

機関番号：32660

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21750195

研究課題名（和文） 電気化学インピーダンス法による酵素バイオ燃料電池の特性解析システムの構築

研究課題名（英文） Development of Electrochemical Impedance Analysis System for Enzyme-type Biofuel Cell

研究代表者

四反田 功 (SHITANDA ISAO)

東京理科大学・理工学部工業化学科・助教

研究者番号：70434024

研究成果の概要（和文）：燃料として糖やアルコールを含めたバイオマスが利用できるバイオ燃料電池は、次世代型クリーンエネルギーとして期待されている。本研究では、酵素を用いたバイオ燃料電池の特性解析を電気化学インピーダンス法によって行う手法を開発した。インピーダンススペクトルを解析するための理論モデルを構築し、インピーダンスシミュレーションを行った。得られたシミュレーションの結果と測定結果を比較することで、理論モデルの妥当性について検証した。

研究成果の概要（英文）：In the present study, an electrochemical impedance analysis system was developed for analysis of enzyme-type biofuel cell. Theoretical equation of the Faradaic impedance of the mediator-type enzyme-functional electrode was derived. The impedance simulation was carried out by using the theoretical model and was discussed the behavior of the impedance spectra with variation of the parameters.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：電気分析化学

科研費の分科・細目：材料化学，機能材料・デバイス

キーワード：酵素，バイオ燃料電池，インピーダンス

1. 研究開始当初の背景

燃料として糖やアルコールを含めたバイオマスが利用できるバイオ燃料電池は、次世代型クリーンエネルギー変換デバイスとして、急速に注目されつつある¹⁻³⁾。特に、酵素反応を利用したバイオ燃料電池は、小型で簡単な構造のものが作成できるので、持ち運び型や、医療用微小電池として期待できる。図1に、グルコース-空気バイオ燃料電池の一例を示す。アノードでは、グルコースオキシ

ダーゼ(GOD)を触媒としたグルコースの酸化反応が起こる。カソードでは、ピリルビンオキソダーゼ (BOD) を触媒とした酸素の還元反応が起こる。この電池は理論的には約 1.2 V の起電力が得られる。しかし、酵素電極を用いたバイオ燃料電池については、得られる電流密度が小さいことが問題であった。

出力向上のためには、タンパク質工学による酵素分子の機能向上とともに炭素電極材料の構造（メソポーラス，ナノマトリックス

構造)に依拠した酵素固定比表面積の増大などの工夫が必要となる。また、電池の内部抵抗も問題となるため、適正な電池の構造デザインが要求される。しかし、バイオ燃料電池の電極やセルの構造を詳細に評価する手法については十分に確立されているとはいえない。そこで、バイオ燃料電池の電極構造評価、特性評価法の一つとして電気化学インピーダンス法が有効であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、スクリーン印刷を用いたバイオ燃料電池用のデバイスを開発すると共に、電気化学インピーダンスを用いたバイオ燃料電池の評価システムを構築した。

2. 研究の方法

(1)スクリーン印刷法によるバイオ燃料電池用電極の作製と電気化学インピーダンス測定

スクリーン印刷法により、酵素型バイオ燃料電池の作製を行った。アノード、カソード共に、酵素、メディエーター、導電剤、バインダーを混練した酵素インクを用いる。酵素をスクリーン印刷法によって固定化することで、再現性の良い膜が得られると考えられた。導電剤には、ケッチェンブラック、カーボンナノチューブなどを用いた。これにより、複数の電極構造を作製することができた。作製したバイオ燃料電池の電気化学インピーダンス測定を行った。3電極法によって、アノード、カソードそれぞれの電極ごとのインピーダンスを測定した。得られた測定結果に対して電極または電池構造モデル(等価回路)を用いたカーブフィッティングを行った。カーブフィッティングにより、溶液抵抗、反応抵抗、電気二重層容量などのパラメータを見積った。他の電気化学測定も併用し、モデルの妥当性を検証した。

(2)ファラデーインピーダンスによるインピーダンスシミュレーション

酵素固定化電極の理論モデルを用いて、ファラデーインピーダンスを導出し、インピーダンスのシミュレーションを行った。各パラメータを変化させたときのインピーダンスの挙動変化から、上記(1)で作製した電極のインピーダンススペクトル解析を行った。得られた結果から、シミュレーションの妥当性を検証した。

4. 研究成果

(1)スクリーン印刷を用いたバイオ燃料電池用電極の作製と電気化学インピーダンス測定

ピルビン酸は解糖系での代謝反応における中間生成物質であり、条件に応じて乳酸発

酵、アルコール発酵へと反応が進行する。このため、ピルビン酸を *in-situ* で測定可能なピルビン酸バイオセンサが研究されている。最近ではバイオセンサの特性評価に電気化学インピーダンス法が有効と考えられている。酵素機能電極は電極反応と酵素触媒反応の共役系であり、一般的に常温、強圧、中性条件で進行し、反応選択性が極めて高い特性を持つと言われている。そこで本研究ではスクリーン印刷電極を用いたピルビン酸デヒドロゲナーゼ固定化電極の作製および電気化学インピーダンス法による評価を行った。

酵素にはピルビン酸デヒドロゲナーゼ、メディエーターには2-メチル-1,4-ナフトキノンを用いた¹⁾。スクリーン印刷によりカーボン電極を作製した。ポリイミド基板に銀インク(リード部分)、カーボンインク(電極部分)、レジストインクの順に印刷した。1%ニトロセルロース膜を用いて、酵素(3 U)とメディエーターを固定化した。全ての電気化学測定はリン酸緩衝液(pH 6.25)、作用極に酵素固定化電極、参照極には飽和 KCl 銀-塩化銀電極、対極には白金線を用い3電極系で行った。電気化学的評価はクロノアンペロメトリー、電気化学インピーダンスを用い、ピルビン酸濃度変化に伴う酵素触媒反応をモニタリングした。インピーダンスの測定条件は周波数範囲 100 kHz から 10 mHz、対数挿引 1桁5点、電位振幅は 10 mV で行った。

図1にインピーダンス測定結果を示す。ピルビン酸濃度 0 mM, 1 mM, 2 mM で測定を行った。高周波数側に小さな半円が、またピルビン酸存在下では中間周波数側に大きな半円が現われた。1 mM よりも 2 mM の方が小さな半円となりスペクトルが現われた。これにより中間周波数の半円が酵素反応に起因するものと考えられた。また、等価回路モデルを用いて反応パラメータの算出をおこなった。

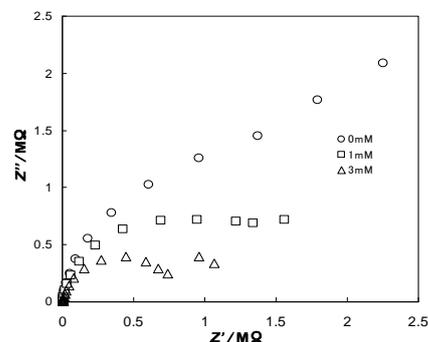


図1 得られた電気化学インピーダンススペクトル

(2) ファラデーインピーダンスによるインピーダンスシミュレーション

酵素機能電極は実サンプルの測定を目的としたバイオセンサや、生体内の小型電源として利用できるバイオ燃料電池の反応場として利用されている。これらのデバイスの発展と実現のためには、反応機構の解析が重要である。電気化学インピーダンス法は反応を時定数で分離できるため、電極反応と酵素触媒反応の共役反応である酵素機能電極の反応解析に有効であると考えられる。またファラデーインピーダンスによるインピーダンスシミュレーションを用いることで、実験結果を理論的に解析することができる。本研究では酵素機能電極を作製し、電気化学インピーダンス測定とファラデーインピーダンスによるインピーダンスシミュレーションを用いて反応機構を実験的にかつ理論的に解析することで、メディエータ型酵素機能電極の新規評価法の確立を目指した。

スクリーン印刷法により作製したカーボン電極上に、カーボンナノチューブ (CNT) を分散させた懸濁液を滴下して十分乾燥させた。次にメディエータであるメタノール飽和テトラシアフルバレン (TTF) 溶液、モデル酵素であるフルクトースデヒドロゲナーゼ (FDH) 溶液 60 Unit を滴下した。さらにポリ-L-リシン溶液、ポリスチレンスルホン酸溶液を滴下し、ポリイオンコンプレックス膜を形成させることにより、酵素を電極上に固定化させた。電気化学測定は三電極系で行い、作用極には作成した FDH 固定化電極、参照極には飽和塩化カリウム銀 / 塩化銀電極、対極には白金線を用いた。測定溶液は pH 4 に調整した McIlvaine 緩衝液を用いた。サイクリックボルタメトリーは走査範囲 $-0.2 \text{ V} - 0.6 \text{ V}$ 、走査速度 1 mV/s で測定した。電気化学インピーダンスは周波数範囲 $100 \text{ kHz} - 100 \text{ mHz}$ 、電位振幅 10 mV 、対数挿引は一斤 5 点で測定した。また、すべての測定溶液は測定前に N_2 ガスで脱気し、恒温槽で $25 \text{ }^\circ\text{C}$ に保持した。

$0.1 - 0.19 \text{ V}$ まで 0.01 V ずつ印加電位を変化させたときのインピーダンススペクトルを図 2 に示す。電位を貴にするに従い、高周波数域の半円は小さくなり、 0.15 V 付近から低周波数域に新たな軌跡が現れた。電気化学インピーダンスでは速い反応が高周波数域に現れ、遅い反応が低周波数域に現れる。以上から高周波数域は電極上での TTF の酸化反応による容量性半円、低周波数域のスペクトルは拡散に起因するスペクトルであると考えられる。すなわち電位を貴にするに従い電流値が増加するため、高周波数域の容量性半円は小さくなると考えられる。また電位を貴にするに従い電極近傍の TTF 濃度が減少するため、低周波数域に拡散のスペクトルが現

れたと考えられる。

ファラデーインピーダンスの理論式から導かれたインピーダンススペクトルを用いることで実験結果を理論的に解析することができる。電極に与えた電位振幅によって電極の表面状態 (濃度) が変化するとき、低周波数域に新たな軌跡が加わる。これをファラデーインピーダンスと呼ぶ。メディエータ型酵素機能電極の反応モデルからファラデーインピーダンスを導出した。メディエータや基質濃度は実験値を用い、メディエータの拡散係数を $10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ 、フルクトースの拡散係数を $10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ とし、ファラデーインピーダンスを用いたインピーダンスシミュレーションを行った。シミュレーションから得られたサイクリックボルタモグラムを図 3 に示す。酵素触媒反応によく見られるシグモイド型の曲線が得られた。 $0.1 - 0.19 \text{ V}$ の電位範囲では混合律速となった。図 2 の $0.1, 0.19 \text{ V}$ で計算したインピーダンススペクトルを図 4 に示す。 0.1 V では一つの容量性半円のみが現れ、 0.19 V では高周波数域には容量性半円、低周波数域には有限拡散のスペクトルが現れた。実験結果とシミュレーション結果は良好な一致を示した。電極表面のメディエータ濃度の変化をシミュレーションすることで、印加電位によって変化するインピーダンススペクトルの変化を考察することができた。

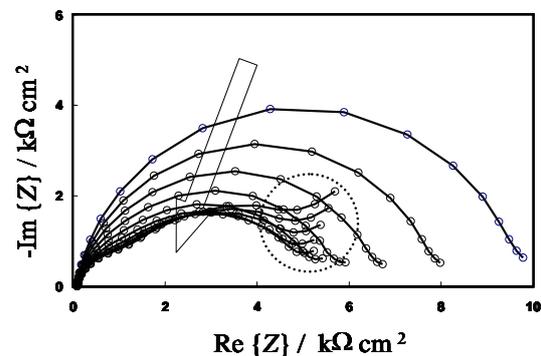


図 2 フルクトース濃度が 3 mM のときの 0.01 V ずつ印加電位を変化させたときのインピーダンススペクトル ($0.1 - 0.19 \text{ V}$)

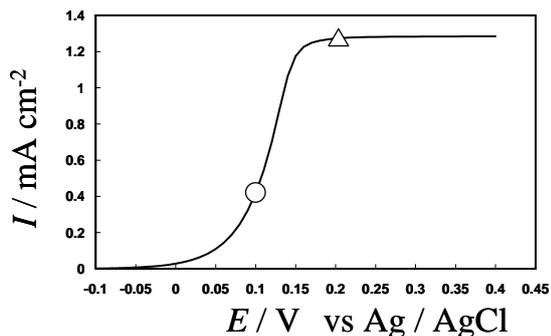


図3 フルクトース濃度が3mMと仮定したときのサイクリックボルタンメトリーシミュレーション

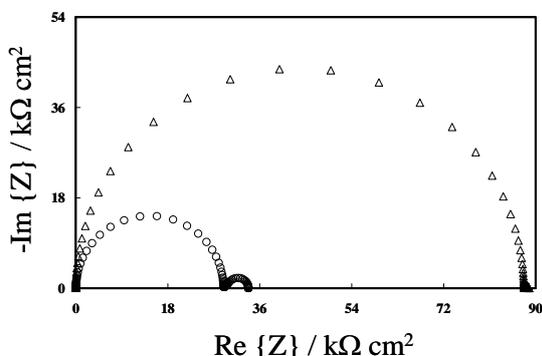


図4 シミュレーションから得られたインピーダンススペクトル(0.1V, 0.19V)

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)

[学会発表] (計 5 件)

- (1) Isao Shitanda, Masafumi Konya, Jun Nak anishi, Kunihiro Watanabe, Masayuki Itagaki, "Impedance Simulation of Mediator-type Enzyme Biofuel Cell Electrode", 215th ECS Meeting, 2009年5月27日, Honolulu.
- (2) 石塚由樹, 四反田功, 板垣昌幸, 渡辺邦洋
"ピルビン酸デヒドロゲナーゼ固定化電極の電気化学インピーダンスを用いた評価", 日本分析化学会第58年会, 2009年9月24日, 北海道大学
- (3) 毛利俊介, 四反田功, 板垣昌幸, 渡辺邦洋, "Ag/C/CeO₂ペーストを用いたスクリーン印刷型酸素センサの作製と電気化

学的評価, 日本分析化学会第58年会, 2009年9月24日, 北海道大学

- (4) Naofumi Ohta, Isao Shitanda, Masayuki Itagaki, Kunihiro Watanabe, "Faradaic Impedance Simulation of Mediator-type Enzyme-functional Electrode", 8th International Symposium on Electrochemical Impedance Spectroscopy, 2010年6月10日, Portugal.
- (5) 小川修治, 四反田功, 板垣昌幸, 渡辺邦洋, "電気化学インピーダンス法によるピルビン酸デヒドロゲナーゼ固定化電極の特性評価", 2010年電気化学秋季大会, 2010年9月2日, 神奈川工科大学.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

四反田 功 (SHITANDA ISAO)

東京理科大学理工学部助教

研究者番号: 70434024