

令和 5 年 6 月 17 日現在

機関番号：51201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K15368

研究課題名（和文）発電阻害物質の除去機構を実装した多段階フロー式酵素燃料電池の開発

研究課題名（英文）Development of a flow-type multi-step enzymatic fuel cell implementing a mechanism to remove inhibitors of power generation

研究代表者

本間 俊将（Homma, Toshimasa）

一関工業高等専門学校・その他部局等・准教授

研究者番号：20818538

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）：糖やアルコールが持つ化学エネルギーを直接電気エネルギーに変換するため生物の代謝反応を模倣した発電システムの開発に取り組んだ。まず、酸素還元酵素とギ酸脱水素酵素を使った酵素燃料電池を作製し、ギ酸を燃料として出力が得られることを確認した。次に、シュウ酸を二酸化炭素と水へと分解できる酵素群を電極触媒としたアノードを作製したが、酸化電流はほとんど得られなかった。多段階酵素反応を利用した酵素燃料電池による糖やアルコールの完全酸化には酵素の活性化や安定化、集積化が重要であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

モバイル機器の機能が充実していくのに伴い、安全かつ大容量の電源が必要になってきている。糖やアルコールの体積あたりのエネルギー密度はリチウムイオン電池よりも優れており、それらを燃料として発電できる酵素燃料電池は情報社会と循環型社会の両立に適した電源といえる。本研究では、長時間継続して発電可能な酵素燃料電池の開発を目指した。残念ながら期間中の開発はならなかったが、糖やアルコールの化学エネルギーを全て取り出すには多段階酵素反応に関わる全ての酵素の活性化や安定化、集積化が重要であることが確認できた。本研究成果は高性能な酵素燃料電池の開発に役立つものと思われる。

研究成果の概要（英文）：A fuel cell was fabricated using an enzyme as an electrocatalyst to convert the chemical energy of formic acid into electrical energy. An electrode was fabricated to obtain electrical energy from oxalic acid, but little current was obtained. The stability, activity, and orientation of the immobilized enzymes are thought to be important factors in improving the output.

研究分野：バイオ電気化学

キーワード：燃料電池 酵素反応 エネルギー変換 多段階反応 モバイル電源

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

モバイル機器の多機能化に伴い、大容量モバイル電源の必要性が増している。糖やアルコールの体積あたりのエネルギー密度はリチウムイオン電池よりも優れており、それらから電気を得る酵素燃料電池は魅力的存在である。従来は 1 種類の酵素のみを利用したものが多く、燃料の持つエネルギーの一部しか利用できなかったが、複数の代謝酵素を電極触媒とした多段階反応型酵素燃料電池が開発され、エネルギーを 100% 利用できる可能性が出てきた。しかしこれまで採用されてきたバッチ式では電解液に溜まった中間生成物や炭酸イオンが酵素反応を阻害するため、出力低下が起こり、最終的に途中で発電が止まってしまう問題¹⁾があった。

2. 研究の目的

上記の問題を受けて、本研究では反応と生成物分離を同時に達成するフロー式多段階反応型酵素燃料電池を着想した。フロー式で定常発電を達成するためには、フローの消費電力を十分上回る出力が必要となる。そこで、多段階反応型酵素燃料電池の高出力化と発電阻害物質除去機構の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ギ酸酵素燃料電池の構築

糖やアルコールを二酸化炭素と水まで酵素反応で酸化していく場合、ギ酸を二酸化炭素へと変換する反応が最も下流となるため、まずギ酸酵素燃料電池の作製を行った。アノードの触媒としてギ酸脱水素酵素 (FDH) を採用した。FDH は β -ニコチンアミドアデニンジヌクレチド (NAD) を補酵素とする酵素である。酵素反応によって生成する NADH は電極と反応しにくいいため電極触媒としてポリアニリンとポリアクリル酸から成る複合膜を使用した。カソードの触媒にはピリルビンオキシダーゼ (BOD) を使用した。BOD は酸素を水へと還元する酵素である。酵素と電極間の電子伝達を効率的に行うため、ポリ(3-メチルチオフェン)膜で電極を被覆し、ABTS を電子伝達物質として利用した。アノードとカソードを向かい合うように置き、Nafion 膜をその間に設置した。アノードと Nafion 膜の間にはギ酸、NAD、FDH を含むリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を入れ、カソードと Nafion の間には、ABTS と BOD を含むリン酸カリウム緩衝液を入れた。電池性能は、ポテンシオスタットを用いて任意の電位を電極間に与えた際の電流を読み取ることによって評価した。

(2) シュウ酸デカルボキシラーゼ生産株の作製

次に、想定する代謝経路において、ギ酸の上流に位置するシュウ酸を燃料とした発電を検討した。高活性なシュウ酸デカルボキシラーゼ (OxDC) を大量に調製するため、大腸菌を宿主とした発酵生産を試みた。OxDC 遺伝子には *Bacillus subtilis* 由来の配列に対してコドン最適化を施したものをを用いた。この遺伝子を pET22b ベクターに導入し、BL21 (DE3) pLysS を形質転換した。その後、抗生物質を含む LB 培地で培養し、発現の有無を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で確認した。

(3) ピロロキノリンキノン依存性脱水素酵素群の活性評価

代謝経路においてシュウ酸の上流に位置するアルコールや糖を分解するための酵素として酢酸菌が持つピロロキノリンキノン依存性脱水素酵素の利用を検討した。S. Minteer らの論文²⁾を参考に酵素を精製し、ジクロロインドフェノールとフェナジンメトサルフェートを用いた比色定量法でエタノール、ホルムアルデヒドおよびグリセロールに対する触媒活性を評価した。

4. 研究成果

(1) ギ酸酵素燃料電池の構築

Figure 1 (A) に示すように、FDH を触媒としたアノードでは 0 V vs. SCE 以上の電位で酸化電流が得られ、0.1 V 以上でほぼ一定になった。一方、BOD を触媒としたカソードでは 0.5 V vs SCE 以下の電位で還元電流が得られた (Figure 1 (B))。これらのアノードとカソードを用いて作製したギ酸酵素燃料電池の電流-電圧曲線および出力-電圧曲線を Figure 1 (C) に示す。電池の起電力はアノードとカソードの電気化学反応から予想される値に近かった (約 0.55 V)。最大出力密度は電極面積 1 cm² 当たり 7.3 μ W であり、従来の酵素燃料電池³⁾と比較すると小さな値であった。カソード側で得られる電流値はアノード側で得られるものよりも小さいため電池の性能はカソードの性能で制限されていると考えられる。カソードの性能は BOD の活性化や最適な電極材料の選択などによって改善できる。

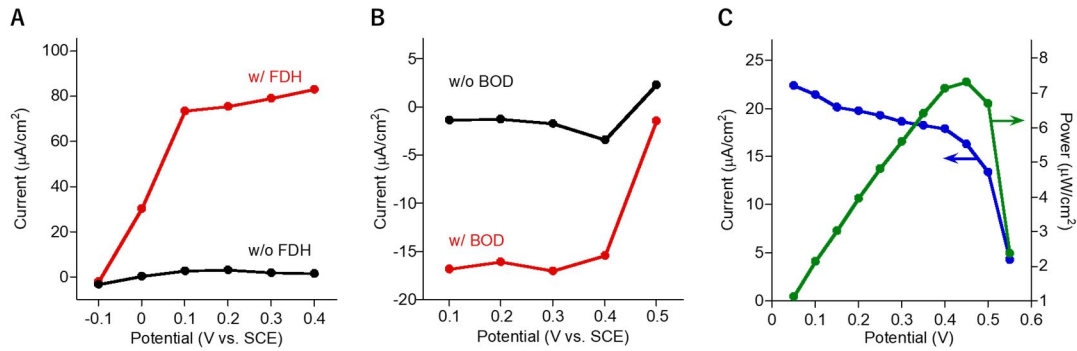


Figure 1 FDH を用いたギ酸の電気化学的酸化反応 (A)、BOD を用いた酸素の電気化学的還元反応 (B) および (C) ギ酸酵素燃料電池の出力試験結果

(2) シュウ酸デカルボキシラーゼ生産株の作製

本研究ではアノードの反応に注目しているため、次に、想定代謝経路においてギ酸の上流に位置するシュウ酸の電気化学的酸化を試みた。シュウ酸の分解酵素としてシュウ酸オキシダーゼ (OxDC) を選択した。OxDC はシュウ酸をギ酸と二酸化炭素へと分解する酵素である。ギ酸酵素燃料電池と組み合わせることでシュウ酸を二酸化炭素と水へと完全に分解して電気エネルギーが得られるようになる。

しかしながら、市販の OxDC をアノード側に加えても酸化電流は得られなかった。これは OxDC の活性が低いことや酵素量が少ないことが要因と考えられる。そこで、OxDC の異種発現系を構築し、OxDC の大量調製法を確立することとした。まず、発現用ベクターに OxDC 遺伝子をクローニングし、コロニー-PCR と DNA シーケンスで設計通りの発現用ベクターが構築できていることを確認した (Figure 2 (A))。次に、BL21 (DE3) pLysS を形質転換し、コロニー-PCR で発現ベクターの有無を確かめた (Figure 2 (B))。3 つの形質転換体のコロニーを選び、OxDC の発現試験を行った。残念ながら、発現誘導剤であるイソプロピル- β -チオガラクトピラノシド (IPTG) を加えても OxDC と思われるタンパク質は確認できなかった (Figure 2 (C))。現在、他の宿主を用いた異種発現系を検討しているところである。

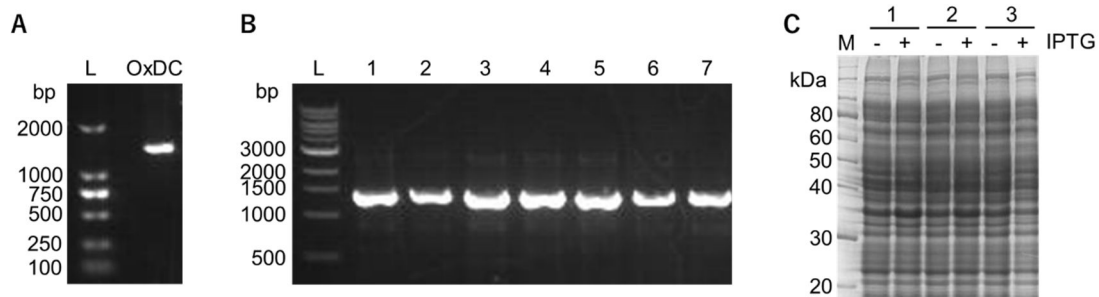


Figure 2 OxDC 発現用ベクターの構築 (A)、大腸菌の形質転換 (B) および OxDC 発現 (C) の確認

(3) ピロロキノリンキノン依存性脱水素酵素群の活性評価

代謝経路の上流に位置するアルコールや糖の分解酵素の活性について評価した。エタノールやホルムアルデヒドに対する活性と比較して、グリセロールに対する活性は 1/20 程度しか無かった。低活性の原因の一つとして酵素が不活化したことが挙げられる。すなわち、発電中も酵素が安定に活性を維持できる電解液条件の探索が必要といえる。現在、細胞内で酵素が安定かつ高活性で存在することに学び、電解液に高分子添加剤を加えるなどの検討を行っている。十分な出力が得られる確証を得てから、フロー式の多段階反応型酵素燃料電池の開発に移る予定である。

< 引用文献 >

- 1) S. Xu and S.D. Minteer, *ECS Electrochemistry Letters*, **3**, H24-H27, (2014)
- 2) R.L. Arechederra and S.D. Minteer, *Fuel Cell*, **9**, 63-69 (2009)
- 3) T. Kuwahara et al., *Synthetic Metals*, **159**, 1859-1864 (2009)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Homma Toshimasa, Tsurusaki Yoshino, Kamimura Naofumi, Masai Eiji, Ang Lily Zuin Ping | 4. 巻 154 |
| 2. 論文標題 Protocatechuic acid fuel cell: A sustainable energy generation system based on microbial metabolism of lignin-derived aromatic compounds | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Biomass and Bioenergy | 6. 最初と最後の頁 106254 ~ 106254 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biombioe.2021.106254 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Homma Toshimasa, Terui Shu, Yokoyama Fuki, Okino Saki, Ohta Sora, Kato Chihiro, Haraguchi Naoki, Fujisawa Ikuhide, Itsuno Shinichi, Ang Lily Zuin Ping | 4. 巻 120 |
| 2. 論文標題 Simple production of resilin like protein hydrogels using the <i>Brevibacillus</i> secretory expression system and column free purification | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Biotechnology and Bioengineering | 6. 最初と最後の頁 194 ~ 202 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bit.28267 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Ami Suzuki, Lily Zuin Ping Ang, Naofumi Kamimura, Eiji Masai, Toshimasa Homma |
| 2. 発表標題 Effects of Electrode Surface Modification on Electrochemical Oxidation of Protocatechuic Acid |
| 3. 学会等名 6th STI-Gigaku 2021 (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Toshimasa Homma, Hibiki Chiba, Lily Zuin Ping Ang |
| 2. 発表標題 Electrochemical polymerization of aniline in a polystyrene sulfonate solution and characterization of the resulting film |
| 3. 学会等名 4th STI-Gigaku (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Toshimasa Homma, Lily Zuin Ping Ang |
| 2. 発表標題 Composition control of polyaniline/poly(acrylic acid) films for enzyme electrodes |
| 3. 学会等名 第29回日本MRS年次大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|