

Title	セルロースからの直接エネルギー変換システム
Author(s)	菅野, 康仁
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/334
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

セルロースからの直接エネルギー変換システム

Direct energy conversion system from cellulose

2010年

大阪大学大学院工学研究科 精密科学・応用物理学専攻

菅野 康仁

Yasuhito Sugano

学位論文

Direct energy conversion system from cellulose

セルロースからの直接エネルギー変換システム

大阪大学大学院工学研究科 精密科学・応用物理学専攻

博士後期課程 3年

菅野 康仁

目次

第1章 序論

1-1 緒言.....	5
1-2 既往のセルロース系バイオマスからのエネルギー変換技術.....	7
1-3 燃料電池を用いたセルロース系バイオマスからのエネルギー変換技術..	8
1-3-1 微生物燃料電池.....	15
1-3-2 酵素燃料電池.....	17
1-3-3 金属燃料電池.....	18
1-4 本研究の目的と意義.....	19
参考文献.....	22

第2章 セルロースの電気化学的酸化反応系の構築

2-1 緒言.....	26
2-2 セルロースの溶解.....	27
2-2-1 溶解前後におけるセルロースの結晶構造変化.....	30
2-3 セルロースの電気化学的酸化反応.....	31
2-4 電気化学的酸化反応によるセルロースの構造変化.....	37
2-5 電気化学的酸化反応に対するセルロースの分子サイズの影響.....	39
2-6 セルロース燃料電池の作製・評価.....	43
2-7 まとめ.....	44

参考文献.....	45
-----------	----

第3章 電気化学的に直接酸化されたセルロース誘導体の構造解析

3-1 緒言.....	47
3-2 セルロースの電気化学的酸化反応と反応電子数.....	47
3-3 電気化学的に酸化されたセルロース誘導体の構造解析.....	49
3-3-1 酸化セルロース誘導体の特性変化.....	49
3-3-2 酸化セルロース誘導体の構造変化.....	52
3-3-3 酸化セルロース誘導体の分子量分布.....	58
3-4 セルロースの電気化学的酸化反応機構に関する考察.....	60
3-5 酸化セルロース誘導体の被分解能の評価.....	62
3-6 まとめ.....	64
参考文献.....	65

第4章 セルロース分解のための生体構造模倣型人工触媒系の創生

4-1 緒言.....	67
4-2 生体構造模倣型人工触媒の作製.....	70
4-3 生体構造模倣型人工触媒の触媒発現と pH 依存性.....	73
4-4 生体構造模倣型人工触媒の触媒能と機能化 CNT 量の関係.....	74
4-5 アミノ酸修飾による生体構造模倣型人工触媒の触媒発現への影響.....	76
4-6 生体構造模倣型人工触媒の反応効率.....	80

4-7 まとめ.....	87
参考文献.....	88
第5章 総括.....	89
業績リスト.....	95
謝辞.....	101

第1章

序論

1-1 緒論

産業革命以降、石油などの化石資源から、エネルギーや工業原料を統合的に製造する技術体系であるオイルリファイナリーは、20世紀における先進諸国の発展に大きく貢献した。しかし、化石資源の大量消費は、温暖化や大気汚染などの、地球規模での環境問題を深刻化させた。また、化石資源の採掘可能埋蔵量も、石油では約40年程度と見積もられ、資源の枯渇によるエネルギーおよび物質供給問題が危惧されてきている。このような環境およびエネルギー・物質供給問題の解決策の一つとして、従来の化石資源の消費型社会から、再生可能な資源を利用した循環型社会への転換が必要であると考えられている。特に、環境負荷が少なく、再生可能な石油代替エネルギーの導入が重要であると言われている。¹⁻³ 再生可能エネルギーには、太陽光や風力、波力、地熱などが検討されているが、場所によって利用可能な資源量が異なることや、自然条件に左右されるといった問題がある。そこで、再生可能であるだけでなく、炭素源のサイクルとしてカーボンニュートラルな資源であるバイオマスが注目されている。¹⁻⁷ バイオマスは、太陽エネルギーを有機物の形で固定化した動植物体であり、地球上に豊富に、広域に分布している再生可能資源である。その持続可能な管理の下で資源として使用されれば、地球温暖化の原因の一つと考えられているCO₂の増大に寄与しない。また、廃棄物系バイオマスなどを、有用物質に

変換すること（バイオマスリファイナリー）が可能であるため、総合的なエネルギーの安定性や利用範囲の広さなどの点で、バイオマスが石油代替資源の一つとして期待されている（図 1.1）。



Figure 1.1 Oil-refinery and bio-refinery

バイオリファイナリーでは、食料と競合しない、食品廃棄物や林地残材、農業残渣などの廃棄または未利用のセルロース系バイオマスを、エネルギーおよび物質供給源として有効利用することが、特に重要な課題となっている。⁸⁻¹⁶ しかし、セルロース系バイオマスは難分解・難溶解性であり、その利活用は円滑には進んでいないという現状がある。図 1.2 は、我が国の各種バイオマスの利用状況を示したもので、林地残材や食品廃棄物、稲ワラやもみ殻などの農業残渣などの利用率が低い。食料と競合しない、これらのセルロース系バイオマスを有効活用していくことが、資源の少ない我が国にとって、特に重要な課題となっている。

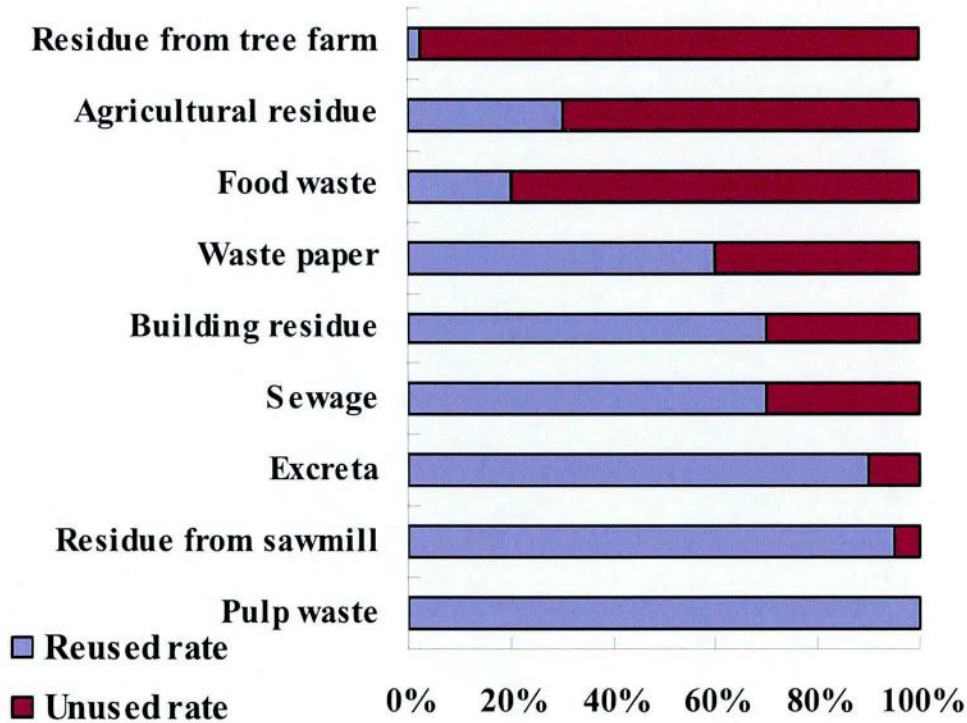


Figure 1.2 Biomass utilization rate in Japan

1.2 既往のセルロース系バイオマスからのエネルギー変換技術

現在、セルロース系バイオマスの実用的な利用に向けた研究開発が求められている。セルロース系バイオマス、特にその主成分であるセルロースは、エタノールや水素などのエネルギー、または機能性の樹脂やポリマー、プラスチックなどの物質供給源と成り得るため、さまざまな分野でその利用技術に関する研究が盛んに行われている。セルロースはグルコース（またはセロビオース単位）のポリマーで、植物の細胞壁などに含まれ、木材などの強固な構造に寄与している。グルコースは約 2890 kJ/mol のギブスエネルギーを有しており、そのポリマーであるセルロースは、その分子量に比例した潜在的エネルギーを有している。このセルロースをエネルギー利用に関する代表的な例として、セルロースからエタノールまたは水素を生成する試みが挙げられる。¹²⁻¹⁶ 難溶性のセル

ロースを、酵素などを用いて、グルコースなどの可溶性の単糖成分まで分解し（糖化プロセス）、^{6, 17-27} 次に、得られた可溶性糖成分を、微生物を用いてエタノールや水素などの燃料物質に変換する（発酵プロセス）。²⁸⁻³³ これらの燃料物質を燃料電池などのエネルギー変換装置に供給することで、最終的にバイオマスからエネルギーを取り出すという試みが行われている（エネルギー変換プロセス）（図 1.3）。

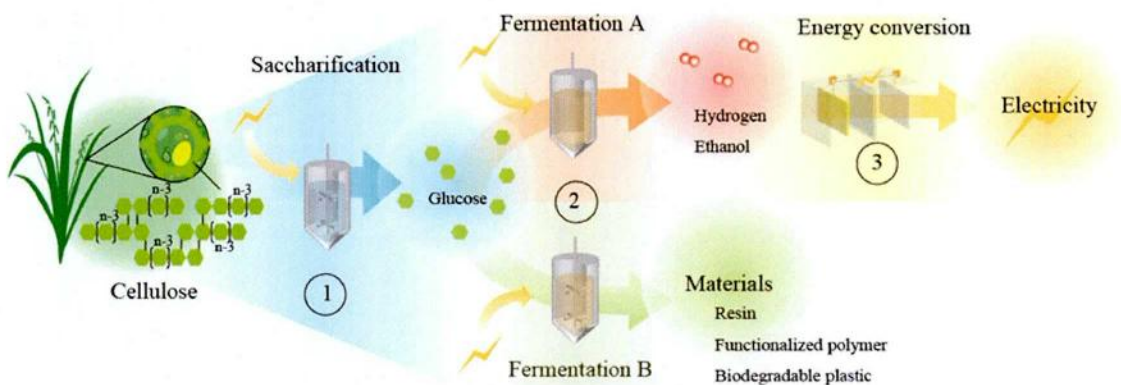


Figure 1.3 Conventional technology related with energy conversion from cellulosic biomass

しかしながら、糖化および発酵プロセスには、外部からのエネルギー供給や特別な操作が必要である他、各プロセス連結間におけるエネルギー損失などの問題がある（図 1.4）。^{34, 35} 特に糖化プロセスでは、未だ実用的な糖化技術は確立されておらず、対費用効果の高い糖化技術の研究開発が求められている。

1.3 燃料電池を利用したセルロース系バイオマスからのエネルギー変換技術

バイオマスをエネルギー資源として利用する場合、バイオマスからのエネルギー変換過程に関わる投入エネルギー（トータルエネルギーコスト）を抑え、そのエネルギー収支が実用的な範囲に収まるかが重要となってくる。

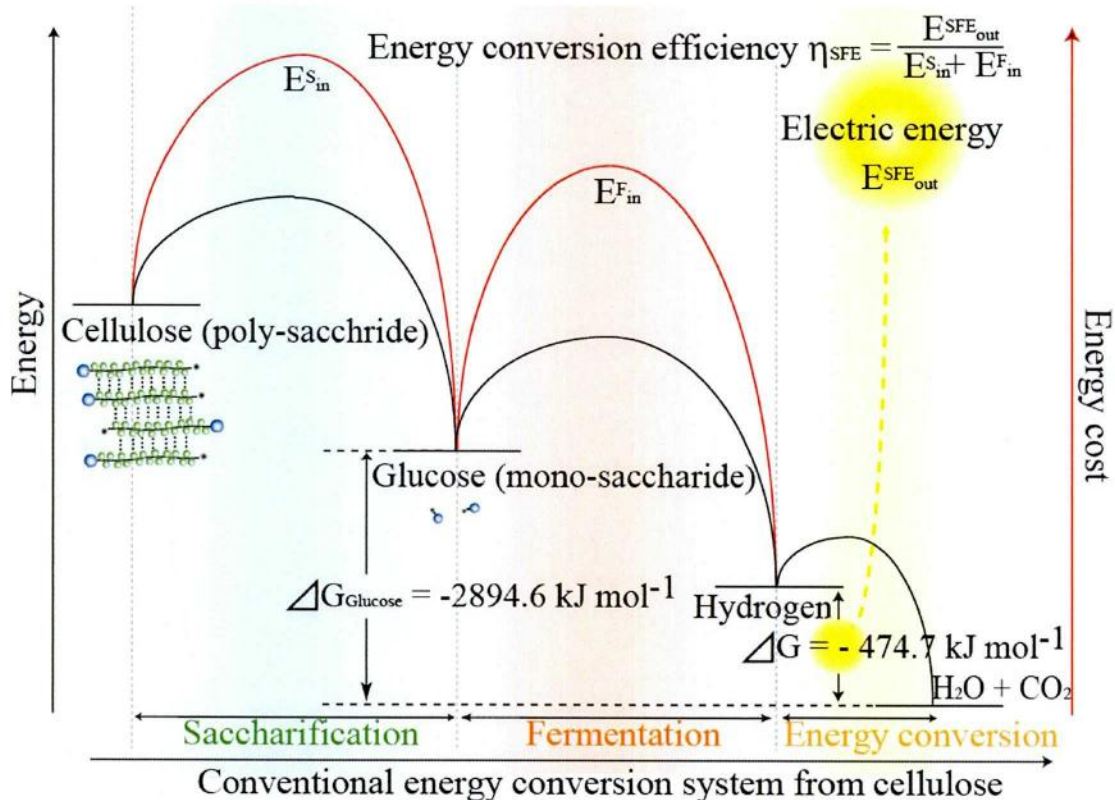


Figure 1.4 Energy diagram of conventional energy conversion system

バイオマスからのエネルギー変換効率は、実際にバイオマスをエネルギー資源として利用する際の重要な評価基準となってくる。

このような背景の中、近年、高いエネルギー変換効率を有する燃料電池を用いたバイオマスからのエネルギー利用に関する研究が盛んに行われてきている。

^{36, 37} 燃料電池は、燃料物質の化学反応($\Delta G < 0$)を、電池内の一対の電極上における電極反応として進行させることにより、その化学エネルギーを直接電気エネルギーに変換できる電気化学変換システムである。そのエネルギー変換効率 η は次式で表され、

$$\eta = (\Delta H - T \Delta S) / \Delta H \quad (1.1)$$

(ΔH :エンタルピー変化, T :絶対温度, ΔS :エントロピー変化)

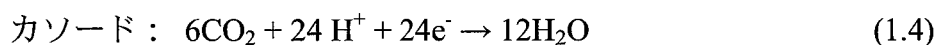
従来の熱機関のエネルギー効率の上限を規定するカルノーサイクル $\eta = (T_H - T_L)/T_H$, ($T_H > T_L$)よりも高く、次世代のエネルギー分野における重要な基幹技術の一つであると考えられている (図 1.5)。(カルノーサイクルでは、 T_H を大きく取らないと効率が良くなり、実際の発電効率は $\sim 40\%$ 程度である。一方、電気化学反応では、理論発電効率は $80\% \sim 90\%$ である。) 燃料電池は、分離膜で隔てられた2相構造内に、外部回路で連結している一対の電極が組み込まれた比較的簡単な構造を有しており (図 1.6)、大型化から小型化までのスケール制御や、場所に依存しない燃料補給 (充電) が可能であることから、携帯性の高い分散型エネルギー供給装置という特徴も有している。

燃料電池から得られる電力密度 P は、以下の式で表される。

$$P [\text{W}/\text{m}^2] = E [\text{V}] \times I [\text{A}]/S [\text{m}^2] \quad (1.2)$$

ここで、 E は起電力、 I は外部回路に流れる電流、 S は電極面積である。燃料物質から電気エネルギーを取り出しているとき、燃料電池のアノードおよびカソードではそれぞれ酸化還元反応が起こっている。

例えば、バイオマスの主成分であるセルロース $((\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n)$ の構成糖単位であるグルコース $(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6)$ から、燃料電池を介して電気エネルギーを取り出す場合、次のような半反応がそれぞれの電極上で進行している。



電池全体としては、グルコースの酸化反応であり、以下のように表される。



このとき、アノードおよびカソード間には、電子のエネルギー差に応じた電位差 (起電力) が生じる (図 1.7)。

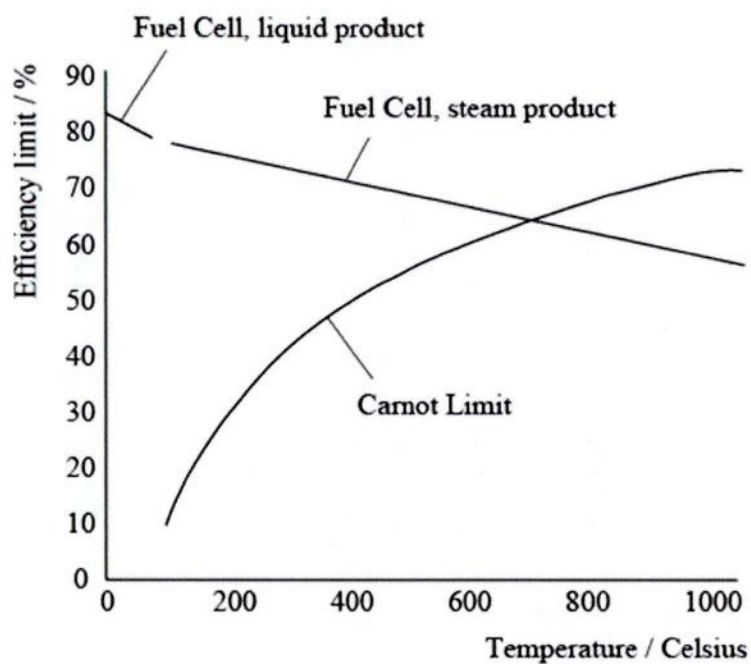


Figure 1.5 Efficiency of Fuel cells and Carnot Limit. Maximum H₂ fuel cell efficiency at standard pressure, referred to Higher Heating Value. The Carnot limit is shown for comparison, with 50°C exhaust temperature.

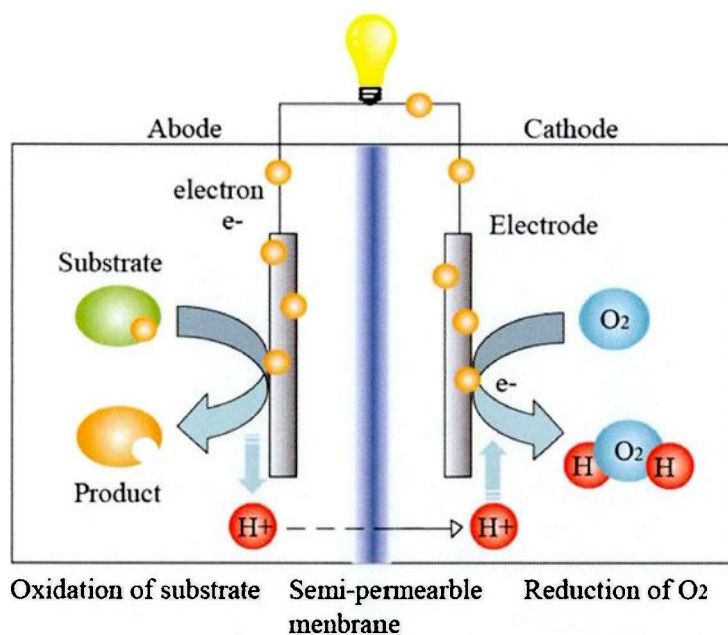


Figure 1.6 Composition of general fuel cells

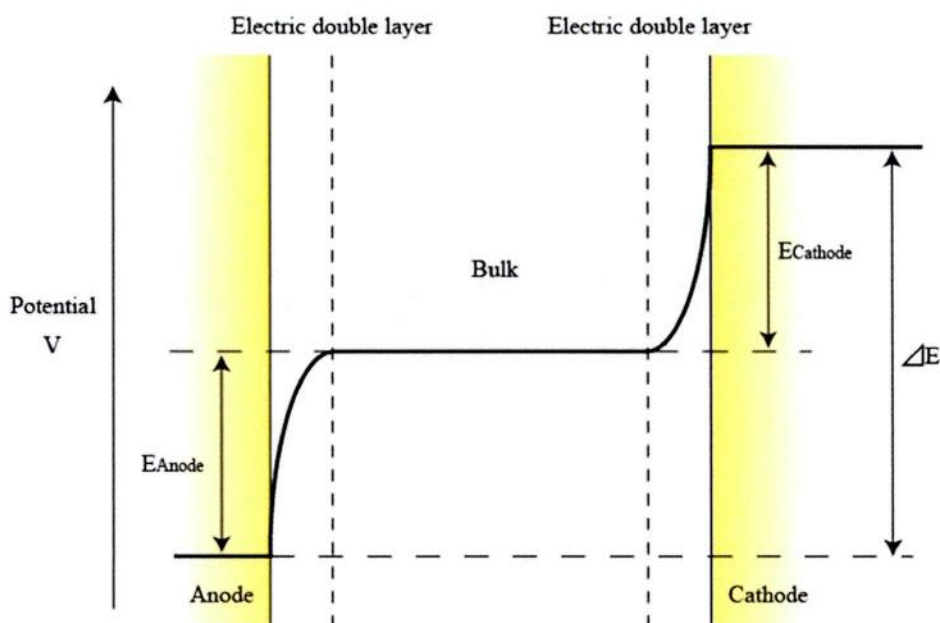


Figure 1.7 Operating potential of fuel cell system created by anode and cathode in the view of reactions at electric double layer

それぞれの半反応のエネルギー状態は、既知の標準酸化還元電位 E^0 として参照することができ、それぞれの正味の反応の起電力を見積もることができる（表 1.1）。この場合、グルコースを燃料として得られる燃料電池の起電力は、 $\Delta E = E_{\text{cathode}} - E_{\text{anode}}$ より 1.25 V であることがわかる。このとき電極に負荷をつなげば、電子が電位の低い電極（アノード）から高い電極（カソード）へ移動して電流が流れる。

Table 1.1 Standard oxidation-reduction potentials of half reaction (vs. SHE)

Reaction		E°/V
$O_2 + 4H^+ + 4e^-$	$\Leftrightarrow 2H_2O$	+0.82
$2HNO_3 + 10H^+ + 10e^-$	$\Leftrightarrow N_2 + 6H_2O$	+0.80
$CO_2 + 8H^+ + 8e^-$	$\Leftrightarrow CH_4 + 2H_2O$	-0.25
$NAD^+ + H^+ + 2e^-$	$\Leftrightarrow NADH$	-0.32
$HCOOH + 4H^+ + 4e^-$	$\Leftrightarrow CH_3OH + H_2O$	-0.36
$C_6H_{10}O_6 + 2H^+ + 2e^-$	$\Leftrightarrow C_6H_{12}O_6 + H_2O$	-0.36
$CO_2 + 6H^+ + 6e^-$	$\Leftrightarrow CH_3OH + H_2O$	-0.40
$CH_3COOH + 4H^+ + 4e^-$	$\Leftrightarrow CH_3OH + H_2O$	-0.40
$2H^+ + 2e^-$	$\Leftrightarrow H_2$	-0.41
$6CO_2 + 24H^+ + 24e^-$	$\Leftrightarrow C_6H_{12}O_6 + 6H_2O$	-0.43
$2CO_2 + 12H^+ + 12e^-$	$\Leftrightarrow C_2H_5OH + 3H_2O$	-0.50

近年、この燃料電池の仕組みを利用して、セルロースを糖化処理して得られるグルコースから、直接電気エネルギーを取り出すグルコース燃料電池に関する研究開発が活発化しており、発酵プロセスを必要とせず、携帯性の高い燃料電池を利用するため、より応用範囲を広げたバイオマスからのエネルギー変換技術として期待されている (図 1.8)。³⁶⁻⁴⁰ 地球上に豊富に分布しているバイオマスを、燃料電池を介してその場で効率的にエネルギーに変換することが可能になれば、場所に依存しない分散型エネルギー供給システムの構築が可能とな

り、持続可能な循環型社会の形成に大きく寄与するものと考えられる。

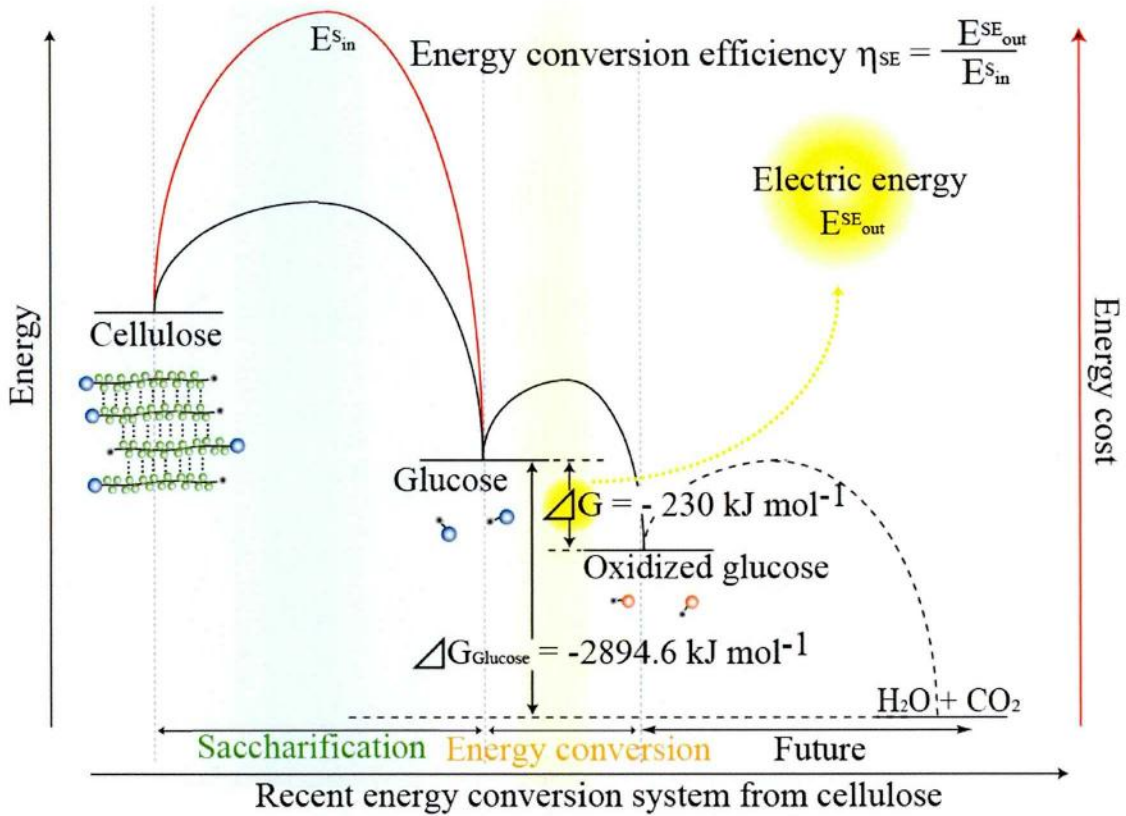


Figure 1.8 Energy diagram of recent energy conversion system using fuel cell

以下に、バイオマス成分を燃料とした燃料電池（バイオ燃料電池）に関する研究例を紹介する。バイオ燃料電池は、燃料物質の酸化還元反応に関する触媒系の違いにより、主に三種の種類（微生物燃料電池、酵素燃料電池、金属燃料電池）に分類され得る。

1-3-1 微生物燃料電池

微生物燃料電池は、微生物の代謝能を、燃料物質の酸化還元反応に関わる触媒として利用する燃料電池である。⁴¹⁻⁴⁴ 微生物に限らず、生命システムの本質は非平衡状態にあり、代謝とは広い意味でエントロピー増大の方向に抗して自然エネルギーを取り入れ、利用する全過程のことと考えられる。生物は原理的に開放系で、決して平衡にはなく、たえず高エンタルピー、低エントロピーの栄養物（燃料物質）を取り込み、特定の基質から特定の生成物に至る一連の酵素反応系（代謝経路）を経て、低エンタルピー、高エントロピーの物質に分解し、その過程で自由エネルギーを獲得している。代謝経路は一般に、糖、脂肪、タンパク質などを分解して低分子の代謝中間体に分解する異化経路と、異化で得られたエネルギーを利用して低分子化合物から、より複雑な高分子化合物を合成し、細胞合成を行う同化経路に分けられる。生命が燃料物質（例えばバイオマス成分であるグルコース）からエネルギーを獲得する際、この異化経路において、より分子量の小さいピルビン酸などに分解される。好気条件では、このピルビン酸は、さらにトリカルボン酸回路(TCA 回路)で NADH と FADH₂ を生成し、これらが電子伝達系で酸素により酸化されるとき、酸化的リン酸化で ATP（アデノシン 3 リン酸）を生成する。1 分子の ATP が加水分解されると、約 31 kJ のエネルギーが放出される。細胞は、燃料物質から変換した ATP をエネルギー源として蓄え、必要に応じて ATP を加水分解し、化学的な仕事、運動、輸送等に利用する機能を有している。微生物燃料電池は、この燃料物質の異化、およびその過程で生成される電子给与体(NADH, FADH₂)と酸素の酸化還元反応を燃料電池システムに組み込むことで、燃料物質から電気エネルギーを取り出すことを可能にしている（図 1.9(a)）。⁴⁵⁻⁵⁰ グルコースを燃料とした場合、それぞれの標準酸化還元電位の値から、理想的には 1.24 V 程度の起電力が得られるはず

であるが、実際には微生物代謝および電子授受反応における微生物と電極間の抵抗に起因するエネルギーロスなどにより、微生物燃料電池の起電力は、理論値よりも低くなる（図 1.9(b)）。

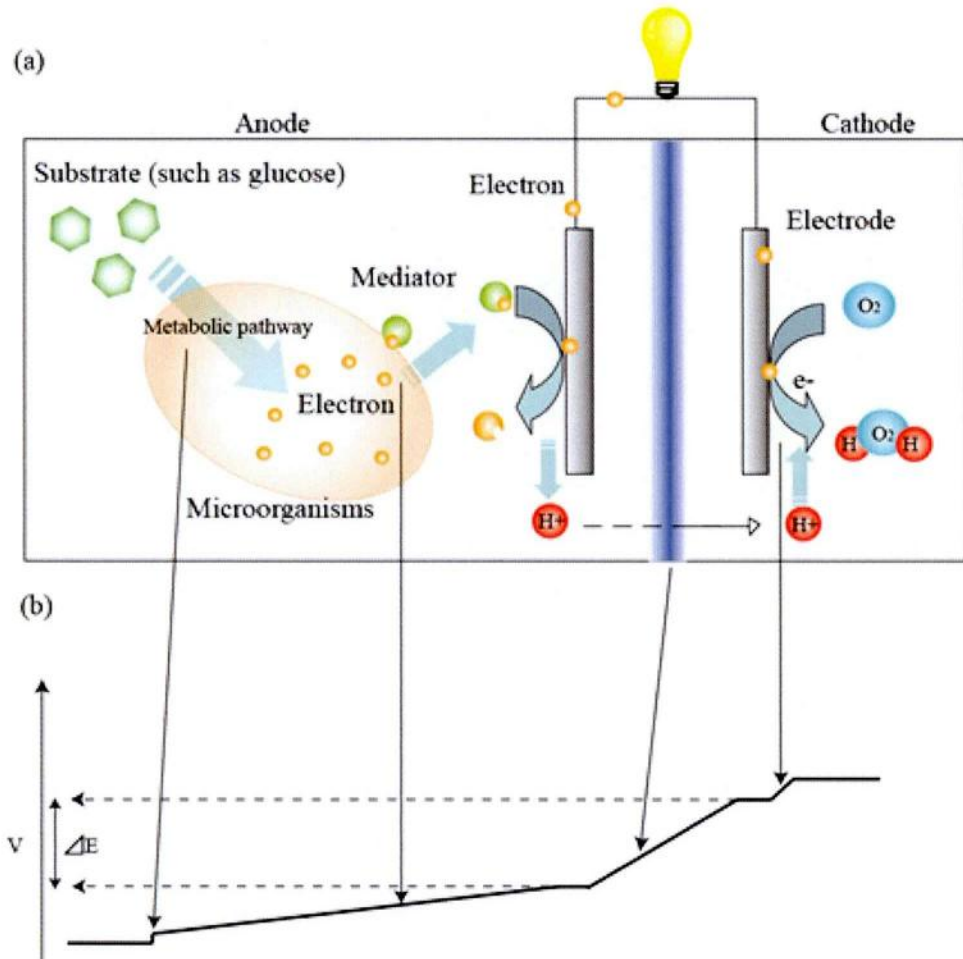


Figure 1.9 Scheme of microbial fuel cells. (a) Composition of the fuel cell. (b) Potential loss in each stage of reaction processes.

この起電力低下を減らすために、電極表面との電子伝達能の高い微生物の探索およびスクリーニングが重要となってくる。微生物燃料電池は、未だ実用的な段階ではないが、燃料種に合わせて微生物を選択することで、ほとんど全ての

バイオマス成分を燃料として利用することが可能であることや、燃料が供給される限り（微生物が活着している限り）、比較的安定に電力供給できるため、その適用範囲は広い。⁵¹ しかし、燃料電池に適した微生物の遺伝子発現や代謝制御などが難しく、電池出力や安定性、動作環境などに問題点がある。⁵² 燃料電池と微生物をひとつのバイオ燃料電池システムとして機能させるには、微生物の生命機能をシステムとして捉え、細胞を構成する部品の情報や、ハイスループットに得られる遺伝子発現、タンパク質発現、代謝物濃度、代謝流速分布などの情報を統合的に解析し、システム同士を合理的に統合させる必要があり、解決すべき課題は多いという現状がある。

1-3-2 酵素燃料電池

酵素燃料電池は、上述した代謝ネットワークにおいて、電子伝達反応を触媒する酵素そのものを電極上に固定化させ、電池電極を酵素反応の電子受容体として作用させることで、酵素の基質となる燃料物質から電気エネルギーを取り出すことが可能なバイオ燃料電池である。⁵³⁻⁵⁸ 生体触媒である酵素を利用しているため、酵素燃料電池は、常温における動作、酵素の基質となり得る全ての燃料種が利用可能、高価な無機触媒が不要などの特徴を有している。また、酵素の持つ高い基質選択性から、電極上におけるクロス反応（燃料の酸化と同時に還元も起こる反応）の心配が少ないため小型化が可能であり、また高い生体適合性も有していることから、生体埋め込み型の発電デバイスとして、医療分野からも期待されている。⁵⁹⁻⁶¹ 現在の酵素燃料電池系は、主にグルコースオキシダーゼ(GOD)やグルコースデヒドロゲナーゼ(GDH)を触媒としてアノード電極上に修飾したものが盛んに研究されている。これらの酵素により、グルコースが酸化($C_6H_{12}O_6 + 1/2O_2 \rightarrow C_6H_{10}O_6 + H_2O$)されてグルコノラクトンが生成され、理

論的には 1.18 V の起電力が得られる。しかし、上述したように、実際は電池の反応段階で徐々に電位差が小さくなる。

酵素燃料電池の場合、酵素が触媒するグルコース酸化反応に関与する電子を電池電極に伝達して、燃料電池の発電機能が有効となるが、グルコースの酸化反応を行う酵素の触媒活性サイトは、絶縁性のタンパク質構造の内部に存在し、電極との間で電子伝達することができない。そのため、メディエーター（電子伝達物質）を介して酵素反応で得られる電子を電池電極に伝達する必要がある。その際、燃料物質（グルコース）から酵素、酵素からメディエーターに電子が移るに従い、徐々に酸化還元電位の低下が起こり、電池の起電力が低下する。また、使用するメディエーターの安定性などに起因する、燃料電池性能の安定性や短寿命などの問題点が存在する。

1-3-3 金属燃料電池

金属燃料電池は、バイオマス由来の燃料物質の酸化還元反応を、微生物や酵素などの生体触媒ではなく、金属の触媒作用を用いた燃料電池である。いくつかの金属は、アルカリ環境下においてグルコースなどのアルドースの酸化反応を触媒することが報告されている。⁶²⁻⁶⁴ この金属の糖酸化に対する触媒能を燃料電池電極として機能させることで、メディエーターなどを介さず、電極表面でグルコースなどの燃料物質と電子授受することが可能な化学燃料電池に応用することができる。⁶⁵ そのため、微生物燃料電池や酵素燃料電池と比べて電圧降下の要因となる要素が少なく、より理論値に近い起電力(1.18 V)を得られるところが考えられる。また、生体触媒を使用しないため、温度や pH など反応環境のデザインが可能となり、微生物燃料電池および酵素燃料電池とは異なる方向からバイオマス利用に関する燃料電池技術が展開される可能性を有している。

現在、これらのバイオ燃料電池は、ウォークマンなどの商用電源として使用され、今後は、携帯電話やノートパソコンなど、他の携帯機器の電源装置としての利用が期待されている。このように、バイオマスからのエネルギー変換過程におけるプロセス数の減少は、エネルギー変換効率や分散型エネルギー供給性の向上などが見込まれ、バイオマスがより多くの分野で代替資源として利用されることが期待される。しかし、既存の技術では、不溶性の高分子であるセルロースなどのバイオマスの主成分が電池電極と電気化学的に相互作用することができず、燃料として利用可能なものは、上述したグルコースなどのセルロース由来の可溶性の糖成分に限られている。現在のバイオマスからのエネルギー変換技術には、依然として、その主成分であるセルロースから、グルコースに分解する糖化プロセスが必要であるという現状と課題がある。

1.4 本研究の目的および意義

従来のバイオマスからのエネルギー変換技術では、エネルギーを生成するために、糖化や発酵など、外部からエネルギーを必要とするいくつかのプロセスが必要であり、バイオマスからのエネルギー変換システム系全体のエネルギー変換効率は低いという現状がある。また、地球上に豊富に、広域に分布しているセルロース系バイオマスの分散型エネルギー供給に適した利点を十分に利用することができておらず、エネルギー資源としてのバイオマスが持つポテンシャルを最大限に発揮できていない。

本研究では、バイオマスの主成分であるセルロースを、糖化も発酵プロセスも介さず、従来のバイオ燃料電池システムよりも高いエネルギー変換効率で、直接電気エネルギーに変換できる、次世代のバイオ燃料電池システム系の提

案・構築を試みる(図 1.10 および 1.11)。

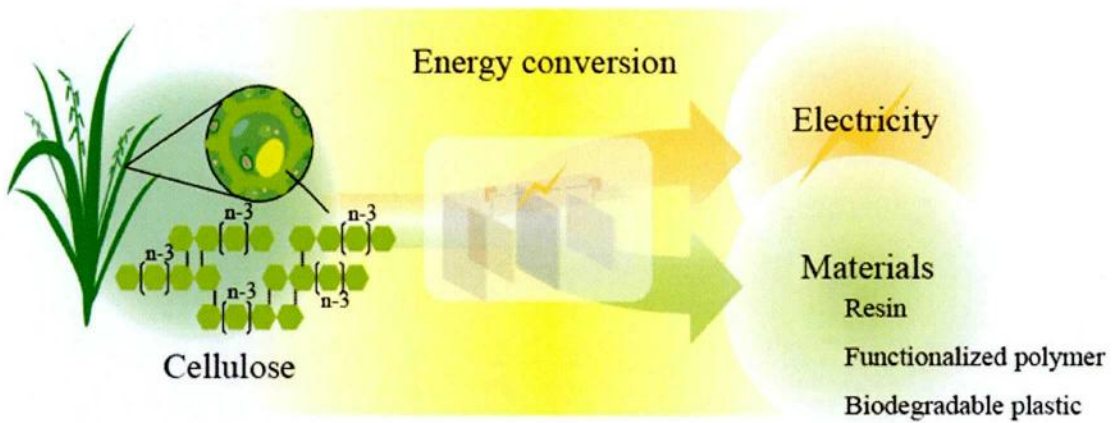


Figure 1.10 Direct energy conversion system from cellulose using fuel cell.

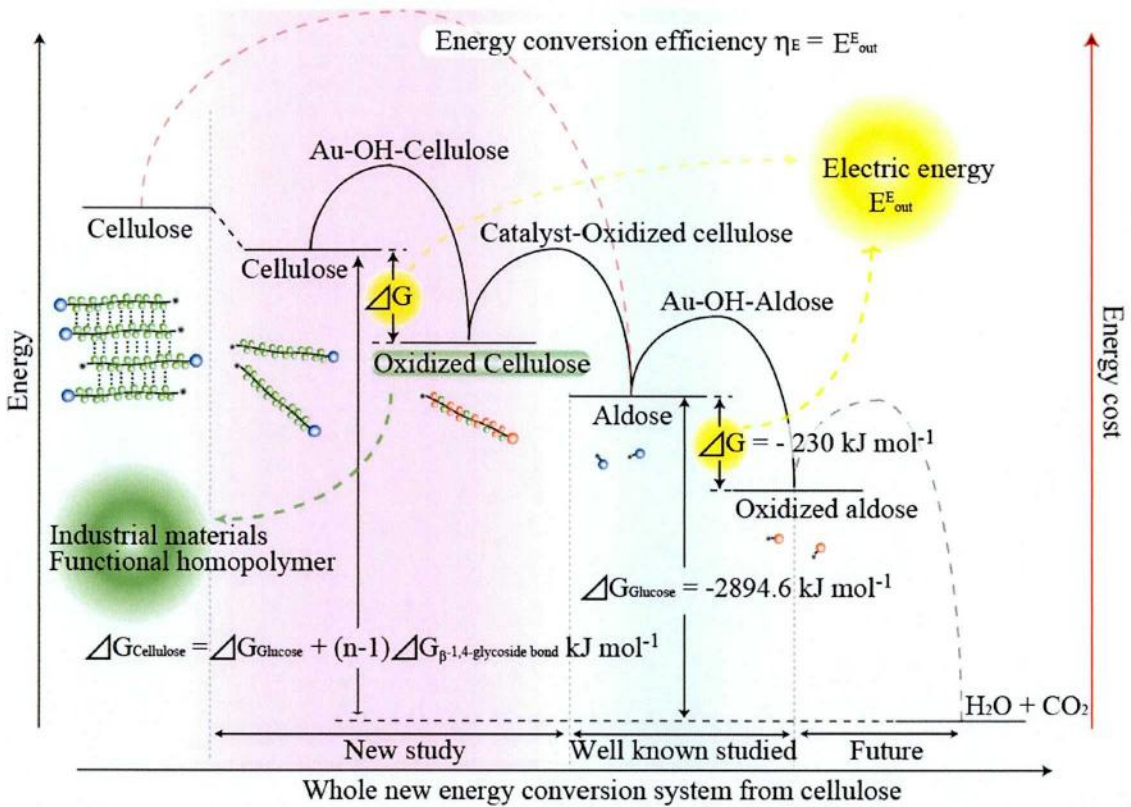


Figure 1.11 Energy diagram of direct energy conversion system from cellulose using fuel cell

未利用または廃棄されるセルロース系バイオマスは、人類の生活圏に豊富に存在しており、それらが on site で携帯電話などの携帯機器の燃料源として使用できれば、バイオマスのエネルギー利用に関する技術レベルが大きく向上する。また、エネルギーと同時に、機能性のセルロース系ポリマーなど、より付加価値の高い工業原料も製造することが可能であるため、次世代の重要な化石資源代替技術として、持続可能な循環型社会の形成に貢献できると考えられる。また、現在のセルロースなどの高分子の改質技術に、電気化学的手法を取り入れることで、従来の改質技術では制御の難しかった領域に応用・展開でき、新たな機能性新素材や、ナノ材料などを選択的に生成できることも期待される。

本論文の構成

本論文は、本章（序論）を含めた全 5 章から構成されている。以下に、各章の概要を述べる。

第 2 章では、結晶性セルロースを、金属電極の糖酸化に対する触媒能を発現できる環境下で、その分子内・分子間水素結合を切断させたときの、セルロース分子と電極表面との電気化学的相互作用について述べる。また、セルロースを直接燃料として作動するセルロース燃料電池の特性を示し、セルロースからの直接エネルギー変換システムについて議論する。

第 3 章では、セルロースを電気化学的に酸化することで得られる酸化セルロース誘導体の構造を、X 線回折、フーリエ変換赤外分光およびサイズ排除クロマトグラフィーを用いて調べ、セルロースの電気化学的酸化反応の前後における構造変化について述べる。また、構造解析結果および反応電子数と生成酸化

セルロース誘導体の量的関係から、セルロースの電気化学的酸化に関する反応機構について議論する。最後に、酵素を用いた酸化セルロース誘導体の被糖化能（分解能）を調べ、構造変化に伴うセルロースの特性変化について述べる。

第4章では、セルロースの分解反応を触媒する酵素（セルラーゼ）の触媒活性部位を、カーボンナノチューブ(CNT)を用いて再構築した生体構造模倣型人工触媒について議論する。また、本人工触媒の触媒活性に影響を与える実験パラメータ(pH, CNT量など)を調べ、生体構造模倣型人工触媒の触媒反応機構について考察する。

第5章では、本論文における研究成果をまとめる。

参考文献

- 1 B. Kamm & M. Kamm, Biorefinery - Systems, *Chem. Biochem. Eng. Q.* 2004, 18, 1-6.
- 2 G. W. Huber & A. Corma. Synergies between Bio- and Oil Refineries for the Production of Fuels from Biomass. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, 46, 7184 – 7201.
- 3 L. R. Lynd, J. H. Cushman, R. J. Nichols & C. E. Wyman, *Science*. 1991, 251, 1318.
- 4 L. R. Lynd, C. E. Wyman & T. U. Gerngross, *Biotechnol. Prog.* 1999, 15, 777.
- 5 C. E. Wyman, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1994, 45/46, 897.
- 6 C. E. Wyman & N. D. Hinman, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1990, 24/25, 735.
- 7 G. W. Huber, S. Iborra & A. Corma, *Chem. Rev.* 2006, 106, 4044.
- 8 E. M. Rubin, Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*. 2008, 454, 841-845.
- 9 J. Hill, E. Nelson, D. Tilman, S. Polasky, & D. Tiffany, Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proc. Natl Acad.*

- Sci. USA.* 2006, 103, 11206-11210.
- 10 D. Tilman, J. Hill, & C. Lehman, Carbon-negative biofuels from low-input highdiversity grassland biomass. *Science.* 2006, 314, 1598-1600.
 - 11 M. E. Himmel, et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science.* 2007, 315, 804-807.
 - 12 B. Hahn-Hägerdala, M. Galbea, M. F. Gorwa-Grauslunda, G. Lidéna & G. Zacchi, *TRENDS in Biotechnology.* 2006, 24, 12, 549-556.
 - 13 A. V. Bridgwater & G. V. C. Peacocke, *Renewable Sustainable Energy Rev.* 2000, 4, 1.
 - 14 D. C. Elliott, E. G. Baker, D. Beckman, Y. Solantausta, V. Tolénhiemo, S. B. Gevert, C. HPrnell, A. Qstman & B. KjellstrPm, *Biomass.* 1990, 22, 251.
 - 15 D. C. Elliott, D. Beckman, A. V. Bridgwater, J. P. Diebold, S. B. Gevert & Y. Solantausta, *Energy Fuels.* 1991, 5, 399.
 - 16 D. Mohan, C. U. Pittman & P. H. Steele, *Energy Fuels.* 2006, 20, 848.
 - 17 C. E. Wyman, *Annu. Rev. Energy Environ.* 1999, 24, 189.
 - 18 N. Mosier, et al. *Bioresour. Technol.* 2005, 96, 1986-1993.
 - 19 C. E. Wyman, et al. *Bioresour. Technol.* 2005, 96, 1959-1966.
 - 20 J. Soderstrom, et al. *J. Wood Chem. Technol.* 2005, 25, 187-202.
 - 21 A. Wingren, et al. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2005, 121, 485-499.
 - 22 L. E. Gollapalli, et al. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2002, 98-100, 23-35.
 - 23 E. Varga, et al. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2002, 98-100, 73-87.
 - 24 P. Sassner, et al. *Enzyme Microb. Technol.* 2006, 39, 756-762.
 - 25 K. Ohgren, et al. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2005, 121, 1055-1067.
 - 26 C. Tengborg, et al. *Biotechnol. Prog.* 2001, 17, 110-117.

- 27 C. Tengborg, et al. *Enzyme Microb. Technol.* 2001, 28, 835-844.
- 28 B. S. Dien, et al. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003, 63, 258-266.
- 29 A. Mohagheghi, et al. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2002, 98-100, 885-898.
- 30 E. Palmqvist, & B. Hahn-Hagerdal, *Bioresour. Technol.* 2000, 74, 25-33.
- 31 D. J. Schell, et al. *Bioresour. Technol.* 2004, 91, 179-188.
- 32 K. L. Kadam, et al. *Biotechnol. Prog.* 2000, 16, 947-957.
- 33 I. Sarvari Horvath, et al. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69, 4076-4086.
- 34 R. C. Saxena, D. K. Adhikari, & H. B. Goyal, *Renew. Sust. Energ. Rev.* 2009, 13, 167.
- 35 K. Saga, et al., *J. Jpn. Soc. Energ. Res.* 2009, 30, 9.
- 36 F. Davis & P. J. Higson, *Biosens. Bioelectron.* 2007, 22, 1224.
- 37 R. A. Bullen, T. C. Arnot, J. B. Lakeman & F. C. Walsh, *Biosens. Bioelectron.* 2006, 21, 2015.
- 38 S. K. Chaudhuri & D. R. Lovley, *Nat. Biotechnol.* 2003, 21, 1229.
- 39 I. Willner et al., *Science* 2002, 298, 2407.
- 40 J. Kim, H. Jia & P. Wang, *Biotechnol. Adv.* 2006, 24, 296.
- 41 B. E. Logan, B. Hamelers, R. Rozendal, U. Schröder, J. Keller, S. Freguia, P. Aelterman, W. Verstraete & K. Rabaey, *Environ. Sci. Technol.* 2006, 40, 17, 5181-5192.
- 42 R. S. Berk & J. H. Canfield, *Appl. Microbiol.* 1964, 12, 10-12.
- 43 J. B. Davis & H. F. Yarbrough, *Science.* 1962, 137, 615-616.
- 44 B. Cohen, *J. Bacteriol.* 1931, 21, 18-19.
- 45 K. Rabaey, N. Boon, S. D. Siciliano, M. Verhaege & W. Verstraete, *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70, 5373-5382.

- 46 K. Rabaey, N. Boon, M. Hofte, W. Verstraete, *Environ. Sci. Technol.* 2005, 39, 3401-3408.
- 47 D. R. Bond & D. R. Lovley, *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69, 1548-1555.
- 48 G. Reguera, K. D. McCarthy, T. Mehta, J. S. Nicoll, M. T. Tuominen, D. R. Lovley, *Nature*. 2005, 435, 1098-1101.
- 49 D. R. Bond, D. E. Holmes, L. M. Tender, D. R. Lovley, *Science*. 2002, 295, 483-485.
- 50 B. E. Logan, *Environ. Sci. Technol.* 2004, 38, 160a-167a.
- 51 D. R. Bond & D. R. Lovely, *Appl Environ Microbiol.* 2005, 71, 2186-2189.
- 52 G. T. R. Palmore & G. M. Whitesides, *American Chemical Society*. 1994, 271-290.
- 53 S. C. Barton, J. Gallaway & P. Atanassov, *Chem. Rev.* 2004, 104, 4867-4886.
- 54 J. Kim, H. Jia & P. Wang, *Biotechnol. Adv.* 2006, 24, 296-308.
- 55 Y. Yan, W. Zhen, L. Su, L. Mao, *Adv. Mater.* 2006, 18, 2639-2643.
- 56 W. Zheng, Q. Li, L. Su, Y. Ya, J. hang & L. Mao, *Electroanal.* 2006, 18, 587-594.
- 57 R. Duma & S. D. Minteer, *Polym. Materials. Sci. Eng.* 2006, 94, 592-593.
- 58 D. Ivnitski, B. Branch, P. Atanassov & C. Apblett, *Electrochem. Comm.* 2006, 8, 1204-1210.
- 59 S. Kerzenmacher, J. Ducree, R. Zengerle & F. von Stetten, *Journal of Power Sources*. 2008, 182, 1-17.
- 60 A. Heller, *Anal. Bioanal. Chem.* 2006, 385, 469-473.
- 61 N. Mano, F. Mao & A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 6588-6594.
- 62 F. Matsumoto, M. Harada, N. Koura, S. Uesugi, *Electrochem. Commun.* 2005, 5, 42.
- 63 A. Kubo, Y. Kuwahara, I. Taniguchi, *J. Electroanal. Chem.* 2006, 590, 37.
- 64 M. Tominaga, M. Nagashima, K. Nishiyama, I. Taniguchi, *Electrochem. Commun.* 2007, 9, 1892.

第2章 セルロースの電気化学的酸化反応系の構築

2-1 緒言

本章では、結晶性セルロースを、糖を酸化させる金の触媒能が発現できる環境下に溶解（分子分散）させ、セルロース分子が電極表面と電気化学的に相互作用できる環境を構築することで、糖化および発酵プロセスを介さず、セルロースから直接電気エネルギーを取り出すことが可能な、ユニークなエネルギー変換システムについて述べる。

電池電極と燃料物質の電気化学反応は、電極が電解質溶液と接している電極表面（界面）で起こる。電極が電解質に接すると電極界面に静電的電位が発生し、バルク溶液からは異なる界面構造である電気二重層が形成される。電気二重層の厚さは数Å程度で、この領域内で電極と燃料物質の電子授受反応が進行する。グルコースなどの可溶性の単糖成分は、この電気二重層内で電極表面と電気化学的に相互作用することが可能であり、これまでに多くの可溶性糖成分の電気化学的特性に関する知見が得られてきている。⁷⁻¹³ これらの研究報告は、金属電極を用いたグルコース燃料電池の構想および開発に大きく寄与している。しかしながら、グルコースのポリマーであるセルロースは、単に分子量の増加だけでなく、一本一本のポリマー（セルロース分子鎖）同士による化学結合ネットワークが形成された不溶性の結晶構造を有している。そのため、電極表面近傍の電気二重層内に各セルロース分子が侵入することが難しく、電極と電気化学的に相互作用することができない。実際、これまでにセルロースなど水不溶性の高分子ポリマー分子と、アルカリ環境下における金属電極上との電極電気化学的知見に関する研究はほとんど報告されておらず、金属電極を用いたセ

ルコースからの直接エネルギー変換は難しいという現状がある。セルロースと電極を電気化学的に相互作用させるためには、まず金属電極の糖酸化に対する触媒能が発現できる環境下で、セルロース分子の結晶性を壊す必要がある。

2-2 セルロースの溶解

結晶性セルロースは、分子内・分子間水素結合および分子間の疎水結合によってその結晶構造を維持している（図 2.1）。セルロースの溶解は、セルロース分子間に形成されているこれらの結合をすべて切断し、セルロース分子間の相互作用を緩和させ、セルロース分子鎖を分子レベルで分散できていることを示す。この状態を形成させるには、セルロース中の水素結合あるいは疎水結合を切断することに加えて、これらの相互作用を妨げるようにセルロース分子の OH 基の一部（あるいはすべて）をブロックしておく必要がある。

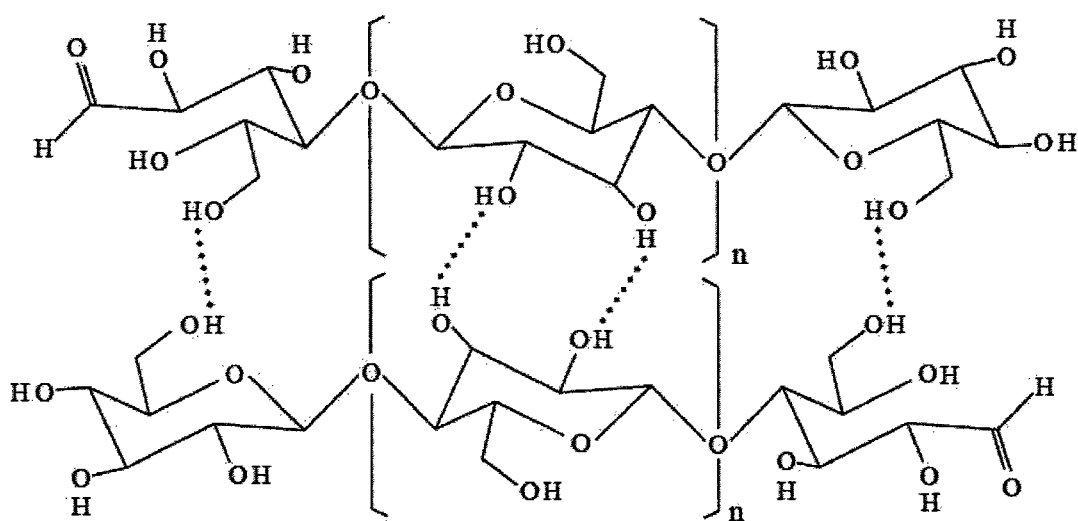


Figure 2.1 Chemical structure of cellulose

セルロースの溶解に関する研究は、繊維工業の分野で盛んに行われており、現在さまざまなセルロース溶剤に関する研究が行われている。セルロースはアルカリ性環境下では比較的安定であり、水酸化銅エチレンジアミン溶液等のアルカリ性のセルロース溶剤の研究などが報告されている。また、非水系セルロース溶剤として、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミドなどを主溶媒とした溶媒系に関する研究も盛んに行われている。これらの溶媒（系）は、セルロースの水酸基と反応あるいは強い相互作用し、不安定な誘導体あるいは錯体を形成させ、セルロースの溶解状態を維持している。一部のセルロース溶剤は、再生セルロース成形品の工業生産に利用されている。もっとも大量に生産されているのがレーヨン繊維である。まずセルロースを20%程度の水酸化ナトリウム水溶液に浸漬し、液体の二硫化炭素を加えることにより、セルロースの水酸基の一部がキサントゲン酸塩($R-O-CS_2Na$)という誘導体となって可溶化され、粘セルロース溶液が得られる。このセルロースのキサントゲン酸塩溶液を希硫酸-無機塩（硫酸ナトリウム）含有水溶液中に注入することにより、キサントゲン酸塩部分がセルロース水酸基から外れ、繊維状の再生セルロースゲルが生成し、これを乾燥するとレーヨン繊維が得られる。このキサントゲン酸塩法では、有毒な硫化水素が発生するため、環境に負荷を与えない新しいセルロースの溶剤の研究開発が求められている。

2-2-1 溶解前後におけるセルロースの結晶構造変化

セルロースの溶媒はいくつか報告されているが、本研究では、3種類の溶媒（イオン液体、水酸化ナトリウム/チオ尿素混合溶媒、水酸化ナトリウム）を用いてセルロースの溶解を検討した。まず、イオン液体を用いた場合、セルロー

スは溶解したが、非常に高い粘性があるという難点があった。また、水酸化ナトリウムとチオ尿素の混合溶媒を用いた場合、低温処理 (-15°C) の後、セルロースは良く溶けたが、電気化学測定時、電極表面へのチオ尿素の吸着現象が激しいという問題点があった。一方、水酸化ナトリウムのみを用いた場合、低温処理 (-15°C) の後セルロースが溶解し、さらにこれらの問題は観察されなかったため、本実験におけるセルロース溶媒とした。図 2.2 は、セルロースの溶解前後におけるセルロース含有水酸化ナトリウム溶液の顕微鏡画像を示しており、溶解前ではセルロースの構造が観察されているのに対し、溶解後ではこれらの構造が観察されなくなったことがわかる。また、図 2.3 は、セルロースの溶解前後におけるセルロースの X 線回折(XRD)パターンを示している。溶解前では、セルロースの結晶構造に由来する二つの主要な回折ピーク($2\theta = 20, 23^\circ$)が検出されているのに対し、溶解後ではこれらの回折ピークは検出されておらず、セルロースの結晶性が無くなっている（または 10 nm (X 線回折の検出限界) 以下の結晶サイズにまで低下している) ことを示している。¹³ この溶解機構は、まず水が水酸化ナトリウムと水和構造を形成し、次にこの水和構造体がセルロースと相互作用（溶媒和）して、セルロースを溶解させると考えられている。そのため、水和構造の維持あるいは溶媒和促進のため、低温ほど溶解が進んでいると考えられる。セルロースの結晶性の低下は、上述したセルロース分子内・分子間水素結合ネットワークの崩壊を示唆しており、セルロース分子鎖一本一本が、水酸化ナトリウム溶液中でランダムな配向性を有した状態を形成していると考えられる。これらの結果から、このセルロース溶液を用いることで、電極界面との間で電子授受可能な電気二重層領域にまで個々のセルロース分子が到達できる可能性が考えられ、金電極と電気化学的に相互作用することが期待される。

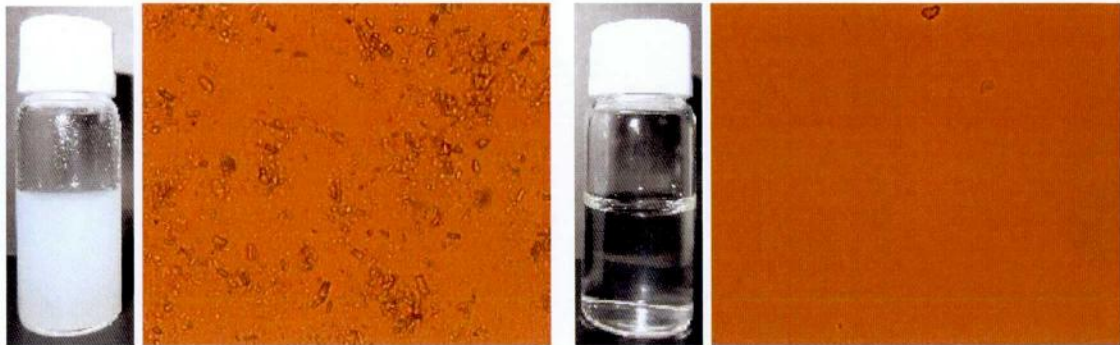


Figure 2.2 Microscopic images of cellulose in alkaline solution.

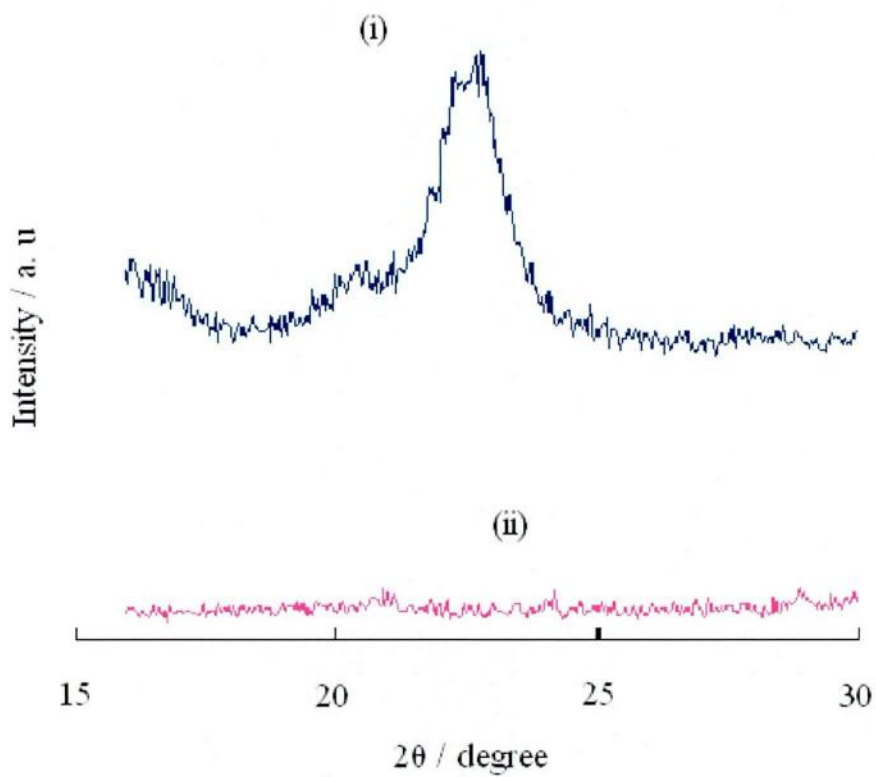


Figure 2.3 X-ray diffractograms of cellulose solution. (i) cellulose sample before dissolution, (ii) cellulose sample after dissolution.

2-3 セルロースの電気化学的酸化反応

作製したセルロース溶液を用いて、セルロースの電気化学的特性（電流-電位応答）を調べた。電流-電位応答は、ポテンシオスタットを用いたサイクリックボルタンメトリーにより測定した。サイクリックボルタンメトリー(cyclic voltammetry; CV)は、電位走査法とも呼ばれ、電極電位を初期電位(E_i)から掃印速度(v)で反転電位(E_λ)まで掃印したのち逆転し、 E_i までもどしたときに流れる電流を測定する手法である。 E_i を電極反応の起こらない電位に、また E_λ を電極反応が拡散律速となるような電位で走査すると、反応電流のピーク波形を示す電流-電圧曲線（サイクリックボルタモグラム）が得られる。負電流が観測される場合、電極表面において還元反応が優先的に進行していることを示す。また、正電流が観測される場合、酸化反応が優先的に進行していることを示す。本実験では、この CV 測定を用いて、金電極表面におけるセルロースの酸化電流の検出を試みた。本実験における CV 測定では、作用極として金電極、対極として白金電極、参照極として Ag/AgCl 電極から成る電気化学セルを作製し、走査範囲-0.1 ~0.4、走査速度 5 mV/sec として電気化学測定を行った（図 2.4）。

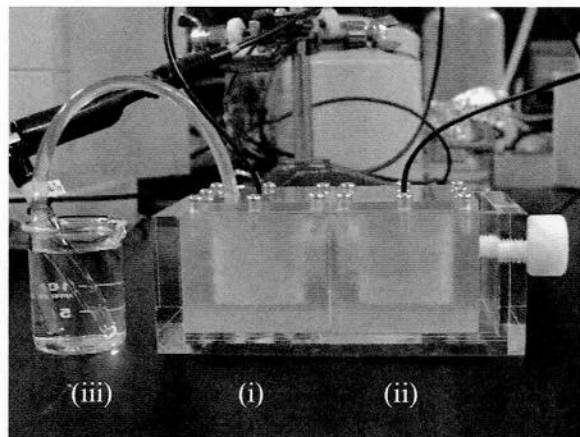


Figure 2.4 Electrochemical cell. (i) Anode, (ii) Cathode, (iii) Saturated KCl

図 2.5 は、金電極表面におけるセルロースのサイクリックボルタモグラム（電流-電位曲線）を示している。セルロースが無い、または溶解していない場合、走査電位に対する酸化電流はほとんど検出されなかった。一方、セルロースが溶解している場合、走査電位 0.09 V および 0.24 V において、二つの酸化ピークが検出された。これは、セルロースを水酸化ナトリウム溶液中に分子分散させることで、バルク中のセルロース分子鎖一本一本が、電子授受可能な電極表面近傍の電気二重層領域にたどりつくことが可能となり、金電極表面(Au-OH)上におけるセルロース分子の吸着(Au-OH-Cellulose)、電子授受(Cellulose → Oxidized cellulose + ne⁻), 電極表面からの離脱(Au-OH)といった一連の反応を含む、セルロースの電気化学的酸化反応が進行したものと考えられる。

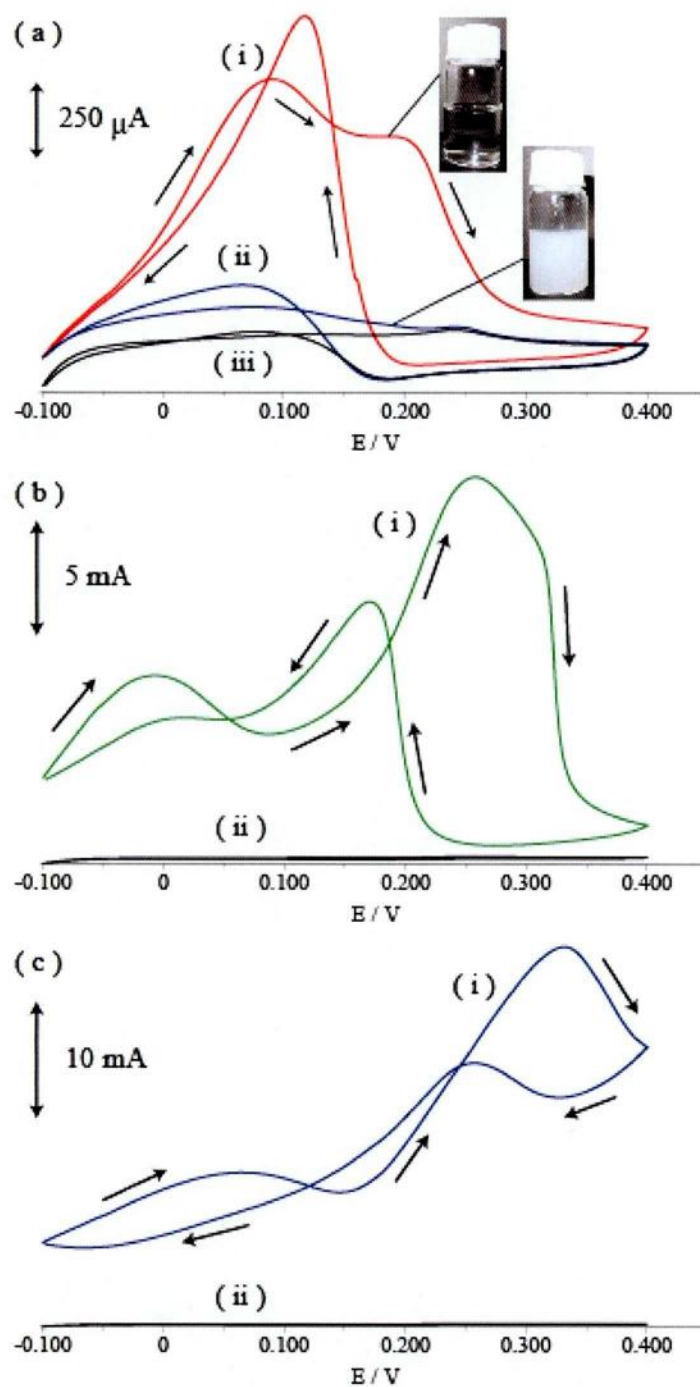


Figure 2.5 Electrochemical characterisation of 2% (w/v) cellulose and its sugar units: Cyclic voltammograms of (a) cellulose solution in 1.33 M NaOH after cold treatment (picture inset) (i), cellulose in 1.33 M NaOH before cold treatment (picture inset) (ii), and 1.33 M NaOH control (iii). (b) cellobiose in 1.33 M NaOH (i), and control (ii). (c) glucose 1.33 M NaOH (i), and control (ii). Scan rate 5 mV/s, with 40 mM phosphate buffer solution, pH 7.0 (PBS) as the supporting electrolyte.

また、セルロースが溶液中に分子分散したことにより、反応溶液内のセルロースの mol 濃度および拡散速度が増加し、次式で示されるコットレルの式に従ってセルロースの酸化電流が検出されたものと考えられる。

$$i(t) = \frac{nFAD_0^{1/2}C_0}{\pi^{1/2}t^{1/2}}$$

ここで、 $i(t)$ は電流値、 n は電子数、 F はファラデー定数、 D_0 は拡散係数、 C_0 は基質濃度、 t は走査時間を表す。

また酸化ピークが一つ以上検出されたことから、セルロースの電気化学的酸化反応は、複数の電子伝達が関与する多電子酸化反応である可能性も示唆している。ここで、セルロースの構成糖単位であるグルコースおよびセロビオース（グルコースの2量体）のサイクリックボルタモグラムと比較してみると、各糖成分には、それぞれ特有の電気化学的応答を示すことがわかる。各糖成分の酸化ピーク電位および酸化ピーク電流(I_{pa})を Table 2.1 に示す。

Table 2.1 Electrochemical parameters of sugars

	Peak potential (V)	Current (mA)
Glucose	0.32	40
Cellobiose	0.25	20
Cellulose	0.09	1

最も高い E_{pa} を示したのはセルロース (0.09 V) であり、最も低い E_{pa} を示したのはグルコース (0.32 V) であった。また、最も高い I_{ap} を示したのはグルコース (40 mA) であり、最も低い I_{ap} を示したのはセルロース (1 mA) であった。セロビオースの E_{pa} はセルロースとグルコースの E_{ap} の中間よりもグルコース側 (0.25 V)、 I_{ap} は両者のほぼ中間値 (20 mA) であった。この結果から、糖を構成するモノマー糖単位が増加するに従い、糖の電気化学的酸化反応における E_{ap} がネガティブ側にシフトし、 I_{ap} が減少する傾向が示唆された。この傾向は、電極界面におけるポリマー特有の電気化学的挙動として、意義深い知見が得られたものと思われる。得られたボルタモグラムがセルロース由来のものであることを確認するために、セルロース溶液内に含まれるグルコースを測定した。その結果、作製したセルロース溶液内には、約 0.03 mg/ml のグルコースが含まれていることがわかった。そこで、標準グルコース溶液として、同濃度のグルコース (0.03 mg/ml) を含む水酸化ナトリウム水溶液を調整し、同様のサイクリックボルタメトリーを行い、セルロースのボルタモグラムと比較することで、セルロース溶液内に含まれるグルコースの影響について調べた。図 2.6 は、金電極表面における標準グルコース溶液のボルタモグラムを示しており、グルコース特有の E_{ap} 付近に、酸化ピークが検出された。ここで、セルロースのボルタモグラムと比較してみると、走査電位に対するセルロースの酸化電流は、標準グルコースの酸化電流よりも大きく、セルロース溶液内に含まれるグルコースは、セルロースの電気化学特性に対する影響が小さいことがわかった (図 2.7)。この結果から、得られたボルタモグラムは、セルロース特有のものであると考えられる。

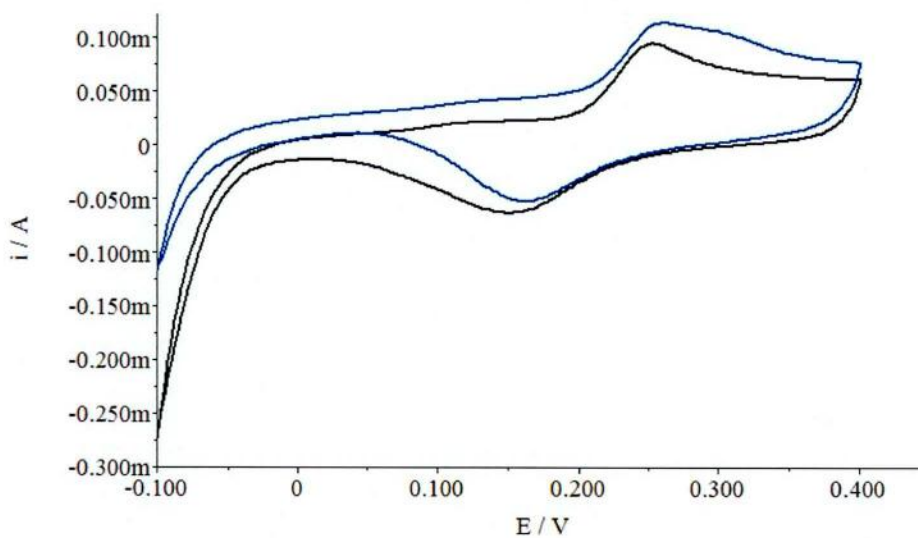


Figure 2.6 Cyclic voltammogram of standard glucose sample. (blue line: 0.03 mg/ml of glucose in 1.33 M NaOH, black line: 1.33 M NaOH)

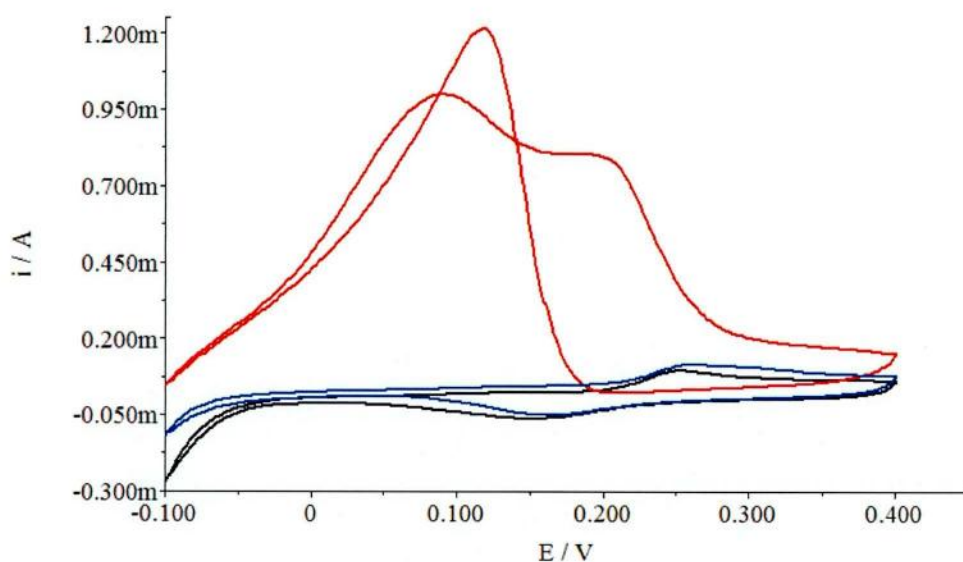


Figure 2.6 Cyclic voltammograms of cellulose and standard glucose sample. (red line: 2% (w/v) cellulose in 1.33 M NaOH, blue line: 0.03 mg/ml of glucose in 1.33 M NaOH, black line: 1.33 M NaOH)

以上の結果から、糖の酸化に対する金電極の触媒能が発現できる環境下でセルロースの分子内・分子間水素結合を崩壊させることで、電極上でセルロースを電気化学的に直接酸化できることが示された。また、グルコースやキシロース、セロビオースなど、可溶性の糖類（六単糖、五単糖、オリゴ糖など）の金属電極表面における電気化学的特性に関する報告例は多く存在するが、¹⁴ セルロースのような、水不溶性の多糖類の電極表面における電気化学的特性に関する報告はほとんどないことを考えれば、本研究で得られたセルロースのボルタモグラムは、多糖類の金属電極上における新しい電気化学的知見として、今後の新しい研究展開に寄与すると思われる。

2-4 電気化学的酸化反応によるセルロースの構造変化

セルロースの電気化学的酸化反応は、セルロース分子と電極表面における電子授受反応であるため、酸化反応前後においてセルロース分子の構造が変化していると考えられる。本項では、フーリエ変換赤外分光(FT-IR)を用いて、電気化学的な酸化反応の前後におけるセルロースの構造解析を行った。FT-IR 測定では、真空凍結乾燥処理により粉末上にした試料を用いた。図 2.7 に、溶解前後および電気化学的酸化反応前後におけるセルロースの FT-IR スペクトルを示す。溶解前のセルロースには、いくつかの特徴的な鋭い吸収ピークが観察された。セルロースの溶解後には、これらのピーク強度が変化し、特に OH 基に由来する 3300 cm^{-1} 付近のピーク強度が減少する変化が観察された。つぎに、セルロースが電気化学的に酸化されると、C=O または C-O-H の内角偏角振動に帰属する 1400 cm^{-1} 付近の吸収ピーク強度が顕著に増加した。¹⁵

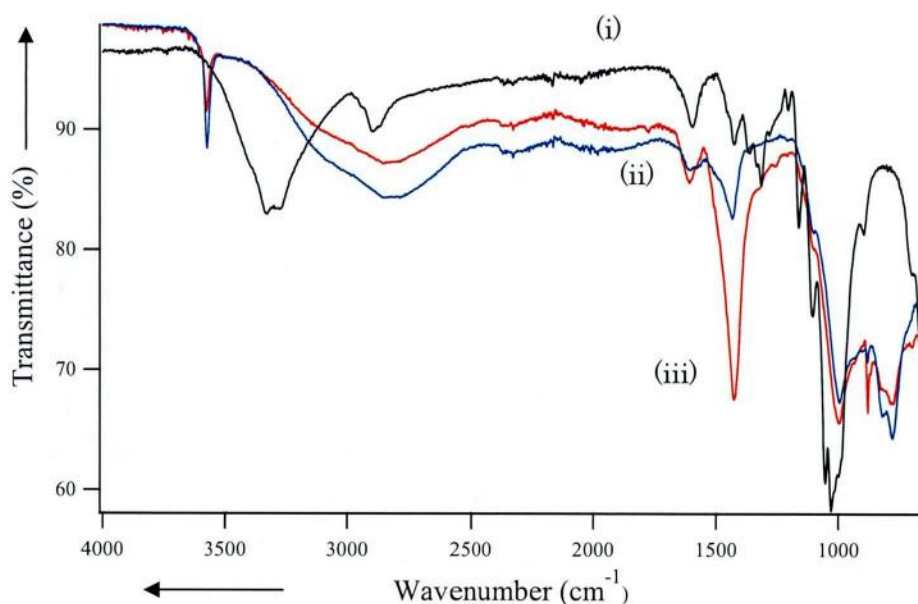


Figure 2.7 FT-IR spectra of cellulose sample. (i) cellulose before solubilization; (ii) cellulose after solubilization (before oxidation); (iii) cellulose after oxidation. IR spectra were collected from 650 to 4000 cm^{-1} . The oxidised cellulose samples were collected from cellulose after undergoing cyclic voltammetry until disappearing of the oxidation peak (4500 scan cycles).

この結果は、電気化学的に酸化されたセルロースは、分子鎖上のカルボニル基が増加したセルロース誘導体に変化した可能性を示している。興味深いことに、酸化反応前後において、セルロース溶液の粘性の増加が確認された (Table 2.2)。酸化されたセルロース誘導体が、この溶液粘性の増加に寄与している可能性が考えられる。この電気化学的に酸化されたセルロース誘導体については、3章で詳しく述べる。

Table 2.2. Viscosity of cellulose solution before and after oxidation by cyclic voltammetric analysis (CV).

Samples	H ₂ O	Cellulose solution (before oxidation)	Cellulose solution (after oxidation)
Viscosity [mPa.s]	1.3	6.53	12.9

グルコースなどの可溶性単糖類の金電極上における電気化学的酸化反応では、グルコースの還元末端であるアルデヒド基が、アルカリ環境下における金の触媒活性部位(Au-OH)により酸化され、カルボキシル基に変化するという反応機構が報告されている。セルロースはグルコースのポリマーであるため、その分子鎖に還元末端としてアルデヒドが存在しており、上述したアルカリ環境下における金電極の糖酸化に対する触媒能がセルロース分子に対して作用したとすれば、少なくとも、セルロースの還元末端であるアルデヒド基が酸化され、カルボキシル基に変化している可能性が考えられる。以上の結果から、電気化学的にセルロースを酸化させることで、少なくとも分子鎖上の還元末端が酸化され、カルボキシル基に変化したセルロース誘導体が形成された可能性が示唆された。

2-5 電気化学的酸化反応に対するセルロースの分子サイズの影響

セルロースの電気化学的酸化における反応機構に関する知見を得るため、セルロースの I_{ap} に対するセルロースの分子サイズの影響について調べた。異なるサイズのセルロース試料を調整するために、ボールミルを用いた物理的な破碎処理を行った。ボールミル処理されたセルロースの分子サイズは、動的光散乱法(DLS)によりその大きさを測定した。最終的に、DLS 測定値でおよそ 100 nm

および 500 nm を中心に分布するセルロース試料を調整することができた。この試料を用いて、セルロースのサイクリックボルタモグラムを測定し、分子サイズの違いによる I_{ap} の変化を比べた。その結果、セルロースの分子サイズが、DLS 測定値で 500 nm から 100 nm に 80 % 減少すると、セルロースの金電極表面における I_{ap} が約 13 % 増加した(図 2.8)。セルロースの分子サイズとその長さが線形的に関連しているとする、分子サイズが 80 % 減少することで、重量あたりのセルロース分子数は 5 倍に増加するはずである。さらに、それぞれのセルロース分子が還元末端を有すると仮定すると、 I_{ap} が最大 500 % 増加し得るはずである。溶液中におけるセルロース分子の拡散速度などの諸律速因子の影響を考慮しても、分子サイズの減少量に対する I_{ap} の増加量が極めて小さい。以上の結果から、セルロースの分子サイズを減少させることで、金電極表面における I_{ap} が増加することがわかった。しかし、分子サイズの減少に伴う還元末端の増加量と、得られた I_{ap} の増加量の一致が認められなかった。これは、アルカリ環境下におけるセルロースと金表面の電子授受反応が、既存のグルコースなどのモノマー分子とは異なる、ポリマー分子特有の反応機構を有している可能性が考えられる。セルロースの電気化学的酸化に関する反応機構のより詳しい考察については、第 3 章で後述する。

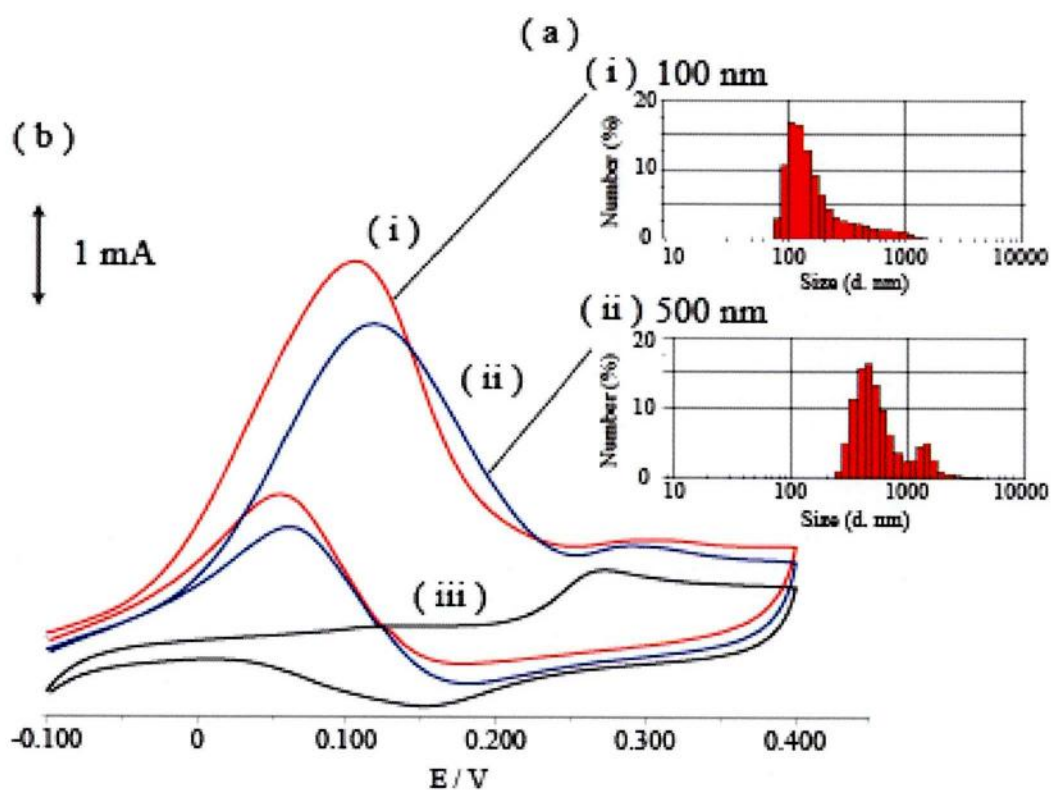


Figure 2.8 Electrochemical characterisation of cellulose samples: (a) size distribution after nano-particulation to (i) 100 nm and (ii) 500 nm. (b) cyclic voltammograms of (i) 100 nm, (ii) 500 nm and (iii) without cellulose. Scan rate 5 mV/s, with 40 mM phosphate buffer solution, pH 7.0 (PBS) as the supporting electrolyte.

2-6 セルロース燃料電池の作製・評価

2-3 項より、金電極の有する糖酸化に対する触媒能を発現できる環境下で、セルロースの分子内・分子間水素結合を切断することで、セルロースが電極表面と電気化学的に相互作用できる反応場を構築することが可能となり、セルロースが電極上で直接酸化され得ることがわかった。そこで、バイオマスの主成分であるセルロースから、糖化も発酵プロセスも介さず、直接電気エネルギーを供給することが可能な、ユニークなセルロース燃料電池の作製を試みた。図 2.9 は、実際に作製した燃料電池の構造である。セルロース燃料電池の電流-電圧曲線を、異なる抵抗 (100 Ω - 100 kΩ) を用いてデジタルマルチメーターにより測定した。セルロース燃料電池の電力密度 $P(\text{W}/\text{m}^2)$ は、以下の関係から求めた。

$$P[\text{W}/\text{m}^2] = E[\text{V}] \times I[\text{A}] / A[\text{m}^2] \quad (2-1)$$

ここで、 E は電池電圧[V]、 I は外部回路に流れた電流[A]、 A は電極表面積[m²]を示す。図 2.10 に、セルロース燃料電池の電池特性を示す。測定の結果、セルロース燃料電池の最大電流密度は 497 mA/m²、最大電力密度は 44 mW/m²であった。この値は、グルコースなどのバイオマス由来の糖成分を燃料とするバイオ燃料電池よりも低い。¹⁶ しかし、先に述べたように、既存のエネルギー変換技術では、電気エネルギーを取り出す過程（糖化および発酵プロセス）で、外部からエネルギーを投入する必要がある。さらに、既存のプロセスの組合せで成るエネルギー変換系では、各プロセスの連結箇所におけるエネルギー損失などの問題も抱えている。これらの要素を考慮すると、本研究で構築できたセルロース燃料電池系は、従来のものと比べて、燃料物質からのエネルギー変換効率が低い、新しいバイオマスからのエネルギー変換システムとして提案できるものと思われる。

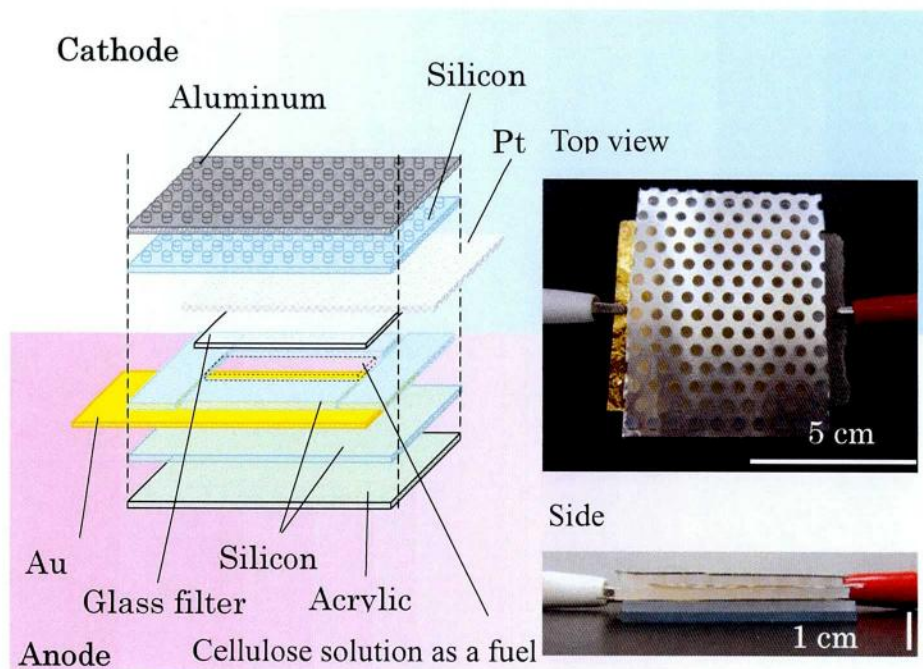


Figure 2.9 Diagram and cross-sectional picture of the cellulose fuel cell system.

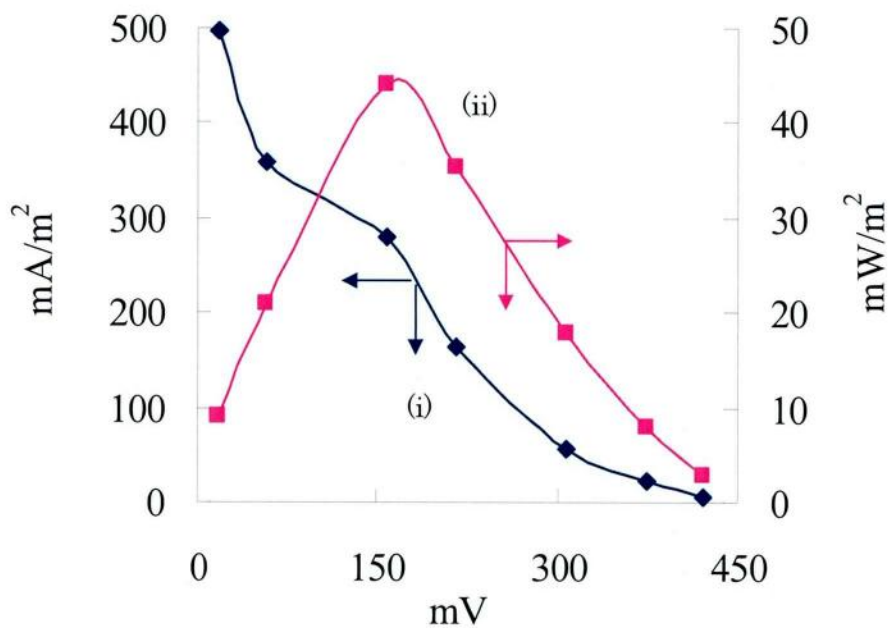
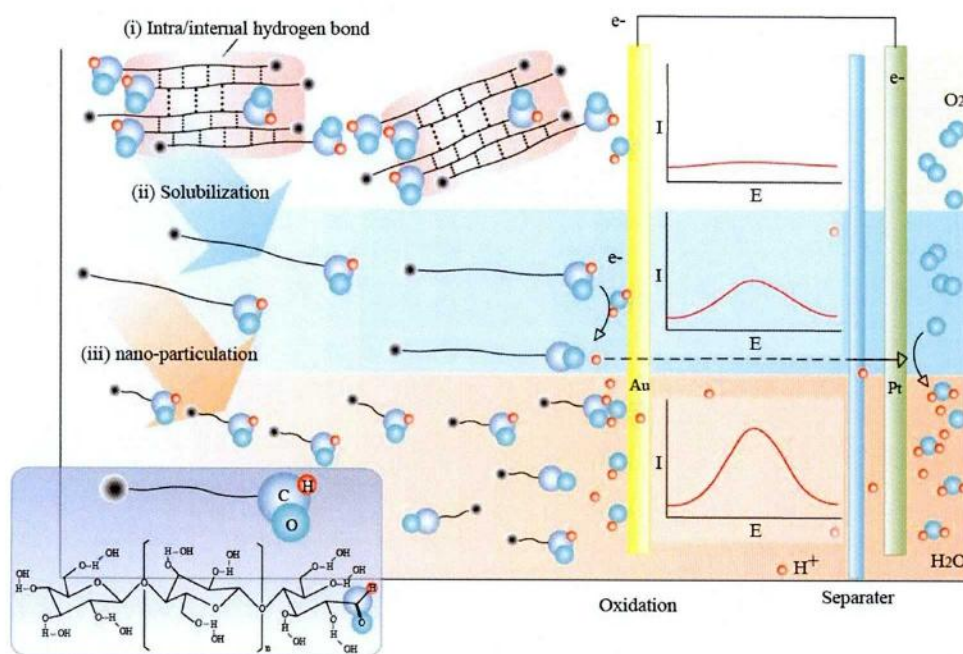


Figure 2.10 Characteristics of cellulose fuel cells. (i) current density, (ii) power density. Fuel cell parameters were measured using several values of resistance with a digital multi-meter.

2-7 まとめ

本章では、金の糖酸化に対する触媒能が発現できるアルカリ環境下で、電気化学的に不活性なセルロースの結晶構造の維持に寄与している分子内・分子間水素結合を切断することで、セルロース分子鎖一本一本が溶液中でランダムな配向性を有し、金電極と電気化学的に相互作用できる電気化学的に活性な状態を形成させ、金表面上(Au-OH)でセルロースを直接、電気化学的に酸化できることを見出した。また、水不溶性多糖類の最初の電気化学的知見として、セルロースのサイクリックボルタモグラムを得ることができた。また、電気化学的に酸化されたセルロースは、分子上のカルボキシル基が増加したセルロース誘導体に変化することがわかった。さらに、実際にセルロースを直接燃料として作動する、セルロース燃料電池の作製に成功した。これにより、バイオマスの主成分であるセルロースから、糖化も発酵プロセスも必要とせず、直接電気エネルギーに変換することが可能な、新しいバイオマスからのエネルギー変換システム系の構築に成功した。また、このエネルギー変換システム系は、エネルギー変換と物質変換が、電極上の電子授受反応を介して共役しているため、エネルギー供給と平行して、物質供給も可能であるという特徴も有している。従来のセルロースの改質技術では、エネルギーを消費して目的生成物を得ていることを考えれば、本システム系は、セルロースから電気エネルギーを取り出しながら、ポリマー系工業原料も同時に生成できるユニークなセルロースリファイナリーシステムという特徴も有している。



Scheme 1. Pathway to cellulose oxidation on a gold electrode. (i) Cellulose crystallised state; (ii) Dissolution breaks intra/internal hydrogen bonds; (iii) Nano-particulation increases the amount of reducing terminals.

参考文献

- 1 R. C. Saxena, D. K. Adhikari & H. B. Goyal, *Renew. Sust. Energ. Rev.* 2009, 13, 167-178.
- 2 E. M. Rubin, *Nature*. 2008, 454, 841-845.
- 3 S. K. Chaudhuri & D. R. Lovley, *Nat. Biotechnol.* 2003, 21, 1229-1232.
- 4 I. Willner et al., *Science* 2002, 298, 2407-2408.
- 5 J. Kim, H. Jia & P. Wang, *Biotechnol. Adv.* 2006, 24, 296-308.

- 6 F. Matsumoto, M. Harada, N. Koura & S. Uesugi. *Electrochem. Commun.* 2005, 5, 42-46.
- 7 A. Kubo, Y. Kuwahara & I. Taniguchi. *J. Electroanal. Chem.* 2006, 590, 37-46.
- 8 M. Tominaga, M. Nagashima, K. Nishiyama & I. Taniguchi, *Electrochem. Commun.* 2007, 9, 1892-1898.
- 9 C. Jin & I. Taniguchi, *Mater. Lett.* 2007, 61, 2365-2367.
- 10 A. Lue, L. Zhang & D. Ruan, *Macromol. Chem. Phys.* 2007, 208, 2359-2366.
- 11 D. Klemm, B. Heublein, H. P. Fink & A. Bohn, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 3358-3393.
- 12 J. Cai & L. Zhang, *Macromol. Biosci.* 2005, 5, 539-548.
- 13 A. Isogai, et al., *Cellulose*, 1998, 5, 309-319.
- 14 S. Takashi, et al., *Biotechnol. Bioeng.* 1979, XXI, 1031-1042.
- 15 X. Yin, A. Koschella & T. Heinze, *React. Funct. Polym.* 2009, 69, 341-346.
- 16 S. Kerzenmacher, J. Ducree, R. Zengerle & F. von Stetten, *J. Power Sources.* 2008, 182, 1-17.

第3章 電気化学的に直接酸化されたセルロース誘導体の構造解析

3-1 緒言

前章より、セルロースが電気化学的に酸化されることで、その分子鎖上におけるカルボニル基が増加したセルロース誘導体に変化することが示唆された。本章では、この電気化学的に生成された酸化セルロース誘導体の、X-ray diffraction (XRD), Fourier transmission infra red spectroscopy (FT-IR), Size exclusion chromatography (SEC)を用いた構造解析を行った。さらに、セルロースの酸化反応に関与した電子および生成した酸化セルロース誘導体の量的関係を考察し、セルロースの電気化学的酸化反応に伴う酸化セルロース誘導体への反応機構の解明を試みる。また、酸化セルロース誘導体の酵素(Cellulase)による被分解能を調べ、得られたセルロース誘導体の特性評価を行った。

3-2 セルロースの電気化学的酸化反応と反応電子数

本項では、電気化学的に酸化されたセルロース誘導体の試料作製と、その時セルロースの酸化反応に関与した電子数について述べる。図 3.1 は、電気化学セル系への電位の掃印開始時および終了時における、セルロースのボルタモグラム、およびこの時セルロースの酸化反応に関与した電気量(クーロン[C])を、電位の掃印回数に対してプロットしたものを示す。この図から、セルロースから金電極表面への電子授受数は、電位の掃印回数の増加にしたがい、指数関数的に減少していることが分かる。これは、セルロースと金電極表面における電子伝達速度に、セルロースの電極表面への拡散速度が追いついていない可能性が

考えられる。この結果を基に、本実験においてセルロースの酸化反応に関与した総電気量 (3.75 C) を求め、セルロースの電気化学的酸化に関する反応機構の考察に用いた (3-4 参照)。

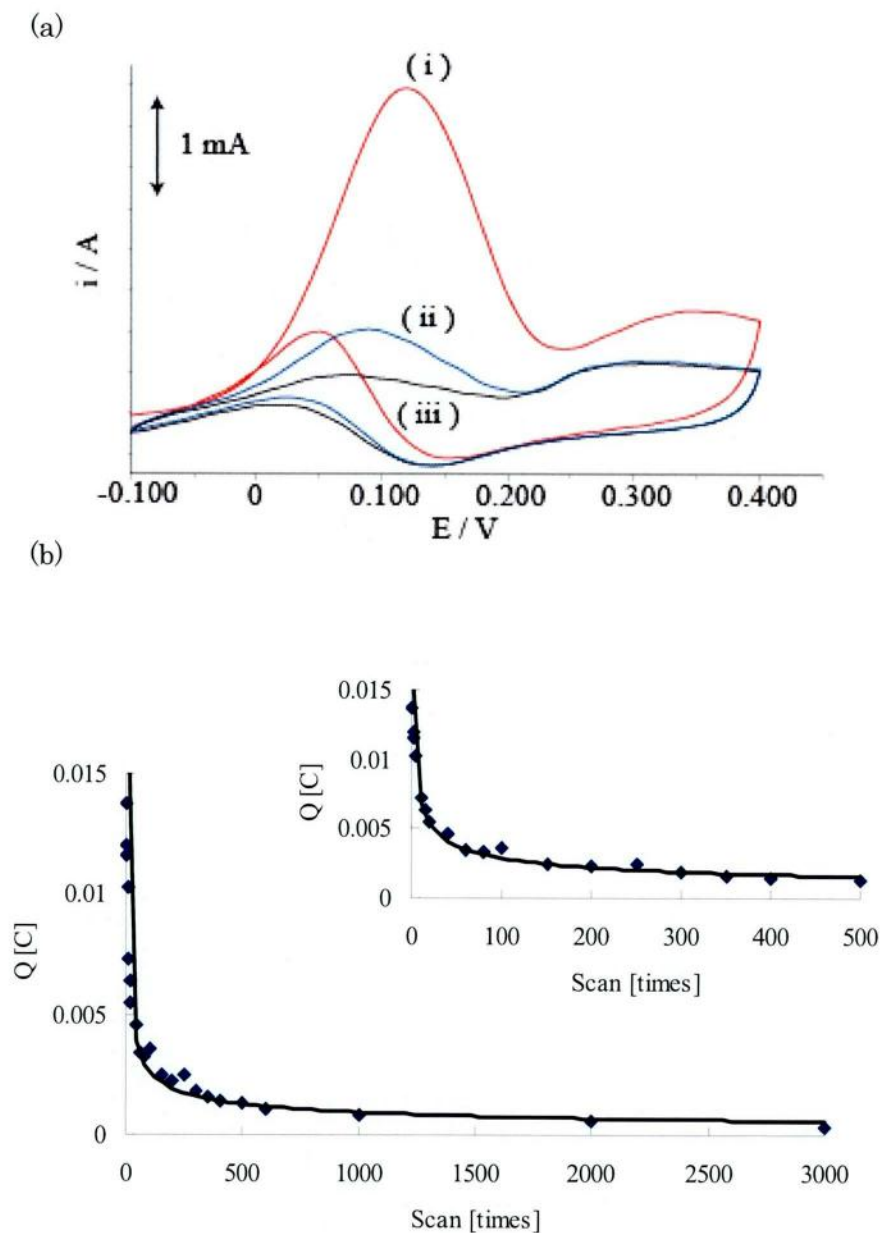


Figure 3.1 The electrochemical oxidation of cellulose. (a) Cyclic voltammogram of cellulose using Au electrode under the alkaline condition. (i) Initial cycle (1 scan), (ii) Middle cycle (500 scans), (iii) Final cycle (3,000 scans). Scan range: -0.1 V to 0.4 V, Scan rate: 50 mV/s (respect to Ag/AgCl). (b) The coulomb value during cellulose oxidation. (Inset: coulomb value during 0 ~ 500 scans of CV.)

3-3 電気化学的に酸化されたセルロース誘導体の構造解析

3-3-1 酸化セルロース誘導体の特性変化

電気化学的に酸化されたセルロースは、分子上のカルボニル基が増加したセルロース誘導体に変化することは、既に 2 章で示された。ここでは、カルボニル基の増加による、酸化セルロース誘導体の特性変化について述べる。3-2 項で作製した酸化セルロース誘導体含有水酸化ナトリウム水溶液に、塩酸を徐々に加えて pH を中性(7.0)に調整した。その結果、溶液中に分子分散していたセルロースの析出が観察された（再生セルロース）。先に述べたが、セルロースが水酸化ナトリウム水溶液に溶解（分子分散）している時、OH⁻イオン(NaOH 由来)がセルロース分子上の OH 基と相互作用しており、¹⁻³ セルロース分子上の OH 基同士による分子内・分子間相互作用が弱まっている状態が形成されていると考えられる（図 3.2）。

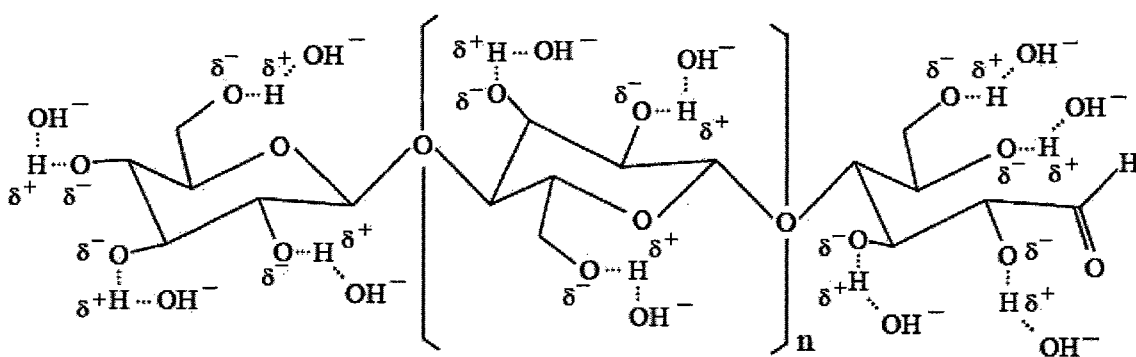


Figure 3.2 Chemical structure of cellulose after dissolution.

その結果、セルロース分子鎖一本一本が溶液中に分散することが可能となり、無色透明なセルロース溶液を得ることができる。ここで塩酸を滴下すると、中和効果によりセルロース分子と相互作用していた OH⁻が取り除かれ、セルロース分子の OH 基由来の分子内・分子間水素結合が再び形成される。その結果、結晶性のセルロース（再生セルロース）が析出し、溶液が白濁したものと思われる。この中和溶液を、遠心分離(12,000 rpm, 15 min)により上清と沈殿成分に分け、凍結乾燥処理して粉末状試料を調整した。この電気化学的酸化および中和処理したセルロース溶液の上清および沈殿成分の粉末試料の構造特性を、FT-IR を用いて解析した。

興味深いことに、カルボニル基に帰属する吸収ピークの増加は、上清試料の FT-IR スペクトルに現れ、沈殿試料のスペクトルには現れなかった（図 3.3）。この結果から、電気化学的に酸化されたカルボニル基リッチなセルロース誘導体は、親水性のカルボニル基の増加に伴う水との親和性が増加した、水可溶性のセルロース誘導体に変化した可能性が示唆された。また、沈殿試料の FT-IR スペクトルは、酸化される前の元の結晶性セルロースのスペクトルに似ていることから、沈殿成分は再生セルロースであると考えられる。^{4,6}

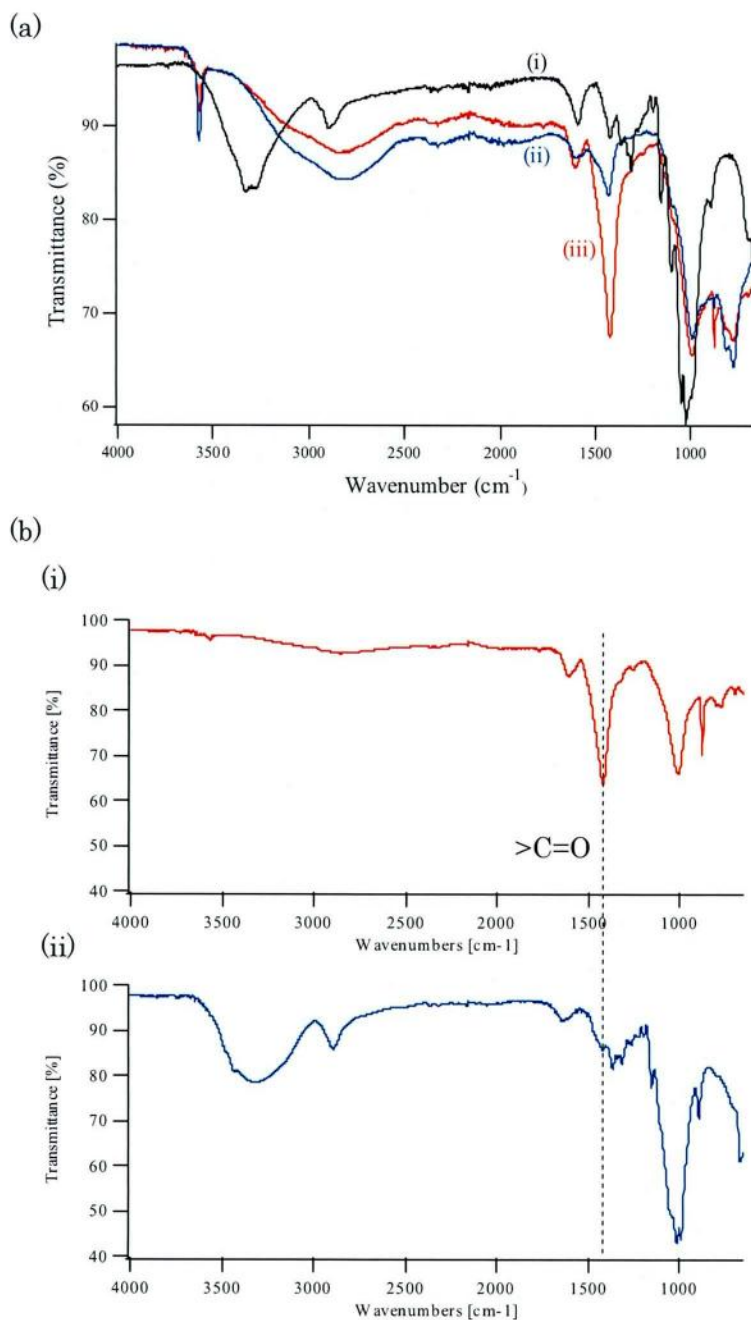


Figure 3.3 FT-IR analysis of cellulose samples. (a) FT-IR spectra of cellulose samples (i) cellulose (before dissolution), (ii) cellulose (after dissolution, before electrochemical oxidation), (iii) cellulose (after electrochemical oxidation). (b) FT-IR spectra of water soluble and insoluble parts in cellulose after electrochemical oxidation. (i) supernatant (soluble part), (ii) pellet (insoluble part). Resolution: 4 cm⁻¹. Range: 650 to 4000 cm⁻¹.

3-3-2 酸化セルロース誘導体の構造変化

前項では、金表面におけるセルロースの電気化学的酸化反応により、水不溶性のセルロースが、水可溶性の酸化セルロース誘導体に変化した可能性が示された。本項では、電気化学的な酸化反応がセルロースの構造に与える影響をより詳しく理解するために、XRD および FT-IR を用いて、セルロースの酸化反応の前後におけるセルロース溶液の水可溶成分および水不溶成分の構造解析を行った。その際、3-3-1 項で作製した酸化セルロース含有水酸化ナトリウム水溶液を元に、図 3.4 に示した試料調整を行い、本構造解析用の試料とした。

構造解析の前に、ここで調整した試料を用い、セルロース溶液の水可溶成分および水不溶成分の重量を測定した。その結果、電気化学的酸化反応の前後において、セルロース溶液の水可溶/不溶成分比に変化があることが分かった（図 3.5）。興味深いことに、3000 回の電位走査を伴う電気化学的酸化反応の後、6.4%(8.2×10^{-3} [g])のセルロース溶液内の水可溶成分が増加し、水不溶成分比は減少していた。この結果は、セルロースの電気化学的酸化により、セルロース溶液内の水不溶成分が、水可溶性成分に変化した可能性を示し、3-3-1 項で示唆された電気化学的酸化による水可溶性セルロース誘導体の存在を支持している。

ここで、電気化学的酸化前のセルロース溶液において、微量(2 %程度)の水可溶成分の存在が示唆されているが、これは透析処理による水酸化ナトリウム成分を完全に(100 %)取り除くことができず、水酸化ナトリウム由来の OH⁻がセルロースの OH 基に作用している分子分散状態のセルロース($\text{Cellulose-O}^{\delta-}\text{H}^{\delta+}\cdot\text{OH}^-$)に起因するものであると考えられる。また、酸化反応後のセルロース溶液の量が酸化前に比べて減少しているが、これは透析・遠心分離・凍結乾燥を含む試料作製の全過程における、人為的操作に起因する試料回収率の低下に由来する

ものであると考えられる。

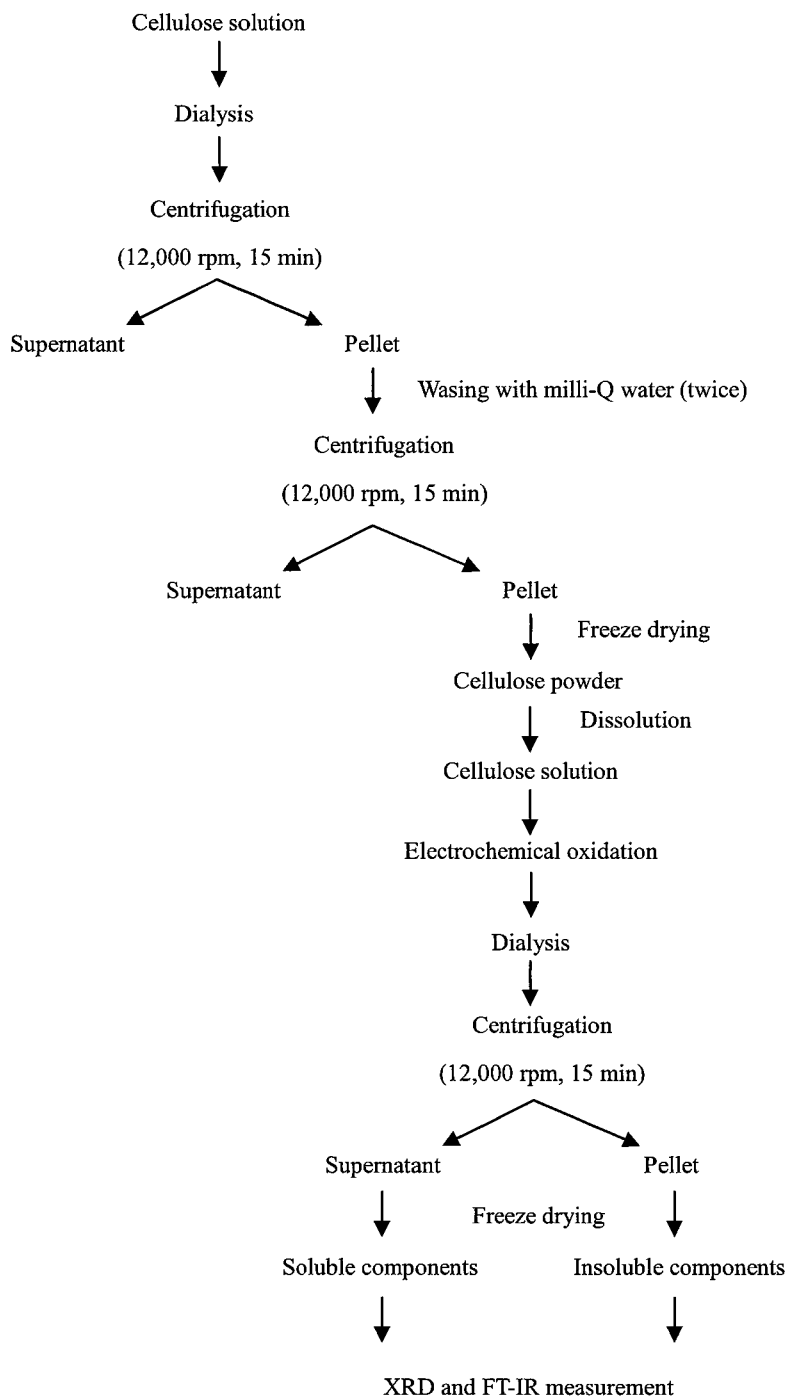


Figure 3.4. Sample preparation for structure analysis

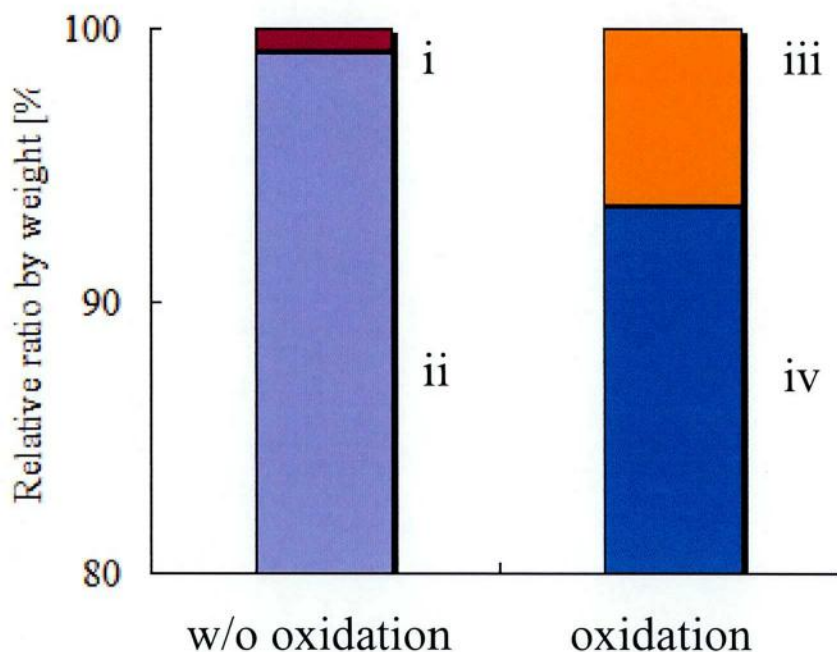


Figure 3.5 Mass balance of supernatant and pellet components as a dry weight in cellulose solution before and after electrochemical oxidation. The total mass includes the supernatant and pellet parts in cellulose solution after dissolution process was defined as 100 % of volume. Each sample was measured by balancer after freeze drying treatment. (i: supernatant before oxidation, ii: pellet before oxidation, iii: supernatant after oxidation, iv: pellet after oxidation)

さらに詳しく電気化学的酸化反応に伴うセルロースの水可溶成分および水不溶成分の構造変化を調べるために、酸化反応前後における各セルロース試料の構造解析を行った。図 3.6 に、電気化学的酸化反応の前後における、セルロース溶液の水可溶成分の XRD および FT-IR スペクトルを示す。XRD スペクトルから、電気化学的酸化反応の前後において、セルロースの結晶性に大きな変化は検出されず、セルロースの溶解以降、その構造はアモルファスに近い状態にあることがわかった。^{13,14} また、FT-IR スペクトルでは、酸化反応の前後において、カルボニル基に帰属する吸収ピーク(1400 cm⁻¹)の強度が顕著に変化しており、セルロースの酸化により、その分子上のカルボニル基が増加した化学構造に変化

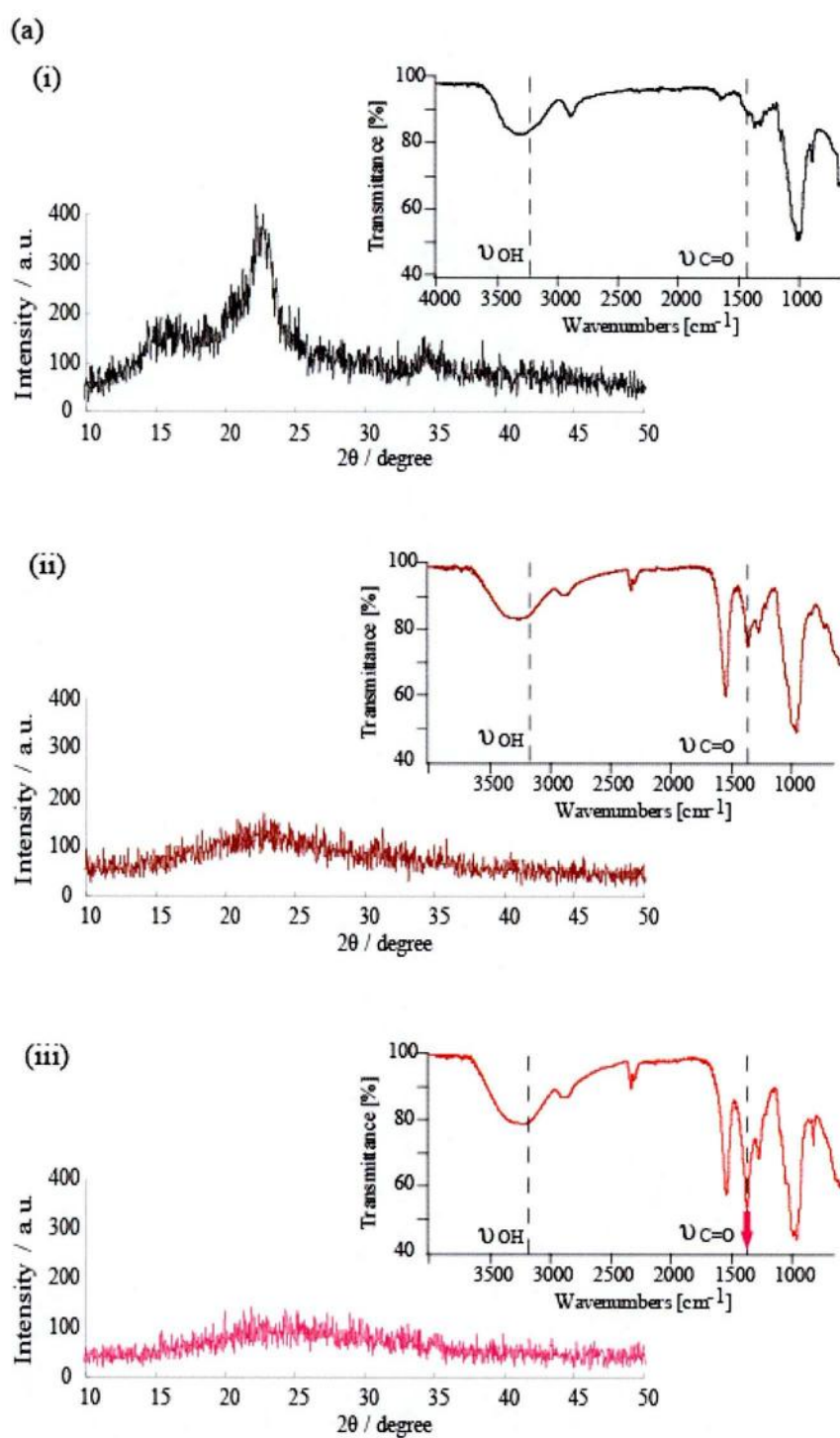


Figure 3.6 Structural analysis of water soluble and insoluble parts in cellulose samples before and after electrochemical oxidation. (a) XRD spectra of water soluble part in cellulose samples. (In-set shows FT-IR spectra.) (i) before dissolution), (ii) after dissolution, (before electrochemical oxidation), (iii) after electrochemical oxidation.

したことが改めて示された。⁷⁻⁹ これらの結果は、セルロース分子鎖上の OH 基が酸化されて親水性のカルボニル基に変化し、セルロース分子の OH 基由来の分子内および分子間水素結合ネットワークの形成を妨げ、水可溶性のセルロース誘導体が形成されている可能性を示唆している。¹⁰⁻¹² 一方、電気化学的酸化反応の前後におけるセルロース溶液の水不溶成分の XRD および FT-IR スペクトルでは、水可溶成分とは異なる構造変化が観察された (図 3.7)。XRD を用いた測定結果から、結晶性セルロースを、水酸化ナトリウムを用いて水中で分子分散可能な状態 ($\text{Cellulose-O}^{\delta-}\text{H}^{\delta+}\cdot\text{OH}$) にした後、透析により水酸化ナトリウム由来の OH⁻ を取り除いて再び結晶化させた再生セルロースは、特に $2\theta = 23^\circ$ におけるピーク強度が低下していることが示され、もとのセルロースとは異なる結晶構造を有していることがわかった。このときの FT-IR スペクトルに顕著な変化はなく、各吸収ピーク強度が低下するという現象が確認された。さらに、電気化学的酸化反応の後、透析処理により結晶化させた再生セルロースの XRD 測定では、 $2\theta = 23^\circ$ におけるピーク強度がさらに低下し、他に $2\theta = 20^\circ$ におけるピーク強度も顕著に低下していることを示す結果が得られた。この結果は、電気化学的酸化処理後の再生セルロースは、もとのセルロースおよび電気化学処理前の再生セルロースとも異なる、より低結晶性の構造を有していることを示している。この低結晶性の再生セルロースは、セルロースの電気化学的酸化によりその分子鎖上の OH 基がカルボニル基に変化したか、セルロースの分子内・分子間水素結合の形成を完全に阻害できる程度にまで酸化されていない不完全酸化セルロース誘導体が再結晶化したものであると考えられる。セルロースの酸化反応がさらに進行すれば、分子内・分子内相互作用を阻害するに足るカルボニル基を有する、水溶性の酸化セルロース誘導体が形成されるものと推察される。これまで、セルロースの溶解処理が、再生セルロースの構造に与える影響について研

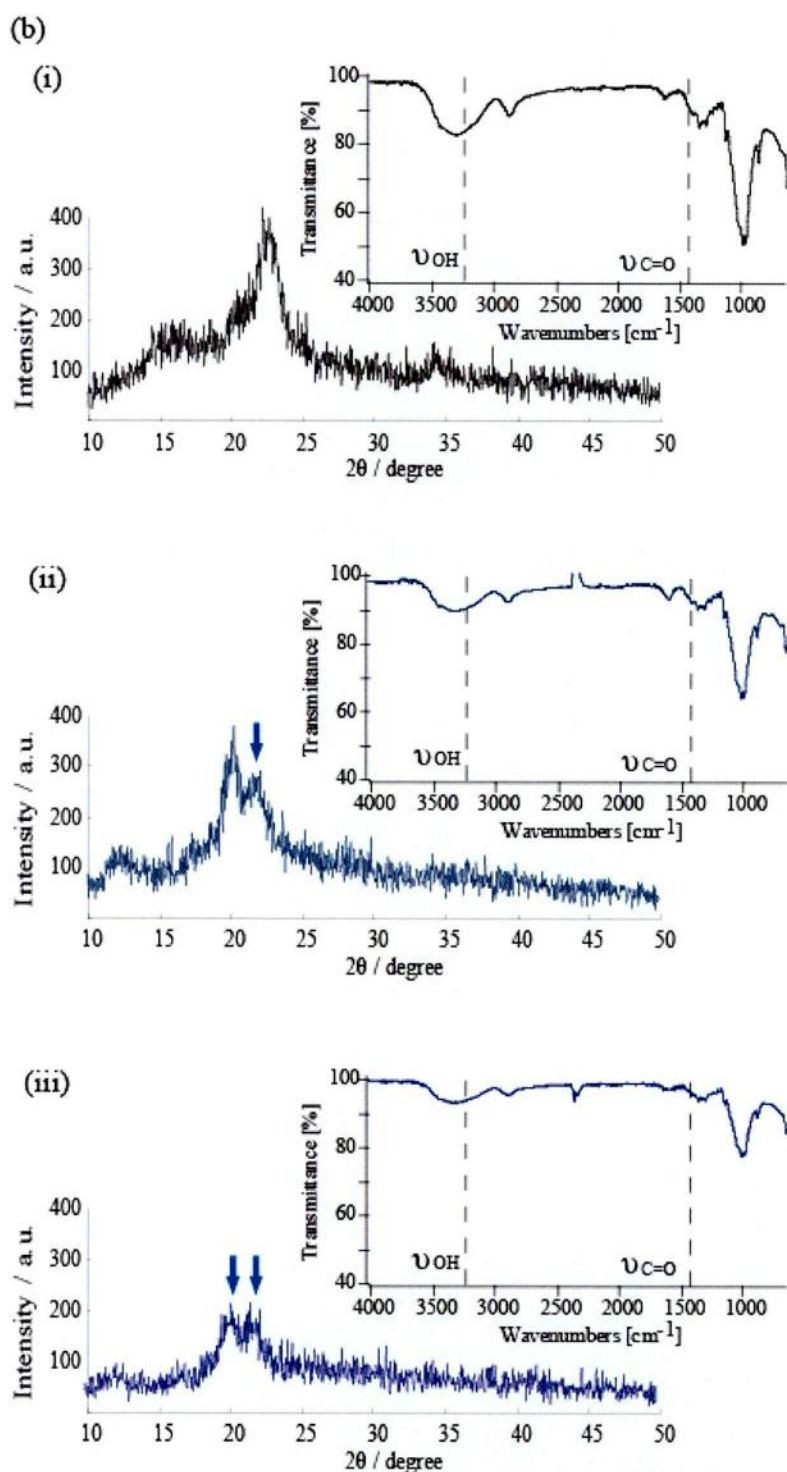


Figure 3.7 XRD spectra of water insoluble part in cellulose samples. (In-set shows FT-IR spectra.) (i) before dissolution, (ii) after dissolution, before electrochemical oxidation, (iii) after electrochemical oxidation. Experimental parameters in XRD are following. Cu $K\alpha$ radiation at 40 kV and 30 mA with a scan range of 0.04° . The diffraction angle range: 16 to 30° .

究した報告例は存在するが、セルロースの電気化学的酸化処理が、再生セルロースの構造に与える影響に関する報告はほとんどない。¹⁵⁻¹⁷ 以上の構造解析結果から、セルロースの電気化学的酸化反応により、もとの水不溶性のセルロースが、カルボニル基の増加した分子構造に変化し、次第に分子内・分子間の水素結合相互作用が弱まり、最終的にその結晶性が低下したアモルファス状の水可溶性酸化セルロース誘導体に変化したことが示唆された。

3-3-3 酸化セルロース誘導体の分子量分布

水可溶性の酸化セルロース誘導体に関するより詳しい情報を得るために、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)を用いた、酸化セルロース誘導体の分子量分布を測定した。SECでは、Shodex製のカラム OH pack SB805HQを用いた。図3.8に、再生セルロース (in-set) および酸化セルロース誘導体のクロマトグラムを示す。

電気化学的酸化反応前の再生セルロースのクロマトグラムでは、一つのピークが検出されたのに対し、電気化学的酸化反応後の酸化セルロース誘導体のクロマトグラムでは、複数のピークが検出された。この結果は、金表面におけるセルロースの電気化学的酸化反応により、一種類のセルロースから複数の酸化セルロース誘導体が生成したことを示唆している。SECでは、分子サイズに起因する保持時間の違いを利用して、分子サイズの大きい分子から検出される。しかし、本実験結果は分子サイズの違いによる影響ではなく、酸化セルロース誘導体の分子上に存在するカルボニル基および水酸基の割合の変化と、SECカラム内充填材の表面官能基との化学的相互作用の違いに起因するものと考えられる。

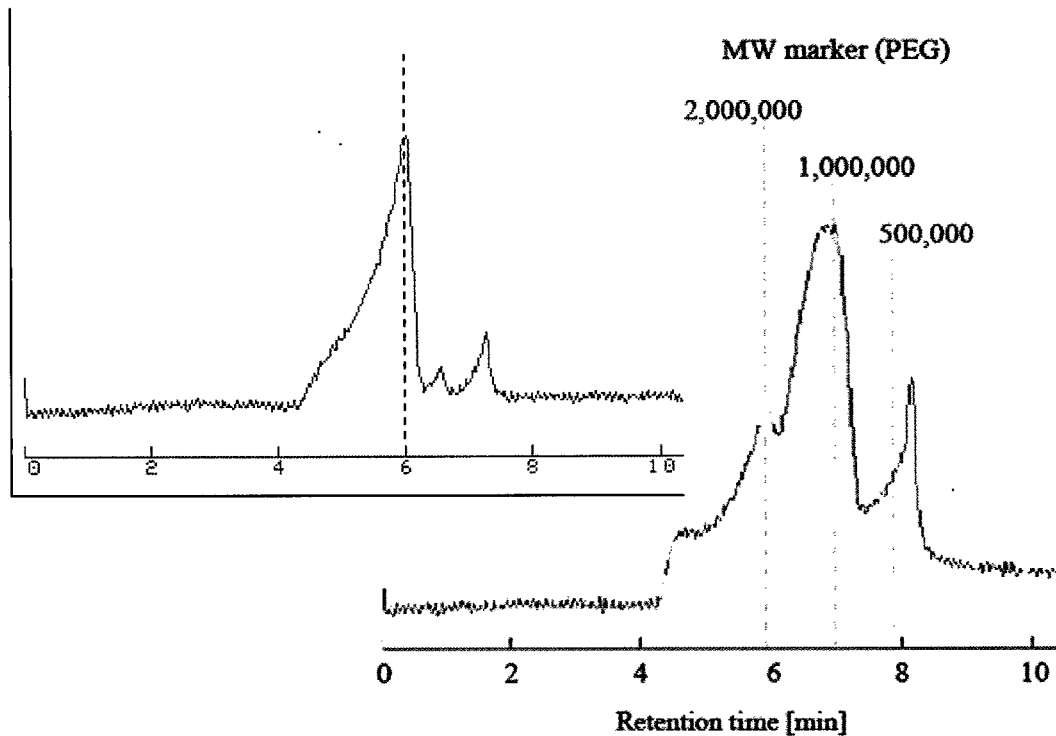


Figure 3.8 SEC spectrum of water soluble oxidized cellulose derivatives. Flow rate: 1.0 ml/min, Injection volume: 30 μ l, sample concentration: 1.0 mg/ml (w/v), mobile phase: milli-Q water, column temp: 25 $^{\circ}$ C. Some polyethyleneglycol (PEG) were used as a MW marker. (Inset figure is SEC spectrum of original cellulose before oxidation.)

先に示したカルボニル基に帰属する 1400 cm^{-1} における吸収ピーク強度の増加は、酸化反応の程度の異なる複数の酸化セルロース誘導体の平均として検出されたものであると考えられる。また、仮にクロマトグラムの保持時間の違いが分子サイズの違いに起因する場合、金表面上においてセルロースの水酸基が酸化され、カルボニル基に変化する反応以外に、セルロース分子鎖の切断に関わる反応も起こっていることを示唆する。これまでに、セルロースが水酸化ナトリウ

ム水溶液中に分子分散できる状態($\text{Cellulose-O}^\delta\text{-H}^\delta\text{+}\cdot\text{OH}^-$)にあるとき、セルロース分子の C1 位および C4 位は高磁場側（低 ppm 側）にシフトし、その他の C2、C3、C5、C6 位は低磁場側（高 ppm 側）にシフトするという $^{13}\text{C-NMR}$ を用いた実験結果が報告されている。溶液 NMR における化学シフトの変化は、主に電子密度の変化に対応しているため、このときのセルロース分子は、C2、C3、C5、C6 の電子密度が減少し、C1 および C4 の電子密度が増加していることを意味している。セルロース分子が切断される場合、その構成糖単位（グルコース）同士の C1 および C4 位による化学結合で形成される β -1,4-グリコシド結合が切断されることと同義である。このセルロース分子のグリコシド結合に関わる C1 および C4 位炭素の電子密度の偏りが、金表面における電気化学的反応による電子授受反応を介して、セルロース分子の分解反応に寄与しているとすれば、非常に興味深い研究が展開されるものと考えられる。

3-4 セルロースの電気化学的酸化反応機構に関する考察

セルロースの電気化学的酸化反応の反応機構を明らかにするために、金表面におけるセルロースの酸化反応に関与した電子と、生成した酸化セルロース誘導体の量的関係を調べた。これまでに、セルロースの構成糖単位であるグルコースが、アルカリ環境下における金属電極上(ex. Au-OH)で電気化学的に酸化される反応は、グルコースの還元末端であるアルデヒド基が、電極上でカルボキシル基に変化する 2 電子反応であることが解明されている。^{18, 19} ファラデーの電気分解の法則から、反応電子数と反応生成物との関係は、以下のように表される。

$$m = \left(\frac{Q}{F}\right)\left(\frac{M}{z}\right) \quad (3.1)$$

ここで、 m は反応生成物の量[g]、 Q は反応に関与した電子数[C]、 F はファラデー一定数($96,500 \text{ C mol}^{-1}$)、 M は反応物質の分子量[g mol^{-1}]、 z は反応電子数を表す。グルコースの電気化学的酸化反応と同様に、そのポリマーであるセルロースの電気化学的酸化反応が 2 電子反応($z = 2$)であるとする、反応生成物である酸化セルロース誘導体は、ファラデーの電気分解の法則から約 9.7 g 生成されることになる。しかし、実際に生成した酸化セルロース誘導体の重量は $8.2 \times 10^{-3} \text{ g}$ (3-3-2 参照)であり、理論値と実測値に大きな差異がある。この結果は、セルロースの電気化学的酸化反応では、2 電子以上の電子授受反応が関与していることを示唆している。これまでの酸化セルロース誘導体の構造解析結果と併せて考察すると、アルカリ環境下における金電極上の電気化学的なセルロースの酸化反応機構は、セルロース分子鎖の還元末端であるアルデヒド基からカルボキシル基への 2 電子反応、およびセルロース分子鎖上の複数の水酸基からカルボニル基への 1 電子反応を有する、多電子酸化反応である可能性が考えられる。実際、高分子ポリマーであるセルロースの還元末端が酸化され、親水性のカルボキシル基に変化しただけで、分子全体の水との親和性が増加した水溶性物質に変化したとは考えにくい。そこで、セルロースの電気化学的酸化反応により、どの程度の水酸基がカルボニル基に変化したかを、ファラデーの電気分解の法則および実測値($m: 8.2 \times 10^{-3} \text{ [g]}$ (3-3-2 参照), $Q: 3.75 \text{ [C]}$ (3-2 参照), $M: 5.0 \times 10^5 \text{ [g mol}^{-1}]$ (3-3-3 参照))から見積もった。その結果、本実験におけるセルロースの電気化学的酸化反応において、少なくとも約 2370 電子が酸化反応に関与していることが示された。これは、一分子のセルロース鎖上に存在する水酸基の約 28.4 %がカルボニル基に変化したことを示唆している。この試算結果から、一分子のセルロースが水に溶解(分子分散)可能となるのに必要なカルボニル基の割合を推察することができた。以上の結果から、アルカリ環境下における金表面上のセ

ルロースの電気化学的酸化反応は、その還元末端（アルデヒド基）がカルボキシル基に変化する 2 電子反応および、分子鎖上の水酸基がカルボニル基に変化する複数の 1 電子反応を伴う、多電子酸化反応である可能性が示された。

3-5 酸化セルロース誘導体の被分解能の評価

セルロースが水可溶性の酸化セルロース誘導体となることで、もとのセルロースとどのような特性変化があるのかを調べた。本項では、セルロースの特性の一つとして、酵素による被分解能について述べる。セルロース誘導体の被分解能は、*Treesei* 由来のセルラーゼ(2 mg/ml)と各種セルロースサンプル(10 mg/ml)を、50 mM のクエン酸緩衝液中(pH: 4.8)にて 50°C で反応させ、生成したグルコース濃度を、酵素法を用いて測定し、元の結晶性セルロースと比較することで評価した。図 3.9 は、酵素による基質の分解反応時間に対する、分解生成物（グルコース）濃度を示している。この結果から、酸化セルロース誘導体の被糖化速度は、もとのセルロースおよび再生セルロースよりも高いことがわかる。特に、酵素反応初期における基質の分解速度に大きな差異がみられる。これは、セルロースおよび再生セルロースは水不溶性であり、酸化セルロース誘導体は水可溶性であるため、基質と酵素の接触確率が異なることに起因しているものと考えられる。図 3.10 は、各基質の酵素による被糖化率を示している。その結果、酸化セルロース誘導体の被糖化能は、もとのセルロースおよび再生セルロースよりも約 3 倍高いことが示された。また、この酸化セルロース誘導体の被分解能は、CMC の分解能に匹敵することがわかった。これらの結果から、水不溶性セルロースを電気化学的に酸化して得られた水可溶性酸化セルロース誘導体は、酵素によってより分解しやすい物質特性を有していることがわかった。

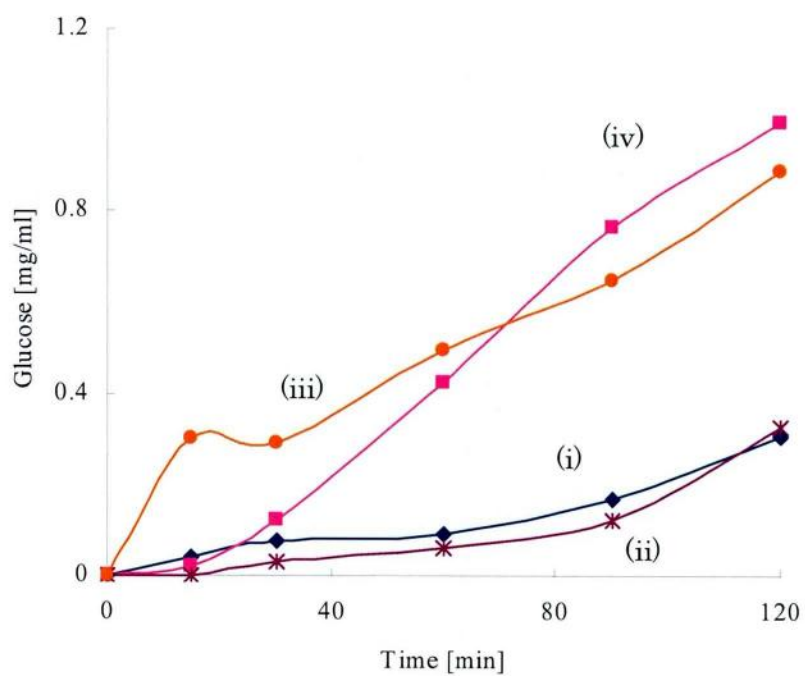


Figure 3.9 Glucose yield against the enzymatic reaction time. (i) cellulose (original), (ii) insoluble part of cellulose after electrochemical oxidation, (iii) soluble part of cellulose after electrochemical oxidation, (iv) carboxymethyl cellulose (CMC).

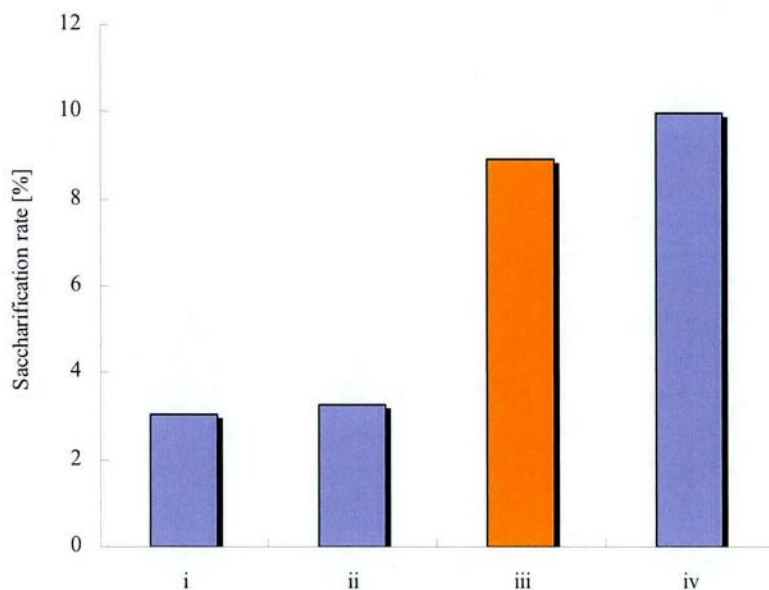


Figure 3.10 Enzymatic saccharification rate of cellulose sample. (i) cellulose (original), (ii) insoluble part of cellulose (after oxidation), (iii) soluble part of cellulose (after oxidation), (iv) CMC.

3-6 まとめ

水不溶性のセルロースを電気化学的に直接酸化させることにより、分子鎖上におけるカルボニル基が増加した、水溶性のセルロース誘導体が生成することが示された。この水溶性のセルロース誘導体は、元のセルロースに比べて、酵素による被糖化能が高いという特徴を有することもわかった。また、一つの電気化学的反応場で得られるセルロース誘導体は一種類ではなく、複数種存在する可能性が示唆された。さらに、セルロースの電気化学的酸化反応のメカニズムに関する研究結果も得られ、セルロース分子鎖の還元末端(COH 基)だけでなく、分子鎖上の複数の OH 基が酸化される多電子反応である可能性が示唆さ

れ、グルコースなど、他の燃料物質の酸化反応が2電子反応であることを考えれば、セルロースが燃料として非常に高いポテンシャルを有していることがわかった。電気化学的なセルロースの酸化反応に関する反応機構の解明は、セルロースからのエネルギー変換効率の向上だけでなく、選択的に、特定のセルロース誘導体を生成あるいはデザインすることが可能な制御系の構築にも大きく寄与することが期待される。

本研究成果により、従来のセルロースなどの難溶性ポリマーの改質技術分野に、電気化学的手法を導入できることが示され、電極電位やその材質、界面状態など、各種電気化学的パラメータが加わり、従来の化学的改質では制御の難しかった領域に応用・展開できる可能性が考えられる。これにより、新たな機能性新素材や、ナノ材料などを選択的に生成できることも期待される。

参考文献

- 1 M. R. Edward, *Nature*. 2008, 454, 841-845.
- 2 M. F. Demirbas, *Appl. Energ.* 2009, 86, 5151-5161.
- 3 N. Mosier, C. Wyman, B. Dale, R. Elander, Y. Y. Lee, M. Holtzapple & M. Ladisch, *Bioresource. Technol.* 2005, 96, 673-686.
- 4 R. W. Kessler, U. Becher, R. Kohler & B. Goth, *Biomass. Bioenerg.* 1998, 14, 3, 237-249.
- 5 R. C. Saxena, D. K. Adhikari & H. B. Goyal, *Renew. Sust. Energ. Rev.* 2009, 13, 167-178.
- 6 S. K. Chaudhuri, D. R. Lovley, *Nat. Biotechnol.* 2003, 21, 1229-1232.
- 7 T. Heinze & T. Liebert, *Prog. Polym. Sci.* 2001, 26, 1689-1762.
- 8 S. J. Eichhorn, C. A. Bailline, N. Zafeiropoulos, L. Y. Mwaikambo, M. P. Ansell, A.

- Dufresne, K. M. Entwistle, P. J. Herrera-Franco, G. C. Escamilla, L. Groom, M. Hughes, C. Hill, T. G. Rials & P. M. Wild, *J. Mater. Sci.* 2001, 36, 2107-2131.
- 9 A. Samir, F. Alloin & A. Dufresne, *Biomacromolecules*. 2005, 6, 612-626.
- 10 K. Dieter, H. Brigitte, P. F. Hans & B. Andreas, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 3358-3393.
- 11 C. D. Blasi, E. G. Hernandez & A. Santoro, *Ind. Eng. Chem. Res.* 2000, 39, 873-882.
- 12 X. Yin, A. Koschella & T. Heinze, *React. Funct. Polym.* 2009, 69, 341-346.
- 13 T. Sasaki, T. Tanaka, N. Nanbu, Y. Sato & K. Kainuma, *Biotechnol. Bioeng.* 1979, XXI, 1031-1042.
- 14 S. Y. Oh, D. I. Yoo, Y. Shin, H. C. Kim, H. Y. Kim, Y. S. Chung, W. H.P ark & J. H. Youl, *Carbohydr. Res.* 2005, 340, 2376-2391.
- 15 A. Isogai & R. H. Atalla, *Cellulose*. 1998, 5, 309-319.
- 16 J. Cai, L. Zhang, *Macromol. Biosci.* 2005, 5, 539-548.
- 17 A. Lue, L. Zhang & D. Ruan, *Macromol. Chem. Phys.* 2007, 208, 2359-2366.
- 18 I. Becerik, *Turk. J. Chem.* 1999.23, 57-66.
- 19 S. B. Aoun, Z. Dursun, T. Koga, G. S. Bang, T. Sotomura & I. Taniguchi, 2004. *J. Electroanal. Chem.* 567, 175-183.

第4章 セルロース分解のための生体構造模倣型人工触媒系の創生

4-1 緒言

2章および3章から、本研究で提案したセルロースからの直接エネルギー変換システムは、糖化および発酵プロセスを必要とせず、セルロースから直接電気エネルギーおよび機能性ポリマーを同時に生成可能な、新しいバイオマスからのエネルギー・物質変換システム系の実現可能性を示した。しかし、エネルギー供給という観点から見た場合、セルロースから得られる電力が低いという問題点がある。セルロース燃料電池の電力密度の向上は、地球上に広域に分布しているバイオマスを on-site で利用できる可能性を秘めた、次世代のエネルギー供給システムの構築に貢献することが期待される。

セルロース燃料電池の電力密度を決定する重要な要素としては、主に電極間電位差、電流密度、反応物質 1 分子当りの電子授受数などが考えられる。電極電位および電流密度の向上に向けた研究は、燃料電池分野をはじめとした多くの領域で取り組まれており、反応物質に適した電極材料を使用することや、電極表面をナノ構造化し、糖酸化に対する新たな触媒能を発現させることにより、電極間電位差の増加や、有効反応表面積の増加に伴う見かけの電流密度の向上が見込まれる。

また、燃料物質 1 分子当りから得られる電子数の向上に関しては、グルコースのポリマーであるセルロースは、グルコースなど他の低分子燃料物質と比べて、十分酸化された後においても、モノマー単位にまで分解されることで、電極上で酸化され得る構造を有する燃料物質を新たに供給することができ、さらに多くの電力が得られることが見込まれる。本システムでは、セルロースを電気化

学的に酸化することで、被分解能の高い、水溶性の酸化セルロース誘導体が生成されることが示された（3章参照）。機能性電極の作製など、上述した既存の最適化により、より多くのエネルギーおよび分解されやすい酸化セルロース誘導体が生成され、この誘導体を分解・糖化させ、さらにエネルギーを取り出すことで、従来のグルコースなどを用いたバイオ燃料電池よりも、燃料物質からのエネルギー変換効率の高い燃料電池システム系の構築が可能となる。しかし、酸化セルロース誘導体を分解・糖化するために、従来の糖化プロセスを再び取り入れては、本研究のコンセプトと一致しない。そこで、新たにセルロースの加水分解反応を触媒する酵素の触媒活性部位の構造を、人工的に燃料電池電極または電池内構造に形成させることで、従来のバイオ燃料電池に比べて、エネルギー変換効率および分散型エネルギー供給性に優れた、新しいセルロース燃料電池システム系が構築できると考えられる。

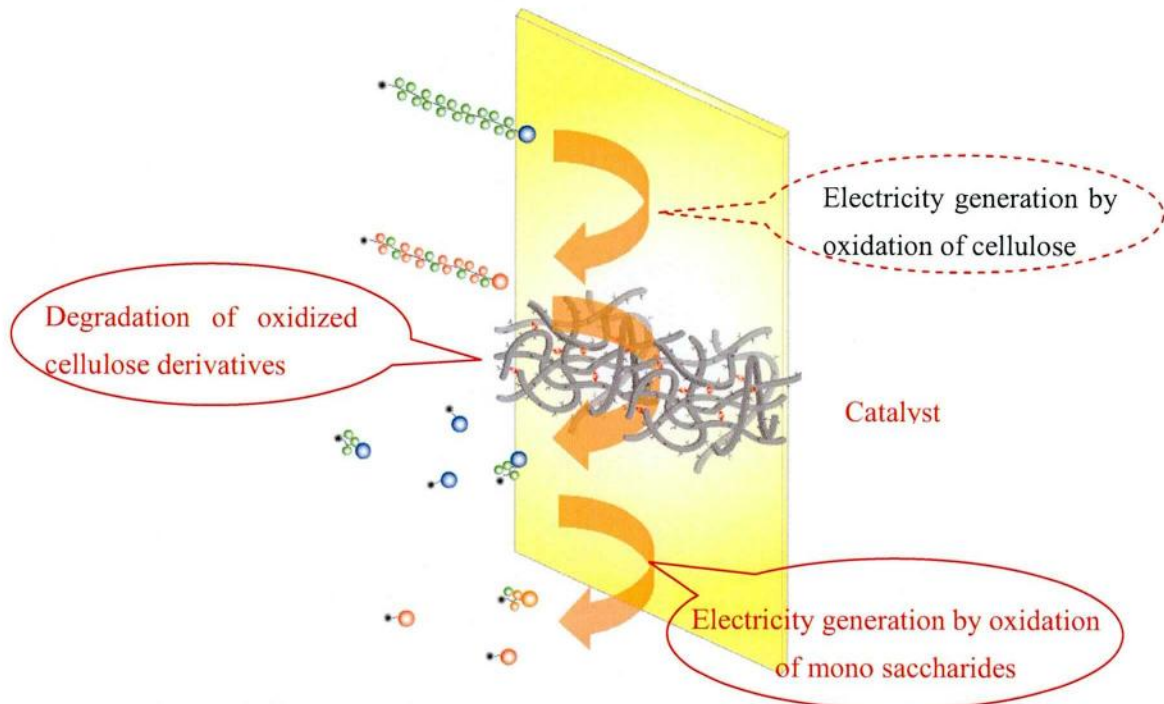


Figure 4.1 Scheme of direct energy conversion from cellulose with high efficiency

自然界では、酵素(Cellulase)がセルロースを分解する際、酵素の活性中心である2つのカルボキシル基がセルロース内の β -1,4-グリコシド結合を切断する反応を触媒する。¹⁻³ この2つのカルボキシル基の間には数 Å の距離があり、この空間内でセルロースのグリコシド結合が切断される。一方の基はマイナス電荷を帯び、もう一方の基は電荷を帯びていない構造を持っており、この2つの基が同時に β -1,4-グリコシド結合に作用するという反応機構が報告されている。⁴⁻⁶

本章では、カーボンナノチューブ(CNT)などのナノ材料を用いて、このセルラーゼの活性中心を模した構造を人工的に再構築し、糖の分解を触媒する反応の発現を試みる(図 4.1)。現在、ゼオライトをはじめ、金属や担持体などのナノ材料の種類、またはその粒子径の大きさと触媒能の関係を検討する研究はよく行われているが、ナノ材料を用いて、上述した酵素などの生体分子が持つ、独特の構造を模した触媒能の発現に関する研究報告はほとんどない。⁷⁻¹¹ Å 単位の制御は難しいが、それでも確率的に酵素の活性中心模倣構造による、糖の分解反応を発現できる可能性が考えられる。本章で提案する生体構造模倣型人工触媒は、セルロースからのエネルギー変換効率の向上だけでなく、触媒科学の分野に新たな方向性を示すことができると考えられる。

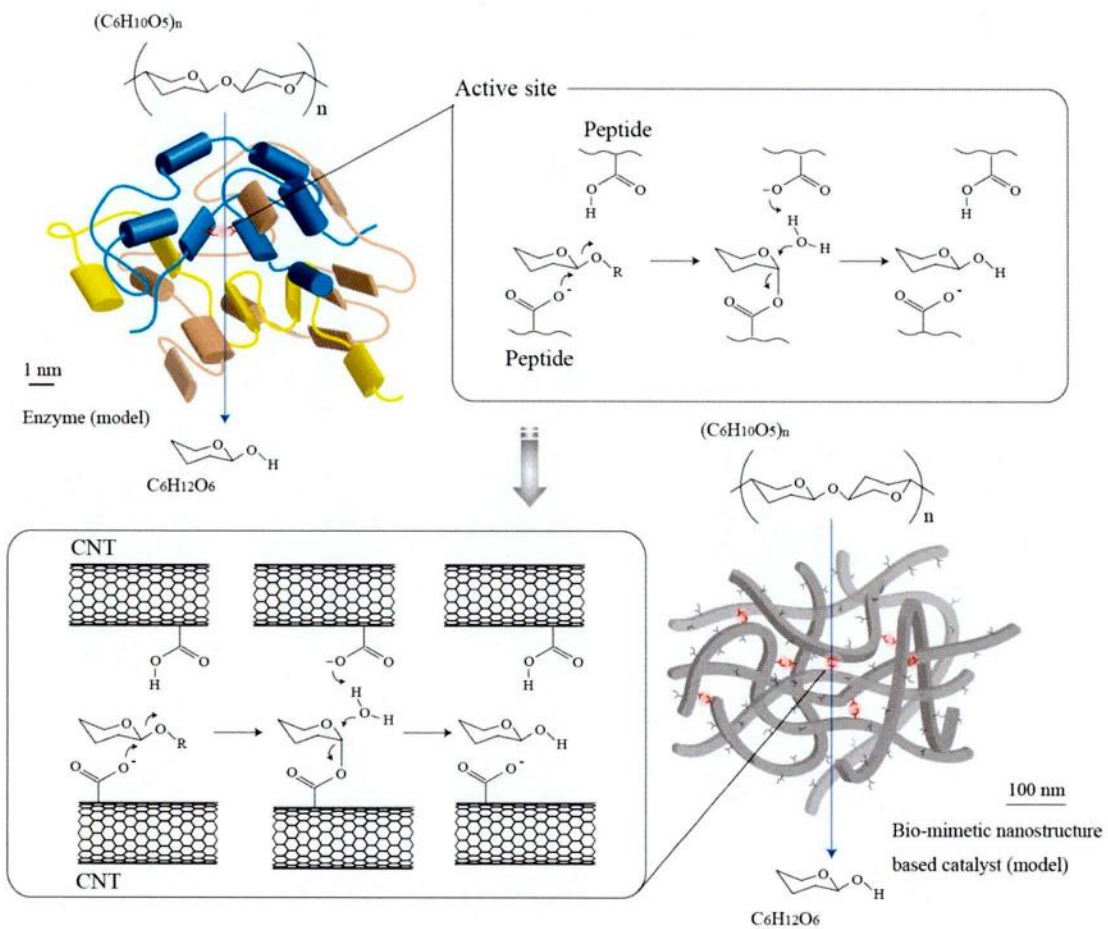


Figure 4.1 Hypothesis of sugar degradation by carbon nanotube structured biomimetic catalyst.

4-2 生体構造模倣型人工触媒の作製

生体構造模倣型人工触媒を構築するため、糖の分解反応に対する触媒活性部位となるカルボキシル基を修飾し、本人工触媒の基本構成単位となるCNT(COOH-CNT)を作製した。CNT表面におけるCOOHの修飾は、これまで多くの方法が報告されている。¹²⁻¹⁴ 本研究では、酸処理を用いた一般的な方法

($\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{SO}_4$, 1:3, (v/v))で、COOH-CNT を調整した。¹⁴ 図 4.2 に、CNT および COOH-CNT の FT-IR スペクトルを示す。COOH-CNT の FT-IR スペクトルでは、(1430, 1460)、1640 および 2980 cm^{-1} において、カルボキシル基由来の $>\text{C}=\text{O}$ 、C-O-H および OH の内角振動吸収ピークが検出されたのに対し、CNT の FT-IR スペクトルでは、これらの吸収ピークは検出されなかった。¹⁴ この結果から、酸処理により CNT に糖の触媒活性部位となるカルボキシル基を修飾した COOH-CNT を作製できたことが確認された。

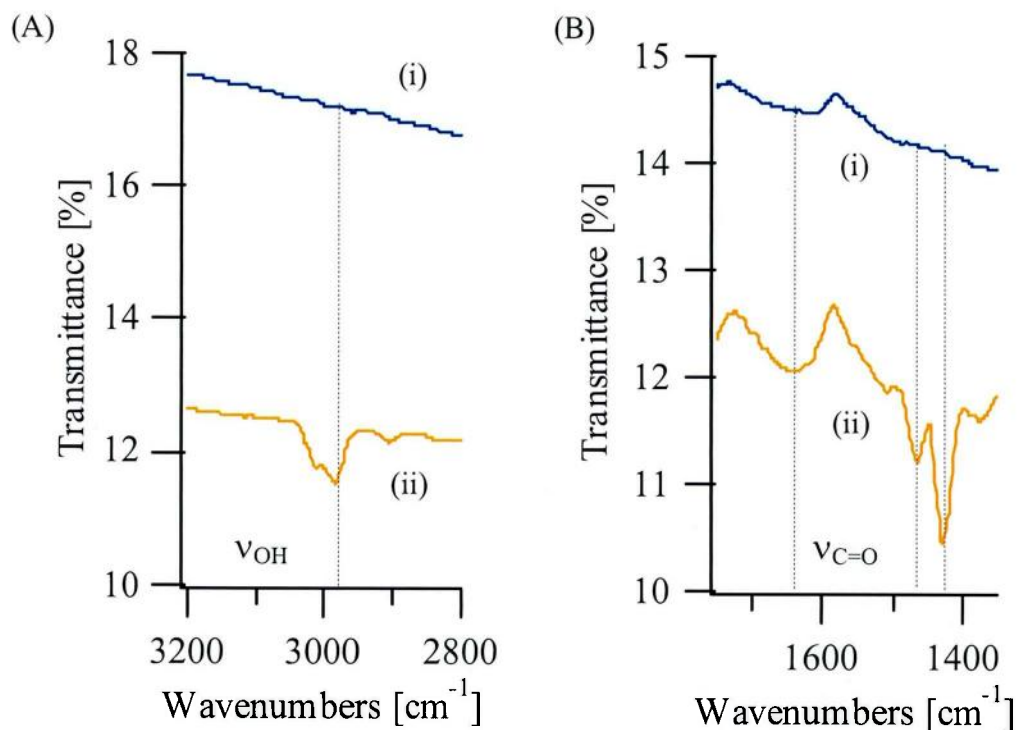


Figure 4.2 FT-IR spectra of CNT and COOH-CNT: (A) The range of OH bending vibration derived from carboxylate, (i) CNT, (ii) COOH-CNT. (B) The range of C=O bending vibration derived from carboxylate, (i) CNT, (ii) COOH-CNT.

作製した COOH-CNT を用いて、セルラーゼの活性部位構造を模倣した人工触媒の作製を試みた。アミノシラン処理を施した 1×1.5 cm のガラス基盤に、CNT または COOH-CNT を滴下し、 80°C のオープンで乾燥させた。この操作を繰り返して、ガラス基盤上に CNT または COOH-CNT が積層したマトリックス構造を形成させた。図 4.3 に、作製した CNT および COOH-CNT マトリックスの SEM 画像を示す。SEM 観察から、CNT および COOH-CNT マトリックスの間に大きな構造上の違いはなく、ともに CNT が何層にも折り重なってできた、複雑なナノ構造を有していることがわかる。また、CNT 同士が近接した領域も観察することができ、これらの構造が、生体構造模倣型人工触媒の触媒発現に寄与するものと考えられる。

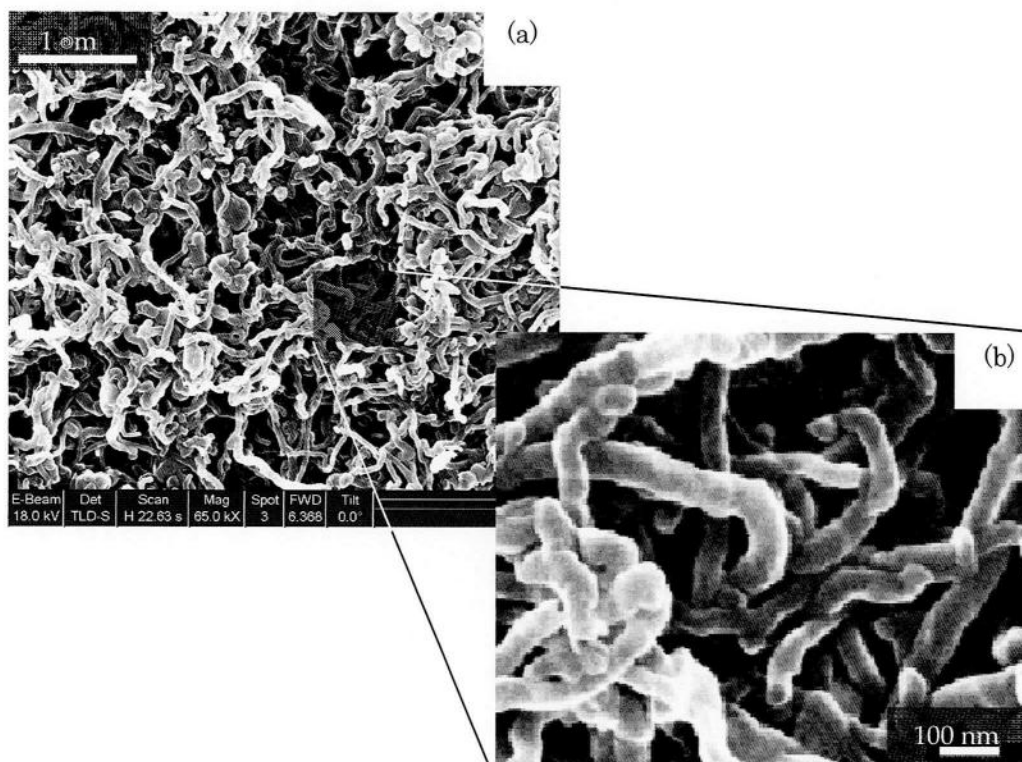


Figure 4.3 SEM images of CNT based matrix. (a) 1 μm scale, (b) 100 nm scale.

4-3 生体構造模倣型人工触媒の触媒発現と pH 依存性

本節では、4-2 節で作製した生体構造模倣型人工触媒の触媒発現について議論する。本人工触媒の触媒発現を評価するために、10 mM のセロビオース（グルコース分子の C1 および C4 位が β -1,4-グリコシド結合して成るグルコースの二量体）を含むクエン酸リン酸緩衝液を CNT および COOH-CNT マトリックスに 100 μ l 滴下して 24 時間反応させ、溶液中のグルコース濃度を、酵素法を用いて測定した。図 4.4 に、異なる pH 環境下における CNT および COOH-CNT マトリックス上のグルコース（分解生成物）濃度を示す。

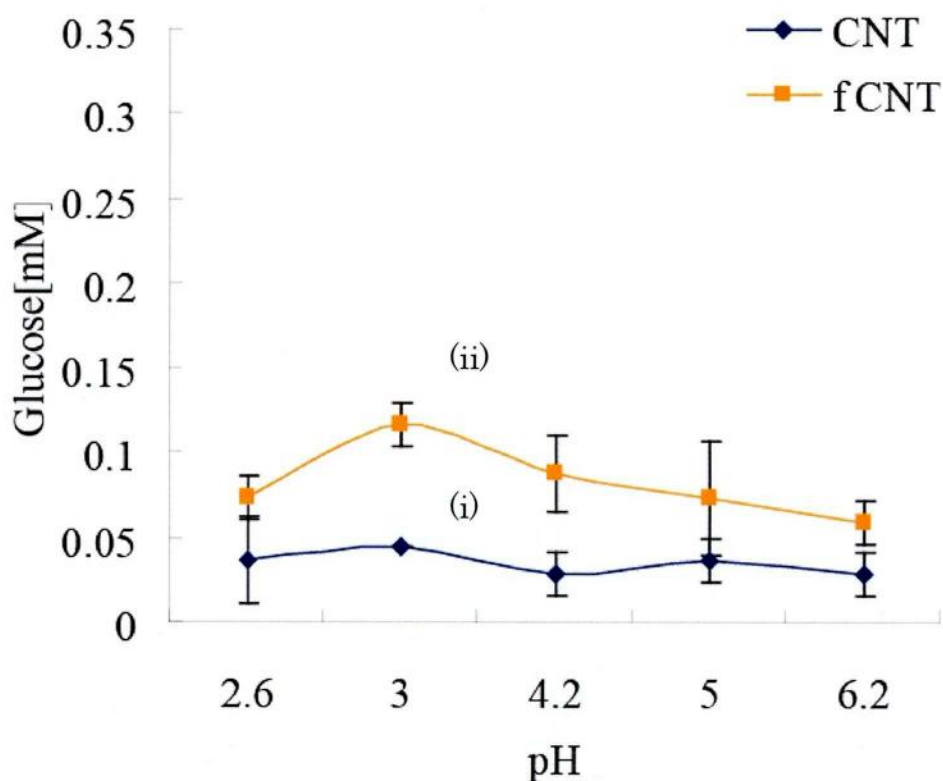


Figure 4.4 Effect of pH on nano-structure based catalyst against degradation of cellobiose: (i) CNT matrix, (ii) COOH-CNT matrix.

本人工触媒を用いたセロビオースの分解実験の結果、COOH-CNT マトリックスを用いた場合の方が、CNT マトリックスを用いた場合よりも、基質の分解成分であるグルコースの濃度が高かった。この結果は、CNT 上の COOH がセロビオースの分解反応に影響していることを示している。また、CNT マトリックスを用いた場合、異なる pH に対するグルコース濃度の変化はみられなかったが、COOH-CNT マトリックスを用いた場合、生成したグルコース濃度に pH 依存性があることがわかり、COOH-CNT マトリックス上の反応環境場の pH が 3.0 のとき、反応溶液内のグルコース濃度が最も高かった。一般に、官能基のプロトン化/脱プロトン化の平衡条件は pK 値で与えられる。カルボキシル基の pK 値が約 3.1~4.4 であることを考えると、COOH-CNT マトリックスの触媒能が、COOH/COO⁻のカップリング構造が形成する確率が高い pH 3.0 付近で最も高く発現した結果は、より実際の酵素（セルラーゼ）の触媒活性部位が形成する反応場に近い構造を構築できた可能性を示唆している。

4-4 生体構造模倣型人工触媒の触媒能と機能化 CNT 量の関係

生体構造模倣型人工触媒の触媒発現が、実際の酵素（セルラーゼ）の触媒活性部位に近い構造を形成する確率が支配的に関与している場合、触媒反応に関与する COOH-CNT の増加量に比例して、触媒発現も増加すると考えられる。そこで、異なる COOH-CNT 量で構築された COOH-CNT マトリックスを用いた場合に対する生成グルコース濃度を調べ、本人工触媒の触媒発現に関する考察を試みた。COOH-CNT 量の異なるマトリックスは、COOH-CNT の滴下回数を制御することで作成した。図 4.5 に、本人工触媒を構成する COOH-CNT 量に対する生成グルコース濃度を示す。この図から、COOH-CNT 量が増加するにつれて、反

応溶液内のグルコース濃度が増加したことがわかる。この結果から、ある一定の確率の元で、糖のグリコシド結合を切断するのに必要な COOH/COO 構造が形成されており、さらに COOH/COO 構造を形成する確率因子である COOH-CNT が増加することで、COOH/COO 構造の絶対数が増加し、この構造が寄与する糖の分解反応が促進されたと考えられる。以上の結果から、本章で提案した生体構造模倣型人工触媒の糖の分解反応は、COOH-CNT を用いて再構築した COOH/COO 構造が触媒しており、またその触媒発現量は、人工触媒における COOH/COO 構造の形成確率に依存している可能性が示唆された。

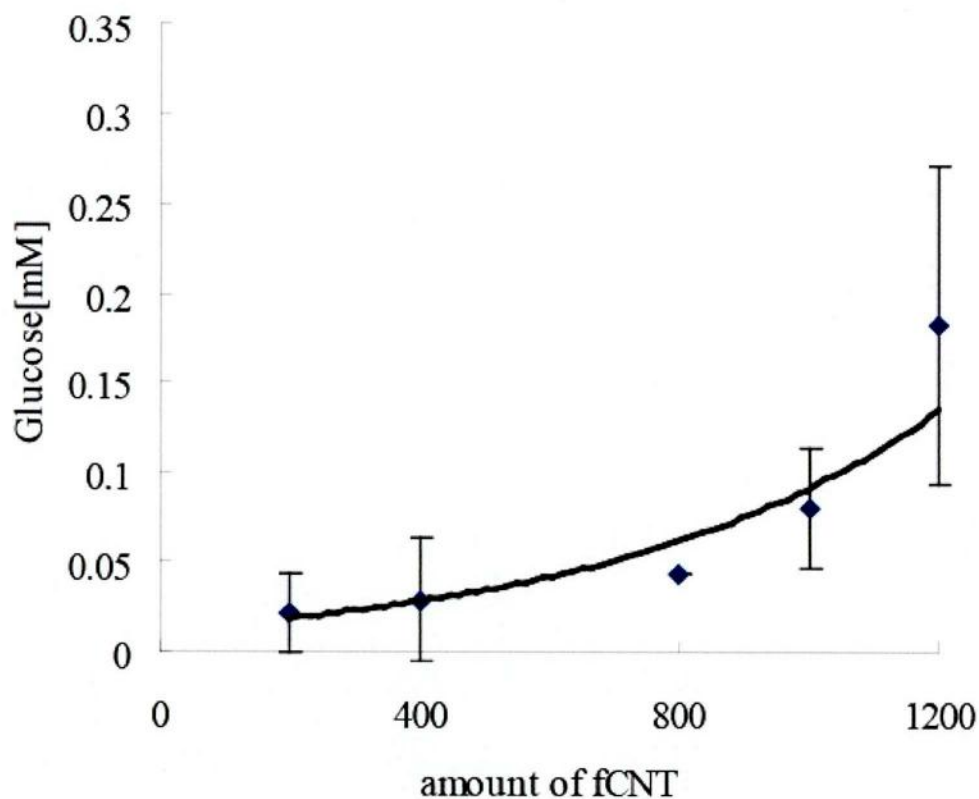


Figure 4.5 Concentration of glucose produced against the amount of COOH functionalized CNT on a glass substrate.

4-5 アミノ酸修飾による生体構造模倣型人工触媒の触媒発現への影響

これまでの結果から、生体構造模倣型人工触媒の擬似活性部位である COOH/COO⁻構造の形成確率の増加に比例して、本人工触媒の反応効率が増加する可能性が示唆された。本節では、酸性アミノ酸を COOH-CNT に化学修飾させ、人工触媒構造内における活性部位(COOH/COO⁻構造)の形成確率の増加を試み、糖分解(β -1,4-グリコシド結合の切断反応)の触媒反応効率の向上を試みる。本実験では、二つのカルボキシル基を有する酸性アミノ酸であるグルタミン酸およびアスパラギン酸を用いた (図 4.6)。

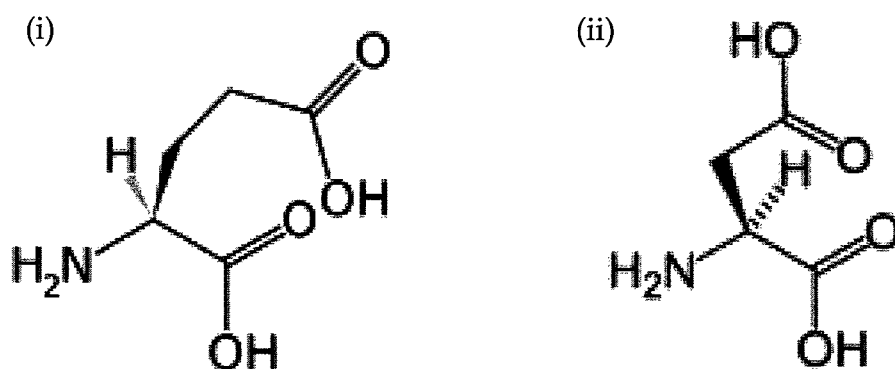


Figure 4.6 Chemical structures of amino acid. (i) Glutamic acid, (ii) Aspartic acid.

COOH-CNT への修飾には、EDC を反応促進剤として用い、COOH-CNT のカルボキシル基(COOH)とグルタミン酸またはアスパラギン酸のアミノ基(NH₃)を化学結合させたアミノ酸修飾 CNT マトリックスを新たに作製した。図 4.6 からわかりように、アミノ酸修飾人工触媒では、その構成単位である COOH-CNT 上の一つのカルボキシル基に対して、二つのカルボキシル基を有するアミノ酸のアミノ基と結合するため、カルボキシル基の数が最大 2 倍に増加する (図 4.7)。

そのため、アミノ酸修飾人工触媒の触媒活性構造の形成確率が増加し、その触媒活性がアミノ酸を修飾していないものより高くなる可能性が考えられる。

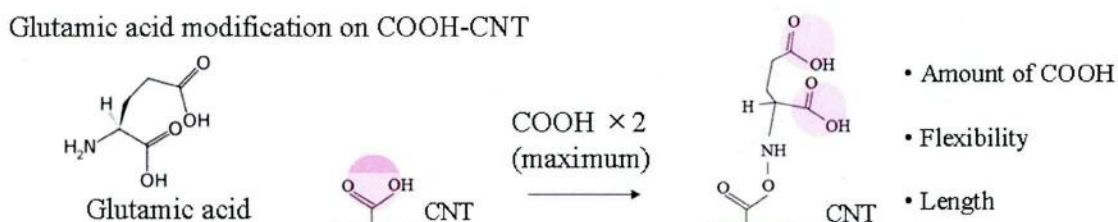


Figure 4.7 Scheme of amino acid modification on COOH-CNT

このアミノ酸を修飾したことによる本人工触媒の触媒活性への影響を調べるために、4.3 節と同様の測定を行い、アミノ未修飾の触媒活性と比較した。まず、グルタミン酸を修飾したことによる人工触媒活性への影響について議論する。図 4.8 は、グルタミン酸修飾(Glutamic acid-COOH-CNT)人工触媒の異なる pH におけるグルコース生成量を示している。この図から、グルタミン酸修飾人工触媒を用いた場合の生成グルコース濃度に pH 依存性があり、反応溶液の pH が 3.0 のとき最も高いグルコースが生成されたことがわかる。また、このとき(pH: 3.0)の生成グルコース濃度は、グルタミン酸未修飾の人工触媒を用いた場合よりも約 1.6 倍高かった。

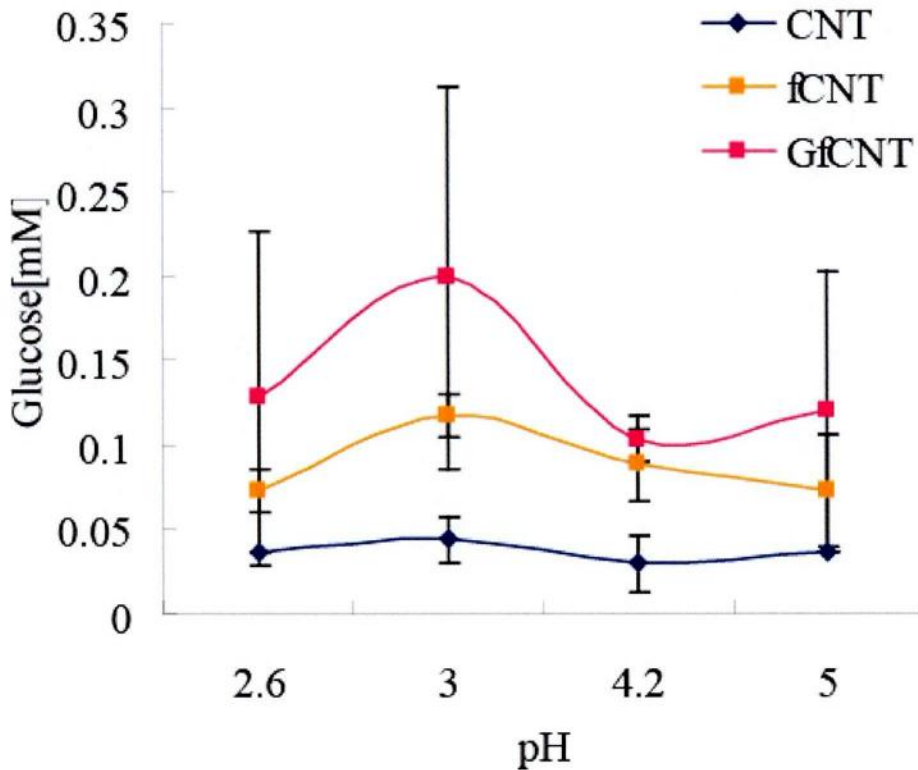


Figure 4.8 Effect of the glutamic acid functionalized CNT matrix against the cellobiose degradation at different pH values.

また、図 4.9 にグルタミン酸修飾人工触媒を構成する COOH-CNT 量に対する生成グルコース濃度を示す。この図から、人工触媒を構成する COOH-CNT 量が増加すると、生成グルコース量が増加する傾向が示唆されるが、アミノ酸を修飾していない人工触媒の結果(4-4 節)と比べると、COOH-CNT の増加量と生成グルコースの増加量の関係がリニアではなかった。これらの結果から、本人工触媒を構成する COOH-CNT にグルタミン酸を修飾することで、糖の分解反応(α-1,4-グリコシド結合の切断)に対する触媒活性が向上することが示された。

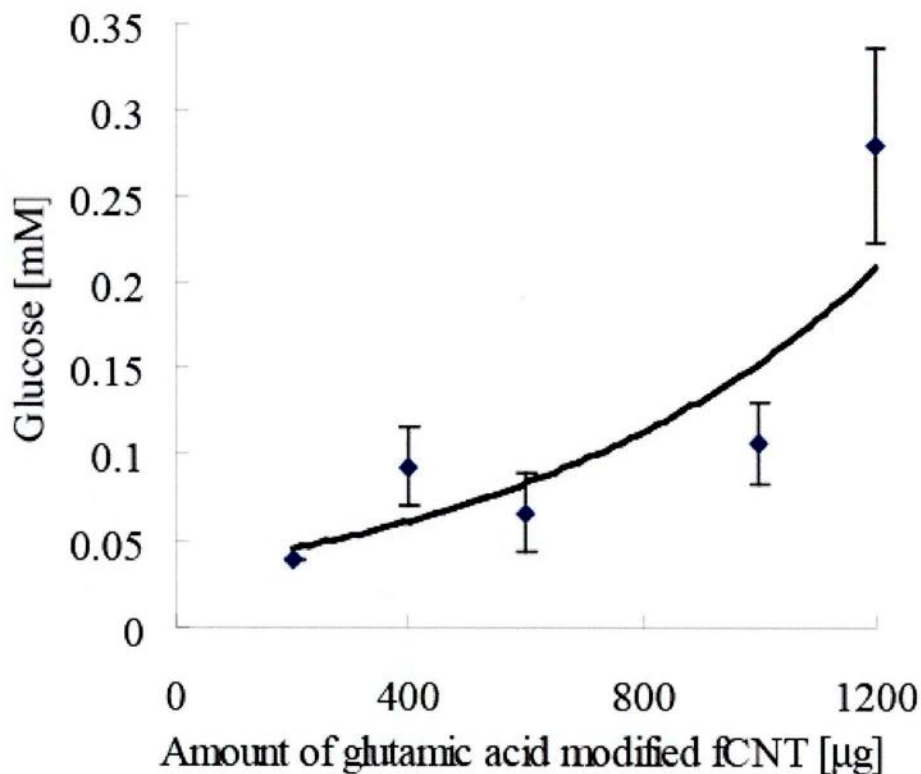


Figure 4.9 Concentration of glucose produced against the amount of glutamic acid functionalized COOH-CNT matrix.

これは、人工触媒内のカルボキシル基の数が増加し、糖の分解に対する触媒反応を発現できる、より多くの触媒部位（COOH/COO-構造）が形成されたため、触媒活性が増加したと考えられる。

次に、アスパラギン酸を修飾したことによる人工触媒活性への影響について議論する。図 4.10 は、アスパラギン酸修飾(Aspartic acid-COOH-CNT)人工触媒の異なる pH におけるグルコース生成量を示している。この図から、アスパラギン酸修飾人工触媒を用いた場合の生成グルコース濃度にも pH 依存があり、反応溶液の pH が 3.0 のとき最も高い触媒活性を発現したことがわかる。

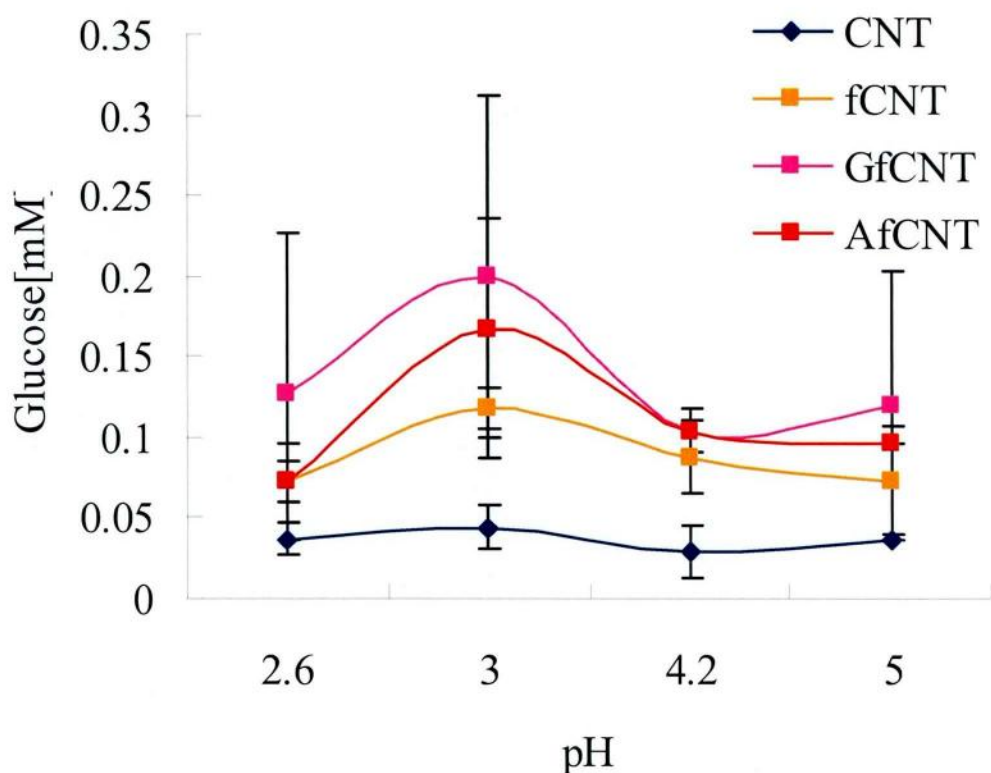


Figure 4.10 Effect of the amino acid functionalized CNT matrix against the cellobiose degradation at different pH values.

しかしながら、グルタミン酸修飾人工触媒と比べて、アスパラギン酸修飾人工触媒の触媒活性は低いことが示された。興味深いことに、セルラーゼに類する天然の酵素の多くが、グルタミン酸由来のカルボキシル基を触媒活性部位として機能させていることが知られている。本研究の今後の成果により、酵素の部分的な立体構造の意義を明確にできる可能性が考えられる。

4-6 生体構造模倣型人工触媒の反応効率

前節までの結果から、本研究で構築した生体構造模倣型人工触媒が、被模倣酵素（セルラーゼ）と同様の触媒能を発現できることが示された。本節では、

この生体構造模倣型人工触媒の触媒能を、他の生体触媒（酵素）の触媒能と比較・評価し、本人工触媒の触媒効率および反応速度論を考察する。表 4.1 に、生体構造模倣触媒および生体触媒の特異活性の値を示す。

Table 4.1 The specific activity of sugar degradable catalysts.

Catalyst	Specific activity [nmol/min/mg]	References
exoglucanase (derived from <i>Aspergillus sp.</i>)	440	15
β -glucosidase (derived from <i>Aspergillus sp.</i>)	1020	15
β -glucosidase (derived from apple seed)	380	16
Bio-mimetic nano-structure based catalyst	3.82	This work

本人工触媒の基質に対する特異活性は約 3.82 nmol/min/mg of catalyst であり、他の天然の生体触媒である酵素（セルラーゼ）と比較すると、本人工触媒の触媒効率が極めて低いことがわかる。これは、人工触媒において、糖の分解反応を発現可能な COOH/COO⁻構造の数が少ないことが考えられる。恐らく人工触媒を構成する COOH-CNT のほとんどが、理想的な COOH/COO⁻構造を形成するための足場(scaffolds)として機能しているものと思われる。この考察から、実用的な触媒能を有する人工触媒の構築を考慮した場合、前節で述べた COOH/COO⁻の形成確率は低いということが示された。また、本人工触媒が模倣した構造は、酵素の触媒活性部位に由来する構造だけであり、酵素の持つ他の重要な機能（基質の認識および結合機能、基質の触媒部位への誘導・配向制御機能、触媒反応後の基質との離脱機能など）を発現する構造は、本人工触媒には形成されていない。そのため、天然の酵素の触媒効率に比べて、その機能の一部しか発現で

きない本人工触媒の触媒効率は低かったものと考えられる。

ここで、表 4.1 で示した酵素の分子量および単位重量あたりの酵素分子の数 [unit/mg] を試算したものを表 4.2 に示す。

Table 4.2 Molecular weight and the molecular number of enzyme.

Catalyst	Molecular weight	Total number of molecule [unit/mg]
Exoglucanase (<i>Aspergillus sp.</i>)	57500	1.04696×10^{16}
β -glucosidase (<i>Aspergillus sp.</i>)	40000	1.505×10^{16}
β -glucosidase (apple seed)	120 (kDa)	5.018×10^{15}

人工触媒の分子量については、その構成単位であるひとつの CNT を 1 unit として、特異活性を試算した。CNT は直径 55 nm、長さ 1.2 μm の棒状構造として扱い、炭素-炭素結合間距離を 1.42 Å とした。¹⁷ 本実験で使用した CNT の断面の層数の定量は未確認であるが、4, 5 層程度から数十層の範囲であると仮定した。仮に 4 層構造として試算すると、1 mg の CNT マトリックスに約 5.64×10^{12} 個の CNT が存在することが示唆された。これらの情報を元に、次式に従って一分子の触媒当りの特異活性 E [nmol/min/unit of catalyst] を求めた。

$$E \text{ [nmol/min/unit]} = \frac{\text{Specific activity [nmol/min]}}{\text{Total number of molecule in one mg of catalyst sample [unit/mg]}}$$

その結果、本人工触媒の一分子当りの特異活性の方が、酵素の一分子当りの特異活性よりも高かった (図 4.11)。

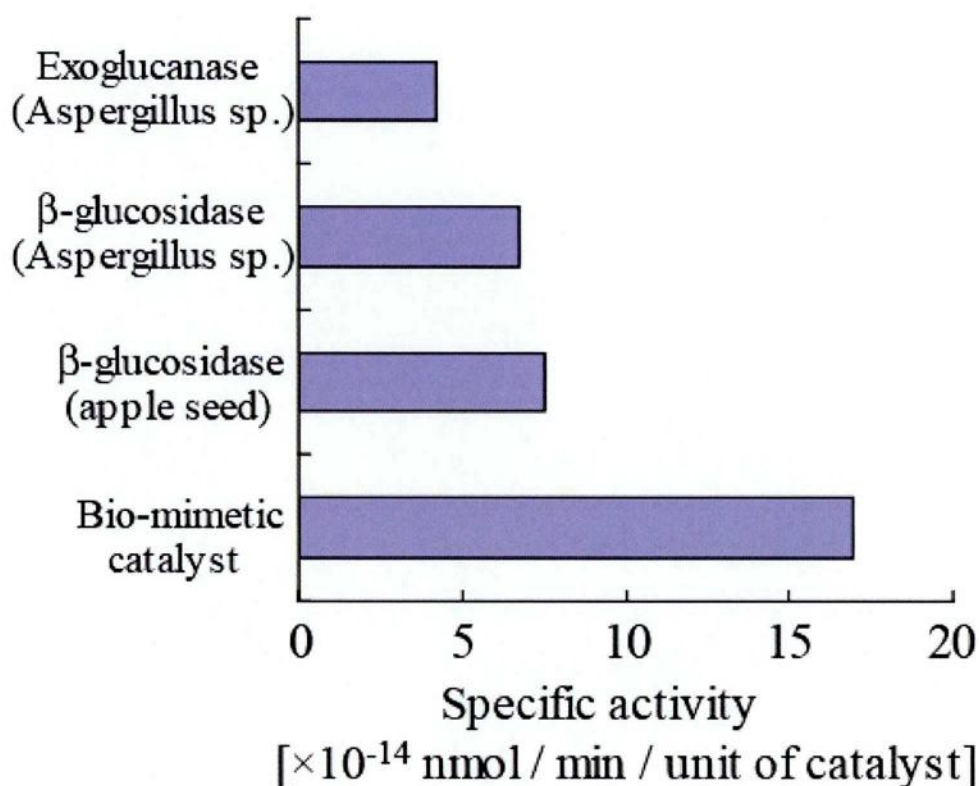


Figure 4.11 Specific activity of cellobiose degradation against the one unit of catalysts.

この結果は、本人工触媒の重量当りの活性部位数が、酵素の重量当りの活性部位数よりも多い可能性を示唆している。一般に、セルラーゼに類する酵素は、数百 kDa のタンパク質複合体であり、その各々のタンパク質複合体に（主に）一つの活性部位を持つ。^{15, 16} そのため、個々の触媒一分子当りの活性は、重量が大きく反応サイト数が一つしかない酵素よりも、重量が酵素のタンパク質複合体と比べて軽く、また低い形成確率ながらも複数の反応サイトが存在する可能性を有する生体模倣型人工触媒の方が高いという結果が得られたものと考えられる。この結果から、本人工触媒は、触媒重量当りの触媒反応サイト数が酵素に比して多いという特徴が示された。

次に、本人工触媒の触媒活性部に寄与するカルボキシル基の数を中和滴定により求め、CNT 上におけるカルボキシル基の密度を試算した。中和滴定では、1 mM の水酸化ナトリウム水溶液に、水に分散させた COOH-CNT(1 mg/ml)溶液を徐々に滴下していき、滴下量に対する pH 変化を測定した (図 4.11)。

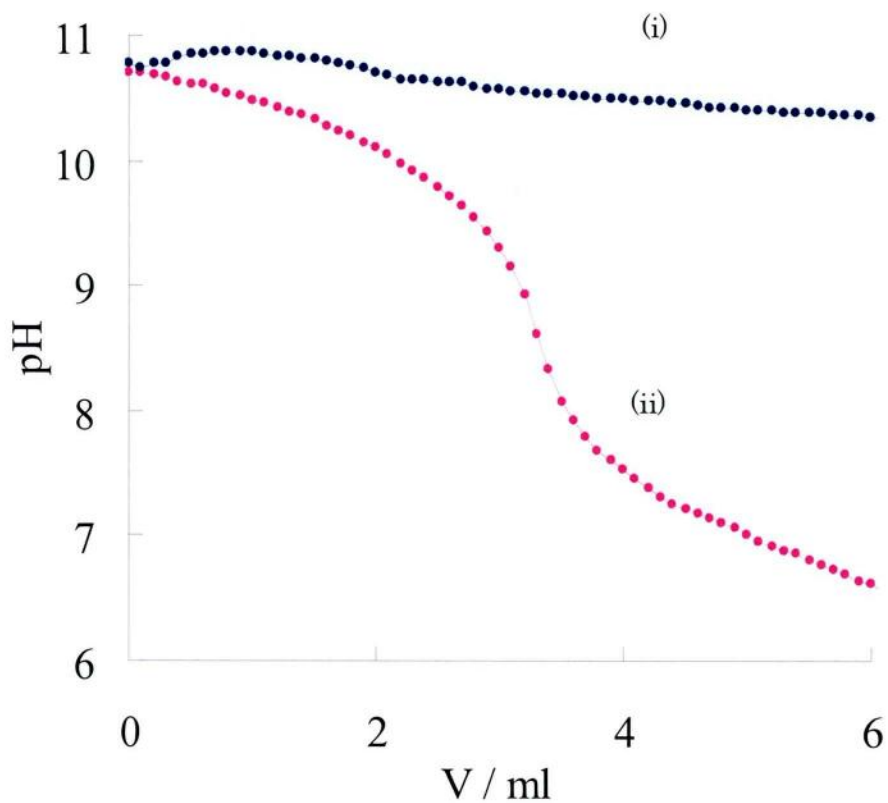


Figure 4.11 Neutralization titration of sodium hydroxide using the COOH-CNT: (i) CNT, (ii) COOH-CNT.

本滴定における中和反応では、以下の反応が進行していると考えられ、

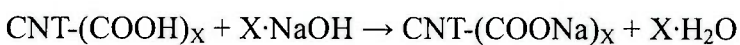


図 4.11 の結果および次式から、CNT 一分子あたりに存在するカルボキシル基の数を見積もった。

$$X = \frac{n_{\text{NaOH}}}{m_{\text{CNT-(COOH)}_n} / M_{\text{CNT-(COOH)}_n}}$$

(n_{NaOH} : 10 [μmol] (反応した水酸化ナトリウム量)、 $m_{\text{CNT-(COOH)}_n}$: 3.3 [mg] (平衡点に達するまでの COOH-CNT 量)、 $M_{\text{CNT-(COOH)}_n}$: 1.15×10^8 [g/mol] (CNT の分子量))

その結果、一つの CNT 上に約 3.48×10^5 unit のカルボキシル基が修飾されていることが示された。これは、CNT の単位表面積 1 nm^2 当りに約 1.68 unit のカルボキシル基が存在していることになる。この一つの CNT 上におけるカルボキシル基間の平均距離は、触媒サイトとして機能するカルボキシル基間の距離よりも大きく、また、CNT 上に修飾されたカルボキシル基の配向性も、CNT 平面に対して垂直方向に修飾されると考えられているため、一つの CNT 上で糖の分解反応が進行する可能性は少なく、少なくとも二つ以上のカルボキシル基修飾 CNT が触媒サイトの形成に必要であることを示している。また、仮に二つのカルボキシル基修飾 CNT が近接していたとしても、CNT 上の全てのカルボキシル基が糖の分解反応に有効な触媒サイトの形成に寄与するとは限らず、多くのカルボキシル基が触媒サイトの形成に寄与できていない可能性が十分考えられる。さらに、触媒反応に寄与する一対のカルボキシル基は、一方がプロトン化しており他方は脱プロトン化している状態ではじめて糖の分解活性サイトとして機能すると考えられるため、有効な触媒サイトの形成確率はさらに低くなると考えられる。図 4.12 は、本人工触媒を構成する CNT 一分子あたりに存在する有効な触媒サイト数を見積もった結果を示す。人工触媒を構成する CNT 一分子あたりの触媒サイト数(Y [unit/molecule])は、一分子の生体触媒 (酵素) には一つの触媒

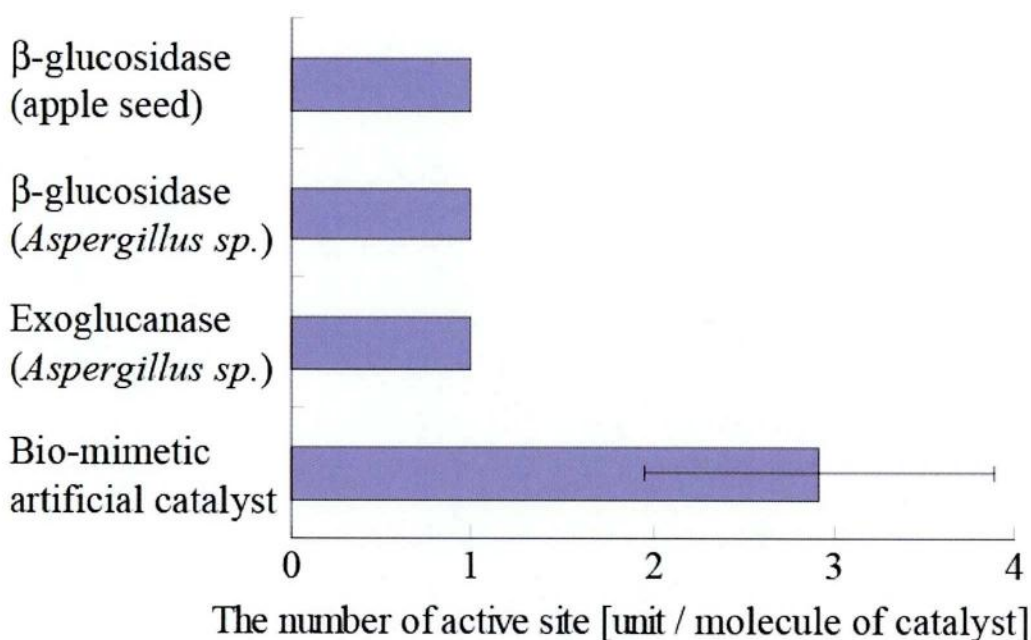


Figure 4.12 The number of active sites per molecule of catalyst. One CNT structure was considered as one molecule of catalyst.

サイトが存在することから、本人工触媒および生体触媒の特異活性 [nmol/min/molecule] の比を取ることで見積もった。

$$Y [\text{unit/molecule}] = \frac{E_{\text{Bio-mimetic catalyst}} [\text{nmol/min/molecule}]}{E_{\text{Enzyme}} [\text{nmol/min/molecule}]}$$

その結果、一つの CNT に、一つ以上の触媒サイトが存在する可能性が示唆され、本人工触媒では、天然の生体触媒よりも多くの触媒活性サイトが形成され得るという特徴が示された。また、本試算結果は CNT を 4 層構造として見積もった最小値である。さらに、本人工触媒では、CNT および COOH 基の配向性の最適化は行われていないため、その触媒反応効率は、長い進化の過程で最適化されてきた天然酵素のカルボキシル基間の距離および配向性が寄与する触媒反応効率よりも低い可能性が十分考えられる。そのため、CNT が 4 層以上の構造を有

する可能性と、個々の触媒サイトの反応効率の違いを考慮すると、実際の CNT 一分子あたりの触媒サイト数は今回見積もった値よりも多いと思われる。今後の最適化、特に CNT および COOH の配向性の制御による理想的な触媒活性部位 (COOH/COO⁻) の形成確率の向上により、さらに糖分解の触媒効率の増加が期待される。

4-7 まとめ

糖のβ-1,4-グリコシド結合を加水分解する酵素セルラーゼの触媒活性部位の構造を、ナノ材料である CNT を用いて再構築し、セルラーゼと同様の糖の分解機能を発現するバイオミメティックな人工触媒を構築することができた。本人工触媒の触媒活性は、カルボキシル基の pK 値付近で最大となり、また人工触媒中に存在するカルボキシル基の量の増加とともに、触媒活性が増加することが示された。これは、本人工触媒が、糖の加水分解反応を触媒する活性部位構造の形成確率に依存していることが示唆された。また、カルボキシル基の数が等しいグルタミン酸およびアスパラギン酸を修飾した人工触媒の活性に違いが認められ、アミノ酸の構造由来の機能に起因する興味深い要素があることが示された。これは、セルラーゼの活性部位を形成するカルボキシル基の多くが、グルタミン酸由来のものである理由を解き明かす方向に展開できるものと思われる。本章で展開されてきた生体構造模倣型の人工触媒に関する概念は、本論文の目的であるセルロースからの効率的な直接エネルギー変換系の構築だけでなく、既知の反応機構を扱う他の生体関連分野にも大きく寄与できると考えられる。本人工触媒に関する研究は、従来とは異なる方向から生命の本質に迫る研究展開に貢献できる可能性を秘めていると思われる。

参考文献

- 1 R. H. Doi & A. Kosugi, *Nature Reviews Microbiology*. 2004, 2 (7), 541-551.
- 2 C. Sanchez, *Biotechnology Advances*. 2009, 27, 185-194.
- 3 R. E. Nordon, S. J. Craig & F. C. Foong, *Biotechnol Lett*. 2009, 31, 465-476.
- 4 A. Ochiai, T. Itoh, Y. Maruyama, A. Kawamata, B. Mikami, W. Hashimoto & K. Murata, *J. BIOL. CHEM.* 2007, 282, NO. 51, 37134-37145.
- 5 A. Vasella, G. J. Davies & M. Bohm, *Current Opinion in Chemical Biology*. 2002, 6, 619-629.
- 6 A. White & D. R. Rose, *Curr. Opin. Struc. Biol.* 1997, 7, 645-651.
- 7 C. M. Thomas & T. R. Ward, *Appl. Organomet. Chem.* 2005, 19, 35-39.
- 8 G. L. Elizarova, G. M. Zhidomirov & V. N. Parmon, *Catalysis Today*. 2000, 58, 71-88.
- 9 Z. Fang & R. Breslow, *Org. Lett.* 2006, 8, 2, 251-254.
- 10 V. R. Choudhary, S. K. Jana & B. P. Kiran, *Catal. Lett.* 1999, 59, 217-219.
- 11 A. V. Krishnan, K. Ojha & C. Pradhan, *Organic Process Research & Development*. 2002, 6, 132-137.
- 12 C. M. Thomas & T. R. Ward, *Appl. Organomet. Chem.* 2005, 19, 35-39.
- 13 C. Zhou, S. Wang, Q. Zhuang & H. Zhewen. *CARBON*. 2008, 46, 1232-1240.
- 14 M. K. Kumar & S. Ramaprabhu, *J. Phys. Chem. B*. 2006, 110, 11291-11298.
- 15 P. S. Bagga, D. K. Sandhu & S. Sharma. *J. Appl. Bacteriol.* 1990, 68, 61-68.
- 16 H. L. Yu, J. H. Xu, W. T. Lu & G. Q. Lin, *Enzyme. Microb. Tech.* 2007, 40, 354-361.
- 17 M. T. Yin, M. L. Cohen, *Phys. Rev. B*. 1984, 29, 12, 6996-6998.

第5章 総括

本研究では、バイオマスの主成分であるセルロースを、糖化も発酵プロセスも介さず、従来のバイオ燃料電池システムよりも高いエネルギー変換効率で、直接電気エネルギーに変換できる、ユニークなセルロース燃料電池システム系構築を試み、バイオマスの新しい利用技術の提案を行った。これにより、地球上に豊富に、広域に分布しているバイオマスを、分散型エネルギー供給源として利用する実現可能性を示し、次世代のエネルギー供給網システムの構築・デザインに寄与することが期待される。

その最初の段階として、金の糖酸化に対する触媒能が発現できるアルカリ環境下で、電気化学的に不活性なセルロースの結晶構造の維持に寄与している分子内・分子間水素結合を切断させ、セルロース分子と金電極が電気化学的に相互作用できる反応環境を見出すことに成功した。これにより、従来不可能であったセルロースからの直接エネルギー変換が可能となり、従来技術に必須の糖化および発酵プロセスを介さず、直接セルロースから電気エネルギー供給が可能な、新しいバイオ燃料電池（セルロース燃料電池）系の構築に成功した。

さらに、セルロースの化学エネルギーを電気エネルギーに変換した後、水不溶性のセルロースが水可溶性の酸化セルロース誘導体に変化することがわかった。この結果をもとに、酸化反応の前後におけるセルロースの構造および反応特性を調べ、セルロースの電気化学的酸化の反応機構の側面が明らかになった。これらの結果から、エネルギーと同時にポリマー系工業原料も生成できるセルロースリファイナリーシステムに展開できる可能性が示され、セルロースの直接エネルギー変換システム系の新しい可能性が示された。また、ひとつの電気化学反応場で得られる酸化セルロース誘導体は一種類ではなく、複数種存在す

ることが示唆され、従来のセルロースの改質技術にも応用・展開できることも示された。また、この酸化セルロース誘導体は、もとのセルロースに比べて、酵素による被糖化能が高いことがわかった。本論文では、この分解しやすい酸化セルロース誘導体をさらにエネルギー源として利用することで、燃料物質からのエネルギー変換効率の高いセルロース燃料電池の改良を試み、糖の分解反応を触媒する新しい人工酵素の創生を試みた。その結果、化学修飾したカーボンナノチューブ(CNT)を用いて、糖を分解する酵素セルラーゼの触媒活性中心の構造を人工的に再構築し、酵素と同様の触媒機能を発現する、バイミメティックな人工触媒の創生に成功した。現在、ゼオライトをはじめ、金属や担持体などのナノ材料の種類、またはその粒子径の大きさと触媒能の関係を検討する研究はよく行われているが、ナノ材料を用いて、上述した酵素などの生体分子が持つ、独特の構造を模した触媒能の発現に関する研究報告はほとんどない。Å単位の制御は難しいが、それでも確率的に酵素の活性中心模倣構造による、糖の分解反応を発現できる可能性が考えられる。本研究で提案する人工触媒により、酵素の部分的な機能評価ができる可能性が考えられ、セルロースからのエネルギー変換効率の向上だけでなく、従来とは異なる方向から生命の本質に迫る研究展開に寄与することが期待される。

Summary

The demand for energy is increasing due to population growth, industrialisation, and a lack of sufficient cost-effective renewable-energy sources. Utilizing biomass as an alternative energy source is increasingly becoming one of the most important topics for material based sustainable society. A number of conventional techniques to exploit this energy source including saccharification, fermentation and energy conversion have been reported. Using these processes, energy is generated intensively using hydrogen and ethanol produced from cellulose, the main component of biomass. Unfortunately, these techniques require specialised equipment, input energy for operating whole system and infrastructure. Recently, sugar-based bio fuel cells which can convert into the electric energy from chemical energy of sugars derived from biomass without fermentation using oxidation reaction of sugars on anodic functional electrode have been reported. Biofuel cells have a much broader range of application for distributed energy supply due to cutting of fermentation from its energy conversion process. Until now, various types of sugar based biofuel cells have been devised and developed. However, the fuels for these cells are monosaccharide such as glucose mainly and still need to be produced from cellulose via saccharification for utilization of biomass as an energy source. The need for complicated process like saccharification substantially limits wide adoption of this technique as a viable green fuel cell technology. Reducing the intermediate steps is very important if cellulose can be widely tapped of its stored energy, and allows further research progress to be made in bio fuel cells. In this respect, enabling direct electron transfer from biomass components to the electrode surface is a crucial step. Indeed, the electrochemical oxidation of soluble sugars on gold or silver electrodes under alkaline

conditions has been reported, leading to the development of sugar-based fuel cells. However, as far as we are aware, there are no reports on direct utilization of complicated polysaccharides such as cellulose. The electrochemical characteristics of cellulose have not been studied mostly because of their rigid crystalline structure. Since dissolution of cellulose is possible under certain conditions, we considered it possible to exploit the present cellulose dissolution protocols and, develop an analytical technique in which cellulose can be oxidized directly on an electrode surface. Main results in each chapter are summarized as follow.

In chapter 2, direct electrochemical oxidation of dissolved cellulose was achieved on gold electrode. To the best of our knowledge, this is the first report of the basic characteristics of electrochemical oxidation of cellulose under alkaline conditions. A fuel cell was constructed successfully and evaluated. We nano-particulated cellulose and managed to increase the current generated. This cellulose based fuel cell system generated both the electric energy, and cellulose derivatives without saccharification and fermentation processes. These experiments present initial but important steps in the utilization of cellulose for electrical power generation. The fuel cell system is simple, less labour-intensive, and is economical with regard to both reagents and time. This proof-of-concept study raises new possibilities for utilization of biomass constituents, and could lead to the development of a sustainable biomaterial-based industry.

In chapter 3, we report the production of water-soluble cellulose derivatives from water-insoluble cellulose using electrochemical oxidation on gold, under the alkaline conditions. We characterized the structure of the derivatives using XRD, FTIR, and SEC

techniques. The results suggest that some hydroxyl groups on cellulose molecule are oxidized into the carbonyl groups due to electrochemical oxidation. We further demonstrated that these oxidized cellulose derivatives are more readily degraded by cellulase enzymes more readily than the original cellulose. In addition, the calculation of electron transfer during electrochemical oxidation process between cellulose molecule and gold electrode revealed it to be a multiple electron transfer reaction process. These results have direct application to the development of a novel cellulose refinery technology with simultaneous electricity generation and production of water-soluble cellulose derivatives. To be able to utilize cellulose, one of the major constituents of biomass- yet very hard to directly tap into- should be considered a key contribution to bio-refinery in the near future.

In chapter 4, I claim successful construction of a bio-inspired catalyst based on the CNT matrix functionalized with carboxylate groups. This nanostructure is capable of catalyzing sugar degradation reaction by cleaving the β -1,4-glycosyl bonds of the sugar substrate by the same way as the natural cellulase. Our construct successfully mimicked the active center of the sugar degrading β -glycosyl hydrolases. The catalyst functioned optimally at pH \sim 3.0. Our work will allow for the construction of an array of artificial catalysts that mimic the conformation of the active centers of enzymes, for which the structure-catalysis relationships are already known or at least can be partially speculated. With some improvement, such bio-inspired catalysts can be used in bioprocess industries, especially in bio-energy conversion, thereby avoiding the use of hazardous microbial cultures or expensive natural enzymes. Recently, for on-site utilization of biomass, a unique fuel cell was developed capable of generating electricity

directly from cellulose.¹³ We propose that the integration of this artificial catalyst with a direct energy conversion system that will enable us to use biomass from ubiquitous sources, for example, wastes, as a fuel for generating electricity. Moreover, such constructs can be used for systematic evaluation of the functional individual parts of complex enzyme conformations to gain a better insight into the mechanisms of enzymatic activity.

This novel bio-mimetic approach can enhance the scientific understanding of synthetic catalysis, natural catalytic processes, which will, in turn, provide information related to macroscopic biological networks.

業績リスト

本学位論文に関する原著論文

1. **Yasuhito Sugano**, Mun'delanji Vestergaard, Hiroyuki Yoshikawa, Masato Saito and Eiichi Tamiya,
“Direct electrochemical oxidation of cellulose: A cellulose-based fuel cell system,”
Electroanalysis. (doi. 10.1002/elan.201000045).
2. **Yasuhito Sugano**, Mun'delanji Vestergaard, Masato Saito and Eiichi Tamiya,
“Carbon nanotube structured biomimetic catalyst for polysaccharide degradation,”
(submitted).
3. **Yasuhito Sugano**, Hoa Le Quynh, Mun'delanji Vestergaard, Sathuluri Ramachandra Rao, Hiroyuki Yoshikawa, Masato Saito, Yamaguchi Yoshinori and Eiichi Tamiya,
“Electrochemical derivitization of cellulose on gold for enhanced cellulase degradable substrates and structural characterization,” (submitted).

関連原著論文

1. Le Quynh Hoa, **Yasuhito Sugano**, Hiroyuki Yoshikawa, Masato Saito and Eiichi Tamiya,
“*A biohydrogen fuel cell using a conductive polymer nanocomposite based anode,*”
Biosensors and Bioelectronics. (doi: 10.1016/j.bios.2010.04.017)

総説・解説等

1. 菅野康仁, 民谷栄一.
“セルロース燃料電池”
燃料電池, Vol. 9, No. 1, 2009.

国際会議発表

1. **Yasuhito Sugano**, Junichi Naruse, Le Quynh Hoa, Hiroyuki Yoshikawa, Masato Saito and Eiichi Tamiya,
“Cellulose refinery system using direct electrochemical oxidation,”
7th Asian Conference on Electrochemistry (7th ACEC). Kumamoto university, Japan, 2010.05.18-22 (口頭発表)
2. **Yasuhito Sugano**, Masato Saito, and Eiichi Tamiya,
“Direct electricity generation from cellulose using fuel cell,”
First International Symposium on Atomically controlled Fabrication Technology. Osaka university, Japan, 2009.02.16-17 (ポスター発表)

3. **Yasuhito Sugano, Masato. Saito and Eiichi Tamiya,**
“*Biofuel Cells with Cellulose Nano-Particles,*”
The Electrochemical Society, Pacific Rim Meeting 2008. Honolulu, Hawaii,
2008.10.13. (口頭発表)

国内会議発表

口頭発表

1. 菅野康仁、成瀬淳一、Hoa Le Quynh、吉川裕之、斉藤真人、民谷栄一
”燃料電池システムを用いたセルロースの反応生成物の解析”
電気化学会第 77 大会. 富山大学五福キャンパス, 2010.03.29
2. 菅野康仁, 成瀬淳一, 吉川裕之, 斉藤真人, 民谷栄一
“セルロース燃料電池”
第 61 回日本生物工学会大会. 名古屋大学東山キャンパス, 2009.09.23
3. 菅野康仁, 成瀬淳一, Hoa Le Quynh, 吉川裕之, 斉藤真人, 民谷栄一
“セルロースからの直接エネルギー変換システム”
2009 年電気化学秋季大会. 東京農工大学小金井キャンパス, 2009.09.11
4. 菅野康仁、成瀬淳一、斉藤真人、民谷栄一
“セルロースのナノ粒子化とバイオ燃料電池への応用”
電気化学会第 76 大会. 京都大学吉田キャンパス, 2009.03.30

5. 菅野康仁, Minhaz Uddin Ahmed, 斎藤真人, 民谷栄一
“未利用バイオマスからの電気化学エネルギー変換”
電気化学会第 75 大会. 山梨大学, 2008.03.29

6. 菅野康仁、山村昌平、高村禅、民谷栄一
“複数の微生物を用いたリグノセルロース系バイオマスの糖化”
第 59 回日本生物工学会.大会 広島大学東広島キャンパス, 2007.09.25-27

7. 菅野康仁、山村昌平、池田隆造、高村禅、民谷栄一
“複数の担子菌を用いた未利用バイオマスからの糖化プロセス”
農芸化学会 2007 年度大会、東京農業大学 世田谷キャンパス, 2007.03.24-27

8. 菅野康仁, 池田隆造, 石川光祥, 山村昌平, 高村 禅, 民谷栄一
“未利用バイオマスからの微生物変換による水素生産”
電気化学会第 73 回大会、首都大学東京南大沢キャンパス, 2006.04.01-03

9. 菅野康仁、清水和幸
“大腸菌の *aceA* 遺伝子破壊が培養特性及び代謝関連タンパク質の発現に及ぼす
影響”
生物工学会九州支部大会 2005

ポスター発表

10. 菅野康仁, 成瀬淳一, Hoa Le Quyn, 吉川裕之, 斉藤真人, 民谷栄一

“セルロース燃料電池”

第3回電気化学研究会. 神戸大学, 2009.11.28

11. 菅野康仁, 山村昌平, 池田隆造, 高村禅, 富山雅光, 民谷栄一

“複数の微生物を用いた未利用バイオマスの糖化システム”

北陸地区講演会と研究発表会. 富山大学工学部, 2006.11.18

12. 菅野康仁, 山村昌平, 池田隆造, 石川光祥, 高村禅, 富山雅光, 民谷栄一

“複数の白色腐朽菌を用いた未利用バイオマスからのエネルギー変換”

生体機能関連化学部会 (第21回)・バイオテクノロジー部会 (第9回)・生命化学研究会 (第9回) 合同シンポジウム. 京都大学, 2006.9.28-30

特許等

1. 民谷栄一, 菅野康仁. 電気化学を用いたポリマーの製造方法と生成物, 特願
2010-073902

その他 (受賞暦等)

ポスター賞

1. 菅野康仁. 関西電気化学奨励賞. 2009.11.28
2. 菅野康仁. 最優秀ポスター賞. 石川県加賀市バイオマスタウン構想事業. 2005

新聞記事

3. 民谷栄一, 菅野康仁. 木材から直接発電 阪大 廃材利用バイオ電池に道. 日経産業新聞 2009.04.17

謝辞

本研究は、民谷栄一教授のご指導のもと、大阪大学大学院工学研究科精密科学・応用物理学専攻において行われたものである。本研究を遂行するにあたり、多くの方々にご協力頂きました。ここで厚く御礼申し上げます。

博士前期過程から博士後期課程の間、終始懇切なご指導、ご鞭撻を賜りました。大阪大学大学院工学研究科教授 民谷栄一先生に謹んで感謝申し上げます。

本学位論文作成にあたり御検討いただき、有益な御教示を賜りました本学大学院工学研究科教授 笠井秀明先生、小林慶裕先生、神戸大学大学院工学研究科教授 近藤昭彦先生に厚く御礼申し上げます。

本学大学院工学研究科助教 吉川裕之先生には日々の研究に関してご意見、ご指導賜りました。心より御礼申し上げます。

X 線回折測定にご協力頂きました本学大学院工学研究科教授 今中信人先生、助教 田村真治先生に厚く御礼申し上げます。

走査型電子顕微鏡観察にご協力頂きました本学産業科学研究所教授 松本和彦先生、准教授 前橋兼三先生、助教 大野恭秀先生に厚く御礼申し上げます。

電極素材の作製にご協力頂きました、本学大学院工学研究科講師 清野智史先生に厚く御礼申し上げます。

日々の研究にあたりご意見いただきました山口佳則特任准教授、斎藤真人助教に御礼申し上げます。

日々の研究生生活において、よく議論して頂いた Mun'delanji Vestergaard 博士、Ha Minh Hiep 博士、Mohammad M. Hossain 氏、Hoa Le Quynh 氏に、心より深く感謝いたします。

日々の研究生生活で共に切磋琢磨し、大変お世話になった田中嘉人博士、安國

良平博士、Guillaume Laurent 博士、佐武主康氏、横山委未氏、谷山俊一氏に深く感謝いたします。

日々の研究室生活において様々な形でご協力、ご意見いただきました民谷研究室の皆様に感謝いたします。合田真紀子様、川和田晴己様、信岡美穂様、五条久美子様、藤原泰子様には、日々の研生活を送る上で様々な御援助を賜りました。心より感謝申し上げます。

最後に、進学のお機会を与えて頂くと共に、終始暖かく見守ってくれた家族に深く感謝します。

