



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102017265 A

(43) 申请公布日 2011. 04. 13

(21) 申请号 200980115610. 3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 04. 23

H01M 8/16 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C12N 9/02 (2006. 01)

2008-122574 2008. 05. 08 JP

C12N 15/00 (2006. 01)

H01M 4/90 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 11. 01

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2009/058065 2009. 04. 23

(87) PCT申请的公布数据

W02009/136548 JA 2009. 11. 12

(71) 申请人 索尼公司

地址 日本东京

(72) 发明人 中川贵晶 汲田英之 后藤义夫

酒井秀树 角田正也

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限  
责任公司 11240

代理人 吴孟秋 梁韬

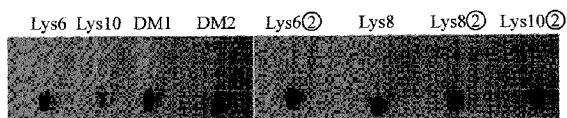
权利要求书 1 页 说明书 7 页 序列表 2 页  
附图 2 页

(54) 发明名称

新型酶电极和使用该酶电极的燃料电池

(57) 摘要

本发明提供了利用酶作催化剂进行氧化还原反应的酶电极。在该酶电极中,固定在酶电极上的酶通过将至少一个对预定氨基酸残基进行编码的密码子加入或插入到对该酶进行编码的碱基序列而被改性,从而提高与反应基质或电子转移介质的亲和性和/或反应速度。由于电极上的氧化还原反应高效进行,所以该酶电极可提高所获得的电能输出。因此,适用于所有类型的燃料电池、生物传感器和电子设备。



1. 一种酶电极，其中，利用酶作为催化剂进行氧化还原反应，并且  
通过将至少一个编码特定的氨基酸残基的密码子加入或插入到编码所述酶的碱基序列中来改变所述酶，从而提高与反应基质或电子转移介质的亲和性和 / 或反应速度，并固定所述酶。
2. 根据权利要求 1 所述的酶电极，其中，通过静电相互作用来提高与所述反应基质或电子转移介质的亲和性和 / 或反应速度。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的酶电极，其中，所述氨基酸残基具有与所述反应基质或电子转移介质的电荷相反的电荷。
4. 根据权利要求 3 所述的酶电极，其中，所述电子转移介质是其氧化形式或还原形式为阴离子的介质，并且所述氨基酸残基是从赖氨酸残基、组氨酸残基和精氨酸残基中选择的一种氨基酸。
5. 根据权利要求 1 所述的酶电极，其中，通过亲水性或疏水性相互作用提高与所述反应基质或电子转移介质的亲和性。
6. 根据权利要求 5 所述的酶电极，其中，所述反应基质或所述电子转移介质是亲水性物质，并且氨基酸是亲水性氨基酸。
7. 根据权利要求 5 所述的酶电极，其中，所述反应基质或电子转移介质是疏水性物质，并且所述氨基酸是疏水性氨基酸。
8. 一种燃料电池，其中，利用酶作为催化剂在电极上进行氧化还原反应，并且  
通过将至少一个编码特定的氨基酸残基的密码子加入或插入到编码所述酶的碱基序列中来改变所述酶，从而提高与反应基质或电子转移介质的亲和性和 / 或反应速度，并且所述酶固定在正极和负极中的至少一个上。

## 新型酶电极和使用该酶电极的燃料电池

### 技术领域

[0001] 本发明涉及酶电极。更具体地，涉及一种这样的酶电极，其中使用起催化剂作用的酶进行氧化还原反应，且被改良以实现更高的输出，还涉及使用该酶电极以实现更高输出的燃料电池。

### 背景技术

[0002] 近年来，因为可有效地从燃料（如不易与常规工业催化剂反应的葡萄糖和乙醇）中提取电子，所以具有固定在负极和正极中至少一个电极上用作催化剂的氧化还原酶的燃料电池（以下称为“生物燃料电池”），作为下一代具有高容量和安全性的燃料电池，已备受关注。

[0003] 用图 5 描述了一般的生物燃料电池的反应方案。在图 5 所示的使用葡萄糖作为燃料的生物燃料电池中，葡萄糖的氧化反应在负极处进行（图 5(a)），而大气中的氧（ $O_2$ ）的还原反应在正极处进行（图 5(b)）。

[0004] 对电子流详细说明如下。在负极处，电子以如下顺序连续转移到葡萄糖、葡萄糖脱氢酶、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（ $NAD^+$ ）、心肌黄酶、电子转移介质、然后转移到电极（碳）。

[0005] 相反，在正极处，从负极释放的电子以如下顺序连续转移到电极（碳），电子转移介质，然后到胆红素氧化酶（ $BOD$ ），且用电子和从外部供应的氧气进行还原反应从而产生电能。

[0006] 虽然这样的生物燃料电池作为高度安全的燃料电池而引起了注意，但是它们具有如下问题，即，比其它燃料电池输出低。因此，最近研究了制造具有高输出的生物燃料电池（如参考 PTL 1 和 PTL2）。

[0007] 例如，根据 PTL 1 中所述的生物燃料电池，电极由具有多孔结构的导电元件（金属、导电聚合物、金属氧化物、碳材料等）构成，并且酶、电子转移介质等被固定在孔中，从而提高每块有效面积的载酶密度并提高电流密度。

[0008] 根据 PTL 2 中所述的生物燃料电池，阴极由诸如碳的多孔材料以及固定在其上的酶和电子转移介质构成，并且阴极的至少一部分设置为与气相的用作反应基质的空气或氧气接触，因此可充分发挥高电极特性。

[0009] 除了通过修改电极结构来实现较高输出的技术，还有通过改变固定在电极上的酶自身使燃料电池实现较高输出的技术。例如，PTL3 公开了通过脱氢酶和心肌黄酶的融合制备蛋白质，且该融合蛋白质固定在负极上从而有效地执行从基质到电极的电子转移反应，且因此使得生物燃料电池具有较高输出。

[0010] 而且，PTL 4 公开了如下技术，即，通过在电极上固定通过结合两种或多种不同类型的酶蛋白质构成的结合蛋白质，从而由于形成结合蛋白质的两种类型的酶蛋白质之间相对距离小，有效执行从基质到电极的电子转移反应，使得生物燃料具有较高输出。

[0011] 应该注意，为了提高生物燃料电池的输出，必须提高待固定在电极上的酶和反

应基质（具体地，电子转移介质）之间的反应效率。酶和反应基质之间的反应由亲和性（ $K_m$ ）和反应速度（ $k_{cat}$ ）表达，且这两个参数是通过酶与反应基质的组合确定的，因此，必须寻找彼此兼容的酶和反应基质（具体地，电子转移介质）。

[0012] 然而，为了提高生物燃料电池的输出，需要在由电子转移介质等决定的电势保持高水平下而获得高电流；因此，在目前的情况下，酶和反应基质的组合受到限制，且输出值受到限制。

[0013] 引用文献列表

[0014] 专利文献

[0015] PTL 1：日本未审查专利申请公开第 2006-234788 号

[0016] PTL 2：日本未审查专利申请公开第 2006-93090 号

[0017] PTL 3：日本未审查专利申请公开第 2007-163185 号

[0018] PTL 4：日本未审查专利申请公开号第 2006-163268 号

## 发明内容

[0019] 技术问题

[0020] 如上所述，已经从各种角度开发了提高生物燃料电池输出的技术，但获得电能的生物燃料电池的基本原理都是基于电极上的氧化还原反应；因此，不提高反应基质和电极上的酶之间的反应效率就不能获得根本的解决方案。

[0021] 因此，本发明的主要目的是人工提高固定在生物燃料电池电极上的反应基质和酶之间的兼容性，以便提高电极上的反应效率，因此使得生物燃料电池能够实现更高输出。

[0022] 技术方案

[0023] 问题的解决方案

[0024] 本申请的发明人进行了广泛研究以便提高电极上的反应基质和酶之间的反应效率从而实现前述目的，结果，通过关注酶和反应基质之间的静电相互作用、亲水性和疏水性相互作用而成功地人工提高了酶和反应基质之间的兼容性，并做出本发明。

[0025] 首先本发明提供了酶电极，其中利用作为催化剂的酶进行氧化还原反应，且通过将至少一个特定的氨基酸残基进行编码的密码子加入或插入到对酶进行编码的碱基序列中来改变酶，从而提高与反应基质或电子转移介质的亲和性和 / 或反应速度，并固定该酶。

[0026] 不特别限制改变酶的方法，只要该方法通过将至少一个对特定氨基酸残基进行编码的密码子加入或插入到对酶进行编码的碱基序列中而提高与反应基质或电子转移介质的亲和性和 / 或反应速度；然而，例如，静电相互作用可用于提高与反应基质或电子转移介质的亲和性和 / 或反应速度。

[0027] 不特别限制氨基酸残基；然而，例如，可使用具有与反应基质或电子转移介质的电荷相反的电荷的氨基酸残基。

[0028] 也不特别限制电子转移介质和氨基酸残基的具体类型；然而，例如，当其氧化形式或还原形式是阴离子的介质用作电子转移介质时，可从赖氨酸残基、组氨酸残基和精氨酸残基中选择氨基酸残基。

[0029] 而且，通过利用亲水性或疏水性相互作用而提高与反应基质或电子转移介质的亲和性和 / 或反应速度的方法可用作改变酶的方法。

[0030] 在这种情况下，当反应基质或电子转移介质是亲水性物质时，将亲水性氨基酸用作氨基酸残基，而当反应物质或电子转移介质是疏水性物质时，将疏水性氨基酸用作氨基酸残基，从而提高亲和性和 / 或反应速度。

[0031] 接下来，本发明提供了燃料电池，用酶作为催化剂在电极上进行氧化还原，通过将至少一个对特定氨基酸残基进行编码的密码子加入或插入到对酶进行编码的碱基序列中来改变酶，从而提高与反应基质或电子转移介质的亲和性和 / 反应速度，且所述酶固定在正极和负极中的至少一个上。

[0032] 本发明使用的技术术语将在下面说明。

[0033] 本发明使用的“酶的改变”指的是，加入或插入对氨基酸残基进行编码的一个或多个密码子，从而改变诸如稳定性和与反应基质或电子转移介质的亲和性和 / 或反应速度的特性，而不改变酶蛋白质的功能。

[0034] 本发明的有益效果

[0035] 根据本发明的酶电极使得在电极上高效进行氧化还原反应，且因此可提高最终的电能输出。

#### 附图说明

[0036] 图 1 是示出了实施例 1 中 Lys6 基因的 DNA 测序结果的代替示图的曲线图。

[0037] 图 2 是示出实施例 1 中 Lys8 基因的 DNA 测序结果的代替示图的曲线图。

[0038] 图 3 是示出实施例 1 中 Lys10 基因的 DNA 测序结果的代替示图的曲线图。

[0039] 图 4 是示出由实施例 2 中 Lys6-BOD 基因、Lys8-BOD 基因和 Lys10-BOD 基因表达的酶的 BOD 活性的有无的代替示图的照片。

[0040] 图 5 是示出一般生物燃料电池的反应方案的示意图。

#### 具体实施方式

[0041] 以下说明执行本发明的优选实施方式。注意，下面所述实施方式是本发明代表性实施方式的实例，不能用这些实施方式狭隘地解释本发明的范围。

[0042] < 酶电极 >

[0043] 根据本发明的酶电极是利用作为催化剂的酶进行氧化还原反应的电极，并且是其上固定有已改变过的酶从而提高与反应基质或电子转移介质的亲和性和 / 或反应速度的电极。

[0044] 通过将至少一个对特定氨基酸残基进行编码的密码子加入或插入对酶进行编码的碱基序列中来完成的酶的改变。在这种情况下，“改变”指的是，通过在不改变酶的性质同时加入或插入至少一个特定氨基酸残基，来提高与反应基质或电子转移介质的亲和性和 / 或反应速度。

[0045] 不特别限制改变酶的具体方法，只要是通过将至少一个对特定氨基酸残基进行的密码子加入或插入到对酶进行编码的碱基序列中，来提高与反应基质或电子转移介质的亲和性和 / 或反应速度；然而，例如，可通过利用静电相互作用或亲水性或疏水性相

互作用来提高与反应基质或电子转移介质的亲和性和 / 或反应速度。

[0046] 至于通过利用静电相互作用而提高亲和性和 / 或反应速度的具体方法, 例如, 可将对具有与所使用的反应基质或电子转移介质相反的电荷的氨基酸残基进行编码的密码子加入或插入到对酶进行编码的碱基序列编码中, 以便提高所要固定的酶和反应基质或电子转移介质之间的亲和性和 / 或反应速度。

[0047] 更具体地, 在使用具有负电荷的反应基质或电子转移介质的情况下, 将对具有正电荷的氨基酸残基进行编码的密码子加入或插入对酶进行编码的碱基序列中, 且在使用具有正电荷的反应基质或电子转移介质的情况下, 加入或插入对具有负电荷的氨基酸残基进行编码的密码子; 因此, 可以提高表达的酶和反应基质或电子转移介质之间的亲和性和 / 或反应速度。

[0048] 此外, 因为将对具有电荷的氨基酸残基进行编码的密码子加入或插入到对酶进行编码的碱基序列中, 所以可由于静电相互作用而将酶固定在电极上, 且因此使酶电极稳定化。

[0049] 此外, 可减少在电极上固定酶所需的材料, 结果, 可降低酶电极的制造工艺成本。

[0050] 不特别限制可用于利用静电相互作用的电子转移介质。具有负电荷的电子转移介质(其氧化形式或还原形式为阴离子的介质)的实例包括诸如 ABTS(2, 2' - 连氨基双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸盐)(2, 2' - azinobis(3-ethylbenzoline-6-sulfonate)) 的色素, 以及诸如六氰合铁离子和八氰合钨离子的氰基金属络合物, 并且电子转移介质(其氧化形式或还原形式为阳离子的介质)的实例包括吡啶、联吡啶等与其配位的金属络合物, 如  $[\text{Os}(\text{trpy}3)]^{3+/2+}$ 、 $[\text{Os}(\text{py})_2(\text{bpy})_2]^{3+/2+}$  和  $[\text{Fe}(\text{dpy})]^{3+/2+}$ 。

[0051] 具有正电荷的氨基酸的实例包括赖氨酸残基、组氨酸残基和精氨酸残基, 并且它们可单独使用或者作为两种或多种类型的组合使用。

[0052] 其中, 特别优选组氨酸残基。一般地, 当将酶固定在电极上时, 执行使用聚-L-赖氨酸的酶的固定方法; 然而, 当将对赖氨酸残基进行编码的密码子加入或插入到对酶进行编码的碱基序列中时, 存在如下优点, 即, 可以在不使用聚-L-赖氨酸的情况下将酶固定在电极上, 且因此可降低聚-L-赖氨酸材料的成本。

[0053] 具有负电荷的氨基酸残基的实例包括天冬氨酸残基和谷氨酸残基, 这些氨基酸残基可单独使用或作为两种或多种类型的组合使用。

[0054] 使用亲水性或疏水性相互作用提高亲和性的具体方法涉及当使用亲水性反应基质或电子转移介质时, 将对亲水性氨基酸残基进行编码的密码子加入或插入到对酶进行编码的碱基序列中, 并且当使用疏水性反应基质或电子转移介质时, 将对疏水性氨基酸残基进行编码的密码子加入或插入到对酶进行编码的碱基序列中, 以便提高表达的酶和反应基质或电子转移介质之间的亲和性和 / 或反应速度。

[0055] 不特别限制可在利用亲水性或疏水性相互作用时使用的电子转移介质。亲水性电子转移介质的实例包括具有 Log P 值(即, 亲水性 / 疏水性的一般参数)小于 0 的电子转移介质, 如氰基金属络合物(如六氰合铁离子和八氰合钨离子)、醌(如 Q0)和色素(如 2, 2' - 连氨基双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸盐))。疏水性电子转移介质的实例包括 Log P 值大于 0 的电子转移介质, 如 VK1、VK3、苯醌和蒽醌。

[0056] 亲水性氨基酸残基的实例包括丙氨酸残基、缬氨酸残基、亮氨酸残基、异亮氨酸残基、蛋氨酸残基、色氨酸残基、苯基丙氨酸残基和脯氨酸残基，并且这些氨基酸残基可单独使用或作为两种或多种类型的组合使用。

[0057] 疏水性氨基酸残基的实例包括甘氨酸残基、丝氨酸残基、苏氨酸残基、半胱氨酸残基、酪氨酸残基、天冬酰胺残基 (asparagineresidue)、谷氨酸残基、赖氨酸残基、组氨酸残基、精氨酸残基、天冬氨酸残基和谷氨酸残基，且这些氨基酸残基可单独使用或作为两种或多种类型的组合使用。

[0058] 根据本发明的可固定在酶电极上的酶的类型没有特别限制，可自由选择任何已知的酶。例如，当将根据本发明的酶电极用作正极时，可固定具有氧化酶活性和用作反应基质的酶，例如漆酶、胆红素氧化酶 (BOD) 或抗坏血酸氧化酶。

[0059] 在将根据本发明的酶电极用作负极时可固定的酶没有特别限制；然而，例如，当使用含有糖作为反应基质的基质时，优选固定通过氧化来降解糖的氧化酶。氧化酶的实例包括葡萄糖脱氢酶、葡萄糖酸-5-脱氢酶、葡萄糖酸-2-脱氢酶、醇脱氢酶、醛还原酶、醛脱氢酶、乳酸脱氢酶、羟基丙酮酸还原酶、甘油酸脱氢酶、甲酸脱氢酶、果糖脱氢酶和半乳糖脱氢酶。

[0060] 而且，当将根据本发明的酶电极用作负极时，除了上述氧化酶，还可固定氧化的辅酶和辅酶氧化酶。氧化的辅酶的实例包括烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD<sup>+</sup>)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADP<sup>+</sup>)、黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD<sup>+</sup>) 和吡咯喹啉醌 (PPQ<sup>2+</sup>)。辅酶氧化酶的实例是心肌黄酶。

[0061] 而且，可将电子转移介质固定在本发明的酶电极上，以便使由氧化还原反应产生的电子向电极顺利转移。可固定在本发明的酶电极上的电子转移介质的类型没有特别限制，可自由选择任何已知的电子转移介质。例如，当将根据本发明的酶电极用作正极时，可固定 ABTS (2, 2'-连氨基双 (3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸盐)、K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 等作为电子转移介质。

[0062] 而且，例如，当将根据本发明的酶电极用作负极时，可固定 2-氨基-3-羧基-1, 4-萘醌 (ACNQ)、维生素 K<sub>3</sub>、2-氨基-1, 4-萘醌 (ANQ)、2-氨基-3-甲基-1, 4-萘醌 (AMNQ)、2, 3-二氨基-1, 4-萘醌、锇 (Os)、钌 (Ru)、铁 (Fe)、钴 (Co) 等的金属络合物、诸如苜蓿紫精的紫精化合物、具有醌骨架的化合物、具有烟酰胺结构的化合物、具有核黄素结构的化合物、或具有核苷酸磷酸盐结构的化合物。

[0063] 注意，可使用任何已知材料作为用于根据本发明的酶电极的材料，而没有特别限制，只要该材料可电连接到外部。其实例包括金属，如 Pt、Ag、Au、Ru、Rh、Os、Nb、Mo、In、Ir、Zn、Mn、Fe、Co、Ti、V、Cr、Pd、Re、Ta、W、Zr、Ge 和 Hf；合金，如阿留麦尔镍合金 (alumel)、黄铜、硬铝、青铜、镍格林合金、铂铑、海波可、坡莫合金、坡明德合金、德银和磷青铜；导电聚合物，如聚乙炔；碳材料，如石墨和炭黑；硼化物，如 HfB<sub>2</sub>、NbB、CrB<sub>2</sub> 和 B<sub>4</sub>C；氮化物，如 TiN 和 ZrN；硅化物，如 VSi<sub>2</sub>、NbSi<sub>2</sub>、MoSi<sub>2</sub> 和 TaSi<sub>2</sub>，以及这些物质的混合物。

[0064] < 燃料电池 >

[0065] 根据本发明的燃料电池是在具有起催化剂作用的酶的电极上进行氧化还原反应的燃料电池，并且是将改变的酶固定在正极和负极的至少一个上从而提高与反应基质或

电子转移介质的亲和性和 / 或反应速度的燃料电池。

[0066] 通过将至少一个对特定氨基酸残基进行编码的密码子加入或插入到对酶进行编码的碱基序列中来完成酶的改变。根据本发明的燃料电池的电极细节与上面讨论的酶电极的细节相同；因此，这里省略其说明。

[0067] 除了电极之外，根据本发明的燃料电池的结构、功能等没有特别限制，并可进行自由设计，只要使用了根据本发明的酶电极即可。

[0068] 因为在根据本发明的燃料电池电极上高效地进行氧化还原反应，所以可提高获得的电能的输出。而且，因为电极自身的稳定性高，所以可提供具有良好耐用性的燃料电池。

[0069] < 电子设备 >

[0070] 根据本发明的燃料电池可产生大输出电流和电压，此外，具有耐用性；因此，其适用于所有类型的已知电子设备。

[0071] 不特别限制电子设备的结构、功能等，只要可使用根据本发明的燃料电池即可，并且包括所有电操作设备。其实例包括：电子设备，如收集、移动设备、机器人、个人计算机、游戏机、车载设备、家用电器和工业产品；移动产品，如汽车、自行车、飞机、火箭和宇宙飞船；医学设备，如分析仪、起搏器发电机和诸如生物传感器的体内设备；以及发电系统和热电联产系统，如通过分解垃圾来发电的系统。

[0072] 实施例 1

[0073] 在实施例 1 中，制备基因，其中对特定氨基酸残基进行编码的密码子结合在对酶进行编码的碱基序列中，从而改变可固定在根据本发明的酶电极上的酶。

[0074] 具体地，用可固定在根据本发明的酶电极上的作为酶实例的 BOD 和作为氨基酸残基的赖氨酸残基来制备将赖氨酸残基结合到胆红素氧化酶（以下称为“BOD”）末端的基因。

[0075] 首先，将分别结合有四个、六个、八个和十个赖氨酸残基的 pMET $\alpha$ B 载体 Lys4、Lys6、Lys8 和 Lys10 制备为 BOD 基因载体，如表 1 所示。

[0076] [表 1]

[0077]

pMET $\alpha$ B 载体	
Lys4	GGG ACTAGT CAC TTT TTC TTT TTC TCGTCAGCTGCGGCGTAAGG
Lys6	GGG ACTAGT CAC TTT TTC TTT TTC TTT TTC TCGTCAGCTGCGGCGTAAGG
Lys8	GGG ACTAGT CAC TTT TTC TTT TTC TTT TTC TTT TTC TCGTCAGCTGCGGCGTAAGG
Lys10	GGG ACTAGT CAC TTT TTC TTT TTC TTT TTC TTT TTC TTT TTC TCGTCAGCTGCGGCGTAAGG

} Spe I 位点
 成熟 BO 的 C 末端：具有 Spe I 位点的终止密码子

[0078] 含 BOD 基因的基因（以下称为“Lys4-BOD 基因”、“Lys6-BOD 基因”、“Lys8-BOD 基因”、“Lys10-BOD 基因”）是通过 PCR 技术，利用如上制备的 pMET $\alpha$ B 载体 Lys4、Lys6、Lys8 和 Lys10 制备的。接下来，通过连接将这些基因（Lys4-BOD 基因、Lys6-BOD 基因、Lys8-BOD 基因、Lys10-BOD 基因）结合到质粒中。质粒转化到大肠杆菌中并使用限制性培养基展开（develop）。

[0079] 结果，分别获得对照菌落（无质粒）、Lys4、Lys6、Lys8 和 Lys10。分别拾取

菌落，在 Spe I 和 EcoRI 处切断，并进行凝胶电泳以确认目标载体 (pMET  $\alpha$  B 载体 Lys4、Lys6、Lys8 和 Lys10) 是否转化。

[0080] 然后对 Lys4、Lys6、Lys8 和 Lys10 基因中的每个都进行 DNA 测序从而确认目标 Lys 序列。DNA 测序的结果分别在图 1 至图 3 中示出 (Lys6：图 1，Lys8：图 2，Lys10：图 3)。

[0081] 实施例 2

[0082] 在实施例 2 中，将实施例 1 中制备的质粒转化到甲醇毕赤酵母 (*Pichia Methanolica*) 从而研究有无 BOD 活性。

[0083] 使用 pMAD11 的感应细胞，将用限制性酶 ASC1 切除的 Lys4 基因、Lys6 基因、Lys8 基因和 Lys10 基因分别转化到甲醇毕赤酵母，并在 MD 培养基中展开，且从每种基因得到两个菌落。

[0084] 用 BMDY 培养菌落将其并转移到 BMMY 从而诱导 BOD 的表达。为此，加入 ABTS (2, 2' - 连氨基双 (3- 乙基苯并噻唑啉 -6- 磺酸盐)，并观察了颜色变绿的过程，从而进行是否有 BOD 活性的表达检查。结果在图 4 中示出。注意，图 4 中的文字 DM1 和 DM2 表示未结合赖氨酸残基的 BOD。

[0085] 如图 5 所示，所有酶中都确认了 BOD 活性。因此，在实施例 2 中，确认由将赖氨酸残基结合到对 BOD 进行编码的碱基序列的末端的基因表达的改变的蛋白质保持了 BOD 活性。

[0086] 工业适用性

[0087] 根据本发明的酶电极允许在电极上高效进行氧化还原反应，且因此导致电能输出可以提高。因此，其可以用在各种类型的燃料电池、生物传感器和电子设备中。

[0088] 而且，如果用在燃料电池、生物传感器和电子设备中，则因为电极自身的稳定性高，所以根据本发明的酶电极可提供高耐用性的燃料电池、生物传感器和电子设备。

[0089] 而且，根据本发明的酶电极可减少在电极上固定酶所需的材料；因此，有助于降低酶电极自身和燃料电池、生物传感器、电子设备等的制造成本。

[0001]

## 序列表

- <110> 索尼公司
- <120> 酶电极以及燃料电池
- <130> 07904977
- <160> 4
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
- <211> 44
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> Lys4-BOD 的载体
- <400> 1
- gggactagtc actttttctt tttctcgtea gctgcggcgt aagg 44
- <210> 2
- <211> 50
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> Lys6-BOD 的载体
- <400> 2
- gggactagtc actttttctt tttctttttc tcgtcagctg cggcgtaagg 50
- <210> 3
- <211> 56
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> Lys8-BOD 的载体
- <400> 3
- gggactagtc actttttctt tttctttttc tttttctcgt cagctgcggc gtaagg 56
- <210> 4
- <211> 62
- <212> DNA
- <213> 人工序列

[0002]

---

<220>

<223> Lys10-BOD 的载体

<400> 4

gggactagtc actttttctt tttcttttc tttttcttt tctcgtcagc tgcggcgtaa 60

gg 62

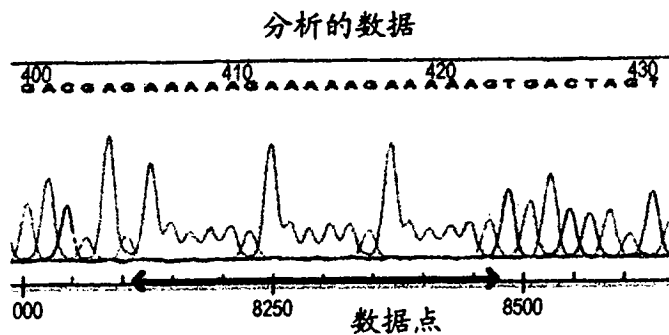


图 1

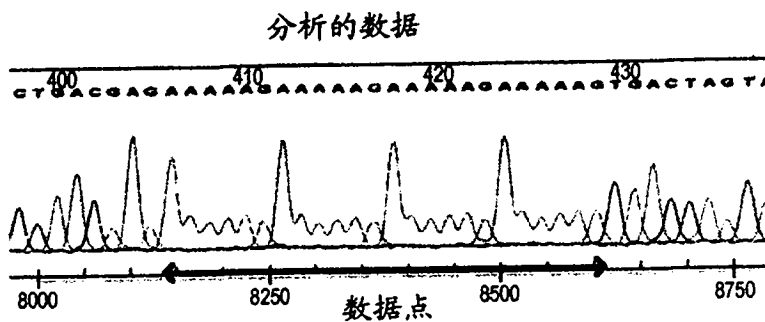


图 2

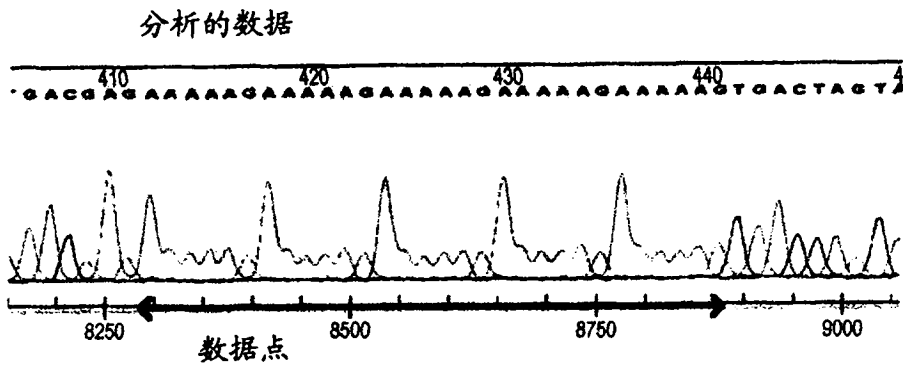


图 3

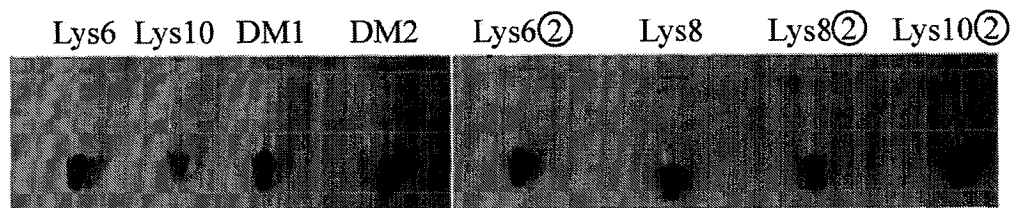


图 4

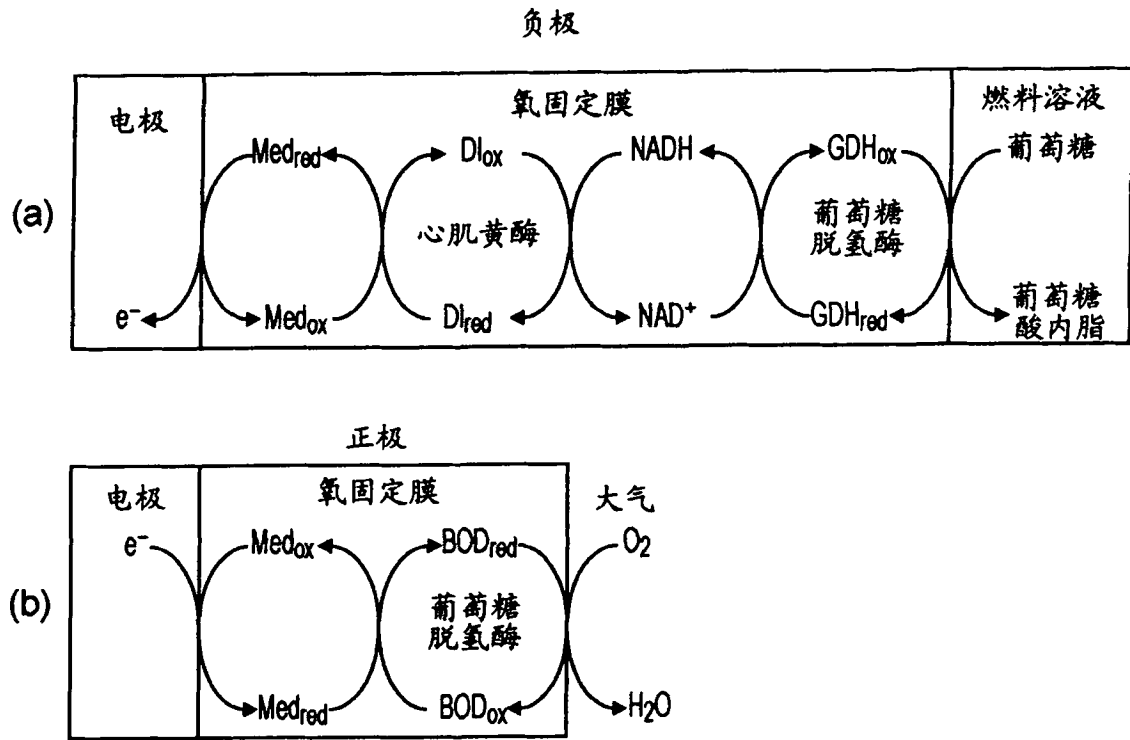


图 5