

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K04822

研究課題名(和文) カーボン表面のメディエータ高密度固定によるバイオ燃料電池高電流密度化へ向けた研究

研究課題名(英文) Immobilization of mediators with high surface coverage for high-current-density biofuel cell

研究代表者

田巻 孝敬 (Tamaki, Takanori)

東京工業大学・科学技術創成研究院・准教授

研究者番号：80567438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、触媒として酵素を用いるバイオ燃料電池の高電流密度化へ向けて、メディエータを電極表面に高密度かつ安定に固定化する電極表面構造制御手法を開発した。具体的にはカーボン表面に強く吸着するアントラセン二量体を、スペーサーを介してメディエータと複合化した。メディエータは従来法より約40倍高密度に固定され、電位サイクルに対して安定であることが示された。また、スペーサーの可動性や長さが酵素との反応性に重要であることが示された。さらに、アントラセン二量体による酵素の固定化についても検討し、酵素の活性状態を維持したままカーボンブラック表面へ高密度固定する手法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酵素を使いグルコースなどの生体に安全・安心な燃料から発電するバイオ燃料電池は、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ます。バイオ燃料電池では、酵素が本来有している高い反応速度を十分に活用できていないことが分かっています。本研究では、酵素の反応速度を有効に活かすために、酵素から電極へ電子を受け渡すメディエータと呼ばれる分子を、電極表面に高密度かつ安定に固定する方法を開発しました。

研究成果の概要(英文)：Enzymatic biofuel cells can use a variety of non-toxic fuels like glucose and ethanol, and have attracted attention as energy sources used near the body. If the high intrinsic activity of enzymes is effectively utilized, high-current-density biofuel cells become possible. One problem is the limited surface coverage of mediators on the surface. In this project, we aim to achieve highly stable and concentrated immobilization of mediators on carbon by making a complex of a mediator with an anthracene dimer that has been reported to be strongly and specifically adsorbed on carbon surfaces. Results showed that the complex enabled the high surface coverage of mediators and stable immobilization of mediators during redox cycles. Also, choice of linker was shown to be important to obtain enzymatic catalytic current. In addition, we utilize the anthracene dimer for immobilization of active enzymes on carbon black by making a complex with a hydrophilic unit and an enzyme-immobilization unit.

研究分野：化学工学

キーワード：バイオ燃料電池 メディエータ 酵素 材料システム設計 アントラセン二量体 フェロセン 表面修飾 カーボンブラック

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

バイオ燃料電池は、触媒として酵素を用いることで、グルコースなどの生体に安全・安心な燃料が利用できるため、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。酵素が有する反応速度は十分に高く、当研究室で実施した酵素電極中の反応拡散過程を考慮したモデル計算によって、粒径 30 nm 程度のカーボンブラックで構成される三次元カーボン電極で酵素の高い反応速度を活用できれば、現状より約 2 桁高い数百 mA/cm² の高電流密度化が可能であることを示している。また、現状で得られている電流密度とモデル計算との差異について実験的に検証を行い、電極-酵素間で電子を授受する酸化還元分子であるメディエータを電極表面に高密度に固定化できず、酵素の高い反応速度を活用できていないことが電流密度を制限している主要因であることを明らかにしている。従来メディエータの固定で一般的に使われてきたメディエータ固定化ポリマー(レドックスポリマー)と酵素で構成されるレドックスポリマーゲルについては、レドックスポリマー層の膜厚が厚くなるとレドックスポリマー中の電子伝導律速となり、ポリマー層厚みに制限がある。また、メディエータ分子を電極表面へ物理吸着により固定した系では、電極反応によりメディエータの酸化/還元状態が変化して親水性が増加した際に、電極から漏出することが課題となっている。一方で、当研究室で提案したレドックスポリマーをグラフト重合した酵素電極では、電子伝導距離の短縮により電子伝導律速は解消したものの、電極表面上のメディエータの密度制御・特に高密度化が困難であった。

2. 研究の目的

本研究では、酵素が有する高い反応速度を活用したバイオ燃料電池の高電流密度化の実現へ向けて、メディエータを電極表面に高密度かつ安定に固定化する電極表面構造制御手法を開発する。図 1 に示すように、カーボン表面に強く吸着するアントラセン二量体を、スペーサーを介してメディエータと複合化することにより、カーボン微粒表面へ高密度かつ安定にメディエータを固定化した構造を構築した。

さらに、電極材料であるカーボン表面への酵素の物理吸着に伴う変性・失活も低電流密度要因の一つであることから、アントラセン二量体による酵素の固定化についても検討した。

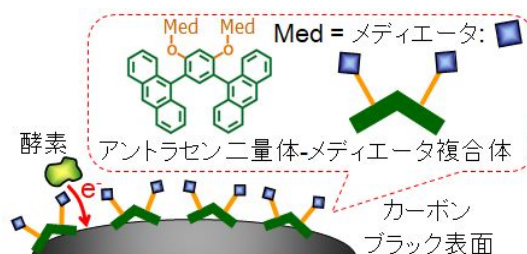


図 1 本研究で提案するアントラセン二量体との複合化によるメディエータの高密度固定

3. 研究の方法

メディエータにフェロセンを用い、スペーサーとしてアルキル鎖(図 2a, Complex A)、またはエチレングリコール鎖(図 2b, Complex B)を用いて、アントラセン二量体と複合化した。得られた複合体をカーボンブラックと混合することにより、複合体をカーボンブラック表面へ固定化し、Cyclic voltammetry (CV)により評価した。

酵素の固定化については、図 3 に示すようにアントラセン二量体と親水ユニットの複合体を合成し、酵素の物理吸着の抑制を図った。続いて、親水ユニットへ酵素を化学的に固定化する酵素固定ユニットを導入した。親水ユニットとしては、カルボン酸および鎖長の異なるポリエチレングリコール鎖(PEG4 および PEG8)を用い、酵素固定ユニットとしては *N*-hydroxy-succinimide (NHS)基を PEG8 の末端へ導入した。得られた複合体のカーボンブラックへの修飾はメディエータ固定複合体と同様にカーボンブラックとの混合により行い、酵素 Glucose oxidase (GOx)の吸着試験として、GOx 吸着量、および吸着 GOx 活性の評価を行った。

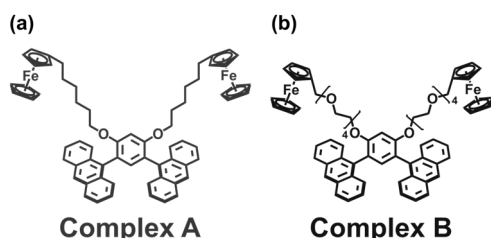


図 2 アントラセン二量体-メディエータ複合体の構造式

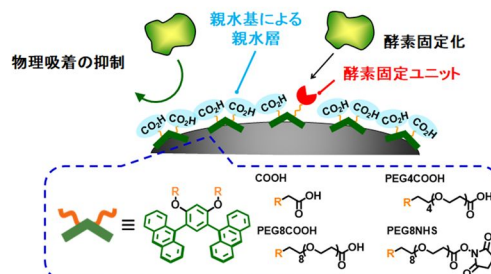


図 3 アントラセン二量体-親水ユニットおよび酵素固定ユニット複合体

4. 研究成果

アントラセンと複合化した化合物(Complex A, B)、および複合化していない 6-(Bromohexyl)ferrocene (Monomer)をそれぞれカーボンブラックと混合して固定化し、CV 測定を行

った。得られたフェロセン由来の酸化還元ピーク面積より被覆率を計算したところ、当研究室で従来行ってきたグラフト重合より約40倍高密度に固定化できていることが分かった。

また、電位サイクルを繰り返して、ピーク電流の電位サイクル依存性を評価した結果を図4に示す。アントラセンと複合化していないメディエータは電位サイクルの増加に伴いピーク電流値が減少した一方で、アントラセンと複合化したメディエータは、スペーサーに依らず電流値がほとんど変化せず、電極へ安定に固定化されたことが示された。

酵素 GOx との反応性を評価したところ、Complex A では GOx の基質となるグルコースを添加しても電流値の増加がみられず、触媒電流が得られなかった(図5a)一方で、Complex B はグルコースの存在下で酸化電流が増加し、触媒電流が得られた(図5b)。この結果より、アルキル鎖を用いたスペーサーの可動性や長さが酵素との反応性に重要であることが示された。

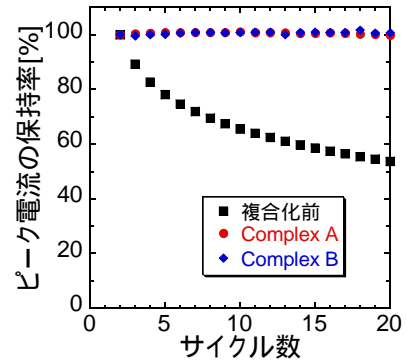


図4 複合化前後のピーク電流の電位サイクル依存性

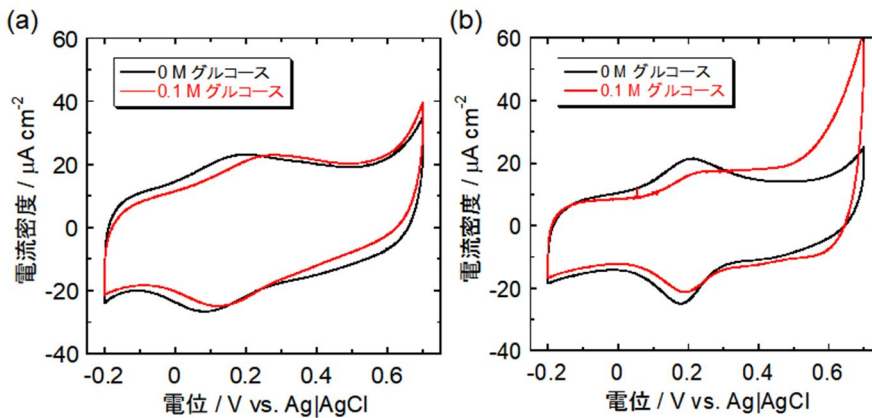


図5 (a) Complex A、(b) Complex B 修飾カーボン電極での GOx との反応性評価

続いて、低電流密度のもう一つの要因である酵素のカーボン表面への物理吸着に伴う変性・失活を解決するため、アントラセン二量体による酵素の固定化についても検討した。

図3で示した各親水ユニットと複合化したアントラセン二量体を合成し、カーボンブラックへの吸着特性を評価したところ、親水ユニットに依らず、カーボンブラック表面の単層完全被覆に相当する吸着量で吸着平衡となった。

GOx の吸着量を評価した結果、図6aに示すように未修飾の場合と比較して親水ユニット複合化アントラセン二量体で修飾した場合は酵素吸着が抑制された。また、酵素固定ユニット導入後は導入前の PEG8 と比較して吸着量が約3倍増加した。吸着酵素活性評価により、吸着 GOx の比活性[U/mg_GOx]を測定し、カーボンブラック重量あたりの酵素吸着量と吸着酵素の比活性の積であるカーボンブラック重量あたりの吸着酵素活性値[U/mg_CB]を算出した。図6bに示すように、酵素固定ユニット修飾カーボンブラックでは未修飾カーボンブラックの約2倍となった。

以上の結果、アントラセン二量体との複合化により高密度かつ安定にメディエータの固定化ができること、およびスペーサー構造が酵素との反応性に重要であることが示された。Complex B では触媒電流が得られたものの、得られた触媒電流密度が低いため、酵素との反応性をさらに高めるための検討が必要であることが明らかとなった。さらに、アントラセン二量体を用いることで、酵素の活性状態を維持したままカーボンブラック表面へ高密度固定する手法を確立した。

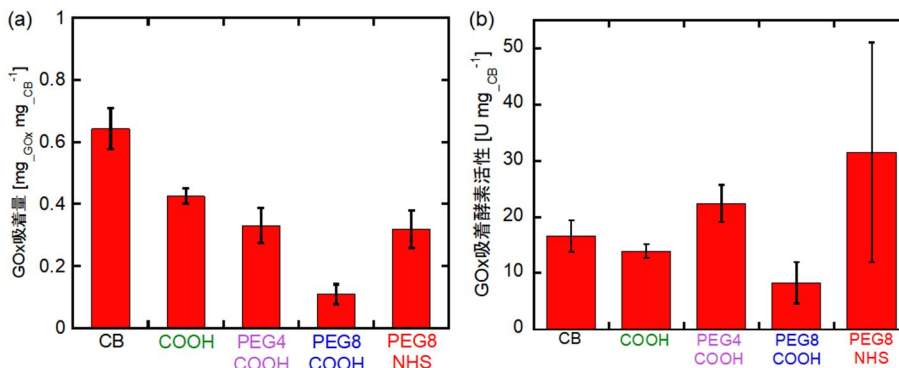


図6 親水ユニット・酵素固定ユニット複合体修飾カーボンブラックでの (a) 酵素吸着量、(b) 吸着酵素活性評価結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tamaki Takanori, Sugiyama Tomoharu, Oshiba Yuhei, Yamaguchi Takeo	4. 巻 3
2. 論文標題 Retention of activity and secondary structure of hyperthermophilic laccase adsorbed on carbon black	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Physics: Energy	6. 最初と最後の頁 34002
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1088/2515-7655/abe2f6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田巻孝敬
2. 発表標題 固体高分子形燃料電池・水電解および酵素型バイオ燃料電池の電極触媒開発
3. 学会等名 第81回応用物理学会秋季学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山崎諒太, 田巻孝敬, 泉田晃弥, 山川進二, 吉沢道人, 山口猛央
2. 発表標題 アントラセン二量体-レドックスポリマー複合体を用いた高電流密度バイオ燃料電池の開発
3. 学会等名 化学工学会第51回秋季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田巻孝敬
2. 発表標題 アントラセン二量体を用いた酵素固定化手法の開発
3. 学会等名 第30回日本MRS年次大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 泉田晃弥, 田巻孝敬, 宮西将史, 吉沢道人, 山口猛央
2. 発表標題 アントラセン二量体を用いた活性な酵素固定化手法の開発
3. 学会等名 第29回日本MRS年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田巻孝敬
2. 発表標題 バイオ燃料電池の高電流密度化へ向けた高密度で安定なメディエータ固定化手法の開発
3. 学会等名 第29回日本MRS年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 泉田 晃弥, 田巻 孝敬, 宮西 将史, 吉沢 道人, 山口 猛央
2. 発表標題 アントラセン二量体を用いた活性な酵素固定化手法の開発
3. 学会等名 化学工学会第85年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石井理子, 田巻孝敬, 黒田清徳, 宮西将史, 吉沢道人, 山口猛央
2. 発表標題 バイオ燃料電池の高電流密度化に向けたアントラセン二量体 - メディエーター複合体の開発
3. 学会等名 化学工学会第50回秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田巻孝敬
2. 発表標題 バイオ燃料電池酵素電極の材料システム設計
3. 学会等名 第28回日本MRS年次大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石井理子, 田巻孝敬, 黒田清徳, 宮西将史, 吉沢道人, 山口猛央
2. 発表標題 バイオ燃料電池の高電流密度化に向けたアントラセン二量体 - メディエーター複合体の開発
3. 学会等名 第28回日本MRS年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石井理子, 田巻孝敬, 黒田清徳, 宮西将史, 吉沢道人, 山口猛央
2. 発表標題 バイオ燃料電池の高電流密度化に向けたアントラセン二量体 - メディエーター複合体の開発
3. 学会等名 化学工学会第84年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 三林浩二（分担執筆：田巻孝敬）	4. 発行年 2020年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 300
3. 書名 酵素トランスデューサーと酵素技術展開（分担執筆：第19章 グルコースを用いた酵素型バイオ燃料電池）	

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	石井 理子 (Ishii Noriko)	大学院生	
研究協力者	泉田 晃弥 (Izumida Koya)	大学院生	
研究協力者	山崎 諒太 (Yamazaki Ryota)	大学院生	
連携研究者	吉沢 道人 (Yoshizawa Michito) (70372399)	東京工業大学・科学技術創成研究院・准教授/教授 (12608)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関