

硝酸呼吸を利用した大腸菌の電気培養

配島 義隆¹, 平野 伸一^{2*}, 松本 伯夫², 大村 直也², 安藤 昭一¹
(¹千葉大院・融合、²電中研)

* (財)電力中央研究所 環境科学研究所 バイオテクノロジー領域
〒270-0021 千葉県我孫子市我孫子 1646 電話:04-7182-1181
Fax: 04-7183-3347 E-mail: s-hirano@cripi.denken.or.jp

微生物を用いたバイオプロセスの効率化のためには微生物の生育および活性を制御する手法が必要である。微生物の生育は呼吸などのエネルギー獲得過程における電子供与体から電子受容体への電子の流れによって支えられている。よって、電気的に電子供与体もしくは電子受容体を再生し、電子の流れをサポートすることにより生育促進が可能と考えられる。本研究では微生物を利用した物質生産およびエネルギー回収への電気培養適用の可能性を示すため、様々な物質生産のプラットフォームとなっている大腸菌の硝酸呼吸に着目し電気培養を行った結果、特定の電位条件下で大腸菌の生育を促進し、モデル物質の生産を向上させることができた。さらに、本培養法では有機物の持つエネルギーの一部を電極反応を介して水素として回収することが可能であった。以上、電気を用いることで物質生産促進とエネルギー回収を同時に行う革新的微生物培養法の可能性を見出すことができた。

1. はじめに

物質生産や廃棄物処理といった微生物反応が関与するバイオプロセスの効率化のためには微生物の生育を制御、促進する手法が必要である。微生物の生育は呼吸などのエネルギー獲得過程における電子供与体から電子受容体への電子伝達反応、すなわち電子の流れに支えられている。そこで、我々のグループでは電子供与体もしくは電子受容体を電気化学的に酸化/還元し電子の流れをコントロールすることで、微生物の生育を促進する「電気培養法」の開発に取り組んでいる。これまでに、電気培養法を用いて培養が困難である鉄酸化細菌や環境浄化に関わる微生物の培養および選択的集積に成功している[1, 2]。本研究では電気培養法を物質生産などのバイオプロセスに適用することを目指し、物質生産に汎用されている大腸菌を対象とした電気培養を試みることで、電気を用いた物質生産プロセスの基盤となる新規微生物培養法の提案を目的とした。微生物反応を利用した物質生産において嫌気条件下でのプロセスは通気コストの削減、酸素非存在下のみ進行する反応の存在などの利点を有するが、嫌気呼吸反応の効率の悪さに起因した生育の問題などがある。そこで、我々は嫌気呼吸様式の一つである大腸菌の硝酸

呼吸に着目し、硝酸還元により生じた亜硝酸を電気的に酸化、電子受容体である硝酸を再生することによって大腸菌の生育促進およびそれに基づいた嫌気条件下での物質生産性の向上を試みた。さらに、本研究では呼吸反応において通常捨てられている有機物の持つエネルギーの一部を電極反応により水素として回収することを試みた (図 1)。

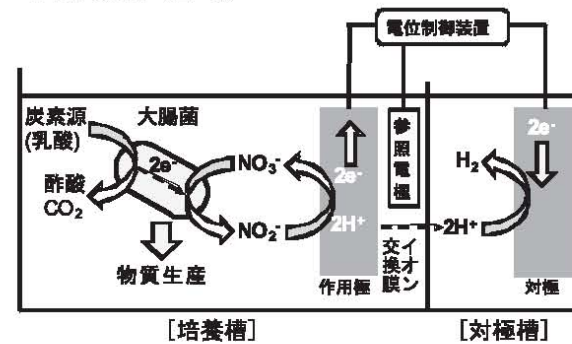


図 1. 硝酸呼吸を利用した電気培養のコンセプト

2. 実験手法【電気培養法】

大腸菌 (JM109 株) の電気培養には図 2 に示す培養システムを用いた。市販の培養瓶に陽イオン交換膜で作成した袋を取り付け、袋の外部を大腸菌の培養を行

う培養槽、袋内部を対極槽とした。両槽に電極として炭素板を、培養槽には参照電極 (Ag/AgCl) を挿入し、これら電極を電位制御装置に接続することで、定電位電解を行いながら大腸菌の培養が可能な電気培養システムを構築した。気相部分を窒素で置換し、嫌気条件下で大腸菌の電気培養を行い、生育の評価を行うと共に、発生したガスを培養瓶に設置したアルミバックにより回収し、定量・分析を行った。

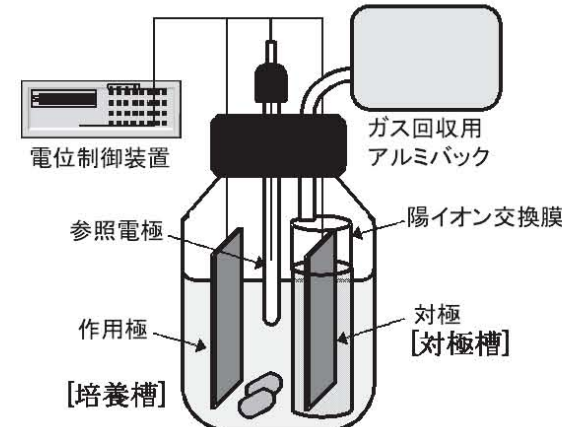


図 2. 大腸菌電気培養に使用した電気培養システム

3. 結果と考察

(1) 電気培養による大腸菌の生育促進

培養液中の亜硝酸を電極反応により酸化するために必要な電位を本システムにおいて検討したところ、+0.9V~+1.2V(vs Ag/AgCl) の電位を印加することで、すみやかに亜硝酸は酸化され硝酸を再生可能であることが明らかとなった。そこで、一定の電位 (+0.9V~+1.2V) を印加しながら大腸菌 JM109 株の培養を行った。その結果、大腸菌の硝酸呼吸により蓄積した亜硝酸の硝酸への酸化反応を反映した電流の増加に伴って、大腸菌の対数増殖期が非通電時と比べ延長され、最終到達菌体密度が増加した。さらに、詳細な検討により大腸菌の生育促進には+1.0V が最適であることが明らかとなり、この通電条件において電気培養をおこなった結果、最終菌体密度は最大で約 3.6 倍まで増加した。

(2) 電気培養による物質生産性の向上

大腸菌を用いた物質生産に対する電気培養の効果を評価するために、モデルとして一般的なプラスミド (pUC18) を導入した大腸菌の電気培養を行い、物質生産の指標として β -ガラクトシダーゼ活性の測定を行った。+1.0V の電位を印加しながら電気培養を行った結果、野生株と同様に組換え大腸菌の増殖は促進され、

最終菌体密度は非通電時の約 2.6 倍に達した。さらに、培養終了時における一細胞あたりの β -galactosidase 活性は非通電時と比べて約 4.2 倍に増加した。以上、電気培養の適用によりモデル組換え大腸菌の酵素生産を向上できることが示された。よって、有用物質生産能を有する組換え大腸菌による生産プロセスを電気培養法を用いて効率化できる可能性が示唆された。

(3) 電極反応を介したエネルギー回収

+1.0V の電位を印加し、大腸菌の電気培養を実施したところ、増殖期間において対極から顕著なガス発生が確認され、組成としてはほぼ水素であった。この水素発生は非通電時および大腸菌の培養を行わない際には見られないため、大腸菌が有機物から取り込み、呼吸反応を経由し硝酸に捨てられた電子を作用極で回収し、対極上で H^+ を還元することで起こったと考えられる。水素生産に絞って考えた場合、本法は水の電気分解より投入電気エネルギーが小さく、一般的な水蒸気回収法と異なりほぼ純粋な水素が有機物の含有するエネルギーをもとに得られるという利点を有している。

以上の結果より、電気を用いることで大腸菌の生育および物質生産を促進し、同時に有機物からのエネルギー回収を行う革新的微生物培養法を提案する [3]。

4. 今後の展望

大腸菌の電気培養条件の最適化および化成品、ポリマー原料、バイオ燃料などの有用物質生産に関連する遺伝子を大腸菌に導入し嫌気条件下における物質生産プロセスへの展開を図る。また、電極、培養槽の構造、対極槽溶液などの条件変更によって、水素変換効率を向上し、より多くのエネルギーを回収可能とすることを目指している。なお、電気培養技術を実施するための電気培養システムは、タイテック (株) から販売されている (2009 年 5 月~)。

参考文献

- [1]. 松本伯夫, *et al.*: 電力中央研究所報告書 電気による微生物の制御 (その 4), U99012 (1999)
- [2]. 松本伯夫, *et al.*: 電力中央研究所報告書 電気による微生物の制御 (その 8), V04006 (2005)
- [3]. 平野伸一, *et al.*: 電力中央研究所報告書 電気を用いた革新的微生物変換技術の開発(その 1), V09026 (2010)