

平成 22 年 5 月 12 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19310070

研究課題名 (和文) エネルギー変換のための生体触媒—電極接合系の創成と反応解析

研究課題名 (英文)

Creation and Kinetics Analysis of Biocatalysis-Electrode Interface for Energy Conversion

研究代表者

加納 健司 (KANO KENJI)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：10152828

研究成果の概要 (和文)：未来型エネルギー変換システムであるバイオ電池の基礎反応としての生体触媒機能電極反応について、基礎および応用の研究を行った。酸化還元酵素および微生物を触媒とする直接電子移動 (DET) 型について、その反応機構と界面での酵素安定性について論じた。一方、本目的に照らした新規炭素素材を開発し、いくつかの DET 型電極作成法を提示した。これらの結果、酸素還元空気極として、受動型作動時における定常電流密度 20 mA cm^{-2} という世界最高の性能を実現した。

研究成果の概要 (英文)：Fundamental and applied researches have been performed for biological fuel cell as a potent energy conversion system in future. By focusing on direct electron transfer (DET) type bioelectrocatalytic reactions with enzymes or microbes as catalysts, mechanism of the electron transfer and stability of enzyme in electric double layer have been discussed in detail. On the other hand, methods for preparation of mesoporous carbon material suitable for enzyme immobilization and DET reactions and of bio-electrodes have been presented. Based on these studies, a novel biocathode to show a steady-state current density as high as 20 mA cm^{-2} under passive mode, has successfully been constructed. The performance is the best in the world.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
20 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
21 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：ナノ・マイクロ科学

科研費の分科・細目：ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：バイオ電池；マルチ銅酸化酵素；フラボヘモプロテイン；電流—電圧曲線；直接電子移動型触媒；酵素還元電極反応；糖酸化電極反応；炭素素材

1. 研究開始当初の背景

バイオ電池は急速にかつ世界的に注目を

浴びるようになってきている。申請者らはメデイエータ電子移動(MET)型酵素バイオ電池の出力として世界最高レベルの数 mW cm^{-2} 程度まで向上させることに成功しており、その成果は世界的に、高く評価されていた。

一方、直接型電子移動(DET)型では、世界の研究者の報告が数~数十 $\mu\text{W cm}^{-2}$ 程度とMET 型のそれに比べ極めて小さい上、その反応メカニズムも不明であった。その中で、申請者らは、 1 mW cm^{-2} 程度の出力のDET 型酵素バイオ電池を構築することに成功した。こうした特性はバイオ電池としては驚くべきものであった。DET 型バイオ電池では、メデイエータの流出によるクロスオーバーがないので、隔膜は不要である点も、他にはない大きな特色である。このような学問的世界的情勢のもと、DET 型バイオ電池は、MET 型バイオ電池とともに、日本が世界をリードできる分野のひとつになりつつある状況であった。

2. 研究の目的

本研究では、DET 型バイオ電池に焦点を絞りその電極反応の本質に迫るとともに、電池作製の技術基盤を確立することを目的とした。具体的には次の4点を基軸として、DET 型生体触媒機能電極反応の熱力学的および速度論的な基礎研究を展開するとともに、バイオ電池の技術基盤を確立することを目的とした。

- (1) DET 型酵素機能電極反応の探索とその反応に及ぼす酵素・電極特性因子の解明
- (2) DET 型酵素機能電極反応の電流-電圧曲線の理論構築
- (3) DET 型微生物機能電極反応の反応機構の解明
- (4) DET 型バイオ電池の構築

3. 研究の方法

- (1) 酵素の電子移動に関して、既存構造データをもとに、類似酵素の酸化還元中心と表面までの推定距離を算出し、電気化学特性との関係から、Marcus 理論を考慮しながら DET 型反応に関する電子距離の問題を明らかにする。
- (2) 炭素素材のマクロ孔の様子を SEM 観察し、SEM 情報と電気化学特性の関係を明らかにする。また、CV や RDE 法を利用し、電気化学データを触媒活性情報と物質移動情報に区別して理解する。
- (3) カーボンゲルを用いて、そのメソ孔の平均直径と電気化学特性の関係を明らかにする。
- (4) EQCM 等により、吸着量と電気化学活性を、電位と時間の関数として観測し、酵素反応速度定数の電位依存性、あるいは時間依存性に関する情報を得る。これを基に電流-電

圧曲線の理論を提案する。

(5) 微生物を保持させた炭素基材を電極として、基質の触媒酸化反応を、電気化学的に追跡する。この電気化学情報とバイオフィームとの関係を明らかにする。

(6) マルチ銅酵素を触媒とする DET 型の三相界面構造を構築し、現在の溶液浸漬型に比べ電流密度を2桁程度まで向上させるセル設計を行う。

4. 研究成果

未来型エネルギー変換システムとしてのバイオ電池について、直接電子移動(DET)型生体触媒機能電極反応の熱力学的および速度論的な基礎研究を展開し、バイオ電池の技術基盤を確立することを目的とし、主に、以下の4点について成果が得られた。

- (1) 直接電子移動(DET)型のバイオカソードとして、マルチ銅酵素を触媒とする三相界面構造を構築することを目的として、炭素の種類とバインダーの種類、およびそれらの混合比などを綿密に調べた。さらに緩衝液濃度の最適化を行い、定常的電流密度に 20 mA cm^{-2} を実現した。
- (2) 高分子化条件の検討により、酵素の大きさ程度の細孔を有する種々の炭素を調整することに成功した。またその細孔を制御する方法も見出した。これにより、酵素の数倍程度の細孔が適切であることがわかった。
- (3) 電気二重層の電場と酵素の相互作用により、酵素が失活することを示し、表面修飾により本効果を弱めることに成功した。
- (4) DET型微生物機能電極反応と言われてきた反応系について、電気化学挙動を精査した結果、微生物が産生する酸化還元物質が、メデイエータとなっていることを明らかにした。また、培養液中から、酸化還元物質としてのキノンとフラビンを同定した。さらに、特定の微生物電池アノードでは好気条件の方が、電流密度が大きくなることを示した。そのほか、非常に多くの理解の進展や、方法論の提示をしてきたが、それらの詳細は、雑誌論文および口頭発表の形で報告している。これらの知見は、生物機能電極反応の理解とバイオ電池の更なる発展に大きく寄与する。

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 24 件)

- 1) マルチ銅酵素を機軸とするカソード触媒。辻村清也, 加納健司; 燃料電池, **9** (1), 62-70 (2009). 査読なし
- 2) 酵素を使った燃料電池用電極。辻村清也, 加納健司; 機能材料, **29** (9), 44-57 (2009). 査読なし

- 3) バイオ電池のための酵素触媒機能電極. 辻村清也, 加納健司; *Electrochemistry*, **76** (12), 900–909 (2008). 査読なし
- 4) Effects of Oxygen on *Shewanella decolorationis* NTOU1 Electron Transfer to Carbon Felt Electrodes. Shiue-Lin Li, Stefano Freguia, Shiu-Mei Liu, Sheng-Shung Cheng, Seiya Tsujimura, Osamu Shirai, Kenji Kano; *Biosens. Bioelectron.*, in press. 査読有
- 5) Flavins Contained in Yeast Extract are Exploited for Anodic Electron Transfer by *Lactococcus lactis*. Masaki Masuda, Stefano Freguia, Yung-Fu Wang, Seiya Tsujimura, and Kenji Kano; *Bioelectrochemistry*, in press. 査読有
- 6) Electron Transfer Pathways in Microbial Oxygen Biocathodes. Stefano Freguia, Seiya Tsujimura, Kenji Kano; *Electrochim. Acta*, **55** (3), 813–818 (2010). 査読有
- 7) Electrochemical Reaction of Fructose Dehydrogenase on Carbon Cryogel Electrodes with Controlled Pore Sizes. Seiya Tsujimura, Akiko Nishina, Yasuyuki Hamano, Kenji Kano, and Soshi Shirai; *Electrochem. Commun.*, **12** (3), 446–449 (2010). 査読有
- 8) Coulometric D-fructose Biosensor Based on Direct Electron Transfer Using D-Fructose Dehydrogenase. Seiya Tsujimura, Akiko Nishina, Yuji Kamitaka, and Kenji Kano; *Anal. Chem.*, **81** (22), 9383–9387 (2009). 査読有
- 9) *Lactococcus lactis* Catalyses Electricity Generation at Microbial Fuel Cell Anodes via Excretion of a Soluble Quinone. Stefano Freguia, Sinnki Masuda, Seiya Tsujimura, and Kenji Kano; *Bioelectrochemistry*, **76** (1/2), 14–18 (2009). 査読有
- 10) Air Diffusion Biocathode with CueO as Electrocatalyst Adsorbed on Carbon Particle Modified Electrodes. Ryota Kontani, Seiya Tsujimura, and Kenji Kano; *Bioelectrochemistry*, **76** (1/2), 10–13 (2009). 査読有
- 11) Direct Electrochemistry of CueO and Its Mutants at Residues to and Near Type I Cu for Oxygen-Reducing Biocathode. Yuko Miura, Seiya Tsujimura, Sinji Kurose, Yuji Kamitaka, Kenji Kataoka, Takeshi Sakurai, and Kenji Kano; *Fuel Cells*, **9** (1), 70–78 (2009). 査読有
- 12) Direct Electrochemistry of Histamine Dehydrogenase from *Nocardioides simplex*. Maiko Tsutsumi, Seiya Tsujimura, Osamu Shirai, and Kenji Kano; *J. Electroanal. Chem.*, **625** (1), 144–148 (2009). 査読有
- 13) Coulometric Bioelectrocatalytic Reactions Based on NAD-dependent Dehydrogenases in Tricarboxylic Acid Cycle. Jun Fukuda, Seiya Tsujimura and Kenji Kano; *Electrochimica Acta*, **54** (2), 328–333(2008). 査読有
- 14) Electrochemical Regulation of the End-product Profile in *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 with an Endogenous Mediator. Yung-Fu Wang, Masaki Masuda, Seiya Tsujimura, and Kenji Kano; *Biotechnol. Bioengineer.*, **101** (3), 579–586 (2008). 査読有
- 15) Amperometric Detection of Acetate Based on Mediated Bioelectrocatalysis using *Escherichia coli* Cells Cultivated with Acetate. Yung-Fu Wang, Seiya Tsujimura, and Kenji Kano; *Electrochemistry*, **76** (8), 631–633 (2008). 査読有
- 16) Pentacyanoferrate and Bilirubin Oxidase-bound Polymer for Oxygen Reduction Bio-cathode. Kenji Ishibashi, Seiya Tsujimura, and Kenji Kano; *Electrochemistry*, **76** (8), 594–596 (2008). 査読有
- 17) Direct Electron Transfer Reaction of D-Gluconate 2-Dehydrogenase Adsorbed on Bare and Thiol-modified Gold Electrodes Seiya Tsujimura, Tomohiko Abo, Kazunobu Matsushita, Yoshitaka Ano, and Kenji Kano; *Electrochemistry*, **76** (8), 549–551 (2008). 査読有
- 18) CueO-immobilized Porous Carbon Electrode Exhibiting Improved Performance of Electrochemical Reduction of Dioxygen to Water. Seiya Tsujimura, Yuko Miura, and Kenji Kano; *Electrochimica Acta*, **53** (18), 5716–5720 (2008). 査読有
- 19) Thermodynamic Redox Properties Governing Half-reduction Characteristics of Histamine Dehydrogenase from *Nocardioides simplex*. Maiko Tsutsumi, Nobutaka Fujieda, Seiya Tsujimura, Osamu Shirai, and Kenji Kano; *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72** (3), 786–796 (2008). 査読有
- 20) Mediated Bioelectrocatalytic Reaction Using Monolayered Redox Polymer on a Glassy Carbon Electrode Surface and Effect of the

- Ionic Strength on the Catalytic Current. Seiya Tsujimura, Akio Ishii, Tomohiko Abo, and Kenji Kano; *J. Electroanal. Chem.*, **614** (1/2), 67–72 (2008). 査読有
- 21) Electrochemistry of D-Gluconate 2-Dehydrogenase from *Gluconobacter frateurii* on Indium Tin Oxide Electrode Surface. Seiya Tsujimura, Tomohiko Abo, Yoshitaka Ano, Kazunobu Matsushita, and Kenji Kano; *Chem. Lett.*, **36** (9), 1164–1165 (2007). 査読有
- 22) Diffusion-controlled Oxygen Reduction on Multi-copper Oxidase-adsorbed Carbon Aerogel Electrodes without Mediator. Seiya Tsujimura, Yuji Kamitaka, and Kenji Kano. *Fuel Cells*, **7** (6), 463–469 (2007). 査読有
- 23) Self-excreted Mediator from *Escherichia coli* K-12 for Electron Transfer to Carbon Electrodes. Yung-Fu Wang, Seiya Tsujimura, Sheng-Shung Cheng, and Kenji Kano; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **76** (6), 1439–1446 (2007). 査読有
- 24) Fructose/Dioxygen Biofuel Cell Based on Direct Electron Transfer-type Bioelectrocatalysis. Yuji Kamitaka, Seiya Tsujimura, Norihiko Setoyama, Tsutomu Kajino, and Kenji Kano; *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **9** (15), 1793–1801 (2007). 査読有
- [学会発表] (計 23 件)
- 1) Improved Performance of Oxygen-reducing Biocathode in Biological Fuel Cells. Kano, Kenji, Tsujimura, Seiya, 217th ECS Meeting, Vancouver, Canada, April 25-30, 2010.
- 2) Air Diffusion Biocathode based on Direct Electron Transfer-type Bioelectrocatalysis. Kenji Kano, Seiya Tsujimura; 217th ECS Meeting, Vancouver, Canada, April 25-30, 2010
- 3) 生体触媒電極反応とバイオ電池. 加納健司, 日本化学会第 90 春季年会, 2010/03/26, 東大阪市
- 4) 酵素機能電極の何を理解して, 何に役立つのか? 加納健司, 第 12 回基礎電気化学フォーラム, 2010/02/13, 京都
- 5) バイオ電池の現状と展望. 加納健司, 化学電池材料研究会, 第 25 回講演会, 2009/12/16, 東京
- 6) 酵素と電極の接合—シグナル変換からエネルギー変換—. 加納健司, 東海コンファレンス, 2009/11/06, 松本
- 7) Surface Properties Governing Direct Electron Transfer Kinetics of a Multi-copper Oxidase CueO. Kenji Kano, Seiya Tsujimura; 216th ECS Meeting, Vienna, Austria, October 4-9, 2009.
- 8) Redox Enzyme-based Bioelectrocatalytic Reactions and Its Application to Biosensors and Biofuel Cells. Kano, Kenji, George Wilson's 70th Birthday Symposium, September 11-12, 2009, Apollo Auditorium, Nichols Hall, The University of Kansas, KS, USA.
- 9) Fundamental and Perspective of Bioelectrochemistry. Kenji Kano; Osaka Univ. Global COE Program: Dynamics of Biological Systems, Frontier Biosciences GCOE Young Researchers Retreat 2009, Rokko Sky Villa, Kobe. 2009/08/24-26.
- 10) 有機物から電気を取り出すバイオ電池. 加納健司, 食品衛生懇話会, 2009/09/08, 大阪
- 11) 酵素・微生物バイオ電池の現状. 加納健司, 発酵と代謝研究シンポジウム, 「広がる微生物の世界」, (財) バイオインダストリー協会 2009/08/07, 東京
- 12) Direct Electron Transfer of Redox Enzymes and its Application to Biofuel Cells. Kenji Kano; The 42nd Heyrovský Discussion, Třeš' Castle, Czech Republic, June 14-18, 2009.
- 13) バイオ電池の現状と展望. 加納健司, 平成 21 年度 触媒学会燃料電池関連触媒研究会, 2009/03/17, 東京
- 14) Kinetic Characterization of Multi-copper Oxidase and the Synthesis of Pentacyanoferrate-bound Polymer for Oxygen Reduction Bio-cathode. Kenji Ishibashi, Seiya Tsujimura, Kenji Kano; The 214th ECS Meeting (2008 Fall Meeting of The Electrochemical Society of Japan), October 12–17, 2008, Honolulu, HI, U.S.A.
- 15) バイオ燃料電池 最近の動向と応用展開. 加納健司, 第 60 回日本生物工学会大会, 2008/08/27-29, 仙台
- 16) 情報変換・エネルギー変換に向けた生物電気化学. 加納健司, 第 95 回分析技術研究会, 2008/06/04, 大阪
- 17) Direct Electron Transfer-type Fructose/dioxygen Biofuel Cell. Kenji Kano, Seiya Tsujimura, Yuji Kamitaka; 213th ECS Meeting, May 18–22, 2008, Phoenix, Arizona,

U.S.A.

18) Direct Electron Transfer-type Biofuel Cells.
Kenji Kano, The 6th Asian Conference on Electrochemistry, Chientan Overseas Youth Activity Center, Taipei, Taiwan, 2008, 05/11-14.

19) 太陽のめぐみをバイオの力で電気に変える. 加納健司, 食品科学工学会関西支部主催市民フォーラム, 2008/05/09, 京都

20) 酢酸菌由来の酵素の生物電気化学的利用. 加納健司, 日本農芸化学会 2008 年度大会「産業を創出する応用微生物学—酢酸菌バイオテクノロジーの新展開—」, 2008/03/26-29, 名古屋

21) 生体エネルギー変換に学ぶバイオ電池への夢. 加納健司, 日本生体エネルギー研究会第 33 回討論会, 2007/11/15-17, 山口

22) 電極触媒としての酸化還元酵素—バイオ電池への夢. 加納健司, 第 57 回 錯体化学討論会, 2007/09/25-27, 名古屋

23) 次世代型バイオ電池への夢. 加納健司, 日本農芸化学会 関西支部, 07/07/07, 大阪
第 450 回講演会・ミニシンポジウム

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bapc.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加納 健司 (KANO KENJI)
京都大学・農学研究科・教授
研究者番号：10152828

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし