

フォーカス 26 <第 29 回> : 成果事例クローズアップ (九州地区ナノテクノロジー拠点ネットワーク)

## 酵素修飾ナノ構造炭素電極とバイオ燃料電池

熊本大学大学院自然科学研究科 富永昌人

九州大学大学院工学研究院 中嶋直敏



上左：熊本大学大学院自然科学研究科 富永昌人

上右：九州大学大学院工学研究院 中嶋直敏

### 1. はじめに

環境・エネルギー問題から、太陽電池、燃料電池、二次電池といった電池全般に対する関心が高まっています。酵素反応をベースとしたバイオ燃料電池は、生体と同様の穏やかな条件下での発電が可能のために安全性が高く、また種々の酵素の組み合わせにより多様な燃料を利用可能であり、エネルギー変換効率も高い理想の電池です。しかしながら、酵素の安定性は無機触媒のそれに比して低く、さらに酵素は一般的に無機触媒に比べて高価であり酵素を多量に用いた燃料電池の実用化はコスト的に厳しいなど、酵素ベース型バイオ燃料電池の長期安定動作には解決すべき困難な問題があります。上記問題を解決した場合には酵素ベース型バイオ燃料電池の実用化が大いに期待されます。すなわち、電極基板上に固定化した酵素を発電のために最大限に有効活用することで固定化酵素量を極微量にし、そのコストを大幅に削減できるようになります。このような酵素固定化電極として、電極とその表面上に固定化された酵素との間での直接的な電子移動反応が可能な電極設計様式が考えられます [1][2][3][4][5][6][7][8][9]。この場合に必要な酵素は、電極上で

の単分子層レベルの量 (ピコ mol/cm<sup>2</sup> レベル) で良いこととなります。ナノ構造炭素素材を用いることで極めて大きな電極面積を得ることが可能です。酵素と電極のコストを極めて低く抑えることが可能になると、酵素固定化電極の利用方法が従来とは大きく変わります。ディスプレイ型酵素固定化電極の定期的な交換や短時間使用を前提にした、酵素ベース型バイオ燃料電池の実用化も十分に可能と考えています。しかしながら、現状ではほとんど多くのケースにおいて、電極上に固定化された酵素全体量に対して直接的な電子移動反応に関与している酵素は極微量にすぎません。すなわち、電極上の大部分の酵素は直接型電子移動反応において不活性です。この原因には、電極上への吸着による酵素の変性と電子移動反応において不適切な酵素分子の吸着配向が主な要因と考えられますが、特に酵素分子の吸着配向が大きく影響を及ぼしていることが多くの文献から報告がなされています。

外部ユーザは、優れた導電特性と比表面積を有するナノカーボン構造体としてカーボンナノチューブをプラットフォーム電極として用いた、酵素修飾ナノ構造炭素電極の開発とその応用に関する研究を行っています [4][5][6][7][8]。本課題では、酵素ベース型バイオ燃料電池や高感度バイオセンサ電極の開発の観点から、酵素修飾ナノ構造炭素電極の作製とその評価のニーズが外部ユーザ側から提案されました。このニーズに対して、「九州地区ナノテクノロジー拠点ネットワークの分子・物質合成解析支援」による計測の支援がなされました。本稿では研究成果の一部を紹介します。

\* 問い合わせ：

九州地区ナノテクノロジー拠点ネットワーク

九州大学

〒819-0395 福岡市西区元岡 744

九州大学 伊都キャンパス W2-618

電話：092-802-2548

E-mail：nano\_office@nanoscience.cstm.kyushu-u.ac.jp

## 2. カーボンナノチューブ界面と電気化学反応

電気化学反応では、固体（電極）と液体とが接する固液界面において電子移動と物質移動とが起きます。従いまして、電極界面は電極反応に極めて大きな影響を及ぼします。カーボンナノチューブ（CNT）の界面に関しても電気化学反応の観点から十分に注意が払われて然るべきですが、CNT界面の清浄性を十分考慮していない研究報告も見受けられます。

本課題では、CNT界面の清浄さと電極反応について検討しました。清浄なCNT界面で測定するために合成直後のCNTを用いました。図1はアルコールCVD法で作製したCNT修飾金電極です。金電極基板上にCNTを合成した直後に電気化学測定が可能であり、測定溶液中で金基板からのCNT剥離はほとんどありません。ラマン分光法や透過型電子顕微鏡（TEM）測定の結果から、合成されたCNTは、直径約1nmの単層カーボンナノチューブ（SWCNT）であることが判りました。界面活性剤を用いて孤立分散化したCNTにおいて、光励起による発光現象（フォトルミネッセンス；PL）から半導体性CNTのカイ

ラリティを評価できます。本課題で合成したSWCNTのPLマッピング結果を図2に示します。カイラリティから決定されるSWCNTの直径は0.7～1.1nmでありTEM測定結果とも良く一致します。金電極上のSWCNT層が20 $\mu\text{m}$ のケースでは、電気二重層容量から評価されたCNT表面積は、見かけの電極面積の約1000倍になります。

電気化学測定プローブにはチトクロムcとフェロセンカルボン酸を用いました。両物質とも電気化学測定においては代表的な生体分子および錯体です。SWCNT合成直後の電極を用いますと、図3に示すように可逆なチトクロムcおよびフェロセンカルボン酸の酸化還元波が観測されました。酸化還元電位も一般的な電極で測定されたそれとほぼ同じ値です。本電極を研究室の室内の大気下に放置しておきますと、その暴露時間とともにいずれの酸化還元ピーク電流も小さくなり、その電極反応が抑制されることが示されました。特にチトクロムcのケースではその影響が顕著に示されました。チトクロムcの電極反応は電極界面の影響が極めて大きいことが知られています [8][9]。以上の結果は、一般的なCNTにも該当すると考えられます。市販品のCNTを用いての電気化学測定は、

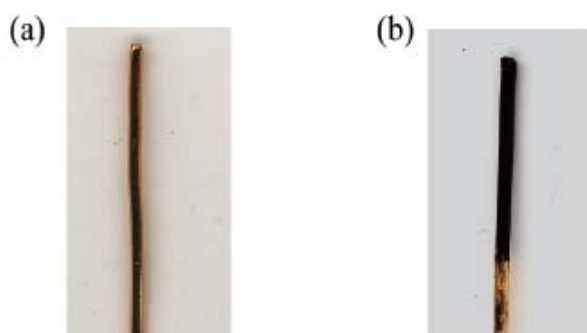


図1 SWCNT合成前 (a) と合成後 (b) の金ワイヤ。

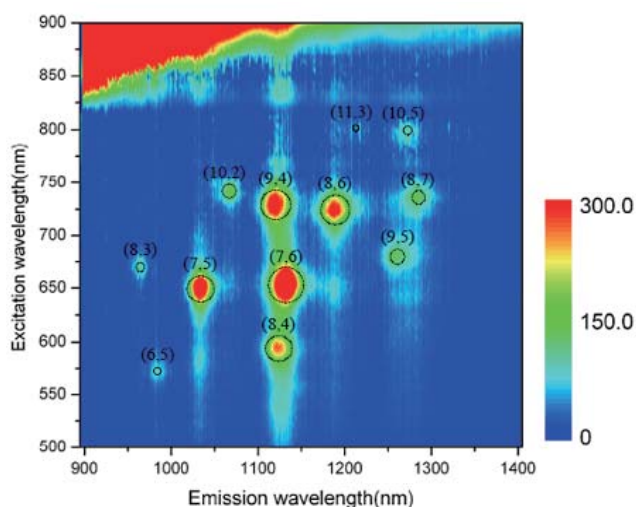


図2 金電極上に合成されたSWCNTのPLマップ。  
分散剤：コール酸ナトリウム。

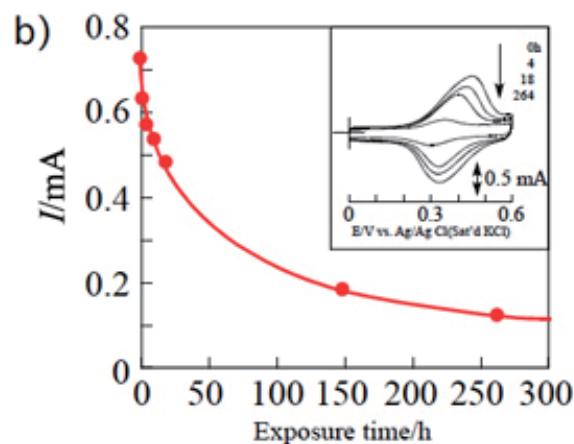
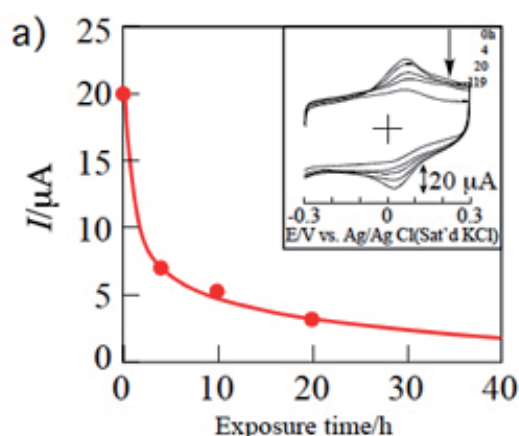


図3 SWCNT修飾金電極を用いたチトクロムc (a) およびフェロセンカルボン酸 (b) の電極反応に及ぼすSWCNT表面汚染の影響。チトクロムc測定の際にはSWCNTに酸化処理した電極を用いた。リン酸緩衝溶液 (pH 7) 中のチトクロムcおよびフェロセンカルボン酸の濃度は、それぞれ0.1Mおよび1mM。見かけの電極面積：0.25 cm<sup>2</sup>。

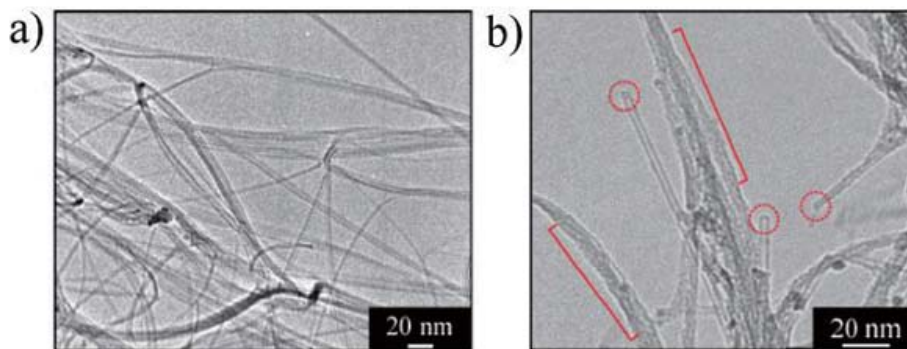


図4 CNTへのUV-オゾン処理前 (a) および処理後 (b) のTEM像. 処理時間は15分間.

その界面がなんらかの汚染を受けていると考えるのが妥当と思われ、測定や結果の考察にはそのことを十分に考慮する必要があると考えられます。

### 3. 電極反応特性に及ぼす SWCNT 酸化処理法の影響

CNTはその合成条件によって構造欠陥量が異なります。CNTの構造欠陥部位には、C-OやC=O、O-C=Oなどのカーボン酸化物官能基が存在します。一般的なカーボン電極の場合、これらのカーボン酸化物は電気化学反応に大きな影響を及ぼします。本課題では、高品質なSWCNTに電気化学法およびUV-オゾン法による酸化処理を施した場合の電気化学特性に及ぼす影響について検討しました。

UV-オゾン (UVパワー: 11 mW cm<sup>-2</sup>, オゾン濃度: ~100 ppm) 照射前後でのCNTのTEM写真を図4に示します。UV-オゾン処理後ではCNT表面構造が崩れている様子や先端のキャップ部位が開いている様子が観察されました。UV-オゾン処理時間の増加に伴って、SWCNTのラマンラマン測定から得られるGバンドピークが減少しました (図5)。GバンドはCNTのグラファイト構造由来のピークであることから、処理時間の増加によってSWCNTのグラファイト構造が破壊されることが判ります。その表面のX線光電子分光法 (XPS) 測定の結果から、C-OやC=O、O-C=Oなどの官能基の増加が処理時間とともに観測されました。電気化学的酸化処理 (中性溶液中、サイクル電位幅: 0 ~ 1.5 V vs. 銀 / 塩化銀電極) を施した場合にも、電位サイクル回数の増加とともにGバンドの減少およびカーボン酸化物官能基の増加が、UV-オゾンの場合と同様に観測されました。

UV-オゾン酸化および電気化学酸化処理されたSWCNT修飾金電極を用いてフェロセンカルボン酸のサイクリックボルタモグラムの測定し、そのシミュレーション解析を行いました (図6)。電子移動反応速度は、未処理SWCNT (0.45 ~ 1.4 × 10<sup>-3</sup> cm s<sup>-1</sup>) およびUV-オゾン処理SWCNT (0.45 × 10<sup>-3</sup> cm s<sup>-1</sup>) に対して電気化学酸化処理SWCNT (7.6 × 10<sup>-3</sup> cm s<sup>-1</sup>) は約1/20であるこ

とが解りました。ちなみに、カーボン電極として一般的なグラッシーカーボンでは16 × 10<sup>-3</sup> cm s<sup>-1</sup>でした。さらに重要なことは、実測したボルタモグラムとシミュレーションの合致の違いです。電気化学酸化処理SWCNTでは実測したものとシミュレーションとが極めて良く合致したのに対して、未処理およびUV-オゾン処理SWCNTのケースではあまり合致しませんでした。これは電極界面の均一性の違いが原因と考えられます。電気化学処理ではSWCNT全体が均一に酸化されたと考えられます。未処理SWCNTにはある程度の欠陥構造が存在しますので均一な界面でないと考えられます。UV-オゾン処理SWCNTでは、他の測定の結果からも総合的に考察した結果、SWCNT層 (約20μm) の表面層が処理されており、その層の深部まで処理が進んでいないことが原因と考えられます。以上の結果が示すように、SWCNTの欠陥構造は電気化学反応に極めて大きな影響を及ぼすことが解ります。

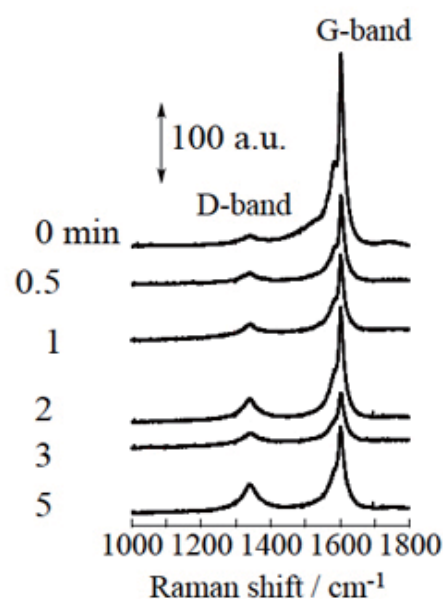


図5 SWCNTへのUV-オゾン処理時間とラマンピーク.



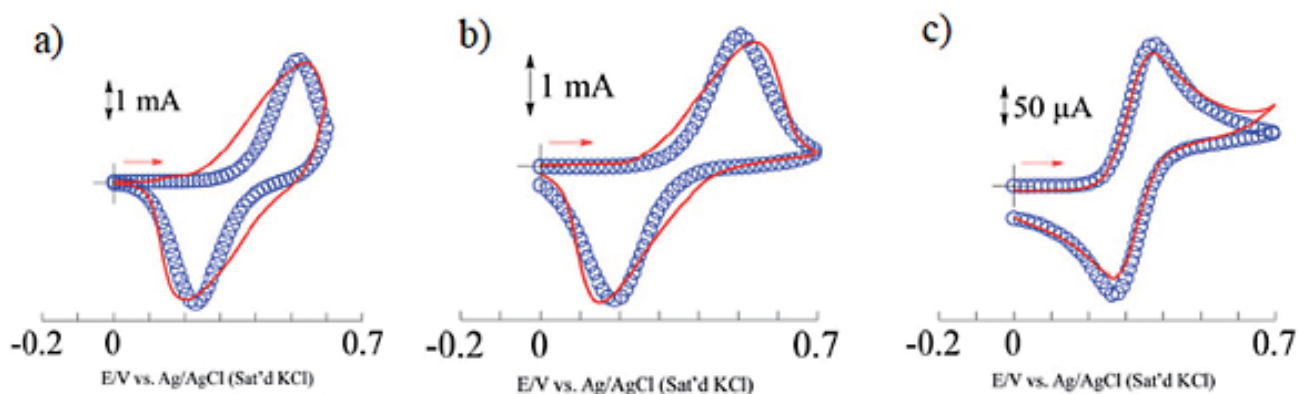


図6 SWCNT 修飾金電極上での 1 mM フェロセンカルボン酸 (リン酸緩衝溶液, pH 7) のサイクリックボルタモグラム (実線) およびそのシミュレーション (丸印). a) as-grown SWCNT ; b) UV- オゾン処理 SWCNT ; c) 電気化学処理 (20 回サイクル) SWCNT. 電位掃引速度 : 320  $\text{mV s}^{-1}$ . 見かけの電極面積 :  $0.25 \text{ cm}^2$ . シミュレーションパラメータ: 拡散係数 =  $5.8 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ , 不均一電子移動速度定数: a)  $0.45 \sim 1.4 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ ; b)  $0.45 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ ; c)  $7.6 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ .

#### 4. 酵素固定化 SWCNT と燃料電池への応用

CNT は優れた導電特性と比表面積を有するナノカーボン構造体であり, 酵素固定化電極作製のための優れたプラットフォーム電極です. 本稿では, ラッカーゼを用いた検討結果の一部を紹介します. ラッカーゼはマルチ銅酵素とよばれ, 銅錯体から構成された Type I, II, III の活性中心部位を有しています. マルチ銅酵素は酸素還元の間接体である過酸化水素を生成することなく, 4 電子還元により酸素分子を水分子まで還元することが可能です. その還元電位は中性付近の溶液中で  $+0.6 \sim 0.7 \text{ V}$  (vs. 銀/塩化銀電極) と極めて優れた酸素還元能を有しています. そのため酵素反応型バイオ燃料電池の酸素還元極としての利用が期待されている酵素の一つです [1][2].

ラッカーゼ (Lac) は *Trametes sp.* 由来のものを購入し, 含まれている安定化剤などをクロマトグラフィーで除去して精製したものを用いました. 合成直後の SWCNT 修飾金電極をすぐさま  $5 \mu\text{M}$  の Lac 溶液 (リン酸溶液, pH 5)

に浸漬し, Lac を SWCNT 表面に固定化しました. このようにして作製した電極では, Lac と SWCNT との直接型電子移動反応に基づく Lac による酸素の触媒還元電流が観測されます (図 7). Lac による触媒還元電流の大きさは, SWCNT の前処理によって異なることが判りました. すなわち, 5 回サイクルの電気化学酸化処理を施した SWCNT が最も大きな触媒電流を観測しました. SWCNT 上に吸着した酵素量はいずれの電極でも同程度であったこと, またそれらの酵素活性も同程度であったことから, 触媒電流の違いは吸着酵素量やその活性の違いに由来するものではありません. 電極上での酵素の直接型電子移動反応は界面上での酵素の吸着配向が重要です. 適度に酸化処理した SWCNT 上で Lac は電子移動反応に適した配向で吸着するものと考えられます (図 8).

Lac 固定化 SWCNT 修飾金電極で観測された触媒還元電流は時間経過とともに徐々に減少します. これは酵素が SWCNT から脱離するため, もしくは酵素の SWCNT への強い吸着のため酵素が変性したためと考えられます. 一

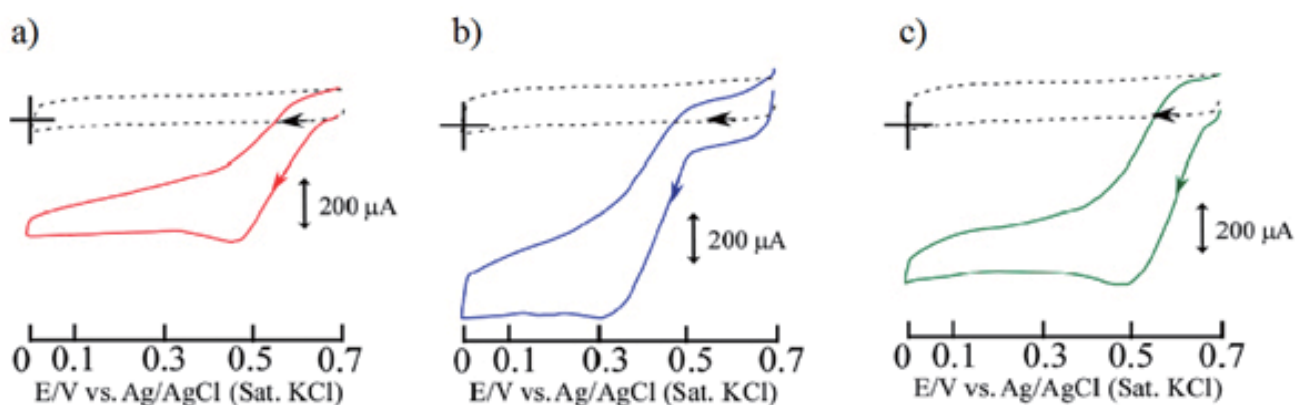


図7 Lac 固定化 SWCNT 修飾金電極上で観測された, Lac と SWCNT との直接型電子移動反応に基づく Lac による酸素の触媒還元電流. a) as-grown SWCNT ; b) 電気化学処理 (5 回サイクル) SWCNT ; c) 電気化学処理 (10 回サイクル) SWCNT. 酸素飽和のリン酸溶液 (pH 5) 中: 実線. アルゴン飽和のリン酸溶液: 波線. 電位掃引速度 :  $20 \text{ mV s}^{-1}$ . 見かけの電極面積 :  $0.25 \text{ cm}^2$ .

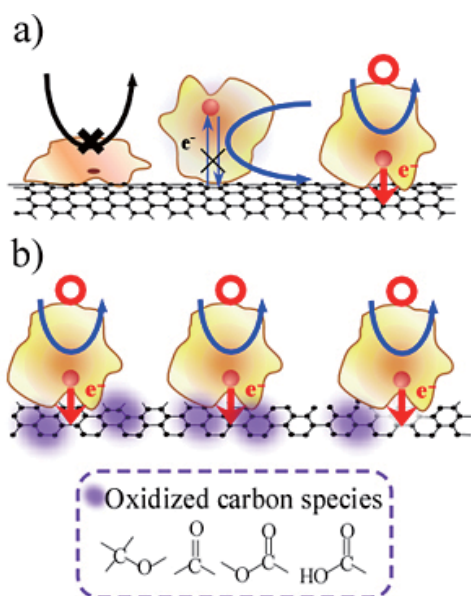


図8 As-grown SWCNT (a) および酸化処理 SWCNT (b) 上での Lac の吸着配向の模式図。

週間後では、触媒還元電流はおよそ半分程まで小さくなります。ところで、脂質を修飾剤に用いた電極では、固定化酵素の酸化還元反応を阻害することなく、その固定化酵素を安定化することが知られています [10]。SWCNT を生体脂質のフォスファチジルコリンであらかじめ修飾した後に Lac を固定化したものは、一週間後でも 80% 近くの活性を保つことが可能となり、脂質膜修飾 SWCNT は酵素の活性保持に有用であることが明らかになりました。

フルクトースデヒドロゲナーゼ (FDH) および Lac を固定化した SWCNT 修飾金電極を用いて、フルクトース-酸素バイオ燃料電池を作製しました [6][7]。図9の模式図に示すように、酸化極と還元極とを隔てるセパレーターも必要なく、シャープペン芯程度の直径の SWCNT 修飾金電極に FDH と Lac を浸漬固定化したものを、フルクトースと酸素を含む溶液中に浸漬することで、開回路ポテンシャル:0.78 V, 最大電流密度:0.6 mA cm<sup>-2</sup>, 最大電力:0.2 mW cm<sup>-2</sup> を示すシンプルな燃料電池が作製できました。

## 5. おわりに

ナノカーボン材料は、電子配線や電極材料さらには再生医療の細胞足場やドラッグデリバリーシステムなど、電子材料から医療分野の広範囲での応用が期待されています。本稿では、カーボンナノチューブの有する優れた導電性および比表面積に注目し、酵素固定化のプラットフォーム電極として用いた最近の結果を紹介しました。また、カーボンナノチューブを電気化学測定の電極材料として用いる際の界面特性についても併せて紹介しました。酵素修飾ナノ構造炭素電極の応用例として酵素ベース型燃料電池を紹介しましたが、酸化極と還元極とに固

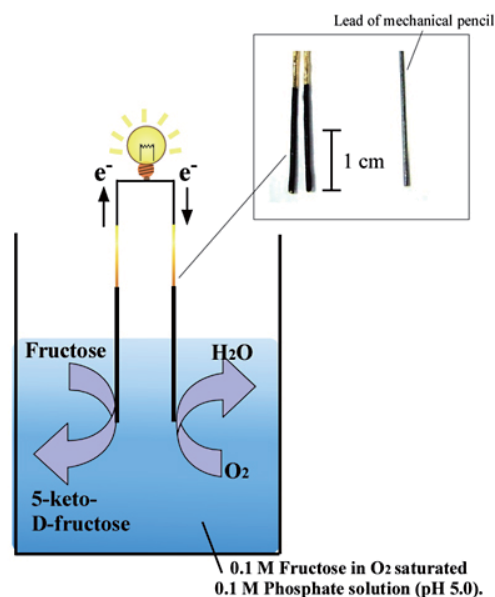


図9 FDH および Lac 固定化 SWCNT 修飾金電極を、それぞれフルクトース酸化極および酸素還元極とした燃料電池の模式図。

定化されたトータルの酵素量は、数十ナノ mol 程度です。「はじめに」にも記載しましたが、電極界面上での酵素固定化の最適化がなされると、更なる出力の向上が期待されます。ディスプレイ酵素固定化電極を用いた酵素ベース型燃料電池の実用化も将来的には可能になるものと考えています。

## 謝辞

本稿の PL 測定結果は、九州地区ナノテクノロジー拠点分子・物質合成解析において、田中泰彦博士 (現 佐世保高専) にご協力いただきました。松本 学氏 (現 東芝), 野村真也氏 (現 ソニー LSI デザイン), 西村敏史氏 (現 東芝), 金子詩織氏 (現 同仁化学研究所), 山口裕之氏 (現 カネカ), 深道佑一氏 (現 日東電工), 坂本伸悟氏 (現 外部ユーザ研究室 D2) に実験のご協力を頂きました。また、本研究課題は 2008 年度まで旧谷口研究室 (谷口 功教授, 現 熊本大学学長) で行われました。この場を借りて謝意を申し上げます。

## 参考文献

- [1] M. Tominaga, M. Ohtani and I. Taniguchi, Phys. Chem. Chem. Phys., 10 (2008) 6928.
- [2] M. Tominaga, M. Otani, M. Kishikawa and I. Taniguchi, Chem. Lett., 35 (2006) 1174.
- [3] M. Tominaga, C. Shirakihara and I. Taniguchi, J. Electroanal. Chem., 610 (2007) 1.
- [4] M. Tominaga, A. Ohira, A. Kubo, I. Taniguchi and M. Kunitake, Chem. Commun., (2004) 1518.

- [5] M. Tominaga, S. Nomura and I. Taniguchi, *Electrochem. Commun.*, 10 (2008) 888.
- [6] M. Tominaga, S. Nomura and I. Taniguchi, *Biosens. Bioelectron.*, 24 (2009) 1184.
- [7] M. Tominaga, S. Kaneko, S. Nomura, S. Sakamoto, H. Yamaguchi, T. Nishimura and I. Taniguchi, *ECS Transactions* 16 (2009) 1.
- [8] M. Tominaga, H. Yamaguchi, S. Sakamoto and I. Taniguchi, *Chem. Lett.*, 39 (2010) 976.
- [9] M. Tominaga, N. Hirata and I. Taniguchi, *Electrochem. Commun.*, 7 (2005) 1423.
- [10] M. Tominaga, S. Hashimoto, A. Misaka and N. Nakashima, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 2790.

(熊本大学 富永昌人)