

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：13102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23360302

研究課題名(和文) 酵素固定による導電性高分子膜の修飾とバイオ燃料電池向け電極作製への適用

研究課題名(英文) Modification of Conducting Polymer Films by Enzyme Immobilization for Fabrication of Electrodes of Biological Fuel Cells

研究代表者

下村 雅人 (SHIMOMURA, Masato)

長岡技術科学大学・工学部・教授

研究者番号：20251853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円、(間接経費) 4,410,000円

研究成果の概要(和文)：3-メチルチオフェン(3MT)とチオフェン-3-酢酸(T3A)の共重合体膜にグルコースオキシダーゼ(GOx)を共有結合させた酵素電極をグルコース燃料電池に適用し、電子伝達物質(メディエータ)の存在下において、良好なアノード特性を確認した。一方、ラッカーゼ(Lac)を吸着させたポリ3MT膜はメディエータを要しない直接電子移動型のカソードとして機能した。GOx-3MT/T3A共重合体膜とLac-ポリ3MT膜を、それぞれ、アノードとカソードに用い、植物由来のセルロースを酵素分解して得たグルコース溶液によって発電を試みた結果、カソード1cm<sup>2</sup>あたり10μW程度の出力が確認できた。

研究成果の概要(英文)：Bioelectrodes were fabricated with conducting polymer films for the purpose of applying them to a biological fuel cell driven with glucose. An enzyme electrode was prepared by covalently immobilizing glucose oxidase (GOx) on a copolymer film of 3-methylthiophene (3MT) and thiophene-3-acetic acid (T3A), which showed a good performance as an anode of the fuel cell in the presence of an electron-transferring mediator. A cathode was prepared by adsorbing laccase (Lac) on poly3MT film, which functioned as a direct electron transfer type cathode without any mediator. A fuel cell was constructed with the GOx-3MT/T3A copolymer film (anode) and the Lac-poly3MT film (cathode) and subjected to electric power generation using glucose solutions obtained by enzymatic decomposition of plants cellulose. A considerable power output (ca. 10 microwatt/cm<sup>2</sup>-cathode) was generated by the fuel cell driven with the plants-derived glucose solutions.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：材料工学，構造・機能材料

キーワード：酵素 酵素固定 共有結合 ハイブリッド化 導電性高分子 バイオ燃料電池 電極 酵素電極

### 1. 研究開始当初の背景

環境への負荷低減が求められるようになり、既に、バイオマスからのエタノール生産が行われているが、今後、様々な技術的・社会的要因によってバイオ燃料の形態はますます多様化して行くことは必至である。このような背景から、バイオ燃料の新規かつ多様な利用技術の開発が不可欠であり、燃料電池もその一つとして位置づけられる。バイオ燃料電池については、環境への負荷低減という視点以外に、人工臓器用の超小型電源として生体内での利用も検討されている。

これまでに、筆者らは、3-メチルチオフェン (3MT)とチオフェン-3-酢酸 (T3A) の電解共重合反応により-COOH 基を有する導電性高分子の薄膜を作製し、この-COOH 基との縮合反応でグルコースオキシダーゼを共有結合させた酵素固定化電極の作製技術に取り組んできた。この酵素固定化電極を用いて電流検知型のグルコースセンシングを試み、酵素固定化電極  $1 \text{ cm}^2$  あたり  $0.5 \text{ mA}$  程度の高いグルコース応答電流が得られることを示した。酵素固定化電極の作製に用いた導電性高分子の表面は、多孔質であり、微細な繊維状構造も見られた。このような表面構造によって十分な固定化酵素量が確保され、これがグルコースセンシングにおける高い応答電流の要因となっている。また、この酵素固定化電極をグルコース燃料電池のアノードとして適用すれば、固定化酵素によるグルコースの酸化反応によって得られるエネルギーを電気エネルギーとして獲得しうることが熱力学的に検証されている。

一方、研究対象の燃料電池で用いるグルコースはデンプンの加水分解によって容易に生産しうが、多量のデンプンを燃料生産に利用することは、他のバイオ燃料と同様に、食料としての利用を脅かすことになるため、原料としてセルロースに着目する必要がある。セルロースは結晶性多糖であり、分解は容易ではないが、これを加水分解する酵素としてセルラーゼが知られている。連携研究者はセルラーゼのタンパク質工学的改変やセルラーゼを生産する糸状菌 (*Trichoderma reesei*) 遺伝子の進化分子工学的改変によってセルロース分解活性の向上を図り、効率的にセルロースからグルコースを獲得できるようになった。

このように、グルコース燃料電池の主要構成要素である酵素固定化電極の開発について十分な見通しが得られていること、グルコースをバイオ燃料として利用することは現実的にも可能な状況にあることから、本研究の目的は達成可能である。すなわち、バイオセンサーの研究成果を基盤として高性能な酵素固定化電極を開発し、グルコース燃料電池に適用することによって、化石資源に依存しない新規な電気エネルギー獲得技術を構築すべく、本研究の着手に至った。

### 2. 研究の目的

石油、石炭などの化石資源に代わる再生可能なエネルギー資源として、バイオマスを有効かつ適切に利用する技術の開発が急務である。本研究は、地球上に豊富に存在する植物バイオマスを原料として生産するグルコースをバイオ燃料として捉え、これから電気エネルギーを獲得するための酵素電極を開発し、バイオ燃料電池に適用することを意図して計画した。

本研究の目的は、グルコース酸化酵素と表面に固定化した高機能電極を創出し、これをバイオ燃料電池に適用することにある。具体的には、導電性高分子の表面に酵素分子と電子伝達分子を結合させた酵素固定化電極を開発し、これをグルコース燃料電池のアノード(燃料極)として用いることによって、新規な電気エネルギー獲得システムの構築に取り組んだ。

### 3. 研究の方法

研究対象とするグルコース燃料電池の構成を図1に示す。このシステムではグルコースを燃料とし、これをアノードに固定化したグルコースオキシダーゼ (GOx) によって酸化してグルコノラクトンに転換する。その際に、電子伝達物質 (メディエータ M) は還元体 (H-M-H) となるが、H-M-H はアノード表面で酸化されて M が再生する。一連の反応で生成した  $\text{H}^+$  はカソード表面で  $\text{O}_2$  と反応して  $\text{H}_2\text{O}$  を与える。全体としての反応は  $\text{H-M-H} + 1/2 \text{O}_2 \longrightarrow \text{M} + \text{H}_2\text{O}$  となり、この反応に伴う自由エネルギー変化を電気エネルギーに転換しようというものである。

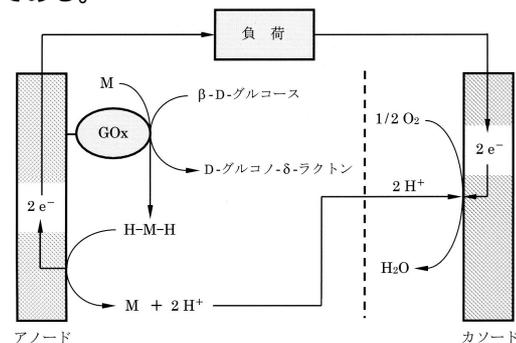


図1 グルコース燃料電池の構成

本研究では、導電性高分子を活用した高効率な酵素固定化電極を開発し、これを燃料電池システムに適用することによってグルコースからの電気エネルギー獲得を図る。

#### (1) 研究の全体計画

酵素固定化電極とこれを用いた燃料電池システムに関して、次の事項についての検討を行い、グルコース燃料電池システム実現の可能性を見極める。

まず、酵素固定化電極をアノードとするグルコース燃料電池の構成・動作条件と基本特性との関係を検討し、発電特性の評価を

行う。

次いで、メディエータ M の使用に関して、GOx とともに導電性高分子膜表面に共有結合させることを試み、アノード反応に及ぼす効果を検討する。

さらに、カソードについても酵素の利用を検討する。貴金属電極を代替しうる酵素固定化電極の作製を試み、セルロース由来の粗製グルコースによる発電に適用する。

## (2) 実施内容と方法

### アノード用酵素固定化電極の作製と特性評価

電解重合法により作製した 3MT/T3A 共重合体 (図 2) 等の導電性高分子の膜表面に存在する -COOH 基と GOx の -NH<sub>2</sub> 基とを縮合反応させ、図 3 のように共有結合 (-CONH- 結合) による GOx の固定化を行い、アノード用電極を作製した。メディエータについても -COOH 基を足場として共有結合による固定化を試みた。

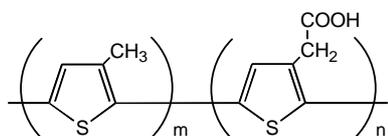


図 2 3MT/T3A 共重合体の構造

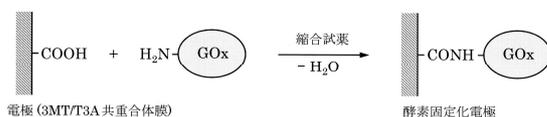


図 3 共有結合法による GOx の固定

このようにして作製した GOx 固定化電極について、電気化学的評価および分析化学的・生化学的評価 (固定化 GOx の定量、酵素活性の評価) を実施した。

### GOx 固定化電極を用いたグルコース燃料電池の試作と特性評価

アノード槽とカソード槽とをプロトン伝導性高分子電解質膜 (Nafion 膜) で隔てたガラス製セルを作製し、各槽には 0.10 M のリン酸緩衝液 (pH 7.0) を入れ、GOx 固定化 3MT/T3A 共重合体膜および白金電極を、それぞれ、アノードおよびカソードとして配置した。この燃料電池を用いてグルコースによる発電試験を実施し、電流-電圧特性および電力-電圧特性の評価を行った。

### カソード用酵素固定化電極の作製と特性評価

3MT/T3A 共重合体膜の表面に酸素還元酵素 (ラッカーゼおよびビリルビンオキシダーゼ) を共有結合によって固定化し、グルコース燃料電池のカソードとしての特性評価を実施した。

また、各種導電性高分子膜からラッカーゼへの直接電子移動についても検討し、メディエータを用いずに酸素還元を行うことを試みた。

セルロース由来の粗製グルコース調製  
各種植物バイオマス由来のセルロースを酵素 (セルラーゼ) によって分解し、粗製グルコースを得た。この粗製グルコースを燃料電池による発電試験に供した。

### セルロース由来の粗製グルコースによる発電

アノードおよびカソードの両極に酵素固定化電極を用いた燃料電池を構成し、植物バイオマス由来のセルロースを酵素分解して得た粗製グルコースを燃料として発電試験を実施した。

## 4. 研究成果

### (1) アノード用酵素固定化電極の特性

電解重合によって 3MT/T3A 共重合体膜 (面積 0.25 cm<sup>2</sup>) を作製し、膜の表面に存在する -COOH 基と GOx の -NH<sub>2</sub> 基とを縮合反応させて GOx 固定化電極 (GOx 固定化量 10 μg/cm<sup>2</sup>, 固定化 GOx の活性 20 mU) を作製した。電解重合におけるモノマー組成 (T3A の割合) は共重合体膜の導電率および GOx の固定化量と活性を考慮して 10% とした。

図 4 にグルコース濃度と GOx 固定化電極によるグルコース酸化電流 I との関係を示す。グルコース酸化電流の測定は、1.0 mM の *p*-ベンゾキノン (メディエータ) を含む 0.10 M のリン酸緩衝液 (pH 7.0) にグルコースを溶解させ、サイクリックボルタンメトリーによって行った。グルコース濃度の増大に伴って I は増加し、0.1 M のグルコースに対して 3.5 mA/cm<sup>2</sup> 程度の酸化電流が得られた。

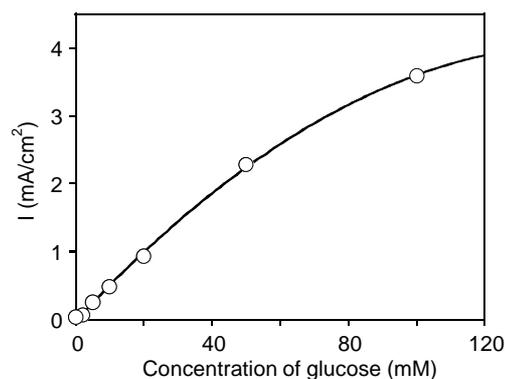


図 4 グルコース濃度とグルコース酸化電流との関係

一方、炭素数 2~12 の直鎖状ジアミンおよび分子量 4,000~15,000 のポリ(L-リシン) をスペーサーとして 2,5-ジヒドロキシベンズアルデヒドを共有結合させ、ヒドロキノン構造のメディエータを固定化した GOx 固定化電極の作製を試みた。その結果、長鎖のジアミンやポリ(L-リシン) を用いてメディエータを固定化した電極で比較的大きなグルコース酸化電流が観測されたものの、その値は遊離の *p*-ベンゾキノンを用いた場合 (図 4) の 1/5 ~ 1/4 程度にとどまった。

一方、酵素固定化電極の表面に形成させたヒドロキソンの電解重合層がメディエータとして機能し、バイオ燃料電池の電子伝達系に適用可能であることを確認した。この結果は前例のない新規な酵素/メディエータ固定化電極の作製技術を提示するものである。

上述の研究と並行して、導電性高分子膜の表面に酵素の固定化点を与えるための新規方法を検討した。ポリアクリル酸存在下における電解重合によって表面にカルボキシル基を有する導電性高分子/ポリアクリル酸複合膜が得られ、この複合膜は十分な電気化学的活性を有していた。膜表面のカルボキシル基は、酵素のアミノ基と縮合可能であるため、これを足場として酵素を共有結合させることにより、当該複合膜をバイオ燃料電池の酵素固定化電極として適用しうる。

### (2) GOx 固定化電極を用いたグルコース燃料電池の特性

メディエータとして 1 mM の *p*-ベンゾキノンをアノード槽を含む燃料電池について電流-電圧特性および電力-電圧特性の評価を行った。図 5 および図 6 に示すように、グルコース濃度の増大に伴って電池電流  $I_{cell}$  は増加し、それに伴って出力  $P$  も増加した。

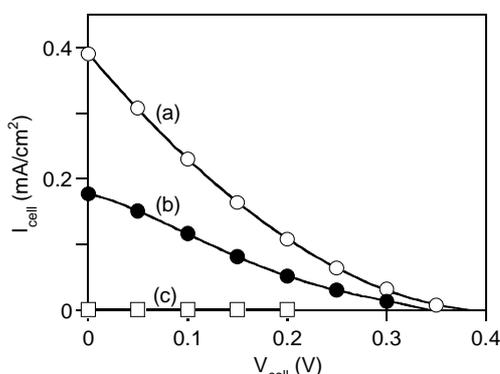


図 5 グルコース燃料電池の電流-電圧特性：(a) グルコース 100 mM, (b) グルコース 5 mM, (c) グルコースなし

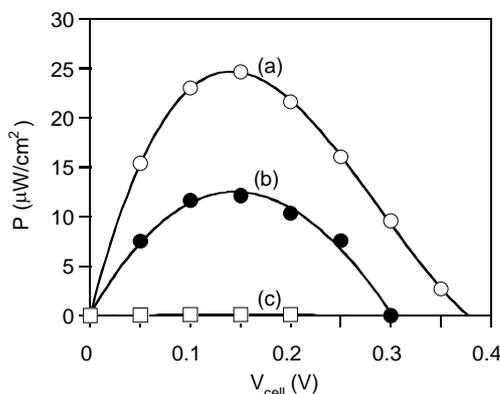


図 6 グルコース燃料電池の電力-電圧特性：(a) グルコース 100 mM, (b) グルコース 5 mM, (c) グルコースなし

電池の開放電圧はグルコース濃度によらず 0.35 ~ 0.40 V 程度であるが、短絡電流は、グルコース濃度を 100 mM とした場合に 0.4 mA/cm<sup>2</sup>, グルコース濃度を 5 mM とした場合には 0.4 mA/cm<sup>2</sup> 程度である。最大出力は電圧 0.15 V 付近で得られ、グルコース濃度 100 mM および 5 mM の場合、それぞれ、25 µW/cm<sup>2</sup> および 12 µW/cm<sup>2</sup> であった。

### (3) カソード用酵素固定化電極の特性

ラッカーゼ (Lac) およびピリルピンオキシダーゼ (BOx) を 3MT/T3A 共重合体膜の表面に共有結合によって固定化し、グルコース燃料電池用カソードとしての適性を評価した。2,2'-アゾピス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) をメディエータとして酵素固定化電極の酸素還元能を評価した結果、いずれの酵素を固定化した導電性高分子電極によっても酸素還元電流が得られることが確認できた。

次いで、GOx を固定化した 3MT/T3A 共重合体膜および酸素還元酵素 (Lac, BOx) を固定化した 3MT/T3A 共重合体膜を、それぞれ、グルコース燃料電池のアノードおよびカソードとして適用し、100 mM のグルコースを燃料として発電特性の評価を実施した。表 1 に示すように、ラッカーゼを固定化したカソードを用いた場合にはカソード 1cm<sup>2</sup> あたり 25 µW の最大出力 ( $P_{max}$ ) が得られ、ピリルピンオキシダーゼを固定化したカソードを用いた場合には 50 µW の  $P_{max}$  が得られることを確認した。これらの値は白金電極をカソードとした場合 (図 6, (a)) と比較しても遜色がない。

表 1 酵素固定化電極をカソードとしたグルコース燃料電池の発電特性

Cathode	$P_{max}$ (µW/cm <sup>2</sup> )
Lac-3MT/T3A	25.2
BOxc-3MT/T3A	50.4

また、メディエータを用いずにカソード反応 (酸素還元) を行うことを目的として、各種導電性高分子電極に Lac を吸着させ、電極から固定化 Lac への直接電子移動についての検討を行った。Lac を吸着固定化した 10 種の導電性高分子電極 (ポリチオフェン, ポリ(3-メチルチオフェン), ポリ(3-エチルチオフェン), ポリ(3-プロピルチオフェン), ポリ(3-ブチルチオフェン), ポリ(3-ペンチルチオフェン), ポリ(3-ヘキシルチオフェン), ポリ(3,4-エチレンジオキシチオフェン), ポリアニリンおよびポリピロール) について、メディエータを用いずに酸素還元能を評価した結果、ポリチオフェン, ポリ(3-メチルチオフェン), ポリ(3-エチルチオフェン), ポリ(3-プロピルチオフェン) の 4 種に Lac を固定化した場合に酸素還元電流が観測された。

これらの中で、ポリ(3-メチルチオフェン) (P3MT) 膜に Lac を固定化した電極が最も大きな酸素還元電流を与えたことから、P3MT の利用が膜表面から Lac への直接電子移動に有効であると判断した。図 7 は、酸素および窒素で飽和させた酢酸緩衝液 (pH 4.5) 中で、Lac 固定化 P3MT 膜について電流-電圧特性を調べた結果である。+0.4 V (vs. Ag/AgCl) において  $150 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  の酸素還元電流  $j$  が得られているが、この値は Lac 固定化導電性高分子膜による酸素の電気化学的還元に関する他の研究で得られた結果よりも大きい。この結果から、Lac 固定化 P3MT 膜をグルコース燃料電池の酸素極とすることにより、メディエータを用いることなしにカソード反応 (酸素還元) を実現できる見通しが得られた。

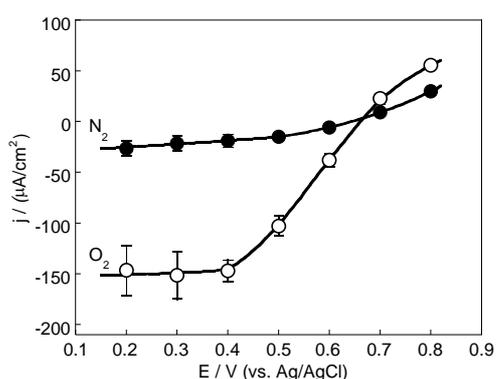


図 7 Lac 固定化 P3MT 膜の酸素還元特性

#### (4) セルロース由来の粗製グルコース調製

タケ、イナワラ、スギおよびナラ由来のセルロースをセルラーゼによって分解・糖化処理することにより、粗製グルコースを得た。それぞれのセルロース分解液は、グルコース濃度が 5.0 mM となるように、0.05 M の酢酸緩衝液 (pH 5.0) によって希釈した。

このようにして調製した粗製グルコース溶液を燃料電池による発電試験に供した。粗製グルコースにはグルコース以外の単糖も含まれており、表 2 に示すように、それらの濃度はセルロース原料によって異なっていた。また、当該単糖の中では、キシロースの濃度が比較的高いこともわかった。

表 2 セルロース由来の粗製グルコース溶液に含まれる他の単糖

原料	濃度 (mM)		
	Xylose	Arabinose	Mannose
タケ	2.0	0.10	N. D.
イナワラ	0.7	0.09	N. D.
スギ	0.05	N. D.	0.17
ナラ	1.2	0.10	0.02

N. D.: 検出されず

#### (5) セルロース由来の粗製グルコースによる発電

GOx および Lac を固定化した 3MT/T3A 共重合体膜を、それぞれ、グルコース燃料電池のアノードおよびカソードとして適用し、セルロース由来の粗製グルコース (5 mM) を燃料として発電試験を実施した。

図 8 は各種粗製グルコースを燃料とした場合の電流-電圧特性である。図中には、5 mM の純グルコースを燃料とした場合の結果も併せて示した。粗製グルコースを燃料とした場合の電流値は純グルコースを用いた場合と比較して小さく、スギ (Cedar), イナワラ (Rice straw), タケ (Bamboo), ナラ (Oak) を原料とするものの順に減少している。

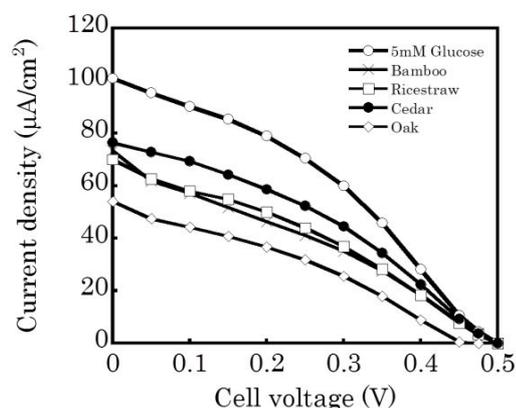


図 8 セルロース由来の粗製グルコースを用いた燃料電池の電流-電圧特性

図 8 の電流-電圧特性から求めた短絡電流  $I_{sc}$ 、開放電圧  $V_{oc}$  および最大出力  $P_{max}$  を表 3 にまとめた。粗製グルコースを燃料とした場合、 $V_{oc}$  については純グルコースを用いた場合と比較してほとんど相違はないが、 $I_{sc}$  と  $P_{max}$  の値は純グルコースを用いた場合よりも小さく、スギ、イナワラ、タケ、ナラを原料とするものの順に減少している。

表 3 セルロース由来の粗製グルコースを用いた燃料電池の発電性能

原料	$I_{sc}$ ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ )	$V_{oc}$ (V)	$P_{max}$ ( $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ )
純グルコース	101	0.48	18.0
タケ	73	0.50	10.6
イナワラ	70	0.50	11.1
スギ	76	0.46	13.3
ナラ	54	0.47	7.7

表 2 のデータを考慮すれば、粗製グルコースを燃料とした場合に  $I_{sc}$  と  $P_{max}$  の値が純グルコースを用いた場合よりも小さくなる傾向は粗製グルコース溶液中のキシロース濃度に関連しているように思われる。そこで、

異なる量のキシロースを含む 5.0 mM グルコース溶液中で,GOx 固定化電極を用いてグルコース酸化を試みたところ,図 9 に示すように,キシロース濃度の増加に伴うグルコース酸化電流の減少が確認された。

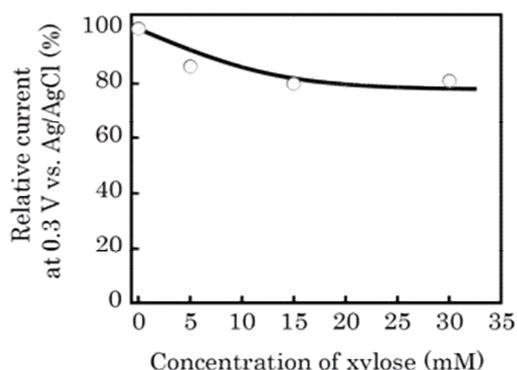


図 9 キシロース濃度のグルコース酸化電流への影響

粗製グルコース溶液に共存するキシロースの影響を反応速度論的に検討した結果,キシロースが GOx によるグルコース酸化反応を阻害していることが示唆された。

#### (6) 今後の課題

本研究において,メディエータを固定化した GOx 固定化電極の作製を試みたが,そのアノード性能は不十分であり,改善が必要である。カソードについては Lac 固定化 P3MT 膜を用いることにより,メディエータを用いずに酸素還元を実現できる見通しが得られたことから,その特性の向上を図ることも今後の課題である。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

T. Homma, M. Kondo, T. Kuwahara, M. Shimomura, Electrochemical Polymerization of Aniline in the Presence of Poly(acrylic acid) and Characterization of the Resulting Films, *Polymer*, 査読有, Vol. 53, pp. 223-228 (2012)

T. Kuwahara, H. Yamazaki, M. Kondo, M. Shimomura, Modification of an Enzyme Electrode by Electrodeposition of Hydroquinone for Use as the Anode of a Glucose Fuel Cell, *Applied Surface Science*, 査読有, Vol. 258, pp. 6321-6325 (2012)

T. Homma, M. Kondo, T. Kuwahara, M. Shimomura, Immobilization of Acid Phosphatase on a Polyaniline/Poly(acrylic acid) Composite Film for Use as the Anode of a Fuel Cell Driven with L-Ascorbic Acid 2-Phosphate, *Polymer Journal*, 査読有, Vol. 44, pp. 1117-1122 (2012)

T. Kuwahara, T. Asano, M. Kondo, M. Shimomura, Bioelectrocatalytic O<sub>2</sub> Reduction with a Laccase-Bearing Poly(3-methylthiophene) Film Based on Direct Electron Transfer from the Polymer to Laccase, *Bioelectrochemistry*, 査読有, Vol. 91, pp. 28-31 (2013)

T. Homma, M. Kondo, T. Kuwahara, M. Shimomura, Bio- and Bioelectro- Catalytic Properties of Polyaniline/Poly(acrylic acid) Composite Films Bearing Covalently-Immobilized Acid Phosphatase, *Reactive and Functional Polymers*, 査読有, Vol. 74, pp. 31-36 (2014)

他 2 件 (省略)

〔学会発表〕(計 4 7 件)

T. Kuwahara, T. Asano, K. Nakata, S. Oka, M. Kondo, M. Shimomura, Direct Electrochemical Reaction between Oxygen-Reducing Enzymes and Polythiophene Films, Preprints, The 9<sup>th</sup> SPSJ International Polymer Conference (IPC 2012), p. 596 (2012)

T. Homma, M. Kondo, T. Kuwahara, M. Shimomura, Immobilization of Glucose Oxidase and Electron Mediators on Polyaniline/Poly(acrylic acid) Films for Fabrication of Bioanodes, The 9<sup>th</sup> SPSJ International Polymer Conference (IPC 2012), p. 597 (2012)

他 4 5 件 (省略)

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

下村 雅人 (SHIMOMURA, Masato)  
長岡技術科学大学・工学部・教授  
研究者番号: 2 0 2 5 1 8 5 3

#### (2) 研究分担者

桑原 敬司 (KUWAHARA, Takashi)  
長岡技術科学大学・工学部・助教  
研究者番号: 5 0 5 2 5 5 7 4

#### (3) 連携研究者

岡田 宏文 (OKADA, Hirofumi)  
長岡技術科学大学・工学部・教授  
研究者番号: 7 0 2 3 3 3 4 3