

福岡工業大学 機関リポジトリ

FITREPO

Title	ラッカーゼ修飾電極を用いた電極触媒反応による塩化フェノールの分解
Author(s)	川上満泰
Citation	福岡工業大学研究論集 第40巻第1号 P21-27
Issue Date	2007
URI	http://hdl.handle.net/11478/446
Right	
Type	Research Paper
Textversion	publisher

Fukuoka Institute of Technology

ラッカーゼ修飾電極を用いた電極触媒反応による 塩化フェノールの分解

太 田 真 一 (物質生産システム工学専攻)
神 谷 英 和 (生命環境科学科)
天 田 啓 (生命環境科学科)
川 上 満 泰 (生命環境科学科)

Electrocatalytic Degradation of Chlorinated Phenolic Compound with Laccase-Modified Polyaniline / Silica Sol-Gel / Carbon Composite Electrodes

Shin-ichi OTA (Material Science and Production Engineering, Graduate School of Engineering)

Hidekazu KOYA (Department of Life, Environment and Materials Science)

Kei AMADA (Department of Life, Environment and Materials Science)

Mitsuyasu KAWAKAMI (Department of Life, Environment and Materials Science)

Abstract

Laccase (E.C. 1.10.3.2) from *Trametes versicolor* has been electrochemically immobilized on the layer of electropolymerized polyaniline entrapped in a thin silica sol-gel film deposited onto a carbon electrode. A couple of redox peaks have been observed for the cyclic voltammogram of the laccase-immobilized electrode, suggesting that direct electron transfer occurs between the enzyme molecule and the electrode. Magnitude of the oxidation peak current around +0.36 V (vs. Ag/AgCl) has been found to increase with the addition of 4-chloro-2-methoxyphenol (4C2M), as a substrate. Further, the degradation activity of laccase for 4C2M has been observed to be enhanced by applying an electrode potential of 0.5 V in a degradation experiment, performed with an electrochemical reactor, employing the laccase-immobilized electrode. These results suggest the possibility that the substrate can be electrocatalytically degraded with the laccase-immobilized electrode, as developed in the present study.

Keywords: laccase, *trametes versicolor*, polyaniline, sol-gel, electrocatalysis

1. 緒 言

担子菌に属する白色腐朽菌は、主に木材中のセル

ロースを養分として吸収し成長する。木材の主要構成成分であるセルロースは、リグニンという物質で守られており、木材としての強度にも密接に関わりがある。自然界に生息する微生物の中でも木材を媒介として成長する真菌は、リグニンを分解する酵素を生産することが知られている。それらは酸化還元酵素に大別され、

平成19年5月31日受付

リグニン分解酵素と呼ばれている。自然界において構造が複雑で難分解性であるリグニンを分解することから、有機芳香族化合物などの難分解性化合物の分解への応用について幅広く研究されている⁽¹⁻⁶⁾。

ラッカーゼ (Lac) (学術名: ポリフェノールオキシダーゼ、ウルシオールオキシダーゼ EC. 1. 10. 3. 2) は、マンガンペルオキシダーゼ (MnP)、リグニンペルオキシダーゼ (LiP) 等とともに、リグニン分解酵素として白色腐朽菌によって分泌、生産されることが知られている。MnP や LiP の活性発現は、 H_2O_2 に依存しており、 H_2O_2 が存在する状況下で、酸化反応を生じる。一方、Lac は、MnP や LiP とは異なり H_2O_2 ではなく、 O_2 に依存して酸化反応を生じる。菌類から精製された Lac は、分子量6.4万で酵素活性部位に銅錯体を持つタンパク質である。Lac は4個の Cu イオンを活性中心に持つブルー銅酸化酵素であり、基質特異性が低くフェノール類やクロロフェノール類、芳香族アミンなど広範囲な電子供与体を基質として酸化することが知られている。例えばフェノール類の場合、H 原子の引き抜きによるフェノキシラジカルの生成が最初に起こり、引き続いて酵素反応によるキノン類への変化、あるいは非酵素的な不均化反応や重合反応などが進行するといわれている⁽⁷⁾。また、Lac は木材の構成成分のひとつであるリグニン中のポリフェノール性部位をターゲットとして攻撃すると考えられており、フェノール性部位を酸化してその物質のラジカルを生成する⁽⁸⁾。

電極触媒反応とは、ある物質が電極近傍に存在する状況下において電極上での電子のやり取りを触媒となる物質でコントロールする反応であり、電極に一定の電位をかけることによって触媒反応で生じた還元体から電子を受け取ることにより、物質を酸化させるものである。このメカニズムを応用して、電気化学的に化合物の酸化還元反応による電子のやり取りを制御することが可能である。この電極触媒反応には、Fig. 1(a) に示す直接移動型と、Fig. 1(b) に示すメディエータ型があり、例えば直接移動型は、炭素電極とラッカーゼ酵素の間で、直に電子のやり取りを行うタイプであるが、一般に直接電子移動は、酵素の活性部位が電極面へと向いている条件でないと起こりにくい。従って、直接電子移動型の場合、電極表面に直接電子移動を起こり易くさせるプロモータ作用を持つ導電性膜などを導入する必要がある。メディエータ型は、炭素電極とラッカーゼ酵素の間に、酸化還元物質を介在させ、電

気化学的に酸化還元物質の酸化還元反応を制御することによって電子移動を間接的に促進させる。これらは、従来主にバイオセンサの原理として用いられており、現在も幅広く研究が行われている⁽¹²⁻¹⁴⁾。特に Lac を用いた電極触媒反応についての研究は、あまり知られていない。そこで本研究では、プロモータ作用があるとされるポリアニリン膜を電解重合合法により多孔性のシリカゾルゲル膜の細孔中に包埋させる方法により⁽¹⁵⁾炭素電極表面に形成し、その上に酵素を被覆することによって直接電子移動型が期待される固定化酵素被覆電極を作製した。フェノール系難分解性化合物のモデルとして 4-Chloro-2-methoxyphenol (4C2M) を基質として用い、Lac と電極間での直接電子移動による電極触媒反応の効果について検討した。

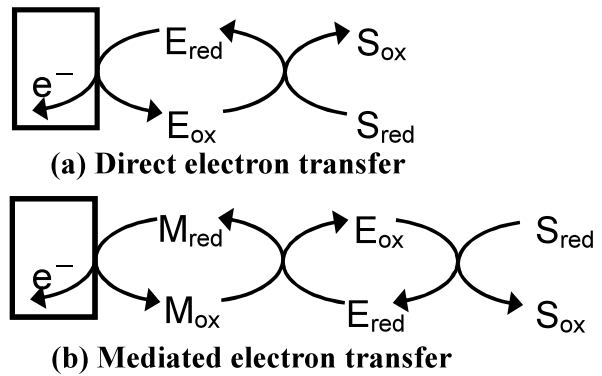


Fig. 1 Mechanisms of bioelectrocatalysis; E: enzyme, S: substrate, M: mediator

2. 実験

2.1 試薬

Tetraethyl-orthosilicate (TEOS) および 4-Chloro-2-methoxyphenol (4C2M) は、東京化成工業(株)よりそれぞれ購入し、*Trametes versicolor* 由来の Lac は Sigma-Aldrich 社より購入し使用した。2,2'-Azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) は Sigma 社より購入した。その他の無機塩類などはすべて関東化学(株)の特級試薬を使用した。また電解液や緩衝液などの調製には超純水を使用した。

2.2 電気化学測定装置

電解重合およびサイクリックボルタモグラム (CV) 測定には、BAS 社の CV-50W エレクトロケミカルア

ナライザーを用いた。また定電位分解試験には(株)扶桑製作所の高感度ポテンシostat HECS318を使用した。測定法は3電極法とし、対極には自作のPt線電極を、また参照電極には、3 M NaClを電解液とするAg/AgCl電極 (BAS, RE-1B)を使用した。測定セルはジャケットに恒温水を流すことにより25°Cに保持した。必要な場合には電解液にあらかじめN₂ガスを約15 min 流して脱O₂処理を行ったのち、そのままN₂気流下で実験を開始した。

2.3 酵素活性

0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を 3 ml、10 mM-ABTS 溶液 0.1 ml を石英ガラスセルに入れ、ラッカーゼ溶液を 0.1 ml 添加し、反応を開始させた。最初の 15 sec は攪拌し、25°C に保持した恒温槽中で 45 sec 保持させ、1 min 毎に 436 nm における吸光度の増加を測定した。1 U は、1 μmol/min の ABTS を酸化させるラッカーゼの量と定義した。

2.4 電解重合

電極には直径 5 mm、長さ約 30 mm の炭素棒 (日立化成(株)、spectroscopic graphite) を用い、電極面を紙やすり、さらにアルミナ懸濁液 (1 μm) で研磨したのち、超純水中で超音波洗浄を行った。電極の側面は、テフロンシールテープおよびシリコンチューブで覆った。0.1 M NaCl を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を電解液とし、N₂雰囲気下で CV 測定を行うことにより、電極面の清浄化を確認した。

TEOS、超純水、HCl をそれぞれ mol 比で 10 : 11 : 0.05 になるようにガラス容器中に入れ、マグネティックスターラーで 300 rpm の速度で、約 5 h 攪拌し、透明な溶液が得られたらこれをストック液とした⁽¹⁵⁾。このストック液をメタノールで 1 : 3 に希釈し、電極面に 10 μl 載せ室温で自然乾燥させることによりシリカゲル膜を形成した。シリカゲル膜形成後の電極を 0.2 M アニリンを含む 1 M HCl 溶液を電解液として +0.7 V (vs. Ag/AgCl) で 10 min 定電位電解重合を行った⁽¹⁶⁾。電極面を超純水でリンスし、0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) を電解液として 15 min カソード分極を行った。分極後、電極面をリンスし、0.023 mg のラッカーゼ酵素を含む 15 ml の 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) に漬け、+0.65 V (vs. Ag/AgCl) で 5 min アノード分極を行い、ラッカーゼをポリアニリン膜表面に固定させた。走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて、炭素板上のシリカ

ゲル膜と炭素電極の表面、酵素被覆電極の表面を観察した。また、0.1 M 酢酸緩衝液を電解液として CV 測定を行うことにより、ラッカーゼ固定化電極の酸化還元特性を確認した。

2.5 直接電子移動の確認

ラッカーゼを固定した炭素電極を用いて、0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を電解液とし、N₂気流下で基質添加前の CV 測定を行い、電解液を 300 rpm で攪拌させながら 0.01 mM の濃度に調製した 4 C 2 M 溶液を 50 μl 添加し、5 min 後に攪拌を止めて CV 測定を行った。さらに 50 μl ずつ 200 μl まで基質を添加し、基質によるラッカーゼの波形の変化により直接電子移動の確認を行った。

2.6 分解試験

均相系の反応は、25°C に保持した測定セル中に、0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を用いて 0.1 mM の濃度に調製した 4 C 2 M 溶液を 15 ml 入れ、N₂ または Air を反応開始 30 min 前から通気し、ラッカーゼ溶液を 50 μl (340 U/mg) 添加し反応を開始させた。所定の時間毎に溶液をあらかじめ 1 M HCl 0.1 ml を入れた試験管に採取した。

酵素被覆電極 (80 U/mg) を用いた反応も同様に行い、電位印加 +0.5 V (vs. Ag/AgCl) と電位印加なしの条件で行った。採取した反応液は、溶離液として アセトニトリル : 超純水 : 酢酸 = 65 : 35 : 0.125 の混合溶液を用い、流速 0.5 ml/min の条件で HPLC を用いて分析した。

3. 結果および考察

3.1 酵素被覆電極の作製

Fig. 2(a)~(c) にそれぞれ炭素板上のシリカゲル膜、炭素電極表面および酵素被覆電極表面の SEM 画像を示す。ストック液を塗布して乾燥させた炭素板の場合、ゲル粒子 (粒径約 2.85 μm) の集団が確認できる。また、炭素電極表面と酵素被覆電極表面を比較すると酵素被覆電極表面にゲル粒子がほとんど見えなくなっていた。これにより、電極表面に電解重合膜が形成されたと判断できる。

炭素電極の清浄化を確認したボルタモグラムの Fig. 3 に、酵素被覆電極のボルタモグラムの Fig. 4 に示す。Fig. 3 と Fig. 4 を比較すると Fig. 4 において、

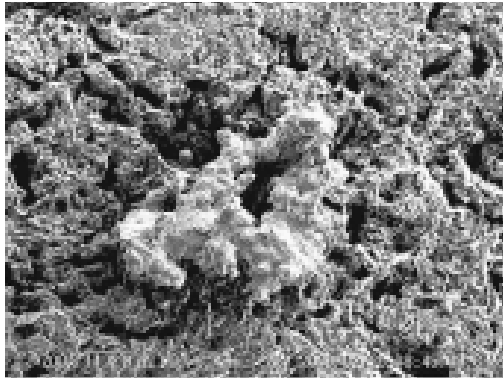


Fig. 2 (a)

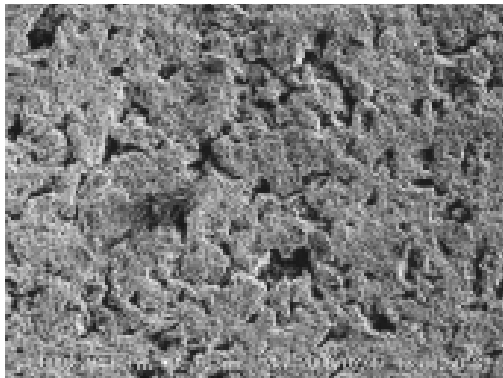


Fig. 2 (b)

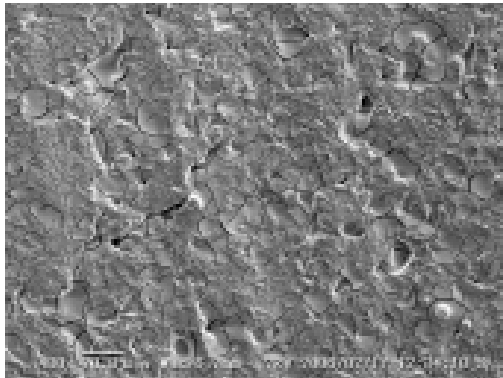


Fig. 2 (c)

Fig. 2 SEM images of silica sol-gel particles deposited on an electrode (a), surface of carbon electrode (b), and surface of polyaniline-coated electrode (c).

-0.10 V (vs.Ag/AgCl) 付近の小さな還元ピークと共に +0.36 V (vs.Ag/AgCl) 付近に幅広の酸化ピークが確認できる。菌体由来 Lac の活性中心には3種類のタイプの異なる Cu イオンが含まれており、酸化還元ピーク電位は、活性中心のタイプによって異なってい

ることが知られている。例えば Cu タイプ 1、タイプ 3 は約 +0.66 V (vs.Ag/AgCl) (*Trametes versicolor* 由来 Lac)⁽¹⁷⁻¹⁹⁾、また Cu タイプ 2 は約 +0.23 V (vs.Ag/AgCl) (*Rhus vernicifera* 由来の Lac)⁽¹⁶⁾ の値が報告されている⁽²⁰⁾。本研究で得られた実験値 +0.36 V は、タイプ 1、3 の値よりかなり負側にシフトした値であり、タイプ 2 の値に近いことがわかる。ただし、文献で報告された値とは測定方法も異なっており、また電解重合膜上への固定化により、Lac 活性中心の酸化還元電位が変化することも考えられるので結論は得られていない。また、4C2M による酵素被覆電極の電気化学特性に及ぼす影響について調べた結果を Fig. 5 に示す。4C2M 添加毎にラッカーゼのピーク電位 +0.36 V 付近の酸化電流が増大している事が確認で

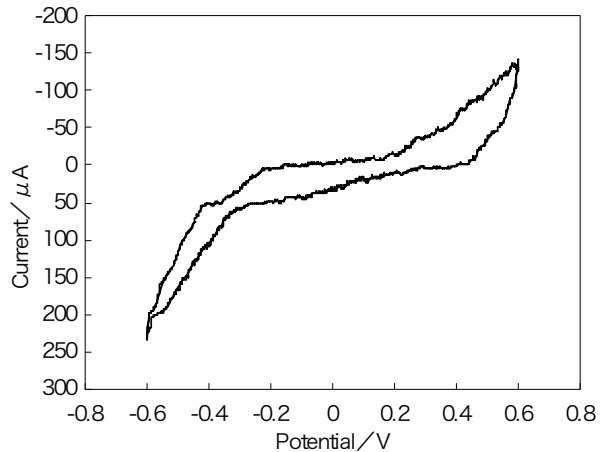


Fig. 3 Cyclic voltammogram of a cleaned electrode.

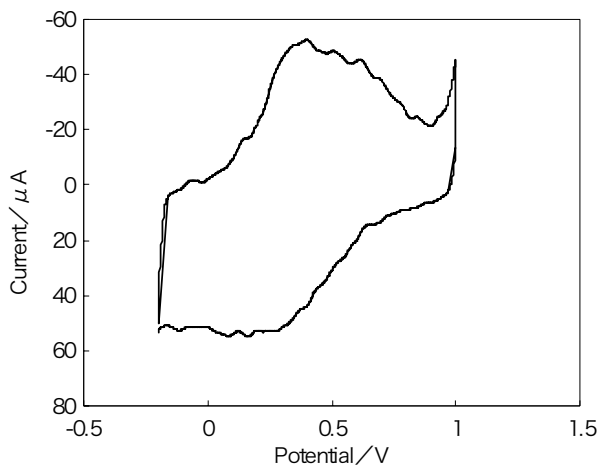


Fig. 4 Cyclic voltammogram of laccase-immobilized electrode.

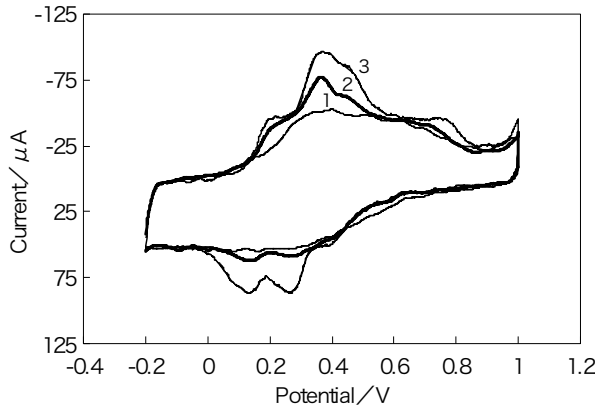


Fig. 5 Changes of cyclic voltammograms for laccase-immobilized electrode with addition of 4-chloro-2-methoxyphenol, (1) 0 μl , (2) 50 μl , (3) 100 μl .

き、このことからラッカーゼと電極との間で直接電子のやり取りが行われていることが推察できる。

3.2 分解試験

まず始めに、Lac の活性発現における O_2 の効果を調べるために、均相系分解反応を行った。Fig. 6 に均相系反応における分解試験の結果を示す。Air 雰囲気下、 N_2 雰囲気下共に 2 回ずつ実験を行ったが、共通して Air 雰囲気下の条件のみ大幅な 4C2M の減少が見られ分解が進行することがわかった。これは、Lac の触媒作用に O_2 が必要なことを示している。また、 N_2 雰囲気下でもわずかであるが 4C2M の減少が見られる。これは N_2 ガスによる除 O_2 処理が完全でなく、わずかに残存する O_2 が反応に関与したことが原因の一つであろう。また 4C2M の電極への吸着も原因として考えられる。

Fig. 7 に酵素被覆電極における分解試験の結果を示す。Air 雰囲気下の条件では、電位印加なしの条件より電位印加 +0.5 V の条件で分解率が 44.3% 増加した。同様に N_2 雰囲気下の条件では、電位印加 +0.5 V の条件で分解率が 46.5% 増加した。Air、 N_2 雰囲気下ともに電位印加によって分解率が增大しており、この結果はポリアニリン膜がプロモータとして作用し、電極と Lac との間の直接電子移動による電極触媒反応が生じていることを示すものと考えられる。また、Air 雰囲気下では O_2 と電極反応による Lac のターンオーバーが競争して起こることが考えられるが、Air、 N_2 いずれの雰囲気下においても、電位印加の場合は大き

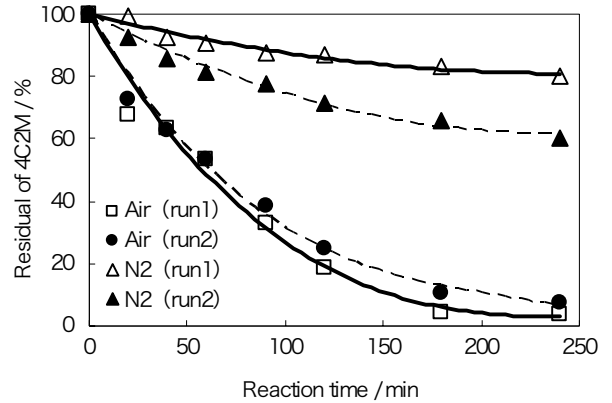


Fig. 6 Time-course of residual substrate for homogeneous 4C2M degradation with laccase; under Air, run1 (\square) and run2 (\bullet); under N_2 , run1 (\triangle) and run2 (\blacktriangle).

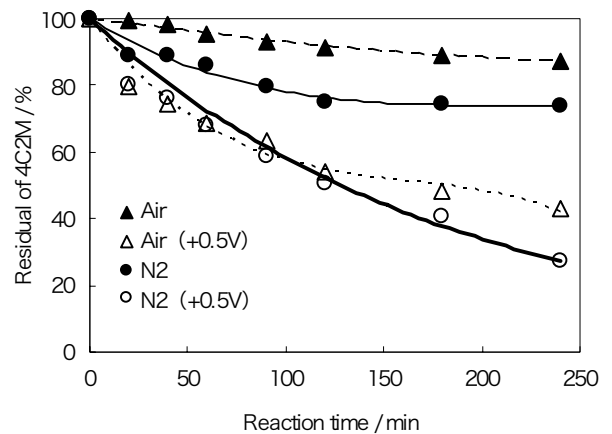


Fig. 7 Effect of the potential application on the time-course of residual substrate for 4C2M degradation with the laccase-immobilized electrode; under Air without application of potential (\blacktriangle) and with potential +0.5V (\triangle); under N_2 without application of potential (\bullet) and with potential +0.5V (\circ).

な差が認められないことから、電極反応による非活性な還元型 Lac から活性な酸化型 Lac へのターンオーバーが優先的に生じることが示唆される。

4. 結 語

電解重合法によって作成したポリアニリン膜上に Lac を固定化し酵素被覆電極を作製した。酵素被覆電極の CV 測定において +0.36 V および -0.10 V 付近にそれぞれ酸化および還元ピークが出現し、酵素分子

と電極間で直接電子移動が生じることが示唆された。Lac による均相系反応による分解では、N₂雰囲気下、25°C、4時間で、29.7±10%の分解率を得た。酵素被覆電極による分解では、N₂雰囲気下、25°C、4時間、電位印加+0.5Vで、72.5%の分解を得た。同条件下で、電位印加+0.5Vと電位印加なしを比較すると電位印加+0.5Vの条件で分解率がおよそ42.8%増加した。このことから電位印加+0.5Vによって、酵素と電極の間で電子のやり取りが行われ、N₂雰囲気下でも電圧を印加することによって分解速度が増大することがわかった。これらの結果より、直接電子移動型の電極触媒反応は、O₂濃度の影響を受けにくく、高効率の分解技術として幅広い分野への応用が期待される。

5. 謝 辞

本研究は、文部科学省より私立大学学術研究高度化推進事業ハイテクリサーチセンター (2005-2009) の助成を受けて行われた。

参 考 文 献

- 1) M. J. Han, H. T. Choi, and H. G. Song, "Degradation of phenanthrene by *Trametes versicolor* and its laccase", *J. Microbiology*, Vol. 42 (2004), pp.94-98.
- 2) F. d'Acunzo, and C. Galli, "First evidence of catalytic mediation by phenolic compounds in the laccase-induced oxidation of lignin models", *Eur. J. Biochem.* Vol. 270 (2003) pp.3634-3640.
- 3) M. C. N. Saparrat, F. Guillén, A. M. Arambarri, N. T. Martinez, and M. J. Martinez, "Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete *Coriolopsis rigida*", *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 68 (2002), pp.1534-1540.
- 4) D. S. Yaver, F. Xu, E. J. Golightly, K. M. Brown, S. H. Brown, M. W. Rey, P. Schneider, T. Halkier, K. Mondorf, and H. Dalobøge, "Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*", *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 62 (1996), pp.834-841.
- 5) A. Kollmann, A. Brault, I. Touton, J. Dubroca, V. Chaplain, and C. Mougin, "Effect of nonylphenol surfactants on fungi following the application of sewage sludge on agricultural soils", *J. Environ.* Vol. 32 (2003), pp.1269-1276.
- 6) C. Eggert, U. Temp, and K. E. L. Eriksson, "The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase", *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 62 (1996), pp.1151-1158.
- 7) C. F. Thurston, "The structure and function of fungal laccases", *Microbiology*, Vol. 140 (1994), pp.19-26.
- 8) C. Johannes and A. Majherczyk, "Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems", *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 66 (2000), pp.524-528.
- 9) S. Larsson, P. Cassland, and L. J. Jönsson, "Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase", *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 32 (2001), pp.1163-1170.
- 10) Y. Fukushima, and T. K. Kirk, "Laccase component of the *Ceriporiopsis subvermispota* lignin-degrading system", *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 61 (1995), pp.872-876.
- 11) G. P. Shumakovich, S. V. Shleev, O. V. Morozova, P. S. Khohlov, I. G. Gazaryan, A. I. Yaropolov, "Electrochemistry and kinetics of fungal laccase mediators", *Bioelectrochemistry*, Vol. 69 (2006), pp.16-24.
- 12) V. A. Bogdanovskaya, M. R. Tarasevich, L. N. Kuznetsova, M. F. Reznik, E. V. Kasatkin, "Peculiarities of direct bioelectrocatalysis by laccase in aqueous-nonaqueous mixtures", *Biosens. Bioelectron.*, Vol. 11-12 (2002), pp.945-951.
- 13) J. B. Raoof, R. Ojani, H. Beitollahi, and R. Hosseinzadeh, "Electrocatalytic oxidation and highly selective voltammetric determination of L-cysteine at the Surface of a 1-[4-(Ferrocenyl ethynyl)phenyl]-1-ethanone modified carbon paste electrode", *Anal. Sci.*, Vol. 22 (2006), pp.1213-1220.
- 14) X. Lin, and C. Jiang, "Self-assembly of molybdophosphate on a glassy carbon electrode covalently modified with choline and electrocatalytic reduction of iodate", *Anal. Sci.*, Vol. 22 (2006), pp.697-700.
- 15) A. Chaubey, K. K. Pande, B. D. Malhotra, "Application of polyaniline / sol-gel derived tetraethylorthosilicate films to an amperometric lactate biosensor", *Anal.*

- Sci.*, Vol. 19 (2003), pp.1477-1480.
- 16) S. timur, N. pazarlioglu, R. pilloton, A. telefoncu, "Thick film sensor based on laccases from different sources immobilized in polyaniline matrix", *Sens. Actuators B*, Vol. 97 (2004), pp.132-136.
- 17) O. V. Koroleva, I. S. Yavmetdinov, S. V. Shleev, E. V. Stepanova, V. P. Gavrilova "Isolation and study of some properties of laccase from the basidiomycetes *Cerrena maxima*" *Biochemistry (Mosc)*, Vol. 66 (2001), pp.618-22.
- 18) B. Reinhammar, "Oxidation-reduction potentials of the electron acceptors in laccases and stellacyanin", *Biochim. Biophys.*, Vol. 275 (1972), pp.245-259.
- 19) B. Reinhammar, T. I. Vänngård, "The electron-accepting sites in *Rhus vernicifera* laccase as studied by anaerobic oxidation-reduction titrations", *Eur. J. Biochem.*, Vol. 18 (1971), pp.463-468.
- 20) A. Christenson, N. Dimcheva, E. E. Ferapontova, L. Gorton, T. Ruzgas, L. Stoica, S. Shleev, A. I. Yaropolov, D. Haltrich, R. N. F. Thorneley, S. D. Aust, "Direct electron transfer between ligninolytic redox enzymes and electrodes" *Electroanalysis*, Vol. 16 (2004), pp.1074-1092.