

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 27 日現在

機関番号：54601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501046

研究課題名(和文)低コスト自己駆動型電量分析装置の開発とそれを活用した科学・環境教育

研究課題名(英文)Development of low-cost self-driven coulometric system as science teaching materials and its application to education of science and environment

研究代表者

三木 功次郎(MIKI, Kojiro)

奈良工業高等専門学校・その他部局等・教授

研究者番号：80259910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：低コストの自己駆動型電量分析システムを開発し、生体成分の定量に用いた。グルコースをグルコースデヒドロゲナーゼで酸化し、電子受容体となるユビキノン0(UQ0)を還元した。カーボンフェルトを正極・負極の電極として用いた測定セルで、還元型UQ0と[Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup>との酸化還元電位の差を駆動力として、還元型UQ0を酸化した。得られた電気量は理論値によく一致し、本法で測定した日本酒モロミ中のグルコース濃度は吸光度法とよく一致した。また、別の酵素系を用いることで、ピルビン酸を定量することも可能であった。この電量分析システムは、高専や高校における化学実験教材として利用可能である。

研究成果の概要(英文)：A new method for determination of D-glucose was developed by combining glucose dehydrogenase (GDH) reaction and a low-cost self-driven coulometric system. Carbon felt was used as an electrode material for both the anode and cathode of the coulometric cell. Glucose was oxidized in the presence of GDH and electron acceptor (Ubiquinone 0, UQ) was reduced. To determine the amount of reduced UQ, reduced UQ was oxidized at the anode driven by the electromotive force, and ferricyanide ion containing in the anode solution was reduced. The measured total charge was almost same of the theoretical values obtained from the glucose concentration. Glucose concentrations in sake moromi measured by this method were correlated with those determined by spectrophotometry. Pyruvate could be measured by the system using lactate dehydrogenase, NADH, diaphorase, and UQ.

The system could be used as science teaching materials in the chemical experiment of College of Technology and senior high school.

研究分野：生物電気化学，分析化学，科学教育

科研費の分科・細目：科学教育・教育工学，科学教育

キーワード：クーロメトリー 自己駆動 酵素反応 酸化還元反応 科学教育 金属ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

我々は糖やエタノールなどのバイオマス  
を燃料として、直接電力を得るバイオ燃料電池の研究を行っている。この電池では、負極での電極反応(酸化反応)と正極での電極反応(還元反応)を介して、電子が外部回路を流れて電気エネルギーを取り出すことができる。カーボンフェルトを電極に用い、パン酵母(生体触媒)・エタノール(燃料)・ビタミンK<sub>3</sub>(電子伝達メディエータ)による負極の酸化反応と、K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>の還元反応をリンクさせ、小型モーターを約1時間駆動することに成功しており、バイオ・エネルギーなどに関する教材として利用可能である。

一方、電量分析法(クーロメトリー)は、目的物質の酸化反応または還元反応に伴い流れる電流(電気量)から、目的物質の絶対量を測定できる分析法である。電量分析法は、外部電源により電気エネルギーを加えて電気分解を行うのが一般的である。これに対して、内山俊一らはカーボンフェルトを電極として用い、自己駆動型電量分析法を開発している。これは外部電源の代わりに、試料の電極での酸化反応(または還元反応)と対極活物質の電極での還元反応(または酸化反応)の酸化還元電位の差によって発生する起電力を駆動力とし、バイオ燃料電池と同じ原理を用いている。

そこで、バイオ燃料電池の研究成果を踏まえ、自己駆動型電量分析法を高校・高専などでの教材として活用できるようになれば、物質の絶対定量・酸化還元反応・定量分析などについて、実践的に教育することが可能と考えた。

2. 研究の目的

本研究では、教材用の自己駆動型電量分析装置の開発および食品中に含まれる各種成分分析法の確立を目的とし、これら活用した授業カリキュラムの作成を目指した。

(1)低コスト自己駆動型電量分析装置の開発

本装置を教材とするために、測定セルの製作コストの低減と共に、安全かつ簡便に製作できるものを目指した。また、市販のデジタルボルトメーター・パソコンを用いて測定機器の低コスト化および簡易化に向けて検討

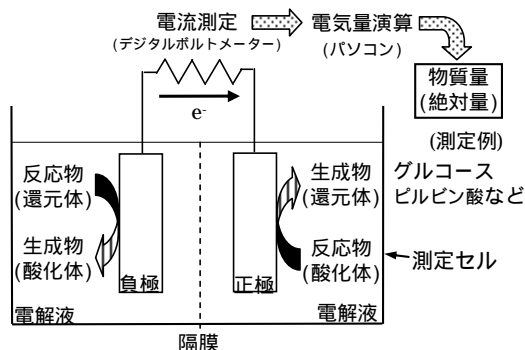


図1 自己駆動型(電池型)電量分析法の原理図  
この場合、負極側電解液に測定対象物質を加える

した(図1)。

(2)酵素を用いたバイオ電量分析法の開発

脱水素酵素を触媒として用い、グルコース・ピルビン酸などの定量を試みた。それぞれ、酵素量・UQ<sub>0</sub>量・pHなどについて検討し、最適化を行った。

(3)電極表面の修飾のための金属ナノ粒子の調製

電極の性能向上のために、化学修飾に用いる金属ナノ粒子の調製およびその特性の評価を行った。

(4)教材としてのカリキュラム開発

本装置と生体触媒として酵素・微生物菌体などを用いることで、食品分析・環境分析など教材として幅広い利用が可能であると考えられる。教材として共通に必要な概念となる酸化還元反応・酵素反応・定量分析などの基本的事項について、カリキュラムの検討を行った。

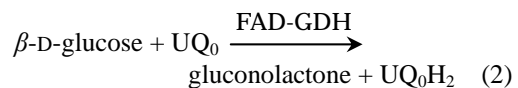
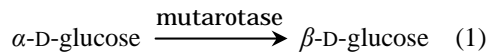
3. 研究の方法

(1)低コスト自己駆動型電量分析装置の開発

測定セルは市販の樹脂製透析セルを改造して作製した。負極・陽極の電極には体積当たりの表面積の大きなカーボンフェルトを用いた。低コスト化を行った際の問題点、特に電気量測定精度の低下、電解反応速度の低下による測定の時長時間化、再現性などについて検討を行った。また、市販のデジタルボルトメーターとパソコンをUSBケーブルで接続し、エクセルを用いた測定システムを開発を行った(図2)。

(2)酵素を用いたバイオ電量分析法の開発

ムタローターゼとFADを補酵素とするグルコース脱水素酵素(FAD-GDH)を用い、次の反応でグルコースを酸化した。電子受容体に



は、2,3-ジメトキシ-5-メチル-p-ベンゾキノ(UQ<sub>0</sub>)を用いた。酵素反応が終了したこの溶液を測定セルに添加し、デジタルボルトメーターを用いて自己駆動によるUQ<sub>0</sub>H<sub>2</sub>の酸化電

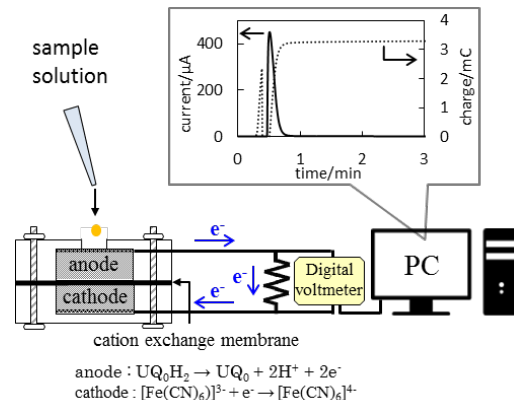
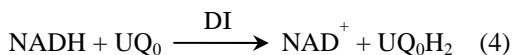


図2 自己駆動型電量分析システム

流を測定した。電気量から生成した  $UQ_0H_2$  量を求め、グルコース濃度を算出した。

また、NADH 酸化酵素であるジアホラーゼ (DI) と乳酸脱水素酵素 (LDH) を用いて、下記の反応によるピルビン酸測定も検討した。



### (3) 電極表面の修飾のための金属ナノ粒子調製法の開発

効率よく全電解するために、金ナノ粒子を用いた電極表面の化学修飾について試みた。金ナノ粒子の調製およびその特性について検討を行った。

### (4) 授業カリキュラムの検討

本測定システムを教材として利用するための初歩的段階として、高専の学生向けのカリキュラムの検討を行った。本測定システムの理解のためには、酸化還元反応・酵素反応・定量分析などの基本的事項について学ぶ必要がある。実際に学生に実験させ、指導した結果について検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 低コスト自己駆動型電量分析装置の開発

測定セルは市販の樹脂製透析用セルを一部加工して作製した。負極・正極の電極には表面積が大きく、安価なカーボンフェルトを用いた。負極反応槽と正極反応槽の間の隔膜には、安価なセロハン膜を用いることを試みたが、両極の溶液成分の混入があり、現時点では市販の陽イオン交換膜を用いることとした。一定電位を印加時の  $K_4Fe(CN)_6$  の酸化電流より電気量を求めて、測定精度・再現性などについて基礎的評価検討した。その結果、 $K_4Fe(CN)_6$  水溶液を添加した場合の電解効率はほぼ 100% となり、誤差は 0.98% になった。

自己駆動型電量分析では、パソコンに USB 接続したデジタルポルトメーターで、負極 - 正極間に接続した抵抗の両端の電圧を測定し、電流および電気量を求めた。測定および計算は Excel ソフトを用いて処理した。

### (2) 酵素を用いたバイオ電量分析法の開発

#### グルコース定量

FAD-GDH によるグルコースの酸化反応 (化学反応式(2)) に伴い生成する還元型  $UQ_0$  (負極に添加) と  $[Fe(CN)_6]^{3-}$  (正極) の酸化還元電位の差により、自己駆動で電解電流が流れることを確認した。10 mM グルコース 50  $\mu$ L をサンプルに用いて、FAD-GDH 量・ $UQ_0$  量・pH などについて検討し、最適条件を決定した。酵素反応は 3 分、クーロメトリー測定は 1 分以内に終了した。測定で得られた電気量は、グルコース濃度 10 ~ 300 mg/dL の範囲で理論値によく一致した。本法を用いて日本酒モロ

ミ中のグルコース濃度を測定したところ、既存のグルコース測定キットを用いた測定値とよく一致した (相関係数  $r = 0.999$ )。日本酒モロミ中には、グルコース測定に影響を与える酸化還元物質もなく、迅速・簡便・安価なグルコース定量法として応用可能である。

#### NADH およびピルビン酸定量

ジアホラーゼによる NADH の酸化反応 (化学反応式(4)) に伴い生成する還元型  $UQ_0$  と  $[Fe(CN)_6]^{3-}$  の酸化還元電位の差による自己駆動により流れた電解電流より、電気量および、NADH 濃度を算出した。酵素量・ $UQ_0$  量・pH などについて検討し、最適条件を決定した。酵素反応は 3 分以内、電量分析は 4 分以内に終了し、吸光度により求めた NADH 量とよく一致した電気量となった。

この NADH 測定の応用として、LDH でピルビン酸を還元し (化学反応式(4))、その後、残存する NADH を測定することでピルビン酸定量を試みた。酵素量・ $UQ_0$  量・pH などについて検討し、最適条件を決定した。測定で得られた電気量は、理論値によく一致した。また、本法を用いて日本酒モロミのピルビン酸濃度を測定したところ、吸光度法による測定値とよく一致した。NAD 依存性脱水素酵素は数多くあり、これら酵素を用いた生体成分や食品成分の定量に応用が可能と考えられる。

### (3) 電極表面の修飾のための金属ナノ粒子調製法の開発

相間移動法を用いて化学的還元により金ナノ粒子を形成させた。この金粒子を、11-mercapto-undecanoic acid (MUA) でコーティングすることにより水溶性 MUA-金ナノ粒子を調製した。TEM 測定により平均径 2 nm、変動係数は 16.3% であった。調製した水溶性金ナノ粒子と菌体を接触させたところ、ある濃度以上でナノ粒子濃度の上昇に伴い枯草菌の生育が阻害されていることが確認された。また、低温 (29, 20 ) で接触培養を行ったところ、金ナノ粒子の阻害効果が抑制されることが明らかとなった。これは低温において菌体細胞膜の性質が変化したこと起因すると考えられる。一方、大腸菌を用いて同様の実験を行ったところ、枯草菌生育に影響を及ぼすナノ粒子濃度領域においてもその生育に影響は見られなかった。

### (4) 授業カリキュラムの検討

高専の低学年レベルで、自己駆動型電量分析装置を学生実験に使用することを考え、酸化還元反応・酵素反応・定量分析などに関する実験内容の検討を行った。また、高専 5 年生に電量分析測定セルの組立を行わせたところ、約 60 分必要であることが分かったので、中学生・高校生の教材としてはさらに簡便に組み立てられるように今後検討が必要である。

また、クーロメトリー測定セルをそのまま利用して、自己駆動型電量分析と同じ原理で

作動するバイオ燃料電池の作製を行った。エタノールを燃料とし、市販パン酵母を生体触媒、2-メチル-1,4-ナフトキノン（ビタミンK<sub>3</sub>）を電子受容体として用いた。その結果、開回路時の電圧 0.74 V、最大出力 20.0 mW を得ることができ、小型モーターを駆動することが可能であった。小学 5・6 年生を対象に、この電池を教材として用いた実験教室を開催したところ、参加者からは微生物の様々な働きが分かったと好評であった。

#### 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 1 件）

K. Naoe, K.Yamanaka, S.Takeuchi, M. Kawagoe and M.Imai, Preparation of water-soluble mercaptocarboxylated gold nanoparticles and their dispersion properties, J. Chem. Eng. Jpn, 査読有, 2012, 789-792, 10.1252/jcej.12we073

〔学会発表〕（計 13 件）

川嶋 浩平、北村 誠、三木 功次郎, 自己駆動型クーロメトリーを用いた NADH の定量とその応用, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014 年 3 月 29 日, 神奈川

今田豊希, 山中幸一郎, 長山和史, 直江 一光, 金ナノ粒子を用いた Pickering エマルションの調製とその酵素反応媒体としての利用, 第 16 回化学工学会学生発表会, 2014 年 3 月 1 日, 大阪

羽谷航, 柳瀬剛士, 直江一光, 澤井淳, 今井正直, 水溶性金ナノ粒子の調製とそれらが及ぼす微生物細胞への影響, 第 45 回化学工学会秋季大会, 2013 年 9 月 17 日, 岡山

三木功次郎, 川嶋浩平, 北村 誠, 自己駆動型バイオクーロメトリーによる日本酒モロミ中のグルコース定量, 日本食品科学工学会第60回大会, 2013年8月30日, 東京

川嶋 浩平, 三木 功次郎, FAD 依存性グルコース脱水素酵素を用いた自己駆動型バイオクーロメトリーによる日本酒モロミ中のグルコース定量, 日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013 年 3 月 26 日, 仙台

三木功次郎, 川嶋浩平, 酵母を用いたバイオ電池教材の開発, 日本化学会第93春季年会, 2013年03月24日, 滋賀

K.Naoe, R.Tanaka, S.Kawada and S.Nishino, Effect of anionic gold nanoparticles on structure and enzymatic activity of protein, 14th International Association of Colloid and Interface Scientists, Conference (IACIS 2012, Sendai), 2012 年 05 月 15 日, 仙台

三木功次郎, 船曳歩, 酵母を用いたバイオ燃料電池の開発, 日本化学会第 92 春季年

会, 2012 年 3 月 26 日, 横浜  
河田晋治, 西野悟, 直江一光, 逆ミセル有機相への可溶化に伴う金ナノ粒子の分散挙動, 化学工学会第 77 回年会, 2012 年 3 月 15 日, 東京

K.Yamanaka, S.Takeuchi, K. Naoe and M. Imai, Preparation of water-soluble gold nanoparticles and their solution properties, 8th European Congress of Chemical Engineering, 2011年9月26日, Berlin, Germany

K.Yamanaka, K.Naoe, K.Nakagawa, S. Takeuchi, M.Kawagoe and M.Imai, Higher order structure of proteins in the presence of water-soluble metal nanoparticles, 1st European Congress of Applied Biotechnology, 2011年9月26日, Berlin, Germany

Kojiro Miki, Ayumu Funabiki, Kenji Kano, Development of Biofuel Cell using Baker's Yeast as Biocatalyst and Ethanol as Fuel, IUPAC International Congress for Analytical Sciences 2011, 2011年5月25日, 京都

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

三木 功次郎 (MIKI KOJIRO)  
奈良工業高等専門学校・物質化学工学科・教授  
研究者番号: 80259910

##### (2) 研究分担者

直江 一光 (NAOE KAZUMITSU)  
奈良工業高等専門学校・物質化学工学科・教授  
研究者番号: 00259912

##### (3) 研究分担者

北村 誠 (KITAMURA MAKOTO)  
奈良工業高等専門学校・物質化学工学科・准教授  
研究者番号: 60341369