

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5408650号
(P5408650)

(45) 発行日 平成26年2月5日(2014.2.5)

(24) 登録日 平成25年11月15日(2013.11.15)

(51) Int. Cl. F 1
H 01 M 8/16 (2006.01) H 01 M 8/16

請求項の数 5 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2009-60332 (P2009-60332)	(73) 特許権者	503360115 独立行政法人科学技術振興機構
(22) 出願日	平成21年3月12日 (2009.3.12)		埼玉県川口市本町四丁目1番8号
(65) 公開番号	特開2010-218690 (P2010-218690A)	(73) 特許権者	504137912 国立大学法人 東京大学
(43) 公開日	平成22年9月30日 (2010.9.30)		東京都文京区本郷七丁目3番1号
審査請求日	平成24年3月7日 (2012.3.7)	(74) 代理人	100080089 弁理士 牛木 護
		(74) 代理人	100137800 弁理士 吉田 正義
		(74) 代理人	100148253 弁理士 今枝 弘充
		(74) 代理人	100148079 弁理士 梅村 裕明

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物燃料電池

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

一対の電極と、

有機物と、前記有機物を分解し電子を放出する細胞外電子伝達能を有する微生物と、前記電子を前記一対の電極の一方に伝達するメディエータと

を備える微生物燃料電池において、

前記微生物は光が無い環境下でも細胞外電子伝達能を有し、

前記メディエータがポルフィリンを含有し、

前記ポルフィリンが、水溶性ポルフィリンであって、

前記水溶性ポルフィリンが、鉄ポルフィリン又はマンガンポルフィリンであることを特徴とする微生物燃料電池。 10

【請求項2】

前記一対の電極と、前記有機物と、前記微生物と、前記メディエータとは、容器内に設けられており、

前記容器は、微生物を活性化させるための外部光が遮断され、内部を暗室状態にし得るように構成されている

ことを特徴とする請求項1記載の微生物燃料電池。

【請求項3】

前記水溶性ポルフィリンが、カチオン性であることを特徴とする請求項1又は2記載の微生物燃料電池。 20

【請求項 4】

一对の電極と、有機物と、前記有機物を分解し電子を放出する細胞外電子伝達能を有する微生物と、前記電子を前記一对の電極の一方に伝達するメディエータとを備える微生物燃料電池において、前記微生物は光が無い環境下でも細胞外電子伝達能を有し、前記一方の電極はポルフィリンで修飾され、

前記ポルフィリンが、水溶性ポルフィリンであって、

前記水溶性ポルフィリンが、鉄ポルフィリン又はマンガンポルフィリンであることを特徴とする微生物燃料電池。

【請求項 5】

前記一对の電極と、前記有機物と、前記微生物と、前記メディエータとは、容器内に設けられており、

前記容器は、微生物を活性化させるための外部光が遮断され、内部を暗室状態にし得るように構成されている

ことを特徴とする請求項 4 記載の微生物燃料電池。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、微生物燃料電池に関するものである。

【背景技術】

【0002】

微生物燃料電池は、一对の電極と、前記電極に電気的に接続された外部回路と、前記一对の電極を分離する隔膜とを備え、一方の電極側には *Shewanella* などの細胞外電子伝達能を有する微生物が保持されている。ここで、細胞外電子伝達能とは、金属イオンやその酸化物を電子受容体として利用しこれらを還元する一連の流れによって、生命活動に必要なエネルギーを獲得する能力をいう（非特許文献 1）。このような細胞外電子伝達能のひとつとして、細胞膜に局在化したシトクロムを介して体外に電子を放出するという、*Shewanella loihica*、及び、*Shewanella oneidensis* のような *Shewanella* 属、*Geobacter* 属等の一部の細菌に特有の電子伝達機構がある（非特許文献 2, 3）。

【0003】

このように構成された微生物燃料電池は、微生物が前記一方の電極に電子を伝達することで電気エネルギーを生産するデバイスである。エネルギー源には再生可能なバイオマスや生活排水等に含まれる有機汚染物質を用いることができることから、持続可能なエネルギー源として近年注目されている。また、金属元素を還元、固定する能力を持つ微生物もあり、排水の処理や環境浄化の手段としても注目されている。微生物燃料電池には単一の微生物を用いる系と、排水などに生息する微生物群をそのまま使う混合培養系（例えば、特許文献 1）の 2 つに大別される。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献 1】特開 2006 - 81963 号公報

【特許文献 2】特開 2005 - 235484 号公報

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献 1】Lovley D.R. ; Nat.Rev.Microbiol., 2006, 4, 497-508

【非特許文献 2】Grahnick, J.A. ; Newman, D.K. ; Molecul.Microbiol. 2007, 65, 1-11

【非特許文献 3】Hernandez, M.E. ; Newman, D.K. ; Cell.Mol.Life Sci. 2001, 58, 1562-1571

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

10

20

30

40

50

しかしながら、上記特許文献1などの従来の微生物燃料電池では、既存の白金を触媒に用いた化学燃料電池と比較して電流密度が極めて低いことが問題となり実用の段階からは遠い、というのが現状である。ここ数年エネルギー密度は向上を続けているが、水素燃料電池などの化学燃料電池と比較すると、少なくともさらに数桁程度、電流密度を向上させなければ実用の段階まで進むことはできない。また、特許文献2に述べられているように色素増感タイプの微生物燃料電池が提案されている。これは微生物の光起電力を用いて発電させる方法が述べられているが、下水処理などで用いる場合必ずしも光照射ができる環境にあるとは限らない。

【0007】

従来、出力エネルギー密度を増大させるため、一般的には、HNQ(2-hydroxy-1,4-naphthoquinone)などの電子を伝達する電子メディエータ(以下、単にメディエータという)添加も検討されているが、電流発生量は充分でない。また、従来の微生物燃料電池では、負極における反応が光を必要とするので、構成が制限されると共に、光の強度によって電流量が変化してしまうという問題があった。

【0008】

そこで本発明は上記した問題点に鑑み、光の無い環境下で使用できると共に、電流発生量を増加させることができる微生物燃料電池を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明の請求項1に係る発明は、一对の電極と、有機物と、前記有機物を分解し電子を放出する細胞外電子伝達能を有する微生物と、前記電子を前記一对の電極の一方に伝達するメディエータとを備える微生物燃料電池において、前記微生物は光が無い環境下でも細胞外電子伝達能を有し、前記メディエータがポルフィリンを含有し、前記ポルフィリンが、水溶性ポルフィリンであって、前記水溶性ポルフィリンが、鉄ポルフィリン又はマンガンポルフィリンであることを特徴とする。

【0010】

本発明の請求項2に係る発明は、前記一对の電極と、前記有機物と、前記微生物と、前記メディエータとは、容器内に設けられており、前記容器は、微生物を活性化させるための外部光が遮断され、内部を暗室状態にし得るように構成されていることを特徴とする。

【0012】

本発明の請求項3に係る発明は、前記水溶性ポルフィリンが、カチオン性であることを特徴とする。

【0014】

本発明の請求項4に係る発明は、一对の電極と、有機物と、前記有機物を分解し電子を放出する細胞外電子伝達能を有する微生物と、前記電子を前記一对の電極の一方に伝達するメディエータとを備える微生物燃料電池において、前記微生物は光が無い環境下でも細胞外電子伝達能を有し、前記一方の電極はポルフィリンで修飾され、前記ポルフィリンが、水溶性ポルフィリンであって、前記水溶性ポルフィリンが、鉄ポルフィリン又はマンガンポルフィリンであることを特徴とする。

【0015】

本発明の請求項5に係る発明は、前記一对の電極と、前記有機物と、前記微生物と、前記メディエータとは、容器内に設けられており、前記容器は、微生物を活性化させるための外部光が遮断され、内部を暗室状態にし得るように構成されていることを特徴とする。

【発明の効果】

【0016】

本発明の微生物燃料電池によれば、ポルフィリンを通じて微生物から電極へ電子を伝達させることにより、電極から遠く離れて浮遊した微生物からも電子を電極へ伝達させることができるので、電流密度を増加させることができる。また、外部光の無い環境下でも電力を発生させることができるので、下水配管の中での廃棄物を用いた発電などにも活用で

10

20

30

40

50

きる。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】本実施形態に係る微生物燃料電池の全体構成を示す縦断面図である。

【図2】本実施例に係る電気化学セルの全体構成を示す図であり、(A)斜視図、(B)縦断面の模式図である。

【図3】本発明の実施例1の結果を示す電流-時間曲線である。

【図4】本発明の実施例2の結果を示す電流-時間曲線である。

【図5】本発明の実施例3の結果を示す電流-時間曲線である。

【図6】本発明の実施例4の結果を示す電流-時間曲線である。

10

【図7】本発明の実施例5の結果を示す電流-時間曲線である。

【図8】本発明の実施例6の結果(1)を示す電流-時間曲線である。

【図9】本発明の実施例6の結果(2)を示す電流-時間曲線である。

【図10】本発明の実施例6の結果(3)を示す電流-時間曲線である。

【図11】本発明の実施例6の結果(4)を示す電流-時間曲線である。

【図12】本発明の実施例7に係る電気化学セルの全体構成を示す図であり、(A)斜視図、(B)縦断面の模式図である。

【図13】本発明の実施例7の結果を示す電圧-時間曲線である。

【図14】本発明の実施例7の結果を示す電流-電圧、電力曲線である。

20

【発明を実施するための形態】

【0018】

微生物燃料電池で電流生成を決定する因子は多様であるが、電極の比表面積や装置スケール、電極材料の選択は化学電池でも共通の因子であるのに対し、微生物から電極への電子移動は微生物燃料電池に特有であることから中でも最も重要である。にもかかわらず、微生物から電極への電子移動反応機構について研究し、それを電流密度の増大につなげた研究報告の例はほぼ皆無である。その理由として、電流生成を行う生きた微生物の電極反応を電気化学的に研究するのに適した系が知られていなかったことがあげられる。本発明者はその点に注目して電気化学的研究を行うことによって本発明を行った。

【0019】

以下の説明は、細胞外電子伝達能を有する微生物の一種であるShewanellaを例にとって示す。尚、Shewanellaは、本来、深海に生存する微生物であり、光が無い環境下でも細胞外電子伝達能を発揮する。

30

【0020】

このShewanellaを用いた微生物燃料電池について検討を行った結果、Shewanellaは有機物である多糖体などを吸収し、細胞膜に局在化したシトクロムから電子を細胞外に放出するが、浮遊している細胞外電子伝達能を有するShewanellaは電極の表面近傍のShewanellaのみで電子伝達が行われ、電極から離れた位置で浮遊しているShewanellaでは電子伝達がほとんど行われず電流生成に寄与していないので、電流量を大きくとることができない原因となっていることを見出した。

【0021】

図1に示す微生物燃料電池1は、一对の電極2と、前記電極2を電氣的に接続する外部回路3と、前記一对の電極2を分離する隔膜4とを備える。一对の電極2は、容器5内に設けられ、当該容器5は前記隔膜4で仕切られている。

40

【0022】

隔膜4は、プロトン(H⁺)を選択的に透過させ得るように構成されている。本実施例では、カチオン交換膜を用いることができ、特に限定されるものではないが、例えば、高分子膜や、無機膜を使ったものを用いることができる。

【0023】

容器5内には、電解質が収容されており、一方の電極(負極)2a側には微生物としてのShewanellaを培養した培養液及びShewanellaに養分を供給する燃料としての有機物が注入

50

されている。他方の電極（正極）2bには、酸素を含む空気を供給し得るように構成されている。尚、容器5は、Shewanellaを活性化させるための外部光が遮断されており、内部を暗室状態にし得るように構成されている。

【0024】

有機物は、特に限定されるものではないが、例えば、メタノールやエタノールのようなアルコール類、又は、グルコース等の単糖類、デンプン、アミロース、アミロペクチン、グリコーゲン、セルロース、マルトース、スクロースや、ラクトース等の多糖類を適用することができる。

【0025】

上記負極2aにおいて、Shewanellaの代謝を触媒過程として利用し、燃料となる有機物、例えばグルコースを分解し、Shewanellaの代謝廃棄物として出される電子(e⁻)を伝達することで電気エネルギーを取り出し得るように構成されている。この場合、負極2aにおいて有機物は、二酸化炭素または酢酸などの中間物質に分化される。一方、正極2bでは、酸素還元が起きる。

10

【0026】

かかる構成に加え、本実施形態の場合、負極2a側に注入され電解質と混合した培養液には、メディエータとしてのポルフィリンが添加されている。ポルフィリンは、安定な酸化還元特性を有し、メディエータとして通常用いられているHNQと異なり、電荷を変えることができるので使いやすいという利点がある。

【0027】

20

上記構成において、Shewanellaは、有機物を捕捉すると、内部で電子(e⁻)とプロトン(H⁺)とを生成する。ここで、Shewanellaは、光が無い環境下でも細胞外電子伝達能を発揮するので、暗室状態である容器5内においても電子を生成することができる。

【0028】

培養液中に添加されたポルフィリンは、Shewanellaに接近して、Shewanellaから電子(e⁻)を放出させる。放出された電子(e⁻)は隣接するポルフィリンに伝わり、最終的に負極2aへと運ばれる。これによって、微生物燃料電池1は、ポルフィリンを添加しない場合と比べ大幅な電流生成を生じさせることができる。電子(e⁻)は、外部回路3を介して、正極2bへ移動する。

【0029】

30

また、プロトン(H⁺)は、隔膜4を透過して正極2b側に移動する。正極2b側に移動したプロトン(H⁺)は正極2bから電子(e⁻)を受け取り、空気に含まれる酸素と結合してH₂Oを生成する。このようにして、微生物燃料電池1は、暗室状態である容器5内において、正極2b側で、負極2a側から供給される電子(e⁻)を順次消費することにより、電流生成を生じさせることができる。

【0030】

ポルフィリンは、シトクロムの活性中心であるヘムと構造類似性を持ち、中心金属により酸化還元特性を変えることができる。また、環外周部への置換基導入が可能で、正電荷、負電荷を持たせることができ、ポルフィリンは効率的なメディエータとして作用する。

【0031】

40

ポルフィリンは、Shewanellaが一般的に生存する水に溶ける親水性の方が望ましいが、Shewanellaが親水性以外の液体で生存できるのであれば親水性である必要はない。

【0032】

一般的に、Shewanellaは負に帯電しているので、ポルフィリンは、正に帯電したカチオン性のほうがShewanellaに接近しやすく電流を増大させる効果がより大きくなる。また、正に帯電したカチオン性のポルフィリンは、より強い相互作用（静電的な相互作用）によって、より効率的な電子授受を行うことができる。

【0033】

また、使用するポルフィリンは、中心金属がマンガン(Mn)、鉄(Fe)といったc-シトクロムの酸化還元電位と近いものがより効果がある。

50

【0034】

尚、上記実施形態では、Shewanellaを例にとって説明したが、使用する微生物は細胞外電子伝達能をもつものであれば特に限定されるものではない。例えば、微生物単独でなくミックスドカルチャーと呼ばれる混合形の微生物でもよい。

【0035】

また、上記実施形態では、ポルフィリンを負極2a側のShewanellaが浮遊する培養液中に添加する場合について説明したが、本発明はこれに限らず、負極2aにポルフィリンを修飾させても、同等の電流を増大させる効果が得られる。

【実施例】

【0036】

以下、実施例について説明する。実施例では、光の無い環境下でも電流発生量を増加させることができることを確認するため、全て暗室条件で微生物電流生成値の測定を行った。微生物としては、光が無い環境下でも細胞外電子伝達能を発揮することができるShewanella loihica PV-4を用いた。Shewanella loihica PV-4はATCC(American Type Culture Collection)より購入した(カタログ番号(2008年度版);BAA-1088)。

【0037】

実施例1~6は請求項1~4に対応する。実施例1~5は、負極2a側に注入された培養液にメディエータとしてのポルフィリンを添加した場合の効果について、種々のポルフィリンを用いてそれぞれ確認した。ここで、ポルフィリンは、MnTMPyP[manganese (III) meso-tetrakis(N-methyl-4-pyridyl)porphyrin]、FeTMPyP[iron (III) meso-tetrakis(N-methyl-4-pyridyl)porphyrin]、MnTPPS[manganese (III) meso-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin]、MnTPP[manganese (III) meso-tetraphenylporphyrin]、及びFeTPP[iron (III) meso-tetraphenylporphyrin]を用いた。

【0038】

また、実施例6では、培養液に添加するポルフィリンの濃度と微生物電流生成値との関係について調べた。用いたポルフィリンは、MnTMPyPとし、MnTMPyPの濃度は、1, 5, 20, 30mMとした。

【0039】

さらに、実施例7は、請求項1に対応し、ポルフィリンで修飾した負極を用いた場合の効果を確認した。修飾に用いたポルフィリンは、MnTAPyP [manganese (III) meso-tetrakis(N-aminoethyl-4-pyridyl)porphyrin]である。

【0040】

尚、以下に述べる実施例は電気化学セルでのデータであり、実際の微生物燃料電池の形状とは異なるが、電流増大効果の発現は変化がない。

【0041】

(実施例1) MnTMPyPの例

本実施例で用いた電気化学セル10について、図2を参照して説明する。尚、本図(A)は、電気化学セル10の全体斜視図、本図(B)は、(A)における縦断面を模式的に示す図である。

【0042】

図2に示す電気化学セル10は、上記負極2aに対応する作用極12と、上記正極2bに対応する対極13及び参照極14と、上記容器5に対応する反応槽16とを備え、作用極12と対極13及び参照極14とは外部回路3に電氣的に接続されている。

【0043】

尚、電気化学セル10は隔膜を有さず、反応槽16内が仕切られていない点において、上述した微生物燃料電池1と構成が異なるが、上記したように、電流増大効果の発現は変化がない。実際の使用においては、長期間の使用に耐え得るようになるため、負極2aと正極2bとは隔膜4で仕切るのが好ましいが、以下に述べる実施例では、本発明の特徴的構成であるメディエータとしてポルフィリンを用いた場合の電流値を測定できれば足りるので、隔

10

20

30

40

50

膜4を有さない電気化学セルを用いた。

【0044】

また、反応槽16内は、電解質が収容されており、温度調整用配管17a,17bによって反応槽16の周囲を循環する温度調整用媒体によって一定温度に保持される。

【0045】

本実施例において、反応槽16は、上板18と下板19と、前記上板18及び下板19で保持された筒状部材20とからなる。筒状部材20と下板19との間に、上記作用極12が保持されており、また、上板18に対極13及び参照極14が保持されている。上板18と下板19とはボルト21,21で締結されている。反応槽16内には、MnTMPyPとShewanella loihica PV-4を含む懸濁液が注入され、電解質と混合されている。

10

【0046】

Shewanella loihica PV-4は以下の手順で培養した。寒天培地 (Marine Broth 20 g L⁻¹, Agar(寒天)15 g L⁻¹) 上で保存されているコロニーを1日MB(Marine Broth 20 g L⁻¹) 中、30 °Cで前培養した後に、培養液をDM-Lに替え2日間30 °Cで培養した。遠心分離を行いMnTMPyPを含んだDM-LでShewanella loihica PV-4を懸濁させ図2に示す電気化学測定用の電気化学セル10のシリコンゴム栓15を貫き反応槽16内に注入した。電気化学セル10内のMnTMPyPの濃度は10mMとなるようにした。

【0047】

作用極12にはITO電極 (電極面積 3.14 cm²)、対極13には白金線、参照極14にはAg|AgCl|KCl sat.電極を用い、電解質は電気化学セル10内をDM-L4.0mLとなるように調製した。

20

【0048】

電気測定はHSV-100 (Hokuto Denko) を用いた。作用極12の電位は参照極14に対して+0.2Vに固定した。温度は25 °Cで行い、電気化学セル10を図示しないシールドケース内に配置し、暗室内で測定した。また、比較として、MnTMPyPを含まない電気化学セル10を用いて測定した。

【0049】

尚、DMとは、Defined Mediaの略で、その組成 (各 g L⁻¹) は、NaHCO₃ 2.5、CaCl₂ · 2H₂O 0.08、NH₄Cl 1.0、MgCl₂ · 6H₂O 0.2、NaCl 10、2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid (HEPES、緩衝溶液) 7.2である。Shewanella loihica PV-4への電子供与体としてsodium lactate (ラクテート) を10mM、また本培養時にはShewanella loihica PV-4に必要な微量な養分を供給するため有機物としてyeast extractを0.5g L⁻¹も加えた。以下ラクテートの入ったDM培地をDM-Lと記す。

30

【0050】

また、MnTMPyPは、以下の手順で生成した。まず、TMPyPを合成した。TMPyP [meso-tetrakis(N-methyl-4-pyridyl)porphyrin]の金属錯体を合成するにあたり、まず金属フリーのTPyP[meso-tetrakis(4-pyridyl)porphyrin]を合成した (Ref. A. D. Adler et al J. Org. Chem., 1967, 32, 467.、 R. F. Pasternack et al J. Am. Soc. Chem., 1972, 94, 4511-4517.)。酢酸中にピロールと4-ピリジルカルボキシアルデヒドを加えて120 °Cで2時間還流した。減圧して酢酸を留去した後に、カラムクロマトグラフィー (溶媒:クロロホルム・メタノール、充填剤:シリカゲル) で精製後、クロロホルム/メタノールで再結晶させてTPyPを得た。この得られたTPyPをN, N-ジメチルホルムアミド(DMF)に溶かし、p-トルエンスルホン酸メチルを加えて150 °Cで12時間還流した。氷冷し濾別にてTMPyPを得た。

40

【0051】

このようにして得たTMPyPを用いてMnTMPyPを合成した (Ref. J.-H. Fuhrhop et al Inorg. Chem., 1998, 37, 6052-6059.)。すなわち、TMPyPをDMFに溶かし、酢酸マンガニ(II)を加えて140 °Cで3時間攪拌した。減圧してDMFを留去した後、純水に溶解しそこにアンモニウムヘキサフルオロホスフェートを加えて沈殿させ濾別した。純水に溶解し陰イオン交換樹脂 (塩化物イオン) に通して、エバポレーターで溶媒を除去し、減圧して乾燥させ、MnTMPyPを得た。その結果得られたMnTMPyPとShewanella loihica PV-4を含む懸濁液を

50

電気化学セル10内に注入した。

【0052】

このようにして構成された電気化学セル10では、*Shewanella loihica* PV-4がラクターを捕捉すると、内部で電子(e^-)とプロトン(H^+)とを生成する。

【0053】

電気化学セル10内に添加されたMnTMPyPは、*Shewanella loihica* PV-4に接近して、*Shewanella loihica* PV-4から電子(e^-)を放出させる。放出された電子(e^-)は隣接するMnTMPyPに伝わり、最終的に作用極12へと運ばれる。電子(e^-)は、外部回路3を介して、対極13へ移動する。

【0054】

また、プロトン(H^+)は、対極13側に移動する。対極13側に移動したプロトン(H^+)は対極13から電子(e^-)を受け取り、空気に含まれる酸素と結合して H_2O を生成する。このようにして、電気化学セル10は、暗室状態において、作用極12側から対極13側へ電子(e^-)が流れることにより発生する微生物電流生成値を測定した。

【0055】

この結果、得られた電流 - 時間曲線を図3に示す。MnTMPyPを添加した場合は、MnTMPyPが存在しない(*Shewanella loihica* PV-4のみ)時に比べて、微生物電流生成値が25倍以上に飛躍的に向上した。尚、10時間以降に見られる電流の減少は、燃料であるラクターの消費に帰属される。

【0056】

(実施例2) FeTMPyPの例

実施例1と同様に、*Shewanella loihica* PV-4を培養したDM-L中にFeTMPyPを添加した懸濁液を電気化学セル10に注入した。電気化学セル10内でのFeTMPyPの濃度は10mMとなるようにした。また、比較として、FeTMPyPを含まない電気化学セル10を用いて測定した。電気化学セル10はシールドケース内に配置し、暗室内で測定した。

【0057】

尚、FeTMPyPは、以下の手順で生成した(Ref. R. F. Pasternack et al J. Inorg. Nucl. Chem., 1977, 39, 1865-1870.)。すなわち、上記実施例1にて得たTMPyPをDMFに溶かし、塩化鉄(II)を加えて140°Cで8時間攪拌した。減圧してDMFを留去した後、純水に溶解しそこにアンモニウムヘキサフルオロホスフェートを加えて沈殿させ濾別した。純水に溶解し陰イオン交換樹脂(塩化物イオン)に通して、エバポレーターで溶媒を除去し、減圧して乾燥させ、FeTMPyPを得た。

【0058】

この電気化学セル10を用いたときの電流 - 時間曲線を図4に示す。FeTMPyPを添加した場合は、FeTMPyPが存在しない(*Shewanella loihica* PV-4のみ)場合と比べ、微生物電流生成値が15倍以上増加した。

【0059】

(実施例3) MnTPPSの例

実施例1と同様に、*Shewanella loihica* PV-4を培養したDM-L中にMnTPPSを添加した懸濁液を電気化学セル10に注入した。電気化学セル10内でのMnTPPSの濃度は、10mMとなるようにした。また、比較として、MnTPPSを含まない電気化学セル10を用いて測定した。電気化学セル10はシールドケース内に配置し、暗室内で測定した。

【0060】

尚、MnTPPSは、以下の手順で生成した(Ref. A. D. Adler et al J. Org. Chem., 1967, 32, 467.、 M. Tsutsui et al J. Org. Chem., 1973, 38, 2103.、 J.-H. Fuhrhop et al Inorg. Chem., 1998, 37, 6052-6059.)。まず、酢酸中にピロールとベンズアルデヒドを加えて120°Cで2時間還流した。減圧して酢酸を留去した後に、カラムクロマトグラフィー(溶媒:クロロホルム・ヘキサン、充填剤:シリカゲル)で精製後、クロロホルム/ヘキサンで再結晶させてTPP[meso-tetraphenylporphyrin]を得た。このようにして得られたTPPに濃硫酸を加えて90°Cで5時間攪拌した後に、室温でさらに2日間攪拌した。純

10

20

30

40

50

水で希釈し酸化カルシウムで中和した後、固形分を濾過にて除きエバポレーターで濃縮した。炭酸水素ナトリウムを加えてpHを9とし、固形分を濾過にて除いた後、エバポレーターで溶媒を除去した。純水に溶解し陽イオン交換樹脂（水素イオン）に通して、エバポレーターで溶媒を除去し、TPPSを得た。このTPPSをメタノールに溶かし、ナトリウムメトキシドを加えエバポレーターで溶媒を除去した。残渣を純水に溶解し、酢酸マンガ(II)を加えて85°Cで3時間攪拌した。純水で希釈し陽イオン交換樹脂に通して、エバポレーターで溶媒を除去した。メタノールに溶解、ナトリウムメトキシドを加えエバポレーターで溶媒を除去し、減圧して乾燥させ、MnTPPSを得た。

【0061】

この電気化学セル10を用いたときの電流 - 時間曲線を図5に示す。MnTPPSを添加した場合は、MnTPPSが存在しない（*Shewanella loihica* PV-4のみ）場合に比べ、微生物電流生成値が4倍程度増加した。

10

【0062】

（実施例4）MnTPPの例

本実施例は、実施例1に対し、*Shewanella loihica* PV-4を本培養の際に、MnTPPのN,N-dimethylformamide溶液(1mM)を200mL加えて培養して得たDM-Lを電気化学セル10に注入した点が異なる。また、比較として、MnTPPを含まない電気化学セル10を用いて測定した。電気化学セル10はシールドケース内に配置し、暗室内で測定した。

【0063】

尚、MnTPPは、以下の手順で生成した（Ref. A. D. Adler et al J. Inorg. Nucl. Chem., 1970, 32, 2443-2445.）。すなわち、上記実施例5にて得たTPPをクロロホルムに溶かし、少量のメタノールに溶かした塩化マンガ(II)を加えて70°Cで8時間還流した。反応混合物を飽和食塩水で洗いクロロホルムで抽出、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後にエバポレーターで溶媒を除去した。カラムクロマトグラフィー（溶媒：クロロホルム・メタノール、充填剤：シリカゲル）で精製後、クロロホルム/ヘキサンで再結晶させてMnTPPを得た。

20

【0064】

この電気化学セル10を用いたときの電流 - 時間曲線を図6に示す。MnTPPを添加した場合は、MnTPPが存在しない（*Shewanella loihica* PV-4のみ）場合に比べ、微生物電流生成値が2倍以上増加した。

30

【0065】

（実施例5）FeTPPの例

本実施例は、実施例1に対し、*Shewanella loihica* PV-4を本培養の際に、FeTPPのN,N-dimethylformamide溶液(1mM)を200mL加えて培養して得たDM-Lを電気化学セル10に注入した点が異なる。また、比較として、FeTPPを含まない電気化学セル10を用いて測定した。電気化学セル10はシールドケース内に配置し、暗室内で測定した。

【0066】

尚、FeTPPは、以下の手順で生成した（Ref. A. D. Adler et al J. Inorg. Nucl. Chem., 1970, 32, 2443-2445.）。すなわち、上記実施例5にて得たTPPをクロロホルムに溶かし、少量のメタノールに溶かした塩化鉄(II)を加えて70°Cで8時間還流した。反応混合物を飽和食塩水で洗いクロロホルムで抽出、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後にエバポレーターで溶媒を除去した。カラムクロマトグラフィー（溶媒：クロロホルム・メタノール、充填剤：シリカゲル）で精製後、クロロホルム/ヘキサンで再結晶させてFeTPPを得た。

40

【0067】

この電気化学セル10を用いたときの電流 - 時間曲線を図7に示す。FeTPPを添加した場合は、FeTPPが存在しない（*Shewanella loihica* PV-4のみ）場合に比べ、微生物電流生成値が2倍以上増加した。

【0068】

（実施例6）MnTMPyPの濃度の影響

実施例1と同様に、*Shewanella loihica* PV-4を培養したDM-L中にMnTMPyPを添加した懸

50

濁液を電気化学セル10に注入し、当該電気化学セル10内の濃度が1, 5, 20, 30mMとなる4種の電気化学セル10を用意した。電気化学セル10はシールドケース内に配置し、暗室内で測定した。

【0069】

この電気化学セル10を用いたときの電流 - 時間曲線を図8～図11に示す。MnTMPyPを添加した場合は、MnTMPyPが存在しない (Shewanella loihica PV-4のみ) 場合に比べ、微生物電流生成値がそれぞれ3, 18, 20, 18倍程度増加した。

【0070】

(実施例7) ポルフィリン (MnTAPyP) で修飾したグラファイト電極を用いた例

本実施例で用いた電気化学セル30について、図12を参照して説明する。尚、本図(A)は、電気化学セル30の全体斜視図、本図(B)は、(A)におけるボルトの長手方向を縦とした場合の縦断面を模式的に示す図である。

10

【0071】

電気化学セル30は、負極31と、正極32と、上記容器5に対応する反応槽33とを備え、負極31及び正極32は外部回路3に電氣的に接続されている。尚、電気化学セル30は隔膜を有さず、反応槽33内が仕切られていない点において、上述した微生物燃料電池1と構成が異なるが、上記したように、電流増大効果の発現は変化がない。

【0072】

本実施例において、反応槽33は、上板34と下板35と、筒状部材36と、正極保持部37とを有する。筒状部材36と正極保持部37とは、上板34と下板35とで挟持されている。筒状部材36の側面には、シリコンゴム栓38が設けられており、当該シリコンゴム栓38を通じて負極31が反応槽33内に保持されている。また、正極保持部37は、板状の正極32を反応槽33内に露出した状態で保持し得るように構成されている。上板34と下板35とはボルト21, 21で締結されている。この反応槽33内には、微生物、及び有機物を含む電解質が設けられている。

20

【0073】

電気化学セル30において、微生物源として水田の土を0.2g(wet)、電解質としてリン酸バッファー(200mM、pH 6.8)12mL、有機物としてstarch、peptone、fish extractを混合したもの(75g COD/L)、負極31としてポルフィリンで修飾したグラファイト電極(1 cm²)、正極32として白金(8 mg/cm²)を保持した炭素シートを使用した空気極(7 cm²)、外部回路3として10 k ohmの外部抵抗を用いた。尚、グラファイト電極はチタン線と接合され、シリコンゴム栓38を通じて電気化学セル30に組み込まれている。このように構成された電気化学セル30は30 °C保温庫に配置、暗室条件で測定した。測定にはHA-1510(Hokuto Denko)を用いた。

30

【0074】

尚、グラファイト電極は以下のようにして作製した。

【0075】

まず、グラファイトフェルトを濃硫酸、濃硝酸(3:1)の混酸に浸し超音波処理を6時間行った。グラファイトフェルトを取り出し、純水で酸が出なくなるまで洗ったのち、乾燥させた。

40

【0076】

一方、MnTAPyPは、以下の手順で合成した(Ref. S. Asanuma et al Bioconjugate Chem., 2004, 15, 1360-1365.)。すなわち、上記実施例1にて得たTPyPをDMFに溶かし、1-プロモエチルアンモニウムブロミドを加えて150 °Cで12時間還流した。DMFを留去したのちジクロロメタンで洗い純水で抽出した。エバポレーターで溶媒を除去した。得られたTAPyPをDMFに溶解し酢酸マンガンを(II)を加え140 °Cで3時間攪拌した。減圧してDMFを留去した後、純水に溶解しそこにアンモニウムヘキサフルオロホスフェートを加えて沈殿させ濾別しMnTAPyPを得た。

【0077】

次いで、上記のMnTAPyPをDMFに溶解し上記のグラファイトフェルトを溶液に浸した。少

50

量のトリエチルアミンを加え、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩と1-ヒドロキシベンゾトリアゾールを加え0°Cで2時間攪拌した後、室温で1日攪拌にした。グラファイトフェルトを取り出し、純水でポルフィリンの色が出なくなるまで洗ったのち、乾燥させた。このようにして、ポルフィリンで修飾したグラファイト電極を作製した。

【0078】

このグラファイト電極を用いた場合の電圧 - 時間曲線を図13に示す。ポルフィリンで修飾したグラファイト電極は、ポルフィリンで修飾していない電極に比べて、微生物による起電力値が1.5倍程度増加した。図14に電圧 - 電流、電力曲線を示す。ポルフィリンで修飾していない電極に比べて、電力が2倍以上増加した。

10

【0079】

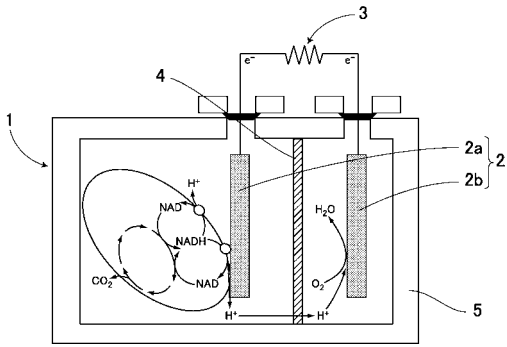
以上の結果から、ポルフィリンを微生物の培養液に添加することにより、ポルフィリンを添加しない場合に比べ、大きな電流量を得られることが確認できた。また、ポルフィリンで修飾した電極を負極に用いた場合には、ポルフィリンを微生物の培養液に添加した場合と同等の電流量が得られることが確認できた。

【符号の説明】

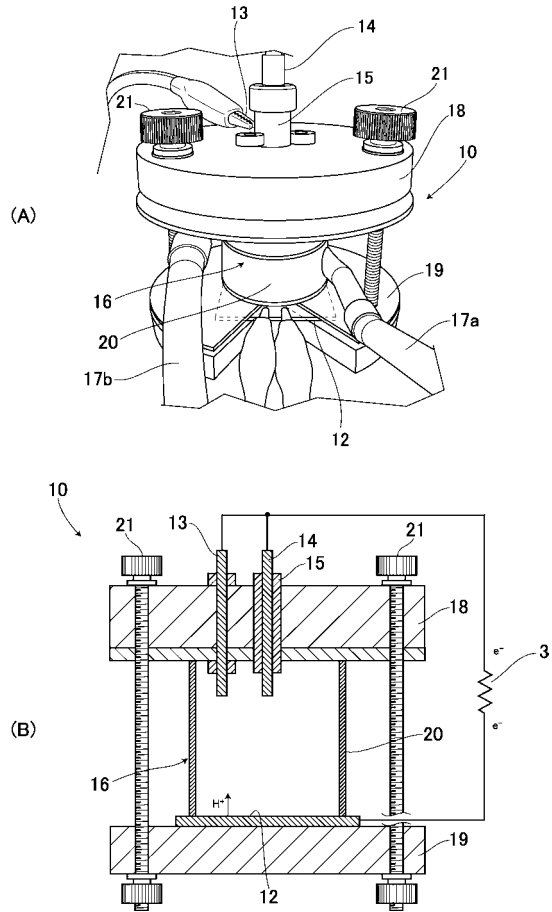
【0080】

1	微生物燃料電池	
2	電極	
2a	負極	20
2b	正極	
3	外部回路	
4	隔膜	
5	容器	
10	電気化学セル	
12	作用極	
13	対極	
14	参照極	
15	シリコンゴム栓	
16	反応槽	30
17a	温度調整用配管	
18	上板	
19	下板	
20	筒状部材	
21	ボルト	
30	電気化学セル	
31	負極	
32	正極	
33	反応槽	
34	上板	40
35	下板	
36	筒状部材	
37	正極保持部	
38	シリコンゴム栓	

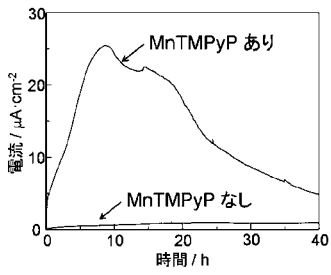
【図1】



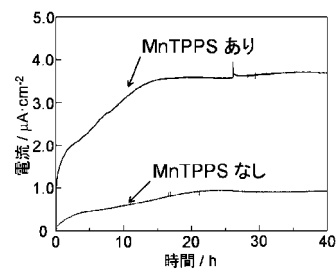
【図2】



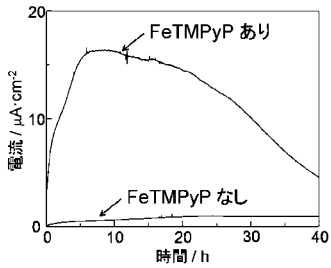
【図3】



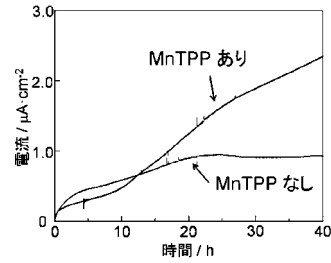
【図5】



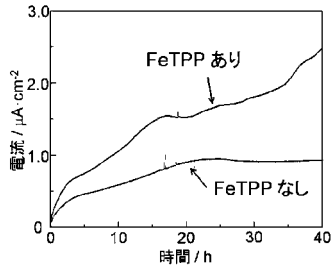
【図4】



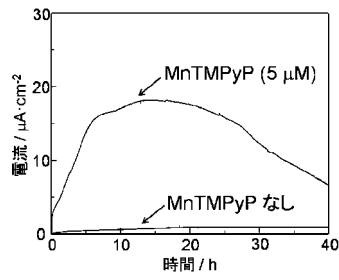
【図6】



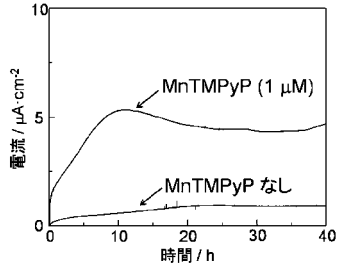
【 図 7 】



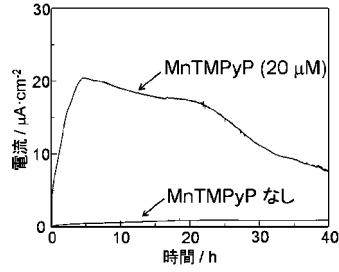
【 図 9 】



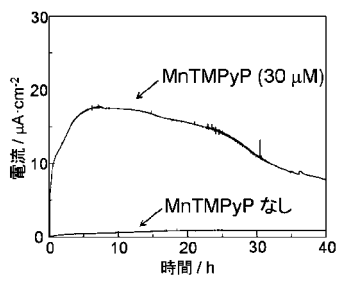
【 図 8 】



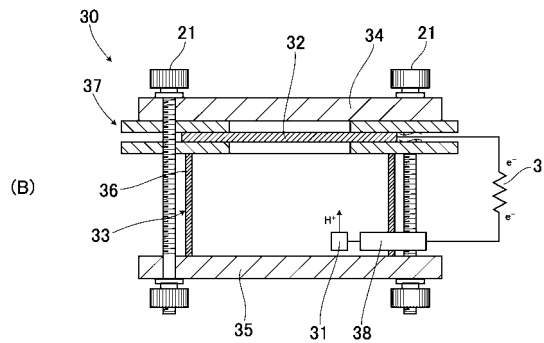
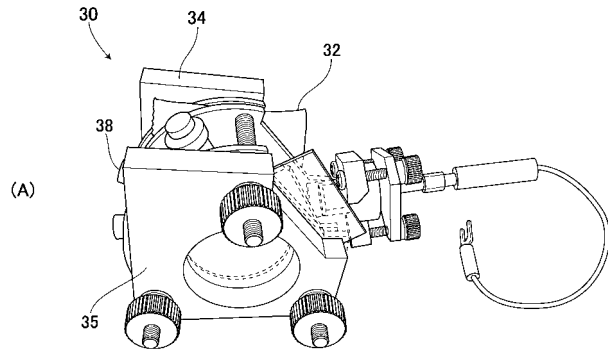
【 図 10 】



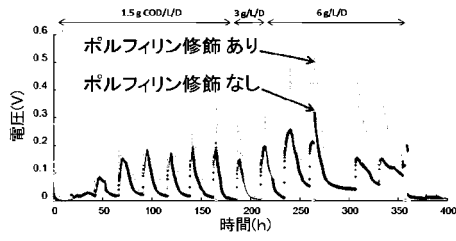
【 図 11 】



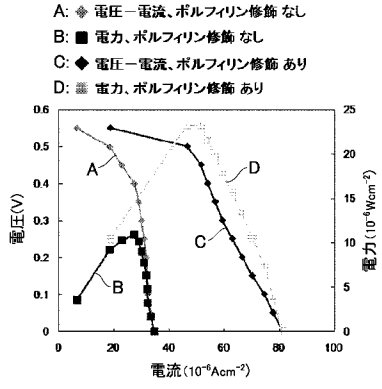
【 図 12 】



【図13】



【図14】



フロントページの続き

- (72)発明者 橋本 和仁
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内
- (72)発明者 石井 和之
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内
- (72)発明者 森 重樹
東京都世田谷区代田1-35-9アティアスハイム101号

審査官 増山 慎也

- (56)参考文献 特開2006-331706(JP,A)
特開2006-179223(JP,A)
特開2005-317520(JP,A)
特開2007-117996(JP,A)
特開2007-090232(JP,A)
特開平10-233226(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
H01M 8/16