

電気化学的手法によるバイオ燃料生産微生物 探索システムの開発

電子技術課 高田耕児 浅田峯夫 牧村めぐみ 横山義之 中央研究所 鍋澤浩文

1. 緒言

バイオ燃料は、再生可能な生物資源から生産される持続可能なエネルギー源として期待されている。その生産性向上のためには微生物による発酵の効率化や酵素反応の効率化が重要であるため、活性の高い微生物や酵素の探索等、様々な研究が行われている。従来、発酵や酵素反応の効率を調べるために、液体クロマトグラフィー等による生成物の分析が行われてきたが、多くの微生物についてスクリーニングを行うには、多大な時間と労力が必要であった。迅速・簡便に微生物の活性を測定するシステムが開発されれば、これを用いて、活性の高い微生物をスクリーニングして、バイオ燃料の生産等に応用することができる。

本研究では、その第一段階として、交流インピーダンス法により迅速・簡便に微生物の活性を測定する方法について検討した。

2. 実験方法

微生物としては、エタノールを生産する微生物である酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) について検討した。培地は YM 液体培地を用いた。

測定には交流インピーダンス法を用いた。交流インピーダンス法は、周波数を変化させて電極間のインピーダンスを求める方法で、微小電圧で測定液の電気的特性を測定できるため、酵母に与える影響が小さい。以前の研究により^{1),2)}、電極と電気二重層との間で行われる電子の授受の起こりにくさを表す電荷移動抵抗 (Rct) を測定することにより、酵母の増殖が測定できることがわかっており、これを酵母の活性測定に利用する。

電極は、以前の研究において作製された^{1),2)}、ガラス基板上に面積 1.4mm² の一対の金薄膜電極が 8 チャンネル並んだ電極チップ (Fig.1) を用いた。

電極上に液滴保持用ホルダーを設置し、測定液を 9μL 滴下した。5 分後に 10mM の K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] を 6μL 添加 (終濃度 4mM) し、ピペッティングにより混合させてから測定した。インピーダンスメーター

(HIOKI 社製 3532-80 型) を使用し、印加電圧 50mV で

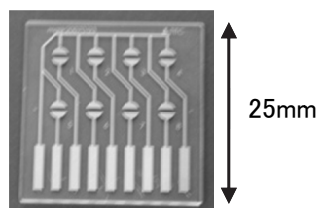


Fig.1 Electrode for Rct measurement.

周波数 10Hz-500kHz 間を測定し、複素インピーダンスプロットから Rct を求めた。

電極は使用後、硫酸過水 (濃硫酸と過酸化水素水を 3 対 1 で混合したもの) で 5 分間処理した後、純粋で洗浄し、乾燥して再利用した。

3. 実験結果および考察

3. 1 迅速な細胞活性測定法の検討

Rct の変化を測定することで、短時間で酵母の活性を測定することができるか検討した。Fig.2 にその結果を示す。酵母を十分に増殖させた後、培地を新鮮なものに交換すると、交換直後は Rct が低い、その後、10 分、30 分という短い時間で Rct が急激に増加した。さらに培養を続け、20 時間経過すると Rct はまた低い値となった。これは新鮮な培地に交換すると短時間で酵母の代謝活性が増加し、時間が経つとまた低下することを示していると考えられる。

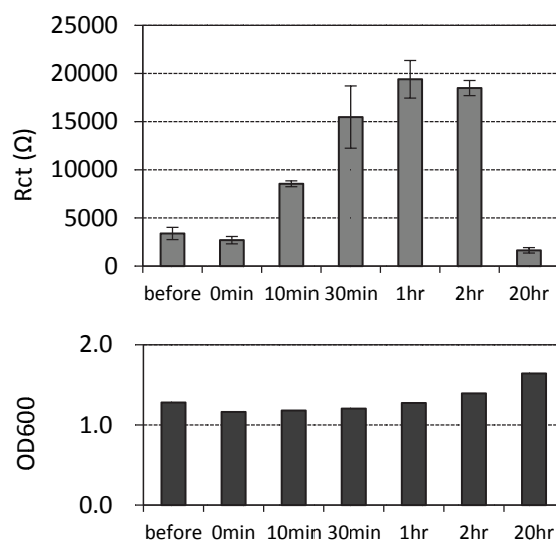


Fig.2 Temporal changes in Rct and turbidity (optical density at 600nm) of yeast culture after medium exchange.

Rct の変化とは対照的に、濁度はもともと高いため、この時間内ではあまり変化を示さない。このことから濁度が高すぎる等の理由で、濁度による評価ができない場合でも Rct の測定により活性が測定できると考えられる。

3. 2 保存処理した酵母からの活性測定

酵母を予め培養しておくのではなく、凍結保存したものから直接培養を開始し、Rct の変化を測定することが

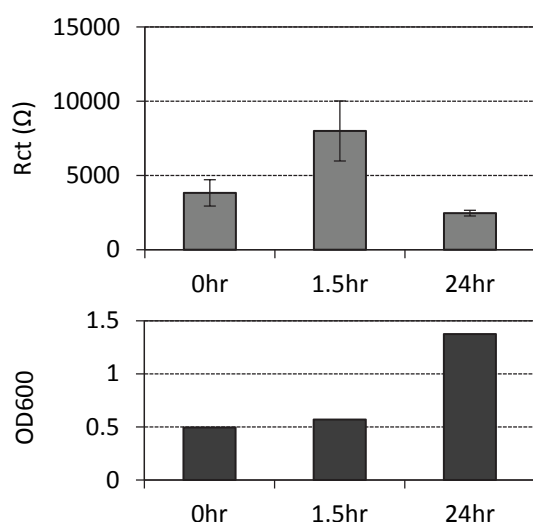


Fig.3 Temporal changes in Rct and turbidity of yeast stock solution diluted with fresh medium.

できれば簡便であるため、これを検討した。まず、酵母を十分に培養した後、グリセロールを加え(終濃度 15%)、-80℃で凍結保存した。次に、これを融解し、新鮮な培地で 10 倍希釈して Rct および濁度を測定した。

Fig.3 に示すように、希釈して 1.5 時間経過すると Rct が 2 倍に増加していた。これにより、酵母のグリセロールストック溶液から 1 時間程度培養することで酵母の代謝活性を測定できる可能性が示された。

3. 3 電極間の誤差の検討

今回使用している電極チップでの Rct 測定の誤差を検討した。8 枚の電極チップについて YM 培地のみを滴下して測定した。Fig.4 にその結果を示す。それぞれの電極チップについて 8 チャンネルの平均値を比較すると、最大値と最小値の差が 6314Ω (4 番を不良チップとして除外した場合は 2701Ω) となり、電極チップ間でばらつきがあった。また、それぞれの電極チップでの 8 チャンネルの測定値の標準偏差は、最大で 1635Ω (4 番を除外した場合は 1146Ω) であり、チャンネル間のばらつきもあった。これらのことから、現状では数千 Ω の差を測

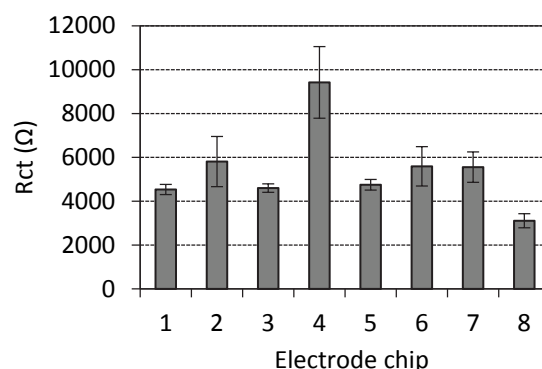


Fig.4 Differences among individual electrode chips.

定することはできないことがわかった。

今後、Rct 測定の精度を上げるためには、まず電極面積について検討する必要がある。電極間のピッチを 96 ウェルプレート等と同じ 9mm とし (現状は約 5mm)、電極形状も検討することで電極面積を大きくすることができる。また、電極の洗浄方法、測定手順についても検討する必要があると考えられる。

4. 結言

交流インピーダンス法を用いて迅速・簡便に細胞の活性が測定できるかを検討し、数十分という短時間で酵母の活性が測定できる可能性が示された。また、濁度による評価ができない条件でも酵母の活性が測定できる可能性が示された。今後、測定精度を上げるためには、電極面積や測定方法等についてさらに検討する必要があると考えられる。

また、バイオ燃料の生産効率や微生物電池の効率を上げるためには、今後、活性の高い微生物をスクリーニングする方法についても検討する必要がある。

「参考文献」

- 1) M. Horii *et al.*
Chemical Sensors **25 Supplement A**, 145-147 (2009)
- 2) 日出嶋宗一他
第 22 回若い研究者を育てる会研究論文集 p31-36

キーワード：電気化学、インピーダンス、微生物、バイオ燃料

Development of a search system for microbes producing biofuels using electrochemical measurements

Koji TAKATA, Mineo ASADA, Megumi MAKIMURA, Yoshiyuki YOKOYAMA, Hirofumi NABESAWA

To raise the efficiency of biofuel production, techniques for screening the microorganism with high activity could be powerful and a rapid method for measuring the cell activity is necessary to develop such a screening system. In this study, we investigated whether the cell activity could be measured by AC impedance method. Charge transfer resistance (Rct) of yeast culture medium was rapidly increased in tens of minutes after the medium exchange, suggesting that the increase of cell activity in fresh medium was monitored by Rct measurement. Moreover, this method would be applicable to the condition in which turbidity could not be measured.