

## 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25年5月23日現在

機関番号：24402  
 研究種目：基盤研究 C  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22560773  
 研究課題名（和文）グルコース燃料電池性能向上に向けた取り組み 「微生物からの電子獲得技術の向上」  
 研究課題名（英文）Study to raise the performance of the glucose fuel cell "Improvement of the electronic acquisition technology from the microbe in the fuel cell"  
 研究代表者  
 東 雅之（AZUMA MASAYUKI）  
 大阪市立大学・大学院工学研究科・教授  
 研究者番号：20285282

研究成果の概要（和文）：本研究では、グルコース燃料電池に適した電池用酵母の育種に取り組んだ。まず、各種酵母の評価に用いる小型のグルコース燃料電池を製作し、電池構成要素の最適化を検討し、微生物電池としては高い出力が得られることを確認した。その後、小型電池を用いて細胞内の代謝と出力の関係を理解するため、パン酵母変異株を用いて解析を進めた。また、パン酵母の他に他種酵母や大腸菌を用いて出力の評価を行い、パン酵母での育種方針を明らかにするとともに、電池用酵母として *Kluyveromyces marxianus* が有望であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Development of the yeast suitable for a glucose fuel cell was examined in this study. At first the fuel cell of a small scale was made for evaluation of various kinds of yeast, and the optimum for high performance was examined. As a result the considerably high power was obtained as a microbial-based fuel cell. Next analyses with the fuel cell using a baker's yeast mutant to understand relation between intracellular metabolism and the power were pushed forward. In addition, an evaluation of the power was carried out using yeast of other kinds and *Escherichia coli*. As a result, directionality of baker's yeast development for the fuel cell was clarified, and it was made clear that *Kluyveromyces marxianus* was promising as yeast for the fuel cell.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,380,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学 生物機能工学

キーワード：生物機能工学 応用微生物 燃料電池 酵母 グルコース

## 1. 研究開始当初の背景

化石燃料の枯渇・地球温暖化・環境破壊などの諸問題から、クリーンエネルギーの開発が求められている。バイオマスの化学エネルギーを電気エネルギーに変換するバイオ燃料電池は、循環型クリーンエネルギーを生み

出す方法の一つとして注目されている。バイオマス例えばグルコースの分解から生じる電子のほとんどを電池に転用できれば、グルコースからのエネルギー収率はバイオエタノールを作るより高くなると期待された。しかし、研究開始当初は大きな可能性はあるものの発電性能は低く、新たなブレイクスルー

となる技術が求められていた。

バイオ燃料電池は酵素により化学エネルギーを電気エネルギーに変換する。生体由来の酵素を用いる酵素型と微生物細胞そのものを利用する微生物型に分類される。グルコースを原料とした電池は一般にグルコース燃料電池と呼ばれる。研究開始当初は、ソニー(株)が開発した酵素型グルコース燃料電池が注目され、その最高出力は電極面積  $1\text{cm}^2$  あたり  $3\text{mW}$  で、ウォークマンの電源として利用できるレベルにあった。しかし、このシステムはグルコースをグルコノラクトンに変換する時に生じる電子を利用しているため、グルコースが持つエネルギーの一部しか利用できない。一方、当時の微生物型グルコース燃料電池の最高出力は酵素型に比べ低かったが、エネルギーを生み出すポテンシャルは高いと考えられた。すなわち、生体ではグルコースを水と二酸化炭素まで分解でき、その間に生じる電子の多くを電池に転用できる可能性がある。効率的かつ短期間に、細胞から電子を獲得できれば、総出力と最高出力はともに高まると考えた。

微生物型では京都大学の加納らやアメリカの Lovley らの細菌を用いた研究などが報告されていた。我々も当大学の機械工学科の脇坂らと共同で酵母を用いて検討していた。しかし、いずれも実用レベルにはなかった。また、廃棄物由来バイオマスを用いた発電について広島大学の柿園の報告などがあった。新たな技術として、微生物の細胞表面に酵素を提示し、それを酵素として利用して発電した例も報告されたが、その出力はまだ低かった。一部、電池のスケールを  $\mu\text{L}$  レベルまで下げて体積当たりの出力の向上を目指す研究もあったが、本研究では操作性、将来のスケールアップへの展開も考慮し  $\text{mL}$  スケールの電池での評価が適切と考えた。

以上、このような研究背景の中、電池用微生物を改良・育種し発電性能を高める触媒の開発は重要な課題で、電池内でのグルコース代謝の理解はその開発にとって必須であると考えられた。

## 2. 研究の目的

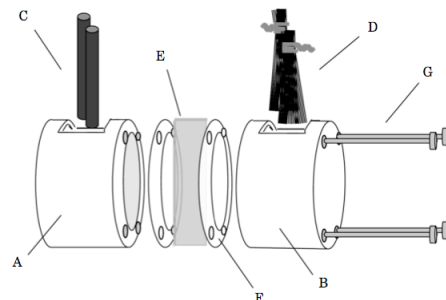
本研究では、上記の理由から微生物型グルコース燃料電池に着目した。短時間でしかも高出力下で微生物触媒の評価を進めるため、 $\text{mL}$  スケールの操作性の良い電池を製作し、高い出力が得られることを確認した。次に、「比較的出力が高く、食品に利用されている安全な生物で、遺伝子ノックアウト株など研究材料が容易に入手できる」という利点から触媒に酵母を用い、その酵母の改良により電池性能の向上を目指した。具体的には、電池内の酵母のグルコース代謝の理解から電池用微

生物の改良・育種の方向を明らかにすることを目的とし、グルコース燃料電池の総出力や最高出力の向上を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 小型グルコース燃料電池の製作

過去に改善してきた酵母グルコース燃料電池を基本に検討を進めた。これまでの酵母グルコース電池は、負極と陽極ともに  $30\text{mL}$  のスケールで、出力評価に約 20 時間を要した。そこで、2 時間程度で出力評価が可能で、操作性の良い  $\text{mL}$  スケールの小型グルコース燃料電池を製作した。具体的には、直径  $3.4\text{cm}$  のアクリル棒の内部を円筒状に削り、各電極槽の体積を  $8.3\text{mL}$  とし、各電極槽の間は陽イオン交換膜である GORE-SELECT (厚さ  $30\mu\text{m}$ ) で仕切った。電極には市販の炭素棒 (直径  $0.5\text{cm}$ ) もしくは炭素繊維 (フィラメントの直径が  $7\mu\text{m}$ ) を用いた (図 1 参照)。燃料にはグルコースを用い、これまでの検討結果を参考にし、メディエーターには 2-ヒドロキシン-1,4-ナフトキノン (HNQ)、緩衝液にはリン酸緩衝液 ( $0.23\text{M}$ ,  $\text{pH}8.0$ ) を用いた。また、正極槽にはヘキサシアノ鉄(III)酸カリウムを酸



化剤として加えた。

図 1 微生物燃料電池の模式図

A: カソード側セル, B: アノード側セル, C: 炭素棒, D: 炭素繊維, E: 陽イオン交換膜, F: シリコンラバー, G: ネジ。

### (2) 使用微生物及びその準備

酵母は市販のドライイーストもしくは実験室酵母一倍体株 BY4741 およびそれを親株とした各種遺伝子ノックアウト株、実験室酵母の二倍体株として BY4743 を用いた。その他に NBRP から購入した *Kluyveromyces marxianus* RAK3605、*Pichia pastoris* GS115、*Hansenula polymorpha* IF00799、*Kluyveromyces lactis* IF01267、*Candida glabrata* YAT3377 に加え、*Schizosaccharomyces pombe* JY746 h<sup>-</sup>、土壤単離酵母 KH108 を用いた。大腸菌は、NBRP より購入した Keio コレクション JW3887、

JW5611, JW3709, JW3710, JW3713, JW3714, JW3715, JW3716, JW3711, JW3712 およびそれらの親株である BW25113 を用いた。

市販のドライイースト以外の酵母は以下の培養で準備した。基本的には全て YPD 培地を用い 30℃ で 20 から 24 時間培養し、その後グルコースを 5% 添加し 1 時間培養した。これらを遠心分離により回収し、リン酸緩衝液で洗浄し、濁度 (600 nm) が負極溶液中で 64 もしくは 128 になるように添加した。また、大腸菌の準備は LB 培地で 20 から 24 時間培養し、上記と同様にグルコースを添加し追加培養を行い調製した。

### (3) 出力の測定

電極の間を抵抗と電流計を直列にそれらと並列に電圧計をつなぎ、それら機器をパソコンと接続し、経時的に回路に流れる電流と電圧を測定した (図 2 参照)。電流計および電圧計には三和電気計器製のデジタルマルチメーター PC500a もしくは PC510a を用いた。なお、ここでは電圧測定用のデジタルマルチメータに流れるごく微量の電流は無視している。出力は得られた電流値と電圧値から計算した。測定は説明がない場合は酵母で 30℃、大腸菌では 37℃ で行い、抵抗は 100 Ω とした。また、実験結果は 2 回もしくは 3 回の測定の平均値で示した。

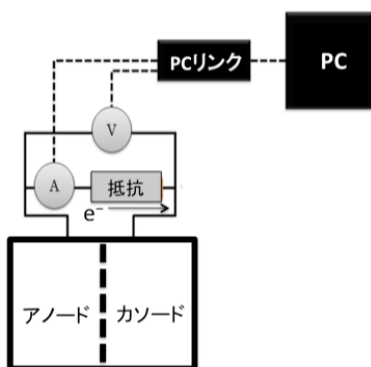


図 2 測定装置の接続

### (4) グルコース及びエタノール濃度の測定

電池負極溶液中のグルコース濃度やエタノール濃度を測定するために、適宜 100 μL の溶液を負極槽からサンプリングした。遠心分離により菌体を除去し、その上清を分析に用いた。

グルコース濃度はグルコース C テスト (WAKO) を用い測定した。エタノールはガスクロマトグラフィーにて測定した。分析カラムは Gaskuropack54 (GL サイエンス) を用い

FID デテクターで検出した。また、一部の実験ではグルコースおよびエタノール濃度を液体クロマトグラフィーを用いて分析した。ULYRON PS-80N (信和化工) の分析カラムを用い、RI デテクターにより検出した。

## 4. 研究成果

### (1) 市販ドライイーストを用いた小型グルコース燃料電池による発電の最適化

製作した電池を用い、種々の構成要素の条件を検討した。電極槽の液量について検討した。各槽の液量を 5.5、6.5、7.5 ml とした場合、液量が増えるほど出力は上昇したが、7.5 ml 以上入れると操作性が悪くなるため、液量は 7.5 ml に固定して実験を進めた。測定結果の例を図 3 に示す。

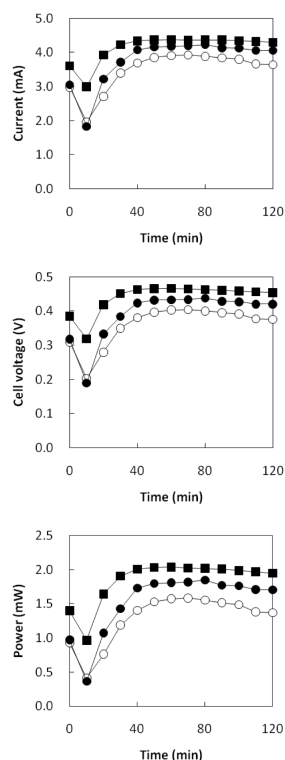


図 3 製作した mL スケール電池を用いた出力の評価

上段は電流値、中段は電圧値、下段は出力を示す。また、負極槽の液量は ■ が 7.5 ml、● が 6.5 ml、○ が 5.5 ml を示す。

燃料となるグルコース、触媒の酵母、メディアエーターである HNQ、正極槽のヘキサシアノ鉄(III)酸カリウムについて最適濃度を検討した。さらに、それぞれの最適量を組み合わせて出力を評価した。その結果、出力は約 30 分後に安定し、その後 2 時間までは安定し

ていた。出力が安定した後の最大出力は 2.6mW であった。以前の測定では、負極液の溶液量が 30ml で最大出力は 9mW 程度であった。負極溶液量当たりの出力は以前と比べ上昇していた。また、負極溶液中のグルコース（添加濃度 3%）は 2 時間後では 1% 前後残存していたが、4 時間後にはほぼ消費された。従って、同様の条件では 2 時間程度の測定が適していると判断した。

さらに、電極の表面積を増やすために、電極を炭素棒から炭素繊維に変更した。また、炭素繊維を用い測定温度を 50°C にした時に最も出力は高まり、最大出力は 6mW を超えた。ただし、温度を上昇させると測定の後半はその出力が低下した。これは細胞内の酵素の失活などが影響しているかもしれない。

以上の測定から、短時間でしかも出力が高い条件での微生物触媒の評価が可能であることが分かった。

## (2) 実験室酵母の各種遺伝子欠損株を用いた出力評価

以下の実験では、実験室酵母 BY4741 およびそれを親株とした各種遺伝子ノックアウト株や代謝阻害剤を用い、代謝と出力の関係を考察した。

### ① 解糖系の酵素と出力の関係

解糖系のキー酵素であるホスホフルクトキナーゼをコードする PFK1 遺伝子の欠損株、ホスホグルコース異性化酵素をコードする PGI1 遺伝子の欠損株の出力を評価したが、どちらも野生株と比べ出力の上昇は見られなかった。これらの遺伝子の欠損は、解糖系へのグルコース代謝の流れをペントースリン酸に向けると考えられ、その変化では出力が上昇しないことが示唆された。またペントースリン酸への分岐で働く、グルコース-6-リン酸脱水素酵素をコードする ZWF1 遺伝子の欠損株を用いたが、出力の上昇は見られなかった。

### ② エタノールへの代謝と出力

TCA 回路を阻害するマロン酸を電池内の負極槽に添加すると極端に出力が低下することから、出力の上昇には代謝の流れを TCA 回路へすなわち呼吸に導くことが重要と考えられる。グルコースが代謝され、エタノールが電池内で蓄積した場合（エタノールのさらなる酸化は進まない）、その反応から電子は得られない。従ってエタノールへの代謝を抑制することで出力の上昇が期待される。

酵母では、解糖系からエタノール発酵への分岐点では、ピルビン酸脱炭酸酵素によってピルビン酸からアセトアルデヒドへの変換が触媒される。その反応を主として触媒する酵素の遺伝子 PDC1 の欠損株を用いて出力を評価した。しかし、PDC1 の欠損だけではエタ

ノール代謝への流れは止まらず、遺伝子欠損による出力の上昇も見られなかった。PDC1 を欠損させても他の酵素がその反応を触媒することが報告されていたため、2 重欠損株の取得を試みた。しかし、PDC1 と PDC5 の 2 重欠損株は、4 分子分析の結果致死性もしくは極端に生育が悪く、その 2 重欠損株の取得は困難であった。

### ③ ATPase の欠損が出力に与える影響

大腸菌の ATPase は、細胞膜の電子伝達系で生じたプロトンの濃度勾配を利用して ATP を合成する。この酵素が変異すると、細胞内ではグルコース代謝に関連する解糖系や TCA サイクルの酵素の活性が高まることが報告されていた。このようなグルコース代謝の上昇は、グルコース燃料電池の出力の向上に繋がると考えられた。そこで、まず大腸菌を用いて ATPase の欠損と出力の関係を検討した。大腸菌の ATPase は 8 種類のサブユニットから構成されている。そこで、それらの各遺伝子の欠損株を収集し出力を評価した。その結果、顕著とは言えないが全ての欠損株で出力は上昇していた。最も出力が高かった欠損株は、 $\beta$  サブユニットを欠損した  $\Delta atpD$  で、平均出力は野生株の 1.2 倍程度まで上昇した。この結果から、ATPase が変異すると全体としてグルコース代謝が高まり、それが出力の上昇に繋がると考えられた。

次に、酵母でも同様の実験を試みた。ATPase の 5 種類のサブユニットについて、各遺伝子の欠損株を用いた。それらの出力は、 $\Delta Atp17$  でわずかに上昇したが、他の 4 株では逆に低下した。酵母のグルコース代謝では、呼吸以外にもエタノールやグリセロールに流れる代謝も機能するため、大腸菌のように単純には出力の上昇に繋がらないと考えられた。

### ④ グリセロールへの代謝と出力

上述した酵母の実験のほとんどで、出力の上昇は見られなかった。これらの酵母の結果を、グルコース消費当たりの総出力とエタノール生成量との関係を散布図にまとめると図 4 のようになる。出力が低い株ではエタノール生成量が多い傾向が見られた。これらの

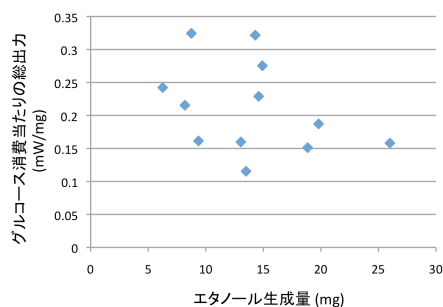


図 4 エタノール生成量と総出力の相関

結果からも、エタノール生成を止めることが、出力を高めるための課題の一つと考えられる。

一方、酵母ではエタノールへの代謝を止めても、代謝の流れは呼吸に向かわずに、グリセロール発酵に向かう可能性が考えられた。そこで、解糖系からグリセロール発酵への分岐で作用する酵素グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼの遺伝子 GPD1 の欠損株を用いて出力を評価した。その結果、遺伝子の欠損により出力が上昇する傾向が見られた。現在もその再現性を含めて確認を進めているが、グルコース代謝の一部はグリセロール発酵にも向かっており、それを弱めることで出力が上昇したと考えられた。

将来、エタノールへの代謝の流れとグリセロールへの代謝の流れを両方止めることで、代謝の多くが呼吸に向い、出力がさらに上昇することが期待される。現在、エタノール発酵を阻害すると報告されている亜硫酸ナトリウムの添加の影響を検討しており、GPD1 欠損との組み合わせによる相乗効果が期待される。

### (3) パン酵母以外の酵母を用いた出力評価

#### ① 他種酵母の電池用触媒としての評価

本研究は、これまでパン酵母 *S. cerevisiae* を用いて研究を進めてきた。糖の資化能力が高い点もパン酵母を用いた理由の一つである。この能力は多くの酵母で共有される。そのため他種酵母も電池用微生物の有望な候補と考えられる。(2) で述べたようにエタノール発酵が出力に大きく影響すると考えられるが、酵母の種類によってエタノール発酵能は異なる。そこで *S. cerevisiae* 以外の 7 種類の酵母を収集し、それらの出力を比較した。その結果、予想したように酵母の種類によって出力は大きく異なった。*K. marxianus* や *C. glabrata* では高い出力が得られたが、*P. pastoris* や *S. pombe* ではその出力は低かった。酵母を分類する指標の一つに、「好気条件下ではグルコースが呼吸を抑制する」クラブトリー効果が知られている。クラブトリーネガティブとポジティブの酵母に分類されるが、今回は出力の高低とクラブトリー効果との関係に一定の傾向は見いだせなかった。

#### ② 他種酵母のグルコース代謝

酵母の種類による代謝の違いを明らかにするために、エタノール生成やグルコース消費濃度について検討した。出力の高い酵母として *K. marxianus*、低い酵母として *P. pastoris* を選び、コントロールに実験室酵母の二倍体株 *S. cerevisiae* BY4743 を用い、負極溶液中のグルコース濃度とエタノール

濃度の経時変化を測定した。その出力は、*K. marxianus*、*S. cerevisiae*、*P. pastoris* の順に高かったが、エタノール生成量とグルコース消費量は逆に *P. pastoris*、*S. cerevisiae*、*K. marxianus* の順に高かった。従って、(2) で述べた結果と同様に、エタノール生成が多いほど出力は低くなった。さらに、測定 2 時間後の消費グルコース当たりの出力を計算すると、*K. marxianus* では 27.3 mW/g、*S. cerevisiae* では 18.8 mW/g、*P. pastoris* では 8.2 mW/g で、この点からも *K. marxianus* は他と比べかなり効率的な触媒と考えられた。

#### ③ *K. marxianus* を用いた微生物電池の評価

最後に、パン酵母で行った実験と同様に、*K. marxianus* を用いて最適な発電条件を検討した。各種構成要素や温度などの条件を検討した結果、その最高出力はパン酵母で得られた最高出力よりもわずかに高い 6.45mW を示した。この値から負極溶液量当たりの出力は 0.86mW/ml と計算され、ml スケールの微生物電池としては高いレベルを示した。この結果から、*K. marxianus* はグルコース燃料電池の触媒としてのポテンシャルが高く、今後の育種対象として有望な株であることが明らかとなった。

また、*K. marxianus* はキシロースを単一炭素源としても生育が可能であるため、キシロースを燃料にした発電も試みた。その結果、グルコースと比較すると出力は低いが、極端な低下ではなかった。従って、*K. marxianus* はグルコースとキシロースが含まれる木質バイオマスからの発電に適していると考えられる。今後、木質系バイオマス発電用の酵母としての育種が期待される。

### 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 5 件)

①金城裕行 立花太郎 東雅之 「各種酵母の微生物型燃料電池における出力評価とグルコース代謝が出力に与える影響」 日本生物工学会大会 2012 年 10 月 24 日 神戸国際会議場

②高野晃輔 井上博貴 東雅之 「酵母を触媒とした微生物燃料電池の開発」 化学工学 3 支部合同福井大会 2011 年 12 月 8 日 ホテルフジタ福井

③三好薫 高野晃輔 金城裕行 脇坂知行 立花太郎 東雅之 「酵母グルコース燃料電池の最適化と電池用酵母の開発に向けた取り組み」 第 13 回化学工学会学生発表会 2011 年 3 月 5 日 神戸大学

④高野晃輔 脇坂知行 立花太郎 東雅之 「グルコース燃料電池に適した微生物の検討とその最適化」 日本生物工学会第 62 回大会 2010 年 10 月 28 日 ワールドコンベンシ

ヨンセンターサミット（宮崎市）

⑤高野晃輔 脇坂知行 立花太郎 東雅之  
「酵母を用いた小型グルコース燃料電池の  
性能向上」 化学工学会第42回秋季大会 2010  
年9月3日 同志社大学

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

東 雅之 (AZUMA MASAYUKI)  
大阪市立大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号：20285282

### (2) 研究分担者 なし