

グルコースを用いた酵素型バイオ燃料電池

田巻孝敬・山口猛央

東京工業大学資源化学研究所

〒226-8503 神奈川県横浜市緑区長津田町4259

Enzymatic Biofuel Cells using Glucose as a Fuel

Takanori Tamaki, Takeo Yamaguchi

Chemical Resources Laboratory, Tokyo Institute of Technology

4259 Nagatsuta, Midori-ku, Yokohama, 226-8503

Abstract: Fuel cells using glucose as a fuel are promising for portable and implantable energy devices because glucose is used as an energy source in most organisms, and not hazardous to human health. Several catalysts have been used to oxidize glucose such as noble metals, metal ad-atoms, redox dyes, microorganisms and enzymes. In this article, we focus on enzymatic fuel cells. For effective electron transfer between an enzyme and an electrode, mediators are generally used. However, when mediators are attached to polymers to form redox polymers, electron conduction through the redox polymer becomes the rate-limiting step in the overall electrode reactions, and limits the current density. To obtain high current density, we have proposed a high-surface-area three-dimensional enzyme electrode made of redox-polymer-grafted carbon black. The effectiveness of the electrode was verified by experiments and a mathematical model. The model calculation suggests that an increase in the surface coverage of the enzyme allows an increase in the current density to the order of 10^2 mA/cm², which allows biofuel cells to be used in portable energy devices. In addition, the performance of a membrane-electrode assembly-style biofuel cell using the electrode was demonstrated.

Keywords: Glucose, Enzyme, Fuel cell, Redox polymer, Carbon black

1. はじめに

グルコースは、バイオマスを構成する成分の一種であり、また血液などの体液に存在し、動植物の活動のエネルギーとなる物質である。したがって、常温常圧に近い条件で作動するグルコースを用いた燃料電池が開発されれば、生体に安全・安心な電源として、人体の近くで使用可能なポータブル型機器や医療補助具、体内埋込型医療機器への応用が期待される。グルコースの燃料としてのエネルギー密度は、仮にグルコースを二酸化炭素まで完全酸化する場合には、変換効率が現実的な40%であっても1,100 Wh/kgであり、現状の2次電池であるリチウムイオンバッテリーの200 Wh/kgを大きくしのぐ。

グルコースを用いる燃料電池における重要な要素として、グルコースを酸化する触媒が挙げられる。これまでに、酵素や微生物などの生体触媒や、貴金属などの非生体触媒が検討されてきた。非生体触媒としては、白金や白金系の合金[1]、金属アド原子[2]などが検討されたが、電流密度が低いことが課題であった。近年、アルカリ雰囲気下で色素を触媒に用いた場合に高電流密度が得られたことが報告されており[3]、酸化機構の解明を含めた今後の展開が期待される。

一方、生体触媒を用いた燃料電池は“バイオ燃料電池”と呼ばれ、微生物および酵素が用いられる[4-6]。微生物を用いた燃料電池は、微生物の耐久性が酵素に比べて高く、条件によっては増殖させることができる点や、二酸

化炭素までの完全酸化が可能である点[7]が利点であり、廃水処理の分野などで開発が期待されている。しかし、微生物のサイズは酵素に比べて大きいために高密度化すなわち電流密度の増加が困難である。そこで、本稿では酵素を用いたバイオ燃料電池に着目する。

2. 酵素型バイオ燃料電池

グルコースを用いた酵素型バイオ燃料電池の電極反応の模式図を図1に示す。

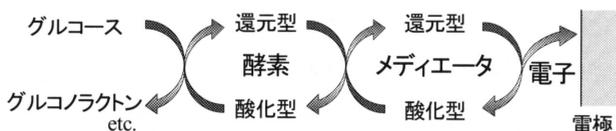


図1. グルコースを用いた酵素型バイオ燃料電池の電極反応の模式図

燃料は、酵素により酸化され、酵素は電子を電極へ伝達することで再生するが、この酵素から電極への電子伝達は一般にメディエータと呼ばれる酸化還元化合物により仲介される。近年、酵素と電極間でメディエータを介さずに、直接電極と電子移動する酵素についても研究が進められており[8]、アノードおよびカソードの両極で直接電子移動する酵素を用いた研究も報告されている[9]。しかし、直接電子移動する酵素の数は限られているため、直接電子移動する酵素の探索、開発と平行して、メディエータを用いた酵素電極の特性改善へ向けた開発が必要である。

バイオ燃料電池の特性を評価するうえで、重要なパラメータの一つは出力密度であり、出力密度は電圧と電流密度の積で表される。バイオ燃料電池の理論起電力は、他の燃料電池と同様に燃料と酸化剤の酸化還元電位の差である。しかし、バイオ燃料電池では電極と反応する物質が酵素やメディエータであるため、実際に得られる開回路電圧はアノードおよびカソードで用いられる酵素またはメディエータの酸化還元電位の差でおおよそ与えられる。両極にメディエータを用いた場合の酸化還元電位と開回路電圧の関係を図2に模式的に示す。ここで、図2の縦軸は電子の持つエネルギーであり、上に行くほど電位がnegativeであることを表す。図2から分かるようにメディエータと酵素の酸化還元電位の差が小さいほど、すなわちアノードではメディエータの酸化還元

電位がnegativeなほど、またカソードではメディエータの酸化還元電位がpositiveなほど、得られる開回路電圧は増加する。しかし、一般にメディエータとして類似の化合物を用いた場合には、酸化還元電位と酵素の酸化還元電位の差が小さいほど、酵素とメディエータの反応速度が減少することが知られている[10,11]。酵素とメディエータの反応速度は電流密度に関係するため、出力密度を増加させるためには適切なメディエータの選択または開発が必要である。ただし、電流密度は酵素とメディエータの反応速度だけではなく、メディエータ間の電子伝達速度や電気化学的に活性な酵素の単位面積あたりの密度、電極中およびアノードからカソードへのプロトン伝導速度、また電極中の燃料や酸化剤の拡散速度など複数の因子が関与する。ここで、電気化学的に活性な酵素とはメディエータを介して、または直接、電極と電子授受する酵素を表し、酵素やメディエータの固定化方法および電極材料の比表面積に大きく依存する。以上のことから、電流密度の増加へ向けては電極のシステム全体を考慮した設計が必要といえる。

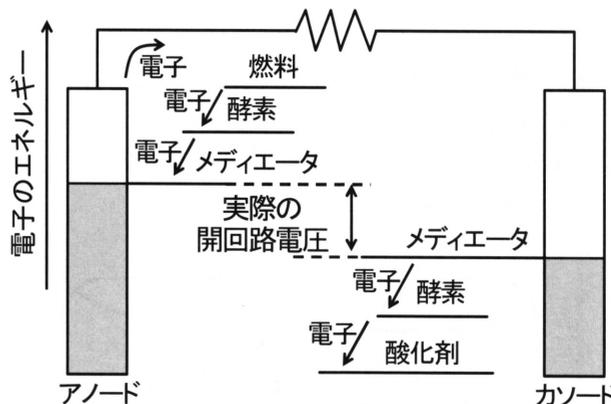


図2. メディエータの酸化還元電位と開回路電圧の関係

酵素型バイオ燃料電池の先行研究は、バイオセンサーを開発してきた生物電気化学の分野の研究者により展開されてきた。これまでに、メディエータと酵素の単分子膜を金基板上へ形成することで酵素の配向を制御する研究や[12]、メディエータを含むポリマー（レドックスポリマー）を架橋し、その中へ酵素を固定化することで三次元電極を構築する研究[13]が報告されている。また日本でも数グループで酵素型バイオ燃料電池に関する研究が展開されており [8, 9, 14-21]、世界の酵素型バイオ燃料電池の研究をリードする一角となっている。酵素型バイオ燃料電池の燃料としては、本稿で対象としてい

るグルコース以外にも、エタノールやフルクトース、またラクトースやセロビオースなどの二糖[22]も検討されている。

バイオ燃料電池の従来研究における大きな課題の一つとして、出力密度・特に電流密度が低いことが挙げられる。既存の水素を用いた固体高分子形燃料電池と比較して、電流密度は2-3桁程度低い値にとどまっている。レドックスポリマーを用いて電極を構築した酵素型バイオ燃料電池の場合、低電流密度の要因はレドックスポリマー中の電子の見かけ拡散係数が低いことに由来するレドックスポリマー中の電子伝導律速であった。

3. 高出力密度化へ向けた研究

本研究グループでは、バイオ燃料電池の電流密度を増加させるために、図3に示すレドックスポリマーをカーボン微粒子(カーボンブラック)へグラフト重合した酵素電極(以下、グラフト電極)を開発した[23-26]。グラフト電極は、粒径が約30 nmのカーボンブラックが積層したカーボン電極と、カーボンブラック表面にグラフト重合により化学的に固定化したレドックスポリマー、および酵素から構成される。高伝導率で実面積の大きいカーボン電極が電極中の電子伝導の主な役割を担うことで、レドックスポリマーが電子伝導すべき距離を短くして電子伝導律速を解消した。

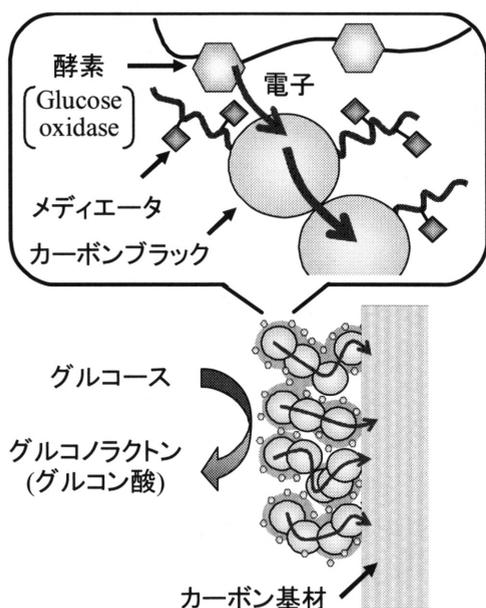


図3. レドックスポリマーのグラフト重合を利用した酵素電極(グラフト電極)の概念図

近年、実面積が大きいカーボン微粒子を電極の構成材料として用いた酵素型バイオ燃料電池の例は他にも数多く報告されており、上述のカーボンブラック以外にも、カーボンナノチューブや細孔径が20 nm程度のカーボンゲルなどが用いられており、10 mA/cm²を超える性能も報告されている[16, 27]。

グラフト電極の利点としては、レドックスポリマーを化学的に固定化しているため、電子伝導距離すなわち鎖長が短く物理的に漏出しやすいレドックスポリマーを用いた場合でも、ポリマーの漏出を防げる点が挙げられる。

カーボンブラック表面へのポリマーのグラフト重合に関しては、カーボンの機能化の観点から研究が行われているが[28]、レドックスポリマーのグラフト重合については報告例がなかった。本研究グループでは、これまでにカーボンブラック(ケッチェンブラック)表面に化学反応により重合開始基を導入し、モノマー存在下で重合を開始することで、レドックスポリマーをカーボンブラック表面へ固定化できること[23]や、ポリマーをカーボン表面へグラフト重合したうえで、ポリマー側鎖との化学反応によりメディエータを固定化できること[24]を示している。

ビニルフェロセン(VFc)をメディエータ部位にもつレドックスポリマーをカーボンブラックへグラフト重合し(図4(a))、作製した電極の評価を以下に示す。Cyclic voltammetry(CV)測定の結果、VFcの酸化還元由来するピークが得られ、グラフト重合したレドックスポリマーが電気化学的に活性であることが示された。そこで、電極へ酵素Glucose oxidaseを固定化し、CV測定を行った。得られたCV曲線を図4(b)に示す。グルコースを含まない溶液ではVFcの酸化還元ピークのみが得られたが、グルコースを含む溶液では酸化電流が大幅に増加し、還元ピークがほとんど見られないシグモイド型の応答が得られた。これは図1に示した酵素の触媒作用に由来し、電極中の酵素とレドックスポリマーが電子の授受を行っていることを示している[23]。従来のレドックスポリマーを用いた酵素型バイオ燃料電池では、レドックスポリマーの構造を制御し、長鎖のスペーサーを用いることで電子の見かけ拡散係数を増加させ、高電流密度化を実現した[29]。一方、本研究グループでは、電子の見かけ拡散係数が低いレドックスポリマーを用いたにもかかわらず、電極構造を制御することで電子伝導律速を解消し、高い電流密度が得られた。

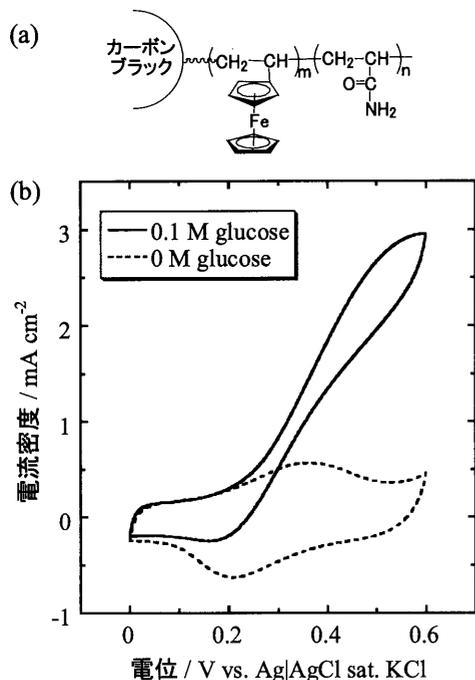


図4ビニルフェロセン(VFc)を用いたグラフト電極
(a) グラフトポリマーの化学構造式、(b) Glucose oxidase 固定電極のCV曲線[23]

グラフト電極による高い電流密度は、VFcに限らずヒドロキノンなどをメディエータとして用いた場合にも得られており[24]、本システムが選択するメディエータによらず電流密度の増加に有効であることが示されている。

さらに、グラフト電極ではレドックスポリマーの電子伝導が律速段階ではないことを検証するために、モデル計算を行った。モデルでは、電極中の反応拡散過程として、酵素反応、メディエータ間の電子伝達、基質の拡散を考慮した。グラフト電極を表現するパラメータを実験から抽出し、異なる電子の見かけ拡散係数について、レドックスポリマー層厚みが電流密度に与える影響を評価した結果、グラフト電極では電流密度が電子の見かけ拡散係数に依存しないこと、すなわち電子の見かけ拡散係数が低い場合でも、レドックスポリマー中の電子伝導が律速段階とはならないことが示された。また、酵素の固定化密度の増加が電流密度の更なる増加に有効であることが示唆され、直接メタノール型燃料電池と同程度の約 10^2 mA/cm^2 の電流密度が得られることが示された[25]。

以上のモデル計算の結果から、電流密度をさらに増加させるためには、現状のグラフト電極で、有効に働く酵素の固定化密度が低い理由の解明が必要であることが示された。そこで、理由として(1)酵素の固定化密度その

ものが低い、(2)酵素とメディエータの電気化学的接触が悪い、(3)酵素が固定化時に失活しているの3点を考慮し、検討を行った。透過型電子顕微鏡を用いた電極の直接観察と、酵素固定化前後の溶液中の酵素濃度の分析により、酵素の固定化密度は充分高いことが示された。続いて、(2)の可能性を検証するために、電気化学測定時に溶存メディエータを加えて、活性が残っている全ての酵素に電気化学的活性を持たせた測定を行ったところ、電流密度に大きな変化はなかった。すなわち、(1)、(2)は問題ではないことが示された。そこで、カーボンブラックへ酵素を吸着させて活性を評価したところ、疎水性のカーボン表面への吸着時に、酵素が失活していることが示され、酵素の有効固定化密度を制限している理由が(3)であることが示された[26]。これらの検証を踏まえると、カーボン表面の処理による親水化や酵素の保護、また吸着時の失活が少ない酵素の利用により、高電流密度化が期待される。

最後に、アノード(酸化極)の酵素にGlucose oxidase、メディエータにVFcを用いたグラフト電極、カソード(還元極)に白金担持カーボン、固体電解質にNafion®112を用いて作製した膜-電極接合体型(MEA型)バイオ燃料電池の評価結果を図5に示す。アノードへグルコース水溶液、カソードへ酸素ガスを供給した。全固体のMEA型にすることで安定化や小型化へ向けた成型加工性の向上が可能となる。グルコースを燃料に用いたMEA型バイオ燃料電池としては、電流を取り出すことに初めて成功した[23]。また、グラフト電極がバイオ燃料電池のアノードとして機能することが示された。

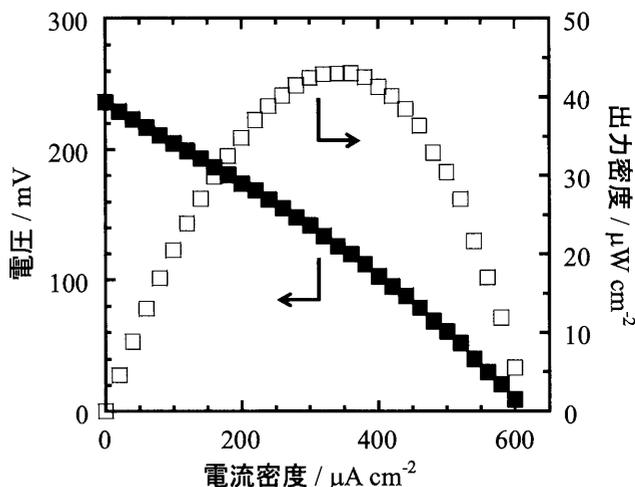


図5. グラフト電極をアノードに用いた膜-電極接合体型バイオ燃料電池の電池試験結果[23]

4. まとめと今後の展望

本稿は、グルコースを用いた酵素型バイオ燃料電池の概論、および出力密度の増加へ向けた最近の開発状況を示した。実面積の大きいカーボン材料の利用によって、従来に比べて電流密度は増加しているが、依然低い値にとどまっている。今後は、カーボン材料への吸着時の酵素の失活の抑制により、さらなる高電流密度化が期待される。

また、現状の酵素型バイオ燃料電池では、グルコースを酸化する酵素として、単独の酵素しか用いられておらず、グルコースから2電子、すなわち、二酸化炭素までの完全酸化(24電子反応)の10%未満しか取り出せていない。最近、生体の代謝システムを模倣して、複数の酵素を利用した多段階酸化反応が検討され始めている[30]が、複数の酵素を適切に組み合わせるためには多くの課題が残っている。

出力密度以外にバイオ燃料電池が抱える大きな課題として安定性、特に酵素の耐久性が挙げられる。安定性の向上へ向けては酵素の遺伝子改質により酵素自体の耐久性を上げる研究[20]や、電極中の酵素周辺のpH環境を酵素に適した構造にする研究[31]などが行われている。バイオ燃料電池を実用化するためには、電池の作動条件下において酵素の耐久性が求められ、今後はさらなる安定性向上へ向けた検討が望まれる。

参考文献

1. S. Kerzenmacher, J. Ducree, R. Zengerle and F. von Stetten: *J. Power Sources* **182**, 1-17(2008).
2. S. B. Aoun, G. S. Bang, T. Koga, Y. Nonaka, T. Sotomura and I. Taniguchi: *Electrochem. Commun.* **5**, 317-320(2003).
3. D. Scott and B. Y. Liaw: *Energy Environ. Sci.* **2**, 965-969(2009).
4. S. C. Barton, J. Gallaway and P. Atanassov: *Chem. Rev.* **104**, 4867-4886(2004).
5. R. A. Bullen, T. C. Arnot, J. B. Lakeman and F. C. Walsh: *Biosens. Bioelectron.* **21**, 2015-2045(2006).
6. I. Ivanov, T. Vidakovic-Koch and K. Sundmacher: *Energies* **3**, 803-846(2010).
7. S. K. Chaudhuri and D. R. Lovley: *Nat. Biotechnol.* **21**, 1229-1232(2003).
8. T. Ikeda and K. Kano: *Biochim. Biophys. Acta-Protein Proteomics* **1647**, 121-126(2003).
9. Y. Kamitaka, S. Tsujimura, N. Setoyama, T. Kajino and K. Kano: *Phys. Chem. Chem. Phys.* **9**, 1793-1801(2007).
10. J. Kulys, T. Buchrasmussen, K. Bechgaard, V. Razumas, J. Kazlauskaitė, J. Marcinkeviciene, J. B. Christensen and H. E. Hansen: *J. Molec. Catal.* **91**, 407-420(1994).
11. S. M. Zakeeruddin, D. M. Fraser, M. K. Nazeeruddin and M. Gratzel: *J. Electroanal. Chem.* **337**, 253-283(1992).
12. I. Willner, Y. M. Yan, B. Willner and R. Tel-Vered: *Fuel Cells* **9**, 7-24(2009).
13. A. Heller: *Phys. Chem. Chem. Phys.* **6**, 209-216(2004).
14. S. Tsujimura, B. Tatsumi, J. Ogawa, S. Shimizu, K. Kano and T. Ikeda: *J. Electroanal. Chem.* **496**, 69-75(2001).
15. S. Tsujimura, K. Kano and T. Ikeda: *J. Electroanal. Chem.* **576**, 113-120(2005).
16. S. Tsujimura, Y. Kamitaka and K. Kano: *Fuel Cells* **7**, 463-469(2007).
17. H. Sakai, T. Nakagawa, Y. Tokita, T. Hatazawa, T. Ikeda, S. Tsujimura and K. Kano: *Energy Environ. Sci.* **2**, 133-138(2009).
18. F. Sato, M. Togo, M. K. Islam, T. Matsue, J. Kosuge, N. Fukasaku, S. Kurosawa and M. Nishizawa: *Electrochem. Commun.* **7**, 643-647(2005).
19. M. Tominaga, C. Shirakihara and I. Taniguchi: *J. Electroanal. Chem.* **610**, 1-8(2007).
20. N. Yuhashi, M. Tomiyama, J. Okuda, S. Igarashi, K. Ikebukuro and K. Sode: *Biosens. Bioelectron.* **20**, 2145-2150(2005).
21. S. Komaba, T. Mitsuhashi and S. Shiraiishi: *Electrochemistry* **76**, 55-58(2008).
22. F. Tasca, L. Gorton, W. Harreither, D. Haltrich, R. Ludwig and G. Noll: *J. Phys. Chem. C* **112**, 13668-13673(2008).
23. T. Tamaki and T. Yamaguchi: *Ind. Eng. Chem. Res.* **45**, 3050-3058(2006).
24. T. Tamaki, T. Ito and T. Yamaguchi: *J. Phys. Chem. B* **111**, 10312-10319(2007).
25. T. Tamaki, T. Ito and T. Yamaguchi: *Fuel Cells* **9**, 37-43(2009).
26. T. Tamaki, A. Hiraide, F. B. Asmat, H. Ohashi, T. Ito and T. Yamaguchi: *Ind. Eng. Chem. Res.* **49**, 6394-6398(2010).
27. S. C. Barton, Y. H. Sun, B. Chandra, S. White and J. Hone: *Electrochem. Solid State Lett.* **10**, B96-B100(2007).
28. N. Tsubokawa: *Prog. Polym. Sci.* **17**, 417-470(1992).
29. N. Mano, F. Mao and A. Heller: *Chem. Commun.*, 2116-2117(2004).
30. D. Sokic-Lazic, R. L. Arechederra, B. L. Treu and S. D. Minteer: *Electroanalysis* **22**, 757-764(2010).
31. N. L. Akers, C. M. Moore and S. D. Minteer: *Electrochim. Acta* **50**, 2521-2525(2005).