

令和 5 年 5 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19862

研究課題名（和文）二酸化炭素と空中窒素を同時固定する電気微生物共生系の構築

研究課題名（英文）Development of electrochemical co-culture system fixing carbon dioxide and dinitrogen at the same time

研究代表者

片山 新太（Katayama, Arata）

名古屋大学・未来材料・システム研究所・教授

研究者番号：60185808

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：生物窒素固定の省エネルギーかつ高活性化を目的とし、窒素固定微生物の細胞外電子供与による高活性化と、酢酸生成微生物の二酸化炭素固定による有機炭素源供給からなる共培養系を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、嫌気性の電気的空間における共培養系における微生物の生態という、これまでに無かった新たな工業的微生物学の一側面を拓くものである。また、本研究の生物電気化学システムが機能すれば、これに太陽電池や小型水力発電のような小型発電装置を組み合わせることで、再生可能エネルギーのみを利用した二酸化炭素と窒素を同時に固定するシステムへと発展させることが可能で、地球環境保全上の大きな貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：For energy-saving highly efficient biological nitrogen fixation, a co-culture system was developed with a highly-efficient nitrogen-fixing microorganism utilizing extracellular electron donation, and with an acetogenic microorganism fixing carbon dioxide for providing organic carbon source.

研究分野：環境工学

キーワード：異種微生物電気培養系 独立栄養条件 二酸化炭素固定 窒素固定 酢酸生成 細胞外電子伝達 固体腐植ヒューミン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

1．研究開始当初の背景

窒素肥料は、高温高压を用いるハーバーボッシュ法による空中窒素固定法で製造されるが、世界エネルギー消費量の約 1%を占め、この工業的製造法の省エネルギー化は喫緊の課題となっている。常温常圧で進む生物窒素固定は省エネルギーであり期待されているが、高活性化が必要とされている。近年、メチルピオロゲン等の水溶性電子伝達物質を用いて窒素固定酵素に直接電子供与を行って窒素固定を行う試みがされている(例えば **Badalyan** ら、*ACS Catal* **9**, 1366, 2019)。しかし、これらの酵素電気化学システムでは、窒素固定酵素ニトロゲナーゼが酸素により失活しやすいこと、水溶性メチルピオロゲンに除草活性があり且つヒト有害性があることから、農業技術として実用化をする上での課題となっていた。これに対し、本研究申請者らは、固体腐植ヒューミンとその類似物質を用いた細胞外電子供与によって多様な窒素固定微生物を細胞レベルで高活性化できることを明らかにしつつあった (**Dey** ら *Scientific Reports*, **11**, 6567, 2021)。固体腐植ヒューミンおよびその類似物質は、無害で化学的にも安定な固相細胞外電子伝達物質である (**Pham** ら *Chemosphere*, **269**, 128697, 2021)。これまで、細胞レベルでの窒素固定微生物の高活性化の研究例は無く、また固相の細胞外電子伝達物質が多様な窒素固定微生物を活性化できることが報告された例はなかった。また、これまで、細胞外電子伝達物質を用いた研究は、アントラキノン-2,6-ジスルホン酸やメチルピオロゲンの様な水溶性物質の研究が殆どで、固相の細胞外電子伝達物質を用いた研究は、本申請者らによるもの以外は殆ど無かった。実用化を想定した場合、水溶性の細胞外電子伝達物質を用いた場合は、反応系からの流出が問題となるため、固相の細胞外電子伝達物質を用いるか、もしくはその様な外部物質を使わない方が、実用化の上で有利と考えられた。また、微生物細胞を用いる窒素固定の促進技術では、微生物の窒素固定を促すエネルギー源・炭素源として多量のマンニトールなどの有機炭素源を用いていた点も問題であった。実用化に向けては、有機物供給が不要となる様な方法を考える必要があった。この点を二酸化炭素固定によって有機炭素を供給する方法によって解決することが考えられた。しかし、窒素固定微生物の細胞維持・活性化のために、二酸化炭素固定(酢酸生成)微生物の共培養系を構築して有機炭素源を供給するという、微生物を複数種用いて反応をデザインする事は、嫌気性微生物を対象とした研究では、これまで申請者の実験例(例えば **Li** ら *Bioresouce Technol.*, **176**, 225-232, 2015; **Laskar** ら *IJERPH* **16**:2873, 2019 など)を除いて殆ど無かった。また更に、そのような共培養系を生物電気化学システムで実施した例は無かった。

2．研究の目的

そこで本研究では、窒素固定微生物を細胞ごと用いて固相電子伝達物質を介した電子供与による高活性化システムの構築を行う。最も活性の高い生物窒素固定は、マメ科植物と窒素固定微生物の共生系である。そこで、本研究では、マメ科植物と窒素固定微生物の共生系(根粒)にみられる高エネルギー源供給系を、細胞外電子伝達を介した嫌気性酢酸生成微生物と好気性窒素固定微生物の共生系(電気共生系)を作出し、二酸化炭素と空中窒素の同時固定を実現することを目的とする。これまで、根粒等の共生的窒素固定の解析は数多く行われて

きたが、その反応場を人工的に再構成する試みは殆ど行われていない。本研究では、嫌気性の細胞外電子伝達場で嫌気性酢酸生成微生物による二酸化炭素還元による有機酸生成と、窒素固定微生物による高効率窒素固定の同時実現することを目的とした。

3．研究の方法

本研究では、まず(1)細胞外電子伝達系を利用して二酸化炭素還元できる嫌気性酢酸生成微生物と、(2)同様の嫌気性条件で働く窒素固定微生物を選抜した。次に(3)酢酸生成微生物と窒素固定微生物が共培養の可能な条件を探索し、電気培養を行い、その窒素固定活性を評価した。

4．研究成果

(1) 細胞外電子伝達系を利用して二酸化炭素還元できる嫌気性酢酸生成微生物の選抜

細胞外電子を利用して二酸化炭素固定できる嫌気性微生物の培養条件を検討して、共培養に適したものを選抜した。

(2) 細胞外電子伝達系を利用し且つ酢酸を利用する窒素固定微生物の選抜

好気性嫌気性の両者を含む多様な従属栄養窒素固定微生物を菌株保存機関から購入し、培養条件を検討して、共培養に適した窒素固定微生物を選抜した。

(3) 酢酸生成微生物と窒素固定微生物の電気共培養系の構築

まず酢酸生成微生物と窒素固定微生物の共培養系が可能であることを確認した後、電気培養を行い窒素固定することに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sujan Dey, Takuya Kasai, Arata Katayama	4. 巻 134
2. 論文標題 Promotion of biological H ₂ (Bio-H ₂) production beyond the metabolic limit by the anaerobic microbial consortia enriched under nitrogen-deficient conditions using humin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 144-152
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2022.04.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sujan Dey, Takuya Kasai, Arata Katayama	4. 巻 13
2. 論文標題 Promotion of nitrogen fixation of diverse heterotrophs by solid-phase humin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 853411
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2022.853411	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Biec Nhu Ha, Duyen Minh Pham, Daiki Masuda, Takuya Kasai, Arata Katayama	4. 巻 119
2. 論文標題 Humin-promoted microbial electrosynthesis of acetate from CO ₂ by Moorella thermoacetica	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biotechnology and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 3487-3496
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/bit.28238	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tingting Hu, Duyen Minh Pham, Takuya Kasai, Arata Katayama	4. 巻 19
2. 論文標題 Emergence of Extracellular Electron Mediating Functionality in Rice Straw-Artificial Soil Mixture During Humification	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Environmental Health and Public Health	6. 最初と最後の頁 15173
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijerph192215173	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tingting Hu, Mirai Yamaura, Duyen Minh Pham, Takuya Kasai, Arata Katayama	4. 巻 135
2. 論文標題 Wide distribution of extracellular electron transfer functionality in natural proteinaceous organic materials for microbial reductive dehalogenation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 238-249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2022.12.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Biec Nhu Ha, Duyen Minh Pham, Takuya Kasai, Takanori Awata, Arata Katayama	4. 巻 19
2. 論文標題 Effect of humin and chemical factors on CO ₂ -fixing acetogenesis and methanogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Environmental Health and Public Health	6. 最初と最後の頁 2546
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijerph19052546	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 9件)

1. 発表者名 Takuya Kasai, Sujan, Dey, Arata Katayama
2. 発表標題 Promotion of biological nitrogen fixation by electron donation from solid phase humin
3. 学会等名 8th The international society for microbial electrochemistry and technology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Biec Nhu Ha, Duyen Minh Pham, Takuya Kasai, Arata Katayama
2. 発表標題 Promotion effect of humin on acetate electrosynthesis from carbon dioxide by <i>Moorella thermoacetica</i> JCM 9320
3. 学会等名 8th The international society for microbial electrochemistry and technology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 笠井拓哉, Dey Sujan, 片山新太
2. 発表標題 固体腐植ヒューミンを用いた窒素固定細菌群による水素生産の促進
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tingting Hu, Mirai Yamaura, Duyen Minh Pham, Takuya Kasai, Arata Katayama
2. 発表標題 Natural proteinaceous organic materials as widely-distributed extracellular electron mediators for microbial reductive dehalogenation
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Arata Katayama, Mahasweta Laskar, Biec Nhu Ha, Duyen Minh Pham, Takuya Kasai
2. 発表標題 Alternate functionality of humin, a solid-phase humic substance, as extracellular electron mediator in carbon dioxide-reducing acetogenesis
3. 学会等名 American Chemical Society, Spring 2021 meeting, "Macromolecular Chemistry: the second century" (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sujan Dey, Takuya Kasai, Arata Katayama
2. 発表標題 Taxonomic diversity of diazotrophs activated by humin and promotion mechanisms
3. 学会等名 World Microbial Forum, ASM and FEMS collaboration, Online (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takuya Kasai, Mahasweta Laskar, Arata Katayama
2. 発表標題 Activation of carbon dioxide reduction by autotrophic acetogen with solid-phase humic substances
3. 学会等名 World Microbial Forum, ASM and FEMS collaboration, Online (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Biec Nhu Ha, Duyen Minh Pham, Takuya Kasai, Arata Katayama
2. 発表標題 Activity of CO ₂ -fixing acetogenesis and methanogenesis in mixed cultures with humin under different conditions
3. 学会等名 Water and Environment Technology Conference Online 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Biec Nhu Ha, Duyen Minh Pham, Takuya Kasai, Takanori Awata, Arata Katayama
2. 発表標題 Effects of chemical factors and microbial community on the activity of CO ₂ -fixing acetogenesis and methanogenesis with the presence of humin as extracellular electron mediator
3. 学会等名 International Conference on Materials and Systems for Sustainability 2021 (ICMaSS2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sujan Dey, Takuya Kasai, Arata Katayama
2. 発表標題 Humin promotes the biological-H ₂ production of an anaerobic consortium enriched under nitrogen-deficient condition
3. 学会等名 International Conference on Materials and Systems for Sustainability 2021 (ICMaSS2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takuya Kasai, Sujan Dey, Takehito Noto, Ryota Ujibayashi, Arata Katayama
2. 発表標題 Study on extracellular electron transfer mechanism in humin promoting redox reactions of nitrogen
3. 学会等名 International Conference on Materials and Systems for Sustainability 2021 (ICMaSS2021) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	笠井 拓哉 (Kasai Takuya) (00833831)	名古屋大学・未来材料・システム研究所・助教 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------