

酵素バイオ電池の最近の展開

Recent Development of Enzyme-based Biofuel Cells

辻村 清也* 加納 健司*

Seiya Tsujimura Kenji Kano

Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University,
Oiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto, 606-8502, Japan

Abstract

Biofuel cells are energy conversion systems in which the catalysts are isolated enzymes. The key concept of biofuel cells is bioelectrocatalysis, and the reaction is classified into two types of mechanisms; namely, the electron is transferred directly between the enzyme and the electrode (called direct electron transfer (DET)-type bioelectrocatalysis) and mediators are used to shuttle electrons between the two (called mediated electron transfer (MET)-type bioelectrocatalysis). In this review, the authors will focus on recent development concerning (1) selection and performance of enzymes as cathode and anode catalysts, (2) selection of mediators and construction of MET-type bioelectrocatalytic systems, and (3) utilization of mesoporous carbon material to immobilize and stabilize enzymes especially in DET-type bioelectrocatalytic systems.

Key words: Biofuel cells; Redox enzyme; Mediator; Mesoporous carbon

1 はじめに

生物はエネルギー源として多種多様な有機物や無機物の酸化反応の触媒としての酵素と、酸素などの還元反応の触媒としての酵素を有しており、これらの触媒機能によって酸化還元反応のエネルギーを巧みに生物エネルギーに変換している。したがって、生物が利用する電子供与体を燃料として、それらを酸化する酵素と、酸素を還元する酵素を電極触媒として電極上に修飾し電池を組めば、燃料の化学エネルギーを電気エネルギーに変換できるはずである (Fig. 1)。これがバイ

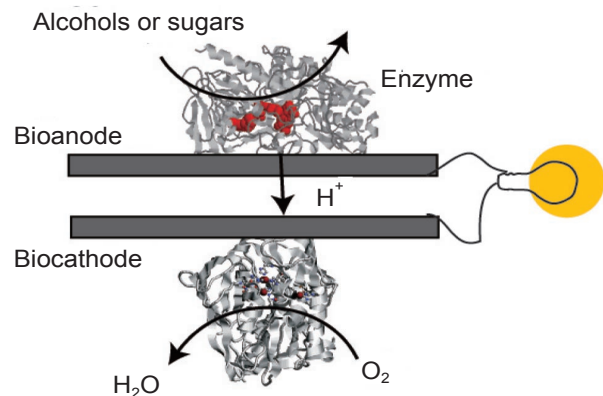


Fig. 1 Schematic diagram showing the concept of biofuel cells.

* 京都大学農学研究科応用生命科学専攻
〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

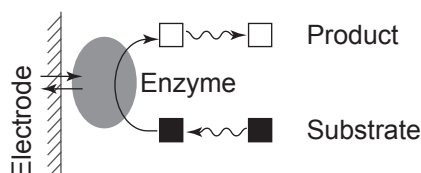
オ（燃料）電池の概念である¹⁻³⁾。燃料電池の無機触媒を生体触媒に置き換えたものとも考えられる。バイオ電池は、酵素というソフトな触媒を利用するため、常温で作動可能、種々のエネルギー源が利用可能、セル形状が単純、小形化が容易、取り扱いが安全、高価な無機触媒が不要、環境負荷がきわめて小さい、といった利点がある。逆に、安定性や電流密度に関する弱点もある。

酸化還元酵素は電子授受に関与する2つ（以上）の物質を基質とし、本来、基質特異性が高いものである。酵素を電極触媒とすることは、基質の一方を電極に置き換えることであり、これを直接電子移動(DET)型酵素機能電極反応という(Fig. 2)。酵素の基質特異性を考えると実現は容易ではないが、いくつかの報告例がある。DET型酵素触媒反応の一つの要件として、Fig. 3のように（溶液中の）基質との触媒反応部位と、

電極と電子授受できる別の酸化還元部位があることが指摘されている⁴⁾。当然、このような反応モデルでは酵素の吸着配向が重要になるが、その制御については未だ明確な成功例は報告されておらず、今後の重要な課題のひとつである。DET型触媒反応の場合、酵素-電極間の界面電子移動速度が非常に重要な鍵となる。遠距離電子移動のモデルで考えるならば、酵素内の酸化還元中心と電極間の距離が短いこと、電子を通しやすいこと、酸化還元に関する再配向エネルギーが小さいことが要求される。しかし、天然の酵素でこれらの因子を制御することは非常に困難であり、酵素の探索がブレイクスルーとなる。一方で、金微粒子やカーボンナノチューブさらにはアントラセンを伝導性のナノワイヤーとして電極と酵素の間に紹介させて、酵素-電極間電子移動速度を向上させる方法も提案されており²⁾、今後の電極表面の（サブ）ナノオーダーでの構造制御に関する研究が期待される。

これに対して低分子酸化還元物質（これを電子伝達メディエータという）を一方の基質の代わりとなるように反応系を組み立てることもできる(Fig. 2)。これをメディエータ(MET)型酵素機能電極反応といい、ほとんどの酸化還元酵素系に適応できるが、メディエータの選択、修飾方法が重要なポイントとなる。現実には、酵素・メディエータ固定膜を考えた場合、電極表面が完全な平面として1~10 mA cm⁻²程度の最大電流密度が期待でき、DET型触媒反応の場合の数倍から数十倍となる⁵⁾。どちらの反応系を利用するにせよ、バイオ電池のキーテクノロジーはこのような酵素-電極間の接合系の構築にある。

Direct electron transfer-type bioelectrocatalytic reactions



Mediated electron transfer-type bioelectrocatalytic reactions

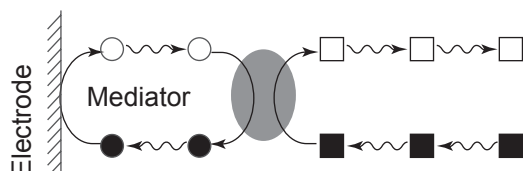


Fig. 2 Mechanistic representation of DET-type and MET-type bioelectrocatalysis.

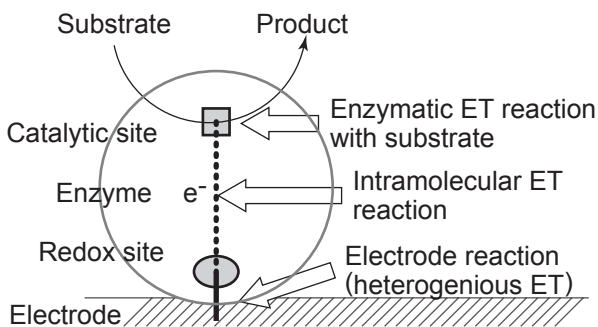


Fig. 3 Schematic diagram showing DET-type bioelectrocatalysis of multi-redox site enzyme.

2 カソード

酸素還元カソード酵素としては、 $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 、 OH^{\cdot} といった酸素還元反応中間体（活性酸素種）を生成しないものを選ぶ必要がある。その有力な候補として、マルチ銅オキシダーゼ(MCO)が挙げられる。MCOは、ラッカーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ、ビリルビンオキシダーゼ(BOD)等、自然界に広く多様に存在し、ブルー銅と呼ばれるタイプ1(T1)銅サイトで電子を受け取り、タイプ2-3銅クラスターで酸素を4電子還元する。

多種多様なMCOから適切な酵素を選ぶ上での第1の着眼点は、電極や電子受容体と電子授受できる酸化還元部位の式量電位(E_E°)である。すなわち、 E_E° が酸素/水の酸化還元電位により近ければ、電池は高い

電圧で作動する。実際、こうした考え方で担子菌である *Trametes* 属のラッカーゼをカソード触媒として選択し、非常に高い電圧で作動する DET 型バイオ電池を構築することに成功している^{6,7)}。

第2の着眼点は酵素反応速度である。MCO の中でも CueO (copper efflux oxidase) の電極触媒活性が非常に高い⁸⁾。さらに、後で述べる多孔性炭素電極を用いることにより、溶液中での酸素供給律速で十数 mA cm^{-2} の電流密度を実現できる^{9,10)}。ごく最近では気相中の酸素を供給するカソードを作成し、数十 mA cm^{-2} にも至る電流密度を実現しており¹¹⁾、MCO は常温、常圧、中性付近での酸素還元触媒として、過電圧や電流密度という観点から白金等の無機触媒をしのぐ性能があることが明らかにされつつある。

電子伝達をスムーズにするひとつの方法として、メディエータを利用することが挙げられる。オスミウム錯体が結合したポリマーと MCO を電極上に固定し、数 mA cm^{-2} の電流密度が得られると報告されている¹²⁻¹⁵⁾。これからは溶存酸素の利用だけではなく、気相中の酸素を効率よく取り込むことに焦点が移っていくと考えられる。気相からの酸素供給を考慮した空気極も提案され、それを利用したバイオ電池も有効に機能することが示された¹⁶⁾。また、カソードにラッカーゼとオスミウム修飾ポリマーを用いた MEA (アノード触媒には白金もしくは白金・ルテニウム) が、PEMFC および DMFC として作動することを報告されている¹⁷⁾。

第3の着眼点は、作動 pH である。多くの MCO は弱酸性中で機能することが知られている。しかし多くのアノード酵素の至適 pH は中性付近にあるうえに、体内埋め込み型バイオ電池を目標とするならば、中性付近でも機能する MCO が必須となる。筆者らは BOD がこの目的にかなうことを示し¹⁸⁾、現在では世界的に利用されるに至っている。逆にアノードに無機触媒を用いた電池を構想するのであれば、酸性中で機能する MCO も魅力的である。CueO を炭素微粒子修飾電極に吸着固定させることにより、pH 2 くらい低い pH でも機能することがわかっている¹⁰⁾。

3 アノード

バイオ電池では、糖、アルコール、有機酸、アミン、水素、あるいは無機化合物等といった、生物がエネルギー源として利用できるすべての還元物質が燃料の対象となる。したがって、それらの酸化反応を触媒する

酵素がアノード触媒となる。このカテゴリーに分類される酵素は、生命維持の根幹に関わるため、膨大な種類がある。

ニコチンアミドジヌクレオチド (リン酸) (NAD(P)) 非依存性の酸化還元酵素は、フラビンやキノン、あるいはヘムや鉄硫黄クラスターといった酸化還元部位を分子内に有する。そして、糖やアルコールといった基質の酸化反応の場合、酵素の電子受容体に対する特異性はさほど高くなく、多くの低分子酸化還元物質に置き換えることができ、MET 形触媒反応系を構築できる。最も多く研究されてきたのは、グルコース 2 電子酸化系である。グルコース酸化酵素 (GOD) とオスミウム錯体が結合したポリマーを利用した系は得られる電流値も高いことからよく研究されている。ただし GOD は本来酸素を電子受容体とするので、酸素の混入による出力低下を引き起こしやすい。むしろ脱水素酵素を利用の方が理にかなっている。ピロロキノリンキノン (PQQ) 依存性のグルコース脱水素酵素 (PQQ-GDH) は、触媒活性が非常に高いのでバイオ電池の触媒としては非常に有望である^{19,20)}。

一方、NAD(P) 依存性酵素は、遊離の NAD(P) を補酵素として機能する。NAD(P)H の直接電解の過電圧は非常に大きいので、酸化還元色素や *o*-キノン類といった触媒を利用する必要がある。NADH 電解の過電圧を最も効果的に下げる方法として、NADH-キノン酸化還元酵素の一種であるジアフォラーゼ (DI) を触媒とし、適当なメディエータとして用いる反応系がある^{21,22)}。

また NAD 依存性のグルコース脱水素酵素 (NAD-GDH) と DI を利用したバイオアノードも提案され^{16,23)}、パッシブ型で数 mW cm^{-2} 程度の出力のバイオ電池が試作されている²⁴⁾。有機化合物の二酸化炭素への完全酸化については、生体内代謝反応を模倣し、NADH(FADH₂) に変換する方法が考えられる。メタノールから二酸化炭素への生物電気化学的 6 電子酸化系を、3 つの NAD 依存性脱水素酵素と NADH 脱水素酵素を利用して実現する報告もされている²⁵⁾。グルコースの場合、二酸化炭素まで 24 電子を酸化できるが、これを生物的に実現しようとする、解糖系と TCA (トリカルボン酸もしくはクエン酸) サイクルに参与するすべての酵素が必要となる。関係する酸化還元酵素は、ほとんど NAD 依存性である。TCA サイクルの再構築と電極反応との共役系についても最近報告されている^{26,27)}。TCA サイクルを利用すると乳酸の 12 電子酸化系が容易に実現できる。また、少し改良すれば、酵

酸の8電子酸化も可能になり、夢が膨らむ課題である。

燃料を完全酸化するという観点では水素の酸化系が最も単純である。触媒としてはヒドロゲナーゼが適するが、酸素耐性に劣り単離および取り扱いが容易ではない。筆者らはヒドロゲナーゼを多く含む菌体（硫酸還元菌）を「酵素の袋」としてそのまま用いる方法を提案し、適切なメディエータを選択することにより、ほぼ過電圧のない水素酸化系を構築し、水素-酸素燃料電池の理論起電力にほぼ等しい開回路電圧が得られている²⁸⁾。

また、DET型酵素電極に関しては、以前まではDET型触媒電流が観測されたとしても、数 $\mu\text{A cm}^{-2}$ あるいはそれ以下の電流密度であり、電池への応用は困難であった。しかし、多孔性炭素電極などを利用することにより、大きな電流密度での酵素触媒電解ができることがわかってきた。例えば、フラクトース脱水素酵素(FDH)では、数 mA cm^{-2} もの大きな電流密度を実現し、DET型バイオ電池の性能を 1 mW cm^{-2} 程度まで飛躍的に向上させた⁶⁾。

4 メディエータの選択

バイオ電池におけるメディエータの選択と固定化に関する課題は、大きな電流密度、小さい過電圧、高い安定性、クロスオーバーの回避など、センサの場合と比べて、より難度の高い条件が要求される。キノン類は安価である上、その酸化還元電位は非常に幅広く、メディエータとして好都合な化合物である。オスミウム錯体もその電位はMET型触媒反応に好都合な領域にあり、配位子による電位チューニングが容易で電位スペクトルも広いという利点を有する。しかし、白金族元素であるためコスト面での問題や毒性の懸念もある。また、シアノ金属錯体もカソード用のメディエータとして有用である。

出力を大きくするためには、小さな過電圧で電子移動速度が速い酵素-メディエータ反応系の探索が必要となる。Fig. 4に典型的な酵素とメディエータの式量電位差と酵素-メディエータ間の二分子反応速度定数の対数の関係を示す。このときメディエータの酸化還元電位が酵素（あるいは基質）の酸化還元電位に近いほど、電池としてはより大きな電圧を得ることができる。しかし、両者の酸化還元電位の差（反応の駆動力）が小さくなればなるほど、直線自由エネルギー関係に従い、酵素-メディエータ間の二分子反応速度定数は指数関数的に小さくなり、電流値もそれにと

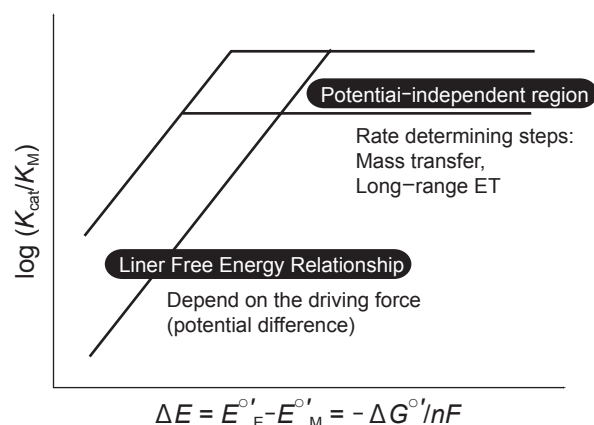


Fig. 4 Typical pattern of bimolecular rate constant ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$) between enzyme and mediator as a function of the formal potential difference ($\Delta E^{\circ'}$) between the two.

ない減少する。逆に先の電位差（反応の駆動力）をある程度以上大きくすると、反応物質の拡散や酵素-メディエータ間の長距離電子移動など別の反応過程が律速段階となり、二分子反応速度定数は電位差に関係せずほぼ一定となる。むやみに電位差を増大することは過電圧の増大、結果として出力の低下を招くだけである。電池という観点からは二分子反応速度定数のみならず、最大電流密度に深くかかわる触媒定数にも注目する必要がある。また、メディエータ自身の電極反応速度も重要となってくる。さらにアノード側のメディエータの式量電位があまりに負であるとメディエータの還元体は酸素により自動酸化され易くなり、酸素のクロスオーバーによって、出力低下を招く。バックボーンポリマーにペンダント状にぶら下がったオスミウム錯体をメディエータとし、酵素も架橋剤を用いてそのポリマーに共有結合させて、電極に固定化する方法が報告されている。多くの場合で、固定化することで拡散係数は低下するが、メディエータとポリマーとの間のリンカーの長さを制御し、錯体自身の動きをよくすることで電流値の向上を達成している¹⁹⁾。

5 多孔性炭素電極

電池の実用化という観点からは、あと一桁の電流密度の向上、つまり数十 mA cm^{-2} 程度の電流密度の実現が望まれる。したがって電極比表面積を増加することは現実的なきわめて重要な課題になる。酵素のサイズ等を考慮に入れたナノオーダーで制御された多孔性炭素材料を開発し、その三次元マトリックスを積極的

に有効活用できる電極を利用することを考えなければならぬ。多孔性炭素電極を利用することにより、電極比表面積の向上による電流密度の上昇、電極と酵素の接触面積を増加させることによる効率的な電子移動パスの形成、さらには酵素の高次構造を保つことによる安定性の向上等が期待され、実際そのような効果が観測されている^{6,9,29,30}。多孔性担体上での酵素の安定化の向上を科学することは、酵素機能を利用するすべての研究領域に対しても、大きな意義を持つであろう。ただし、多孔性電極を用いる場合には、燃料の供給システム、物質輸送速度、局所的 pH 変動、作動温度等の問題も総合的に考慮する必要がある。

多孔性炭素材料技術のベースは、電気化学キャパシタ、固体高分子形燃料電池、リチウムイオン電池などで盛んに研究されている。これら先行技術はバイオ電池用電極の設計に大いに参考になる。現に、現在のプロトタイプバイオ電池は、リチウムイオン電池の負極や燃料電池を参考に作られている。ただし、バイオ電池の反応液は水系であり、主な反応物が分子量 100 から 200 程度の有機物であり、高濃度では粘度も高くなるといった点で従来の電気化学デバイスと異なるので、それらの事項も考慮に入れて設計、作成、評価する必要がある。多孔性炭素材料の細孔径 (nm ~ μm)、炭素微粒子の粒子径、炭素微粒子を結びつける結着剤の特性 (電荷やサイズ)、およびその量 (炭素材との割合)、それらを混合させる溶剤の調整、といった複数の因子の関連を明らかにし、酵素を高密度に安定に担持し、かつイオンおよび物質輸送がスムーズに進行できるような最適な条件を見いだす必要がある。また、酵素吸着および物質輸送を効率的におこなうためには、炭素電極の物理的構造のみならず、表面官能基などの表面特性を制御する必要とされるであろう。

6 おわりに

バイオ電池は、バイオマス燃料の使用、家庭用電源、モバイル機器電源、使い捨て電源、体内埋め込み電源など多方面への応用が考えられる。もちろん、要求される性能は当然その用途によって異なってくる。電池として作動するためには、スタッキングや燃料供給などのシステムなどまだまだ検討すべき内容は多い。このようなバイオ電池の開発研究は、電気化学、酵素科学、材料科学の3つの視点から学際的なアプローチが必要であり、異分野の研究者が共同参画する必要がある。

文 献

- 1) S. C. Barton, J. Gallaway, and P. Atanasov, *Chem. Rev.*, **104**, 4867 (2005).
- 2) J. A. Cracknell, K. A. Vincent, and F. A. Armstrong, *Chem. Rev.*, **108**, 2439 (2008).
- 3) 池田篤治監修, バイオ電気化学の実際, シーエムシー出版 (2007).
- 4) T. Ikeda, in "Frontiers in Biosensorics I", (W. Scheller, F. Schubert, and J. Fedrowitz, eds.), pp. 243-266, Birkhäuser, Verlag, Berlin (1997).
- 5) S. Tsujimura, *Rev. Polarogr.*, **52**, 81 (2006).
- 6) Y. Kamitaka, S. Tsujimura, N. Setoyama, T. Kajino, and K. Kano, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **9**, 1793 (2007).
- 7) K. A. Vincent, J. A. Cracknell, O. Lenz, I. Zebger, B. Friedrich, and F. A. Armstrong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 16951 (2005).
- 8) Y. Miura, S. Tsujimura, Y. Kamitaka, S. Kurose, K. Kataoka, T. Sakurai, and K. Kano, *Chem. Lett.*, **36**, 132 (2007).
- 9) Y. Miura, S. Tsujimura, S. Kurose, Y. Kamitaka, K. Kataoka, T. Sakurai, and K. Kano, *Fuel Cells*, in press. DOI: 10.1002/fuce.200800027.
- 10) S. Tsujimura, Y. Miura, and K. Kano, *Electrochim. Acta*, **53**, 5716 (2008).
- 11) R. Kontani, S. Tsujimura, K. Hamamoto, and K. Kano, *The 214th ECS Meeting (PRiME 2008)*, Abs. #1431 (2008).
- 12) A. Heller, *Curr. Op. Chem. Biol.*, **10**, 664 (2006).
- 13) N. Mano, J. L. Fernandez, Y. Kim, W. Shin, A. J. Bard, and A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 15290 (2003).
- 14) N. Mano, V. Soukharev, and A. Heller, *J. Phys. Chem. B*, **110**, 11180 (2006).
- 15) V. Soukharev, N. Mano, and A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 8368 (2004).
- 16) H. Sakai, T. Nakagawa, A. Sato, T. Tomita, Y. Tokita, T. Hatazawa, T. Ikeda, S. Tsujimura, and K. Kano, *Energy Environ. Sci.*, DOI: 10.1039/b809841g.
- 17) N. S. Hudak and S. C. Barton, *J. Electrochem. Soc.*, **152**, A876 (2005).
- 18) S. Tsujimura, H. Tatsumi, J. Ogawa, S. Shimizu, K. Kano, and T. Ikeda, *J. Electroanal. Chem.*, **496**, 69 (2001).

- 19) S. Tsujimura, K. Kano, and T. Ikeda, *Electrochemistry*, **70**, 940 (2002).
- 20) N. Okumura, T. Abo, S. Tsujimura, and K. Kano, *Electrochemistry*, **74**, 639 (2006).
- 21) K. Miki, T. Ikeda, S. Todoriki, and M. Senda, *Anal. Sci.*, **5**, 269 (1989).
- 22) T. Matsue, H. Yamada, H.C. Chang, I. Uchida, K. Nagata, and K. Tomita, *Biochim. Biophys. Acta*, **1038**, 29 (1990).
- 23) M. Togo, A. Takamura, T. Asai, H. Kaji, and M. Nishizawa, *Electrochim. Acta*, **52**, 4669 (2007).
- 24) H. Sakai, T. Nakagawa, H. Mita, R. Matsumoto, T. Sugiyama, H. Kumita, Y. Tokita, and T. Hatazawa, *The 214th ECS Meeting (PRiME 2008)*, Abs. #1432 (2008).
- 25) G. T. R. Palmore, H. Bertschy, S. H. Bergens, and G. M. Whiteside, *J. Electroanal. Chem.*, **443**, 155 (1998).
- 26) 福田 潤, 辻村清也, 加納健司, 第22回生体機能関連化学シンポジウム講演要旨集, p.288 (2007).
- 27) D. S.-Lazic and S. D. Minteer, *The 214th ECS meeting (PRiME 2008)*, Abs. #2811 (2008).
- 28) S. Tsujimura, M. Fujita, H. Tatsumi, K. Kano, and T. Ikeda, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **3**, 1331 (2001).
- 29) Y. Kamitaka, S. Tsujimura, and K. Kano, *Chem. Lett.*, **37**, 218 (2007).
- 30) S. Tsujimura, Y. Kamitaka, and K. Kano, *Fuell Cells*, **7**, 463 (2007).