

学位申請論文

生体内加工セルロース(牛糞)を基質としたグルコース生成法と
これを燃料として利用した直接グルコース形燃料電池の開発

2017年3月

高橋 昌利

目次

第一章 緒論 1

1.1 生体内加工セルロースからのグルコース生成	
1.1.1 セルロース	1
1.1.2 バイオマスの分類とセルロース系バイオマス	1
1.1.3 家畜排泄物の現状と課題	2
1.1.3.1 家畜排泄物の種類と存在量	3
1.1.3.2 生体内加工セルロース	5
1.1.4 セルロースのからのグルコース生産	5
1.1.4.1 現在のグルコース生産	5
1.1.4.2 セルロースの糖化法	5
1.1.4.3 セルラーゼ	6
1.1.4.4 セルロースの前処理法	6
1.2 グルコースを燃料とした直接形燃料電池	7
1.2.1 グルコースの酸化反応	7
1.2.2 再生可能エネルギー	8
1.2.3 燃料電池	10
1.2.3.1 燃料電池の原理	10
1.2.3.2 燃料電池の種類	11
1.2.3.3 直接形燃料電池	12
1.2.3.4 直接グルコース形燃料電池	12
1.3 本研究の意義と目的	13
1.4 本論文の構成	15
1.5 参考文献	18

第二章 生体内加工セルロース(牛糞)からのグルコース生成法の

検討 20

2.1 緒言	20
2.2 実験方法	21
2.2.1 試料	21
2.2.2 物理的前処理法	21
2.2.3 酵素糖化法	23

2.2.4	グルコース定量	23
2.3	結果および考察	24
2.3.1	物理的前処理法の検討	24
2.3.1.1	光学顕微鏡観察	24
2.3.1.2	酵素糖化	25
2.3.1.3	牛糞中の基質量に及ぼす洗浄処理の影響	26
2.3.2	遊星ボールミル処理法の検討	27
2.3.2.1	粒子径評価	27
2.3.2.2	酵素糖化	29
2.3.3	様々な牛糞のグルコース生産性比較	33
2.4	結言	35
2.5	参考文献	36

第三章 牛唾液によるセルラーゼ糖化促進効果の作用機序に

関する検討 37

3.1	緒言	37
3.2	実験方法	38
3.2.1	試薬及び使用装置	38
3.2.2	酵素至適条件の決定	39
3.2.3	牛唾液を用いた微結晶セルロースの酵素糖化	40
3.2.4	牛唾液の透析処理	40
3.2.5	牛唾液の熱変性処理	40
3.2.6	牛唾液のゲル濾過クロマトグラフィー	41
3.2.7	セルロースの結晶構造解析	41
3.2.8	添加順序に関する検討	41
3.2.9	糖定量	42
3.2.9.1	ムタロターゼ GOD 法によるグルコース定量	42
3.2.9.2	ソモギネルソン法による還元糖定量	42
3.3	結果および考察	43
3.3.1	酵素至適条件検討	43
3.3.2	牛唾液を用いた微結晶セルロースの酵素糖化	44
3.3.3	牛唾液中に存在する糖化促進物質の探索	47
3.3.3.1	透析、熱処理唾液が及ぼす影響	47
3.3.3.2	ゲル濾過クロマトグラフィーによる唾液の分画	48

3.3.4	牛唾液による糖化促進メカニズム	50
3.3.4.1	牛唾液がセルロース結晶形に及ぼす影響	50
3.3.4.2	牛唾液、セルロース、セルラーゼとの相互作用	51
3.3.4.3	既存の糖化促進物質との比較	52
3.3.4.4	牛唾液による糖化促進メカニズム	54
3.3.4.5	リグノセルロースに対する唾液添加効果	55
3.4	結言	57
3.5	参考文献	58

第四章 貴金属触媒のグルコース酸化特性と電気化学的評価・59

4.1	緒言	59
4.2	実験方法	60
4.2.1	試薬	60
4.2.2	貴金属ナノ粒子触媒の調製	60
4.2.2.1	種々の貴金属ナノ粒子触媒の調製法	60
4.2.2.2	Pt-Au 金属ナノ粒子触媒の調製法	61
4.2.2.3	貴金属ナノ粒子触媒インクの調製法	61
4.2.3	貴金属ナノ粒子触媒の透過型電子顕微鏡(TEM)観察	61
4.2.4	貴金属ナノ粒子触媒におけるグルコース酸化のサイクリックボルタンメトリー(CV)	61
4.2.5	燃料電池の作製	61
4.2.5.1	Pt-Au 金属ナノ粒子触媒を用いたアノード電極の作製	61
4.2.5.2	燃料電池の組み立て	62
4.2.6	燃料電池の出力測定	65
4.3	結果および考察	65
4.3.1	種々の貴金属ナノ粒子触媒がグルコース酸化特性に及ぼす影響	65
4.3.2	グルコース酸化特性に及ぼす Pt-Au 金属ナノ粒子の組成の影響	71
4.3.3	グルコース酸化特性に及ぼす炭素担持材料の影響	72
4.3.4	グルコース酸化特性に及ぼす PVP 濃度の影響	73
4.3.4.1	種々の PVP 濃度で調製した Pt-Au 金属ナノ粒子触媒の TEM 観察	73
4.3.4.2	種々の PVP 濃度で調製した Pt-Au 金属ナノ粒子触媒のサイクリックボルタンメトリー	74
4.3.4.3	燃料電池性能	76
4.4	結言	77
4.5	参考文献	78

第五章 Pt-Au 金属触媒を用いた直接グルコース形燃料電池の

最適発電条件の検討 79

5.1 緒言	79
5.2 実験方法	80
5.2.1 シングルセルをベースとした各部品の量産	80
5.2.2 電極素材の検討	80
5.2.3 高い表面積を有する電極の調製	81
5.2.3.1 アノード電極の調製	81
5.2.3.2 カソード電極の調製	81
5.2.4 イオン交換膜	81
5.2.5 燃料供給速度による性能評価	81
5.2.6 アノード側燃料濃度による性能評価	81
5.2.7 スタック型燃料電池	82
5.2.7.1 スタック型グルコース燃料電池の組み立て	82
5.2.7.2 スタック型グルコース燃料電池を用いた開回路電圧-出力測定	82
5.2.8 スタック型グルコース燃料電池を用いた蓄電ユニットの作製	83
5.2.9 充電試験	83
5.2.10 グルコース以外の糖を燃料として用いた時の燃料電池特性評価	84
5.3 結果および考察	85
5.3.1 直接グルコース形燃料電池の出力特性に及ぼすイオン交換膜の影響	85
5.3.2 直接グルコース形燃料電池の出力特性に及ぼす燃料供給速度の影響	87
5.3.3 直接グルコース形燃料電池の出力特性に及ぼすグルコース濃度の影響	89
5.3.4 直接グルコース形燃料電池の出力特性に及ぼすアイオノマー質量(I/C 比)の影響	90
5.3.5 最適な電極素材の検討	92
5.3.6 実用化に向けたスタック式直接グルコース形燃料電池の開発と充電試験	92
5.3.6.1 Pt-Au 金属ナノ粒子触媒を用いたスタック式直接グルコース形燃料電池	92
5.3.6.2 スタック式燃料電池の予備実験	93
5.3.6.3 スタック式燃料電池を構成する電極間のばらつき	94
5.3.6.4 充電試験	95
5.3.7 種々の糖の燃料としての利用性	96
5.3.7.1 生体内加工セルロース由来(牛糞)グルコースが出力特性に及ぼす影響	96
5.3.7.2 グルコース以外の糖が出力特性に及ぼす影響	98
5.4 結言	99
5.5 参考文献	100

第六章 総括	101
研究業績	104
謝辞	106

第一章 緒論

1.1 生体内加工セルロースからのグルコース生成

1.1.1 セルロース

セルロースは地球上に最も豊富に存在する有機化合物である。セルロースは私たちの身の回りにあふれており、汎用材料から、医療材料に至るまで広範囲に利用されている。綿繊維の衣類、セルローススポンジ、住宅・家具、紙、食品、化粧品などにはセルロースは主成分として含まれており、欠かせないものとなっている¹⁾。さらにセルロースは酵素あるいは酸を用いた処理を行い、単糖であるグルコースにすることにより、微生物を生育・培養するための栄養源(炭素源)として用いることができ、有用成分を発酵生産することができる(現在主流となっているものではエタノール発酵や乳酸発酵)。

セルロースはD-グルコース($C_6H_{12}O_6$)が β -1, 4-グルコシド結合を形成して互いに結合し合い、長い鎖状構造をとり結晶化している。1本の分子は数千から1万程度のグルコースからなる。また、グルコシド結合とは、 β -グルコースのC1位と別のグルコースのC4位の水酸基間のアセタール結合である。このセルロースは、すべての分子が束になり微細な紐のような形をとっている。これをマイクロフィブリルといい太さは数nmである。セルロースの化学構造を図1-1に示す。

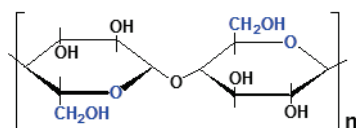


図 1-1 セルロースの化学構造

セルロースの分子式は $(C_6H_{10}O_5)_n$ で表され、重合度は数千～数万と幅広く分布している¹⁾。直鎖状の多糖類であり、還元性を有するアルデヒド基、あるいは分子内でヘミアセタールを形成している末端を還元性末端といい、還元性を示さない末端を非還元末端という²⁾。

1.1.2 バイオマスの分類とセルロース系バイオマス

バイオマスには何十万種という植物、農業系残渣、森林系残渣、産業廃棄物、下水汚泥、動物の排泄物が含まれる。現時点では工業規模の栽培は行われていないが、エネルギー作物は有用なバイオマスの一つである。バイオマスは多種多様であり、分類法もいくつか提案されている。ここでは図1-2のような分類法を示す³⁾。

バイオマスを生産系と未利用資源系に大別し、前者を陸域系と水域系、後者を農林水産系と廃棄物系に分類している。本論文で扱っている家畜排泄物は未利用資源系かつ農林水産系、畜産系に分類される。また、木材や稲わら等の主成分がセルロースで構成されたバイオマスをセルロース系バイオマスと総称されているが、排泄物中には消化しきれなかった、稲わら等が多く含まれており、セルロース系バイオマスの一つとしても分類できる。

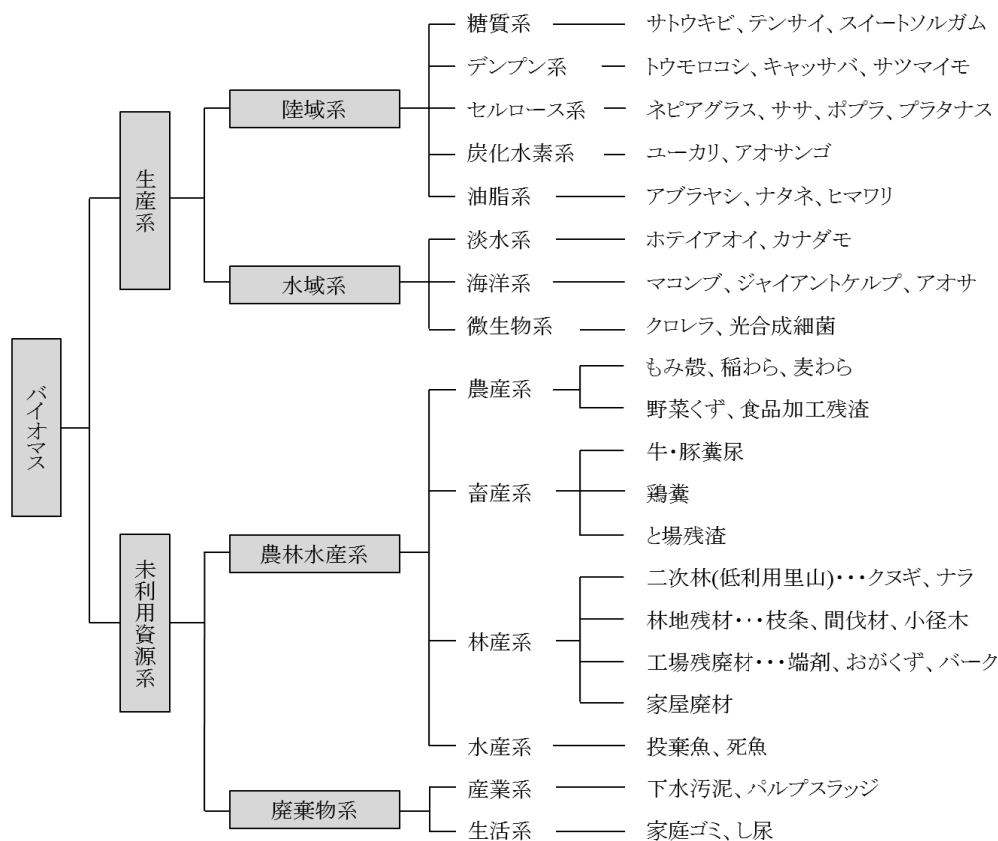


図 1-2 バイオマス資源の分類

1.1.3 家畜排泄物の現状と課題

近年、経済の急速な発展に伴う弊害として環境汚染が問題視されており、廃棄物の削減やその有効利用・再利用が重視されるようになった。その中でも、家畜排泄物は堆肥化され、農作物用の資源として利用している自治体が多い。しかし、費用対効果の意識に乏しく、採算性を無視して再資源化業務を行っている自治体も少なくない。農業廃棄物は産業廃棄物全体の 21%を占めており、資源としての再利用が強く求められている。この中でも家畜排泄物が最も多く、大規模産地においては家畜糞尿による畜産公害が問題となった。そこで 1999 年に「家畜排せつ物の管理の適正化及び利用の促進に関する法律」が制定され、家畜排泄物の適正な処理は重要課題として扱われるようになった。それに対応するために、全国の自治体が畜産環境施設を整備する計画を立て、対応を検討してきた。汚染者負担の原則からすれば家畜排泄物の処理は、畜産経営体が行うべきである。この原則に従うと、処理施設導入の初期投資に加えて排泄物処理コストも大きいため、畜産農家の経営が圧迫されているのが現状である。生産された堆肥を販売して排泄物処理コストを少しでも回収すること

が求められるが、そのためには堆肥の品質も重要となる⁴⁾。以上から家畜排泄物処理コスト削減や新たな家畜排泄物利用法の開発は重要課題となっている。

1.1.3.1 家畜排泄物の種類と存在量

家畜排泄物の主たるものは、家畜糞尿である。その他の畜産廃棄物としては畜産副産物や畜産加工残渣と呼ばれると畜場で生産される枝肉以外の産物がある。表 1-1 に糞尿施設を設計する際に使用される規模算定用の排泄量を示す⁵⁾。

表 1-1 家畜排泄物発生量

畜種	体重 (kg)	乾物量 (kg)	ふん(日・頭羽) 含水率(%)	生重 (kg)	尿(日・頭羽) (kg)	合計(日・頭羽) (kg)	合計(年・頭羽) (t)	
乳用牛	搾乳牛 ¹⁾	700	6.8	86	50	15	65	23.7
	搾乳牛 ²⁾	600-700	5.7	84	36	14	50	18.3
	乾乳牛	550-650	4.2	80	21	6	27	9.9
	育成牛	40-500	3.6	78	16	7	23	8.4
肉用牛	2歳未満	200-400	3.6	78	16	7	23	8.4
	2歳以上	400-700	4.0	78	18	7	25	9.1
	乳用種	250-700	3.6	78	16	7	23	8.4
豚	子豚	3-300	0.15	72	0.5	1.0	1.5	0.55
	肥育豚	30-110	0.53	72	1.9	3.8	5.7	2.08
	繁殖豚	150-300	0.83	72	3.0	7.0	10.0	3.65
採卵鶏	ひな	-	0.013	70	43	-	0.043	0.015
	成鶏 ³⁾	-	0.030	70	100	-	0.100	0.036
	成鶏 ⁴⁾	-	0.030	60	75	-	0.075	0.027
ブロイラー	成鶏	-	0.026	70	87	-	0.087	0.031
	成鶏 ⁵⁾	-	0.026	40	43	-	0.043	0.015

[注] 1)生乳生産量が年間 10,000 kg 程度の場合

2)生乳生産量が年間 7,600 kg 程度の場合

3)低床式鶏舎のふんの場合

4)高床式鶏舎のふんの場合

5)暖房式のウィンドウレス鶏舎のふんの場合

我が国の代表的な家畜としては乳用牛、肉用牛、豚、採卵鶏、ブロイラーが挙げられる。家畜糞尿は、家畜の種類、体重、給与飼料(量、質)、飲水量、飼養形態、季節や家畜の体調によって、その量や質も大きく変動する。これら家畜糞尿は、肥料成分の豊富な資材であり、表 1-2 に代表的な家畜糞の分析事例を示した⁶⁾。

表 1-2 家畜排泄物の分析結果

(単位: 水分は現物%, 他は乾物%, BODはmg/kg-現物)

種類	水分	有機物	炭素	窒素	炭素率	灰分	リン酸	カリウム	カルシウム	マグネシウム	BOD
牛糞	84.3	72.6	41.4	1.8	23	27.5	2.7	0.7	3.7	1.5	22000-26000
豚糞	81.1	80.9	41.5	3.9	11	19.1	4.8	0.4	4.9	1.6	55000-60000
鶏糞	75-80	72.9	42.2	4.6	9	27.3	8.6	2.3	10.9	1.6	65000-70000

例えば、牛糞は炭素率(C/N 比)が高いが、比較的難分解性有機物が多く、鶏糞は窒素、リン酸、カリウムなどの肥料成分割合が高く、比較的分解しやすい有機物(BOD, 生物化学的酸素要求量)が多く含まれる。また、2013 年時点での主な家畜の排泄物発生量を表 1-3 に示す⁴⁾。

表 1-3 畜種別にみた家畜排泄物発生量(単位:万トン)

畜種	発生量
乳用牛	約2,357
肉用牛	約2,442
豚	約2,238
採卵鶏	約745
ブロイラー	約514
合計	約8,295

我が国全体で1年間に発生する家畜排泄物の総量は約 8,295 万トンと推計されており、これは家畜排泄物と同じくバイオマス資源として期待される食品廃棄物(年間発生量約 2,000 万トン)、間伐材・被害木を含む林地残材(年間発生量約 400 万トン)に比べても非常に高く、我が国におけるバイオマス資源の総量(約 3 億 4000 万トン)の約 4 分の 1 を占めている⁴⁾。図 1-3 に全国の畜種別家畜排泄物量を示す⁴⁾。家畜排泄物の発生量は全国の視点からも地域的に偏在しており、畜産が盛んな地域では多量の家畜排泄物が排出されている。

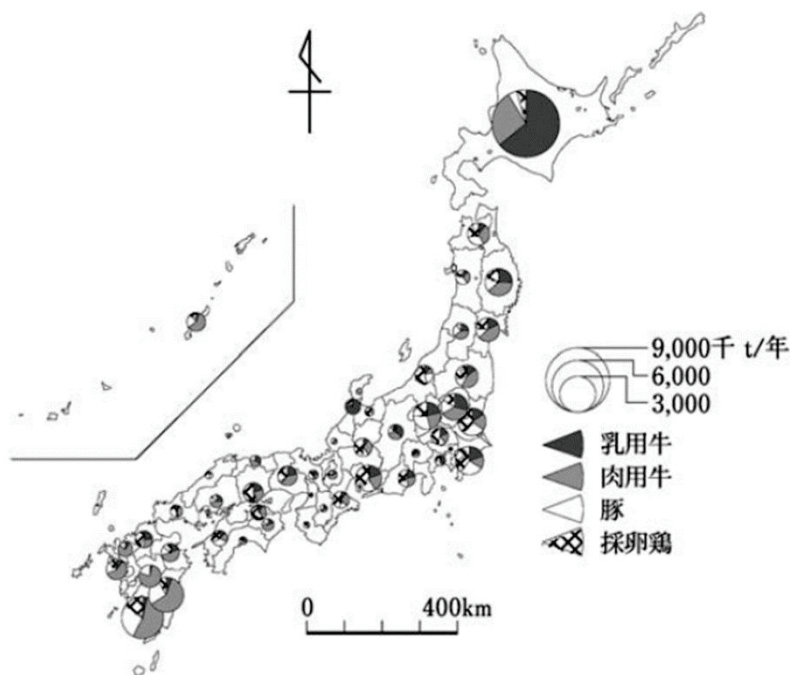


図 1-3 全国の畜種別畜排泄物発生量の分布⁷⁾

1.1.3.2 生体内加工セルロース

家畜排泄物の主成分は、家畜動物が消化しきれなかった稲わら等のセルロース成分であり、この成分は生体内加工セルロースと呼ばれ、木材と同様にセルロース、ヘミセルロース、リグニンを含んでいる。しかし、牛の場合、反芻や複数の胃において消化を繰り返し行っているため、木材中に含まれるセルロースよりも構造が破砕されているものと推察される。これまでに、様々な家畜排泄物の成分分析及び、生体内加工セルロース中のセルロースやヘミセルロースを用いたグルコースや乳酸の産生が報告されている^{8,9)}。家畜排泄物をセルロース源としたグルコース生産ができれば、堆肥化以外の有効利用につながることを期待される。しかし、家畜排泄物中のセルロース含量およびグルコース生産性、経済性は未知であり、家畜排泄物からのグルコース生産は実用化には至っていない。生体内加工セルロースを有効利用することが出来れば、家畜排泄物の処理問題の解決に繋がることが期待される。

1.1.4 セルロースからのグルコース生産

1.1.4.1 現在のグルコース生産

現在の主流となっているグルコース生産法は、トウモロコシやサトウキビ、キャッサバ等の糖質系バイオマスの主要構成成分であるデンプンを分解することによりグルコースを得る生産法である。しかし、本来食用や飼育用を目的として栽培されているこれらのバイオマスを大量に工業利用に用いてしまうと、食糧及びバイオエタノール自体の価格高騰が懸念されている¹⁰⁾。

これらの問題解決に向けて注目されているのが、食糧と競合しないセルロース系バイオマスを用いたグルコース変換法である。セルロース系バイオマスは、糖質系バイオマスの主要構成成分であるデンプンと同様の直鎖状のグルコースポリマーであり、地球上に豊富に存在し、廃棄物の大部分を占めている。そのため食糧との競合が発生せず、工業的に多量のグルコースを利用することが可能となる。しかし、セルロース分子鎖同士が強固に結合しあっているためグルコースへの分解は困難であり、セルロースからのグルコース生産を妨げているのが現状である¹⁰⁾。

1.1.4.2 セルロースの糖化法

セルロースの糖(グルコース)化処理の代表的な方法としては硫酸法がある。この方法では、細断した原料に濃度 70%以上の濃硫酸を加えて植物の構造を破壊するとともに、セルロースを加水分解する。そのあと、固液分離、酸・糖分離を行う。また、濃硫酸の代わりに希硫酸を用いる方法も代表的である。この方法では、濃度 1%程度の希硫酸により 140~260℃程度の高温で加水分解する。これらの酸糖化法は古くから用いられており、糖回収率の高い方法として知られているが、酸による腐食防止のため設備費が高くなる。また、中和の際に生じる石膏(硫酸カルシウム)や廃水の処理、グルコースの過分解などの問題がある¹¹⁾。

これに対し、近年では酵素による糖化法が活発に研究されている。セルロースを選択的に加水分解する酵素は微生物中などに広く存在しており、セルラーゼと呼ばれる。セルラーゼのような酵素は、常温で触媒として効率的に機能することから反応条件がマイルドあり、また、セルラーゼがタンパ

ク質であるため、使用後に環境中に排出されても容易に分解されるため廃液の必要が無いなど環境負荷の少ない方法として利用上多くの利点を持っている¹¹⁾。

しかし、セルラーゼによりセルロースを分解させるには、原料を粉砕したり膨軟化して、セルラーゼとセルロースの接触効率を上げる必要があり、この前処理技術が重要課題となっている。この前処理技術については 1.1.4.4 で述べる。

現時点でコスト面では酸分解法が有利であると言われているが、上記で述べた問題点は、酸を使用する以上、避けられない本質的な問題であるので、今後大幅にコストを削減することは困難であると考えられている¹¹⁾。一方、酵素糖化法は、酵素コストが高いため現状では不利であるが、セルロースの前処理技術の開発による酵素使用量の低減や酵素の改変等、様々なアプローチによって酵素コストの低減が検討されている¹²⁾。

1.1.4.3 セルラーゼ

セルロース分解酵素であるセルラーゼは、セルロースの β -1,4-グリコシド結合を分解する酵素の総称である。セルラーゼは大きく 3 種類に分類でき、セルロースの非結晶領域を内部から切断するエンドグルカナーゼ(EG)、結晶領域を末端からセロビオース単位で切断するセロビオヒドラーゼ(CBH)、セロビオースから最終的にグルコースを作る β -グルコシダーゼ(β GL)で構成されている¹³⁾。(図 1-4)自然界において様々な種類のセルラーゼが共に働くことでセルロースの分解がなされていることが知られている¹⁴⁾。また近年ではセルラーゼ以外の補助タンパク質も注目されている。植物の細胞壁を押し広げるエクспанシンや酸化的にセルロースを分解する GH61 がそれである。

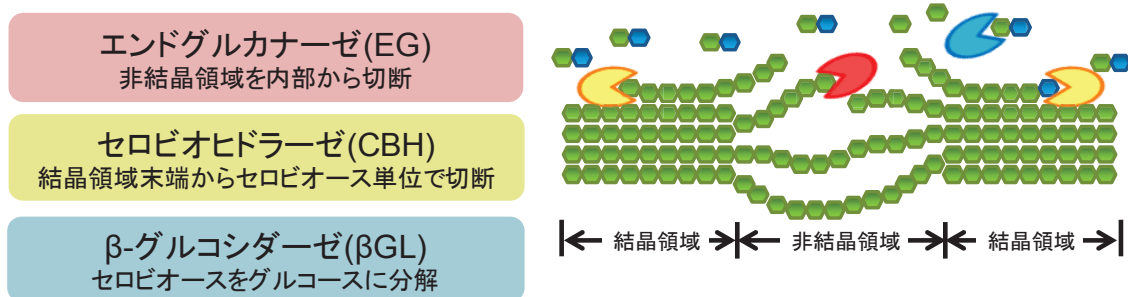


図 1-4 セルラーゼの分類と各作用

1.1.4.4 セルロースの前処理法

リグノセルロース中のセルロースはヘミセルロースやリグニンのネットワークに覆われており、それぞれの成分を有用資源化するためには、各成分を分離する必要がある。リグノセルロースに前処理を施す目的としては、ヘミセルロースおよびリグニンの低分子化と除去、セルロースの結晶性を下げる、セルロースを微細化し酵素との反応効率を向上させる、などが挙げられる。

前処理方法は主に物理的前処理¹⁵⁾⁻¹⁸⁾と化学的前処理¹⁹⁾⁻²¹⁾に大別される。その代表例を表 1-4 に示す²²⁾。

表 1-4 種々のリグノセルロース前処理法

前処理法	方法	例
物理的	粉砕	ボールミル
		ハンマーミル
		ロールミル
	照射	電子線
		γ線
	熱分解	熱処理
化学的	酸	濃硫酸, 希硫酸
		希塩酸
		リン酸
	アルカリ	水酸化ナトリウム
		アンモニア
	過酸化水素水	過酸化水素水
	有機溶媒	多価アルコール, フェノール
	オゾン	オゾン
熱化学分解	超・亜臨界水, 煮沸	

これらの処理法には、エネルギーコスト、環境負荷などの観点からメリット・デメリットがあるが、いくつかの手法を組み合わせる等、使用条件を最適化することにより、リグノセルロースに対する効率的な前処理法となる。物理的前処理において、原料を機械的に微粉砕する方法は非常に効果的であり、物資を投入しないため廃棄物の環境負荷が少ないものの、現状では粉砕に要するエネルギーが大きいという問題がある。この他の物理的前処理としては高温高压の水中で組織構造を分解する熱水処理、原料を高温高压にしたあとで急激に減圧する爆砕処理、水蒸気を用いる蒸煮爆砕処理などがある。これらも同様に要するエネルギーが大きいという問題がある。化学的前処理としては、酸、アルカリ、有機溶媒を用いる方法がある。酸はセルロース分子同士を結合している水素結合を切断することにより、結晶構造を破壊して不定形にする。こうすることでセルロースは容易に加水分解を受けられることになる。しかし、腐食防止や廃水の問題がある。アルカリはバイオマスを膨潤させ、重合度を低減し、結晶性を低下させ、リグニン構造を破壊する。結果としてリグニンと炭水化物の結合が緩められて分離が促進される。アルカリ処理により、ヘミセルロースとリグニンの大部分は可溶化されるが、セルロースのほとんどは変化しないままである。ここで、酵素を添加することにより、理論値近くまで糖化できる。

1.2 グルコースを燃料とした直接形燃料電池

1.2.1 グルコース酸化反応

グルコースを酸化させる場合、安定な分子構造を有しており、酸化過電圧が高いことから、活性の高い触媒を選択する必要がある。グルコースの酸化には酵素並びに金属ナノ粒子を用いた触媒が用いられており、それぞれの長所と短所を表 1-5 に示す²³⁾⁻²⁸⁾。

酵素を触媒として用いた場合、常温・常圧等の温和な条件下において反応の進行が素早いことから高い交換電流密度を得ることができる。しかし、酸やアルカリ条件下において容易に失活すること

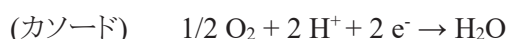
や、一般に酵素は溶液中で用いる必要があるため電極にする際の固定化が困難であり、使用環境が限られ、触媒としての安定性の問題が避けられない。また、微生物や生体内から得られる酵素は、培養時間が必要とされ、容易に大量に得ることができないことから、コスト面の問題も内蔵している。

一方で金属ナノ粒子を触媒として用いる場合、その多くは希少資源である貴金属を使用することから希少資源の枯渇が問題視される。しかし、貴金属触媒は使用条件に依存せず安定であり、少量でも効率の良い触媒能を得ることができる。また、使用済み電極からの回収技術が向上してきたことから、近年では触媒として金属ナノ粒子が多く用いられている。^{29), 30)}

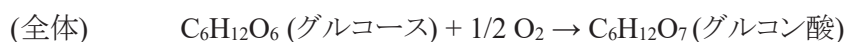
グルコースの酸化反応は以下の通りである。



$E^0 = -0.853 \text{ V (vs. NHE)}$



$E^0 = 0.4703 \text{ V (vs. NHE)}$



$E^0 = 1.256 \text{ V}$

表 1-5 酵素系ならびに貴金属系グルコース酸化触媒の比較

グルコース酸化触媒	長所	短所
酵素系	<ul style="list-style-type: none"> ・常温・常圧下で使用可能 ・反応の進行が素早いことから高い交換電流密度が得られる 	<ul style="list-style-type: none"> ・酸やアルカリ条件下において容易に失活する ・溶液中で用いる必要があり、使用環境が、限られる ・固定化が困難であるため、大量に用いる必要がある (コスト高)
貴金属系	<ul style="list-style-type: none"> ・pHの影響を受けにくい ・少量でも効率の良い触媒能を有する ・調製が容易 	<ul style="list-style-type: none"> ・触媒能は粒子径(表面積)に依存 ・CO等による被毒を受け触媒効果が低下する ・希少金属を用いる(資源の枯渇問題)

1.2.2 再生可能エネルギー

図 1-5 は日本の電源構成の年度別推移を示している。この図からも分かるとおり、2011 年 3 月に発生した東日本大震災以降、その安全性の問題から原子力発電所のほとんどが停止し、電力供給の大部分は火力発電でまかなわれている。これに伴い、電力の供給と引き換えに大気中への大量の二酸化炭素が排出されており、近年、その温室効果による地球温暖化が問題視されている。そこで、種々の再生可能エネルギーの導入も進められており、図 1-6 に示す通り今後も導入の増加が予測されている。太陽光発電において、太陽光は無尽蔵なエネルギー源であり、CO₂を排出せずにク

リーンな発電方法であることから、近年、急速な発展を遂げている。しかし、曇りや雨の日など気象条件により発電能力は低下し、毎日継続した電力の安定な供給が難しいという問題がある。また、地熱発電は、インフラ整備等の経済面や山岳地帯が多い日本では立地面においても問題を抱えている。バイオマス発電は資源を再利用できる利点はあるものの、製造コストや木質ペレット・バイオエタノールなどを製造する際に生じる、二酸化炭素の排出が避けられない。こうした現状から、二酸化炭素を排出せずに電力を計画的に生産できる経済的な発電法の研究・開発が求められている³¹⁾。

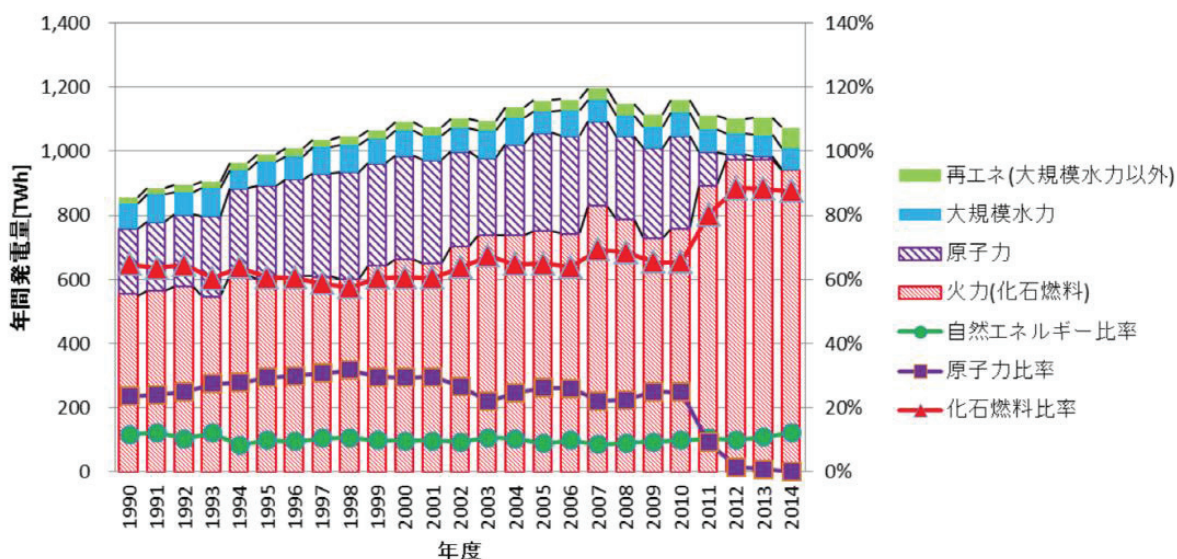


図 1-5 日本の電源構成の推移 (ISEP 環境エネルギー政策研究所 HP より 2015 年 12 月 現在)

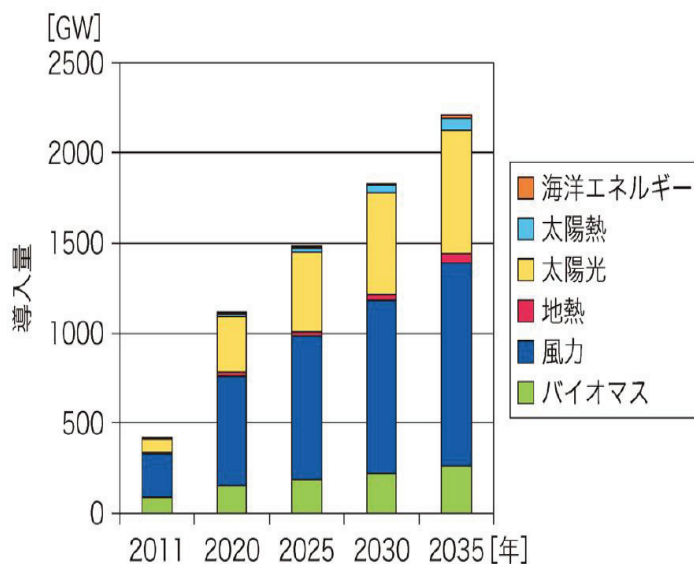


図 1-6 世界の再生可能エネルギーの累積導入量予測
(出典:NEDO 再生可能エネルギー技術白書第 2 版 総論より)

1.2.3 燃料電池

近年、経済の発展に伴い化石資源の消費量が増加し、大気中のCO₂濃度の上昇が懸念されている。我が国では、図1-5に示したとおり、電力供給の9割を火力発電でまかなっており、電力の産出とともに多くのCO₂を排出している。近年、その温室効果による地球温暖化が問題視され、CO₂排出問題はこれからの社会において大きな課題となる。このような背景から、CO₂排出がほとんどなくクリーンな発電とエネルギーを有効に利用する手段として燃料電池が注目されている³¹⁾。図1-7に示した通り、今後も燃料電池の市場は増加が予測され、2025年には5兆円規模まで発展する見込みとなっている。既に、実用化も進められており、2009年に家庭用燃料電池が市場に流通したことを機に、電気自動車への導入や、家庭用燃料電池の普及率も増加しつつある。

家庭用燃料電池では、発電と熱を同時に利用できる燃料電池システムとなっている。このシステムを用いることで、1軒あたりのCO₂の年間排出量は約0.8トン削減できる³²⁾。しかし、家庭用燃料電池の価格は非常に高価であり、製造コストの削減が求められている。また、燃料のほとんどに水素が用いられているため、安全面での懸念や貯蔵のためのインフラ整備などの問題も未だ内蔵していることから、今後も課題解決のための研究開発が重要となる。

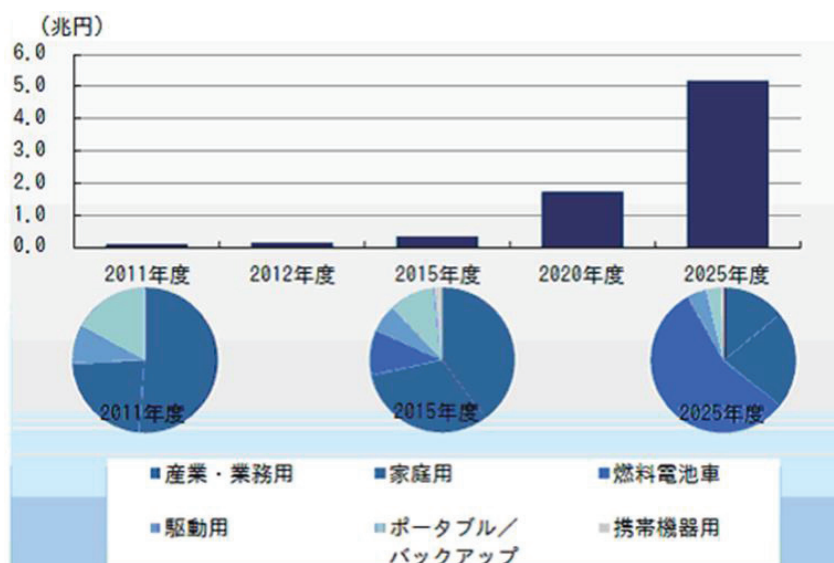


図1-7 燃料電池システム世界市場予測推移

(出典:2013年版「燃料電池関連技術・市場の将来展望」より)

1.2.3.1 燃料電池の原理

燃料電池は、燃料極(負極)へ水素などの燃料および空気極(正極)に空気中の酸素等を常温または高温環境で供給し、触媒を用いた電気化学反応により直接電気エネルギーを取り出すことができる発電装置である。基本構成は、負極と正極を電解質または電解液で隔てており、表1-6に示す通り、負極側に燃料となる酸化されやすい物質(水素や金属等)、並びに正極側に還元されやすい物質(酸素や酸化物等)を充填する。この時、電解質および電解液はイオンのみが伝導でき、電子の伝

導はできない。両極を外部負荷(導線)で接続することで、正極側では還元反応が進行し、負極では酸化反応が進行することで、導線を伝って負極から正極に電子が流れ、電気的な回路が成立する³¹⁾。この電気化学反応による発電では、従来の化石燃料を用いた発電に比べ、CO₂やNO_xなどの環境負荷物質の排出が低く、発電効率がよい。電気容量に限界のある一次電池や二次電池とは異なり、正極と負極の両方に燃料を供給し続ければ電気容量の制限なく放電を行うことが可能な点が特徴である。

表 1-6 燃料電池の反応式

負極	$\text{Re} \rightarrow \text{Re}^{n+} + e^{-}$
正極	$\text{O}_x + ne^{-} \rightarrow \text{O}_x^{n-}$
全体	$\text{O}_x + \text{Re} \rightarrow \text{O}_x^{n-} + \text{Re}^{n+}$

1.2.3.2 燃料電池の種類

燃料電池には様々な種類があり、電池に用いる電解質によって表 1-7 に示すように分類される。電解質がイオン伝導体として機能することができる温度範囲は限定されることから、電解質材料に応じて燃料電池の最適な作動温度や適した触媒、燃料が異なる。

アルカリ形(AFC)、固体高分子形(PEFC)、リン酸形(PAFC)燃料電池は、主に水素を燃料とし、固体酸化物形燃料電池(SOFC)よりも低温で作動可能である。これらの水素を燃料として用いた燃料電池は高出力密度が得られることから、家庭用の電源や燃料電池自動車用電源として期待される。一方で、直接形燃料電池は出力密度において水素を燃料として用いる燃料電池より劣るものの、燃料を改質することなく直接用いることができるため、燃料の供給が容易で簡素なシステムを構築でき、モバイル用電源や非常時用電源としての適用が期待できる。

表 1-7 種々の燃料電池

	アルカリ形 (AFC)	固体高分子形 (PEFC)	リン酸形 (PAFC)	固体酸化物形 (SOFC)	直接燃料形 (DFC)
電解質	KOH水溶液	イオン交換膜	H ₃ PO ₄	イットリア安定化ジルコニアなど固体電解質	イオン交換膜
導電キャリア	OH ⁻	H ⁺	H ⁺	O ²⁻	H ⁺ /OH ⁻
作動温度	50-150℃	70-100℃	170-200℃	700-1000℃	常温
燃料	水素	水素	水素	水素	メタノール, エタノール, グルコース等
正極触媒	白金, ニッケルなど	白金系	白金系	MnO ₃ など	白金系
負極触媒	白金, ラネー銀など	白金系	白金系	ニッケル	白金系

1.2.3.3 直接形燃料電池

現在、市場に流通している家庭用燃料電池(固体高分子形)は、水素源(メタンガス等)となる燃料から燃料改質器により水素に変換し燃料電池へ供給され発電する方式である。しかし、市販の燃料改質器はコストが高く、また小型化が制限されるという問題がある。一方、直接形燃料電池では燃料を水素に変換せずに電極上で直接酸化が可能である。また、燃料は液体の状態、比較的安全性の高いアルコール類や糖類を用いることができる。従って、製造コストも低く、運搬性が良いことから、モバイル用電源や非常時電源等への実用が期待できる。しかし、水素と比較すると、表 1-8 に示す通り、用いる燃料のほとんどは酸化過電圧が大きい酸化が困難であることから、低い出力密度となっている。特に、グルコースを燃料とする場合、安定な分子構造であるため、アルコール類を燃料とする場合と比較して高い酸化過電圧を有しているため、特に低い出力密度となっている。

表 1-8 常温・常圧条件における種々の直接形燃料の最大出力密度値³³⁾

燃料	最大出力密度値 (mW/cm ²)	測定条件(常温・常圧)
メタノール	40	アノード燃料：0.5 M燃料/1.0 M KOH溶液 (供給速度4ml/min) カソード燃料：加湿空気(100ml/min) アノード触媒：Pt-Ru カソード触媒：Pt イオン交換膜：アニオン(トクヤマ製)
エタノール	58	
グルコース	20	

1.2.3.4 直接グルコース形燃料電池

これまで、グルコースを燃料とした直接形燃料電池の報告例を表 1-9 に示す。Basu ら³⁶⁾により、Pt-Au 金属触媒を用いたグルコース酸化が報告されているが最大出力密度は約 1.6 mW/cm²である。一方で、藤原ら³⁷⁾は、Pt-Ru 金属触媒を用いたグルコース酸化により金属触媒を用いた系では最も高い最大出力密度 20 mW/cm² が報告されているが実用レベルには至っていない。また、現在実用化を指向した直接グルコース形燃料電池の研究例としては、体内埋込み型ペースメーカー用電池(数 100 μW/cm²)³⁸⁾やオーディオ機器用ポータブル電源(数 mW/cm²)²⁶⁾があるが、いずれも低出力で可動するデバイス用電源としての利用に限られている。これらの課題を克服し実用化を目指すためには、表 1-11 に示す様な検討項目が考えられるが、最も重要であるのは直接グルコース形燃料電池の出力向上である。出力を向上させるための手段として触媒使用量を増加させる方法も挙げられるが、コスト高や希少資源の枯渇問題等の課題が生じる。したがって、効率よくグルコースを酸化可能な電極触媒の探索ならびに電極部の開発が重要である。そこで、本研究では、電極部の高効率なグルコース酸化触媒の探索から、触媒粒子径の微小化ならびに触媒層内の最適な I/C 比の検討までを行った。

表 1-9 常温・常圧条件における直接グルコース形燃料電池の報告例

酸化触媒	触媒担持量 [※]	触媒塗布量	最高出力密度	燃料	参考文献
PtBi/Vulcan XC 72R	15 wt%	2.0 mg/cm ²	1.3 mW/cm ²	0.2 M Glucose/1.0 M KOH	36)
PtAu/Vulcan XC 72R	15 wt%	2.0 mg/cm ²	1.6 mW/cm ²	0.2 M Glucose/1.0 M KOH	
PtRu/Vulcan XC 72R	15 wt%	2.0 mg/cm ²	1.4 mW/cm ²	0.2 M Glucose/1.0 M KOH	
Au/Vulcan XC 72R	30 wt%	4.0 mg/cm ²	1.5 mW/cm ²	0.05 M Glucose/0.3 M KOH	40)
AuAg/Vulcan XC 72R	30 wt%	2.0 mg/cm ²	3.8 mW/cm ²	0.05 M Glucose/0.3 M KOH	
PtRu/Vulcan XC 72R	27-32 wt%	3.0 mg/cm ²	20 mW/cm ²	0.5 M Glucose/0.5 M KOH	37)

※炭素担持体に対する重量%

1.3 本研究の意義と目的

化石資源の枯渇が問題視され、バイオマス資源からエネルギーを生産する動きが世界的に広がっている。これは、低炭素社会実現による温室効果ガス削減を目指し、またエネルギーや化学素材の多様化を図り、持続可能な社会を形成する上では極めて重要である。しかし、現在、我が国では東日本大震災以来、その安全性の問題から原子力発電所のほとんどが停止し、電力供給の大部分は火力発電が占めている。これに伴い、電力の供給と引き換えに大気中への大量の二酸化炭素の排出が問題視されている。種々の再生可能エネルギーの導入も進められているが、太陽光発電や風力発電は、気象条件により電力の安定供給が難しい。地熱発電はインフラ整備などの経済面や立地面においても問題を抱えており、また、バイオマス発電はバイオメタノールや木質ペレットを燃料とした火力発電であり、二酸化炭素の排出が避けられない。こうした現状から、二酸化炭素を排出せずに電力を計画的に生産できる経済的な発電法並びにエネルギー源の研究・開発が求められている。

このような背景において、グルコースは電力エネルギー源やバイオエタノール等に変換できることから、新規エネルギー源として注目されている。グルコースにはデンプンなどの糖質系バイオマス、または稲わらや木材などのセルロース系バイオマスから製造する方法が考えられる。燃料用のバイオエタノールの生産はブラジルやアメリカを中心に特に盛んに研究されており、アメリカはトウモロコシやデンプンからのバイオエタノール生産を行い、世界最大のバイオエタノール生産国となっている。しかし、生産量の増加に伴い、原料となるトウモロコシの使用量は急増し、トウモロコシ価格が急騰した³⁴⁾。今後もバイオエタノールの需要は増える見込みであるが、食料である糖質系バイオマスを原料としたバイオエタノール生産は食糧難を引き起こす恐れがあるため、食料と競合しないセルロース系バイオマスをを用いたグルコース生産が必須となった。セルロースはグルコースを基本構成単位としており、地球上に豊富に存在するため、セルロースを効率的に分解できればグルコースの大量生産が可能となる。そこで、本研究ではセルロース源として廃棄物系バイオマスの 1/4 を占める家畜排泄物に着目した。

牛や豚等の家畜排泄物中には、生体内加工セルロースと呼ばれる消化しきれなかったセルロースが多く含まれており、我が国において牛糞は年間約 4000 万トン排出されている。牛糞は一部堆肥

に利用されているものの、大部分は廃棄物として処理されているため家畜排泄物の有効利用が望まれている³⁵⁾。そこで、本研究では、まず生体内加工セルロース(牛糞)からのグルコース生成法の探索を行った。すなわち、酵素糖化処理による生成効率の向上を目的とした生体内加工セルロースの前処理法の検討並びに牛唾液による酵素糖化促進効果の検討を行った。また、得られたグルコースを電気エネルギーとして利用するために、グルコースを効率的に酸化させる金属ナノ粒子触媒の検討及び実用化に向けた直接グルコース形燃料電池の開発を行うこととした。実際は、これらの要素技術を実用化させるためには、本研究の検討事項以外にも数多くの課題が存在する。表 1-10 ならびに表 1-11 にセルロースからのグルコース生成および直接グルコース形燃料電池の開発における実用化に向けた課題とその解決に必要な検討項目についてそれぞれ示す。また、本論文中で実際に検討した項目については、該当する章を併せて記載した。

表 1-10 セルロースからのグルコース生成における実用化に向けた課題と検討項目

課題	検討事項
① 原料の回収	<ul style="list-style-type: none"> ・ 回収ルートの構築 ・ 回収プロセスの構築
② 効率的なグルコース生成のための前処理	<ul style="list-style-type: none"> ・ 物理的前処理の検討(第二章) ・ 生体内加工セルロースの利用(第二章) ・ 化学的前処理の検討
③ グルコースの収率向上	<ul style="list-style-type: none"> ・ 酵素の探索 ・ 糖化における至適条件の検討(第三章) ・ 酵素濃度の検討(第二章, 第三章) ・ 糖化促進物質(唾液等)の添加(第三章)
④ コストの削減	<ul style="list-style-type: none"> ・ 安価な酵素の探索 ・ 安価な酵素生成プロセスの構築 ・ 安価な酵素の精製 ・ 酵素使用量の低減 ・ 副生成物や廃棄物質の有効利用(リグニン等)

表 1-11 直接グルコース形燃料電池の開発における実用化に向けた課題と検討項目

課題	検討事項
① 出力の向上	<ul style="list-style-type: none"> ・ 高効率でグルコース酸化可能な触媒の探索(第四章) ・ 触媒の比表面積の向上(粒子径の微小化)(第四章) ・ イオン交換膜の選定(第五章) ・ 最適I/C比の検討(第五章) ・ 最適流量の検討(第五章) ・ 触媒担持量の向上 ・ 燃料を効率的に供給・排出するための流路の設計 ・ 内部抵抗値の低い材料の選定
② 耐久性の向上	<ul style="list-style-type: none"> ・ 劣化メカニズムの解明 ・ 劣化の加速試験
③ コストの削減	<ul style="list-style-type: none"> ・ 貴金属触媒に替わる安価な触媒の探索 ・ 電極セルの低コスト化 ・ 廃液および反応生成物の有効利用
④ 安全な溶媒の使用	<ul style="list-style-type: none"> ・ KOH量の削減 ・ KOH水溶液に替わる安全性の高い溶媒の探索 ・ pHが中性条件下での検討

以上、本研究で、得られた知見を発展させることができれば、将来のエネルギー開発の一助となることが期待できると考え、廃棄物の有効利用の観点から生体内加工セルロース(牛糞)をセルロース源(基質)とした効率的なグルコース生成プロセスを構築すること、並びに、そこで得られたグルコースを燃料として電気エネルギーに変換させることにより、CO₂やNO_x等の環境負荷物質を排出しないクリーンで安全な発電法である直接グルコース形燃料電池の性能向上を目指した。

1.4 本論文の構成

本論文は「生体内加工セルロース(牛糞)を基質としたグルコース生成法とこれを燃料として利用した直接グルコース形燃料電池の開発」と題し、第一章 緒論、第二章 生体内加工セルロース(牛糞)からのグルコース生成法の検討、第三章 牛唾液によるセルラーゼ糖化促進効果の作用機序に関する検討、第四章 貴金属触媒のグルコース酸化特性と電気化学的評価、第五章 Pt-Au 金属触媒を用いた直接形グルコース燃料電池の最適発電条件の検討、第六章 総括の全六章より構成される。

第二章では、牛糞由来の生体内加工セルロースからグルコースへの糖化における種々の物理的前処理法の影響について検討を行った。セルロースをセルラーゼで分解させるには、原料を粉碎し膨軟化して、セルラーゼとセルロースの接触効率を向上させる必要がある。しかし、セルロースは強固な結晶構造を有していることから、その前処理技術が重要となっている。本研究では、物理的前処理法として、ミキサー粉碎、乳鉢粉碎、遊星ボールミルを用いることで牛糞中のセルロースの微細化

に成功した。また、それぞれのセルロース基質を酵素により糖化した結果、遊星ボールミルを用いたときの糖化性が最も高かった。特に、遊星ボールミルの回転数を 750 rpm、酵素として 20 mg/mL Meicelase を用いて反応させた場合、牛糞基質(乾燥重量)1 g あたりから得られるグルコース量は 192.6 mg/g (収率 80%) であり、最も高い収率でグルコースが得られることが分かった。以上より、牛糞中に含まれる生体内加工セルロースから効率的にグルコースを生成できることが分かった。

第三章では、牛唾液によるセルラーゼ糖化促進効果の作用機序に関する検討を行った。反芻動物は稲わらなどの植物、つまりセルロースを食べることで生活に必要なエネルギーを得ているが、セルロースを円滑に消化されやすい形にする役割を担っているのが唾液である。そこで牛の唾液がセルロース酵素糖化に及ぼす効果について詳細な検討を行った。その結果、セルロース基質-セルラーゼ溶液に牛唾液を添加することにより還元糖の収量は約 15 倍向上することが分かった。一方、基質-牛唾液溶液では還元糖の生成が確認されなかったことから、唾液が基質を直接糖に変換しているのではなく、セルロース分解反応を促進する作用があることが示唆された。そこで、牛唾液中に含まれるセルラーゼ促進物質の探索を行ったところ、分子量 14 kDa 以上 100kDa 未満の高分子がセルラーゼ促進物質であることが示唆された。セルロース分解反応の促進メカニズムについて検討するため、牛唾液の表面張力測定を行ったところ、界面活性を示すことが分かった。以上より、牛唾液中の高分子がセルロース分解の際にセルラーゼの安定性を高めるとともに、セルロース表面への不活性なセルラーゼの不可逆的な吸着を抑制するため、微結晶セルロース糖化効率が向上したと考えられる。

第四章では、貴金属ナノ粒子触媒のグルコース酸化特性と電気化学的評価を行った。安定な高分子であるグルコースの酸化により電気エネルギーを得るためには高活性な触媒を選択する必要がある。そこで、種々の金属ナノ粒子触媒(Pt, Au, Pd, Ru)のグルコース酸化特性について検討した結果、Pt ナノ粒子触媒および Au ナノ粒子触媒を用いたときにグルコース酸化が促進されることが分かった。また、高活性を示した Pt と Au を組み合わせた Pt-Au 合金ナノ粒子触媒を用いたところ、Pt:Au=1:4 の比率で調製したとき、単一の金属粒子よりも 5 倍以上のグルコース酸化特性を示すことが分かった。そこで、次に Pt-Au 合金ナノ粒子触媒におけるグルコース酸化特性を向上させるため、ナノ粒子触媒の分散剤として用いているポリビニルピロリドン(PVP)の濃度の影響について検討した。その結果、PVP を使用していない Pt-Au 合金ナノ粒子触媒における酸化ピーク時の電流密度値は 7 mA/cm² であったが、PVP 濃度の増加に伴い電流密度値が上昇し、[PVP] / [metal] = 1 の時に 10 mA/cm² で最大となった。一方、PVP 濃度が高い[PVP] / [metal] = 10 における電流密度値は 4 mA/cm² と減少することが分かった。これは金属ナノ粒子表面に PVP が過剰量吸着しグルコース酸化に係る金属ナノ粒子表面が PVP で被覆されるために、電流密度値が低下したものと推察される。

第五章では、Pt-Au 金属触媒を用いた直接グルコース形燃料電池の最適発電条件の検討を行った。その結果、燃料電池の電極部に用いるイオン交換膜としてカチオン交換膜を用い、電極素材と触媒を結着させるためアイオノマーの量を[アイオノマー質量]/[触媒炭素質量]比=0.1 としたときに、最も高い出力密度が得られることが分かった。また、アノードにグルコース燃料(0.4 M グルコース/1.0

M KOH 水溶液)を流速 5 mL/min で供給し、カソードに加湿混合空気を 2 L/min で供給することにより、室温条件下で 13.9 mW/cm^2 の出力を得ることができた。この値は、これまで報告されている Pt-Au 触媒を用いた燃料電池の中で最も高い値である。次に、このシングルセルを重ね合わせたスタック式直接グルコース形燃料電池 (スタック数:20) を作製したところ、12 V 7 Ah 型の蓄電池へ充電できることが分かった。バッテリーに蓄電された電力は、コンバーターやインバーターを用いて日常の家電製品等を稼働させることも可能であることから、低コストでクリーンな発電システムの一つになることが期待できる。

第六章では、これまでの結果をもとに、生体内加工セルロース(牛糞)からのグルコース生成法からグルコースを燃料として用いた直接グルコース形燃料電池の開発までの本論文の総括を述べた。

1.5 参考文献

- 1) 日本エネルギー学会編, “バイオマスハンドブック”, オーム社 (2009).
- 2) 磯貝明, “セルロースの科学”, 朝倉書店 (2003).
- 3) NEDO, “NEDO-GET-9815(平成 10 年度調査報告書「バイオマス資源を原料とするエネルギー変換技術に関する調査」)”, NEDO (1998).
- 4) 農林水産省 HP, “家畜排せつ物の発生と管理の状況”,
http://www.maff.go.jp/j/chikusan/kankyo/taisaku/t_mondai/02_kanri/ (2014 年 1 月 20 日 現在)
- 5) 畜産環境整備機構 編, “家畜ふん尿処理・利用の手引き”, 畜産環境整備機構 (1998).
- 6) 松崎敏英, “家畜ふん尿の利用と処理”, 農山漁村文化協会 (1979).
- 7) 今野絵奈, 高柳長直, “大規模養豚産地における家畜排せつ物の処理形態と堆肥の利用, 農村研究”, **113** (2011).
- 8) 菊地由希子, “効率的なセルロース酵素糖化法の検討及び乳酸発酵への応用”, 東京理科大学大学院理工学研究科工業化学専攻平成 26 年度修士学位論文.
- 9) 吉本遼, “生体加工セルロース(家畜排泄物)の成分分析および糖化法の検討”, 東京理科大学大学院理工学研究科工業化学専攻平成 26 年度修士学位論文.
- 10) 坂口謙吾, バイオ発電, ワック (2008).
- 11) E. Takashi, Y. Shinichi, I. Hiroyuki, S. Shigeki, *Journal of Japan Institute of Energy*, **87**, 430 (2008).
- 12) F. Shinji, I. Hiroyuki, Y. Shinichi, S. Tsuyoshi, M. Tomoaki, E. Takashi, S. Shigeki, S. Kinya, *Journal of the Japan Petroleum Institute*, **51**, 264 (2008).
- 13) 磯貝明, “セルロース利用技術の最先端”, シーエム出版 (2008).
- 14) 近藤昭彦, 天野良彦, 田丸浩, “バイオマス分解酵素研究の最前線—セルラーゼ・ヘミセルラーゼを中心として—”, シーエムシー出版 (2012).
- 15) T. Thomas, M. Charles, *Biotechnology and Bioengineering*, 1321 (1977).
- 16) K. Minoru, K. Takuji, K. Isao, *Biomass*, **2**, 299 (1982).
- 17) N. Maria, M. Paloma, B. Ignacio, O. Jose, C. Araceli, B. Maecedes, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 105 (2003).
- 18) A. Mariko, E. Takashi, H. Takahiro, *Cellulose*, **11**, 163 (2004).
- 19) C. Vaccarino, R. B. Lo Curto, M. Tripodo, E. Bellocco, G. Lagana, R. Patane, *Biological Wastes*, **20**, 79 (1987).
- 20) T. Melvin, K. Kyoung, N. Mildred, N. Quang, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 105 (2003).
- 21) J. Mohammand, K. Keikhosro, *BioResources*, **2**, 472 (2007).
- 22) USDA, “World Markets and Trade(In selected countries)”, <http://www.fas.usda.gov/>
- 23) S. C. Barton, J. Gallaway, P. Atanassov, *Chem. Rev.*, **104**, 4867 (2004).
- 24) M. T. Meredith, S. D. Minter, *Annu. Rev. Anal. Chem.*, **5**, 157 (2012).

- 25) M. A. dos Santos Bernardes, “Biofuel’s Engineering Process Technology”, InTech, Rijeka, 467 (2011).
- 26) H. Sakai, T. Nakagawa, Y. Tokita, T. Hatazawa, T. Ikeda, S. Tsujimura, K. Kano, *Energy Environ. Sci.*, **2**, 133 (2009).
- 27) S. Xu, S. D. Minteer, *ACS Catal.*, **2**, 91 (2012).
- 28) E. Katz, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 6803 (2003).
- 29) K. Onishi, T. Nakamura, S. Nishihama, K. Yoshizuka, *Ind. Eng. Chem. Res.* **49**, 6554 (2010).
- 30) 吉塚和治, 西浜章平, “有価廃棄物からのレアメタルの分離回収プロセス. リサイクル・廃棄物事典”, 産業調査会, pp. 518 (2012).
- 31) (独)産業技術総合研究所, “きちんとわかる燃料電池”, 白日社 pp. 141 (2014).
- 32) 西川尚男, “燃料電池の技術 固体高分子形の課題と対策”東京電機大学出版局 pp. 1 (2010).
- 33) 藤原直子, 水素エネルギーシステム, **36**, pp. 37 (2011).
- 34) 近藤昭彦, 植田充美, “セルロース系バイオエタノール”, エヌ・ティー・エス (2010).
- 35) 畜産環境整備機構編, “家畜ふん尿処理・利用の手引き”, 畜産環境整備機構 (1998).
- 36) D. Basu, S. Basu, *Electrochim. Acta*, **56**, 6106 (2011).
- 37) N. Fujiwara, S. Yamazaki, Z. Siroma, T. Ioroi, H. Senoh, K. Yasuda, *Electrochem. Commun.*, **11**, 390 (2009).
- 38) B. I. Rapoport, J. T. Kedzierski, R. Sarpeshkar, *PLOS ONE*, **7**, e38436 (2012).
- 39) D. Basu, S. Basu, *Electrochim. Acta*, **55**, 5775 (2010).
- 40) F. M. Cuevas-Muñiz, M. Guerra-Balcázar, F. Castaneda, J. Ledesma-García, L. G. Arriaga, *J. Power Sources*, **196**, 5853 (2011).

第二章

生体内加工セルロース(牛糞)からのグルコース生成法の検討

2.1 緒言

リグノセルロース中のセルロースは糖化を妨げるヘミセルロースやリグニンに覆われており、糖化を行うには、反応を促進するための糖化法の検討およびセルロース基質に対する前処理法の検討が重要となる¹⁾。代表的な糖化法としてはセルロースを酸で分解する酸糖化法と生物化学的にセルロースを選択的に分解する酵素糖化法が挙げられる。酸糖化法は、セルロース分解能は高いが、酸による反応容器の腐食や反応後の廃液、生成したグルコースの過分解が問題となり、実用化が進んでいない¹⁾。一方で酵素糖化法は反応がマイルド²⁾で廃液が生じないことから^{3),4)}、酵素コストが高いという欠点はあるものの、コスト削減を目指し、盛んに研究が行われている⁵⁾。また、リグノセルロースの前処理法は多くの研究がなされており、大きく粉砕等の物理的前処理⁶⁻⁹⁾と酸やアルカリを用いる化学的前処理¹⁰⁻¹²⁾に大別される。その中でも物理的前処理はプロセスが少なく、廃液の問題が無く¹³⁾、かつリグノセルロースに対して効果的な方法であることが確認されている。欠点として粉砕に要するエネルギーが大きいことが挙げられるが、スケールアップを図ることで処理能力が向上するため、現時点では有用な手段であると考えられている⁵⁾。

図 2-1 に示す通り、当研究グループの坂口らにより家畜排泄物の中で牛糞はセルロース含量が多く、糖生産性ポテンシャルが高いことが明らかとなっている。また、牛糞は家畜排泄物の中でも排出量が最も多いことから¹⁴⁾、グルコース源としての利用が期待できる。しかし、牛糞からグルコースを生産する研究はこれまで行われておらず、牛糞の糖化法や前処理法に関する知見は無い。

以上の背景から、本研究では生体内加工セルロースである牛糞からのグルコース生成およびグルコース生産性向上を目的とし、牛糞に対する物理的前処理法、糖化法の検討を行った。

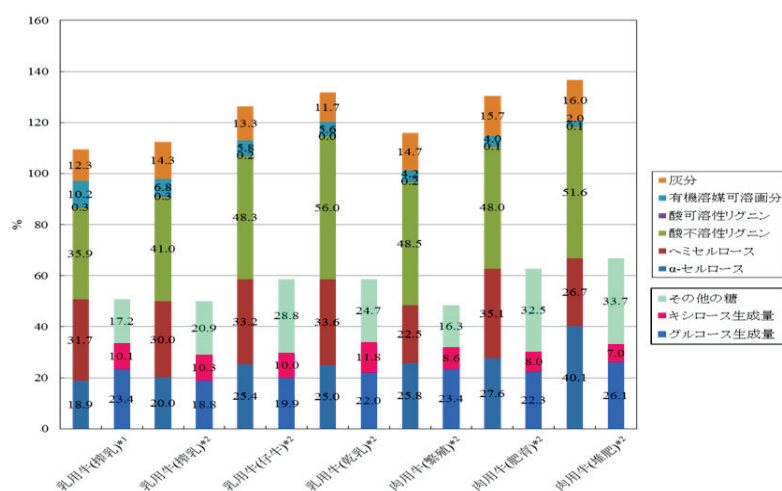


図 2-1 様々な牛糞の成分分析結果

(*1: 岩井牧場, 千葉県, *2: 矢内牧場, 福島県)

2.2 実験方法

2.2.1 試料

(1)牛糞

グルコース生成における前処理法および糖化法の検討材料として、乳用牛(搾乳牛, 岩井牧場, 千葉県)、乳用牛(搾乳牛, 矢内牧場, 福島県)、乳用牛(仔牛, 矢内牧場, 福島県)、乳用牛(乾乳牛, 矢内牧場, 福島県)、肉用牛(繁殖牛, 矢内牧場, 福島県)、肉用牛(肥育牛, 矢内牧場, 福島県)、牛糞堆肥(肥育牛, 矢内牧場, 福島県)の排泄物を用いた。

また、グルコース生産性比較の際は上記に加え、馬(千葉県)、山羊(千葉県)、豚(群馬県)、鶏(千葉県)から採取した排泄物を用いた。

(2)酵素

セルロース分解酵素として、*Trichoderma* 由来のセルラーゼ(*Trichoderma viride*, Sigma-Aldrich 社製)、同じく *Trichoderma* 由来のセルラーゼ(Meicelase, 明治製菓社製)を用いた。

(3)pH 調整剤

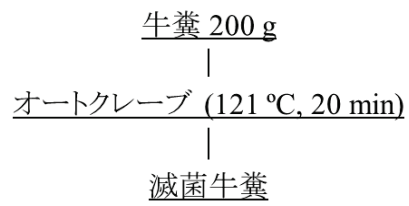
pH 調整剤として、酢酸ナトリウム(CH_3COONa , ナカライテスク社製)を用いた。

(4)グルコース定量キット

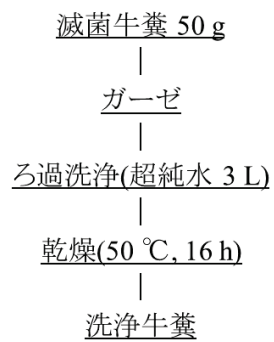
グルコース定量においてグルコース定量キット(ラボアッセイ™ グルコース, 和光純薬工業社製)を用いた。

2.2.2 物理的前処理法

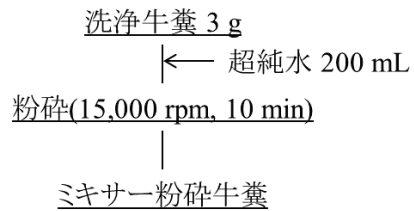
物理的前処理としては滅菌工程、洗浄工程、ミキサー粉砕工程、乳鉢粉砕工程、遊星ボールミル粉砕工程を行った。滅菌工程においては牛糞 200 g を深型シャーレに入れて、オートクレーブ処理 (BS-305, トミー精工社製, 121 °C, 20 min)を行って滅菌牛糞を得た。洗浄工程においては滅菌工程で得られた滅菌牛糞をガーゼで包み、超純水 3 L で洗浄し、その後乾燥(50 °C, 16 h)させ洗浄牛糞とした。このようにして得た洗浄牛糞を用いて、ミキサー粉砕、乳鉢粉砕および遊星ボールミル粉砕を行った。ミキサー粉砕工程においては 3 g の洗浄牛糞に対して超純水 200 mL を添加し、精密分散・乳化装置(クレアミックス, エム・テクニク社製)にて粉砕(15,000 rpm, 10 min)を行った。乳鉢粉砕工程においては洗浄牛糞 3 g を乳鉢にて粉砕(30 min)した。遊星ボールミル粉砕工程においては、ジルコニアの容器にあらかじめ水分量を測定した牛糞 0.2 g に 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液を基質濃度が 1 wt%となるよう、20 mL にメスアップさせた。そこに、10 mm ジルコニアボール 18 個を入れたものを遊星ボールミル装置(Pulverisette7 classic line, Fritsch 社製)にて 600 rpm の回転数で 10 分間の粉砕と 10 分間の休止を組み合わせた粉砕処理(含水率 98.9 %)を計 6 回行った。



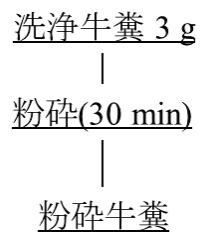
Scheme.1 滅菌工程



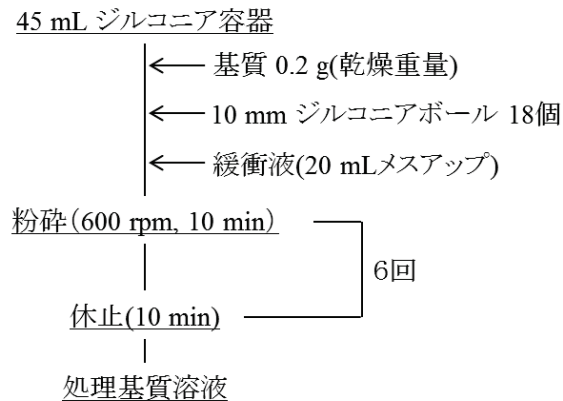
Scheme. 2 洗浄工程



Scheme. 3 ミキサー粉砕工程



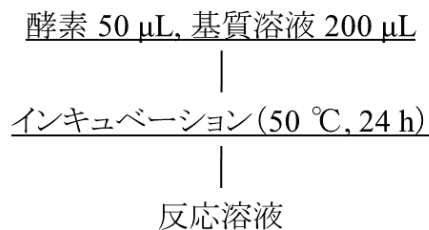
Scheme. 4 乳鉢粉砕工程



Scheme. 5 遊星ボールミル粉碎工程

2.2.3 酵素糖化法

酵素糖化工程においては、基質溶液 200 μL を 2 mL マイクロチューブに分取した。酵素溶液は *Trichoderma viride* および Meicelase にそれぞれ 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5)を添加し、各濃度に調製した。糖化反応は基質溶液 200 μL に対して酵素溶液 50 μL を添加して、反応(50 $^{\circ}\text{C}$, 24 h)させた。



Scheme.6 酵素糖化反応

2.2.4 グルコース定量

溶液中においてグルコースは α 型と β 型が一定の比率を保って存在している。そこで、まずムタロターゼを作用させることにより α -D-グルコースを β -D-グルコースに変換させた。また、 β -D-グルコースとグルコースオキシターゼ(GOD)の反応で生じる過酸化水素によって、フェノールと 4-アミノアンチピリンとが定量的に酸化縮合される。この酸化縮合により生成された赤色色素の吸光度を測定することにより、検体中のグルコース濃度を測定した¹⁵⁾。以下に実験方法を示す。

反応溶液 1.33 μL に発色試薬 200 μL を添加し反応(37 $^{\circ}\text{C}$, 5 min)させ、プレートリーダー(SpectraMax™190, モレキュラーデバイス社製)で吸光度(505 nm)を測定した。また、検量線はグルコース標準液を用いて作成した。

反応溶液・標準液 1.33 μL , 発色試薬 200 μL

インキュベーション (37 $^{\circ}\text{C}$, 5 min)

吸光度測定 (505 nm)

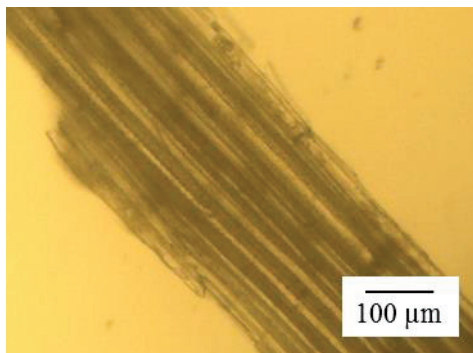
Scheme. 7 グルコース定量

2.3 結果および考察

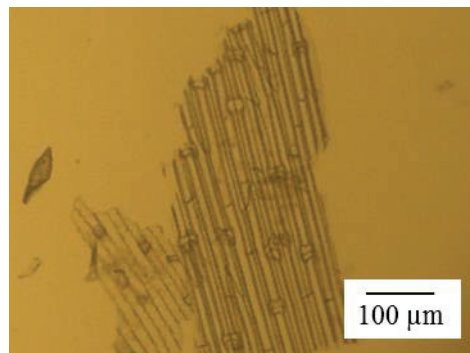
2.3.1 物理的前処理法の検討

2.3.1.1 光学顕微鏡観察

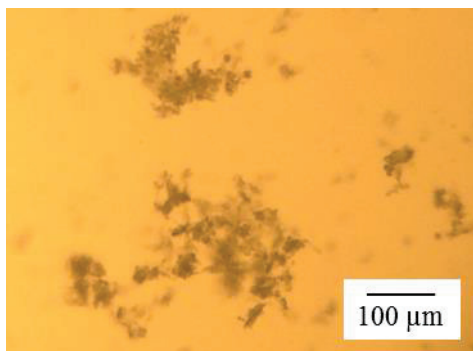
物理的前処理を行った牛糞基質の変化を検証するために光学顕微鏡観察を行った。図 2-2 はそれぞれ洗浄工程、ミキサー粉碎工程、乳鉢粉碎工程、遊星ボールミル粉碎工程を施した後の牛糞の光学顕微鏡観察結果を示す。



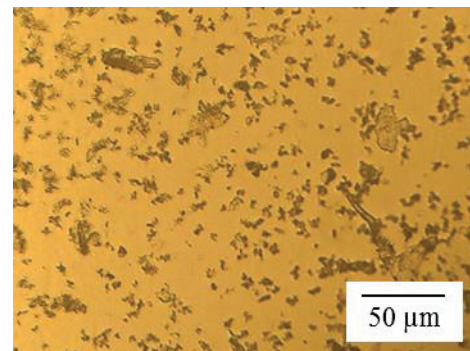
洗浄工程後



ミキサー粉碎工程後



乳鉢粉碎工程後



遊星ボールミル粉碎工程後

図 2-2 物理的前処理を施した基質の光学顕微鏡観察結果

洗浄工程後においてはセルロースの繊維質がはっきりと見え、粒子径は1 mmを超えていた。ミキサー粉碎工程を施した場合、洗浄工程後と比べると粒子径は減少し、約500 μm程度のものが多く見られた。乳鉢粉碎工程後においては粒子径は40 μm以下まで減少するが、粒子同士の凝集が見られた。遊星ボールミル粉碎工程後では50 μm程度の粒子も見られるが、10 μm以下の微細な粒子も数多く見られた。また乳鉢粉碎工程と比較して、微細粒子の凝集の程度は小さかった。以上より、牛糞の物理的前処理においては遊星ボールミル粉碎が最も有効であることが分かった。

ミキサー粉碎および遊星ボールミル粉碎はどちらも湿式機械的粉碎であるが、ミキサー粉碎は開放系、遊星ボールミル粉碎は密閉系で行った。どちらも粉碎中に溶液の温度上昇が確認された。遊星ボールミルを使用する際は10分間の粉碎と10分間の休止を繰り返すことで、過度な温度上昇が起これないように留意したが、密閉系であるので、加圧加温状態になっていたことも考えられ、ボールがセルロース基質に衝突することで起こる物理的な変化に加え、セルロース基質の化学的な物質変化が起こっていたこと(メカノケミカルリアクション)も考えられる。

2.3.1.2 酵素糖化

洗浄等の工程を一切行っていない未処理の牛糞に酵素を添加したところ、グルコースの生成は確認できなかった。セルロース基質は一般的に粉碎等の物理的前処理を施すことで酵素糖化が促進され、グルコース生成量が増加することが知られている¹⁾。よって牛糞中のセルロースからグルコースを生産するために牛糞に対して物理的前処理を施し、酵素糖化を促進することでグルコース生産を試みた。図 2-3 は牛糞(乳用牛, 搾乳牛, 岩井牧場)に対し、洗浄、ミキサー粉碎、乳鉢粉碎、遊星ボールミル粉碎を行い、酵素(*Trichoderma vidide*)によって糖化した結果を示す。

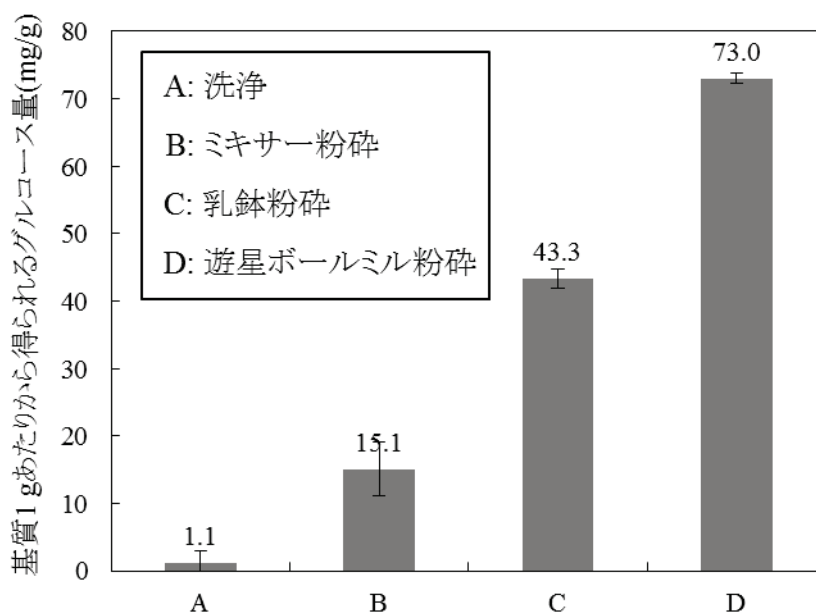


図 2-3 種々の物理的前処理を施した基質の酵素糖化結果

洗浄は物理的前処理ではなく単なる牛糞の洗浄作業であり、ミキサー粉砕、乳鉢粉砕、遊星ボールミル粉砕の比較として載せた。遊星ボールミル粉砕を行ったときに最もグルコース生成量が多く、乳鉢粉砕、ミキサー粉砕、洗浄という順に少なくなった。2.3.1.1の各前処理基質の光学顕微鏡観察結果において洗浄から遊星ボールミル粉砕にかけて基質粒子径の減少が見られたことから洗浄、ミキサー粉砕、乳鉢粉砕、遊星ボールミル粉砕の順に粉砕力が増加し、基質粒子径が減少したため、セルロース基質と酵素の反応性が向上してグルコース生成量が増加したと考えられる。

以上より遊星ボールミルを用いた物理的前処理は牛糞糖化において高い効果を示すことが分かった。また、回転数や時間を任意に設定することができるため、定量性の面でも優れていると考えられる。

2.3.1.3 牛糞中の基質量に及ぼす洗浄処理の影響

2.3.1.2で示した物理的前処理法の検討は、単純に牛糞中のセルロースに対する前処理法の比較を行うことを目的にしていたので、牛糞中の不純物の影響を減らすために牛糞は洗浄したものをを用いた。しかし、実用化を目指す上では不純物の影響を考慮し、資源のロスを抑え、プロセスの簡略化を行う必要がある。そこで、本項では牛糞に洗浄処理を施したときの基質の流出量について検討した。図2-4は牛糞の洗浄前と洗浄後の重量変化を示す。

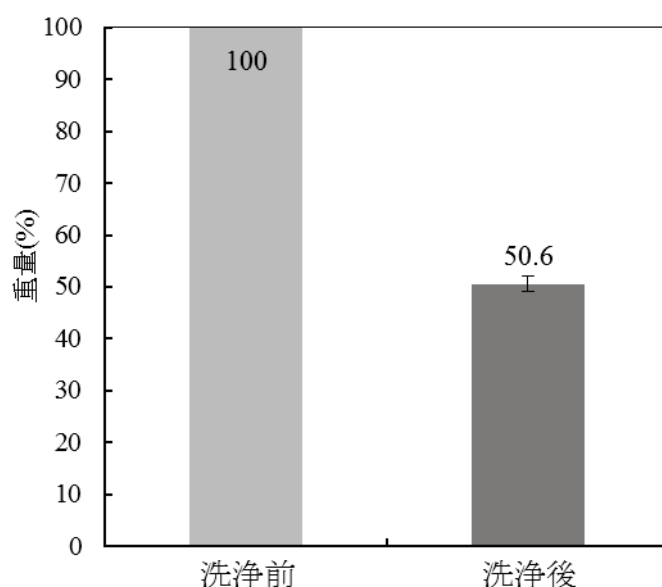


図2-4 牛糞の洗浄前後の重量変化

その結果、洗浄前を100%とすると洗浄後には50.6%となっており、基質量は半減することが分かった。牛糞中にはセルロース以外の不純物も含まれており、それらが流出したことが考えられるが、それに加えて微細なセルロースが流出したことも考えられる。

そこで、本項以降に示す遊星ボールミルの詳細な条件の検討(2.3.2 項)や様々な牛糞を用いたときのグルコース生産性の比較検討(2.3.3 項)においては、実用化を見据え、資源のロスを抑えるために未洗浄牛糞を用いて検討を行った。

2.3.2 遊星ボールミル処理法の検討

2.3.1 ではグルコース糖化の前処理として遊星ボールミル処理が最も効果が高いことを示した。そこで、本項では遊星ボールミルの回転数(最高回転数, 750 rpm)が基質粒子径や糖化性に与える影響について検証した。

2.3.2.1 粒子径評価

遊星ボールミルの回転数が基質粒子の粒子径に及ぼす影響を検証した。図 2-5 に遊星ボールミルの回転数を 450 rpm、600 rpm、750 rpm と変化させたときの牛糞基質の光学顕微鏡観察結果を示す。

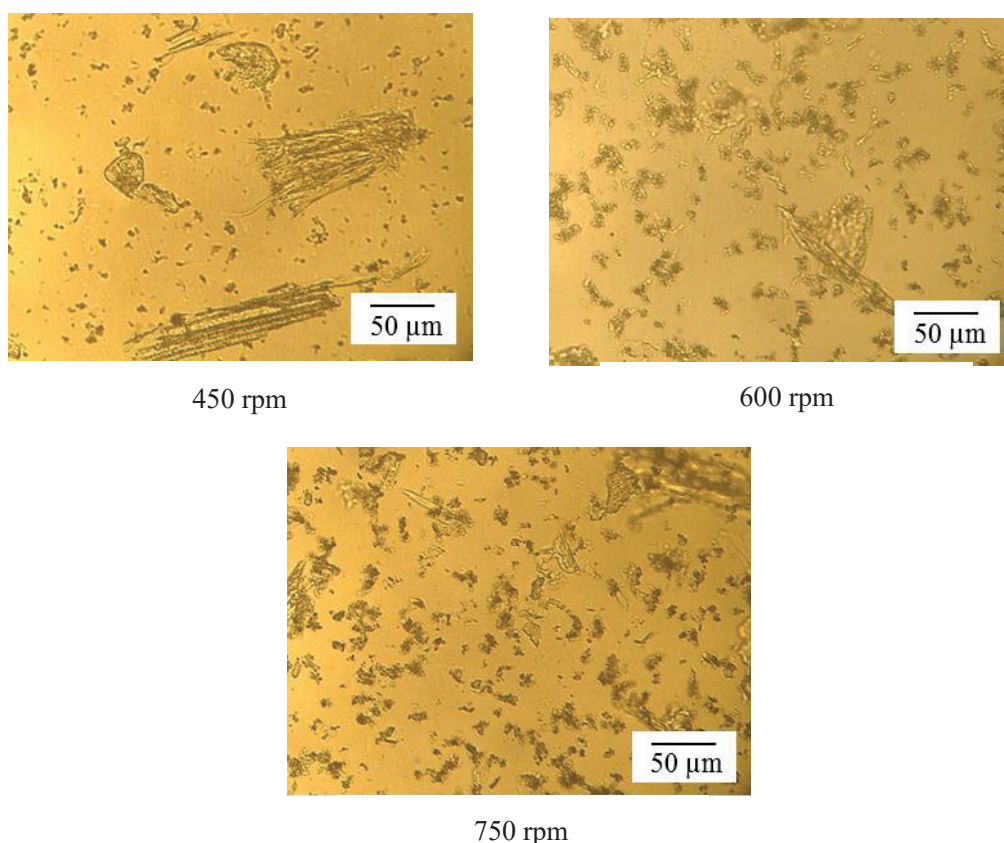


図 2-5 遊星ボールミル処理を施した基質の光学顕微鏡観察結果

その結果、回転数が増加すると粗大な繊維状の基質は観察されず、やや凝集しているものの粒子径の小さな粒子が観察された。

光学顕微鏡により観察された粒子をランダムに 300 個選択し、それぞれの粒子直径を測定して作成した粒度分布のヒストグラムを図 2-6 に示す。

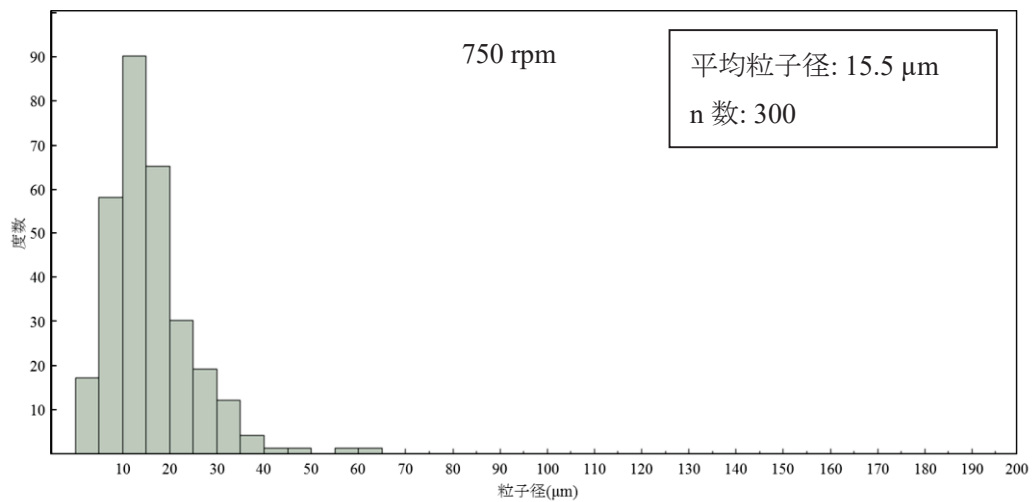
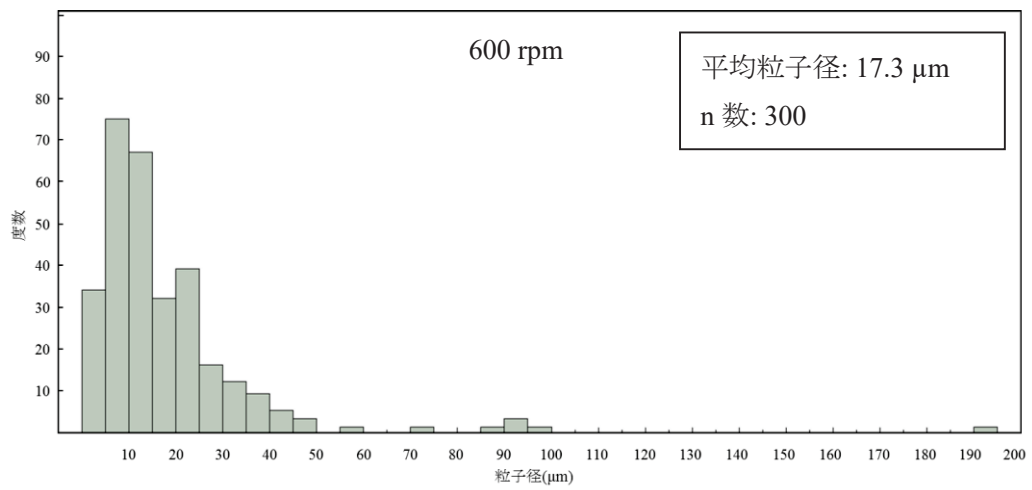
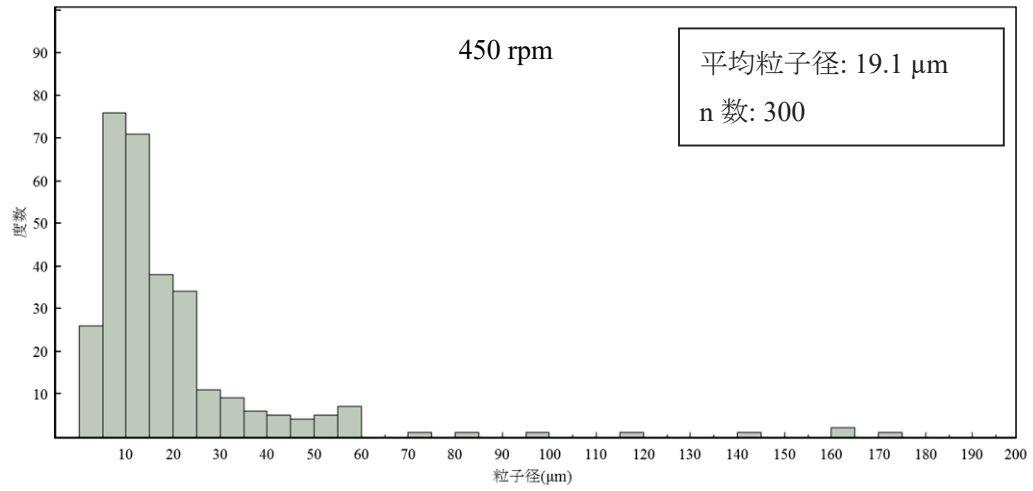


図 2-6 遊星ボールミル処理を施した基質における粒度分布

平均粒子径は遊星ボールミルの回転数が 450 rpm の粉碎基質は 19.2 μm 、600 rpm は 17.4 μm 、750 rpm は 15.6 μm であり、回転数の増加に伴い平均粒子径が減少することが分かった。平均粒子径の減少割合がそれ程大きくないのは、回転数の増加に伴い微細化された粒子の凝集割合が増加したためと考えられる。このような物理的粉碎に伴う基質の凝集は先行研究においても明らかになっている¹⁶⁾。

2.3.2.2 酵素糖化

遊星ボールミルの回転数が酵素糖化に与える影響について検証した。

図 2-7 は牛糞に対して種々の回転数で遊星ボールミル処理を施し、さらに種々の酵素 (*Trichoderma viride*) 濃度で糖化を行ったときのグルコース量を示す。

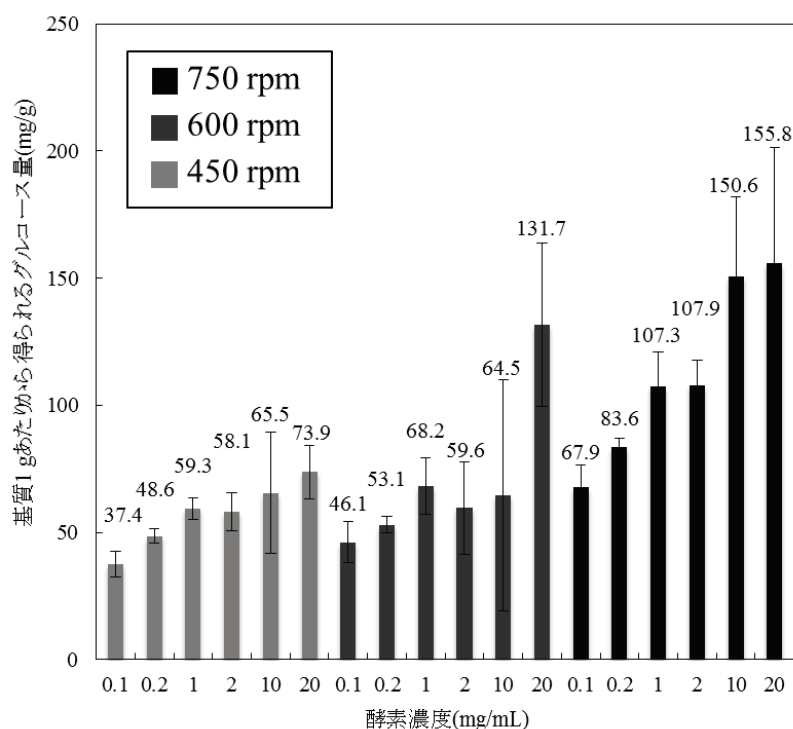


図 2-7 遊星ボールミル処理を施した基質の酵素糖化結果(酵素: *Trichoderma viride*)

遊星ボールミルの回転数は 450, 600, 750 rpm、糖化に用いた酵素の終濃度は 0.1, 0.2, 1, 2, 10, 20 mg/mL と変化させた。図の縦軸は乾燥牛糞 1 g あたりから得られるグルコース量(mg/g)を示す。遊星ボールミルの回転数の増加および酵素濃度の増加に伴いグルコース生成量は増加した。2.3.2.1 で述べたように遊星ボールミルの回転数の増加に伴い小さい基質粒子の数が増加する。したがって、遊星ボールミルの回転数の増加に伴い基質粒子の全表面積が増大し、基質-酵素の反応性が向上したためグルコース生成量が増加したと考えられる。

図 2-7 において酵素濃度を増加させるとグルコース生成量は増加するが、標準偏差も大きくなっている。ここで、図 2-7 に示したグルコース量は酵素中のグルコース量を引いた値である。酵素は菌を培養して作られるが、培養段階でグルコースを添加しており、そのグルコースは取り除かれず酵素粉末中に混入している。図 2-8 に遊星ボールミルの回転数が 750 rpm のときの酵素糖化結果を改めて示す。この図には総グルコース量(測定値)、酵素中のグルコース量、総グルコース量から酵素中のグルコース量を引いた実際のグルコース量を示した。

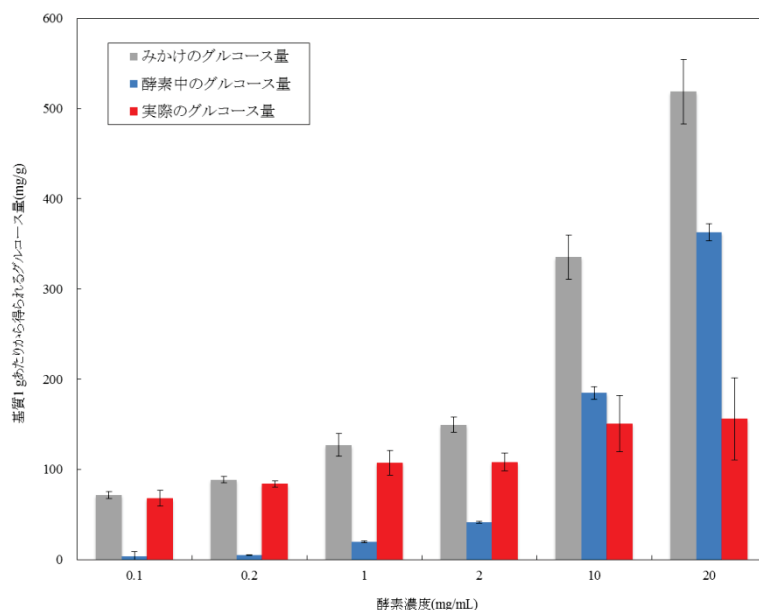


図 2-8 遊星ボールミル処理(750 rpm)を施した基質の酵素糖化結果

酵素濃度が上昇すると酵素中のグルコース量が増えているのが確認できる。よって、セルロースの糖化によるグルコース生成量の誤差に酵素中のグルコース量の誤差が加わったことで標準偏差が大きくなってしまったと考えられる。

次に、酵素を変えても同様に遊星ボールミルの回転数の増加および酵素濃度の増加に伴いグルコース生成量が増加するか、検討を行った。

図 2-9 に酵素として Meicelase(明治製菓社製)を用い、先ほどと同様に遊星ボールミルの回転数と酵素濃度を種々変化させて糖化したときのグルコース生成量を示す。

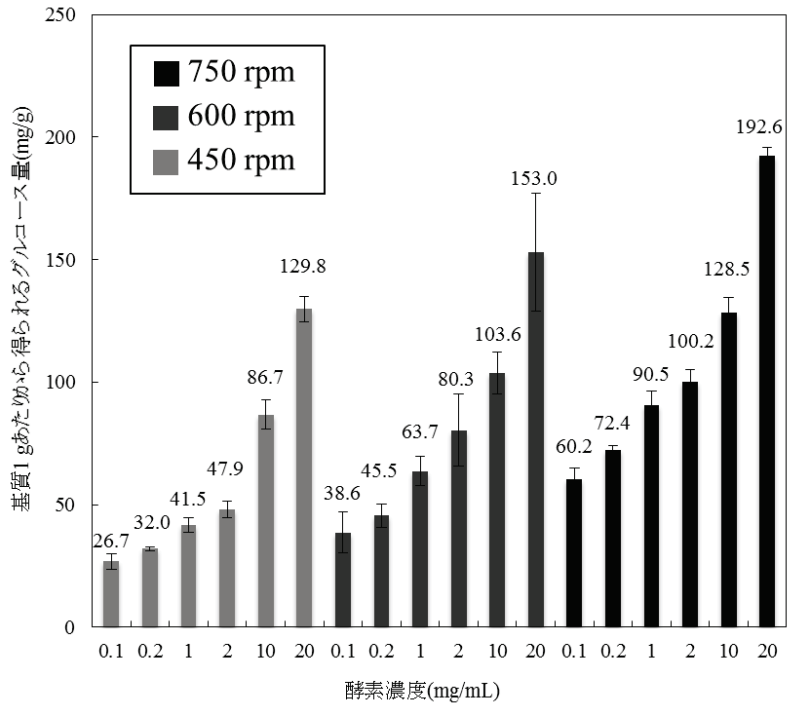


図 2-9 遊星ボールミル処理基質の酵素糖化結果(酵素: Meicelase)

その結果、遊星ボールミルの回転数の増加および酵素濃度の増加に伴いグルコース生成量は増加した。これは酵素に *Trichoderma viride* を用いたときと同様の挙動である。よって、遊星ボールミルの回転数および酵素濃度の増加に伴いグルコース生成量が増加する傾向は酵素によらないことが分かった。

また、Meicelase を用いた時は *Trichoderma viride* を用いた時に比べ酵素濃度の増加に伴う標準偏差の拡大が少なかった。図 2-10 に Meicelase を用い、遊星ボールミルの回転数が 750 rpm の酵素糖化結果を改めて示す。

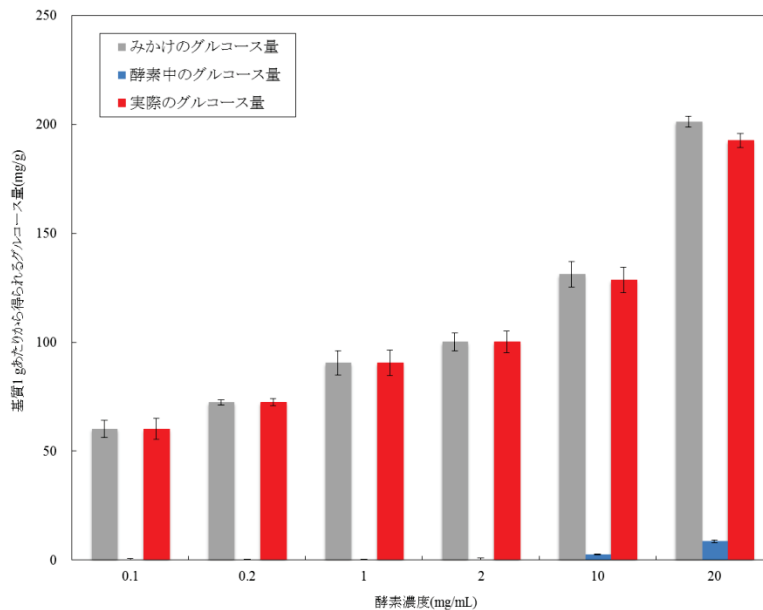


図 2-10 遊星ボールミル処理(750 rpm)基質の酵素糖化結果

この図には先ほどと同様に総グルコース量(測定値)、酵素中のグルコース量、総グルコース量から酵素中のグルコース量を引いた実際のグルコース量を示した。その結果、酵素濃度の増加に伴い酵素中のグルコース量は増加するが、*Trichoderma viride*と比較して酵素中のグルコース量はかなり少ないことが分かった。これにより酵素濃度の増加に伴う標準偏差が *Trichoderma viride* に比べ小さかったと考えられる。

本研究において最もグルコース生成量が多かったのは、遊星ボールミルの回転数が 750 rpm で酵素に 20 mg/mL Meicelase を用いたときであり、基質 1 g あたりから得られるグルコース量は 192.6 mg/g であった。牛糞中に含まれる全グルコース量は 240.0 mg/g であったことから、牛糞からのグルコース収率は 80.3%となった。よって牛糞は遊星ボールミルで粉砕することにより、現段階で約 80% 糖化できることが分かった。また、酵素濃度を 10 mg/mL から 20 mg/mL に増加させた際にグルコース量が急激に増加した理由としては、生体内加工セルロース(牛糞)中にはリグニン等のセルラーゼを吸着してしまう成分が含まれており、酵素濃度が低濃度(10 mg/mL 以下)では系内の多くのセルラーゼがリグニン等に吸着してしまうため、糖化に作用するセルラーゼの量は減少していると推察される。しかし、酵素濃度の増加に伴い、やがてリグニン等への吸着量は飽和に達するため、それ以上の濃度では増加分のセルラーゼが直接糖化に作用することで、10 mg/mL 以上の酵素濃度において、グルコース量が急激に増加したものと考えられる。

2.3.3 様々な牛糞のグルコース生産性比較

様々な牛糞を原料として用いたときのグルコース生産性について比較するため、成分分析および糖ポテンシャル評価を行った乳用牛と肉用牛の排泄物について遊星ボールミル粉碎を行い、グルコース生産性の比較を行った。図 2-11 は乳用牛(搾乳牛, 岩井牧場, 千葉県)、乳用牛(搾乳牛, 矢内牧場, 福島県)、乳用牛(仔牛, 矢内牧場, 福島県)、乳用牛(乾乳牛, 矢内牧場, 福島県)、肉用牛(繁殖牛, 矢内牧場, 福島県)、肉用牛(肥育牛, 矢内牧場, 福島県)、堆肥(肥育牛, 矢内牧場, 福島県)の排泄物を遊星ボールミルで粉碎(750 rpm, 1 h)し、1 mg/mL Meicelase により糖化を行った結果を示す。

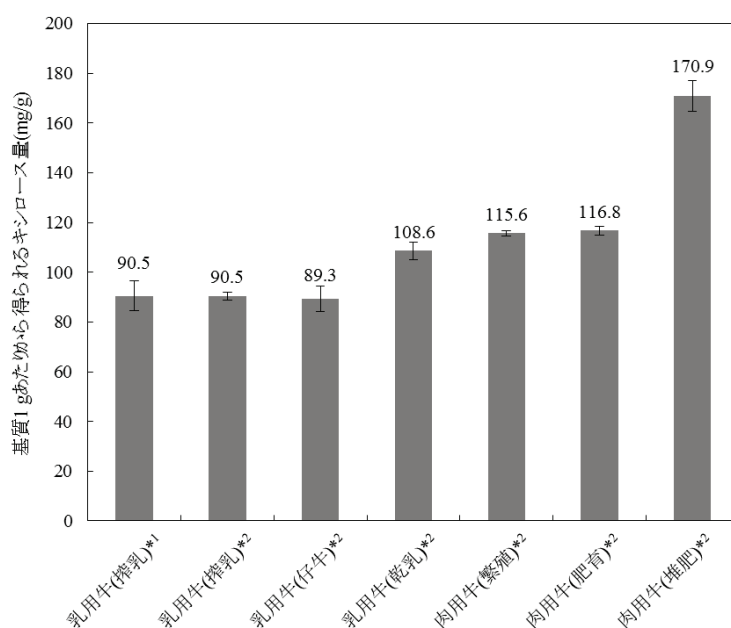


図 2-11 様々な牛糞のグルコース生産性比較

(*1: 岩井牧場, 千葉県、*2: 矢内牧場, 福島県)

その結果、全ての牛糞からグルコースを生成できることが分かった。グルコース量は肉用牛(堆肥)*2が最も多く、乳用牛(乾乳)*2、肉用牛(繁殖)*2、肉用牛(肥育)*2がほぼ同量で次に多く、その次に乳用牛(搾乳)*1、乳用牛(搾乳)*2、乳用牛(仔牛)*2という結果になった。肉用牛(堆肥)*2が最もグルコースの生成が多かった理由としては、堆肥用と用いることから、発酵させやすくするため、おが屑を多く含ませている。従って、糖化の際にこれらの木質成分もセルラーゼにより糖化したためと考えられる。この結果は、当研究グループの坂口らによる先行研究で行った、各排泄物の成分分析および糖ポテンシャル評価と相関が見られ、 α -セルロース量および全グルコース量が多いものは酵素を用いたグルコース生産においても高いグルコース生成量を示すことが分かった。また、乳用牛と肉用牛の排泄物のグルコース生産性に大きな差は見られなかったため、乳用牛と肉用牛の排泄物はどちらもグルコース生産に用いることができることが示唆された。

また、様々な家畜排泄物(牛、馬、山羊、豚、鶏)に対してもグルコース生産性の比較を行った。図 2-12 は、牛、馬、山羊、豚、鶏の排泄物を遊星ボールミルで粉砕(750 rpm, 1 h)し、1 mg/mL Meicelase により糖化を行った結果を示す。

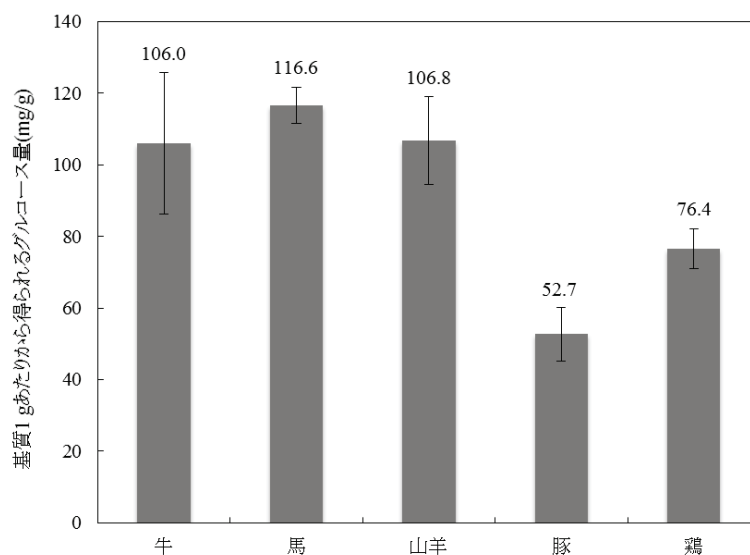


図 2-12 様々な家畜排泄物のグルコース生産性比較

その結果、全ての家畜排泄物からグルコースが生成した。牛、馬、山羊は、標準偏差は大きいがほぼ同程度のグルコースが得られ、豚、鶏に比べてグルコース生産量が多かった。また、鶏は次に多く、豚が最も少なかった。以上より全ての家畜排泄物はグルコース生産に用いることができ、特に牛、馬、山羊のグルコース生産性が高いことが明らかになった。

2.4 結言

本章では「生体内加工セルロース(牛糞)からのグルコース生成法の検討」と題して、牛糞の物理的前処理法および糖化法の検討を試みた。

得られた知見をまとめると以下のようなになる。

物理的前処理法の検討

牛糞に物理的前処理として洗浄、ミキサー粉砕、乳鉢粉砕、遊星ボールミル粉砕を施したところ、洗浄、ミキサー粉砕、乳鉢粉砕、遊星ボールミル粉砕の順に基質粒子径が減少し、酵素糖化によるグルコース生成量も増加することが分かった。したがって、物理的前処理法としては遊星ボールミル粉砕が最も適していることが分かった。

遊星ボールミル処理法の検討

遊星ボールミルの回転数を種々変化させたときのグルコース糖化について検討したところ、回転数の増加に伴いグルコース生成量が増加することが分かった。これは回転数の増加により、小さな基質粒子の数が増加し、基質と酵素の反応性が向上したためであると考えられる。

様々な牛糞のグルコース生産性比較

様々な牛糞を用いてグルコース糖化を行ったところ、乳用牛と肉用牛に関わらず全ての牛糞からグルコースが得られ、グルコース生産性に大きな差は見られなかった。したがって、乳用牛と肉用牛の排泄物の両方からグルコース生産が可能であることが示唆された。

2.5 参考文献

- 1) 山伸也等, “バイオマスエネルギー”, 森北出版, (2009).
- 2) F. Shinji, I. Hiroyuki, Y. Shinichi, S. Tsuyoshi, M. Tomoaki, E. Takashi, S. Shigeki, S. Kinya, *Journal of the Japan Petroleum Institute*, **51**, 264 (2008).
- 3) 磯貝明, “セルロース利用技術の最先端”, シーエムシー出版 (2008).
- 4) 近藤昭彦, 天野良彦, 田丸浩, “バイオマス分解酵素研究の最前線—セルラーゼ・ヘミセルラーゼを中心として—”, シーエムシー出版 (2012).
- 5) E. Takashi, Y. Shinichi, I. Hiroyuki, S. Shigeki, *Journal of Japan Institute of Energy*, **87**, 430 (2008).
- 6) T. Thomas, M. Charles, *Biotechnology and Bioengineering*, 1321 (1977).
- 7) K. Minoru, K. Takuji, K. Isao, *Biomass*, **2**, 299 (1982).
- 8) N. Maria, M. Paloma, B. Ignacio, O. Jose, C. Araceli, B. Maecedes, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 105 (2003).
- 9) A. Mariko, E. Takashi, H. Takahiro, *Cellulose*, **11**, 163 (2004).
- 10) C. Vaccarino, R. B. Lo Curto, M. Tripodo, E. Bellocco, G. Lagana, R. Patane, *Biological Wastes*, **20**, 79 (1987).
- 11) T. Melvin, K. Kyoung, N. Mildred, N. Quang, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 105 (2003).
- 12) J. Mohammand, K. Keikhosro, *BioResources*, **2**, 472 (2007).
- 13) E. Takashi, Y. Shinichi, I. Hiroyuki, S. Shigeki, *Journal of Japan Institute of Energy*, **87**, 430 (2008).
- 14) 農林水産省 HP, “家畜排せつ物の発生と管理の状況”,
http://www.maff.go.jp/j/chikusan/kankyo/taisaku/t_mondai/02_kanri/ (2014年1月20日 現在)
- 15) 和光純薬工業 HP, “ラボアッセイ™ グルコース”,
<http://www.siyaku.com/uh/Shs.do?dspWkfcodes=298-65701> (2014年1月20日 現在)
- 16) 遠藤貴士, 北川良一, 広津孝弘, 細川純, *高分子論文集*, **56**, 166 (1999).

第三章

牛唾液によるセルラーゼ糖化促進効果の作用機序に関する検討

3.1 緒言

近年、化石燃料枯渇への危惧から、石油資源に代わる新たなエネルギー源として単糖であるグルコースが注目されている¹⁾。グルコースはバイオエタノールやポリ乳酸などの様々な工業用途に利用可能であるが、グルコースを工業的規模で用いるためには、安価にかつ大量に生産させることが必須である。そこで古くから着目されているのが、非可食性であり世界最大のバイオマス資源を誇るセルロース系バイオマスからのグルコース生産である。表 3-1 に示す通り、セルロース分解酵素であるセルラーゼを用いた酵素糖化法は、環境への負荷が少なく、またグルコースの過分解が起こらないことから注目されている。しかし、セルロースは強固な結晶構造を有しており、セルロース分解には大量の酵素が必要とされるため、糖化する際の酵素使用量の低減が課題となっている。

表 3-1 種々のセルロース分解法における長所・短所

分解法	長所	短所
硫酸法	・セルロースの分解能が高い	・糖の過分解が起こる ・中和時の生成物の処理が困難 ・耐薬品プラントの整備 (コスト高)
酵素法	・安定な反応系で確実にグルコースへ分解可能	・長い反応時間を要する ・前処理により糖化率が変化する ・大量に用いる必要がある(コスト高)

そこでこれらの課題を解決するために、セルラーゼによるセルロース加水分解効率を向上させる添加物質に関する検討が数多く行われている。例えば、界面活性剤や牛血清アルブミン(BSA)が挙げられ、それぞれセルラーゼによるセルロース加水分解効率を向上させることが報告されている^{2) 5)}。

本研究では、生物学的見地から新たな糖化促進物質を探索することとした。中でも牛などの反芻動物の消化プロセスに、効率的なセルロース分解を行う上でのヒントがあるのではないかと考えた。反芻動物は稲わらなどの植物、つまりセルロースを食べることで生活に必要なエネルギーを得ている。その消化の過程では、強固な結晶構造であるセルロース繊維を物理的に破壊する咀嚼、一度飲み込んだ餌を再び口の中に戻し再咀嚼する反芻、そしてこれらの工程を繰り返すことで餌を消化しやすくしている。このときに餌であるセルロースを、円滑に消化されやすい形にする役割を担っているのが唾液である⁶⁾。そこで本研究では、唾液にセルロース分子間の相互作用を弱める働きがあるという仮定に基づき、牛の唾液がセルロース酵素糖化に及ぼす効果について詳細な検討を行うこととした。

3.2 実験方法

3.2.1 試薬及び使用装置

試薬

(1)基質

牛唾液によるセルロース糖化促進効果の検討基質として微結晶セルロース(Merck 社製)を用いた。

(2)酵素

セルロース分解酵素として、Trichoderma 由来のセルラーゼ(Trichoderma viride, Sigma-Aldrich 社製)を用いた。

(3)pH 調整剤

pH 調整には酢酸(ナカライテスク社製)、酢酸ナトリウム(ナカライテスク社製)、クエン酸(ナカライテスク社製)、クエン酸ナトリウム(ナカライテスク社製)、リン酸水素二ナトリウム(ナカライテスク社製)、リン酸二水素ナトリウム(ナカライテスク社製)を用いた。

(4)還元糖量定量

還元糖量の定量には、硫酸銅五水和物 (Wako 社製)、炭酸ナトリウム(Wako 社製)、酒石酸ナトリウムカリウム(ナカライテスク社製)、炭酸水素ナトリウム(ナカライテスク社製)、モリブデン酸アンモニウム(ナカライテスク社製)、濃硫酸(ナカライテスク社製)、ヒ酸二ナトリウム(ナカライテスク社製)を用いた。

(5)セルラーゼ活性促進助剤

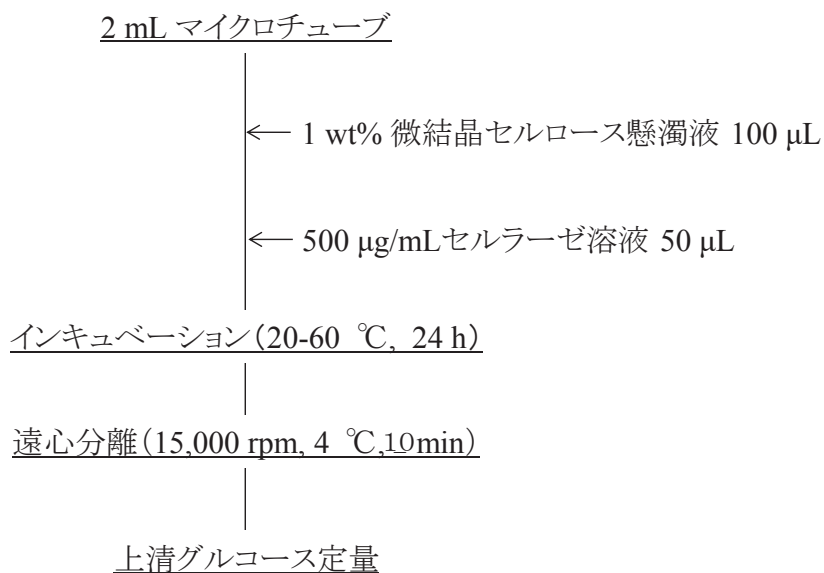
セルラーゼ活性促進助剤として PEG4000(ナカライテスク社製)、Tween20 (Wako 社製)、BSA (CALBIOCHEM 社製)を用いた。

(6)水

超純水装置(ミリポア社製)により精製した MilliQ 水を用いた。

3.2.2 酵素至適条件の決定

市販のセルラーゼ粉末 Cellulase from *Trichoderma viride* の至適 pH 及び温度を決定するための実験を行った。実験方法を Scheme 3.1 に示す。基質として 1 wt% 微結晶セルロース懸濁液、酵素として 500 µg/mL セルラーゼ溶液を各 pH の 50 mM 緩衝液(表 3-2)でそれぞれ調製した。2 mL マイクロチューブに 1 wt% 微結晶セルロース懸濁液 100 µL、500 µg/mL セルラーゼ溶液 50 µL を添加した。pH 条件の検討では pH 3, 4, 5, 6, 7 の各溶液を用いて 50 °C で 24 時間インキュベーションを行った。温度条件検討では pH 4.0 の各溶液を用いて 20, 30, 37, 50, 60 °C で 24 時間インキュベーションを行った。インキュベーション後の溶液を遠心分離機(MX-201, TOMY 社製)を用いて遠心分離 (15,000 rpm, 4 °C, 10 min) し、遠心分離後の上清に対し、ムタローターゼ GOD 法によるグルコース定量を行った。



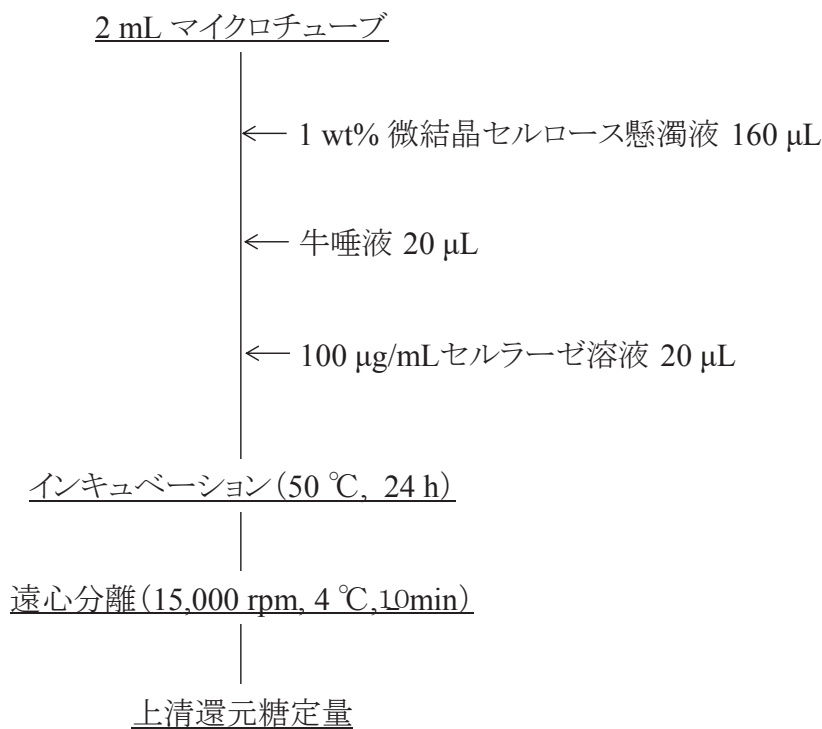
Scheme 3-1 酵素至適条件検討

表 3-2 緩衝液一覧

pH	緩衝液
3.0	クエン酸緩衝液
4.0, 5.0	酢酸ナトリウム緩衝液
6.0, 7.0	リン酸ナトリウム緩衝液

3.2.3 牛唾液を用いた微結晶セルロースの酵素糖化

牛唾液がセルロース酵素糖化に与える影響を調べるために以下の実験を行った。実験方法を Scheme 3.2 に示す。2 mL マイクロチューブに 1 wt% 微結晶セルロース懸濁液 160 μ L、牛唾液 20 μ L、100 μ g/mL セルラーゼ溶液 20 μ L をこの順で添加し反応溶液とした(最終濃度は、微結晶セルロース : 0.8 wt%, 牛唾液 : 10 vol%, セルラーゼ : 10 μ g/mL である)。反応溶液は 50 $^{\circ}$ C で 24 時間インキュベーションを行った。インキュベーション後の溶液を遠心分離 (15,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10 min) し、遠心分離後の上清に対し、ソモギネルソン法を用いた還元糖定量を行った。



Scheme 3-2 牛唾液を用いた微結晶セルロースの酵素糖化

3.2.4 牛唾液の透析処理

牛唾液中に存在する無機塩類を含む低分子化合物を除く目的で透析を行った。牛唾液 2 mL を透析チューブに入れ、超純水 2 L にて 4 $^{\circ}$ C 条件で 1 日おきに超純水を交換しながら、計 3 日間透析を行った。得られたサンプルは 3.2.3 と同様の手順で活性測定に用いた。

3.2.5 牛唾液の熱変性処理

牛唾液中に存在する活性を有する酵素などを失活させる目的でオートクレーブ (BS-305, TOMY 社製) 処理を行った。牛唾液 10 mL を 121 $^{\circ}$ C、保持時間 10 min でオートクレーブ処理を行った後、遠心分離 (15,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10 min) を行い、上清を 3.2.3 と同様の手順で活性測定に用いた。

3.2.6 牛唾液のゲル濾過クロマトグラフィー

ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて牛唾液中に存在する高分子の分画を行った。ゲル濾過クロマトグラフィー実験条件を以下に示す。

装置 : AKT Aprime (GE Healthcare 社製)

カラム : HiLord 16/600 Superdex 200 prep grade (GE Healthcare 社製)

溶離液 : 150 mM NaCl 水溶液

試料注入量 : 4 mL

流速 : 1 mL/min

溶出液分取 : 5 mL×24 本(フラクション No.1-24)

溶出液を SDS-PAGE (12.5 %ゲル) 後、銀染色 (Silver Stain KANTO III、関東化学株式会社製) を行った。フラクションは試料 (A)-(E) の 5 つに分け、得られた画分を限外濾過膜 (アミコンウルトラ 3 K デバイス、Millipore 社製、UFC900308) により濃縮を行った。試料 (A)-(E)、Mix 及び牛唾液のタンパク質濃度を測定後、各試料を 40 µg/mL に調製した。また活性測定は以下の条件で行った。2 mL マイクロチューブに 2 wt% 微結晶セルロース懸濁液 80 µL、試料 (A)-(E)、Mix 及び牛唾液 100 µL、100 µg/mL セルラーゼ溶液 20 µL をこの順で添加し反応溶液とした。反応溶液は 50 °C で 24 時間インキュベーションを行った。インキュベーション後の溶液を遠心分離 (15,000 rpm, 4 °C, 10 min) し、上清に対しグルコース定量を行った。

3.2.7 セルロースの結晶構造解析

牛唾液が微結晶セルロースの結晶構造に及ぼす影響を調べるために、X 線回折 (X' Pert Pro, PHILIPS 社製) 及び赤外吸収スペクトル (FT-IR 6100, JASCO 社製) を用いて評価を行った。唾液添加系サンプルとして 1 wt% 微結晶セルロース懸濁液 8 mL、牛唾液 1 mL、酢酸ナトリウム緩衝液 1 mL をこの順に添加したもの、唾液無添加系サンプルとして 1 wt% 微結晶セルロース懸濁液 10 mL を調製し、50 °C で 24 時間インキュベーションを行った。その後、吸引濾過を行い、60 °C 恒温槽で 1 日以上乾燥させ測定サンプルとした。

3.2.8 添加順序に関する検討

セルロース、セルラーゼ、牛唾液の添加順序が及ぼす影響について調べるために以下の 5 パターンで検討を行った。添加順序以外は 3.2.3 と同様に実験を行った。

- ①セルロース+唾液+セルラーゼ(24 h)
- ②セルロース+唾液(1 h)→セルラーゼ(24 h)
- ③セルラーゼ+唾液(1 h)→セルロース(24 h)
- ④セルロース+セルラーゼ(1 h)→唾液(24 h)

⑤セルロース+唾液+セルラーゼ(25 h)

3.2.9 糖定量

3.2.9.1 ムタロターゼ GOD 法によるグルコース定量

グルコース定量はラボアッセイ™グルコース(和光純薬社製)を用いて行った。発色試薬(60 mmol/L, pH 7.1 リン酸緩衝液、5.3 mmol/L フェノール、0.13 units/mL ムタロターゼ、9.0 units/mL グルコースオキシダーゼ、0.65 units/mL ペルオキシダーゼ、0.50 mmol/L 4-アミノアンチピリン、2.7 units/mL アスコルビン酸オキシダーゼ) 200 μ L、測定試料 1.33 μ L を 96 ウェルマイクロプレート内で混合し、37 °C で 5 分間加温を行った後、プレートリーダー(SpectraMax TM190, モレキュラーデバイス社製)により、ブランクとして用いた超純水を対照として 505 nm における各試料の吸光度を測定した。なお検量線には 1, 2, 3, 4, 5 mg/mL グルコース標準液を用いた。

3.2.9.2 ソモギネルソン法による還元糖定量

銅試薬(A 液:B 液=1:25 を使用する直前に混合、A 液:15 %硫酸銅五水和物、B 液:25 g/L 炭酸ナトリウム、25 g/L 酒石酸ナトリウムカリウム、20 g/L 炭酸水素ナトリウム、200 g/L 硫酸ナトリウム) 80 μ L、測定試料 80 μ L を 2 mL マイクロチューブ内で混合し、10 分間煮沸後、5 分間水冷を行った。水冷後、ネルソン試薬(25 g/L モリブデン酸アンモニウム、42 g/L 濃硫酸、3 g/L ヒ酸二ナトリウム) 80 μ L を添加した後、超純水 1760 μ L で希釈し、15 分間静置を行った。試料を 96 ウェルマイクロプレートへ移した後、595 nm における各試料の吸光度を測定した。なお検量線には 25, 50, 75, 100 μ g/mL グルコース標準液を用いた。

3.3 結果及び考察

3.3.1 酵素至適条件検討

市販のセルラーゼ粉末 Cellulase from *Trichoderma viride* の至適 pH 及び至適温度について検討した結果を図 3-1 および図 3-2 にそれぞれ示す。温度を 50℃ に固定し、pH を 3, 4, 5, 6, 7 と変化させたところ、遊離グルコース量はそれぞれ 0.0245, 1.20, 1.12, 0.514, 0 mg/mL となり、pH4 の値が最も高くなった。また、pH4.0 に固定し、温度を 20, 30, 37, 50, 60 °C と変化させたところ、遊離グルコース量はそれぞれ 0.220, 0.534, 0.783, 1.20, 0.0918 mg/mL となり、50 °C の値が最も高くなった。

以上より、本実験においては pH4.0、温度 50 °C 条件で酵素反応を行うこととした。

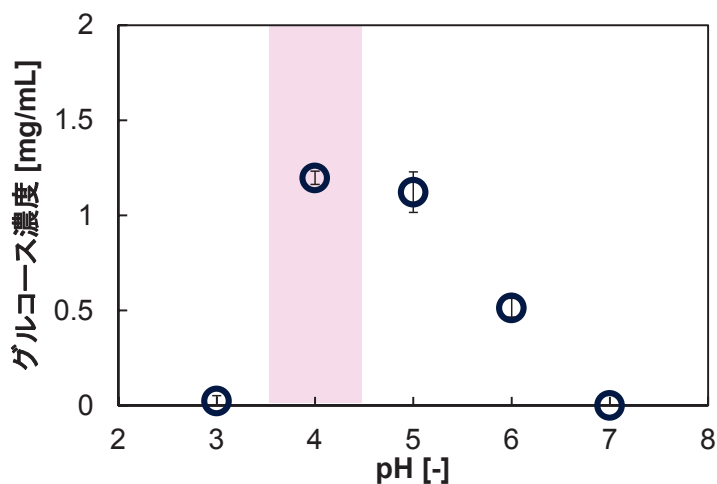


図 3-1 至適 pH 条件検討結果(n=3)

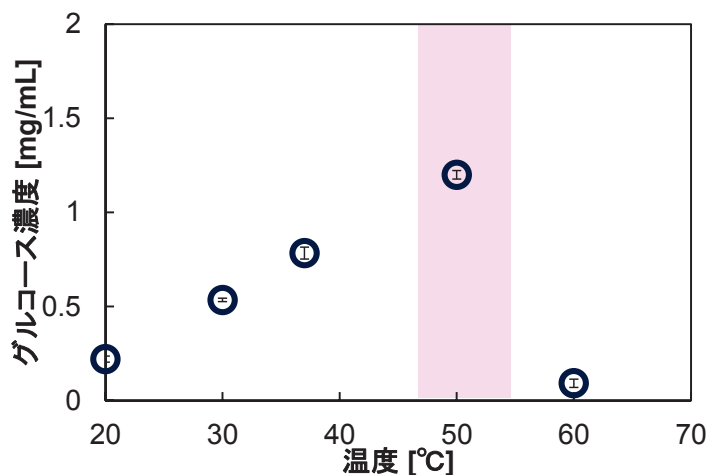


図 3-2 至適温度条件検討結果(n=3)

3.3.2 牛唾液を用いた微結晶セルロースの酵素糖化

牛唾液が微結晶セルロースの酵素加水分解に与える影響について調べた結果を図 3-3 に示す。(A) 基質/酵素/唾液を添加した系、(B) 基質セルロース/酵素セルラーゼのみの系、および(C) 唾液のみの系の還元糖濃度はそれぞれ 0.259, 0.0880, 0 mg/mL であった。したがって、(A)と(B)の値を比較すると、唾液を添加したことにより還元糖量は約 2.9 倍に増加することが分かった。この結果より、唾液自体にセルロースを分解する能力はないが、牛唾液にはセルラーゼによるセルロース分解効率を向上させる効果があることが分かった。

また、牛の個体間差の影響について調べた結果を図 3-4 に示す。Lot.1, 2, 3 の還元糖濃度はそれぞれ 0.229, 0.228, 0.271 mg/mL となり、異なる個体、採取時期の唾液を添加した場合においても、同程度の還元糖濃度が得られることが分かった。

以上より、牛唾液がセルラーゼを用いた酵素加水分解反応を促進させることが明らかとなり、またその効果は牛の個体間に依存しないことが分かった。

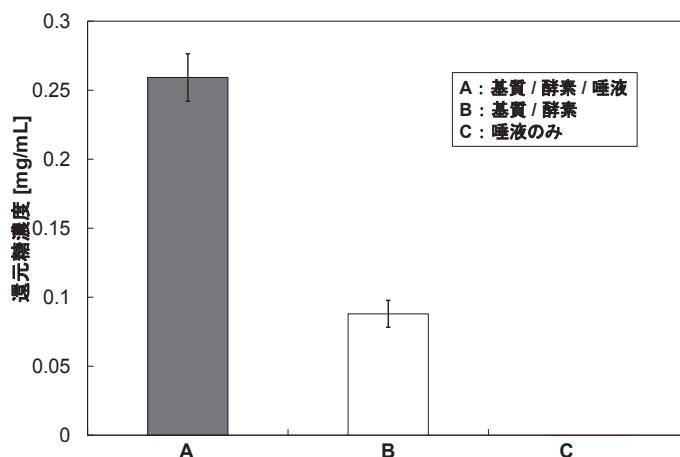


図 3-3 セルロース分解に及ぼす牛唾液の影響(n=3)

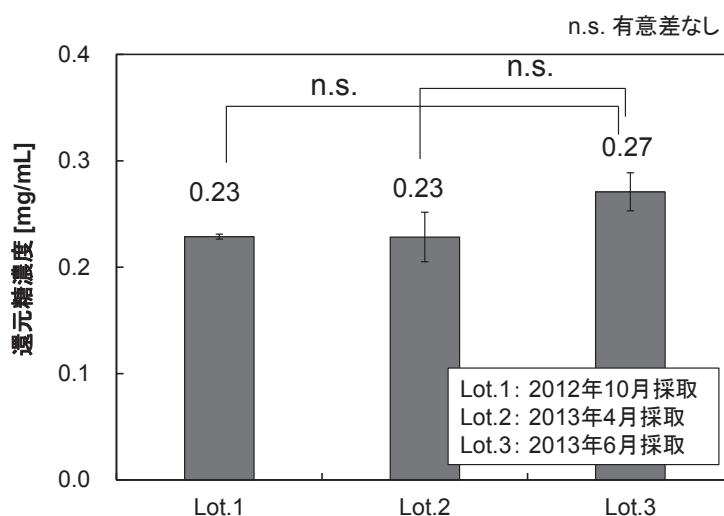


図 3-4 牛の個体間差における影響(n=3)

次にセルラーゼ濃度がグルコース生成量に及ぼす影響について検討を行った。今回は系中のセルラーゼ濃度を 10-1000 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で検討を行い、唾液を添加した系を唾液(+)、唾液を添加していない系を唾液(-)とした。結果を図 3-5 に示す。唾液(+)、唾液(-)の両系で、セルラーゼ濃度の増加に伴って還元糖量は増加するが、セルラーゼ濃度が 500 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度では概ね一定となった。また、今回実験を行った 10-1000 $\mu\text{g/mL}$ の範囲では、どのセルラーゼ濃度においても唾液(+の方が唾液(-)よりも還元糖量は多くなった。特にセルラーゼ濃度が 500 $\mu\text{g/mL}$ 以下の低酵素濃度の領域においては、セルラーゼ濃度の増加に伴う還元糖濃度の増加率が高いことから、唾液添加の影響が大きいことが明らかとなった。

以上より、セルラーゼ濃度 10-1000 $\mu\text{g/mL}$ の範囲では、牛唾液はどのセルラーゼ濃度領域においてもセルロース糖化効率を向上させ、特に低酵素濃度領域において唾液添加の影響が大きくなることを確認した。また、唾液添加によりセルロースを効率的に分解できるセルラーゼ量は 500 $\mu\text{g/mL}$ 以下であり、セルラーゼ濃度をそれ以上増加させてもグルコース生成量は変化しないことが分かった。

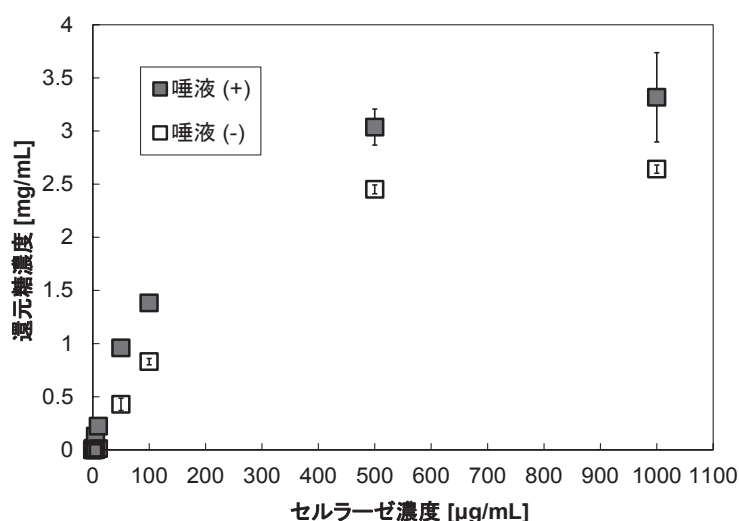


図 3-5 グルコース生成量に及ぼすセルラーゼ濃度の影響(n=3)

次にインキュベーション時間がグルコース生成量に及ぼす影響について検討を行った。インキュベーション時間を 0-72 時間の範囲で種々変化させたときのグルコース生成量を測定した結果を図 3-6 に示す。唾液(+)、唾液(-)の両系で、インキュベーション時間の増加に伴い還元糖量は増加した。しかし、還元糖量の増加率(曲線の傾き)に着目すると、インキュベーション時間 24 時間以下では唾液(-)の系よりも、唾液(+の系の方が還元糖量の増加率は大きくなり、24 時間以降では唾液(+)、唾液(-)の両系で同程度となった。

これら結果より、牛唾液は 0-24 時間の主に反応初期段階でセルロース糖化反応を促進することが明らかとなった。

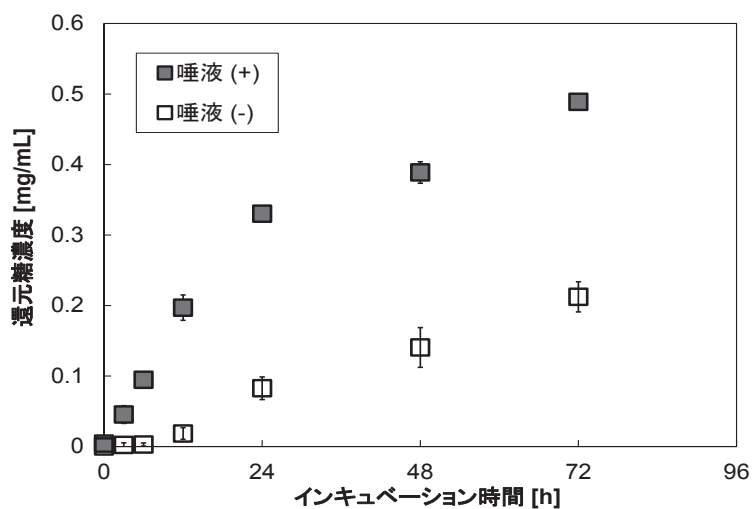


図 3-6 グルコース生成量に及ぼすインキュベーション時間の影響(n=3)

次に、唾液濃度がグルコース生成量に及ぼす影響について検討を行った結果を図 3-7 に示す。唾液濃度を 0, 0.5, 1, 2, 3, 4 vol%と変化させたときの還元糖濃度はそれぞれ 0.021, 0.069, 0.121, 0.163, 0.211, 0.235 mg/mL となり、唾液濃度が 4 vol%以上では約 0.25 mg/mL で一定となった。これは、本実験条件(微結晶セルロース濃度 : 0.8 wt%, セルラーゼ濃度 : 10 μ g/mL, 24 時間インキュベーション)下では、系中の唾液濃度が 4 vol%以上に達すると、唾液中に含まれる原因物質がセルロースの糖化に必要な量よりも過剰となること、もしくは糖化効率を向上させる物性に、これ以上影響を及ぼさないことが原因と考えられる。

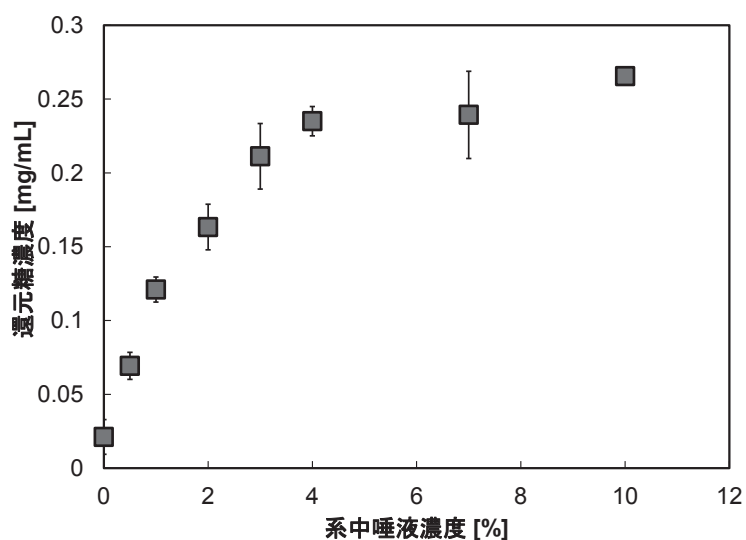


図 3-7 グルコース生成量に及ぼす唾液濃度の影響(n=3)

3.3.3 牛唾液中に存在する糖化促進物質の探索

唾液の主な成分は水であるが、ムチン、ラクトフェリン、パロチン、IGF-1 (Insulin-like growth factor-1)などのタンパク質をはじめ、シアル酸など様々な種類の有機化合物や重炭酸イオンや各種金属イオンなど無機塩類が含まれている⁷⁾。そこで、牛唾液中に存在する糖化促進作用物質を探索するため、以下に示す検討を行った。

3.3.3.1 透析、熱処理唾液が及ぼす影響

牛唾液に対して、無機塩類などの低分子化合物を除く目的で透析処理、また酵素などのタンパク質を変性させる目的でオートクレーブによる熱処理を行い、透析、熱処理唾液が酵素糖化に及ぼす影響について検討した。結果を図 3-8 に示す。

まず透析処理により低分子化合物を除去した唾液を添加した場合においても、未処理の唾液と同程度の還元糖濃度であることが分かった。透析チューブの平均ポアサイズは 20-50 Å、分画分子量は 14 kDa であるため、唾液中の 14 kDa 以下の物質は透析中に膜外へ拡散し取り除かれる。よって、透析処理を施した唾液は 14 kDa 以下、つまり無機塩類をはじめシアル酸、IGF-1 などの低分子化合物が除去された唾液となっている。したがって、無機塩類や 14 kDa 以下の低分子化合物は酵素糖化を促進しないことが示唆された。

またオートクレーブ処理による熱処理を施した唾液を添加した場合においても、未処理唾液と同等の効果が得られた。この結果より、唾液による糖化促進効果は酵素反応により引き起こされたものではないことが示唆された。

以上 2 つの結果をまとめると、糖化促進の原因物質は牛唾液中に含まれる 14 kDa 以上の酵素活性を示さない高分子である可能性が高いことが明らかとなった。

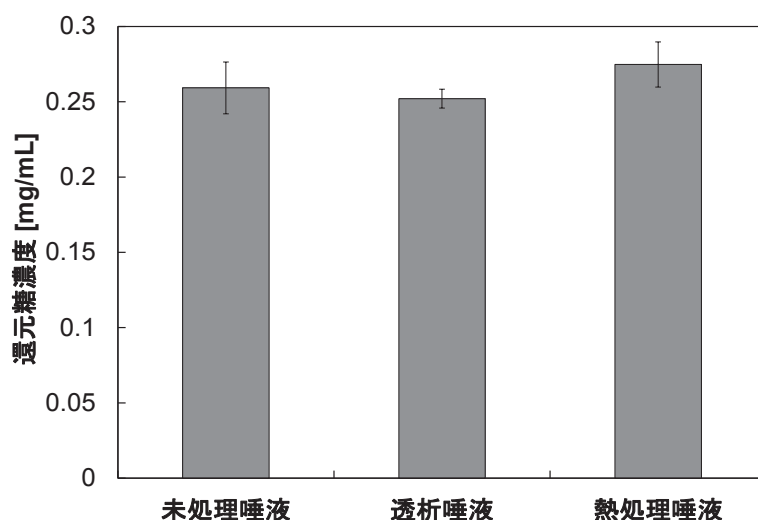


図 3-8 グルコース生成量に及ぼす透析及び熱処理の影響(n=3)

3.3.3.2 ゲル濾過クロマトグラフィーによる唾液の分画

3.3.3.1の結果より、糖化促進の原因物質は牛唾液中に含まれる14 kDa以上の酵素活性を示さない高分子である可能性が高いことが明らかとなった。そこで、糖化促進効果がどの分画分子量の高分子によって引き起こったのかを明らかにするために、牛唾液中に存在する高分子をゲル濾過クロマトグラフィーにより分画し、分画分子量毎の酵素糖化について検討した。

まずゲル濾過クロマトグラフィーにより分画後に、SDS-PAGEを行った結果を図3-9に示す。その結果、唾液中の高分子はFraction No.9-20に分画された。そこで本研究では、分画後のフラクションを次の(A)-(E)の5つに分けた。

(A) 50 kDa以上の高分子を多く含む Fraction No.10, 11を混合したもの

(B) 37 kDa付近の高分子を多く含む Fraction No.12, 13を混合したもの

(C) 70, 25, 15 kDa付近の高分子を多く含む Fraction No.14, 15を混合したもの

(D) 25, 15 kDa付近の高分子を多く含む Fraction No.16, 17を混合したもの

(E) 25, 15 kDa付近の高分子を多く含み、かつ(D)よりも低分子量の割合が多い Fraction No.18, 19を混合したもの

また、これらの(A)-(E)をすべて混合したものを Mix と定義し、併せて用いた。酵素活性測定を行った結果を図3-10に示す。その結果、(A)、(B)、(C)を添加した場合のグルコース濃度はそれぞれ0.140、0.159、0.170 mg/mLであった。また、(D)、(E)、Mixではいずれのグルコース濃度も約0.19 mg/mLであり、未処理唾液を添加した場合と同程度であることが分かった。これらの結果より、全ての分画において唾液を添加していない系に比べグルコース濃度が増加することを確認した。また全てのサンプルは同濃度としているため、分子量が大きい高分子では若干糖化促進効果が低減する結果となった。

以上より、高分子の分子量に多少依存して糖化促進効果は異なるが、14 kDa以上の全ての分画でセルロース糖化を促進することが分かった。

3.3.2.1及び3.3.2.2で得られた結果をまとめると、牛唾液中に含まれるセルラーゼ糖化促進物質は酵素活性を示さない14 kDa以上の高分子であることが明らかとなった。

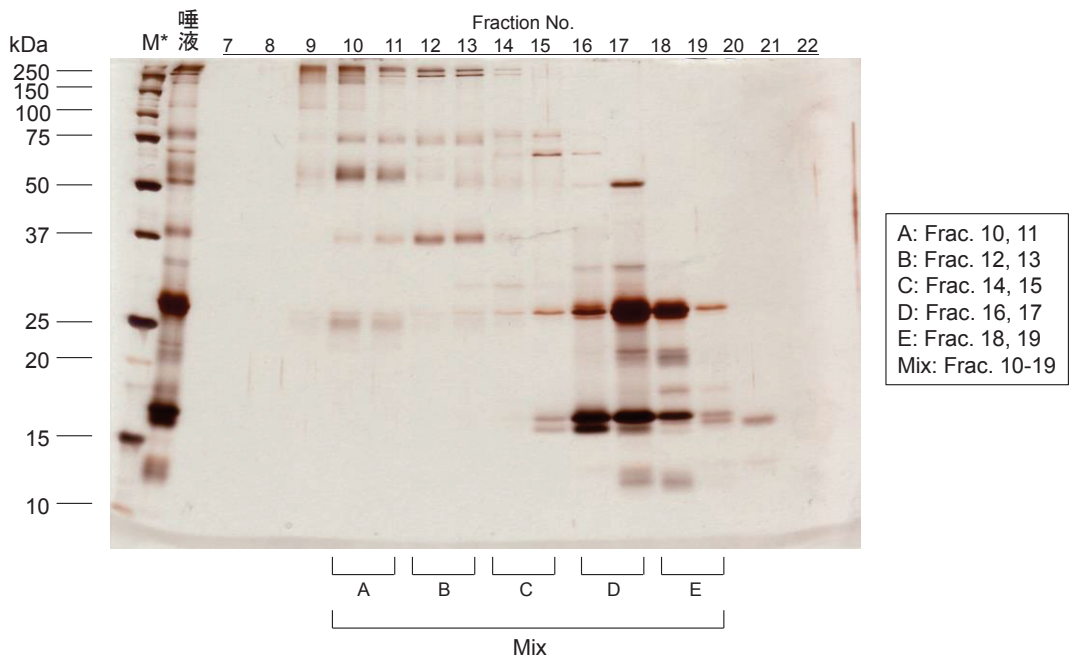


図 3-9 ゲル濾過により分画された牛唾液の SDS-PAGE 結果

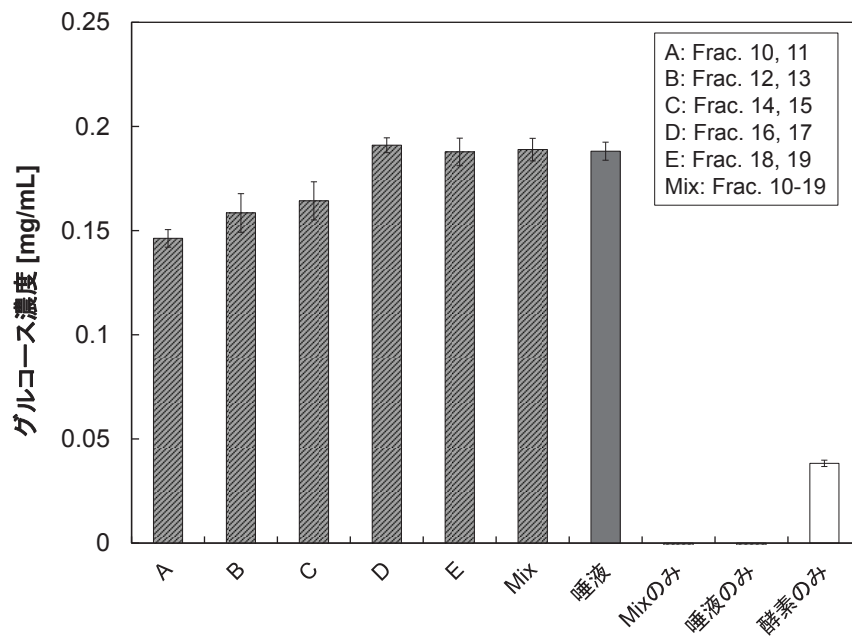


図 3-10 牛唾液ゲル濾過分画の酵素活性への影響(n=3)

3.3.4 牛唾液による糖化促進メカニズム

3.3.4.1 牛唾液がセルロース結晶形に及ぼす影響

セルロースは数種類の結晶形を有することが知られている。また、このセルロースの結晶構造の違いがセルラーゼ加水分解反応に及ぼす効果についての多くの報告がなされている⁸⁾⁻¹⁰⁾。例えば、天然のセルロースの結晶形であるI型を液体アンモニアやアミンにより処理することでIII型へ結晶形が変化するが、このIII型はI型に比べてバルキーな結晶面となるため、酵素による糖化効率を向上させることが知られている¹¹⁾。

そこで牛唾液がセルロースの結晶形に及ぼす影響を確認するために、X線回折や赤外吸収スペクトルを用いてセルロースの結晶構造解析を行った。

X線回折結果を図3-11に示す。牛唾液を作用させたセルロースを唾液(+)、作用させていないセルロースを唾液(-)とした。その結果、唾液(+)、唾液(-)の両系でI型のセルロースに起因する $2\theta = 15-18^\circ$ のブロードなピークおよび $2\theta = 23^\circ$ 付近に回折ピークがみられた¹²⁾。

次に、図3-12に赤外吸収スペクトルを示す。セルロースの結晶構造に依存するピークとして、セルロース分子内水素結合に由来する $3000-3600\text{ cm}^{-1}$ 付近のOH伸縮振動、 2900 cm^{-1} 付近のCH伸縮振動、分子内グリコシド結合に由来する 1100 cm^{-1} 付近のC-O-C逆対称伸縮振動の吸収帯などがある。唾液(+)、唾液(-)の両系で、これらの吸収帯が観測され、唾液添加の有無によるスペクトルの変化は認められなかった¹³⁾。以上より、牛唾液はセルロースの結晶形に影響を及ぼさないことが分かった。

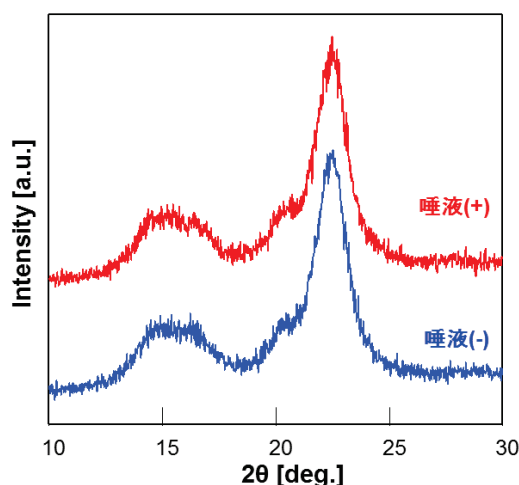


図 3.11 X線回折結果

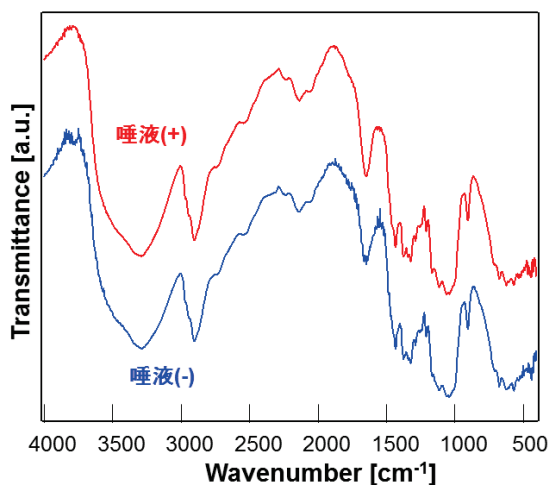


図 3.12 FT-IR 結果

3.3.4.2 牛唾液、セルロース、セルラーゼとの相互作用

牛唾液による糖化促進メカニズムを明らかにするために、牛唾液、セルロース、セルラーゼの添加順序を種々変化させたときのグルコース生成量について検討を行った。添加順序は図 3-13 に示す 5 パターンで、牛唾液を添加した唾液(+)、牛唾液を添加していない唾液(-)の系について検討を行った。結果を図 3-14 に示す。

まず唾液(-)の系において、③の系はグルコース濃度 0.049 mg/mL であり、それ以外は約 0.070 mg/mL となった。つまり唾液(-)の系では、セルロースを後から添加するとセルラーゼ活性が低下することが分かった。この原因として、前処理段階でセルラーゼ単体を 50 °C、1 時間置くことで、多少変性が起こった可能性が考えられる。

次に唾液(+)の系において、④の系はグルコース濃度 0.13 mg/mL であり、それ以外は約 0.15 mg/mL となった。したがって、唾液を後から添加すると、糖化促進効果が僅かに低減することが分かった。この結果より、牛唾液はセルラーゼによる分解前にセルロースへ作用させた方が効率的であると考えられる。また③の系において、唾液(-)の系とは異なり、①②⑤の系と同程度の効果が得られたことより、唾液を作用させることでセルラーゼの変性を防いだと考えられる。

以上の結果より、牛唾液、セルロース、セルラーゼの添加順序がセルロース糖化効率に影響を及ぼすことを確認し、牛唾液はセルラーゼによる分解前にセルロースと相互作用することで糖化促進効果を発現し、また、唾液にはセルラーゼの変性を防ぐ効果があることが示唆された。

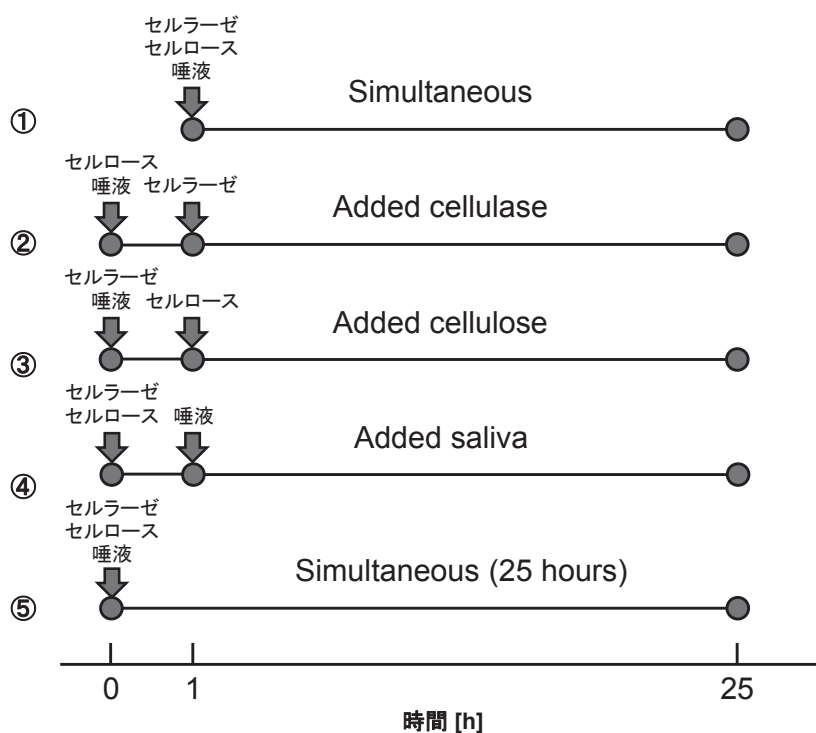


図 3-13 添加順序パターン

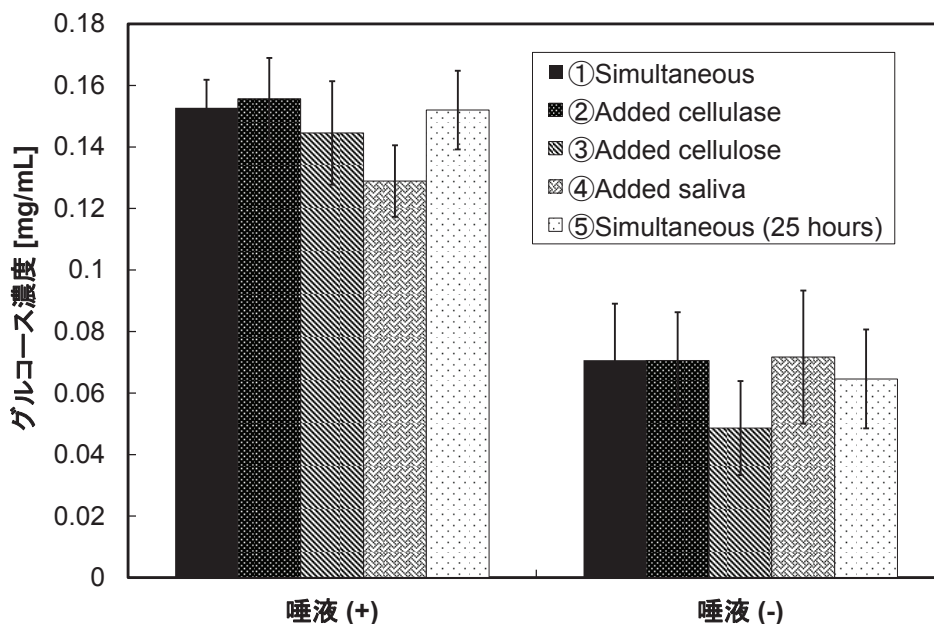


図 3-14 グルコース生成量に及ぼす牛唾液、セルロース、セルラーゼの添加順序の影響(n=3)

3.3.4.3 既存の糖化促進物質との比較

これまでにセルラーゼ糖化促進物質に関する多くの報告がなされており、例えば PEG4000、Tween20、BSA がよく知られている^{2)-5), 14)-15)}。そこで、これら既存の糖化促進物質と牛唾液の糖化促進効果について比較を行った。実験は 3.2.3 に準じて行い、牛唾液の代わりに種々の濃度に調製した PEG4000、Tween20、BSA を用いた。

PEG4000、Tween20、BSA の添加濃度を種々変化させたときの還元糖濃度について検討した結果を図 3-15 に示す。PEG4000 および Tween20 は 2.5, 12.5, 25, 50 mg/mL の各濃度で検討を行った。その結果、PEG4000 の場合、50 mg/mL のときに還元糖濃度は 0.126 mg/mL で最大となり、Tween20 の場合は、2.5 mg/mL のときに還元糖濃度は 0.258 mg/mL で最大となった。BSA は系中における濃度が 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 mg/mL で検討を行った。その結果、BSA 濃度が 0.01 mg/mL のときに還元糖濃度は 0.226 mg/mL で最大となった。

以上の結果から得られた、各添加物質の最大還元糖濃度をまとめた結果を図 3-16 に示す。これらの結果より、牛唾液は Tween20 や BSA と同程度の糖化促進効果が得られることが分かった。

次に、牛唾液の糖化促進作用メカニズムを明らかにするために、牛唾液による糖化促進効果が Tween20 の効果と競合するかを確認した。これまでの結果より、牛唾液の場合には 4 % (図 3-7)、Tween20 の場合には 2.5 mg/mL (図 3-15) で還元糖量が飽和に達することが確認されている。そこで、添加濃度は牛唾液が 7.75 %、Tween20 が 2.5 mg/mL とした。結果を図 3-17 に示す。その結

果、還元糖量は全てのサンプルにおいて約 0.2 mg/mL となった。つまり、牛唾液による促進効果は Tween20 の効果と競合していることが明らかとなり、牛唾液による糖化促進メカニズムは Tween20 で提唱されているメカニズムと同様であることを示唆する結果となった。タンパク質は疎水性アミノ酸残基と親水性アミノ酸残基で構成されているため、両親媒性を有している¹⁶⁾。つまり、牛唾液中のタンパク質が界面活性剤である Tween20 と同様に振る舞ったのではないかと考えられる。

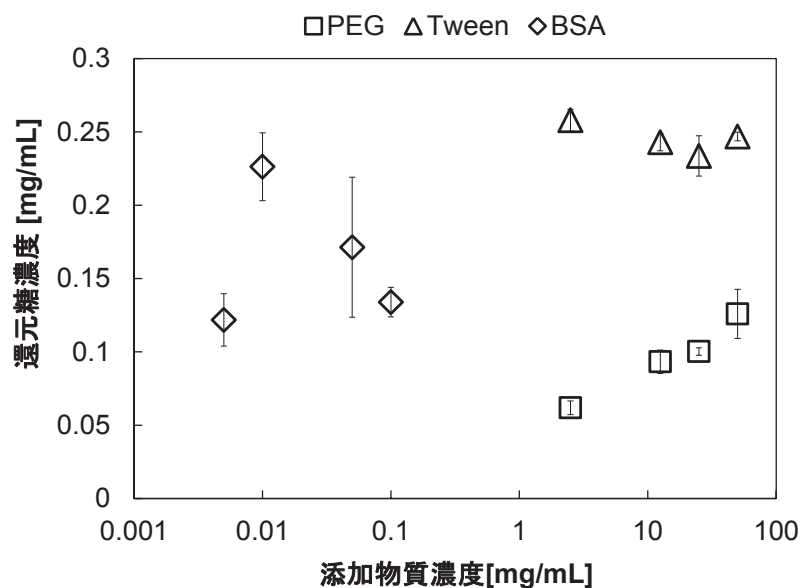


図 3-15 PEG, Tween20, BSA の添加濃度を種々変化させたときのグルコース生成量(n=3)

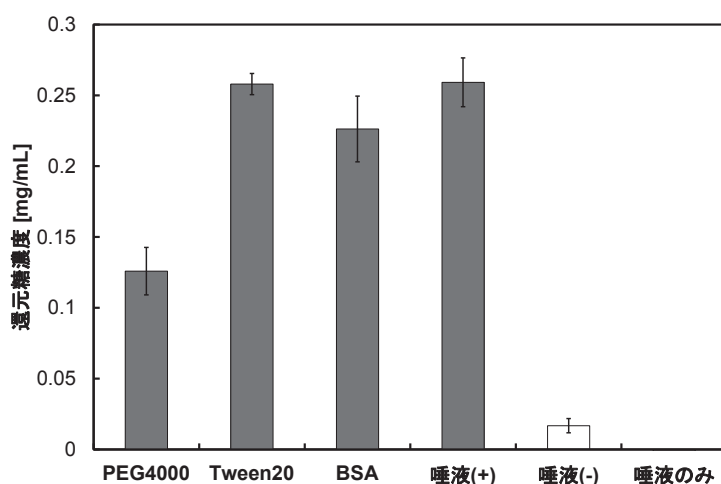


図 3-16 グルコース生成量における牛唾液と他の添加物質の比較(n=3)

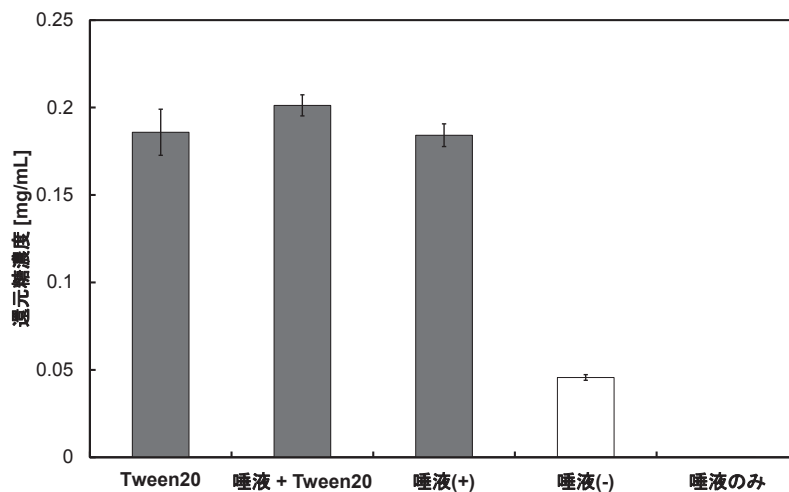


図 3-17 グルコース生成量における牛唾液、Tween20 およびその混合物の比較(n=3)

3.3.4.4 牛唾液による糖化促進メカニズム

3.3.4.3 において、牛唾液によるセルロース糖化促進メカニズムは界面活性剤 Tween20 で提唱されているメカニズムと同様である可能性が高いことが示唆された。そこで、牛唾液の界面活性能を確認するため、静的表面張力を測定した。(図 3-18)

その結果、牛唾液の濃度の増加に伴い表面張力は減少し、牛唾液の濃度が 39.7%以上で表面張力は一定となった。このことから、牛唾液は界面活性能を有することが明らかとなった。

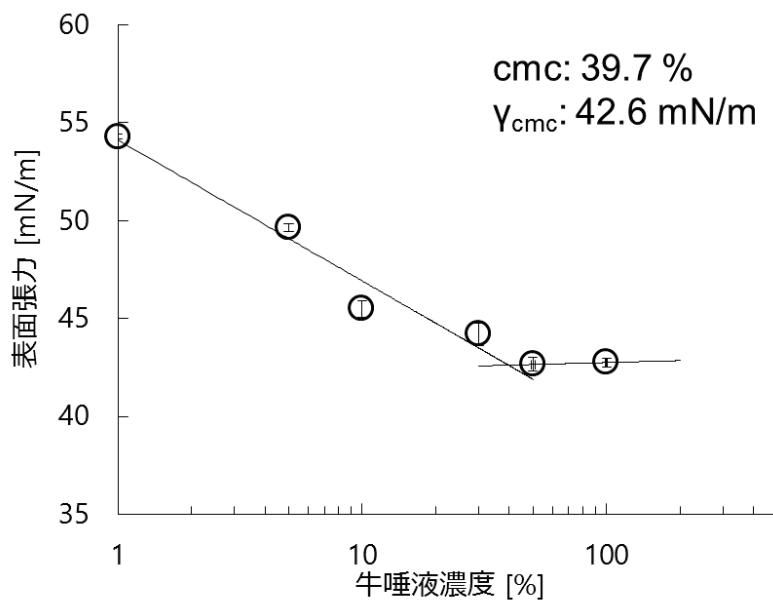


図 3-18 牛唾液の静的表面張力測定結果(25 °C, n=3)

これまでに界面活性剤によるセルラーゼ糖化促進メカニズムは様々なものが提唱されている。Kimらは、界面活性剤が気/液界面へ吸着し、反応液を攪拌させる際に生じるセルラーゼの変性を防いでいると報告している¹⁷⁾。また Castanon や Helle は、界面活性剤存在下においてセルラーゼがセルロースへ吸着するのを防いでいると報告している^{18), 19)}。Kaar や Haltzapple は、界面活性剤がセルロース加水分解反応を向上させる反応部位の可溶性を促進させること²⁰⁾、また界面活性剤がセルラーゼの安定性を向上させ、加水分解反応の進行に伴うセルラーゼの変性を防いでいること、を報告している^{17), 20)}。また Park らは、界面活性剤添加により、セルラーゼがセルロースから脱着するのを促進し、吸着したセルラーゼの不活化を防いでいると報告している^{3), 18), 19)}。

これら既存の知見に基づき、牛唾液がセルロースの酵素加水分解反応を促進させるメカニズムは以下のように考えられる。

セルラーゼは通常セルロースへ可逆的に結合するが、これを繰り返すことにより不可逆的に吸着するようになる²¹⁾。この様に、セルロースへ不可逆的に吸着したセルラーゼは不活性型となるため、加水分解反応はこれ以上進行しなくなることが知られている²²⁾。そこに牛唾液を添加すると、唾液中に含まれる高分子の界面活性効果により、セルラーゼは吸着、分解、脱着のプロセスをスムーズに繰り返すことができ、反応の際のセルラーゼの安定性が高まる。また、牛唾液中に含まれる高分子がセルロースに吸着すると、そのブロッキング効果により、不可逆的なセルラーゼの吸着を防ぐことができる。以上のような理由から、牛唾液により微結晶セルロースの糖化効率が向上したと考えられる。一方、牛唾液の静的表面張力の測定結果、唾液濃度の増加に伴い表面張力は減少し、唾液濃度 39.7%で臨界ミセル濃度(cmc)となることが分かった。しかし、還元糖濃度は唾液濃度の増加に伴い上昇し、唾液濃度が 3%で飽和に達した。この濃度は表面張力測定より得られた cmc と比較すると低い値である。これは、表面張力低下はまだ飽和値になっていないが、基質界面への吸着は低濃度から生じているためと推察される。しかし、牛唾液には多くの高分子成分が存在しており、幅広い分子量分画成分(14 k-100 kDa)において活性が示されたことから、これらの高分子の複合的な作用も考えられるため、牛唾液中に含まれる高分子の界面活性能の寄与は唾液の糖化促進の一つの要因であると考察する。

3.3.4.5 リグノセルロースに対する唾液添加効果

本章ではこれまでに、牛唾液添加により微結晶セルロースの酵素糖化が促進されること、およびその糖化促進メカニズムが Tween20 で提唱されている機構と類似であることを述べてきた。一方で、Tween20 はセルロースだけでなく基質をリグノセルロースとした際の糖化に関しても促進することが知られている。

その糖化促進メカニズムは次の通りである。セルラーゼはリグニンへ非生産的な吸着をすることにより糖化効率が大きく低下する。Tween20などを添加すると、リグニンと Tween20 は疎水的相互作用により優先的に結合するため、セルラーゼとリグニン間の不可逆的な吸着は抑制し、活性を持ったセルラーゼは溶液中により多く遊離させるので糖化効率が向上する^{2, 23)}。

そこで、牛唾液においても前述のようなリグニンへの非特異的な吸着を防ぐ効果もあり得るのではないかと考え、リグノセルロース(チモシー, イネ科)に対する唾液添加の効果に関する検討を行った。実験条件は以下の通りである。

- 基質:ボールミル粉碎処理(750 rpm, 1 h)を施したチモシー(1 wt%)
- 酵素:メイセラゼ(Meiji Seika ファルマ社製) 40 $\mu\text{g/mL}$
- 反応条件:50 $^{\circ}\text{C}$ 、24 時間

結果を図 3-19 に示す。得られたグルコース量は唾液(-)で 0.482 mg/mL、唾液(+)で 0.724 mg/mL となり、牛唾液はリグノセルロースに対しても糖化促進効果を示すことが分かった。よって、牛唾液がリグニンに対するセルラーゼの非特異的な吸着を防ぐこともメカニズムの一つとして考えられる結果となった。

今回は牛唾液が主に微結晶セルロース酵素糖化に与える効果についての検討を行ったが、リグノセルロース分解に対する効果の更なる詳細な検討や 3 種類あると言われるセルラーゼ EG、CBH、 βGL 単体の活性や酵素吸着量に及ぼす影響などを検討することで、より詳細な作用メカニズム解明に繋がると考えられる。

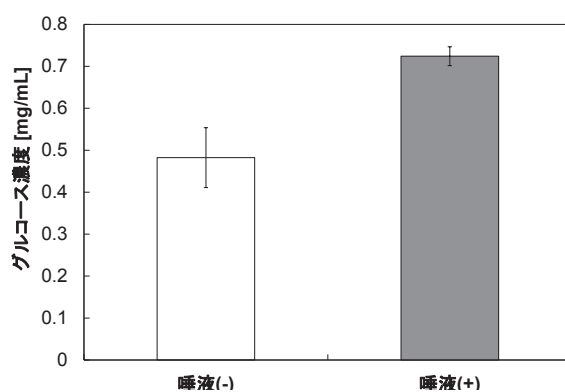


図 3-19 リグノセルロースに対する唾液添加効果(n=3)

3.4 結言

本章では「牛唾液によるセルラーゼ糖化促進効果の作用機序に関する検討」と題して、牛唾液がセルロース酵素加水分解反応に与える様々な影響について、さらに原因物質探索、促進メカニズム解明に関する検討を行った。得られた知見をまとめると以下のようになる。

微結晶セルロースの糖化に及ぼす牛唾液添加の影響

牛の唾液がセルロースの酵素加水分解反応を促進させることを新たに見出した。その効果は、反応時間 0-24 時間の主に反応初期段階で特に大きく、またセルラーゼ濃度や唾液濃度を变化させた際にも糖化促進効果が得られることが分かった。

牛唾液中に存在する糖化促進物質の探索

透析、熱処理及びゲル濾過クロマトグラフィーを用いて牛唾液中に存在する糖化促進物質探索に関する検討を行った。その結果、牛唾液中に含まれる糖化促進物質は酵素活性を示さない高分子(分子量 14 kDa 以上 100 kDa 未満)であることが分かった。

牛唾液による糖化促進メカニズム

牛唾液による糖化促進メカニズムを明らかにするために、セルロースの結晶構造解析、基質/酵素/唾液間の相互作用に関する検討、既存の糖化促進物質との比較、牛唾液の静的表面張力測定を行った。その結果、牛唾液中の高分子はセルロースの結晶形に影響を及ぼしているわけではなく、界面活性能を有していたことから、不可逆的にセルロース表面に吸着したセルラーゼの脱着を促進し、それに伴いセルロース表面には新しい活性点が生じるため、セルラーゼによる加水分解が円滑に進行したため、微結晶セルロースの糖化効率が向上したと考えられる。

牛は世界中に多く存在し、また唾液は容易に入手できるため、合成が必要な界面活性剤など他の添加物質に比べると低コストで大量に入手可能である。今後、様々なバイオマスの糖化プロセスにおいて、セルラーゼ使用量を低減させる添加剤の一つとして、牛唾液は有用であると考えられる。

3.5 参考文献

- 1) 坂口謙吾, “バイオ発電”, ワック (2012).
- 2) T. Eriksson, J. Börjesson, F. Tjerneld, *Enzyme and Microbial Technology*, **31**, 353 (2002).
- 3) J. W. Park, Y. Takahata, T. Kajiuchi, T. Akehata, *Biotechnology and Bioengineering*, **39**, 117 (1992).
- 4) H. Wang, K. Mochidzuki, S. Kobayashi, H. Hiraide, X. Wang, Z. Cui, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **170**, 541 (2013).
- 5) B. Yang, C. E. Wyman, *Biotechnology and Bioengineering*, **94**, 611 (2006).
- 6) 公益社団法人畜産技術協会, “飼料給与の注意点, シープジャパン”, pp. 41 (2001).
- 7) 中村陽二, 飯田潔, 大橋邦啓, 牛唾液採取装置並びに牛唾液採取方法, 特開平 6-43077 (1994).
- 8) K. Igarashi, M. Wada, M. Samejima, *FEBS Journal*, **274**, 1785 (2007).
- 9) M. Wada, L. Heux, A. Isogai, Y. Nishiyama, H. Chanzy, J. Sugiyama, *Macromolecules*, **34**, 1237 (2001).
- 10) A. Mittal, R. Katahira, M. E. Himmel, D. K. Johnson, *Biotechnology for Biofuels*, **4**, 116 (2011).
- 11) 磯貝明, “セルロース利用技術の最先端”, シーエムシー出版 (2008).
- 12) K. Hattori, E. Abe, T. Yoshida, J. A. Cuculo, *Polymer Journal*, **36**, 123 (2004).
- 13) L. Salmen, E. Bergstrom, *Cellulose*, **16**, 975 (2009).
- 14) J. Börjesson, M. Engqvist, B. Sipos, F. Tjerneld, *Enzyme and Microbial Technology*, **41**, 186 (2007).
- 15) Y. Zhang, X. Xu, Y. Zhang, J. Li, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **16**, 930 (2011).
- 16) 西成勝好, “食品ハイドロコロイドの開発と応用”, シーエムシー出版 (2007).
- 17) M. H. Kim, S. B. Lee, D. D. Y. Ryu, *Enzyme and Microbial Technology*, **4**, 99 (1982).
- 18) M. Castanon, C. R. Wilke, *Biotechnology and Bioengineering*, **23**, 1365 (1981).
- 19) S. S. Helle, S. J. B. Duff, D. G. Cooper, *Biotechnology and Bioengineering*, **42**, 611 (1993).
- 20) W. E. Kaar, M. T. Holtzaple, *Biotechnology and Bioengineering*, **59**, 419 (1998).
- 21) A. A. Klyosov, M. L. Rabinowitch, *Enzyme Engineering*, **2**, 83 (1980).
- 22) J. A. Howell, M. Mangat, *Biotechnology and Bioengineering*, **20**, 847 (1978).
- 23) 近藤昭彦, 天野良彦, 田丸浩, “バイオマス分解酵素研究の最前線—セルラーゼ・ヘミセルラーゼを中心として—”, シーエムシー出版 (2012).

第四章

貴金属ナノ粒子触媒のグルコース酸化特性と電気化学的評価

4.1 緒言

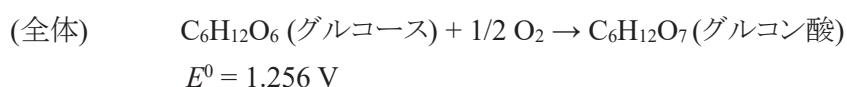
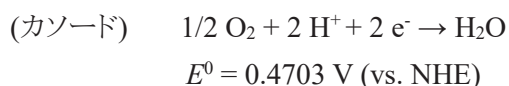
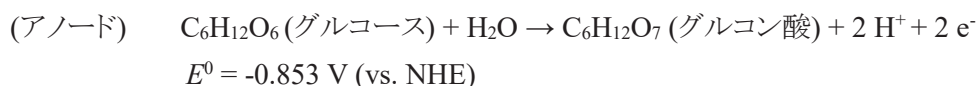
グルコースは通常安定な高分子であることから、酸化させる場合、活性の高い触媒を選択する必要がある。表 4-1 に示したようにグルコースの酸化触媒には酵素並びに金属ナノ粒子を用いた触媒が用いられている¹⁾⁻⁶⁾。酵素を触媒として用いた場合、常温・常圧等の温和な条件下において反応の進行が素早いことから高い交換電流密度を得ることができる。しかし、酸やアルカリ条件下において容易に失活することや、一般に酵素は溶液中で用いる必要があるため、電極にする際の固定化が困難であり、使用環境が限られ、触媒としての安定性の問題が避けられない。一方で金属ナノ粒子を触媒として用いる場合、貴金属触媒は使用条件に依存せず安定であり、少量でも効率の良い触媒能を得ることができる。また、使用済み電極からの回収技術が向上^{7),8)}してきたことから、近年金属ナノ粒子を酸化触媒として多く採用されている。

表 4-1 種々のグルコース酸化触媒の長所・短所

グルコース酸化触媒	長所	短所
酵素系触媒	<ul style="list-style-type: none">・ 常温・常圧下で使用可能・ 反応の進行が素早いことから高い交換電流密度が得られる	<ul style="list-style-type: none">・ 酸やアルカリ条件下において容易に失活する・ 溶液中で用いる必要があり、使用環境が、限られる・ 固定化が困難であるため、大量に用いる必要がある (コスト高)
貴金属系触媒	<ul style="list-style-type: none">・ pHの影響を受けにくく、長期使用が可能(リサイクル可能)・ 少量でも効率の良い触媒能を有する・ 調製が容易	<ul style="list-style-type: none">・ 触媒能は粒子径(表面積)に依存・ CO等による被毒を受け触媒効果が低下する・ 希少金属を用いる(資源の枯渇問題)

金属ナノ粒子触媒は Pt が主に用いられているが⁹⁾⁻¹²⁾、合金系の触媒を用いることで触媒表面に生じる CO による被毒を防ぎ、酸化効率が単金属系に比べ更に向上することが報告されている¹²⁾⁻¹⁶⁾。従って、種々の貴金属合金系の触媒において、金属比率を変化させた時の酸化特性についての研究は重要である。また、金属ナノ粒子を調製する際に、金属ナノ粒子同士の凝集や結晶成長を抑制するための分散安定化剤としてポリビニルピロリドン(PVP)が多く用いられるが、絶縁性の高分子であるため、その濃度が電流密度に及ぼす影響について明らかとすることは、高効率な酸化触媒を調製する際の重要な要素となる。

そこで、本章では、種々の貴金属ナノ粒子および貴金属合金ナノ粒子触媒を用いて、グルコース酸化特性を評価するとともに、PVP の濃度が及ぼすグルコース酸化特性への影響について明らかにすることを目的とした。グルコースの酸化反応は以下の通りである。



4.2 実験方法

4.2.1 試薬

貴金属ナノ粒子触媒を調製するために、白金の前駆体として塩化白金酸六水和物($\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 99%, 和光純薬社製)、金の前駆体として塩化金酸四水和物($\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 99%, 和光純薬社製)、ルテニウムの前駆体として塩化ルテニウム(III) n 水和物($\text{RuCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, 99%, 和光純薬社製)、パラジウムの前駆体としてテトラクロロパラジウム(II)酸カリウム($\text{K}_2[\text{PdCl}_4]$, 和光純薬社製)を用いた。また、金属ナノ粒子の分散剤としてポリビニルピロリドン(PVP, $M_w = \text{ca. } 40,000$, 東京化成工業社製)を用いた。金属イオンの還元剤として水素化ホウ素ナトリウム(NaBH_4 , 東京化成工業社製)を用いた。金属ナノ粒子触媒の担持体としてケッチェンブラック 600 (KB600, EC-600JD, ライオン社製)を用いた。アイオノマーとして Nafion(1-プロパノール/水=7/3, Sigma-Aldrich 社製)を用いた。燃料は D(+)-グルコース(和光純薬製)に電解質として KOH(和光純薬製)を混合した水溶液を用いた。

4.2.2 貴金属ナノ粒子触媒の調製

4.2.2.1 種々の貴金属ナノ粒子触媒の調製法

4.2.1 の種々の貴金属前駆体(HAuCl_4 , H_2PtCl_6 , RuCl_3 , $\text{K}_2[\text{PdCl}_4]$)1.32 mM 水溶液を調製し、1.32 mM PVP 水溶液(ただし、PVP の 1 ユニットの濃度。以下同様)を $[\text{PVP}]/[\text{metal}]=1$ になるように添加した後、15 分間、マグネティックスターラーにより激しく攪拌させた。その後、攪拌させながら金属前駆体に対して 5 等量の NaBH_4 水溶液を素早く添加させることにより、種々の貴金属ナノ粒子分散液を調製した。次に触媒中の貴金属含有量が 5 wt% となるように炭素担持体(KB600)を加えた。24 時間攪拌後、溶液中に存在する塩化物イオンを取り除くため、多量の水を用いて濾過により洗浄後、炭素担持体に担持された貴金属ナノ粒子触媒を回収し、120°C で 2 時間乾燥させた。

4.2.2.2 Pt-Au 金属ナノ粒子触媒の調製法

1.32 mM H_2PtCl_6 水溶液および 1.32mM HAuCl_4 水溶液を調製し、Pt/Au のモル比が 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 になるように分取し、1.32 mM PVP 水溶液を $[\text{PVP}]/[\text{metal}]=0.01, 0.1, 1.0, 10$ になるように添加した後、15 分間、マグネティックスターラーにより激しく攪拌させた。その後、攪拌させながら金属前駆体に対して 5 等量の NaBH_4 水溶液を素早く添加させることにより、Pt-Au ナノ粒子分散液を調製した。次に触媒中の貴金属含有量が 5 wt%となるように種々の炭素担持体(Vulcun, KB300, KB600)を加えた。24 時間攪拌後、溶液中に存在する塩化物イオンを取り除くため、多量の水を用いて濾過により洗浄後、炭素担持体に担持された貴金属ナノ粒子触媒を回収し、 120°C で 2 時間乾燥させた。

4.2.2.3 貴金属ナノ粒子触媒インクの調製法

4.2.2.1 並びに 4.2.2.2 で得られた貴金属ナノ粒子触媒 2 mg に、1-プロパノール(和光純薬社製)を 400 μL 添加後、バス型超音波洗浄器(W-113, アズワン社製)で 10 分間超音波照射し分散させた。その後、アイオノマーとして 10 wt% Nafion 溶液(溶媒:1-プロパノール/水=7/3)を 20 μL 加え、バス型超音波洗浄器により 20 分間超音波照射することで触媒インクを調製した。

4.2.3 貴金属ナノ粒子触媒の透過型電子顕微鏡(TEM)観察

4.2.2.2 で調製した Pt-Au 金属ナノ粒子触媒の形状を TEM(日立ハイテクノロジーズ社製、H-7650)により観察した。支持膜としてカーボン膜が担持された Cu グリッド(日新 EM 社製)に、試料を 1.8 μL 滴下させた後、余剰量を濾紙で吸い取り、その後、デシケーター中で一晩乾燥させた。このようにして得られたグリッドを、加速電圧 120 kV で TEM 観察した。得られた TEM 画像中における任意の粒子 200 個以上を抽出し、金属ナノ粒子の粒子径分布を作成した。

4.2.4 貴金属ナノ粒子触媒におけるグルコース酸化のサイクリックボルタメトリー(CV)

種々の貴金属ナノ粒子触媒におけるグルコース酸化についてサイクリックボルタモトリー(CV)により評価した。4.2.2.3 項で調製した触媒インク 1.5 μL をグラッシーカーボン電極(東陽テクニカ製、G0229, 2 mm ϕ)に塗布し乾燥させた。燃料として、0.1 M グルコース/0.2 M KOH 混合水溶液を用いた。CV は、前述の触媒担持グラッシーカーボン電極を作用極、Pt 線(東陽テクニカ社製、G02282)を対極、Ag/AgCl 電極(東陽テクニカ社製、K0265)を参照極とした三電極系で行い、北斗電工社製の HZ5000 ポテンショガルバナスタットを使用して、掃引速度 20 mV s^{-1} により $-0.5 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ から $+0.5 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ の範囲で測定を行った。

4.2.5 燃料電池の作製

4.2.5.1 Pt-Au 金属ナノ粒子触媒を用いたアノード電極の作製

4.2.2.3 項の方法で調製した Pt-Au 金属ナノ粒子触媒インクを、重量を測定したカーボンクロス(Fuel Cell Earth 社製, CCP40 3 cm x 3 cm)に染み込ませ 100°C で 10 分間乾燥させた。乾燥後、カーボンクロスの重量を測定した。この作業を繰り返し行い、最終的に触媒量 0.5 mg cm^{-2} になるように塗布した

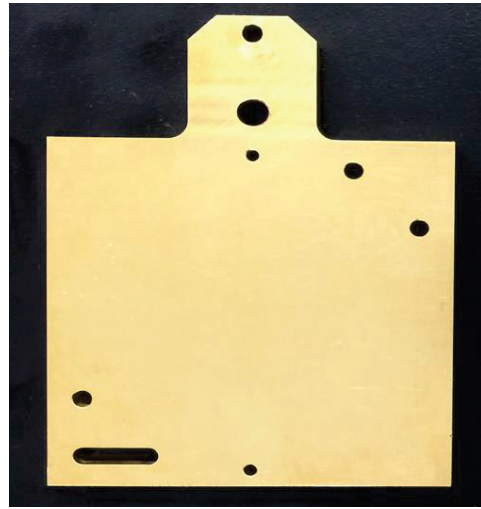
アノード電極を作製した。

4.2.5.2 燃料電池の組み立て

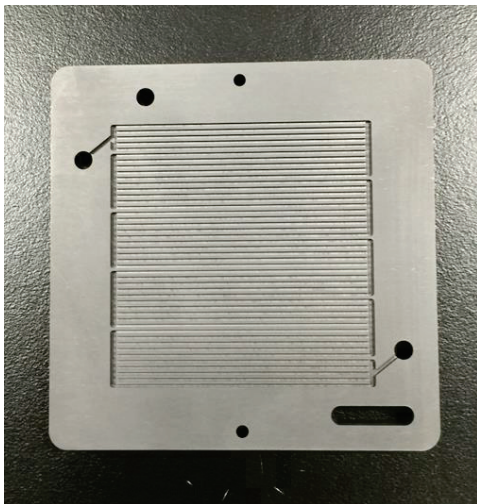
燃料電池特性の実験には市販の燃料電池キット(エレクトロケム社製, EFC-50-03)を用いた。図 4-1 に各パーツの写真、図 4-2 に燃料電池の模式図と作製した燃料電池の写真をそれぞれ示す。アノード電極(e)は 4.2.5.1 項で調製したものをを用いた。カソード電極(g)は市販の Pt/C ペーパー(東レ社製, EC-E20-10-07, 3 cm x 3 cm)を用いた。まず、両電極間をカチオン交換膜(f)(強酸性 Na 型, 一価陽イオン選択透過[陽イオン官能基; スルホン酸基], CIMS, 0.15 mm 厚, アストム社製)で隔て、電極部を組み立てた。中央部を 3 cm x 3 cm の大きさに切り取ったシリコンパッキン(d)(0.3 mm 厚, 10 cm x 10 cm)をグラファイトプレート(c)(エレクトロケム社製 FC-50-005-B-MP, 10 cm x 10 cm)に載せて、シリコンパッキンの開口部に電極部を装填した。同様に別のグラファイトプレートにシリコンパッキンを載せ、図 4-2 上段の模式図のように両者を挟んだ。この際の、両側のグラファイトプレートには、アノード側にはグルコース燃料、カソード側には空気が供給できるように、幅 0.8 mm、深さ 0.9 mm、長さ 70 mm の直線流路が 45 本彫られている。次に、銅板に金メッキが施された集電板(b)を用いて、グラファイトプレートの両側から挟み、最後にそれをステンレス製の外枠(a)で挟んでボルトで固定し燃料電池を組み立てた。



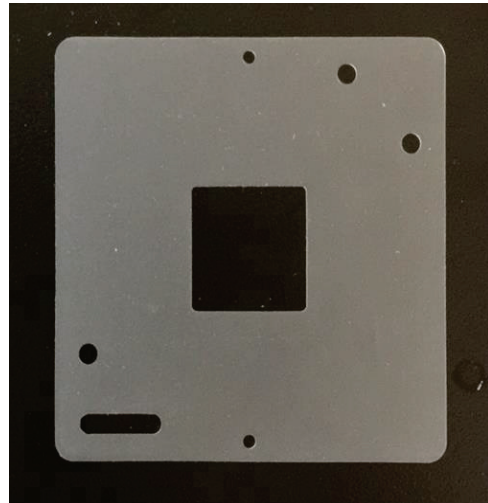
(a) ステンレス製 外枠



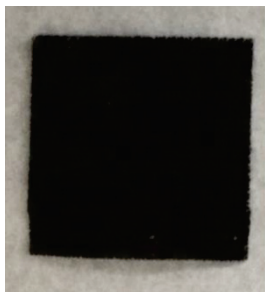
(b) 集電板



(c) グラファイトプレート



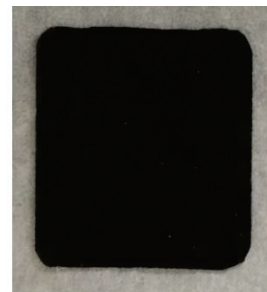
(d) シリコンパッキン



(e) アノード電極

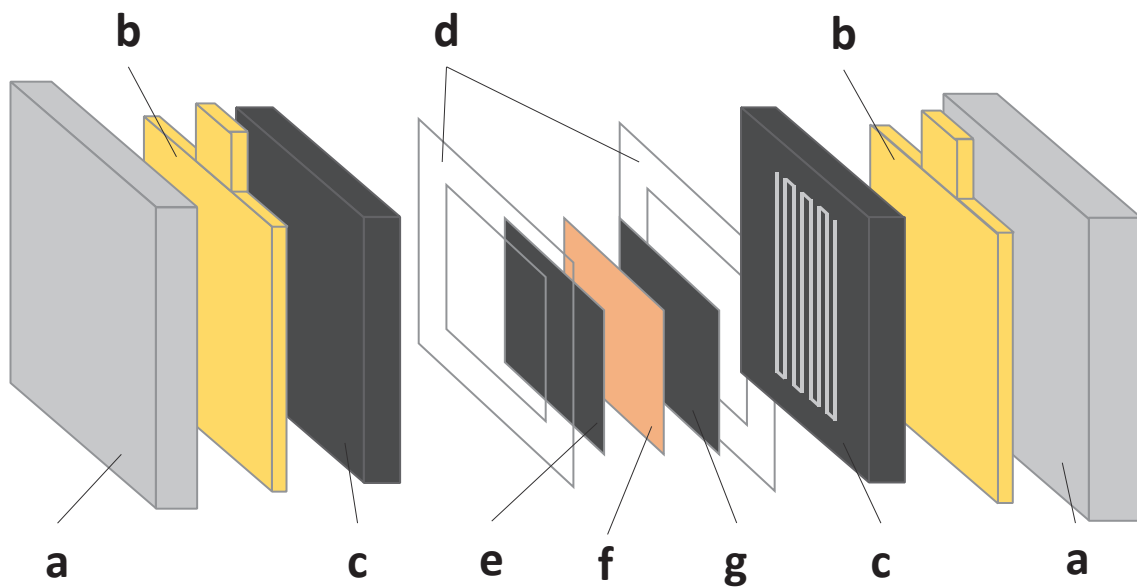


(f) イオン交換膜



(g) カソード電極

図 4-1 各燃料電池のパーツ写真



燃料電池の構成模式図



組み立て完成写真1



組み立て完成写真2

図 4-2 実験で使用した燃料電池の構成図と組み立て完成写真

(a) ステンレス製 外枠, (b) 集電板, (c) グラファイトプレート, (d) シリコンパッキン, (e) アノード電極, (f) カチオン交換膜, (g) カソード電極.

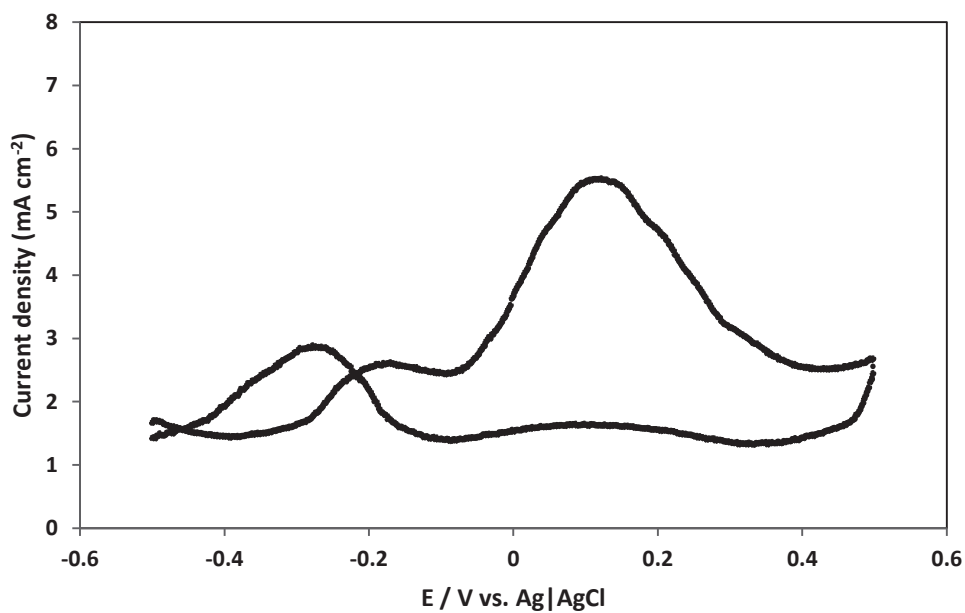
4.2.6 燃料電池の出力測定

種々の PVP 濃度で調製した Pt-Au 金属ナノ粒子触媒を 4.2.2.3 項の方法によりインク調製した。その後、4.2.5.1 項の方法で電極を作製し 4.2.5.2 で作製した燃料電池を用いてアノード側に燃料として、0.2 M グルコース/1.0 M KOH 混合水溶液を流量 10 mL/min で供給し、カソード側には加湿混合空気を流量 2 L/min で供給した。その時の電流-電圧特性 (I-V) 及び電流-出力特性 (I-W) について東陽テクニカ製の燃料電池評価装置 PEM test8900DM を用いて性能評価を行った。

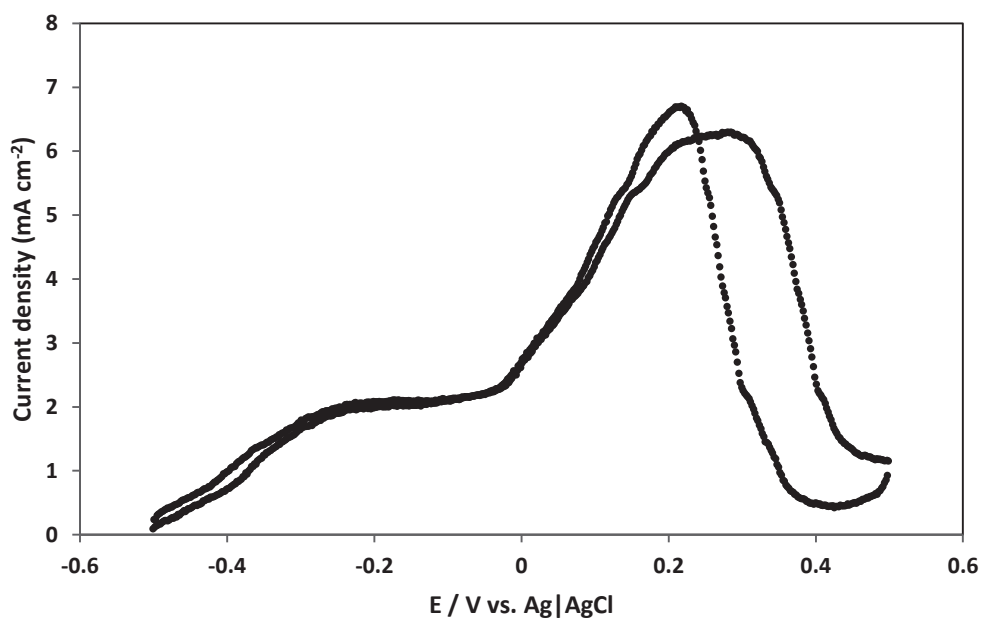
4.3 結果および考察

4.3.1 種々の貴金属ナノ粒子触媒がグルコース酸化特性に及ぼす影響

種々の金属ナノ粒子触媒 (Pt, Au, Pd, Ru) におけるグルコース酸化特性をサイクリックボルタメトリー測定した結果を図 4-3 に示す。-0.5 V vs. Ag/AgCl から +0.5 V vs. Ag/AgCl の範囲で測定した結果、Pt ナノ粒子触媒の電極上において +0.15 V vs. Ag/AgCl 付近にグルコースからグルコン酸への酸化に起因するとみられる酸化ピークが見られた。また Au ナノ粒子触媒の電極上において +0.3 V vs. Ag/AgCl 付近に同様の酸化ピークが見られた。これは、D. Basu らが報告¹³⁾⁻¹⁶⁾しているピークとほぼ一致しており、その詳細を図 4-4 並びに図 4-5 にそれぞれ示す。Pt ナノ粒子触媒によるグルコース酸化では、まず -0.2 V vs. Ag/AgCl 付近においてバルクのグルコース酸化に起因する酸化ピーク (A1) が見られる。さらに電位が貴に進行すると、+0.15 V vs. Ag/AgCl 付近において Pt 表面に吸着し、脱水素化したグルコースの酸化に起因する酸化ピーク (A2) が見られる。Au ナノ粒子触媒では、まず -0.2 V vs. Ag/AgCl 付近で Au 表面に脱水素化したグルコースの吸着に起因する酸化ピーク (A1) が生じる。次に +0.3 V vs. Ag/AgCl 付近においてバルクのグルコースの酸化に起因する酸化ピーク (A2) が見られる。しかし、Au ナノ粒子は +0.4 V vs. Ag/AgCl 以上では Au 表面が酸化されるため、グルコースの酸化は、これ以上進行しなくなり、それに伴い、急激に酸化ピークの減少が確認される。次に、カソードスキャンにおいて +0.2 V ~ +0.3 V vs. Ag/AgCl 付近で酸化ピーク (C1) が観測された。これは、電位が卑に進行すると、酸化された Au 表面が還元されることで O² が生成し、Au 表面においてグルコースの再酸化が進むため、カソードスキャンにおいても、顕著な酸化ピークが見られる。一方で、Pd ナノ粒子触媒並びに Ru ナノ粒子触媒の電極上においては明確なグルコースの酸化と考えられるピークは確認できなかった。従って、Pt ナノ粒子触媒並びに Au ナノ粒子は触媒としてグルコース酸化を促進していることが分かった。

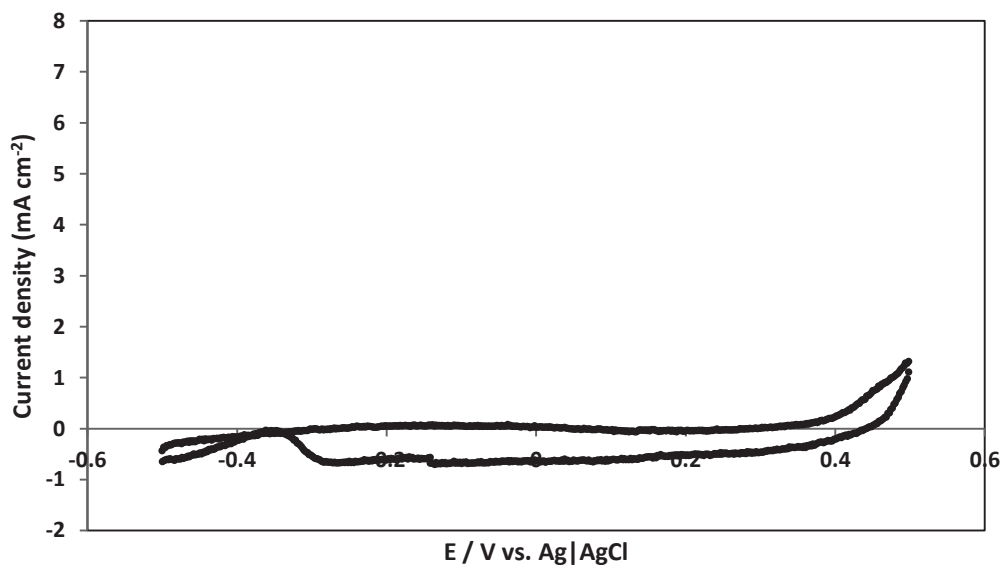


(a) Pt

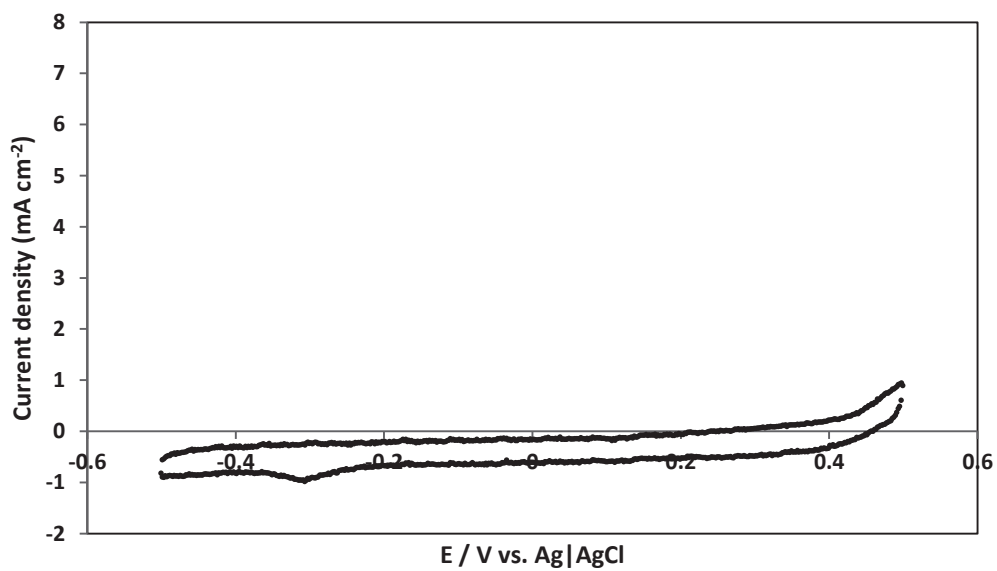


(b) Au

図 4-3 種々の金属ナノ粒子触媒(Pt, Au, Pd, Ru)を用いた 0.1 M グルコース/0.2 M KOH 混合水溶液のサイクリックボルタモグラム

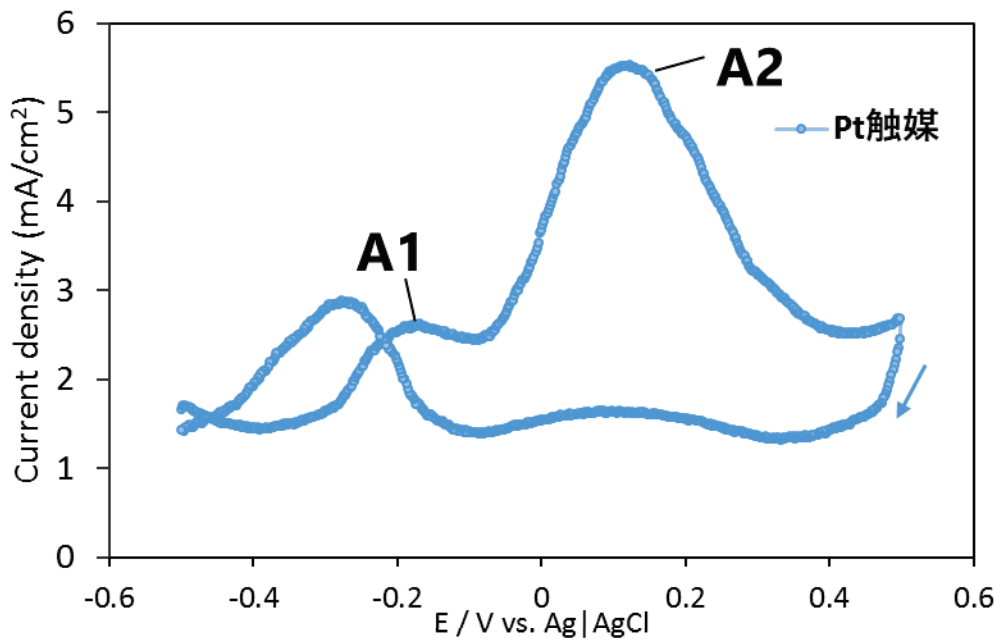


(c) Pd

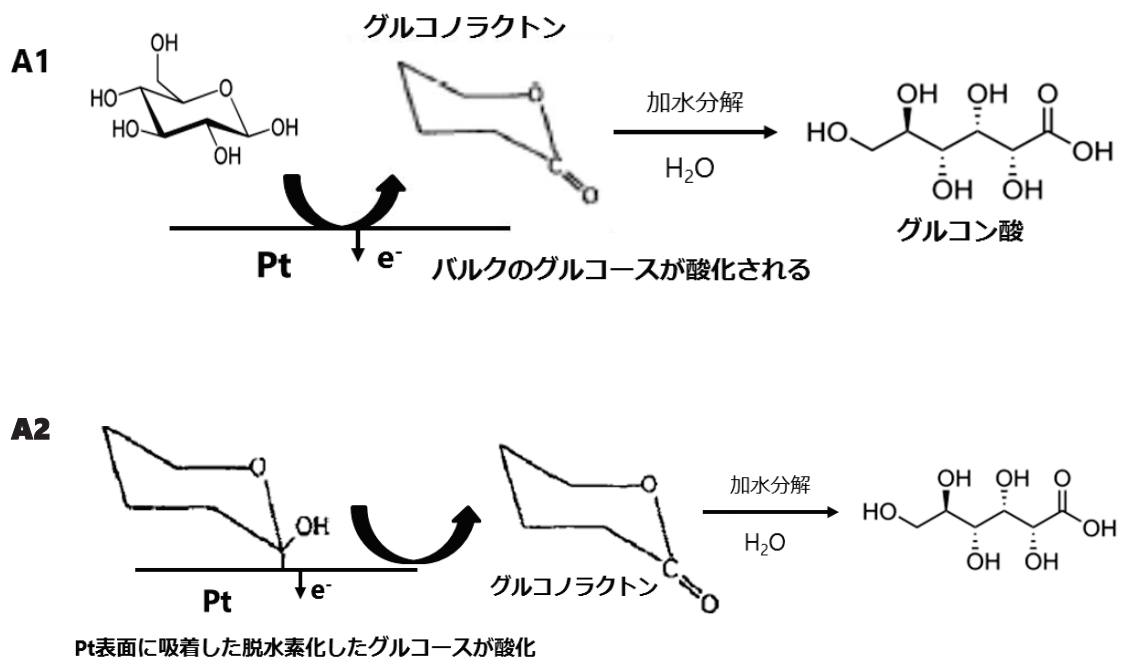


(d) Ru

図 4-3 種々の金属ナノ粒子触媒(Pt, Au, Pd, Ru)を用いた 0.1 M グルコース/0.2 M KOH 混合水溶液のサイクリックボルタモグラム(続き)

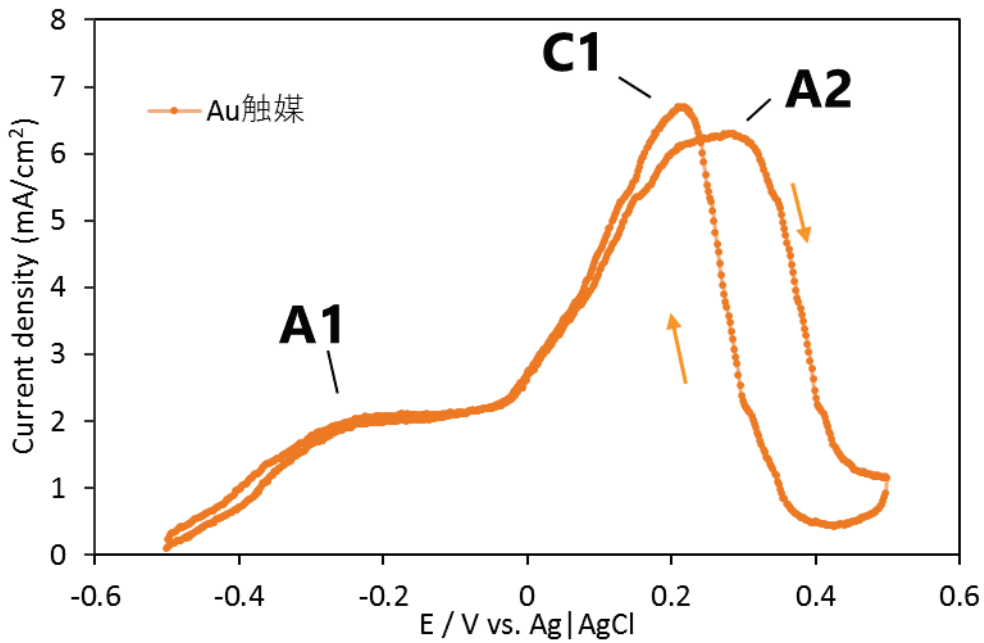


(a) Pt によるグルコース酸化特性におけるサイクリックボルタモグラム

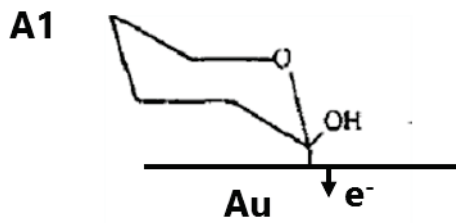


(b) 各ピークにおける反応模式図

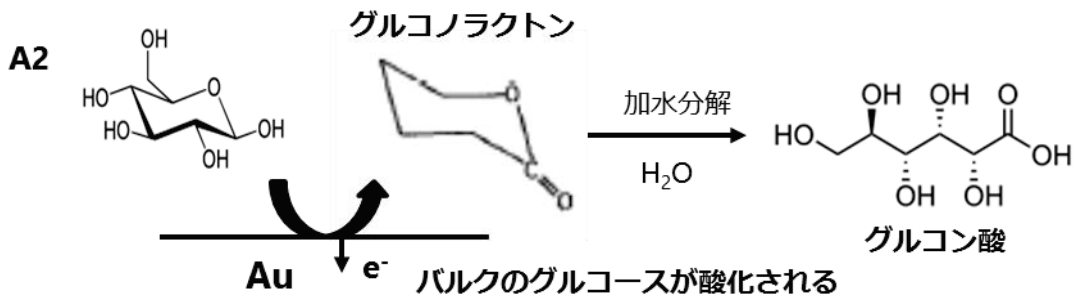
図 4-4 Pt 触媒によるグルコース酸化



(a) Au によるグルコース酸化特性におけるサイクリックボルタモグラム



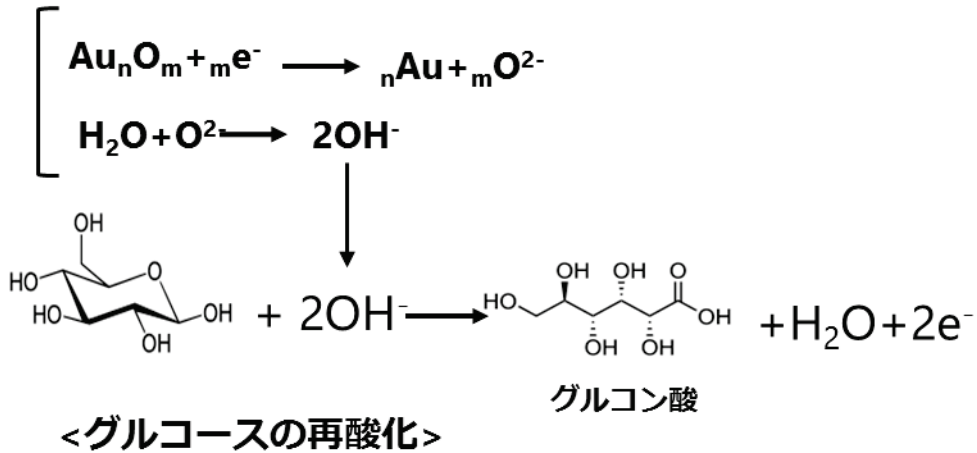
Au表面に脱水素化したグルコースが吸着



0.4 V <

Au表面が酸化されるためグルコースが酸化されない

C1



(b) 各ピークにおける反応模式図

図 4-5 Au 触媒によるグルコース酸化

一方、Pt ナノ粒子触媒および Au ナノ粒子触媒においては、グルコースの酸化に加えて電極表面上で CO が生成し、触媒が劣化することが知られている。近年、これらの合金系の触媒を用いることで触媒表面に生じる CO による被毒を防ぎ、酸化効率が単金属系に比べて更に向上することが報告されている¹²⁾⁻¹⁶⁾。そこで、グルコース酸化能が確認された、Pt ナノ粒子触媒と Au ナノ粒子触媒の合金触媒(Pt:Au=1:1)を調製した。Pt-Au 合金ナノ粒子触媒がグルコース酸化特性に及ぼす影響について検討するため、同様にサイクリックボルタンメトリー測定を行った。その結果を図 4-6 に示す。

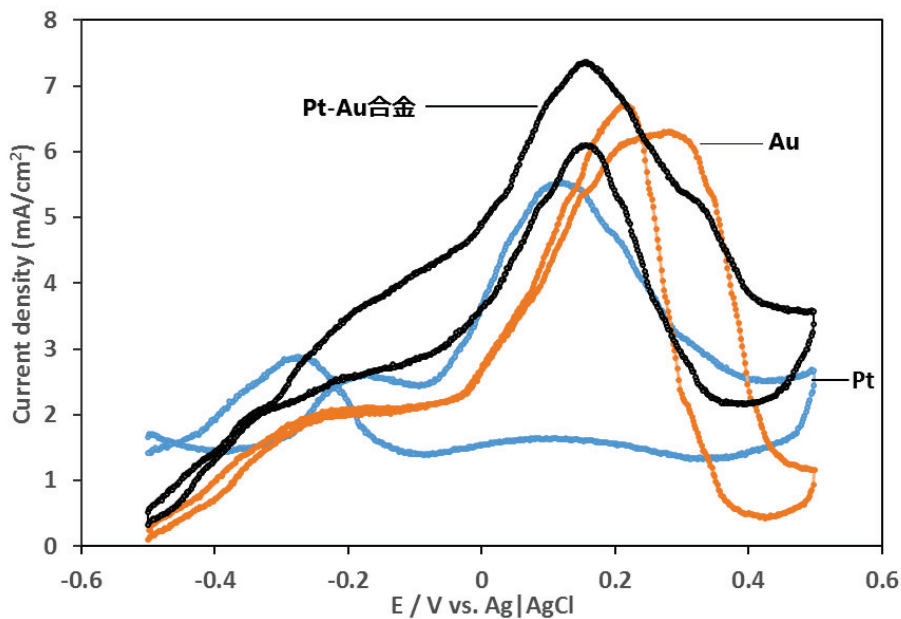


図 4-6 Pt-Au 合金触媒によるグルコース酸化特性

その結果、Pt 単一系の時と同様に、+0.15 vs. Ag/AgCl 付近にグルコースからグルコン酸への酸化に起因するとみられる酸化ピークが見られた。また、その電流密度値は、Pt および Au 単一系の時よりも高い値となった。このことから、以降の検討において Pt-Au 合金ナノ粒子をグルコース酸化触媒として用いることとし、Pt-Au 合金ナノ粒子触媒について詳細な検討を行った。

4.3.2 グルコース酸化特性に及ぼす Pt-Au 金属ナノ粒子の組成の影響

4.3.1 項の結果より、単一金属系(Pt, Au)よりも高いグルコース酸化能を示した、Pt-Au 合金ナノ粒子触媒において、組成比を種々変化させた時のグルコース酸化特性に及ぼす影響について検討を行った。図 4-7 に種々の組成比で調製した Pt-Au 合金ナノ粒子におけるサイクリックボルタモグラムを示す。その結果、+0.15 V~+0.3 V vs. Ag/AgCl 付近にグルコースからグルコン酸への酸化に起因するとみられる酸化ピークが見られ、Pt:Au=1:4 の時、電流密度が最大となった。しかし、それ以上になると大きく電流密度が低下することが分かった。この結果より、以降の検討では Pt:Au=1:4 で調製した合金触媒を用いて検討を行った。

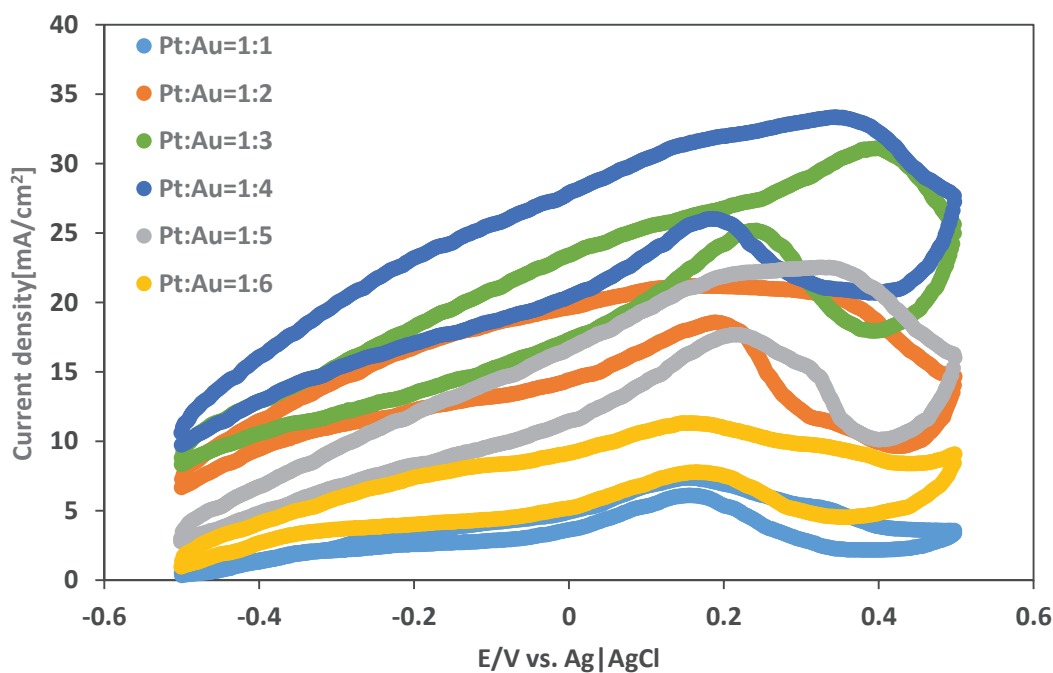


図 4-7 種々の組成比で調製した Pt-Au 合金触媒のグルコース酸化におけるサイクリックボルタモグラム

4.3.3 グルコース酸化特性に及ぼす炭素担持材料の影響

種々の炭素担持体を用いて Pt-Au 金属ナノ粒子触媒を調製した時のグルコース酸化におけるサイクリックボルタモグラムの結果を図 4-8 に示す。その結果、グルコースからグルコン酸への酸化に起因する+0.15 V vs. Ag /AgCl 付近での電流密度値において KB600 を用いたものが最大となった。表 4-2 に本研究で用いた炭素担持体の一次粒子径並びに 1 g 当たりの一次粒子数をまとめた。KB600 は一次粒子径が 34 nm と他の炭素担体と比べて小さく、比表面積も大きい。また、中空構造を有するため、単位 g あたりの粒子数が他の担持体と比べて多い。このことから電極表面の粒子密度が増加するため導電回路が密に形成し、酸化反応により取り出された電子の授受が円滑に行われ、高導電性を発現させることが可能である。その結果、他の炭素担体と比べ高い電流密度値を示したと考えられる。以降、KB600 を Pt-Au 金属ナノ触媒における最適な炭素担持体として用いることとした。

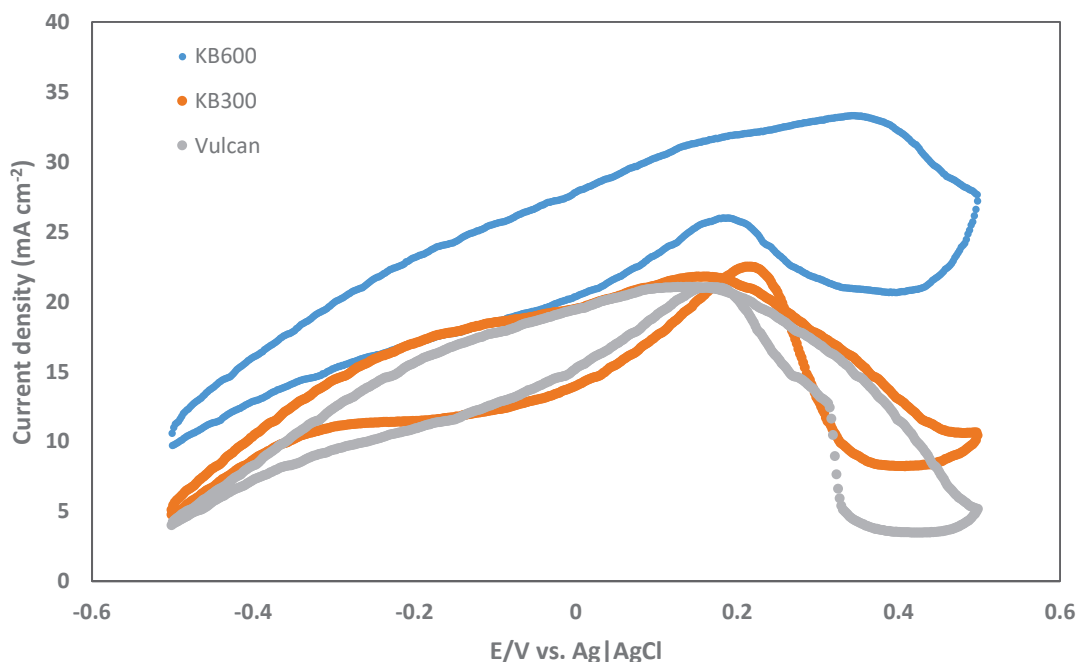


図 4-8 種々の炭素担体を用いた時の Pt-Au ナノ粒子触媒のグルコース酸化におけるサイクリックボルタモグラム [Glucose] = 0.2 M, [KOH] = 0.1 M, sweep rate = 20 mV s⁻¹

表 4-2 種々の炭素担持体の一次粒子径と粒子数

炭素担持体	一次粒子径 (nm)	一次粒子数 (×10 ¹⁵ 個/g)
KB 600	34	110
KB 300	40	38
Vulcan	37	16

4.3.4 グルコース酸化特性に及ぼす PVP 濃度の影響

4.3.4.1 種々の PVP 濃度で調製した Pt-Au 金属ナノ粒子触媒の TEM 観察

4.3.2 項で述べたように Pt-Au 二元合金ナノ粒子の最適な構成条件は Pt / Au = 1 / 4 (モル比) であることが分かった。そこで、この二元金属触媒の粒子径および分散状態に及ぼす安定化剤 (PVP) 濃度の影響について検討を行った。図 4-9 に様々な濃度の PVP を用いて調製した Pt-Au 二元合金ナノ粒子の TEM 像を示す。

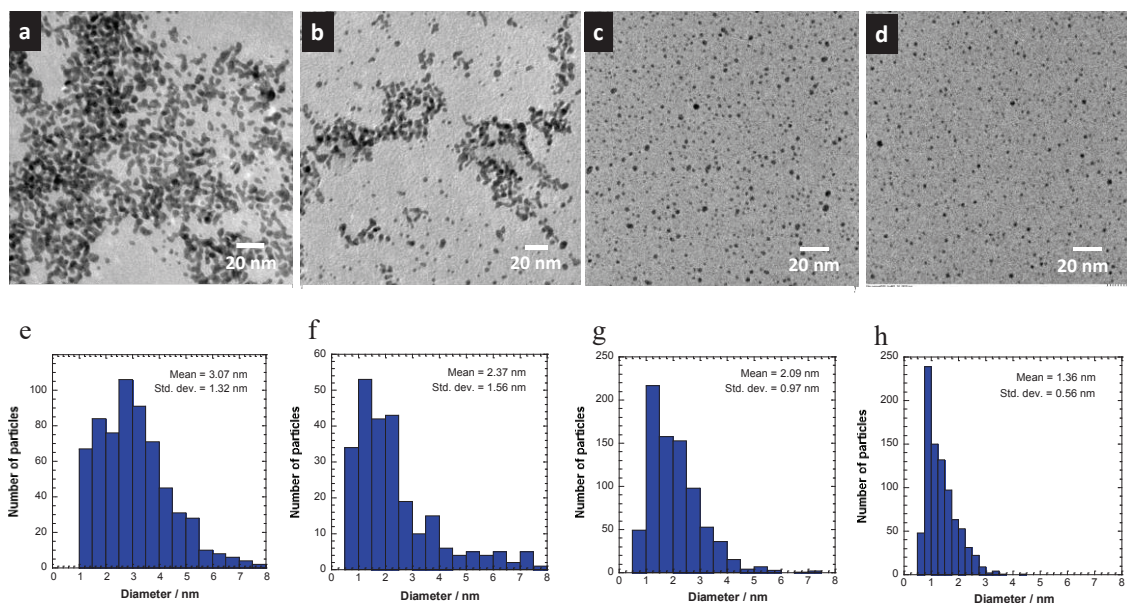


図 4-9 様々な PVP 濃度で調製した Pt-Au 二元合金ナノ粒子の TEM 像および粒子径分布 [PVP] / [metal] (モル比) = (a, e) 0, (b, f) 0.1, (c, g) 1, (d, h) 10, (Pt-Au 全濃度: 2×10^{-4} M).

その結果、PVP の非存在下では、球状だけでなく楕円状の触媒粒子が凝集している様子が観察された (図 4-9(a))。この不定型な粒子の平均粒子径は約 3.1 nm、標準偏差値は 1.32 nm であった (図 4-9(e))。次に、PVP を添加したときの TEM 画像に着目すると、PVP 濃度の増加に伴い不定型な楕円状の粒子の数が減少し、相対的に球状粒子の数が増加した。また、[PVP]/[metal]=1 以上では、ほぼ全ての粒子が球状あることが分かった (図 4-9(b)-(d))。このときの平均粒子径と標準偏差値を算出したところ、いずれも PVP 割合の増加に伴い減少し、[PVP]/[metal]=10 における平均粒子径は約 1.4 nm、その標準偏差値は約 0.6 nm であることが分かった (図 4-9(f)-(h))。これは安定化剤により金属ナノ粒子の結晶成長が抑制されるとともに、嵩高い PVP による立体斥力によって金属ナノ粒子間の凝集が抑制されたためであると考えられる。このことから、安定化剤の濃度が [PVP]/[metal] ≥ 1 であれば金属ナノ粒子は単独で分散し、凝集体の形成は起こらないことが分かった。

次に、種々の濃度の PVP を用いて調製した PtAu₄ ナノ粒子を炭素担体 (KB600) へ担持させた時の TEM 画像を図 4-10 に示した。

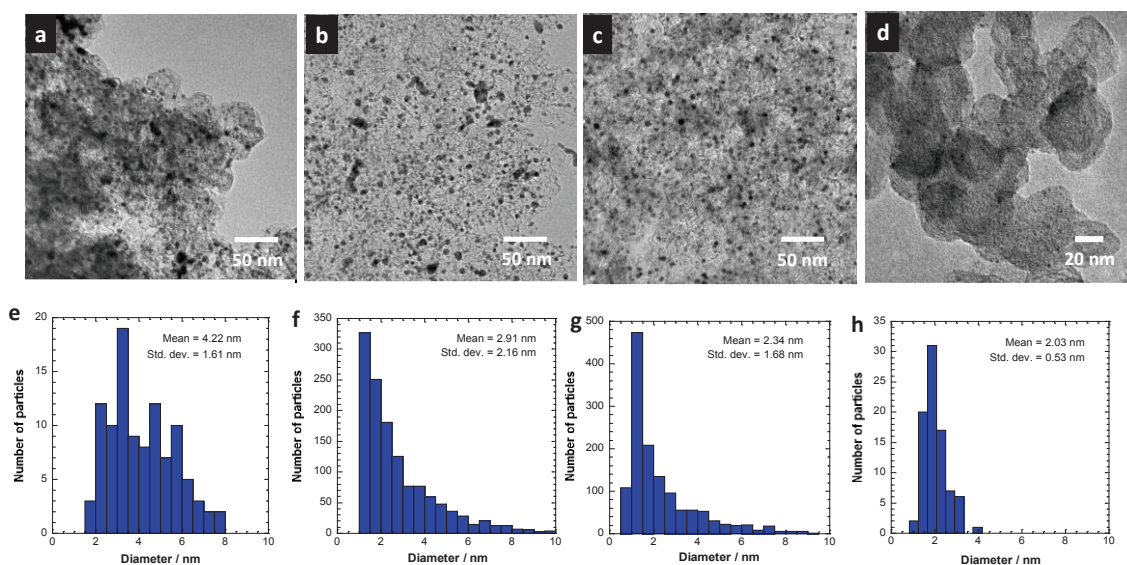


図 4-10 様々な PVP 濃度で調製した Pt-Au 二元合金ナノ粒子の炭素担体へ担持させた時の TEM 像および粒子径分布
 [PVP] / [metal] (モル比) = (a, e) 0, (b, f) 0.1, (c, g) 1, (d, h) 10, (Pt-Au 全濃度: 2×10^{-4} M).

その結果、PVP 無添加の場合、金属ナノ粒子および KB600 が凝集する様子が観察された (図 4-10(a)) が、PVP を添加すると KB600 表面に比較的多量の金属ナノ粒子が凝集することなく担持されることが分かった。TEM 画像より算出した平均粒子径に着目すると、KB600 担持前と比較して金属ナノ粒子の粒子径が大きいことが分かった。これは、金属ナノ粒子表面の PVP の一部が KB600 表面に吸着することにより、金属ナノ粒子が合一することにより成長したためと考えられる。

4.3.4.2 種々の PVP 濃度で調製した Pt-Au 金属ナノ粒子触媒のサイクリックボルタンメトリー

種々の PVP 濃度で調製した Pt-Au 金属ナノ粒子触媒を用いたグルコース酸化におけるサイクリックボルタモグラムの結果を図 4-11 (a)に示す。その結果、+0.15 V vs. Ag /AgCl 付近で小さなアノードピークが観測された。これはグルコースからグルコン酸への酸化に起因すると考えられる。このアノードピークの電流密度値と PVP 濃度の関係を図 4-11 (b)に示す。PVP を使用していない Pt-Au 触媒における電流密度値は 7 mA cm^{-2} であったが、PVP 濃度の増加に伴い、徐々に電流密度値が上昇し、[PVP] / [metal] = 1 の時に 10 mA cm^{-2} で最大となった。しかしながら、それ以上に PVP 濃度が高い [PVP] / [metal] = 10 における電流密度値は 4 mA cm^{-2} と減少することが分かった。グルコースは金属ナノ粒子表面において、その触媒作用により容易に酸化されるが、PVP 表面では酸化されない。従って、[PVP] / [metal] = 10 では、金属ナノ粒子表面に PVP が過剰量吸着し、グルコース酸化に係る金属ナノ粒子表面が遮蔽されるために、電流密度値が低下したものと推察される。

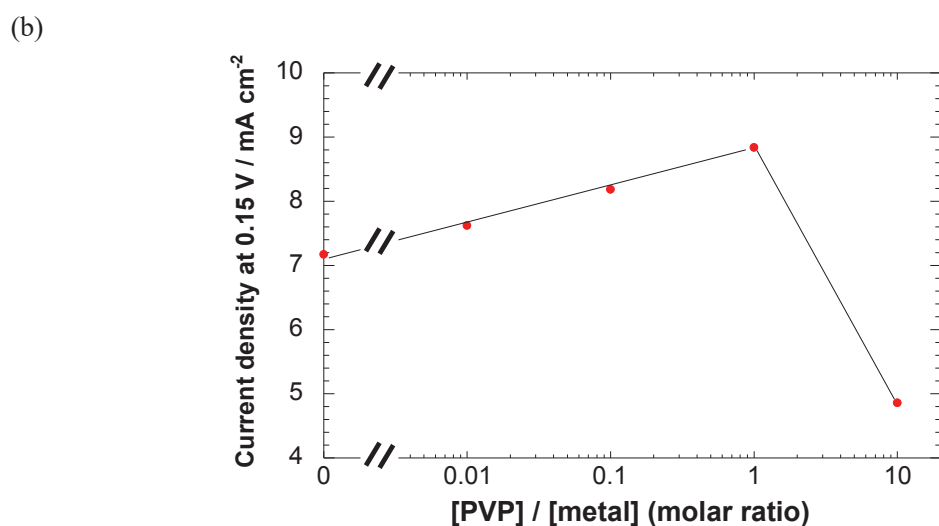
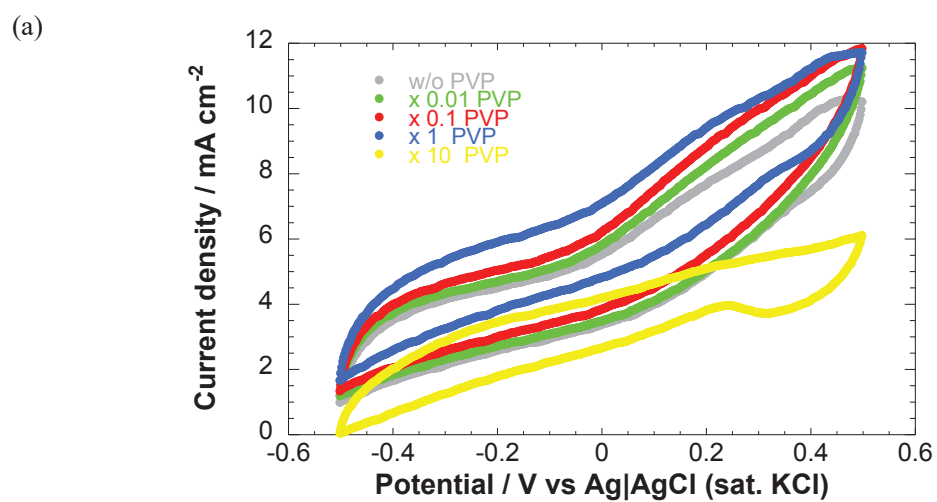


図 4-11 (a) 種々の PVP 濃度で調製した Pt-Au ナノ粒子触媒のグルコース酸化におけるサイクリックボルタモグラム [Glucose] = 0.2 M, [KOH] = 1.0 M, sweep rate = 20 mV s⁻¹.

(b) 種々の PVP 濃度で調製した Pt-Au ナノ粒子触媒のグルコース酸化における+0.15 V (vs Ag|AgCl) 時の電流密度値

4.3.4.3 燃料電池性能

PVP 濃度を種々変化させたときの燃料電池の性能について、アノード電極に Pt-Au 金属ナノ粒子触媒、カソード電極に Pt / C ペーパー電極を用い、0.2 M グルコースに 1.0 M KOH を混和させた燃料を用いて実験を行った。図 4-12 に、種々の PVP 濃度におけるグルコース燃料電池の電流-電圧特性(I-V)および電流-出力特性(I-W)を示す。その結果、最高出力密度値は(0 x PVP) < (10 x PVP) < (1 x PVP)の順序で大きくなり、1 x PVP では 0.38 V 時に 12.7 mW cm⁻²と高い値を示した。

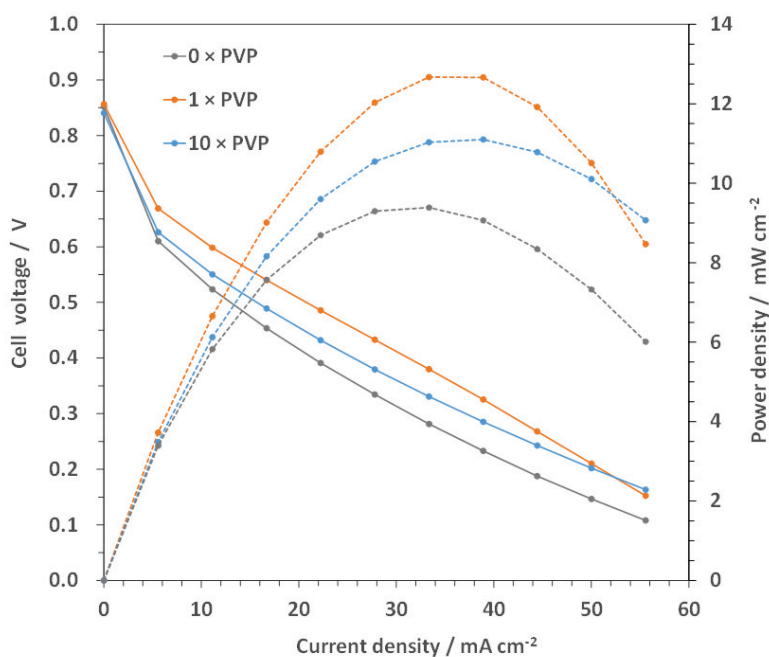


図 4-12 種々の PVP 濃度により調製した Pt-Au 金属ナノ粒子触媒を用いたグルコース燃料電池における電流-電圧特性(I-V)並びに電流-出力特性(I-W)

[Glucose] = 0.2 M, [KOH] = 1.0 M, anode : Pt-Au / C (loading : 1 mg cm⁻²), cathode : Pt / C.

4.4 結言

本章では「貴金属ナノ粒子触媒のグルコース酸化特性と電気化学的評価」と題して、種々の貴金属ナノ粒子および貴金属合金ナノ粒子触媒を用いて、グルコース酸化特性を評価するとともに、PVP の濃度が及ぼすグルコース酸化特性への影響について検討を試みた。得られた知見をまとめると以下のようになる。

種々の貴金属ナノ粒子触媒がグルコース酸化特性に及ぼす影響

種々の貴金属ナノ粒子(Pt, Au, Ru, Pd)を用いて、グルコース酸化特性を評価した結果、Pt ナノ粒子並びに Au ナノ粒子において、他の金属触媒と比較して高いグルコース酸化特性を示すことが分かった。また、Pt と Au の合金ナノ粒子触媒を調製したところ、Pt 並びに Au 単一系の時と比べさらに高いグルコース酸化特性を示し、Pt:Au=1:4 で調製した時、電流密度値が最大となることが分かった。

Pt-Au 金属ナノ粒子触媒を用いたグルコース酸化特性における最適条件の検討

種々の炭素担持体(KB 300, KB 600, Vulcan)を用いて Pt-Au 金属ナノ粒子触媒を調製し、グルコース酸化特性について検討を行った。その結果、炭素担持体に KB 600 を用いた時、電流密度が最大となることが分かった。KB 600 は中空構造を有するため、単位 g あたりの粒子数が他の担持体と比べて多い。このことから電極表面の粒子密度が増加するため導電回路が密に形成し、電子の授受が円滑に行われ、他の炭素担持体と比べ高い電流密度値を示したと考えられる。

PVP の濃度が及ぼすグルコース酸化特性への影響

種々の PVP 濃度で調製した Pt-Au 金属ナノ粒子触媒のグルコース酸化特性に及ぼす影響について検討した。その結果、PVP の濃度が $[PVP] / [metal] \geq 1$ のときに Pt-Au 合金ナノ粒子は凝集せず単独で分散することが分かった。サイクリックボルタモグラム測定を行ったところ、 $[PVP] / [metal] = 1$ の時に 10 mA/cm^2 で最大となり、平均粒子径が約 2 nm の Pt-Au 触媒を調製できることが分かった。一方、PVP 濃度が高い $[PVP] / [metal] = 10$ における電流密度値は 4 mA/cm^2 と減少することが分かった。これは金属ナノ粒子表面に PVP が過剰量吸着しグルコース酸化に係る金属ナノ粒子表面が PVP で被覆されるために、電流密度値が低下したものと推察される。

4.5 参考文献

- 1) S. C. Barton, J. Gallaway, P. Atanassov, *Chem. Rev.*, **104**, 4867 (2004).
- 2) M. T. Meredith, S. D. Minteer, *Annu. Rev. Anal. Chem.*, **5**, 157 (2012).
- 3) M. A. dos Santos Bernardes, “Biofuel’s Engineering Process Technology”, InTech, Rijeka, pp. 467 (2011).
- 4) H. Sakai, T. Nakagawa, Y. Tokita, T. Hatazawa, T. Ikeda, S. Tsujimura, K. Kano, *Energy Environ. Sci.*, **2**, 133 (2009).
- 5) S. Xu, S. D. Minteer, *ACS Catal.*, **2**, 91 (2012).
- 6) E. Katz, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 6803 (2003).
- 7) K. Onishi, T. Nakamura, S. Nishihama, K. Yoshizuka, *Ind. Eng. Chem. Res.* **49**, 6554 (2010).
- 8) 吉塚和治; 西浜章平. 有価廃棄物からのレアメタルの分離回収プロセス. リサイクル・廃棄物事典, 産業調査会, pp. 518 (2012).
- 9) K. Lee, O. Savadogo, A. Ishihara, S. Mitsushima, N. Kamiya, and K. Ota, *J. Electrochem. Soc.*, **153**, A20 (2006).
- 10) K. Kunimatsu, *J. Electroanal. Chem.*, **213**, 155 (1986).
- 11) S. Ha, R. Larsen, and R. I. Masel, *J. Power Sources*, **144**, 28 (2005).
- 12) C. Lamy, A. Lima, V. LeRhun, F. Delime, C. Coutanceau, J. -M. Leger, *J. Power Sources*, **105**, 283 (2002).
- 13) D. Basu, S. Basu, *Int. J. Hydrogen Energy*, **36**, 14923 (2011).
- 14) D. Basu, S. Basu, *Electrochim. Acta*, **56**, 6106 (2011).
- 15) D. Basu, S. Basu, *Int. J. Hydrogen Energy*, **37**, 4678 (2012).
- 16) M. Pasta, R. Ruffo, E. Falletta, C. M. Mari, C. Della Pina, *Gold Bulletin*, **43**, 57 (2010).

第五章

Pt-Au 金属ナノ粒子触媒を用いたグルコース燃料電池の

最適発電条件の検討

5.1 緒言

現在日本では、電力の供給と引き換えに大気中へ大量の二酸化炭素を排出しており、その温室効果による地球温暖化が問題視されている。こうした現状から、二酸化炭素を排出せずに電力を計画的に生産できる経済的な発電法の研究・開発が求められている^{1),2)}。この様な背景から、近年、クリーンな発電とエネルギーを有効に利用する手段として燃料電池が注目されている。図 5-1 に示す通り、燃料電池は化学電池に分類され、化学反応で電気を取り出しており、反応過程での二酸化炭素や窒素酸化物などの環境負荷物質の排出は少ない。さらに、燃料としてのグルコースを安定に供給することができれば計画的に電力を生産し続けることができる筈である。グルコースを用いた発電法や燃料電池³⁾は、現在多くの企業においても実用化が進められているが、それらは概して酵素を利用⁴⁾⁻⁹⁾しているため、耐久性や量産化時のコストの問題が内在している。このような金属ナノ粒子¹⁰⁾⁻¹⁹⁾を触媒として用いることで、酵素に比べて耐久性が高く、量産化も比較的簡単に行えるものと推定している。そこで本研究では、グルコースの酸化による発電方法並びに燃料電池について着目し³⁾、第四章で得られた知見に基づき、Pt-Au ナノ粒子触媒¹⁰⁾をアノード電極に用いた直接グルコース形燃料電池における、電極素材の選定やイオン交換膜の種類、燃料供給流量、燃料グルコース濃度、触媒層内の I/C 比の各検討項目において、最も高出力であった条件を最適発電条件とした直接グルコース形燃料電池の開発を目的とする。また、電力を必要な時に有効利用するための手段の一つとして蓄電池等への充電が挙げられる。そこで直接グルコース形燃料電池を用いた蓄電池への充電についても検討を行った。さらに、第二章、第三章の知見から得られた、生体内加工セルロース(牛糞)由来グルコースを用いた時の出力特性についても検討を行った。

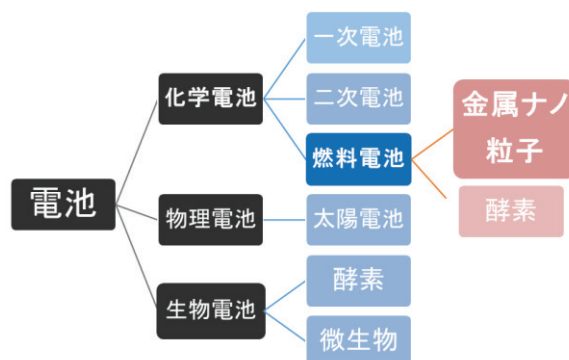


図 5-1 電池の種類と分類

5.2 実験方法

5.2.1 シングルセルをベースとした各 부품の量産

シングルセルをベースとして、セルを構成する各 부품の量産を行った(図 5-1)。まず、電極のスケール UP を視野に入れ、シリコンパッキン中央の電極をセットする開口部は 7 cm x 7 cm に変更した。その後、得られた数値を基に 3D CAD で製図化を行い、データファイルに落とし込んだ。この図面を各製造先に持ち込み、セパレータは人造黒鉛プレート、外枠はステンレス、集電板は金メッキ銅板、ガスケットはシリコンシートを材料として部品の特注製造を行った。

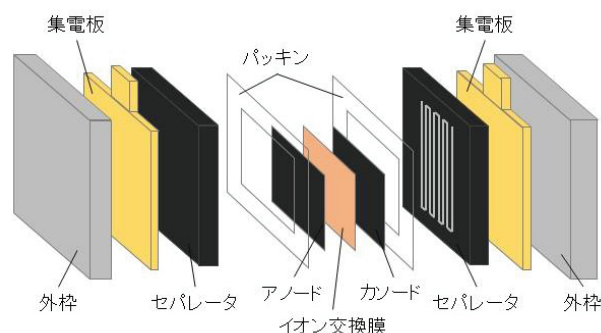


図 5-1 シングルセルの構成図

5.2.2 電極素材の検討

燃料電池の電極材料として、カーボンクロスやカーボンペーパー等の種々の炭素素材が広く用いられている。そこで電極素材の種類が燃料電池の出力に与える影響について検討した。カーボンクロス(Fuel Cell Earth 社製, CCP40)並びにカーボンペーパー(東レ社製, TGP-090)を 3 cm x 3 cm のサイズに調整し、アノード側の炭素素材には 4.2.2.2 項で調製した Pt-Au ナノ粒子触媒を、カソード側の炭素素材には 4.2.2.1 項で調製した Pt ナノ粒子触媒を、 0.5 mg cm^{-2} になるようにそれぞれ塗布した。各電極を下記の組み合わせで、それぞれシングルセルを作製しその時の電流-出力特性を測定した。

- ① アノード:カーボンクロス / カソード:カーボンペーパー
- ② アノード:カーボンクロス / カソード:カーボンクロス
- ③ アノード:カーボンペーパー / カソード:カーボンペーパー
- ④ アノード:カーボンペーパー / カソード:カーボンクロス

5.2.3 高い表面積を有する電極の調製

5.2.3.1 アノード電極の調製

これまで燃料電池評価に用いていた電極のサイズは 3 cm x 3 cm であったが、実用化に向けた電流値の向上を目的として、電極のサイズを 7 cm x 7 cm とし、5.2.2 項の調製法に準じて触媒量が 0.5 mg cm⁻² になるようにカーボクロス(7 cm x 7 cm) に塗布しアノード電極を作製した。なお、Pt-Au 金属ナノ粒子触媒の触媒量は炭素担持体(KB600)に対して 5 wt%とした。

5.2.3.2 カソード電極の調製

これまでカソード電極は市販の Pt/C ペーパー(東レ社製 EC-E20-10-07, 3 cm x 3 cm)を用いていたが購入単価が高価であり、実用化には、コストの削減が求められている。そこで、自作によるカソード電極の作製を行った。カソード用の触媒は 4.2.2.1 項の方法により調製した Pt ナノ粒子とした。なお、Pt ナノ粒子触媒の触媒量は炭素担持体(KB600)に対して 5 wt%とした。この触媒を 5.2.2 項の調製法に準じて触媒量が 0.5 mg cm⁻² になるようにカーボンペーパー(7 cm x 7 cm)に塗布しカソード電極を作製した。

5.2.4 イオン交換膜

これまでグルコース燃料電池のイオン交換膜には陽イオン交換膜(強酸性 Na 型, 一価陽イオン選択透過[陽イオン官能基; スルホン酸基], CIMS, 0.15 mm 厚, アストム社製)を用いていたが、陰イオン交換膜を使用することで燃料電池の出力の向上が報告されている¹⁸⁾。そこで、一価陰イオン選択透過性を有する陰イオン交換膜(強塩基性 Cl 型, 一価陰イオン選択透過[陰イオン官能基; 四級アンモニウム基], ACS, 0.13 mm 厚, アストム社製)を用いた。

5.2.5 燃料供給速度による性能評価

効率の良い運転条件を把握するため、アノード側並びにカソード側において種々の燃料供給速度で運転させた時の燃料電池の性能について評価した。5.2.1 項で作製したシングルセルを用いて、アノード側に燃料として 0.2 M グルコース/1.0 M KOH 混合水溶液を流量 1.25, 2.5, 5, 10 mL/min の各速度で供給し、カソード側には混合空気を流量 0.25, 0.5, 1, 2 L/min の各速度で供給した。この時の、最高出力密度時の電流密度値並びに電圧値を得ることで最適な燃料供給速度について検討を行った。

5.2.6 アノード側燃料濃度による性能評価

アノード側の燃料であるグルコース濃度について種々の濃度で発電させた時の燃料電池の性能について検討を行った。グルコース濃度を 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 M にそれぞれ調製し、そこに 1.0 M KOH を加えた混合水溶液燃料を、流量 5 mL/min で供給した。カソード側には混合空気を 2 L/min で供給し、その時の電流-出力特性(I-W)について東陽テクニカ社製の燃料電池評価装置 PEM test8900DM を用いて性能評価を行った。

5.2.8 スタック型グルコース燃料電池を用いた蓄電ユニットの作製

5.2.7 項で開発を行ったスタック型燃料電池に、チャージコントローラー(EPsolar 社製, Tracer1215BN)及び、密閉型 12 V バッテリー(LONG 社製, GEL 型 LG7-12, 12 V 7 Ah)を接続した。更に、燃料電池に送液ポンプ(KNF 社製, FEM1.10FT.18S2)、燃料タンクを組み合わせ、蓄電ユニットを作製した。図 5-3 にその構成図を示す。

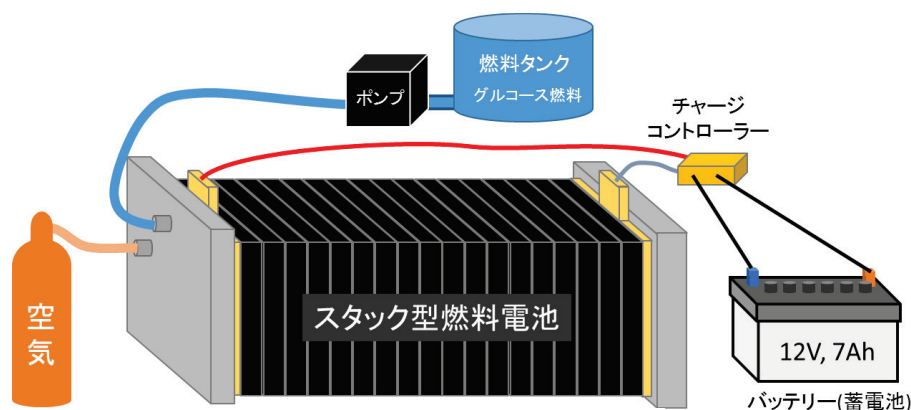


図 5-3 蓄電ユニットの構成図

5.2.9 充電試験

5.2.8 項で作製した蓄電ユニットの充電試験を行った。充電試験を行う前にまず、満充電されている 12V 7Ah バッテリーに DC12V 蛍光灯を接続し 1 時間点灯させることで約 8.4 Wh(満充電時に対して1割)の電力を消費させた。このバッテリーを用いて 5.2.8 項の蓄電ユニットで満充電させた(図 5-4)。充電はチャージコントローラーによって制御し、チャージコントローラーに付属のモニタリング用ソフトで充電の状況を逐次確認しながら試験を行った。チャージコントローラーが実際に行う制御としては、まず大きな電流をバッテリーへ流して電圧を 14.4V まで上げ、その後 14.4V を維持しながら微小の電流を流して充電する。この時の充電方式を「ブーストチャージ」と呼ぶ。このブーストチャージによってバッテリーが満充電となると、自動的に「フロートチャージ」と呼ばれる充電方式に切り替わる。このフロートチャージでは、バッテリーの満充電状態を維持するために、バッテリーが自然放電によって失った電流分を定期的に充電していく。従って、今回の充電試験では、モニタリング用ソフトでブーストチャージからフロートチャージに切り替わった時を満充電と定義し、それに要した時間を計測した。

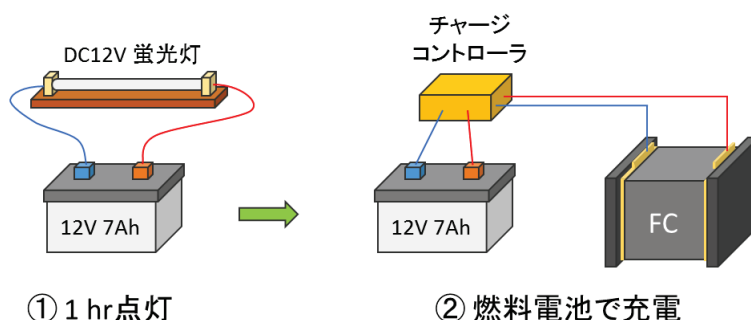


図 5-4 充電試験の模式図

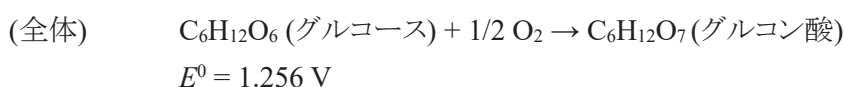
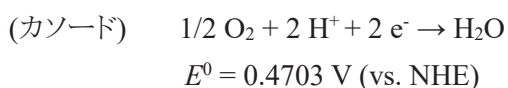
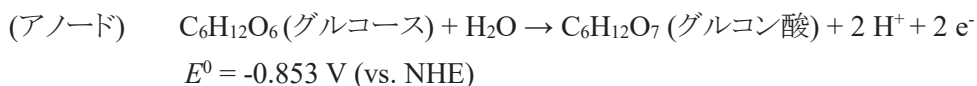
5.2.10 グルコース以外の糖を燃料として用いた時の燃料電池特性評価

これまで燃料としてグルコースを用いているが、他の糖についても燃料として用いることが出来れば Pt-Au 金属ナノ粒子触媒を用いた燃料電池の利用性がさらに高まると考えられる。そこで、グルコースと同様の単糖であるエリトース[C4]、キシロース[C5]、ガラクトース[C6]及びガラクトースとグルコースが β -1.4 グリコシド結合した二糖のラクトース[C6-C6]を、1 M KOH 溶液に各 0.2 M となるように調製し、シングルセルを用いて電流-出力特性について検討した。

5.3 結果および考察

5.3.1 直接グルコース形燃料電池の出力特性に及ぼすイオン交換膜の影響

直接グルコース形燃料電池のイオン交換膜に陽イオン交換膜を用いた時と、陰イオン交換膜を用いた時の反応模式図を図 5-5 に示す。陽イオン交換膜を用いた場合、アノードでグルコースが酸化され、そこで生じたプロトンがカソードへと移動し酸素を還元させ水を生成する²⁰⁾。



一方、陰イオン交換膜を用いた場合、カソードで酸素並びに水が還元され、そこで生じた水酸化物イオンがアノード側へ移動し、アノードでグルコースの酸化とともに水が生成する¹⁸⁾。

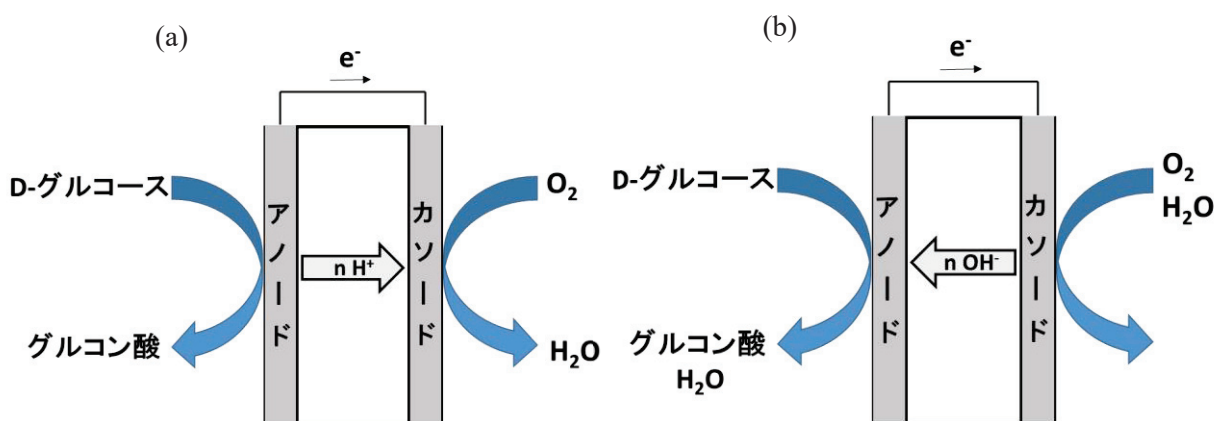
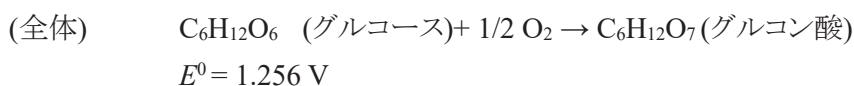
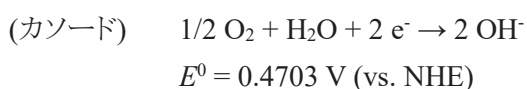
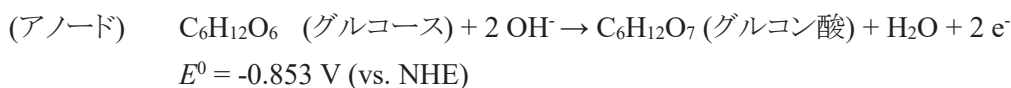


図 5-5 陽イオン交換膜(a)と陰イオン交換膜(b)を用いた時の反応模式図

直接グルコース形燃料電池に用いるイオン交換膜に一価陽イオン選択透過性を有する陽イオン交換膜並びに一価陰イオン選択透過性を有する陰イオン交換膜を用いた時の電流-出力特性(I-W)と電流-電圧特性(I-V)をそれぞれ図 5-5 および図 5-6 に示す。その結果, 陽イオン交換膜を用いた時の直接グルコース形燃料電池の開回路電圧は 0.9 V であり, 最高出力密度値は 7.4 mW/cm²であった。また, 最高出力時における電圧および電流密度はそれぞれ 0.38 V および 19.4 mA/cm²であった。一方, 陰イオン交換膜を用いた時の開回路電圧は 0.92 V, 最高出力密度値は 6.2 mW/cm²であり, そのときの電圧は 0.37 V, 電流密度は 16.6 mA/cm²であった。このことから, どちらも開回路電圧値はほぼ変わらないが, 陽イオン交換膜を用いた方が電流密度値は高く, それに伴い出力も高いことが分かった。

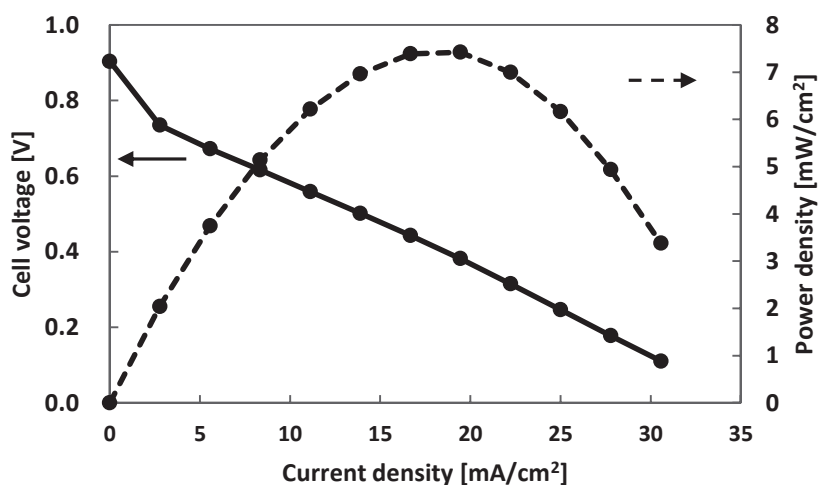


図 5-6 直接グルコース形燃料電池における陽イオン交換膜を用いた時の電流-出力特性(I-W)並びに電流-電圧特性(I-V) 燃料:(アノード) 0.2 M グルコース/1 M KOH 混合水溶液, (カソード) 加湿混合空気

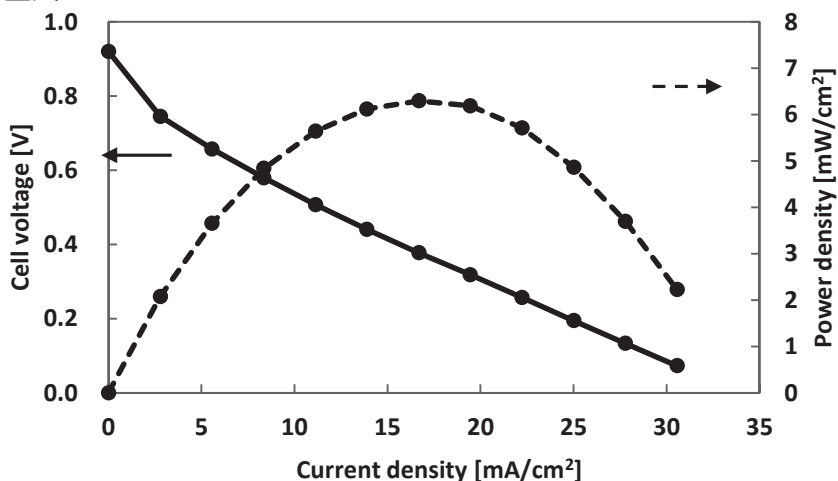
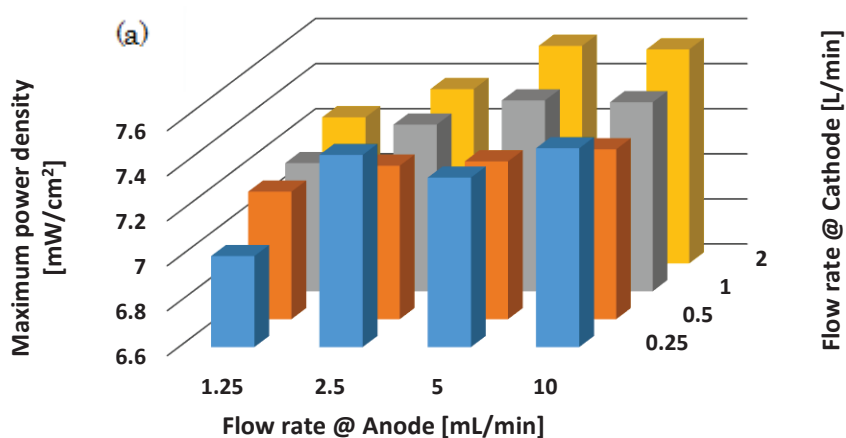


図 5-7 直接グルコース形燃料電池における陰イオン交換膜を用いた時の電流-出力特性(I-W)並びに電流-電圧特性(I-V)燃料:(アノード) 0.2 M グルコース/1 M KOH 混合水溶液, (カソード) 加湿混合空気

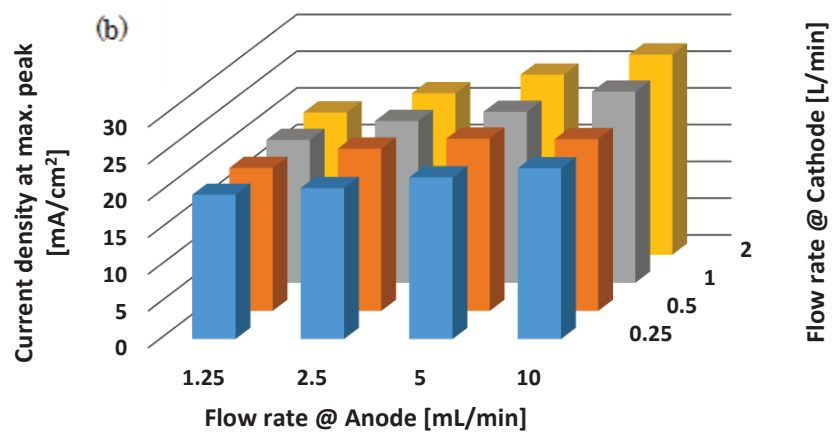
5.3.2 直接グルコース形燃料電池の出力特性に及ぼす燃料供給速度の影響

電気化学反応は、反応物質が拡散や対流により電極表面と接触することにより進行するため、燃料電池の出力特性は燃料の供給速度に大きく依存することが知られている¹⁹⁾。そこで、アノード側およびカソード側に種々の速度で燃料を供給したときの燃料電池の性能について評価した。アノード側に燃料として0.2 M グルコース/1.0 M KOH 混合水溶液を流量 1.25, 2.5, 5, 10 mL/min の各速度で供給し、カソード側には混合空気を流量 0.25, 0.5, 1, 2 L/min の各速度で供給した。この時の最高出力密度時における電流密度値並びに電圧値を図 5-8 に示す。その結果、アノード側およびカソード側のいずれにおいても供給速度の増大に伴い、出力密度値および電流密度値は増大することが分かった。しかし、アノード側のグルコース/KOH 混合水溶液の供給速度が大きくなると、電圧値は逆に大きく低下することが分かった。これは、燃料クロスオーバーの影響によるものと考えられる。すなわち、アノード側に供給されたグルコース燃料が、電極素材であるカーボンクロス並びに陽イオン交換膜を通してカソード側に流入することにより、電圧低下が引き起こされたものと推察される。これらのことより、アノード側の供給量は 2.5–5.0 mL/min 程度が望ましいと考えられる。一方、カソード側は加湿混合空気の供給速度が増大しても、電圧値はほとんど変化せず、供給速度が最も速い 2 L/min のときに最大出力密度が最も高くなることが分かった。以上よりカソード側の供給量は 2 L/min が望ましいと考えられる。



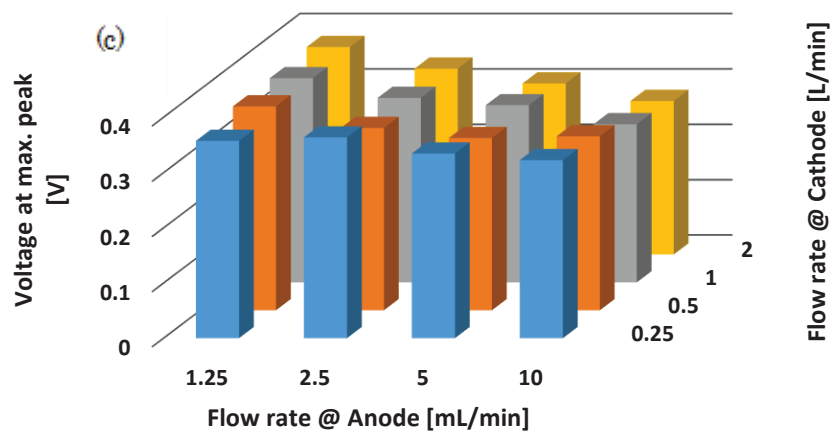
		Anode (mL/min)			
		1.25	2.5	5	10
Cathode (L/min)	0.25	7.0	7.5	7.4	7.5
	0.5	7.2	7.3	7.3	7.4
	1	7.2	7.3	7.4	7.4
	2	7.2	7.4	7.6	7.5

(mW/cm²)



		Anode (mL/min)			
		1.25	2.5	5	10
Cathode (L/min)	0.25	19.6	20.5	22.0	23.2
	0.5	19.4	22.1	23.4	23.4
	1	19.4	22.0	23.2	26.0
	2	19.3	22.0	24.5	27.2

(mA/cm²)



		Anode (mL/min)			
		1.25	2.5	5	10
Cathode (L/min)	0.25	0.36	0.36	0.33	0.32
	0.5	0.37	0.33	0.31	0.31
	1	0.37	0.33	0.32	0.29
	2	0.37	0.34	0.31	0.28

(V)

図 5-8 燃料供給速度を変えた時の(a)最高出力密度値およびその時の(b)電流密度値と(c)電圧値

5.3.3 直接グルコース形燃料電池の出力特性に及ぼすグルコース濃度の影響

アノード側の燃料であるグルコースについて種々の濃度で発電させた時の最高出力密度値を図 5-9 に示す。グルコース濃度を 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 M になるようにそれぞれ調製し、さらに 1.0 M KOH を加えた混合水溶液燃料を流量 5 mL/min で供給した。カソード側には加湿空気を 2 L/min で供給した。その結果、0.4 ~0.5 M のときに出力が最大となった。グルコース濃度が低い場合は貴金属ナノ粒子触媒の反応活性点においてグルコースがすばやく酸化されるためグルコース濃度の増加に伴い出力も向上する。一方、グルコースが高濃度になると、触媒表面において酸化生成物であるグルコン酸の量が増加する。グルコン酸の生成量が、その触媒表面からの脱着量よりも多くなると、やがて触媒表面はグルコン酸で被覆され、グルコースの反応活性点が減少すると考えられる。このような理由により、高濃度領域においてはグルコース濃度の増加に伴い出力が低下したものと考えられる。

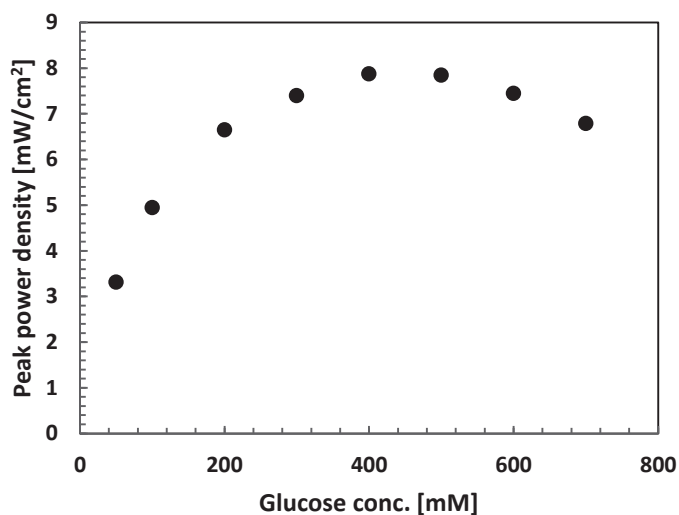
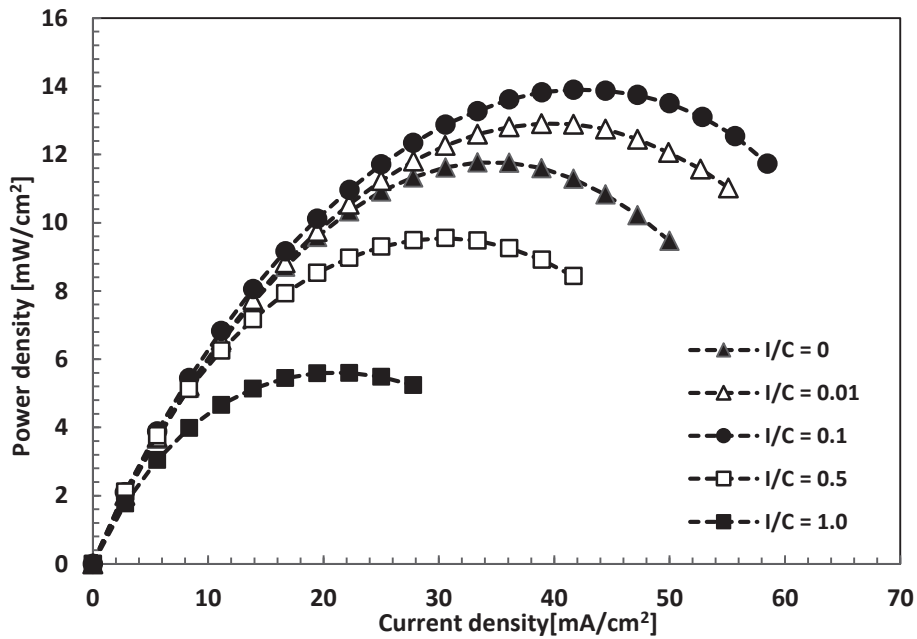


図 5-9 種々のグルコース濃度で供給した時の最大出力密度値

5.3.4 直接グルコース形燃料電池の出力特性に及ぼすアイオノマー質量(I/C 比)の影響

カーボクロスを用いたアノード電極の触媒層は、アイオノマー、触媒、カーボンブラックで構成されている。アイオノマーは、電極素材であるカーボクロスと触媒を結着させ、反応によって生じた電子の電極への伝導性を向上させる。しかし、触媒層内のアイオノマーの割合に応じて活性化損失やオーム損失などが生じ、燃料電池の出力が低下することが知られている²⁰⁾。そこで、直接グルコース形燃料電池の出力特性に及ぼす I/C の影響について検討した結果を図 5-10 に示す。その結果、I/C 比=0.1 の場合に最も高い出力密度を示すことが分かった(最大出力密度 13.9 mW/cm²)。これは、現在報告されている Pt-Au ナノ粒子触媒を用いたグルコース酸化において最大の値である。これまでの最大の値を報告していた Basu ら¹⁶⁾による Pt-Au ナノ粒子触媒の平均粒子径は約 5 nm であり、本研究では第四章で示したように、Pt-Au ナノ粒子触媒の平均粒子径は、PVP 濃度の最適化により約 2 nm であった。従って、比表面積も大きく、高出力を発現したのではないかと考えられる。また、炭素担持体において、Vulcan が広く用いられているが、本検討では第四章の知見から中空粒子構造を有する KB600 を用いている。KB600 は単位 g 当りの粒子数が多く比表面積の増加や電極表面の粒子密度の増加により導電回路が密に形成していることが考えられ、これらの複合的な要因により高出力が得られたと推察する。一方、出力密度は I/C 比が 0.1 までは I/C 比の増加に伴い増大するが、0.1 以上では著しく減少することが分かった。これは、アイオノマーの量が高すぎると、触媒の活性点がアイオノマーにより遮蔽されることや、その嵩高い構造に起因した立体斥力により、触媒表面へのグルコースの吸着が妨害されたためであると考えられる。また、本研究において最も出力密度が高かった I/C 比(0.1)は、気体燃料を用いた水素燃料電池の場合^{19), 20)}と比較すると一桁以上も小さい。その理由として、水素や酸素等の気体燃料を用いた燃料電池では、アイオノマーの量が少なすぎると反応に伴ってイオン交換膜が徐々に乾燥するため、イオン交換膜を介したイオンの移動効率が低下し出力が低下することが知られている²⁰⁾ためである。一方、液体燃料を用いた燃料電池の場合では、イオン交換膜が常に湿っており、イオンの移動効率が常に安定しているため、アイオノマーの割合が相対的に少ない時に出力が最大となったものと考えられる。

(a)



(b)

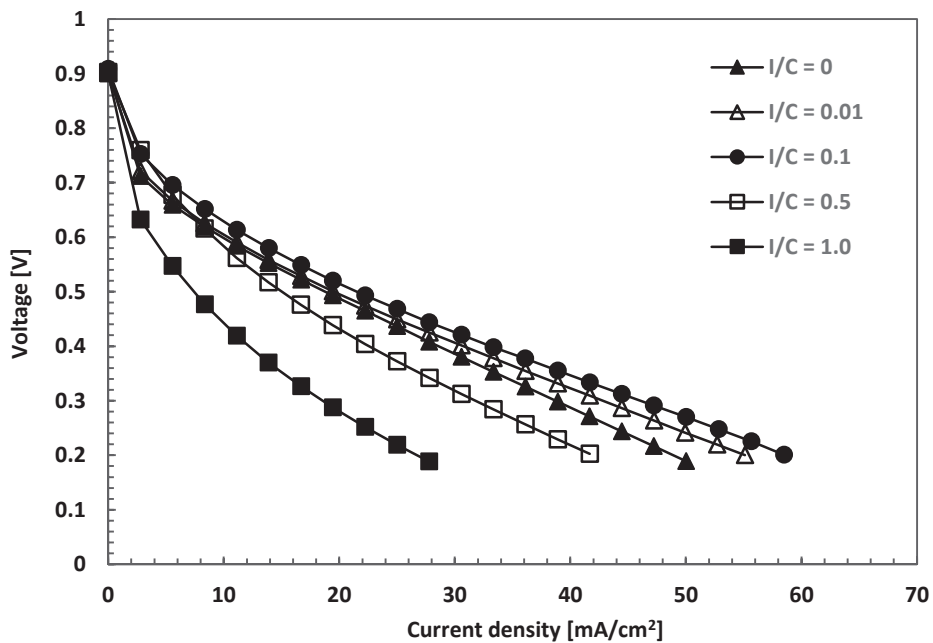


図 5-10 種々の I/C 比における直接グルコース形燃料電池の(a)電流-出力特性と(b)電流-電圧特性

燃料：(アノード)0.4 M グルコース/1 M KOH 混合水溶液(流速 5 mL/min)

(カソード)加湿混合空気(流速 2 L/min)

イオン交換膜：陽イオン交換膜

5.3.5 最適な電極素材の検討

Pt-Au 触媒を用いたグルコース燃料電池において最適な電極素材について検討を行った。カーボンクロス並びにカーボンペーパーで調製した両電極を、種々の組み合わせで燃料電池に装填した時の電流-出力特性を図 5-11 に示す。その結果、アノード側:カーボンクロス(Pt-Au/C)/カソード側:カーボンペーパー(Pt/C)の時に、最も高い出力密度となった。その理由として、カーボンクロスは複数の炭素繊維で編み込まれているため、表面積が大きいこと、および液体の燃料が繊維の奥まで浸透しやすいことが考えられる。一方、カソード側にカーボンクロスを用いると、気体の空気が繊維内を通過してイオン交換膜やアノード側にリークしたために、出力が低下したと考えられる。従って、アノード側は気密性が高いカーボンペーパーが望ましいと考えられる。

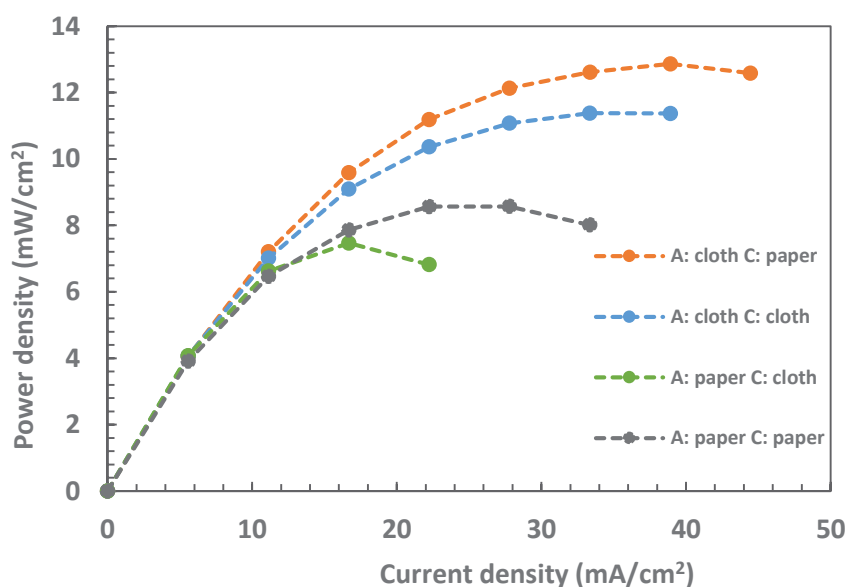


図 5-11 電極素材の組み合わせによる出力への影響

5.3.6 実用化に向けたスタック式直接グルコース形燃料電池の開発と充電試験

5.3.6.1 Pt-Au 金属ナノ粒子触媒を用いたスタック式直接グルコース形燃料電池

5.3.4 項の結果をもとに、イオン交換膜に陽イオン交換膜、アノード電極(7 cm × 7 cm)に I/C 比を 0.1 で調製した Pt-Au 金属ナノ触媒を用いてスタック式直接グルコース形燃料電池(スタック数:20)を作製した(図 5-12)。スタック式とは、図 5-1 の模式図に示した最小単位のセルを直列に複数積層させた燃料電池の構造である。したがって、スタックさせたセルの枚数に比例して開回路電圧が増大し、燃料電池の出力が上昇する。

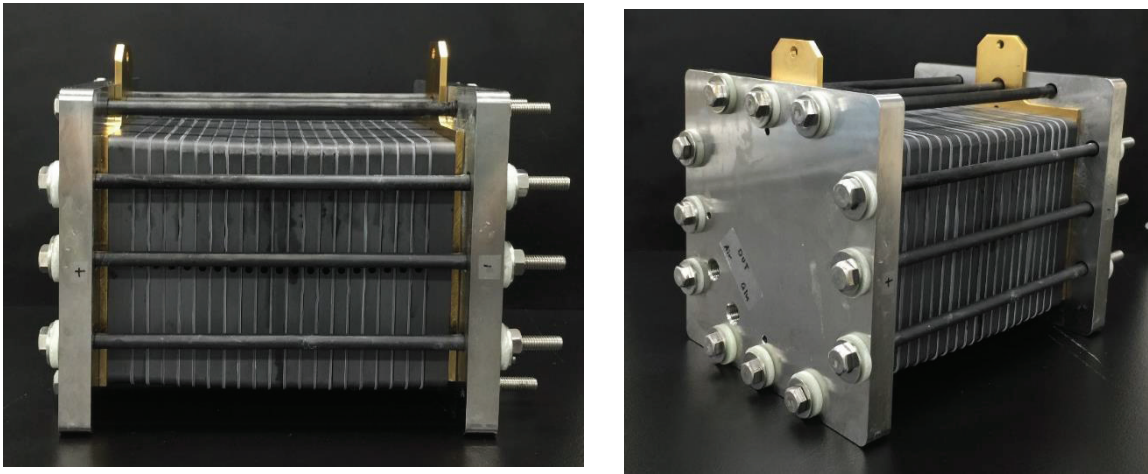


図 5-12 スタック型燃料電池の写真

5.3.6.2 スタック式燃料電池の予備実験

5.3.5.1 で組み立てたスタック式燃料電池(スタック数 20)に、グルコース燃料を供給して出力の確認を行ったところ、スタック式燃料電池の開回路電圧は約 12V であった。シングルセルにおいては約 0.8~0.9 V の開回路電圧が得られていたため、スタック式燃料電池の開回路電圧は理論上、約 16~18 V であるので、実測値は理論値よりも約 4~6V 低い値となった。この原因についてテスターによる調査を行ったところ、集電板(金メッキ銅板)から外枠(ステンレス製)に漏電が確認された。そこで、外枠の素材を導電性のステンレスから絶縁性の ABS 樹脂に変更し、スタック式燃料電池を組み立てた(図 5-13)。その結果、開回路電圧は、理論値通り約 16 V となり漏電も改善された。

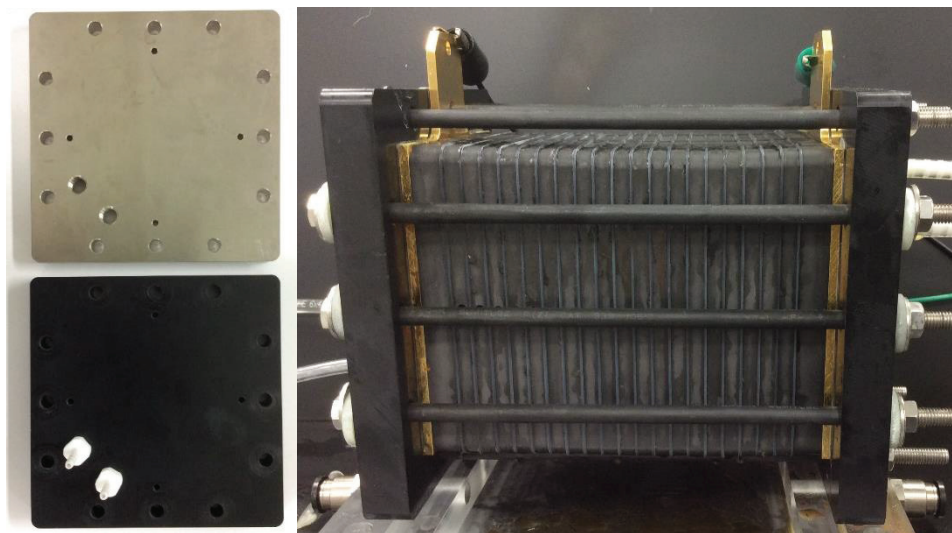


図 5-13 ABS 樹脂製を用いたスタック型燃料電池の写真(ABS 樹脂製外枠使用)
写真(左)の上側は漏電が確認されたステンレス製の外枠で、下側が絶縁性の ABS 樹脂製外枠。写真(右)は ABS 樹脂製外枠を用いたスタック型燃料電池を示す。

そこで、次にこのスタック型燃料電池を用いて、燃料電池評価を行った。その結果、スタック型燃料電池はシングルセルとほぼ同等の電池特性を示したことから、セルをスタックさせても電流-出力特性にほとんど変化はないことが確認できた(図 5-14)。つまり、シングルセルで得られていた出力とほぼ同じ出力をスタック型燃料電池でも出せることが分かった。

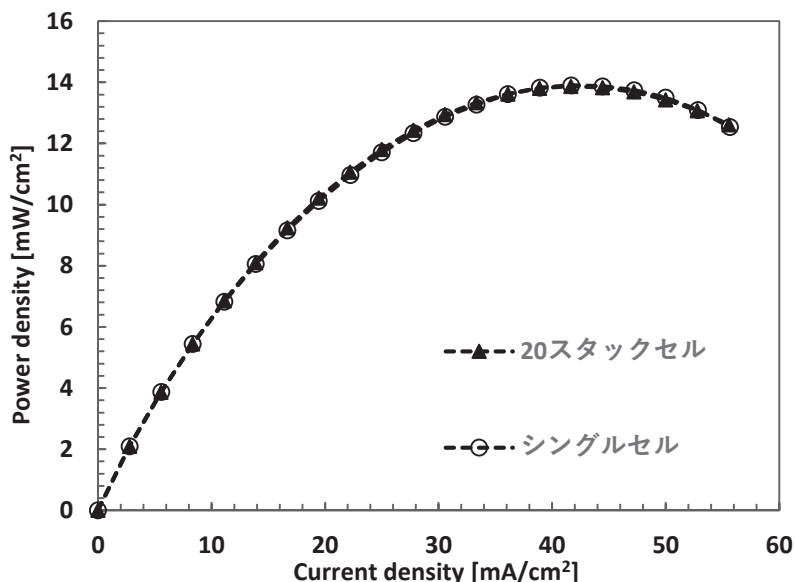


図 5-14 スタック式燃料電池とシングルセルの電流-出力特性の比較
 燃料:(アノード) 0.4 M グルコース/ 1 M KOH 混合水溶液(流速 5 mL/min),
 (カソード) 加湿混合空気(流速 2 L/min),
 イオン交換膜:陽イオン交換膜, I/C 比= 0.1,

5.3.6.3 スタック式燃料電池を構成する電極間のばらつき

スタック式燃料電池を構成する各電極間の電圧のばらつきを確認した。測定の際には、外部負荷を接続しない状態で燃料を供給し、各電極間の電圧(開回路電圧)をテスターで計測した。計測は計 10 回行い、得られた結果について統計解析を行って評価した。

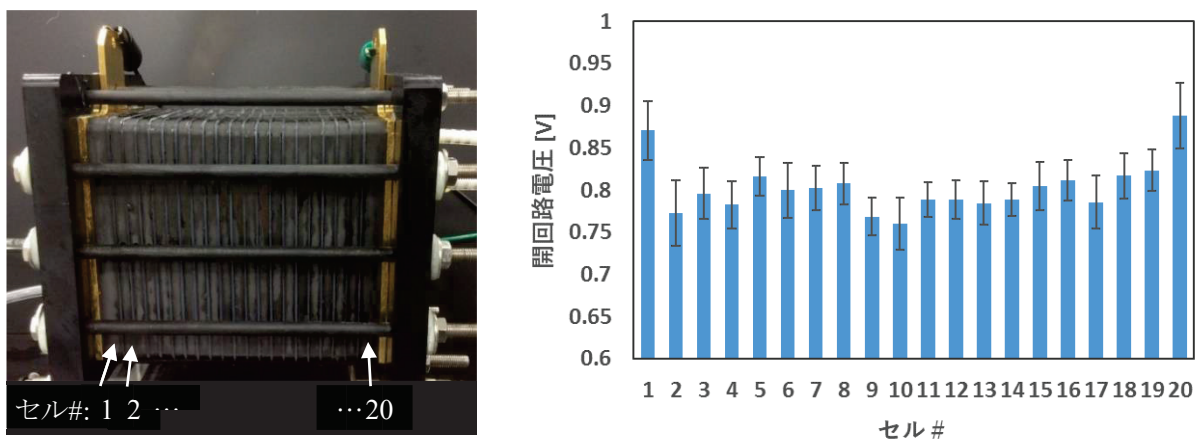


図 5-14 スタック型燃料電池の各電極セル間の開回路電圧

なお、測定は計測時毎に約 1.5 L の水をスタック式燃料電池に供給して電極を洗浄させた。図 5-14 にその結果を示す。

上図は測定に用いた各電極の場所(セル#)を示す。右図は各々のセルごとに開回路電圧を測定し統計解析を行った結果である。横軸はセル#、縦軸は各電池セルの開回路電圧値を表す。なお、グラフの棒は平均値、バーは標準偏差を表す(n=10)。セルごとに 10 回開回路電圧を計測した結果、両端の電極(セル #1 および 20)とその間の電極(セル #2～19)との間で開回路電圧値に差がみられた。統計解析においても、この両端の電極の電圧値(0.88±0.012 V: Mean±SD)はそれ以外の電極に対し外れ値となることが分かった。一方、それ以外のセル#2～#19 の電極においては、各電極間で開回路電圧のばらつきはほとんどなく、0.79±0.018 V (Mean±SD)となった。

5.3.6.4 充電試験

スタック式燃料電池を用いて充電試験を行った結果、充電は開始されるものの、すぐに電流値が減少して充電がストップしてしまうことが分かった。この原因について考察を行ったところ、20 スタック型燃料電池で充電を行う場合、14.4 V を 20 枚の電極で発生させるため、一枚の電極当たりに換算すると平均で約 0.7 V の負荷が必要となる。この時、電流-電圧特性のグラフから、この電圧では約 0.1 A しか電流は生じないことが分かる(図 5-15)。従って、電流値が低すぎるために、充電がストップしてしまうと考えられた。そこで、セルを新たに 8 枚追加し、一枚の電極につき 0.5 V 負担させて充電を行う仕様に変更した。こうすることで、電流-電圧特性から約 0.5 A の電流値をとりだせるようになる。また、計 28 枚の電極をスタックして一つの燃料電池としてもよいが、スタック数が増えると燃料の供給路が長くなるため、各電極へ燃料を均一に供給すること

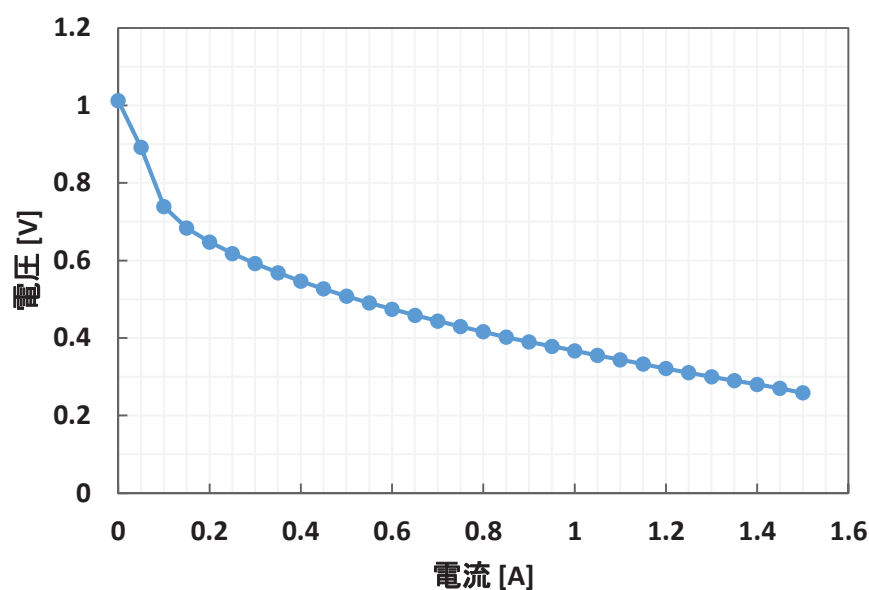


図 5-15 電流－電圧特性

開回路電圧は約 1 V であり、負荷電流が大きくなるに従って電圧が減少していく特性を示す。

が難しくなる。そこで、14 スタック型燃料電池を2 台直列に接続する仕様に改めて充電試験を行った。その結果、想定していた電流が得られるようになり、8.4 Wh 消費させた 12 V 7 Ah のバッテリーを 230 分で充電できることが分かった。(図 5-16)

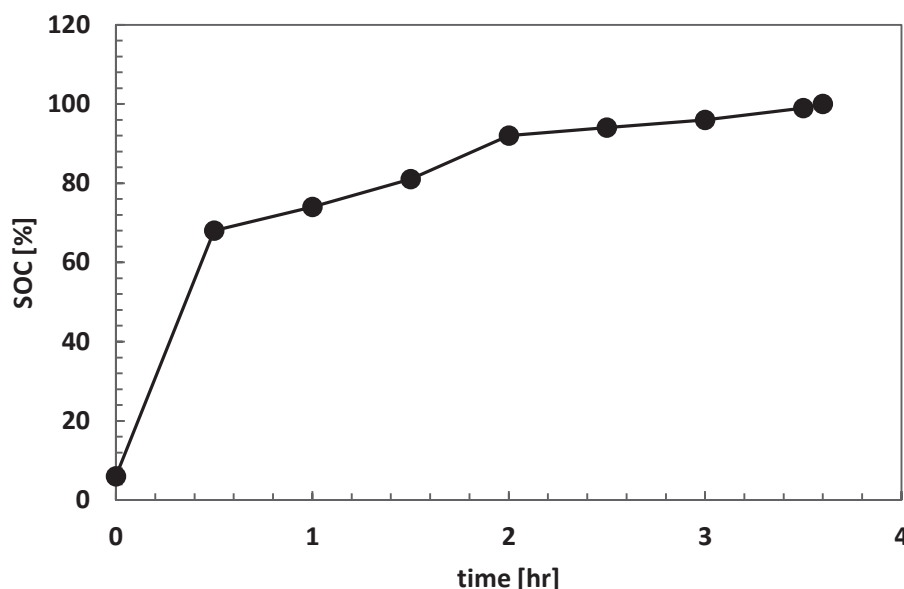


図 5-16 バッテリーの充電状況(SOC; State of Charge)の代表的な継時的推移

SOC が 100%となった時がフル充電となり、ブーストチャージからフロートチャージへ充電方式が切り替わる。

これにより本研究で開発を行ったグルコース燃料電池並びにグルコース燃料電池を用いた蓄電ユニットの試作機開発が完了し、その稼働が実証された。

5.3.7 種々の糖の燃料としての利用性

5.3.7.1 生体内加工セルロース由来(牛糞)グルコースが出力特性に及ぼす影響

第二章および第三章より得られた知見に基づいて生成した、生体内加工セルロース(牛糞)由来のグルコースを用いて、直接グルコース形燃料電池の出力特性について検討を行った。図 5-17 に電流-出力特性ならびに電流-電圧特性を示す。その結果、試薬のグルコースと比較して、若干出力は低下するものの、ほぼ同等の出力が得られることが分かった。生体内加工セルロース(牛糞)由来のグルコースにおいて出力が低下した理由としては、試薬のグルコースよりも生成の純度が低かったことが考えられる。一般的なグルコース精製では、煮沸処理(タンパク質の除去)、炭酸飽充、活性炭カラム処理、陽イオン交換カラム処理、陰イオン交換カラム処理による 5 つの工程が挙げられる。本研究では実用化を考慮し、必要最低限の精製工程のみ(煮沸処理、活性炭カラム処理、陽イオン交換カラム処理)を施したグルコースを用いたため、市販の精製されたグルコースよりも、やや低い出力になったと推察する。

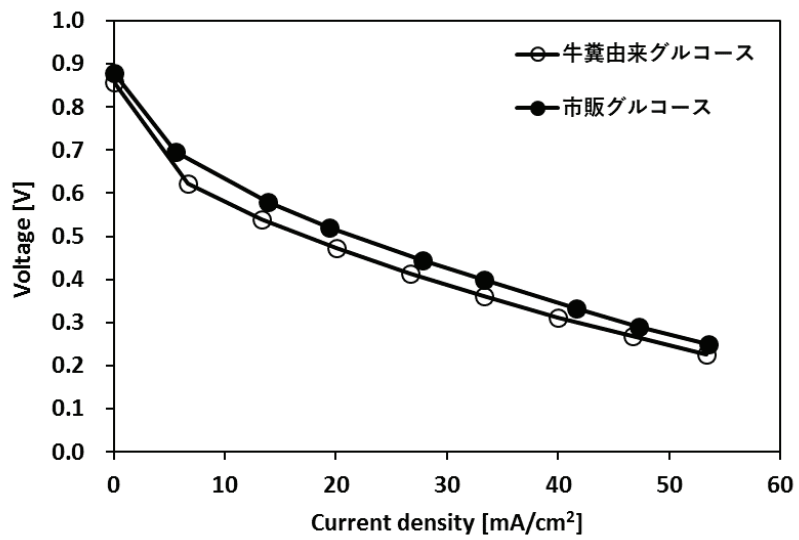
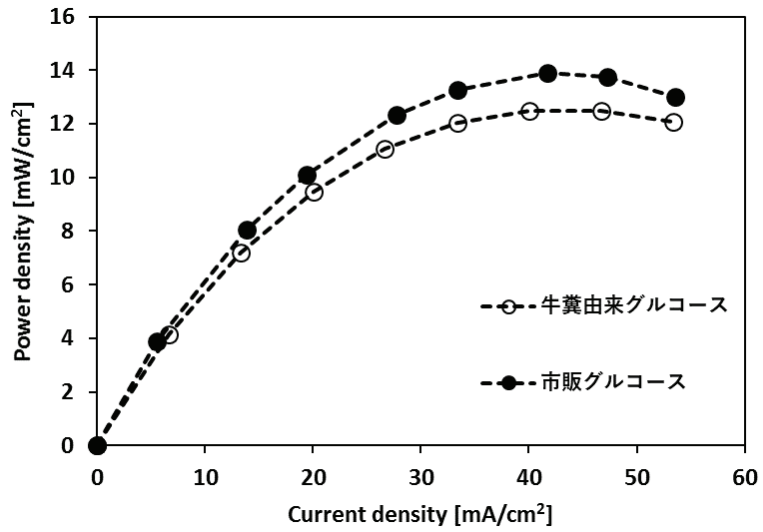


図 5-17 生体内加工セルロース(牛糞)由来グルコースを燃料として用いた時の電流-出力特性(上)、電流-電圧特性(下)

5.3.7.2 グルコース以外の糖が出力特性に及ぼす影響

Pt-Au 金属ナノ粒子触媒を用いた燃料電池において、燃料として種々の糖を用いた際の電流-出力特性の結果を図 5-18 に示す。その結果、いずれの糖においても電流-出力特性が得られ、糖の酸化反応が進行したことから、発電用の燃料として利用できることが分かった。ピーク時の出力密度値はガラクトース>キシロース>グルコース>ラクトース>エリトロースの順となり、グルコースと同じ構造式であるガラクトースが最も高い出力密度値となった。この結果より、本研究で得られた、Pt-Au ナノ粒子触媒並びに直接グルコース形燃料電池はグルコース以外の糖においても電気エネルギーへ変換できることから、汎用性の高さにも期待が持てる。

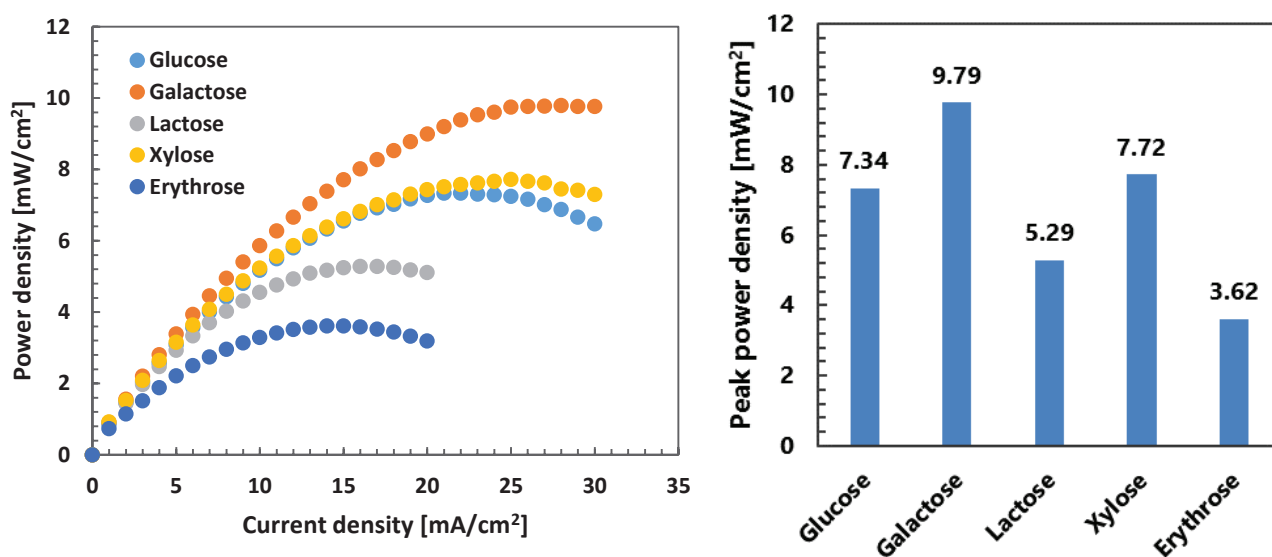


図 5-18 種々の糖で発電させた時の電流-出力特性

5.4 結言

本章では「Pt-Au 触媒を用いた直接グルコース形燃料電池の最適発電条件の検討」と題して、直接グルコース形燃料電池の開発から、発電最適条件の検討を行った。また、スタック式直接グルコース形燃料電池を用いた蓄電池への充電試験、生体内加工セルロース(牛糞)由来グルコースを燃料として用いた時の出力特性についても検討を行った。

直接グルコース形燃料電池の発電最適条件の検討

I/C 比=0.1 で調製した Pt-Au(1:4)金属ナノ粒子触媒(担持量 5 wt%)をアノード電極として用いた直接グルコース形燃料電池において、アノードに 0.4 M グルコース/1.0 M KOH 混合水溶液を流速 5 mL/min、カソードに混合空気を 2 L/min で供給することにより、室温条件下で最大出力密度 13.9 mW/cm² の出力を得ることができた。

実用化に向けたスタック式直接グルコース形燃料電池の開発と充電試験

スタック式直接グルコース形燃料電池においても同等の出力を示し、8.4 Wh 消費させた 12 V 7 Ah 型の蓄電池へ 230 分で充電できることが分かった。バッテリーに蓄電された電力は、コンバーターやインバーターを用いて日常の家電製品等を稼働させることも可能であることから、低コストでクリーンな発電システムの一つになることが期待できる。

生体内加工セルロース(牛糞)由来グルコースが出力特性に及ぼす影響

試薬のグルコースと比較して若干出力は低下するものの、ほぼ同等の出力が得られることが分かった。生体内加工セルロース(牛糞)由来のグルコースにおいて出力が低下した理由としては、試薬のグルコースよりも生成の純度が低かったことが考えられる。今後は高純度な生成を行うことで試薬のグルコースと同等の出力が得られるものと考えられる。本研究では、有効利用が求められている家畜排泄物から電気エネルギーへ変換することができ、今後の代替エネルギー源としての実用化に向けた指針を与えるものと確信する。

5.5 参考文献

- 1) J. Houghton, "Global warming: The complete briefing, 5th Ed.", Cambridge University Press, Cambridge (2015).
- 2) S. Chu, A. Majumdar, *Nature*, **488**, 294 (2012).
- 3) S. -P. Tung, T. -K. Huang, C. -Y. Lee, H. -T. Chiu, *RSC Adv.*, **2**, 1068 (2012).
- 4) S. C. Barton, J. Gallaway, P. Atanassov, *Chem. Rev.*, **104**, 4867 (2004).
- 5) M. T. Meredith, S. D. Minteer, *Annu. Rev. Anal. Chem.*, **5**, 157 (2012).
- 6) M. A. dos Santos Bernardes, "Biofuel's Engineering Process Technology", InTech, Rijeka, pp.467 (2011).
- 7) H. Sakai, T. Nakagawa, Y. Tokita, T. Hatazawa, T. Ikeda, S. Tsujimura, K. Kano, *Energy Environ. Sci.*, **2**, 133 (2009).
- 8) S. Xu, S. D. Minteer, *ACS Catal.*, **2**, 91 (2012).
- 9) E. Katz, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 6803 (2003).
- 10) M. Takahashi, K. Iwabata, K. Torigoe, T. Endo, K. Sakaguchi, M. Abe, H. Sakai, *J. Jpn. Soc., Colour Mater.* in press.
- 11) A. Habrioux, E. Sibert, K. Servat, W. Vogel, B. K. Kokoh, N. Alonso-Vante, *J. Phys. Chem., B*, **111**, 10329 (2007).
- 12) A. Habrioux, W. Vogel, M. Guinel, L. Guetaz, K. Servat, B. Kokoh, N. Alonso-Vante, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **11**, 3573 (2009).
- 13) D. Basu, S. Basu, *Int. J. Hydrogen Energy*, **36**, 14923 (2011).
- 14) H. Zhang, N. Toshima, *J. Colloid Interface Sci.*, **394**, 166 (2013).
- 15) M. Guerra-Balcazar, F. M. Cuevas-Muniz, L. Alvarez-Contreras, L. G. Arriaga, J. Ledesma-Garcia, *J. Power Sources*, **197**, 121 (2012).
- 16) D. Basu, S. Basu, *Electrochim. Acta*, **56**, 6106 (2011).
- 17) D. Basu, S. Basu, *Int. J. Hydrogen Energy*, **37**, 4678 (2012).
- 18) N. Fujiwara, S. Yamazaki, Z. Siroma, T. Ioroi, H. Senoh, K. Yasuda, *Electrochem. Commun.*, **11**, 390 (2009).
- 19) (独)産業技術総合研究所, "きちんとわかる燃料電池", 白日社, pp.141 (2014).
- 20) D. Yang, H. Yu, G. Li, Y. Zhao, Y. Liu, C. Zhang, W. Song, Z. Shao, *J. Power Sources*, **264**, 39 (2014).

第六章 総括

本論文は、「生体内加工セルロース(牛糞)を基質としたグルコース生成法とこれを燃料として利用した直接グルコース形燃料電池の開発」と題して、生体内加工セルロース(牛糞)からグルコースを生成すること、並びに牛唾液によるセルラーゼ糖化促進効果の機序に関する検討を行った。さらに、得られたグルコースを電気エネルギーへ変換するため、グルコース酸化効率の良い金属触媒の検討から燃料電池の開発までを目的とし、詳細な検討を行った。以下に研究成果を述べる。

第二章 《生体内加工セルロース(牛糞)からのグルコース生成法の検討》では、牛糞由来の生体内加工セルロースからグルコースへの糖化における種々の物理的前処理法の影響について検討を行うとともに、遊星ボールミルの回転数や酵素濃度を变化させた時のグルコース生成に及ぼす影響について検討を行った。

その結果、ミキサー粉砕、乳鉢粉砕、遊星ボールミルを用いて粉砕することで牛糞中のセルロースの微細化に成功した。また、それぞれの基質を酵素により糖化した結果、遊星ボールミルを用いたときの糖化性が最も高かった。特に、遊星ボールミルの回転数を 750 rpm、酵素として 20 mg/mL Meicelase を用いて反応させた場合、牛糞基質(乾燥重量)1 g あたりから得られるグルコース量は 192.6 mg/g(収率 80%)であり最も高い収率でグルコースが得られることが分かった。以上より、牛糞中に含まれる生体内加工セルロースから効率的にグルコースを生成できることが分かった。

第三章 《牛唾液によるセルラーゼ糖化促進効果の作用機序に関する検討》では、牛の唾液がセルロース酵素糖化に及ぼす効果について詳細な検討を行った。

その結果、基質・セルラーゼ溶液・牛唾液溶液において還元糖の生成量が基質・セルラーゼ溶液の約 15 倍となった。一方、基質・牛唾液溶液では還元糖の生成が確認されなかったことから、唾液が基質を直接糖に変換しているのではなく、セルロース分解反応を促進する作用があることが示唆された。そこで、牛唾液中に含まれる糖化促進物質の探索を行った。その結果、セルロースの加水分解を促進する原因物質は変性したタンパク質などを含む分子量 14 kDa 以上 100 kDa 未満の高分子であることが示唆された。牛唾液がセルロースの分解反応を促進させるメカニズムについて、基質、酵素、唾液の添加順序を変化させた結果、基質/唾液/酵素の順で添加した際に還元糖量が最大となった。このことより、唾液が酵素を活性化させているわけではなく、唾液中の高分子が基質へ作用し影響を及ぼしていると考えられる。さらに唾液が基質の結晶形に及ぼす影響について X 線回折と赤外吸収スペクトルを用いて評価した結果、牛唾液の添加によりセルロースの結晶形は変化しないことが分かった。牛唾液の静的表面張力測定を行った結果、界面活性を有していたことから、不可逆的にセルロース表面に吸着したセルラーゼの脱着を促進し、それに伴いセルロース表面には新しい活性点が生

じるため、セルラーゼによる加水分解が円滑に進行したため、微結晶セルロースの糖化効率が向上したと考えられる。

第四章 《貴金属ナノ粒子触媒のグルコース酸化特性と電気化学的評価》では、種々の貴金属前駆体を用いてナノ粒子を調製し、得られた金属ナノ粒子のグルコース酸化特性について検討を行うとともに、ナノ粒子を調製する際の安定化剤であるポリビニルピロリドン(PVP)の濃度が酸化特性に及ぼす影響について検討を行った。

種々の金属ナノ粒子触媒(Pt, Au, Pd, Ru)のグルコース酸化特性について検討した結果、Pt ナノ粒子触媒並びに Au ナノ粒子触媒を用いたときにグルコース酸化が促進されることが分かった。また、高活性を示した Pt と Au を組み合わせた Pt-Au 合金ナノ粒子触媒を用いたところ、Pt:Au=1:4 の比率で調製したとき、単金属粒子よりも 5 倍以上のグルコース酸化特性を示すことが分かった。さらに、Pt-Au 合金ナノ粒子触媒におけるグルコース酸化特性を向上させるため、ポリビニルピロリドン(PVP)の濃度の影響について検討した。その結果、PVP の濃度が $[PVP] / [metal] = 1$ のときに Pt-Au 合金ナノ粒子は凝集せず単独で分散し、酸化ピーク時の電流密度値も 10 mA/cm^2 で最大となった。一方、PVP 濃度が高い $[PVP] / [metal] = 10$ における電流密度値は減少することが分かった。これは金属ナノ粒子表面に PVP が過剰量吸着しグルコース酸化に係る金属ナノ粒子表面が PVP で被覆されるために、電流密度値が低下したものと推察される。

第五章 《Pt-Au 金属触媒を用いた直接グルコース形燃料電池の最適発電条件の検討》では、第四章で得られた知見から、Pt:Au=1:4 で調製した合金ナノ粒子をアノード触媒に用いた直接グルコース形燃料電池を開発し、その出力特性および最適な発電条件ならびに I/C 比が出力へ及ぼす影響について検討を行った。

その結果、I/C 比=0.1 とし、アノードにグルコース燃料(0.4 M グルコース/1.0 M KOH 水溶液)を流速 5 mL/min で供給し、カソードに加湿混合空気を 2 L/min で供給することにより、室温条件下で 13.9 mW/cm^2 の出力を得ることができた。この値は、これまで報告されている Pt-Au 触媒を用いた燃料電池の中で最も高い値となった。次に、このシングルセルを重ね合わせたスタック式直接グルコース形燃料電池(スタック数:20)を作製したところ、 8.2 Wh 電力を消費させた $12 \text{ V } 7 \text{ Ah}$ 型の蓄電池へ約 230 分で充電できることが分かった。また、生体内加工セルロース(牛糞)由来グルコースを燃料として用いた時、試薬のグルコースとほぼ同等の出力が得られることが分かった。

以上述べてきたように、本研究では廃棄物系バイオマスであり、有効利用が求められている家畜排泄物(牛糞)から種々のエネルギー源となるグルコースを効率よく生成する方法を明らかとした。さらに、牛の唾液を用いることでセルラーゼの活性が促進され高い糖化効率が得られることを見出した。また、PVP 濃度を $[PVP] / [metal] = 1$ で調製した PtAu₄ 金属ナノ粒子(平均粒子径 2.1 nm)をアノード触媒として I/C 比=0.1 で調製した電極(触媒塗布量 0.5 mg/cm^2)を用いることにより、生体内加工セルロース(牛糞)由来グルコースは直接グルコース形燃料電

池により電気エネルギーへと変換されたことから、汎用性の高い再生エネルギーの一助となるものと考えられる。

本研究で得られた、こうした成果によって、廃棄物系バイオマスを用いた新たな発電法を世の中に提案するための土台が構築できたのではないかと確信する。

今後の実用化に向けた課題としては下記の点が想定される。

まず、生体内加工セルロースの前処理については最適化できたものの、実用化を視野に入れると、さらに大量にグルコースを生成しなければならない。それに伴い、必然的に酵素の使用量が増えることが予測される。現状、最もコスト高となるのは酵素(試薬)であるため、当研究グループでは、遺伝子工学的な手法による酵素作製法について検討を行っている。今後、安価な酵素の生成法や工業用酵素の探索および牛唾液中に含まれる糖化促進物質の同定ができれば、有効利用が求められている家畜排泄物(生体内加工セルロース)を用いたグルコース生成の実用化が期待できると考えられる。

また、Pt-Au ナノ粒子触媒を用いた直接グルコース形燃料電池においては、これまで報告されている中で最大の出力を得ることができたが、依然として、メタノールやエタノールを燃料とした直接形燃料電池よりも約 1/5 程度の出力であった。そこで、新たなグルコース酸化触媒の探索(三元系金属触媒)や触媒担持量の増加方法等、電極部の改良を行っている。今後は更に、高温条件下による発電試験や最適な燃料供給流路の設計、構成材料の内部抵抗値などの詳細を明らかにし、実用化を目指すために、直接グルコース形燃料電池の出力を更に向上させる必要がある。以上のような課題を解決するため、引き続き研究・開発を進め、将来的に安全でクリーンなエネルギー源の一つになることを強く切望する。

研究業績

主論文を構成する論文

1. Enhancement of Cellulose Degradation by Cattle Saliva

(牛唾液によるセルラーゼ糖化促進効果)

Yasutaka Seki, Yukiko Kikuchi, Yoshihiro Kimura, Ryo Yoshimoto, Masatoshi Takahashi, Kenichi Aburai, Yoshihiro Kanai, Tatsushi Ruike, Kazuki Iwabata, Fumio Sugawara, Hideki Sakai, Masahiko Abe, Kengo Sakaguchi
PLoS ONE, **10(9)**, e0138902 (2015)

2. Effects of stabilizer concentration on the electrochemical performance of Au-Pt anode catalysts for direct glucose fuel cell

(グルコース燃料電池のための Au-Pt アノード触媒の電気化学特性に及ぼす安定剤濃度の効果)

Masatoshi Takahashi, Kazuki Iwabata, Kanjiro Torigoe, Takeshi Endo, Kengo Sakaguchi, Hideki Sakai, Masahiko Abe
Journal of the Japan Society of Colour Material, (印刷中)

3. Pt-Au 金属ナノ粒子触媒を用いた直接グルコース形燃料電池の開発

高橋 昌利, 岩端 一樹, 結城 智晴, 片山 昇, 鳥越 幹二郎, 土屋 好司, 小浦 節子, 中田 一弥, 坂口 謙吾, 酒井 秀樹, 阿部 正彦
材料技術, **34**, 166-176 (2016)

学会発表

1. “Development of the direct glucose fuel cell with a high power density”

Masatoshi Takahashi, Kazuki Iwabata, Kanjiro Torigoe, Yoshihiro Kanai, Tatsushi Ruike,
Kengo Sakaguchi, Hideki Sakai, Masahiko Abe

The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2015)
2015. 12. 15-20 Honolulu, U.S.A (ポスター発表)

2. “Pt-Au 金属ナノ粒子触媒を用いた直接グルコース形燃料電池の開発”

○高橋 昌利¹, 岩端 一樹², 結城 智晴³, 片山 昇³, 鳥越 幹二郎¹, 土屋 好司²,
小浦 節子⁴, 中田 一弥¹, 坂口 謙吾², 酒井 秀樹^{1,2}, 阿部 正彦²

材料技術研究協会討論会 2016. 12. 2-3 千葉 (東京理科大学). (口頭発表)

謝辞

本研究を行うにあたり、終始熱心なご指導、ご鞭撻を賜りました、東京理科大学大学院理工学研究科工業化学専攻 教授 酒井秀樹先生に心から感謝の意を表します。

また、種々の有益なるご助言とご指導を戴き、本論文を審査してくださいました、東京理科大学大学院 理工学研究科 工業化学専攻 教授 郡司天博先生、教授 湯浅真先生、経営工学専攻 教授 堂脇清志先生、電気工学専攻 教授 星伸一先生に心より感謝の意を表します。

本論文をまとめるにあたり、終始温かい激励とご配慮を賜りました、東京理科大学 研究推進機構 総合研究院 教授 阿部正彦先生、岩端一樹博士、土屋好司博士に深く感謝の意を表します。

また、数多くの有意義なご意見、ご助言を賜りました、東京理科大学 理工学部 工業化学科 四反田功先生、鳥越幹二郎博士、電気電子情報工学科 片山昇先生、アクティブ株式会社 坂口謙吾先生、菅原二三男先生、金井良博博士、類家竜司博士に深く感謝の意を表します。

さらに、本研究を遂行する機会を与えていただきました、アクティブ株式会社関係者の皆様に深く感謝の意を表します。

最後に本研究の遂行に際し、心強い支持をして頂いた家族や友人、関係諸氏に心より厚く御礼申し上げます。