

バイオ電池の燃料としての木材糖化液の有用性

高山勝己*、松井栄樹、上島晃智

福井工業高等専門学校物質工学科 (〒916-8507 福井県鯖江市下司町)

*takayama@fukui-nct.ac.jp

Application of wood saccharified liquid as a fuel for the microbial fuel cell

Katsumi TAKAYAMA, Eiki MATSUI, and Akinori UEJIMA

Department of Chemistry & Biology Engineering, Fukui National College of Technology

(Geshi-cho, Sabae-shi, Fukui 916-8507, Japan)

(Received July 18, 2013; Accepted August 23, 2013)

Abstract

In this study, a two-compartment prototype microbial fuel cell (MFC) was constructed. For the anode compartment, vitamin K₃ was used as an electron mediator between membrane-bound D-glucose dehydrogenase (GDH) in *Escherichia coli* cells and the anode electrode. The ferro-ferricyanide redox system was selected for the cathode compartment. We attempted to use a wood saccharified liquid consisting of glucose and xylose as a fuel in the anode compartment. The fuel can be produced by solid acid treatment of wood chips obtained from the sawmill. The open-circuit voltage was 430 mV. The maximum current density of 25 $\mu\text{A cm}^{-2}$ has been achieved at 200 mV of the cell voltage under stirring.

Keywords: Microbial fuel cell, Mediated electron transfer, Wood chips, Saccharification

1. はじめに

石油に基盤をおく生産体系（オイルリファイナリー）から、バイオマス資源に基盤をおく生産体系（バイオリファイナリー）への転換は、循環型社会の実現に向けた鍵である[1]。

近年、糖、アルコール、有機酸、アミン、水素等さまざまな物質を燃料として用いることが可能な酵素燃料電池あるいは微生物燃料電池(Microbial Fuel Cell: MFC)が注目されている[2,3,4]。これらは、酵素（または微生物体内の酵素）を介した酸化還元反応系と電極までの電子移動を何らかの手法を用いてリンクさせて微小な電力を取り出すものである。電池はアノードとカソードを組

み合わせて構築されるが、例えば、微生物を用いたアノード電極の詳細な特性解析を行った例として、大腸菌(PQQを補酵素とする細胞膜結合性グルコースデヒドロゲナーゼをもつ)を触媒とし、メディエータ（電極と細胞内酸化還元酵素間の電子移動を仲介する）に2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinoneを用いた報告がある[5]。微生物を触媒とする場合、酸化還元酵素が細胞内に存在するために電極との直接的電子移動を実現するのは一部の微生物を除いて容易ではない[2,3,4,6]。一方、カソード側としてはビリルビンオキシダーゼ、ジアホラーゼ、ラッカーゼなどの還元酵素（いわゆる酵素機能電極）を用いるもの[2,3,4,6]や、従来の

燃料電池で開発されている既存の空気極がそのまま用いられており、微生物を用いたカソードの事例はいまのところ少ない。電極材料の選択も電池の出力に大きく影響するが基本的に表面積が大きいことが重要であり、多孔性炭素材料の適用例が多い[2,3,4,6]。このようにバイオ燃料電池の研究そのものがまだまだ発展途上にあり、集電体や隔膜の素材、電解質、セル構成、生体触媒として酵素と微生物のどちらを選択しどんな種類のものを用いるのか（これによって基質（燃料）がきまる）、メディエータを必要とするのであれば何を選択するのかなど多くの検討課題を残している。

ところで、バイオ燃料電池に供給する燃料を何に求めるのかという問題も大きな課題であり、例えば単糖類を燃料として用いるとして、これを可食性バイオマスに依存するのなら過去のバイオエタノール製造事例で起こった食料ニーズとの競合となる。結論は、非可食バイオマス（稲わら、草、木材、海藻など）の利用ということが前提にならうが狭い国土しかない日本では、海外の事例にあるような大規模な非可食バイオマスの集積供給拠点は実現しえない。やはり地域レベルでの小規模生産の非可食バイオマスの有効利用を前提として考えなければならぬ。

こうした現状を踏まえて、我々はひとつの試みとして福井県内の中小クラスの木材製造工場から廃棄されている木材削り屑（福井県産・杉、アメリカ産・松、ヨーロッパ産・赤松の混合屑で、最近になって木材ペレット化してストーブ燃料として用いられるようになった）を用いる前処理-糖化プロセスの検討を行ってきた。その結果、木材削り屑を固体強酸（Amberlite IR-120H）で加熱水和処理（100℃, 11hr）することで、ヘミセルロースに由来して生成するグルコース、キシロースを主成分とする糖化液を得ることに成功した（現時点での反応効率は低い）[7,8]。

この成果をもとに、我々は福井県内製材工場から廃棄される木材削り屑固体強酸処理糖化液を燃料とする微生物（大腸菌）燃料電池を構築するまでの一連の検討を行

ったので報告する。なお、カソード側はフェリシアン還元反応系を組み合わせた。

2 実験

2.1 大腸菌を生体触媒とするアノード反応に対する電気化学的特性評価

2.1.1 ビタミンK₃（メデイエータ）のサイクリックボルタンメトリー測定

自作のアクリルセルに、1 mMのビタミンK₃(VK₃, ナカライテスク, 特級)を含むリン酸緩衝溶液(1/15 M, pH 7.0)を1 mL入れ、グラッシーカーボン(GC)電極(5mm i.d., BAS製)、参照電極(vs. Ag/AgCl sat. KCl)、白金円盤対極(5mm i.d., アクリルセルの底面に埋め込んである)をポテンショスタットに接続した。スキャン電位範囲+0.5 ~ - 0.5V (vs. Ag/AgCl, sat. KCl)、スキャン速度50 mV/sの条件下でサイクリックボルタモグラムを取得した。なお、溶液は常にN₂ガスで除酸素を行った。

2.1.2 アノード反応の電気化学特性

GC電極の表面にミリポア膜(ポアサイズ 0.2µm i.d., ミリポア製)を貼り付け、ナイロンネットとパラフィルムで固定して膜貼GC電極を作製し、これを作用電極とした。自作のアクリルセルに1 mMのVK₃を含むリン酸緩衝溶液(1/15 M, pH 7.0)を1 mL入れ、各電極をポテンショスタットに接続し、VK₃の定常電圧を印加して電流値測定を開始した(電流-時間曲線の取得)。溶液は常にスターラーで攪拌し、N₂ガスで除酸素を行った。電流応答が安定したら、*E. coli*懸濁液を溶液のO.D.₆₆₀=1.0になるように加え、再び電流応答が安定になったところで、終濃度5 mMになるようにグルコースを添加し再び定常電流が得られるまで測定した。グルコース添加後の電流-時間曲線の変化から、定常電流密度値および電流密度勾配値を見積もった。この測定操作を3回行った。

2.1.3 アノード反応の表面積増加の効果

円形カーボンフェルトペーパー(5mm i.d.)をGC電

極上に密着させ、その上からナイロンネットとパラフィルムでカーボンフェルトペーパーを抑え込んだカーボンフェルトペーパー被覆GC電極を作製した。カーボンフェルトペーパー被覆GC電極を用いて、実験2.1.2と同様の測定を行い、グルコース添加後の電流-時間曲線の変化から、定常電流密度値および電流密度勾配値を見積もった。この操作を3回行った。

2.1.4 燃料としての各種単糖類の有用性比較

膜貼 GC 電極を用いて、グルコースの他に、ガラクトース、キシロース、マンノース、フルクトースを基質として、実験 2.1.2 と同様の操作を行い、各単糖類添加後の電流-時間曲線の変化から定常電流密度値および電流密度勾配値を見積もった。

2.2 木材切り屑の糖化

固体酸処理と糖濃度の測定において、共同研究者である松井らは、木材切り屑（杉：福井産，松：アメリカ産，赤松：ヨーロッパ産の等量混合物）をワーリングブレンダーで粉砕（20,000rpm,60s）後、強酸性イオン交換樹脂（Amberlite IR-120H）で処理することで、グルコースやキシロースなどの単糖類を含む糖化液を得ることに成功している[7,8]。

この糖化液（pH 2.4）を0.1 M 水酸化ナトリウムで中和（pH 7.0）してから、Glucose(HK) Assay Kit(Sigma製)または D-Xylose Assay Kit(Megazyme製)を用いて糖化溶液に含まれるグルコースおよびキシロースの定量を行った。

2.3 大腸菌微生物燃料電池（2槽式）の構築

2.3.1 グルコースを燃料とする微生物電池の特性評価

自作したセパレート型バイオ燃料電池の構成を図1に示した。アノード、カソード両電極材はカーボンフェルトペーパー（25mm×40mm）を用いた。チタンメッシュを両極の電流コレクターとして用いた。アノード極槽には、リン酸緩衝溶液（1/15 M, pH7.0）をあらかじめ充

填した。カソード極槽には5 mMフェリシアン化カリウムを含むリン酸緩衝溶液（1/15 M, pH7.0）を注入した。両電極槽はNafion® 117膜（Aldrich, 0.007 in. thick）で隔てた。アノードとカソード間に可変式抵抗（Type 2786 Decade Resistance Box, Yokogawa Hokushin Electric, Japan）を直列に接続し、電圧計（HE-106, HOKUTO DENKO, Japan）を並列接続した。

まず可変式抵抗を5 kΩに設定し、アノード極槽に、1) 1mM VK₃、2) 1mM VK₃+ *E.coli*（OD₆₆₀=1.0）、3) 1mM VK₃+ *E.coli*（OD₆₆₀=1.0）+ 5 mM グルコースになるようにリン酸緩衝液に添加したときの、それぞれの電圧-時間曲線を記録した。測定中は、アノード側のみスターラーで攪拌し、N₂ガスで除酸素を行った。

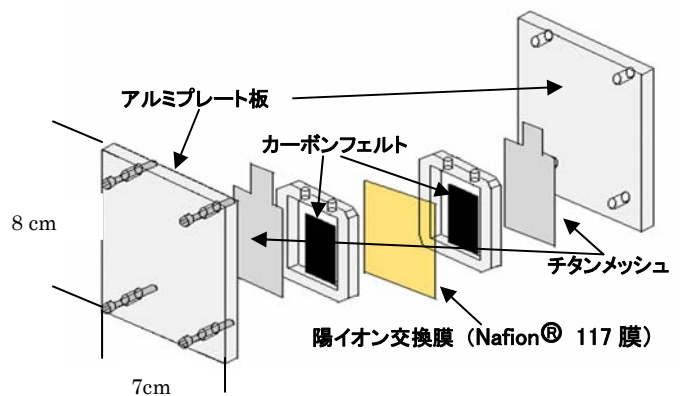


図1 分離型バイオ燃料電池構成

2.3.2 木材切り屑糖化液を燃料とした微生物電池の特性評価

さらに、木材切り屑のAmberlite IR-120H処理糖化液（アルカリ中和処理済み）に1 mM VK₃および*E.coli*（OD₆₆₀ = 1.0）を含ませた溶液をアノード極槽に充填して実験2.3.1と同じ要領で測定を行った。

さらに、同条件下で可変式抵抗を100kΩから100Ωまで適当な間隔で順次減少させながら、1) アノードとカソードの両極間電位差の変化、2) アノード、カソードそれぞれの単極電位の変化を参照電極（vs. Ag/AgCl sat.KCl）基準として、別々に測定した。電極間抵抗値とその時の電圧測定値をオームの法則に適用して電流値を

算出し、電圧-電流曲線を作成した。

3 結果と考察

3.1.1 ビタミン_K₃ (メデイエータ) のサイクリックボルタンメトリー 測定

1mM の VK₃ を含むリン酸緩衝溶液 (1/15 M, pH7.0) のサイクリックボルタモグラムを測定した結果を図 2 に示した。本条件では、VK₃ の酸化側の限界電流は 100 mV (vs. Ag/AgCl sat.KCl) 以上で得られることがわかった。

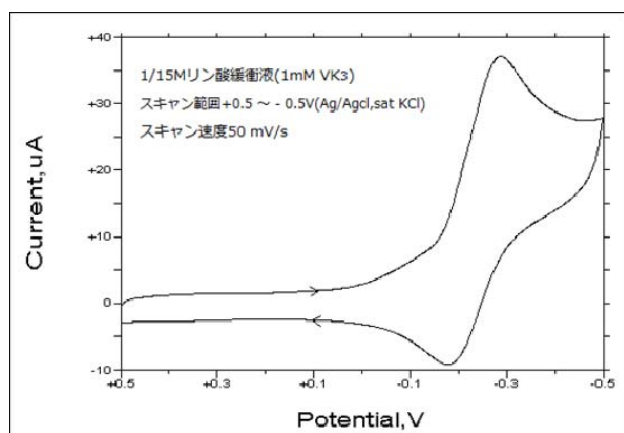


図 2 VK₃ のサイクリックボルタモグラム

3.1.2 アノード極の電気化学特性

自作のアクリルセルに1 mMのVK₃を含むリン酸緩衝溶液 (1/15 M , pH 7.0) を1 mL入れ、膜貼GC電極に 100 mV (vs. Ag/AgCl sat.KCl) 印加し、溶液を攪拌しながらN₂ガスで除酸素を行った。

E.coli とグルコースを順にセルに添加し、定常電流が得られるまで記録した電流-時間曲線を図3に示した。3回繰り返し測定から得られた定常電流密度値(GC電極の幾何面積：19.6mm²) と電流密度勾配値の平均値並びに標準偏差は、

$$\text{定常電流密度値 } 3.30 \text{ } \mu\text{A}/\text{cm}^2$$

$$(\sigma = \pm 0.131, n=3)$$

$$\text{電流密度勾配値 } 7.42 \times 10^{-3} \text{ } \mu\text{A}/\text{s} \cdot \text{cm}^2$$

$$(\sigma = \pm 6.85 \times 10^{-4}, n=3)$$

となった。

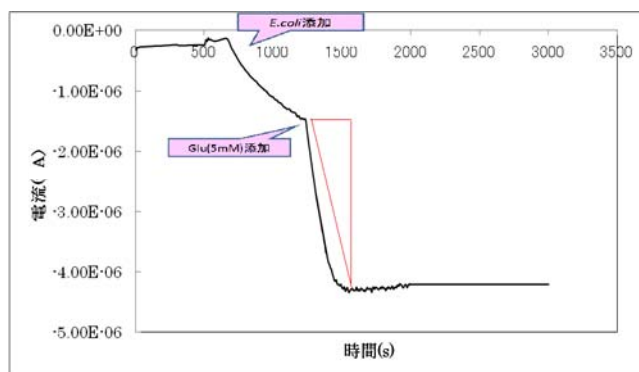


図 3 アノード単極系における電流-時間曲線
作用電極：膜貼り GC 電極を使用

3.1.3 アノード極の表面積増大の効果

カーボンフェルトペーパー(幾何面積 78.5mm²)を GC 電極面に密着させたカーボンフェルトペーパー被覆 GC 電極を用いて、結果 3.1.2 と同様の手法で得た電流-時間曲線を図 4 に示した。

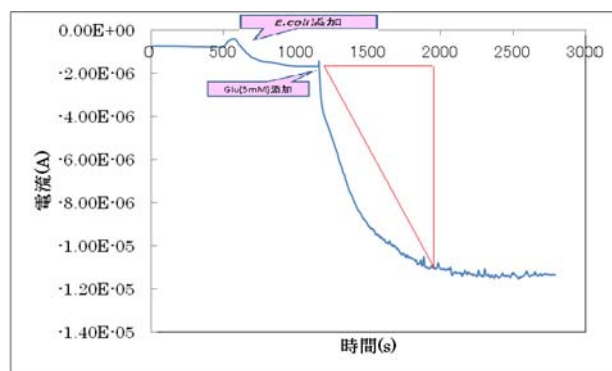


図 4 アノード単極系における電流-時間曲線
作用電極：カーボンフェルトペーパー被覆電極を使用

3 回繰り返し測定から得られた定常電流密度値および電流密度勾配値の平均値と標準偏差を求めたところ、

$$\text{定常電流密度値 } 8.17 \text{ } \mu\text{A}/\text{cm}^2$$

$$(\sigma = \pm 0.216, n=3)$$

$$\text{電流密度勾配値 } 19.8 \times 10^{-3} \text{ } \mu\text{A}/\text{s} \cdot \text{cm}^2$$

$$(\sigma = \pm 6.85 \times 10^{-4}, n=3)$$

となった。

電極面積を4倍程度にした場合、定常電流密度、電流密度勾配値ともに約2.5倍程度となり、電極表面積をいかに大きくするかは高い出力を得るための大きな鍵となる。

3.1.4 燃料としての各種単糖類の有用性比較

結果3.1.2と同様の手法を用いて、グルコースの代わりに、ガラクトース、キシロース、マンノース、フルクトースをそれぞれ基質としたときの電流-時間曲線から求めた定常電流密度値および電流密度勾配値を表1にまとめて示した。

グルコース(6単糖)に対する値を1.0とすると他の単糖類は定常電流密度値基準で0.14~0.42、電流密度勾配値基準で0.19~0.79となった。キシロース(5単糖)やその他の単糖類(6単糖)は、グルコースに比較してエネルギー生産能力は劣るが大腸菌燃料電池の基質として転用できることが分かった。

これは触媒として作用している大腸菌の膜結合性グルコースデヒドロゲナーゼの各種単糖類に対する基質選択性が低いことによるものと考えられる。また、膜結合性グルコースデヒドロゲナーゼは、セロビオースもグルコースと同様に酸化できる[9]。よって、本研究では検討しなかったがセロビオースのようなオリゴ糖も燃料として利用できる可能性がある。

表1 各単糖類を燃料とした時の電流出力比較

単糖類	定常電流密度 ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	電流密度勾配 ($10^{-3}\mu\text{A}/\text{s} \cdot \text{cm}^2$)
グルコース	3.30 (1.0)	7.42 (1.0)
ガラクトース	0.46 (0.14)	1.40 (0.19)
キシロース	0.74 (0.22)	4.71 (0.63)
マンノース	0.84 (0.25)	4.08 (0.55)
フルクトース	1.38 (0.42)	5.86 (0.79)

() 内の数値はグルコースに対する相対値

3.2 木材切り屑の固体酸処理液の有用性

固体酸処理と糖濃度の評価において、木材切り屑は杉:福井産、松:アメリカ産、赤松:ヨーロッパ産の等量混合物であり、その成分構成は α -セルロースが48.44%、ヘミセルロースが24.27%である。木材切り屑5gをワーリングブレンダーで粉碎微細化し、強酸性イオン交換樹脂(AmberliteIR-120H)1.5gと水50mLで加熱処理して得た糖化液のグルコースとキシロースの含有量をGlucose Assay KitまたはXylose Assay Kitを用いて定量を行った結果を以下に示した。

キシロース濃度 = 1.465 g/L (約10 mM)

グルコース濃度 = 0.857 g/L (約5 mM)

3.3 大腸菌微生物燃料電池(プロトタイプ)の構築

3.3.1 グルコースを燃料とした微生物電池の特性評価

バイオ燃料電池を構成し、両極間の抵抗を5k Ω に設定し、アノード槽の組成を、1) 5 mM VK₃のみ、2) 5 mM VK₃ + *E.coli* (O.D.₆₆₀=1.0)、3) 5 mM VK₃ + *E.coli* (O.D.₆₆₀=1.0) + 5 mM グルコースの各条件で両極間電圧の時間変化測定を行った結果を図5に示した。なお、カソード槽は5 mMフェリシアン化カリウム水溶液で満たした。3) の条件(グルコース存在下)で約430 mVの起電力が一定時間維持された。このことから、アノード側のバイオエレクトロカタリシス反応がグルコースを燃料として一定時間にわたって維持できることが示された。

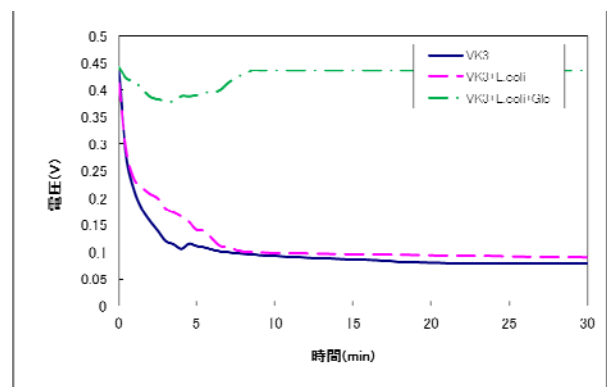


図5 バイオ燃料電池の電流-時間出力曲線

3.3.2 木材切り屑糖化液を燃料とした微生物電池の特性評価

木材切り屑の糖化液（中和処理済みキシロースとグルコースをそれぞれ約 10 mM と 5mM 含む）をアノード層に充填した後、1) 5mM VK_3 と 2) 5mM VK_3 + *E.coli* (O.D.₆₆₀= 1.0)としたときの両極間電圧時間変化の測定を行った結果を図6に示した。

2) の条件下で約 400 mV の起電力が一定時間維持された。よって、木材切り屑の糖化液は、中和処理だけ施せばそのまま燃料として機能し、アノード側のバイオエレクトロカタリシス反応を一定時間にわたって維持できることが示された。

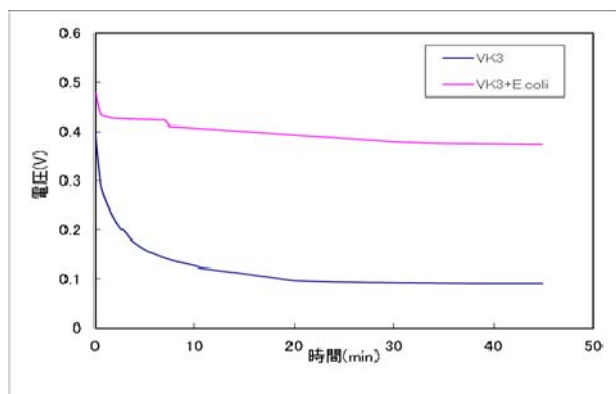


図6 バイオ燃料電池の電流-時間出力曲線
木材糖化液を燃料に用いた場合

次に、電極間の抵抗値を100 kΩから100 Ωまで段階的に減少させながら両極間電圧 (E_{cell}) の測定を行い、オームの法則から電流値を算出して得た電圧-電流曲線を図7に示した。開回路電圧および最大電流は、

開回路電圧： 約 430 mV
最大電流： 約 25 $\mu A/cm^2$ at 0.2 V

となった。

同様の測定手順に従って、参照電極 (vs. Ag/AgCl sat.KCl) を基準としてアノード、カソードに対する個々の電圧 (E_a または E_c)-電流曲線を作成した結果を図8に示した。理論的には、図7の結果との対応で、 $E_{cell} = E_c - E_a$ の関係が成立していなければならないがそうっていない。図8において、特にカソード側の電流-電圧曲線の減少が目立つが、これはカソード側が単なるフェリシアン化カリウムの還元反応であり、カソード電極反応がフェリシアン化カリウムの拡散律速となっているためと考える。

ビリルビンオキシダーゼ、ジアホラーゼ、ラッカーゼなどの還元酵素を用いるカソード電極と組み合わせた上で、データを再取得する必要がある。

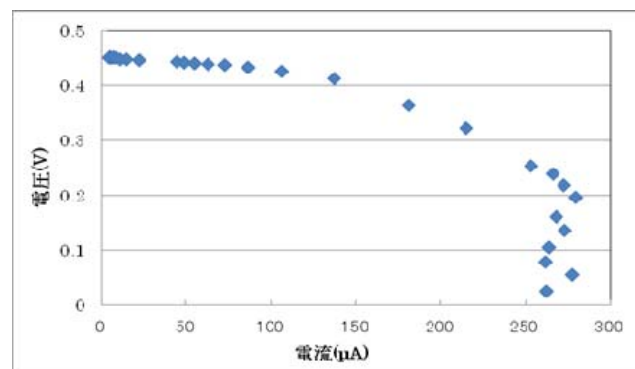


図7 バイオ燃料電池の電圧 (E_{cell}) と電流の関係

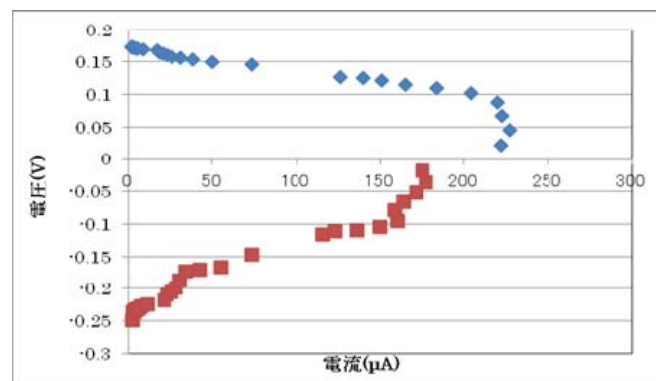


図8 アノード (◆) 並びにカソード (■) 単極ごとの電圧 (E_a または E_c) と電流の関係

4 結論

福井県内製材業者から廃棄されている木材切り屑を固体酸処理することでキシロースとグルコースリッチな糖化液を比較的容易に得ることができる。本研究では、この糖化液を中和処理し、これにビタミンK₃（メディエータ）と大腸菌（生体触媒）をそれぞれ適当な濃度になるよう加え、大腸菌燃料電池のアノード槽に充填し、カソード側にフェリシアン化カリウムの還元系を組み合わせ、バイオ電池を構築した。

その結果、1セルあたり25 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ (at 0.2V)程度の出力が得られた。同タイプの電池を7個直列につなぐと、市販のLED発光ダイオード（赤色:2V程度）を微弱ではあるが点灯させることができる。もちろんこのままでは実用性に程遠く、パフォーマンス的意味合いが強いが、この分野における今後の基礎研究と技術的進展を鑑みれば、地域産未利用バイオマス（木材切り屑）を燃料源とした微小発電（微生物バイオ電池）を提案できたとと言える。

謝辞

本研究は、平成24年度福井県大学研究リーグ活動助成金支援により行われたものであり、ここに感謝の意を表す。

参考文献

1) (財)地球環境産業技術研究機構 編, 工業調査会: 図解 バイオリファイナリー最前線, 2008.

- 2) 池田篤治 監修, シーエムシー出版: バイオ電気化学の実際-バイオセンサ・バイオ電池の実用展開-, 2007.
- 3) 加納健司 監修, シーエムシー出版: バイオ電池の最新動向, 2011.
- 4) 加納健司ら, 化学と工業誌, 特集バイオ電池の最前線, **65(6)**, 448-459, 2012.
- 5) D. Iswantini, K. Kano, and T. Ikeda, Kinetics and thermodynamics of activation of quinoprotein glucose dehydrogenase apoenzyme *in vivo* and catalytic activity of the activated enzyme in *Escherichia coli* cells, *Biochem., J.*, **350**, 917-923, 2000.
- 6) 渡邊一哉、加藤創一郎, 微生物の電気共生 -微生物と鉱物がつくる土の中のマイクロな送電網-, 現代化学, **502**, 44-48, 2013.
- 7) 松井栄樹, 堀田京, 高山勝己, 南保幸男, 未利用バイオマスの成分分離法とセルロース糖化技術の開発, *Journal of Ecotechnology Research*, **16(3-4)**, 121-124, 2012.
- 8) 松井栄樹, 藤田佳菜子, ビンティールスリーノールファラヒン, 坂本丞, 青山絵里, 木材からの効率的な成分分離とキシランを経由した段階的糖化法の開発, 高分子論文集, **70**, 145-150, 2013.
- 9) K. Matsushita, E. Shinagawa, O. Adachi, M. Ameyama, Quinoprotein D-glucose dehydrogenase in *Acinetobacter calcoaceticus* LMD 79.41: the membrane-bound enzyme is distinct from the soluble enzyme, *FEMS Microbiol. Lett.*, **55**, 53-57, 1988