

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月30日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011年度

課題番号：21360388

研究課題名（和文）次世代型高性能バイオ燃料電池の構築

研究課題名（英文）Next-generation high-performance biofuel cell

研究代表者

山口 猛央（YAMAGUCHI TAKEO）

東京工業大学・資源化学研究所・教授

研究者番号：30272363

研究成果の概要（和文）：本研究では、酵素を触媒に用いて、グルコースなど生体に安全・安心な燃料を電気エネルギーへ変換するバイオ燃料電池の高電流密度化へ向けた検討を行った。実用化水準の高電流密度を実現する可能性を有するレドックスポリマーをグラフト重合したカーボン三次元酵素電極において、電流密度を抑制している主要因が、酵素がカーボンへ物理吸着する際の変性・失活であることを示した。また、酵素の失活抑制に有効な手法を開発した。

研究成果の概要（英文）：Enzymatic biofuel cells have a potential to achieve a high current density of  $10^2$  mA/cm<sup>2</sup>, a value required for portable energy devices, with fuels such as glucose and ethanol. Model calculations have suggested that a high-surface area three-dimensional carbon electrode made of redox-polymer-grafted carbon black can realize the required current density. The main reason of the low current density obtained thus far was the deactivation of enzymes upon adsorption on hydrophobic surface of carbon black. Surface modification of carbon black and the use of hyperthermophilic enzymes are effective in reducing the deactivation of enzymes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2010年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2011年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・反応工学・プロセスシステム

キーワード：バイオ燃料電池、レドックスポリマー、酵素反応、失活、カーボン、グラフト重合、表面処理、超耐熱性酵素

## 1. 研究開始当初の背景

生体のエネルギー変換システムを模倣し、酵素を触媒に用いてグルコースなど生体に安全・安心な燃料を電気エネルギーへ変換するバイオ燃料電池は、人体の近くで利用するポータブル機器や医療補助具の電源として期待されている。従来のバイオ燃料電池研究

における重要な課題の一つは、電流密度が低いことであり、酵素から電極への電子伝達を担うメディエータを固定したレドックスポリマーの電子伝導律速により電流密度が制限されていた。本研究グループでは、鎖長の短いレドックスポリマーをグラフト重合によりカーボンブラック表面に化学的に固定

化することで、レドックスポリマーによる電子伝導距離を短縮し、従来の律速段階を解消した高比表面積カーボン三次元酵素電極(図1)を提案し、従来と比べて高い電流密度を得た。また、モデル計算では実用化水準となる $10^2$  mA/cm<sup>2</sup>の電流密度の実現が可能であることを示している。しかし、研究開始当初までに実験で得られた電流密度は、モデル計算で示された高電流密度に比べて、依然2桁程度小さく、その理由も明らかではなかった。

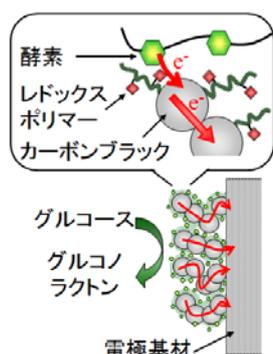


図1. 本研究グループで提案しているレドックスポリマーをグラフト重合したカーボン三次元酵素電極の模式図

## 2. 研究の目的

本研究では、バイオ燃料電池の電流密度を実用化水準まで増加させるために、現状のレドックスポリマーをグラフト重合したカーボン三次元電極において、電流密度を制限している要因を検証し、高電流密度化へ向けた指針を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

電極の反応拡散過程を考慮したモデル計算の結果、高電流密度を実現させるためには、有効に働く酵素の固定化密度の増加が必要であることが示されている。そこで、まず現状の電極において、有効に働く酵素の固定化密度が低い要因を検証した。

考えられる要因としては、図2に示すように、(1)電極中に固定化された酵素の絶対量の不足、(2)酵素とメディエータとの電気化学的な接触の不良、(3)固定化した酵素の

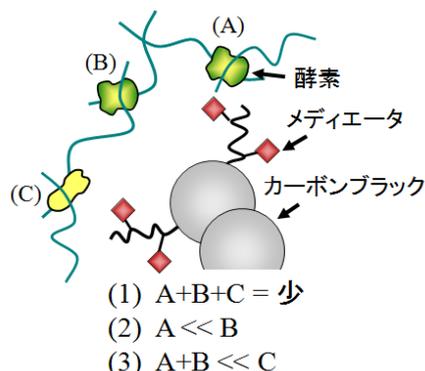


図2. 有効に働く酵素の固定化密度が低い要因の検証

失活の3点が考えられる。

(1)の酵素の絶対量については、三次元カーボン電極の酵素溶液への含浸前後の濃度測定および透過型電子顕微鏡(TEM)による直接観察により評価した。(2)の酵素とレドックスポリマー中のメディエータとの接触については、全ての酵素に電気化学的活性を付与するために、溶存メディエータを加えた電気化学測定を行った。(3)の酵素固定化時の失活については、酵素をカーボンブラックへ吸着させ、溶液へ分散させて活性評価を行った。また、カーボンブラックを修飾剤との混合や酸処理によって親水化し、吸着酵素活性へ与える影響を評価した。さらに、酵素についても検討し、90℃以上に至適温度をもつ超耐熱性酵素の吸着酵素活性を評価した。

## 4. 研究成果

電極中に固定化された酵素の絶対量を評価するために、電極の含浸前後の酵素溶液濃度を蛍光測定により評価した結果、酵素固定化密度は約 $5 \times 10^{-9}$  mol/cm<sup>2</sup>であった。この値は、電流密度から計算される有効な酵素固定化密度の $4 \times 10^{-11}$  mol/cm<sup>2</sup>より2桁程度高く、また酵素の単層被覆を仮定すると、三次元カーボン電極の実面積の約70%に相当する値であり、酵素固定化密度は充分高いことが分かった。すなわち、有効に働く酵素の固定化密度が低い要因は(1)の絶対量の不足ではないことが示された。

次に、(2)のレドックスポリマー中のメディエータと酵素の接触について検証するため、溶存メディエータを加えて電気化学測定を行った。グルコースの酸化電流密度は溶存メディエータの添加により、約2倍までしか増加しなかった。これは、レドックスポリマー中のメディエータと接触していない酵素の量と、接触している酵素の量は同程度であり、(2)が主要な原因ではないことを示している。

そこで、カーボンブラックへ酵素を吸着させて活性測定を行ったところ、酵素活性は溶液中の活性と比較して10%程度まで減少した。これは、疎水的な表面を有するカーボン粒子への物理吸着時に酵素が変性・失活したためと考えられる。

以上の検討より、現状のカーボン三次元電極において、電流密度を制限している主要な要因は(3)の酵素の失活であることが明らかになった。すなわち、電流密度を増加させるためには、酵素がカーボンブラックへ吸着する際の失活を抑制する必要がある。

そこで、吸着時の酵素の失活を抑制する手法として、図3に示すようにカーボンブラックの表面修飾による親水化と、構造の剛直性が高い酵素の利用を検討した。

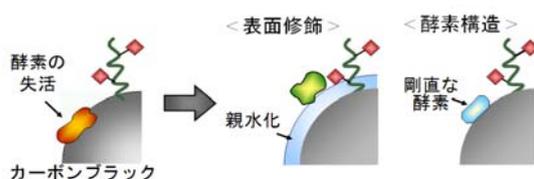


図 3. 物理吸着時の酵素の変性・失活を抑制する手法の検討

カーボンブラックの表面修飾による親水化では、修飾剤との混合と酸処理を検討した。修飾剤としては、酵素の保護作用が報告されているトレハロースと界面活性剤、生体適合性高分子であるポリエチレングリコール(PEG)を用いた。未修飾のカーボンブラックへの吸着と比較して、界面活性剤を用いた場合には酵素のカーボンへの吸着が抑制され、トレハロースと PEG を用いた場合には吸着後の酵素活性が増加したが、いずれも効果は大きくなかった。この理由として修飾剤のカーボン表面の吸着が充分ではない可能性が考えられたため、末端に疎水性のジアシルグリセロール、またはコレステロールを有する PEG によりカーボン修飾を行った。その結果、ジアクリルグリセロール-PEG(図 4)で修飾した場合は、酵素の吸着が大幅に抑制され、溶液中での酵素活性に対する吸着後の酵素活性が、未修飾では 10%程度であったのに対し、修飾した場合は約 40%まで増加した。また、酸処理による親水化も失活抑制に効果があり、吸着酵素活性は約 30%であった。したがって、酵素表面の親水化処理により、酵素の物理吸着に伴う失活・変性のある程度抑制できることが示された。

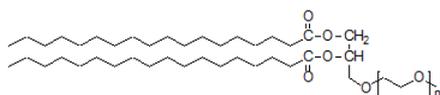


図 4. 酵素の物理吸着時の失活抑制に有効なジアシルグリセロール-PEG の化学構造式

次に、剛直性が高い酵素として超耐熱性ラッカーゼに着目した。超耐熱性ラッカーゼは、至適温度が約 90 と高く、構造が強固で変性・失活しづらいことが予想された。超耐熱性ラッカーゼと、中温性ラッカーゼを未修飾のカーボンブラックへ吸着させて吸着酵素活性を比較した。

その結果、中温性ラッカーゼは物理吸着により失活したのに対して、超耐熱性ラッカーゼでは吸着酵素活性と溶液中の酵素活性がほぼ同じ値となり、吸着による失活が大幅に抑制された。

以上、本研究により酵素を触媒に用いるバイオ燃料電池の電流密度を実用化が可能な水準まで増加させるためには、酵素のカーボンブラックへの物理吸着時の失活抑制が必須であること、そしてカーボンブラック表面

の状態制御と酵素の構造の両面から酵素の失活抑制が可能であることを示した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 14 件)

1. Hidenori Ohashi, Takanori Tamaki, Takeo Yamaguchi, Physical Reexamination of Parameters on a Molecular Collisions-based Diffusion Model for Diffusivity Prediction in Polymers, *J. Phys. Chem. B*, 115 (51), 15181-15187 (2011), 査読有

2. Hidenori Kuroki, Taichi Ito, Hidenori Ohashi, Takanori Tamaki, Takeo Yamaguchi, Bio-molecule-Recognition Gating Membrane Using Biomolecular Cross-Linking and Polymer Phase Transition, *Anal. Chem.*, 83 (24), 9226-9229 (2011), 査読有

3. Xueqin Chi, Hidenori Ohashi, Takanori Tamaki, Takeo Yamaguchi, Grafting of Polyelectrolyte on Porous Substrate by Plasma-induced Polymerization, *J. Photopolym. Sci. Technol.*, 24 (4), 471-473 (2011), 査読有

4. Takanori Tamaki, Atsushi Hiraide, Faizly B. Asmat, Hidenori Ohashi, Taichi Ito, Takeo Yamaguchi, Evaluation of Immobilized Enzyme in a High-Surface-Area Biofuel Cell Electrode Made of Redox-Polymer-Grafted Carbon Black, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 49 (14), 6394-6398 (2010), 査読有

5. Hidenori Kuroki, Hidenori Ohashi, Takanori Tamaki, Taichi Ito, Takeo Yamaguchi, Isolation and Analysis of a Grafted Polymer onto a Straight Cylindrical Pore in a Thermal-Responsive Gating Membrane and Elucidation of its Permeation Behavior, *J. Membrane Sci.*, 352 (1-2), 22-31 (2010), 査読有

6. Taichi Ito, Yuhei Oshiba, Hidenori Ohashi, Takanori Tamaki, Takeo Yamaguchi, Reentrant Phase Transition Behavior and Sensitivity Enhancement of a Molecular Recognition Ion Gating Membrane in an Aqueous Ethanol Solution, *J. Membrane Sci.*, 348 (1-2), 369-375 (2010), 査読有

7. Hidenori Ohashi, Maiko Watanabe, Taichi

Ito, Takanori Tamaki, Takeo Yamaguchi, Fabrication of Protein Renaturation Facilitating Membrane Using Plasma Graft Pore Filling Technique, *J. Photopolym. Sci. Technol.*, 23 (4), 571-573 (2010), 査読有

8. Hidenori Ohashi, Taichi Ito, Takeo Yamaguchi, Prediction of Self-Diffusivity in Multicomponent Polymeric Systems Using Shell-Like Free Volume Theory, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 49 (22), 11676-11681 (2010), 査読有

9. Takanori Tamaki, Taichi Ito, Takeo Yamaguchi, Modeling of Reaction and Diffusion Processes in High-Surface-Area Biofuel Cell Electrode, *Fuel Cells*, 9 (1), 37-43 (2009), 査読有

10. Hidenori Ohashi, Taichi Ito, Takeo Yamaguchi, A New Free Volume Theory Based on Microscopic Concept of Molecular Collisions for Penetrant Self-Diffusivity in Polymers, *J. Chem. Eng. Jpn.*, 42 (2), 86-94 (2009), 査読有

11. Hidenori Ohashi, Toshio Shimada, Takeo Yamaguchi, Development of molecular recognition membrane showing autonomous adsorption-desorption phenomenon, *J. Photo-polym. Sci. Technol.*, 22 (4) 473-476(2009), 査読有

#### 解説論文

12. 田巻孝敬, 山口猛央, グルコースを用いた酵素型バイオ燃料電池, 水素エネルギーシステム, 36, 32-36 (2011), 査読無

13. 山口猛央, 自動車用電池技術における高分子化学の役割, 高分子, 60 (8), 64-65 (2011), 査読無

14. 大橋秀伯, 山口猛央, ガスバリア膜・蒸気透過膜の設計 - 高分子中での分子拡散理論より -, 膜, 36 (2), 71-78 (2010), 査読無

〔学会発表〕(計 81 件) うち招待講演 27 件

1. Takeo Yamaguchi, Functionalized membranes inspired from bio-system, 化学工学会第 77 年会, 2012 年 3 月 15-17 日, 工学院大学, 東京【Invited Lecture】

2. Takeo Yamaguchi, Systematic material development for PEMFCs catalysts, membranes and membrane electrode assemblies, CRC International Symposium

on Green & sustainable catalysis: from theoretical and fundamental aspects to catalyst design, 2012 年 1 月 27 日, 北海道大学, 北海道【Invited Lecture】

3. 山口猛央, 機能膜の新展開 ~ 分離材料からバイオ材料・エネルギー材料へ~, 高分子学会 超分子研究会, 2012 年 1 月 23 日, 東京大学, 東京【招待講演】

4. 山口猛央, 細孔フィリング現象と界面伝導現象を利用した次世代燃料電池電解質膜の開発, 高分子学会 高分子コロキウム, 2011 年 10 月 28 日, 東北大学, 宮城【招待講演】

5. Takanori Tamaki, Tomoharu Sugiyama, Haruki Fujimoto, Hidenori Ohashi, Takeo Yamaguchi, Toward the Retention of Enzyme Activity in High-Surface-Area Electrode Made of Redox Polymer Grafted Carbon Black 2011 AIChE Annual Meeting, 2011 年 10 月 20 日, Minneapolis Convention Center, Minneapolis, Minnesota, USA 【Invited Speaker Session】

6. 山口猛央, プロトン伝導メカニズムと新規電解質膜, 燃料電池実用化推進協議会 燃料電池基盤技術研究懇話会, 2011 年 9 月 21 日, 山梨【招待講演】

7. 田巻孝敬, カーボン微粒子へのグラフト重合によるバイオ燃料電池の開発, 2011 年度粉体操作に伴う諸現象に関する勉強会, 2011 年 8 月 4 日, 倉敷シーサイドホテル, 岡山【招待講演】

8. 山口猛央, 革新的材料技術が支える燃料電池自動車の未来, 高分子学会 ナノテクノロジー研究会, 2011 年 6 月 23 日, 産業技術総合研究所 臨海副都心センター, 東京【招待講演】

9. 山口猛央, 燃料電池性能向上のための高分子電解質膜とイオン伝導メカニズム, 高分子学会 第 60 回年次大会, 2011 年 5 月 25-27 日, 大阪国際会議場, 大阪【招待講演】

10. Takeo Yamaguchi, Electrolyte Membranes Using Nano Capping and Pore-Filling Technologies for Next Generation PEFCs, Korean Chemical Society, 2011 年 4 月 29 日, Jeju, Korea【Invited Lecture】

11. Takeo Yamaguchi, Pore-Filling Electrolyte Membranes and Interface

Proton Transfer Technologies for Next Generation PEFCs, GIST Seminar, 2011年4月27日, Guanaju, Korea【Invited Lecture】

12. Takeo Yamaguchi, Molecular recognition gating membranes inspired by bio-systems, 6th International Symposium On High-Tech Polymer Materials (HTPM-VI) Synthesis, Characterization And Applications, 2010年11月7-11日, Xiamen, CHINA【Invited Lecture】

13. Takanori Tamaki, Takeo Yamaguchi, High-Surface-Area Enzyme Electrode Made of Redox Polymer Grafted Carbon Black for Biofuel Cell Application, 2010 AIChE Annual Meeting, 2010年11月7-12日, Salt Palace Convention Center, Salt Lake City, USA【Invited Speaker Session】

14. 山口猛央, ミクロ細孔を利用した高分子機能の発現 ~ 燃料電池用電解質膜から生体システム発想材料まで~, 第55回高分子学会夏期大会, 2010年7月14日-16日, 仙台【招待講演】

15. 山口猛央, 八尾滋, 電池材料およびシステムの革新と未来への期待, 化学工学会第75年会, 2010年3月18-20日, 鹿児島大学, 鹿児島【依頼講演】

16. 山口猛央, Systematic Device Design, 分子からデバイスまで, 平成21年度つくば学生研究交流会, 2010年3月12日, 産業技術総合研究所, 茨城【基調講演】

17. 山口猛央, 新エネルギー技術10年の展望と企業戦略の要点, 現代経営技術研究所産業事情検討会, 2010年1月26日, 東京【招待講演】

18. Takeo Yamaguchi, Micro pore filling membranes with molecular assembly made by Plasma-Graft Polymerization, Pre-conference of APSPT-6: The Sixth Asia-Pacific International Symposium on the Basic and Application of Plasma Technology, 2009年12月12日, Taipei, Taiwan【Invited Lecture】

19. 山口猛央, バイオマテリアル創製のための新規プラズマグラフト重合法の開発, 学振153委員会研究発表会, 2009年11月27日, 郡山【招待講演】

20. 山口猛央, 固体高分子形燃料電池材料

のシステム設計と細孔フィリング型電解質膜, 学振151委員会研究発表会, 2009年11月24日, 東京【招待講演】

21. Takeo Yamaguchi, Pore Filling Electrolyte Membranes: Water state, Morphology in the Micro Pores and Utilization of Interfaces, LANL-NEDO-AIST Fuel Cell Workshop, 2009年11月20日, Palm Springs, USA【Invited Lecture】

22. 山口猛央, 地球温暖化問題のために、我々ができることは? ~ 燃料電池とエコハウス~, サイエンスアゴラ, 2009年10月31日, 国際研究交流大学村, 東京【招待講演】

23. 山口猛央, 電解質膜における燃料透過阻止・高プロトン伝導性発現のための特異な構造と機構, 高分子学会 超分子研究会シンポジウム, 2009年9月29日, 慶応大学, 東京【招待講演】

24. Takeo Yamaguchi, Pore filling electrolyte membranes : Water state, morphology in the micro pores and utilization of interfaces, PBFC2009: 4th International Conference on Polymer Batteries and Fuel Cells, 2009年8月6日, Yokohama Symposia, Kanagawa【Invited Lecture】

25. 山口猛央, 地球環境問題と次世代燃料電池材料のシステム設計, 理化学研究所講演会, 2009年7月6日, 和光, 埼玉【招待講演】

26. 山口猛央, 固体高分子形燃料電池の今・未来, 高分子膜セミナー, 2009年6月4日, 関西大学【招待講演】

27. 山口猛央, バイオ燃料電池, 財団法人協和会, 2009年5月15日, 衆議院会館, 東京【招待講演】

〔図書〕(計2件)

1) 田巻孝敬, バイオ電池の最新動向 (執筆分担-第3章6 酵素固定多孔質電極), シーエムシー出版, 90-94, 2011

2) 田巻孝敬, 山口猛央, バイオ電池の最新動向 (執筆分担-第4章4 PEFC型バイオ電池), シーエムシー出版, 123-129, 2011

6. 研究組織

(1)研究代表者

山口 猛央 (YAMAGUCHI TAKEO)

東京工業大学・資源化学研究所・教授

研究者番号：3 0 2 7 2 3 6 3

(2)研究分担者

伊藤 大知 (ITO TAICHI)

東京大学・医学研究科・准教授

研究者番号：5 0 4 4 7 4 2 1

田巻 孝敬 (TAMAKI TAKANORI)

東京工業大学・資源化学研究所・助教

研究者番号：8 0 5 6 7 4 3 8

大橋 秀伯 (OHASHI HIDENORI)

東京工業大学・資源化学研究所・助教

研究者番号：0 0 5 4 1 1 7 9