

令和元年6月24日現在

機関番号：54401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K06880

研究課題名(和文)分極改善に基づく高性能な微生物-酵素ハイブリッド型燃料電池の開発

研究課題名(英文) Development of a high performance microorganism-enzyme hybrid fuel cell based on polarization improvement

研究代表者

西岡 求 (NISHIOKA, Motomu)

大阪府立大学工業高等専門学校・その他部局等・教授

研究者番号：40304034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：バイオディーゼル生産に伴う廃グリセリンを微生物燃料電池によりエネルギー化しつつ処理する反応系の構築を目指した。アノード触媒(微生物)、電極構造、プロトン交換膜の電力生成に及ぼす影響を電流-電圧曲線から分極特性を基に検討し、2筒型セルのグリセリン微生物燃料電池を製作した。またカソード反応系を酸化剤(フェリシアン化カリウム)から白金触媒系、酵素触媒系に変更してもグリセリン微生物燃料電池の発電能力は維持され、アノード槽に微生物、カソード槽に酵素を用いるハイブリッド型微生物燃料電池が機能することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バイオディーゼル生産に伴う廃グリセリンの処理を可能とする微生物燃料電池システムの開発を行った。既存の有機廃棄物の処理とエネルギー回収を行う方法は、嫌気発酵によるバイオガス生産が主流であるが、新しい選択肢として微生物燃料電池により直接電気エネルギーへ変換する方法を提案できた。また微生物燃料電池の性能向上を目指す上で、分極特性の評価に基づくシステムの最適化、有機物を分解し電子を取り出すアノード槽反応に微生物を利用し、電子を還元するカソード槽反応に酵素を用いるハイブリッド型微生物燃料電池を提案した。

研究成果の概要(英文)：We aimed to construct a reaction system that processes waste glycerol from biodiesel production and converts it into electrical energy using a microbial fuel cell. The effects of the anode catalyst (microorganisms), electrode structure, and the proton exchange membrane on power generation were examined based on the polarization characteristics from the current-voltage curve, and the two-cylinder type glycerol microbial fuel cell was fabricated. When the cathodic reaction system was changed from an oxidant (potassium ferricyanide) to a platinum catalyst or an enzyme catalyst, the power generation ability of the glycerol microbial fuel cell was maintained, indicating that a hybrid microorganism fuel using microorganisms in the anode tank and an enzyme in the cathode tank works well.

研究分野：生物学・生物化学工学

キーワード：バイオ燃料電池 バイオマス グリセリン 電極反応 電気化学 微生物 酸化還元酵素

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

酵素反応あるいは微生物反応における電子伝達鎖から電子を奪い電極に移すことでエネルギー生産を行うのがバイオ燃料電池である。生物反応を利用して化学エネルギーから直接電気エネルギーに変換しようとする発想そのものは古く、1960～1980年代にかけて研究はされていた。1990年代になり生命科学に関する知見が飛躍的に向上し、バイオエレクトロカタリシス反応の定量的解析法が確立したことから、2001年以降世界的にもバイオ燃料電池の研究が活発化している。

バイオ燃料電池は生体触媒に酵素を使用する酵素バイオ燃料電池(Enzymatic Biofuel Cells)と微生物そのものを利用する微生物燃料電池(Microbial Fuel Cells: MFC)に大別される。酵素燃料電池は、糖やアルコールを燃料として1～数段階の電子引き抜きの酸化反応により電流発生を導くタイプであり、医療、情報などへの利用を想定した微小電源としての開発が注目されている(A. Heller, Phys. Chem. Chem. Phys., 6, 209-216, 2004)。一方、微生物そのものを利用するMFCは、多様な燃料基質を多段階で酸化することが可能であるため、環境中の有機物を利用した発電のみならず環境浄化に付加価値を見いだすことができる(D. Pant, et al., Bioresour Technol., 101, 1533-1543, 2010; 渡邊一哉 監修, 微生物燃料電池による廃水処理システム最前線, NTS, 2013)。

しかしながら発生する電力が少ないことや発電の安定性の問題から実用化への道りは遠いのが実情である。生命系研究者、材料・化学系研究者を中心に精力的な研究・開発が続けられているが、燃料電池(FC)に見られるような工学的なアプローチはまだ不十分といえる。バイオ燃料電池の電流-電圧特性(I-V特性)は低温動作型FCに類似したものとなる。電圧降下要因である抵抗分極、拡散分極、活性化分極それぞれに、バイオ燃料電池を構成する要素がどのように影響を与えるかを定量的に把握することは、バイオ燃料電池の開発の効率化に大きく寄与するものといえる。一方、バイオ燃料電池を構成する要素に目を向けた場合、燃料酸化極となるアノード極と酸素還元極となるカソード極の構造が、生物科学および材料化学的に大きなポイントとなる。電極への電子移動に優れた特性を有する微生物をアノード極に利用することで発電量の向上が報告されている(D. R. Lovley and K. P. Nevin, Curr. Opin. Biotechnol., 22, 441-448, 2011)。糖以外のさまざまな燃料ソースの利用を考えた場合、燃料ソースの資化に優れた微生物(群)を利用できるほうが好ましく、微生物の選択に影響されにくいアノード極の開発が必要と考える。他方、カソード極には、アノード極と異なり微生物を積極的に利用しなければならない理由は存在せず、将来的な電池構造の簡略化を考えた場合、構造が簡略化できる白金電極や酵素修飾電極のほうがむしろ好ましい。白金等の電極素材として利用価値の高い金属材料は高価のものが多く、生産方法・生産量しだいでは劇的に低価格化が可能な酵素のカソード極への利用を考えることは将来性が高い選択といえる。

### 2. 研究の目的

微生物燃料電池における電圧降下要因である分極に及ぼす電池構成要素の影響を定量的に捉える工学的アプローチを基礎として、MFCの性能向上を図る上で重要な要素であるアノードおよびカソード電極反応の改善を行う。MFCのアノードおよびカソード反応における特性を考慮し、燃料酸化極であるアノード極には基質を多段階に酸化できる微生物を用い、酸素還元極であるカソード極には反応の効率化に関する研究が進んでいる酵素修飾電極を使用するハイブリッド型微生物燃料電池(HMFC)システムを組み上げる。さらにMFC運転条件および電池構造の最適化を行う。

アノード極のモデルとしては、研究事例も多い酵母-グルコース系に加え、廃棄物の有効利用の観点からグリセリンを燃料ソースとするグリセリン-グリセリン資化菌系を使用する。バイオマスのエネルギー転換では糖(および糖から生成されるアルコール)が主流であるが、バイオディーゼル(BDF)も一定量の割合を占めている。BDF生産の過程では大量のグリセリンが発生しその抜本的な処理方法は未解決であるため、グリセリンはMFCの燃料ソースとして有望である。

バイオ燃料電池の研究では、微生物・酵素、電極材料の開発に力点が置かれており、電池の構造からの性能向上のアプローチはほとんどされていない。これらの高性能な微生物・酵素や電極材料が見いだされても、電池としての構造や運転方法が最適化されなければ電池システムとしては最高の性能を出すことはできない。本研究では、分極に及ぼす電池構成要素の影響を定量的に理解し、多様な基質を燃料ソースとして利用でき多段階酸化できる微生物をアノード電極触媒として利用し、酸素還元極であるカソード電極触媒には高出力化・効率化の研究が進んでいる酵素を利用することで、MFCと酵素バイオ燃料電池の「良いとこ取り」をしたHMFCシステムの開発とその最適化を目指すことを特徴としている。

### 3. 研究の方法

#### (1)グリセリン資化微生物の分離と同定

グリセリンを単一炭素源として生育できる微生物を大阪府立大学高等専門学校キャンパス内の土壌と近隣を流れる寝屋川から分離した。各収集地点から収集された土壌塊を滅菌水で洗浄し、これらの上清をグリセリンを単一炭素源として含む100 mLの培地に接種し、25°Cの好気条件下で2週間培養した。その後、グリセリン濃度を段階的に濃くした培地で継代培養を行

い、最終的に 10% グリセリンを含む培地中で生育した微生物をグリセリン資化微生物とした。微生物細胞の増殖は、650 nm の光学濁度 (OD<sub>650</sub>) を測定することによって確認した。分離した微生物群解析のため、16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を含む 460 bp を標的 DNA 配列とし PCR を行い、Miseq (Illumina) による DNA シークエンズランに供した。微生物群集解析には MacQIIME を用い、97% 以上の相同性をもつ塩基配列集団を operational taxonomic unit (OTU) として扱い、塩基配列を読み取りデータベース (Green Genes) と照合して菌種の同定を行った。

## (2) メディエータの適性濃度

2-メチル-1,4-ナフトキノン (MNQ) を MFC のメディエータ分子に選定し、MFC 系に最適なメディエータ濃度を定めるため、メディエータ濃度 100, 300, 500, 700, 900 μM について微生物反応で生成したメディエータ分子の還元体を電圧 +0.1 V で検出した。反応液は、9 vol% ジメチルスルホキシド (DMSO) を含む McIlvaine 緩衝液 (pH 7.0) に、グリセリン 684 mM、微生物細胞 7.5 g/L および 100 ~ 900 μM メディエータ分子を溶解し、700 rpm で撹拌した。電極付近のメディエータの拡散を定常状態にするため、作用極には透析膜を付けたグラッシーカーボ (GC) 電極、対極に Pt 電極、参照電極に Ag|AgCl|飽和 KCl 電極を用いた。

## (3) 電流-電圧特性の測定方法

作製した微生物燃料電池のアノード溶液とカソード溶液の組成を表-1 に示した。培養した菌は、20 °C、4000 G で 30 分間の遠心分離を 2 回行い、菌体を少量の McIlvaine 緩衝液で洗浄した後、回収した。これを微生物燃料電池のアノード槽に加え、マグネチックスターラで撹拌した。ファンクションジェネレータ (HB-111A, 北斗電工) を接続したポテンショスタット (HA-151A, 北斗電工) に両電極を接続し、開回路電圧から短絡電流まで 0.5 mV/sec で掃引し、出力される電流・電圧をデータロガーに記録した。アノード・カソード間はプロトン交換膜で仕切り、メディエータには、2-メチル-1,4-ナフトキノン (MNQ) および 2-ヒドロ-1,4-ナフトキノン (HNQ) を使用した。MNQ および ACNQ は水への溶解度が低いいため DMSO を添加した。

## (4) 白金触媒系カソードと酵素触媒系カソードの調整

白金触媒系カソードは空気槽とし、電極は固体高分子燃料電池に用いられている組成を用いた。カーボンペーパー (SIGRACET® GDL) 30 mm × 55 mm に触媒スラリー (白金 0.5 g、純水 1.0 mL、エタノール 0.5 mL、ナフィオン 1.5 mL) とナフィオン膜を圧着することで作成した。

酵素触媒系カソードは、酵素 (ラッカーゼダイワ Y120) 50 mg とメディエータ 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid ammonium salt) (以下 ABTS と略す) 0.0137 g を McIlvaine 緩衝液 50 mL に溶かしてカソード溶液とした。電極はカーボンフェルト (LFP205, 大阪ガスケミカル) を用い、0.74 g になるよう切り取ったものを使用した。

## 4. 研究成果

### (1) メディエータの適性濃度と MFC に適したプロトン交換膜の選択

多くのメディエータ分子は、生物毒性のために MFC で使用される微生物の活性を低下させるため、メディエータ濃度の最適化は MFC の性能を改善するために必要である。図 1 は MNQ の濃度を 100 μM から 900 μM まで変化させたときの還元型メディエータ分子の形成速度の変化を示す。ここで還元型分子の生成率は、単位時間当たりの電流増加量として測定した。生成率の値は、MNQ 濃度に比例して増加し、700 μM でピークとなったため、本研究で使用している MFC 系におけるメディエータ分子の適性濃度は 700 μM とした。

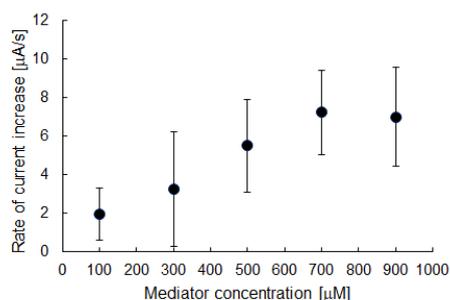


図 1 メディエータの適性濃度

酵母-グルコース系微生物燃料電池を用いて MFC に適したプロトン交換膜を選定した。プロトン交換膜として、ナフィオン膜、陽イオン交換膜 (CMS C-1705, 株式会社アストム)、一過陽イオン選択透過性膜 (CIMS C-1762, 株式会社アストム) の 3 種類の膜を対象に、電流-電位測定を行った。

メディエータ分子には MNQ を用い、膜以外の測定条件はメディエータの選定と同様にした。最大電力密度  $W_{max}$  の値は、ナフィオン膜 0.146 mW/cm<sup>2</sup>、陽イオン交換膜 0.0443 mW/cm<sup>2</sup>、一価陽イオン選択透過性膜 0.0181 mW/cm<sup>2</sup> となり、ナフィオン膜以外の陽イオン交換膜と一価陽イオン選択透過性膜は、酵母-グルコース系微生物燃料電池のプロトン交換膜に適していないことがわかった。

### (2) グリセリン資化微生物の分離と MFC への適用

グリセリンを単一炭素源として生育できる微生物を土壌等より分離したところ、10% グリセリン存在下で生育可能な 5 種類の微生物叢を得ることができた。これらの微生物をアノード触媒として用いて、グリセリンを燃料として発電性能を測定した。アノード槽のメディエータ分子は、MNQ を使用した。5 種類の微生物のうち 2 種類の微生物では有意なレベルの電力発生を示さなかったが、残りの 3 種類の微生物では電力の発生が認められた。図 2 と図 3 は、この 3

種類の微生物 (Isolate 1, 2, 3 と表示) の電流-電圧 (I-V) 特性と、電力-電圧の関係をそれぞれ示している。各微生物の開回路電圧 (OCV) は、0.614 V から 0.705 V まで変化し、理論上のものよりかなり低い値となった。Isolate 1 および 2 は、類似した I-V 特性を示したが Isolate 3 の I-V 曲線は、Isolate 1 および 2 のものと明らかに異なっていた。Isolate 3 の OCV は直線的に急激に減少しており、プロトンはそれによって抵抗分極が大きくなるカソード電極に十分に輸送することができない。一方、電流密度が 0.15 mA/cm<sup>2</sup> を超えると、Isolate 1 および 2 の OCV は急激に低下しており、この挙動は明らかに拡散分極に起因している。したがって、Isolate 1 および 2 に含まれる微生物は、グリセリンを十分に同化することができない、またはグリセリンが分解されるときに放出される電子をメディエータ分子に渡すことができない状態になっていることが考えられる。

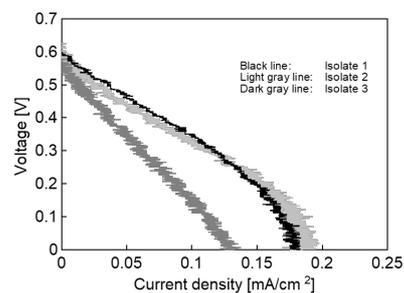


図2 電流-電圧特性

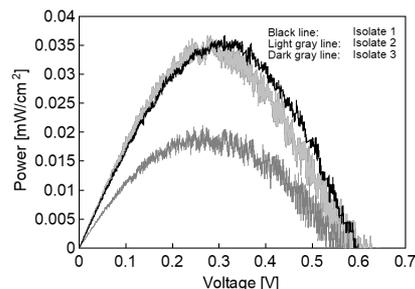


図3 電力-電圧の関係

最大電力密度  $W_{max}$  は、Isolate 1 および 2 を用いた MFC では 0.037 mW/cm<sup>2</sup> となったが、Isolate 3 を用いた MFC の  $W_{max}$  値は Isolate 1 および 2 の場合の半分であった。また Isolate 1 と 2 は MFC の出力特性の点では非常に似かよっているが、長時間運転における電力出力の安定性に差が見られた。運転開始初期の出力電力の値は非常に近く、Isolate 1 では 0.028 mW/cm<sup>2</sup>、Isolate 2 では 0.026 mW/cm<sup>2</sup> であったが、1100 分の運転後、Isolate 1 の電力値は 20% しか減少していないのに対し、Isolate 2 の電力値は 50% 減少した (図 4)。この結果は、Isolate 1 がグリセリン MFC により適した分離微生物であることを示唆している。Isolate 1 および Isolate 2 の微生物叢について、次世代シーケンサを用いた菌叢解析を行った (図 5)。Isolate 1 では Enterobacteriaceae 科の菌株が約 60%、Enterococcaceae 科 Enterococcus 属の菌株が約 30% 含まれているのに対し、Isolate 2 では Enterobacteriaceae 科約 40%、Enterococcaceae 科 Enterococcus 属約 15%、Burkholderiaceae 科 Burkholderia 属約 30% であった。

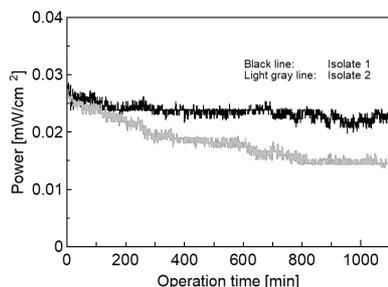


図4 長時間運転における電力変化

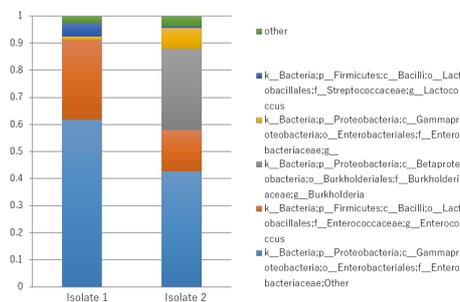


図5 グリセリン資化微生物の菌叢解析

### (3) メディエータ分子および基質分子の種類が MFC の性能に与える影響

メディエータ分子として使用された MNQ は、GC 炭素電極との反応性を基に選択した。しかし、メディエータ分子を選択する際には、微生物から電子を効果的に抽出できるかどうかを検討することも重要である。HNQ は水溶性であるため、さまざまな MFC のメディエータ分子としてよく使用されている。酵母-グルコース系 MFC では、MNQ を使用した MFC のほうが HNQ を用いた MFC より出力電圧が高い結果が得られていた。Isolate 1 を使用したグリセリン MFC においてもメディエータ分子の影響を検討した (図 6)。DMSO を添加していない HNQ を用いた MFC は、DMSO 添加の MNQ と比較して 1.5 倍の最大電流値を示し、最大電力密度  $W_{max}$  は 2.7 倍の 0.10 mW/cm<sup>2</sup> に達した。DMSO の存在は、HNQ を用いた MFC における電力出力を約 50% 低下させたことから MFC に添加することは好ましくないことがわかった。

Isolate 1 は、グリセリンを単一炭素源として使用して増殖することができる微生物として分離された。他の多くの微生物と同様に、Isolate 1 も単一炭素源としてグルコースを使用して増殖することができ、増殖速度で比較するとグリセリンよりもグルコースを好む。グリセリンを含む培地で培養した Isolate 1 を用いて、DMSO を含まない HNQ の存在下でグルコースを炭素源として MFC の性能を調べたところ、最大電力密度  $W_{max}$  の値は 0.067 mW/cm<sup>2</sup> に減少した (図 7)。一般に、グルコースとグリセリンは共に細胞内に取り込まれ、解糖およびトリカルボン酸サイクルを通して代謝される。このプロセスでは、生体エネルギー化合物は電子伝達系とそれに続く酸化的リン酸化によって生成される。細胞内に取り込まれたメディエータ分子は電子伝達鎖から電子を奪って還元体となり、再び細胞外に拡散すると考えられるため、メディエータを介した微生物からアノード電極への電子移動は、MFC の発電能力を強く律速すると考えられる。

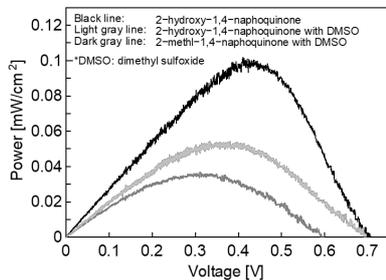


図6 メディエータ分子の影響

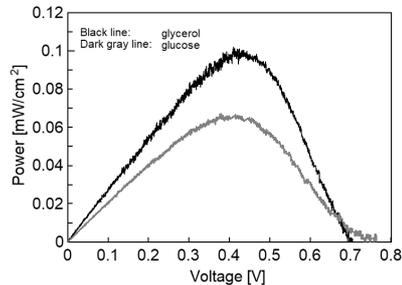


図7 基質の影響

#### (4)カソード電極の触媒反応系

カソード電極の反応系をフェリシアン化カリウムから酵素触媒系に変更し, HMFC システムとして機能するか検討した. また比較対象として固体高分子型水素燃料電池のカソード反応系として使用されている白金触媒系カソードも同様に検討した.

白金触媒系カソードを用いた場合, 最大電力密度  $W_{max}$  の値は  $0.039 \text{ mW/cm}^2$  となり, これはフェリシアン化カリウムを用いた MFC と同等であった. 酵素触媒系では電極としてカーボンフェルトを使用し測定したところ, 最大電力は  $1.6 \text{ mW}$  となり酵素触媒系カソードが機能する HMFC が可能であることが示された.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

1. Motomu Nishioka, Hiroki Den, Tatsuo Noda, Kimihiko Sugiura: “Development of Microbial Fuel Cells Utilizing Glycerol as a Sole Carbon Source”, ECS Transactions, 83, 137-143, 2018. [DOI: 10.1149/08301.0137ecst]

[学会発表](計9件)

1. 野田美瑠季, 野田達夫, 杉浦公彦, 西岡 求: 「グリセリン微生物燃料電池におけるカソード反応系」, 日本高専学会第 25 回年会, 2019.
2. 辰本浩司, 野田達夫, 杉浦公彦, 西岡 求: 「グリセリン微生物燃料電池の電極構成要素が出力に与える影響について」, 日本高専学会第 25 回年会, 2019.
3. 松井響平, 中井裕也, 濱田勇人, 小山晃弘, 西岡 求, 野田達也: 「 $\alpha$ -シクロデキストリンの包接作用を利用したバイオセンシング法の検討」, 日本高専学会第 24 回年会, 2018.
4. 高尾隼空, 松井響平, 西岡 求, 野田達夫: 「カソード型酵素機能電極の開発とその応用」, 第 3 ブロック専攻科研究フォーラム, 2018.
5. 高尾隼空, 西岡 求, 野田達夫: 「複合酵素膜電極を用いたバイオ論理ゲートの構築」, 日本高専学会第 23 回年会, 2017.
6. Motomu Nishioka, Hiroki Den, Tatsuo Noda, Kimihiko Sugiura: “Development of microbial fuel cells utilizing glycerol as a sole carbon source”, 2017 Fuel Cell Seminar & Energy Exposition, 2017.
7. 森田 楓, 川口 彩, 西岡 求, 野田達夫, 杉浦公彦: 「種々の微生物を用いた微生物燃料電池の出力特性」, 第 19 回化学工学学生発表会(豊中大会), 2017.
8. 高尾隼空, 西岡 求, 野田達夫: 「汎用酵素を用いたバイオ論理ゲートの構築」, 第 19 回化学工学学生発表会(豊中大会), 2017.
9. Kaede Morita, Motomu Nishioka, Kimihiko Sugiura: “Search for Microorganism of optimal electron transport property”, The 27th International Symposium on Transport Phenomena, 2016.

#### 6. 研究組織

##### (1)研究分担者

研究分担者氏名: 杉浦 公彦

ローマ字氏名: SUGIURA Kimihiko

所属研究機関名: 大阪府立大学工業高等専門学校

部局名: 総合工学システム学科機械システムコース

職名: 教授

研究者番号(8桁): 00249814

##### (2)研究協力者

研究協力者氏名: 野田 達夫

ローマ字氏名: NODA Tatsuo

科研費による研究は, 研究者の自覚と責任において実施するものです. そのため, 研究の実施や研究成果の公表等については, 国の要請等に基づくものではなく, その研究成果に関する見解や責任は, 研究者個人に帰属されます.