

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 1日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：22651026

研究課題名（和文） 実バイオマスから直接電気エネルギーを生み出す固定化生体触媒の開発

研究課題名（英文） Bio-Fuel Cells from biomass based on whole-cell biocatalyst

研究代表者

福田 秀樹 (HIDEKI FUKUDA)

神戸大学・学長

研究者番号：30263396

研究成果の概要（和文）：本研究では、バイオマスの糖化と単糖の酸化を同時に行う電極の開発を行った。グルコース酸化酵素を固定化した電極を調整し、グルコースから電流を取り出すことができた。続いてこの電極にバイオマス分解酵素であるアミラーゼを固定化し、デンプンを燃料として直接電気エネルギーを取り出すことができた。また、 β グルコシダーゼを固定化した電極を調整し、セロオリゴ糖からも直接電気エネルギーを取り出すことに成功した。

研究成果の概要（英文）：We developed an electrode that can both saccharize and oxidize starchy biomass using multi-immobilization of glucose oxidase, alpha-amylase, and glucoamylase (or beta-glucosidase) on a carbon paste electrode. The electrode is capable of directly producing current from starchy biomass material as well as cellulosic materials.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	0	2,000,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	360,000	3,560,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：生物機能・バイオプロセス

キーワード：固定化触媒・バイオマス・バイオ電池

1. 研究開始当初の背景

バイオ燃料電池は従来の燃料電池とは異なり、バイオマスを燃料として用いることで電気エネルギーを直接取り出すことが可能となるため、環境にやさしいクリーンなエネルギーとして期待されている。しかし従来のバイオ燃料電池はグルコースを燃料としており、バイオマスから直接エネルギーを取り出すことに成功したという報告はほとんど

ない。これまでバイオマスからバイオ燃料やバイオプラスチックなど様々な有用物質を生産する技術が開発されてきているが、バイオマスから直接エネルギーを生産する技術は未だ報告例が少ないのが現状である。

通常、バイオマスをバイオ燃料電池に用いるためには、バイオマスを糖化する酵素(セルラーゼ)によってグルコースなどの単糖へと分解してから用いる必要がある。本研究で

は、セルラーゼをグルコース酸化酵素と同時に固定化することで、バイオマスから直接電気エネルギーを取り出すバイオ燃料電池の開発を目指す。そのためにまず、電極表面への酵素固定化方法について検討し、グルコースを燃料としたアノード電極によって固定化方法の性能評価を行った。

2. 研究の目的

本研究では、バイオマスから直接電気エネルギーを取り出す技術の開発を目指した。バイオマス分解酵素及び酸化還元酵素を同一表面上に固定化することで、バイオマス分解とエネルギー生産を同時に行う電極の開発を目指した。また、固定化菌体触媒技術を電極表面上へ応用し、電極性能の向上を目指した。

3. 研究の方法

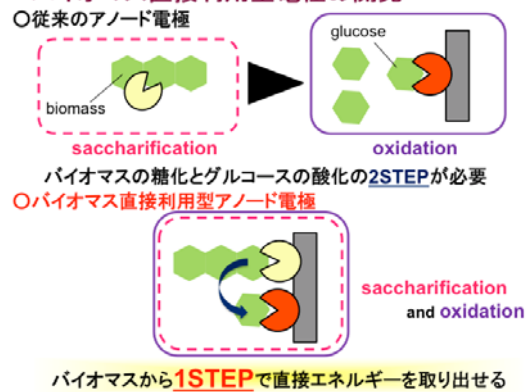
アノードには *Aspergillus niger* 由来のグルコースオキシダーゼ (Gox) を使い、*A. oryzae* を用いて発現精製した。基質にはグルコースまたは可溶性デンプンを用いた。デンプン分解酵素として *Streptococcus bovis* 由来の α アミラーゼを大腸菌を用いて発現精製した。*Rhizopus oryzae* 由来のグルコアミラーゼは市販品を用いた。電極はカーボンペーストを用い、メディエータとして 2-ヒドロキシ-1,4-ナフトキノンを用いた。

Gox をメディエータとともに固定化した電極、Gox とアミラーゼとメディエータを固定化した電極、及びメディエータのみを固定化した電極をそれぞれ調製した。グルコース、または可溶性デンプンを基質とした酸化反応をサイクリックボルタモグラムによってピーク電位を測定し、クロノアンペロメトリーを用いて各電位において電流値を測定した。

さらにアノードの性能を改善するため、改良型アノードの作成も行った。アノードには *Gluconobacter oxygen* 由来の PQQGDH (ピロロキノリンキノン依存型グルコースデヒドロゲナーゼ) を使用し、燃料にはグルコースを用いた。電極にはグラッシーカーボンを使用し、酵素-電極間の電子授受の役割を担うメディエーターとしてフェロセン (Fc) を用いた。フェロセンはカーボンナノチューブ (CNTs) に固定化し、導電性を高めて使用した。

本実験での固定化法の概略図を以下に示す。CNTs に Fc を固定化した溶液を電極表面に滴下し、十分に乾燥させた。その後 GDH を滴下し再び乾燥させ、最後にポリアリルアミン (PAA) とグルタルアルデヒド (GA) を電極上で架橋させ、膜を形成した。作製した電極の性能はサイクリックボルタンメトリーで評価した。

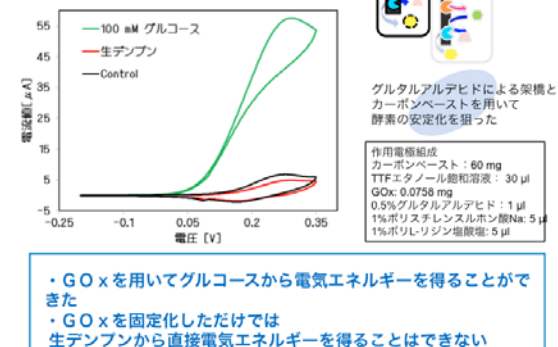
バイオマス直接利用型電極の開発



4. 研究成果

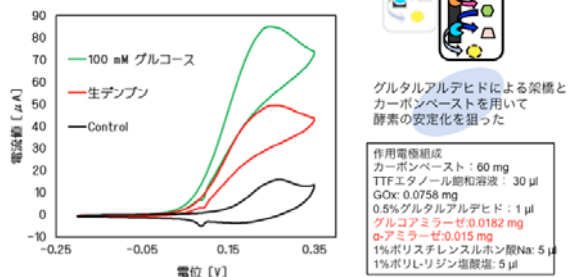
グルコースオキシダーゼ (GOx) を固定化した電極を用いたサイクリックボルタモグラムを以下に示す。グルコースを添加すると電位にピークが見られたことから、グルコース酸化電極の創製に成功した。

CP-TTF-GOx-PIC電極



しかし、グルコースなどの単糖からは電気エネルギーを取り出せるが、オリゴ糖であるバイオマスからは電流を取り出せない。そこで、この電極にバイオマス分解酵素を固定化し、バイオマス分解と酸化反応を同時に行う電極も創製した。バイオマスには分解が容易なデンプンを用い、分解反応と酸化反応における基礎的な知見を得ることを目指した。その結果を以下に示す。アミラーゼを固定化することで、電流ピークがみられ、デンプンから直接電気エネルギーを取り出すことに成功した。

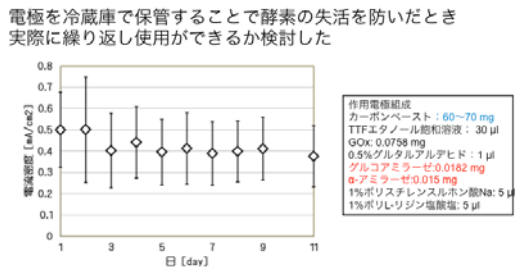
CP-TTF-Mix-PIC電極 (i)



生デンプンを燃料として0.266 Vの電位に0.692 mA/cm²の電流密度を得ることに成功

また、この電極の安定性を評価した。長期保存、及び繰り返し利用における安定性を以下に示す。全ての電極が10日以上にわたり安定であり、本電極は実用性においても優れていることが明らかとなった。しかし、まだまだ十分とは言えないため、電極調整法を最適化し、耐性と安定性を向上させる必要がある。

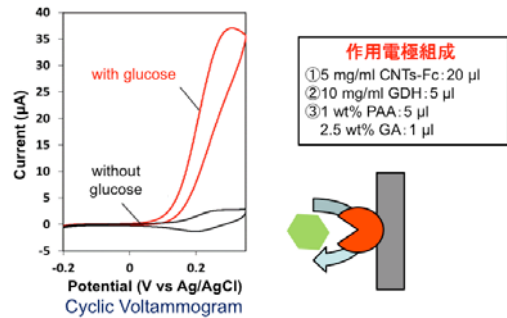
CP-TTF-Mix-PIC電極 (ii)



3本同じ組成の電極を作成し、10日以上測定を行った結果全ての電極がある程度の能力を維持したままであった

続いて、電極の改良を行った。メディエーターを複数種類検討し、フェロセンが最適であることを見出した。このフェロセンをメディエーターとして使い、GDH 固定化電極を調製した。このサイクリックボルタモグラムの以下に示す。グルコースを添加しない系に比べてグルコースを添加した系では、電流値のピークが見られ、グルコースの酸化によって生じた電子が電極-酵素間を移動していることが示された。また、0.3V 付近に 0.54mA/cm²の電流応答を得ることに成功した。これにより、電極の改良は非常に有用な要因であることが明らかとなった。

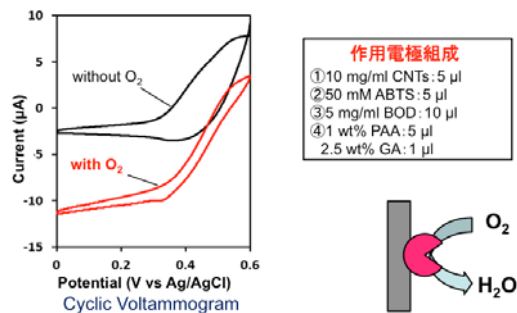
サイクリックボルタメトリー(CV)による電極評価



0.3 V付近に0.54 mA/cm²の電流応答を得ることに成功

続いてカソードの作成も行った。カソードのメディエーターとして ABTS を使い、還元酵素としてビリルビンオキシダーゼ (BOD) を用いた。固定化方法はアノードとほぼ同様に行った。そのサイクリックボルタモグラムの以下に示す。溶液中での酸素存在条件により、電流値のピークが得られたことから、カソードの作成にも成功した。

CVによるカソードの評価



酸素還元ピークの取得に成功

続いて、バイオマスとしてセロオリゴ糖、セルロースをターゲットとし、これらを分解しつつ酸化する電極の創製を行った。初めに、セロオリゴ糖分解酵素としてβグルコシダーゼを選択し、いくつかのβグルコシダーゼの活性を評価した。これより、Thermobifida fusca 由来のβグルコシダーゼが、セロビオースを含め、3糖からできているセロトリオース、4糖からできているセロテトラオースなどの複数種類のオリゴ糖を効率よく分解することが明らかとなった。このβグルコシダーゼを固定化した電極を作成し、セロオリゴ糖からの電流を同様にサイクリックボルタモグラムのにて評価した。すると、セロオリゴ糖の添加とともに電流値が増大し、ピークを確認することができた。また、βグルコシダーゼを固定化していない電極ではピークの増加は確認されなかったことから、糖質酸

化酵素だけではなく、オリゴ糖分解酵素が必要であることも明らかとなった。

更に、セルロースとしてカルボキシメチルセルロースを燃料として用いた電極の創製も行った。カルボキシメチルセルロースの分解にはエンドグルカナーゼも必要であることから、エンドグルカナーゼ及び β グルコシダーゼの両方を固定化した電極を創製し、電流をサイクリックボルタモグラムにて評価した。しかし、電流値の増大はほとんど確認されなかった。これは、エンドグルカナーゼの活性が非常に弱く、分解過程が律速となっていることが示唆された。

以上より、バイオマスを分解しながら酸化還元反応を行い、電気エネルギーを取り出す電極の創製に成功した。今後の課題として、電極表面におけるバイオマス分解能の向上、及び基質の拡散条件の向上がある。酵素の活性を向上させることで分解能を向上させ、また電極表面上を最適化することで基質の拡散効率を向上させることができる。更に、アノードとカソードを組み合わせて電池を作成し、それぞれの酸化還元電位を調製することで（最適なメディエーターの組み合わせを見出すことで）バイオマスから電気エネルギーを直接取り出すことができると期待される。

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1件）

①Matsumoto T, Takase R, Tanaka T, Fukuda H, Kondo A. Site-specific protein labeling with amine-containing molecules using *Lactobacillus plantarum* sortase. *Biotechnol J*. 2012. 642-648

〔学会発表〕（計1件）

①山本 一寛・松本 拓也・田中 勉・近藤 昭彦 「バイオマス同時糖化酸化型電極の開発」 化学工学会第43回秋季大会 2011.9.14-16 名古屋工業大学

〔図書〕（計0件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 秀樹 (HIDEKI FUKUDA)
神戸大学・学長
研究者番号：30263396

(2) 研究分担者

田中 勉 (TSUTOMU TANAKA)
神戸大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：90436551

(3) 連携研究者