様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　　元 年　　６ 月 ２８ 日現在

機関番号：５４６０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2016～2018
課題番号：１６Ｋ００９８９

研究課題名（和文）電気化学を基礎としたバイオ・食品分析・環境教材の開発とそれを活用した科学教育

研究課題名（英文）Development of bio-cell and food / environment analyzer for teaching materials based on electrochemistry and science education using those devices

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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,600,000円

研究成果の概要（和文）：　自己駆動型クーロメトリー装置を教材として用いるために，ディスポーザブル型セルの作製検討を行い，安価で簡便な装置の開発に成功した。また，過酸化水素測定法を開発して，過酸化水素生成型のアスコルビン酸オキシダーゼを用いて新規なアスコルビン酸測定法などを開発できた。
　本装置は中学生・高校生レベルでも使用可能であり，化学の教材として使用可能である。また，この装置の原理は電池と同じであり，同じ装置を用いてバイオ電池の作製も可能であり，小学5，6年生を対象にした実験教室などでも利用可能である。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究では，教材として使用できるバイオ電池および自己駆動型クーロメトリーに利用できる装置を開発した。ディスポーザブル型の電極を用いることで，装置は低コストで高校生，高専生レベルで容易に作製ができ，課外活動などで自分で考えた実験内容でバイオ・食品分析などについて，総合的にかつ実践的に学習させることが可能となる。また，小・中学生には実験教室などにおいて，身近なバイオに興味を持たせることができる。

研究成果の概要（英文）：In order to use a self-driven coulometry device as a teaching material, we tried to make disposable type cells and developed an inexpensive device. Furthermore, we developed a hydrogen peroxide measurement method and developed a new ascorbic acid measurement method using hydrogen peroxide-generating ascorbic acid oxidase.
The experimental device can be understood by junior high school students and high school students in principle, and can be used as a teaching material in chemistry. Moreover, the principle of this device is the same as that of a battery, and it is possible to produce a bio battery using the same device, and it can also be used in experimental classrooms for elementary school children.

研究分野：電気分析化学

キーワード：バイオ電池　自己駆動型クーロメトリー　グルコース測定　ピルビン酸測定　過酸化水素測定　アスコルビン酸測定　実験カリキュラム開発

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９、ＣＫ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

パン酵母を触媒として用い，糖やエタノールなどを燃料として直接電力を得るバイオ電池の開発を行っていた。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ることにより電気エネルギーを取出すことができる。市販の樹脂製透析セルを利用した電池セルを用い,パン酵母を負極の生体触媒として用いた電池を作製し，小型モーターを約 1 時間駆動することに成功した。この電池をエネルギー・バイオに関する教材として活用し，「ひらめき☆ときめきサイエンス」事業により，小学生を対象にした実験教室を開催していた。

一方，電量分析法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。外部電源により電気分解を行うのが一般的であるが，内山らはカーボンフェルトを電極とした自己駆動型電量分析法を開発している。これは外部電源を用いずに，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，電池と同じ原理を用いている。そのため，上述の電池セルを流用して自己駆動型電量分析を試みており，この自己駆動型電量分析法を教材として活用することを目指していた。

２．研究の目的

本研究課題では，さらに作製の容易な電池セル（そのまま自己駆動型電量分析セルとしても利用可能）を設計・開発して，電気化学を基礎にしたバイオ・食品・環境教材開発を目指して，下記の 3 点について研究を行った。物質の絶対定量・酸化還元反応・バイオ・食品分析などについて，総合的にかつ実践的に学習するカリキュラムの構築を目指した。

(1) バイオ燃料電池用および自己駆動型電量分析用セルの設計・開発とその評価

バイオ電池および自己駆動型電量分析の両方の実験に使用可能な電気化学セルの開発を行った。セルの本体部分は樹脂製として，電極はカーボンフェルトを用いた使い捨て型として，中学生でも容易に組み立て可能な構造を目指した。

(2) 生体触媒を用いた自己駆動型電量分析法による食品成分の分析法の開発

(1)で開発した使い捨て型電極を負極側に用い，測定対象となる還元剤（グルコースなど），生体触媒として酸化還元酵素（グルコース脱水素酵素，または微生物など），そして電子受容体を添加する。正極側には酸化剤（例えば $K_3Fe(CN)_6$）を高濃度で溶解して電池セルを構成する。酵素反応または微生物代謝によるグルコースなどの酸化に伴い，電子受容体が還元され，負極の電位が正極の電位より低くなり，起電力ΔEを駆動力として自発的に放電が起こり，このときの電気量を求めることによって，グルコースなどの定量を目指した。

(3) 本教材を用いたカリキュラムの開発

中学校への出前授業，高専学生（1～3 年生）の授業などで本教材を用いることで，科学知識の習得だけでなく，創造力や科学技術に関連する事象の理解力などを伸ばすことを目指し，必要なカリキュラムの開発・検討を行った。バイオ電池では使用する糖類や微生物の種類による電池出力の違いの検討，自己駆動型電量分析では日本酒もろみや各種果物中に含まれるグルコース量の測定法の検討など，問題解決型授業（PBL）に用いることを目指した。

３．研究の方法

(1) バイオ電池の開発

バイオ電池の開発には，パン酵母、燃料としてのエタノールまたはグルコース、電子伝達メディエータとして2-メチル-1,4-ナフトキノン(VK_3)を用い、パン酵母によるエタノールまたはグルコースの酸化に伴うVK_3 の還元反応を利用した。バイオ電池の負極側電解液には、パン酵母、エタノールおよびVK_3を含むリン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)、正極側電解液には$K_3[Fe(CN)_6]$を含むリン酸緩衝液を含侵させた。電極には電極表面積を大きくするためにカーボンフェルト（CF，厚さ5 mm）を用いた。このカーボンフェルトをラミネートフィルムでラミネート加工することにより圧縮して用いた。セル本体は市販の透析用セルを用いて作製し、正極側と負極側を陽イオン交換膜で隔てた。

(2) 自己駆動型クーロメトリー装置による食品成分の分析法の開発

自己駆動型クーロメトリー装置については，バイオ電池と同じ装置を用いた。作用極にはリン酸緩衝液，対極には被還元物質として0.45 M $K_3[Fe(CN)_6]$を含むMcIlvaine氏緩衝液（pH 6.0）をそれぞれ含浸させた。作用極と対極の間に抵抗を接続して，デジタルボルトメーターを用いて電流を測定して，パソコンにより電気量および対象物質の濃度を求めた。

(3) 本教材を用いたカリキュラムの開発

本研究で開発したバイオ電池または自己駆動型クーロメトリー装置を教材として用いたカリキュラムの開発を行った。

４．研究成果

(1) バイオ電池の開発

本研究で生パン酵母を用いた場合のVK_3 還元の最適条件は、パン酵母菌体数5.2×10^9 個/cm^3、エタノール濃度1.85 mol/dm^3、VK_3 濃度7.9 mmol/dm^3（見かけの濃度）、リン酸緩衝液濃度1.0 mol/dm^3（pH 7.0）の場合であった。この最適条件に調製した溶液を負極側電解液、0.95 mol/dm^3 $K_3[Fe(CN)_6]$水溶液を正極側電解液に用いて、バイオ電池を作製した。この電池の両極に可変抵抗を接続して、抵抗値を変化させながら電圧を測定し、電流および出力を算出した（図 1）。開回路時の電圧は0.71 V、最大出力16.5 mW（CFの単位体積当たり2.69 mW/cm^3、電圧0.406 V において）を得ることができ、小型モーター（マブチモーター製、RF-330TK）を駆動することが可能であった。この電池は低コストで作製でき、小学校から高校生まで幅広く教材として利用できることが分かった。

このバイオ電池は小型モーターを約1時間駆動することができ,「微生物の働きをしらべよう」をテーマにした小学生対象の実験教室を開催したところ、好評であった。

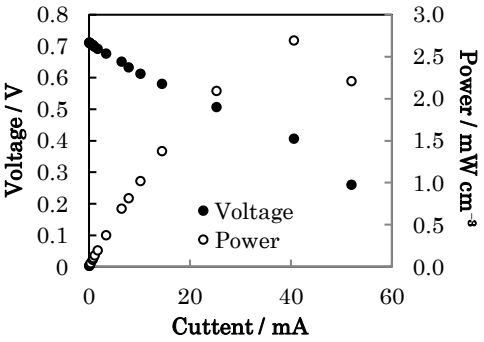

図１ バイオ電池の性能

(2) 自己駆動型クーロメトリー装置による食品成分の分析法の開発

グルコース測定にはFAD依存型グルコースデヒドロゲナーゼ（GDH）を用いた。ピルビン酸測定には酵素として乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH），ジアホラーゼ（DI），補酵素となるNADHを用いた。また，ジアホラーゼおよびグルコースデヒドロゲナーゼの電子受容体として 2,3-ジメトキシ-5-メチル-*p*-ベンゾキノン（UQ_0）を用いた。

グルコースの測定は下記の酵素反応により生成した還元型 UQ_0 と $K_3[Fe(CN)_6]$の酸化還元電位の差に生じた起電力による自己駆動で電流が流れ，回路に挿入した抵抗の両端の電圧をデジタルボルトメータにより測定した。これにより得られた還元型UQ_0量よりグルコース濃度を求めた。

$$\beta\text{-D-glucose} + UQ_0 \xrightarrow{GDH} \text{gluconolactone} + UQ_0H_2$$

電極となるカーボンフェルトをラミネート加工したことにより（図２），取り扱いが簡単となり，一定回数使用後に使い捨てすることもでき，教材として使用することが可能となった。また，酵素反応液のカーボンフェルトへ浸透が早くなり、迅速な電流応答が得られるようになった。グルコースの測定時間は，酵素反応が 5 分，クーロメトリー測定が 2 分であり，10 分以内にデータが得られた。図３に日本酒モロミのグルコース濃度を吸光度法と自己駆動型クーロメトリー法で測定した結果であり，よく一致することが分かった。

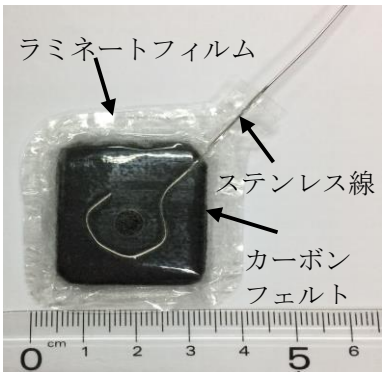

図２ カーボンフェルトを用いた使い捨て電極

また，ピルビン酸については，ピルビン酸が LDH により酸化され，生成した NADH の DI による酸化に伴い，還元型 UQ_0 が生成する。この還元型 UQ_0 量を自己駆動型クーロメトリーにより求め，ピルビン酸濃度を求めた。これにより，日本酒モロミ中のピルビン酸濃度測定ができた。

さらに，過酸化水素測定法を確立し、アスコルビン酸定量への応用を試みた。過酸化水素測定では、作用極にリン酸緩衝液、対極に UQ_0、NADH、DI を含むリン酸緩衝液をそれぞれ含浸させ、両極を陽イオン交換膜で隔てた。測定は H_2O_2 溶液、パーオキシダーゼ（POD）溶液、$K_4Fe(CN)_6$ 溶液を混合して 5 分間反応させ、生成した $K_3[Fe(CN)_6]$量を自己駆動型クーロメトリーで求め，過酸化水素濃度を求めることができた。

過酸化水素生成型のアスコルビン酸オキシダーゼ(ASO)を用い、次の反応により H_2O_2 を生成させることで

$$\text{L-Ascorbic acid} + O_2 \xrightarrow{ASO} \text{L-Dehydroascorbic acid} + H_2O_2$$

アスコルビン酸の定量を試みた。現時点では、6.5 mmol・dm^{-3} のアスコルビン酸まで測定が可能となった（図４）。さらに高濃度のアスコルビン酸を測定するには、ASO 濃度，POD 濃度，酵素反応時間などの反応条件の検討が必要である。

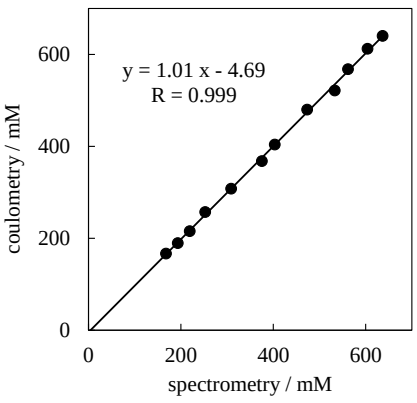

図３ 吸光度法と自己駆動型クーロメトリー法による日本酒モロミ中のグルコース測定の比較

(3) 本教材を用いたカリキュラムの開発

バイオ電池または自己駆動型クーロメトリーを教材として用いたカリキュラムの開発を行った。

パン酵母を用いたバイオ電池を用いた実験としては，小学生 5～6 年生を対象とした実験教室で下記の内容を実施した。

①パン酵母によるアルコール発酵

グルコースを用いたアルコール発酵を行い，石灰水による二酸化炭素の確認をさせた。また，二酸化炭素発生量をガラス製注射器で測定して，発生量の時間依存性の図を作成させた。アルコールの生成を飲酒運転防止用のアルコールチェッカーで簡易的に測定した。顕微鏡を用いて，パン酵母の確認も行った。

②米麹を用いたアミラーゼの実験

米麹からアミラーゼを抽出して，デンプンを含む寒天上に綿棒を用いてアミラーゼ液で絵を書き，その後，薄めたイソジン液をかけてヨウ素デンプン反応で絵を浮かび上がらせた。

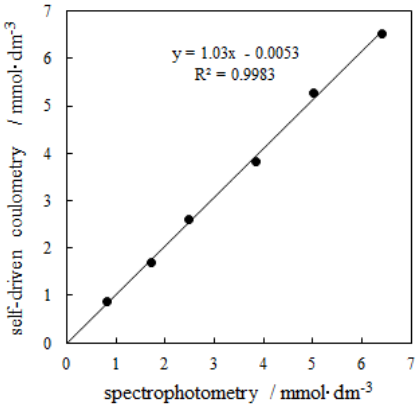

図４ 吸光度法と自己駆動型クーロメトリー法によるアスコルビン酸測定の比較

③米麹によるデンプンの分解

米麹に水を加え，45℃で 4 時間放置した。この溶液を濾過して，グルコース測定試薬を用いて，グルコースの生成を確認した。

④パン酵母バイオ電池の演示実験

パン酵母を用いたバイオ電池を参加者 4 人に 1 台の割合で渡して，プロペラ付きの小型モーターと接続して，モーターの回転を確認した。本研究以前は，バイオ電池でモーターが回転するのは約 2 台に 1 台であったが，本研究でカーボンフェルトをラミネートすることにより，ほぼ 100%モーターが回転するようになった。

各実験の内容・原理については，テキストおよびパワーポイントを用いて，小学生 5～6 年生が理解できる範囲で説明を行った。視覚的に理解でき，かつ興味が持てるこれらの実験を通して，発酵・酵素・物質の酸化還元反応などを理解させることができた。受講者，保護者のアンケートでも評価が高く，「分かりやすい内容だったので、理解がすごくできた。」（小学生），「身近なものの不思議を知る良い機会だと思います。」（保護者）等のコメントであった。これらの実施内容は，中学生にも同様に行うことが可能である。

また，自己駆動型クーロメトリーによる食品分析などは，高校生・高専生のレベルが必要であり，現状では実験教室などは実施できていない。しかし，高専 4 年生（物質化学工学科）に，グルコースおよびピルビン酸の測定を実施させたところ，実験内容は十分理解でき，自分で装置を組み立てることも可能であった。

今後，さらに装置の簡易化および測定対象物質の充実も行い，バイオ・食品分析などについて，総合的にかつ実践的に学習するカリキュラムの構築を目指したい。

５．主な発表論文等

〔学会発表〕（計　7 件）

①緒方 七海、羽様 晃司、北村 誠、三木 功次郎，自己駆動型クーロメトリーを用いた日本酒モロミ中のピルビン酸およびグルコース定量，日本農芸化学会 2017 年度大会（京都），2017 年 3 月 18 日

②三木 功次郎，古辻ななみ、北村 誠、石丸 裕士、
自己駆動型クーロメトリーを用いた過酸化水素の定量法の開発とその応用，
日本農芸化学会 2018 年度大会（名古屋），2018 年 3 月 16 日

③三木功次郎，中谷美智，上永啓介，石丸裕士，北村　誠，超音波洗浄器を用いた米麹中の酵素抽出液調製，平成 28 年度日本醸造学会大会（東京），2016 年 10 月 20 日

④多田佳奈枝，自己駆動型クーロメトリーを用いたアスコルビン酸測定法の開発，第 21 回工業高等専門学校生化学研究発表（大阪），2019 年 3 月 13 日

⑤田中　佑，ディスポーザブルセルを用いた自己駆動型クーロメトリーによる日本酒モロミ中のグルコース測定，第 21 回工業高等専門学校生化学研究発表（大阪），2019 年 3 月 13 日

⑥三木功次郎，田中 佑，多田佳奈枝，北村 誠，直江一光，教材として利用可能なバイオ電池および自己駆動型クーロメトリーの開発，日本化学会 第 99 春季年会（2019）（兵庫），2019 年，3 月 17 日

⑦三木 功次郎、多田 佳奈枝、石丸 裕士、北村 誠、直江 一光，自己駆動型クーロメトリーを用いたアスコルビン酸測定法の開発，日本農芸化学会 2019 年度大会（東京），2019 年 3 月 27 日

６．研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：直江　一光
ローマ字氏名：NAOE Kazumitsu
所属研究機関名：奈良工業高等専門学校
部局名：物質化学工学科
職名：教授
研究者番号（8桁）：00259912

研究分担者氏名：北村　誠
ローマ字氏名：KITAMURA Makoto
所属研究機関名：奈良工業高等専門学校
部局名：一般教科
職名：准教授
研究者番号（8桁）：60341369

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。