

バイオ燃料生産微生物のスクリーニング法に関する研究

電子技術課 高田耕児 浅田峯夫 横山義之 牧村めぐみ* 中央研究所 鍋澤浩文

1. 緒言

バイオ燃料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の研究が行われている。多くの微生物の中から活性の高い微生物をスクリーニングするには、迅速・簡便に微生物の活性を測定する方法が必要と考えられる。本研究では、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の開発を目指している。今年度は、あらたに電極チップを作製し、それを用いて酵母の増殖を測定した。

2. 実験方法

2.1 電極チップの作製

新しい電極チップの外観を図1に示す。96ウェルプレートに挿入して測定できるように基板自体をくし型の形状とし、その先端には微細なくし型電極を設けた。くし型電極のライン&スペースはともに $50\mu\text{m}$ とした。ガラス基板は厚み 1.1mm の Corning 社 Eagle XG を用いた。電極作製は次のように行った。基板に付着した有機物を洗浄除去した後、Cr, Au の順にスパッタリングにより成膜した。Cr の膜厚は 50nm , Au の膜厚は 200nm とした。ポジ型レジストをエッチングマスクとし、Cr, Au それぞれのエッチング液にて電極をパターンニングした。レジストを取り除いたのち、ドライフィルムレジストをマスクとしてサンドブラストによりくし型に加工した。

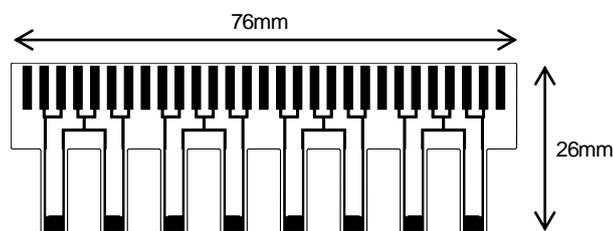


図1 作製する電極チップの形状

2.2 交流インピーダンス測定

96ウェルプレートの各ウェルに YM 培地を $120\mu\text{L}$, 10mM の $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ を $30\mu\text{L}$ 入れて混合し、そこに電極を差し込んで測定した。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 10mV

*現 生活工学研究所

で周波数 15Hz - 1MHz 間を測定し、複素インピーダンスプロットから電荷移動抵抗 (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、純水で洗浄し、乾燥して再利用した。

2.3 酵母の増殖の測定

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の増殖を測定した。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いる。酵母を YM 培地で一晩培養した後、新鮮な YM 培地で 10 倍希釈し、1 時間経過したものに $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ を加えて測定した。

3. 実験結果および考察

3.1 電極チップの作製

図2に完成した電極チップの写真、図3にくし型電極部の電子顕微鏡写真を示す。サンドブラストによりガラス基板を望みの形状に加工できている。くし型電極のライン/スペースは端の電極では $42.6\mu\text{m}/55.8\mu\text{m}$, 中央の電極では $43.7\mu\text{m}/54.7\mu\text{m}$ であった。

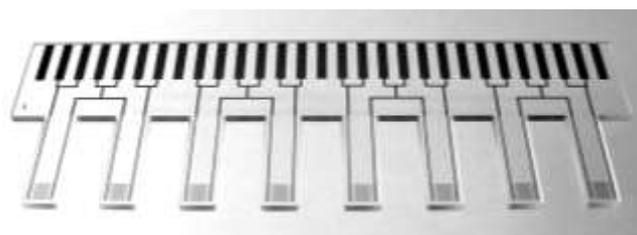


図2 作製した電極の外観写真

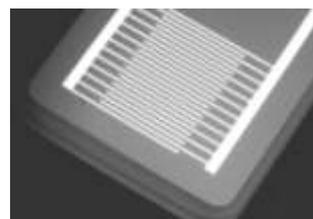


図3 電極の電子顕微鏡写真

3.2 交流インピーダンス測定

今回作製した電極チップと昨年度のチップで電荷移動

抵抗を測定した結果を図4に示す。それぞれ同一チップ内の8個の電極で測定した。複素インピーダンスプロットでの半円の直径が電荷移動抵抗 (R_{ct}) となる。昨年度のチップでは、 R_{ct} がばらついているが、今回作製したチップではばらつきが抑えられているのがわかる。同一チップ内の8個の電極の測定値の標準偏差(平均値で割ったもの)をチップ間で比較したところ、昨年度のチップでは3枚のチップで測定した際の標準偏差が、0.119, 0.108, 0.111 であるのに対し、新しいチップは0.032, 0.030, 0.065 であり、大幅にばらつきが抑えられていた。これは、くし型電極とすることで、微量測定の感度が上昇したことと、96 ウェルプレートに挿入して測定する形にしたことで、測定液の蒸発や電極間の干渉が抑えられたことによるものと考えられる。

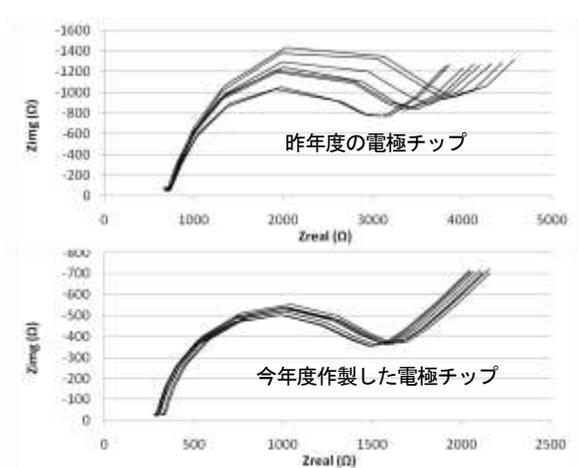


図4 電荷移動抵抗測定結果の比較

3.3 酵母の増殖の測定

YM 培地と酵母を加えて1時間経過したYM培地を比較した結果を図5に示す。酵母の増殖により R_{ct} が大幅に

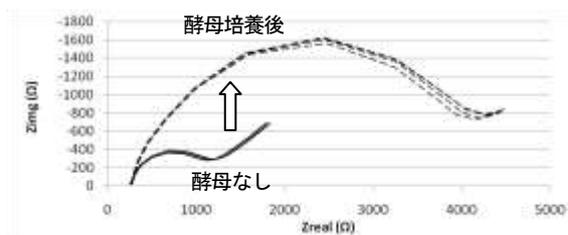


図5 酵母の増殖の測定

大きくなった。また、それぞれ4個の電極での測定値の標準偏差(平均値で割ったもの)はYM培地で0.026、酵母を含むYM培地で0.015とやはり測定値のばらつきが抑えられている。

4. 結言

電荷移動抵抗の測定精度を上げるために、新たに電極チップを作製し、それを用いて酵母の増殖を測定することができた。今後、電極を酵素で修飾するなどの方法によりさまざまな活性をもった微生物をスクリーニングする方法について検討していく。また、酵母の増殖に伴う電荷移動抵抗の増加の原理についてはまだわかっていない部分が多い。今後新しいチップでデータを蓄積することにより電荷移動抵抗増加の原理についても解明していく。

「参考文献」

- 1) M. Horii *et al.*
Chemical Sensors, **25** Supplement A (2009) 145-147
- 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

Research on Screening Methods 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 developed a new electrode chip and investigated whether the cell activity could be measured by AC impedance method. Charge transfer resistance (R_{ct}) measured by newly developed chips is more precise than that measured by the previous chips, and R_{ct} of yeast culture medium was rapidly increased, suggesting that the increase of cell activity in fresh medium was monitored by R_{ct} measurement.