水酸アパタイトを用いたプロトン伝導性無機・有機コンポジット膜の 作製と燃料電池発電特性

室山 健治, 棟方 裕一, 金村 聖志*

首都大学東京大学院都市環境科学研究科環境調和・材料化学専攻 (〒192-0397 八王子市南大沢1-1)

Preparation and Fuel Cell Performance of Proton Conductive Hydroxyapatite Doped Composite Membranes

Kenji MUROYAMA, Hirokazu MUNAKATA, and Kiyoshi KANAMURA *

Department of Applied Chemistry, Graduate School of Urban Environmental Sciences, Tokyo Metropolitan University (1-1 Minami-Osawa, Hachioji, Tokyo 192-0397, Japan)

Received June 4, 2007 ; Accepted July 31, 2007

The biocompatible composite membranes consisting of hydroxyapatite (HAp) and proton-conductive polymers such as poly (2-acrylamido-2-methylpropane sulfonic acid) (PAMPS), poly styrene sulfonic acid (PSSA), and Nafion[®] were prepared. High mechanical stability was given to the composite membranes by needle-like HAp crystallites deposited by a setting reaction of calcium phosphate cement. The proton conductivity of composite membranes was strongly influenced by distribution of HAp and polymer, and changed in the range from 8.7×10^{-3} S cm⁻¹ to 4.5×10^{-4} S cm⁻¹ at 30 °C under 95 % relative humidity. The H₂-O₂ fuel cell based on the PAMPS composite membrane exhibited a promising performance of 20 mA cm⁻² at 0.5 V and 30 °C as a candidate for the micro-fuel cells for biocompatible devices.

Key Words : Hydroxyapatite, Calcium Phosphate Cement, Composite Membrane, Fuel Cell

1 緒 言

重症糖尿病患者や人工臓器の開発に必要な体内留置型のグルコースセンサーが現在活発に研究されている¹⁾。体内留置型のデバイスを構築する上で重要となるのが生体親和性である。生体親和性が不十分であると、センサー表面へタンパク質等が吸着し被膜が形成され、センサーが機能なくなってしまう。そのため、生体親和性のある高分子膜でセンサー表面を覆う試みがなされている。このような膜としてポリウレタン²⁾、Nafion[®]³⁾、ポリビニルアルコール-ヘパリン複合ハイドロゲル⁴⁾、2-ヒドロキシエチルメタクリレート-ポリ(エチレングリコール)テトラアクリレート-エチレンジメタクリレート共重合体⁵⁾などが検討されている。Nafion[®]などの有機ポリマーを添加したテトラエチルシリケートのゾル・ゲルコーティングを検討した例⁶⁾もある。これらの方法でセンサーへ付与される抗血栓性は、ヘパリンやNafion[®]に含まれるスルホン酸基に関係するものと考えられている。

スルホン酸基を有するポリマーはプロトン伝導性を有するため、固体高分子形燃料電池の電解質膜としても用いられる。Nafion[®]等のパーフルオロカーボンスルホン酸ポリマーに加え、様々な炭化水素系ポリマーの使用が検討されている。これらのポリマーを燃料電池の電解質膜として用いる場合、プロトン伝導性に加え、高い形態安定性が必要となる。特にメタノールなどの液体燃料を用いる場合には、膜の膨潤による

燃料のクロスオーバーが顕著となるため、形態安定性は更に重要な要素となる。形態安定性を高める方法として、ポリマー自体の構造制御の他に無機材料とのコンポジット化が検討されている。シリカ、チタニア、水酸アパタイト等⁷⁻¹⁰⁾の無機粒子やリン酸ジルコニウム¹¹⁾、ヘテロポリ酸¹²⁾等の無機酸を添加した無機・有機コンポジット膜が報告されている。これらはいずれも有機ポリマーをマトリックスとして無機物質が添加されている。一方、無機物質をマトリックスとしたコンポジット膜¹³⁾も開発されている。

水酸アパタイト (Ca₅(PO₄)₃OH, HAp) に代表されるリン酸カルシウム系化合物は生体親和性に優れた機能性セラミックスであり、整形外科や歯科の分野で人工骨や人工歯根等の材料として利用されている。その利用形態は二つに大別される。緻密体或多孔体、あるいは顆粒などの焼結体として用いられるものと、セッコウやセメントのように凝結硬化する性質を利用したものがあり、後者は特にリン酸カルシウムセメントとよばれる。このリン酸カルシウムセメントはオルトリン酸カルシウム化合物の混合体から構成される。例えば、 α -リン酸三カルシウム (Ca₃(PO₄)₂, α -TCP)¹⁴⁾ は単独、あるいはリン酸水素カルシウム二水和物 (CaHPO₄·2H₂O, DCPD)、リン酸二水素カルシウム一水和物 (Ca(H₂PO₄)₂·H₂O) との混合体として用いられ、リン酸四カルシウム (Ca₄(PO₄)₂O, TeCP)¹⁵⁾ は α -TCP, DCPD、リン酸水素カルシウム無水和物

(CaHPO₄, DCP) との混合体として用いられる。これらの粉体を水あるいは酸と練和し、ペーストにしたものを常温付近で保持すると、水和反応を起こし水酸アパタイトやリン酸八カルシウム (Ca₈H₂(PO₄)₆·5H₂O) などへ転化する。転化の際に結晶同士が絡み合うように析出し凝結硬化が起るため、ペーストを鋳型へ充填しておけば、その形を反映したアパタイトの多孔体を得ることができる。こうした性質を利用して作製された骨補填剤¹⁶⁾ や歯内療法剤¹⁷⁾ が既に商品化されている。生体親和性の材料の中で水酸アパタイトが注目される理由の一つは、骨や歯などの硬組織だけでなく軟組織に対しても生体親和性を有するという点である。軟組織である皮膚内へ水酸アパタイト材料をインプラントしても、埋入物に沿う表皮の下降や炎症性血球細胞の浸潤が起らないことが確認されている¹⁸⁾。

本研究では、リン酸カルシウムの水和で得られる水酸アパタイトとスルホン酸基をもつ有機ポリマーからなる無機・有機コンポジット電解質膜を作製し、生体用マイクロ燃料電池の電解質膜として検討した。生体親和性の高い材料で電池を構築できれば、センサー部分と電源部分が一体化された体内留置型デバイスの実現が期待できる。原料にモノマーとポリマーを用いた二種類のコンポジット膜について検討を行い、プロトン伝導性、燃料電池特性を評価したので報告する。

2 実験

2.1 水酸アパタイト・プロトン伝導性ポリマーコンポジット電解質の調製

水酸アパタイト (Ca₅(PO₄)₃OH, HAp, 太平洋化学産業(株) HAP200) を 1450℃ で熱分解し、リン酸三カルシウム (Ca₃(PO₄)₂, α-TCP) とリン酸四カルシウム (Ca₄(PO₄)₂O, TeCP) の混合物を調製した。これを粉砕し、ふるいを用いて粒径が 75 μm 以下のリン酸カルシウム粉末を得た。モノマーを用いた場合とポリマーを用いた場合の二種類についてコンポジット膜の作製を検討した。プロトン伝導性モノマーとしては、2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸 (AMPS, 和光純薬工業(株)) を用いた。AMPS の水溶液にリン酸カルシウム粉末をそのまま添加すると急激に AMPS の重合反応が進行しペーストが得られない。そこで AMPS 水溶液に水酸化ナトリウム (NaOH, 和光純薬工業(株)) を加えて中和したものを調製し、架橋剤として N,N'-メチレンビスアクリルアミド (MBA, 和光純薬工業(株))、重合開始剤として過硫酸アンモニウム (APS, 和光純薬工業(株)) を加え、リン酸カルシウム粉末と混合攪拌することでペーストを得た。PAMPS ゲル成分 (AMPS + MBA + APS) とリン酸カルシウム粉末の総

量に対して PAMPS ゲル成分の割合が 10 wt% (PAMPS 10%) あるいは 20 wt% (PAMPS 20%) となるようにリン酸カルシウム粉末を添加した。原料の混合割合を Table 1 に示す。また、比較のために同様の配合でリン酸カルシウム粉末を含まない PAMPS ゲル膜を作製した。一方、ポリマーとの複合化では、ポリスチレンスルホン酸 (PSSA) と Nafion® を複合化ポリマーとして用いた。純水 20 g に対して 5.0 g の *p*-スチレンスルホン酸ナトリウム (SSA, 和光純薬工業(株)) と 0.05 g の APS を溶解させ、60℃ で 24 h 保持することで重合を行い、乾燥後に PSSA を得た。PSSA を純水に溶解し、PAMPS の場合と同様に、PSSA の割合が 10 wt% あるいは 20 wt% となるようにリン酸カルシウム粉末を添加してペーストとした。PSSA 単体の膜に関しては、架橋構造が無く機械的強度が低いため作製できなかった。Nafion® の場合には、粉末 (Nafion-p) と 10 wt% Nafion® 水溶液 (Nafion-s) (Aldrich) を用いた二種類のコンポジット膜について検討した。Nafion® NR50 (Aldrich) を粉砕して得た大きさ数 10 μm の粒子を Nafion-p として用いた。Nafion-p が 10 wt% となるようにリン酸カルシウム粉末を混合し、さら純水を加えてペーストを調製した。同様に Nafion® の割合が 10 wt% となるように Nafion-s にリン酸カルシウム粉末を添加してペーストを調製した。

調製したペーストをガラス板とシリコンゴムシートから作製した鋳型に充填し、60℃ の恒温槽中で 4 日間保持してコンポジット膜を得た。コンポジット膜の大きさが 30 × 30 mm、厚さが 1.3 mm となるように鋳型を調整した。コンポジット膜中の結晶相を X 線回折 (XRD) で同定し、微細構造を走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察した。

2.2 プロトン伝導性の測定と発電特性の評価

作製した電解質膜を 0.1 mol dm⁻³ の HCl へ浸漬後、純水で良く洗浄し、PAMPS 及び PSSA のイオン交換基を H⁺ 型に変換した。Nafion® を用いたコンポジット膜に関してはそのまま純水に浸漬した。膜表面の余分な水分を拭き取り、金電極で膜を挟持して恒温恒湿槽中に静置した。湿度を 95% に保ち、温度を変化させて 5 Hz から 13 MHz の周波数範囲でインピーダンスを測定した (YHP 4192A)。抵抗値、膜厚、金電極の見かけの面積を用いて膜のプロトン伝導性を算出した。

ガラス製のセルを用いて電解質膜の両面へ電極を接触させ、恒温恒湿槽中で発電特性試験を行った。白金黒メッキを施した白金メッシュを電極として用いた。加湿した水素と酸素を 20 ml min⁻¹ の流速でセルへ供給した。定電流電源装置を用いて湿度 95%、温度 30℃ の環境下で電流電圧特性を定電流法により測定した。

Table 1 Mix proportions of the samples (weight %).

Sample	AMPS	MBA	APS	NaOH	SSA	Nafion-p	Nafion-s	Cement	Water
PAMPS 10%	7.04	0.35	0.07	1.39	—	—	—	67.16	23.99
PAMPS 20%	14.98	0.75	0.16	2.95	—	—	—	63.52	17.64
PAMPS gel	48.53	2.43	0.51	—	—	—	—	—	48.53
PSSA 10%	—	—	0.07	—	7.50	—	—	68.11	24.32
PSSA 20%	—	—	0.16	—	15.44	—	—	62.20	22.20
Nafion-p 10%	—	—	—	—	—	7.00	—	63.00	30.00
Nafion-s 10%	—	—	—	—	—	—	52.63	47.37	—

3 結果と考察

リン酸カルシウム、リン酸カルシウムのみを水和させた硬化体、及び各コンポジット膜の粉末X線回折パターンをFig. 1に示す。リン酸カルシウムの場合にはFig. 1 (a)に示すように α -TCPとTeCPのピークのみが観察された。これはHApが完全に熱分解されていることを示す結果である。一方、リン酸カルシウムのみを水和させた硬化体とコンポジット膜の場合には、HAp由来のピークが主となった。これは混和するモノマーやポリマーの種類に依らずリン酸カルシウムの大部分が水和反応によりHApに転化されたことを示唆している。しかしながら、TeCPのピークも若干観察されており、本実験条件では転化が完全には進行しないものと考えられる。また、PAMPSやPSSAの含有量が増えるとHApのピークがブロードになることから、コンポジット化によりHApの結晶成長自体も影響を受けているものと考えられる。これは添加したポリマーが酸として働くためであり、ポリアクリル酸との複合化¹⁹⁾やクエン酸を添加した場合²⁰⁾にも同様の結果が報告されている。

Fig. 2に各試料の破断面のSEM写真を示す。リン酸カルシウムのみを水和して得た硬化体では、Fig. 2 (a)に示すように数 μm のHApの針状結晶が絡み合った構造が観察された。PAMPSを含むコンポジット膜の場合も同様の針状結晶が観察され、PAMPS量が増加するのに従って結晶の隙間がポリマーで充填されてゆくことが明らかとなった。PAMPS量が

Fig. 1 Powder X-ray diffraction patterns of (a) calcium phosphate cement, (b) hydrated calcium phosphate cement (no additives), and composite membranes: (c) PAMPS 10 wt %, (d) PAMPS 20 wt %, (e) PSSA 10 wt %, (f) PSSA 20 wt %, (g) Nafion-p 10 wt %, (h) Nafion-s 10 wt %. ●: HAp, □: TeCP, ▲: α -TCP.

Fig. 2 SEM photographs (in high magnification) of fractured surfaces of (a) hydrated calcium phosphate cement (no additives), and composite membranes: (b) PAMPS 10 wt %, (c) PAMPS 20 wt %, (d) PSSA 10 wt %, (e) PSSA 20 wt %, (f) Nafion-p 10 wt %, (g) Nafion-s 10 wt %.

Fig. 3 SEM photographs (in low magnification) of fractured surfaces of (a) hydrated calcium phosphate cement (no additives), and composite membranes: (b) PAMPS 10 wt%, (c) PAMPS 20 wt%, (d) PSSA 10 wt%, (e) PSSA 20 wt%, (f) Nafion-p 10 wt%, (g) Nafion-s 10 wt%.

20 wt%になるとHApの針状結晶がほぼPAMPSで被覆されている様子が観察された。一方、PSSAを用いたコンポジット膜では、PSSA量が20 wt%の場合でもFig. 2 (e)に示すように細かな空隙が数多く観察された。また、小さなHApの結晶が多く観察された。これは共存するポリマーの種類によってHApの析出状態が変化することを反映した結果であり、XRD測定で得られた結果と良く一致している。Nafion[®]を含むコンポジット膜では、Nafion-p、Nafion-sのどちらの材料を用いた場合もHAp部分とNafion[®]部分が分離した不均一な構造となった。Fig. 3に同じ試料の低倍率SEM写真を示す。Fig. 2の微細構造を良く反映した構造が観察された。モノマーを使用して作製したPAMPSコンポジット膜が非常に均一な構造を有するのに対して、ポリマーであるPSSAやNafion[®]を混合して作製したコンポジット膜の構造は、数10 μmの空隙を所々に有する不均一なものであった。特にPSSA、Nafion-sとリン酸カルシウム粉末を混合して得られるペーストは非常に粘性が高いため、気泡がペーストの内部に取り込まれ、空隙となったものと考えられる。以上の結果から、均一な構造を有するコンポジット膜を得るためには、AMPSのようなモノマーをリン酸カルシウムへの添加物として用いることが望ましいと考えられる。

Fig. 4に交流インピーダンス法で求めた各試料のプロトン伝導性を示す。30℃におけるプロトン伝導性はPAMPSゲル膜、20 wt% PAMPSコンポジット膜、10 wt% PAMPSコ

ンポジット膜でそれぞれ $1.3 \times 10^{-1} \text{ S cm}^{-1}$ 、 $8.7 \times 10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$ 、 $2.7 \times 10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$ となり、体積当たりのPAMPS量を反映した伝導性が得られた。PSSAやNafion[®]を用いたコンポジット膜の場合も同様にポリマー量によって伝導性が変化した。全体的に伝導性は低い値となった。伝導性を支配するもう一つの要素として、コンポジット膜中でのポリマーの分散性が考えられる。高いプロトン伝導性を得るためには均一なプロトン伝導パスの形成が必要である。PSSAやNafion[®]を用いて作製したコンポジット膜で十分な伝導性が得られなかったのは、Fig. 2, 3に示した不均一な構造に起因するものと考えられる。温度依存性から求めた各試料におけるプロトン伝導の活性化エネルギーをTable 2に示す。ポリマーの種類がNafion[®]、PAMPS、PSSAと変化するにつれて活性化エネルギーが増加した。また、PAMPSを用いた電解質膜の活性化エネルギーは、PAMPSゲル膜、20 wt% PAMPSコンポジット膜、10 wt% PAMPSコンポジット膜でそれぞれ0.13 eV、0.22 eV、0.23 eVとなり、コンポジット化により値が増大した。これはプロトン伝導パスの形成状態が異なることを示唆するものであり、HApの結晶析出による影響と考えられる。

各コンポジット膜を用いて水素-酸素燃料電池を作製し、30℃で評価した結果をFig. 5に示す。Fig. 4のプロトン伝導性の序列を良く反映した結果となり、20 wt%のPAMPSを含むコンポジット膜が最も良い発電特性を示した。最大電流密度として約 12 mA cm^{-2} が得られた。作製したコンポジ

Fig. 4 Arrhenius plots of conductivity of a PAMPS gel membrane (■) and composite membranes (○: PAMPS 10 wt%, ●: PAMPS 20 wt%, △: PSSA 10 wt%, ▲: PSSA 20 wt%, +: Nafion-p 10 wt%, ×: Nafion-s 10 wt%).

Fig. 5 Current-voltage curves for hydrogen-oxygen fuel cells using composite membranes (○: PAMPS 10 wt% (t = 1.3 mm), ●: PAMPS 20 wt% (t = 1.3 mm), △: PSSA 10 wt% (t = 1.2 mm), ▲: PSSA 20 wt% (t = 1.3 mm), +: Nafion-p 10 wt% (t = 1.4 mm), ×: Nafion-s 10 wt% (t = 1.3 mm)). Measurement conditions: P_{H_2} : 1×10^5 Pa, P_{O_2} : 1×10^5 Pa, temperature; 30 °C, relative humidity; 95%.

ト膜はいずれも HAp の割合が多いため、硬い板状であり、電極との接触性が不十分な可能性がある。そこでコンポジット膜と白金メッシュ電極の間に PAMPS ゲル膜を導入し、接触抵抗の改善を図った。PAMPS コンポジット膜にゲル膜を導入した時の発電特性を Fig. 6 に示す。また、比較のために PAMPS ゲルのみの結果も併せて示す。30 °C で測定を行った。10 wt % 及び 20 wt % のどちらの PAMPS コンポジット膜においても発電特性が大きく向上し、接触抵抗の改善にゲル膜が非常に有効に働くことがわかった。PAMPS ゲル膜単体では約 100 mA cm^{-2} の高い電流密度が得られるが、膜の機械的強度が非常に低く、長期に使用することは難しいと考えられる。一方、PAMPS コンポジット膜は水酸アパタイトの均一析出により機械的強度に優れた自立膜となり、0.5 V で 20 mA cm^{-2} の発電が可能である。現在、電池の小型、高特性化に向けて、コンポジット膜の薄膜化について検討を進めている。また、実際に生体内で作動させる場合には、グルコース等の血中成分を酵素やメディエーターを介して燃料とする必要がある^{21,22)}。その場合、それらの材料の固定化と配置を検討する必要がある。

Fig. 6 Current-voltage curves for hydrogen-oxygen fuel cells using a PAMPS gel membrane (■, t = 1.0 mm) and composite membranes (○: PAMPS 10 wt% (t = 1.3 mm), ●: PAMPS 20 wt% (t = 1.3 mm), △: PAMPS 10 wt% + gel, ▲: PAMPS 20 wt% + gel). Measurement conditions: P_{H_2} : 1×10^5 Pa, P_{O_2} : 1×10^5 Pa, temperature; 30 °C, relative humidity; 95%.

Table 2 Activation energy of proton conduction in various electrolyte membranes.

Sample	Activation energy / eV
PAMPS 10%	0.23
PAMPS 20%	0.22
PAMPS gel	0.13
PSSA 10%	0.34
PSSA 20%	0.42
Nafion-p 10%	0.15
Nafion-s 10%	0.17

4 結 論

リン酸カルシウムの粉体とプロトン伝導性モノマーあるいはポリマーを混合し、生体親和性を有する燃料電池用コンポジット膜を作製した。リン酸カルシウムの水和反応でコンポジット膜中に水酸アパタイトが析出するため、非常に機械的強度の高い膜が得られる。30 °C でのプロトン伝導性は、PAMPS を含む膜で $2.7 \sim 8.7 \times 10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$ 、PSSA を含む膜で $4.9 \times 10^{-4} \sim 2.0 \times 10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$ 、Nafion を含む膜で $4.5 \sim 6.4 \times 10^{-4} \text{ S cm}^{-1}$ となり、膜中でのポリマーの分散性が伝導性に大きく影響することが明らかとなった。最も特性の良かった 20 wt % の PAMPS を含むコンポジット膜を用いて水素酸素燃料電池を構築し、0.5 V で 20 mA cm^{-2} の出力を得ることに成功した。コンポジット膜中でのポリマーの分散性を高め、膜と触媒電極層との接触抵抗を低減することで更なる特性の向上が期待できる。

5 謝 辞

本研究の一部は文部科学省補助金（特定領域研究「DMFC の新展開」13134204）の助成を受けて行なわれた。また、太平化学産業㈱より HAp を提供して頂いた。

文 献

- 1) K. Takahashi and A. Sasaki, *Adobansutosensahandobukku*,

- Baihukan, p. 225 (1994) [in Japanese].
- 2) M. Koudelka, F. Rohner-Jeanrenaud, J. Terrettaz, E. Bobbioni-Harsch, N. F. de Rooij, and B. Jeanrenaud, *Biosens. Bioelectr.*, **6**, 31 (1991).
 - 3) R. F. B. Turner, D. J. Harrison, and R. V. Rojotte, *Biomaterials*, **12**, 361 (1991).
 - 4) E. Brinkman, L. Van der Does, and A. Bantjes, *Biomaterials*, **12**, 63 (1991).
 - 5) C. P. Quinn, C. P. Pathak, A. Heller, and J. A. Hubbell, *Biomaterials*, **16**, 389 (1995).
 - 6) M. Gerritsen, A. Kros, V. Sprakel, J. A. Lutterman, R. J. M. Nolte, and J. A. Jansen, *Biomaterials*, **21**, 71 (2000).
 - 7) M. Watanabe, H. Uchida, Y. Seki, M. Emori, and P. Stonehart, *J. Electrochem. Soc.*, **143**, 3847 (1996).
 - 8) E. Chalkova, M. B. Pague, M. V. Fedkin, D. J. Wesolowski, and S. N. Lvov, *J. Electrochem. Soc.*, **152**, A1035 (2005).
 - 9) S. P. Nunes, B. Ruffmann, E. Rikowski, S. Vetter, and K. Richau, *J. Membr. Sci.*, **203**, 215 (2002).
 - 10) K. Kaneko, Y. Takeoka, M. Aizawa, and M. Rikukawa, *Synth. Met.*, **135-136**, 73 (2003).
 - 11) C. Yang, S. Srinivasan, A. S. Aricò, P. Cretì, V. Baglio, and V. Antonucci, *Electrochem. Solid-State Lett.*, **4**, A31 (2001).
 - 12) B. Tazi and O. Savadogo, *Electrochim. Acta*, **45**, 4329 (2000).
 - 13) K. Kanamura, T. Mitsui, and H. Munakata, *Chem. Mater.*, **17**, 4845 (2005).
 - 14) H. Monma and T. Kanazawa, *Yogyo-Kyokai-Shi*, **84**, 209 (1976).
 - 15) W. E. Brown and L. C. Chow, *U. S. Patent*, 4518430 (1985).
 - 16) M. Hirano, *Seramikkusu*, **37**, 735 (2002) [in Japanese].
 - 17) Y. Nakano and M. Ohgaki, *J. Soc. Inorg. Mater. Jpn.*, **8**, 76 (2001) [in Japanese].
 - 18) A. Makishima and H. Aoki, *BaioSeramikkusu*, Gihodo Shuppan, p.58 (1984) [in Japanese].
 - 19) H. Nakajima, H. Monma, and H. Hashimoto, *J. Soc. Inorg. Mater. Jpn. (Gypsum & Lime)*, No.210, 43 (1987) [in Japanese].
 - 20) K. Shigeru, T. Oku, and S. Takagi, *Nippon-Seramikkusu-Kyokai-Gakujutsu-Ronbunshi*, **97**, 101 (1989) (in Japanese).
 - 21) J. Kim, H. Jia, and P. Wang, *Biotechnol. Adv.*, **24**, 296 (2006).
 - 22) D. H. Park and J. G. Zeikus, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 1292 (2000).