

導電性高分子と酵素のハイブリッド化による
バイオ電気化学システムの構築

本間 俊将

目 次

第 1 章 緒言

1.1 背景	-1-
1.2 酵素固定における導電性高分子の利用と本研究の目的	-2-
1.3 本論文の概要	-4-
参考文献	-6-

第 2 章 ポリ (*N*-フェニルグリシン) 膜の作製と

酵素固定化電極への応用

2.1 まえがき	-8-
2.2 実験	-9-
2.2.1 試薬および装置	-9-
2.2.2 ポリ (<i>N</i> -フェニルグリシン) 膜の作製	-10-
2.2.3 IR スペクトルの測定	-10-
2.2.4 表面構造の解析	-10-
2.2.5 導電率測定	-11-
2.2.6 グルコースオキシダーゼの固定化	-11-
2.2.7 固定化グルコースオキシダーゼの活性測定	-12-
2.2.8 グルコースセンシングによる電極性能の評価	-13-

2.3	結果および考察	-13-
2.3.1	<i>N</i> -フェニルグリシンの電解重合	-13-
2.3.2	ポリ(<i>N</i> -フェニルグリシン)膜の物性	-15-
2.3.3	ポリ(<i>N</i> -フェニルグリシン)膜への酵素固定	-16-
2.3.4	酵素固定化電極のセンシング性能	-17-
2.4	まとめ	-19-
	参考文献	-20-

第3章 ポリアニリン／ポリアクリル酸複合膜を利用した 酵素固定化電極の作製とその特性評価

3.1	まえがき	-22-
3.2	実験	-24-
3.2.1	試薬および装置	-24-
3.2.2	ポリアニリン／ポリアクリル酸複合膜の作製	-24-
3.2.3	IR スペクトルの測定	-25-
3.2.4	導電率測定	-25-
3.2.5	電気化学的測定	-26-
3.2.6	カルボキシル基の定量	-26-
3.2.7	グルコースオキシダーゼの固定化	-27-
3.2.8	グルコースセンシングによる電極性能の評価	-27-
3.3	結果および考察	-27-
3.3.1	ポリアクリル酸存在下におけるアニリンの電解重合	-27-

3.3.2	ポリアニリン／ポリアクリル酸複合膜の構造	-30-
3.3.3	ポリアニリン／ポリアクリル酸複合膜の電気的性質	-32-
3.3.4	ポリアニリン／ポリアクリル酸複合膜への酵素固定	-34-
3.3.5	酵素固定化電極のセンシング性能	-35-
3.4	まとめ	-36-
	参考文献	-36-

第4章 導電性高分子を利用したバイオカソードの作製と

グルコース-酸素燃料電池の構築

4.1	まえがき	-38-
4.2	実験	-40-
4.2.1	試薬および装置	-40-
4.2.2	ポリチオフェン誘導体膜の作製	-41-
4.2.3	酵素固定化電極の作製	-41-
4.2.4	酵素固定化量の測定	-42-
4.2.5	白金黒電極の作製	-42-
4.2.6	電気化学的測定	-42-
4.2.7	グルコース-酸素燃料電池の作製および性能評価	-43-
4.3	グルコース-酸素燃料電池の発電原理	-44-
4.4	結果および考察	-45-
4.4.1	バイオカソードの酸素還元特性	-45-
4.4.2	グルコース-酸素燃料電池の発電性能	-45-

4.5	まとめ	-48-
	参考文献	-48-

第5章 導電性高分子と酵素を利用したアスコルビン酸誘導体

燃料電池の構築

5.1	まえがき	-51-
5.2	実験	-53-
5.2.1	試薬および装置	-53-
5.2.2	酸性ホスファターゼ固定化電極の作製	-54-
5.2.3	固定化酸性ホスファターゼの活性測定	-55-
5.2.4	脱リン酸化反応の速度論解析	-56-
5.2.5	電気化学的測定	-56-
5.2.6	アスコルビン酸誘導体燃料電池の作製および性能評価	-56-
5.3	結果および考察	-58-
5.3.1	アスコルビン酸誘導体の電気化学的性質	-58-
5.3.2	酵素固定化電極によるアスコルビン酸誘導体の電気化学的酸化	-58-
5.3.3	ポリアニリン／ポリアクリル酸複合膜への酵素固定	-59-
5.3.4	酵素反応に及ぼす固定化の影響	-61-
5.3.5	ポリアニリン／ポリアクリル酸複合膜による電極修飾の影響	-65-
5.3.6	アスコルビン酸誘導体燃料電池の発電性能	-67-
5.4	まとめ	-71-
	参考文献	-72-

第 6 章 導電性高分子を酸素還元触媒として利用する

グルコースバイオセンシング

6.1	まえがき	-75-
6.2	実験	-76-
6.2.1	酵素固定化電極の作製	-76-
6.2.2	電気化学的測定	-77-
6.2.3	グルコースセンシング	-77-
6.3	結果および考察	-78-
6.3.1	ポリアニリン／ポリアクリル酸複合膜の酸素還元特性	-78-
6.3.2	グルコースセンシング	-79-
6.3.3	共存物質の影響	-81-
6.4	まとめ	-81-
	参考文献	-82-
	第 7 章 結言	-84-
	参考文献	-87-
	公表論文	-88-
	国際会議での発表	-90-
	謝辞	-91-

第 1 章

緒言

1.1 背景

酵素は生体高分子であるタンパク質のうち触媒として機能する一群である。一般的な無機触媒と比較して、(1) 常温・常圧・中性付近という温和な条件下で反応を進め、(2) 基質特異性および反応特異性を有し、(3) 反応効率が高く、(4) 生物培養によって大量生産できるという特徴がある。ゆえに、酵素の活用は資源枯渇という問題を抱える我々にとって重要な課題である。

酵素を金属やカーボンのような導電材料に固定化することにより、酵素触媒反応と電気化学反応の連結を可能にした素子を酵素固定化電極という。電気化学反応の触媒としての酵素利用はバイオセンサーの研究でよく知られている^[1]。電気化学計測は容易に微弱な信号を取り出すことができるので、酵素触媒反応との連結によって生体物質の簡便で選択的な微量定量が可能になる。この技術は、簡易血糖計として実用化に至っており、製造プロセスの品質管理などへの産業利用も行われている。一方、生体が食物を燃料に駆動する機械であるとする、酵素は化学エネルギーを異種のエネルギーに変換する触媒と考えることができる。近年、この点に注目し、酵素固定化電極を組み込んだ燃料電池を使用してブドウ糖などから電気エネルギーを得る研究が盛んに行われている^[2]。このように、酵素固定化電極は酵素の新しい使い道としてライフサイエンスのみならず、エネルギーの分野においても非常に注目されている。

酵素固定化電極の機能の大部分は、触媒分子である酵素の性質に依存することは言うまでもない。例えば、グルコースオキシダーゼ (GOx) を選択すればグルコースセンサーとして使用でき、また、アルコールオキシダーゼを選択すればエタノールセンサーとして使用できる。さらに、タンパク質工学的的手法によって酵素を改変すれば、使用条件や性能

をある程度制御できる^[3]。しかしながら、より高い要求を満たす酵素固定化電極を開発するには、酵素の固定化環境や酵素と電極間の電子伝達などを考慮しなければならず、こうした酵素側からのアプローチだけでは限界がある。すなわち、酵素固定化電極の研究には、酵素工学を含め、合成化学、材料科学、エレクトロニクスなどの多岐にわたる分野の統合が必要不可欠といえる。

1.2 酵素固定における導電性高分子の利用と本研究の目的

一般的な酵素固定化電極では、酵素反応で生じた電子を導電材料が電流として読み取る。ゆえに、導電材料と酵素間の電子伝達が容易であることが望ましい。また、酵素固定化電極は主に水中で使用されるため、導電材料からの酵素の溶解を防ぐ必要がある。したがって、酵素固定化電極を構築するうえで、いかにそれらを考慮して酵素を固定化できるかが極めて重要となる。

有機・無機材料上に生体由来物質を固定化する方法は担体結合法、架橋法および包括法に大別できる^[4]。担体結合法は適当な不溶性担体の表面に酵素を結合させるものであり、結合様式としては共有結合、イオン結合、あるいは物理的吸着などが挙げられる。架橋法は酵素を橋かけすることによって分子集合体として扱おうとするものである。また、包括法については、酵素を架橋高分子の網目に取り込んだものや半透性の高分子被膜で被覆したものなどがある。これらの固定化技術はいずれも導電材料への酵素固定に適用可能である。しかし、固定化担体や架橋高分子などの多くは絶縁性であり、これらの使用は導電材料と酵素間の電子伝達の観点から好ましくない。

導電性高分子は金属や半導体と同様に電気を流すことができる共役系高分子である。代表的なものとして、ポリピロール、ポリチオフェンおよびポリアニリンがある。導電性高分子は、それ自体が電子伝達可能で、容易に導電材料上に薄膜として得られることから、酵素固定化電極の作製に利用されてきた^[5-7]。初期の研究では、酵素の存在下でピロールやアニリンの電解重合を行い、生成する導電性高分子膜中に酵素を取り込む方法（一

種の包括法)によって酵素固定化電極が作製された^[8-12]。しかし、導電性高分子膜中に取り込まれた酵素分子のうち触媒として電気化学反応に寄与するのは膜表面近傍に存在するものに限られ、しかも膜表面近傍に存在する分子は脱離しやすいため、この方法は酵素の利用に関して極めて非効率的であった。一方で、導電性高分子膜を酵素固定化担体として用いる方法(すなわち、担体結合法)も行われてきた^[13-20]。これは、電解重合により得られる導電性高分子膜が大面積を持つことに着目したものであり、酵素の効率的な利用を実現できる。この方法において重要な点は導電性高分子膜と酵素間の結合様式である。イオン結合や物理的吸着の場合、使用環境によって酵素が脱離してしまう可能性がある。したがって、安定な固定化を実現するためには、導電性高分子膜と酵素との間に強固な結合を形成する必要がある。

ここまで述べたように、導電性高分子は、固定化酵素の安定性の問題さえ解決できれば、酵素固定化電極の性能向上に寄与しうる電子伝達媒体および酵素固定化担体といえる。その一方で、導電性高分子の一種であるポリアニリンはアスコルビン酸(ビタミンC)^[21]やニコチンアミドアデニンジヌクレオチド^[22]の電気化学的酸化における触媒として機能することが近年報告された。これらの報告は、導電性高分子膜に電極触媒という第三の機能があることを示す点で非常に興味深い。すなわち、導電性高分子と酵素の適切な組み合わせによって新たな電極反応が生み出される可能性がある。

このような背景から本研究では、高い導電性を有し、かつ、酵素と共有結合させうる導電性高分子膜の創出と、導電性高分子を利用した酵素固定化電極による新規電極反応系の構築を目指した。前者に関しては、これまで高い導電性を示す導電性高分子のモノマーと、カルボキシル基やアミノ基を有したモノマーの共重合による導電性高分子膜の作製が報告されている^[23-26]。しかしながら、この共重合法は導電性高分子の導電率低下を招く。すなわち、安定な固定化を求めれば、導電性高分子と酵素との電子伝達が起こりにくくなり、逆に効率的な電子伝達を求めれば、酵素が脱離してしまう危険性が生じる。そこで本研究では、比較的高い導電性を示すポリ(*N*-フェニルグリシン)の薄膜化およびカ

ルボキシル基を有するポリアクリル酸とポリアニリンとの複合膜化という、共重合法とは全く異なる二つの方法を検討した。一方、後者に対しては、導電性高分子を利用した酵素固定化電極に関して 3 種類の新しい電極反応系を提案・検討した。これら電極反応系の研究背景には、バイオ燃料電池の高出力化やバイオセンサーの高機能化などがある。それらの詳細については各章のまえがきに示した。

このように本論文では、酵素固定化電極に関して導電材料の設計から応用可能な電極反応系の開拓まで取り組むことにより得られた成果について述べる。本研究の意義は、導電性高分子の高機能化、すなわち電極側からのアプローチによりバイオ燃料電池やバイオセンサーの性能向上に貢献できることを証明する点である。今後、ここで示した成果と酵素側からのアプローチを融合することにより、多様な資源から電気エネルギーを獲得することやより選択性の高いセンシングを実現することが可能になるものと考えられる。

1.3 本論文の概要

本論文は全 7 章から構成されている。本章を除いた各章の概要を次に示す。

第 2 章

ポリ (*N*-フェニルグリシン) の膜を電気化学的に製膜する方法およびその膜を利用した GOx 固定化電極の性能について述べた。そして、グルコースセンシングの結果から、ポリ (*N*-フェニルグリシン) を利用した GOx 固定化電極は、カルボキシル基を有した他の導電性高分子を利用したものと比較して、優れた性能を有することを明らかにした。

第 3 章

ポリアクリル酸存在下におけるアニリンの電解重合およびそれにより得られるポリアニリン/ポリアクリル酸複合膜の特性について述べた。特に、複合膜の特性に及ぼすポリアクリル酸含有量の影響については、複合膜を利用した GOx 固定化電極の性能と結び付

けて考察した。まず、ポリアクリル酸含有量は膜の導電性および膜表面のカルボキシル基を左右する重要な因子であることを明らかにした。次に、固定化 GOx の量はカルボキシル基の量の増加に伴って増えることを詳述した。そして、GOx 固定化電極をグルコースセンシングに応用した際の電流応答とポリアクリル酸含有量の関係から、ポリアクリル酸含有量の増加が GOx 固定化電極の高性能化に寄与することを確認した。

第 4 章

バイオ燃料電池の高出力化を目指し、導電性高分子とビリルビンオキシダーゼから成るバイオカソードを提案した。白金触媒を担持したカソードとの比較によって、提案したバイオカソードが優れた酸素還元特性を有することを明らかにした。また、バイオカソードの利用がバイオ燃料電池の出力向上に有効であることを示した。

第 5 章

アスコルビン酸を発電システムの燃料として用いる際の安定性の問題を解決するため、酵素固定化電極を用いて安定型アスコルビン酸誘導体を酸化する新しい電極反応系を提案した。まず、酸性ホスファターゼ固定化電極を用いたアスコルビン酸 2-リン酸エステルの酸化について取り上げ、提案した電極反応系が固定化酵素によるアスコルビン酸の生成および生成したアスコルビン酸の電気化学的酸化によって成立することを証明した。次に、酵素固定化電極へのポリアニリン/ポリアクリル酸複合膜の利用について検討し、この複合膜の利用がアスコルビン酸誘導体の酸化に極めて有効であることを示した。

第 6 章

ポリアニリン/ポリアクリル酸複合膜による電気化学的酸素還元に基づく新しいグルコースセンシング法を提案した。これは、ポリアニリン/ポリアクリル酸複合膜を利用した GOx 固定化電極を使用するものであり、固定化 GOx のグルコース酸化反応に伴う酸

素消費を複合膜による酸素還元電流の減少で読み取る方法である。酸素還元電流とグルコース濃度の関係から、提案した方法がグルコースの検出に利用できることを証明した。

第7章

本研究成果を通じて得られた成果を総括し、今後期待される展望について述べた。

参考文献

- [1] 池田篤治,「バイオ電気化学の実際ーバイオセンサ・バイオ電池の実用展開ー」, 株式会社シーエムシー, 2007.
- [2] 加納健司,「バイオ電池の最新動向」, 株式会社シーエムシー, 2011.
- [3] 民谷栄一,「バイオセンサーの先端科学技術と応用」, 株式会社シーエムシー, 2007.
- [4] 千畑一郎,「固定化酵素」, 講談社, 1975.
- [5] M. Gerard, A. Chaubey, B.D. Malhotra, *Biosens. Bioelectron.*, 2002, **17**, 345–359.
- [6] T. Ahuja, I.A. Mir, D. Kumar, Rajesh, *Biosens. Bioelectron.*, 2007, **28**, 791–805.
- [7] N.K. Guimard, N. Gomez, C.E. Schmidt, *Prog. Polym.*, 2007, **32**, 876–921.
- [8] H. Shinohara, T. Chiba, M. Aizawa, *Sens. Actuator*, 1988, **13**, 79–86.
- [9] Y. Kajiya, H. Sugai, C. Iwakura, H. Yoneyama, *Anal. Chem.*, 1991, **63**, 49–54.
- [10] S. Fabiano, C. Tran–Minh, B. Piro, L.A. Dang, M.C. Pham, O. Vittori, *Mater. Sci. Eng.*, 2002, **C21**, 61–67.
- [11] M. Gao, L. Dai, G.G. Wallace, *Synth. Mat.*, 2003, **137**, 1393–1394.
- [12] D. Pan, J. Chen, S. Yao, W. Tao, L. Nie, *Anal. Sci.*, 2005, **21**, 367–371.
- [13] S. Mu, H. Xue, *Sens. Actuator B*, 1996, **31**, 155–160.
- [14] A. Kumar, Rajesh, A. Chaubey, S.K. Grover, B.D. Malhotra, *J. Appl. Polym.*

- Sci.*, 2001, **82**, 3486–3491.
- [15] A. Gambhir, M. Gerard, A. Mulchandani, B.D. Malhotra, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2001, **96**, 249–257.
- [16] K. Ramanathan, S.S. Pandey, R. Kumar, A. Gulati, A.S.N. Murthy, B.D. Malhotra, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2000, **78**, 662–667.
- [17] M.A. Rahman, D.S. Park, Y.B. Shim, *Biosens. Bioelectron.*, 2004, **19**, 1565–1571.
- [18] Rajesh, V. Bisht, W. Takashima, K. Kaneto, *Surf. Coat. Technol.*, 2005, **198**, 232–236.
- [19] M. Şenel, C. Nergiz, *Curr. Appl. Phys.*, 2012, **12**, 1118–1124.
- [20] H. Jiang, A. Zhang, Y. Sun, X. Ru, D. Ge, W. Shi, *Electrochim. Acta*, 2012, **70**, 278–285.
- [21] J. Yano, H. Hirayama, Y. Harima, A. Kitani, *J. Electrochem. Soc.*, 2010, **157**, B506–B511.
- [22] P.N. Bartlett, E.N.K. Wallace, *J. Electroanal. Chem.*, 2000, **486**, 23–31.
- [23] M.M. Ayad, N.A. Salahuddin, A.K. Abouseif, M.O. Alghaysh, *Eur. Polym. J.*, 2008, **44**, 426–435.
- [24] 桑原敬司, 大島賢治, 山内健, 下村雅人, 宮内信之助, *高分子論文集*, 2004, **61**, 122–126.
- [25] M. Shimomura, R. Miyata, T. Kuwahara, K. Oshima, S. Miyauchi, *Eur. Polym. J.*, 2007, **43**, 388–394.
- [26] T. Kuwahara, K. Oshima, M. Shimomura, S. Miyauchi, *Synth. Met.*, 2005, **152**, 29–32.

第 2 章

ポリ (*N*-フェニルグリシン) 膜の作製と酵素固定化電極への応用

2.1 まえがき

カルボキシル基やアミノ基を持つ導電性高分子は、酵素表面に存在する官能基との間で共有結合を形成できるため、導電材料表面への強固な酵素固定に有用である。しかし、そのような導電性高分子は導電率が著しく低い^[1-4]。例えば、*o*-カルボキシルアニリンを重合して得たカルボキシル基を持つポリアニリンの導電率は 3.0×10^{-8} S/cm であり^[5]、この値はカルボキシル基を持たないポリアニリンの値と比較して 8 桁も小さい。原因は、高分子主鎖のコンホメーションを官能基が乱すためと考えられているが、未だ詳細はわかっていない。酵素固定化電極の性能は、固定化酵素の触媒作用のみならず、導電材料を介した酵素から外部回路への電子伝達にも影響を受けることが予想されるため、酵素固定化電極に利用する導電性高分子の導電率は、可能な限り高いことが望ましい。

近年、アニリン誘導体である *N*-フェニルグリシンの化学重合により、 1.7×10^{-4} S/cm の導電率を有するポリ (*N*-フェニルグリシン) (PPG, Fig. 2-1) の粉末が得られることが報告された^[6]。PPG は、比較的高い導電率を有し、かつ、構造中にカルボキシル基を持つことから、酵素固定化電極の導電材料として有望である。そこで本研究では、*N*-フェニルグリシンの電解重合によって PPG を膜状に合成し、膜表面のカルボキシル基と酵素のアミノ基の間にアミド結合を形成させる方法で酵素固定化電極の作製を試みた。固定化する酵素としてはグルコースを特異的に酸化する酵素である GOx を選択した。GOx を利用したグルコースセンシングは酵素固定化電極の性能を評価するためによく検討されている^[7-10]。作製した GOx 固定化電極をグルコースセンシングに応用し、他の導電性高分子を用いたグルコースセンサーと比較することで PPG の有用性を検討した。

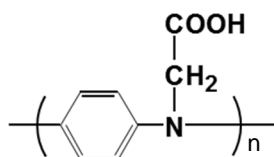


Fig. 2-1 Chemical structure of PPG.

2.2 実験

2.2.1 試薬および装置

N-フェニルグリシンは東京化成工業（株）から購入し、メタノールで再結晶を行ってから使用した。GOx（EC 1.1.3.4, *Aspergillus species* 由来, 活性 162 U/mg）およびペルオキシダーゼ（EC 1.11.1.7, Horseradish 由来, 活性 130 U/mg, POD）は東洋紡（株）から購入した。D-グルコースは、和光純薬工業（株）の特級試薬をそのまま使用した。1-シクロ-3-(-2-モルフォリノエチル)カルボジイミドメソ-*p*-トルエン sulfonate (CMC) と *N*-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) はそれぞれ Sigma-Aldrich, Inc. とナカライテスク（株）から購入した。その他の試薬は、特級試薬もしくは分析用試薬であり、精製せずに使用した。実験に用いたすべての水溶液は純水で作製した。また、グルコース水溶液は、 α 形と β 形を平衡状態にするため、使用する 1 日以上前に調製した。

電解重合およびグルコースセンシングは、ポテンショスタット/ガルバナスタット μ Autolab III (Eco Chemie) と接続した三電極セルを使用して行った。対向電極は白金板を、参照電極は飽和カロメル電極 (SCE) を用いた。SCE は、電極内部の汚染を防ぐために、飽和 KCl の塩橋を介して三電極セルと接続した。作用電極および酵素固定化電極の一部として使用する金電極は、アルミナ基板上に蒸着した金薄膜をサンライズ工業（株）から購入し、以下のように処理することで作製した。まず、Piranha 溶液 (H_2SO_4 : 30 % H_2O_2 = 3 : 1) に室温下で 15 分間浸漬し、純水で洗浄することで金表面の汚れを除去した。次に Fig. 2-2 に示すようにマスキングを施し、外部回路との接続部分と電極反応場として機能する金表面 (0.25 cm^2) を準備した。吸光度の測定には、(株) 島津製作

所の紫外-可視-近赤外分光光度計 UV-3100PC を使用した。

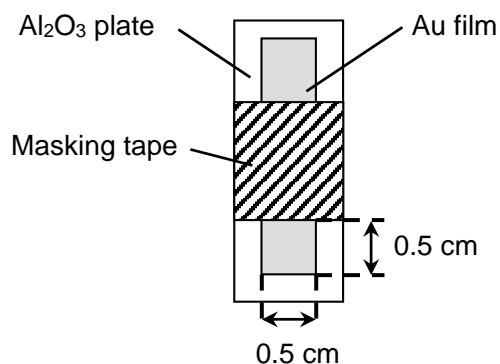


Fig. 2-2 Top view of an Au electrode.

2.2.2 ポリ (*N*-フェニルグリシン) 膜の作製

N-フェニルグリシンの電解重合によって PPG 膜を金電極表面に作製した。重合溶液には、あらかじめ窒素ガスを用いて溶存酸素を取り除いた 0.1 M *N*-フェニルグリシンを含む 1.0 M 硝酸水溶液を使用した。電解重合は、0.75 V vs SCE の電圧を金電極に印加することで行い、通過電荷量が 4.0 C/cm² に達するまで続けた。得られた PPG 膜は純水で丁寧に洗浄した。

2.2.3 IR スペクトルの測定

IR スペクトルの測定は、ダイヤモンド ATR クリスタルを備えた Nicolet iS10 FT-IR Spectrometer を用いて行った。測定には、真空乾燥した PPG 膜を使用した。

2.2.4 表面構造の解析

PPG 膜の表面構造は日本電子 (株) 製の JSM-6301F を使用した走査型電子顕微鏡法 (SEM) で観察した。PPG 膜は、真空乾燥し、日本電子 (株) 製の JFC-1500 を用いて 10 nm の厚さを持つ金薄膜で修飾してから用いた。

2.2.5 導電率測定

導電率測定は JIS K 7194 を参考にした四探針法によって行った。まず、真空乾燥した膜を絶縁テープで剥がし、剥がした膜を上向きにしてガラス板上に固定した。この際に絶縁テープ上にある剥がした膜に亀裂やむらがないことを確認した。次に、金製の針 4 本が 1 mm 間隔で並んだプローブと接続した三菱化学アナリテック（株）製ロレスターGP MCP-T610 を使用して絶縁テープ上にある膜の表面抵抗率 R を測定した。得られた値と以下の式から膜の導電率 σ を求めた。

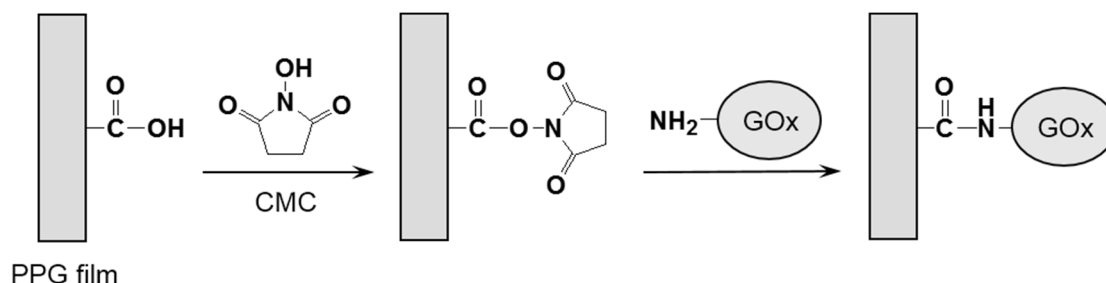
$$\sigma = \frac{1}{R \times 2.719 \times t} \quad (\text{式 2-1})$$

ここで、 t は導電体の厚さであり、 R 測定後の試料を液体窒素中で絶縁テープごと破断し、その断面を SEM で観察することにより求めた。また、2.719 は試料の形状に依存する係数であり、ロレスターGP 内蔵の計算ソフトによって算出した。

2.2.6 グルコースオキシダーゼの固定化

PPG 膜表面への GOx の固定化は、Scheme 2-1 に示す方法によって行った。まず、CMC 100 mg および NHS 15 mg を含んだ水溶液 2 ml 中に PPG 膜を室温で 20 分間浸漬することにより、膜表面のカルボキシル基を NHS 活性エステルに変えた。次に、膜を純水で洗浄し、表面の余分な水分を除去した後、5 mg/ml GOx 水溶液 15 μ l を膜表面に滴下し、室温で 30 分間静置することで GOx のアミノ基と NHS 活性エステルの間の縮合反応を行った。なお、固定化操作中の GOx 水溶液の揮発を防ぐため、膜はシャーレ内に静置した。このように処理した膜 (PPG-GOx 膜) を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 3 ml で洗浄し、次いで純水で洗浄した。洗浄操作によって得られた未固定の GOx を含んだ緩衝液は回収し、固定化 GOx 量の評価に使用した。固定化 GOx 量は、Sigma-Aldrich, Inc. の QuantiPro BCA 分析キットを使用して未固定の GOx を定量し、固定化操作によ

って減った GOx 量を求めることで評価した。PPG-GOx 膜は使用するまで 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中、4°C で保存した。



Scheme 2-1 Covalent immobilization of GOx on the PPG film.

2.2.7 固定化グルコースオキシダーゼの活性測定

固定化 GOx の活性測定は、Trinder の方法^[11]を参考に行った。具体的には、GOx によるグルコース酸化反応で生じた過酸化水素を POD 存在下で 4-アミノアンチピリンおよびフェノールと反応させ、生成する有色化合物の吸光度を測定することによって固定化 GOx の活性を求めた。まず、5 ml エッペンチューブ内に 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 4.75 ml と PPG-GOx 膜を入れ、溶液が 25°C になるように加温した。次に、1 M グルコース水溶液 0.25 ml を加えてよく攪拌し、固定化 GOx によるグルコース酸化反応を開始させた。グルコース酸化反応は開始から 3 分後、PPG-GOx 膜を取り出すことで停止した。酵素反応後の溶液に 8 mg/ml 4-アミノアンチピリンと 0.63 mg/ml POD を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 0.1 ml と 11.2 mM フェノール水溶液 0.15 ml を加えて混合することで有色化合物を生成させた。混合から 10 分間静置し、溶液の 505 nm での吸光度を測定した。固定化 GOx の活性は吸光度の値と検量線に基づいて算出した。検量線は濃度既知の過酸化水素水溶液を用いて有色化合物を生成させることで作製した。

2.2.8 グルコースセンシングによる電極性能の評価

PPG-GOx 膜を用いたグルコースセンシングは、電子メディエータを使用する手法で行った。GOx を含む多くの酸化還元酵素は、酸化還元部位をタンパク質の殻の内部に有しており、電極との電子の授受が困難である。そこで、酵素と電極との電子伝達に、電子メディエータと呼ばれる、電子の授受を仲介する低分子化合物を使用する。PPG-GOx 膜を利用するグルコースセンシングでは、以前の研究^[12,13]を参考にし、電子メディエータとして *p*-ベンゾキノン (BQ) を用いた。

まず、1.0 mM BQ を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 20 ml に窒素ガスを通じることで溶存酸素を除いた。次に、PPG-GOx 膜をこの溶液に浸し、0.4 V vs. SCE の電位を印加した。バックグラウンド電流が安定した後、0.2 M グルコース水溶液 100 μ l を段階的に加え、電流が一定となったときの値をグルコースに対する電流応答として読み取った。なお、センシング中は、PPG-GOx 膜へのグルコースの輸送を容易にするため、マグネティックスターラーを使用して溶液を 400 rpm の速度で攪拌し続けた。

2.3 結果および考察

2.3.1 *N*-フェニルグリシンの電解重合

ピロールやアニリンなどの芳香族化合物は、電気化学的酸化によって電極上に高分子薄膜を生ずる^[14]。一般的に電解重合と呼ばれるこの方法は、導電材料上に導電性高分子膜を容易に作製することができる。電解重合では、作用極上でモノマーが酸化され、生じたラジカルカチオン同士がカップリングを繰り返すことにより重合が進行する。

そこで、まず PPG 膜を作製する前に *N*-フェニルグリシンがどの電位から電気化学的に酸化するかを調べるため、0 から 1.0 V vs. SCE の範囲で掃引速度 0.01 V/s の単掃引ボルタンメトリを行った。ボルタンメトリとは、作用電極に印加している電位を時間とともに

に一定速度で変化させる測定方法であり、電位-電流曲線を得ることができるものである^[15]。物質によって反応する電位が異なるので電位は反応物の定性に利用でき、電流は濃度に依存するのでその定量に利用できる。Fig. 2-3 に金電極を用いて 1.0 M 硝酸水溶液中で測定した *N*-フェニルグリシンの単掃引ボルタモグラムを示す。見て分かるように、0.7 V vs. SCE 以上の電位で酸化電流が観察された。この電流は *N*-フェニルグリシンの

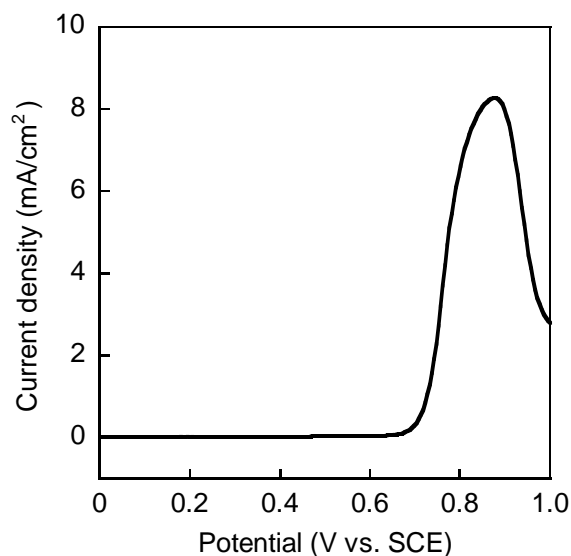


Fig. 2-3 Linear sweep voltammogram measured with a gold electrode in a 1.0 M HNO₃ solution containing 0.1 M *N*-phenylglycine.

重合をもたらすラジカルカチオンの生成に起因すると考えられる。実際、単掃引ボルタモトリー時に金電極表面を目視で観察したところ、0.7 V vs. SCE を境に金電極表面の色が重合膜の形成を示す黒色に変わった。これらの事実は、0.7 V vs. SCE 以上の印加電位で *N*-フェニルグリシンを電解重合できることを示している。しかし、0.8 V vs. SCE で PPG 膜の作製を試みたところ、*N*-フェニルグリシンの電解重合は起こったものの、非常に脆い不均一な膜が得られた。アニリンや *N*-メチルアニリンの電解重合では、それらの酸化開始電位より過剰に高い電位で重合すると、重合反応と同時に高分子主鎖の分解反応が起こることが報告されており^[16]、こうした分解反応が *N*-フェニルグリシンの電解重合においても同様に起きたと考えられる。一方、0.75 V vs. SCE で電解重合を行ったところ、丈夫で均一な膜が得られた。このことから本研究では、PPG 膜の作製における印加電位として 0.75 V vs. SCE を選択した。

Fig. 2-4 に *N*-フェニルグリシンの電解重合で得られた典型的なクロノアンペログラムを示す。酸化電流は初期段階で急激に増え、その後、約 200 秒後まで緩やかに増加した。この電流値増加の傾向は、核形成過程を含んだ電解重合で観察される傾向とよく似てい

る^[17]。したがって、初期とその後の電流増加はそれぞれ PPG の核形成と PPG 膜の成長に相当すると考えられる。酸化電流は最終的に約 6 mA/cm^2 でほぼ一定になった。この理由としては、PPG 膜の成長速度が膜表面への *N*-フェニルグリシンの供給速度に制限されたことなどが考えられる。電解重合を硝酸、塩酸、硫酸および過塩素酸の各水溶液中で行った結果、硝酸水溶液中で重合した場合に最も酸化電流の増加速度が大きい、すなわち PPG 膜の成長が早いことがわかった。ゆえに、PPG 膜の作製には硝酸水溶液を使用した。

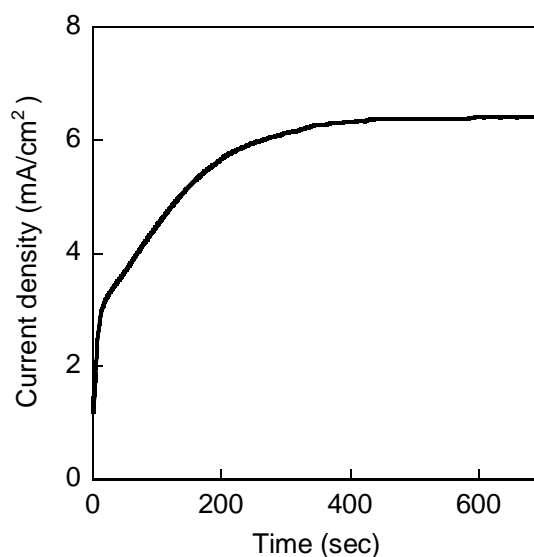


Fig. 2-4 Chronoamperogram for electrochemical polymerization of *N*-phenylglycine in a 1.0 M HNO_3 solution.

2.3.2 ポリ (*N*-フェニルグリシン) 膜の物性

Fig. 2-5 に ATR 法で測定した PPG 膜表面の IR スペクトルを示す。このスペクトルは、化学重合で得られた粉状の PPG のものとほぼ一致していた^[6]。1700 cm^{-1} 付近に見られる吸収ピークは、 $\text{C}=\text{O}$ 伸縮振動に由来しており、PPG 膜表面にカルボキシル基が存在していることを意味している。一方、SEM によって PPG 膜を観察した結果、Fig. 2-6 に示すように、膜表面が繊維状構造であることがわかった。これは、PPG 膜が見かけの面積と比較して非常に大きい表面積を有することを示している。さらに、PPG 膜の導電率は、化学重合で得られる PPG 粉

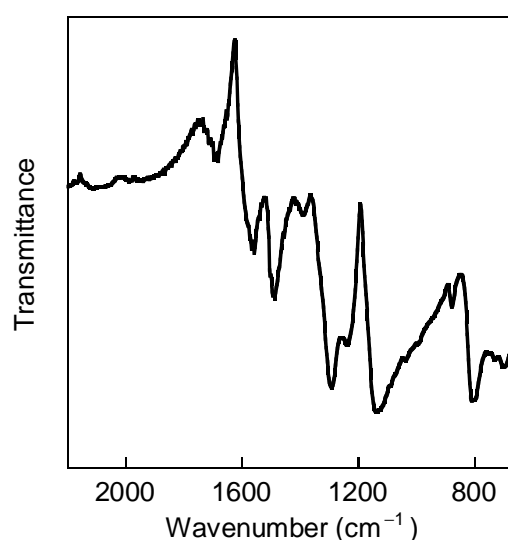


Fig. 2-5 IR spectrum of the PPG film surface.

の値と近い $2.5 \times 10^{-3} \text{ S/cm}$ であった。この値は *o*-カルボキシルアニリンを重合して得たカルボキシル基を持つポリアニリンより 10 万倍大きい。これらの結果から、PPG 膜が酵素固定化担体および導電媒体に必要な不可欠な物性を有することを証明した。

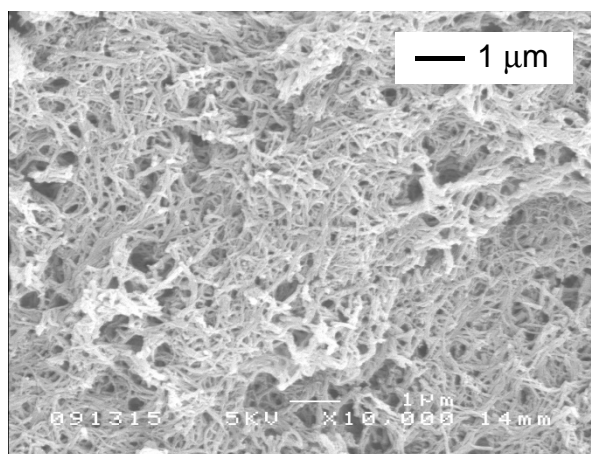


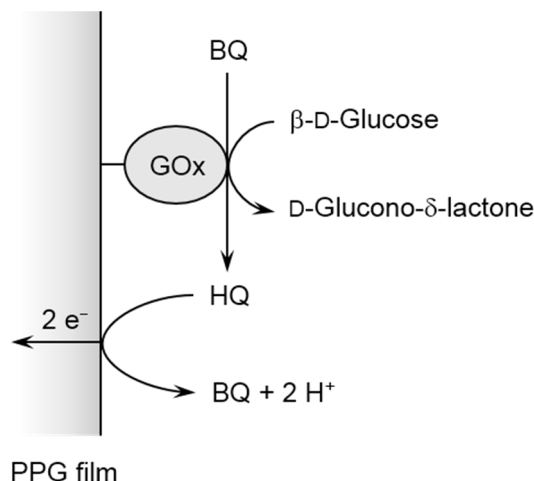
Fig. 2-6 SEM image of the PPG film surface.

2.3.3 ポリ (*N*-フェニルグリシン) 膜への酵素固定

PPG 膜上のカルボキシル基と GOx のアミノ基との間にアミド結合を形成する方法により PPG 膜上への GOx の固定化を試みた。固定化 GOx の量とその比活性を求めた結果、それぞれ $66.4 \mu\text{g/cm}^2$ と 1.82 U/mg だった。活性を有した GOx が PPG 膜上に存在することから、PPG 膜が酵素固定化担体として利用できることは明らかである。しかし、本研究で採用した固定化操作では、アミド結合を介して固定化された GOx 分子のみならず、PPG 膜に吸着している GOx 分子が存在する可能性がある。後者の場合、環境の変化などにより PPG 膜上から脱離してしまう問題がある。そこで、PPG 膜への GOx の吸着について評価するため、カルボキシル基を活性化させずに GOx 水溶液を PPG 膜に滴下した。この方法により固定化された GOx の量は $24.0 \mu\text{g/cm}^2$ であり、これは Scheme 2-1 の手順で固定化された GOx 量の 3 分の 1 の値だった。このことは、PPG 膜上のカルボキシル基が GOx の安定な固定化に寄与することを裏付けている。

2.3.4 酵素固定化電極のセンシング性能

Scheme 2-2 に本研究で行ったグルコースセンシングの原理を示す。まず、固定化 GOx により基質である β -D-グルコースが酸化され、GOx の酸化還元部位が還元状態になる。次に、還元状態の GOx から溶液中に共存させた電子メディエータである BQ に電子およびプロトンが渡り、ヒドロキノン (HQ) が生成すると同時に GOx が再び元の酸化状態に戻る。そして、HQ を電極上



Scheme 2-2 Glucose oxidation with immobilized GOx and role of BQ as a mediator.

で酸化することにより、酵素反応によって生じた電子を電流として検出する。電極で酸化された HQ は再び BQ に戻り、繰り返し利用される。ここで検出される電流は全て固定化 GOx によるグルコースの酸化反応で生じたものである。ゆえに、電極が受け取った電子の量は反応したグルコースの量に対応し、電流応答としてグルコース濃度を知ることができる。

グルコース濃度の変化に対する PPG-GOx 膜の電流応答の一例を Fig. 2-7 に示した。グルコース濃度は、PPG-GOx を配置した測定溶液に 0.2 M グルコース水溶液 100 μ l を段階的に添加することで変化させた。なお、図中の矢印は添加したタイミングを示している。グルコース溶液を添加すると酸化電流は増加し、添加後

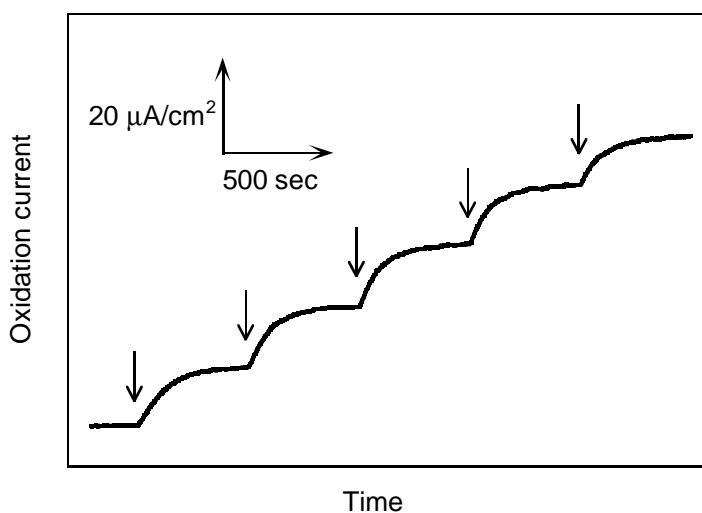


Fig. 2-7 Current response of the PPG-GOx film to successive addition of 0.2 M glucose into an phosphate buffer solution (0.1 M, pH 7.0) containing 1.0 mM BQ.

200 秒から 250 秒でほぼ一定となった。また、添加するたびに酸化電流は大きくなった。このことから、PPG-GOx 膜はグルコースセンサーの検出部位として機能することがわかった。

Fig. 2-8 に電流応答とグルコース濃度
の関係を示す。電流応答はグルコース濃
度 7.5 mM 付近まで直線的に増加し、そ
れ以上の濃度ではほぼ一定となった。グ
ルコースセンサーは血中糖濃度の測定
に使用されており、一般的にその濃度は
5 mM 程度が平均値であるとされている
[18]。PPG-GOx 膜は、7.5 mM まで直線
性を示したことから、血糖値センサーに
応用できる可能性が示唆された。また、

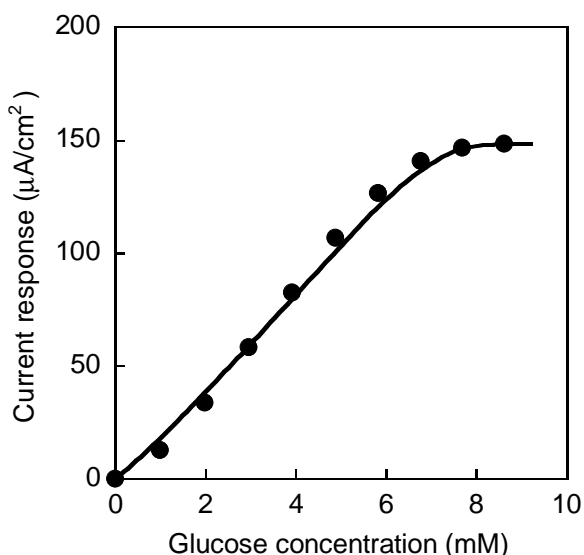


Fig. 2-8 Plots of the current response against glucose concentration.

Fig. 2-8 の直線部分の傾きから PPG-GOx 膜のグルコースに対する感度を $21.0 \mu\text{A}/(\text{mM cm}^2)$ と見積もった。GOx を担持したポリ [1- (2-カルボキシルエチル) ピロール] 膜^[3] およびポリ (チオフェン-3-酢酸) 膜^[4] を利用し、BQ を用いた方法でグルコースセンシングを行った際の感度は、それぞれ 0.3 および $3 \mu\text{A}/(\text{mM cm}^2)$ であり、PPG-GOx 膜の値はこれらと比較してかなり大きかった。ポリ [1- (2-カルボキシルエチル) ピロール] 膜およびポリ (チオフェン-3-酢酸) 膜の導電率はそれぞれ 10^{-8} S/cm と 10^{-7} S/cm であることから、PPG-GOx 膜の比較的高い感度は、PPG 膜の優れた導電性に起因していると考えられる。さらに、センシング性能に関して、導電性高分子膜を導電媒体および GOx の固定化担体として利用した他のグルコースセンサーと比較した (Table 2-1)。検出下限については、Currie の考え方^[24]に基づいて算出した。見てわかるように、GOx 固定化電極の導電媒体および固定化担体に PPG 膜を利用することによって優れたセンシング性能が示された。5 つの PPG-GOx 膜を用いてセンシングの再現性を調べたところ、感度の

標準偏差が 6.2%であった。このことは、PPG-GOx 膜の作製法が許容可能な再現性を有していることを示している。

Table 2-1

Comparison of the glucose sensing performances of the GOx-immobilized electrodes.

Conducting component	Sensitivity ($\mu\text{A}/(\text{mM cm}^2)$)	Linear range (mM)	Detection limit (mM)	Ref.
PPG	21.0	0–7.5	0.03	Present study
PEDOT	15.2	0.2–8	0.04	[19]
POAP/CNT	11.4	0–5	–	[20]
PAB	1.25	10–35	–	[21]
PPyAA/Au	0.42	1–18	0.05	[22]
PP2ABA	0.058	3–40	0.5	[23]

PEDOT, poly(3,4-ethylenedioxythiophene); POAP, poly(*o*-aminophenol); CNT, carbon nanotube; PAB, poly(2-aminobenzoic acid); PPyAA, poly(pyrrole propylic acid); PP2ABA, poly(pyrrole-2-aminobenzoic acid).

2.4 まとめ

N-フェニルグリシンの電解重合によって PPG を膜状に合成し、膜表面のカルボキシル基を結合点として GOx を固定化することで PPG-GOx 膜を作製した。*N*-フェニルグリシンの電解重合条件を検討したところ、硝酸水溶液中で 0.75 V vs. SCE の電位を印加することで丈夫な PPG 膜が得られることがわかった。得られた膜は比較的高い導電性 ($2.5 \times 10^{-3} \text{ S/cm}$) を有し、かつ、膜表面にカルボキシル基を持つことを確認した。PPG-GOx 膜の作製において、このカルボキシル基は、アミド結合による GOx の固定化に寄与した。電子メディエータとして使用するグルコースセンシングに PPG-GOx 膜を応用した結果、グルコース濃度に依存する電流応答が得られ、PPG-GOx 膜はグルコースセンサーの検出部位として機能することが示された。グルコースに対する感度の値は、他の導電性高分子膜を導電媒体および GOx 固定化担体として利用したグルコースセンサー

のものより大きい。これは PPG 膜の比較的高い導電性に起因していると考えられる。ここで得られた成果は、導電媒体と酵素固定化担体としての PPG の有用性を示すものである。

参考文献

- [1] M.M. Ayad, N.A. Salahuddin, A.K. Abou-Seif, M.O. Alghaysh, *Eur. Polym. J.*, 2008, **44**, 426–435.
- [2] 桑原敬司, 大島賢治, 山内健, 下村雅人, 宮内信之助, *高分子論文集*, 2004, **61**, 122–126.
- [3] M. Shimomura, R. Miyata, T. Kuwahara, K. Oshima, S. Miyauchi, *Eur. Polym. J.*, 2007, **43**, 388–394.
- [4] T. Kuwahara, K. Oshima, T. Yamauchi, M. Shimomura, S. Miyauchi, *Synth. Met.*, 2005, **152**, 29–32.
- [5] M.T. Nguyen, A.F. Diaz, *Macromolecules*, 1995, **28**, 3411–3415.
- [6] X. Lei, Z. Su, *Mater. Lett.*, 2007, **61**, 1158–1161.
- [7] L. Mao, K. Yamamoto, *Talanta*, 2000, **51**, 187–195.
- [8] E. Katz, D.D. Schlereth, H.L. Schmidt, *J. Electroanal. Chem.*, 1994, **367**, 59–70.
- [9] G. Tao, E. Katz, I. Willner, *Chem. Commun.*, 1997, 2073–2074.
- [10] R. Hirsch, E. Katz, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 12053–12054.
- [11] P. Trinder, *Ann. Clin. Biochem.*, 1969, **6**, 24–27.
- [12] C. Liu, T. Kuwahara, R. Yamazaki, M. Shimomura, *Eur. Polym. J.*, 2007, **43**, 3264–3276.
- [13] C. Liu, H. Ohta, T. Kuwahara, M. Shimomura, *Eur. Polym. J.*, 2008, **44**, 1114–1122.

- [14] 土田英俊, *高分子*, 1986, **35**, 124–127.
- [15] 松田好晴, 岩倉千秋, 「電気化学概論」, 丸善株式会社, 1994.
- [16] A. Malinauskas, J. Malinauskienė, *Chemija*, 2005, **16**, 1–7.
- [17] J. Yano, K. Yoshikawa, A. Kitani, *Anal. Sci.*, 1997, **13**, 741–746.
- [18] 今堀和友, 山川民夫, 「生化学辞典」, 東京化学同人, 1992.
- [19] S. Fabiano, C. Tran–Minh, B. Piro, L.A. Dang, M.C. Pham, O. Vittori, *Mater. Sci. Eng.*, 2002, **C21**, 61–67.
- [20] D. Pan, J. Chen, S. Yao, W. Tao, L. Nie, *Anal. Sci.*, 2005, **21**, 367–371.
- [21] K. Ramanathan, S.S. Pandey, R. Kumar, A. Gulati, A.S.N. Murthy, B.D. Malhotra, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2000, **78**, 662–667.
- [22] M. Şenel, C. Nergiz, *Curr. Appl. Phys.*, 2012, **12**, 1118–1124.
- [23] A. Berkkkan, A.İ. Seçkin, K. Pekmez, U. Tamer, *J. Solid State Electrochem.*, 2010, **14**, 974–980.
- [24] L.A. Currie, *Anal. Chem.*, 1968, **40**, 586–593.

第3章

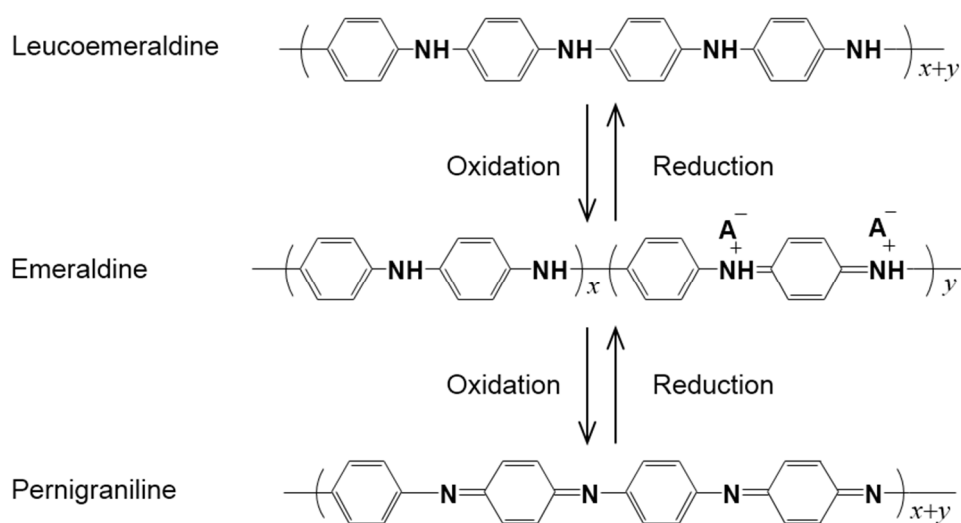
ポリアニリン／ポリアクリル酸複合膜を利用した

酵素固定化電極の作製とその特性評価

3.1 まえがき

ポリアニリン (PANI) は、その導電性、安定性、機械的柔軟性および特殊な酸化還元特性のために、幅広く研究されてきた^[1,2]。実際の応用としては、二次電池、表示素子、センサーなどがあり、導電性高分子の中で初めて実用化されたことで知られている。

興味深いことに、PANI の電氣的性質は他の導電性高分子と本質的に異なる。ポリピロールやポリチオフェンなどの一般的なものは、酸化状態で導電体、還元状態で絶縁体であるのに対し、PANI は中間酸化状態 (Emeraldine) でのみ導電体であり、還元状態 (Leucoemeraldine) およびより高い酸化状態 (Pernigraniline) では絶縁体である (Scheme 3-1) ^[3,4]。また、導電性の発現に高分子主鎖中にある窒素原子のプロトン化が求められるため、導電性は pH の影響を強く受ける。PANI の pK_a は 2 から 3.5 であることから、中性付近では PANI はほとんど導電性を示さない^[5]。



Scheme 3-1 Redox reaction of PANI.

第1章で述べたように、PANI はアスコルビン酸やニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの電気化学的酸化に対して電極触媒のように振舞うことが報告されている。アスコルビン酸やニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの電気化学的酸化の促進はバイオセンサーやバイオ燃料電池の高性能化につながるため^[6]、中性溶液中における PANI の導電材料としての利用が強く求められている。中性溶液中で PANI に導電性を持たせる方法として、ポリアクリル酸 (PAA, Fig. 3-1) との複合化がある^[7]。PANI と PAA を複合した系では、PAA のカルボキシル基が PANI の窒素原子のプロトン化をもたらすため、結果として、複合体は中性溶液中でも導電性を示す。PANI と PAA の複合体は PAA 存在下でのアニリンの電解重合によって容易に薄膜状に作製でき^[8]、さらに、PAA のカルボキシル基は生体由来物質の共有結合による固定化に使用できる^[9,10]。これらのことから、PANI に代わり、PANI/PAA 複合体が酵素固定化電極の構成要素として利用されてきた。

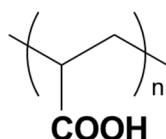


Fig. 3-1 Chemical structure of PAA.

そうした中で著者は、高い導電性を有し、かつ酵素と結合しうる導電性高分子膜を作製する方法として PANI と PAA の複合化に注目した。これまで PANI/PAA 複合膜を用いた酵素固定化電極に関する研究は報告されているが^[11,12]、それらはバイオセンサーやバイオ燃料電池への応用研究でしかなく、膜の性質にはほとんど触れなかった。しかし、PANI/PAA 複合膜中の PAA が膜の導電性の発現および酵素固定に対して重要な働きをすることを考えると、複合膜中の PAA 含有量は酵素固定化電極の性能を左右する重要な因子であることが容易に想像できる。そこで本研究では、PAA 含有量の異なる PANI/PAA 複合膜の物性を調査し、複合膜を利用した GOx 固定化電極のセンシング性能に及ぼす PAA 含有量の影響について検討した。酵素固定化電極の性能に及ぼす PANI/PAA 複合膜の組成の影響に注目した研究はこれまでになく、本研究の成果は PANI の触媒作用をバ

イオセンサーやバイオ燃料電池に導入するうえでの重要な指針になるといえる。また、酵素固定化電極に適した導電性高分子膜の創出においても興味深い情報になると考えられる。

3.2 実験

3.2.1 試薬および装置

アニリンはナカライテスク（株）の特級試薬を購入し、減圧蒸留した後、使用するまでの間、窒素雰囲気下で冷凍保存した。粉末状の PAA（平均分子量：250,000）は和光純薬工業（株）の一級試薬を使用した。その他の試薬は特級試薬もしくは分析用試薬を購入し、そのまま使用した。

電解重合はポテンシostat／ガルバノスタット μ Autolab III（Eco Chemie）と接続した三電極セルを使用して行った。白金板および SCE をそれぞれ対向電極および参照電極として使用した。作用電極には第 2 章で作製法を述べた金電極を用いた。IR スペクトルの測定にはサーモフィッシャーサイエンティフィック（株）製の Nicolet 6700 を使用した。電気化学的測定については、SCE の代わりに Ag/AgCl 電極を使用したことを除き、電解重合と同様の三電極セルを使用して行った。

3.2.2 ポリアニリン／ポリアクリル酸複合膜の作製

PANI/PAA 複合膜は PAA 存在下でのアニリンの電解重合により、金電極表面に作製した。重合溶液は、0.5 M 硫酸に 0.5 M アニリンを溶解させ、さらに様々な濃度の PAA を溶解させたものを用いた。重合に先立ち、重合溶液に窒素ガスを通じることで溶存酸素を除いた。電解重合は -0.4 から 0.9 V vs. SCE の範囲を 50 mV/s の速度で繰り返し電位掃引することで行った。電位掃引は、通過電荷量が 140 mC に達するまで行った。重合後、未反応のモノマーを除くために電極を 0.5 M 硫酸で洗浄し、次いで純水で洗浄した。

3.2.3 IR スペクトルの測定

PANI/PAA 複合膜の IR スペクトルは、透過法によって測定した。測定に使用するペレットの作製は以下の手順で行った。まず、真空乾燥した膜を電極から剥がし、秤量してから一定量の KBr とよく混合した。次に、錠剤成型器中で 600 kgf/cm² の圧力を 5 分間与えることでペレット状にした。また、比較のために PAA 粉末の IR スペクトルを測定した。その場合、ペレットの作製には、既知量の PAA を含むメタノール溶液を染み込ませ、よく真空乾燥した KBr 粉末を用いた。

3.2.4 導電率測定

導電率は、Cai と Chen の方法^[13]を参考にした四端子法で測定した。測定用の電極はフェノール樹脂に直径 0.5 mm の金製の端子 4 本を Fig. 3-2 に示すように埋め込むことで作製した。測定試料である PANI/PAA 複合膜は、短絡させた 4 本の端子を作用極として用い、3.2.2 に示す条件で電解重合を行うことにより作製した。電解重合は、各端子表面に生成した膜がつながり、一つの膜になるまで続けた。なお、端子間の距離は 0.1 mm である。導電率は、複合膜を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に浸した状態で測定した。三電極系によって 3000 秒間、複合膜に任意の電位を印加した後、すぐに外側の端子に電気を流し、内側の端子にかかる電圧を読み取った。導電率 σ は次の式から計算した。

$$\sigma = \frac{I\ell}{VLd} \quad (\text{式 3-1})$$

ここで、 I は外側の端子間に流した電流、 V は内側の端子間にかかる電圧、 ℓ は端子間の距離、 L と d はそれぞれ膜の幅と厚さである。厚さ d は光学顕微鏡を用いて測定した。

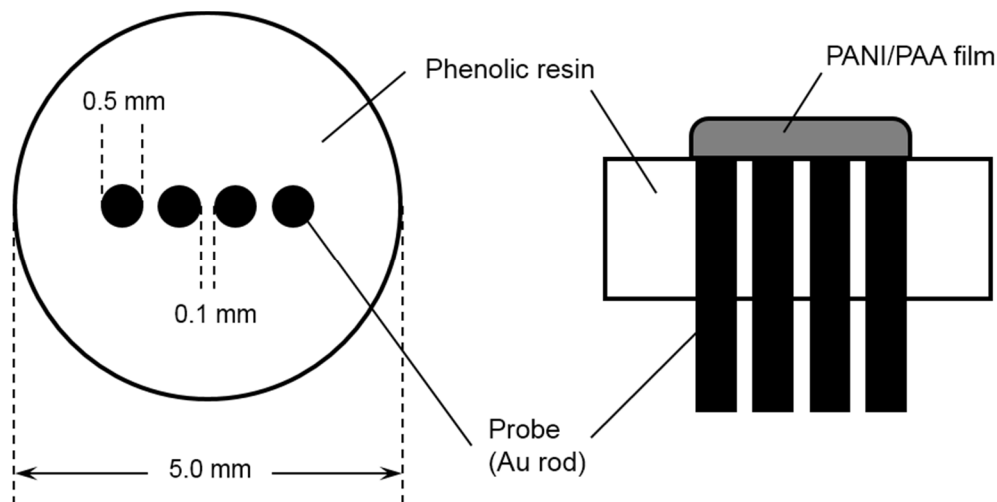


Fig. 3-2 Device used for in-situ conductivity measurement.

3.2.5 電気化学的測定

PANI/PAA 複合膜の酸化還元特性は、25°Cの条件で、10 mV/s の速度で掃引するサイクリックボルタンメトリによって評価した。測定溶液には、あらかじめ窒素ガスを通じることで溶存酸素を取り除いた 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を使用した。

3.2.6 カルボキシル基の定量

カルボキシル基 1 mol とトリイジンブルー (TB) 1 mol がイオン対を形成することを利用した方法^[4]によって PANI/PAA 複合膜表面のカルボキシル基を定量した。まず、水酸化ナトリウムで pH を調整した 0.5 mM TB 水溶液 (pH 10) に PANI/PAA 複合膜を 4 時間浸し、カルボキシル基と TB のイオン対を形成させた。次に、膜を水酸化ナトリウム水溶液 (pH 10) に移して攪拌することにより、膜中の余分な TB を除去した。カルボキシル基からの TB の脱離は、膜を 50 wt% 酢酸水溶液 2 ml に 40 分間浸すことで行った。膜から脱離した TB の量を 633 nm での吸光度測定で測定することによって膜表面のカルボキシル基量を求めた。

3.2.7 グルコースオキシダーゼの固定化

2.0 ml の純水に 50 mg CMC と 10 mg GOx を加えた水溶液に PANI/PAA 複合膜を室温で 1 時間浸漬することにより膜表面に GOx を固定化した。このように処理した複合膜 (PANI/PAA-GOx 膜) は純水で洗浄し、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中、4°C で保存した。固定化 GOx の活性は、前章に示した方法および条件で求めた。

3.2.8 グルコースセンシングによる電極性能の評価

前章と同様、BQ を電子メディエータとして使用する方法で行った。PANI/PAA-GOx 膜に 0.4 V vs. SCE の電位を印加し、バックグラウンド電流が安定した後、グルコース水溶液を段階的に加え、電流が一定となったときの値をグルコースに対する電流応答として読み取った。

3.3 結果および考察

3.3.1 ポリアクリル酸存在下におけるアニリンの電解重合

PAA 存在下でのアニリンの電解重合はアニリンの電解重合において一般的な電位掃引法によって行った^[15]。電解重合の様子は Fig. 3-3 に示すようなサイクリックボルタンメトリとして観察できる。1 回目の電位掃引の結果から、アニリンの酸化は、0.8 V vs. SCE で起こることが明らかになった。この値は PAA 非存在下における値と一致しており^[16]、PAA がアニリンの電気化学的酸化に影響しないことを示している。0.2 V 付近の酸化波および -0.1 V 付近の還元波は、電極表面

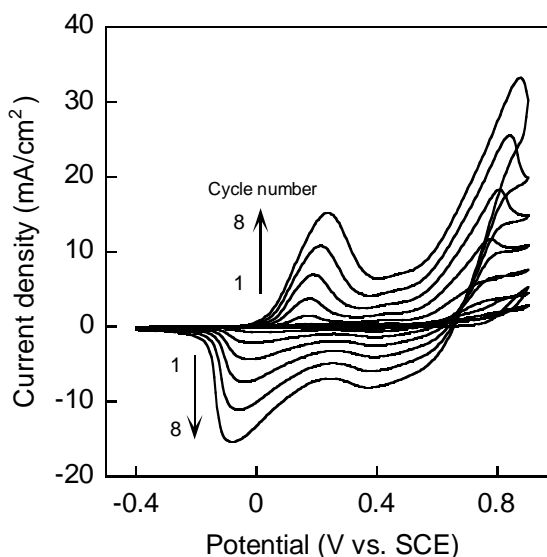


Fig. 3-3 Multisweep cyclic voltammograms for the polymerization of aniline in the presence of 25.0 mg/ml PAA.

に堆積した PANI の酸化還元によるものであり、電位掃引の繰り返しに伴って大きくなった。電気活性種が電極表面に付着している場合、一般的に、酸化波または還元波の面積は電極表面に存在する電気活性種の量に比例する^[17]。したがって、酸化波と還元波が大きくなったことは、PANI/PAA 複合膜の成長を表している。

PAA の存在が PANI の成長に与える影響を検討するため、還元波の面積（還元波を積分して得られた電気量）と掃引回数

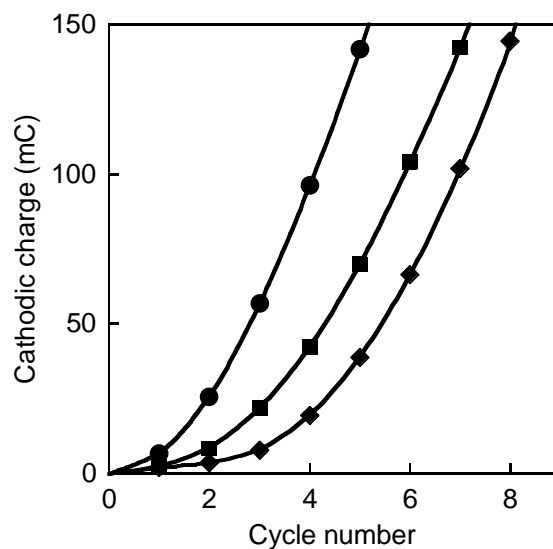


Fig. 3-4 Relations between cyclic number and cathodic charge during polymerization of aniline in 0.5 M H₂SO₄ containing 0 (●), 2.5 (■) and 25.0 (◆) mg/ml PAA.

関係を調べた (Fig. 3-4)。PAA 非存在下との比較により、存在下では初めの数周において PANI の成長が遅れることがわかった。この傾向は、PAA 濃度のより濃い溶液で、さらに顕著になった。この原因としては、アニリンと PAA が持つカルボキシル基の間で形成する水素結合の影響があげられる。水素結合を形成したアニリン分子の拡散速度は PAA の拡散速度に依存するため、PAA 濃度の上昇に伴って、アニリンは電極表面に供給されづらくなる。つまり、電極表面へのアニリンの供給が滞ったことにより、膜の形成が遅れたと考えられる。PAA 濃度 25.0 mg/ml 以下の条件において作製した膜を目視によって観察したところ、局所的なムラは見られなかった。一方、PAA 濃度 100 mg/ml でアニリンの電解重合を試みたところ、膜の形成がほとんど進まず、均一な膜は得られなかった。

PAA 濃度の異なる重合溶液から得た膜の IR スペクトルを PAA の IR スペクトルと共に Fig. 3-5 に示す。PAA 存在下で重合した膜には PANI の典型的なピークのほかに、カルボキシル基の C=O 伸縮振動 (1700 cm⁻¹) に由来するピークが観察された。この結果は、PANI 膜中への PAA の取り込みが起こったことを示している。また、重合溶液中の

PAA 濃度の増加に伴って、カルボキシル基に由来するピークは大きくなった。膜中の PANI の量は、重合時に通過電荷量を揃えることで調節しており、PAA 濃度によらず一定であると考えられる。実際、酸性条件下でのサイクリックボルタンメトリによって、PAA 濃度 25.0 mg/ml の重合溶液から得られた膜の酸化還元ピークが PAA 非存在下で得られた膜のものとほぼ同じ大きさであること、つまり、複合膜中の PANI の量が PANI 膜中の量と同じであることを確認している (Fig. 3-6)。したがって、カルボキシル基に由来するピークの増大は、膜中に取り込まれる PAA の量の変化を表している。このことから、重合溶液中の PAA 濃度によって PANI/PAA 複合膜の PAA 含有量を調節できることが明らかになった。

Lambert-Beer の法則に従い、IR スペクトルで観察された 1700 cm^{-1} のピークをもと

に PANI/PAA 複合膜中の PAA 含有量を求めた。Fig. 3-7 には重合溶液の PAA 濃度と複合膜の PAA 含有量の関係を示す。複合膜の PAA 含有量は、重合溶液の PAA 濃度の上昇に伴って増えた。しかし、液中の PAA 濃度が 5 mg/ml を超えると PAA 含有量の増加は緩やかになる傾向があった。この理由については、PANI 膜の構造上の問題であると考えられるが、詳しいことはわかっていない。以後、PAA 濃度の異なる重合溶液から得た複合膜の呼称を Table 3-1 に示すように PAA 含有量で表した。

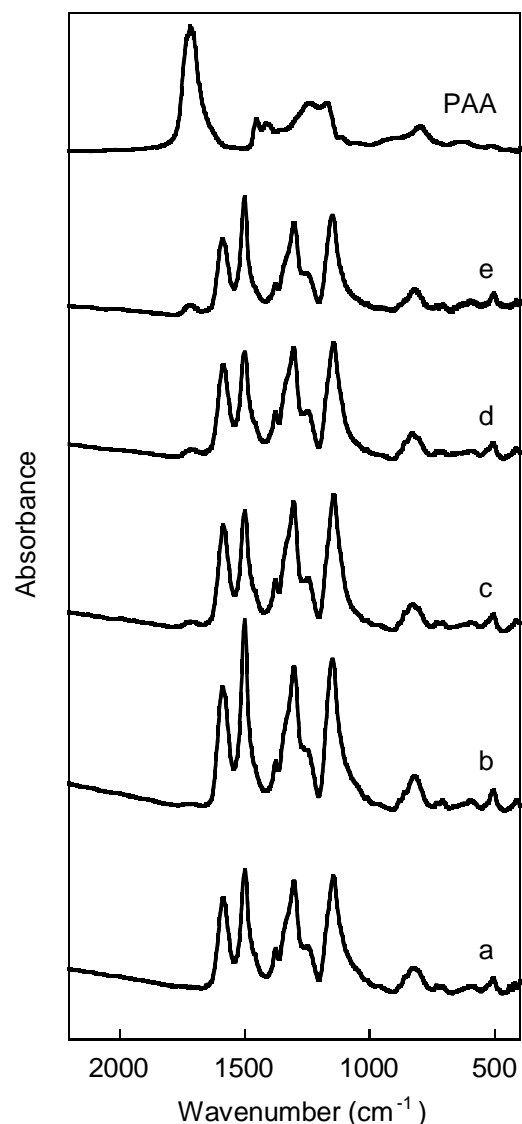


Fig. 3-5 IR spectra of PANI film (a), PANI/PAA films (b-e) and PAA. The spectra b, c, d and e are of the films prepared in the presence of 0.5, 2.5, 5.0 and 25.0 mg/ml.

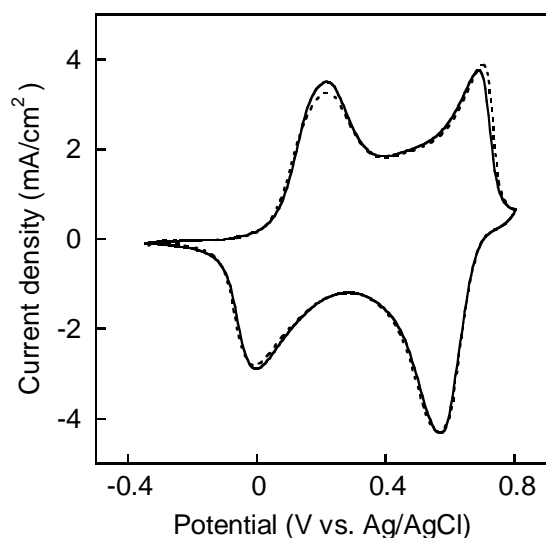


Fig. 3-6 Cyclic voltammograms with PANI (solid line) and PANI/PAA films (dotted line) in 0.1 M HCl buffer solution (pH 1.0). The PANI/PAA film was prepared in the presence of 25.0 mg/ml PAA.

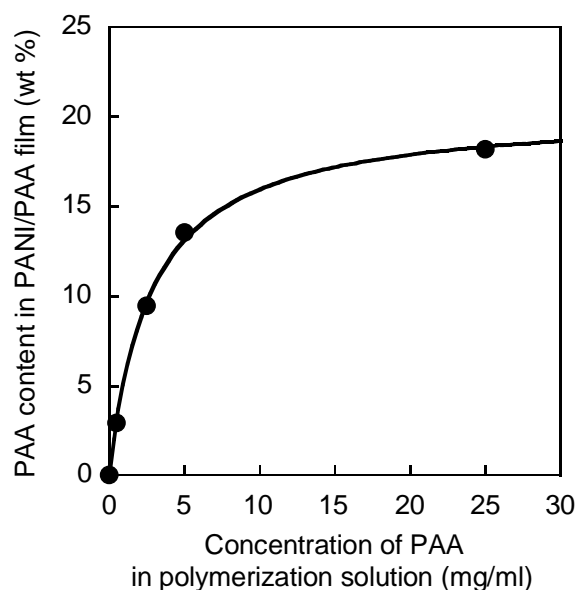


Fig. 3-7 Relation between PAA content in PANI/PAA films and PAA concentration of polymerization solutions.

Table 3-1

Abbreviated names of PANI/PAA films.

Sample	PAA concentration in polymerization solution (mg/ml)	PAA content (wt%)
PAA0 (= PANI)	0	0
PAA3	0.5	2.9
PAA9	2.5	9.4
PAA14	5.0	13.5
PAA18	25.0	18.2

3.3.2 ポリアニリン／ポリアクリル酸複合膜の構造

SEM によって複合膜表面を観察した結果を Fig. 3-8 に示す。PAA 含有量 0 から 14 wt%の膜 (PAA0~PAA14) は、繊維状および粒状から成る非常に空洞の多い構造をしていることがわかった。一方、PAA 含有量 18 wt%の膜 (PAA18) は、他の膜より太い繊維を持つ網目状の構造を形成していた。いずれの場合においても、複合膜は見かけよりも非

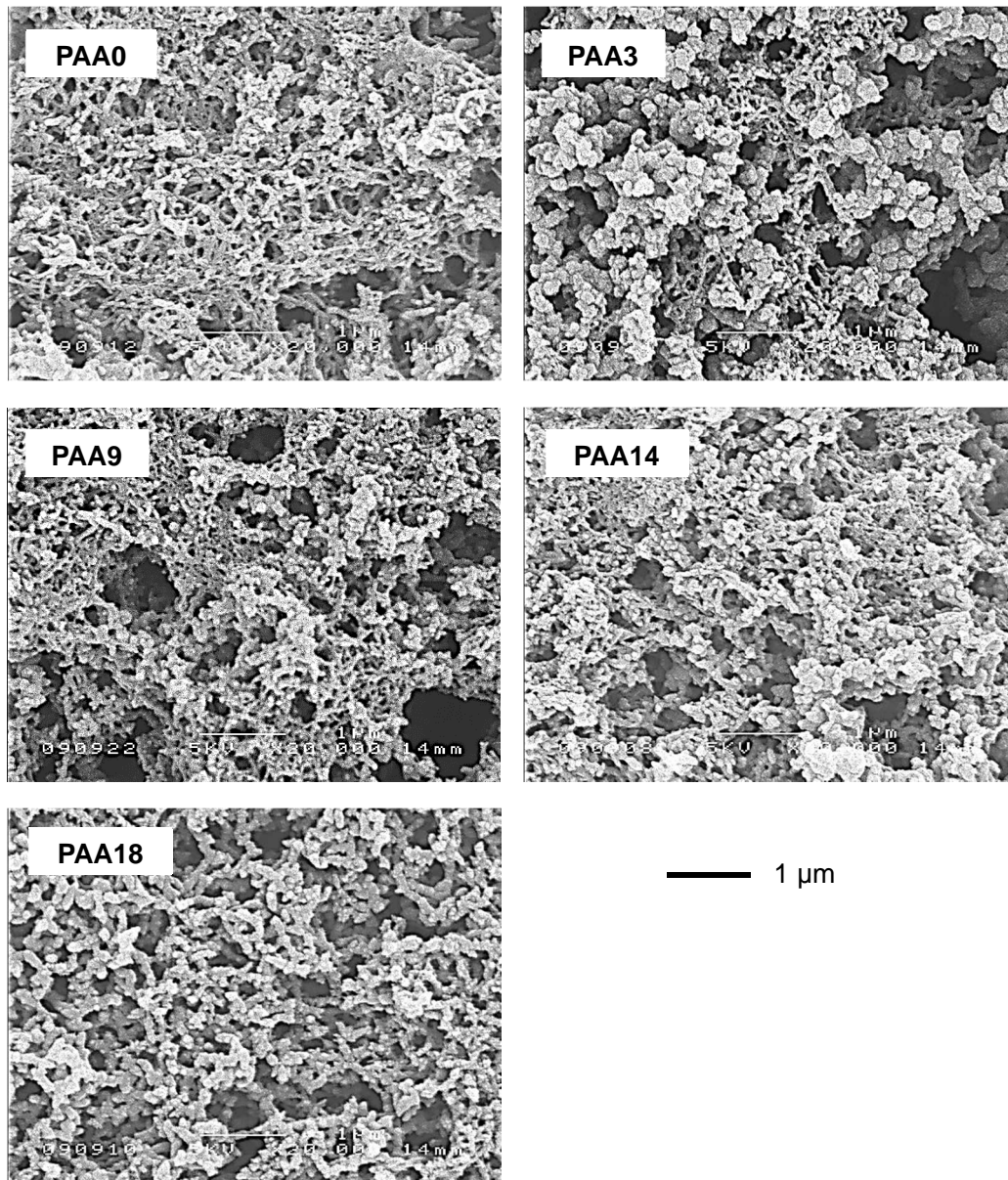


Fig. 3-8 SEM images of the surface of PANI/PAA films.

常に大きな表面積を有していた。このような大きな表面積は酵素固定や酵素と電極間の効率的電子伝達に有利であると考えられる。また、膜の断面を SEM によって観察した。Fig. 3-9 には一例として、PAA0 と PAA18 の断面を示す。膜の内部は多くの空洞を有していた。これは、表面観察で見られた空洞の多い構造が膜形成の初期段階から形作られ、電解重合の進行に伴って溶液側に成長したためであると考えられる。複合膜の膜厚を断面図から求めた結果、PAA3, PAA9 および PAA14 の膜厚はほぼ PANI 膜 (PAA0) と同

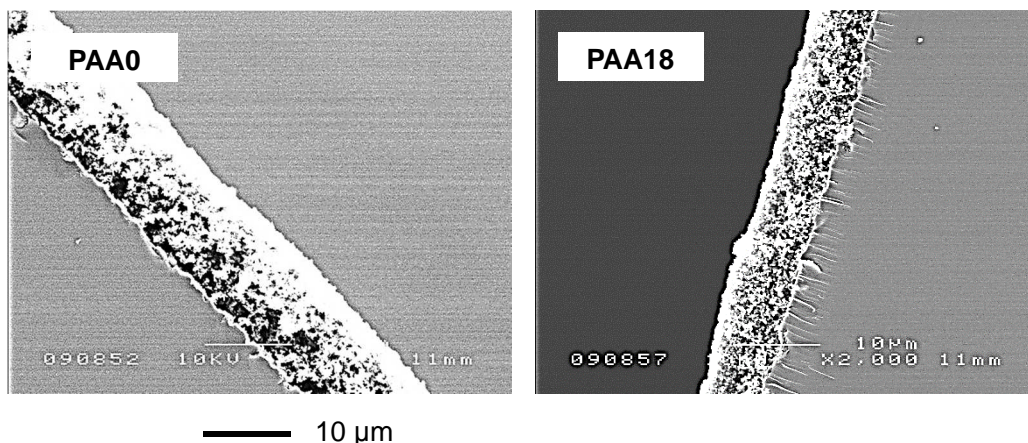


Fig. 3-9 SEM images of the cross-section of PAA0 and PAA18.

じ 10 μm 程度であったのに対し, PAA18 の膜厚はより薄く, 7 μm 程度であることがわかった (Fig. 3-10)。SEM による観察で得られたこれらの結果は重合溶液中の PAA の存在が膜の形成に影響することを示唆している。しかし, PAA 濃度 5 mg/ml 以下の範囲において, PAA は PANI の形成にほとんど影響しないと考えられる。PAA18 の構造が PAA0 から PAA14 の構造と異なるという事実は, PAA 濃度 5 mg/ml 以上で PAA 含有量の増加が緩やかになることと関連していると思われる。

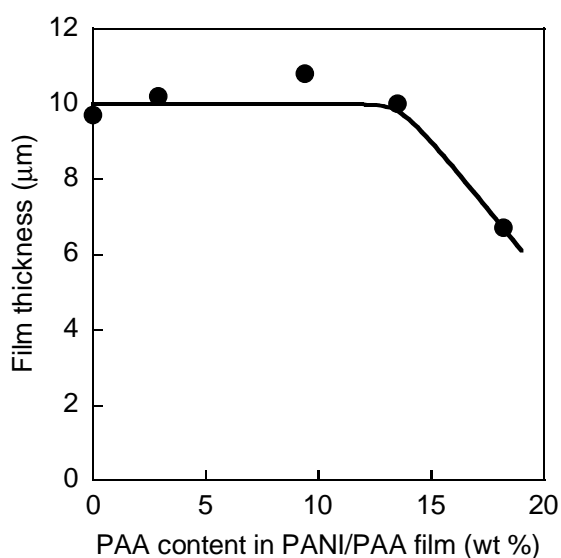


Fig. 3-10 Relation between the PAA content in the PANI/PAA film and the thickness of the film.

3.3.3 ポリアニリン/ポリアクリル酸複合膜の電気的性質

PANI/PAA 複合膜を酵素固定化電極に応用する場合, 中性条件下における導電性は必要不可欠である。そこで, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中での導電率測定を検討した。しかし, PANI の導電性は pH 環境のみならず, PANI 自身の酸化還元状態によっても影響される。そこで, 印加電位で酸化状態を制御した PAA14 を用い, 膜の導電性に及ぼす酸化状態の影響について調べた。その結果, Fig. 3-11 に示すように, 印加電位 0.4 V vs.

SCEにおいて最も高い導電率が得られた。
 この結果を受けて本研究では、0.4 V vs. SCE の電位を複合膜に印加してから導電率を測定した。

Fig. 3-12 に PANI/PAA 複合膜の導電率と PAA 含有量の関係を示す。予想したとおり、PANI/PAA 複合膜は PAA を含まない PANI 膜より高い導電率を有していた。これは、PAA のカルボキシル基が PANI の窒素原子のプロトン化をもたらしたことに起

因している。注目すべきは、膜の導電性が PAA 含有量の増加に伴って劇的に向上している点である。膜の導電性は膜中の PANI 部分の酸化還元挙動と密接に関連していると予想される。そこで、Fig. 3-12 に示した導電性の変化を明らかにするため、中性溶液中でのサイクリックボルタンメトリによって PANI/PAA 複合膜の酸化還元特性に及ぼす PAA 含有量の影響を調べた。Fig. 3-13 を見てわかるように、PANI/PAA 複合膜では酸化還元

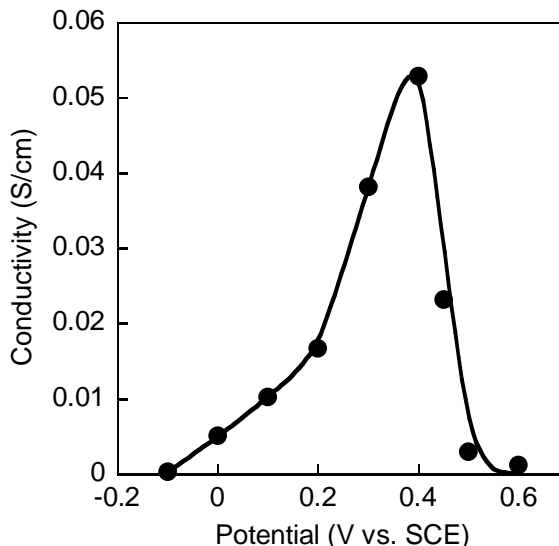


Fig. 3-11 Effect of applied potential on the conductivity of the PANI/PAA film under neutral condition.

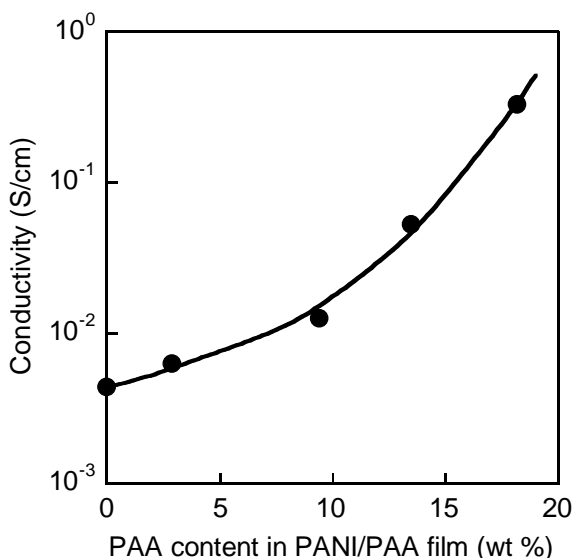


Fig. 3-12 Relation between the PAA content in the PANI/PAA film and the conductivity of the film under neutral condition.

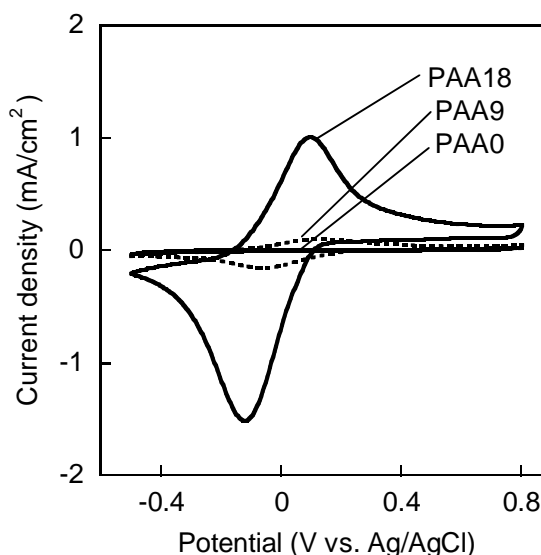


Fig. 3-13 Cyclic voltammograms measured with PANI and PANI/PAA films under neutral condition.

波が見られた一方、PANI 膜では見られなかった。この酸化還元波は Scheme 3-1 に示した PANI の酸化還元反応に起因している。興味深いことに、PAA18 の酸化還元波は PAA9 のものと比較してかなり大きかった。酸化還元波の大きさは電気化学的に酸化還元可能な PANI 部分の量を反映している。したがって、複合膜の導電性の劇的な向上は、酸化還元可能な PANI 部分、言い換えれば、中間酸化状態をとれる PANI 部分の増加によるものと考えられる。

3.3.4 ポリアニリン／ポリアクリル酸複合膜への酵素固定

膜に取り込まれた PAA 鎖の一部は膜表面に存在しており、そうした部分のカルボキシル基は酵素固定に使用できる。膜表面のカルボキシル基を定量した結果、Fig. 3-14 に示すように、PAA 含有量が多い複合膜ほど膜表面に多くのカルボキシル基を持つことがわかった。これらカルボキシル基と GOx のアミノ基との間にアミド結合を形成することにより、複合膜表面に GOx を固定化した。1 cm²あたりの固定化 GOx の活性を Fig. 3-15 に示す。PAA 含有量が 9 wt%までの範囲において、活性は PAA 含有量の増加に伴って上昇した。この上昇は、固定化の結合点となるカルボキシル基の増加に伴って固定化 GOx

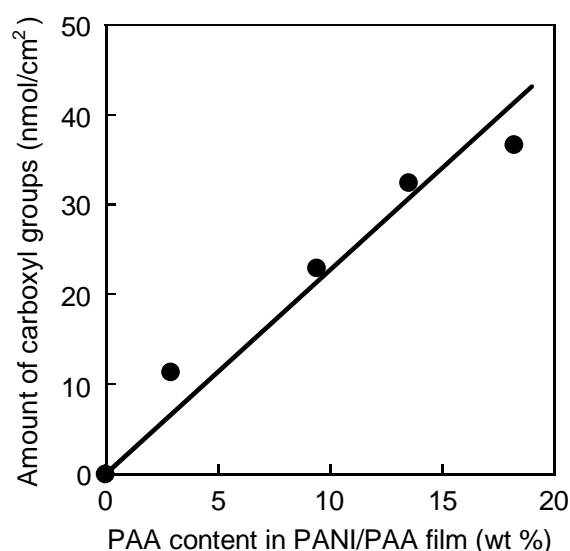


Fig. 3-14 Relation between the PAA content in the PANI/PAA film and the amount of carboxyl groups on the film.

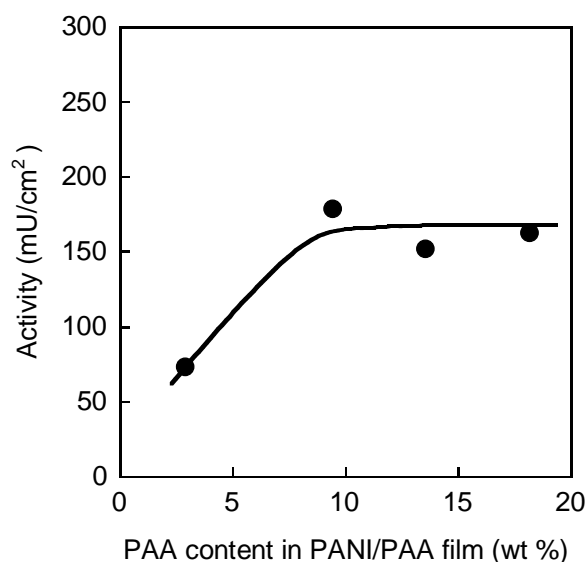


Fig. 3-15 Relation between the PAA content in the PANI/PAA film and the apparent activity of the immobilized on the film.

の量が増えたことに起因する。しかし、PAA含有量9 wt%以上では、カルボキシル基の量がPAA含有量の増加に伴って増えたのに対し、酵素活性は約150 mU/cm²でほぼ一定だった。このことは、20 µg/cm²以下のカルボキシル基の量でGOxが十分密に固定化されており、それ以上のカルボキシル基の存在はGOxの固定化に寄与しないためと考えられる。

3.3.5 酵素固定化電極のセンシング性能

グルコースセンシングは、前章と同様、BQを電子メディエータとして使用方法で行った。センシング結果の例として、PAA3にGOxを固定化した際の結果をFig. 3-16に示す。見て分かるように、PANI/PAA-GOx膜は、前章で述べたPPG-GOx膜より優れた電流応答を示した。これは、PANI/PAA複合膜が酵素電極の構成要素として非常に有望であることを示している。PANI/PAA-GOx膜の電流応答は、測定溶液中のグルコース濃度の増加に伴い上昇したが、グルコース濃度がより高い範囲では頭打ちになった。電流応答が頭打ちになる理由としては、固定化GOxによるグルコース酸化反応や複合膜上で起こるHQの酸化反応、膜内の電子伝達などの速度が制限されていることがあげられる。

PAA含有量が異なるPANI/PAA-GOx膜で同様にセンシングを行ったところ、Fig. 3-17に示すように、PAA含有量が多い膜を用いた時ほど、高濃度のグルコース存在下における電流応答が高い値を示すという興味深い結果が得られた。PAA含有量9 wt%以上では、固定化GOxの活性がほぼ一定であったことを考慮すると、高濃度のグルコース存在下における電流応答の値はHQの電気化学的酸化反応や膜内の電子伝

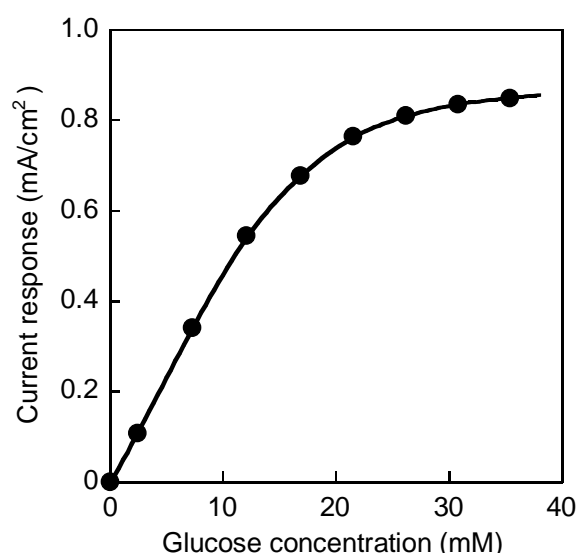


Fig. 3-16 Current response of the GOx-immobilized PANI/PAA film to various concentration of glucose.

達速度, つまり, PANIPAA 複合膜の導電性や表面構造の影響を反映していると考えられる。この結果は, PAA 含有量の増加が PANI/PAA 複合膜を利用した酵素固定化電極の高性能化をもたらすことを明らかにしている。

3.4 まとめ

PAA 存在下でアニリンを電解重合することにより, PANI/PAA 複合膜を作製した。膜の PAA 含有量は, 0 から 18 wt%の範囲で

変化し, 重合溶液中の PAA 濃度によって制御することが可能であった。PAA 含有量の異なる複合膜を SEM で解析した結果, 膜構造が PAA 含有量に影響を受けることが明らかになった。また, PAA 含有量の増加は中性溶液中における導電性の向上および膜表面に存在するカルボキシル基の増加をもたらした。そのカルボキシル基を結合点として PANI/PAA-GOx 膜を作製し, グルコースセンシングに応用したところ, PAA 含有量が多い膜を用いた時ほど高い電流応答が得られた。この結果は, PANI/PAA 複合膜を用いて電気化学センサーやバイオ電気化学システムを構築するうえで PAA 含有量が非常に重要な因子であることを明らかにしている。ゆえに, 第 5 章および第 6 章に示す PANI/PAA 複合膜の応用研究では, 今回得られた成果に基づいて研究を遂行した。

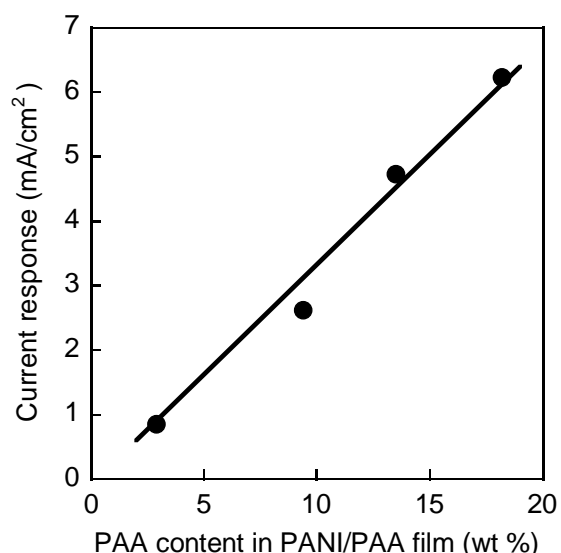


Fig. 3-17 Relation between the PAA content in the PANI/PAA film and the current response of the GOx-immobilized PANI/PAA film to 90 mM of glucose.

参考文献

- [1] E.T. Kang, K.G. Neoh, K.L. Tan, *Prog. polym. Sci.*, 1998, **23**, 277–324.
- [2] 倉本憲幸, マテリアルライフ学会誌, 2004, **16**, 107–114.

- [3] W.S. Huang, B.D. Humphrey, A.G. MacDiarmid, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1.*, 1986, **82**, 2385–400.
- [4] 吉野勝美, 小野田光宣, 「高分子エレクトロニクス ー導電性高分子とその電子光機能素子化ー」, コロナ社, 1996.
- [5] 中尾秀信, 長岡勉, 藤本倫生, 角野浩二, 矢野潤, 小倉興太郎, *分析化学*, 1993, **42**, 787–791.
- [6] M. Zayats, B. Willner, I. Willner, *Electroanalysis*, 2008, **20**, 583–601.
- [7] Y. Tang, K. Pan, X. Wang, C. Liu, S. Luo, *Microchim. Acta*, 2010, **168**, 231–237.
- [8] L.T. Cai, H.Y. Chen, *J. Appl. Electrochem.*, 1998, **28**, 161–166.
- [9] Z. Yin, Y. Liu, L.P. Jiang, J.J. Zhu, *Biosens. Bioelectron.*, 2011, **26**, 1890–1894.
- [10] H. Gu, X. Su, K.L. Loh, *Chem. Phys. Lett.*, 2004, **388**, 438–487.
- [11] P.N. Bartlett, E. Simon, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2000, **2**, 2599–2606.
- [12] O.A. Raitman, E. Katz, A.F. Bückmann, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 6487–6496.
- [13] L.T. Cai, S.B. Yao, S.M. Zhou, *J. Electroanal. Chem.*, 1997, **421**, 45–48.
- [14] Z.F. Li, E.T. Kang, K.G. Neoh, K.L. Tan, *Biomaterials*, 1998, **19**, 45–53.
- [15] 吉野勝美, 「導電性高分子の基礎と応用 ー合成・物性・評価・応用技術ー」, IPC, 1988.
- [16] 矢野潤, 吉河研一, 木谷皓, *分析化学*, 1997, **46**, 343–349.
- [17] 電気化学会 編, 「電気化学測定マニュアル基礎編」, 丸善出版, 2002.

第 4 章

導電性高分子を利用したバイオカソードの作製と

グルコース-酸素燃料電池の構築

4.1 まえがき

燃料電池は化学エネルギーを電気エネルギーに直接変換する発電システムである。「電池」と呼ばれるが、そのシステムは発電機に近く、補充可能な燃料および酸化剤を供給することで継続的に電力を供給できる^[1-4]。理論的には燃料電池はリチウムイオン電池などの二次電池に比べ、数倍のエネルギー容量を実現できる可能性があり、エネルギー問題や、地球温暖化への対応策の一つとして注目されている。また、多機能化が進む小型電子機器の電源には、小型、軽量、長時間作動が強く求められており、これらの要求を満たす電源としても燃料電池が期待されている。

近年、メタノール燃料電池を小型電子機器の電源として利用する研究が多くなされている^[5-9]。メタノールは水素などの気体燃料と比較して取り扱いや貯蔵が容易であるため、小型化、軽量化に適している。メタノール燃料電池は、アノード（電池の負極）で燃料であるメタノールの直接的酸化、カソード（電池の正極）で酸素の還元を行い、その際に生じた電子およびプロトンがそれぞれ外部回路および高分子電解質中を移動し、対極に達することで出力を与える。すでに、メタノール燃料電池を電源としたノート型 PC の試作も行われており、実用化に最も近い燃料電池といえる^[9]。しかしながら、メタノールの酸化と酸素の還元には白金などの貴金属触媒を必要とすることや、燃料であるメタノールおよび中間生成物であるホルムアルデヒドが有毒であるといった解決すべき問題点が残っている。

グルコースは生物の活動を支える燃料として利用されており、そのエネルギー抽出過程およびグルコースの持つエネルギー量には大変興味深いものがある。人間が体内でグ

ルコースからエネルギーを得る場合、グルコースは解糖系、クエン酸サイクルおよび電子伝達鎖で変換を受ける。



このグルコースの 24 電子酸化反応では、自由エネルギー変化が $\Delta G = -2873 \text{ kJ/mol}$ にも達し、 $\Delta G = -nFE$ の関係から最大 1.24 V の起電力が得られると試算できる^[10-12]。現在最も優れた発電性能を示す水素燃料電池の理論的な起電力が 1.23 V であることを考えると、かなり大きい起電力を有することがわかる^[13-16]。つまり、式 4-1 に示す反応から効率よくエネルギーを得ることができれば、メタノール燃料電池に代わる安全でクリーンな小型電源の構築が可能になる。

式 4-1 で示されるグルコース酸化反応から電気エネルギーを取り出すためには、グルコースの酸化反応と酸素の還元反応を空間的に別の場所で生じ、かつグルコース酸化反応が酵素の還元反応よりもネガティブな電位で生じるような仕組みを構築する必要がある。また、グルコースを水と二酸化炭素まで完全に酸化するためには多くの触媒（酵素）が必要となる。以前、本研究室の桑原は、ポリチオフェン誘導体 (Fig. 4-1) の膜と GOx から成る酵素固定化電極を利用したグルコースの 2 電子酸化反応と、白金触媒を利用した酸素還元反応を高分子電解質膜で仕切った 2 つの槽でそれぞれ起こすことにより、グルコース酸化反応から電気エネルギーを得ることに成功した^[17]。この成果は、酵素と導電性高分子から成る酵素固定化電極を燃料電池に応用した点で非常に興味深い。

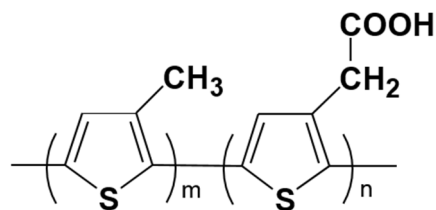


Fig. 4-1 Chemical structure of the thiophene copolymer.

GOxによるグルコースの2電子酸化反応の場合でも、理論的な起電力は約1.18 V ($\Delta G = \text{約} -230 \text{ kJ/mol}$)になる。したがって、十分なエネルギーが得られると期待できる。しかし、桑原のグルコース-酸素燃料電池の起電力は理論的起電力より著しく低い値であり、電池出力は決して高くない。電池の起電力を改善するためには、酸化反応はよりネガティブな電位で、還元反応はよりポジティブな電位で起こるように電池構成を再考する必要がある。

酸素から水への4電子還元反応を触媒する酵素として、ラッカーゼやビリルビンオキシダーゼ (BOx) がある^[18-22]。これらは常温、常圧、中性付近で効率的に酸素を還元することが可能であり、そのような環境下であれば白金触媒をしのぐ性能を有することが明らかにされつつある。そこで本研究では、その高い触媒能に着目し、ポリチオフェン誘導体とBOxから成るバイオカソードについて検討した。これまで、燃料電池のカソードには白金などの貴金属触媒が必要不可欠であった。導電性高分子と酵素から成るハイブリッド材料をアノードのみならずカソードとしても使用し、高い出力を持つ燃料電池を構築できるならば、電池の低価格化に対して非常に有利である。このような観点から、作製したバイオカソードの性能は白金触媒を担持したカソードを比較対象として評価した。

4.2 実験

4.2.1 試薬および装置

BOx (EC 1.3.3.5, *Myrothecium verrucaria* 由来, 28 U/mg) は Sigma Chem. Co. から購入した。3-メチルチオフェン (3MT) はナカライテスク (株) の特級試薬、チオフェン-3-酢酸 (T3A) は東京化成工業 (株) の一級試薬を使用した。蛋白質測定に用いるフェノール試薬はナカライテスク (株) が市販する酸度 1.8 N のものを使用した。*N,N,N',N'*-テトラメチル-1,4-フェニレンジアミン (TMPD)、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)、二酢酸鉛 (II) 三水和物は Aldrich Chemical. Co. から購入し、ヘキサクロロ (IV) 白金酸六水和物は和光純薬工業 (株) か

ら購入した。その他の試薬は特級試薬もしくは分析用試薬を購入し、精製せずにそのまま使用した。

導電性高分子膜の作製および電気化学測定は、北斗電工(株)製のポテンショスタット／ガルバノスタット HA-150G, クーロンアンペアアワーメーター HF-203D およびファンクションジェネレーター HB-105A と接続した三電極セルを使用して行った。白金板および SCE をそれぞれ対向電極および参照電極として使用した。SCE に関しては、電極内部の汚染を防ぐために、飽和 KCl の塩橋を介して三電極セルと接続した。作用電極には第 2 章で作製法を述べた金電極を用いた。

4.2.2 ポリチオフェン誘導体膜の作製

ポリチオフェン誘導体膜は桑原の方法に従い^[17], 3MT と T3A の電解共重合によって金電極表面に作製した。重合溶液にはアセトニトリル 20 ml に 0.45 M 3MT, 0.05 M T3A および 0.10 M 過塩素酸テトラエチルアンモニウムを溶解させたものを用いた。重合に先立ち、重合溶液に 20 分以上窒素ガスを通じることで溶存酸素を除いた。電解共重合は金電極に 2.2 V vs. SCE の電位を通過電荷量が 0.80 C に達するまで印加することによって行った。重合後、未反応モノマーを取り除くため、得られたポリチオフェン誘導体膜を純水で洗浄した。膜の IR スペクトルから、ポリチオフェン誘導体を構成するモノマー単位の比が 3MT:T3A=9:1 であることを確認した。この結果は桑原の報告と一致している。

4.2.3 酵素固定化電極の作製

酵素固定化電極は 0.5 mg/ml の酵素と 24 mg/ml の CMC を含む純水にポリチオフェン誘導体で修飾した電極を室温で 1 時間浸すことによって作製した。こうして得られた酵素固定化電極は純水で洗浄し、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中、4°C で保存した。なお、これ以降は、酵素と用途の違いに注目し、GOx が固定化された電極を GOx アノード、BOx が固定化された電極を BOx カソードと表記した。

4.2.4 酵素固定化量の測定

酵素固定化量の測定は Lowry 法^[23]によって行った。まず、2 wt%炭酸ナトリウムを含む 0.1 N 水酸化ナトリウム水溶液 50 ml と 1 wt%酒石酸カリウムナトリウム・四水和物および 0.5 wt%硫酸銅・五水和物を含む水溶液 1 ml を混合した。次に、この溶液 3 ml と純水 0.2 ml を混合した溶液に酵素固定化電極を浸し、よく攪拌した後、室温で静置した。10 分経過した後、フェノール試薬 0.3 ml を加え、すばやく攪拌した。室温で 30 分間静置した後、750 nm における吸光度を測定した。ブランクには、酵素固定化電極の代わりにポリチオフェン誘導体膜で修飾した電極を使用した。測定で得た吸光度の値と牛血清アルブミンを用いて作成した検量線から酵素固定化量を算出した。

4.2.5 白金黒電極の作製

比較対象として、白金黒 (PtB) カソードを作製した。まず、白金板をアセトン中で 15 分間超音波処理した後、続けて純水中で 15 分間超音波処理し、乾燥させた。次に、10 mg/ml ヘキサクロロ白金 (IV) 酸と 0.5 mg/ml 二酢酸鉛 (II) を含む純水に白金板を浸し、 -1.0 V vs. SCE の電圧を 10 分間印加することで白金板上に PtB を電着させた。PtB は 0.10 M 硫酸水溶液中、50 mV/s の速度で -0.5 から 0.5 V vs. SCE の範囲を 5 周電位掃引することによって活性化させた。こうして得られた PtB カソードは純水で洗浄した後、使用するまで純水中で保存した。

4.2.6 電気化学的測定

アノードおよびカソードの電気化学的特性は、掃引速度 5 mV/s の単掃引ボルタンメトリで評価した。

4. 2. 7 グルコース-酸素燃料電池の作製および性能評価

グルコース燃料電池の構成を Fig. 4-2 に示す。電池は、一つの槽の大きさが直径 20 mm, 深さ 45 mm である二槽式の容器を用いて作製した。まず, GOx アノードを配置したアノード槽と BOx カソードもしくは PtB カソードを配置したカソード槽をプロトンのみ透過可能な Aldrich Chemical Co.製の Nafion 112 (perfluorinated membrane, 0.005 inch thick) で分離した。次に, アノード槽に 0.1 M グルコースと 1.0 mM TMPD を含む溶存酸素を除いた 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を入れ, カソード槽に酸素飽和させた 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を入れた。なお BOx 固定化電極を使用する場合のみ, カソード槽に 1.0 mM ABTS を加えた。

電池性能は, ポテンショスタットを用いて任意の電位 (出力電圧, V_{cell}) を両極間に与えた際の電流 (I_{cell}) を読み取ることによって評価した。電池の出力 (P) は V_{cell} と I_{cell} の積で求めた。

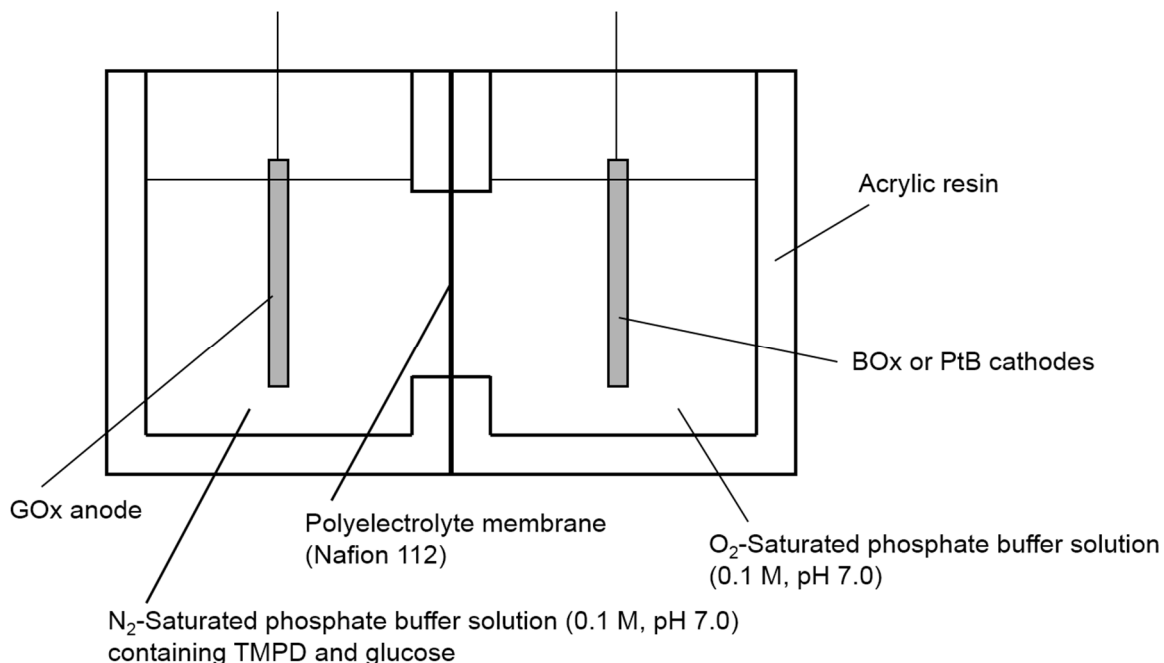
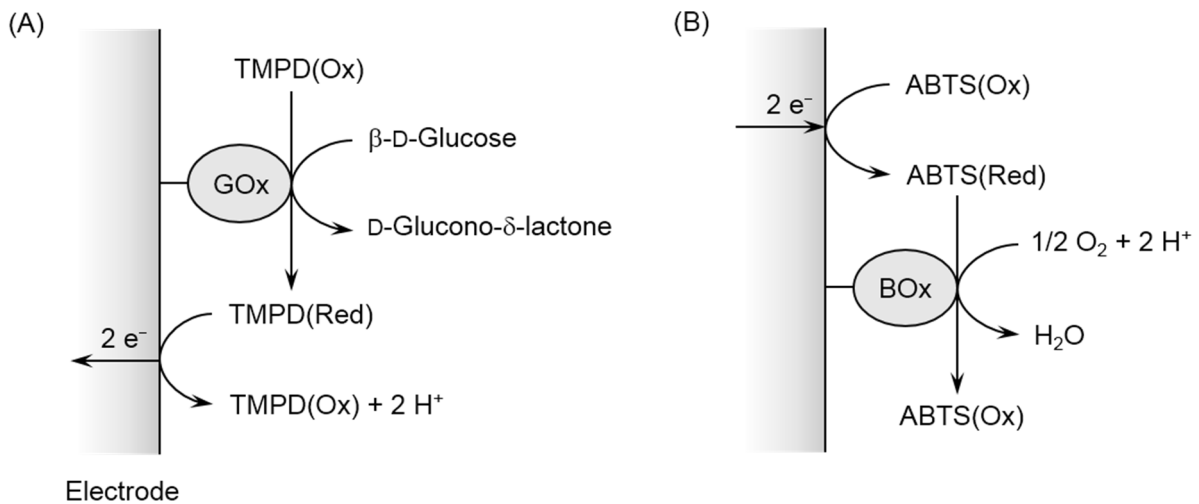


Fig. 4-2 Schematic illustration of the glucose- O_2 fuel cell.

4.3 グルコース-酸素燃料電池の発電原理

電池の起電力 (V_{oc}) はアノード槽とカソード槽で起こる電極反応の電位の差で決まり、外部回路に流すことのできる電流 (I_{cell}) の大きさは電極反応速度で決まる。実際には、起電力は様々な過電圧が生じることによって出力電圧 (V_{cell}) となり、 I_{cell} と V_{cell} の積で燃料電池の出力が決まる。したがって、電池の性能は電極反応および電極材料の選択によってほぼ決まるといっても過言ではない。GOx アノードによるグルコース酸化反応および BOx カソードによる酸素還元反応を Scheme 4-1 に示す。GOx アノードでは、ポリチオフェン誘導体膜上に固定化された GOx が触媒として働き、グルコースを酸化する。そして、TMPD が電子メディエータとして働き、還元状態の GOx から電子をポリチオフェン誘導体膜に伝達する。一方、BOx カソードでは、ABTS が電子メディエータとして働き、ポリチオフェン誘導体膜から電子を膜上に固定化された BOx に伝達する。そして、BOx がその電子と溶液中のプロトンを利用して酸素を水へと還元する。提案するグルコース-酸素燃料電池では、GOx アノードと BOx カソードを外部回路で連結し、GOx アノードで生成した電子を BOx カソードに供給することで発電が可能となる。



Scheme 4-1 Schematic Biocatalytic reactions on the GOx anode (A) and BOx cathode (B).

4.4 結果および考察

4.4.1 バイオカソードの酸素還元特性

Fig. 4-3 に BOx カソードを用いて測定した単掃引ボルタモグラムを示す。BOx カソードは、0.5 V vs. SCE 以下の電位で酸素還元電流を示した。この還元開始電位は ABTS の還元開始電位に近いことから、得られた酸素還元電流は、Scheme 4-1 (B) に示した BOx を触媒とする電極反応に起因すると考えられる。BOx カソードと PtB カソードの酸素還元電流を比較したところ、BOx カソードは、PtB カソードより 0.25 V 高い電位で酸素を還元でき、しかも、0.1 V vs. SCE 以上の電位においてより大きい酸素還元電流を示すことがわかった (Fig. 4-4)。この結果は、BOx カソードが中性付近で従来のカソードより優れた酸素還元活性を有することを明らかにしている。

4.4.2 グルコース-酸素燃料電池の発電性能

GOx アノードを用いたグルコース酸化反応に由来する電流を Fig. 4-5 に示す。酸化電流は -0.1 V vs. SCE 以上の電位で得られた。Fig. 4-3 に示した結果を考慮に入れると、

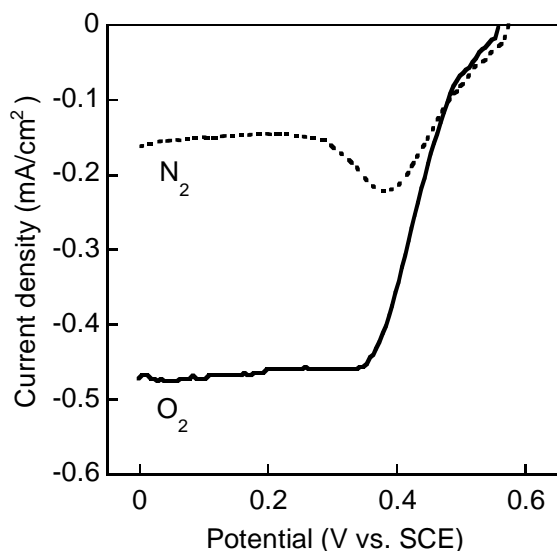


Fig. 4-3 Reduction currents generated by the BOx cathode in O₂-saturated (dotted line) and N₂-saturated (solid line) phosphate buffer solutions (0.1 M, pH 7.0) containing 1.0 mM ABTS.

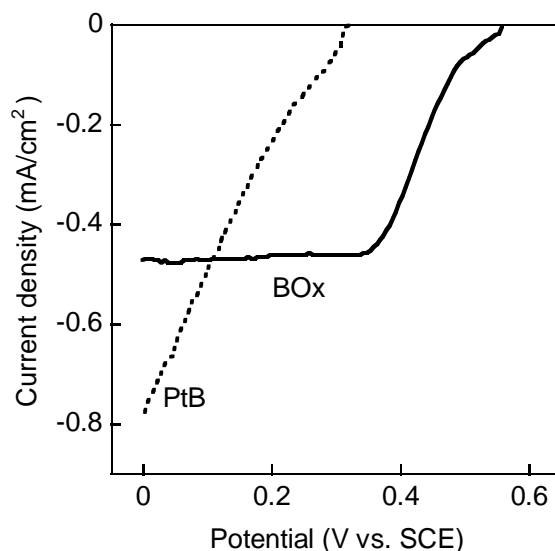


Fig. 4-4 Reduction currents generated by the BOx and PtB cathodes in an O₂-saturated phosphate buffer solution (0.1 M, pH 7.0). In the case of the BOx cathode, the current was measured in the presence of 1.0 mM ABTS.

GOx アノードと BOx カソードから成るグルコース-酸素燃料電池の起電力は 0.6 V になると予想できる。実際に構築したグルコース-酸素燃料電池の I-V 曲線および P-V 曲線を Fig. 4-6 に示す。電池の V_{oc} は 0.61 V であり、予想した値とほぼ同じであった。また、この値は桑原が報告した電池の値^[17]より 0.1 V 以上高い。最大出力密度 (P_{max}) は 0.15 mW/cm^2 であり、GOx と BOx を使用した他のグルコース-酸素燃料電池の出力 (約 $50 \mu\text{W/cm}^2$) と比較してか

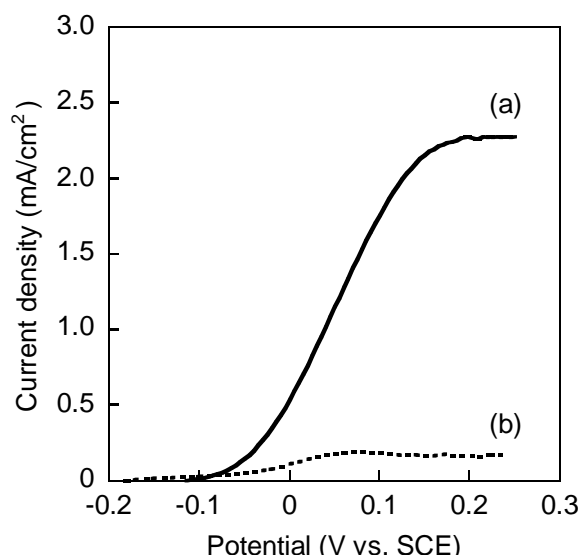


Fig. 4-5 Current observed with the GOx anode in a phosphate buffer solution (0.1 M, pH 7.0) containing 1.0 mM TMPD in the presence (a) and absence (b) of 0.10 M glucose.

なり大きい値だった^[24,25]。ポリチオフェン誘導体膜は高い導電性、大きな表面積および酵素固定に有用なカルボキシル基を有しており、バイオセンサーの高性能化において貢献してきた^[26,27]。今回の結果は、ポリチオフェン誘導体膜がバイオ燃料電池の高出力化においても有望な導電材料であることを示している。

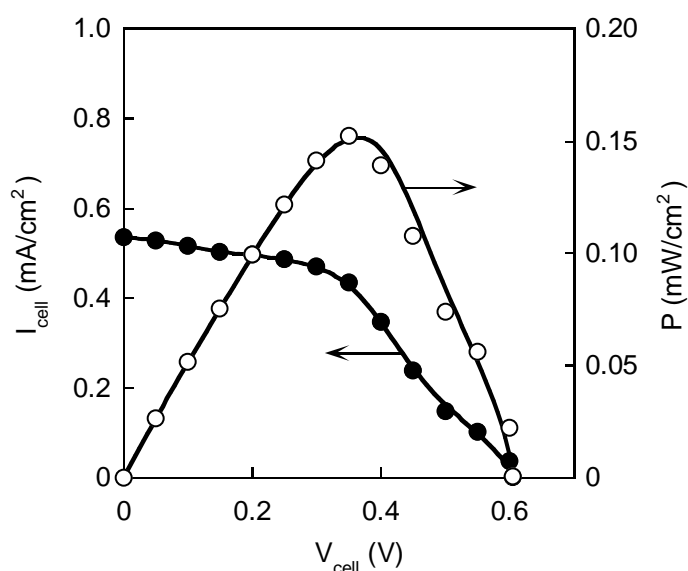


Fig. 4-6 Cell currents and power output of the glucose- O_2 fuel cell consist of the GOx anode and the BOx cathode as functions of cell voltage.

BOx カソードと PtB カソードをそれぞれ使用した際の電池性能を Table 4-1 にまとめた。短絡電流 (I_{sc}) は $V_{cell}=0$ の時の I_{cell} であり、フィルファクター (FF) は以下の式で定義される値である [28,29]。

$$FF = \frac{P_{max}}{V_{oc} \times I_{sc}} \quad (\text{式 4-2})$$

FF は、電池が示す最大出力がその電池が持つ最大性能のうちのどのくらいの割合であるかを示す値であり、エネルギー変換効率の良さを示す重要なパラメータである。

I_{sc} や V_{oc} の値から、カソードの性能の違いが電池性能に影響を及ぼしていることは明らかである。BOx カソードを用いた場合の方がより高い FF を示した。このことは、酵素と導電性高分子から成る酵素固定化電極の使用によってグルコース酸化反応から従来の方法よりも効率よく電気エネルギーが得られることを証明している。しかしながら、Fig. 4-3 と Fig. 4-5 を比較してわかるように、BOx カソードで得られる電流値は GOx アノードで得られるものよりかなり小さい。つまり、GOx アノードと BOx カソードで構成した電池の性能は BOx カソードの性能で制限されている。ポリチオフェン誘導体膜上に固定化された GOx および BOx の量はそれぞれ 4.2 および 1.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ だった。したがって、グルコース-酸素燃料電池の出力をより高めるためには、固定化 BOx 量の増加に向けたさらなる検討が必要である。

Table 4-1

Comparison of the performances of the glucose- O_2 fuel cells equipped with the BOx cathode and the PtB cathode.

Cathode	V_{oc} (V)	I_{sc} (mA/cm^2)	P_{max} (mW/cm^2)	FF
BOx	0.61	0.54	0.150	0.47
PtB	0.41	0.84	0.077	0.22

4.5 まとめ

ポリチオフェン誘導体膜を酵素固定化担体および導電媒体として利用して GOx アノードおよび BOx カソードを作製し、それらを用いてグルコース-酸素燃料電池を構築した。BOx カソードは、PtB カソードより 0.25 V 高い電位で酸素を還元でき、かつ、0.1 V vs. SCE 以上の電位においてより大きい酸素還元電流を示した。構築したグルコース-酸素燃料電池の最大出力は 0.15 mW/cm² だった。この値は、バイオカソードの代わりに PtB カソードを用いた電池や、GOx と BOx を触媒として利用した他のグルコース-酸素燃料電池の値より大きい。このことは、酵素と導電性高分子から成る酵素固定化電極の使用がグルコース酸化反応から効率よく電気エネルギーが得るための有効な手段であることを示している。しかし、ポリチオフェン誘導体膜上の BOx の少なさが電池の出力を制限していることも明らかになった。したがって、さらなる性能の向上には、より酵素固定に適した導電性高分子膜の創出や BOx 固定化法の検討が必要である。

参考文献

- [1] B.C.H. Steele, A. Heinzl, *Nature*, 2001, **414**, 345–352.
- [2] 電気学会・燃料電池発電次世代システム技術調査専門委員会 編, 「燃料電池の技術」, オーム社, 2002.
- [3] 本間琢也, 「図解 燃料電池のすべて」, 株式会社工業調査会, 2003.
- [4] N. Fujiwara, S. Yamazaki, K. Yasuda, *J. Jpn. Petrol. Inst.*, 2011, **54**, 237–247.
- [5] X. Ren, M.S. Wilson, S. Gottesfeld, *J. Electrochem. Soc.*, 1996, **143**, 12–15.
- [6] D.H. Jung, C.H. Lee, C.S. Kim, D.R. Shin, *J. Power Sources*, 1998, **71**, 169–173.
- [7] 山口猛央, *膜*, 2002, **27**, 124–130.
- [8] S.K. Kamarudin, F. Achmada, W.R.W. Daud, *Int. J. Hydrogen. Energy*, 2009, **34**, 6902–6916.

- [9] U.A. Icardi, S. Specchia, G.J.R. Fontana, G. Saracco, V. Specchia, *J. Power Sources*, 2008, **176**, 460–467.
- [10] 谷口功, *化学と工業*, 2005, **58**, 1332–1335.
- [11] 田宮信雄, 村松正美, 八木達彦, 吉田浩 訳, 「ヴォート生化学 (上)」, 東京化学同人, 東京, 1997.
- [12] 社団法人日本化学会 編, 「化学便覧」, 丸善, 東京, 2004.
- [13] R.A. Bullen, T.C. Arnot, J.B. Lakeman, F.C. Walsh, *Biosens. Bioelectron.*, 2006, **21**, 2015–2045.
- [14] 梅田実, *応用物理*, 2006, **75**, 988–994.
- [15] 本間琢也, 高木靖雄, 梅田実, 「燃料電池の仕組みがわかる本」, 技評論社, 東京, 2004.
- [16] S. Tatsumi, M. Fujita, H. Tatsumi, K. Kano, T. Ikeda, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2001, **3**, 1331–1335.
- [17] 桑原敬司, 「酵素を固定化した導電性高分子によるバイオセンシングおよびエネルギー変換」, 博士論文, 2007.
- [18] J. Fei, H.-K. Song, G.T.R. Palmore, *Chem. Mater.* 2007, **19**, 1565–1570.
- [19] G. Gupta, V. Rajendran, P. Atanasov, *Electroanalysis*. 2004, **16**, 1182–1185.
- [20] Y. Kamitaka, S. Tsujimura, K. Kataoka, T. Ikeda, K. Kano, *J. Electroanal. Chem.*, 2007, **601**, 119–124.
- [21] S. Tsujimura, K. Kano, T. Ikeda, *J. Electroanal. Chem.*, 2005, **576**, 113–120.
- [22] 池田篤治, 「バイオ電気化学の実際 —バイオセンサ・バイオ電池の実用展開—」, 株式会社シーエムシー, 2007.
- [23] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, 265–275.
- [24] H.H. Kim, N. Mano, X.C. Zhang, A. Heller, *J. Electrochem. Soc.*, 2003, **150**,

A209–A213.

- [25] A.Habrioux, G. Merle, K.B. Kokoh, C. Innocent, M. Cretin, S. Tingry, *J. Electroanal. Chem.*, 2008, **622**, 97–102.
- [26] T. Kuwahara, K. Oshima, M. Shimomura, S. Miyauchi, *Polymer*, 2005, **46**, 8091–8097.
- [27] C. Liu, T. Kuwahara, R. Yamazaki, M. Shimomura, *Eur. Polym. J.*, 2007, **43**, 3264–3276.
- [28] E. Katz, B. Filanovsky, I. Willner, *New J. Chem.*, 1999, **23**, 481–487.
- [29] C.A. Culter, A.K. Burrell, D.L. Officer, C.O. Too, G.G. Wallace, *Synth. Met.*, 2002, **128**, 35–42.

第 5 章

導電性高分子と酵素を利用したアスコルビン酸誘導体燃料電池の構築

5.1 まえがき

近年、ビタミン C として知られている L-アスコルビン酸 (ASA) を利用した ASA 燃料電池が報告されている^[1-5]。ASA 燃料電池は、アノードで燃料である ASA の酸化、カソードで酸素の還元を行い、出力を与える。その出力は比較的高く、グルコース燃料電池の 10 倍以上の値を示す。ASA はメタノールなどとは異なり、電気化学的に酸化されやすい化合物であり、その電極反応の際には白金などの貴金属触媒を必要としない。そのため、ASA の燃料としての利用は電極構成の自由度を増し、電池の低価格化や小型化に対して非常に有利である。また、ASA およびその電極反応生成物であるデヒドロアスコルビン酸 (DHASA) は極めて安全性の高い化合物である。このように、ASA の利用は安全性の観点からも優れている。

ASA 燃料電池の開発に向けて解決すべき問題の一つに ASA 水溶液の低い安定性がある。水溶液中の ASA は、酸素によって容易に酸化されてしまう^[6-9]。この酸化反応は熱や光、重金属イオンの存在などによって促進されるため、条件によっては、ASA の濃度が数秒のうちに半減してしまうこともある。現在、報告されている ASA 燃料電池は電解液として硫酸水溶液を使用している^[1-3]。これは、ASA が強酸性条件下では比較的安定に存在するためであると考えられる。しかしながら、硫酸水溶液の使用により、安全性が高いという ASA の利点は損なわれてしまう。

ASA の安定性の向上を目的としたアプローチとして、化学的もしくは酵素工学的手法による ASA の修飾がある^[10-13]。山本らは、ASA の最も酸化されやすい部位である 2-位の水酸基をグルコース 1 分子で α 置換した ASA 誘導体を作製し、中性溶液中において安定性が十分に保持されることを報告している^[14]。そのような ASA 誘導体は、安定型 ASA

と呼ばれ、アスコルビン酸 2-グルコシド, 2-O-オクタデシルアスコルビン酸などがある。これらを燃料として用いることができれば, 安定性の問題が解決されるため, 強酸性水溶液を使用する必要はなくなる。しかしながら, このように酸化されやすい部位を保護した ASA 誘導体は電気化学的に不活性であることが予想される。したがって, これらを燃料とするためには, ASA の電気化学的酸化の前に, 保護基を脱離する操作が必要になると考えられる。

ASA 誘導体は, 化粧品や飼料などに含まれており, 生体内に摂取されると加水分解酵素の働きによって保護基がはずされ, ASA として働く^[15,16]。ゆえに, 燃料電池内で生体内と同様の加水分解反応を起こすことができれば, ASA 誘導体を ASA の形で電気化学的に酸化できると考えられる。そこで本研究では, Fig. 5-1 に示すような, 加水分解酵素を固定化した電極を用いて ASA 誘導体からの ASA の生成および生成した ASA の電気化学的酸化を行うというこれまでにない電極反応系を提案した。これによって, ASA の生産および酸化をほぼ同時に同じ場所で行うことができ, 電解液に強酸性水溶液ではなく, 安全性に優れた緩衝液を使用することが可能になる。

実験に用いる ASA 誘導体と加水分解酵素にはアスコルビン酸 2-リン酸エステル (ASA2P, Fig. 5-2) と酸性ホスファターゼ (ACP) をそれぞれ選択した。ASA2P は優れた保存安定性および高い安全性を有する化合物である^[15-17]。例えば, ASA2P 水溶液を

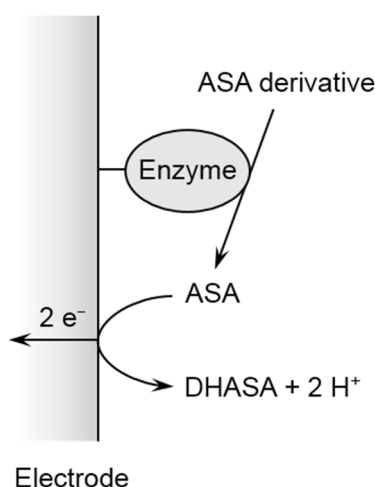


Fig. 5-1 Bioelectrochemical reactions of ASA derivatives on enzyme-immobilized electrodes.

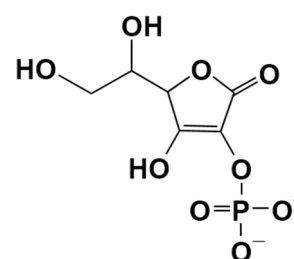


Fig. 5-2 Chemical structure of ASA2P.

40°C以上で 60 日間放置したとしてもほとんど分解しないことが明らかになっている^[18]。また ACP は、至適 pH が 5 付近の脱リン酸化酵素であり^[19-21]、生体内において ASA2P から ASA を生成する^[22]。ゆえに、ACP による ASA2P の加水分解反応は、提案する電極反応系に適していると考えられる。一方、PANI で電極表面を修飾することにより、ASA の電気化学的酸化がよりネガティブな電位で起こることが報告されている^[23]。前章で述べたように、燃料電池のアノード反応はよりネガティブな電位で起こることが望ましい。そこで、ACP 固定化電極の電極材料としては第 3 章で述べた PANI/PAA 複合膜を選択した。本章では、ACP 固定化電極による ASA2P の電気化学的酸化について説明した後、提案する電極反応系における PANI/PAA 複合膜の有用性について検討し、最後に、複合膜を利用して作製した ASA2P 燃料電池の性能について述べる。

5.2 実験

5.2.1 試薬および装置

ASA2P の三ナトリウム塩は和光純薬工業（株）から購入し、メタノールと純水で再結晶を行ってから使用した。ACP (EC 3.1.3.2, wheat germ 由来, 0.5 U/mg) はナカライテスク（株）から入手し、実験に使用するまで冷蔵で保存した。3-メルカプトプロピオン酸 (MPA), ASA, およびヘキサシアノ鉄 (III) 酸カリウム ($K_3[Fe(CN)_6]$) はナカライテスク（株）の特級試薬を使用した。モリブデン (IV) 酸二ナトリウム・三水和物およびイソブタノールは和光純薬工業（株）の特級試薬を購入した。ACP の速度論解析に使用する 4-ニトロフェニルリン酸 (4NPP) は二ナトリウム塩の六水和物を Sigma-Aldrich, Inc.から入手した。電池の作製に使用する Nafion 溶液 (5 wt% in mixture of lower aliphatic alcohol and H_2O , contains 45% water) および Nafion 115 (perfluorinated membrane, 0.005 inch thick) は Aldrich Chemical Co.から購入した。酸素の還元反応を行うカソードには、ElectroChem, Inc.製の白金担持カーボンペーパー (CP/Pt) EC-10-05-7 を用いた。その他の試薬は特級試薬もしくは分析用試薬を購入し、そのま

ま使用した。

電気化学的測定は、ポテンショスタット／ガルバノスタット μ Autolab III (Eco Chemie) と接続した三電極セルを使用して行った。対向電極には白金板を、参照電極には SCE 電極もしくは Ag/AgCl 電極を使用した。SCE 電極を使用する場合には、電極内部の汚染を防ぐため、飽和 KCl の塩橋を介して三電極セルと接続した。作用電極には第 2 章で作製法を述べた金電極を用いた。吸光度の測定には (株) 島津製作所の紫外-可視-近赤外分光光度計 UV-3100PC を使用した。

5.2.2 酸性ホスファターゼ固定化電極の作製

まず、3 章で述べた手順に準じて PANI/PAA 複合膜を金電極表面に作製した。次に、電極を CMC 100 mg および NHS 15 mg を含んだ水溶液 2 ml 中に室温で 20 分間浸漬することにより、複合膜表面のカルボキシル基を NHS 活性エステルに変えた。膜を純水で洗浄した後、電極表面の余分な水分を除去した。さらに、膜表面に 5 mg/ml ACP 水溶液 15 μ l を滴下し、シャーレを用いて ACP 水溶液の揮発を防ぎながら室温で 30 分間静置することにより、ACP のアミノ基と NHS 活性エステルとの縮合反応を行った。このように処理した電極 (PANI/PAA-ACP 電極) を 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 1 ml で洗浄し、続いて純水で洗浄した。この操作によって得られた未固定の ACP を含む緩衝液は回収し、固定化 ACP 量の評価に使用した。固定化 ACP 量は、活性測定によって未固定 ACP の酵素量を測り、固定化操作によって減った ACP の酵素量を求めることで評価した。

また比較のために、PANI/PAA 複合膜を使用しない ACP 固定化電極を作製した。まず、金電極を 10 mM MPA を含むメタノール溶液に浸し、室温で 30 分間静置することで金表面に MPA の自己組織化単分子層を準備した。次に、上述した ACP の固定化法に従って MPA 層のカルボキシル基と ACP のアミノ基との間でアミド結合を形成させ、ACP を金電極上に固定化した。以降、このように作製した ACP 固定化電極を MPA-ACP 電極と表記した。

5.2.3 固定化酸性ホスファターゼの活性測定

固定化 ACP の活性測定は、以下に示す二通りの方法で行った。

・方法 1

黄色の $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ は ASA によって還元され、無色の $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ に変わることを利用して固定化 ACP の活性を求めた。まず、10 mM ASA2P を含む 0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 5.0) 2 ml に ACP 固定化電極を浸漬し、25°C の条件で定めた時間静置することで酵素反応を進行させた。次に、酵素反応後の溶液 1 ml に純水 0.7 ml および 10 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 水溶液 0.3 ml を加えて混合し、この溶液の 420 nm における吸光度を測定した。なお、吸光度測定ブランクには純水を使用した。固定化 ACP の活性は、吸光度の値と検量線から算出した。検量線は、酵素反応後の溶液の代わりに、既知量の ASA を含む緩衝液を用いることで作成した。

・方法 2

高橋の方法^[24]に従って固定化 ACP の活性を測定した。高橋は、酵素反応で生じた遊離リン酸の量を有色化合物であるモリブデンリン酸の形成を利用して測定している。

まず、10 mM ASA2P を含む 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 1.5 ml に ACP 固定化電極を浸漬し、25°C の条件で定めた時間静置することで酵素反応を進行させた。次に、1.5 N H_2SO_4 0.2 ml, 2% モリブデン酸ナトリウム水溶液 0.2 ml およびイソブタノール 0.8 ml を入れた 2 ml エッペンチューブに酵素反応後の溶液 0.2 ml を入れて攪拌し、30 秒間静置した。さらに、分離したイソブタノール層から 0.4 ml 取り、0.5% ASA を含む 0.05% KHSO_4 水溶液 0.4 ml およびエタノール 0.2 ml と混合した。この混合液を 37 °C で 30 分間加温し、水浴で放冷した後、純水をブランクにした上で 700 nm における溶液の吸光度を測定した。固定化 ACP の活性は、吸光度の値と検量線から算出した。検量線は、酵素反応後の溶液の代わりに、濃度既知の NaH_2PO_4 水溶液を用いることで作成した。

比較のために、遊離状態の ACP の活性を評価した。10 mM ASA2P を含む pH 5.0 の 0.1 M 酢酸緩衝液 1.5 ml に 5 mg/ml ACP 水溶液 15 μl を加え、25°C の条件で定めた時間

放置した後、すぐに溶液中のリン酸イオン濃度を測定した。

5.2.4 脱リン酸化反応の速度論解析

ACP による脱リン酸化反応の速度論解析には、基質として 4NPP を使用した。4NPP の脱リン酸化により生成する 4-ニトロフェノール (4NP) は黄色に発色する性質を有している。酵素反応の経過時間と 4NP の生成量の関係を吸光度測定で調べることで脱リン酸化反応の速度を求めた。

4NP の生成量は次のように測定した。まず、4NPP を含む pH 5.0 の 0.1 M 酢酸緩衝液 2 ml に ACP 固定化電極を浸し、酵素反応を開始させた。25°C の条件下で適当な時間放置した後、この反応液 100 μ l を取り出し、1 M 水酸化ナトリウム水溶液 1 ml と混合した。次に、この溶液をプラスチック製の測定セルに移し、405 nm の吸光度を測定した。生成物量の算出はあらかじめ作成した検量線を用いて行った。検量線は反応液の代わりに既知量の 4NP を含む緩衝液を使用して作成した。

5.2.5 電気化学的測定

ASA2P の酸化開始電位は、掃引速度 10 mV/s のサイクリックボルタンメトリによって調査した。ASA2P 酸化電流は、ACP 固定化電極に任意の電圧を印加し、電流値が一定になったときの値を読み取る方法で測定した。測定は、溶存酸素を除いた 10 mM ASA2P を含む 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を用い、25°C で行った。

5.2.6 アスコルビン酸誘導体燃料電池の作製および性能評価

ASA2P 燃料電池の構造は燃料の溶液を入れるアノード槽と空気と接触するカソード部から成る。電池の概略図を Fig. 5-3 に示した。まず、2.5 cm \times 2.5 cm に切り出した CP/Pt の白金担持面に適量の Nafion 溶液を塗布して乾燥した後、3.0 cm \times 3.0 cm に切り出した Nafion 115 を白金担持面に重ね、110°C で 10 分間ホットプレスすることでこ

れらを接合した。CP/Pt と Nafion 膜の接合はアノード側で生じたプロトンのカソード側への拡散を容易にするためである。次に、Nafion 膜と接合した CP/Pt を Nafion 膜側が溶液と接触するようアクリル樹脂製の容器に固定した。また、CP/Pt と外部回路の接続には白金メッシュを使用し、CP/Pt の CP 側に配置した。なお、液漏れおよび Nafion 膜の膨潤を防ぐため、パーツの間にシリコンゴムおよびテフロンパンチングシートを挟み、ワセリンを塗布した。

カソードの性能はアノード槽に 0.10 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を満たした状態で評価した。還元電流の測定には、アノード槽に配置した白金板および Ag/AgCl 電極をそれぞれ対向電極および参照電極として利用した。

出力試験は、アノードとステンレスメッシュの間に任意の電位 (V_{cell}) を与えた際の電流値 (I_{cell}) を測定することによって行った。アノード槽には 10 mM ASA2P を含む 0.10 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を満たした。電池の出力 (P) は V_{cell} と I_{cell} の積で求めた。また、起電力 (V_{oc}) は 0 A における電位差測定によって決定した。溶液はあらかじめ窒素ガスを通じることによって溶存酸素を取り除いてから用いた。

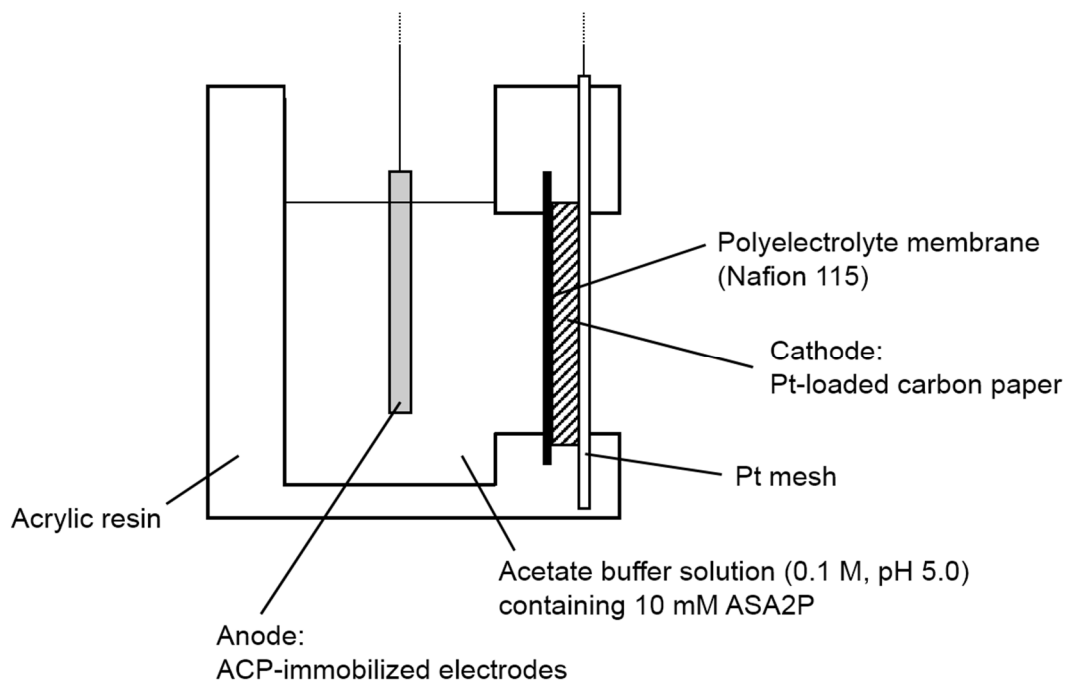


Fig. 5-3 Construction of the ASA2P fuel cell.

5.3 結果および考察

5.3.1 アスコルビン酸誘導体の電気化学的性質

ASAとASA2Pをそれぞれ含む0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 5.0) 中で、未修飾の金電極でサイクリックボルタンメトリを行った結果、ASAが0.1 V vs. Ag/AgCl以上の電位で酸化されるのに対し、ASA2Pは-0.1から0.5 V vs. Ag/AgClの範囲では酸化されないことが明らかになった (Fig. 5-4)。ASA2Pは安定性向上のためにASAの酸化されやすい部位がリン酸基で保護されている。この結果は、リン酸化によって

ASAの酸化に対する安定性が大幅に向上したことを示す一方、ASA2Pを燃料とするためには脱リン酸化が必要であることを示している。

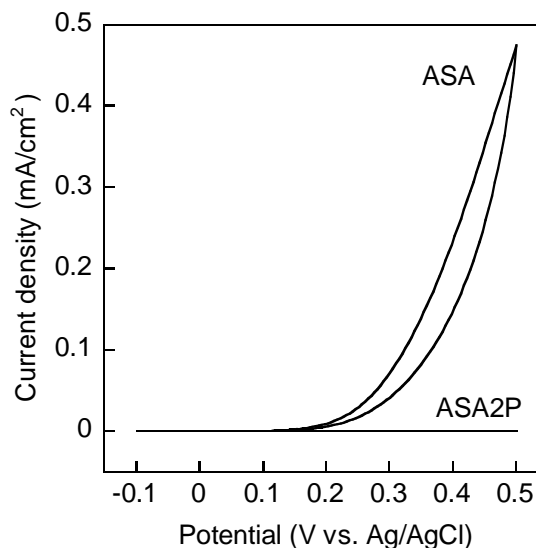


Fig. 5-4 Cyclic voltammograms for 10 mM ASA and ASA2P measured with a gold electrode.

5.3.2 酵素固定化電極によるアスコルビン酸誘導体の電気化学的酸化

PANI/PAA-ACP を作製する前に、考案した電極反応が実際に起こることを確認するために、ACP を固定化した金電極による ASA2P の電気化学的酸化を試みた。金表面への ACP の固定化は、金電極を 10 mM MPA を含むエタノール溶液に室温下で 30 分間浸漬し、金表面に MPA の単分子層を形成させた後、続けて ACP 24 mg および CMC 40 mg を含む水溶液 2 ml に 18 時間浸漬することによって行った。方法 1 で固定化 ACP の活性を測定したところ、1 cm²あたり 15.6 mU であった。この ACP 固定化電極を用いてサイクリックボルタンメトリを行った結果を Fig. 5-5 に示す。ACP 固定化電極は ASA2P 存

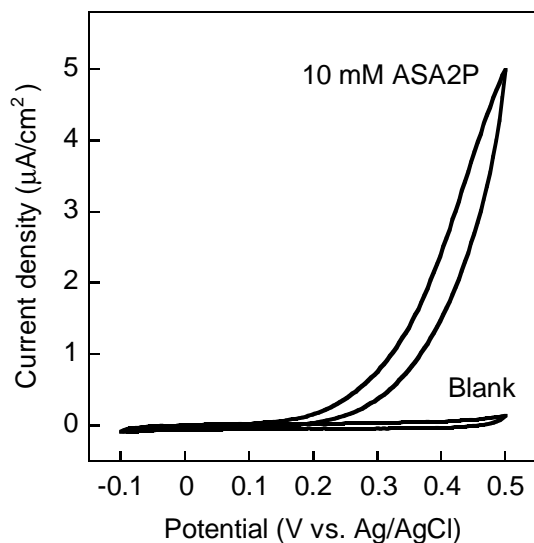


Fig. 5-5 Cyclic voltammograms for 10 mM ASA2P and blank with no ASA2P measured with the ACP-immobilized electrode.

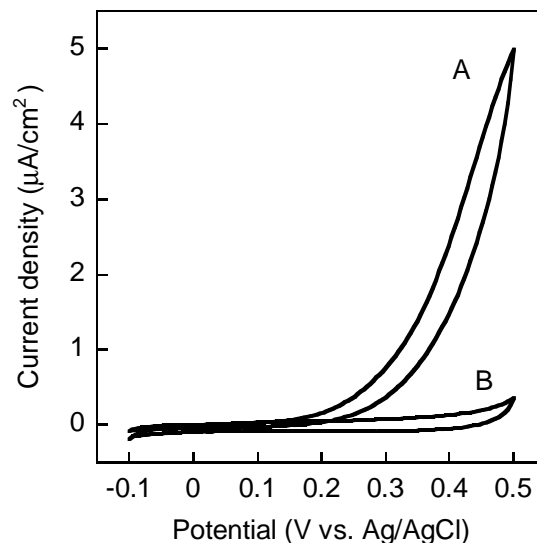


Fig. 5-6 Cyclic voltammograms for 10 mM ASA2P measured with the ACP-immobilized (A) and monolayer-modified (B) electrodes.

在下において 0.1 V vs. Ag/AgCl 以上で酸化電流を示した。この CV の形状は、ASA を酸化した際に得られるものと類似しており、酸化電流が ASA の電気化学的酸化に起因することを明らかである。ACP を固定化していない MPA 単分子層修飾電極では、同様の酸化電流が得られなかったことから (Fig. 5-6)、酸化電流は固定化 ACP と ASA2P の反応によって生成した ASA によるものであるといえる。これらの結果から、Fig. 5-1 に示した電極反応が可能であることが確認された。

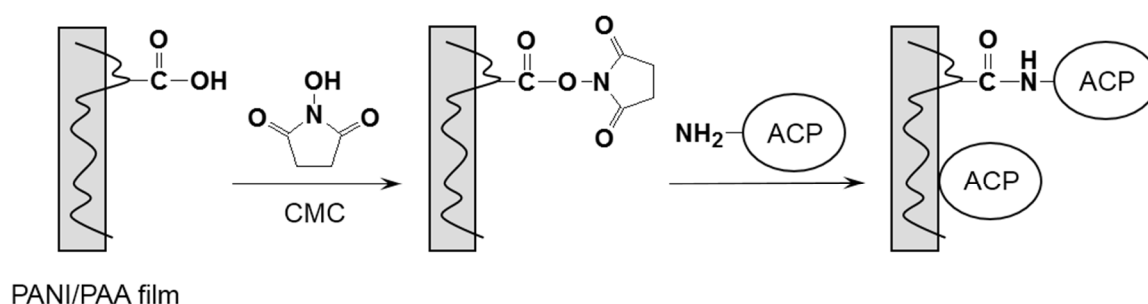
5.3.3 ポリアニリン/ポリアクリル酸複合膜への酵素固定

PANI/PAA 複合膜への ACP の固定化は、複合膜上のカルボキシル基と ACP のアミノ基との間にアミド結合を形成させる方法によって行った。この固定化方法では、膜表面に存在するカルボキシル基の量が ACP の固定化に影響を及ぼすことが予想される。そこで、PAA 含有量の異なる 5 種類の膜 (PAA0~PAA18) を固定化担体として使用し、固定化 ACP 量を調べた。また、本研究で採用した固定化操作では、アミド結合を介して固定化された ACP 分子のみならず、複合膜に吸着している ACP 分子が存在する可能性がある。そこでさらに、カルボキシル基を活性化させずに ACP 水溶液を膜に滴下する方法でも

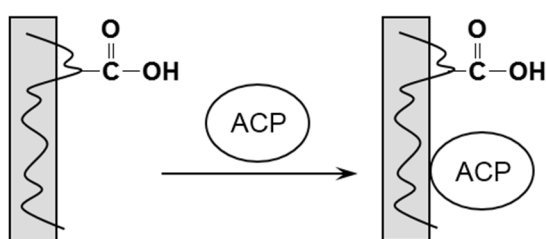
ACP の固定化を行い、膜表面への ACP の吸着について評価した。以降、カルボキシル基の活性化を含む固定化法を共有結合法と呼び、活性化を含まない固定化法を非共有結合法と呼ぶ。

共有結合法と非共有結合法の違いについて Scheme 5-1 に示し、それぞれの方法において固定化された ACP の量と第 3 章で示した複合膜表面に存在するカルボキシル基の量について Table 5-1 にまとめた。今回の固定化操作では、複合膜表面に ACP が吸着することを確認した。吸着によって固定化された ACP の量は、カルボキシル基量の違いによって多少ばらつきがある。このばらつきは膜の表面積の違いに起因すると考えられる。一方、共有結合法による固定化では、固定化 ACP 量がカルボキシル基量の増加に伴って増える傾向にあった。注目すべきは、共有結合法と非共有結合法の固定化量の差とカルボキシル基量が比例関係にある点である (Fig 5-7)。この事実は、PAA のカルボキシル基と ACP のアミノ基との間のアミド結合が狙い通り形成され、そのように固定化された ACP の量は膜表面に存在するカルボキシル基の量に依存することを示している。

Covalent immobilization



Non-covalent immobilization



Scheme 5-1 Immobilization of ACP on PANI/PAA film.

Table 5-1

Amounts of ACP immobilized on PANI/PAA films having various amounts of carboxyl groups on their surfaces in covalent and non-covalent manners.

PANI/PAA film	Amount of carboxyl groups on the surface (nmol/cm ²)	Amount of immobilized ACP (μg/cm ²)	
		Covalent case	Non-covalent case
PAA0	0	60	59
PAA3	11.3	61	50
PAA9	22.9	73	57
PAA14	32.4	77	61
PAA18	36.7	99	77

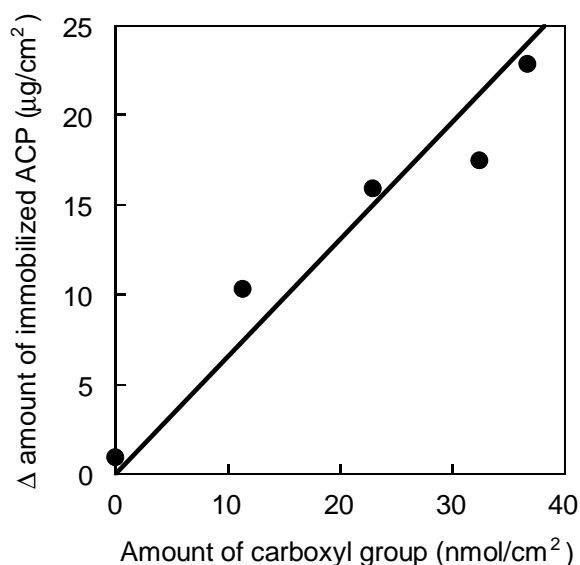


Fig. 5-7 Relation between the amount of carboxyl group on PANI/PAA film and the difference in the amount of immobilized ACP between covalent and non-covalent cases.

5.3.4 酵素反応に及ぼす固定化の影響

PANI/PAA 複合膜への固定化が ACP の活性に及ぼす影響を調べるため、固定化 ACP による 4NPP の脱リン酸化反応を速度論的に解析した。ACP の脱リン酸化反応は Michaelis–Menten 型の酵素反応であり [22,26]、以下の式で表わすことができる。



ここで、E, S, ES および P はそれぞれ酵素 (ACP), 基質 (4NPP), 酵素-基質複合体, 生成物 (4NP) を表しており, さらに k_1 , k_{-1} および k_{cat} は各素反応の速度定数を表している。特に k_{cat} はターンオーバー数と呼ばれ, 酵素 1 分子が触媒する 1 秒間当たりの反応数を表す重要な速度論パラメータである。一方, 式 5-1 で表すことができる反応では, ある基質濃度 [S] における反応速度 V について以下に示す Michaelis-Menten の式が成り立つ。

$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{式 5-2})$$

V_{max} は最大反応速度, K_m は Michaelis 定数であり, 酵素の初濃度を $[E]_0$ とすれば, $V_{max} = k_{cat}[E]_0$, $K_m = (k_{-1} + k_{cat})/k_1$ となる。Lineweaver-Burk プロットは, 式 5-2 から速度の逆数 $1/V$ を縦軸に, 基質濃度の逆数 $1/[S]$ を横軸にプロットしたもので, 縦軸および横軸における切片からそれぞれ V_{max} および K_m を求めることができる。

遊離状態の ACP および固定化 ACP による脱リン酸化反応の Lineweaver-Burk プロットを Fig. 5-8 に示す。PANI/PAA 複合膜への ACP の固定化は共有結合法および非共有結合法で行い, それぞれの固定化酵素について脱リン酸化反応を解析した。なお, 複合膜には表面に 32.4 nmol/cm^2 のカルボキシル基を持った PAA14 を使用した。Lineweaver-Burk プロットから得られた k_{cat} および K_m を Table 5-2 にまとめる。固定化 ACP の k_{cat} は, 固定化方法によらず, 遊離状態の値より小さかった。ゆえに, 固定化が ACP の反応速度に影響することは明らかである。一方, 固定化 ACP の K_m は遊離状態の値より大きかった。 K_m は酵素の基質に対する親和性の尺度であり, 値が小さいほど親和性が高い。つまり, K_m の増大は, 固定化によって ACP が基質との複合体を形成しづらくなったことを意味している。固定化は酵素の機動性を奪ってしまうため, 活性部位と基質が接触する機会は減少する。さらに, 活性部位が固定化担体と接触するように固定

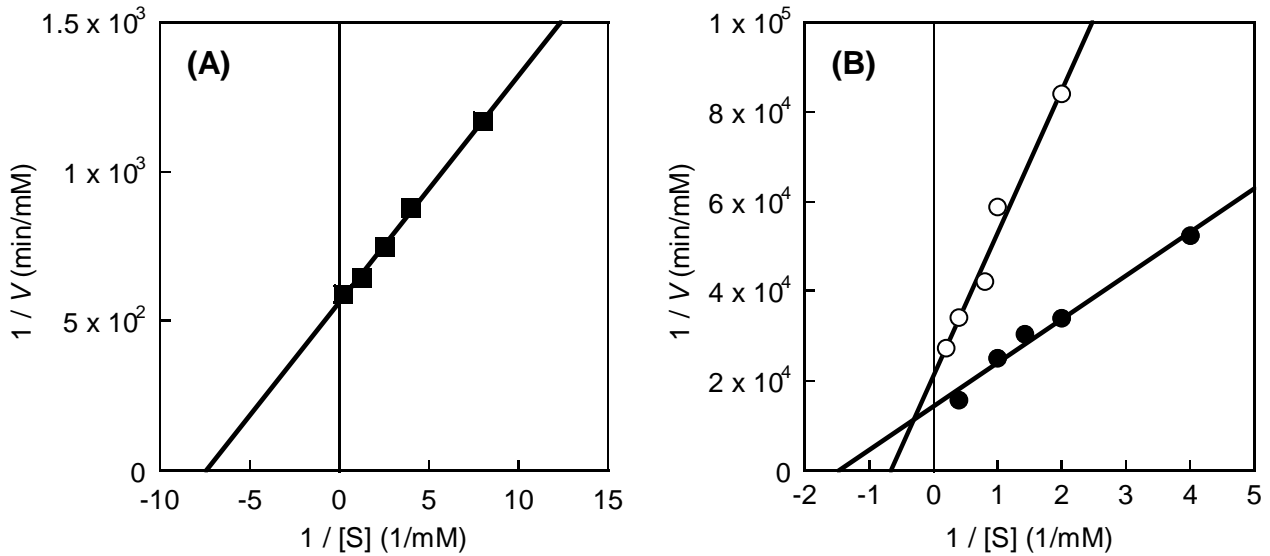


Fig. 5-8 Lineweaver-Burk plots for dephosphorylation of 4NPP by native ACP (A) and ACP immobilized in covalent (●) and non-covalent (○) manners (B).

Table 5-2

Kinetic parameters for native ACP and ACP immobilized on PANI/PAA film in covalent and non-covalent manners.

ACP	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)
Native	3.48	0.13
Immobilized in the covalent manner	0.135	0.68
Immobilized in the non-covalent manner	0.091	1.51

化されてしまうと、活性部位に基質が接触することがより困難になる。

興味深いことに、共有結合法で固定化された ACP の K_m は非共有結合法で固定化されたものの値より小さかった。この K_m の違いには、アミド結合を介して固定化された ACP 分子の有無が関わっていると思われる。アミド結合は ACP 分子と複合膜表面に存在する PAA 鎖の間に形成されており、PAA 鎖に結合した ACP 分子は PAA 鎖の柔軟性に由来する機動性を持つと推測される。そのため、PAA 鎖に結合した ACP 分子は、複合膜表面に吸着した ACP 分子より基質と接触しやすく、複合体を容易に形成できると考えられる。このように速度論解析の結果は、共有結合法による PANI/PAA 複合膜上への酵素固定が酵素活性の保持に有効であることを示した。

Fig. 5-9 は、共有結合法および非共有結合法で固定された ACP の ASA2P に対する活性を複合膜上に存在するカルボキシル基の量に対してそれぞれプロットしたものである。酵素反応は 10 mM ASA2P を含む 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 中、25°C の条件で行った。活性測定は、複合膜中の PANI 部位が酵素反応で生成した ASA を酸化してしまう恐れがあったため、リン酸イオンを定量する方法 2 で行った。共有結合法の場合、活性は複合膜上のカルボキシル基の増加に伴って増え、4 mU/cm² でほぼ一定になった。この活性の増加は、Table 5-1 に示した ACP 量の増加に関連しているはずである。

非共有結合法で固定化された ACP の活性がカルボキシル基量によらず、約 1 mU/cm² であったことを考えると、吸着により固定化された ACP は ASA2P の脱リン酸化反応に大きく関与しないといえる。そこで、共有結合法による固定化の際に、非共有結合法で固定化された ACP と同量の ACP が吸着によって固定化されると仮定し、Table 5-1 および Fig. 5-9 に示す値からアミド結合を介して固定化された ACP のみの比活性を算出した。アミド結合を介して固定化された ACP と複合膜表面に吸着した ACP のそれぞれの比活性を遊離状態の ACP の比活性に対する相対値として Fig. 5-10 に示す。アミド結合を介して固定化された ACP は複合膜上のカルボキシル基の量が 20 nmol/cm² 以下において遊離状態の ACP の約 80% の活性を有していた。一方、PANI/PAA 複合膜上に吸着した ACP の比活性は膜上の PAA 鎖の量によらず、極めて低いことがわかった。これらのことは、速度論解析の結果と矛盾しない。すなわち、アミド結合を介して固定化された、言い換えれば、PAA 鎖に結合した ACP は複合膜に吸着した ACP と比較して、基質分子

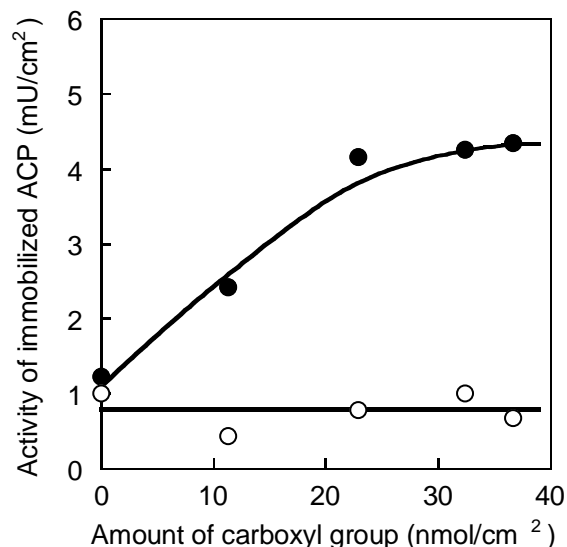


Fig. 5-9 Relation between the amount of carboxyl groups on PANI/PAA film and the activity of ACP immobilized in covalent (●) and non-covalent (○) manners.

と接触しやすいことを示している。したがって、Fig. 5-9 で見られた、膜表面のカルボキシル基量の増加に伴った活性の向上は、柔軟な PAA 鎖に固定化された ACP の量が増えたことが要因といえる。

20 nmol/cm² 以上のカルボキシル基の増加は、アミド結合を介して固定化された ACP の比活性の減少をもたらした。これは PAA 鎖に結合した ACP がより密になり、活性部位への基質の接触が阻害されたためであると考えられる。

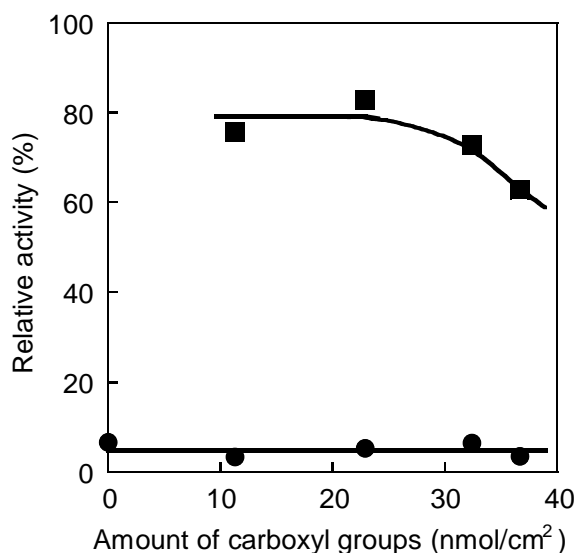


Fig. 5-10 Relation between the amount of carboxyl group on PANI/PAA film and the relative activity of ACP combined with PAA chains (■) and adsorbed (●) on the film.

5.3.5 ポリアニリン/ポリアクリル酸複合膜による電極修飾の影響

PANI/PAA 複合膜を用いた電極修飾の有用性について検討するため、PANI/PAA-ACP 電極と MPA-ACP 電極を用いて比較実験を行った。なお、PANI/PAA-ACP 電極の複合膜には、前節に示した活性測定の結果を踏まえ、PAA18 を使用した。

クロノアンペロメトリにより ASA2P 酸化電流と印加電圧の関係を調べた結果を Fig. 5-11 に示す。MPA-ACP 電極の場合、ASA2P 酸化電流は、約 0.1 V vs. Ag/AgCl 付近から増加し、0.2 V vs. Ag/AgCl 以上でほぼ一定となった。この酸化開始電位は、金電極を用いて ASA を電気化学

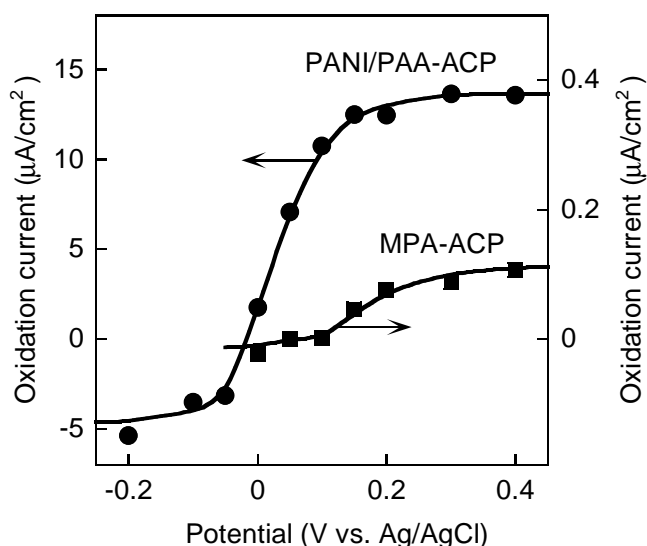


Fig. 5-11 Currents obtained by bioelectrochemical oxidation of ASA2P with the PANI/PAA-ACP and MPA-ACP electrodes.

的に酸化した際の値と一致している。一方, PANI/PAA-ACP 電極では, 約 0 V vs. Ag/AgCl 以上の電位で酸化電流を示した。これは, PANI/PAA 複合膜中の PANI 部位が ASA の酸化に対する触媒として機能しているためと考えられ^[23], 期待した通り, PANI/PAA 複合膜を電極材料とすることで ASA の酸化をよりネガティブな電位で起こすことに成功した。

Table 5-3 に PANI/PAA-ACP 電極および MPA-ACP 電極で得られた 0.2 V vs. Ag/AgCl における ASA2P 酸化電流値, 電極あたりの酵素活性および酵素反応によって生成した ASA の酸化効率を示す。酵素活性の値は, ASA2P 酸化電流を測定した際と同様の条件 (10 mM ASA2P, 0.10 M 酢酸緩衝液, pH 5.0, 25°C) で酵素反応を行い, 生成したリン酸イオンの量を方法 2 で測定したものである。ASA 酸化効率は, 酵素反応によって生成した ASA のうち電気化学的に酸化された ASA の割合のことであり, 以下の式によって求めた。

$$\text{ASA 酸化効率 (\%)} = \frac{\text{ASA2P 酸化電流}}{\text{酵素活性} \times 2 \times F} \times 100 \quad (\text{式 5-3})$$

ファラデー定数: F

酵素電極による ASA 誘導体の電気化学的酸化においては, 固定化酵素の反応によって生成した ASA をいかに効率よく電気化学的に酸化し, 大きい電流を得るかが重要な点であり, ASA 酸化効率はその指標といえる。

Table 5-3 Activities, ASA2P oxidation currents and oxidation efficiencies of the PANI/PAA-ACP and MPA-ACP electrodes.

Electrode	Activity of ACP (mU/cm ²)	Oxidation current (μA/cm ²)	Oxidation efficiency (%)
PANI/PAA-ACP	1.09	12.0	85.7
MPA-ACP	0.04	0.1	20.0

Table 5-3 を見てわかるように、PANI/PAA-ACP 電極は、MPA-ACP 電極と比較して 100 倍以上大きい ASA2P 酸化電流を示した。この電流値の差は、主に酵素活性の違いによるものであるが、PANI/PAA-ACP 電極の ASA 酸化効率が MPA-ACP 電極の 4 倍以上も大きい点にも注目すべきである。固定化 ACP から電極表面への ASA の移動は自然拡散であり、電極表面で酸化されず電極から離れる方向に拡散してしまう ASA も存在する。この高い ASA 酸化効率は、PANI/PAA 複合膜表面の多孔質な網目構造が ASA の効率的な捕集に寄与していることを示している。

5.3.6 アスコルビン酸誘導体燃料電池の発電性能

PANI/PAA-ACP 電極をアノード、大気中の酸素を還元できる CP/Pt をカソードとする ASA2P 燃料電池を構築した。ASA2P の酸化と酸素の還元を組み合わせることにより、ASA2P 燃料電池では Fig. 5-12 のような一連の反応が起こると予想される。アノードでは、ACP の作用により生成した ASA が電極で酸化されて DHASA、プロトンおよび電子を生じる。生成したプロトンは Nafion 膜を通過してカソード側に移動し、Pt の触媒作用により酸素と反応して水になる。この時、外部回路を電子が流れて電流が取り出せる。この一連の反応については、反応の標準酸化還元電位とともに、式 5-4 から式 5-7 に示した。ただし、式 5-4 は電気化学反応ではないため、電池反応そのものには関与しない。

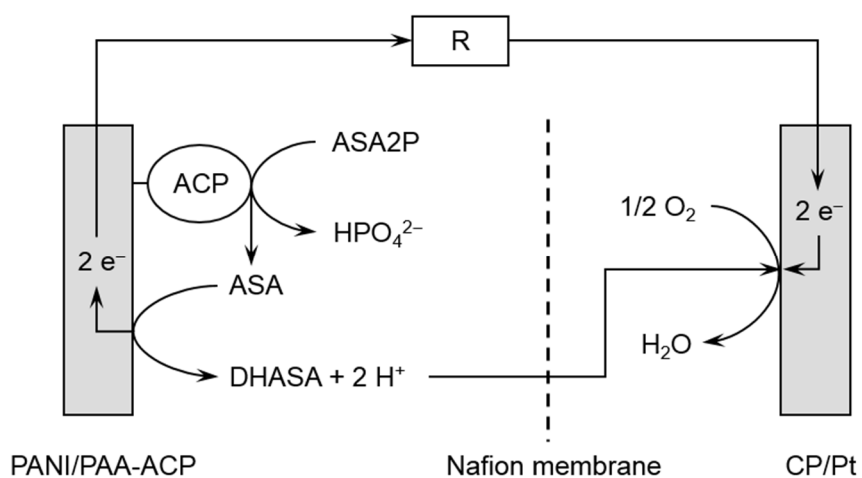
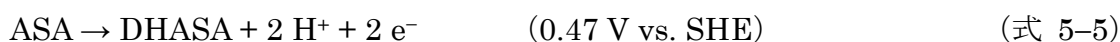
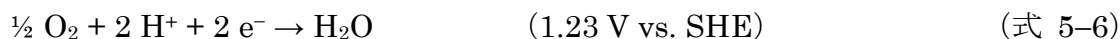


Fig. 5-12 Bioelectrochemical reaction of the ASA2P fuel cell.

Anode



Cathode



Total



全反応の式を踏まえると ASA 燃料電池と同様の発電機構を持つことがわかる^[2,5]。したがって、ASA2P 燃料電池の理論的な起電力は、ASAFC と同じ 0.76 V となる。Fig. 5-13 から CP/Pt による酸素還元が 0.7 V vs. Ag/AgCl 以下の電位で起こることがわかる。PANI/PAA-ACP 電極による ASA2P の電気化学的酸化が 0 V vs. Ag/AgCl 以上で起こることから、この ASA2P 燃料電池の V_{oc} は、理論的な起電力に近い 0.7 V になると予測される。

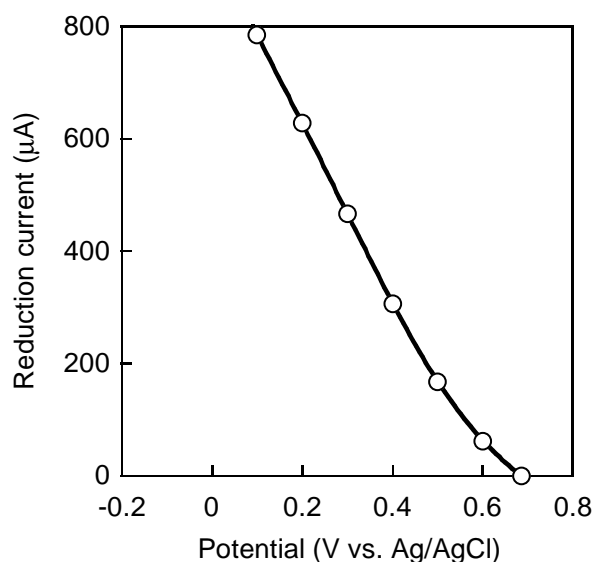


Fig. 5-13 Current obtained by electrochemical reduction of O_2 with CP/Pt.

Fig. 5-14 に出力試験によって得られた I-V 曲線および P-V 曲線を示す。ASA2P 燃料電池の V_{oc} は、0.70 V であり、予測した値と一致した。また、 I_{sc} は、 $16.4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ であった。この値は、Fig. 5-11 からわかるように、PANI/PAA-ACP 電極により得られる ASA2P 酸化電流の値 ($15 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) に近い。したがって、この ASA2P 燃料電池の性能はアノード反応の速度に制限されているといえる。ASA2P 燃料電池の最大出力 P_{max} は P-V 曲線から $6.0 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ と見積もった。この結果は、ASA2P を燃料として利用した発電が可能

であることを証明している。

PANI/PAA-ACP 電極の代わりに MPA-ACP 電極を使用した ASA2P 燃料電池を作製し、出力試験を行うことで、アノードの違いが電池の性能に及ぼす影響を調べた (Table 5-4)。

PANI/PAA-ACP 電極を用いて得られた P_{\max} は MPA-ACP 電極を用いて得られる値の 70 倍以上であった。また、FF の値から、PANI/PAA-ACP 電極

を用いた方が発電効率に優れることがわかった。これらのことから、PANI/PAA 複合膜の使用が ASA2P からの電気エネルギーの獲得に重要であるといえる。

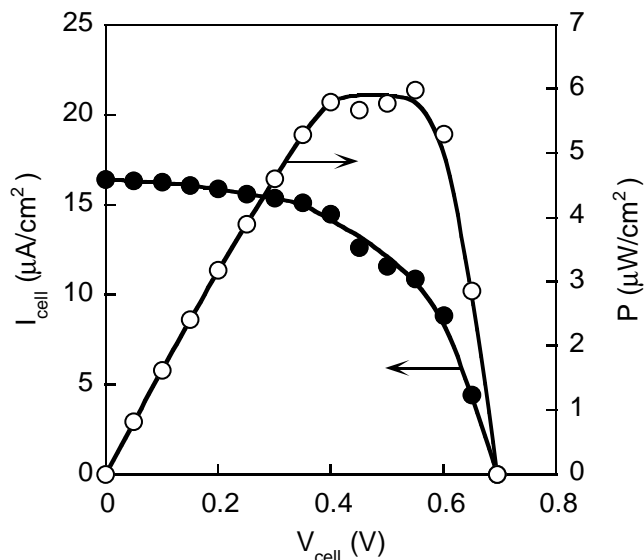


Fig. 5-14 Cell currents and power outputs of the ASA2P fuel cell as functions of cell voltage.

Table 5-4 Comparison of the performance of the ASA2P fuel cells equipped with the PANI/PAA-ACP electrode and the MPA-ACP electrode.

Electrode	V_{oc} (V)	I_{sc} ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	P_{\max} ($\mu\text{W}/\text{cm}^2$)	FF
PANI/PAA-ACP	0.70	16.4	6.00	0.52
MPA-ACP	0.57	1.0	0.08	0.15

PANI/PAA-ACP 電極を用いて作製した ASA2P 燃料電池により ASA2P から電気エネルギーを取り出せることを証明した。しかし、その出力は第 4 章で述べたグルコースバイオ燃料電池の 1/25 であった。ASA2P 燃料電池の性能はアノード反応の速度、すなわち、PANI/PAA-ACP 電極による ASA2P の酸化速度によって制限されている。一般的に、電極反応速度を改善する方法としては、燃料供給量の増加や作動温度の上昇などがあげられる^[27]。そこで、ASA2P の電気化学的酸化に及ぼす ASA2P 濃度と測定温度の影響について調査した。Fig. 5-15 に示すように、ASA2P 濃度の上昇に伴い、酸化電流は増加したが、2 mg/ml 以上では徐々に増加が緩やかになる傾向があった。そのため、燃料供給

量の増加による電流の上昇はあまり期待できないといえる。一方、温度上昇に伴って ASA2P 酸化電流は増加し、45°C で 35 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ に達した (Fig. 5-16)。しかし、45°C 以上の温度上昇では、ASA2P 酸化電流は逆に減少した。これは ACP の失活が要因であると考えられる。ゆえに、作動温度の上昇による高出力化は、ACP の失活を招く危険性がある。

酵素固定化電極による ASA 誘導体の電気化学的酸化は、固定化酵素による ASA の生成

と生成した ASA の電気化学的酸化に大きく分けられる。複合膜による ASA の電気化学的酸化について調べた結果、PAA18 は ASA2P 酸化電流よりはるかに大きい酸化電流を示した (Fig. 5-17)。ゆえに、固定化 ACP の量をさらに増やし、ASA の生成速度を高めることができれば、ASA2P 燃料電池の高出力化は可能である。しかしながら、Fig. 5-10

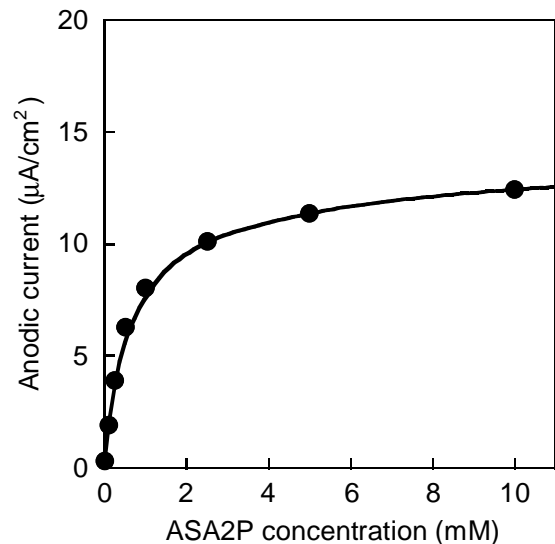


Fig. 5-15 Effect of ASA2P concentration on the anodic current measured with the PANI/PAA-ACP electrode at 0.2 V vs. Ag/AgCl.

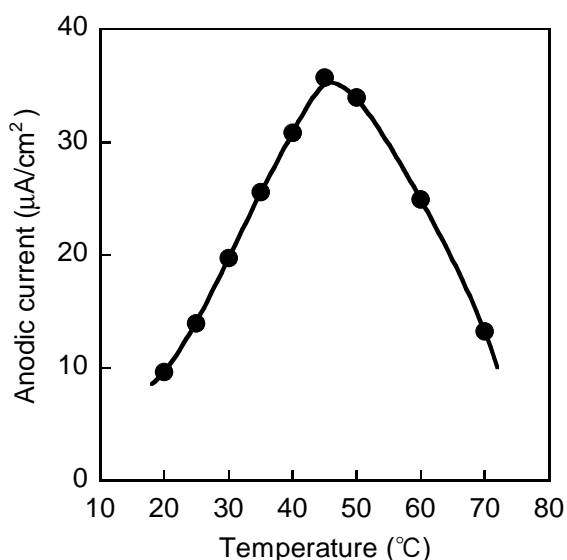


Fig. 5-16 Effect of temperature on the anodic current measured with the PANI/PAA-ACP electrode at 0.2 V vs. Ag/AgCl.

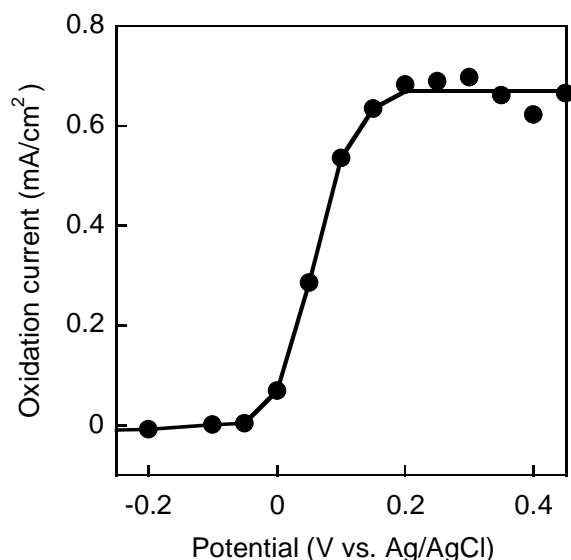


Fig. 5-17 Currents obtained by electrochemical oxidation of ASA with PAA18.

に示すように、これ以上の固定化 ACP 量の増加は、活性の低下ももたらすため、効果的な方法とはいえない。ASA の生成速度を高める他の方法としては、より ASA を生成しやすい、加水分解酵素と ASA 誘導体との組み合わせの探索があげられる。

燃料電池の出力向上には起電力の上昇も有効である。もし ASA の電気化学的酸化がよりネガティブな電位で起これば、起電力はさらに上昇するはずである。酸化還元のプロトンの脱着が関わる電気活性種の酸化還元電位は pH の影響を受けることが知られている^[28]。これは、プロトンが多く存在する溶液中では、プロトン放出のために大きなエネルギーが必要ということである。ゆえに、より高い pH の緩衝液を使用すれば、ASA の電気化学的酸化はよりネガティブな電位で起こると思われる。しかし、緩衝液の pH の上昇は、酸素還元を開始電位の低下ももたらすため、起電力の上昇にはつながらない。そこで、溶液の pH を変えずに ASA の酸化が起こるアノード近傍の pH のみを上昇させる方法が考えられる。実際に、アミノエタンチオールを用いた自己組織化単分子層の形成により金電極表面にアミノ基を導入し、サイクリックボルタンメトリにより ASA の電気化学的酸化に及ぼすアミノ基導入の影響を調べた結果、ASA の酸化は、未修飾の金電極を用いた場合より 0.08 V 低い電位で起こった。この ASA の酸化開始電位の低下は、電極近傍の pH がアミノ基によって緩衝液の pH より高くなったためであると考えられる。したがって、PANI/PAA 複合膜表面へのアミノ基のような塩基性官能基の導入も、ASA 誘導体燃料電池の出力を向上させる一つの手法であるといえる。

5.4 まとめ

ACP 固定化電極を用いて ASA2P からの ASA の生成および生成した ASA の電気化学的酸化を行うという、これまでにない電極反応系を構築した。そして、PANI/PAA-ACP 電極をアノード、CP/Pt をカソードとする ASA2P 燃料電池を作製し、ASA2P から電気エネルギーが得られることを証明した。

MPA-ACP 電極を用いた比較実験の結果、PANI/PAA 複合膜の使用は ASA2P からの

電気エネルギーの獲得に極めて有効であることがわかった。PANI/PAA 複合膜の効果は次の3点で説明できる。一つ目は、複合膜中の PANI 部位が ASA の電気化学的酸化に対する触媒として機能する点。二つ目は、膜表面に存在する PAA 鎖が固定化 ACP 量の増加およびその活性の保持に寄与し、結果として ASA 生成速度の向上をもたらす点、そして三つ目は、複合膜表面の多孔質構造が酵素反応で生成した ASA を効率的に捕集できる点である。これらのことは、PANI/PAA 複合膜が ASA 誘導体燃料電池に適した導電材料であることを意味している。

ASA 誘導体燃料電池の性能について検討した結果、性能のさらなる向上には、より ASA を生成しやすい、加水分解酵素と ASA 誘導体との組み合わせの探索や PANI/PAA 複合膜表面への塩基性官能基の導入などが効果的であることがわかった。

参考文献

- [1] N. Fujiwara, S. Yamazaki, Z. Siroma, T. Ioroi, K. Yasuda, *Electrochem. Commun.*, 2006, **8**, 720–724.
- [2] N. Fujiwara, S. Yamazaki, Z. Siroma, T. Ioroi, K. Yasuda, *J. Power Sources*, 2007, **167**, 32–38.
- [3] S.K. Mondal, R.K. Roman, A.K. Shukla, N. Munichandraiah, *J. Power Sources*, 2005, **145**, 16–20.
- [4] J. Wu, Z. Xiao, Y. Ying, P.C.H. Chan, *J. Zhejiang Univ. Sci. A*, 2008, **9**, 955–960.
- [5] 池田篤治, 「バイオ電気化学の実際 —バイオセンサ・バイオ電池の実用展開—」, 株式会社シーエムシー, 2007.
- [6] R.W. Peterson, J.H. Walton, *J. Chem. Soc.*, 1943, **65**, 1212–1217.
- [7] A. Weissberger, E. Luvallb, D.S. Thomas Jr, *J. Am. Chem. Soc.*, 1943, **65**, 1934–1939.

- [8] 羽田野昭, 加藤好夫, *ビタミン*, 1969, **40**, 416–419.
- [9] 石井謙二, 桜井英敏, *栄養学雑誌*, 1990, **48**, 149–156.
- [10] H. Nomura, T. Ishiguro, S. Morimoto, *Chem. Pharm. Bull.*, 1969, **17**, 387–393.
- [11] Y.M. Kim, M.J. Yeon, N.S. Choi, Y.H. Chang, M.Y. Jung, J.J. Song, J.S. Kim, *Microbiol. Res.*, 2010, **165**, 384–391.
- [12] 山本格, *化学と生物*, **29**, 726–733.
- [13] A. Maruyama, S. Koizumi, T. Fujio, *Agric. Biol. Chem.*, 1990, **54**, 2309–2313.
- [14] 山本格, *化学*, 1991, **46**, 248–253.
- [15] 渡辺剛幸, 細川英毅, 元木喜隆, 示野貞夫, *水産増殖*, 1996, **44**, 369–373.
- [16] 伊藤忍, 小方英二, *化学と工業*, 1999, **52**, 694–698.
- [17] K. Furumoto, E. Inoue, N. Nagao, E. Hiyama, N. Miwa. *Life Sci.*, 1998, **63**, 935–948.
- [18] R. Austria, A. Semenzato, A. Bettero, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1997, **15**, 795–801.
- [19] P. Kittakoop, S. Piyatiratitivorakult, P. Menasveta, *Comp. Biochem. Physiol.*, 1996, **113B**, 737–743.
- [20] Z.H.M. Verjee, *European J. Biochem.*, 1969, **9**, 439–444.
- [21] B.K. Joyce, S. Grisolia, *J. Biol. Chem.*, 1960, **235**, 2278–2281.
- [22] 美間博之, 野村容朗, 今井祥雄, 高島弘道, *ビタミン*, 1970, **41**, 387–398.
- [23] J. Yano, H. Hirayama, Y. Harima, A. Kitani, *J. Electrochem. Soc.*, 2010, **157**, B506–B511.
- [24] 高橋泰常, *生化学*, 1955, **26**, 74–82.
- [25] B.K. Joyce, S. Grisolia, *J. Biol. Chem.*, 1960, **235**, 2278–2281.
- [26] H. Takeda, H. Tanaka, K. Nomura, *Chem. Lett.*, 2010, **39**, 1102–1103.
- [27] D.H. Jung, C.H. Lee, C.S. Kim, D.R. Shin, *J. Power Sources*, 1998, **71**, 169–173.

[28] 藤嶋昭, 相澤益男, 井上徹, 「電気化学測定法(上)」, 技報堂出版株式会社, 1984.

第 6 章

導電性高分子を酸素還元触媒として利用する

グルコースバイオセンシング

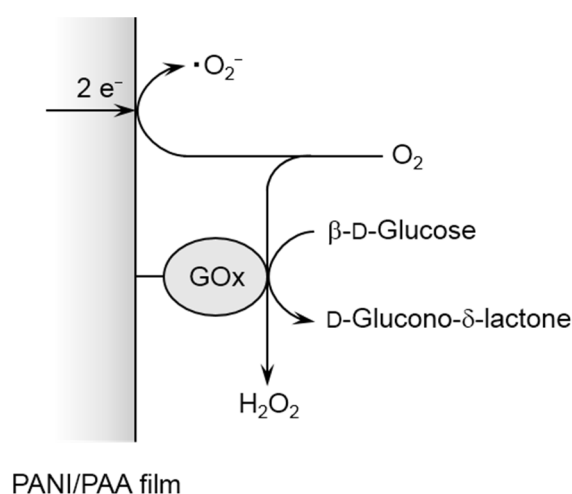
6.1 まえがき

センシング技術は、医学的診断や食品管理、環境モニタリングなどの幅広い用途が期待され、半世紀近く研究されている^[1-4]。特に近年は、糖尿病患者の急増に伴い、操作性とコストを重視したグルコースセンサーの開発が盛んに行なわれている^[5]。第 2 章および第 3 章では、GOx 固定化電極と電子メディエータを使用するグルコースセンシング法について述べた。このセンシング法を利用したグルコースセンサーはすでに実用化されている^[5]。しかし、電子伝達メディエータの使用は反応系や取扱手順を複雑にするため、より簡便なセンシング法が検討されている。

メディエータを使用しないグルコースセンシング法として、GOx がグルコースを酸化する際に生じる過酸化水素を電極で酸化し、その酸化電流の値からグルコース濃度を求める方法がある^[6-9]。しかし、過酸化水素の酸化に由来する電流を得るためには、SCE 基準で 0.8 V 程度の比較的高い電位を電極に印加する必要があるため、実サンプルを測る際に予期しない酸化反応が起こるといった問題がある。例えば、血液中にグルコースと共に存在する ASA やアセトアミノフェンといった電気活性種は、容易に電極上で酸化するため、しばしば電流応答に正の誤差を与える。

また、GOx によるグルコース酸化反応に伴った溶存酸素濃度の減少を酸素還元電流の変化で読み取ることでグルコース濃度を求める方法もある^[10-12]。電気化学的酸素還元は低い電位で起こるので、電気活性種の影響を受けにくい。しかしながら、電気化学的な酸素の還元には、Pt, Au, Ir などの貴金属触媒が必要であり、この手法はコストの問題を抱えている。

本研究ではそれらの問題を踏まえ、安価で作製が容易な PANI/PAA 複合膜を GOx 固定化担体および導電媒体としてのみならず、酸素還元触媒としても利用する電流検知型グルコースセンシングを提案した (Scheme 6-1)。複合膜の構成要素である PANI には、酸素還元に対して優れた触媒活性があることが報告されている^[13-16]。そこでまず、PANI/PAA 複合膜の酸素還元能について調査し、その後、提案するグルコースセンシングの可能性について検証した。



Scheme 6-1 Amperometric glucose sensing with GOx-immobilized electrodes by the mechanism proposed in the present study.

6.2 実験

6.2.1 酵素固定化電極の作製

まず、第 3 章で述べた手順に準じて PAA18 を金電極表面に作製した。次に、電極を CMC 100 mg と NHS 15 mg を含む 2 ml の水溶液に室温で 20 分間浸すことによって膜表面のカルボキシル基を NHS 活性エステルに変えた。さらに、電極を純水で洗浄した後、10 mg GOx を含む純水 2 ml に室温で 30 分間浸すことによって GOx のアミノ基と NHS 活性エステルの間にはアミド結合を形成させた。このように作製した PANI/PAA-GOx 電極は、純水で洗浄した後、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で保存した。

6.2.2 電気化学的測定

測定はポテンショスタット/ガルバナスタット μ Autolab III (Eco Chemie) と接続した三電極セルを使用して行った。対向電極には白金板を, 参照電極には SCE を使用した。

PANI/PAA 複合膜および PANI/PAA-GOx 電極の電気化学的特性は, 50 mV/s の速度で掃引するサイクリックボルタンメトリにより解析した。測定は, 窒素もしくは酸素で飽和させた 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中, 25°C の条件で行った。

PANI/PAA 複合膜の酸素に対する応答は, 大気圧下, 25°C の条件における電流測定で評価した。PANI/PAA 複合膜を窒素飽和させた 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 20 ml に浸し, -0.3 V vs. SCE の電位を印加した。バックグラウンド電流が安定した後, 酸素飽和させた 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を加え, 電流が一定となったときの値を酸素に対する電流応答として読み取った。酸素飽和の状態は, 外部から酸素ガスを純水中に送り込み続けることで用意した。飽和状態の酸素濃度は, Pyroscience 製の FireSting 酸素モニターを用いて, 34 mg/l でほぼ一定であることを確認した。なお, 測定中は, PANI/PAA 複合膜への酸素の輸送を容易にするため, マグネティックスターラーを用いて溶液を 400 rpm の速度で攪拌し続けた。

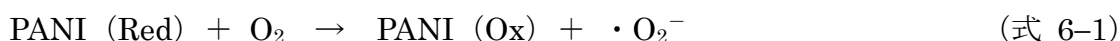
6.2.3 グルコースセンシング

大気圧下, 25°C の条件で PANI/PAA-GOx 電極を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 20 ml に浸し, -0.3 V vs. SCE の電位を印加した。バックグラウンド電流が安定した後, 0.1 M グルコース水溶液を加え, 電流が一定となったときの値をグルコースに対する電流応答として読み取った。なお, 測定中は, PANI/PAA-GOx 電極へのグルコースの輸送を容易にするため, マグネティックスターラーを用いて溶液を 400 rpm の速度で攪拌し続けた。

6.3 結果および考察

6.3.1 ポリアニリン/ポリアクリル酸複合膜の酸素還元特性

本研究で提案するグルコースセンシングは、酵素反応に伴う溶存酸素濃度の減少を電流応答として読み取る方法である。従って、以下の式に示す PANI による酸素還元反応^[16]は溶存酸素濃度を電流応答に変換する重要な役割を担っている。



式を見てわかるように、酸素還元反応には、酸化還元可能な PANI が必要である。PANI の酸化還元反応は基本的に強酸性条件下で起こり、酵素反応が起こる中性条件下では起こりにくい。実際、中性条件下では、PANI はほとんど酸素還元活性を示さないことが報告されている^[16]。しかし、Fig. 6-1 に示すように、PANI/PAA 複合膜は中性条件下において 0 V vs. SCE 以下の電位で酸素還元電流を示した。これは、PANI/PAA 複合膜中の PAA のカルボキシル基が PANI 部位の窒素原子のプロトン化をもたらすためであると考えられる。この結果に基づいて、-0.3 V vs. SCE における電流測定により溶存酸素濃度の変化に対する PANI/PAA 複合膜の電流応答を調べた。測定溶液に酸素飽和水溶液を 50 秒間隔で滴下した際の電流応答を Fig. 6-2 (A) に示した。還元電流は酸素飽和水溶液の滴下に応じて素早く増加

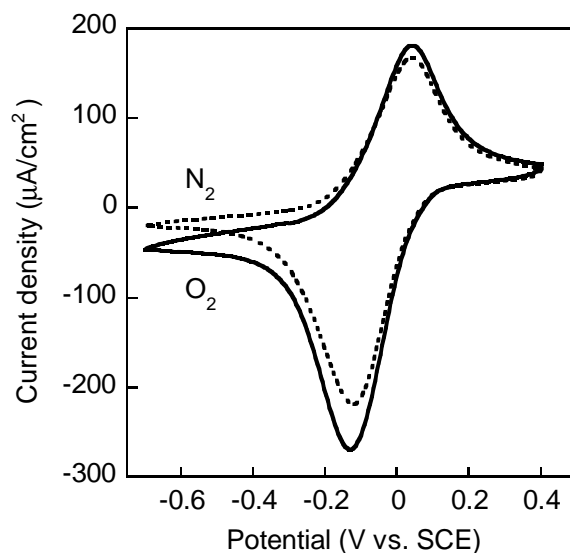


Fig. 6-1 Cyclic voltammograms measured with the PANI/PAA composite film in N₂-saturated (dotted line) and O₂-saturated (solid line) phosphate buffer solutions of pH 7.0.

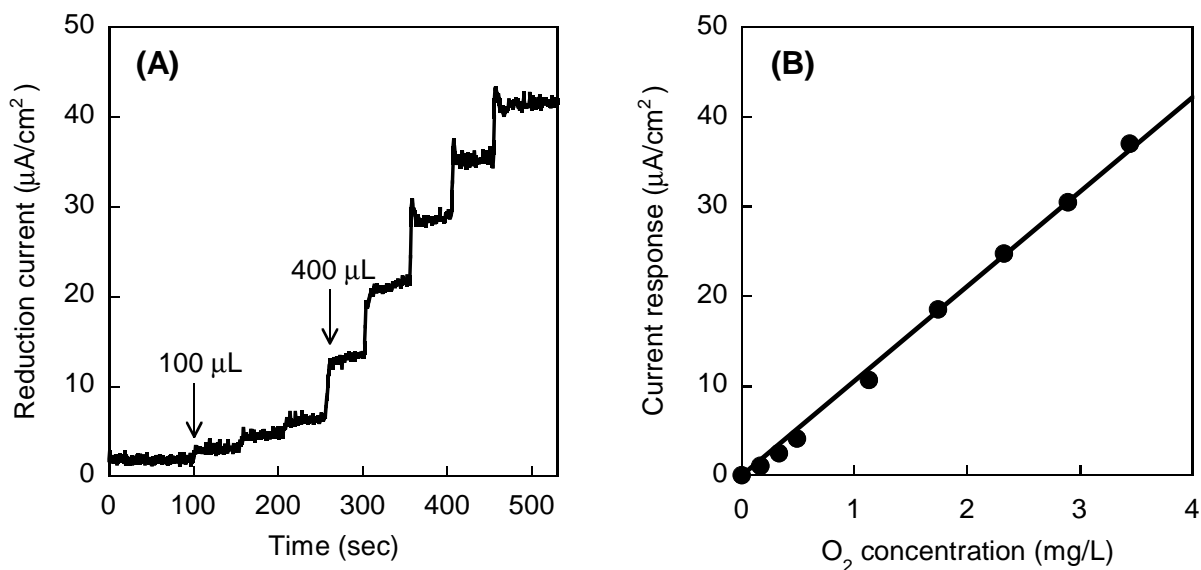


Fig. 6-2 Current response of the PANI/PAA composite film to successive addition of an O_2 -saturated phosphate buffer solution of pH 7.0 into the N_2 -saturated solution (A) and plots of the current response against O_2 concentration (B).

し、20 秒以内ではほぼ一定になった。この電流応答と酸素濃度の関係を Fig. 6-2 (B) にまとめたところ、電流応答は溶液中の酸素濃度の上昇に伴い、直線的に増加することがわかった。この結果は、PANI/PAA 複合膜が、酸素還元に対する電極触媒として、溶存酸素濃度の変化の電気化学的検出に応用できることを意味している。

6. 3. 2 グルコースセンシング

PANI/PAA-GOx 電極の酸素還元特性をサイクリックボルタンメトリによって調査した。結果を Fig. 6-3 に示す。PANI/PAA-GOx 電極も PANI/PAA 複合膜と同様に、0 V vs. SCE 以下で酸素還元電流を示した。また、この酸素還元電流はグルコース存在下で減少した。これは、固定化 GOx

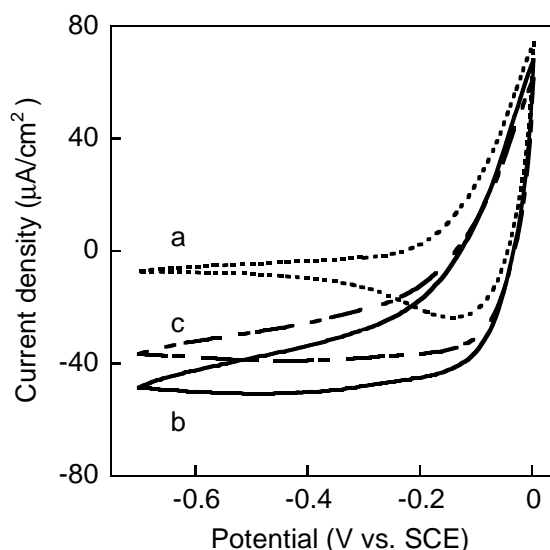


Fig. 6-3 Cyclic voltammograms measured with the PANI/PAA-GOx electrode in a N_2 -saturated phosphate buffer solution of pH 7.0 (a) and the O_2 -saturated solution in the absence (b) and presence (c) of 10 mM glucose.

によるグルコース酸化反応に伴った酸素濃度の低下に起因する。したがって、PANI/PAA 複合膜は Scheme 6-1 に示す反応でグルコースを検出できるといえる。

グルコースセンシングは、電子伝達メディエータの添加や溶存酸素の除去などの前処理を施していない 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中に PANI/PAA-GOx 電極を配置し、電極に -0.3 V vs. SCE の電位を印加することによって行なった。グルコース濃度は、測定溶液中にグルコース水溶液を 100 秒間隔で段階的に添加することで変化させた。Fig. 6-4 (A) に示すように、酸素還元電流は、グルコース水溶液の滴下に応じて減少し、その後、50 秒以内でほぼ一定になった。このような電流応答はグルコース水溶液を滴下する度に観察され、その応答の大きさはグルコース水溶液の滴下量、すなわち、測定溶液中のグルコース濃度の変化量の大きさに依存した。電流応答と測定溶液中のグルコース濃度の関係を Fig. 6-4 (B) に示す。1.1 mM までの範囲において、電流応答はグルコース濃度の上昇に伴い、直線的に増加した。この結果は、提案したセンシング法が実際にグルコース濃度の測定に利用できることを証明している。直線部分の傾きから見積もった PANI/PAA-GOx 電極のグルコースに対する感度は $29.9\ \mu\text{A}/(\text{mM cm}^2)$ であった。Pt を酸素還元触媒として利用して GOx の反応に伴う酸素消費を検出するグルコースセンサーの

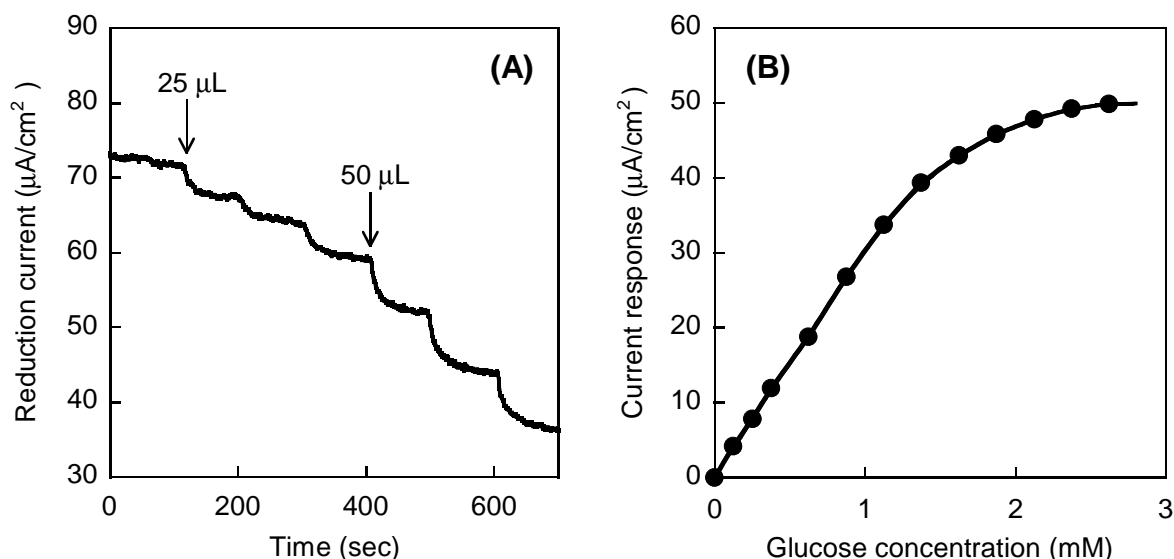


Fig. 6-4 Current response of the PANI/PAA-GOx electrode to successive addition of 0.1 M glucose into a phosphate buffer solution of pH 7.0 (A) and plots of the current response against glucose concentration (B).

感度は $2.6 \mu\text{A}/(\text{mM cm}^2)$ であり^[11], PANI/PAA-GOx 電極の値はこれと比較して大きかった。これは溶存酸素濃度の変化に対する PANI/PAA 複合膜の優れた電流応答に由来すると考えられる。また, Currie の考え方^[17]で求めた検出限界は 0.02 mM であり, Table 2-1 に示した導電性高分子と酵素からなる他のグルコースセンサーより低い値だった。さらに, 5つの PANI/PAA-GOx 電極を用いてセンシングの再現性を調べたところ, 感度の標準偏差は 4.1% であった。これらのことは, 提案したセンシング法が精度良くグルコースを定量できることを明らかにしている。

一方, 1.1 mM 以上で電流応答がほぼ頭打ちになった。この原因は, グルコースを酸化する速度がバルク溶液から電極近傍に酸素を供給する速度を上回り, その酸素供給速度が電流値を決定づけているためであると推測される。

6.3.3 共存物質の影響

生体試料や果汁といった実サンプルのグルコース濃度を測定する場合, 電流応答に及ぼす共存物質の影響は深刻な問題である。前述したように, ASA やアセトアミノフェンといった電気活性種は, 電極表面で容易に酸化するため, 測定結果に正の誤差を与えやすい。また, ガラクトースやフルクトースといったグルコース以外の単糖が含まれている場合もあり, これらも正の誤差を与える可能性がある。しかし, Fig. 6-5 に示すように, 提案したセンシング法で得られる電流応答は, そのような共存物質に影響を受けないことが明らかになった。これは, 測定電位がこれらの物質が酸化される電位より十分に低いことと, GOx の基質特異性の高さによるものである。

6.4 まとめ

PANI/PAA 複合膜による酸素還元反応と GOx によるグルコース酸化反応を組み合わせたセンシング法によってグルコースを電気化学的に検出できることを証明した。さら

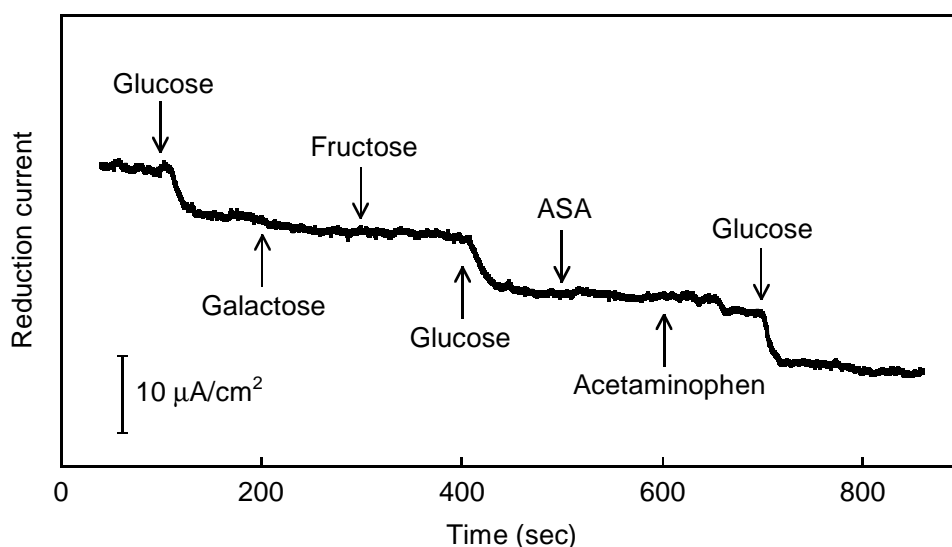


Fig. 6-5 Current response of the PANI/PAA-GOx electrode to sequential addition of 0.1 M glucose, galactose, fructose, ASA and acetaminophen into a phosphate buffer solution of pH 7.0.

に、グルコースに対する電流応答は、グルコースと共に存在することが予想される電気活性種や単糖に影響を受けないことが明らかになった。

本章で述べたセンシング法で特筆すべきは、導電性高分子と酵素という比較的安価な素材がセンシングの重要な役割を担う点である。PANI/PAA 複合膜は簡便かつ安価に作製することができ、GOx は生物培養による大量生産が可能である。現在、血糖値センサーの開発において衛生上好ましい使い捨て可能な検出部位が求められており、PANI/PAA-GOx 電極はその有望な候補であるといえる。

参考文献

- [1] J. Wang, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 814–825.
- [2] M. Gerard, A. Chaubey, B.D. Malhotra, *Biosens. Bioelectron.*, 2002, **17**, 345–359.
- [3] 下村雅人, *日本ゴム協会誌*, 2004, **77**, 22–26.
- [4] 鈴木一路, 吉田章一郎, 渡辺正, *生産研究*, 1996, **48**, 28–33.

- [5] 池田篤治, 「バイオ電気化学の実際 —バイオセンサ・バイオ電池の実用展開—」, 株式会社シーエムシー, 2007.
- [6] K. Ramanathan, S.S. Pandey, R. Kumar, A. Gulati, A.S.N. Murthy, B.D. Malhotra, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2000, **78**, 662–667.
- [7] D. Pan, J. Chen, S. Yao, W. Tao, L. Nie, *Anal. Sci.*, 2005, **21**, 367–371.
- [8] M. Şenel, C. Nergiz, *Curr. Appl. Phys.*, 2012, **12**, 1118–1124.
- [9] Y. Xian, F. Liu, L. Feng, F. Wu, L. Wang, L. Jin, *Electrochem. Commun.*, 2007, **9**, 773–780.
- [10] S.J. Updike, G.P. Hicks, *Nature*, 1967, **214**, 986–988.
- [11] H. Shinohara, T. Chiba, M. Aizawa, *Sens. Actuator*, 1988, **13**, 79–86.
- [12] W. Chen, Y. Ding, J. Akhigbe, C. Brückner, C.M. Li, Y. Lei, *Biosens. Bioelectron.*, 2010, **26**, 504–510.
- [13] 大木成政, 上杉慎治, 村山耕亮, 松本太, 小浦延幸, 岡島武義, 大坂武男, *Electrochemistry*, 2002, **70**, 23–29.
- [14] G. Mengoli, M.M. Musiani, G. Zotti, S. Valcher, J. *Electroanal. Chem.*, 1986, **202**, 217–230.
- [15] L. Doubova, G. Mengoli, M.M. Musiani, S. Valcher, *Electrochim. Acta*, 1989, **34**, 337–343.
- [16] C.Q. Cui, J.Y. Lee, *J. Electroanal. Chem.*, 1994, **367**, 205–212.
- [17] L.A. Currie, *Anal. Chem.*, 1968, **40**, 586–593.

第 7 章

結言

本論文では、導電性高分子を酵素固定化担体および導電媒体として利用する酵素固定化電極の作製，ならびに導電性高分子の特徴を活かしたバイオ燃料電池およびバイオセンサーの構築について示した。第 1 章で述べたように，酵素固定化電極の高性能化には酵素側からのアプローチだけでは限界があり，電極側からのアプローチが必要不可欠である。ここで示した成果は，多岐にわたる分野の統合が不可欠である酵素固定化電極の開発に対し重要な知見を与えるものであると考えている。

第 2 章および第 3 章では，酵素固定化電極に適した導電性高分子膜の創出に関して述べた。まず第 2 章では，*N*-フェニルグリシンの電解重合によって作製した PPG 膜が酵素固定化電極の構成要素として優れた性能を有することを示した。PPG 膜はこれまで報告されてきたポリチオフェンやポリピロールの誘導体と同様にその鎖中にカルボキシル基を有しているため共有結合による酵素の固定に利用できる。しかし，従来作製されてきたカルボキシル基を有する導電性高分子膜を構成要素とする酵素固定化電極は，膜の導電性の低さから基質に対して非常に小さな応答を示すものしか存在しないという問題を有していた^[1,2]。本研究では，この問題を解決すべく電解重合法による PPG の薄膜化を検討し，その導電性を従来の膜と比較して 1 万倍程度 ($2.5 \times 10^{-3} \text{ S/cm}$) に向上させることに成功した。さらに，酵素電極に応用することにより，グルコースに対する電流応答が従来の 10 倍に増加することを明らかにした。ここで示した成果は，酵素固定化担体の導電性の重要性をあらためて確認するものであり，導電性高分子膜が多くの可能性を有していることを示すものと考えている。

第 3 章では，導電性高分子である PANI と酵素固定に有用な官能基を有する PAA から

成る複合膜を酵素固定化電極に応用した際の膜の物性と電極性能の関係について述べた。PANI/PAA 複合膜中の PAA 含有量の増加は、中性条件における複合膜の導電性の向上や、膜表面上に存在するカルボキシル基量の増加を導くことを示した。そして、酵素を固定化した PANI/PAA 複合膜のセンシング性能は複合膜中の PAA 含有量が多いほど優れており、複合膜の組成が電極の性能に影響を及ぼす重要な因子であることを明らかにした。これらの成果は、複合化によって導電性高分子膜が高機能化されうることを示しており、今後、酵素電極の開発を進めていく上で重要な指針を与えたと考えている。

これまで、酵素固定化電極に適した導電性高分子膜の探索は、高い導電性を示す導電性高分子となりうるモノマーと、カルボキシル基やアミノ基を有するモノマーとの共重合によって試みられてきた。本研究の成果は、新たな導電性高分子膜の作製法を提案するものであり、導電性高分子の酵素電極の構成要素としての重要性をさらに高めるものである。また、これまでの知見と本研究の成果を合わせて考えると、高い導電性を示す導電性高分子のモノマー（ピロールやチオフェン）と *N*-フェニルグリシンの共重合体膜や、非常に高い割合で PAA を含んだ導電性高分子膜は、酵素固定化担体および導電媒体として非常に優れた性能を有することが予想される。それらを利用した酵素固定化電極の性能が今後解明されることに期待している。

続く第 4 章から第 6 章では、導電性高分子を応用した新しい電極反応系について示した。まず、第 4 章ではポリチオフェン誘導体膜と BO_x から成る酵素固定化電極のバイオカソードとしての応用について述べた。本電極は中性条件下で一般的に燃料電池のカソードとして利用されている白金触媒を担持した電極よりも 0.2 V 以上高い電位で酸素還元由来する電流を示す。また、それに付随して、本電極をカソードとして組み込んだグルコースバイオ燃料電池は、白金触媒を担持した電極を組み込んだ場合と比較して、起電力が 0.2 V 程度、最大出力は約 2 倍に増加した。ここ述べた成果は、導電性高分子膜がバイオ燃料電池を構成する両電極の構成要素として有用である可能性を示している。

第 5 章では、ASA 誘導体の電気化学的な酸化を可能とする電極反応系への PANI/PAA

複合膜の応用が極めて有効であることを示した。ここで見出した PANI/PAA 複合膜の効果は次の 3 点である。一つ目は、複合膜中の PANI 部位が ASA の電気化学的酸化に対する触媒として機能する点、二つ目は、膜表面に存在する PAA の高分子鎖が固定化酵素の増加およびその活性の保持に寄与し、結果的に ASA の生成速度の向上をもたらす点、三つ目は、複合膜表面の多孔質構造が酵素反応で生成した ASA を効率的に捕集できる点である。本章で示した加水分解酵素を利用した電極反応系は、使用可能な酵素の種類を大幅に増加させるため、これまで主に酸化還元酵素のみが使用されてきた酵素電極に新たな可能性を与える。そのような条件においても導電性高分子膜が非常に優れた性能を示したことは大変興味深い。この導電性高分子の汎用性の高さは、今後、新たな電極反応系が考案された際にも有効に働くことが期待される。

第 6 章では、導電性高分子と酵素の触媒作用を利用した新たなバイオセンシング法について述べた。ここでは、GOx によるグルコース酸化反応と PANI/PAA 複合膜による酸素還元反応を組み合わせた方法を提案し、それが実現可能であることを証明した。また、本法によりセンシングの際に共存する可能性がある物質の影響を抑制できることを明らかにした。ここで提示した成果は導電性高分子の特性と酵素反応とを適切に組み合わせることでこれまでになかった新たなバイオセンシング法が確立されうることを示している。

以上のように、第 4 章から第 6 章では、導電性高分子と酵素から成る酵素固定化電極の応用について示した。自然界には数多くの酵素が存在しており、それらが促進する反応も多種多様である。酵素と導電材料の新たな組み合わせは、現状では想像できないような機能を有する酵素固定化電極の開発につながるものと予想される。本研究の成果がそのきっかけとなることを期待している。

本論文で示してきたように、導電性高分子を利用した酵素電極は多くの可能性を秘めている。導電性高分子は分子および分子集合体レベルで設計できるという特徴を持つ導

電材料であり，分子設計によって機能を自由自在に制御できる可能性がある^[3]。したがって，タンパク質工学的的手法による酵素機能の改変や，新たな触媒作用を持つ酵素の探索といった酵素側からのアプローチと，分子設計による導電性高分子膜の高機能化といった電極側からのアプローチの融合によって，今後，望んだ通りの機能を持った酵素固定化電極を構築できるようになるであろう。これが実現した暁には必ずしや，我々の生活はより豊かなものになるはずである。本研究はそうした酵素固定化電極の発展にとって重要な情報を提供したと考えている。

参考文献

- [1] M. Shimomura, R. Miyata, T. Kuwahara, K. Oshima, S. Miyauchi, *Eur. Polym. J.*, 2007, **43**, 388–394.
- [2] T. Kuwahara, K. Oshima, T. Yamauchi, M. Shimomura, S. Miyauchi, *Synth. Met.*, 2005, **152**, 29–32.
- [3] 吉野勝美, 小野田光宣, 「高分子エレクトロニクス ー導電性高分子とその電子光機能素子化ー」, コロナ社, 1996.

公表論文

1. Fabrication of enzyme electrodes with a polythiophene derivative and application of them to a glucose fuel cell.
T. Kuwahara, T. Homma, M. Kondo, M. Shimomura, *Synth. Met.*, 2009, **159**, 1859–1864.
2. A novel system combining biocatalytic dephosphorylation of L-ascorbic acid 2-phosphate and electrochemical oxidation of resulting ascorbic acid.
T. Kuwahara, T. Homma, M. Kondo, M. Shimomura, *Biosen. Bioelectron.*, 2011, **26**, 3382–3385.
3. Electrochemical polymerization of aniline in the presence of poly(acrylic acid) and characterization of the resulting films.
T. Homma, M. Kondo, T. Kuwahara, M. Shimomura, *Polymer*, 2012, **53**, 223–228.
4. Immobilization of acid phosphatase on a polyaniline/poly(acrylic acid) composite film for use as the anode of a fuel cell driven with L-ascorbic acid 2-phosphate.
T. Homma, M. Kondo, T. Kuwahara, M. Shimomura, *Polym. J.*, 2012, **44**, 1117–1122.
5. Bio- and bioelectro-catalytic properties of polyaniline/poly(acrylic acid) composite films bearing covalently-immobilized acid phosphatase.
T. Homma, M. Kondo, T. Kuwahara, M. Shimomura, *React. Funct. Polym.*, 2014, **74**, 31–36.

6. Amperometric glucose sensing with polyaniline/poly(acrylic acid) composite film bearing covalently-immobilized glucose oxidase: A novel method combining enzymatic glucose oxidation and cathodic O₂ reduction.

T. Homma, D. Sumita, M. Kondo, T. Kuwahara, M. Shimomura, *J. Electroanal. Chem.*, 2014, **712**, 119–123.

7. Covalent immobilization of glucose oxidase on the film prepared by electrochemical polymerization of *N*-phenylglycine for amperometric glucose sensing.

T. Homma, T. Ichimura, M. Kondo, T. Kuwahara, M. Shimomura, *Eur. Polym. J.*, 2014, **51**, 130–135.

8. 金電極の表面修飾がアスコルビン酸の電気化学的酸化に及ぼす影響

加藤正敏, 本間俊将, 近藤みずき, 桑原敬司, 下村雅人, *電気化学会 技術・教育研究 論文誌*, 2014, **21**, 1–7.

9. Polyaniline/poly(acrylic acid) composite film: A promising material for enzyme-aided electrochemical sensors.

T. Homma, M. Kondo, T. Kuwahara, M. Shimomura, *Eur. Polym. J.*, 2015, **62**, 139–144.

国際会議での発表

Immobilization of glucose oxidase and electron mediators on polyaniline/poly(acrylic acid) films for fabrication of bioanodes.

T. Homma, M. Kondo, T. Kuwahara, M. Shimomura, *The 9th SPSJ International Polymer Conference*, 14P1G6-085a (2012年 12月 14日, 神戸国際会議場)

謝辞

御多忙中にもかかわらず、本論文の審査をしてくださいました長岡技術科学大学生物系 下村雅人 教授，城所俊一 教授，政井英司 教授，本多元 准教授ならびに環境系 解良芳夫 教授に深く感謝いたします。下村雅人 教授には研究活動全般にわたり格別なる御指導と御高配を賜りました。私が 3 年間で博士論文をまとめることができたのは、先生が熱心に御指導くださったからに他なりません。この場をお借りし、重ねて御礼申し上げます。

本研究を遂行するうえで有益な議論と御助言をくださいました長岡技術科学大学生物系 桑原敬司 助教，円滑な研究遂行に御尽力いただきました近藤みずき 技術職員に深く感謝いたします。また，研究遂行にご協力くださいました長岡技術科学大学生物系 生物材料工学研究室の卒業生，修了生および学生の諸氏に心から御礼を申し上げます。

最後に，研究活動の継続に様々な御支援を賜りました皆様方ならびに，自分勝手な学生生活を長きに渡り見守ってくださいました両親および祖父母に対して深い感謝の意を表し，謝辞といたします。

平成 27 年 2 月 本間俊将