

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年4月16日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012年度

課題番号：23760726

研究課題名（和文） バイオ燃料電池の高性能化へ向けた酵素電極の新規ナノ構造制御

研究課題名（英文） Nano-structure control of enzyme electrode toward high performance biofuel cell

研究代表者

田巻 孝敬 (Tamaki Takanori)

東京工業大学・資源化学研究所・講師

研究者番号：80567438

研究成果の概要（和文）：本研究では、グルコースなど生体に安全・安心な燃料が利用できる酵素を触媒に用いたバイオ燃料電池の高性能化へ向けた検討を行った。従来の課題である低電流密度を解消するために、酵素の失活要因である電極表面への物理吸着を抑制する親水化と電極内のプロトン伝導性の付与を同時に実現し得るメチルスルホン酸基をカーボン微粒子表面へ導入したうえで、酵素から電極への電子伝導を担うレドックスポリマーを固定化する二段階修飾を行い、バイオ燃料電池の高電流密度化へ向けた基盤を構築した。

研究成果の概要（英文）：Enzymatic biofuel cells convert the chemical energy of fuels like glucose and ethanol into electricity. One important issue to be addressed is their low current density. A high-surface-area three-dimensional enzyme electrode made of redox-polymer-grafted carbon black has a potential to achieve high current density. However, deactivation of enzymes upon adsorption on carbon black should be decreased. Thus, carbon black was doubly modified with redox polymer and methyl-sulfonic acid group that was used not only to make the surface hydrophilic but also for proton conduction in the enzyme electrodes, which is required in the future all solid-type, high-current-density biofuel cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・反応工学・プロセスシステム

キーワード：材料合成プロセス、バイオ燃料電池、材料システム設計、酵素、レドックスポリマー、グラフト重合、プロトン伝導、失活抑制

1. 研究開始当初の背景

バイオ燃料電池は、固体高分子形燃料電池(PEFC)の貴金属触媒の代わりに酵素を用いるため、従来のPEFCでは検討されてこなかったグルコースなどの生体に安全・安心な燃料が利用でき、医療用補助具や携帯機器のポータブル電源として開発が期待されている。しかし、バイオ燃料電池の出力密度、特に電流密度は、従来のPEFCと比較して2-3桁低い値にとどまっている。従来研究における低電流

密度の主な要因は、酵素と電極間の電子伝導を担うレドックスポリマーの電子伝導律速であった。レドックスポリマーは、酸化還元分子(メディエータ)が結合されたポリマーであるが、電子伝導率はカーボンと比較して数桁低く、レドックスポリマーが長距離を電子伝導する必要がある電極では、電子伝導律速となる。

本研究グループではレドックスポリマーをカーボン微粒子(カーボンブラック)表面へ

グラフト重合した電極(図1)を開発し、レドックスポリマーが担う電子伝導距離の短縮により、電子伝導律速が解消され、従来と比べて高い電流密度(3 mA/cm²)が得られることを示した。また、モデル計算の結果、実用化水準となる高電流密度(10² mA/cm²)の実現が可能であることを示した。

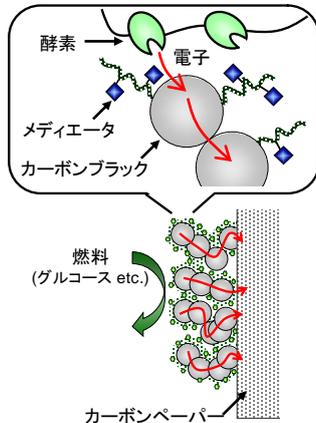


図1 レドックスポリマーをグラフト重合した酵素電極

しかし、現状の酵素電極では、酵素がカーボン表面へ物理吸着する際の変性・失活により、導入した酵素のうち活性を保っている酵素が数%しかなく、高電流密度化には物理吸着に伴う失活を抑制する必要があることが示されている。また、バイオ燃料電池全体の反応を考慮すると、酵素電極中をプロトンが伝導する必要がある。現状では、得られる電流密度が低いため溶液中のプロトン伝導で充分であったが、高電流密度化に伴い、酵素電極へのプロトン伝導性の付与が必要となる。しかし、プロトン伝導性を有する酸性環境下では酵素の活性が低下するため、プロトン伝導と酵素活性保持の両立が必要である。

2. 研究の目的

本研究ではバイオ燃料電池の高電流密度化へ向けて、従来の課題であった酵素の物理吸着による変性・失活の抑制と、酵素電極内へのプロトン伝導の付与を実現するために、酵素電極のナノ構造制御を行った。具体的には、図2に示すように、電極を構成するカー

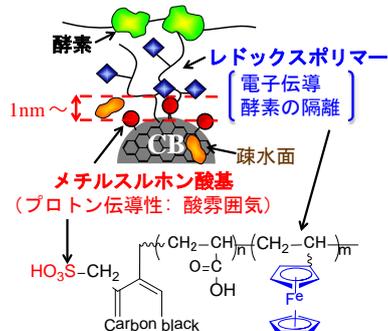


図2 メチルスルホン酸基とレドックスポリマーによる二段階修飾

ボンブラック表面を、メチルスルホン酸基とレドックスポリマーにより二段階修飾した。メチルスルホン酸基は酵素の物理吸着を抑制する親水化とプロトン伝導の機能を担い、レドックスポリマーは酵素から電極への電子伝導とともに、酵素をカーボン疎水表面とメチルスルホン酸基の酸性雰囲気から隔離する。二段階修飾カーボンブラックの評価と吸着酵素活性の評価から、バイオ燃料電池の高電流密度化へ向けた基盤を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

カーボンブラックの二段階修飾として、ホルムアルデヒドと亜硫酸ナトリウムで処理することによりメチルスルホン基を導入した。続いて、メチルスルホン基の導入反応で使われずに残存したカーボン表面の官能基をもとに、以下の二通りの方法によりレドックスポリマーをグラフト重合した。一つ目の手法では、カーボン表面のフェノール性水酸基あるいはカルボキシル基へ重合開始基であるアゾ基を導入し、レドックスポリマーをグラフト重合した。もう一方の手法では、フェノール性水酸基を起点にして、セリウムイオン存在下でのレドックス反応により、ポリアクリル酸をグラフト重合したうえで、アクリル酸側鎖のカルボキシル基との縮合反応によりアミノ基を有するメディエータ化合物を固定化し、レドックスポリマーへ変換した。また必要に応じて二段階修飾前にカーボンブラックを酸性溶液で処理し、親水化した。修飾カーボンブラックの評価は、IR測定、滴定および電気化学測定により行い、吸着酵素活性は酵素を修飾カーボンブラックへ吸着させ、溶液へ分散させて活性測定を行うことにより評価した。

4. 研究成果

カーボンブラックへのメチルスルホン酸基の導入は、IR測定および滴定により確認した。続いてアゾ基から開始するグラフト重合によりレドックスポリマーを導入した。電気化学測定の結果、カーボンブラックが二段階修飾されたことが示された。しかし、吸着酵素活性を評価したところ、未修飾カーボンブラックへ吸着させた場合と吸着酵素活性は大きくは変わらなかった。

そこで、カーボンブラック表面をより親水化するために、酸処理を行った。親水化により、吸着酵素活性は増加した。また、親水化により導入される官能基は二段階修飾反応の足場ともなるため、親水化したカーボンブラックではメチルスルホン酸基の導入量が大幅に増加し、貴金属触媒を用いた固体高分子形燃料電池で性能が向上した導入量と同じオーダーとなった。このことから、高電流

密度バイオ燃料電池で必要とされるプロトン伝導性は付与できたと考えられる。しかし、親水化及びメチルスルホン基の導入を行ったカーボンブラックは、親水化のみを行ったカーボンブラックと比較して、吸着酵素活性が低下した。これは、導入したスルホン酸の酸環境による影響と考えられた。

スルホン化されたカーボン表面から酵素を隔離するために、ある程度の鎖長を有するポリマーをグラフト重合する必要があると考え、メディエータの非存在下でポリマーのグラフト重合を行ったうえで、重合後にグラフトポリマー側鎖の官能基との反応によりメディエータを固定化し、レドックスポリマーへ変換した。これまでに構築した酵素電極の反応拡散モデルより、ポリマー長さが百nm程度以下であれば、電子伝導律速にならないことが示唆されている。そこで、ポリアクリル酸をカーボンブラック表面へグラフト重合により固定化し、側鎖のカルボキシル基との縮合反応によりアミノ基を有するメディエータ化合物を固定化することで、レドックスポリマーへ変換した。電気化学測定の結果、化合物由来の酸化還元ピークが得られ、化合物の固定化を確認した。そこで、二段階修飾したカーボンブラックを用いて吸着酵素活性を評価した。結果を図3に示す。

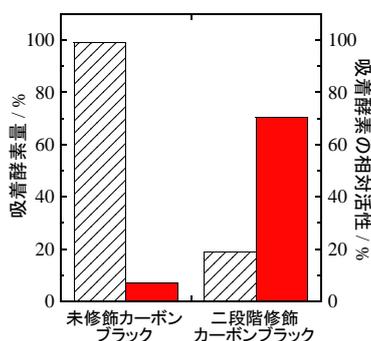


図3 二段階修飾カーボンブラックによる吸着酵素活性の維持

スルホン酸基とレドックスポリマーにより二段階修飾したカーボンブラックでは、酵素の物理吸着が大幅に抑制され、また高い吸着酵素活性が得られた。滴定により求めたスルホン基量は貴金属触媒を用いた固体高分子形燃料電池で性能が向上した導入量と同じオーダーであり、バイオ燃料電池で必要とされるプロトン伝導性は付与できたと考えられることと併せ、二段階修飾法によりバイオ燃料電池の高電流密度化へ向けた基盤を構築することができた。

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 7 件)

1. Y. Oshiba, T. Tamaki, H. Ohashi, H. Hirakawa, S. Yamaguchi, T. Nagamune, T. Yamaguchi "Effect of length of molecular recognition moiety on enzymatic activity switching", *J. Biosci. Bioeng.*, in press, DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.04.003, 査読有
2. Y. Oshiba, T. Tamaki, H. Ohashi, H. Hirakawa, S. Yamaguchi, T. Nagamune, T. Yamaguchi "A molecular recognition moiety and its target biomolecule interact in switching enzyme activity", *J. Biosci. Bioeng.*, 115(6) (2013) 639-644, DOI: 10.1016/j.jbiosc.2012.12.019, 査読有
3. Y. Sugawara, T. Tamaki, H. Ohashi, T. Yamaguchi "Control of the poly(N-isopropylacrylamide) phase transition via a single strand-double strand transformation of conjugated DNA", *Soft Matter*, 9(12) (2013), 3331-3340, DOI: 10.1039/c3sm27230c, 査読有
4. T. Tamaki "Enzymatic Biofuel Cells Based on Three-Dimensional Conducting Electrode Matrices", *Topics Catal.*, 55 (16-18) (2012) 1162-1180, DOI: 10.1007/s11244-012-9895-y, 査読有
5. Yuuki Sugawara, Hidenori Kuroki, Takanori Tamaki, Hidenori Ohashi, Taichi Ito, Takeo Yamaguchi "Conversion of a molecular signal into a visual color based on the permeation of nanoparticles through a biomolecule-recognition gating membrane", *Anal. Methods*, 4(9) (2012) 2635-2637, DOI: 10.1039/c2ay25265a, 査読有
6. 田巻孝敬, 山口猛央 "酵素型バイオ燃料電池の高出力密度化", *化学工学会バイオ部会ニュースレター*, 30 (2012) 9-12, 査読無
7. 田巻孝敬, 山口猛央 "グルコースを用いた酵素型バイオ燃料電池", *水素エネルギーシステム*, 36 (2011) 32-36, 査読無

[学会発表] (計 24 件)

1. 大柴雄平, 田巻孝敬, 大橋秀伯, 平川秀彦, 山口哲志, 長棟輝行, 山口猛央 「位置選択的コンジュゲートによる遺伝子組み換え酵素の活性・構造評価」化学工学会 第78年会、大阪、3月17-19日 (2013)

2. 菅原勇貴、田巻孝敬、大橋秀伯、山口猛央「DNA固定化分子認識ゲート膜の開発」化学工学会 第78年会、大阪、3月17-19日 (2013)

3. Takanori Tamaki, Haruki Fujimoto, Hidenori Ohashi, Takeo Yamaguchi, “Surface Modification of Carbon Black toward Retention of Enzyme Activity in High-Surface-Area Enzymatic Biofuel Cell Electrodes”, Pacific Rim Meeting on Electrochemical and Solid-state Science, Hawaii, USA, 7th-12th November (2012)

4. Takanori Tamaki, Hidenori Ohashi, Takeo Yamaguchi, “High-Surface-Area Three-Dimensional Enzymatic Biofuel Cell Electrode Made of Redox-Polymer Grafted Carbon Black”, IUMRS-ICEM2012, Yokohama, 23rd-28th September (2012)

5. 大柴雄平、田巻孝敬、大橋秀伯、平川秀彦、山口哲志、長棟輝行、山口猛央「シグナル応答型人工酵素の活性調節」第61回高分子討論会、愛知、9月19-21日 (2012)

6. 菅原勇貴、田巻孝敬、大橋秀伯、山口猛央「DNAアプタマー修飾相転移ポリマーを用いた新規分子認識材料」化学工学会関東支部横浜大会、神奈川、8月30-31日 (2012)

7. Yuhei Oshiba, Takanori Tamaki, Hidenori Ohashi, Taichi Ito, Hidehiko Hirakawa, Satoshi Yamaguchi, Teruyuki Nagamune, Takeo Yamaguchi, “Control of P450cam Activity with the Avidin Recognition”, The 11th International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity and Biotechnology, Turin, Italy, 22nd-26th June, (2012)

8. 杉山朋晴、田巻孝敬、大橋秀伯、山口猛央「Laccaseとグラフトレドックスポリマーを用いたバイオカソードの開発」電気化学会第79回大会、静岡、3月29-31日 (2012)

9. Takanori Tamaki, Tomoharu Sugiyama, Haruki Fujimoto, Hidenori Ohashi, Takeo Yamaguchi, “High-surface-area enzymatic biofuel cell electrodes made of redox-polymer-grafted carbon black”, 243rd American Chemical Society National Meeting & Exposition, San Diego, California, USA, 25th-29th March (2012)

10. 藤本治貴、田巻孝敬、大橋秀伯、山口猛央「バイオ燃料電池の高電流密度化へ向けた

カーボンブラックの新規表面修飾法の開発」化学工学会 第77年会、東京、3月15-17日 (2012)

11. 杉山朋晴、田巻孝敬、大橋秀伯、山口猛央「Laccaseとグラフトレドックスポリマーを用いたバイオカソードの酸素還元特性」化学工学会 第77年会、東京、3月15-17日 (2012)

12. 菅原勇貴、田巻孝敬、大橋秀伯、山口猛央「DNAアプタマー修飾感温性ポリマーに関する相転移挙動の解析」化学工学会 第77年会、東京、3月15-17日 (2012)

13. Takanori Tamaki, Tomoharu Sugiyama, Haruki Fujimoto, Hidenori Ohashi, Takeo Yamaguchi, “Toward the Retention of Enzyme Activity in High-Surface-Area Electrode Made of Redox Polymer Grafted Carbon Black”, 2011 AIChE Annual Meeting, Minneapolis, Minnesota, USA, 16th-21st October (2011) 【Invited Speaker session】

14. Tomoharu Sugiyama, Takanori Tamaki, Hidenori Ohashi and Takeo Yamaguchi “Development of Biocathode Using Laccase and Redox-Polymer-Grafted Carbon”, 2011 AIChE Annual Meeting, Minneapolis, Minnesota, USA, 16th-21st October (2011)

15. Yuhei Oshiba, Takanori Tamaki, Hidenori Ohashi, Taichi Ito, Hidehiko Hirakawa, Satoshi Yamaguchi, Teruyuki Nagamune and Takeo Yamaguchi, “Control of Enzyme Activity by Introduction of Molecular Recognition Moiety”, 2011 AIChE Annual Meeting, Minneapolis, Minnesota, USA, 16th-21st October (2011)

16. 杉山朋晴、田巻孝敬、大橋秀伯、山口猛央「超耐熱性Laccaseを用いたバイオ燃料電池用酵素還元電極の開発」酵素工学会第66回講演会、東京、9月29日 (2011)

17. 大柴雄平、田巻孝敬、大橋秀伯、平川秀彦、山口哲志、長棟輝行、山口猛央「アビジンシグナルによる酵素の活性調節」酵素工学会第66回講演会、東京、9月29日 (2011)

18. Takanori Tamaki, Tomoharu Sugiyama, Haruki Fujimoto, Hidenori Ohashi, Takeo Yamaguchi, “Toward the Retention of Enzyme Activity in High-surface-area Electrode Made of Redox Polymer Grafted Carbon Black for Biofuel Cells”, The 62nd Annual Meeting of the International

Society of Electrochemistry, Niigata, Japan, 11st-16th September (2011)

19. 藤本治貴、田巻孝敬、大橋秀伯、山口猛央「バイオ燃料電池の高電流密度化へ向けたカーボンブラックの化学修飾」化学工学会第43回秋季大会、愛知、9月14-16日(2011)

20. 杉山朋晴、田巻孝敬、大橋秀伯、山口猛央「グラフトドックスポリマーとLaccaseを用いたバイオカソードの開発」化学工学会第43回秋季大会、愛知、9月14-16日(2011)

21. 大柴雄平、田巻孝敬、大橋秀伯、平川秀彦、山口哲志、長棟輝行、山口猛央「分子認識による活性制御型人工酵素の構築」化学工学会 第43回秋季大会、愛知、9月14-16日(2011)

22. 田巻孝敬「カーボン微粒子へのグラフト重合によるバイオ燃料電池の開発」2011年度粉体操作に伴う諸現象に関する勉強会、岡山、8月4日(2011)【招待講演】

23. Yuuki Sugawara, Takanori Tamaki, Hidenori Ohashi, Takeo Yamaguchi, “Biomolecular recognition polymer using aptamer and dissociation of dsDNA for

gating membrane”, International Congress on Membranes and Membrane Processes 2011, Amsterdam, The Netherlands, 23rd-29th, July (2011)

24. 菅原勇貴、田巻孝敬、大橋秀伯、山口猛央「DNAアプタマーと感温性ポリマーを用いた分子認識ポリマーの開発」高分子学会 第60回年次大会、東京、5月25-27日(2011)

〔図書〕(計 2 件)

1. 田巻孝敬, バイオ電池の最新動向(執筆分担-第3章6 酵素固定多孔質電極), シーエムシー出版, 90-94, 2011

2. 田巻孝敬, 山口猛央, バイオ電池の最新動向(執筆分担-第4章4 PEFC型バイオ電池), シーエムシー出版, 123-129, 2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田巻 孝敬 (Tamaki Takanori)

東京工業大学・資源化学研究所・助教

研究者番号: 80567438