

福岡工業大学 機関リポジトリ

FITREPO

Title	生ラッカーゼを固定化したポリアニリン/シリカゲル修飾 グラファイト電極の電気化学的特性
Author(s)	川上満泰
Citation	福岡工業大学研究論集 第41巻第2号 P127-P132
Issue Date	2009
URI	http://hdl.handle.net/11478/447
Right	
Type	Research Paper
Textversion	publisher

Fukuoka Institute of Technology

ラッカーゼを固定化したポリアニリン/シリカゲル修飾 グラファイト電極の電気化学的特性

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)

Direct Electrochemistry for Laccase – Modified Polyaniline/Silica Sol-Gel Film-Coated Graphite Electrode

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 graphite electrode. The magnitude of redox peaks of the cyclic voltammogram observed for the laccase-modified electrode has been found to vary remarkably with the electropolymerization conditions. It could be presumed that the conductivity of polyaniline would exert considerable effects on the direct electron transfer between the enzyme molecule and the electrode surface. The electrochemical parameters obtained by cyclic voltammetry have showed a pH dependence, and it was suggested from the results that the binding of copper ion in the active center of laccase might become appreciably loose at pH 3.0.

Keywords: laccase, *Trametes versicolor*, polyaniline, sol-gel, electron transfer

1. 緒言

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, リグニン分解酵素として白色腐朽菌等によって分泌, 生産されることが知られている⁽¹⁻³⁾. 菌類から精製された Lac は, 分子量約6.4万で酵素活性部位に銅錯体を持つタンパク質であり, 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. Lac は3種類(タイプ1, タイプ2, タイプ3)のCuイオンを活性中心を持つブルー銅酸化酵素であり, それぞれの酸化ピーク電位が, タイプ1, タイプ3では約+0.66V (vs.Ag/AgCl) (*Trametes versicolor* 由

来 Lac)⁽⁴⁻⁶⁾, またタイプ2は約+0.23V (vs.Ag/AgCl) (*Rhus vernicifera* 由来の Lac)⁽⁷⁾の値が報告されている⁽⁸⁾. Lac は, Lac を生産する菌の種類や, 発現させる環境によって特性が変化し, *Trametes hirsuta* 由来の Lac は至適 pH が3.5~4.5, pI 値が4.2±0.1, *Cerrena unicolor* 由来の Lac は至適 pH が4.0~6.0, pI 値が4.5±0.2と報告されている⁽⁹⁾.

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. Fig.1に示す直接移動型は, 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。

筆者らは、すでに電解重合ポリアニリンをプロモータとする直接電子移動型の固定化酵素被覆電極を作製し、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報告した⁽¹⁰⁾。

論文では、これまでの研究の継続として電解重合条件の影響とラッカーゼ修飾電極の電気化学特性に及ぼす pH の影響について報告する。

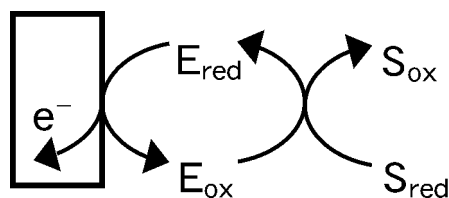


Fig.1 Mechanism of Direct electron transfer; E: enzyme, S: substrate.

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-ethylbenzothiazoline-6-sulfonicacid) (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 HECS 318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、3M 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 15min 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

0.1M 酢酸緩衝液 (pH5.0) を 3 ml, 10mM-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 0.1ml 添加し、反応を開始させた。最初の 15sec は攪拌し、25°C に保持した恒温槽中で 45sec 保持させ、1 min 毎に 436nm における吸光度の増加を測定した。1 U は、1 μmol/min の速度で ABTS を酸化させるラッカーゼの量と定義した。

2.4 電極の前処理 (シリカゲル膜の導入)

電極には直径 5 mm, 長さ約 30mm 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。0.1M NaCl を含む 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.0) 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 300rpm 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⁽¹¹⁾。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。

2.5 Lac 修飾電極の作製

電解重合を用いた方法では、シリカゲル膜形成後の電極を 0.2M アニリンを含む 1 M HCl 溶液を電解液として +1.0V (vs. Ag/AgCl) で 1 min 定電位電解重合を行った。電極面を超純水でリンスし、0.1M 酢酸緩衝液 (pH5.5) を電解液として -0.65V (vs. Ag/AgCl) で 15min カソード分極を行った。分極後、電極面をリンスし、66U のラッカーゼ酵素を含む 15ml の 0.1M 酢酸緩衝液 (pH5.5) に漬け、+0.65V (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。

2.6 直接電子移動の確認および pH 特性

ラッカーゼを固定した炭素電極を用いて、0.1M 酢酸緩衝液 (pH5.0) 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 300rpm で攪拌させながら 0.01mM の濃度に調製した 4C2M 溶液を添加し、5 min 後に攪拌を止めて CV 測定を行った。pH の異なる緩衝液 0.1M 酢酸緩衝液 (pH5.0), 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.0), 0.1M クエン酸緩衝液 (pH3.0) を電解液とし、N₂ 気流下で CV 測定を行い、各種 pH でのラッカーゼの波形の変化を検証した。

2.7 分解試験における pH の影響

均相系の反応は、25°C に保持した測定セル中に、それぞれ 0.1M 酢酸緩衝液 (pH5.0), 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.0), 0.1M クエン酸緩衝液 (pH3.0) を用いて 0.1mM の濃度に調製した 4C2M 溶液を 15ml 入れた条件で行った。

Air を反応開始30min 前から通気し、ラッカーゼ溶液を100 μ l (66Unit) 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 0.1ml を入れた試験管に採取した。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0.2ml/min の条件でLC/MS/MS を用いて分析した。

3. 結果および考察

3.1 Lac 修飾電極の作製と電極触媒反応

ポリアニリンの重合条件を変えて作製したラッカーゼ修飾電極のサイクリックボルタモグラムを Fig.2 に示す。ポリアニリンを電極表面に導入する時、+1.0V(vs.Ag/AgCl) で1 min 間の電解重合を行った場合と、+0.7V(vs.Ag/AgCl) で5 min 間の電解重合を行った場合とを比較すると、得られる酸化還元ピークの電流値が+1.0V/1min で行う条件において約10倍の電流値を示した。これは、重合条件によって得られる、ポリアニリンの導電性や膜厚などが異なるためと推察された。また、Fig.2では+0.2~+0.6V 付近に幅広い酸化ピークと-0.15V 付近に還元ピークが確認できた。Shleev らの報告によれば、*Trametes hirsuta* 由来の Lac を、4-アミノチオフェノールをプロモータとして導入した Au 電極上に固定化した Lac 修飾電極では、タイプ1の酸化ピークが780mV vs.NHE (560mV vs.Ag/AgCl)、タイプ2, 3 集合体の酸化ピークが400mV vs.NHE (180mV vs.Ag/AgCl) 付近に確認されている⁽¹²⁾。本研究で得られた値と比較すると酸化ピーク電位は、タイプ1の酸化ピーク電位と近いが、作用極の構造や測定方法が異なっているため、断定するには至らなかった。

電解重合法を用いてポリアニリンを電極表面に導入した際の、反応液を採取し吸光スペクトルを測定した結果を Fig.3 に示す。ポリアニリンは、重合反応の過程において構造が変化することが知られており、導電性を持つエメラルディン塩(緑色)構造では600nm~800nm に極大吸収を持つことが知られている⁽¹³⁾。本研究においても、電解重合後の反応溶液は無色から緑色へと変化し、図に示すように600 nm~800nm の波長にかけてエメラルディン塩と思われる吸収極大が確認できた。

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.4 に示す。4C2M 添加毎にラッカーゼのピーク電位+0.36V 付近の酸化電流が増大している事が確認できた。以上の結果から、電極表面に導入されたポリアニリンがプロモータとして作用して電極面に Lac が静電引力によって、かなり強く吸着され、活性部位が電極面へと向くように制御できたことが示唆される。

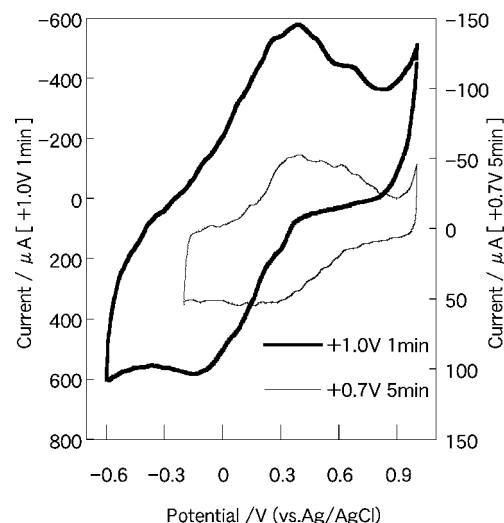


Fig. 2 Cyclic voltammograms of laccase-immobilized electrodes with varying electropolymerization condition.

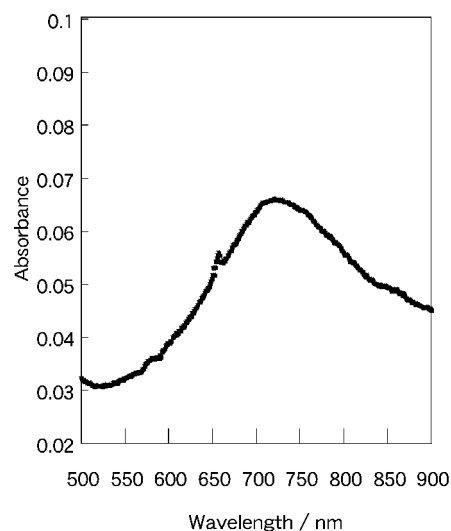


Fig. 3 visible absorbance spectra obtained after electropolymerization of aniline.

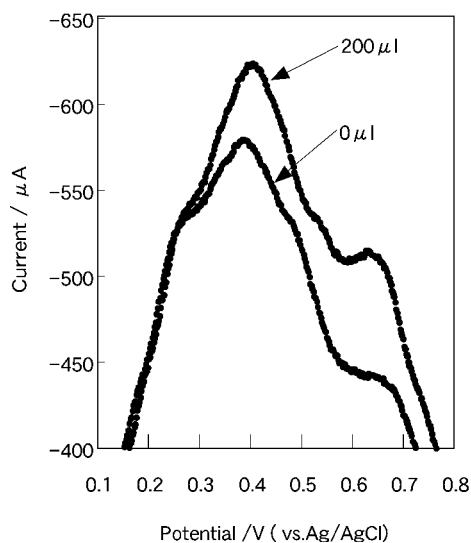


Fig. 4 Changes of cyclic voltammograms for laccase-immobilized electrode with addition of 4-chloro-2-methoxyphenol, (1) 0 μl, (2) 200 μl.

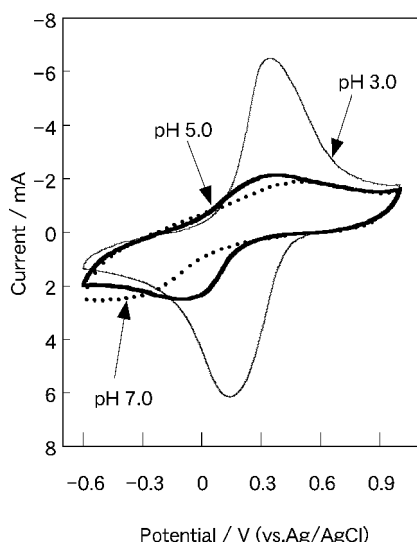


Fig. 5 Changes of cyclic voltammograms for laccase-immobilized electrode in acetate buffer pH5.0, phosphate buffer pH7.0 and citrate buffer pH3.0.

3.2 電気化学特性の pH 依存性

Fig.5に pH を変化させたときの Lac 修飾電極のボルタモグラムを示し, Fig.5より得られた電気化学的パラメータを Table.1に示す。それぞれの pH において酸化ピーク電位 $E_{p_{ox}}$ はほとんど変化しないのに対し, 還元ピーク電位 $E_{p_{red}}$ は pH が低くなるにつれてプラス側へとシフトすることや, 酸化還元ピーク電位の差が pH3.0では急激に小さくなるのがわかる。また, pH5.0および7.0の場合と pH3.0の場合とは得られた酸化還元ピーク電流がおおよそ 2~5 倍と大きな値を示した。このように pH3.0における波形は, pH5.0や7.0の場合とはかなり異なることから, CV における掃引速度の影響 (Fig.6) と均相系反応における酵素活性の pH 依存性を調べた (Fig.7)。

Fig.6の結果より, ピーク電流は掃引速度の 1 乗よりも 1/2 乗に比例しており, また酸化還元ピークの電位差 ($E_{p_{ox}} - E_{p_{red}}$) がかなり小さく電極と電極間の電子移動速度が速いことから, pH3.0において活性中心の Cu イオンは電極表面に固定されていない状態に近いことが推察される。Fig.7にそれぞれの pH での均相系反応による分解試験の結果を示す。pH5.0の条件において 4C2M の残留率は, 反応開始 20 min で 13% と大幅な減少が確認でき, pH7.0の条件においても 240min で 74% と僅かではあるが残留率の減少が確認できた。これに対し pH3.0の条件下では, 残留率の減少が全く確認できなかった。この結果は pH3.0ではタンパク質の変性などの影響で活性中心の立体構造が変化し触媒作用がほぼなくなることを示しており, 上記の結果とよく対応する。

Table. 1 Influence of pH on electrocatalysis laccase-immobilized electrode of electrocatalytic

pH	$E_{p_{ox}}$ (V)	$E_{p_{red}}$ (V)	$i_{p_{ox}}$ (μA)	$i_{p_{red}}$ (μA)	$\Delta(E_{p_{ox}} - E_{p_{red}})$	midpoint potential
3.0	0.32	0.17	-5830	5320	0.15	0.08
5.0	0.30	-0.09	-1050	2280	0.39	0.20
7.0	0.52	-0.43	-460	2110	0.95	0.48

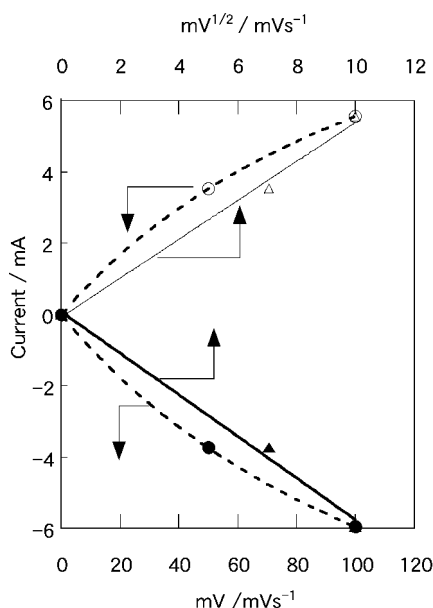


Fig. 6 Relations between peak currents ($i_{p_{ox}}, i_{p_{red}}$) and scan rate.

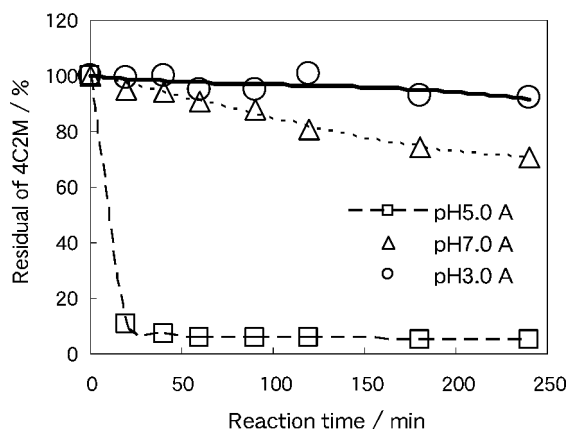


Fig. 7 Time-course of residual substrate for homogeneous 4C2M degradation with laccase; pH5.0(□), pH7.0(△), pH3.0(○).

4. 結語

電解重合法を用いることによりエメラルディン塩型ポリアニリンを電極表面に導入し、静電引力を利用して固定化することによって、Lac と電極間で直接電子移動が生じることが示唆された。作製した酵素修飾電極の CV 測定において、pH によって、酸化還元波が変化することが確認でき、pH3.0で酵素タンパク質の変性が起こり溶液中に Cu イオンが漏出した可能性が示唆された。

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. C. N. Saparrat, F. Guillén, A. M. Arambarri, N. T. Martínez, and M. J. Martínez, "Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete *Corioloopsis rigida*", *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 68 (2002), pp.1534-1540.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) B. Reinhammar, "Oxidation-reduction potentials of the electron acceptors in laccases and stellacyanin", *Biochim. Biophys.*, Vol.275 (1972), pp.245-259.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) S. Shleev, A. J. Wilkolazka, A. Khalunina, O. Morozova, A. Yaropolov, T. Ruzgas, L. Gorton, "Direct electron transfer reactions of laccases from different

- orgins on carbon electrodes”, *Bioelectrochemistry*, Vol.67 (2005), pp.115-124.
- 10) S. Ota, H. Koya, K. Amada, M. Kawakami, “Electrocatalytic Degradation of Chlorinated Phenolic Compound with Laccase-Modified Polyaniline/Silica Sol-Gel/Carbon Composite Electrodes”, *Res. Bull. Fukuoka Inst. Tech.*, Vol.40 No.1 (2007), pp21-27.
- 11) 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
- 12) S. Shleev, M. Pita, A. I. Yaropolov, T. Ruzgas, L. Gorton, “Direct heterogeneous electron transfer reactions of *Trametes hirsute* laccase at bare and thiol-modified gold electrodes”, *Electroanalysis*, Vol.18 No.19-20 (2006), pp.1901-1908.
- 13) T. Hino and N. Kuramoto, “Synthesis of novel functionalized polyanilines and the evaluation of its ability for a latent catalyst”, *Bull. Yamagata Univ. (Eng)*, Vol.29 No.2 (2007), pp.99-105.