

ポリチオフェン膜にラッカーゼを吸着固定させた 直接電子移動型バイオカソード

浅野 健, 近藤みずき, 桑原敬司*, 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

Biocathode composed of polythiophene film and adsorbed laccase involving direct electron transfer

Takeshi ASANO, Mizuki KONDO, Takashi KUWAHARA
and Masato SHIMOMURA

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

(Received November 30, 2012; Accepted January 23, 2013)

Abstract

Conducting polymer films were prepared by electrochemical polymerization of thiophene, aniline and pyrrole. Biocathodes were fabricated by adsorbing laccase on the films in an acetate buffer solution containing laccase. A bioelectrocatalytic O₂ reduction was investigated with the biocathodes by cyclic voltammetry in 0.05 M acetate buffer solutions (pH 4.5) saturated with O₂ or N₂. The biocathode fabricated with polythiophene gave the O₂ reduction current based on direct electron transfer (DET) from the polymer to laccase. The onset potential of the O₂ reduction current was +0.63 V vs. Ag/AgCl. No O₂ reduction current was obtained using biocathodes fabricated with polyaniline and polypyrrole, whereas adsorbed laccase had O₂-reducing activity. Thus, DET to active sites of laccase molecules was considered to depend on the properties of the conducting polymer used.

Key words: Biocathode, Direct Electron Transfer, Laccase, Polythiophene

1. はじめに

ラッカーゼは 4 個の銅イオンを活性中心にもつ酸化酵素であり、基質特異性が低く広範囲な電子供与体を基質とすることから[1-3]、食品や環境、エネルギー変換などさまざまな分野で注目されている[4-9]。

ラッカーゼは T1 サイトと T2/T3 サイトと呼ばれる二つの活性部位を持つ。T1 サイトは一核銅錯体からなり、基質の酸化を担う。また、三核銅クラスターからなる T2/T3 サイトは、T1 サイトでの基質の酸化によって生じた電子を利用して酸素を水に還元する[1,3]。この酸素から水を生成する性質が注目され、ラッカーゼをバイオ燃料電池の酸素還元極 (バイオカソード) の触媒として利用することが検討されている[10-12]。

バイオカソードの触媒として用いる場合、ラッカーゼは酸素の還元を使用する電子を電極から受け取る必要がある。このラッカーゼと電極との間の電子の移動には、メディエータと呼ばれる酸化還元物質を経由する方法(MET)と電極からラッカーゼの T1 サイトに直接移動する方法(DET)がある。

MET 型電子移動は、メディエータの還元が可能であればよいため、利用できる電極材料の種類が多い。しかし、メディエータの電解セル内への添加、もしくは電極表面への固定化を必要とし、電極の電位は使用するメディエータの酸化還元電位に依存する[13]。

DET 型電子移動は、ラッカーゼのみを電極上へ固定化すればよいため、MET 型に比べ電極の構成が非常に単純となる。さらに、電極の電位はラッカーゼ本来の酸化還元電位に近い値となる。しかしながら、現在のところ、DET 型バイオカソードに関する報告は電極材料としてカーボンを利用したものが大部分であり、その他の電極材料については限られている[10-12]。

有機導電体である導電性ポリマーは、コンデンサーや機能性フィルムなどへの応用が検討されており、モノマーやドーパントの選択、化学的な修飾などにより、多種多様な機能を発現する[14]。この導電性ポリマーを電極材料として利用した DET 型酸素還元の達成は、バイオ燃料電池の

利用範囲の拡大をもたらすとともに、導電性ポリマーの次世代バイオ素子への応用の可能性を示すと考えられる。

そこで本研究では、ラッカーゼを酸素還元触媒とする DET 型バイオカソードの電極材料への導電性ポリマーの適用を検討した。その結果、ポリチオフェン膜が電極材料として有用であることを見出し、さらに、固定化ラッカーゼの保持している酵素活性などから、ポリチオフェンの疎水性が効果的に作用することで DET 型の酸素還元が起こることを明らかにした。

2. 実験

2.1. 試薬および装置

ラッカーゼ(EC 1.10.3.2, from *Trametes* sp., 108 U/mg)は天野エンザイム(株)より入手した。チオフェン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、ピロールおよびアニリン、2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリンスルホン酸)アンモニウム塩(ABTS)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グレードのものをそのまま用いた。すべての水溶液は純水精製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(AutoLab, μ AutoLab type III および ALS, DY2323)を用いて行った。測定セルは三電極セルを用い、銀/塩化銀電極(Ag/AgCl)および白金板(2 cm \times 2 cm)をそれぞれ参照電極および対向電極として使用した。作用電極として使用した金電極($\phi = 3$ mm)は、0.5 μ m の α -アルミナペーストにより研磨後、純水で超音波洗浄を行った後、使用した。吸光度の測定は UV-VIS 分光光度計(島津製作所製, UV-3100PC)を用いて行った。

2.2. ラッカーゼ固定化電極の作製

ポリチオフェン膜は 0.5 M のチオフェンおよび 0.1 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を重合溶液とし、+2.2 V vs. Ag/AgCl の電圧を作用電極に印加することによって作製した。ポリピロール膜は

0.5 Mのピロールおよび0.1 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を重合液とし、+1.0 V vs. Ag/AgClの電圧を印加することで作製した。ポリアニリン膜は0.5 Mのアニリンを含む0.5 M硫酸を重合液とし、+1.0 V vs. Ag/AgClの電圧を印加することで作製した。いずれのポリマー膜を作製する場合も重合は通過電荷量が100 mCに達するまで行った。導電性ポリマーにより修飾した電極はモノマーや弱く吸着したポリマーを除くために蒸留水で洗浄した。ラッカーゼの固定化は1 mg/mLのラッカーゼを含む0.05 M酢酸緩衝液(pH 4.5)中に作製した導電性ポリマー膜を電極ごと2時間、4°Cで浸漬することで行った。

2.3. ラッカーゼ固定化電極の評価

作製したラッカーゼ固定化電極の電気化学的な特性は、0.05 M酢酸緩衝液(pH 4.5)を測定溶液として用い、+0.1 Vから+0.7 V vs. Ag/AgClの範囲でサイクリックボルタメトリーを行うことで調べた。電位の掃引速度は5 mV/sとした。酢酸緩衝液中の溶存酸素の濃度は、酸素ガスもしくは窒素ガスをバブリングすることで調整した。

電極に固定化したラッカーゼの活性は0.25 mMのABTSを含む0.05 M酢酸緩衝液(pH 4.5) 2 mLに作製した酵素電極を25°Cで浸漬し、ラッカーゼとの反応によって生じるABTSの酸化体の吸光度を波長420 nmで1分ごとに測定することで評価した。ラッカーゼとの反応により、ABTS溶液は無色から緑色に変化する。活性単位1 Uは1分間で1 μmolのABTSの酸化体を生成する酵素量と定義した。

3. 結果と考察

3.1. ラッカーゼ固定化ポリチオフェン膜による酸素還元

ポリチオフェン膜表面にラッカーゼを固定化した電極は、酸素存在下、+0.6 V vs. Ag/AgCl付近から立ち上がる特徴的な還元電流を示した(Figure 1A)。還元電流の大きさは酸素濃度に依存し、緩衝液中の酸素濃度を増加させるにつれて増加した。

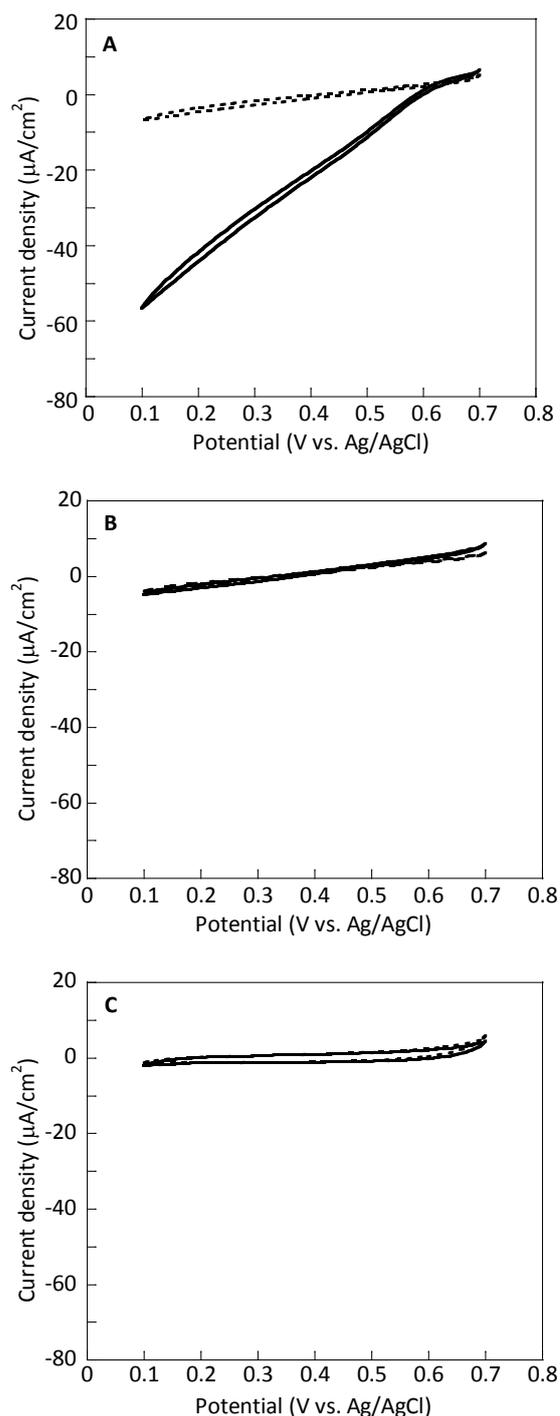


Figure 1 Cyclic voltammograms for (A) laccase-adsorbed polythiophene film, (B) bare polythiophene film and (C) laccase-adsorbed gold electrode in O₂- (solid line) and N₂- (dashed line) saturated acetate buffer solutions of pH 4.5.

ラッカーゼ未固定のポリチオフェン膜を用いた場合に得られるボルタモグラムの形状は、酸素の有無に影響されなかった(Figure 1B)。また、ポリチオフェン膜で修飾していない金電極にラッカーゼの吸着を行った電極につい

でも、酸素の存在がボルタモグラムに大きく影響を与えることはなかった(Figure 1C)。

ラッカーゼと酸素が共存しなければ特徴的な還元電流は得られなかったことから、Figure 1A に示した還元電流の生成にポリチオフェンに吸着したラッカーゼによる酸素還元反応が関与していることは明らかである。また、この還元電流が立ち上がる電位は *Trametes* sp.由来のラッカーゼの酸化還元電位およびカーボン電極上にラッカーゼを固定化することで作製された DET 型バイオカソードで得られた酸素還元電流の立ち上がり電位に近い[10,11]。

これらの結果に加えて、ポリチオフェン膜による電極修飾を行わなければ還元電流は得られないこと、電流の生成にメディエータを必要としないことを考慮すると、ラッカーゼを吸着したポリチオフェン膜を用いることで得られた特徴的な還元電流は、ポリチオフェン膜からラッカーゼへの DET をともなった酸素還元電流であるといえる。すなわち、ラッカーゼを固定化したポリチオフェン膜は DET 型バイオカソードとして機能することが明らかとなった。

3.2. ラッカーゼと導電性ポリマー間の直接電子移動

ポリチオフェンと同様に導電性ポリマーとして知られるポリアニリンおよびポリピロロール膜を用いて作製したラッカーゼ固定化電極は、酸素存在下であってもポリチオフェン膜を用いた際に見られたような+0.6 V vs. Ag/AgCl 付近から立ち上がる還元電流を示さなかった(Figure 2)。また、本研究で検討した範囲内では、これらの膜の作製条件は還元電流の生成に影響しなかった。

Table 1 に示すように、ラッカーゼはいずれの導電性ポリマー膜上に固定化された場合も酵素活性を保持していた。とくに、ポリアニリンで修飾した電極の電極当たりの酵素活性はポリチオフェンを用いた場合よりも約 1.4 倍大きかった。それにもかかわらず、DET 型の酸素還元はポリチオフェン膜のみでしか起こらなかった。これらの結果は、電極材料として利用した導電性ポリマー膜の性質がラッカーゼとの間の DET に非常に強く影響していることを示している。

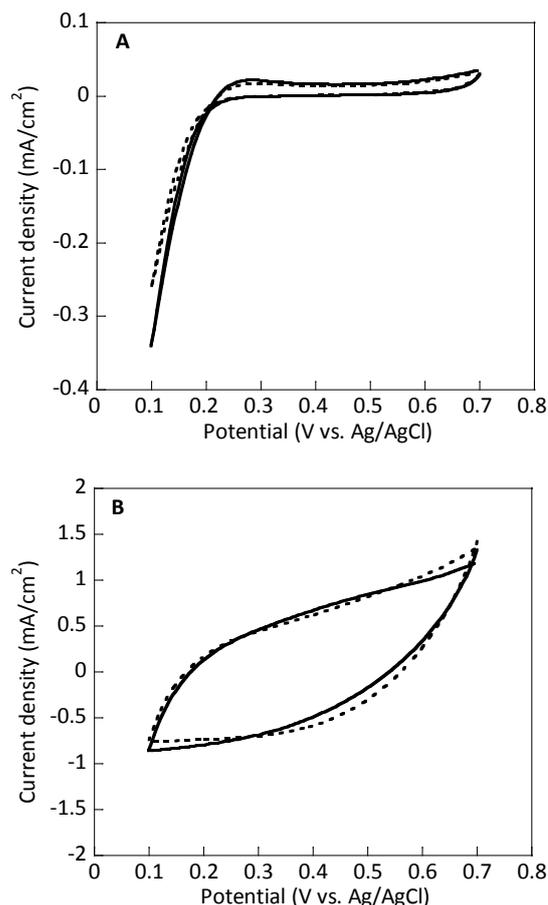


Figure 2 Cyclic voltammograms for laccase-adsorbed (A) polyaniline and (B) polypyrrole film in O₂- (solid line) and N₂- (dashed line) saturated acetate buffer solutions of pH 4.5.

Table 1 Activity of adsorbed laccase

	Activity (mU/cm ²)
polythiophene	124
polyaniline	176
polypyrrole	44

本研究ではラッカーゼの活性を緩衝液中に溶解させた ABTS との反応速度により評価している。すなわち、ポリマー膜に吸着したラッカーゼが活性を保持してさえいれば、活性の値は得られる。一方で、電極材料とラッカーゼ間で DET が起こるためには、ラッカーゼの活性部位と電極材料が近接する必要がある[1,10,12]。したがって、電極上で活性を保持しているすべてのラッカーゼが電流生成に関与しているとは考えづらく、固定化されたラッカーゼの配向性の違いが得られる電流値に影響していると考えられる。

ラッカーゼの酸化還元を担う T1 銅の周囲を取り囲むポケットには疎水性の官能基が多く存在する。そのため、疎水性の高い物質が T1 銅に近接しやすいとされている [2,12]。この疎水性ポケットを利用してラッカーゼの配向性を制御し、DET の効率を向上させたという報告がある [15]。この報告では、アントラセンによって修飾したカーボンナノチューブにより電極表面を修飾し、ラッカーゼの T1 サイトが疎水性のアントラセンに選択的に配位することを利用してラッカーゼの配向性を制御している。

本研究で使用した三種類の導電性ポリマーを比較すると、ポリチオフェン膜の疎水性がもっとも高い。したがって、ポリマーの疎水性の強さが DET のための重要な要素であり、ポリチオフェンを用いた場合のみ酸素還元電流が得られた要因であると考えられる。

4. まとめ

導電性ポリマーであるポリチオフェン膜上にラッカーゼを吸着固定した電極が、DET 型のバイオカソードとして機能することを示した。この電極ではポリチオフェン膜の疎水性が T1 サイトへの接近を可能とし、DET に有利に働いていると考えられる。本研究で得られた成果は、導電性ポリマーの DET 型バイオカソードの電極材料としての応用の可能性を示しており、今後のバイオカソードの開発に重要な知見を与えると予想される。

謝辞

本研究を行うにあたり、ラッカーゼを提供してくださった天野エンザイム株式会社はこの場を借りて感謝申し上げます。また、本研究の一部は科学研究費補助金（基盤研究(B)課題番号 23360302)の交付を受けて行われたものであり、ここに記して謝意を表したい。

引用文献

[1] E.I. Solomon, U.M. Sundaram, T.E. Machonkin, Multicopper oxidases and oxygenases, Chem. Rev.,

- vol. 96, No. 7, pp. 2563–2605 (1996).
- [2] J.P. Kallio, S. Auer, J. Jänis, M. andberg, K. Kruus, J. Rouvinen, A. koiviula, N. Hakulinen, Structure-function studies of a *melanocarpus albomyces* laccase suggest a pathway for oxidation of phenolic compounds, J. Mol. Biol., vol. 392, No. 4, pp. 895–909 (2009).
- [3] T. Sakurai, K. Kataoka, Structure and function of type I copper in multicopper oxidases, Cell. Mol. Life Sci., vol. 64, No. 19–20 pp. 2642–2656 (2007).
- [4] K. Fahr, H. Wetzstein, R. Grey, D. Schlosser, Degradation of 2,4-dichlorophenol and pentachlorophenol by two brown rot fungi, FEMS Microbiol. Lett., vol. 175, No. 1, pp. 127–132 (1999).
- [5] R.C. Minussi, G.M. Pastore, N. Durán, Potential applications of laccase in the food industry, Trends Food Sci. Technol., vol.13, No. 6–7, pp. 205–216 (2002).
- [6] S.R. Couto, J.L.T. Herrera, Industrial and biotechnological applications of laccases: A review, Biotech. Adv., vol. 24, No.5, pp. 500–513 (2006).
- [7] A. Zille, F.D. Munteanu, G.M. Gübitz, A.C. Paulo, Laccase kinetics of degradation and coupling reactions, J. Mol. Catal. B: Enzymatic, vol. 33, No. 1–2 pp. 23–28 (2005).
- [8] C. Eggert, U. Temp, K.L. Eriksson. Laccase is essential for lignin degradation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*, FEMS Microbiol. Lett., vol. 407, No. 1, pp. 89–92 (1997).
- [9] E. Srebotnik, K.E. Hammel, Degradation of non phenolic lignin by the laccase/1-hydroxybenzotriazole system, J. Biotech., vol. 81, No. 2–3, pp. 179–188 (2000).
- [10] T. Miyake, S. Yoshino, T. Yamada, K. Hata, M. Nishizawa, Self-regulating enzyme-nanotube ensemble films and their application as flexible electrodes for biofuel cells, J. Am. Chem. Soc., vol. 133, No. 13, pp. 5129–5134 (2011).
- [11] Y. Kamitaka, S. Tsujimura, N. Setoyama, T. Kajino, K. Kano, Fructose/dioxygen biofuelcell based on direct electron transfer-type bioelectrocatalysis, Phys. Chem. Chem. Phys., vol. 9, No. 15, pp. 1793–1801 (2007).
- [12] C.G. Sánchez, M. Pita, C.V. Domínguez, S. Shleev, A.L.D. Leacey, Gold nanoparticles as electronic bridges for laccase-based biocathodes, J. Am. Chem. Soc., vol. 134, No. 41, pp. 17212–17220 (2012).
- [13] C. F. Sánchez, T. Tzanov, G. M. Gübitz, A. C. Paulo, Voltammetric monitoring of laccase-catalysed mediated reactions, Bioelectrochem., vol. 58. No. 2, pp.149–156 (2002).
- [14] Y. Kobayashi (ed.), “Recent progress in conducting polymers”, CMC publishing Ltd., Japan (2009).
- [15] M. T. Meredith, M. Minson, D. Hickey, K. Artyshkova, D. T. Glatzhofer, S. D. Minter, Anthracene-modified multi-walled carbon nanotubes as direct electron transfer scaffolds for enzymatic oxygen reduction, ACS Catal., vol. 1, No. 12, pp. 1683–1690 (2011).