

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：54601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K03131

研究課題名(和文) 新規なバイオ電池および自己駆動型クーロメトリーの開発とその教育カリキュラムの作成

研究課題名(英文) Developments of novel bio-fuel cell and self-driven coulometric system as science teaching materials and their application to the establishment of experimental curriculum

研究代表者

三木 功次郎(MIKI, Kojiro)

奈良工業高等専門学校・物質化学工学科・教授

研究者番号：80259910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：電気化学をベースにした新規のバイオ電池と自己駆動型クーロメトリー装置の作製検討を行い、安価で簡便な装置の開発に成功した。作製したバイオ電池では模型用モーターを約1時間駆動することに成功した。また、自己駆動型クーロメトリー装置に様々な酵素を導入し、日本酒もろみや各種食品に含まれるグルコースやピルビン酸などの食品成分の測定法の開発に成功した。さらに入手が容易な装置を用いて米麹酵素の迅速抽出法を確立した。本装置は高校生・高専生レベルでも使用可能であり、教材として利用することにより実験カリキュラムの開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、新規のバイオ電池及び自己駆動型クーロメトリー装置を開発した。ディスポーザブル型の電極を用いることで安価な教材として使用することができ、食品分析について総合的かつ実践的な学習を実施することが可能となる。

研究成果の概要(英文)：In order to use a bio-fuel cell or a self-driven coulometry device as a teaching material, we made disposable type electrochemical cells and developed an inexpensive device. The bio-fuel cell we made succeeded in driving the model motor for about an hour. In addition, we introduced various enzymes into a self-driven coulometry device and succeeded in developing a method for measuring food components such as glucose and pyruvic acid etc. which contained in Sake mash and various foods. Furthermore, a rapid extraction method for enzymes contained in malted rice was established using an easily available device. These devices can be used at the high school and technical college level, and we developed an experimental curriculum by using it as a teaching material.

研究分野：電気分析化学

キーワード：バイオ電池 自己駆動型クーロメトリー 実験カリキュラム開発

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

これまでパン酵母を触媒として利用し、糖やエタノールなどを燃料として直接電力を得るバイオ電池の開発を行ってきた。この電池では、負極での電極反応（酸化反応）と正極での電極反応（還元反応）を介して、電子が外部回路を流れることにより電気エネルギーを取り出すことができる。そこで、入手が容易な市販の樹脂製透析セルを利用した電池セルを用い、パン酵母を負極の生体触媒として用いた電池を作製し、小型モーターを約 1 時間駆動にすることに成功している。この電池を教材として活用し、「ひらめき☆ときめきサイエンス」事業により、小学生を対象にした実験教室を開催していた。

一方、電量分析法は目的物質の酸化反応または還元反応に伴い流れる電流（電流量）から、目的物質の絶対量を測定できる分析法である。外部電源により電気分解を行うのが一般的であるが、内山俊一らはカーボンフィルトを電極とした自己駆動型電量分析法を開発した。これは外部電源を用いずに、試料の電極での酸化反応（または還元反応）と対極活物質の電極での還元反応（または酸化反応）の酸化還元電位の差によって発生する起電力を駆動力とし、電池と同じ原理を用いるものである。そのため、上述の電池セルを流用して自己駆動型電量分析を試みており、この自己駆動型電量分析法を教材として活用することを目指していた。

### 2. 研究の目的

#### 1) 新規バイオ電池の開発とその評価

低コストで簡単に作製可能な電池セルの開発を行う。また、作製した電池セルを用いて微生物を触媒として用いたバイオ電池の作製を試み、電気エネルギーの取得条件を調べる。

#### 2) 生体触媒を用いた自己駆動型クーロメトリー装置の開発とその評価

開発した電池セルを用いて自己駆動型クーロメトリー装置を構築し、様々な種類の生体触媒を導入することによって、その反応に伴う電流測定から食品成分などの定量を行う。

#### 3) 米麹酵素の迅速抽出法の開発

アルコール発酵などの実験を組み合わせて視覚的に理解でき、かつ興味を持てる実験カリキュラムの構築を目指し、実際に日本酒製造の醸造管理において重要な指標である米麹の酵素活性について、比較的容易に手に入る一般的な超音波洗浄器を用いた酵素抽出法の開発を目指す。

#### 4) 本教材を用いた実験カリキュラムの開発

開発した教材を用いて、高校生、高専生を対象とした実験カリキュラムの開発を目指す。知識の習得だけでなく、創造力、探求心、科学技術に関連する事象に対する理解力・判断力などを伸ばすために必要なカリキュラムを検討する。

### 3. 研究の方法

#### 1) 新規バイオ電池の開発

低コストで簡単に作製可能な電池セルの開発を行った。負極および正極にはカーボンフェルト(CF)を用い、このCFをラミネート加工で圧縮して、取扱いが容易な電池セルを実現した。作製した電池セルを用いてバイオ電池の作製を試みた。

#### 2) 自己駆動型クーロメトリー装置の開発

自己駆動型クーロメトリーは、開発した電池セルを用いて装置を構築し、負極と正極にそれぞれ含浸させた酸化還元物質の電位差で自己放電させ、両極間に抵抗とデジタルボルトメータを接続して電流測定から電流量を求め、測定物質の定量を行った。

#### 3) 米麹酵素の迅速抽出法の開発

比較的容易に手に入る一般的な超音波洗浄器を用いた酵素抽出法の開発を目指した。米麹と塩を含む緩衝溶液を入れたスクリー管瓶を水が入った超音波洗浄器に入れて一定時間の超音波照射処理を行い、ろ過後の米麹サンプル溶液の各酵素活性を測定した。国税庁所定分析法との比較を行った。

#### 4) 実験カリキュラムの開発

高校生および高専生向けの実験では、単に面白い、興味を持つだけの授業・実験ではなく、バイオ・エネルギー・環境・定量分析などに関して総合的に学習でき、定性的、定量的な議論ができる指導内容となるカリキュラムを目指した。

#### 4. 研究成果

##### 1) 新規バイオ電池の開発

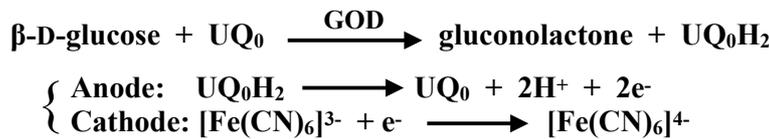
負極および正極にはそれぞれカーボンフェルトを用い、このカーボンフェルトをラミネート加工で圧縮することにより、製作が簡便で取扱いが容易な電気化学セルが実現できた。実際に学生に本セルの作製を行ってもらったところ、高専学生レベルでも容易に作製できることを確認した。

この電気化学セルを用いてバイオ電池の作製を試みた。負極にはパン酵母、エタノール、ピタミン K3 (電子伝達メディエータ) を含むリン酸緩衝溶液を含浸させ、正極にはヘキサシアニド鉄(III)酸カリウム (電子受容体) を含むリン酸緩衝溶液を含浸させ、可変抵抗器で抵抗値を変化させながら両極の電位差を測定し、オームの法則から電流の経時変化を求めた。パン酵母濃度の影響を検討したところ、最適条件で得られた電力条件において模型用モーターを約 1 時間駆動することに成功した。

##### 2) 自己駆動型クーロメトリー装置の開発

自己駆動型クーロメトリーは、電池と同じ原理で負極と正極にそれぞれ含浸させた酸化還元物質の電位差で自己放電させる。作製した電気化学セルを用いて両極間に接続した抵抗にデジタルボルトメータを接続して、その測定電圧から電流を求め、測定物質の定量を行った。

醸造分野や医療分野において重要な成分であるグルコースの測定を行った。まず、酵素としてグルコースデヒドロゲナーゼ (GDH) を用い、グルコースを酸化して電子受容体である 2,3-ジメトキシ-5-メチル-p-ベンゾキノン (UQ0) を還元した。この還元型 UQ0 とヘキサシアニド鉄(III)酸カリウムを用いて電池を構成して、電流応答から電気量を求め、酸化された UQ0 量からグルコース定量が簡便に行えた。さらに、コスト低減を目指し、GDH ではなく、安価なグルコースオキシダーゼ (GOD) を用いて同様の反応が進行するか検討した。



通常、GOD はグルコースの酸化に伴い、酸素を還元するため、GOD を含むグルコースと酵素反応液は窒素ガスを用いて脱酸素を行うことによって、従来の吸光度測定法で得たグルコース濃度とよく一致する結果を得ることができ、グルコースの定量が効率良く簡便に行えることを明らかにした (Table 1)。

Table.1 Glucose concentration measured by self-driven coulometry

sample	quantity of electricity		Glucose concentration	efficiency
	mC	mM		
1	1.63	4.96	99.4	
	1.64	4.97	99.7	
2	1.58	4.79	96.1	
	1.60	4.85	97.3	

Glucose concentration measured by absorbance is 4.989 mmol/dm<sup>3</sup>

そこで、実際の日本酒モロミ中のグルコースおよびピルビン酸の測定も行い、本法により醸造成分の分析が可能であることを示した。これらの結果は日本酒醸造において上槽時期を決定するのに重要である。

また、上記装置を用いて、NADH 酸化酵素であるジアホラーゼ (DI) と電子受容体 UQ0 との反応から、NADH の定量を行ったところ、吸光度測定から得られた値と比較すると効率は約 90%であった。そこで、乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) を導入し、ピルビン酸と NADH との反応からピルビン酸量に応じた NADH の減少量を求め、ピルビン酸濃度の算出も行った。その効率は約 87%であった。

さらに、上記 DI 反応系にパーオキシダーゼ (POD) を導入し、自己駆動型クーロメトリーによる過酸化水素測定法を確立した。これによりアスコルビン酸オキシダーゼ (ASO) を用いた本法によるアスコルビン酸測定も可能となった。

##### 3) 米麹酵素の迅速抽出法の開発

アルコール発酵などの実験を組み合わせることで視覚的に理解でき、かつ興味が持てる実験カリキュラムの構築を目指し、実際に日本酒製造の醸造管理において重要な指標である米麹の酵素活性に着目した。米麹の酵素抽出法は国税庁所定分析法で定められているが、静置抽出法、ホモジナイズ抽出法ともに手間がかかり、本分析法の代替となる、より短時間での抽出法の開発を試み

た。本研究では、比較的容易に手に入る一般的な超音波洗浄器を用いた抽出法の開発を目指した。米麴と塩を含む緩衝溶液を入れたスクリー管瓶を水が入った超音波洗浄器に入れて一定時間の超音波照射を行った。各種米麴サンプルを用いて超音波洗浄器による酵素抽出時間を変え、処理を行った。ろ過後の米麴サンプル溶液の $\alpha$ -アミラーゼ活性、糖化力、酸性カルボキシペプチダーゼ活性、 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性、グルコアミラーゼ活性を測定した。超音波処理による各抽出効率は、抽出時間を延ばすことで上昇し、抽出時間 35 分で国税庁所定分析法と同等の抽出率が得られた (Fig. 1)。国税庁所定分析法では抽出に 3 時間かかるものもあり、入手が容易な装置を用いて同分析法と同等の抽出率が得られ、かつ迅速な抽出方法の開発が実施できた。

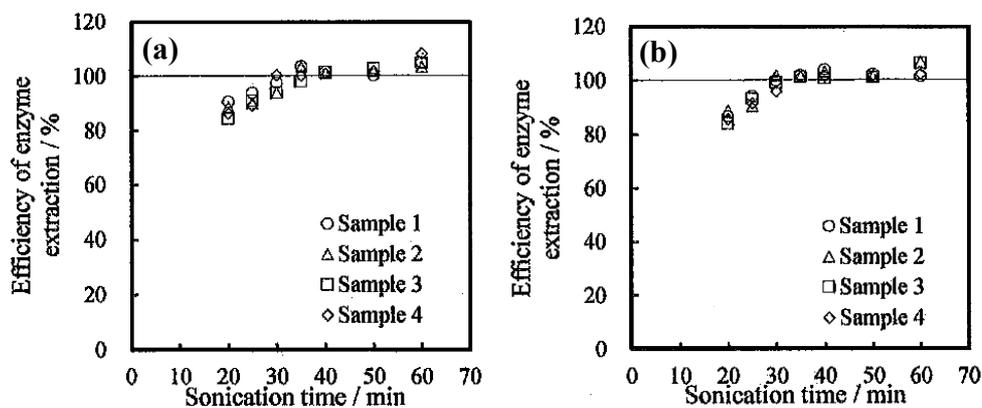


Fig. 1 Dependence of extraction efficiencies for (a)  $\alpha$ -amylase and (b) saccharification power on sonication time.

#### 4) 実験カリキュラムの開発

開発した簡易電気化学セルを用いて、バイオ電池と自己駆動型クーロメトリーの実験が実施可能となったため、各種微生物を用いたバイオ電池の作製や自己駆動型クーロメトリーによる新規な定量法の開発を高校生・高専生レベルで実施できる。そこで、物質の絶対定量・酸化還元・分析・環境問題・エネルギーなどについて、総合的に学習させることを目指して実験カリキュラム検討を行った。

なお、本研究の実施期間中に新型コロナウイルスが蔓延したため、感染拡大防止の観点から、中学校などへの出前授業や実験教室の実施はできなかった。そこで、高専において、高専生自身による簡易電気化学セルの組み立て及び本セルを用いた各種実験、米麴酵素の抽出実験を行った。

バイオ電池では、使用する糖類や濃度条件による電池出力の違いの検討、自己駆動型クーロメトリーでは、実際の日本酒もろみや各種食品中に含まれる食品成分量の測定検討などを行うとともに、米麴酵素の抽出実験も行い、本手法を学生実験に導入するための条件検討(実験条件及び実施時間など)を行うことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三木功次郎, 北村誠, 馬場紗代
2. 発表標題 超音波洗浄器を用いた米麹の酵素抽出液の迅速調製
3. 学会等名 令和3年度日本醸造学会大会(オンライン), 講演番号4
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三木功次郎, 安井健太, 田中 佑
2. 発表標題 グルコースオキシダーゼを用いた自己駆動型クーロメトリーによる日本酒モロミ中のグルコース測定
3. 学会等名 令和2年度日本醸造学会大会(オンライン), 講演番号33
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三木功次郎, 田中佑, 北村誠, 直江一光
2. 発表標題 ディスプレイセルを用いた自己駆動型クーロメトリーによる日本酒もろみ中のグルコース測定
3. 学会等名 日本食品科学工学会第66回大会, 2Bp07
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
研究分担者	直江 一光  (NAOE Kazumitsu)  (00259912)	奈良工業高等専門学校・物質化学工学科・教授    (54601)	

6. 研究組織（つづき）

	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 分 担 者	北村 誠  (KITAMURA Makoto)  (60341369)	奈良工業高等専門学校・一般教科・准教授     (54601)	

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