

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 22日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22710082

研究課題名（和文） 燃料電池用メソポーラスカーボン-酵素複合触媒の創製

研究課題名（英文） Development of Mesoporous Carbon-enzyme electrocatalysts

研究代表者

林 灯 (HAYASHI AKARI)

九州大学・水素エネルギー国際研究センター・准教授

研究者番号：60443214

研究成果の概要（和文）：

申請者の従来研究であるメソポーラスカーボンを用いた燃料電池触媒研究の特徴を活かし、新たにラッカーゼ（マルチ銅オキシダーゼ酵素）を組み合わせることで、新しい複合触媒を作製した。ナノ空間内で安定化されたラッカーゼは有機溶媒（メタノール）に対する耐久性が大きく向上した。また、アントラセンをカーボン上に固定し、ラッカーゼのオリエンテーションを制御することで、より高い酸化還元電流応答を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：

A new carbon-enzyme hybrid material was developed through fixation of Laccase (multicopper oxidase enzyme) into the nano-space of mesoporous carbon. As a result, Laccase gained high durability toward organic media. Electrocatlytic activity toward oxygen reduction was also demonstrated by controlling the orientation of Laccase by addition of anthracene.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合化学

科研費の分科・細目：環境・共通基礎研究

キーワード：バイオ燃料電池・酵素・カーボン多孔体・電気化学・酸素還元

1. 研究開始当初の背景

化石資源に大きく依存した社会から持続的発展可社会に変革すべく、環境調和型化学システムへの移行が望まれている中で、エネルギー消費、副生成物（廃棄物）が少ないという特長を有する酵素に着目した。特に、マルチ銅オキシダーゼ酵素の酸素還元特性が

報告されている中で、申請者の従来研究であるメソポーラスカーボン（カーボン多孔体）担体のナノ空間を利用した燃料電池電極触媒の研究に、新たに酵素の概念を取り入れることを提案した。具体的には、メソポーラスカーボンのナノ空間で起こる特有の物質移動や触媒の安定化の特徴とマルチ銅オキシ

ダーゼを組み合わせることで、燃料電池触媒の長期的技術課題である白金代替触媒となるメソポーラスカーボン-酵素複合触媒の開発が可能となると考えた。

2. 研究の目的

申請者が見出したメソポーラスカーボンのナノ空間で起こる特異な現象とマルチ銅オキシダーゼ酵素を組み合わせる、つまりマルチ銅オキシダーゼをカーボンナノ空間に挿入したメソポーラスカーボン-酵素複合触媒を作製することを目的とした。

更に、マルチ銅オキシダーゼの酸素還元特性を利用した燃料電池用白金代替触媒の開発を目指して、研究期間内に新規メソポーラスカーボン-酵素の触媒活性及び耐久性について調べることを目標とした。

3. 研究の方法

(1) メソポーラスカーボンのカーボンナノ空間 (8 nm) へのマルチ銅オキシダーゼの固定化

メソポーラスカーボン粉末にマルチ銅オキシダーゼの1つであるラッカーゼを固定化する目的で、メソポーラスカーボン分散液にラッカーゼ溶液を加え、4°Cで攪拌する。固定化されたラッカーゼの量は、遠心分離後、液中に残ったラッカーゼ濃度を測定することから決定する。また、比較対象として、市販のカーボンへの固定化も行う。

(2) カーボン上に固定化されたラッカーゼの酵素活性評価

メソポーラスカーボン-ラッカーゼ複合材料と酵素活性評価試薬である ABTS と反応させることで生成する ABTS⁻の吸光度を測定し、カーボンナノ空間に固定化されたラッカーゼ活性を調べる。

(3) カーボン上に固定化されたラッカーゼの耐環境性評価

ナノ空間に固定化されたラッカーゼの有機溶媒に対する耐久性について、メソポーラスカーボン-ラッカーゼ複合材料を有機溶媒に浸漬後に酵素活性を評価することで調べる。

(4) カーボン上に固定化されたラッカーゼの電気化学酸素還元評価

メソポーラスカーボン-ラッカーゼ複合触媒を作用極として、酸素飽和溶液中での酸素還元電流値を調べる。

4. 研究成果

(1) メソポーラスカーボンのカーボンナノ空間 (8 nm) へのラッカーゼ酵素の固定化

メソポーラスカーボン粉末へのラッカーゼを固定化は、図1に示すような方法で行った。メソポーラスカーボンは、図に示すようなナノチャンネル構造 (直径8nm) を有し、そのナノ空間へラッカーゼを固定した。比較対象として、市販のカーボンブラックへの固定化も同様に行った。



図1. ラッカーゼの固定化方法

一晩攪拌後、遠心分離機を用いて、溶液と粉末を分離した。カーボン上に固定化されたラッカーゼの量は、溶液中に残存するラッカーゼの量を市販のたんぱく定量キットを用いて測定し、それ以外のラッカーゼは全てカーボンに固定化されたと考えた。加えたラッカーゼの量に対して、どの程度 (重量%) のラッカーゼがカーボンに固定化されたかを表1に示す。市販のカーボンブラックには、99%以上のラッカーゼが吸着したのに対し、メソポーラスカーボン上には、15-20%しか固定化出来なかった。これは、メソポーラスカーボンの8 nm という非常に小さな空間に対して、カーボンブラックは30 nm以上の粒子間細孔を持つことから生じる吸着能力の違いであると考えられる。

	ラッカーゼの吸着 (48h)	420 nmでの吸収 (ABTS ⁻)
MPC (8 nm)	15-20%	1.4
CB (>30nm)	>99%	0.2

表1. カーボン上に吸着されたラッカーゼ量及び固定化されたラッカーゼにより生成した ABTS⁻の吸光度. MPC=メソポーラスカーボン、CB=市販のカーボンブラック

(2) カーボン上に固定化されたラッカーゼの酵素活性評価

メソポーラスカーボン-ラッカーゼ複合材料と酵素活性評価試薬である ABTS と反応させることで生成する ABTS⁻の吸光度を測定し、

カーボンナノ空間に固定化されたラッカーゼ活性を調べた。表 1 に示された吸光度が大きいほど、酵素活性が高いことを示すことから、ラッカーゼの吸着量が低いにも関わらず、メソポーラスカーボンに固定化されたラッカーゼの酵素活性は非常に高いことが分かる。しかしながら、固定化前のラッカーゼでは、吸光度が 2.0 程度を示すことから、固定化により活性が低減することは回避出来なかったが、市販のカーボンブラックを用いるよりもかなり改善できた。

図 2 に示すように、8 nm のナノチャンネルの入り口付近にラッカーゼが固定化されていると考える。ナノチャンネルの疎水性とラッカーゼの疎水基の相互作用により物理吸着することで、酵素活性サイトへ十分に ABTS がアクセス出来ると考える。一方、市販のカーボンブラックでは、ラッカーゼがより密に（多く）存在するため、活性サイトへ ABTS がアクセスできず、酵素活性が低いと思われる。



図 2. カーボンナノチャンネルに固定化されたラッカーゼのイメージ図

(3) カーボン上に固定化されたラッカーゼの耐環境性評価

ナノ空間に固定化されたラッカーゼの有機溶媒に対する耐久性について調べる目的で、カーボンラッカーゼ複合材料を 50% のメタノール溶液に 30 分浸漬させた。浸漬前後でのラッカーゼの酵素活性を比較した結果、メソポーラスカーボンのナノ空間に固定化されたラッカーゼは浸漬前の 80-95% の活性を維持できた。一方、市販のカーボンブラック上に固定化されたラッカーゼは、30-50% 程度しか維持することが出来なかった。これらの結果より、ナノ空間内にラッカーゼを固定化することで、酵素の耐環境性を向上することに成功したと言える。

(4) カーボン上に固定化されたラッカーゼの電気化学酸素還元評価

カーボンラッカーゼ複合材料の燃料電池カソード触媒としての活性評価を行った。図 3 に示すような溶液系電気化学セットアップを用いて、カーボンラッカーゼ複合材料の酸素還元活性を測定した。しかしながら、酸素還元活性は、ほとんど検出できなかった。

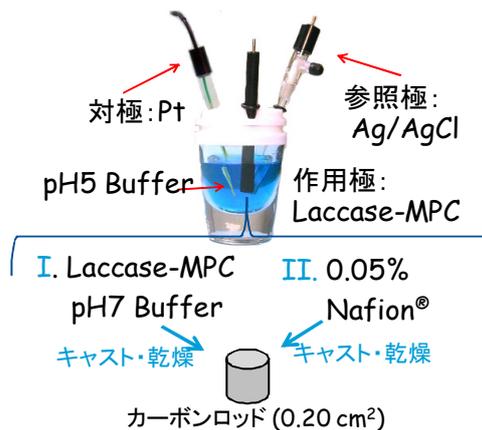


図 3. 本研究で用いた溶液系電気化学セットアップ (その 1)

固定化ラッカーゼの酵素活性としては高い活性が見られた一方で、電気化学酸素還元反応では活性が見られない理由の一つに、固定化されたラッカーゼの反応応答の遅さが考えられる。酵素活性試薬を用いて評価する際は、ラッカーゼが十分に反応する時間が少なくとも数分単位であるが、電気化学反応では数秒単位である。

そこで、メディエータとして硫酸銅を使用した。また、反応時間が短い場合、よりラッカーゼのオリエンテーションが重要となると考え、Gewirth らの論文 (J. Phys. Chem. Lett. 2010, 1, 2251-2254) で報告されているアントラセンを基板表面に修飾することで、ラッカーゼの疎水基との相互作用を利用したラッカーゼオリエンテーションの制御を試みた。今回の研究では、図 4 に示す 3 種類のアントラセンを用いて、カーボンナノ空間内に物理吸着させた。

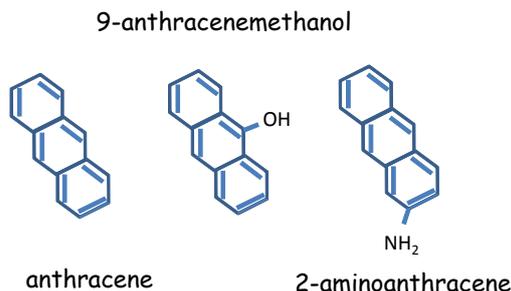


図 4. 本研究で用いた 3 種類のアントラセン

アントラセンを吸着させたカーボンを用極として、ラッカーゼ (及び硫酸銅) が存在する溶液中で酸素還元活性を測定した。図 5 に市販のカーボンブラックを用いた場合の結果を示す。カーボンブラックのみ (黒線) では、酸素還元電流が観測されないが、アン

トラセンを物理吸着したカーボンブラック（水色線）では、酸素還元電流が流れ始める。更に溶液中に硫酸銅を加えることで、電流値が大幅に増え（ピンク線）、酸素還元性能が大きく向上することが分かった。

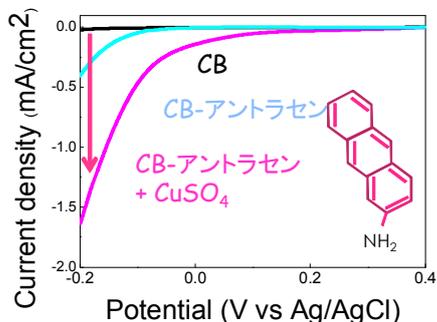


図5. 市販カーボンブラック（CB）を用いたリニアスイープボルタモグラム
黒：CB、水色：CB-アントラセン、ピンク：CB-アントラセン+硫酸銅

この時、3種類のアントラセンを用いたが、2-アミノアントラセンを用いた時のみ、その効果がみられた。これは、Gewirthらの報告例と一致する結果で、アントラセンの「2」の位置で基板表面に固定化された時に、その上に吸着するラッカーゼのオリエンテーションが最適化されると予想される。

メソポーラスカーボンを用いて同様の評価を行った。その結果を図6に示す。図6中に、比較としてカーボンブラック-アントラセンの硫酸銅添加の結果（ピンク線）を示している。アントラセンを物理吸着したメソポーラスカーボン（青線）では、酸素還元電流がピンク線に比べて大きい。つまり、酸素還元活性が高いことが分かる。溶液中に硫酸銅を加えることで、電流値が増え（赤線）、酸素還元性能が更に向上することが分かった。

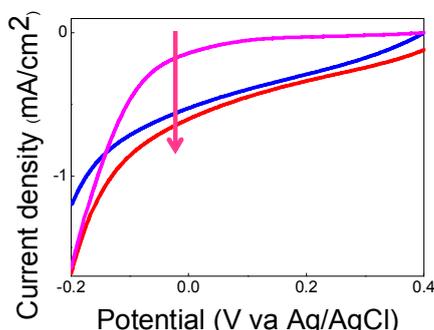


図6. メソポーラスカーボン（MPC）を用いたリニアスイープボルタモグラム
ピンク：CB-アントラセン+硫酸銅、青：MPC-アントラセン、赤：MPC-アントラセン+硫酸銅

(5) 結言

カーボンナノ空間の中で、ラッカーゼ酵素は安定に存在し、その酵素活性も維持できることがわかった。酵素の欠点である耐環境性の低さも、向上されることが分かった。

一方、電気化学反応活性はそのままではほとんど見られなかった。メディエータとして硫酸銅を添加することで、酸素還元電流応答の改善が見られた。また、酵素電気化学反応において、固定化された酵素のオリエンテーションが重要であることが分かった。アントラセンをカーボン上に固定し、ラッカーゼのオリエンテーションを制御することで、より高い酸化還元電流応答を得ることができた。

更なる酸素還元性能の向上は必要ではあるが、耐環境性を向上できる特徴を活かせば、白金代替触媒となる可能性があると考えられる。

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10件)

- ① 林 灯、カーボンナノ空間を反応場とする酵素反応、電気化学会第79回大会、2012.3.29、アクティビティ浜松（静岡）
- ② 林 灯、酵素複合型カーボン電極の開発とバイオ燃料電池への応用、名古屋工業大学-産業技術総合研究所連携・協定記念公演、2012.2.8、レセプションハウス名古屋通信会館（愛知）
- ③ 林 灯、Development of nanostructured carbon and application toward electrocatalysts、第21回日本MRS学術シンポジウム、2011.12.21、横浜市開港記念会館（神奈川）
- ④ 林 灯、Exploration of electrocatalytic reactions in nano-space of carbon materials: application to fuel cells、242nd American Chemical Society National Meeting、2011.8.29、Denver (USA)
- ⑤ 林 灯、Application of nanostructured carbon materials toward electrocatalysts、219th ECS Meeting、2011.5.4、Montreal (Canada)
- ⑥ 林 灯、カーボンナノ空間を反応場とする触媒反応、電気化学会第78回大会、2011.3.29、横浜国立大学（横浜）
- ⑦ (招待講演) 林 灯、カーボンナノ空間でおこる電気化学反応-メソポーラスカーボンを用いた燃料電池触媒-、産総研研究講演会 in 中部、2011.2.9、ウインク愛知（名古屋）

- ⑧ 林 灯、Development of mesoporous carbon nanoreactor、Pacifichem2010、2010.12.17、Honolulu (USA)
- ⑨ 林 灯、Mesoporous carbon nanoreactor、NCSS2010、2010.9.22、幕張メッセ (千葉)
- ⑩ 林 灯、Development of nanostructured carbon materials and their application toward electrocatalysts for polymer electrolyte fuel cell、217th ECS Meeting、2010.4.27、Vancouver (Canada)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 灯 (HAYASHI AKARI)

九州大学・水素エネルギー国際研究センター・准教授

研究者番号：60443214

(2) 連携研究者

加藤 且也 (KATO KATSUYA)

産業技術総合研究所・先進製造プロセス研究部門・研究グループ長

研究者番号：70356781