

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：52201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15353

研究課題名(和文) ソフト界面で自発重合する環境適応型導電性マテリアル合成プロセスの革新

研究課題名(英文) Selectively and environmentally-friendly process advancing on a soft-interface to synthesize electroconductive material

研究代表者

加島 敬太 (Kashima, Keita)

小山工業高等専門学校・物質工学科・准教授

研究者番号：90710468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では流動性を有するソフト界面を反応場とした酵素反応による材料合成の構築として、ラッカーゼを用いた導電性ポリアニリン-エメラルジン塩(PANI-ES)の選択的合成を検討した。界面活性剤で形成した分子二重膜小胞体が最適なソフト界面として働くことを見出すとともに、アニリンとアニリン二量体(PADPA)を複合原料とすることで、安定な導電性を有するPANI-ES様の生成物が得られることを示した。また、ソフト界面が安定化した領域が形成されることで、PANI-ESが選択的に合成される機構を明らかにした。さらに、新規な原料としてチロシンとフェノールの反応を評価し、結合部位を制御できる可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で着目したソフト界面を反応場として導入した酵素反応による導電性ポリアニリンの合成法は、温和なpH条件で化学的酸化剤を用いることなく、室温中で原料を混合するのみの簡便な操作で、目的分子を選択的に合成できる点で、環境適合性に優れた材料合成プロセスとして新規性が高い。特に、酵素として既に工業的な利用に実績のある食品工業用ラッカーゼを選択し、有効性を明らかにした点は、実用的なプロセス構築に有益な知見である。さらに、ソフト界面が反応の選択性を制御する機構を解明するとともに、新規な原料の検討として生体分子群の反応系に可能性を見出した点は、将来的な発展性に富んだ成果として価値の高い成果である。

研究成果の概要(英文)：An industrial laccase-catalyzed synthesis of electroconductive polyaniline in emeraldine salt form (PANI-ES) in the presence of soft-interface was investigated. It was found that vesicles from AOT known as a surfactant well worked as reaction templates. PANI-ES like products with highly stabilized radical cations were obtained from the oxidation of mixture of aniline and its dimer. The presence of AOT vesicles has an insignificant effect on the formation of enzyme-substrate complex during reaction. On the other hand, the interaction between AOT and aniline dimer as a substrate decreased fluidity of soft interface of AOT vesicles remarkably. This trend agreed with the characteristics of reaction products obtained. The interaction between substrate and soft interface would be key factor for the mechanisms on selective synthesis of objective product. In addition, the reaction using tyrosine and phenol were also investigated and the possibility for broad application was found.

研究分野：生物化学工学

キーワード：ポリアニリン-エメラルジン塩 ベシクル AOT アニリン p-アミノジフェニルアミン ラッカーゼ  
チロシン フェノール

## 1. 研究開始当初の背景

生体内の反応を触媒する酵素を用いた材料分子の合成は、温和な条件で反応が進行するため、環境適応型の物質生産手法として期待されている技術分野である。実用化に向けて、目的物の合目的な合成に向けた反応選択性の付与が重要である。そこで、反応経路を制御する因子として、酵素反応にテンプレートと称される官能基が配列した分子群を導入する手法が研究展開されている。近年、酵素反応を制御するテンプレートとして、両親媒性分子が形成する流動性を持った分子集合膜のソフト界面（ベシクル、ミセル）の有効性が見出されてきた。

本研究で注目した導電性ポリアニリンは、安価なアニリンを原料として合成可能であり、成膜が容易なため、需要拡大が続いている導電性ポリマーである。アニリンの重合体は種々の形をとり得るが、アニリンが一定方向で直鎖状に結合し、かつ構造中に非局在化したラジカルカチオンを有するポリアニリン-エメラルディン塩 (Polyaniline emeraldine salt, PANI-ES) のみが優れた導電性を示す。しかし、従来の有機化学合成法では $-30^{\circ}\text{C} \sim -20^{\circ}\text{C}$ の超低温・ $\text{pH}=1 \sim 2$ の強酸条件と、安全性に懸念のある酸化剤・有機溶媒を使用するため、設備費、エネルギー消費、生産過程で生じる廃棄物処理、安全確保を含めた人件費などのコスト低減に向けて、環境適応型プロセスの開発が課題となっている。また、ポリアニリンは重合過程によって複数の酸化還元状態をとり得るため、絶縁体の酸化物を含まない高純度な PANI-ES の合成には、高度な重合制御が必要である。

導電性を有する PANI-ES の合成に向けて、酸化還元酵素によるアニリンの酸化反応に、硫酸基を有する電解質ポリマー、ミセル、ベシクルをテンプレートとして導入する手法が有効であることが明らかにされている。これらの反応で主に検討されてきたペルオキシダーゼは、反応の進行に過酸化水素の添加が必要である。一方、本研究で着目したラッカーゼを用いた反応系は、溶液中に溶存する酸素の存在によって反応が進行する点でプロセス設計の工程が省略でき、優位性が高い。しかし、ラッカーゼを用いた反応においては、アニリンを基質として PANI-ES を選択的に合成する報告は無く、アニリンの二量体である *p*-aminodiphenylamine (PADPA) を基質とした反応に限定されていた。PADPA は空気中で酸化されやすく、反応に供する前に再結晶化による精製が必要であり、高いコストが課題であった。また、これまで検討されていた酸化還元酵素は高価であり、安価で入手可能な酵素の検討が重要であった。さらに、テンプレートが酵素反応を制御する機構には未知な点が多く、反応の選択性を担う因子の解明を通して、アニリン系以外の反応系への応用の可能性を見出すことが期待されている。

## 2. 研究の目的

本研究は、食品工業用ラッカーゼを用いた導電性ポリアニリン PANI-ES の選択的合成法の最適化を軸として、1) 原料基質として PADPA の一部をアニリンに置き換える複合基質系の検討、2) 反応生成物の詳細分析と反応条件の最適化、3) 酵素と基質、並びにテンプレートの相互作用による選択性への寄与の解明を目的とする取り組みである。本反応の模式図を図 1 に示す。また、4) アニリン系以外の反応系としてチロシンとフェノールの酸化反応を検討した。

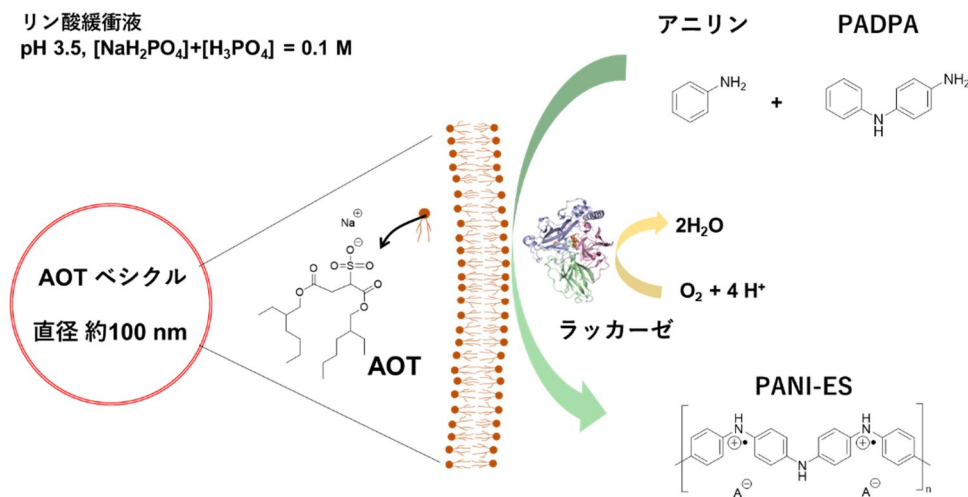


図1 AOTベシクルをテンプレートとして導入し、ラッカーゼと酸素を触媒としたアニリン+アニリン二量体 (PADPA) の酸化反応による導電性ポリアニリン-エメラルジン塩 (PANI-ES) の合成

### 3. 研究の方法

#### 1) 複合基質系の検討

アニリン、アニリン二量体である PADPA、並びに種々の比率でアニリンと PADPA を添加した混合基質を、テンプレートと共存させた pH 3.5 のリン酸緩衝液中にてラッカーゼの添加により酸化させることで、得られた生成物を評価した。本研究では酵素として、既に工業的な利用の実績がある食品工業用ラッカーゼ(Y120, Amano Enzyme, Japan)を選択した。また、ソフト界面を有するテンプレートとして、界面活性剤である sodium bis (2-ethylhexyl) sulfosuccinate (aerosol AT, AOT)で形成した分子二重膜(ベシクル)を分散させた。生成物を含む反応液を、紫外可視近赤外分光光度測定(Ultra violet-visible-Near Infrared, UV/Vis/NIR)により評価した。

#### 2) 反応生成物の詳細分析と酵素濃度の検討

上記方法で得られた反応液に含まれるラジカル生成量を電子スピン共鳴(Electron Paramagnetic Resonance, EPR)を用いて測定した。また、diethyl ether と tert-butyl methyl ether (MTBE)の混合溶媒に反応生成物を抽出し、フーリエ変換赤外線分光法(Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR)で分析した。さらに、反応生成物をアンモニアと hydrazine で脱プロトン化、および還元して MTBE で抽出し、この抽出物を液体クロマトグラフィー(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)を用いて分析した。HPLC 分析では、検出器としてフォトダイオードアレイ(Photo Diode Array, PDA)、および質量分析装置(Mass spectrometry, MS)を用いて生成物を分析した。また、種々の濃度条件で添加した食品工業用ラッカーゼによる複合基質の酸化反応を行い、反応生成物を UV/Vis/NIR スペクトラム測定により評価することで、最適酵素濃度を検討した。

#### 3) 酵素と基質、並びにテンプレートによる相互作用の評価

これまで得られた最適反応条件を用いて、酵素と基質、並びにテンプレートの相互作用を個別に検討することで、選択的な PANI-ES の合成に寄与する因子を検討した。

定量性に優れたモデル基質として、2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS)を選択し、AOT ベシクルを添加した pH 3.5 のリン酸緩衝液中にて、食品工業用ラッカーゼの添加により酸化させた。反応の進行を紫外可視分光光度計による吸光度測定で経時的に評価し、初期反応速度を求めた。種々の ABTS 濃度条件で初期反応速度を求めることで、ラッカーゼによる ABTS の酸化反応を定量的に評価した。また、対照として AOT ベシクルを添加しない系においても初期反応速度を測定し、反応生成物に対するテンプレートの有無による影響を解析した。

AOT ベシクルの表面を形成する二分子膜界面の流動性に対する基質の影響を明らかにするために、蛍光プローブ分子として 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH)を用いた蛍光偏向解消度測定を行った。

#### 4) 新規な原料基質の展開

本手法を応用し、食品添加用ラッカーゼと酸素によるチロシンの酸化に、AOT ベシクルをテンプレートとして導入した反応を検討した。反応 pH はラッカーゼの最適条件である pH 3.5、並びにチロシンの pKa 2.2 を下回る pH 2.0 にて反応を進行させた。反応液をチロシンの等電点である pH 5.7 に調整し、冷蔵庫内で冷却することで生成物の結晶を採取し、FTIR で分析した。また、フェノールを基質として同様の酸化反応を検討した。

### 4. 研究成果

#### 1) 原料基質の複合によるポーラロンの安定化

AOT ベシクルを共存させた pH 3.5 のリン酸緩衝液中にて、アニリン、PADPA、並びに種々の比率でアニリンと PADPA を添加した混合基質を、ラッカーゼの添加により酸化させ、反応液の吸光スペクトルを評価した。PANI-ES の導電性を担うラジカルカチオン(ポーロン)は 420nm と 1000nm 付近に明確な吸収を示すことが知られている。図 2 に、反応開始 24 時間後における波長 1000nm の吸光度 ( $A_{1000}$ ) に対するアニリンと PADPA の複合比率の影響を示す。基質がアニリンのみのとき、ポーロンの生成は確認できなかった。複合基質における PADPA 比率の増大にともなって、 $A_{1000}$  は増大し、アニリン 0.6 mM + PADPA 0.7 mM の条件にて最大値となり平衡に達した。したがって、最適な基質の複合比率をアニリン 0.6 mM + PADPA 0.7 mM に決定した。

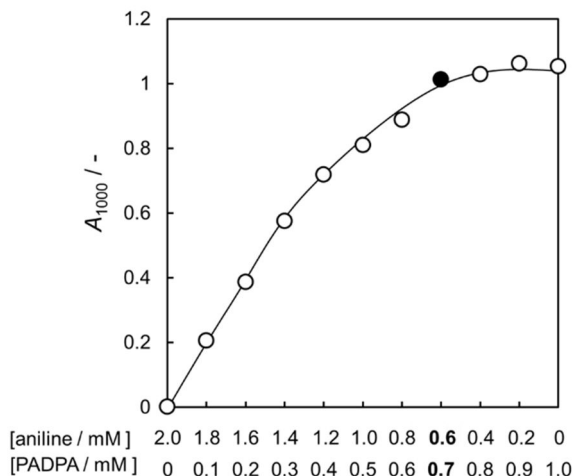


図2 波長1000nmにおける吸光度 ( $A_{1000}$ ) に対するアニリンとPADPAの複合比率の影響

アニリン、PADPA、並びに最適比率の混合基質で反応させた生成物の吸光スペクトラムを経時的に測定した。ポーラロンの生成を示す  $A_{1000}$  の経時変化を図 3 に示す。最適な混合基質条件の反応では、反応開始後 24 時間までに  $A_{1000}$  の値が増大し、その後は 4 週間以上安定であった。一方、PADPA のみを基質とした反応では、複合基質系と同様に反応開始後 24 時間までに最大値に達したが、その後は低下し、半酸化状態といえるポーラロンのラジカルカチオンが完全酸化に向かって進行し、ポーロンが減少することが示唆された。また、アニリンのみを基質とした場合、ポーロンの形成は確認されなかった。アニリンと PADPA の複合基質系とすることで、本来は反応性が高く不安定なラジカルカチオンの安定性を向上できることを明らかにした。

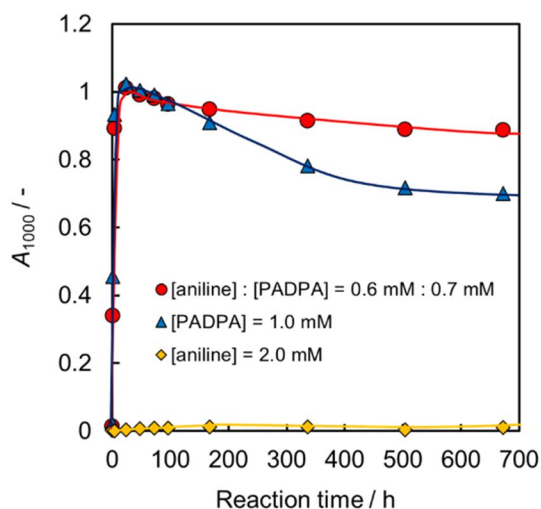


図3 ポーラロンの生成を示す  $A_{1000}$  の経時変化

## 2) 反応生成物の特性評価と酵素濃度の最適化

最適混合比率のアニリンと PADPA を、AOT ベシクルを分散させた pH 3.5 のリン酸緩衝液中にて食品工業用ラッカーゼと酸素により酸化させることで、得られた反応生成物を EPR 測定で分析した。PANI-ES のラジカルカチオンに由来すると考えられる有意なシグナルピークが得られた。また、反応生成物の抽出物の FTIR 分析を行ったところ、ポーロン構造中の C-N 伸縮振動および C=C 伸縮振動に帰属される  $1240\text{ cm}^{-1}$ ,  $1570\text{ cm}^{-1}$  のピークが得られた。一方、HPLC-DAD/MS 分析からは、主たる反応生成物がアニリンの四量体であることが示された。これらの結果によって、本反応の生成物はポーロンを有する PANI-ES 様のアニリン四量体であることを明らかにするとともに、食品工業用ラッカーゼの有効性を示した。

また、種々の濃度で食品工業用ラッカーゼを添加した反応における初期反応速度と、 $A_{1000}$  の最大値から、最適なラッカーゼ濃度条件を 18 nM に決定した。

## 3) 酵素と基質、並びにテンプレートの相互作用による反応選択性への寄与

本研究では、食品工業用ラッカーゼと酸素が触媒するアニリンとアニリン二量体(PADPA)の複合基質の酸化反応に、AOT ベシクルをテンプレートとして導入することで、深緑色を呈する導電性のポリアニリン-エメラルジン塩(PANI-ES)様の重合体が選択的に得られることを明らかにした。この反応系において、AOT ベシクルを添加しない場合、赤紫色の酸化物が得られ、PANI-ES を合成することはできなかった。また、ラッカーゼを添加しない場合、無色透明なまま反応は進行しなかった。そこで、反応生成物の選択性を支配する因子を解明するために、以下の検討を行った。

まず、酵素と基質の複合体形成に寄与する因子を理解するために、食品工業用ラッカーゼを酵素として、ABTS をモデル基質とした酸化反応に、テンプレートとして AOT ベシクルを添加した反応と、添加しない反応を比較し、酸化反応による ABTS ラジカルの生成における初期反応速度を測定した。得られた初期反応速度を Michaelis-Menten 式に適用し、最大反応速度と Michaelis 定数を求めた。さらに、得られた最大反応速度と Michaelis 定数を用いて Hill の式による解析を行った。その結果、AOT ベシクルを添加した系では、非添加の系と比較して最大反応速度は低下した。一方、酵素と基質の反応活性点の数と理解される Hill 定数は、AOT ベシクルの有無に関わらず、およそ 1.1 となり、AOT ベシクルの存在は酵素であるラッカーゼとモデル基質である ABTS による酵素基質複合体の形成に支配的な影響を生じないことを明らかにした。

また、AOT ベシクルの表面を形成する二分子膜界面の流動性に対する、基質分子の存在の影響を明らかにするために、蛍光プローブ分子として DPH を用いた蛍光偏角測定を行った。その結果、PADPA の添加濃度の増大にともなって、AOT 膜界面の流動性は顕著に低下した(図 4)。膜界面近傍に接近した PADPA と AOT 分子群の相互作用によって、AOT ベシクルの分子集合界面で相互的に引力を生じ、膜界面が安定

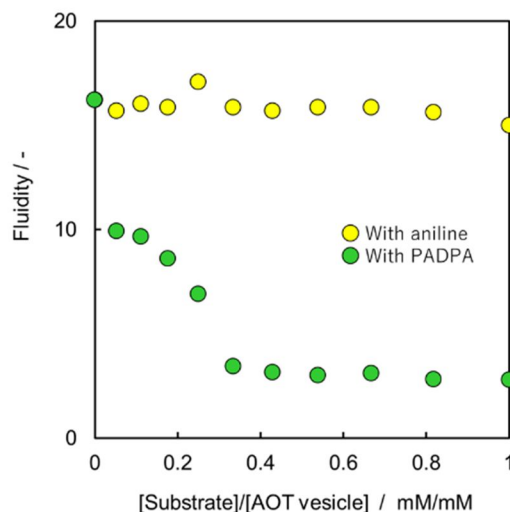


図4 AOTベシクル膜の流動性に対するアニリン、並びにPADPAの添加による影響

化した領域を形成することが示唆された。一方、アニリンを添加した系においては、濃度に関わらず AOT ベシクルの膜界面の流動性に変化は生じなかった。この傾向は、アニリンのみを基質にした系で反応が進行せず、PADPA が基質として主体となった場合に PANI-ES 様の生成物が得られた結果と合致した。このことから、pH 3.5 のリン酸緩衝液中でアニリンと PADPA を基質とし、ラッカーゼと酸素を触媒とした PANI-ES 様の生成物の選択的な合成には、PADPA と AOT ベシクルの膜界面間で生じる相互引力が支配的に働いていることを明らかにした。

#### 4) 生体分子を原料基質とした新奇な反応系の展開

酵素反応にテンプレートを導入することで目的分子を選択的に合成する反応系は、本研究で注目した導電性ポリアニリンに集中して研究が進められており、種々の物質生産への展開に向けた検討が期待されている。そこで本研究では、アミノ酸であるチロシンに着目し、ラッカーゼと酸素による酸化反応に AOT ベシクルを分散させた反応系を評価した。pH 3.5、並びに pH 2.0 で進行させた反応生成物を結晶化して採取し、FTIR で測定した。pH 3.5 の反応系で得られた生成物において、フェノール由来の O-H 吸収が減少するとともに、単量体では確認されなかったエーテル結合(C-O-C)を示す吸収が得られたことから、チロシンの酸化による重合体の形成が示唆された(図 5a)。一方、pH 2.0 の反応系で得られた生成物では、エーテル結合を示す吸収とともに、ペプチド結合の吸収が得られた(図 5b)。これより、アミノ酸であるチロシン重合体の合成に適用できることを示すとともに、反応溶液系の pH を調整することで、反応生成物を制御できる可能性を見出した。

一方、フェノールを基質とした反応では、ラッカーゼ濃度の増大に伴って褐色の反応物が生成されることが確認された。今後、反応条件の最適化と生成物の評価手法の構築に取り組み、より詳細な検討を行っていく。

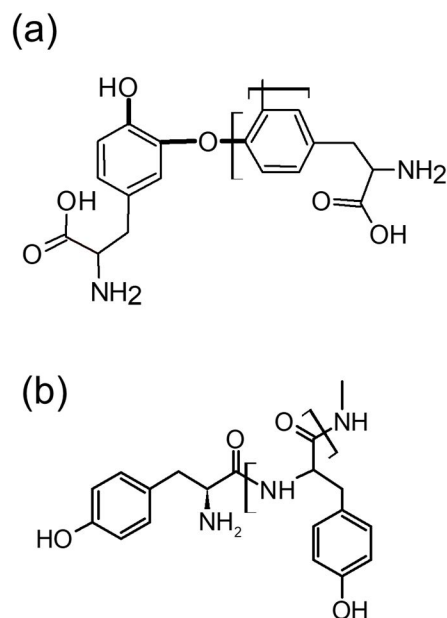


図5 チロシンの重合 (a) エーテル結合の形成、(b) ペプチド結合の形成

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 加島敬太	4. 巻 46
2. 論文標題 アニオン性ソフト界面をテンプレートとした酵素反応による導電性ポリアニリンの合成	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 膜	6. 最初と最後の頁 71 - 77
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5360/membrane.46.71	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yuto Nakano, Keita Kashima, Masanao Imai, Peter Walde
2. 発表標題 How an industrial laccase and anionic vesicles work on the oxidation of a mixture of the two substrates aniline and p-aminodiphenylamine in order to synthesize polyaniline in its conductive emeraldine salt form
3. 学会等名 11th Edition of International Conference on Catalysis, Chemical Engineering and Technology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中野雄斗, 加島敬太, 今井正直
2. 発表標題 アニオン性界面で進行する導電性ポリアニリンの酵素合成におけるlaccaseの活性評価
3. 学会等名 第23回化学工学会学生発表会 2021年3月6日
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中野雄斗, 加島敬太
2. 発表標題 ベンジル界面でのaniline/p-aminodiphenylamineの酵素酸化におけるlaccase濃度の寄与
3. 学会等名 第6回関東磐越地区化学技術フォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoyuki Fujisaki, Keita Kashima, Peter Walde
2. 発表標題 On the enzymatic oxidation of aniline, p-aminodiphenylamine (PADPA) or their mixtures by using an industrial laccase and vesicles as templates
3. 学会等名 12th European Congress of Chemical Engineering & 5th European Congress of Applied Biotechnology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoyuki Fujisaki, Keita Kashima, Peter Walde
2. 発表標題 Effect of Monomer Composition on the Laccase/O <sub>2</sub> -Catalyzed Oxidation of Aniline and p-Aminodiphenylamine in the Presence of Anionic Vesicles
3. 学会等名 The 4th International Symposium on Process Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤崎 智行, 加島 敬太, Peter Walde
2. 発表標題 ソフト界面でのアニリン単量体/二量体の酵素酸化による導電性ポリアニリンの合成
3. 学会等名 第22回化学工学会学生発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤崎 智行, 加島 敬太, Peter Walde
2. 発表標題 導電性ポリアニリンの酵素合成と基質組成の制御によるポーラロンの安定化
3. 学会等名 第10回福島地区CEセミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤崎 智行, 加島 敬太, Peter Walde
2. 発表標題 AOTベシクル存在下での酵素酸化による導電性polyanilineの合成における基質組成の寄与
3. 学会等名 第5回関東磐越地区化学技術フォーラム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	Walde Peter  (Walde Peter)	ETH Zurich・Department of Materials・Professor	
研究協力者	今井 正直  (Imai Masanao)  (80193655)	日本大学・生物資源科学部・教授   (32665)	
研究協力者	高屋 朋彰  (Koya Tomoaki)  (90515553)	小山工業高等専門学校・物質工学科・准教授   (52201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
スイス	ETH Zurich		