

電気培養による新規発酵技術創出の可能性

松本 伯夫

微生物が生育する過程では、さまざまな酸化還元反応が関与している。微生物の呼吸に着目すれば、グルコースなどの有機物や還元型の金属イオンを電子供与体、酸素や硝酸イオン、硫酸イオンなどを電子受容体とし、電子供与体と電子受容体の間で電子の受け渡し、すなわち酸化還元反応が生じる過程で微生物は生命活動に必要なエネルギーを獲得している。また、発酵や代謝に着目すれば、微生物内部で起こる一連の代謝反応の過程で、NADHなどの物質が関わる酸化還元反応が生じている。一方、地下環境に生息する微生物群に見られるように、地表付近の酸化環境から地下の還元環境へと移行するに従い、微生物の種類が変化していくことが知られている。このように、酸化還元という要素は微生物にとって少なからず重要な生育因子であるといえる。裏返せば、微生物を取り巻く酸化還元反応、あるいは酸化還元状態を自在に操ることができれば、発酵生産の向上や、新たな物質生産系の構築につながる可能性がある。筆者らは、微生物培養液の中に電極を設置し、電気化学的手法によって酸化還元状態を制御する培養法を検討しており、これを「電気培養」と呼んでいる。ここでは、電気培養のしくみを紹介するとともに、種々の事例をもとに新規発酵技術創出の可能性を考えてみたい。

電気培養のしくみ

筆者らが実施する電気培養は、基本的に図1に示す構造を有している。培養槽はイオン交換膜で仕切られた二槽式の容器からなり、このうち的一方を培養槽として使

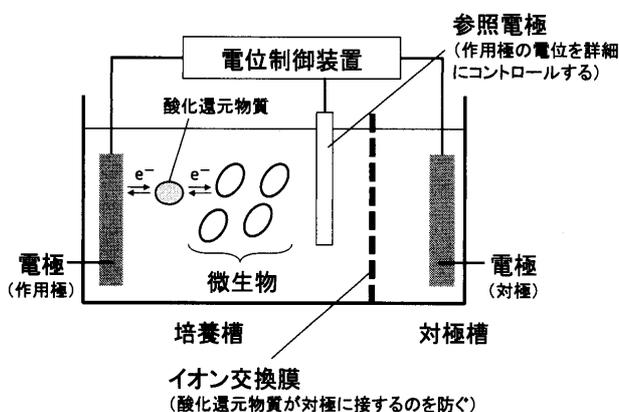


図1. 電気培養槽の構造

用する。各槽には電極を設置し、この間に通電することにより、培養槽の酸化還元状態を変化させることが可能となる。この際、電極上で生じる酸化還元反応を効率よく微生物に作用させるために、培養液中に酸化還元反応を媒介する物質を溶存させるのが効果的である。また、培養槽に参照電極を設置することで、培養槽の酸化還元電位を正確に調整することが可能となる。

電気培養の効果

電気培養による微生物への効果として、呼吸促進作用と代謝制御作用があげられる。呼吸促進作用は、微生物が「呼吸」に用いる電子供与体、あるいは電子受容体を電極上で生成させることによって、より高密度の微生物が得られるというものである（図2a）。一方の代謝制御作用は、電極上で生成する酸化体、あるいは還元体によって、溶液全体の酸化還元電位を特定の値に保つことで、微生物の代謝経路を改変するというものである（図2b）。以下、それぞれのケースについて具体的な事例をもとに紹介する。

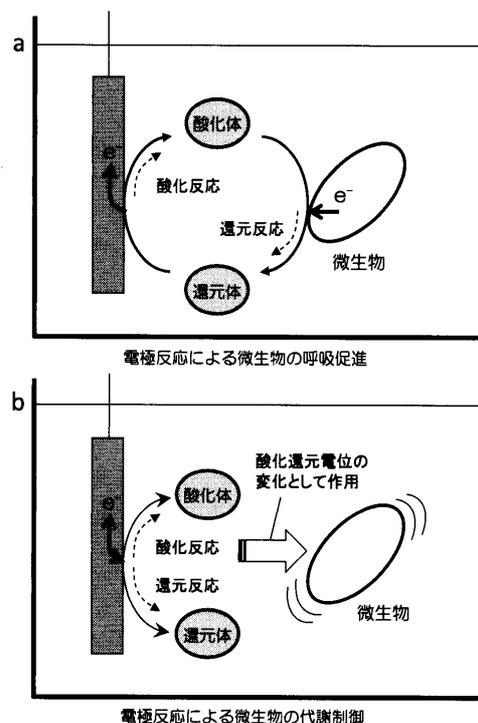


図2. 電気培養の効果

著者紹介 (財)電力中央研究所 (上席研究員) E-mail: norio@criepi.denken.or.jp

呼吸促進作用の事例

微生物の呼吸様式は多種多様であり、微生物の種類によってさまざまな電子供与体と電子受容体が存在する。鉄酸化細菌では、二価の鉄イオンを電子供与体、酸素を電子受容体とする呼吸を行っている。通常、この微生物を培養する際には、培養液中に二価鉄イオンを溶解し、空気を送り込むことで呼吸をさせるが、微生物の増殖に伴って、電子供与体である培養液中の二価鉄イオンは、鉄酸化細菌に電子を奪われ(酸化され)、三価鉄イオンへと変化していく。培養液に含まれる二価鉄イオンがすべて三価鉄イオンに変化すると、鉄酸化細菌は呼吸ができなくなり増殖が停止する。ところで、鉄酸化細菌の呼吸によって生じた三価鉄イオンは、電極反応によって容易に二価鉄イオンへと還元することができる。この作用を利用し、上述の電気培養槽を使用して培養液中の鉄イオンを常に二価鉄に還元しながら培養を実施することで、鉄酸化細菌は増殖を続けることが可能となる。筆者らの実験では、培養槽に設置した電極の電位を0 V (vs. Ag/AgCl) 付近に設定し電気培養を行うことで、一週間後の菌体密度は通常の培養と比較して約50倍高密度に達するという結果を得た(図3) 1)。鉄酸化細菌の電気培養について、全体的な電子の流れを見れば、あたかも菌体が電気エネルギーを受け取って生育しているように見ることができる。このようにして増殖させた微生物に有用物質の生産能を付与することができれば、電気エネルギーによる物質生産系の構築が可能となるだろう。

鉄酸化細菌は、生育に最適なpHが低いことや、遺伝子導入系が十分に確立されていないことなどから、この菌を使用した電気培養による物質生産は、現時点では容易ではないといえる。一方で、ある種の大腸菌は、嫌気的な環境下で硝酸(NO_3^-)を電子受容体、乳酸などの

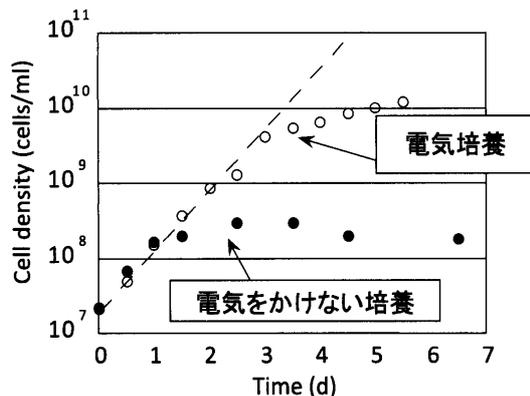


図3. 電気培養による鉄酸化細菌の増殖曲線

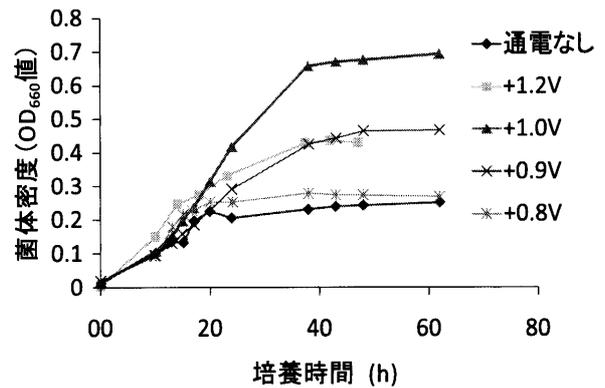
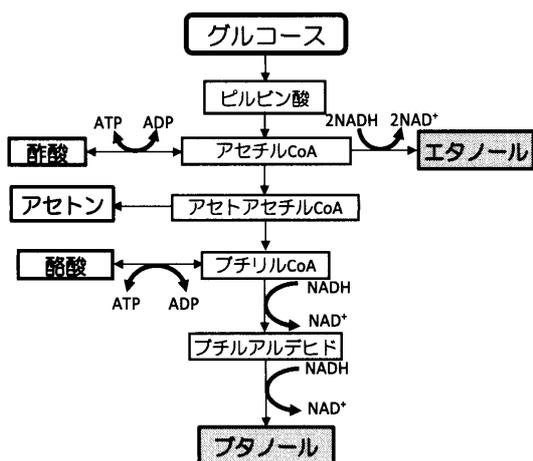
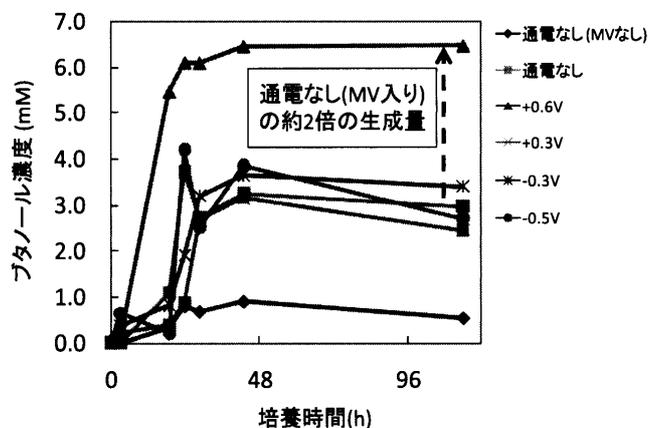


図4. 種々の酸化還元電位で大腸菌を培養した時の増殖曲線

有機物を電子供与体として生育することができる。この菌の生育に伴い、 NO_3^- は呼吸の結果亜硝酸(NO_2^-)へと還元されるが、これを電気化学的に再び NO_3^- に酸化することで、鉄酸化細菌と同様の増殖効果が期待できる。このような点に着目し、 NO_3^- および乳酸で呼吸、生育する大腸菌JM109株をもちいて、嫌気的環境下での電気培養を実施した。JM109株の培養開始後12時間目から、 NO_2^- の酸化が起こる+1.0 V (vs. Ag/AgCl)の電位を電極に与えながら培養を実施したところ、培養開始48時間目において、電気をかけない培養に比べ3.6倍の高密度菌体を得ることができた(図4) 2)。さらに、物質生産系の構築を想定し、この菌にラクトース分解酵素である β -ガラクトシダーゼを生産する遺伝子を導入し電気培養を実施したところ、電気をかけない培養と比較し10倍以上の酵素活性が見られた。このように大腸菌は中性のpHで生育し、遺伝子導入系も確立していることから、電気培養による物質生産系の構築が行いやすいといえる。特に、本実験系で使用したような嫌気的環境下における電気培養は、酸素による失活を受ける酵素などを生産する上で、有用な手法になりうると考えている。

代謝制御作用の事例

*Clostridium acetobutylicum*は、アセトン・ブタノール・エタノール発酵(ABE発酵)を行う菌として知られており、セルロース系の未利用バイオマスを糖化し、アルコール生産を行うという視点から注目されている。ABE発酵は、図5に示すように複数の酸化還元反応が関与する複雑な代謝経路であり、単一の生産物を高効率で獲得するためのさまざまな検討がこれまでもなされている。筆者らは、*C. acetobutylicum*の培養時に、特定の酸化還元電位を維持することで代謝産物の生成量に変化が生じるのではないかと考え、電気培養を実施した。グルコースを基質とし、酸化還元物質としてメチルピオ

図5. *C. acetobutylicum*によるABE発酵の代謝経路図6. 電気培養による *C. acetobutylicum* のグリセロール生産活性の変化

ロゲンを溶存させた培養液中で、*C. acetobutylicum*の電気培養を実施したところ、+0.6V (vs. Ag/AgCl)においてブタノールの生成量が約2倍に増加した(図6)。詳細なメカニズム解明にはさらなる解析が必要ではあるが、電位制御によってABE発酵に関する代謝経路が適正に制御されたものと考えている。

電気培養が目指すもの

電気培養は、従来の培養法に「酸化還元電位」という新しい制御因子を付与するものである。上記事例から、電気培養によって微生物の呼吸促進、すなわち増殖のために必要なエネルギーの供給が可能であること、また、酸化還元が関与する代謝経路を制御することが可能であ

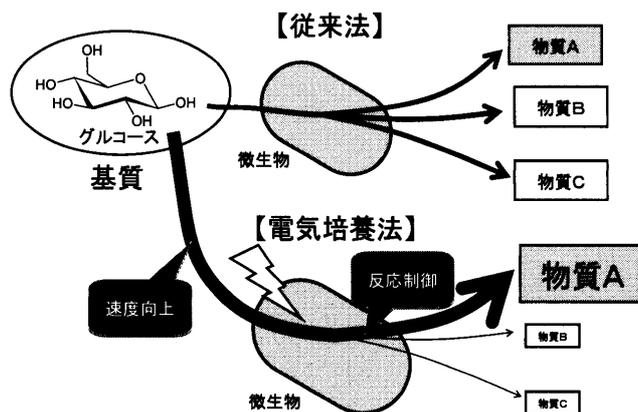


図7. 電気培養が目指す発酵制御

ることが示された。これらの効果を利用することで、図7に示すように目的の物質を高効率で生産する新しい発酵プロセスの提案につながる可能性がある。

電気培養によって菌体内の特定の代謝を制御することを考える場合、電極と菌体を結ぶ酸化還元物質の選定が重要な要素となる。特に、菌体内の特定の代謝経路に対して作用するような酸化還元物質の選定が必要となるだろう。電極上で酸化還元が生じる物質は数多く存在し、それぞれが特定の酸化還元電位を有しているほか、細胞膜の透過性や微生物に対する毒性の有無なども異なる。最良の酸化還元物質の選定には試行錯誤が必要だが、物質生産に適した酸化還元物質、ならびに電気化学的な培養条件が見つかれば、新規発酵技術の創出につながるだろう。

まとめ

酸化還元電位を電気化学的に調整する電気培養法には、過剰な酸化剤、還元剤などの薬品添加が不要であること、電位のきめ細やかな調整が可能であること、などの特徴がある。上述のような電気培養による増殖促進、生産性向上といった効果が得られた事例をもとに、実際の発酵生産に適用可能な電気培養技術の開発を進めていきたい。

文献

- 1) Matsumoto, N. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **70**, 464 (2000).
- 2) 平野伸一ら：電力中央研究所報告, V09026 (2010).