

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25820387

研究課題名(和文) 酵素近傍のナノ構造制御による全固体型バイオ燃料電池の高電流密度化

研究課題名(英文) Surface modification of carbon to reduce deactivation of enzymes for high-current-density biofuel cells

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、酵素を触媒に用いるバイオ燃料電池について、酵素近傍のナノ構造により高電流密度化を図った。バイオ燃料電池は、生体に安全・安心なグルコースなどを燃料として利用できる次世代電池であるが、出力密度、特に電流密度が低いことが課題であった。これまでの研究により、低電流密度の要因は酵素が電極を構成するカーボン微粒子表面へ物理吸着する際の変性・失活であることが明らかになっている。本研究ではカーボン微粒子の表面修飾により酵素の物理吸着を大幅に抑制したうえで、電極へ酵素を固定化することで、高い電流密度を得た。

研究成果の概要(英文)：Enzymatic biofuel cells can utilize nontoxic fuels such as glucose and ethanol, and have the potential to power portable devices near the body. However, the power density, especially the current density, of biofuel cells is still low considering the high intrinsic activity of enzymes. Our previous study revealed that the deactivation of enzymes upon physical adsorption on carbon black surface is the main reason for the low current density. Thus, the surface treatment of carbon black was performed by graft polymerization of an anionic polymer, and by mixing of carbon black with polyethylene glycol. The enzyme was then immobilized in the electrode using a method other than physical adsorption, namely, via ammonium sulfate precipitation with crosslinking. This electrode showed higher current density than the electrode fabricated by a previous procedure.

研究分野：工学

キーワード：バイオ燃料電池 材料システム設計 酵素 グラフト重合 失活抑制 親水化処理 カーボン レドックスポリマー

1. 研究開始当初の背景

酵素を触媒に用いるバイオ燃料電池は、生体に安全・安心なグルコースなどを燃料として利用できる次世代電池であり、人の近くで作動する医療用補助具や携帯機器での利用が期待されている。しかし、バイオ燃料電池の出力密度、特に電流密度が低いことが課題であった。

本研究グループではこれまでに、低電流密度の要因が、電極を構成するカーボン微粒子表面へ酵素が物理吸着する際の変性・失活であることを明らかにしている。また、物理吸着に伴う失活を抑制して酵素の特性を十分に活用できれば、携帯機器向けに開発されている直接メタノール燃料電池に匹敵する高電流密度化が可能であることをモデル計算により示唆している。すなわち、バイオ燃料電池の高電流密度化には、酵素を失活させずに電極へ固定化する手法の開発が必要であった。

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、活性を維持した状態で酵素を電極へ固定化するために酵素近傍のナノ構造制御を行った。具体的には、電極表面との親和性を有するペプチドタグを遺伝子組換えにより酵素へ導入する手法、および電極を構成するカーボン微粒子(カーボンブラック)の表面修飾を行い、酵素の失活へつながる物理吸着を抑制したうえで酵素を固定化する手法(図1)を検討した。

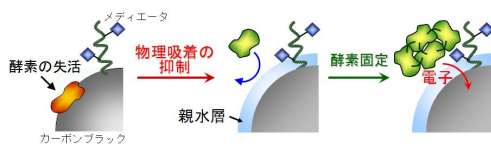


図1 バイオ燃料電池の高電流密度化へ向けた酵素の物理吸着の抑制と酵素固定

3. 研究の方法

ペプチドタグ融合酵素の開発では、酵素として用いるグルコースオキシダーゼ(GOx)のC末端へ、疎水性基板へ吸着することが知られているペプチドタグを付加し、発現ベクターに組み込んだ遺伝子組換え体を作製した。しかし、発現の確立が困難であったことから、カーボンブラックの表面修飾を重点的に推進した。

カーボンブラックの表面修飾では、ポリエチレングリコール(PEG)との物理混合と、アニオン性ポリマーのグラフト重合を検討した。PEGについては、通常末端のPEGと疎水部末端を有する Diacylglycerol PEG (dg-PEG)の二種類を用い、カーボンブラックとの混合により修飾を行った。グラフト重合では、カーボンブラックを従来よりも高濃度の硝酸と硫酸の混合液で処理したうえで、スルホン酸基を有する 2-Acrylamido-2-methyl-

propane sulfonic acid (AMPS)をカーボン表面から開始するグラフト重合により固定化した。修飾カーボンブラックへの酵素 GOx の吸着量の評価には HPLC を用いた。

物理吸着を抑制したカーボン電極への GOx の固定化は、硫安沈殿と架橋の組み合わせにより行った。なお、酵素電極で用いるカーボンブラックには、ビニルフェロセンをメディエータ部位に有するレドックスポリマーをグラフト重合して、GOx からの電子授受機能を付与した。

4. 研究成果

カーボンブラックへの表面修飾の評価は、PEG 吸着については HPLC、酸処理・グラフト重合系についてはカーボンブラック表面の酸官能基量の滴定により行い、PEG あるいは poly(AMPS)による修飾を確認した。また、酸処理した後のカーボンブラックを用いて電極を作成し、電気化学測定を行ったところ、電子伝導に由来する抵抗は、未修飾の場合とほぼ同等であり、酸処理によるカーボンの電子伝導性への影響は無視できることが示された。

そこで、修飾カーボンブラックを酵素溶液中で一定時間攪拌し、GOx の吸着量を評価した。酸処理及び poly(AMPS)をグラフト重合したカーボンブラックへの酵素吸着量の評価結果を図2に示す。

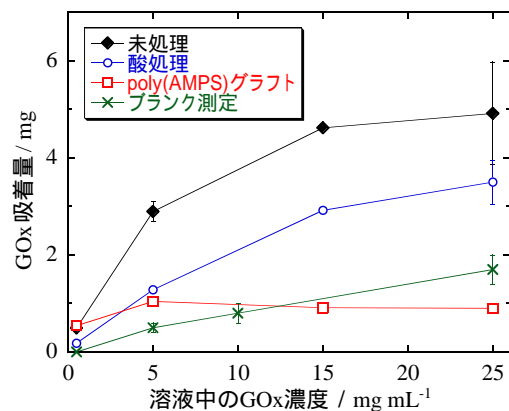


図2 酸処理および poly(AMPS)グラフトカーボンブラックへの GOx 吸着量

未修飾のカーボンブラックでは GOx の仕込み量の増加に伴い吸着量が増加し、カーボンブラックの表面積と GOx のサイズから計算される単層の飽和吸着量に近い値まで吸着した。一方で、酸処理したカーボンブラックでは GOx の吸着量が減少し、poly(AMPS)のグラフト重合により吸着量はさらに減少した。同様に、PEG 修飾したカーボンブラックでも未修飾のカーボンブラックと比較して吸着量は大幅に減少した。したがって、カーボンブラックの表面処理により、GOx の物理吸着を抑制できることが示された。

吸着量が大幅に減少した poly(AMPS)グラフトカーボンブラック、PEG および dg-PEG 修飾カーボンブラックについて、吸着酵素活

性を評価した結果を図 3 へ示す。dg-PEG では、吸着酵素活性が検出できないほどに酵素吸着が抑制されていることが示された。

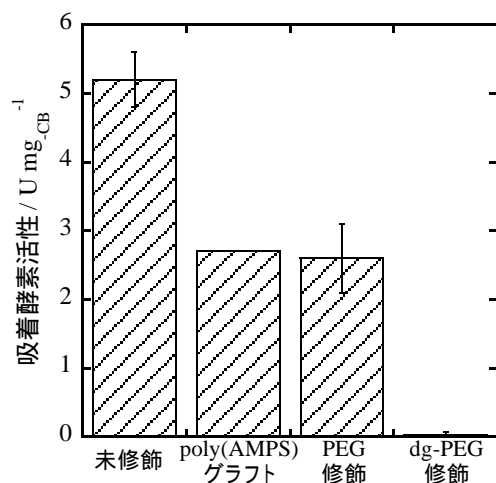


図 3 吸着酵素活性

物理吸着を抑制したカーボン電極への酵素の固定化は、硫安沈殿と架橋の組み合わせにより行った。酵素電極の作製は従来、カーボンブラックへレドックスポリマーをグラフト重合したうえで 3 次元電極を作製し、電極を GOx 溶液へ直接含浸していたが、本研究では作製した 3 次元電極を dg-PEG 溶液へ含浸してカーボン表面を親水化したうえで、硫安沈殿と架橋により GOx を固定化した。GOx 固定電極のグルコース溶液中における電気化学測定結果を図 4 に示す。いずれの電極においても 0.25 V 付近から電流が増加し、グルコース酸化電流が得られたが、dg-PEG 修飾したうえで硫安沈殿と架橋の組み合わせにより GOx を固定化した電極では、従来法と比較して約 2 倍の電流密度が得られた。

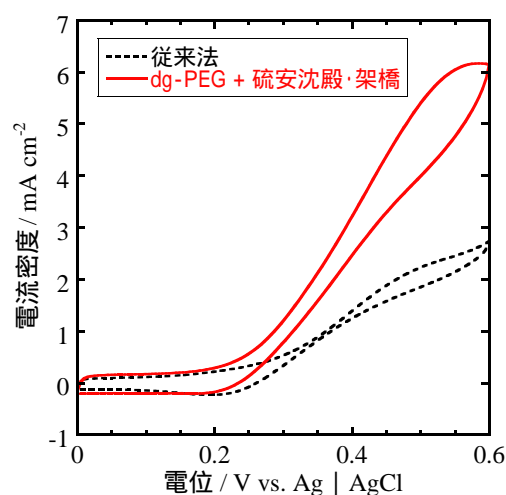


図 4 GOx 固定電極のグルコース溶液中における電気化学測定結果

以上の結果より、カーボンブラックへの物理吸着を抑制した電極へ酵素を固定化することにより高電流密度化が可能であることを示した。しかし、硫安沈殿と架橋の組み合

わせは酵素の固定化手法として最適とはいえず、固定化手法の改善や、電極材料の適切な選択により更なる高電流密度化へ向けた検討が必要である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Yuuki Sugawara, Takanori Tamaki, Takeo Yamaguchi, Development of an aptamer-functionalized molecular recognition gating membrane targeting a specific protein on the basis of the aggregation phenomena of DNA-PNIPAM, *Polymer*, 査読有, 62 (7) (2015) 86-93, DOI: 10.1016/j.polymer.2015.02.027

2. Takanori Tamaki, Tomoharu Sugiyama, Masahiro Mizoe, Yuhei Oshiba, Takeo Yamaguchi, Reducing Physical Adsorption of Enzymes by Surface Modification of Carbon Black for High-Current-Density Biofuel Cells, *J. Electrochem. Soc.*, 査読有, 161 (13) (2014), H3095- H3099, DOI: 10.1149/2.0181413jes

3. Yuuki Sugawara, Takanori Tamaki, Takeo Yamaguchi, DNA molecular recognition of intercalators affects aggregation of thermo-responsive polymer, *Polym. Chem.*, 査読有, 5 (16) (2014) 4612-4616, DOI: 10.1039/C4PY00600C

4. Tomoharu Sugiyama, Takanori Tamaki, Takeo Yamaguchi, Development of Redox Polymer Grafted onto Carbon Black using 2,2'-azino bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) as a Biocathode, *J. Chem. Eng. Jpn.*, 査読有, 47 (8) (2014) 704-710, DOI: 10.1252/jcej.13we319

5. Yuuki Sugawara, Takanori Tamaki, Hidenori Ohashi, Takeo Yamaguchi, Switchable Aggregation Phenomena of DNA-Conjugated Poly(N-isopropylacrylamide) Driven by Transformation between ssDNA and dsDNA with Control of DNA Charges and Flexibility, *Chem. Lett.*, 査読有, 42 (12) (2013) 1568-1570, DOI: 10.1246/cl.130794

〔学会発表〕(計 15 件)

1. Takanori Tamaki, Systematic material design using biomolecules, 249th ACS National Meeting & Exposition, 2015 年 3 月 22-25 日, Denver, CO (USA)

2. 森田 直樹、田巻 孝敬、大柴 雄平、山口 猛央、電極上の固定化酵素活性向上へ向けた研究、化学工学会 第 80 年会、2015 年 3 月 19-21 日、芝浦工業大学(東京)

3. 田巻 孝敬、酵素バイオ燃料電池の高出力密度化へ向けた材料設計、バイオ電池(微生物

燃料電池(酵素型電池)の特性から高効率化・高出力密度化の研究開発動向と発電・排水処理技術、2014年12月12日、御茶ノ水 連合会館(東京)【招待講演】

4. Takanori Tamaki, Yuuki Sugawara and Takeo Yamaguchi, Molecular Recognition Gating Membrane Using DNA-conjugated Thermoresponsive Polymer, IUMRS-ICA2014, 2014年8月24-30日、福岡大学(福岡)

5. Takanori Tamaki, Yuuki Sugawara and Takeo Yamaguchi, Molecular recognition gating membrane composed of DNA-conjugated thermoresponsive polymer, The 10th International Congress on Membranes and Membrane Processes, 2014年7月20-25日、 Suzhou (China)

6. 田巻 孝敬、バイオ燃料電池の高出力密度化へ向けた材料設計、高分子学会 燃料電池材料研究会、2014年6月13日、化学会館(東京)【招待講演】

7. Takanori Tamaki, Masahiro Mizoe, Tomoharu Sugiyama, Takeo Yamaguchi, Surface Modification of Carbon for High Power Density Biofuel Cell Using High-Surface-Area Electrode Made of Redox-Polymer-Grafted Carbon, 225th ECS Meeting, 2014年5月11-15日 Orland, FL (USA)

8. 溝江 昌洋、田巻 孝敬、山口 猛央、バイオ燃料電池の高電流密度化に向けたカーボンブラックの表面修飾、電気化学会第81回大会、2014年3月29-31日、関西大学(大阪)

9. 溝江 昌洋、田巻 孝敬、山口 猛央、バイオ燃料電池の性能向上へ向けたカーボンブラックの表面修飾、化学工学会 第79年会、2014年3月18-20日、岐阜大学(岐阜)

10. 田巻 孝敬、酵素型バイオ燃料電池の高出力密度化へ向けた材料システム開発、2013高分子・ハイブリッド材料研究センター若手フォーラム、2013年12月20日、東北大学(宮城)【招待講演】

11. 田巻 孝敬、山口 猛央、グルコースを燃料とする酵素型バイオ燃料電池の高出力密度化、有機エレクトロニクス研究会、2013年12月17日、機械振興会館(東京)

12. Takanori Tamaki, Yuuki Sugawara and Takeo Yamaguchi, Molecular Recognition Material based on DNA-conjugated Thermoresponsive Polymer, 23rd Annual Meeting of MRS-J, 2013年12月11日、横浜市開港記念会館(神奈川)

13. Takanori Tamaki, Takeo Yamaguchi,

High-Surface-Area Three-Dimensional Enzymatic Biofuel Cell Electrode, 2013 JSAP-MRS Joint Symposia, 2013年9月17日、同志社大学(京都)

14. 田巻 孝敬、生体分子を用いた機能材料システム開発、材料化学システム討論会 2013、2013年9月2日、松島センチュリーホテル(宮城)

15. 田巻 孝敬、山口 猛央、材料機能システム設計に基づくバイオ燃料電池酵素電極の開発、2013年4月26日、産業技術総合研究所(茨城)

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・講師

研究者番号：80567438