

# マイクロ流路型バイオ燃料電池の開発

都甲 真, 梶 弘和, 安部 隆, 西澤 松彦\*

工学研究科 バイオロボティクス専攻  
バイオマイクロマシン工学講座 教授  
E-mail: nishizawa@biomems.mech.tohoku.ac.jp



## 1. はじめに

バイオ燃料電池は高い反応選択性を有す酵素触媒を用いることで、グルコース[1-10]やアルコール[11-13]などを燃料とし発電を行う。そのため、温和な環境で発電が行える、実質アノードとカソードの二本の電極だけで構成できるため簡単な構造にできる、といった利点を有しており、体内発電を含め多様な応用が検討され始めている。電極と直接反応する酵素電極の検討も進められているが[17,18]、一般にバイオ燃料電池では酵素触媒と電極とのスムーズな電子伝達のため、有機小分子や金属錯体などを電子メディエータとして利用する[14-16]。この電子メディエータは反応電位に加え、体内埋め込みを考えた際の安全性や環境適合性なども重要となる。よってそれらを兼ね備えた有機分子である 2-methyl-1,4-naphthoquinone (vitamin K<sub>3</sub>, VK<sub>3</sub>)がメディエータとして有望視されている[19,20]。これは nicotinamide-adenine dinucleotide (NADH)を酸化する酵素である diaphorase (Dp)のメディエータとして高い反応性を有している。NADを補酵素とする酸化還元酵素は非常に多量存在しており、様々な電極系の構築が可能である。

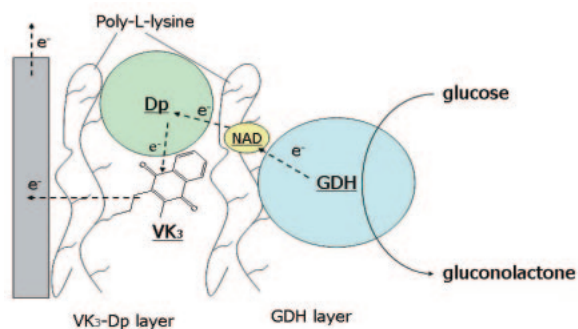


図1. The presumptive electron-relay/glucose oxidation system catalyzed by PLL-VK<sub>3</sub>/Dp/GDH.

ここで例えば NAD 依存性の glucose dehydrogenase (GDH)を組み合わせるによりグルコースの酸化が可能となる。ここで、隔膜を必要としない簡素な構造のバイオ燃料電池を作製するためには、酵素に加えメディエータを電極へ固定化する必要がある。Satoらは vitamin K<sub>3</sub>の誘導体と Dp を poly-L-lysine(PLL)に固定化することで、NADH の拡散律速となる酸化電流を得ている[19]。我々は VK<sub>3</sub>誘導体を polyallylamine(PAA)に修飾したポリマーに Dp/GDH を二層構造で固定化することで、グルコース酸化電極を作製してきた[10]。

酵素やメディエータなどの電極材料に加え、小型バイオ燃料電池の構造といったものも重要な研究である。そのような小型電源は自立型の小型分析チップや微小機械の電源として[14]、また生体埋め込みの電源として[2-5,7,14]期待されている。そのような目的としてはマイクロ流路型のバイオ燃料電池が適していると考えられる。また微細加工による小型電源の作製は、一時電池[21,22]や燃料電池[23-25]の分野でも盛んに検討されている。

今回、VK<sub>3</sub>を修飾するポリマーを PAA から PLL に変更することで、メディエータ固定化ポリマーの電極性能への影響を観測し、より高い反応性を有すグルコース酸化電極の作製を行った。また、そのグルコース酸化電極をアノードとしたグルコース燃料電池の定量評価系として、マイクロ流路型バイオ燃料電池を作製し、出力や耐久性など電池性能の評価を行った。

## 2. 実験

### 2.1 試薬

PLL-VK<sub>3</sub> の合成は以前報告したのと同じような方法で行った[10]。以下その合成法を簡単に示す。2-(3-Carboxypropyl)-3-methyl-1,4-naphthoquinone を N-hydroxy-succinimide により活性化させ poly-L-lysine hydrochloride (PLL, MW ca. 80,000, SIGMA)が

有するアミノ基の約 40 %に導入した. Diaphorase (Dp; EC 1.6.99; 1090 U/mg)はユニチカ (株) より購入した.  $\text{NAD}^+$  依存性の glucose dehydrogenase (GDH; EC 1.1.1.47; 250 U/mg)は東洋紡績 (株) より提供していただいた. Ketjenblack (KB; EC-600JD)はケッチェン・ブラック・インターナショナル (株) より提供していただいた. PDMS (SYLPOT 184 W/C)は東レ・ダウコーニング (株) より購入した. また  $\text{NADH}$  および  $\text{NAD}^+$ はオリエンタル酵母工業 (株) から購入した.

## 2.2 電極作製法と電気化学測定系

PLL-VK<sub>3</sub>/Dp/GDH 修飾電極の作製法を以下に示す. 8  $\mu\text{L}$  の PLL-VK<sub>3</sub> 水溶液(4.83 mM VK<sub>3</sub>)を 2  $\mu\text{L}$  の Dp 水溶液(14  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  in 50 mM phosphate, pH 7.0)と混合し, 混合液の 4  $\mu\text{L}$  を直径 3mm のグラッシーカーボン(GC)電極上に塗布し 2 h 乾燥させる. KB を利用する場合には 10  $\mu\text{L}$  の PLL-VK<sub>3</sub>/Dp 混合溶液と 1  $\mu\text{L}$  の KB 分散水溶液(ca. 13 mg mL<sup>-1</sup>)を混合し, GC 電極に 4.4  $\mu\text{L}$  塗布する. さらに酵素二層膜の作製のため, PLL-VK<sub>3</sub>/Dp(KB)修飾 GC 電極上に, GDH(16  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ )溶液と PLL(16 mg mL<sup>-1</sup>)溶液の混合液(1:1)を 4  $\mu\text{L}$  塗布した. Dp, GDH 及び lysine の等電点がそれぞれ 4.7, 4.5, 9.74 であることから, 酵素-ポリマー間の静電相互作用により中性の水溶液に不溶な酵素電極を作製した.

PDMS 被覆した白金カソードはの PDMS 分散液 (2 mg mL<sup>-1</sup>) (Toray Dow Corning Silicone, DC 85 ADDITIVE)を白金平板電極に塗布(66.7  $\mu\text{L cm}^2$ )し 3 h 空气中で乾燥させることで作製した[8].

すべての電気化学測定は 0.1 M の NaCl を含む 50 mM のリン酸緩衝液(pH 7.0)中にて行った. 溶液の温度は 37 °C で一定とした. 酵素修飾電極の電気学

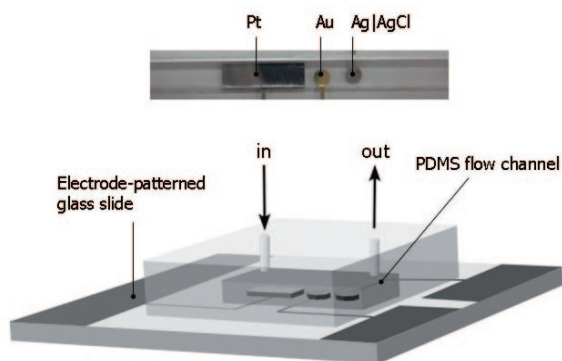


図 2. The structure of the microfluidic biofuel cell used in this study.

的特性は三極式の電気化学測定(Hokuto Denko HSV-100 electrochemical analyzer)により評価した. 作用極には酵素を修飾した直径 3mm のグラッシーカーボン(GC)電極を, 参照極には Ag|AgCl(飽和 KCl)電極を, 対極には白金のワイヤーを用いた.

## 2.3 マイクロ流路型バイオ燃料電池

KB/PLL-VK<sub>3</sub>/Dp/GDH 修飾電極の燃料電池のアノードとしての評価を行うため, 図 2 に示すようなマイクロ流路型のセルを作製した. 電極はスライドガラス上にフォトリソグラフィ, スパッタリングなど微細加工を施すことで作製した. アノードは酵素を修飾した金電極(直径 2mm)を用い, カソードには PDMS を被覆した白金電極(3 mm × 10 mm), もしくは Ag|AgCl 電極(直径 2 mm)を用いた. Ag|AgCl 電極は Ag|AgCl インク(BAS Inc.)を白金電極上に塗布し, 80 °C で 2 h ほど乾燥させることにより作製した. 流路は PDMS を加工することによって作製し, 高さは 1mm, 幅は 3mm とした. 電池性能は抵抗を 1 k $\Omega$  から 3 M $\Omega$  の間で変化させ, そのときの電圧を読み取り, 電流-電圧曲線を作成することで評価した.

## 3. 結果

### 3.1 PLL-VK<sub>3</sub>/Dp/GDH (KB) 修飾電極の電気化学的評価

グルコース,  $\text{NADH}$  を含まない溶液中において PLL-VK<sub>3</sub>/Dp/GDH 修飾電極は可逆的なボルタモグラムを示し, ピークの中心電位は -0.27 V であった. これは遊離の VK<sub>3</sub>(-0.19 V, pH 7.0)と同程度である. ピーク間電位は掃引速度 5 mV s<sup>-1</sup> において 50 mV であり, 電位掃引速度を上げるに従い上昇した. またピーク電流が電位掃引速度に比例していることから, 電極表面に吸着している VK<sub>3</sub> のみが反応に関与していることが示唆された.

図 3 に示すように 3.0 mM の  $\text{NADH}$  の添加によって酸化触媒電流が観測された(図 3 b, 破線). これは我々が以前報告した PAA-VK<sub>3</sub> を用いた電極系 [10] の場合に比べ 50 倍程度大きい値であった. この結果はおそらくメディエータの固定化に用いたポリマーの差によるものと考えられる. つまり PLLの方が PAA の場合に比べ長い側鎖を持っていることなど高い自由度を有しており, よって固定化されている VK<sub>3</sub> の自由度が向上し, Dp との反応性が

向上したのではないかと考えられる。さらに 3.0 mM のグルコース及び 1.0 mM  $\text{NAD}^+$ を添加した場合はグルコースの酸化に伴う触媒電流が得られ(図 3c), その値は 3.0 mM  $\text{NADH}$ を添加した場合に得られた電流値(図 3b)とほぼ同程度であり, 図 1 に示した電子伝達リレーが機能していることがわかった。これにより, 二層目に alcohol dehydrogenase のような GDH 以外の  $\text{NAD}$  依存性酵素を用いることで, 様々な燃料からの発電が容易に行えることが示唆された。

我々は以前 KB の酵素膜への添加が電極面積の向上に寄与し, それが電流値の大きな増加につながることを示した[10]。図 4 は KB を添加した PLL-VK<sub>3</sub>/DP/GDH 修飾電極のボルタモグラムであり, 図 3 のものに比べ 10 倍程度大きな酸化電流が得られた。KB 修飾電極の実効電極表面積は平滑な GC 電極に比べ, 46 倍程度大きくなっていることが, ボルタモグラムの -0.5 V における非ファラデー電流を比較することでわかった。また KB の微細構造中においても酵素-メディエータ間の反応が阻害されることはなく, 2 mA cm<sup>-2</sup> 程度のグルコース酸化電流が得られた(図 4 d)。

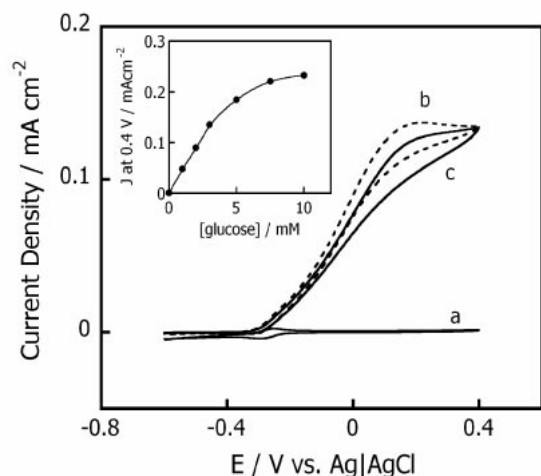


図 3. (a) Cyclic voltammograms for an electrochemical cell containing a PLL-VK<sub>3</sub>/Dp/GDH-modified GC electrode with a  $\text{N}_2$ -saturated pH 7.0 phosphate-buffered electrolyte solution at 37 °C. (b and c) Voltammograms for cells similar to that of Fig. 4(a) but with 3.0 mM  $\text{NADH}$  (b) or 3.0 mM glucose and 1.0 mM  $\text{NAD}^+$  (c) added to the electrolyte solutions. In all cases, the scan rate was 5 mV s<sup>-1</sup>. The inset is a plot of the current density at 0.4 V versus the glucose concentration.

この PLL-VK<sub>3</sub>/DP/GDH/KB 修飾電極の pH に対する耐性を評価した。様々な pH の緩衝溶液中での電極の 0 V における電流値を比較したところ, 電極は pH が 4.8-8.5 の範囲で機能し, pH 7 付近で最も高い活性を示した。さらに同様に, 温度の影響を評価したところ, 45 °C までは電極活性が上がり続け, その後急激に活性が低下した。これらの結果は, 酵素活性そのものと同様な挙動であり[27], 酵素活性が直接電極性能に影響することがわかった。

次に PLL-VK<sub>3</sub>/DP/GDH/KB 修飾電極の保存に関する耐久性を評価した(図 5)。実験は pH 7 のリン酸緩衝液中での保存(a)と, 空気中での保存(b)の二種類について評価した。空気中で保管した物については, 一週間後においても新鮮な電極の 80 % 程度の電流を得ることができた。しかしながら, リン酸緩衝液中で保存していたものについては, 二日後には, 初日の値(1.5 mA cm<sup>-2</sup>)の 5 分の 1 程度まで減少して, その後はなだらかに減少した。酵素修飾電極の活性低下は酵素活性の低下や図 1 に示す電子伝達リレーが阻害されるため行われると考えられ, さらに上の結果より, 酵素膜の膨潤や酵素の膜外への脱離が原因ではないかと考えた。

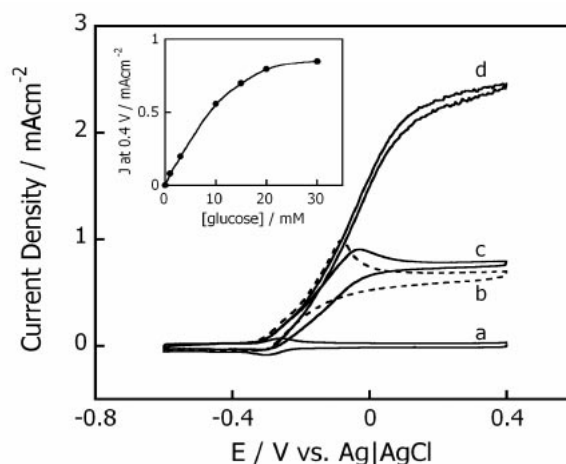


図 4. (a) A cyclic voltammogram for a KB/PLL-VK<sub>3</sub>/Dp/GDH-modified GC electrode in a  $\text{N}_2$ -saturated pH 7.0 phosphate-buffered electrolyte solution at 37 °C. (b-d) Cyclic voltammograms in the solution described in the legend of Fig. 4(a) but with 20 mM  $\text{NADH}$  (b), or 20 mM glucose, 1.0 mM  $\text{NAD}^+$ (c), or 30 mM glucose, 1.0 mM  $\text{NAD}^+$ (d). For (d), the electrolyte solution was stirred at 1000 rpm. In all cases the scan rate was 5 mV s<sup>-1</sup>. The inset shows a plot of the current density at 0.4 V versus glucose concentration.

### 3.2 マイクロ流路中での電池出力評価

我々が今回作製したような酵素を触媒とするマイクロ流路型バイオ燃料電池(図2)は、自立型マイクロチップや体内埋め込み型デバイス用の電源として期待できる[2-5,7,14]. このような流路型のシステムは送液条件などを容易に規定することができるため、バイオ燃料電池の出力、耐久性などの定量評価系としても有用である.

図6は5.0 mM glucoseと1.0 mM NAD<sup>+</sup>の燃料を含んだ溶液を1.0 mL min<sup>-1</sup>で送液した場合のバイオ燃料電池の電流-電圧曲線(A), および電力-電圧曲線(B)を示している. またすべての測定においてアノードには PLL-VK<sub>3</sub>/DP/GDH/KB 修飾電極を用いた.

カソードに Ag|AgCl を用いた電池において、燃料溶液を窒素置換した溶液(□), 空気飽和の溶液(Δ), のいずれにおいても最大電流値は 0.13 mAcm<sup>-2</sup>を示し、最大電力は 20 μW cm<sup>-2</sup>程度であった. しかし起電力は(OCV)窒素置換した溶液のもの(0.37 V)の方が、空気飽和の溶液のもの(0.31 V)よりも大きかった. これは燃料溶液中に溶け込んでいる酸素が VK<sub>3</sub> や酵素を酸化しているためと考えられる[28]. しかしながら、それらは図1の反応系を大きく阻害するまでには至らなかったため同程度の最大電流が得られたものと考えられる.

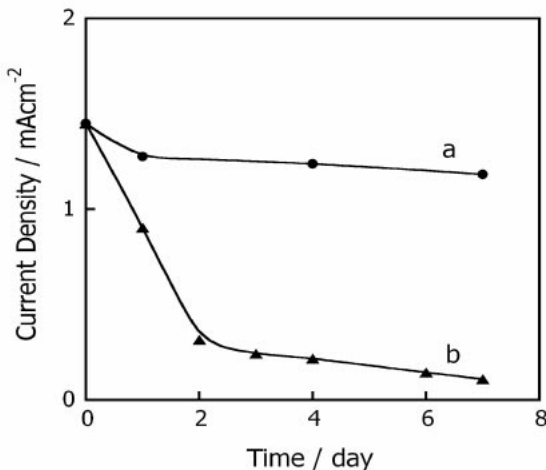


図5. Plots of the current density measured daily at 0 V in a N<sub>2</sub> saturated, 5.0 mM glucose, 1.0 mM NAD<sup>+</sup> pH 7 phosphate-buffered electrolyte solution. The KB/PLL-VK<sub>3</sub>/Dp/GDH-modified electrode that when not in use was (a) stored in air or (b) stored in the buffer solution (b).

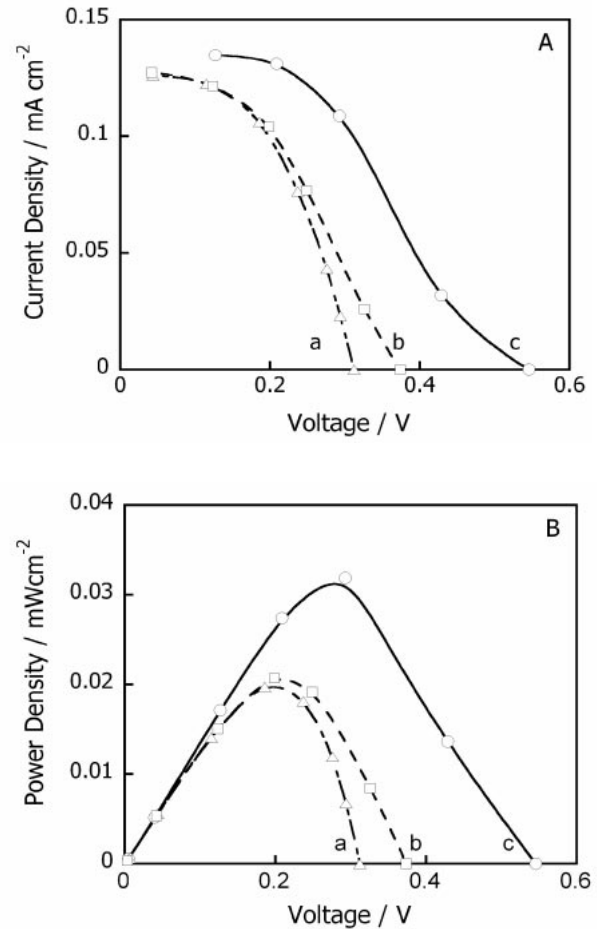


図6. (A) Current-voltage profiles and (B) power-voltage profiles for a fuel cell operating with a fuel flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup> at 37 °C. The fuel was a pH 7 phosphate buffer containing 5.0 mM glucose and 1.0 mM NAD<sup>+</sup>. The anode was a KB/PLL-VK<sub>3</sub>/Dp/GDH-coated Au electrode and the cathode was (a) a Ag|AgCl electrode (N<sub>2</sub>-saturated fuel), (b) a Ag|AgCl electrode (air-saturated fuel) or (c) a PDMS-coated Pt (air-saturated fuel).

次にカソードに酸素選択透過性を有す PDMS 被覆した白金電極[26]を用いることでグルコース/酸素型のバイオ燃料電池の評価を行った(図6, ○). ここではアノードの評価を行うためにカソードはアノードの10倍の表面積のものとした. また白金カソードはアノード近傍における酸素の濃度を減少させる目的で、アノードの上流に配置した. この電池ではOCVが0.55 V, 最大電力は32 μW cm<sup>-2</sup>といった出力が得られた. ここで最大電流は0.13 mA cm<sup>-2</sup>は他のものと同程度であり、電池の最大電流はアノード反応が律していることがわかった. 図7は100 kΩの外部抵抗を接続した際のグルコース/酸素型のバイオ燃料電池の放電電流と流速の関係

を示している。流速が大きくなるにつれ、放電電流が大きくなるといった結果が得られた。これは、流速の増大に伴い電極表面への燃料の供給量が増したためである。

電池の耐久性評価を、定抵抗(100 k $\Omega$ )を付加した際の放電電流を観測することにより行った(図8)。流速は1.0 mL min<sup>-1</sup>で一定とした。放電電流はアノード反応が性能を律しているため、カソードの種

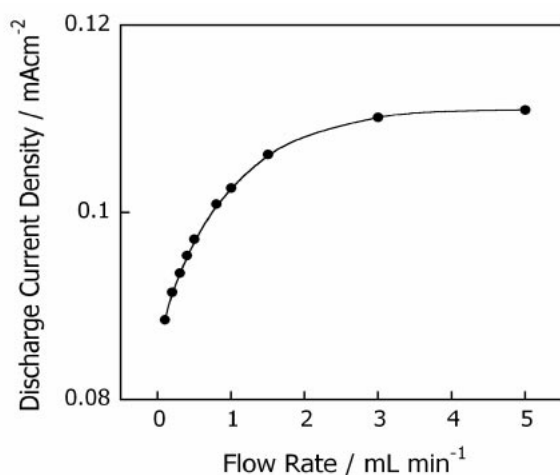


図7. A plot of the discharge current density vs. the fuel flow rate at 37 °C for a biofuel cell containing a KB/PLL-VK<sub>3</sub>/Dp/GDH-modified anode and a PDMS-coated Pt cathode. The load was 100 k $\Omega$ . The fuel was an air-saturated pH 7.0 phosphate-buffered 1.0 mM NAD<sup>+</sup>, 5.0 mM glucose solution.

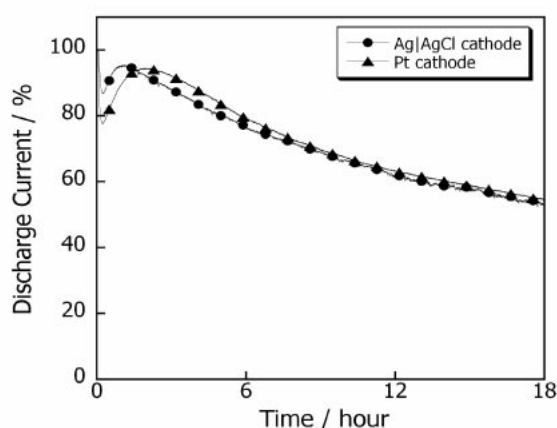


図8. Plots of the discharge current density (R=100 k $\Omega$ ) versus time of operation for biofuel cells containing a KB/PLL-VK<sub>3</sub>/Dp/GDH anode and a Ag|AgCl cathode (●) or a PDMS-coated Pt cathode (▲), and an air-saturated pH 7.0 phosphate-buffered fuel containing 1.0 mM NAD<sup>+</sup> and 5.0 mM glucose. Both cells were run, with a flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup>.

類によらず一定だった。つまりこの測定はアノードの耐久性を評価していることになる。

放電初期においては電流値の上昇が見られた。これはおそらく酵素膜への燃料の浸透過程によるものである。その後電流は徐々に減少し、18 h 後には初期の 50 %以下となる 0.05 mA cm<sup>-2</sup>程度まで減少した。この原因としては酵素や VK<sub>3</sub> の脱離や膜の膨潤に伴う電子伝達リレーの阻害などが考えられる。よって耐久性の向上のためには、ポリマーの架橋や、半透膜等のコーティングなどによる膨潤の防止が効果的なのではないかと考えられる。

#### 4. まとめ

PLL-VK<sub>3</sub>をメディエータとし、Dp/GDHを触媒としたグルコース酸化系を確立した。ここで、二層膜の特性を生かし、他の NAD 依存性の酵素を入れ替えることで、容易にアルコールなど他の燃料からの発電が可能である。また流路型のバイオ燃料電池により、燃料の送液条件を一定とすることで、出力や耐久性などの電池性能を定量的に評価することを可能とした。またそこで得られた耐久性の結果から、耐久性の向上のためには酵素膜の膨潤を防ぐことが必要なのではないかと考えた。

#### 謝辞

この研究は東北大学グローバルCOE「新世紀世界の成長焦点に築くナノ医工学拠点」のサポートのもと行われました。

#### 文献

- [1] Willner B and Willner I. Reconstituted Redox Enzymes on Electrodes: From Fundamental Understanding of Electron Transfer at Functionalized Electrode Interfaces to Biosensor and Biofuel Cell Applications. In: *Bioelectronics*, edited by Willner I and Katz E, Wiley-VCH, Weinheim, 35-93, 2005.
- [2] Mano N, Mao F, and Heller A. Characteristics of a miniature compartment-less glucose-O<sub>2</sub> biofuel cell and its operation in a living plant. *J Am Chem Soc* **125**, 6588-6594, 2003.
- [3] Heller A. Miniature biofuel cells. *Phys Chem Chem Phys* **6**, 209-216, 2004.

- [4] Heller A. Integrated medical feedback systems for drug delivery. *AIChE journal* **51**, 1054-1066, 2005.
- [5] Heller A. Potentially implantable miniature batteries. *Anal Bioanal Chem* **385**, 469-473, 2006.
- [6] Katz E, Filanovsky B, and Willner I. A biofuel cell based on two immiscible solvents and glucose oxidase and microperoxidase-11 monolayer-functionalized electrodes. *New J Chem*, 481-487, 1999.
- [7] Katz E, Buckmann AF, and Willner I. Self-powered enzyme-based biosensors. *J Am Chem Soc* **123**, 10752-10753, 2001.
- [8] Tamaki T and Yamaguchi T. High-surface-area three-dimensional biofuel cell electrode using redox-polymer-grafted carbon. *Int Eng Chem Res* **45**, 3050-3058, 2006.
- [9] Tsujimura S, Kano K, and Ikeda T. Glucose/O<sub>2</sub> biofuel cell operating at physiological conditions. *Electrochemistry* **70**, 940-942, 2002.
- [10] Sato F, Togo M, Islam MK, Matsue T, Kosuge J, Fukasaku N, Kurosawa S, and Nishizawa M. Enzyme-based glucose fuel cell using vitamin K<sub>3</sub>-immobilized polymer as an electron mediator. *Electrochem Commun* **7**, 643-647, 2005.
- [11] Akers NL, Moore CM, and Minter SD. Development of alcohol/O<sub>2</sub> biofuel cells using salt-extracted tetrabutylammonium bromide/Nafion membranes to immobilize dehydrogenase enzymes. *Electrochim Acta* **50**, 2521-2525, 2005.
- [12] Moore CM, Minter SD, and Martin RS. Microchip-based ethanol/oxygen biofuel cell. *Lab Chip* **5**, 218-225, 2005.
- [13] Palmore GTR, Bertschy H, Bergens SH, and Whitesides GM. A methanol/dioxygen biofuel cell that uses NAD<sup>+</sup>-dependent dehydrogenase as catalysts: application of an electro-enzymatic method to regenerate nicotiamide adenine dinucleotide at low overpotentials. *J Electroanal Chem* **443**, 155-161, 1998.
- [14] Barton SC, Gallaway J, and Atanassov P. Enzymatic biofuel cell for implantable and microscale devices. *Chem Rev* **104**, 4867-4886, 2004.
- [15] Kano K and Ikeda T. Fundamentals and practices of mediated bioelectrocatalysis. *Anal Sci* **16**, 1013-1021, 2000.
- [16] Kano K and Ikeda T. Bioelectrocatalysis, powerful means of connecting electrochemistry to biochemistry and biotechnology. *Electrochemistry* **71**, 86-99, 2003.
- [17] Tsujimura S, Kano K, and Ikeda T. Bilirubin oxidase in multiple layers catalyzes four-electron reduction of dioxygen to water without redox mediators. *J Electroanal Chem* **576**, 113-120, 2005.
- [18] Tsujimura S, Nakagawa T, Kano K, and Ikeda T. Kinetic study of direct bioelectrocatalysis of dioxygen reduction with bilirubin oxidase at carbon electrodes. *Electrochemistry* **72**, 437-439, 2004.
- [19] Sato A, Kano K, and Ikeda T. Diaphorase/naphthoquinone derivative-modified electrode as an anode for diffusion-controlled oxidation of NADH in electrochemical cells. *Chem Lett* **32**, 880-881, 2003.
- [20] Ogino Y, Takagi K, Kano K, and Ikeda T. Reactions between diaphorase and quinine compounds in bioelectrocatalytic redox reactions of NADH and NAD<sup>+</sup>. *J Electroanal Chem* **396**, 517-524, 1995.
- [21] Sammoura F, Lee KB, and Lin L. Water-activated disposable and long shelf life microbatteries. *Sens Act A* **111**, 79-86, 2004.
- [22] Lee KB. Urine-activated paper batteries for biosystems. *J Micromech Microeng* **15**, S210-S214 2005.
- [23] Ferrigno R, Strook AD, Clark TD, Mayer M and Whitesides GM. Membraneless vanadium redox fuel cell using laminar flow. *J Am Chem Soc* **124**, 12930-12931, 2002.
- [24] Chohan ER, Markoski LJ, Wieckowski A, and Kenis PJA. Microfluidic fuel cell based on laminar flow. *J Power Sources* **128**, 54-60, 2004.
- [25] Jayashree RS, Gancs L, Chohan ER, Primak A, Natarajan D, Markoski LJ, and Kenis PJA. Air-breathing flow-based microfluidic fuel cell. *J Am Chem Soc* **127**, 16758-16759, 2005.
- [26] Mizutani F, Sato Y, Hirata Y, and Iijima S. Interference-free, amperometric measurement of urea in biological samples using an electrode coated with tri-enzyme/polydimethylsiloxane-bilayer membrane. *Anal Chim Acta* **441**, 175-181, 2001.
- [27] <http://www.toyobo.co.jp/e/seihin/xr/enzyme/product.html>
- [28] Tatsumi H, Nakase H, Kano K, and Ikeda T. Mechanic study of the autoxidation of reduced flavin and quinine compounds. *J Electroanal Chem* **443**, 236-242, 1998.