためである。3MT/T3A コポリマーは上記のとおりカルボキシル基を有しているため、これを反応点として酵素と電子伝達メディエータを共固定することも可能である[14].

3.2. GOx 電極の電流生成能

Figure 3A は 3MT/T3A コポリマーを利用して作製した

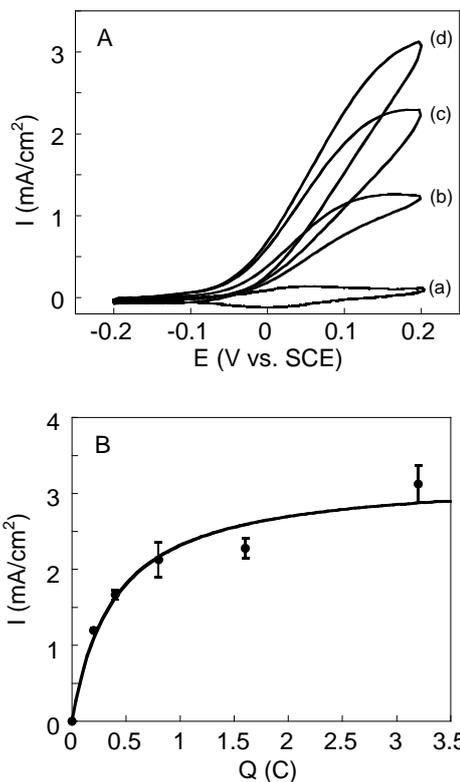


Figure 3 A: Cyclic voltammograms for GOx-electrodes fabricated with 3MT/T3A copolymer films prepared with different amounts of passed charge in 0.10 M phosphate buffer solution (pH 7.0) containing 1 mM TMPD. The amounts of passed charge were (a) 0.8 C, (b) 0.2 C, (c) 0.8 C, (d) 3.2 C. In the case of (b), (c) and (d), the buffer solution containing 0.10 M glucose was used. B: Plots of glucose oxidation current at 0.2 V vs. the amount of passed charge.

GOx 電極を用いて測定したサイクリックボルタモグラムの示している。Figure 3A (a)はグルコースを含まない溶液中、(b)-(d)はグルコース存在下で得られたボルタモグラムである。また、(b)-(d)はそれぞれ電解重合時の通過電荷量が異なるコポリマー膜を用いて作製した酵素電極を使用して測定した。

グルコースが電解溶液中に存在する場合、電極電位が -0.1 V vs. SCE のあたりで立ち上がる特徴的な酸化電流が得られた。グルコースが存在しない場合にはこの酸化電流は観察されないことから、固定化された GOx によるグルコース酸化反応に基づいた電流であるといえる。グルコースが存在しない場合にも酸化還元ピークが確認されたが、これは電解溶液中に溶解させた電子メディエータに由来

するものである。

Figure 3A (b)-(d)では、3MT/T3A コポリマーを電解重合した際の通過電荷量が異なるにもかかわらず、酸化電流の立ち上がりの電位はほぼ一定であった。この電位は電子メディエータとして使用したTMPDに由来するものであり、通過電荷量を変化させた場合においても3MT/T3A コポリマー膜は酸化還元種の酸化に対して同様の特性を示すことがわかった。しかし、対照的に、得られたグルコース酸化電流の大きさに対しては通過電荷量の影響が強く見られ、通過電荷量が多いほどグルコース酸化電流は大きくなった。

Figure 3Bは、グルコース存在下で得られたボルタモグラムから読み取った酸化電流の値を3MT/T3A コポリマー膜作製時の通過電荷量に対してプロットしたものである。ここに示されるように、電流値は通過電荷量が1Cのあたりまで増加した後、ほぼ一定となった。このことから、重合反応の進行によりコポリマー膜の状態が変化していることが予想される。なお、0Cとは電解重合を行っていない金電極に他の電解重合膜と同様にGOx固定化処理を行ったものであり、酵素触媒電流は観察されなかった。また、通過電荷量を3.2Cよりも多くした場合、その後の操作によってコポリマーが崩れることがあり、再現性を欠くため、通過電荷量は3.2Cまでに留めた。

通過電荷量は電解重合時に流れた電流と時間の積によって決定されている。すなわち、同一の重合溶液や電圧(通過電荷量以外は全く同様の条件)で重合反応を行った場合は同程度の大きさの電流が流れるため、通過電荷量が多ければ重合時間が長いと考えてよい。しかしながら、定電圧重合を行った場合、時間経過と共に流れる電流値は徐々に変化し、常に一定ではない。したがって、重合時間の経過と通過電荷量の増加は一次的な関係にはない。

また、通過電荷量以外にも電解重合時のモノマー濃度や重合溶媒、支持電解質、重合電位などを変化させることにより電極性能の向上を試みたが、いずれの場合も重合反応が進行しない、あるいは重合は起こるが得られる酵素触媒電流が小さいといった結果となり、通過電荷量の増加に見られるような著しい性能の向上は見られなかった。

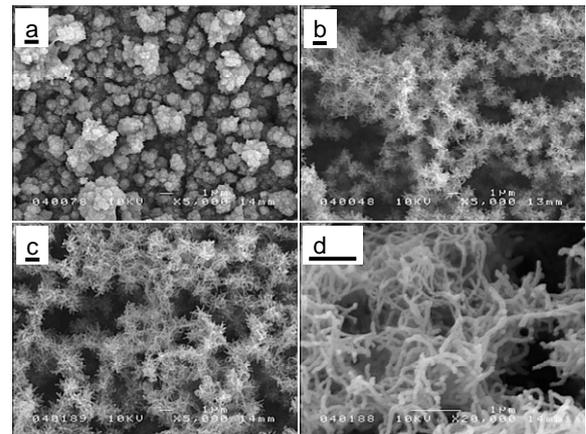


Figure 4 SEM images of the surface of 3MT/T3A copolymer films prepared with different amounts of passed charge. (a) 0.2 C; (b) 0.8 C; (c and d) 1.6 C. The bar in each image put into scale of 1 μm .

3.3. 通過電荷量の電極性能への影響

Figure 4に3MT/T3A コポリマーのSEM写真を示した。それぞれ重合時の通過電荷量が(a) 0.2 C, (b) 0.8 C, (cおよびd) 1.6 Cの際のコポリマー膜表面を示しており、(d)に関しては(c)をさらに拡大したものである。各画像の記号の下のバーは1 μm を示している。

画像からわかるように、重合初期の0.2Cでは粒状のコポリマーが電極表面を覆っているのに対し、通過電荷量の増加に伴って徐々に繊維状のポリマーが形成され、通過電荷量が1.6Cの場合には網目状に絡み合った繊維状のポリマーによって電極表面が完全に覆われている。この繊維の直径は50-100 nm程度であり、網目の孔は大きいもので直径数 μm であった。図には示していないが、通過電荷量3.2Cの場合にも1.6Cと同様の網目状の表面が観察された。したがって、重合反応がある程度進行すると、その後は繊維の伸長や形成が起こり続けるものと考えられる。

以前にカーボンペーパーを電極担体として使用した際には、重合の進行にともなってカーボン繊維の表面に粒状のコポリマーが積み重なった樹状構造を形成する様子が観察された[13]。しかしながら、Figure 4に見られるような網目状構造は観察されておらず、電極担体の形状がコポリマーの形状に影響を及ぼすという興味深い結果が得られた。これは平板の電極とカーボンペーパーのように繊維

が複雑に入り組んだような形状の電極では、重合時にモノマーの電極表面への拡散状態が異なるために生じた結果であると考えられる。

また、コポリマー膜の厚さに関しては、通過電荷量の増加に伴って増加している様子が見られた。しかし、重合直後、緩衝溶液中での保存や測定を行っている場合と、SEM観察のように完全に乾燥した状態では明らかに厚さが異なっており、正確な厚みを計測するには至っていない。この現象は特に網目状構造を示す通過電荷量で重合したのに見られることから、溶液中でコポリマー膜は溶媒を取り込むことによって膨潤していると考えられる。

Figure 5A は $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ を含むりん酸緩衝液(pH 7.0)中で 3MT/T3A コポリマーにより修飾した電極を用いて測定したサイクリックボルタモグラムを示している。また、Figure 5B は 5A で得られたボルタモグラムの酸化ピーク値を 3MT/T3A コポリマー膜作製時の通過電荷量に対してプロットしたものである。

すべての通過電荷量のコポリマー膜について $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ に由来する酸化還元ピークが観察され、そのピーク電流はグルコース酸化電流と同様に通過電荷量の増加に伴って大きくなることがわかった。また、酸化還元ピークの電位は通過電荷量の影響をほとんど受けておらず、ピーク間の midpoint の電位(0.171 V vs. SCE)も変化していないことから、通過電荷量の増加によるコポリマーの電気化学的な性質の変化は少ないと推察される。

各電極間で 3MT/T3A コポリマー膜作製時の通過電荷量以外の条件はすべて同様であること、さらに SEM 写真(Figure 4)で見られたように重合の進行に伴い 3MT/T3A コポリマーは網目状の構造を示すことから、Figure 3 に見られる電流値の増加はコポリマー膜の表面積の増加によるものであると考えられる。Figure 5 からもわかるように電極表面積の増加は酸化還元反応に有利に働く。したがって、酵素から電極への電子伝達の際にも電子メディエータの電極酸化の効率を高めているものと考えられる。

カーボンペーパーを利用した以前の研究では、通過電荷量の増加は固定化 GOx 量に対して強く影響しなかった。本研究においては、酵素固定への若干の影響が見られたが、

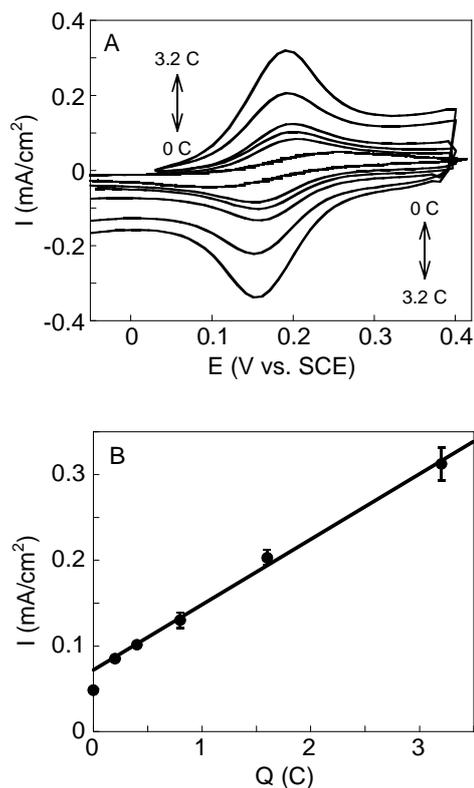


Figure 5 A: Cyclic voltammograms for 3MT/T3A copolymer films prepared with different amounts of passed charge in 0.10 M phosphate buffer solution containing 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$. B: Plots of anodic peak current of voltammograms in figure 5A vs. the amount of passed charge.

その影響は電子メディエータの酸化還元に見られたような顕著なものではなかった。しかしながら、酵素量の増加が電極あたりの触媒反応速度の向上を導くことは明らかであり、通過電荷量の増加によるグルコース酸化電流の向上には、固定化 GOx 量の増加も少なからず影響していると考えられる。

一方、通過電荷量が 1 C を越えたあたりからグルコース酸化電流が一定値に近づいたこと(Figure 3B)に対し、Figure 5B では通過電荷量とともに電流値は直線的に増加し続けている。Figure 5 は 3MT/T3A コポリマーのみで修飾した電極を使用して得られた結果であるが、GOx を固定した電極を使用した際にも同様の直線性が得られた。したがって、重合時の通過電荷量の増大によって酵素触媒電流が一定となる原因は、酵素が関与する反応にあるといえる。通過電荷量が増加しても固定化酵素量は増大しないこ

とから、おそらく、複雑な形状を持つコポリマーでは、その表面付近にしか酵素が固定されていない可能性がある。また、基質および生成物の拡散が効率よく起こっておらず、酵素を有効に利用できていないといったことも考えられる。今後、これらを考慮した電極表面を設計することにより、さらに酵素触媒電流を増加させることが可能かもしれない。

3.4. 3MT/T3A コポリマーの BOx 電極への利用

酵素電極は様々な酸化還元酵素を用いて作製されている[15-17]。特に、酵素反応を利用したバイオ燃料電池では酵素電極の役割は重要である。また、バイオセンサーへの利用においても基質に対応した酵素の使用が必要であり、さまざまな酵素を利用した酵素電極の作製が行われている。これら多種の酵素に対して同一の酵素固定化担体を利用した酵素電極の作製が可能であれば、電極作製の簡便化やコストダウンが期待できる。

BOx は Figure 6 に示すような酸素の水への還元反応を触媒可能な酵素であり、バイオ燃料電池のカソード触媒として有用である。Figure 7 に GOx の場合と同様の条件で作製した 3MT/T3A コポリマーで修飾した電極に BOx を固定化した電極(BOx 電極)によって得られた酸素還元電流と電解重合時の通過電荷量の関係を示した。また、BOx 電極を使用する場合も GOx 電極と同様に電子伝達メディエータを電解液中に溶解させて測定を行った。メディエータには BOx やラッカーゼを電気化学系で使用の際に一般的に使用されている ABTS を選択した[18]。

還元反応を触媒する酵素を利用した場合にも 3MT/T3A コポリマーは酵素固定化担体として十分に機能した。さらに、BOx 電極により得られた触媒電流の値も GOx 電極の場合と同様に通過電荷量の増加に伴って変化したことから、電解重合時の通過電荷量の増大が酵素電極の性能向上に対して有効であることを確認できた。

ここでは、BOx についてのみ示したが、BOx と同様に酸素還元反応を行うラッカーゼや NAD⁺ を補酵素として利用するグルコースデヒドロゲナーゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼ、その他にアルコールオキシダーゼを利

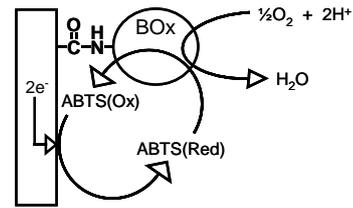


Figure 6 Bioelectrocatalytic reaction of BOx-electrode.

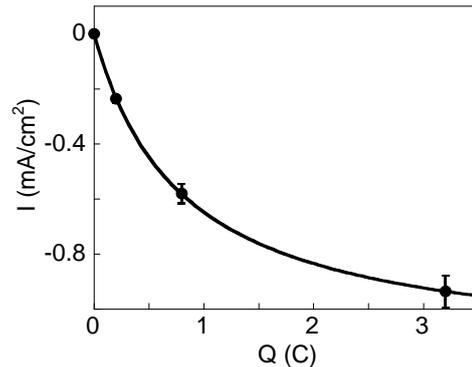


Figure 7 Plots of oxygen-reduction current vs. the amount of passed charge during synthesis of 3MT/T3A copolymer.

用した酵素電極についても 3MT/T3A コポリマーは酵素固定化担体として良好であった。

3.5. 3MT/T3A コポリマーを固定化担体とする酵素電極を利用したグルコース/酸素燃料電池

前述のとおり、バイオ燃料電池用電極として酵素電極の利用が検討されている。そこで、3MT/T3A コポリマーを利用して作製した GOx 電極および BOx 電極をそれぞれアノードおよびカソードとしてグルコース/酸素燃料電池を構成し、発電性能の評価を行った。

Figure 8 は通過電荷量を 3.2 C として得たコポリマーを用いて作製した GOx 電極および BOx 電極をアノードおよびカソードとして組み込んだ燃料電池の発電性能を示している。作製したグルコース/酸素燃料電池は開放電圧 0.62 V、短絡電流 1.12 mA/cm² を示し、電池電圧が 0.35 V の時に最大出力 0.35 mW/cm² を示した。両極とも通過電荷量を 0.8 C として得たコポリマーを利用して作製した酵素電極を使用したグルコース/酸素燃料電池の場合、その最大出力は 0.15 mW/cm² であったことから、重合時の通過電

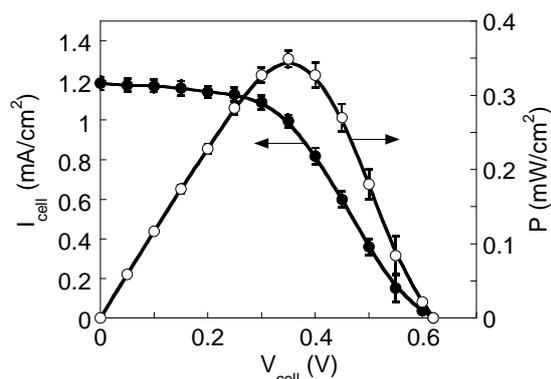


Figure 8 Performance of glucose fuel cell with GOx-anode and BOx-cathode.

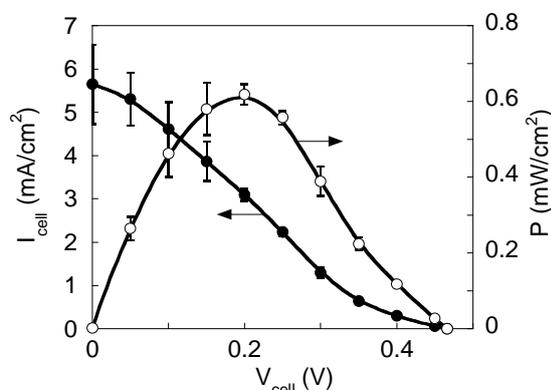


Figure 9 Performance of glucose fuel cell with GOx-anode and Pt-cathode.

荷量の増加の有用性が改めて確認できた。

開放電圧に関しては電子メディエータの酸化還元電位に依存するが、電流値に関しては酵素触媒電流の大きさに強く影響される。Figure 8 で得られた結果についても、GOx 電極および BOx 電極により得られる電流の大きさの差 (Figure 3 および Figure 7) から見積もられるように、BOx 電極の性能に大きく依存しているといえる。

そこで、カソードに非常に面積の大きな白金電極 (GOx 電極に対して見かけで 20 倍) を用いて、GOx 電極によって出力が制限されたグルコース/酸素燃料電池を構成、その発電性能の評価を行った。その結果、開放電圧は 0.47 V となり、BOx 電極を利用した場合と比較して低下したものの、短絡電流は 5.65 mA/cm² (面積は GOx 電極基準) と大幅に向上し、それに伴って最大出力も 0.62 mW/cm² (面積は GOx 電極基準、電池電圧 0.20 V) と大きくなった (Figure

9)。すなわち、ここで扱ったグルコース/酸素燃料電池に関しては、カソードとしての BOx 電極の性能を改善することにより、発電性能を大きく向上させることが可能であるといえる。

本研究では電子メディエータを溶解させた条件で発電実験を行った。したがって、高分子電解質を利用し、アノードおよびカソード槽を分離している。しかしながら、酵素電極はその高い基質選択性から電子メディエータを酵素と共に電極上に共固定することで、電解質膜を必要としない単槽式の電池セルを構成することが可能である。単槽式の採用は電池セルの構成の自由度を増すと同時に、コストダウンも見込まれる。一方、白金のような金属触媒を用いる化学燃料電池では単槽式の採用は難しく、酵素電極を利用するバイオ燃料電池の大きな利点は単槽化にあるともいえる。今後、ここで得られた酵素固定化担体に関する知見に基づいて酵素-電子メディエータ共固定酵素電極の性能を向上させていくことで酵素電極利用の可能性をさらに拡大できると考えている。

4. まとめ

酵素固定化担体として 3MT/T3A コポリマーを利用した GOx 電極を作製し、重合条件が電極性能に与える影響を検討した。GOx 電極によるグルコース酸化電流はコポリマーの電解重合時の通過電荷量の増加にもなって増大した。コポリマー膜の評価から、グルコース酸化電流が増加する要因は膜表面の構造変化にともなった電極表面積の増加であることがわかり、表面積の増加が電子メディエータの酸化速度の増大および固定化 GOx 量の増加をもたらしていると考えた。この酵素固定化担体は BOx を利用した酵素電極にも適用可能であり、その場合にも重合時の通過電荷量の影響が見られた。3MT/T3A コポリマーを酵素固定化担体とする GOx 電極および BOx 電極をそれぞれアノードおよびカソードとしてグルコース燃料電池を構成し、発電性能を評価したところ、0.35 mW/cm² が最大出力を得ることを確認できた。

引用文献

- [1] J. Razumienė, V. Gurevičienė, V. Laurinavičius, J.V. Gražulevičius, Amperometric detection of glucose and ethanol in beverages using flow cell and immobilized on screen-printed carbon electrode PQQ-dependent glucose or alcohol dehydrogenase, *Sens. Actuators, B*, 78, 243-248 (2001)
- [2] Y. Kamitaka, S. Tsujimura, N. Setoyama, T. Kajino, K. Kano, Fructose/dioxygen biofuel cell based on direct electron transfer-type bioelectrocatalysis, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 9, 1793-1801 (2007)
- [3] S.D. Minteer, B.Y. Liaw, M.J. Cooney, Enzyme-based biofuel cells, *Current Opinion on Biotechnology*, 18, 228-234 (2007)
- [4] N. Mano, F. Mao, A. Heller, On the parameters affecting the characteristics of the "wired" glucose oxidase anode, *J. Electroanal. Chem.*, 574, 347-357 (2005)
- [5] P. Du, S. Liu, P. Wu, C. Cai, Single-walled carbon nanotubes functionalized with poly(nile blue A) and their application to dehydrogenase-based biosensor, *Electrochim. Acta*, 53, 1811-1823 (2007)
- [6] M. Zayats, E. Katz, I. Willner, Electrical Contacting of Flavoenzymes and NAD(P)⁺- Dependent Enzymes by Reconstitution and Affinity Interactions on Phenylboronic Acid Monolayers Associated with Au-Electrodes, *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 14724-14735 (2002)
- [7] S.C. Barton, H.-H. Kim, G. Binyamin, Y. Zhang, A. Heller, The "Wired" Laccase Cathode: High Current Density Electroreduction of O₂ to Water at + 0.7V (NHE) at pH 5, *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 5802-5803 (2001)
- [8] S. Zhang, W. Yang, Y. Niu, C. Sun, Multilayered construction of glucose oxidase and poly(allylamine)ferrocene on gold electrodes by means of layer-by-layer covalent attachment, *Sens. Actuators, B*, 101, 387-393 (2004)
- [9] Y. Xiao, F. Patolsky, E. Katz, J.F. Hainfeld, I. Willner, "Plugging into Enzymes": Nanowiring of Redox Enzymes by a Gold Nanoparticle, *Science*, 299, 1877-1881 (2003)
- [10] M. Togo, A. Takamura, T. Asai, H. Kaji, M. Nishizawa, An enzyme-based microfluidic biofuel cell using vitamin K₃-mediated glucose oxidation, *Electrochim. Acta*, 52, 4669-4674 (2007)
- [11] A.L. Sharma, R. Singhal, A. Kumar, Rajesh, K.K. Pande, B.D. Malhotra, Immobilization of Glucose Oxidase onto Electrochemically Prepared Poly(aniline-co-fluoroaniline) Films, *J. Appl. Polym. Sci.*, 91, 3999-4006 (2004)
- [12] 桑原敬司, 大島賢治, 山内健, 下村雅人, 宮内信之助, 3-メチルチオフェン/チオフェン-3-酢酸コポリマーへのグルコースオキシダーゼの固定化とセンサーへの応用, *高分子論文集*, 61 (2), 122-126, (2004)
- [13] T. Kuwahara, H. Ohta, M. Kondo, M. Shimomura, Immobilization of glucose oxidase on carbon paper electrodes modified with conducting polymer and its application to a glucose fuel cell, *Bioelectrochemistry*, 74 (1), 66-72 (2008)
- [14] T. Kuwahara, K. Oshima, M. Shimomura, S. Miyauchi, Immobilization of glucose oxidase and electron-mediating groups on the film of 3-methylthiophene/thiophene-3-acetic acid copolymer and its application to reagentless sensing of glucose, *Polymer*, 46 (19), 8091-8097 (2005)
- [15] S. Topcagic, S.D. Minteer, Development of a membraneless ethanol/oxygen biofuel cell, *Electrochim. Acta*, 51, 2168-2172 (2006)
- [16] E. Katz, I. Willner, A Biofuel Cell with Electrochemically Switchable and Tunable Power Output, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 6803-6813 (2003)
- [17] F. Mizutani, Y. Sato, S. Yabuki, T. Sawaguchi, S. Iijima, Enzyme electrodes based on self-assembled monolayers of thiol compounds on gold, *Electrochim. Acta*, 44, 3833-3838 (1999)
- [18] S. Tsujimura, H. Tatsumi, J. Ogawa, S. Shimizu, K. Kano, T. Ikeda, Bioelectrocatalytic reduction of dioxygen to water at neutral pH using bilirubin oxidase as an enzyme and 1,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonate) as an electron transfer mediator, *J. Electroanal. Chem.*, 496, 69-75 (2001).