

令和元年6月17日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05960

研究課題名(和文)安全でしなやかな酵素燃料電池実現のための酵素電極界面材料開発

研究課題名(英文) Development of the interfacial materials between enzymes and electrodes for safe and soft enzymatic biofuel cell

研究代表者

青柳 将 (Aoyagi, Masaru)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・主任研究員

研究者番号：50356333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：脂質ナノチューブと集電体のナノ炭素材料の複合化を検討して、複合体上での酵素反応を電気化学測定により評価した。また脂質ナノチューブの代わりにアミノ基含有高分子を電極表面に塗布して、その効果を検討した。その結果、ビリルビンオキシダーゼ(BOD)を使用したカソード反応には電流値が増大する効果が確認されたが、フルクトースデヒドロゲナーゼを用いたアノード反応には電流値が減少した。さらに集電体のナノ炭素材料の種類や表面官能基についてそれぞれ検討を行った。また、高耐久性の人工耐熱性BODについても検討行ったところ、キトサンの添加により大きな電流地を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酵素燃料電池の電極修飾にこれまで種々の化合物が検討されてきた。脂質ナノチューブは新しい材料で炭素材料との複合化についても知見がなかった。本研究では両溶媒から高濃度で脂質ナノチューブと炭素材料を複合化する手法を見出すことができた。炭素材料に限らず、脂質ナノチューブと無期刑材料の複合化に向けて、可能性が広がることが期待できる。また、種々のアミノ基含有高分子の添加効果やナノ炭素材料を検討し、酵素燃料電池に好適な材料を見出した。

研究成果の概要(英文)：Hybridization of lipid nanotubes and nanocarbon materials on carbon electrodes are investigated. Enzymes are deposited on the electrodes and the electrodes were subjected to electrochemical measurements. Instead of lipid nanotubes, amine functional polymers were also examined. The results showed that the amine functional polymers accelerated cathode reaction by bilirubin oxidase (BOD) but decelerated anode reaction by fructose dehydrogenase. Positive effect of the addition of the amine functional polymers were also observed in thermostable enzyme. Addition of chitosan accelerated the enzymatic reaction of thermostable BOD.

研究分野：電気化学

キーワード：酵素燃料電池 界面化学 ナノ炭素材料 高分子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

酵素燃料電池は電極上に固定化された酵素が基質を酸化・還元する際に生じる電子の収受を利用して発電する燃料電池の一種である。酵素燃料電池の課題として「酵素の脱落や活性低下による起電力の低下」や「酵素(触媒)-電極間の電子移動の高効率化」が挙げられる。研究代表者はこれまでに、天然由来の原料から合成される脂質分子が水素結合や遷移金属との配位結合などの分子間相互作用を介して脂質ナノチューブが自己集合すること、その内空間にタンパク質を担持して熱や変性剤による変性に対して安定化することを報告してきた。また遷移金属イオンを担持した脂質ナノチューブがアルコールなどの酸化反応における不均一系触媒として機能することを明らかにしてきた。そこで、上記のようなタンパク質担持、安定化能、不均一系触媒能などの機能を有する脂質ナノチューブが、酵素燃料電池の課題解決に活用できると考えた。すなわち本研究では脂質ナノチューブにより、集電部材として大きな比表面積を有するナノ炭素材料、酵素と複合化することにより、酵素や触媒を安定かつ高密度に固定化し、酵素/触媒と電極間の電子の収受を可能とする電極界面を実現が期待できる。

2. 研究の目的

本研究は、これまでに研究代表者が開発してきた脂質の自己集合により形成する脂質ナノチューブを応用して、酵素燃料電池の性能向上に向けた電極界面材料を開発することである。具体的には、酵素-脂質ナノチューブとナノ炭素材料の複合化により酵素を安定かつ高密度に担持し、反応で発生する電子の速やかな収受が可能な電極界面材料の開発を目指す。さらに一部の酵素をより安定な有機人工触媒へ代替することも検討する。これらを通じてウェアラブルデバイス用電源として期待されている酵素燃料電池の耐久性・発電効率の向上に資することを目指す。

3. 研究の方法

酵素燃料電池を構成するアノード、カソードにおける酵素反応は、表面を修飾したグラッシーカーボン(GC)電極に酵素を固定し、サイクリックボルタムメトリー(CV)測定により評価した。詳細を以下に記す。N-メチルピロリドン分散媒とするナノ炭素材料とポリフッ化ビニリデン(PVDF)の混合分散液をGC電極に滴下、加熱乾燥して集電体が修飾されたGC電極を得た。この電極に酵素、およびメディエーター、脂質ナノチューブ、アミノ基含有高分子を塗布乾燥した。

電極反応の酵素として、カソード反応に *Myrothecium*、*Bacillus Subtilis* 由来ピリルピノキシダーゼ(BOD、天野エンザイム)あるいは人工耐熱性BOD(耐熱性酵素研究所)を用い、メディエーターとして2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸アンモニウム)(ABTS)を添加した。またCV測定用溶媒としてリン酸緩衝液(pH 7.0)を用いた。アノード反応には *Gluconobacter* sp. 由来フルクトースデヒドロゲナーゼ(FDH、東洋紡)を用い、電解液はフルクトースを溶解したMcIlvaine緩衝液(pH5.0)を用いた。

酵素燃料電池の評価は以下の方法で行った。ナノ炭素材料とポリフッ化ビニリデン(PVDF)の混合分散液をカーボンクロスに滴下、加熱乾燥して電池用電極を得た。このカーボンクロス電極2枚にそれぞれアノード、カソードに対応する酵素、メディエーター、脂質ナノチューブ、アミノ基含有高分子を塗布乾燥した。アノード、カソードのカーボンクロス電極でセパレータ用セロファンを挟むことで電池を作成した。この電池にフルクトースを溶解したMcIlvaine緩衝液(pH5.0)を注入し、IV特性を測定し、また昇圧回路を介して砲弾型赤色LEDの点灯試験を行った。

4. 研究成果

(1) 末端にアミノ基を有するペプチド脂質から自己集合する脂質ナノチューブは脂質の末端のアミノ基がチューブ表面に存在して、その表面電位がプラスになるため、表面電位がマイナスの酵素をはじめとするたんぱく質を静電的に吸着する。そこで他のPVDFをバインダとしてケッチェンブラックを表面に固定した電極にアミノ基含有脂質ナノチューブを塗布して複合化し、さらに酵素、メディエーターを固定して電気化学測定を行った。その結果、アノード、カソードのいずれの反応においても酵素反応由来の電流値は変化しないか複合化前より減少した。こ

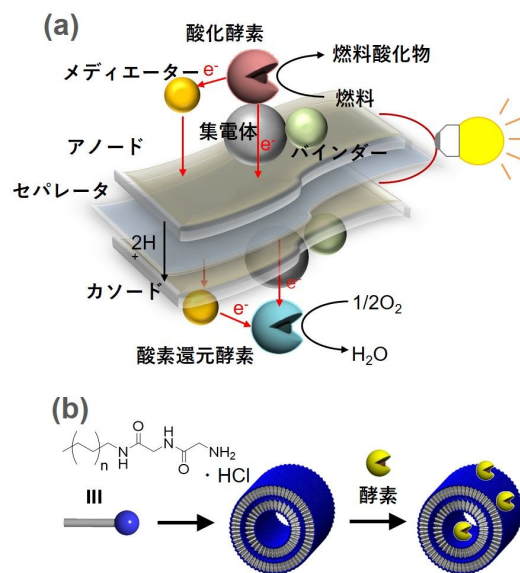


図1. (a) 酵素燃料電池の概念図、(b) 脂質ナノチューブの酵素吸着イメージ

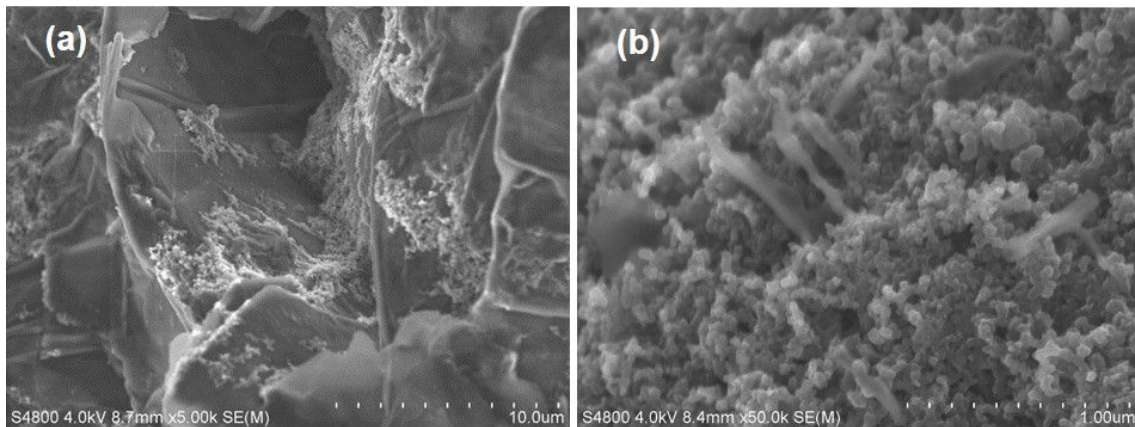


図 2. ケッチェンブラック PVDF 脂質集合体の SEM 像 (a) 室温(シート状集合体)、(b) 60 °C (ナノチューブ集合体)

の複合体を走査型電子顕微鏡(SEM)で観察したところ、ケッチェンブラック PVDF 層の上に分離して脂質ナノチューブが層を形成した構造で、効果的な複合化が起きていないことが分かった。そこで、ケッチェンブラックおよび PVDF、脂質、あるいはケッチェンブラックと脂質の混合分散液を GC 電極に塗布して乾燥した。室温で減圧乾燥したと、脂質はチューブ状ではなく、シート状の集合体を形成した(図 2a)。そこで、60 °C で加熱乾燥したところ、脂質はチューブ集合体を形成して、ケッチェンブラックと脂質ナノチューブが混在した複合体が得られた(図 2b)。この電極表面に BOD と ABTS を固定して CV 測定を行ったところ、同様に酵素反応由来の電流値は変化しないか複合化前より減少した。減少の原因は脂質分子の一部が集電体のケッチェンブラックをコートして絶縁層を形成したためと推定される。

(2) 脂質ナノチューブに代わるアミノ基が集積した物質としてアミノ基を含有する高分子を用いて、その添加効果を検討した。カソード反応について初めに分岐鎖ポリエチレンジアミンを添加して CV 測定を行ったところ、添加前より電流値が増大し、増大の程度はその分子量に依存することが分かった。一方、直鎖ポリエチレンジアミンを添加したところ、電流値の顕著な増大は観察されなかった(図 3a)。さらに合成高分子のポリアリルアミン塩酸塩、ポリジアリルジメチルアンモニウムクロライド、天然由来高分子のポリリジン、キトサンを添加した場合により大きな電流値が得られることが分かった。また、これらの高分子の添加を塗布、あるいは浸漬によって行うことで電流値に変化が見られた。CV 測定後の電解液の紫外可視吸収スペクトルから、アミノ基含有高分子によってメディエーターの電極から電解液への流出が抑制されていることが分かった。

一方、アノード反応においては、ポリエチレンジアミンを添加すると電流値の顕著な低下がみられた。カソードのみにこれらのアミノ基含有高分子を添加した電極を用いて酵素燃料電池を作成し、IV 特性を測定したところ、開回路電圧が 0.50 V、最大出力 0.14 mW (0.32 V)であった(図 3b)。この電池は昇圧回路を介して LED の点滅動作が可能であることを確認した。

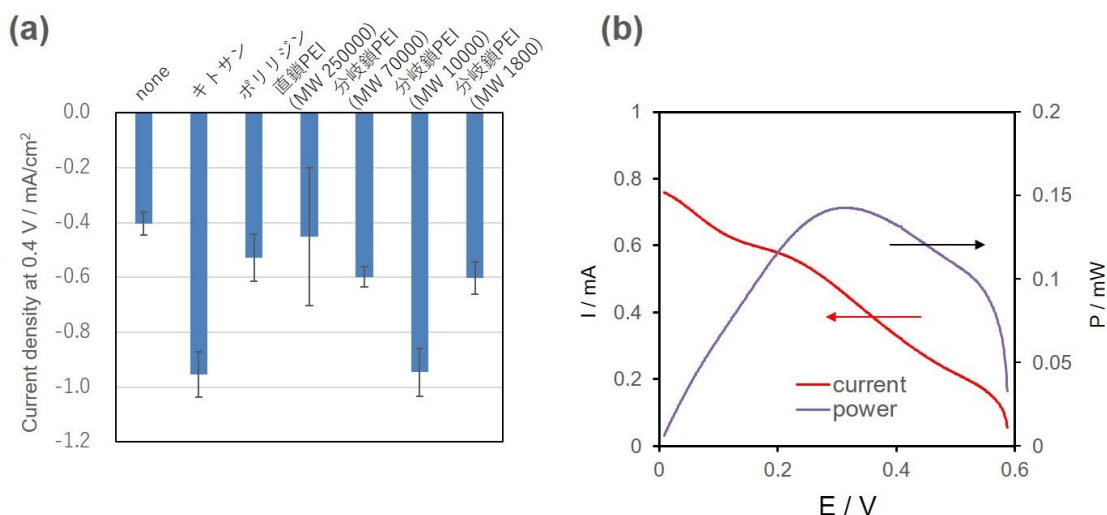


図 3. (a) カソード反応へのアミノ基含有高分子の添加効果、(b) カソードにキトサンを添加した酵素燃料電池の IV 特性

(3) カソード反応で用いる酵素の BOD は電子収受にかかわる部位にアミノ基が偏在し、マイナスに帯電した電極に対して効率的に電子移動することが知られている。集電体のケッチェンブラックの XPS を測定したところ、酸素由来のシグナルが観測され酸素官能基がわずかに存在することが確認された。すなわち、ケッチェンブラックの表面には低濃度でカルボキシル基が存在することが示唆された。より効果的な電子移動を誘起するため、ケッチェンブラックを過酸化水素中に分散、加熱により酸化を行った。反応後の試料の XPS では酸素由来のシグナル強度が増大し、含有酸素の増加が示唆された。反応時間の増大とともに酸素由来のシグナル強度も増大したが、正確な定量には至らなかった。集電体としてこの酸化処理したケッチェンブラックを用いた電極にアノード、カソードの酵素を固定して CV 測定を行ったところいずれの場合も電流値が低下した。これらの違いは緩衝液の pH における、各部材の表面電位、親疎水性が影響していると推定される。

(4) 集電体であるナノ炭素材料としてマルチウォールカーボンナノチューブ (MWCNT)、シングルウォールカーボンナノホーン (SWCNH)、食用竹炭についても検討を行った。まず電極として用いるカーボンクロスにナノ炭素材料の分散液を塗布して電子顕微鏡で観察したところ、カーボンクロスを構成する炭素繊維上に MWCNT は複雑に絡まった網目状凝集体、SWCNH は粒径が 40~80nm の球状凝集体、竹炭は粒径が 0.5~1mm の球状体が付着していた。CNT、SWCNH は炭素繊維上の一部に凝集体の島を形成し、分布に粗密があるのに対して、竹炭は比較的均一に分散し、ナノ炭素材料の種類によって分散性に違いが観測された。

次に上記のナノ炭素材料を修飾した GC 電極に BOD、ABTS、アミノ基含有高分子を塗布し、CV 測定での電流値への影響を調べた。その結果、観測された電流値は、ケッチェンブラック > MWCNT > SWCNH > 竹炭であった。ナノ炭素材料を修飾した GC 電極にフルクトースデヒドロゲナーゼを固定してフルクトース溶液中で CV 測定を行った結果、ケッチェンブラック、SWCNH では酵素反応由来の電流値が観測されたのに対して、MWCNT および竹炭ではほとんど電流値が観測されなかった。

(5) 高耐久性の電池を目指して、人工型耐熱性 BOD をカソード酵素として用いて CV 測定を行った。この人工耐熱性 BOD は天然型の Myrothecium、Bacillus Subtilis 由来 BOD では有効であったメディエーターの添加が不要であった。酵素からの電子移動は電極上での酵素の配向の影響が大きいことから、耐熱性 BOD は電子移動にかかわる部位が電極により近い位置に配向することが示唆された。またアミノ基含有高分子としてキトサンを添加したところ、非添加より大きな電流値が得られた (図 4)。

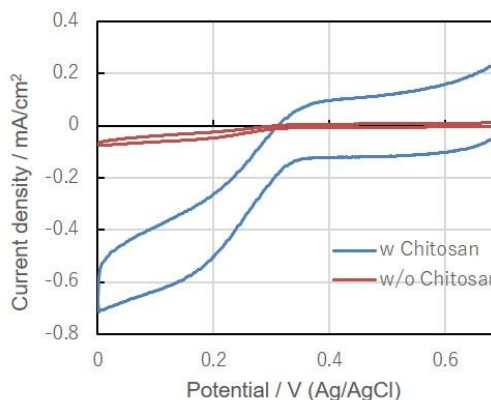


図 4.人工耐熱性 BOD のキトサン添加、非添加時の CV

5. 主な発表論文等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：栗田遼二

ローマ字氏名：Ryoji Kurita

所属研究機関名：国立研究開発法人産業技術総合研究所

部局名：生命工学領域

職名：研究グループ長

研究者番号 (8 桁)：50415676

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。