

Enterobacter aerogenes の水素発生における
ギ酸添加の影響とギ酸分解機構に関する研究

Research on the mechanism of formate decomposition and effect
of formate on hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*

国立大学法人 横浜国立大学 学術
情報センター

図書 化学

11737388

横浜国立大学附属図書館



11737388

寄贈者：黒河達生

11737388
Enterobacter aerogenesの水素発生
におけるギ酸添加の影響とギ酸分解

377.51
KU

Enterobacter aerogenes の水素発生における
ギ酸添加の影響とギ酸分解機構に関する研究

Research on the mechanism of formate decomposition and effect
of formate on hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*

横浜国立大学附属図書館



11737388

学籍番号	01TA016
氏名	黒河 達生
Name	Tatsuo, Kurokawa
責任指導教員	谷生 重晴
修了年月日	2006年3月24日

Enterobacter aerogenes の水素発生における
ギ酸添加の影響とギ酸分解機構に関する研究

目次

第1章 緒論

- 1.1 バイオマスと水素エネルギー
- 1.2 水素発酵における水素収率と光水素発生
- 1.3 発酵によるバイオマスからのエネルギー生産
 - 1.3.1 メタン発酵
 - 1.3.2 エタノール発酵
- 1.4 研究の目的と各章の概要

第2章 これまでの研究からの知見及び理論

- 2.1 微生物の発酵水素発生
- 2.2 発酵における代謝と水素発生経路
- 2.3 水素発生と菌体増殖の関係
- 2.4 菌体増殖に対する酢酸の影響
- 2.5 微生物の酸耐性
- 2.6 大腸菌におけるギ酸分解の制御機構
- 2.7 ギ酸分解酵素の金属原子間における電子伝達のしくみ
- 2.8 *Enterobacter aerogenes* の水素収率改善案についての検討
 - 2.8.1 水素収率改善案について
 - 2.8.2 硝酸イオンが発酵水素発生に及ぼす影響
 - 2.8.3 鉄イオンが発酵水素発生に及ぼす影響
- 2.9 結論

第3章 発酵水素発生に対するギ酸添加の影響とギ酸分解機構

3.1 本章の目的

3.2 実験方法

3.3 実験結果

3.3.1 グルコース培地へのギ酸添加の影響

3.3.2 菌体の増殖に対するギ酸添加の影響

3.3.3 積算水素発生量とグルコース消費量に対するギ酸添加の影響

3.3.4 水素発生速度とグルコース消費速度に対するギ酸添加の影響

3.3.5 ギ酸生成、ギ酸分解と水素発生の関係

3.3.6 代謝産物の生成についての分析

3.3.7 ギ酸濃度と菌体モル濃度の関係

3.4 考察

3.4.1 水素発生経路と水素収率について

3.4.2 代謝産物濃度、収率と水素発生量の関係について

3.4.3 水素収率の向上について

3.5 結論

第4章 ギ酸添加実験に基づく発酵水素発生の理論

4.1 本章の目的

4.2 酸化還元電位と水素発生

4.2.1 培地のギ酸濃度と水素発生の起こりやすさ

4.2.2 細胞内におけるギ酸分解

4.3 代謝産物収支についての理論

4.4 結論

本研究に関連した発表

参考文献

謝辞

第 1 章 緒論

1.1 バイオマスと水素エネルギー

バイオマスとは、動植物由来の有機性資源である。例として、農作物、木材、海藻などの農林水産資源がある。また、食品廃棄物、畜産廃棄物、下水汚泥、廃木材などの廃棄物もバイオマスに含まれる。バイオマスの特徴は、次の二点である。

第一に、生命活動に由来して持続的に生じる再生可能な資源であること。

第二に、燃焼によって排出する二酸化炭素は、再び生命活動によって植物に固定される。したがって、地球上の二酸化炭素濃度の増加をもたらすことはないこと。このような特徴から、資源・エネルギーとして有効に利用することが注目されている。例として、食品廃棄物や畜産廃棄物はコンポスト化（堆肥化）によって農業用の肥料に使うことができる。また、食品廃棄物、畜産廃棄物、下水汚泥から微生物によるメタン発酵（1.3 節参照）によってメタンガスを回収することができる。

バイオマスからの主要なエネルギー生産法としては、バイオマス発電とバイオマス熱利用がある。前者は汚泥、木屑、農業廃棄物の燃焼による発電で、後者は黒液・廃材の燃焼による熱利用である。黒液・廃材は製紙工場においてパルプ化工程で副産物として発生するものである。

近年、バイオマスから水素を取り出すことが研究、実践両面で進められている。水素は 21 世紀の燃料・エネルギーとして期待されており、次の特徴を有する。

第一に、燃焼により水のみが生成する点でクリーンである。

第二に、燃焼により電力を取り出す場合、他のエネルギーと比較して省エネルギーである[1]。

第三に、分子量（2.0159）が小さいことから、単位重量当たりのエネルギーが他の燃料に比較して大きいこと。

このような特徴から、水素をいかに製造して、貯蔵、運搬、利用するかがということが各方面から研究されている。水素をバイオマスから得る技術として、バイオマスのガス化がある。これは、高温高圧の下で、バイオマスをガス化して水素や一酸化炭素を得る技術である。ガス化では通常、水素や一酸化炭素以外に、メタンや二酸化炭素などが混合して得られる。

本研究は、水素発酵によるバイオマスからの水素生産を目指して、基礎的見

地から行った。発酵は微生物が嫌氣的に有機物を分解して、生存のためのエネルギーを獲得する生命活動である。水素発酵では、微生物の発酵によってバイオマスから水素を取り出すため、ガス化のように高温高圧を必要としない。また、微生物が水素発酵で放出するガスは、水素と二酸化炭素のみであり、これらの分離は膜分離によって容易に行うことができる。また、水素発酵による水素の純度は高く、燃料電池への供給も可能である。よって、水素発酵は、バイオマスと水素の長所を活かした技術として、将来の水素供給に有用な技術となることが期待される。その実用化への課題は、第一に水素収率と水素発生速度の向上、第二に発酵廃液の処理である。前者における水素収率は、例えば単糖のグルコース 1 モルから何モルの水素が得られるかを表す数値である。水素収率の向上は、谷生教授による水素発酵とエタノール発酵のエネルギー変換効率 (%) の比較からその重要性が指摘されており、1.3 節で詳しく述べる。次の 1.2 節では、水素発酵における水素収率について説明する。

1.2 水素発酵における水素収率と光水素発生

水素発酵において理論上で最大の水素収率は 4 であり、次の反応による。



この反応は、グルコースから酢酸と二酸化炭素と水素のみが生成した場合を表す。しかし、実際の水素発酵では、グルコースから各種の有機酸（ギ酸、乳酸、酪酸など）やアルコールを生成する。したがって、水素収率は 4 より低くなる。これまでの報告では、グルコースからの水素収率は 2.5 前後が最大であり、*Clostridium butyricum*（以下、*C. butyricum*）という *Clostridium* 属の細菌による。*C. butyricum* は、水素収率が高く、実用に近い菌であるが、酸素が存在すると増殖できなくなる絶対嫌気性菌である。

本研究において研究の対象とした微生物は、*Enterobacter aerogenes*（以下、*E. aerogenes*）で、発酵による水素発生を行う菌である。*E. aerogenes* は、通性嫌気性菌と呼ばれ酸素が存在しても増殖可能である。したがって、取り扱いが容易であることから実用面での利点を持っているといえる。しかし、*E. aerogenes* によるグルコースからの水素収率は 1 であり [2][3]、*C. butyricum* と比較すると低い値である。*E. aerogenes* と *C. butyricum* を混合して培養を行うと、酸素の影響は *E. aerogenes* の好気呼吸による酸素吸収で無視できるようになり、*C. butyricum* の増殖にとっても有利に働く。この混合した培養によ

っては、グルコースからの水素収率が 2.4~2.7 と報告されており、*E. aerogenes* 単独の培養より大きいことが示されている [4][5]。

微生物による水素発生には、水素発酵を行う微生物以外に、光合成細菌による光水素発生が知られている。この細菌は、太陽光エネルギーによる光合成反応を元にして水素発生を行うもので、この過程での最終的な反応はプロトン還元による水素発生である。光合成細菌は、有機酸やアルコールを分解して、水素発酵より高い水素収率で水素を得ることができる。例として、酢酸から 1 モルから水素が 4 モル得られる反応について次に示す。



水素発酵後には、必ず廃液（主に有機酸とアルコールからなる廃液）を生じる。そのため、この廃液を、光合成細菌による光水素発生により処理することが期待されている。水素発酵の水素収率が低くとも、光水素発生を組み合わせることで、水素収率を引き上げることが可能である。官崎大学の横井らは、水素発酵後の廃液を光水素発生に用いてグルコースからの水素収率が 7 になったと報告している [4][5]。

光水素発生では、光合成細菌による光エネルギーから水素エネルギーへの変換効率を向上させるための研究が進められている。そのため、産業技術総合研究所の若山らにより、培養槽の形状を工夫することで光の透過量を増して、光合成細菌が光エネルギーを効率よく吸収できるような研究が試みられている [6][7]。

1.3 発酵によるバイオマスからのエネルギー生産

有機物を発酵によって分解する技術として、メタン発酵、エタノール発酵、アセトン-ブタノール発酵などがある（アセトン-ブタノール発酵は現在では使われておらず、過去に用いられた技術である）。ここではメタン発酵、エタノール発酵について本研究課題の水素発酵と関連づけて以下に説明する。

1.3.1 メタン発酵

メタン発酵は、有機物と多種多様な微生物が共存している環境下で、嫌気性、温度が 5~70℃、pH が中性付近などの条件が満たされれば、自然に有機物の分解が進み、メタンと二酸化炭素が生成する反応である [8]。日本では、下水処理

技術として古くから用いられてきた。最近では、EUを中心とするヨーロッパ、インド、中国などで、畜産廃棄物からメタン発酵によりメタンガスを回収、利用することが盛んになってきている。実際にメタン発酵で生じるガスは、メタンが6割で、二酸化炭素が残りの4割となっており、これらを総称してバイオガスという。バイオガスは、容積当たりのエネルギー(kWh / m³)でみると6(kWh / m³)であり、プロパンガス(26 kWh / m³)や天然ガス(10 kWh / m³)に比較すると小さいが、水素(3 kWh / m³)に比べると2倍の熱量を持っている[9]。このような特性からバイオガスは、石油や石炭のように直接に燃焼して利用されている。

メタン発酵の過程は、次の二段階で進むとされる。第一段階では、炭水化物、脂質、タンパク質などの有機物が、発酵によって各種の有機酸とアルコールに変換される。この段階で活発に働く微生物は、炭水化物、脂質、タンパク質などの加水分解を行う微生物群である。この微生物群は、加水分解細菌とよばれ、*Clostridium* 属、*Bacteroides* 属、*Bacillus* 属などがある。加水分解細菌によって炭水化物は糖、脂質は脂肪酸とグリセリン、タンパク質はアミノ酸にまで分解される。続いて酸発酵を行う微生物によってこれらの有機物は主に酢酸やギ酸などの有機酸、あるいは水素やアルコールに変換される。

第二段階では、メタン生成菌によって有機酸、水素、アルコールからメタンが生成する。第二段階の反応式を例として以下に示す。

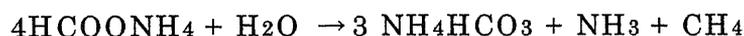
エタノールからの酢酸の生成



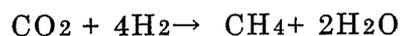
酢酸からのメタン生成



ギ酸からのメタン生成



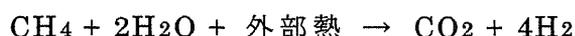
二酸化炭素と水素からのメタン生成



最近、熱処理や pH を低くする処理をすることで、第二段階のメタン生成菌の活動を妨げることができることが明らかになった。メタン生成菌の活動を妨

げること、第一段階の酸発酵において水素の生成量が増加したと報告されている[10]。このようにメタン生成を妨げ、有機物から水素をより多く取り出すための研究が試みられている。それは、水素が、燃料電池の燃料として直接に燃料電池へ送り込むことができる利点を持っているためである。メタンの場合は、燃料電池の種類によっては水素へ変換する必要がある。メタンの水素への変換は、水蒸気改質法によって行われるが、吸熱反応であるため外部熱を必要とする。

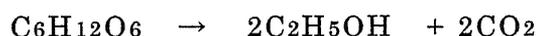
メタンの水蒸気改質による水素製造の反応式



したがって、熱エネルギーを供給するコストをかけて行うことになる。そこで、発酵によりメタンよりも水素を得ることの重要性が指摘されている。ただし、水素発酵により水素を得ることができても、同時に有機酸やアルコールが生成して廃液となる。この廃液処理のために、有機酸とアルコールをメタンにまで分解できるメタン発酵は重要な技術であり、水素発酵と組み合わせて用いることが研究、検討されている。ただし、メタン発酵の後にも発酵廃液が生じる。その廃液には、有機物、アンモニア、リン酸塩などが含まれている。通常、発酵廃液の処理は、希釈した発酵廃液を好気的な条件で微生物によって分解する方法（活性汚泥法[11]）によって処理する。しかし、活性汚泥法によって有機物の濃度を減少させることはできるが、アンモニアとリン酸塩は十分に処理することができず、湖沼における富栄養化の要因になる。このように、発酵法だけでバイオマスの処理を全てできるということはなく、物理的処理や化学的処理法を組み合わせる必要がある[12]。

1.3.2 エタノール発酵

エタノール発酵は、サトウキビなどを原料として酵母菌の発酵を利用してエタノールを生産するものである。全世界では約 3300 万 kl のエタノールが生産されている。最近、廃木材をエタノール発酵によってエタノールの製造に利用することが可能になっている[13]。エタノール発酵は、グルコースを発酵の基質とした場合、次の反応式によって表すことができる。



水素発酵とエタノール発酵のエネルギー変換効率(%)を比較した報告[14]について次に説明する。

エネルギー変換効率は、

(得られる電気エネルギー / グルコースの発熱量) × 100 = エネルギー変換効率(%)として算出する。つまり、グルコースを発酵の基質とした場合に、どれだけ電気エネルギーを得ることができるかという効率を表す。

具体的には、水素発酵の場合に、グルコース 1 モルから取り出した水素を燃料電池で使用した場合のエネルギー変換効率(%)を求める。エタノール発酵では、グルコースを発酵の基質としてエタノールを得て、これを燃料にして火力発電で電気を得るといった場合のエネルギー変換効率(%)を求める。両者の比較を次に示す。

(1) 水素発酵について

グルコースからの水素収率が 1 である場合にエネルギー変換効率は次のようになる。

- ①水素収率 : 1.0 mol / mol-glucose
- ②グルコースの燃焼熱 : 2820.0 kJ / mol
- ③水の生成自由エネルギー : 234.7kJ / mol

なお、燃料電池では、水素 1 モルと酸素 1/2 モルから水 1 モルが生成する。このとき生じる化学エネルギー(③で表す)が電気エネルギーに変換される。

- ④燃料電池の理論効率 : 80%

$$\text{エネルギー変換効率} = \text{①} \times \text{③} \times \text{④} / \text{②} = 6.7\%$$

(2) エタノール発酵について

グルコースからのエタノール収率が 1.7 である場合にエネルギー変換効率は次のようになる。

- ⑤エタノールの収率 : 1.7 mol / mol-glucose
- ⑥エタノールの燃焼熱 : 1366.9 kJ / mol
- ⑦蒸留のエネルギー : 得られたエネルギーの約半分に相当
- ⑧大型火力発電の効率 : (約) 40%

$$\text{エネルギー変換効率} : (\text{⑤} \times \text{⑥} \times \text{⑧} / \text{②}) \times 0.5 = 16.5\%$$

水素発酵によってグルコースから水素を生産して、燃料電池によって化学エネルギーを電気エネルギーに変換した場合、エネルギー変換効率は 6.7%であった。エタノール発酵の場合では、得られたエタノールを火力発電で電気エネルギーに変換した場合にその効率は 16.5%であった。したがって、エタノール発酵のエネルギー変換効率に対して同等以上とするためには、水素収率を少なくとも 2.5 以上に向上させる必要がある。

1.4 研究の目的と各章の概要

本研究は、バイオマスを利用した微生物の水素発酵（発酵水素生産）について、基礎的な知見を得て、応用に結びつけることを意図して行ったものである。具体的には、*E. aerogenes* の発酵水素発生におけるギ酸分解による水素発生機構に着目して、研究を行った。研究においては、水素発生機構を検証すると共に、水素収率や水素発生速度についても向上させる糸口を得るべく進めた。

本論文は、第1章から第4章で構成されている。

第1章の第1節ではバイオマスの利点と、バイオマスからのエネルギー生産について述べた。次に、バイオマスからの水素エネルギー生産として本研究課題の水素発酵がどのような意義を持つかを述べた。

第2節では、水素発酵と光水素発生について、水素収率を中心に説明した。

第3節では、実用化されている発酵法として、メタン発酵、エタノール発酵を挙げ、水素発酵との関連についてまとめた。

第2章では、発酵水素についてこれまでの研究から得られている知見と理論について述べた。主に次の四点である。

第一に、*E. aerogenes* の発酵水素発生について知見と理論を説明した。

第二に、酢酸が微生物の生育、増殖に及ぼす影響について大腸菌で明らかになっている知見を説明した。

第三に、大腸菌 (*Escherichia coli*) のギ酸分解による水素発生がどのようなしくみによって起きるかについて述べた。

第四に、谷生教授により提唱されてきた水素収率改善案について検討、考察した結果をまとめた。

第3章では、発酵水素発生に対するギ酸添加の影響を実験によって検証した結果について述べた。主に次の四点である。

第一に、ギ酸添加が菌体の生育、増殖に与える影響について検討した。

第二に、ギ酸添加が水素発生速度と水素発生量、水素収率に及ぼす影響についての結果をまとめた。

第三に、*E. aerogenes* による水素発生機構、経路について検証した。

第四に、水素収率の向上に必要な手段を、実験結果から考察した。

第4章では、ギ酸添加の実験を通じて得られた、発酵水素発生の理論について述べた。主に次の二点である。

第一に、酸化還元電位とギ酸分解による水素発生の関係について説明した。

第二に、代謝産物収支計算法についての理論についてまとめた。

第 2 章 発酵水素発生における知見

2.1 微生物の発酵水素発生

E. aerogenes は、腸内細菌の一種であり、大腸菌と同じ属に分類される通性嫌気性菌である。通性嫌気性菌は、酸素が存在する環境では好気呼吸を行い、酸素が存在しない場合には発酵により有機物を分解して生育する。発酵では、有機物の分解により二酸化炭素、メタン、有機酸、アルコールなどの代謝産物が生成する。生成する代謝産物は菌の種類や分解する基質（炭水化物、タンパク質、脂肪など）によって異なる。

E. aerogenes は、グルコースを基質とした発酵により、水素と二酸化炭素、有機酸（ギ酸、酢酸、乳酸、酪酸）、アルコール類（エタノール、2, 3-ブタンジオール）を生成する（図 2-1）。特に、2, 3-ブタンジオールは、*E. aerogenes* に特有の代謝産物で、培地 pH が低い時（pH 5.0 前後）に、有機酸の生成を抑えるために、2, 3-ブタンジオールの生成が活発になる。つまり、この菌は、培地 pH が生存に適した範囲内に収まるように、調節する機能を持っている。

大腸菌は、*E. aerogenes* と同様に発酵水素発生をするが、2, 3-ブタンジオールを生成することはできない。したがって、有機酸の生成によって培地 pH が低下した場合、生存が困難になる。大腸菌によるグルコースからの代謝産物は、水素、ギ酸、酢酸、コハク酸、乳酸、エタノールである（図 2-2）。このうち水素は、ギ酸が生成した後に、これを分解することによって発生する。

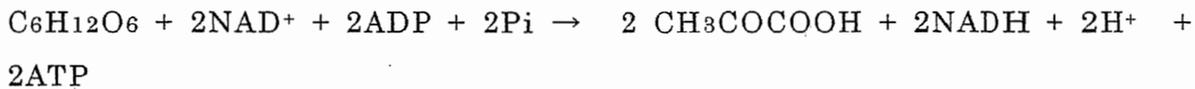
C. butyricum は、グルコースからの代謝産物として水素、酪酸、酢酸、乳酸、エタノールを生成する（図 2-3）。*Clostridium* 属は、低い培地 pH（pH 4.0 - 5.0）にも強く、胞子を形成することで高温・高圧下でも一定の割合で生存することができる。

2.2 発酵における代謝と水素発生経路

生物は、有機物を分解することによって、有機物の持つ化学エネルギーを ATP（アデノシン 3 リン酸）という形で取り出す。ATP を加水分解することによって得られるエネルギーを利用して、生存のための活動を行う。

解糖系は、全生物界において糖代謝の主要経路であり、糖の代謝によって ATP を生成する。解糖系におけるグルコース（単糖）の分解では、グルコース 1 分子あたり 2 分子の ATP を生じる。この反応では、下に示すように 2 分子の

ATP のほかに、2 分子のピルビン酸、2 分子の NADH (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド) が生成する。



ただし、 CH_3COCOOH : ピルビン酸

2NAD^+ : ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド

NADH : ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの還元型

ADP : アデノシン 2 リン酸

P_i : 無機正リン酸

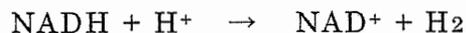
この式に示すように、グルコース由来の炭素原子は全てピルビン酸として代謝される。また、グルコース由来の水素原子によって NAD^+ が還元することで NADH が生成する。

解糖系の次の段階が発酵の主たる過程である。ピルビン酸は、発酵においてガス、有機酸、アルコールなどの代謝産物に変換される。 NADH は、ピルビン酸からの代謝産物の生成過程で再び酸化型の NAD^+ になる (以下、 NADH の再酸化)。 NAD^+ は、再び解糖系に戻って機能する。微生物は、解糖系で ATP を生成するために、発酵によって継続的に NADH の再酸化を行って、解糖系に NAD^+ を供給しているといえる。例として、発酵によるピルビン酸からの乳酸生成で NADH の再酸化が起きることを示す。

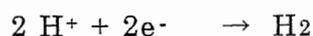
ピルビン酸からの乳酸生成と NADH の再酸化



NADH の再酸化は水素の生成によっても起きる。*C. butyricum* による発酵水素発生の反応である (図 2-3)。



E. aerogenes も NADH の再酸化によって水素発生を行うという仮説が熱力学的考察から提案されている。大腸菌は、ギ酸分解反応によって水素を生成する。



ギ酸 (HCOOH) は微生物の生育可能な pH (大腸菌では pH 5~pH 8) では、ギ酸イオンとして存在している割合が高く (ギ酸の pK_a : 3.75)、ギ酸イオンの分解による水素発生として表すと次のようになる。

1グルコース

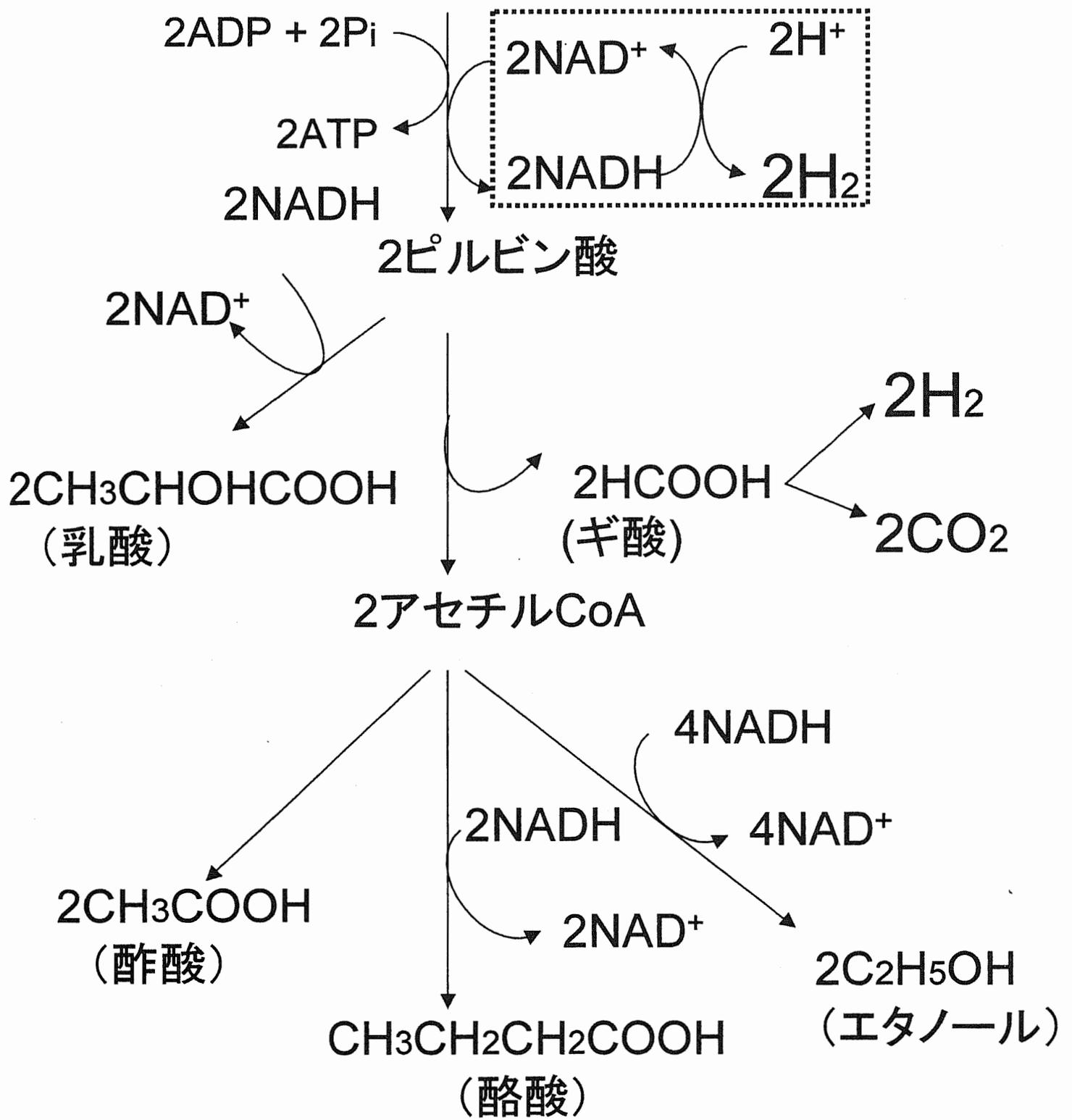


図2-1 *Enterobacter aerogenes* による
発酵水素発生の経路

点線内のNADH反応経路における水素発生は
仮説として提唱されている。

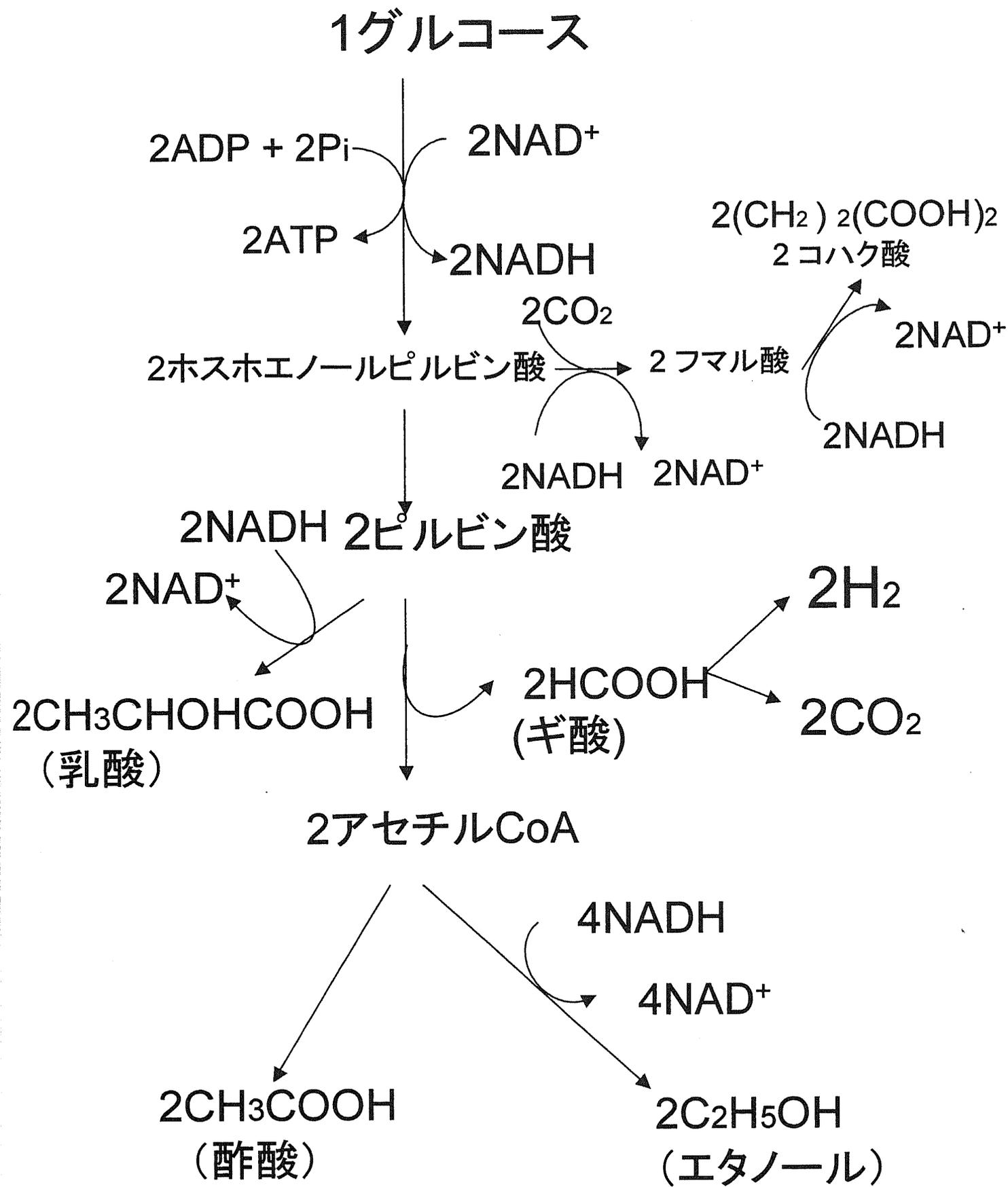


図2-2 *E.coli* (大腸菌) による
発酵水素発生経路。

1グルコース

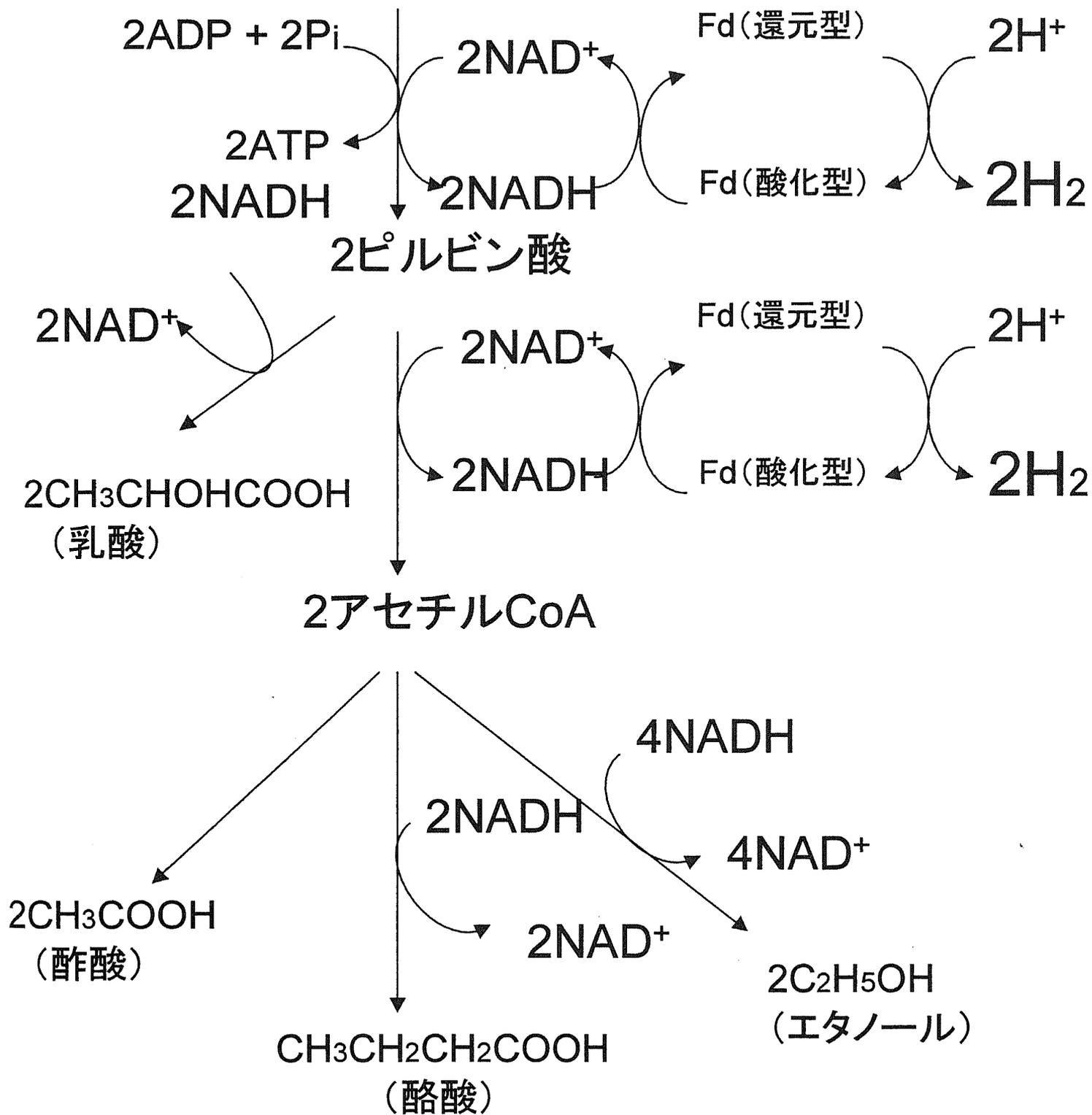
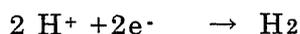


図2-3 *Clostridium butyricum* による
発酵水素発生の経路。



水素発生の経路は、上記の NADH の再酸化、ギ酸分解による経路以外にも、ピルビン酸の分解による経路がすでに明らかになっている。

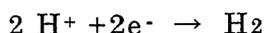
2.3 水素発生と菌体増殖の関係

1. 水素発生と培地 pH との関係

菌体の増殖は培地の pH に大きく影響を受ける[2]。 *E. aerogenes* の増殖における至適 pH は pH7.0 であり、増殖速度 (mg-cell / h) が最も大きい (図 2-4)。増殖速度は、培地 pH が pH7.0 より低くなるにつれて低下する。

一方、水素発生における至適 pH は pH6.0 付近であり、水素収率が約 1 (図 2-4)、水素発生速度は 11.3 (mmol / g dry cell / h) であり最も大きい (図 2-5)。pH7.0 では、約 4 (mmol / g dry cell / h) と pH6.0 の 3 割程度の大きさである。増殖速度が最も小さい pH5.0 における水素発生速度は、8.5 (mmol / g dry cell / h) と pH6.0 の 7 割程度の大きさである。

培地 pH と水素発生の関係については、電気化学的な視点から次のように考えられている[2]。



これらの反応式は、NADH の再酸化によって放出した電子が、プロトン還元することによって水素が生成することを表す。電子は負電荷を持っており、より正の電位へ方向に移動する。これらの反応式を酸化還元電位の式により表すと次のようになる。

$$\text{NADH} : \text{E} = \text{E}_0 + (\text{RT} / 2\text{F}) \ln \{ [\text{NAD}^+] [\text{H}^+] / [\text{NADH}] \} \quad (2.1)$$

$$\text{水素} : \text{E} = \text{E}_0 + (\text{RT} / 2\text{F}) \ln \{ ([\text{H}^+])^2 / (\text{P}_{\text{H}_2}) \} \quad (2.2)$$

ただし、NADH については、 E_0 は pH 0、25°C、1 気圧における中点電位 ($[\text{NAD}^+] = [\text{NADH}]$) を表す。水素については、 E_0 は、pH 0、25°C、水素分圧 (P_{H_2}) が 1 気圧での標準酸化還元電位 (0V) を表す。

電気化学的には、(2.2) 式の酸化還元電位が (2.1) 式の酸化還元電位より高い場合に、NADH の酸化で生じた電子がプロトンに伝わり水素が発生する。つまり、(2.2) 式の酸化還元電位から (2.1) 式の酸化還元電位を引いた酸化還元電位差 ΔE が正であるときに水素発生が起こる。

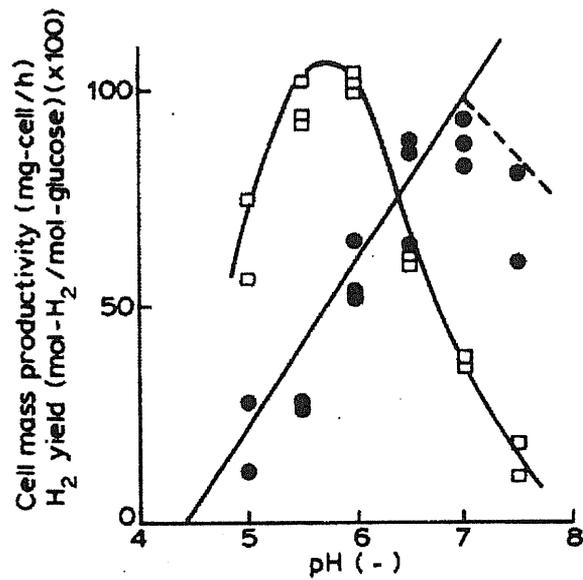


図 2-4 菌の増殖速度と水素収率に対する培地 pH の影響 [2]

●は、菌の増殖速度 (mg-cell/h) を、□は、水素収率を表す。

培養条件: 培養温度 38°C, 培地 pH は、30% NaOH または 30% H₂SO₄ を用いて、pH コントローラーによる自動制御

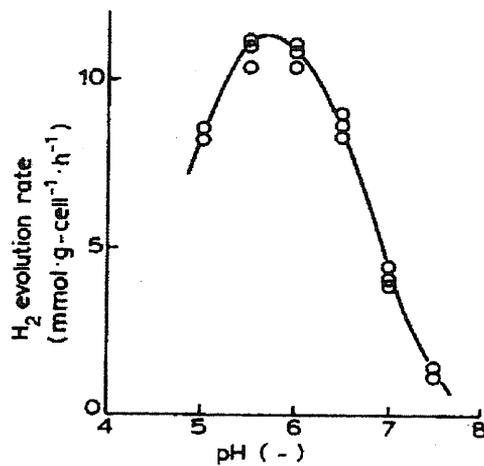


図 2-5 比水素発生速度 (菌体 1g 当たりからの水素発生速度) に対する培地 pH の影響 [2]

培養条件: 培養温度 38°C, 培地 pH は、30% NaOH または 30% H₂SO₄ を用いて、pH コントローラーによる自動制御

ΔE と培地 pH との関係は図 2-6 のように表される[2]。この図では、NADH の再酸化が細胞膜の内側 (pH 8) で起こり、水素発生は細胞膜の外側、つまり培地 pH の条件で起こるとして算出されている (図 2-7 を参照) [2]。図 2-6 から、培地 pH が低いほど、 ΔE は正の方向に大きくなることが分かる。よって、培地 pH が低いほど水素が生成する方向に反応が進むといえる。 ΔE は pH 5.0 の方が、pH 6.0 より大きいことから電気化学的には pH 5.0 の方が、水素が発生しやすくなる。しかし、実際には pH 6.0 で最も水素発生速度と水素収率が大きいので、酸化還元電位差のみでは水素発生と培地 pH との関係を完全に説明することができないと考えられている。そこで、水素発生の起こりやすさについては、酸化還元電位差と菌体の増殖の両面から考える必要がある。すなわち、培地 pH が 5.0 の時は、菌体の増殖が pH 6.0 の時より不活発なので、この点を水素発生が不活発になる要素と考えるのである。

なお、図 2-6 において、培地 pH が pH 6.0 の場合、 $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+] = 1$ 、水素分圧 1 atm の算出条件下では ΔE がわずかに負であるが、 $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+] = 20$ 、水素分圧 0.1 atm では正である。このように ΔE の正負は算出条件に左右され、必ずしも実際の水素発生の有無と一致しない。なお、実際の細胞内における $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$ は、嫌気状態 (発酵) で 0.7 程度、酸素の存在する好気状態では 0.03 程度であることが大腸菌の研究から明らかになっている。

酸化還元電位差の計算によれば、もし水素発生と NADH の再酸化の両者の反応が細胞膜の内側、すなわち細胞内 pH (pH 8.0 程度、培地 pH によらず一定) で起こるとすれば、 ΔE は負となる。また、両者の反応が共に細胞膜の外側 (培地 pH) で起こるとしても、pH 4.0-8.0 の広い範囲にわたって ΔE は負となる。よって、図 2-6 の算出条件 (NADH の再酸化は細胞膜の内側、水素発生は細胞膜の外側で起こる) が、水素発生の実験結果と最もよく合致している。

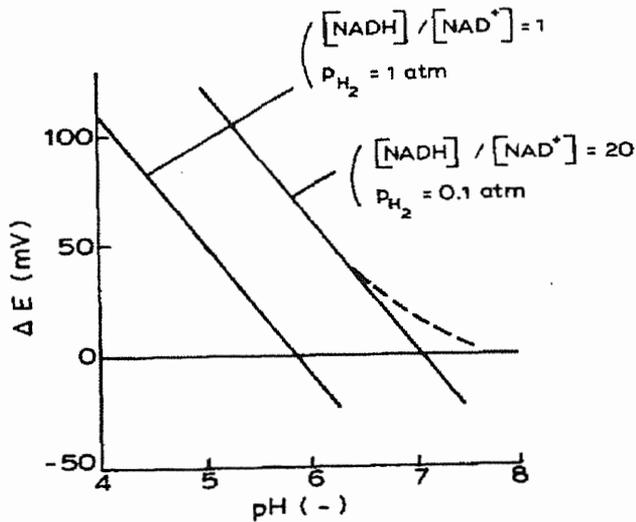


図 2-6 NADH-水素系の酸化還元電位差と培地 pH の関係 [2]
 $[NADH] / [NAD^+]$ は、細胞内における NADH の還元型と酸化型の濃度比を表している。

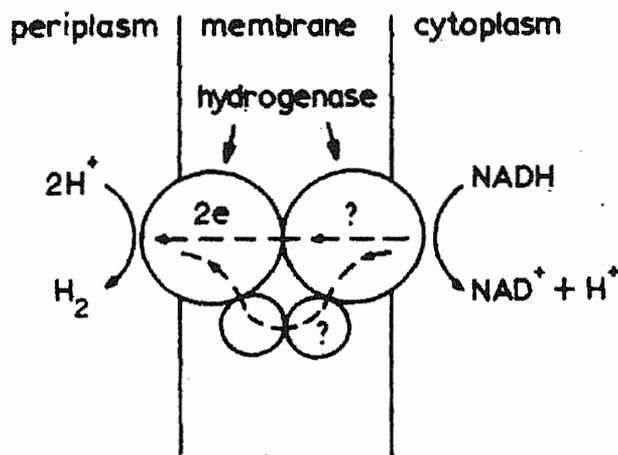


図 2-7 NADH-水素発生の電子伝達機構 [2]

cytoplasm が細胞膜 (membrane) の内側、periplasm が細胞膜の外側を表す。水素発生に関わる酵素ヒドロゲナーゼ (hydrogenase) は、大腸菌のヒドロゲナーゼを参考に 4 量体 (大きさ 2 つのサブユニットと小さな 2 つのサブユニット) で表している。電子 (e) はヒドロゲナーゼによって細胞膜を内側から外側に伝達されると考えられる [2]。

2.4 菌体増殖に対する酢酸の影響

大腸菌の細胞内 pH は、培地 pH が 5.5-9.0 の広い範囲にわたって変化しても、ほぼ一定の pH 8.0 に保たれることが判明している。ただし、培地に酢酸が一定濃度以上に存在すると、培地の酢酸 (CH_3COOH) によって、細胞内の pH と酢酸イオン濃度が低下することが判明している(図 2-8)[15]。図 2-8 は、次のように説明される。

- ① 培地には、酢酸イオンとプロトンの結合により酢酸 (CH_3COOH) が存在しており、酢酸イオンと平衡状態となっている。酢酸 (CH_3COOH) は、電荷を有しないために、菌の細胞膜を容易に透過する性質を持つ。この点について、生化学の基礎的知見から、細胞膜などの生体膜には、極性ないしは荷電した溶質を透過しない性質があることが分かっている。これは、細胞膜を構成する主な分子であるリン脂質とステロールが疎水的な相互作用によって脂質二重層を形成することに起因する。すなわち、脂質二重層では、リン脂質とステロールの非極性部分が向き合い、極性部分が外側に向いた構造をとっており、極性溶質に対して不透過性を示すことが分かっている。極性物質やイオンの膜透過は、特定の膜タンパク質が脂質二重層を通るための輸送担体 (トランスポーター) として機能するために可能になることも分かっている。これは、輸送担体が極性物質やイオンの膜透過に必要な活性化エネルギーを低くしていることによる。
- ② 細胞膜を透過した酢酸は、細胞内で酢酸イオンとプロトンに解離して、細胞内 pH と酢酸イオン濃度を低下させる。

ここで、培地に存在する酢酸の濃度 ($[\text{CH}_3\text{COOH}]$) は、下記の Henderson-Hasselbalch 式から培地 pH と酢酸イオンと関係付けられる。

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log [\text{CH}_3\text{COO}^-] / [\text{CH}_3\text{COOH}] \quad (2.3)$$

(pH は培地 pH、酢酸の pKa = 4.76)

(2.3) 式より、培地 pH が一定の場合は、培地の酢酸イオン濃度が高いほど酢酸濃度も高くなる。培地の酢酸濃度が高いと、菌の細胞膜を透過する酢酸分子も増加する。したがって、理論的には、透過する酢酸分子が多いほど、細胞内の pH は低下して、細胞内の酢酸イオン濃度は増加する。しかしながら、培地の酢酸イオン濃度が細胞内の pH と細胞内の酢酸イオンに与える影響は必ずし

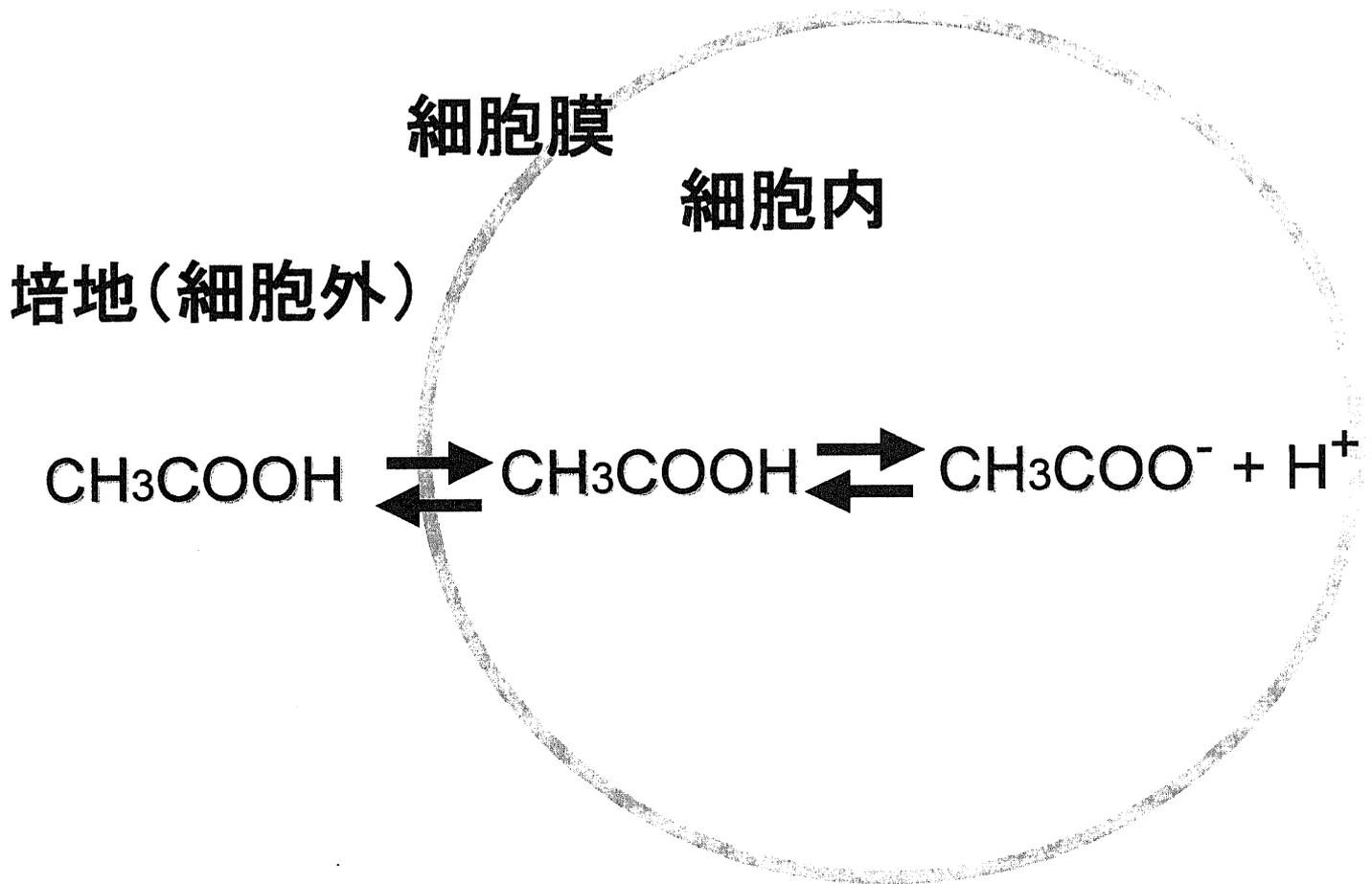


図2-8 培地の酢酸(CH_3COOH)が細胞内のpHと酢酸イオン濃度に与える影響についての模式図(文献[16]に基づいて作成)。細胞膜を透過した酢酸は、酢酸イオンとプロトンに解離して細胞内のpHを低下させ、酢酸イオン濃度を増加させる。

も理論と一致しない。この点を以下に図 2-9 より説明する[15]。

大腸菌 O-157 株（以下、O-157）について、培地 pH が pH 5.9 で一定の時、培地中の酢酸イオン濃度が高いほど、細胞内 pH が低下し、(図 2-9 a) 細胞内の酢酸イオン濃度は高くなる (図 2-9 b)。ただし、細胞内の酢酸イオン濃度は 300mM を超えた後は増加していない。また、大腸菌 K-17 株（以下 K-17）では、培地の酢酸イオン濃度が高くなると、細胞内 pH は pH 6.9 から 6.7 に低下するが再び pH 6.8 へ上昇する。しかし、細胞内の酢酸イオン濃度は、培地の酢酸イオン濃度の増加にほぼ比例して高くなる。このように、菌株の違いによって酢酸イオン濃度による影響の受け方は異なっている。

培地の酢酸イオン濃度によって、細胞内のカリウムイオン濃度も影響を受ける(図 2-9 c)。カリウムイオン濃度は O-157 では 300mM 前後で一定であるが、K-17 では 500mM 以上まで増加する。この傾向は、細胞内の酢酸イオン濃度の増加においても同じであることから両者の相関が指摘されている。

図 2-10 に、O-157 と K-12 の生育に対する培地の酢酸濃度の影響を示す[32]。図 2-10a より、どちらの菌についても、酢酸濃度が高いほど、培地の菌体濃度は小さいことが分かる。菌体濃度の減少は、酢酸によって菌の増殖が制限（阻害）されていることを表している。菌体濃度がゼロであることは菌が増殖しないことを指す。同じ酢酸濃度でも、O-157 では K-12 により菌体濃度が高いことから、前者の増殖は後者より酢酸濃度の影響を受けにくいことがわかる。

図 2-10 b より、どちらの菌についても、酢酸濃度が高いほど、培地に残存するグルコースの濃度が高いことが分かる。これは、菌が、それ以上グルコースを消費しないことを表しており、つまり菌の増殖が制限されていることを意味する。O-157 では、酢酸濃度が 100mM までならば培地のグルコースを全て消費して増殖する。K-12 では酢酸濃度が 30mM を超えるとグルコースが残存して、それ以上増殖できない。したがって、O-157 の方がより高い酢酸濃度に対応しているといえる。このように O-157 は酢酸による酸性のストレス（負荷）に対して他の大腸菌より高い抵抗性を持つ。以上のように培地の酢酸濃度の増加は、菌の増殖を抑えるような影響を与える。これは、酢酸が細胞内に透過するほどに細胞内 pH が低下し (図 2-9a)、菌体増殖に関わるタンパク質の機能が阻害されて、その結果、菌体増殖が阻害されるためである。

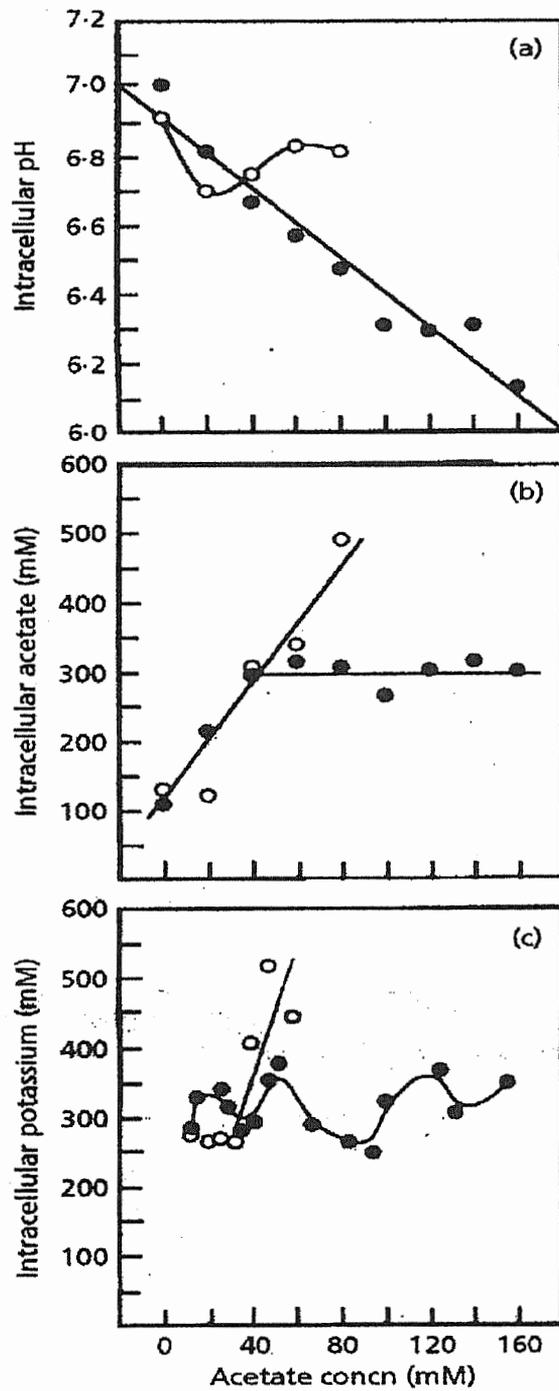


図 2-9 培地の酢酸イオン濃度が細胞内に与える影響 [16]

(a) 培地の酢酸イオン濃度と細胞内 pH

(b) 培地の酢酸イオン濃度と細胞内の酢酸イオン濃度の関係

(c) 培地の酢酸イオン濃度と細胞内のカリウムイオン濃度の関係

○は、大腸菌 K-12、●は大腸菌 O-157:H7 についての測定値を示す。
 培養条件：グルコース制限培地での連続培養による。本培養培地の pH：pH 5.9

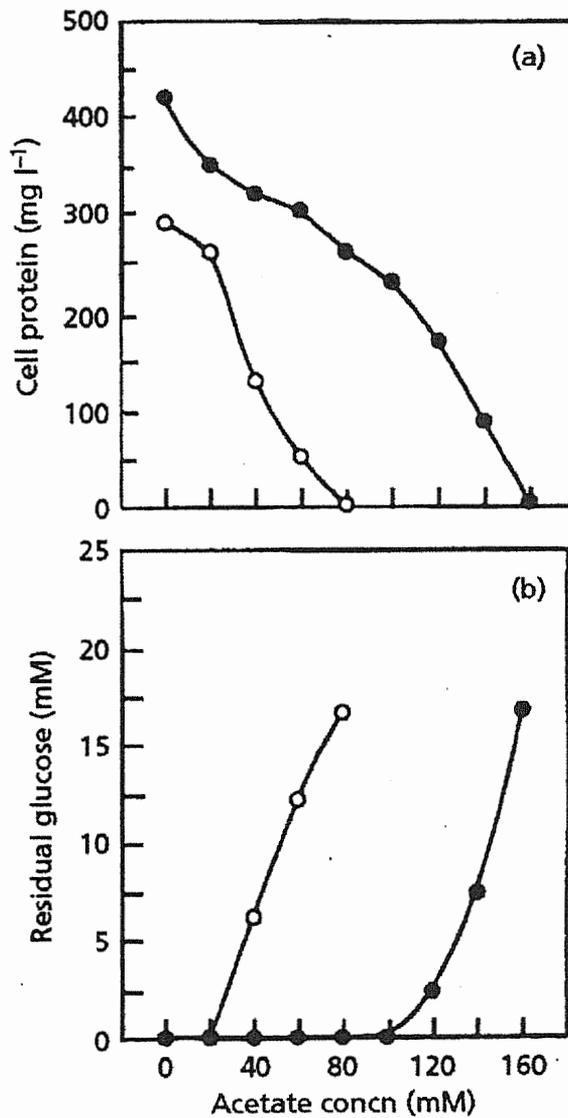


図 2-10 大腸菌の生育に対する培地の酢酸濃度の影響 [16]

(a) 菌体濃度 (mg / l) に対する酢酸濃度の影響

(b) 培地に残存するグルコース濃度と酢酸濃度の関係

○は、大腸菌 K-12、●は大腸菌 O-157:H7 についての測定値を示す。

培養条件：連続培養による (dilution rate 0.085 h⁻¹ , 基質はグルコースでグルコース供給液におけるグルコース濃度は 16.7mM)、培地 pH: pH 5.9

2.5 微生物の酸耐性

一般に菌は、外界の環境変化（酸性度やアルカリ性度、温度、粘度など）に応答（ストレス応答といわれる）する能力を有している。酸に対して応答する力は、acid stress tolerance と各種の論文[17-18]で表記されていることから、ここでは微生物の酸耐性と表記する。酸耐性には、次に挙げる3つの性質が関与している。

第一に、細菌は、酸性環境下で、細胞膜を構成する成分であるタンパク質や脂肪酸の組成を変化させ、その環境に耐えられるようにする性質を持つ[17]。

第二に、細菌は、酸によって細胞内 pH が変化することに対して、細胞内 pH を調節する性質を有する。一つは、細胞内液の pH 緩衝作用によって生存に適した pH を維持する。また、ギ酸分解酵素によるギ酸の分解も細胞内 pH を調節する手段となる（次節 2.6 を参照）。

第三に、酸による遺伝子（DNA）の損傷を防ぐ性質。また、損傷した場合には、損傷を修復する。これらの性質には DNA 結合タンパク質が関与することが判明している[19]。

酸耐性は、菌の増殖とも深く関係しており、菌が急激に増殖する対数期より、増殖後に菌体数がほぼ一定となる定常期において酸耐性が強く働くことが分かっている[18]。この要因として、定常期の細胞は対数期の細胞より、細胞内での酸の解離によるプロトン蓄積しにくい（細胞外に出す）ことが関わると報告されている。対数期の細胞は定常期の細胞より、酸の解離によるプロトンを細胞内に5~10倍蓄積するという。

2.6 大腸菌におけるギ酸分解の制御機構

大腸菌は、細胞膜に存在するギ酸分解酵素系の働きによってギ酸分解による水素発生を行う。ギ酸分解酵素系は、主にギ酸分解を触媒するギ酸デヒドロゲナーゼと水素発生を触媒するヒドロゲナーゼによって構成されている（図 2-11a）。大腸菌によるギ酸分解は、次のような順序で進む（図 2-11a, 文献 22 の Rossmann らのモデルに基づいて作成）[20-22]。

- ① グルコースの代謝によって、細胞内でギ酸（ HCOOH ）が生成する。生成したギ酸は解離して、細胞内のギ酸（イオン）濃度とプロトン濃度が高くなる。これらの濃度が高くなると生存のためには不利である。
- ② そこで、ギ酸イオン濃度の増加が信号となって、ギ酸分解酵素系の遺伝子が発現して、ギ酸分解酵素系が合成される。そのギ酸分解酵素系によりギ酸分解が進む。ただし、グルコースの代謝によって細胞内で生成したギ酸は、特定の輸送担体（formate channel）によって細胞外（培地）に運び出されることも分かっている。また、図 2-11a で示すように、培地のギ酸（ HCOOH ）が細胞内へ透過した場合も、ギ酸（ HCOOH ）解離により、細胞内のギ酸（イオン）濃度とプロトン濃度が高くなり、ギ酸分解が進むことが知られている。

このように、大腸菌は生存のために、細胞内のギ酸濃度が高くなると、ギ酸分解を始め、細胞内外のギ酸濃度を生存に適するように調節する。つまり、ギ酸分解による水素発生は、生存のための手段であるといえる。

図 2-11b に Rossmann らのモデルによるギ酸分解のモデル図を示す[22]。この図は、次のように説明される。まず、細胞内のギ酸濃度の上昇が信号となって、FhlA (formate hydrogenlyase A) タンパク質がギ酸分解酵素系の遺伝子である *fdhF* 遺伝子を発現させる。*fdhF* 遺伝子の発現により、図 2-11 の FDH_H (formate dehydrogenase H: ギ酸デヒドロゲナーゼを指す) をはじめとするギ酸分解酵素系の合成が進む。この Rossmann らのモデルは、現在までに分子レベルで証明されてきている。また、最近、FhlA タンパク質の遺伝子である *fhl A* 遺伝子と高い相同性を持つ *E.aerogenes* の *fhl A* 遺伝子が発見された[23]。大腸菌と同じ属である *E.aerogenes* が、大腸菌と同様のギ酸分解機構を有している可能性がある。

注) 細胞膜上の青色部は、ヒドロゲナーゼ、赤部はギ酸デヒドロゲナーゼ(FDH_H)を示す。ギ酸分解は細胞内で起きるとした(第四章参照)。

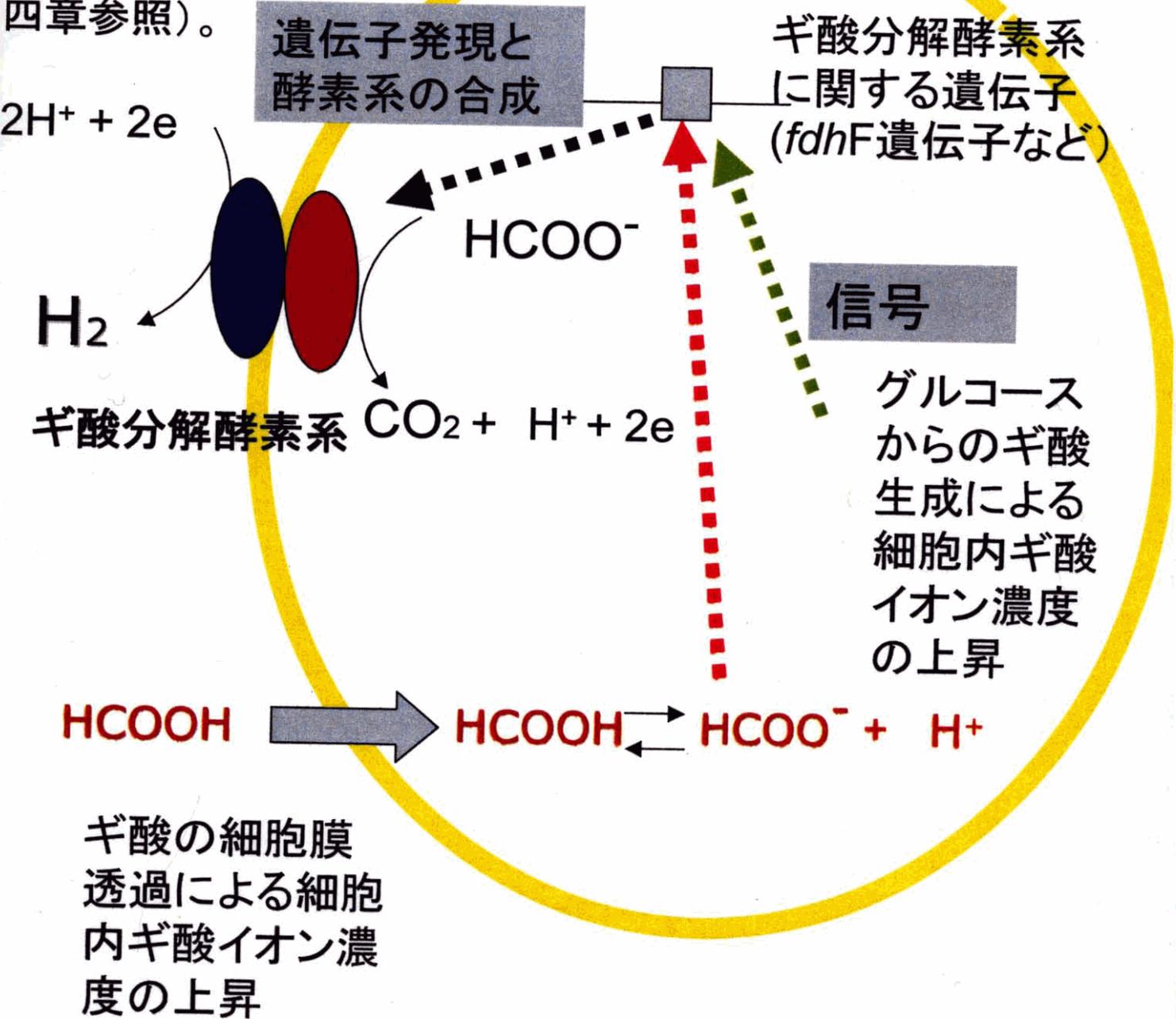


図2-11a 細胞内ギ酸イオン濃度の上昇によるギ酸分解酵素系の合成(文献[22]に基づいて作成)。

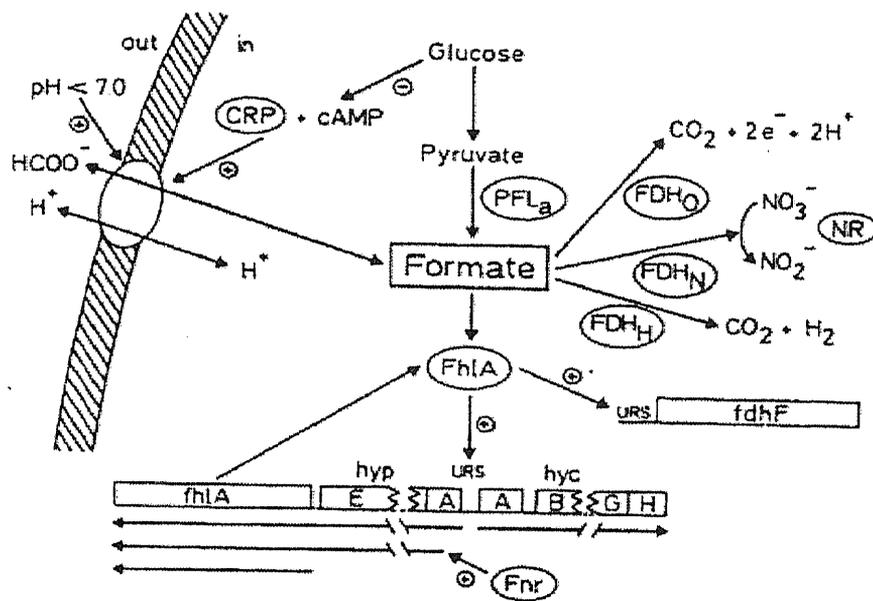


図 2-11b Rossmann らの提唱するギ酸分解機構のモデル図 [22]

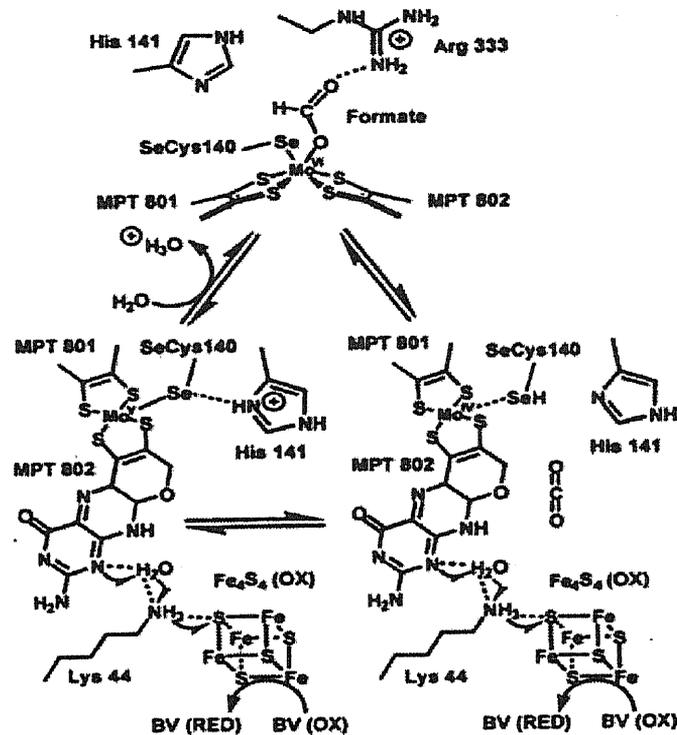


図 2-12 ギ酸分解により生じた電子が金属原子間を伝わる仕組みについてのモデル。電子は、BV (benzyl viologen) を還元することが分かっている [24]。

2.7 ギ酸分解酵素の金属原子間における電子伝達のしくみ

ギ酸デヒドロゲナーゼは、ギ酸分解を触媒する酵素で、分子量は約 80kDa である。酵素 1 モル当りに Fe を 3.3g 含み、他に Mo、Se を含有している。このように金属原子を含有する酵素は金属タンパク質と呼ばれる。

ギ酸デヒドロゲナーゼの Fe、Mo、Se は、ギ酸分解を触媒する酵素の活性に必要不可欠であることが分かっている。これら金属原子がギ酸分解における電子伝達に関わっていることが、ギ酸デヒドロゲナーゼのタンパク質立体構造解析などによるデータから明らかになっている [24]。金属原子間の電子伝達について提案されているモデル [24] を以下に説明する (図 2-12)。

まず、ギ酸の分解によって CO_2 とプロトン、電子が生成する。ギ酸一分子から生じた二つの電子は Mo に直接伝わり、これを還元する。図 2-12 に示すように、Mo 原子はギ酸デヒドロゲナーゼが有する MPT (molybdopterin) 及び SeCys140 残基と化学的に結合している。MPT は、Mo と結合して電子伝達を行う補因子 (cofactor) であり、グアニンなどの塩基を有している。MPT には、化学構造の異なる MPT801、802 があり (図 2-12)、各々の有する二つの硫黄原子が四角形を形成して Mo と結合している。Se は、その四角形を底面とするピラミッド構造の垂直軸方向にある。Mo の還元によって Mo の酸化数は +6 から +4 になる。Mo の還元に伴い、ギ酸からのプロトンは SeCys140 残基の Se をプロトン化 (SeH) する。SeCys140 残基の Se は Mo と化学的に結合しており、プロトン化により SeH と Mo は水素結合を形成する。

次に電子は Mo 原子から MPT を通じてリジン 44 残基のアミノ末端から

Fe_4S_4 の S に伝わる経路が最も直接的だと考えられている。ギ酸から伝わった二つの電子のうち、まず一つが Fe_4S_4 に伝わり Mo の酸化数は +5 となる。この間に、ギ酸からのプロトンによって His141 がプロトン化されて、His141 のイミダゾール基と SeCys140 残基の Se との間で水素結合が形成される。さらに二つ目の電子が Fe_4S_4 に伝わり、Mo の酸化数が +6 ともとの酸化数に戻る。この Mo の酸化によって、SeCys140 残基と His141 の水素結合が切れて、His141 のプロトンは溶媒中に放出されると推定されている。

このように二つの電子が順に Mo から Fe_4S_4 に伝わるためには、一つ目の電子によって還元された Fe_4S_4 が直ちに酸化される必要がある。しかし、 Fe_4S_4 の酸化によって生じた電子を受け取る分子 (電子受容体) はまだ判明していない。BV (benzyl viologen) を電子受容体として用いた実験から、 Fe_4S_4 から BV への電子伝達が可能であることが示されている。

以上のように、Fe、Mo、Se は、ギ酸分解によって生じた電子を伝達する役目を担っている。この電子がヒドロゲナーゼまで伝達されるとプロトンと結合して水素が発生する。

2.8 *Enterobacter aerogenes* の水素収率改善案についての検討

2.8.1 水素収率改善案について

1.2 節で述べたように、発酵における理論上の最大の水素収率は 4 である。

このとき、グルコースから酢酸、水素、二酸化炭素が生成する。この反応を NADH の観点から説明すると、次のとおりである。図 2-3 に示すように、*Clostridium* 属では解糖系で 1 モルのグルコースから 2 モルの NADH が生成する。さらに 2 モルの NADH がピルビン酸からアセチル CoA の生成過程で生成する。これらの合計 4 モルの NADH が全て水素生成によって再酸化すれば水素収率は 4 となる。この場合、アセチル CoA は、全て酢酸生成に利用されることが必要である。それは、酢酸生成が NADH の再酸化を伴わずに起こる唯一の代謝産物生成の反応であることによる。実際の発酵では、酪酸や乳酸の生成によって NADH が再酸化されるので *Clostridium* 属の中で最も水素収率の高い *C. butyricum* でも水素収率は 2.35 である。

C. butyricum は絶対嫌気性菌であることから、酸素存在下では生育できないが、*E. aerogenes* などの通性嫌気性菌は、酸素存在下で好気呼吸をすることができる。一般に好気呼吸では、解糖系、クエン酸回路および電子伝達鎖が働いて、グルコースが炭酸ガスと水にまで代謝される時、グルコース 1 モル当たり NADH が 10 モル生成する (図 2-13)。もし、この 10 モルの NADH が水素生成に利用できれば水素収率が向上する可能性があるという水素収率の改善案が提案されている [25]。通常的好気呼吸では、電子伝達鎖に存在する NADH デヒドロゲナーゼによって全て NADH が NAD^+ に酸化する。この酸化で生じたプロトンと電子は酸素と結合して水を生成する。したがって、10 モルの NADH を水素発生に利用するためには、第一に NADH デヒドロゲナーゼによる NADH の再酸化を阻止する必要がある。このため、谷生研究室では NADH デヒドロゲナーゼの機能を阻害する阻害剤 (ロテノン、アミタールなど) を用いて NADH デヒドロゲナーゼの作用を阻害することを試みてきた。しかし、阻害剤が本当に NADH デヒドロゲナーゼを阻害したかについて明らかな結果が得られていなかった。そこで、著者は阻害剤を用いた研究の文献調査を行った。その結果、次の点が明らかになった。第一に、多くの好気呼吸を行う微生物は、二種類の

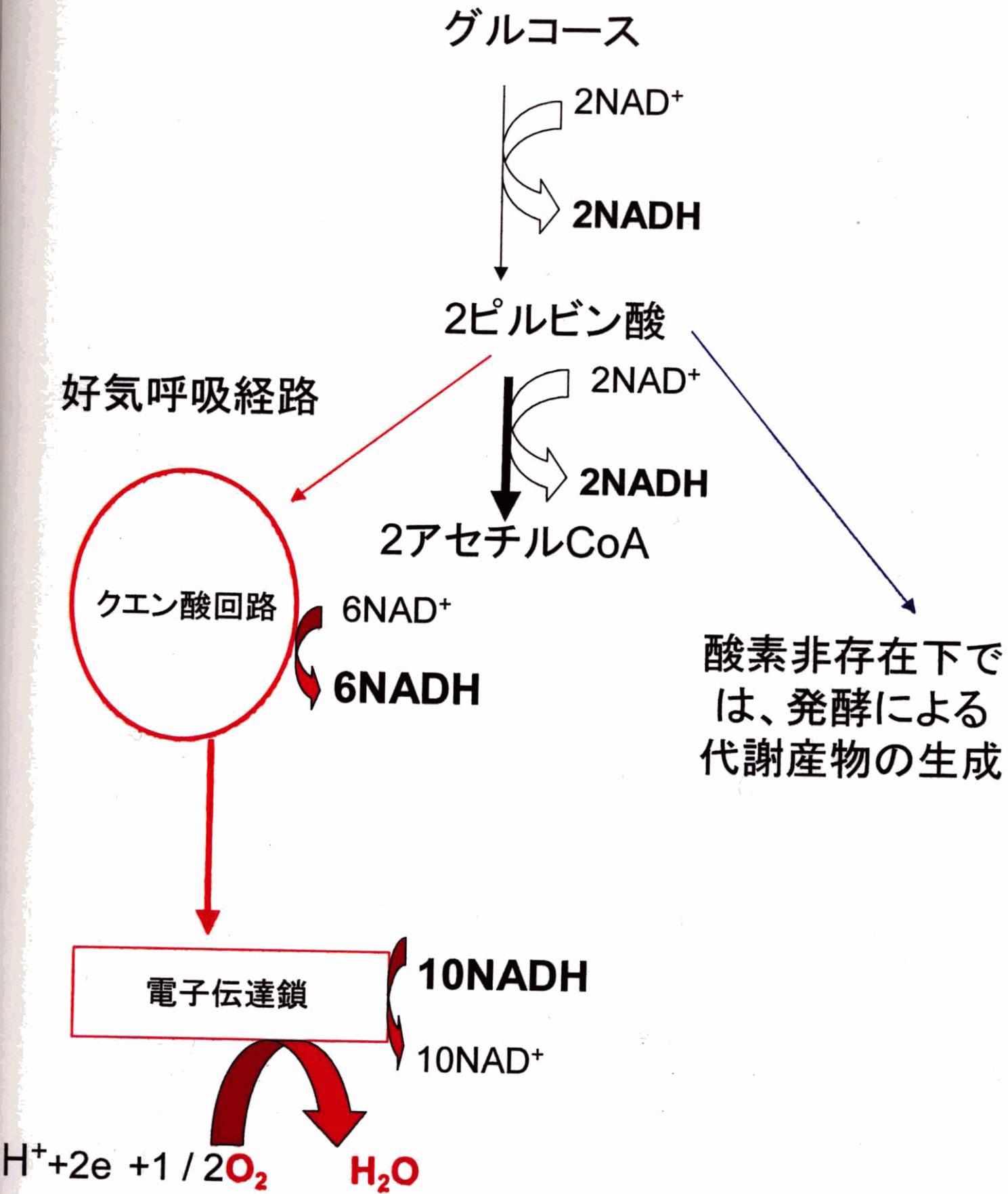


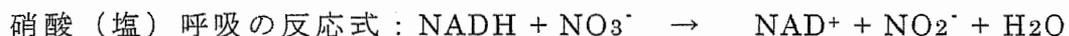
図 2-13
通性嫌気性菌における好気呼吸経路と発酵の関係

NADH デヒドロゲナーゼ (NADH デヒドロゲナーゼ I と II) を有していること。第二に、既存の阻害剤は NADH デヒドロゲナーゼ I には阻害効果を持つが、NADH デヒドロゲナーゼ II については阻害できないことが分かった [26]。同じ文献により、NADH デヒドロゲナーゼ I、II の両者に対する阻害剤がいくつか見出されていることが分かったが、市販されておらず入手には至らなかった。現在では阻害剤ではなく、NADH デヒドロゲナーゼの遺伝子を機能させないという観点から研究が進められている。なお、大腸菌では、NADH デヒドロゲナーゼ I、II の遺伝子を欠損させた株が得られており、生育や遺伝子発現についての研究が行われている [27-32]。

通性嫌気性菌に好気呼吸を行わせる実験のために、まず有機物の分解で生じた電子が酸素に受け取られることが必要である。酸素は、電子を受け取ることから好気呼吸における電子受容体と呼ばれる。実験の上では、酸素を継続的に培地に送り込みつつ、発生する気体を正確に定量することは難しい。したがって、実験の上では、酸素に代わる電子受容体が必要である。そこで次節においては、*E. aerogenes* の好気呼吸について、電子受容体を中心にこれまで判明している知見を最初に述べ、次に著者による文献調査と実験の結果について説明する。

2.8.2 硝酸イオンが発酵水素発生に及ぼす影響

細菌の中には、有機物を酸化して硝酸イオンを還元するものがある。これを硝酸 (塩) 呼吸という。



E. aerogenes は、硝酸 (塩) 呼吸を行うことのできる細菌であることがわかっている。硝酸イオンは、酸素に匹敵する高い標準酸化還元電位を有していること (図 2-15) から、酸素に代わる電子受容体として実験に利用できると想定されて谷生研究室において研究が行われてきた。これまでに、発酵水素発生の途中で、硝酸イオンを培地に 5mM 添加すると、発酵水素発生が不活発になることが分かっている。すなわち、グルコースの消費速度と水素発生速度は低下して、水素の収率も低下する。大腸菌では、硝酸イオンが水素生成を触媒するヒドロゲナーゼ (ギ酸分解酵素系の一部) の酵素活性を阻害すること [33] が明らかになっており、*E. aerogenes* で水素発生が不活発になった要因も同じであると推定される。また、*E. aerogenes* の代謝に与える影響としては、硝酸イオ

ンの存在により、グルコースから酢酸が主に生成することが培地成分の分析(高速液体クロマトグラフィー)から分かっている。

著者による文献調査から、大腸菌では、硝酸イオンが培地に存在すると、*E.aerogenes* と同様に主に酢酸が生成するが、このときクエン酸回路が働かないことが分かった[34]。その要因は、硝酸イオンによって、コハク酸デヒドロゲナーゼと 2-オキソグルタレート合成が抑制されるためであると考えられている。コハク酸デヒドロゲナーゼはクエン酸回路と電子伝達鎖で機能する酵素であり、この酵素が合成されなければクエン酸回路と電子伝達鎖が機能することはできない。

著者は、実験により *E. aerogenes* の場合においても、1%のグルコースからの代謝産物は酢酸が主であること(条件:培養開始時の pH6.0、培養温度 37°C、硝酸カリウム 5mM)を確認した。したがってグルコースから生じたピルビン酸はアセチル CoA に変換されるが、アセチル CoA はクエン酸回路に入らず、すべて酢酸に変換されたことになる(図 2-14)。この結果は、*E. aerogenes* の硝酸呼吸においても大腸菌と同様にクエン酸回路が働かないことを意味している。*E. aerogenes* の水素収率改善案では、クエン酸回路が機能することが前提にあるため、硝酸イオンを酸素に代わる電子受容体として用いることはできないといえる。なお、硝酸(塩)呼吸によって、1モルのグルコースから2モル近くの酢酸が生成することから、この過程で4モルの NADH が生成すると推定される。仮に、NADH による硝酸イオンの還元を阻止して、全て水素発生に利用できるとすれば、1モルのグルコースから4モルの水素が生成することになる。しかし、硝酸イオンの存在によって、水素生成を触媒するヒドロゲナーゼの酵素活性が阻害されること[33]から、硝酸イオンを水素発生実験に用いることは難しいと考えられる。硝酸イオンによるヒドロゲナーゼの酵素活性阻害は、ヒドロゲナーゼに関連する遺伝子の発現量が低下することに起因することが分かっている [33]。

2.8.3 鉄イオンが発酵水素発生に及ぼす影響

次に、酸素に代わる電子受容体として、三価の鉄イオンを選び、水素発生に与える影響を検討した。三価の鉄イオンは、標準溶液中において酸素に匹敵する高い標準酸化還元電位で電子を受け取ることができること(図 2-15)から、電子受容体の候補と考えた。

その結果、三価の鉄イオン(硫酸鉄: $\text{Fe}_2(\text{SO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)を 5mM(2.53 g / l-culture)で添加したグルコース 1%培地(鉄培地)では、培養 8 時間までの積算

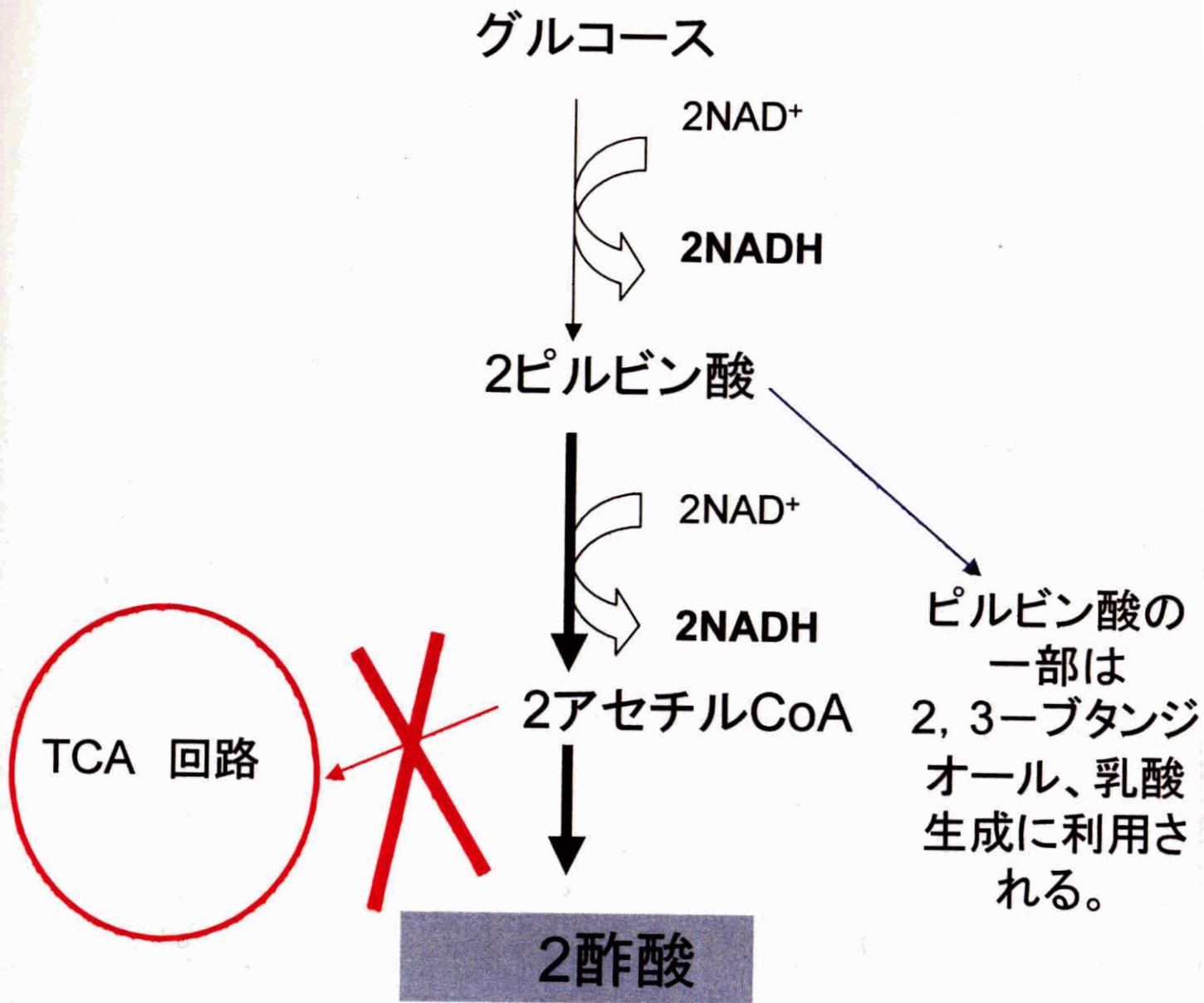


図 2-14

硝酸呼吸の経路

1. 硝酸呼吸では、代謝産物の大部分は酢酸である。
クエン酸回路に入るアセチルCoAはない。
2. 酢酸生成の過程で、1モルのグルコースから4モルのNADHが生成する。NADHは、硝酸イオンを還元して亜硝酸イオンが生成する。



25°C、pH 7、1 atm における E'_0 (V)



図 2-15 酸素、鉄、硝酸、NADHの
標準酸化還元電位

水素発生量とグルコース消費量が対照（鉄添加なし）より多かった。グルコース消費量が多かったことは、菌の増殖が活発であったことを示唆しており、今後詳細な菌体濃度の分析が必要である。

鉄培地では、対照と同様に発酵水素発生が起きたことから、鉄によって好気呼吸が真に起きたか明確にはできなかった。ただし、実験の条件から、好気呼吸が培養の開始から短時間に起きた可能性がある。それは次の理由による。添加した 5 [mmol / l-culture] の鉄イオンを全て還元するために電子は等量の 5 [mmol / l-culture] 必要である。仮に、鉄イオンによって好気呼吸が起きて、グルコースが完全に炭酸ガスと水に酸化するならば、1 [mmol / l-culture] のグルコースの酸化によって電子 12 [mmol / l-culture] が放出される。したがって、グルコースが 0.42 [mmol / l-culture] だけ酸化すれば、5 [mmol / l-culture] 電子が放出され、添加した 5 [mmol / l-culture] の鉄イオンを全て還元できる。菌は、0.42 [mmol / l-culture] という量のグルコースであれば、少なくとも培養開始後 30 分以内には消費するので（図 2-16）、このわずかの間に 5 [mmol / l-culture] の鉄イオンが全て還元された可能性がある。よって、鉄イオンが電子の受容体となり、好気呼吸が培養後 30 分以内に起きた可能性は残っている。また、グルコースが 10 [mmol / l-culture] 酸化すれば、120 [mmol / l-culture] の電子が放出されるため、これを受け取る鉄イオンは 120mM（硫酸鉄として約 60g / l）存在しなければならない。このように、グルコースの酸化量が多いほど鉄イオンの量も多くしなければならない。したがって、重金属の生体（微生物に対する）毒性という観点から、鉄イオンを実験系として用いることには量的に限度があると考えられる。

鉄イオンが水素発生に及ぼす影響について最近いくつかの報告がなされている。このうちの一つに大豆食品由来の菌群による水素発生に対して 2 価の鉄イオン（ FeCl_2 を用いている）の効果を調べたものがある [36]。この報告では、2 価の鉄イオンが 200 [mg / l-culture] から 4000 [mg / l-culture] の範囲では、スクロース 1g から 120ml 程度の水素発生量であった。水素収率として計算すると 1 モルのスクロースから最大で 1.9 モルの水素が得られたことになる。また、2 価の鉄イオンは 80 [mg / l-culture] 以下では、水素発生量が 10ml 前後と極端に少ない。鉄イオンを添加しなければわずか 2ml しか水素が発生しない。したがって、鉄イオンの濃度によって大きく水素発生量が影響を受ける例といえる。また、別の報告によると、*Clostridium* 属によるスクロースからの水素発生は、培地に 2 価の鉄イオン（ FeSO_4 ）を含まなければ水素収率が 1.94 と一般的な値であるが、2 価の鉄イオンを 1600 [mg / l-culture] で含む培地では水素収率が 2.73 に増加した [37]。この場合には、酢酸と酪酸の生成量が変化す

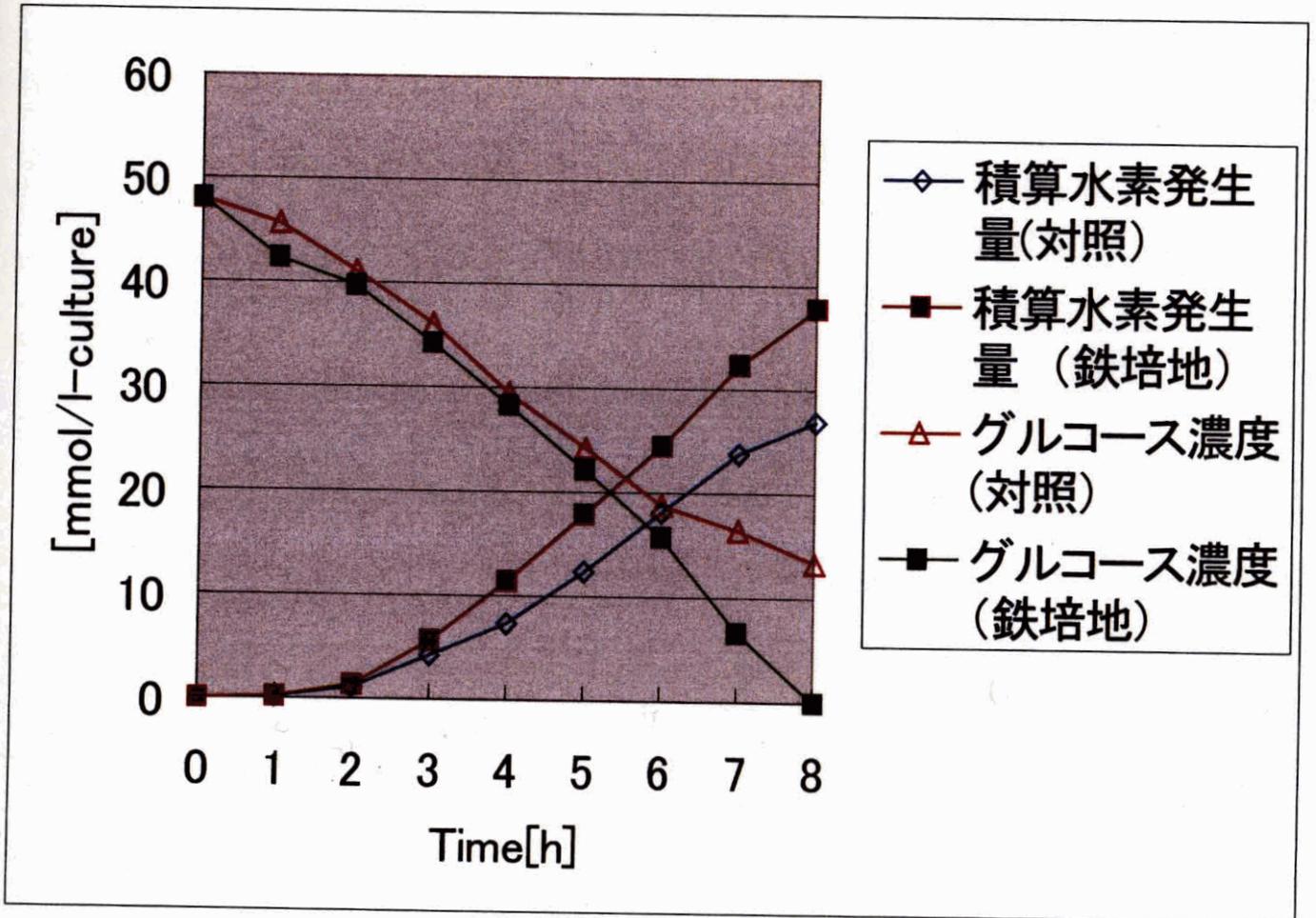


図 2-16 鉄添加が水素発生とグルコース消費に及ぼす影響

培養条件: 培養温度37°C、培地pH: pH 5.8
 1%グルコース培地を使用。鉄培地は、1%グルコース培地に硫酸鉄(Ⅲ)を5mMで添加した。

ることが水素収率の増加した要因として挙げられている。このように、2 価の鉄イオンがスクロースなどの代謝に影響を与えることが明らかになってきている [36-39]。金属イオンの水素発生に与える影響は、鉄イオン以外にも、ナトリウムイオン、マグネシウムイオン、亜鉛イオンなどで調べられており、各々のイオンについて水素発生に適した濃度が報告されている [40]。

本実験結果 (図 2-16) から、鉄イオンによって水素発生が活発になった一つの要因は、グルコースの消費が活発であったことである。そこで、グルコースの消費と相関があると推定された鉄イオンの取り込みについて以下に述べる。

鉄イオンは、微生物によって細胞内に取り込まれることが分かっている。微生物は、鉄イオンを取り込むために、シデロフォアを合成する。シデロフォアとは、分子量 1000Da 未満の低分子化合物であり、微生物により合成され、環境中に放出される。特に微生物にとって細胞内の鉄イオン濃度が低い状態の時に、シデロフォアを放出して、環境中の鉄イオンをキレート化して細胞内に取り込むことが分かっている。

E. Coli、*Pseudomonas aeruginosa*、*Nycobacterium spp* など微生物によって異なるタイプのシデロフォアが存在する。そのうち、エンテロバクチン (enterobactin) は大腸菌のシデロフォアであり、三価の鉄イオンと結合、キレート化する [41][42]。下式で表されるキレート定数 K_f は 10^{49} であり、この数値は非常に強固に三価の鉄イオンと結合、キレート化することを意味する。

$$K_f = [\text{Fe}(\text{enterobactin})^{3-}] / ([\text{Fe}^{3+}] [\text{enterobactin}^{6-}])$$

シデロフォアによる鉄イオンの取り込みには、ATP の加水分解エネルギーを必要とすることが分かっている。したがって、鉄イオンの取り込みが起きる場合、グルコースなど基質の分解によって生成した ATP を利用するため、ATP の消費が促進される可能性がある。ATP の消費が促進されれば、グルコースの代謝もそれに合わせて速くなるはずである。鉄イオンの取り込みを検証するために、今後は培地の鉄イオン濃度を分析する必要がある。

2.9 結論

1. 生物は、糖代謝の主要経路である解糖系で ATP、ピルビン酸、NADH を生成する。微生物は発酵によって、NADH を再酸化して解糖系に戻し、解糖系を継続的に機能させることができる。水素発生をする微生物の中には、NADH を再酸化することによって水素を発生するもの (*C. Butyricum* など) がある。大腸菌 (*Escherichia coli*) は NADH の再酸化ではなく、グルコースから生成したギ酸を分解することによって水素を発生する。本研究の対象とした *E. aerogenes* の水素発生は NADH の再酸化が関与するという仮説が示されている。
2. NADH の再酸化による水素発生は、電気化学的な理論の上で培地 pH が低いほど起こりやすい。この結果は、pH 7.0 または pH 8.0 より pH 6.0 の方において水素発生が活発であるという実験結果と合致している。ただし、培地 pH が pH 5.0 の場合では水素発生が pH 6.0 より活発でなくなることから、水素発生と菌体増殖を合わせて考える必要がある。菌体増殖に適した pH は、pH 7.0 であり、それより低いほど増殖は遅く、不活発になる。つまり、pH 5.0 では菌体増殖が不活発であることから水素発生も遅く、不活発になると説明される。
3. 菌体の細胞内 pH は、培地の pH によらず一定の約 pH 8.0 である。しかし、培地に一定濃度以上の酢酸などの有機酸が存在すると、有機酸の細胞内への透過により細胞内 pH が低下する。
4. 大腸菌は、細胞内のギ酸イオン濃度およびプロトン濃度が増加すると、生存に不利であることから、ギ酸分解を行う。すなわち、ギ酸分解には細胞内のギ酸イオン濃度と pH を調節する目的があるといえる。細胞内ギ酸イオン濃度の上昇は、Fhl A タンパク質によって感知されて、ギ酸分解系の遺伝子発現が起こる。
5. ギ酸分解を触媒する酵素である、ギ酸デヒドロゲナーゼは、Fe 原子、Mo 原子 Se 原子を含有している。これらの金属原子は、ギ酸分解で生じた電子を伝達する役目を担っている。
6. 大腸菌による硝酸呼吸では、グルコース代謝によりピルビン酸からアセチル CoA を経て酢酸が生成する。これは、硝酸の存在によりクエン酸回路を構成する酵素が機能しない結果であることが文献調査から分かった。実験から、*E. aerogenes* の場合にも、グルコース代謝により主に酢酸が生成したことから硝酸呼吸によりクエン酸回路が機能していないと考えられた。

この結果、硝酸イオンの存在下では、酸素と同じ好気呼吸経路（解糖系、クエン酸回路、電子伝達系の順）をとることができないことが分かった。

7. 3 価の鉄イオンを含むグルコース培地では、グルコース消費と水素発生が活発に進行することが分かった。グルコース消費が速く進行することから菌体増殖の速度が大きくなっていると考えられる。3 価の鉄イオンを好気呼吸の電子受容体となり得るか検討するためには、実験に用いた 5mM (2.53 g / l-culture)の鉄イオン濃度では低かったと考えられた。しかし、生体毒性の観点から、鉄イオン濃度を高くして、電子受容体についての検討をすることは難しいと推定された。今後は、2 価の鉄イオン濃度で研究報告があるように、発酵水素発生に至適な 3 価の鉄イオン濃度を検討することが必要である。

第3章 発酵水素発生に対するギ酸添加の影響とギ酸分解機構

3.1 本章の目的

近年、微生物による水素発酵の研究は進展している。研究の動向を大きく三つに分けると以下のように分けられる。

第一に、水素発酵をする菌株の改良や培養法の工夫についての研究[43-53]。

第二に、水素発酵における代謝や水素発生などの諸現象を基礎科学的に解析した研究[2, 3][54-58]。

第三に、下水汚泥や厨芥、農業廃棄物など水素発酵の基質を実用に合わせて行うもの。また、下水汚泥由来の菌株による水素発生の研究[4, 5][59-62]。

本章における研究は、上記の第二の研究に分類されるが、実用を目指すために、研究を通じて第一の内容に進展できるように考慮して進めた。

E. aerogenes がどのようにしてグルコースから水素を発生するかについて、*Clostridium* 属のように NADH を利用するのか、大腸菌のようにギ酸分解に依存するのかについては明確になっていない。

最近、ギ酸などの有機酸が菌の生育や代謝に様々な影響を与えることが判明してきている。*Clostridium* 属では、酪酸や酢酸がグルコースからの代謝産物量や菌体の生育に影響を与えることも判明している[63]。大腸菌では分子レベルの解析が進んでおり、グルコース培地にギ酸や酢酸を添加するとタンパク質の発現に影響されることが明らかになった[64]。大腸菌の水素発生については、thiosulphate(チオ硫酸)をグルコース培地に添加すると、水素収率が増加するという報告がある[47]。この報告では、チオ硫酸が大腸菌のグルコース代謝に影響を与えたことで、水素収率が増加したと述べられている。

このような最近の知見から、本章での研究は、*E. aerogenes* による水素発生経路に深く関わりと考えられるギ酸に着目した。具体的には、*E. aerogenes* によるグルコースからの水素発生にギ酸が与える影響を検討した。そこから、グルコースの代謝や水素発生経路について分析し、水素収率向上の糸口を見出すことを目指した。検討項目は、主に次の3点である。

1. 培地 pH を制御しない簡便な実験系で、ギ酸とグルコースを組み合わせた培地と、各々を単独で含む培地での水素発生を比較した。

2. 培地 pH を一定にした実験系で、ギ酸を添加したグルコース培地と添加していないグルコース培地(対照)を比較して、積算水素発生量、代謝産物生成量、菌体濃度などを測定、分析した。

3. 1, 2 の実験を通じて、水素発生速度、水素収率などを両者の培地で比較、検討して、水素発生経路について分析した。

3.2 実験方法

3.2.1 培養の手順および培養法

測定データを取るための本培養実験の前に *E. aerogenes* の前培養を行って、菌体を増殖させ、これを本培養に用いた。前培養は、本培養実験の前日に行った。前培養の条件は、培養時間 16 時間、培養温度 27°C、培養液体積 250ml であった。

培地 pH を制御しない系での実験は、次の手順で行った。

本培養液 45ml に前培養液 5ml を加えて（培養液の組成は後述）、60ml の容器で回分培養を行った。回分培養は、最初に投入した培養液で全ての反応を行う培養法である。したがって、培養を始めた後に培養液を新たに加える、または取り出すことはない。培養条件を次に示す。

本培養の条件：培養温度 37°C、培地 pH は、実験開始時に pH 6.0 であった。

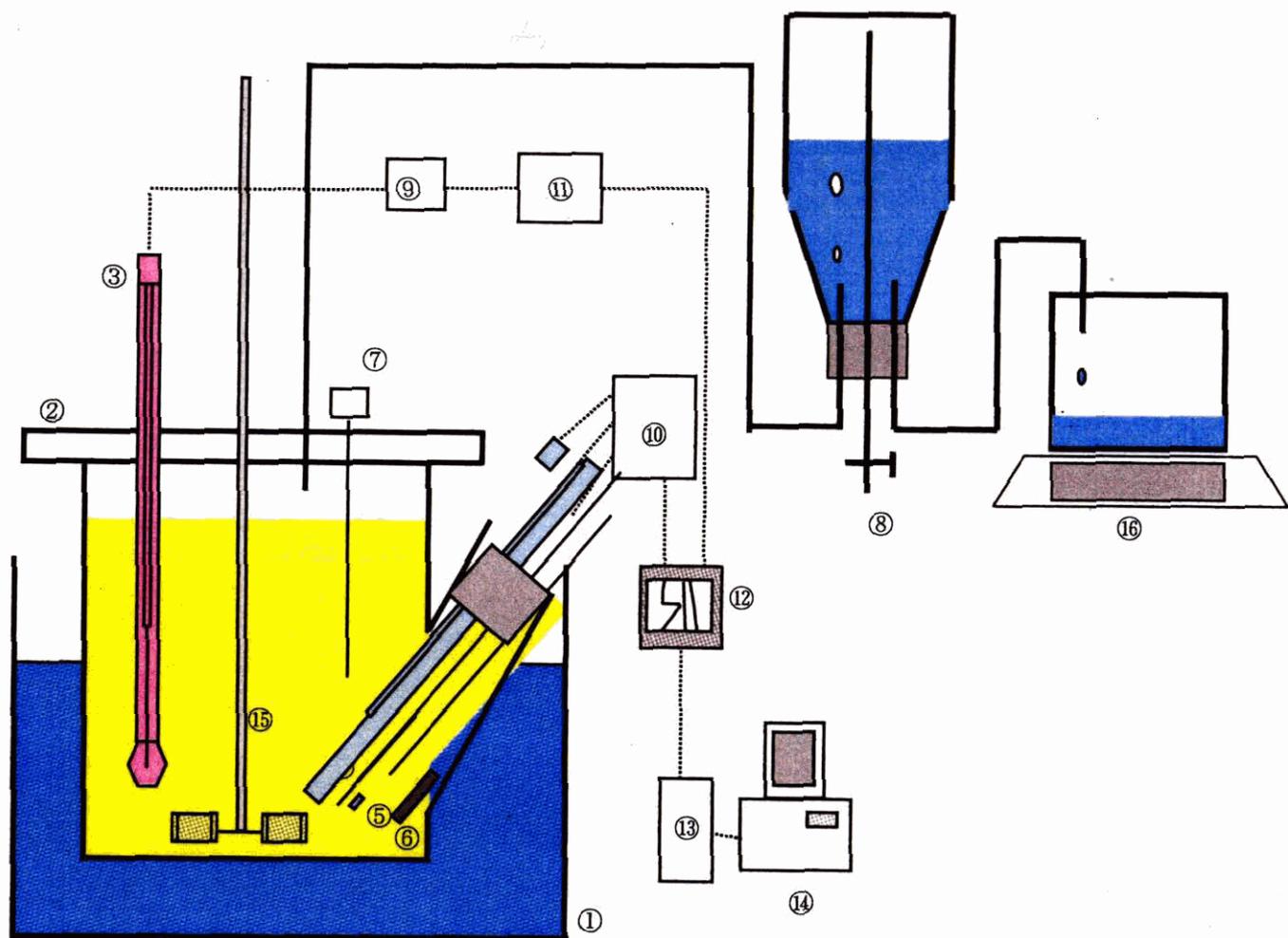
培地 pH を一定にした系での実験は、次の手順で行った。

前培養液 60ml を遠心分離（7000rpm）にかけて集菌して、本培養液に植菌した。本培養液（液相）は 2L であり、2.5L の培養槽で回分培養を行った（実験装置図は図 3.2-1 を参照のこと）。したがって、気相は 0.5L であった。本培養液中の溶存酸素を窒素置換により除去することで、培養開始から培養液を嫌気的な状態にした。この窒素置換によって気相部分も空気から窒素に置換される（気圧は 1 気圧）。培養条件について次に示す。

本培養の条件：培養温度 37°C、攪拌速度 120rpm、培地 pH は pH 5.5 または pH 6.3 であった。培地 pH は 1M の水酸化ナトリウムと 1M の塩酸を pH メーターと連動したポンプ（いずれも自動調節）によって供給することによって、一定に制御した。前培養液と本培養液の組成を重量パーセントで次に示す。

前培養液：1.5% glucose, 0.5% peptone, 1.4% Na₂HPO₄, 0.6% KH₂PO₄, 0.2% (NH₄)₂SO₄, 0.1% citrate2H₂O, 0.02% MgSO₄7H₂O

本培養液：1% glucose, 0.5% peptone, 0.1% Na₂HPO₄, 0.2% KH₂PO₄, 0.2% (NH₄)₂SO₄, 0.1% citrate2H₂O, 0.02% MgSO₄7H₂O



①恒温槽 ②培養槽 ③pH電極 ④銀-塩化銀照合電極 ⑤白金電極 ⑥白金電極 ⑦サンプル採取口 ⑧ガス捕集器(NaOH) ⑨pHコントローラー (pHメーター, 1M NaOH, 1M HCl) ⑩酸化還元電位計 ⑪アンプ ⑫記録計 ⑬A/D変換器 ⑭パソコン ⑮プロペラ型攪拌翼 ⑯電子天秤

図3.2-1 実験装置図

培養により発生するガス(水素、二酸化炭素)が、⑧のガス捕集器内の1N NaOHを通ることで、二酸化炭素は除去される。容器上部の気相に捕集された水素により気相の圧力が上がり、NaOHが⑯の電子天秤上の容器に気相の圧力が元に戻るまで押し出される。押し出されたNaOHの体積は、気相に捕集された水素の体積に等しい。そこで、このNaOHの重量を水素発生量として測定する。なお、1MのNaOHは比重が1.04であるため、厳密には電子天秤で測定された重量を1.04で割ることで水素の体積とする必要がある。

ギ酸添加の実験では、本培養液にギ酸塩（ギ酸ナトリウム）を 20mM で添加した（これをギ酸培地と記した）。ギ酸ナトリウムは水溶液中でギ酸イオンとナトリウムイオンに完全に解離する。ギ酸イオンは水溶液中で一部がプロトンと結合してギ酸（HCOOH）になる。しかし、ギ酸（HCOOH）の pKa は 3.75 であることから、本実験に用いた培地 pH（pH 6.0 の前後）では、大部分がギ酸イオンとして存在する。菌がグルコースから生成するギ酸（HCOOH）についても、培地中では大部分がギ酸イオンとプロトンに解離して存在する。したがって、本章でギ酸分解と表記した場合は、ギ酸イオン（HCOO⁻）の分解を指す。有機酸としてのギ酸を表す場合は、ギ酸（HCOOH）と表記して両者を区別した。

3.2.2 測定および分析法

（1）化学分析

グルコース濃度、ギ酸を含む全ての代謝産物濃度の定量は、HPLC(高速液体クロマトグラフ装置) (655A 日立) を用いて行った。実験手順として、本培養液を遠心分離にかけて (10000 rpm)、菌を沈殿させた後、上清を採取して HPLC による分析に供した。HPLC のカラムは GL-C610H カラム (日立ケミカル) であり、カラムの温度を 40℃ で操作した。また、0.1% リン酸を流速 1.0 (ml/min) でキャリアー液として使用した。検出法は、分析の対象になる物質を含むキャリアー液と含まないキャリアー液の屈折率の違いによるものであった。

培養槽の気相におけるガス成分の検出には、ガスクロマトグラフ装置 (Shimadzu GC-3BT) を用いた。キャリアーガスとしてアルゴンを用いた。検出法は、分析の対象になる物質を含むキャリアーガスと含まないキャリアーガスとの熱伝導度の違いによるものであった。

（2）水素発生量の測定

水素発生量の測定は、1N の水酸化ナトリウムを置換する気液交換法（水素と同時に発生する二酸化炭素は水酸化ナトリウムによって吸収させて、水素発生量を水酸化ナトリウムの重量として電子天秤で計る方法）を用いて行った。水素発生量（体積）は 0℃、1atm における気体の状態方程式により、モル数に換算した。培養で発生するガスは、水素と二酸化炭素であり、気相の窒素は両者の発生によって押し出される。そこで二酸化炭素によって押し出された窒素の体積は、ガス発生量から差し引くことで補正した。補正する窒素の体積は、気相の二酸化炭素濃度をガスクロマトグラフィーで定量することで求めた。

(3) 菌体濃度の測定

分光光度計により、550nmにおける培養液の散乱光強度を測定した。測定値から標準曲線により菌体濃度に換算した。標準曲線は、次の手順で作成した。第一に、散乱光の強度を測定した培養液を30mlとり遠心分離(10000 rpm)にかけた。遠心分離により菌体を沈殿させ、上清(菌体を含まない培養液)を除いた。菌体を乾燥させ、乾燥菌体重量を計量して、培養液中の菌体濃度を求めた。培養液の散乱光強度と菌体濃度を対応させて、近似曲線を作成した。

3.3 実験結果

3.3.1 グルコース培地へのギ酸添加の影響(培地 pH を一定に制御しない実験系における結果)

表 3-1 に、ギ酸とグルコースを組み合わせた培地と、いずれか一方を含む培地での水素発生について比較した結果を示す。培地 1 から 4 でグルコースとギ酸塩の組成を変えており、培地の番号が上がるにつれて、グルコース濃度を低く、ギ酸濃度を高くしている。すなわち、培地 1 ではグルコースを 60 (mmol / l-culture)、培地 2 ではグルコースを 40 (mmol / l-culture)、ギ酸を 20 (mmol / l-culture)、培地 3 ではグルコースを 20 (mmol / l-culture)、ギ酸を 40 (mmol / l-culture)、培地 4 ではギ酸を 60 (mmol / l-culture) 含む。

培地 2, 3 では、積算水素発生量が各々 66, 60 (mmol / l-culture) あった。グルコースとギ酸の合計モル数は、培地 1L 当たり 60 mmol であるから、培地 2, 3 に含まれるグルコースとギ酸は全て水素発生に利用されたといえる。それは、先述のようにグルコース 1 モルからの水素は約 1 モル発生し、ギ酸 1 モルの分解によっても水素が 1 モル得られるためである。しかしながら、グルコースのみを含む培地 1 では、積算水素発生量が 45 (mmol / l-culture) であり、水素収率は 0.75 と低かった。これは培地 pH が 5.0 まで低下したことによると考えられる。水素発生速度は、培地 2, 3 が培地 1 より大きかった。これは、グルコースとギ酸を組み合わせたことによって、培地 pH が大きく低下せず、水素発生に有利な pH であったためと考えられる。培地 pH が大きく低下しなかった要因は、グルコース消費に伴う酸の生成により培地 pH が低下することに対して、ギ酸の分解による pH の増加(下記に反応式から説明)が拮抗作用を示したと考えられる。

培地 4 における積算水素発生量は 17 (mmol / l-culture) であり、まだ 53 (mmol / l-culture) のギ酸が分解されずに培地に残存していることがわかる。

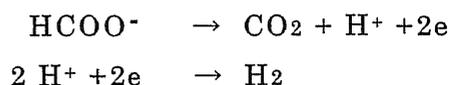
表3-1 ギ酸とグルコースを組み合わせた培地と
いずれか一方を含む培地からの水素発生と比較

培地 番号 と 組成	積算水 素発生 量 (mmol/l -culture)	水素発生速度 (mmol/l·h)	菌体重量 (g/l)	開始 時の pH	終了 時の pH
1. 60/0	45	5.6	0.96	6.0	5.0
2. 40/20	66	8.3	0.67	6.0	5.9
3. 20/40	60	7.4	0.42	6.0	6.5
4. 0/60	17	2.1	0.18	6.0	6.8

- 培地番号の右に、グルコース濃度 / ギ酸濃度 を示す。
- 濃度の単位は (mmol / l-culture) である。培地1がグルコースを60 (mmol / l-culture)で含む培地である。
- 培養8時間後におけるデータ である。
- 培養条件： 培地体積 50ml、培養温度 37°C

培地 4 での水素発生速度は、培地 2, 3 における水素発生速度の 1/4 程度であり、培地 4 でのギ酸分解による水素発生速度（式 3.6 の右辺の $\Delta D / T$ ）が明らかに小さいことが分かる。

この要因は、培地 pH が水素発生に至適な pH6.0 より高くなったことによると考えられる。培地 pH の高くなった要因は、次の式に示すようにギ酸の分解と水素の発生によって培地中のプロトンが減少したことによると考えられる。



文献によると、これまでにギ酸とグルコースを組み合わせた培地における水素発生の研究には、大腸菌を用いたものがある。この報告では、ギ酸のみを 1M で含む培地における大腸菌の水素発生は培養 8 時間で止まるが、この培地に 2.2 (mmol / l-culture) のグルコースが存在すると 72 時間以上にわたって継続して水素が発生したと報告されている [49]。この要因は明示されていないが、グルコースが菌の生育のためのエネルギー源になり、菌の数と生存時間を増加させたことに起因すると推定される。ただし、ギ酸のみを 1M で含む培地の pH がどのように変化したかについては述べられておらず、ガス発生が止まる原因は明らかでない。上述のように、表 3-1 に示した *E. aerogenes* での結果から、大腸菌でガス発生が止まった要因は、培地 pH の増加にあると推定される。

以上のように、ギ酸とグルコースの組み合わせにより活発に水素発生を行うことが分かった。しかしながら、少なくとも以下の三点について明らかにされていない。

- ① なぜ水素発生が活発に起きるのかという点（上記の大腸菌における研究においても [49]、深く言及されていない）。
- ② ギ酸とグルコースはどのように分解されるのかという点（例えば、両者が分解される比率はどのようになるか）。
- ③ グルコースの代謝はギ酸によってどのように影響を受けるかという点（例えば、グルコースからの水素収率に与える影響）。

ギ酸がグルコースを基質とした水素発酵に与える影響を検討する上で、まずこれらの三点を明らかにする必要がある。また、これらの検討結果を基にして、*E. aerogenes* の水素発生において NADH とギ酸がいかに関わっているかを検証することができると考えられる。このことは、水素発生機構の解明につながる可能性を持つ。そのため、次に培地 pH を一定に制御した培養で、上記の三点を含めて詳細な検討を行った。

3.3.2 菌体の増殖に対するギ酸添加の影響

以下の実験結果は全て培地 pH を一定に制御した実験系における結果である。

図 3.3-1 に菌体の増殖に対するギ酸添加の影響を示す。同図の a (pH 6.3), b(pH 5.5) は、培養開始から培地の菌体濃度がどのように変化したについて表している。どちらの培地 pH においても、ギ酸培地（ギ酸ナトリウムを 20mM で添加した培地）の方が対照（ギ酸ナトリウムを添加しなかった培地）より菌体濃度が低かった。これは、菌体の増殖が遅かったことを示している。pH 6.3 の対照とギ酸培地のいずれも、培養 7 時間までは菌体濃度が大きく変化しなかったが、培養後 7 時間以降に菌の増殖が活発になった。pH 5.5 では、pH 6.3 と比較して、菌体濃度は大きく増加せず、菌体の増殖が遅いことが分かった。

菌体濃度を培養時間で割ることにより算出した菌体の増殖速度を図 3.3-1c (pH 6.3), d (pH 5.5) に示す。pH 6.3 では培養 6 時間まで、ギ酸培地の菌体増殖速度は対照の約 0.5 倍であったが、培養 8 時間から増殖速度が急速に増加して培養 9 時間には対照と同等の速度となった。

pH 5.5 のギ酸培地では、対照に比べて明らかに菌体の増殖速度が小さかった。また、少なくとも培養 8 時間は、pH 6.3 の場合のようにギ酸培地の菌体増殖速度が対照と同等まで増加することはなかった。

菌体の増殖は、グルコース培地への酢酸の添加により遅れる、または阻害されることが分かっている [16]。この要因は、酢酸 (CH_3COOH) が菌の細胞内に透過することによる。そこで、本実験において、培養開始時点でギ酸培地にはどれだけギ酸 (HCOOH) が存在したかについて Henderson-hasselbalch 式 (3.7 式) から計算した。その結果、ギ酸 (HCOOH) 濃度は、pH 6.3 では 0.06 mM、pH 5.5 ではその 6 倍の 0.36 mM であった。よって、pH 5.5 のギ酸培地では、pH 6.3 のギ酸培地より、細胞内に透過するギ酸 (HCOOH) が理論的には 6 倍多いことになる。これが、pH 6.3 に比較して、pH 5.5 でギ酸培地の菌体増殖が対照より明らかに遅れた要因と考えられる。

$$\text{Henderson-hasselbalch 式} : \text{pH} = \text{pKa} + \log [\text{HCOO}^-] / [\text{HCOOH}]$$

(pKa = 3.75、ギ酸イオン濃度は 20mM) (3.7)

菌体の比増殖速度を図 3.3-1 e(pH6.3), f (pH5.5) に示す。比増殖速度 (h^{-1}) は、菌体増殖速度 ($\text{g-cell formed} / \text{l} \cdot \text{h}$) を菌体濃度 ($\text{g-cell} / \text{l}$) で割って算出するものである。つまり、比増殖速度は、単位菌体 1g 当たりの菌体増殖速度 (菌体が 1g 培地に存在するとして、換算した値) を表している。ギ酸培地

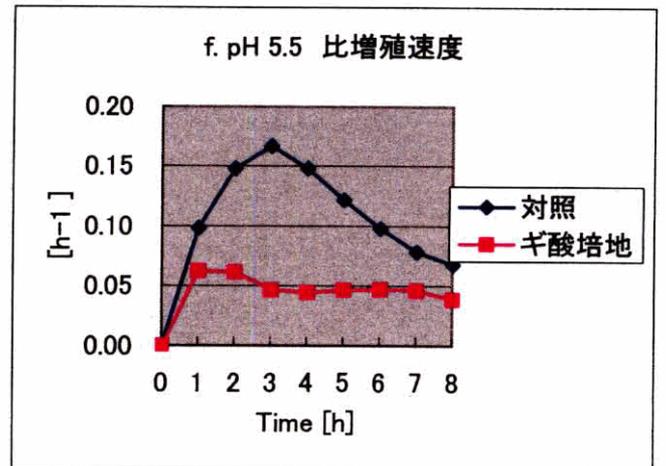
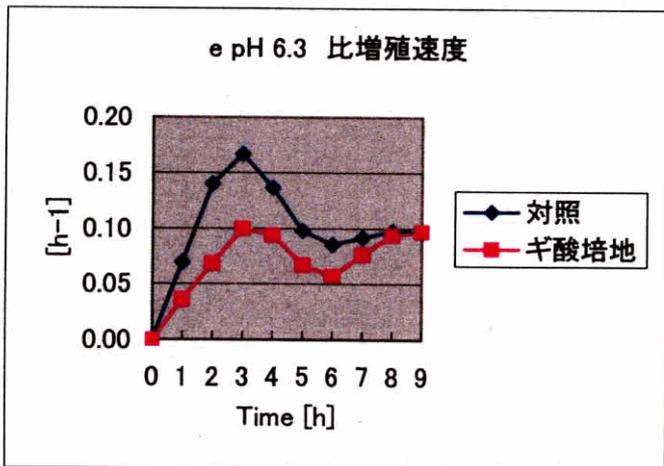
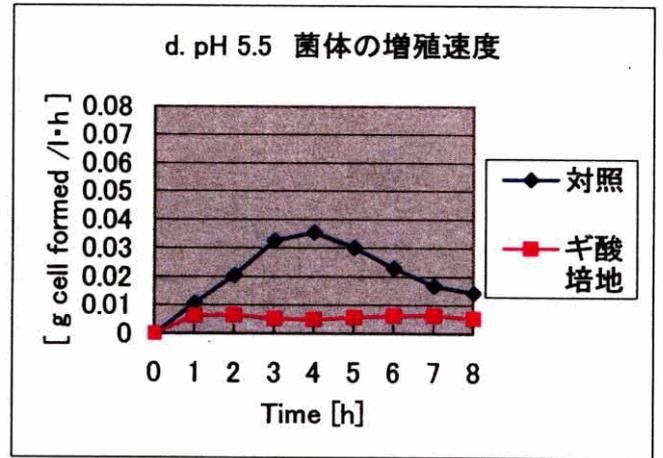
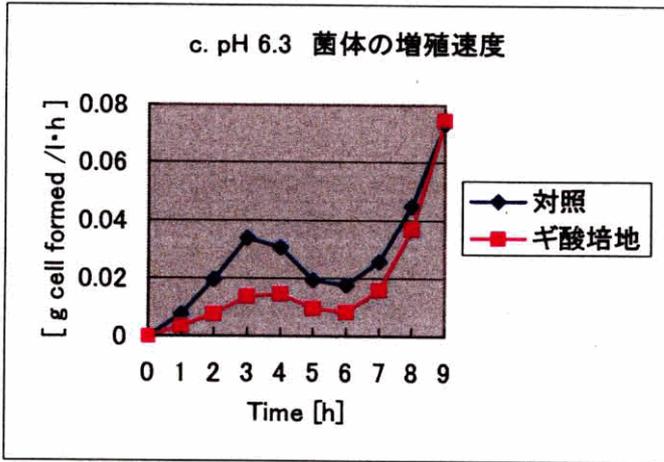
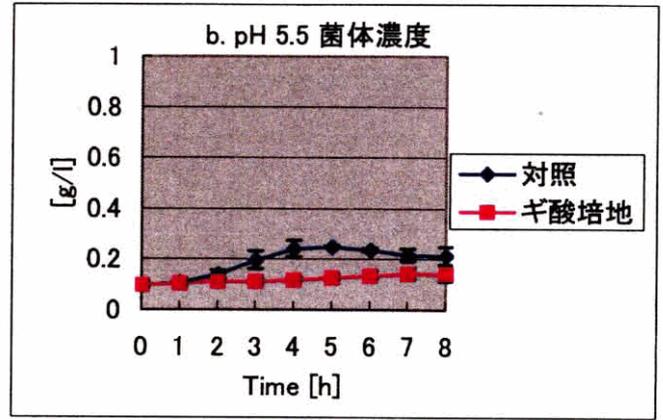
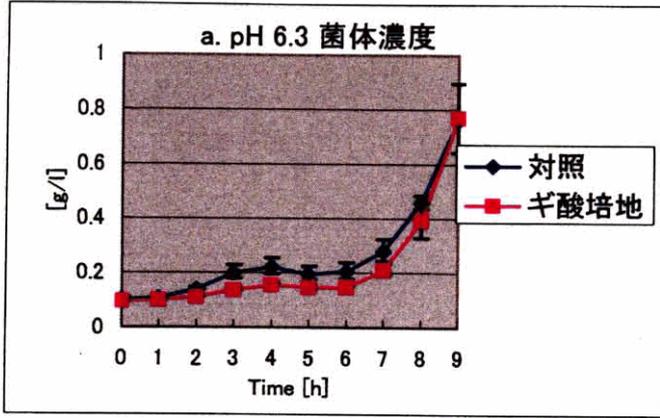


図 3.3-1 菌体の増殖に対するギ酸添加の影響

の比増殖速度は、図に示した大部分の時間で、対照より小さかった。したがって、同じ量(1g)の菌が存在するとしてもギ酸培地での菌体増殖が遅いことが分かった。

3.3.3 積算水素発生量とグルコース消費量に対するギ酸添加の影響

図 3.3-2a,b (pH6.3 での結果)、図 3.3-3a,b (pH5.5 での結果) に積算水素発生量とグルコース消費量についてギ酸培地と対照を比較して示す。ギ酸培地でのグルコース消費量が対照より少なかった。ギ酸培地では、菌の増殖が遅かったことから、グルコース消費量が少ないことは妥当な結果である。また、pH 6.3 のギ酸培地では、培養 9 時間後までに積算水素発生量が対照を約 2 倍上回った (図 3.3-2b)。この結果から、ギ酸培地では、添加したギ酸の分解による水素発生と、グルコース消費による水素発生との両方が起きており、これにより大きな積算水素発生量となったと考えられた。この考え方は、pH 5.5 においても同じである (図 3.3-3)。そこで、グルコース消費量と積算水素発生量の関係を次の (3.8)、(3.9) 式として表す。

$$\text{対照培地} \quad \Delta V_1 = Y_{H_2/S} \cdot \Delta S_1 \quad (3.8)$$

$$\text{ギ酸培地} \quad \Delta V_2 = Y_{H_2/S} \cdot \Delta S_2 + \Delta D \quad (3.9)$$

ただし、 ΔV (accumulated hydrogen Volume) : 積算水素発生量

ΔS (Substrate) : 基質 (グルコース) 消費量

記号の右についた番号 1,2 で、対照とギ酸培地を区別する。

$Y_{H_2/S}$: 水素収率 (グルコース消費量に対する水素発生量の割合)。

よって、 $Y_{H_2/S} \cdot \Delta S$ は、グルコース消費による水素発生量を表す。

ΔD (hydrogen volume from formate decomposition) : 添加したギ酸の分解による水素発生量

(3.9)式より、添加したギ酸の分解量は、グルコースからの水素収率が対照と同じであるとして式 2 より算出した。この算出によって、培養 8 時間後における添加したギ酸の分解量は、pH6.3 では積算水素発生量の約 65%であったのに対して、pH5.5 では約 75%であることが分かった (図 3.3-2b、図 3.3-3b)。

3.3.4 水素発生速度とグルコース消費速度に対するギ酸添加の影響

図 3.3-2 c,d (pH6.3)、図 3.3-3 c,d (pH5.5) にグルコース消費速度と水素発生速度の関係を示す。培養 3~6 時間についてみると、グルコース消費速度は、pH6.3 で対照がギ酸培地の約 2 倍、pH5.5 で対照がギ酸培地の約 2.5 倍であった。ギ酸培地の水素発生速度は、pH6.3 で対照の約 2 倍、pH5.5 で対照の約 1.5 倍であった。これらの結果より、添加したギ酸の分解による水素発生速度とグルコース消費による水素発生速度の和が、対照における水素発生速度を上回ったと考えられる。そこで、先述の式 1, 2 を各々時間 (T) で割って水素発生速度についての式 3, 4 で表す。

$$\text{対照培地} \quad \Delta V_1 / \Delta T = (Y_{H_2/S} \cdot \Delta S_1) / \Delta T \quad (3.10)$$

$$\text{ギ酸培地} \quad \Delta V_2 / \Delta T = (Y_{H_2/S} \cdot \Delta S_2) / \Delta T + \Delta D / T \quad (3.11)$$

ただし、 $\Delta V / \Delta T$: 水素発生速度

$(Y_{H_2/S} \cdot \Delta S) / \Delta T$: グルコース消費による水素発生速度

$\Delta D / T$: 添加したギ酸の分解による水素発生速度

(3.11)式の添加したギ酸の分解による水素発生速度は、同式の左辺から右辺の第一項 $(Y_{H_2/S} \cdot \Delta S_2) / \Delta T$ を引いて求めた。ギ酸培地でのグルコースからの水素収率は、対照と同じであるとした。

図 3.3-2 e,f (pH 6.3)、図 3.3-3 e,f (pH 5.5) に、比グルコース消費速度と比水素発生速度の関係を示す。比グルコース消費速度と比水素発生速度は、先述のグルコース消費速度と水素発生速度を、その時点での菌体濃度で割って算出したものである。つまり、菌体 1g 当たりによるグルコース消費速度と水素発生速度を示す。培養 3~6 時間についてみると、ギ酸培地での比水素発生速度は、pH 6.3、pH 5.5 のいずれも対照の約 3 倍であった。

表 3.2, 3.3 に、培養 4、8 時間後における、水素発生、基質消費、菌体増殖のデータを数値として示した。ギ酸培地と対照での水素発生速度と比水素発生速度の違いについて以下に説明する。

pH 6.3 の培地における培養 4 時間後では、ギ酸培地における水素発生速度は、2.4 (mmol / l · h) であり、対照の 1.4 (mmol / l · h) を 1.7 倍上回った。比水素発生速度は、ギ酸培地で 15.2 (mmol / g-cell · h) であり、対照の 6.4 (mmol /

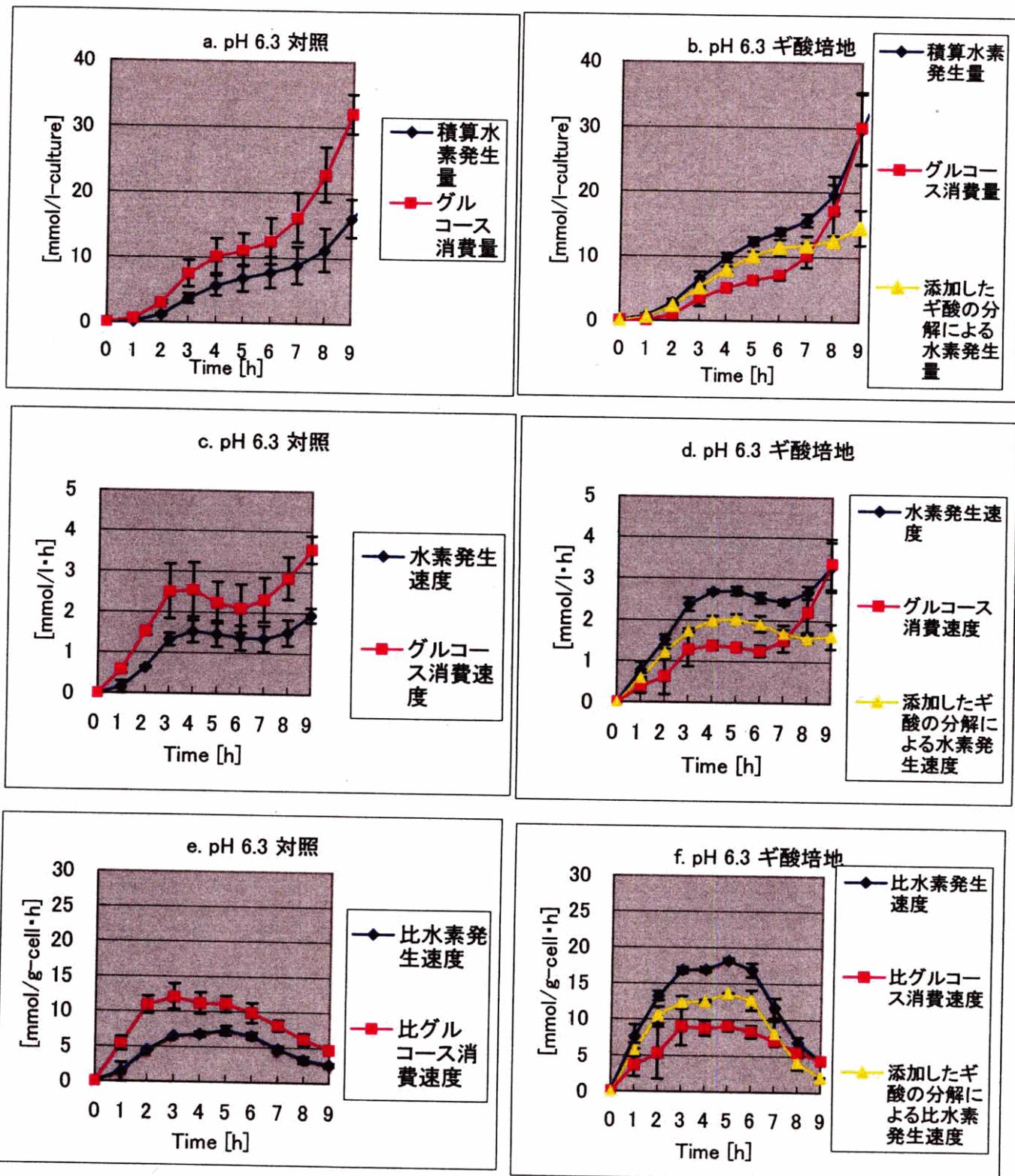


図 3.3-2 培地pH 6.3における水素発生とグルコース消費に対するギ酸添加の影響

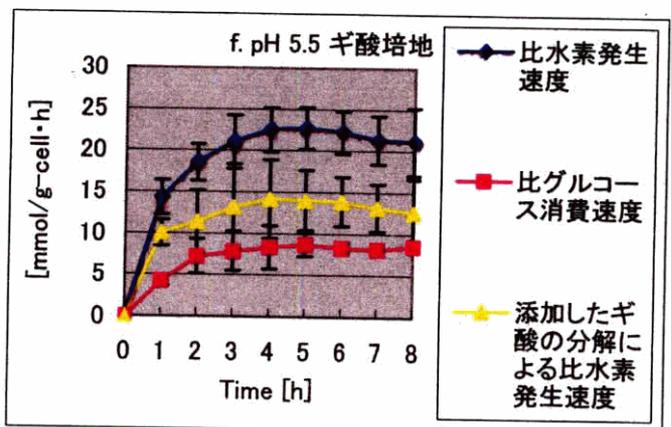
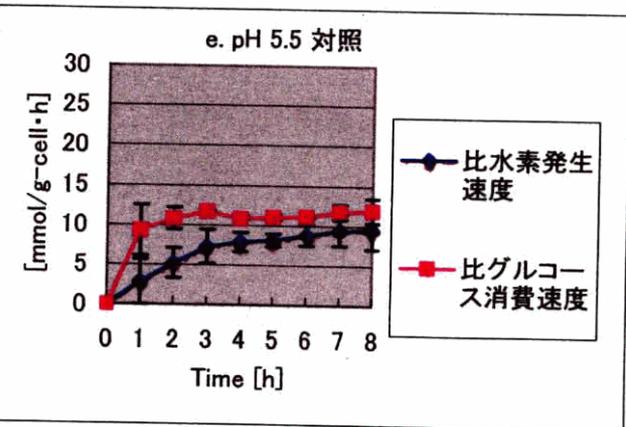
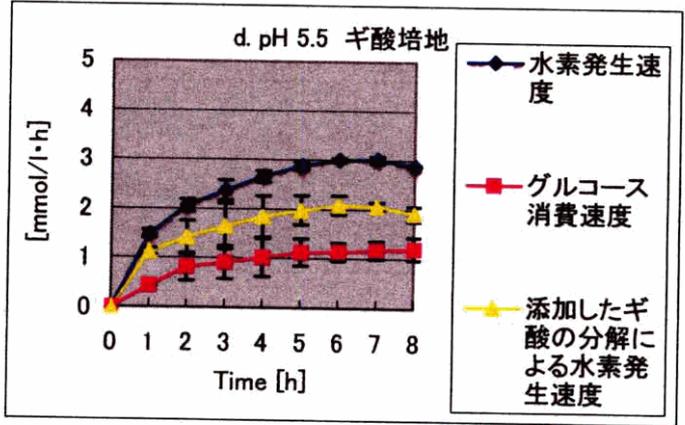
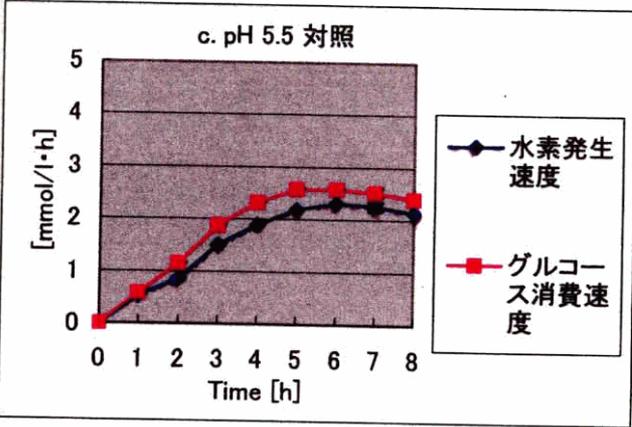
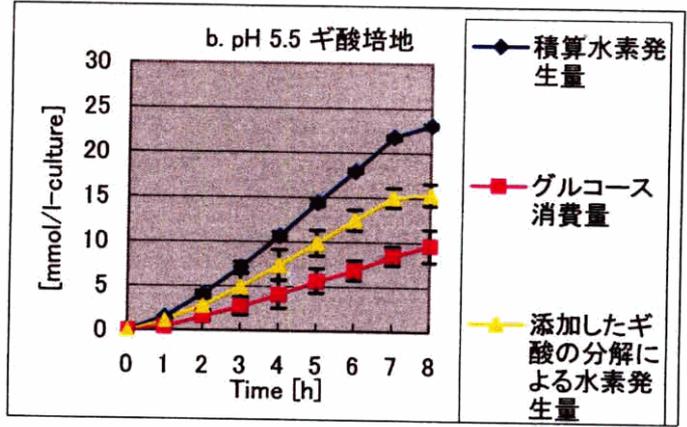
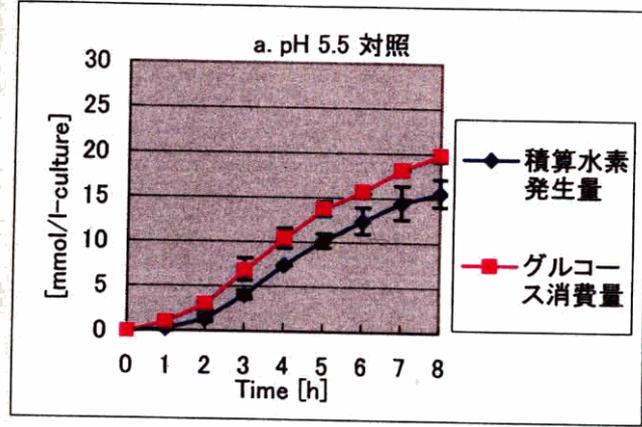


図 3.3-3 pH 5.5における水素発生とグルコース消費に対するギ酸添加の影響

表3-2 培地pH 6.3での培養4時間後における、水素発生、基質消費、菌体増殖に関するデータ。表の数値は平均値(n = 3)を表す。

	積算水素*	水素発生速度	比水素発生速度	基質消費量	基質消費速度	比基質消費速度	菌体濃度	増殖速度	比増殖速度
対照	5.6	1.4	6.4	10.2	2.6	11.6	0.22	0.03	0.14
干酸培地	9.8	2.4	15.2	5.2	1.3	8.2	0.16	0.01	0.09

注)* 表の積算水素は積算水素発生量を表す。

培地pH 6.3での培養8時間後における、水素発生、基質消費、菌体増殖に関するデータ。表の数値は平均値(n = 3)を表す。

	積算水素*	水素発生速度	比水素発生速度	基質消費量	基質消費速度	比基質消費速度	菌体濃度	増殖速度	比増殖速度
対照	11.3	1.4	3.1	22.8	2.9	6.2	0.46	0.04	0.09
干酸培地	19.6	2.5	6.1	17.23	2.2	5.4	0.4	0.04	0.09

表3-3 培地pH 5.5での培養4時間後における、水素発生、基質消費、菌体増殖に関するデータ。表の数値は平均値(n = 3)を表す。

	積算水素*	水素発生速度	比水素発生速度	基質消費量	基質消費速度	比基質消費速度	菌体濃度	増殖速度	比増殖速度
対照	7.4	1.8	7.7	10.4	2.6	10.8	0.24	0.04	0.16
ギ酸培地	10.6	2.6	22.1	4.1	1.0	8.3	0.12	0.01	0.08

培地pH 5.5での培養8時間後における、水素発生、基質消費、菌体増殖に関するデータ。表の数値は平均値(n = 3)を表す。

	積算水素*	水素発生速度	比水素発生速度	基質消費量	基質消費速度	比基質消費速度	菌体濃度	増殖速度	比増殖速度
対照	15.6	1.9	9.3	20	2.5	11.9	0.21	0.02	0.07
ギ酸培地	23	2.9	20.7	9.6	1.2	8.6	0.14	0.01	0.05

注)* 表の積算水素は積算水素発生量を表す。

g-cell · h)を 2.4 倍上回った。

培養 8 時間後における水素発生速度(mmol / l · h)は、ギ酸培地、対照のどちらにおいても培養 4 時間後と同じ大きさであった。比水素発生速度は、ギ酸培地で 6.1(mmol / g-cell · h)であり、対照の 3.0(mmol / g-cell · h)を 2 倍上回った。ここで、比水素発生速度の大きさは、各々の培地において培養 4 時間後に比べて半分以下に低下した。これは、各々の培地において菌体濃度が培養 4 時間から培養 8 時間にかけて 2 倍以上に増加したことによる。

pH 5.5 における水素発生速度は培養 4 時間後では、ギ酸培地が 2.6 (mmol / l · h) であり、対照の 1.8(mmol / l · h)を 1.5 倍上回った。比水素発生速度は、ギ酸培地で 22.1(mmol / g-cell · h)であり、対照の 7.7(mmol / g-cell · h)を 2.9 倍上回った。

培養 8 時間後における水素発生速度は、ギ酸培地が 2.6 (mmol / l · h) であり、対照の 1.9(mmol / l · h) を 1.4 倍上回った。比水素発生速度は、ギ酸培地で 20.7(mmol / g-cell · h)であり、対照の 9.3(mmol / g-cell · h)を 2.6 倍上回った。

pH 6.3 と pH 5.5 におけるギ酸培地の比水素発生速度を比較すると、pH 5.5 のギ酸培地における比水素発生速度が明らかに大きかった。この要因は次節の比ギ酸分解速度の結果において述べる。

3.3.5 ギ酸生成、ギ酸分解と水素発生の関係

次にギ酸培地と対照におけるグルコースの代謝に着目して再度、積算水素発生量及び水素発生速度について検討した。*E. aerogenes* はグルコース代謝の過程でギ酸を生成し、分解する。図 3.3-4 に示すように、対照では培養開始からギ酸濃度が増加したことからグルコース消費によってギ酸が生成することが分かる。ギ酸濃度はギ酸生成量とギ酸分解量のバランスによって決まる。そこで、対照でのギ酸濃度を次のように表す。

$$\text{対照：ギ酸濃度} = \text{ギ酸生成量} - \text{ギ酸分解量} \quad (3.12)$$

ギ酸培地では、最初にギ酸を添加した量 (20 mmol / l-culture) だけギ酸濃度が高いので、次のように表す。

$$\text{ギ酸培地：ギ酸濃度} = 20 + \text{ギ酸生成量} - \text{ギ酸分解量} \quad (3.13)$$

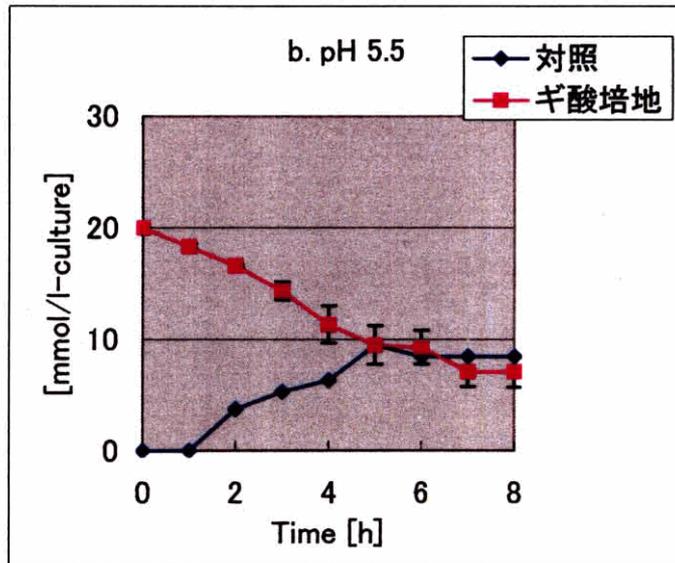
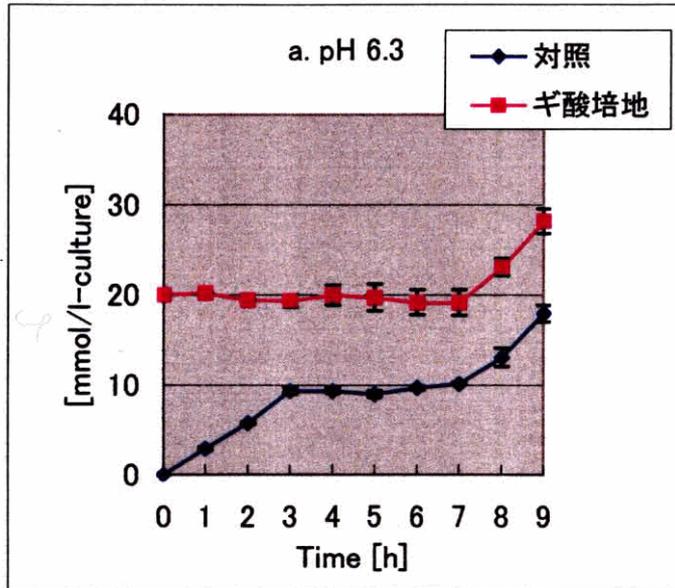


図 3.3-4 対照、ギ酸培地でのギ酸濃度の変化

ただし、ギ酸培地でのギ酸分解量は、添加したギ酸の分解に依拠する量とグルコース消費によって生成したギ酸が分解する量の合計である。

上式において、ギ酸濃度は液体クロマトグラフィーによる測定値をそのまま代入できるが、ギ酸生成量は代謝経路から以下の手順で算出した。

ギ酸は、ピルビン酸から生成するが、このときギ酸と等量のアセチル CoA が生成する。アセチル CoA は、エタノール、酢酸、酪酸に変換されることから、アセチル CoA の生成量をこれらの代謝産物量の和として次式で表す。

$$\text{アセチル CoA の生成量} = \text{酢酸濃度} + \text{エタノール濃度} + (\text{酪酸濃度}) \times 2 \quad (3.14)$$

(3.14)式から求めたアセチル CoA の生成量をギ酸生成量とした。次に、各々の培地でのギ酸生成量とギ酸濃度からギ酸分解量を求めた。ギ酸生成量、ギ酸分解量、積算水素発生量を合わせて図 3.3-5a, b(pH 6.3) , 図 3.3-6a, b(pH 5.5) に示す。

培養 3~7 時間についてみると、pH 6.3 (図 3.3-5 a, b) では、ギ酸培地のギ酸分解量は対照の約 2 倍であり、ギ酸生成量は、対照の約 0.7 倍であった。ギ酸培地のギ酸分解量はギ酸生成量と同等であったが、対照ではギ酸生成量がギ酸分解量の約 2 倍であった。

pH 5.5 (図 3.3-6 a, b) では、ギ酸培地のギ酸分解量は対照の約 1.5 倍であったが、ギ酸生成量は対照の約 0.3 倍であった。ギ酸培地のギ酸分解量はギ酸生成量より明らかに多く、ギ酸分解反応が活発であるといえる。対照では、ギ酸生成量がギ酸分解量の約 1.7 倍であり、この値は pH 6.3 の対照と比較すると小さかった。すなわち、pH 5.5 では生成したギ酸の約 6 割が分解されたが、pH 6.3 では、生成したギ酸の約 4 割しか分解されていなかった。このように培地の pH が低いと、ギ酸生成量に対するギ酸分解量が増加する点は、ギ酸培地についても同じである。

図 3.3-5a, b , 図 3.3-6a, b から、pH 6.3、pH 5.5 のいずれにおいても、対照、ギ酸培地ともに、ギ酸分解量と積算水素発生量が培養 8 時間までは同等であった。これは、対照、ギ酸培地ともに水素発生がギ酸分解によるものであったことを表している。*E. aerogenes* の水素発生経路は、NADH 反応経路とギ酸分解経路の二つが想定されたが、本実験条件下では、少なくとも培養 8 時間はギ酸分解経路が主であることが明らかになった。以上の結果から、ギ酸培地において積算水素発生量が多かった理由は、ギ酸分解量が多かったからであると結論できる。

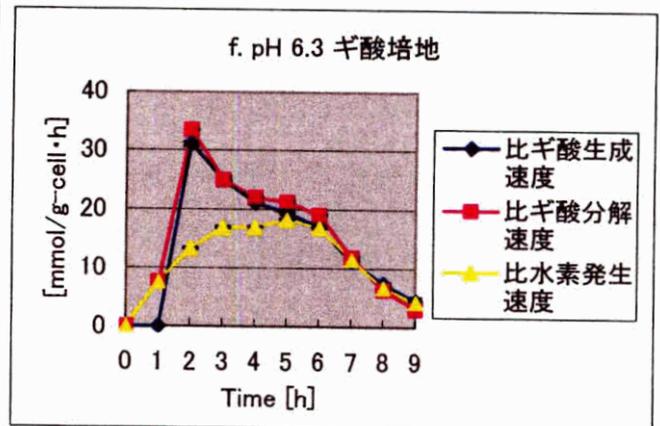
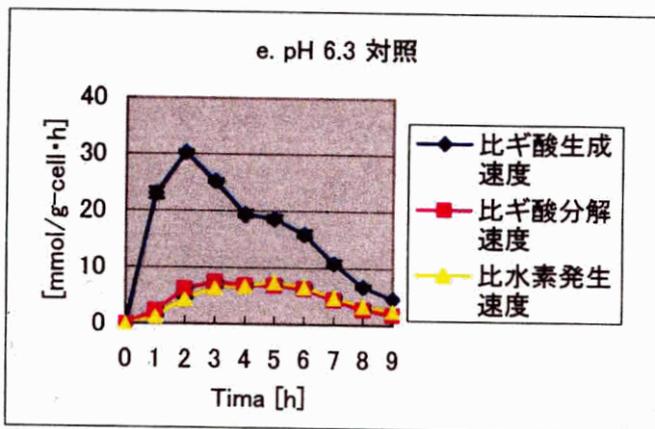
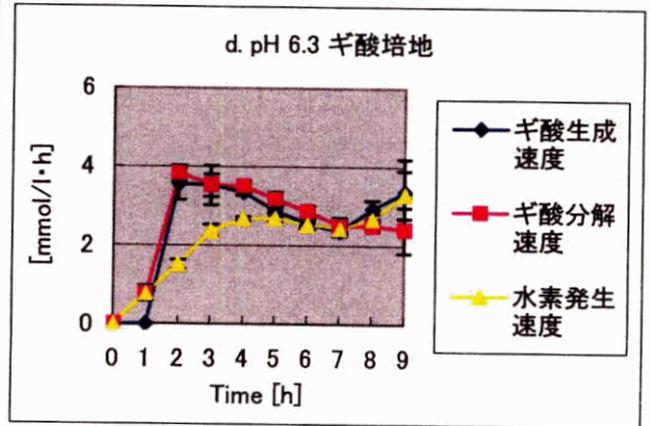
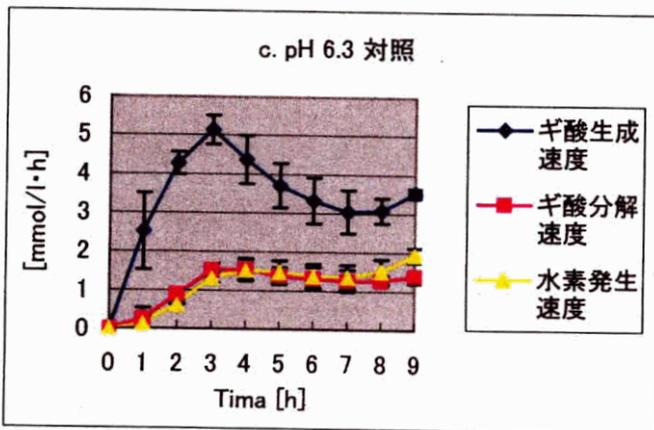
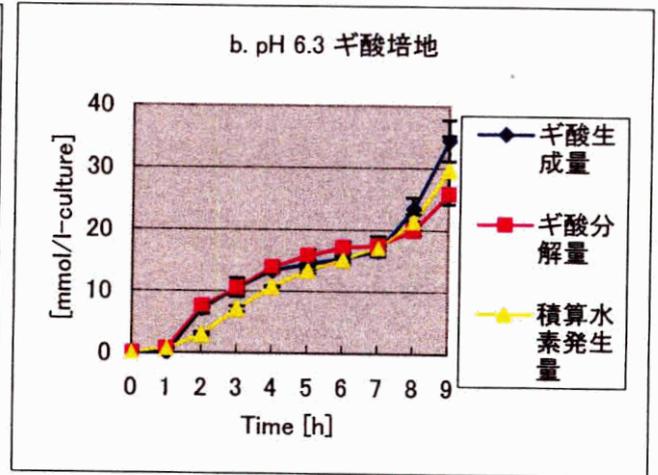
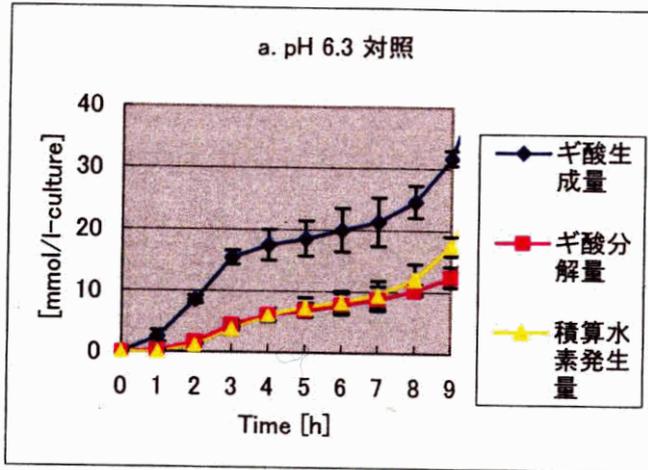
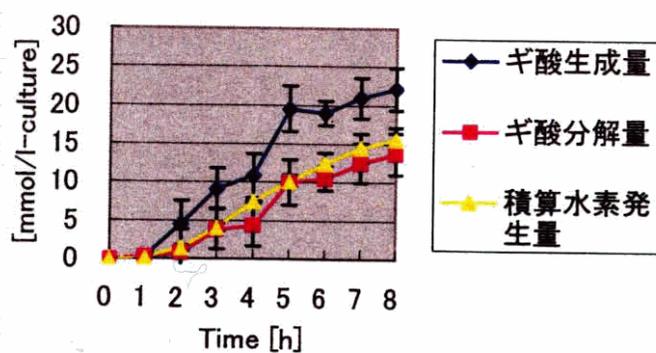
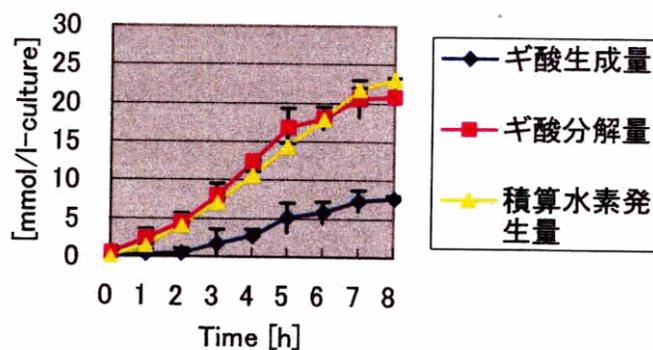


図3.3-5 pH 6.3 におけるギ酸分解とギ酸生成および水素発生の関係

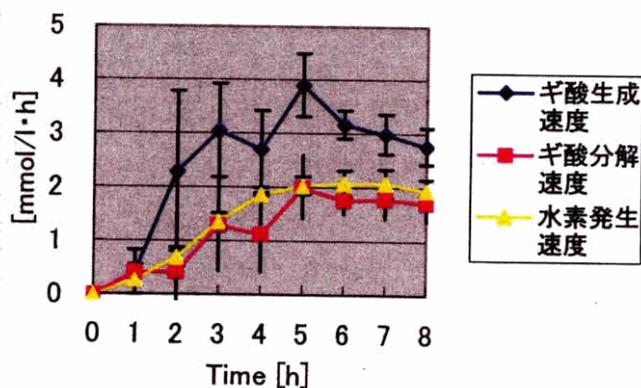
a. pH 5.5 対照



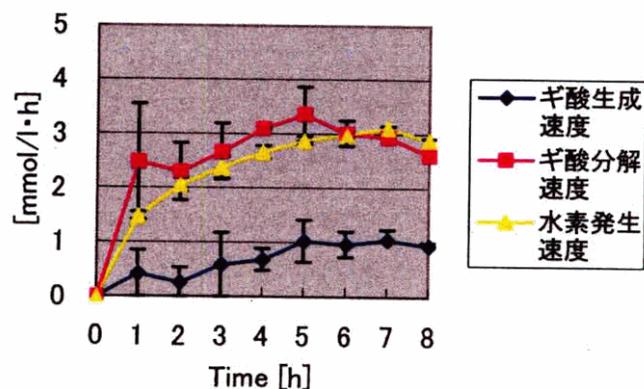
b. pH 5.5 ギ酸培地



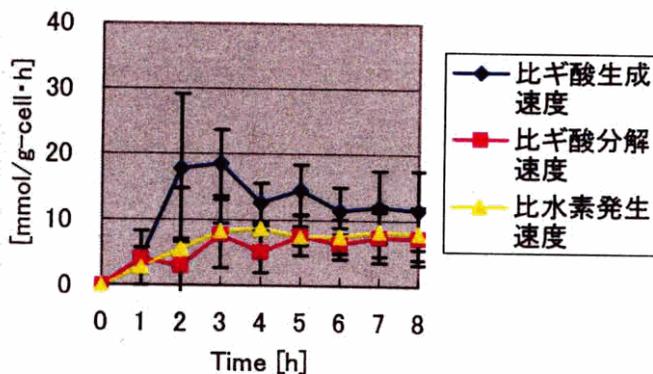
c. pH 5.5 対照



d. pH 5.5 ギ酸培地



e. pH 5.5 対照



f. pH 5.5 ギ酸培地

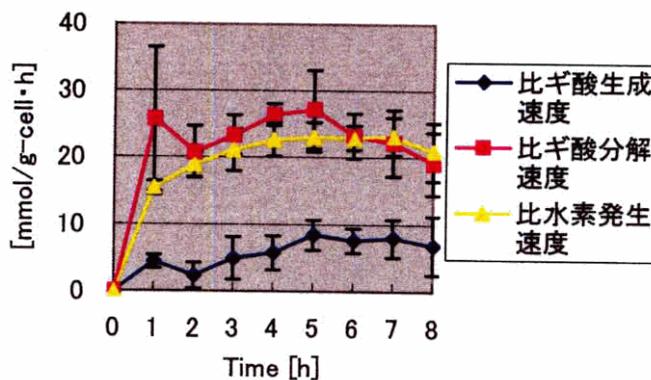


図3.3-6 ギ酸分解とギ酸生成および水素発生の関係

図 3.3-5 c, d、図 3.3-6 c, d よりギ酸分解速度と水素発生速度が同等であることが分かる。この関係は、比ギ酸分解速度と比水素発生速度についても同じである。ただし、ギ酸分解については代謝産物濃度から算出し、水素発生についてはガス発生量の測定によるもので、両者の値には若干の違いがある。

表 3-4 に、培養 8 時間後におけるギ酸生成、ギ酸分解、水素発生についてのデータを示した。培養 8 時間後における比ギ酸生成速度は、ギ酸培地で $7.3(\text{mmol} / \text{g-cell} \cdot \text{h})$ であり、対照の $6.7(\text{mmol} / \text{g-cell} \cdot \text{h})$ と同等であった。しかしながら、比ギ酸分解速度は、ギ酸培地で $6.3(\text{mmol} / \text{g-cell} \cdot \text{h})$ であり、対照の $2.8(\text{mmol} / \text{g-cell} \cdot \text{h})$ を 2.3 倍上回った。

pH5.5 では、ギ酸培地の比ギ酸生成速度は $6.8(\text{mmol} / \text{g-cell} \cdot \text{h})$ であり、対照の $11.5(\text{mmol} / \text{g-cell} \cdot \text{h})$ に対して約 0.6 倍であった (表 3-5)。しかし、比ギ酸分解速度は $19(\text{mmol} / \text{g-cell} \cdot \text{h})$ であり、対照の $7.4(\text{mmol} / \text{g-cell} \cdot \text{h})$ を 2.6 倍上回った。

以上から、第一に、培地 pH が同じであっても、ギ酸培地の方が対照より比ギ酸分解速度が大きかった。

第二に、pH 5.5 と pH 6.3 を比較すると、対照についても、ギ酸培地についても、培地 pH が 5.5 の場合において比ギ酸分解速度が pH6.3 の場合より大きいことが分かった。

第一についての要因は次のように説明できる。ギ酸分解は、細胞内のギ酸イオン濃度が高くなることが信号となって、ギ酸分解酵素系が合成されることから始まる (二章図 2-11a)。pH 6.3 のギ酸培地には、培養開始時点で 0.06mM の HCOOH が存在しており、対照では培養開始時に HCOOH は存在していない (3.3.3 節)。よって、ギ酸培地では、細胞膜を透過するギ酸により、細胞内のギ酸イオン濃度が培養開始時から対照より高くなり、ギ酸分解を活発に行ったと推定される。これが、大きな比ギ酸分解速度の要因と考えられる。

第二についての要因も同様の考え方を適用して次のように説明できる。ギ酸培地での HCOOH 濃度は、培養開始時点で pH 5.5 の培地が pH 6.3 より 6 倍高いと計算された (3.3.3 節)。よって、細胞膜を透過するギ酸は pH 5.5 の方が pH 6.3 より多く、細胞内のギ酸イオン濃度が高くなるため、比ギ酸分解速度がより大きくなる。このような培地 pH とギ酸分解の関係について、電気化学的な視点からの考察を第四章で述べる。

表3-4 培地pH 6.3での培養8時間後におけるギ酸生成、ギ酸分解、水素発生についてのデータ。表の数値は平均値(n=3)を表す。

	ギ酸生成量	ギ酸分解量	積算水素発生量	ギ酸生成速度	ギ酸分解速度	水素発生速度	比ギ酸生成速度	比ギ酸分解速度	比水素発生速度
対照	24.6	10.2	11.3	3.1	1.3	1.4	6.7	2.8	3.1
ギ酸培地	23.3	20	19.6	2.9	2.5	2.5	7.3	6.3	6.1

培地pH 5.5での培養8時間後におけるギ酸生成、ギ酸分解、水素発生についてのデータ。表の数値は平均値(n=3)を表す。

	ギ酸生成	ギ酸分解量	積算水素発生量	ギ酸生成速度	ギ酸分解速度	水素発生速度	比ギ酸生成速度	比ギ酸分解速度	比水素発生速度
対照	22.1	13.7	15.6	2.8	1.7	1.9	11.5	7.4	9.3
ギ酸培地	7.6	20.8	23	1	2.6	2.9	6.8	19	20.8

3.3.6 代謝産物の生成についての分析

図 3.3-7, 図 3.3-8 に代謝産物の濃度（生成量）とグルコース消費量の関係を示す。乳酸、酢酸、エタノール、酪酸、2,3-ブタンジオールについては、ギ酸のように生成後に一部が直ちに分解されることはないので、代謝産物の濃度は代謝産物の生成量を表している。ギ酸生成量については、先述のように酢酸、エタノール、酪酸濃度から算出したものを示す。

図 3.3-7 から、pH 6.3 の場合において次の七点が指摘できる。

第一に、対照、ギ酸培地共にギ酸は培養開始から数時間は最も多く生成される代謝産物である。

第二に、対照、グラフの形状から、グルコース消費量とギ酸生成量は相関しており、培養後 6 時間以降ではグルコース消費量が増加したことでギ酸生成量が増加したと考えられる。グルコース消費量の増加は菌の増殖が活発になったことを表す。

第三に、対照、ギ酸培地共に培養後 7 時間以降にエタノールの生成量は増加せず、乳酸、酢酸、酪酸の生成量が増加した。培養後 7 時間以降は、菌の増殖が活発になったことから、菌の急速な増殖時にはエタノール生成が抑えられ、酸生成（ギ酸、酢酸、酪酸、乳酸）に比重が置かれると考えられる。これは、菌にとってエタノールが一定濃度以上に存在すると増殖に不利に働くためであると考えられる。酸の生成において、特に乳酸の生成量が最も増加しており、菌の増殖には乳酸の生成が強く相関すると考えられる。なお、乳酸は菌の増殖が活発でない培養 7 時間の間においてもグルコースからの代謝産物として生成した。

第四に、培養後 9 時間で、グルコース消費量は対照とギ酸培地で同等であるが、前者の乳酸濃度は約 34mM で、後者の約 24mM であった。上述のように乳酸の生成は菌の増殖と強く相関していると考えられることから、培養開始後から菌の増殖が遅いギ酸培地では乳酸の生成も遅く、結果として乳酸濃度が低くなったと考えられる。

第五に、酪酸は、代謝産物の中で最も遅くに（培養 7 時間以降）生成が始まった。酪酸生成の反応式から、酪酸一分子の生成には二分子のアセチル CoA と一分子の酢酸が必要である。一般に発酵における代謝では、アセチル CoA からの酪酸生成、酢酸生成、エタノール生成はそれぞれ別々の反応である。つまり、アセチル CoA からの代謝経路が分岐しているが、酪酸生成に酢酸が必要であることから、酪酸生成の以前に酢酸生成が進んでいなければならないことになる。

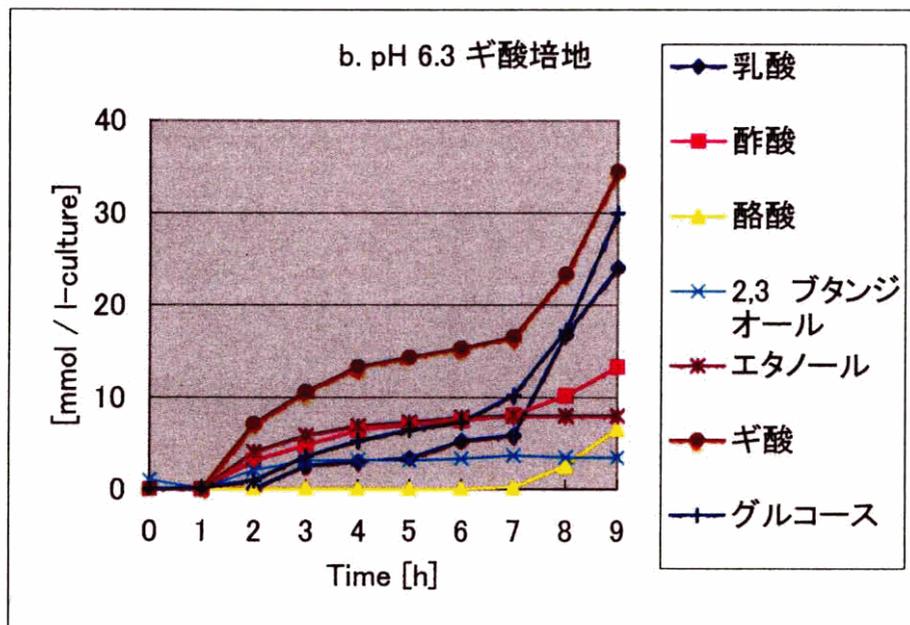
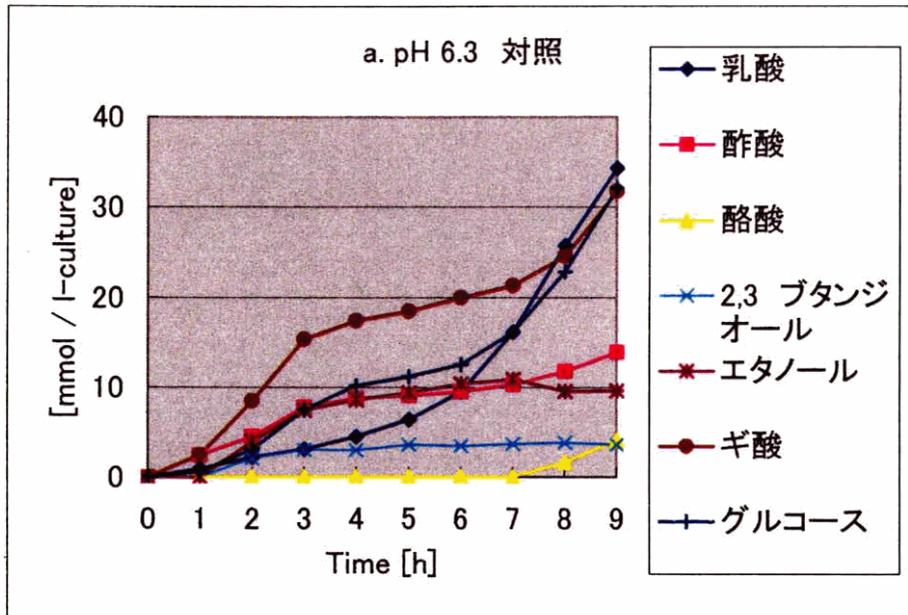


図 3.3-7 代謝産物の濃度(生成量)とグルコース消費量の関係
 ギ酸生成量は、3.14式に基づく算出値である。

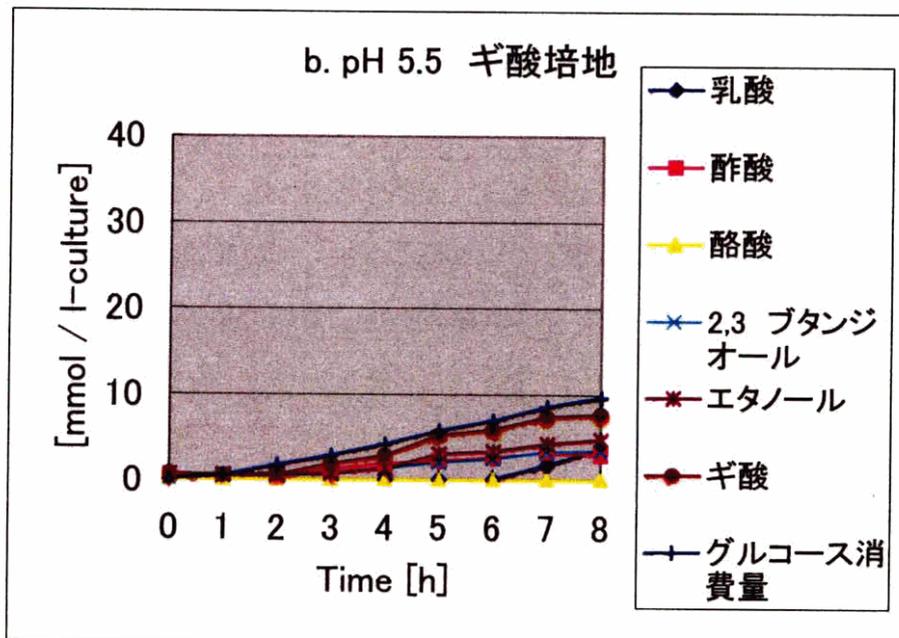
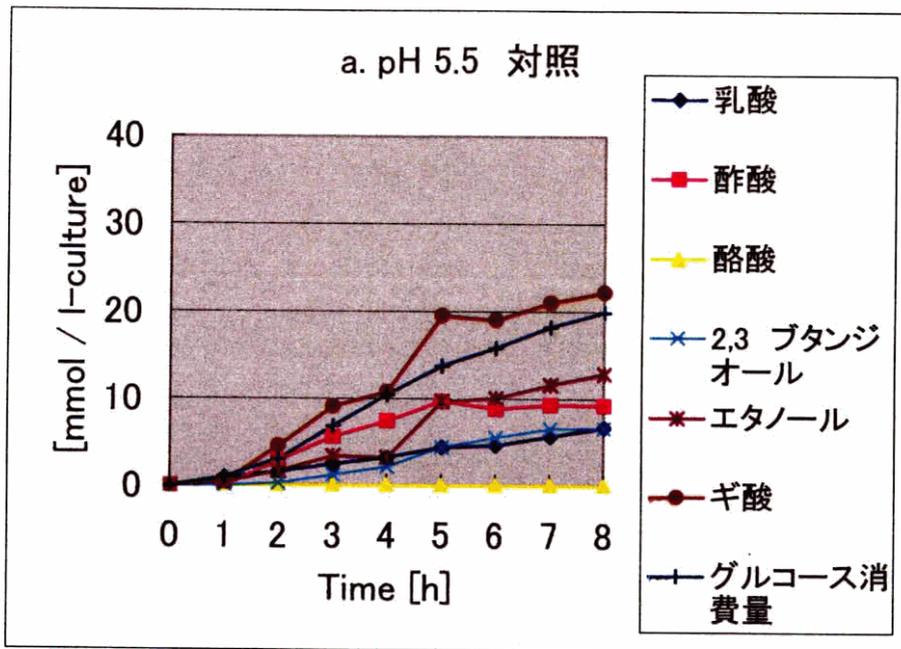


図 3.3-8 代謝産物の濃度(生成量)とグルコース消費量の関係
 ギ酸生成量は、3.14式に基づく算出値である。

よって酪酸が代謝産物の中で最も遅くに生成する要因は、ある程度の酢酸が生成した後でなければ酪酸生成が進まないためであると推定される。菌の増殖が活発になる時間帯に酢酸を用いての酪酸生成が進むことから、酪酸生成は増殖に強く関連していると考えられる。培地中の酢酸濃度が増加すると菌の増殖は阻害されることが明らかになっており、酢酸が過剰に培地中に蓄積することを避けるために酪酸生成を開始した可能性がある。なお、酪酸では増殖阻害の報告がない。

また、pH 5.5 の場合において、次の二点が指摘できる（図 3.3-8）。

第一に、グルコース消費量も代謝産物生成量もほぼ一定の割合で増加した。これは、pH6.3 と比較して、菌が培養 6 時間以降に急速に増殖せず、グルコース消費も急速に進まなかったためである。

第二に、対照では、ギ酸生成量がグルコース消費量を上回ったが、ギ酸培地では逆に下回った。ギ酸培地では、添加したギ酸の分解がグルコース消費よりも活発に進んでおり、ギ酸生成よりもギ酸分解に比重が置かれていることがわかる。

pH 6.3 の対照におけるギ酸収率と乳酸収率及び水素収率の関係について図 3.3-9a に示す。菌体増殖によりグルコース消費量が増加する培養後 6 時間以降に（図 3.3-7）、ギ酸収率が減少して乳酸収率が増加したことが分かる（図 3.3-9a）。理論的には、ギ酸と乳酸以外の代謝産物の生成量が一定であれば、ピルビン酸からの乳酸生成量の増加によって、ピルビン酸からのギ酸生成量は相対的に減少する。図 3.3-7a より、pH 6.3 の対照ではエタノール、2,3 ブタンジオールの生成量はほぼ一定になっており、酢酸、酪酸生成はギ酸生成と連関している。よって、ギ酸収率の減少が乳酸収率の増加につながったことは妥当な結果であると考えられる。水素収率については、培養後 6 時間以降にやや減少した。これは、ギ酸収率が減少したことに起因する。つまり、グルコース消費量に対するギ酸生成量（ギ酸収率）が減少すれば、生成したギ酸の分解に依存した水素発生量も減少する。以上の結果より、水素収率の向上のために、急速な菌体増殖に伴う、グルコース消費と乳酸生成を抑えることが必要であると考えられる。菌体増殖を抑えた培養法として菌体の固定化培養法が知られており今後検討する必要がある。

pH 5.5 の対照では、ギ酸収率、水素収率、乳酸収率はほぼ一定で推移した（図 3.3-9b）。pH 5.5 では少なくとも培養 8 時間は、菌体増殖が pH6.3 ほど活発でなかったことから、グルコース消費量と代謝産物生成量が pH 6.3 ほど急速に増加しなかったために、各々の収率の変化も小さかったと考えられる。pH 5.5 での水素収率は 0.6 から 0.8 であり、pH 6.3 における約 0.5 より高かった。pH

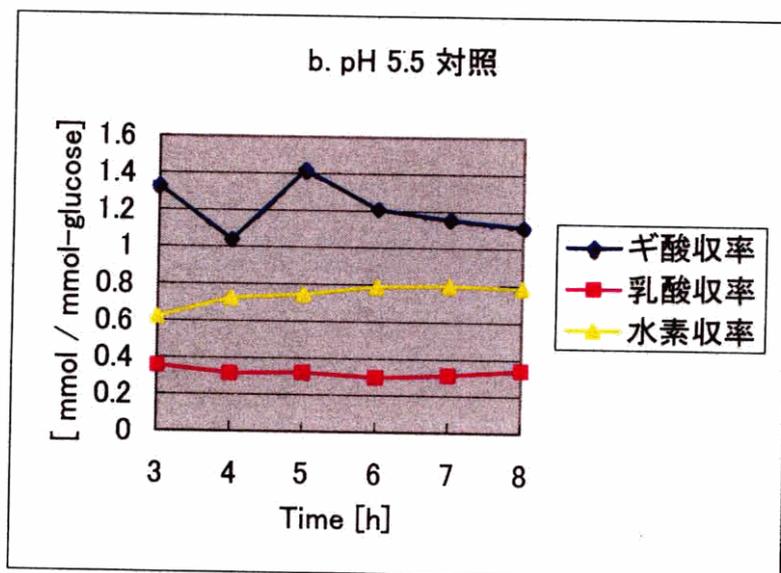
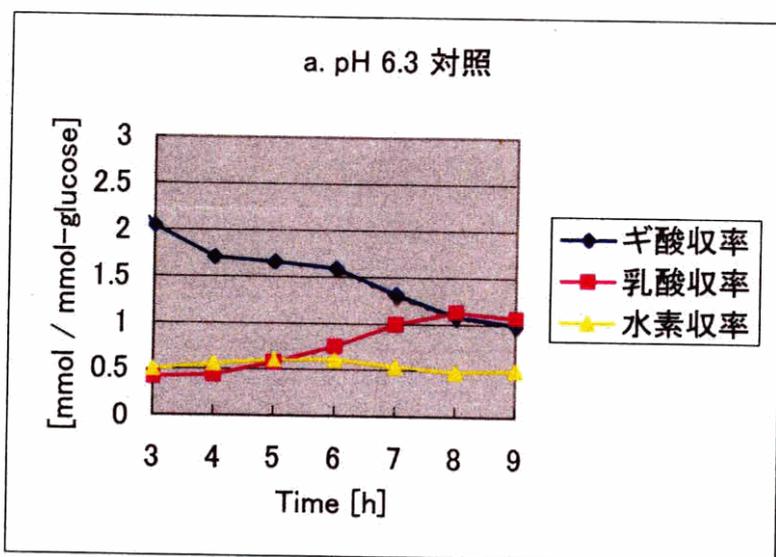


図 3.3-9 対照培地におけるギ酸収率と乳酸収率及び水素収率の関係

5.5では、生成したギ酸を分解する割合が水素収率より高かった（図 3.3-5a と図 3.3-6a）ために水素発生量が多くなり水素収率が高くなったと考えられる。

表 3-5（pH 6.3）、表 3-6（pH 5.5）に代謝産物の濃度、収率と積算水素発生量、基質（グルコース）消費量を示す。表 3-5 で、対照とギ酸培地では乳酸濃度および乳酸収率が明らかにギ酸培地で対照より低かった。これは、乳酸生成に強く関連していると考えられる菌体増殖が、培養開始からギ酸培地において対照より遅かったことに起因すると推定される。

表 3-5, 3-6 に示した NADH 収支、ピルビン酸収支は、投入したグルコースに対して回収した代謝産物のバランス（収支）を表す指標である。これらの収支の値が 1 であれば、完全に収支がとれていることになる。表 3-5, 3-6 の NADH 収支、ピルビン酸収支はいずれも 0.9 から 1.1 の範囲内であり収支がとれていることを表している。このように両者の収支がとれていることから、酢酸、エタノール、酪酸の生成量から算出したギ酸生成量の値も妥当であったことが確認された。また測定した水素発生量が、培地成分（グルコースおよび代謝産物）の分析結果と符合したものであることも確認された。この収支についての理論は、第四章において詳しく述べた。

3.3.7 ギ酸濃度と菌体モル濃度の関係

図 3.3.10 に、ギ酸濃度 [mmol / l-culture] と菌体モル濃度 [mmol / l-culture] の比を示す。ここで、菌体モル濃度とは、培地の菌体濃度 X [g / l] を、菌体が 1 モル存在するときの菌体重量で割ったものと定義する。*E. aerogenes* の菌体の分子組成が $C_{11}H_{1.78}N_{0.24}O_{0.33}$ であることが分かっていることから、菌体が 1 モル存在するときの菌体重量を 22.4 の n 倍 として表す。

$$\text{菌体モル濃度 [mmol / l-culture]} = \frac{X}{22.4 n} \times 10^3$$

ここで、図 3.3.10 の縦軸の値は、[ギ酸濃度 / 菌体モル濃度] を、n 倍して表したものである。

pH 6.3 の対照では、培養開始から [ギ酸濃度 / 菌体モル濃度] × n（以下、[ギ酸濃度 / 菌体モル濃度] と略す）が増加した。この結果は、ギ酸濃度の増加が菌体モル濃度の増加より多いことを示している。培養 2 時間以降は、この比が約 1 でほぼ一定となり、菌体増殖が活発になる培養 6 時間以降は、1 より減少

表3-5 pH6.3での、培養9時間後における代謝産物の濃度測定、収率、収支の測定、算出結果

培養9時間後における代謝産物濃度の測定結果								
pH 6.3 9h	乳酸	酢酸	B.D	エタノール	酪酸	ギ酸濃度	ギ酸生成量	ギ酸分解量*
対照	34.3±0.7	14±1.3	3.6±0.2	9.6±0.6	4.1±0.3	19.3±2.8	32	12
ギ酸培地	24.1±2.7	13.3±1.7	3.4±0.1	8.0±0.7	6.6±1.2	28.5±2.5	34	26(10)

培養9時間後における代謝産物収率の算出結果

pH6.3 9h	乳酸	酢酸	B.D	エタノール	酪酸	ギ酸
対照	1.1	0.4	0.1	0.3	0.1	1.0
ギ酸培地	0.8	0.4	0.1	0.3	0.1	1.0

培養9時間後における代謝産物収支の算出結果

pH6.3 9h	積算水素発生量	基質消費量	水素収率	NADH生成量	NADH再酸化量**	NADH 収支	ピルビン酸収支
対照	16±3	32	0.5	64	69(4)	1.1	1.1
ギ酸培地	30±5	30	0.7	60	60(4)	1.0	1.1

単位: 代謝産物の収率、水素収率は mmol / mmol グルコース

ギ酸濃度とギ酸生成、ギ酸分解量、積算水素発生量などの量については、mmol / l-culture
NADH、ピルビン酸収支については、mmol / mmol で表す。

表の説明:

- ・表の数値は、データの平均値(n = 3)を表す。±数値は、標準偏差を表す。代謝産物のB.Dは、2,3ブタンジオールを表す。
- ・代謝産物の収率は、代謝産物の生成量をグルコース(基質)消費量で割った値である。
- ・水素収率は、水素の発生量をグルコース(基質)消費量で割った値である。
- ・ギ酸生成量は下の式から算出した。
ギ酸生成量 = 酢酸濃度 + エタノール濃度 + (酪酸濃度) X 2
- ・ギ酸分解量は、ギ酸生成量とギ酸濃度(測定値)から計算した。
- ・ギ酸分解量* のカッコ内は添加したギ酸の分解による水素発生量を表す(算出は本文の3.15式による)。
- ・NADH生成量は解糖系において生成したNADHの量を表す。NADH 再酸化量は、代謝産物の生成によって再酸化したNADHの量をあらわす。NADH 再酸化量** のカッコ内は水素発生によって再酸化したNADHの量を表す(第4章参照)。

表3-6 pH 5.5での、培養9時間後における代謝産物の濃度測定、収率、収支の測定、算出結果

培養8時間後における代謝産物濃度の測定結果									
pH 5.5	8h	乳酸	酢酸	B.D	エタノール	酪酸	ギ酸濃度	ギ酸生成量	ギ酸分解量*
対照		6.7±0.3	9.3±0.5	6.6±0.7	12.9±3.2	0	8	22	12
ギ酸培地		3.5±1.4	2.9±0.8	3.4±0.6	4.7±0.3	0	7	8	22 (15)

培養8時間後における代謝産物収率の算出結果

pH 5.5	8h	乳酸	酢酸	B.D	エタノール	酪酸	ギ酸
対照		0.3	0.5	0.3	0.6	0	1.1
ギ酸培地		0.4	0.1	0.2	0.3	0	0.8

培養8時間後における代謝産物収支の算出結果

pH 5.5	8h	積算水素発生量	基質消費量	水素収率	NADH生成量	NADH再酸化量**	NADH 収支	ピルビン酸収支
対照		16±2	20	0.8	40	43 (4)	1.1	1.1
ギ酸培地		23±0.3	10	0.8	20	17 (8)	0.9	0.9

単位：代謝産物の収率、水素収率は mmol / mmol グルコース

ギ酸濃度とギ酸生成、ギ酸分解量、積算水素発生量などの量については、mmol / l-culture

NADH、ピルビン酸収支については、mmol / mmol で表す。

表の説明：

・表の数値は、データの平均値(n = 3)を表す。±数値は、標準偏差を表す。代謝産物のB.Dは、2, 3ブタンジオールを表す。

・代謝産物の収率は、代謝産物の生成量をグルコース(基質)消費量で割った値である。

・水素収率は、水素の発生量をグルコース(基質)消費量で割った値である。

・ギ酸生成量は下の式から算出した。

ギ酸生成量 = 酢酸濃度 + エタノール濃度 + (酪酸濃度) X 2

ギ酸分解量は、ギ酸生成量とギ酸濃度(測定値)から計算した。

ギ酸分解量* のカッコ内は添加したギ酸の分解による水素発生量を表す(算出は本文の3.15式による)。

・NADH生成量は解糖系において生成したNADHの量を表す。NADH 再酸化量は、代謝産物の生成によって再酸化したNADHの量をあら

わす。NADH 再酸化量** のカッコ内は水素発生によって再酸化したNADHの量を表す(第4章参照)。

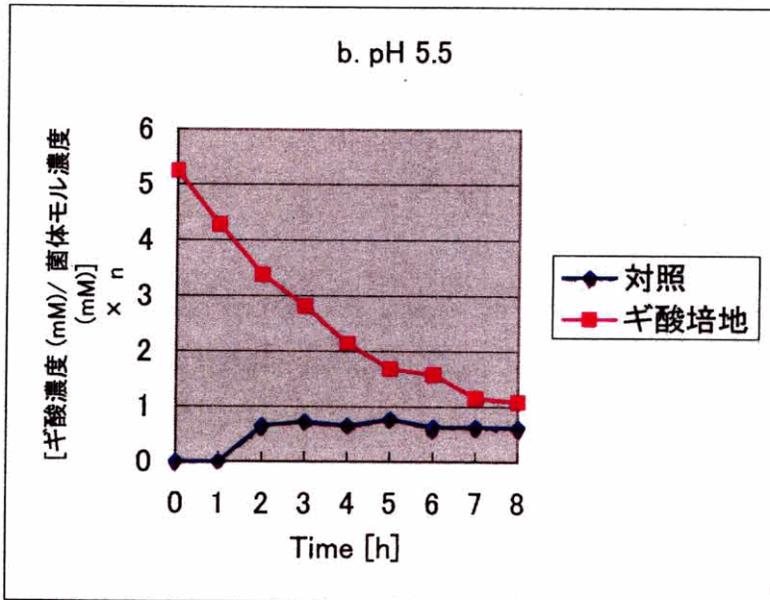
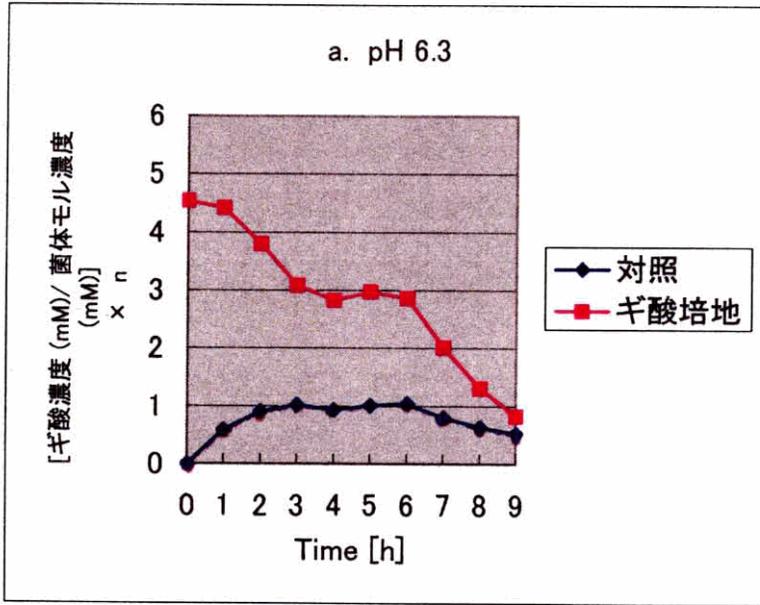


図 3.3-10 ギ酸濃度と菌体モル濃度 の比

した (図 3.3.10a)。よって、菌は、この比が 1 を超えないように培地中のギ酸濃度を調節しながら増殖したと推定される。この点は、pH 5.5 の対照においても、上記の比が約 0.8 でほぼ一定となった。

培養開始時における pH 6.3、pH 5.5 のギ酸培地では、[ギ酸濃度 / 菌体モル濃度]が約 5 であった。pH 6.3 のギ酸培地では、菌体増殖 (3.3.3 節、図 3.3-1a) により [ギ酸濃度 / 菌体モル濃度]が減少して、対照における比の値に近づいた (図 3.3.10b)。pH 5.5 のギ酸培地においても、[ギ酸濃度 / 菌体モル濃度]が減少して、対照における比の値に近づいた。この比の減少は、ギ酸濃度の低下 (図 3.3-4b) と菌体モル濃度の増加 (3.3.3 節、図 3.3-1b) の両者に依存しているといえる。このように、ギ酸培地で [ギ酸濃度 / 菌体モル濃度]が減少して対照に近づくことから、ギ酸培地では添加したギ酸が菌体増殖に対して負荷となったために、これを軽減するように菌体がギ酸濃度と増殖のバランスを調節したと考えられる。3.3.3 節の図 3.3-1 c で、培養 8 時間から急速に増殖速度が上がる現象が確認された。この要因は、[ギ酸濃度 / 菌体モル濃度]が 1 に近づくことで菌に対するギ酸濃度による負荷が減少したためと推定される。

図 3.3.11 に、pH 6.3 での代謝産物生成量 [mmol / l-culture] と菌体モル濃度 [mmol / l-culture] の比を示す。図 3.3.11 の縦軸の値は、[代謝産物生成量] / 菌体モル濃度を n 倍したものである。図 3.3.11 で、ギ酸生成量と菌体モル濃度の比には上限があり、対照、ギ酸培地共に、その上限値は 2 から 2.5 の間にあることが分かる。また、他の代謝産物についても、その上限値は、1 前後であった (ただし、酪酸は除く)。これは、比の上限を超えないように代謝産物の生成量と菌体増殖が調節されていることを示している。

3.4 考察

3.4.1 水素発生経路と水素収率について

培養 22 時間後における、積算水素発生量、代謝産物の収率、水素収率および NADH、ピルビン酸収支を表 3.7、3.8 に示す。培養 22 時間後は、対照、ギ酸培地共に 1% グルコースを全て消費していることから、代謝産物の収率、水素収率などを比較、検討する上でこの時間が最も適している。

積算水素発生量は、pH 6.3 のギ酸培地で 66 (mmol / l-culture)、対照で 40 (mmol / l-culture)、pH 5.5 のギ酸培地で 95 (mmol / l-culture)、対照で 52 (mmol / l-culture) であった。ここで、ギ酸培地での積算水素発生量は、グ

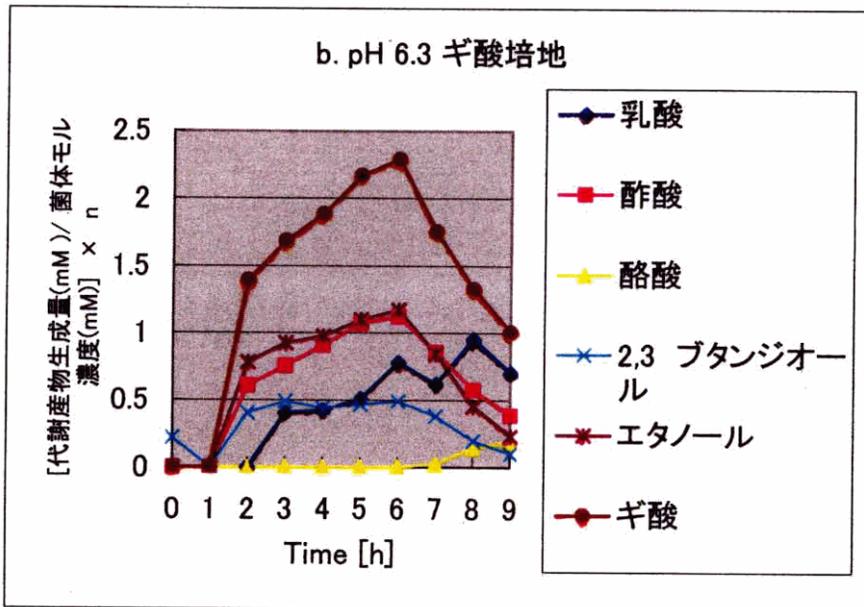
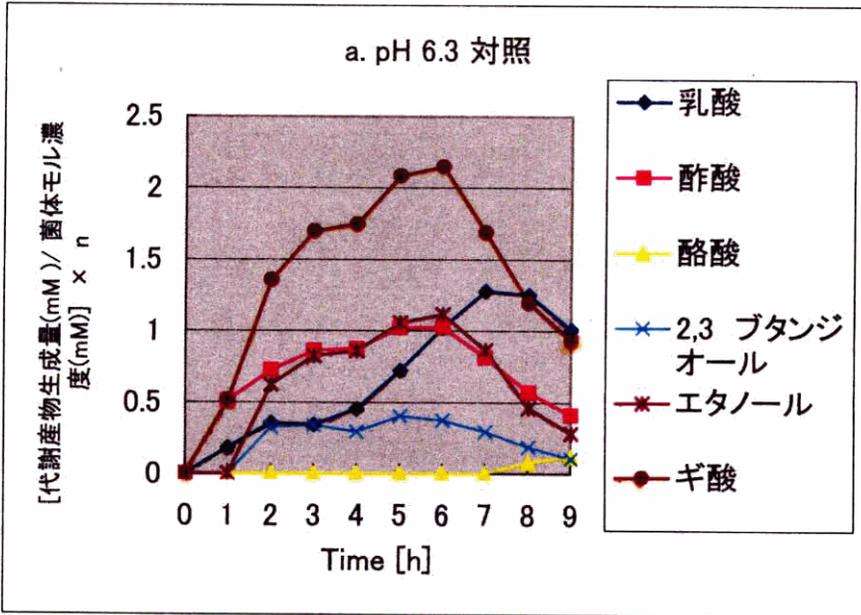


図 3.3-11 代謝産物生成量と菌体モル濃度の比

表3-7 pH6.3での、培養22時間後における代謝産物の濃度測定、収率、収支の測定、算出結果

培養22時間後における代謝産物濃度の測定結果

pH 6.3 22h	乳酸	酢酸	B.D	エタノール	酪酸	ギ酸濃度	ギ酸生成量	ギ酸分解量*
対照	34.6 ± 1.0	19.3 ± 0.2	3.8 ± 0.3	11 ± 1.6	18.2 ± 2.3	34 ± 4.8	67	33
ギ酸培地	26.9 ± 1.0	21.7 ± 1.3	2.9 ± 0.3	8.5 ± 0.2	19.6 ± 1.1	41.5 ± 1.7	70	48.5 (11)

培養22時間後における代謝産物収率の算出結果

pH 6.3 22h	乳酸	酢酸	B.D	エタノール	酪酸	ギ酸
対照	0.6	0.4	0.1	0.2	0.3	1.2
ギ酸培地	0.5	0.4	0.1	0.2	0.3	1.3

培養22時間後における代謝産物収支の算出結果

pH 6.3 22h	積算水素発生量	基質消費量	水素収率	NADH生成量	NADH再酸化量**	NADH 収支	ピルビン酸収支
対照	40 ± 4	55	0.7	110	106 (7)	0.9	1.0
ギ酸培地	66 ± 9	55	1.0	110	100 (18)	0.9	1.0

単位: 代謝産物の収率、水素収率は mmol / mmol グルコース

ギ酸濃度とギ酸生成、ギ酸分解量、積算水素発生量などの量については、mmol / l-culture
NADH、ピルビン酸収支については、mmol / mmol で表す。

表の説明:

- ・表の数値は、データの平均値(n = 3)を表す。土数値は、標準偏差を表す。代謝産物のB.Dは、2, 3ブタンジオールを表す。
- ・代謝産物の収率は、代謝産物の生成量をグルコース(基質)消費量で割った値である。
- ・水素収率は、水素の発生量をグルコース(基質)消費量で割った値である。
- ・ギ酸生成量は下の式から算出した。
ギ酸生成量 = 酢酸濃度 + エタノール濃度 + (酪酸濃度) X 2
- ・ギ酸分解量は、ギ酸生成量とギ酸濃度(測定値)から計算した。
- ・ギ酸分解量* のカッコ内は添加したギ酸の分解による水素発生量を表す(算出は本文の3.15式による)。
- ・NADH生成量は解糖系において生成したNADHの量を表す。NADH 再酸化量は、代謝産物の生成によって再酸化したNADHの量をあらわす。
- ・NADH 再酸化量** カッコ内は水素発生によって再酸化したNADHの量を表す(第4章参照)。

表3-8 pH 5.5での、培養22時間後における代謝産物の濃度測定、収率、収支の測定、算出結果

培養22時間後における代謝産物濃度の測定結果

pH 5.5 22h	乳酸	酢酸	B.D	エタノール	酪酸	ギ酸濃度	ギ酸生成量	ギ酸分解量*
対照	7.7±0.3	23.6±0.2	3.2±0.3	9.9±2.4	12.5±0.3	6.0	58	52
ギ酸培地	13±4.6	22.1±1.1	2.3±0.1	4.3±0.2	14.5±0.9	6.0	55	69 (18)

培養22時間後における代謝産物収率の算出結果

pH 5.5 22h	乳酸	酢酸	B.D	エタノール	酪酸	ギ酸
対照	0.1	0.4	0.1	0.2	0.2	1.1
ギ酸培地	0.2	0.4	0.04	0.1	0.3	1.0

培養22時間後における代謝産物収支の算出結果

pH 5.5 22h	積算水素発生量	基質消費量	水素収率	NADH生成量	NADH 再酸化量**	NADH 収支	ピルビン酸収支
対照	52±6	55	1.0	110	67 (0)	0.6	0.7
ギ酸培地	95	55	1.4	110	88 (27)	0.8	0.7

単位: 代謝産物の収率、水素収率は mmol / mmol グルコース

ギ酸濃度とギ酸生成、ギ酸分解量、積算水素発生量などの量については、mmol / l-culture
NADH、ピルビン酸収支については、mmol / mmol で表す。

表の説明:

・表の数値は、データの平均値(n = 3)を表す。±数値は、標準偏差を表す。代謝産物のB.Dは、2, 3ブタンジオールを表す。

・代謝産物の収率は、代謝産物の生成量をグルコース(基質)消費量で割った値である。

・水素収率は、水素の発生量をグルコース(基質)消費量で割った値である。

・ギ酸生成量は下の式から算出した。

ギ酸生成量 = 酢酸濃度 + エタノール濃度 + (酪酸濃度) × 2

ギ酸分解量は、ギ酸生成量とギ酸濃度(測定値)から計算した。

・ギ酸分解量* のカッコ内は添加したギ酸の分解による水素発生量を表す(算出は本文の3.15式による)。

・NADH生成量は解糖系において生成したNADHの量を表す。NADH 再酸化量は、代謝産物の生成によって再酸化したNADHの量をあらわす。

・NADH 再酸化量** カッコ内は水素発生によって再酸化したNADHの量を表す(第4章参照)。

ルコース消費による水素発生量と添加したギ酸の分解による水素発生量の合計である。したがって、ギ酸培地でのグルコース消費による水素発生量は、積算水素発生量から添加したギ酸の分解による水素発生量を差し引いた値である。

そこで、添加したギ酸の分解による水素発生量を次の式により算出した。

$$\text{添加したギ酸の分解による水素発生量} = (\text{ギ酸分解量}) \times \{20 / (20 + \text{ギ酸生成量})\} \quad (3.15)$$

(3.15) 式より、培養 22 時間後における添加したギ酸の分解による水素発生量は、pH 6.3 のギ酸培地で 10 (mmol/l-culture)、pH 5.5 では 20 (mmol/l-culture) であった。よって、グルコースからの水素発生量は、積算水素発生量から添加したギ酸の分解による水素発生量を差し引いて pH 6.3 で 56 (mmol/l-culture)、pH 5.5 で 75 (mmol/l-culture) となった。これらの値は、対照における積算水素発生量を上回った。この結果から、ギ酸培地でのグルコースからの水素収率を、グルコース消費による水素発生量をグルコース消費量で割って算出すると、pH 6.3 では 1.01、pH 5.5 では 1.36 であった。対照での水素収率は、pH 6.3 では 0.72、pH 5.5 では 0.95 であったことから、ギ酸培地における水素収率が対照を上回った。この要因を次のように分析した。

pH 6.3 の対照とギ酸培地では、積算水素発生量がギ酸分解量より大きかった(表 3-7)。これは、水素がギ酸分解のみならず、他の経路によって生成したことを示唆している。*E. aerogenes* の水素発生は NADH の再酸化によっても起こり得ることが指摘されている。そこで、水素発生がギ酸分解と NADH の再酸化の両方によって起きたとして、積算水素発生量を両者の和として下式で表した。

$$\text{積算水素発生量} = \text{NADH の再酸化による水素発生量} + \text{ギ酸分解量} \quad (3.16)$$

(3.16) 式より、積算水素発生量からギ酸分解量(表)を差し引いて NADH の再酸化による水素発生量を算出すると、pH 6.3 の対照で 7 (mmol/l-culture)、ギ酸培地で 18 (mmol/l-culture) であった。よって、この式によって考えると、ギ酸培地では NADH の再酸化に依拠する水素発生量が対照より約 10 (mmol/l-culture) 多かったと推定される。

pH 5.5 対照では積算水素発生量とギ酸分解量が等しかったことから、NADH の再酸化による水素発生はなかったことになる。この結果は、pH 6.3 の対照と異なっており、再検討する必要がある。pH 5.5 のギ酸培地では、NADH の再

酸化による水素発生量は 28 (mmol/l-culture) と算出された。

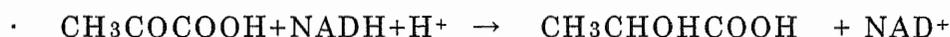
以上のように、積算水素発生量を NADH の再酸化による水素発生量とギ酸分解量の和として表すと、ギ酸培地の方が対照より多くなることが示された。ギ酸培地でなぜ水素収率が増加したかについて、グルコースから生成したギ酸分解量には大きな差がないことから、NADH の再酸化による水素発生量の違いとして説明することが一つの考え方である。

また、(3.16)式から算出した NADH の再酸化による水素発生量を NADH 収支の計算式 (第四章) に代入すると、pH 6.3 では対照、ギ酸培地共に 0.9 と NADH 収支がほぼとれていることが分かった (表 3-7)。これは、(3.16)式が妥当であったことを示している。すなわち、*E. aerogenes* の水素発生経路は、ギ酸分解を主とすれば、NADH の再酸化を副として両者を併用すると考えられる。pH 5.5 では、NADH 収支が対照で 0.6、ギ酸培地で 0.7 であった (表 3-8)。これは、解糖系で生成した NADH が代謝産物の生成によって 6 割から 7 割程度しか再酸化していないことを表している。なぜ、NADH の再酸化量が小さくなったかについて、代謝産物の内、培養 22 時間までに乳酸の一部が菌によって分解された可能性がある。乳酸は、グルコースが消費し尽くされる頃に分解されて濃度が低下することがあり、分解により乳酸濃度が低くなると、NADH の再酸化量も小さく計算されることになる。特に pH 5.5 の対照では乳酸濃度が培養 8 時間で 6.7mM (表 3-6)、培養 22 時間で 7.7mM と濃度が同等であったことから、培養 8 時間から培養 22 時間の間にグルコース消費で生じた乳酸が分解された可能性が強い。今後は培地 pH と NADH 収支、および水素発生量との関係をさらに解析する必要がある。

3.4.2 代謝産物濃度、収率と水素発生量の関係について

次に水素以外の代謝産物生成量を分析して、水素発生量との相関について検討した。pH 6.3 では、ギ酸培地の乳酸濃度が 5.5 (mmol/l-culture) 低かった (表 3-8)。乳酸は、ピルビン酸から生成する。

ピルビン酸からの乳酸生成と NADH の再酸化



代謝産物の収支を考えると、乳酸濃度が低かった分、解糖系で生成したピルビン酸は、乳酸以外の代謝産物の生成によって代謝される必要がある。そこで、ピルビン酸が乳酸生成ではなく、ギ酸生成に利用された場合、水素はどれだけ

増加するかについて以下に述べる。

ギ酸は、ピルビン酸からアセチル CoA と等量生成する（下式を参照）。

また、アセチル CoA からは、酢酸、エタノール、酪酸が生成する。このうち、酢酸の生成は、NADH の再酸化を伴わないが、エタノール、酪酸は NADH の再酸化を伴って生成する（下式を参照）。

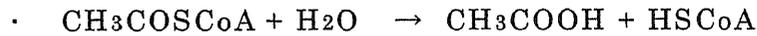
解糖系でのグルコースからのピルビン酸生成



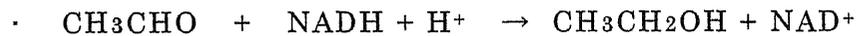
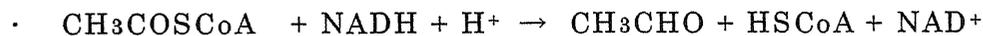
ピルビン酸からのギ酸とアセチル CoA の生成



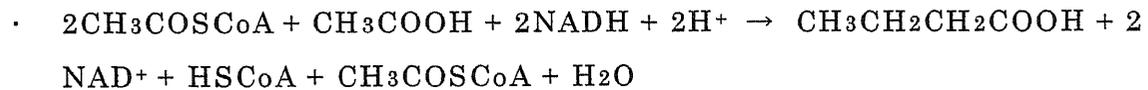
アセチル CoA からの酢酸生成（NADH の再酸化を伴わない）



アセチル CoA からのエタノール生成と NADH の再酸化

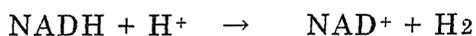


アセチル CoA からの酪酸生成と NADH の再酸化



よって、*E. aerogenes* の水素発生が、ギ酸分解と NADH の再酸化の両者によって起きとすれば、アセチル CoA から酢酸が生成する場合は最も多く水素が得られることになる。なぜなら、酢酸の生成は、NADH の再酸化を伴わないので、解糖系で生じた NADH を水素発生に利用できるためである。

NADH の再酸化による水素発生



アセチル CoA からエタノールまたは酪酸が生成する場合は、NADH の再酸化を伴うため、酢酸の場合のように NADH からの水素発生を期待することはできない。

そこで、ギ酸と酢酸の生成経路を考えると、解糖系でグルコースからピルビン

酸が 5.5 (mmol / l-culture) 生成するとき、NADH は、5.5 (mmol / l-culture) 生成する。また、ギ酸もピルビン酸から 5.5 (mmol / l-culture) 生成する。よって、これらが全て水素発生に利用されたとすれば、合計して 11 (mmol / l-culture) だけ水素発生量が多くなるはずである。実験結果からは、ギ酸生成量は 3 (mmol / l-culture)、酢酸生成量は 2 (mmol / l-culture) だけギ酸培地が多かった (表 3-7)。また、3.4.1 の考察で述べたように、NADH の再酸化による水素発生量も対照より約 10 (mmol / l-culture) 多くなると推定された。したがって、乳酸生成に利用されない分、ピルビン酸がギ酸と酢酸生成に利用されて水素発生量が多くなる可能性は十分考えられる。

pH 5.5 のギ酸培地では、乳酸とエタノール濃度に対照との違いが表れたことから次にこの点を考察する (表 3-8)。ギ酸培地の乳酸濃度は、対照より約 6 (mmol / l-culture) 高かった。乳酸濃度が高いと、ピルビン酸からのギ酸生成量を減らすため、水素発生量の増加にはつながらない。実験結果では、ギ酸培地でのギ酸生成量は 3 (mmol / l-culture) 対照より少なかった (表 3-8)。

ギ酸培地では、エタノール生成量が対照より 5.5 (mmol / l-culture) 低かった。エタノール生成量の減少によって、NADH の再酸化量は、その 2 倍の 11 (mmol / l-culture) 減少する。この 11 (mmol / l-culture) が水素発生によって再酸化されたとすれば、ギ酸培地での積算水素発生量が増加する可能性はある。ただし、ギ酸培地と対照のグルコースからの水素発生量の違いである、約 25 (mmol / l-culture) には満たない。よって、乳酸、エタノールなどの代謝産物生成量の違いのみからグルコースからの水素発生量の違いを説明することはできない。pH 5.5 のギ酸培地においては、解糖系で生成した NADH (対照と同量) を再酸化して、水素にする量が増加する要因が別にあったものと推定される。例えば、ギ酸添加によりギ酸分解酵素系の合成量が多くなることは充分考えられ、NADH の再酸化による水素発生量を多くするように影響している可能性もある。つまり、ギ酸分解酵素系は、大腸菌におけるギ酸分解に関わる酵素複合体 (いくつかの酵素の集合体) であり、*E.aerogenes* におけるギ酸分解酵素系に相当する酵素複合体では、ギ酸分解と NADH の再酸化の両者が起きる可能性もある。

3.4.3 水素収率の向上について

水素収率の向上には、基質の代謝経路が水素を最も多く生成する経路であることが必要である。解糖系でグルコース 1 モルから 2 モルのピルビン酸が生成して、ピルビン酸が、全てギ酸とアセチル CoA の生成に利用されるとギ酸とア

セチル CoA は各々 2 モル生成する。したがってグルコースからのギ酸収率は最大で 2 であり、水素発生がギ酸分解のみに依存しているとすれば水素収率の最大値は同じく 2 である。先述のように、*E. aerogenes* は、解糖系で生成する NADH を水素生成に利用できるとすれば、酢酸生成の場合に最も多く水素を発生する。そこで、上述のギ酸分解による水素発生と NADH からの水素発生とを合わせると、グルコースからの水素収率の最大値は 4 である。この場合の反応式は、次のとおりである。式の下線部が水素発生に寄与する。



式で表すように、水素収率が 4 の場合、第一に、ピルビン酸は全てギ酸とアセチル CoA の生成に利用されること、第二にアセチル CoA は全て酢酸生成に利用されることが条件である。第二については、酢酸は NADH の再酸化を伴わず生成するが、エタノール、酪酸は NADH の再酸化を伴うためである。*E. aerogenes* が NADH を水素生成に利用できるのであれば、エタノール、酪酸生成による NADH の再酸化は最小限にして、ギ酸と酢酸の生成量が多くなることが水素収率の向上に有効である。

また、ギ酸と酢酸の生成量が多くなれば、ピルビン酸からの乳酸、2, 3-ブタンジオール生成量を減少させ、それらの生成に伴う NADH の再酸化も減少させることができる。この点からも、水素収率の向上に有効であるといえる。そこで、グルコース消費によるギ酸と酢酸の生成量を増加させる方法についての考察を以下に述べる。

菌は細胞内ギ酸イオン濃度の上昇に対応してギ酸分解を進めることから、ギ酸分解による水素発生はギ酸という酸ストレス（酸負荷）に対する応答である（二章 2.6）。図 3.3.10 で示したように、ギ酸濃度に対する菌体モル濃度の比は、約 1 であった。この比を超えても生育できる菌株は、通常より高いギ酸濃度に対応できることを意味する。このような菌株は、高濃度のギ酸が存在している培地で生育できる菌株を育種することで得られるはずである。また、高い濃度のギ酸の存在下で生育できる菌株は、グルコース代謝によるギ酸生成量が増加する可能を持つ。ギ酸生成には、その後の酢酸生成（ギ酸と同じモル数）も伴うため、真にギ酸生成量を大きくするためには、高濃度のギ酸と酢酸に対応できる菌株を育種するほうが、より強力な手段といえる。このような育種により、ギ酸と酢酸の生成量を増加させ、水素収率の向上を図ることができると考えられる。

E. aerogenes は、培地の pH が低下するとピルビン酸から 2, 3-ブタンジオー

ルを生成して、ピルビン酸からのギ酸や酢酸などの酸生成量を抑えることが分かっている。これは、酸耐性（二章 2.5）の一つといえる。本実験結果において、2,3-ブタンジオールの生成量は少なかったが、これは培地の pH を一定に制御したためと考えられる。高濃度のギ酸、酢酸に耐えうる菌株は、酸耐性の能力が強いため、2,3-ブタンジオールの生成を必要としない可能性がある。

なお、遺伝的な変異株を作成することによって *E. aerogenes* の水素収率が向上することが報告されている [43][44]。この報告によると、グルコースからエタノールと乳酸の生成量を減じた変異体を作成すると、水素収率が 1.7 程度に向上したことが示されている。

3.5 結論

以下に、本章の研究から明らかになった点を要約して、説明する。

1. 培地 pH を一定にした実験により、ギ酸培地では菌体の増殖が遅れたが、水素は対照より活発に出すことが分かった。その要因は、ギ酸培地ではギ酸分解が活発に進むためであったが、グルコース消費とギ酸分解の分析より、より詳細には次のような要因によることが分かった。すなわち、ギ酸添加により、グルコースからのギ酸生成が培養開始から遅れるが、生成したギ酸と添加したギ酸の両者を含めたギ酸の分解が促進されることによることが明らかになった。
2. 培地 pH の違いによって、ギ酸生成と分解の速度が変化することが分かった。まず、pH 6.3 では、ギ酸培地の比ギ酸生成速度が対照と同等であったが、比ギ酸分解速度は対照より 2.3 倍大きかった。ギ酸培地の比ギ酸生成速度と比ギ酸分解速度は培養 8 時間までは同等であり、ギ酸分解とギ酸生成が均衡した。
3. 次に、pH 5.5 のギ酸培地では、比ギ酸生成速度が対照の 0.6 倍であったが、比ギ酸生成速度は対照より 2.6 倍大きかった。つまり、pH 5.5 のギ酸培地では、ギ酸分解がギ酸生成より活発であることが分かった。
4. ギ酸培地で比ギ酸分解速度が対照より大きかった要因は、培養開始時点で、培地のギ酸 (HCOOH) 濃度が高かったためと推定された。すなわち、細胞内に透過したギ酸 (HCOOH) 分子が多かったために、ギ酸分解酵素系の合成を促進して大きな比ギ酸分解速度を生み出したと考えられる。同様に、pH 5.5 のギ酸培地が pH 6.3 のギ酸培地より大きな比ギ酸分解速度で

あったことは、細胞内に透過したギ酸 (HCOOH) 分子が多かったことによると考えられた。

5. 菌は、ギ酸濃度と菌体増殖を一定の比になるように調節して増殖すると考えられた。また、代謝産物生成量と菌体モル濃度の比には、上限が存在した。よって、この上限を超えないように代謝と増殖が調節されていると考えられる。この結果より、水素収率の向上には、通常より高いギ酸と酢酸濃度に適応できる菌株を育種することが有用であるという方策を見出した。
6. pH6.3 において、乳酸生成は菌体が急速に増殖する時間帯で活発となったことから、菌体増殖と強い相関があると考えられた。培養開始後から菌の増殖が遅いギ酸培地では乳酸の生成も遅く、グルコース代謝が明らかに添加したギ酸の存在によって影響を受けることが分かった。また、pH6.3での分析により、水素収率が乳酸収率とギ酸収率に影響を受けることが判明した。この結果より、水素収率の向上のために、急速な菌体増殖に伴う、グルコース消費と乳酸生成を抑えることが必要であることが分かった。今後、固定化菌体培養などの菌体の増殖を抑えた培養技術を確立する必要がある。
7. 代謝産物収支の分析により、*E. aerogenes* の水素発生は主にギ酸分解に依存していることが分かった。ただし、ギ酸分解量のみでは積算水素発生量には満たないことから、NADH の再酸化による水素発生量を考慮する必要がある。すなわち、菌体は細胞内の NADH についての酸化還元バランス (NADH と NAD⁺の比率) を一定に保つために、有機酸やアルコールの生成のみならず、水素生成によっても NADH を再酸化する経路をとっていると推定される。したがって、*E. aerogenes* の水素発生は、ギ酸分解と NADH の再酸化による経路の両者を併用していると考えられ、大腸菌 (ギ酸分解のみ) と *C. Butyricum* (NADH の再酸化による経路のみ) の中間的な位置付けにあることが示唆された。ギ酸培地におけるグルコースからの水素収率の増加は、NADH の再酸化による水素発生量が対照より大きいことによると推定された。

第4章 ギ酸添加実験に基づく発酵水素発生の理論

4.1 本章の目的

本章は、第一に、第三章でのギ酸添加実験の結果を踏まえて、ギ酸分解による水素発生について理論的に考察することを目的とした。具体的には、電気化学的な観点から、ギ酸分解が起きる場合のギ酸濃度、培地 pH、細胞内 pH などの条件について論じた。

また、第二に、水素発生量と水素収率を全ての代謝産物との関係から総合的に分析するために代謝産物収支について考察することを目的とした。代謝産物収支が正確にとれて初めて、水素発生量の測定値と、液体クロマトグラフィーにより測定した有機酸とアルコールの濃度を比較分析して、量的な関係を明らかにすることができる。しかしながら、これまでの研究では、*E. aerogens* についての水素発生経路が明らかになっていなかったことから、代謝産物収支計算の結果のみ示した例[43]はあっても、代謝産物収支の計算法は各種の論文にも明記されていなかった。本研究の第三章において、*E. aerogens* の水素発生経路は主にギ酸分解によるが、NADH の再酸化による水素発生も起こる得ることを NADH 収支の計算結果から示した(3.4.1 節、表 3.5-3.8 参照)。このような代謝産物収支の計算法について、作成した過程を含めて述べた。

4.2 酸化還元電位と水素発生

4.2.1 培地のギ酸濃度と水素発生の起こりやすさ

酸化還元電位に着目してギ酸培地と対照における水素発生について考察する。一般に酸化還元電位は次の式で表せる。

$$E = E_0 + (RT / nF) \ln [\text{酸化型活量}] / [\text{還元型活量}] \quad (4.1)$$

ただし、上の式の単位、数値は次のとおりである。

E_0 : pH 0, 1atm, 298 K における標準酸化還元電位

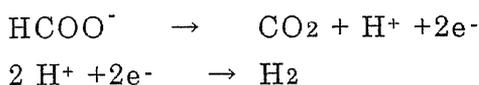
R : 気体定数 (8.314 J / K · mol)

T : 絶対温度 (K)、計算では 298K を用いた

n : 一分子当たり移動する電子の数

F : ファラデー定数 (96.48 kJ / V · mol)

ギ酸分解によって水素が発生する時、次の酸化還元反応が起こる。なお、本章では、ギ酸分解という表記をギ酸イオンの分解という意味で表している。



すなわち、ギ酸分解で生じた電子がプロトン還元して水素を生成する。

電子は負電荷を持つので、水素生成反応の酸化還元電位がギ酸分解反応の酸化還元電位より高いときに、ギ酸分解による電子がプロトンに伝わる。言い換えれば、水素の酸化還元電位からギ酸の酸化還元電位を引いた値である酸化還元電位差 ΔE が正のとき水素発生が起こる。

そこで、ギ酸と水素の酸化還元電位は、それぞれ次のように表せる。

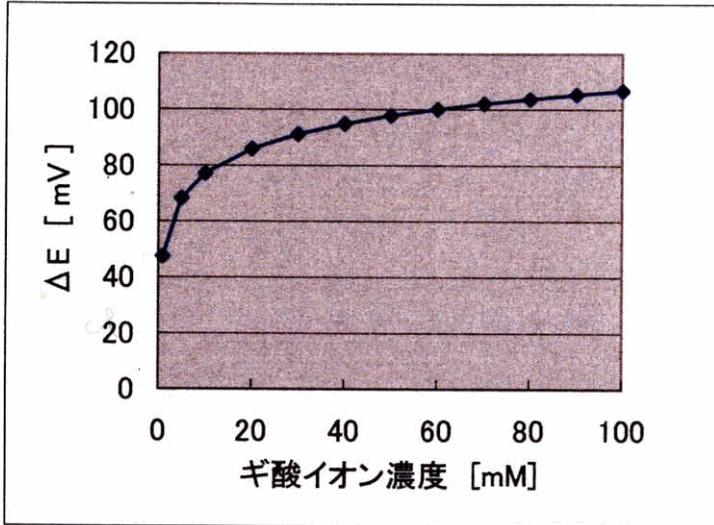
$$\text{ギ酸} : E = E_0 + (RT / 2F) \ln \{ ([\text{CO}_2]) ([\text{H}^+]) / ([\text{HCOO}^-]) \} \quad (4.2)$$

$$\text{水素} : E = E_0 + (RT / 2F) \ln \{ ([\text{H}^+])^2 / (P_{\text{H}_2}) \} \quad (4.3)$$

これらの式より、微生物によるギ酸分解の ΔE と培地のギ酸濃度の関係を調べた。ただし、ギ酸分解と水素発生が共に細胞膜の外側（培地側）で起きると仮定した。この仮定により、(4.2)のギ酸イオン濃度は、培地のギ酸イオン濃度として計算することができる。

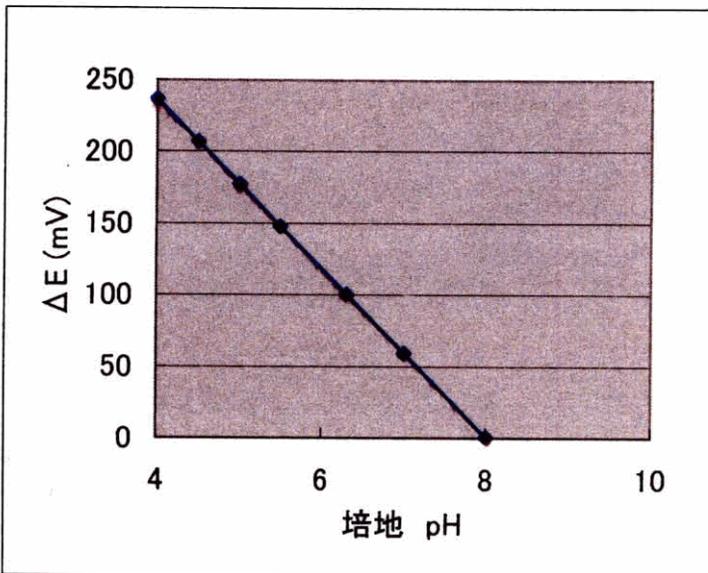
図 4-1 に、ギ酸濃度以外の条件が一定である時、培地のギ酸濃度が高いほどに ΔE は大きくなることを示す。これは、ギ酸培地でギ酸分解による水素発生が活発に起きた実験結果とよく合致している。

図 4-1 の算出条件について、水素分圧は、培養槽の気相部分（実験開始時では全て窒素）が 1atm であることから、培養開始から 1～2 時間後の水素分圧として 0.1atm とした。また、培地の二酸化炭素濃度は、0.01 (mmol / l-culture) のギ酸分解によって 0.01 (mmol / l-culture) の二酸化炭素が生じる時を想定した。0.01 (mmol / l-culture) 程度のギ酸分解は、グルコースから生成するギ酸の量からすると培養のごく初期に可能である。なお、算出条件の二酸化炭素(g) は、ギ酸分解の直後に、気体(gas)として存在する状態を指している。二酸化炭素は水への溶解度が高く、溶解して炭酸になるが、この算出では二酸化炭素(g)とした（図 4-2 においても同様）。



算出条件
 培地 pH: 6.0
 気相の水素分圧: 0.1 atm
 培地中の二酸化炭素濃度:
 $[\text{CO}_2(\text{g})] = 0.01\text{mM}$

図4-1 培地のギ酸濃度とギ酸一水素系の酸化還元電位差の関係
 ギ酸分解と水素発生が共に細胞膜の外側(培地側)で起きるといった条件下での算出結果。



算出条件
 培地 pH: 6.0
 細胞内 pH: 8.0
 気相の水素分圧: 0.1 atm
 細胞内の二酸化炭素とギ酸イ
 オンの濃度比:
 $[\text{CO}_2(\text{g})] / [\text{HCOO}^-] = 1$

図 4-2 培地pHとギ酸一水素系の酸化還元電位差の関係
 ギ酸分解が細胞内で起きる条件下での算出結果。

ΔE は、ギブズエネルギー変化 ΔG (以下 ΔG) とともに次の式によって関連づけられる。

$$\Delta G = -nF\Delta E \quad (4.4)$$

(n : 一分子あたりに授受される電子の数 F : ファラデー定数)

右辺は、電子の流れによって生じる電氣的仕事の総量であり、電荷量 (nF) と起電力 (E) の積によって表す。マイナス符合は外界に対して仕事をした場合に慣例でつけることになっている。一方、左辺の ΔG は次のように定義されている。すなわち、ある化学反応の系が平衡状態にない時に、平衡に向かって動こうとする駆動力を ΔG として表す。 ΔG は化学反応における生成物の自由エネルギー量から反応物の自由エネルギー量を引いた値として算出される。したがって、 ΔG が負の値をとる場合は、生成物の自由エネルギー量が反応物の自由エネルギー量より小さい。この場合は、生成物を形成する方向に反応が進行する。それは、系の自由エネルギーが減少する方向に化学反応が進行する傾向を持つためである。また、この式において ΔE が正の場合に ΔG は負であり、その反応が生成物の形成する方向に自発的に起こる。 ΔE は大きいほど ΔG も負の方向に大きくなり、その反応がより大きな駆動力によって自発的に進行することを表している。

ギ酸分解反応によって二酸化炭素と水素が生成する系において、標準状態 (1bar, 298K) での $\Delta_r G^0$ (標準モル生成ギブズエネルギー変化) を算出すると、下の式より -59.7 kJ/mol であった。

$$\Delta_r G^0 = \Delta_f G^0(\text{CO}_2) + \Delta_f G^0(\text{H}_2) - \Delta_f G^0(\text{HCOOH}) \quad (4.5)$$

ただし、二酸化炭素、水素、ギ酸の標準モル生成ギブズエネルギー ($\Delta_f G^0$) は、それぞれ -394.4 、 0 、 -334.7 (kJ/mol) とする。よって、標準状態では、ギ酸分解が自発的に進行することが分かる [88]。

4.2.2 細胞内におけるギ酸分解

ギ酸分解と水素発生に関わる酵素(ギ酸デヒドロゲナーゼとヒドロゲナーゼ)が細胞膜の内側に存在しており、どちらの反応も細胞膜の内側で起きるというモデル図を報告した論文がある [65][66]。しかし、微生物により水素発生は培地 pH に影響を受けるため、ギ酸分解は細胞膜の内側で起きても、水素発生は

細胞膜の外側で起こるといふ見方がより実際の現象に合致したものと考えられる。NADH の再酸化による水素発生においても、細胞膜の内側で NADH の再酸化、細胞膜の外側で水素発生が起きると電気化学的な考察により指摘されている[2]。そこで、細胞内 (pH 8.0) でギ酸分解が起きて、培地 pH で水素が発生するという視点に立つと、培地 pH と ΔE (水素の酸化還元電位からギ酸の酸化還元電位を引いた値) の関係は図 4-2 のように表せる。この図から、培地 pH が低いほど ΔE は大きく、水素は発生しやすくなることがわかる。ただし、この算出では、細胞内の二酸化炭素濃度と細胞内のギ酸濃度の比を 1 とした。

細胞内のギ酸濃度は、ギ酸分解と直接関係していることが明らかになっている。すなわち、細胞内のギ酸濃度が上昇すると、ギ酸分解酵素系が合成されて、ギ酸分解が始まる (二章 2.6)。そこで、細胞内のギ酸濃度とギ酸分解による水素発生の関係について、さらに次のように考察した。

菌の内部でギ酸分解が起こる場合には、培地のギ酸濃度ではなく、細胞内のギ酸濃度を考える必要がある。細胞内外の pH が異なることから、細胞内のギ酸濃度と培地中のギ酸濃度とは必ずしも一致しないためである。そこで、電気化学的に水素発生が起こりうる条件、すなわち ΔE が正になるということを経験条件として、その場合の細胞内ギ酸濃度を算出した。

算出条件

菌体中の二酸化炭素濃度	0.01mM
細胞内の pH	pH 8.0
気相における水素分圧	0.1atm
培地 pH	pH 5.5、pH 6.3、pH 7.0

先述の(4.2)、(4.3)式を変形すると各々次の (4.6)、(4.7) 式が得られる。

$$\text{ギ酸} : E = E_0 + 2.303 (RT / 2F) \log [H^+] + 2.303 (RT / 2F) \log \{ ([CO_2]) / ([HCOO^-]) \} \quad (4.6)$$

$$\text{水素} : E = E_0 + 2.303 (RT / 2F) \log ([H^+])^2 - 2.303 (RT / 2F) \log (P_{H_2}) \quad (4.7)$$

さらに、計算して、

$$\text{ギ酸} : E = -0.207 - 0.02956 \text{pH} + 0.02956 \log \{ ([CO_2]) / ([HCOO^-]) \} \quad (4.8)$$

$$\text{水素} : E = -0.05912 \text{pH} - 0.02956 \log (P_{H_2}) \quad (4.9)$$

ただし、ギ酸分解の酸化還元電位式における pHには、細胞内 pH8を代入する。水素発生の酸化還元電位式における pHは培地 pH (pH 5.5、pH 6.3、pH 7.0) を代入する。また、ギ酸の E_0 は、 $[\text{CO}_2]$ と $[\text{HCOO}^-]$ が等しい時における中点電位 (-0.207V) として表した。水素の E_0 は、pH0, 1atm, 298K における標準酸化還元電位 0V とした。

両式より、水素の酸化還元電位からギ酸の酸化還元電位を引いた値である ΔE が正になる条件、 $\Delta E > 0$ を解くと、次の結果となる。

$$\text{pH } 5.5 \text{ で、} [\text{HCOO}^-] > 1 \times 10^{-7} \text{ mM}$$

$$\text{pH } 6.3 \text{ で、} [\text{HCOO}^-] > 4 \times 10^{-6} \text{ mM}$$

$$\text{pH } 7.0 \text{ で、} [\text{HCOO}^-] > 1 \times 10^{-4} \text{ mM}$$

この結果より、pH 6.3 で ΔE が正になるのは、ギ酸イオン濃度が $4 \times 10^{-6} \text{ mM}$ より大きい場合である。この濃度で細胞内には何分子のギ酸イオンが存在しているか、菌を直径 $1 \mu\text{m}$ の球体であるとみなすと次のように計算される。

菌の体積は、球体の体積を求める公式 $(4/3) \pi r^3$ により、 $0.5 \times 10^{-9} \text{ (mm}^3\text{)}$ である。また、ギ酸イオン濃度が $4 \times 10^{-6} \text{ mM}$ であることは、1L ($1 \times 10^6 \text{ mm}^3$) の容積中に $4 \times 10^{-6} \text{ mmol}$ のギ酸分子があることを表す。よって、菌の体積中に $4 \times 10^{-6} \text{ mM}$ でギ酸が存在する時、ギ酸分子の数は、次のように計算できる。

$$(\text{菌の体積}) \times 4 \times 10^{-6} \text{ (mmol)} / (1 \times 10^6 \text{ mm}^3) \quad (4.10)$$

$$= 2.0 \times 10^{-21} \text{ (mmol)}$$

$$= 2.0 \times 10^{-24} \text{ (mol)}$$

このモル数を、アボガドロ数 (6×10^{23}) により分子数に直して、

$$2.0 \times 10^{-24} \text{ (mol)} \times 6 \times 10^{23}$$

$$= 1.2 \text{ (個)}$$

よって、菌の体積中に $4 \times 10^{-6} \text{ mM}$ でギ酸が存在する時は、ギ酸分子の数は約 1 個である。したがって、pH 6.3 では、ギ酸分子が 1 個より多く細胞内に存在すれば、 ΔE が正になってギ酸分解が起こりやすくなるといえる。同様に、pH 5.5 では、ギ酸分子の数にして 0.03 個より多ければ ΔE が正になる。0.03 個という数値は、pH 6.3 よりギ酸分解が起こりやすいことを示している。また、pH 7.0 ではギ酸分子が 30 個より多ければ ΔE が正になる。この結果は、pH 7.0 では、pH 6.0 ほどに活発に水素発生が発生しないという事実と合致している。

以上のように、培地 pH が低いほど、細胞内のギ酸イオン濃度がより低い状態で水素発生が起きることが示された。

4.3 代謝産物収支についての理論

4.3.1 *E. aerogenes* の代謝産物収支計算法

水素収率は、積算水素発生量をグルコースの消費量で割れば求められるが(ギ酸培地ではギ酸添加量を積算水素発生量から引いてグルコースの消費量で割る)。水素収率を求めて比較することは容易であるが、水素発生量と他の代謝産物生成量を量論として総合的に分析する必要がある。そのため、実験結果から代謝産物収支の計算を行い、その過程で、全ての代謝産物の生成経路を推定して、理論と実験結果が最もよく合致するような計算法を確立することが必要である。代謝産物収支とは、投入したグルコースに対して回収した代謝産物のバランス(収支)である。代謝産物収支の分析には、次の三つが重要である。第一に代謝産物の収率、第二に NADH 収支、第三にピルビン酸収支である。これらの理論を次に説明する。

① 代謝産物収率

酢酸などの代謝産物の生成量は、代謝産物収率とグルコース消費量と次の関係にある。

$$\text{代謝産物収率} = \frac{\text{代謝産物の生成量}}{\text{グルコース消費量}} \quad (4.11)$$

② NADH 収支

解糖系では、NAD⁺がグルコースからの水素原子によって還元されて NADH が生成する。生成した NADH は、代謝産物が生成するときに再び NAD⁺に酸化する(NADH の再酸化)。その NAD⁺は解糖系において再び NADH 生成に利用されるというように循環して利用される。この循環によって、菌体内における NADH と NAD⁺ の比、すなわち両者の酸化還元バランスは一定になるように調節される。そこで NADH 収支は、解糖系で生成する NADH が、代謝産物の生成によってどの程度 NAD⁺に再酸化するかの割合を表す。その算出方法を次に示す。

$$\text{NADH 収支} = \frac{\text{NADHの再酸化量}}{\text{解糖系でのNADH生成量}} \quad (4.12)$$

右辺で、再酸化する NADH の量とは、水素を含む代謝産物の生成によって再酸化する NADH の量である。NADH 生成量と再酸化する NADH の量が等しいとき NADH 収支は 1 である。分母の解糖系での NADH 生成量は次式に示すようにグルコース消費量の 2 倍である。

解糖系でのグルコースからのピルビン酸生成



よって上式は、次のように表せる。

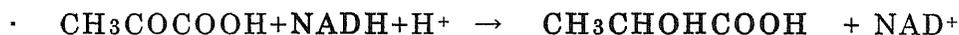
$$\text{NADH 収支} = \frac{\text{NADHを再酸化して生じる代謝産物と水素の量}}{2 \times (\text{グルコース消費量})} \quad (4.13)$$

この式から、代謝産物 1 分子が生成する際に再酸化する NADH の分子の数を係数に入れて、(4.14)式を作成した。例えば、乳酸 1 分子は、NADH 1 分子の再酸化を伴うため、乳酸生成量そのものが乳酸生成に伴う NADH の再酸化量であり、(4.14)式の分子において、乳酸生成量の係数は 1 である。

$$\text{NADH 収支} = ((\text{乳酸生成量}) + (2,3 \text{ ブタンジオール生成量}) + 2 (\text{エタノール生成量}) + 2 (\text{酪酸生成量}) + (\text{NADH からの水素発生量})) / 2 (\text{グルコース消費量}) \quad (4.14)$$

下記に、代謝産物の生成反応を示す。

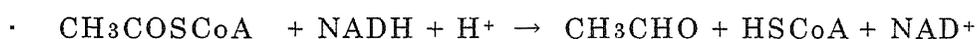
ピルビン酸からの乳酸生成と NADH の再酸化

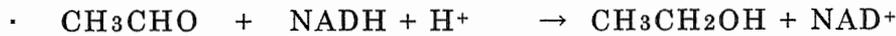


ピルビン酸からの 2,3 ブタンジオールの生成と NADH の再酸化

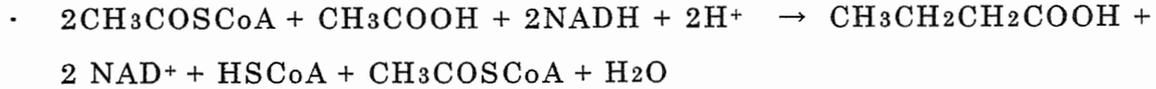


アセチル CoA からのエタノール生成と NADH の再酸化





アセチル CoA からの酪酸生成と NADH の再酸化



アセチル CoA からの酢酸生成（この酢酸生成のみ、NADH の再酸化は伴わないので、(4.14)式には直接関係しないが、後述するピルビン酸収支に関係する。）



(4.14)式を作成するにあたり、次に示すピルビン酸からアセチル CoA の生成反応が重要である。

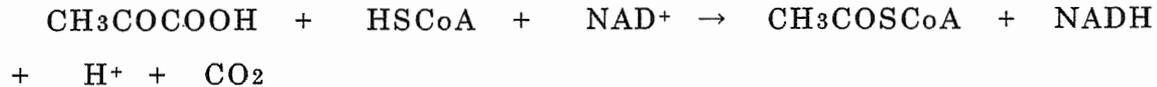
ピルビン酸からアセチル CoA の生成

1. ギ酸の生成を伴う場合



.

2. ギ酸が生成せず、NADH が生成する場合（絶対嫌気性菌で知られる反応）



上記の 1 式は、大腸菌などの通性嫌気性菌で知られる反応で、本章での *E. aerogenes* についての収支計算ではこの反応を用いた。2 式によって収支計算を行わないのは、*E. aerogenes* がグルコースからギ酸を生成することを本研究での実験により確認しているためである。

また、2 式に基づいて収支計算をするのは、グルコースからギ酸を生成しない *C. butyricum* のような絶対嫌気性菌の場合である。この場合、2 式で NADH の生成量がアセチル CoA の生成量と等しいことから、(4.14)式の分母に相当する NADH 生成量は、解糖系での NADH 生成量とアセチル CoA の生成量の合計にする必要がある。

③ ピルビン酸収支

解糖系でグルコースから生成するピルビン酸の炭素原子はグルコース由来である。このピルビン酸から発酵における代謝産物が生成するので、ピルビン酸

の生成量に対する代謝産物の生成量がピルビン酸収支である。理論的には、生成するピルビン酸が全て発酵によって代謝産物の生成に利用されることでその収支がとれている（収支は 1）ことになる。この収支を算出することで、グルコース由来の炭素原子が代謝産物の生成にどの程度利用されるかを評価できる。その算出方法を次に示す。

$$\text{ピルビン酸収支} = \frac{\text{ピルビン酸から生成する代謝産物の生成量}}{\text{解糖系でのピルビン酸生成量}} \quad (4.15)$$

右辺で、ピルビン酸から生成する代謝産物には、ギ酸の生成量を含めない。それは、1モルのピルビン酸からは、ギ酸とアセチル CoA が各々1モルで同時に生成することによる（下式）。

ピルビン酸からアセチル CoA の生成



つまり、ギ酸とアセチル CoA の生成に何モルのピルビン酸が利用されたかを算出するためには、アセチル CoA またはギ酸のいずれか一方の生成量を算出すればよい。そこで、本項では、アセチル CoA の生成量（酢酸、エタノール、酪酸の生成量の和）を算出することで求めた。また、分母の解糖系でのピルビン酸生成量はグルコース消費量の 2 倍である。よって、(4.15)式は次の(4.16)式のように表せる。

$$\text{ピルビン酸収支} = \left((\text{乳酸生成量}) + 2 (\text{2,3ブタンジオール生成量}) + (\text{酢酸生成量}) + (\text{エタノール生成量}) + 2 (\text{酪酸生成量}) \right) / 2 (\text{グルコース消費量}) \quad (4.16)$$

以上の NADH、ピルビン酸収支の算出式は、実験による代謝産物のデータを繰り返し分析することによって、作成したものである。

4.4 結論

以下に、本章の研究から明らかになった点を要約して、説明する。

1. ギ酸分解による水素発生は培地 pH が一定の時、培地のギ酸濃度が高いほど電気化学的に起こりやすくなることを示した。これは、ギ酸を添加した培地で水素が活発に発生した実験結果と符合しており、一つの説明といえる。

2. 細胞内 (pH8.0) においてギ酸分解が起きて、培地 pH で水素が発生するとき、培地 pH が低いほど ΔE (水素の酸化還元電位からギ酸の酸化還元電位を引いた値) は大きく、水素は発生しやすくなることを示した。また、 ΔE が正になるという条件を検討した結果、培地 pH が低いほど、細胞内のギ酸イオン濃度がより低い状態で水素発生が起こりやすくなることが分かった。

3. 代謝産物濃度と水素発生量、基質消費量の測定データから、これまでの研究では示されていなかった代謝産物収支計算法を作成することができた。NADH 収支計算では、NADH の再酸化による水素発生量を考慮して、基質の水素原子がどの代謝産物に、どのくらいの量で利用されたかを収支として表す式を示した。ピルビン酸収支計算では、グルコースの炭素原子が、ピルビン酸を経て、どの代謝産物に、どのくらいの量で利用されたかを収支として表す式を示した。代謝産物収支計算法は、*E. aerogenes* の水素発生経路のみならず、代謝産物の量的な関係を解析する上で重要であり、今後、鉄イオンや有機酸、アルコールなどが水素発生に及ぼす影響を評価する場合に有用な方法である。

本研究に関連した発表

1. 黒河 達生、谷生 重晴

発酵水素生産におけるギ酸添加の効果

2001年10月 水素エネルギー協会大会 口頭発表

2. 黒河 達生、谷生 重晴

Fermentative hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*.

2003年9月 マリンバイテクノロジー国際会議 ポスター発表

3. 黒河 達生、谷生 重晴

発酵水素生産におけるギ酸添加の効果

2003年12月 水素エネルギー協会大会 口頭発表

4. 黒河 達生、谷生 重晴

Effects of Formate on Fermentative Hydrogen Production by
Enterobacter aerogenes.

2004年6月 世界水素エネルギー会議 ポスター発表

5. 査読付き論文 Tatsuo Kurokawa, Shigeharu Tanisho

Effects of Formate on Fermentative Hydrogen Production by

Enterobacter aerogenes. *Marine Biotechnology*, 2005, 112-118

参考文献

1. Yoshida, K. 水素経済は日本の救世主となり得るか
エネルギー・資源 2003, 24(6), 1-4
2. Tanisho, S., Kamiya, N., Wakao, N. Hydrogen evolution of
Enterobacter aerogenes depending on culture pH: mechanism of hydrogen
evolution from NADH by means of membrane-bound hydrogenase. *Biochim.
Biophys. Acta.* 1989, 973(1), 1-6
3. Converti, A. and Perego, P. Use of carbon and energy balances in the
study of the anaerobic metabolism of *Enterobacter aerogenes* at variable
starting glucose concentrations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002, 59,
303-309
4. Yokoi, H. et al. Microbial hydrogen production from sweet potato
starch residue. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 2001, 91(1),
58-63
5. Yokoi, H. et al. Microbial production of hydrogen from starch
manufacturing wastes. *Biomass and Bioenergy* 2002, 22, 389-395
6. Wakayama, T. et al. 光合成細菌による光水素発生に用いるフォトバイオ
リアクターの光透過性改善による高効率化 水素エネルギーシステム 2001
26(1), 6-10
7. Wakayama, T. et al. フォトバイオリアクターによる光水素発生 2002
金属 72(5) 413-418
6. 日本エネルギー学会編 バイオマスハンドブック 2002
オーム社
9. Schuiz et al. バイオガス実用技術 2003 オーム社

10. Oh, S, E. et al. The relative effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production. Environ. Sci. Technol. 2003, 37, 5186-5190
11. Katsura, K et al. 好熱微生物を利用した余剰汚泥が発生しない活性汚泥プロセス 水環境学会誌 1998, 21, 6, 360-366
12. 化学工学会編 物理および化学的水処理技術と装置 (上) 1990 培風館
13. 環境技術, バイオマスに関する特集より 2005, 34(3)
14. 谷生 重晴 生物学的手法を用いた水素関連新技術の可能性調査報告書 第二章 2.4 2000 水素エネルギー協会
15. Paden, E et al. pH homeostasis in bacteria. Biochimica et Biophysica Acta. 1981, 650, 151-166
16. Russeell, B, J and Diez-Gonzalez, F. The effects of fermentation acids on bacterial growth. Advances in microbial physiology 1998, 39, 205-234
17. O'burne, C, p. et al. Survival of low-pH stress by *Escherichia coli* O157:H7: Correlation between alterations in the cell envelope and increased acid tolerance. Applied and Environmental Microbiology 1999, 65 (7), 3048-3055
18. Kasper, C, W. et al. Contribution of dps to acid stress tolerance and oxidative stress tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. Applied and Environmental Microbiology 2000, 66 (9), 3911-3916
19. Wolf, S, G. et al DNA protection by stress-induced biocrystallization. Nature 1999, 400, 83-86

20. Mnatsakanyan Nelli et al. Hydrogenase 3 but Hydrogenase 4 is major in hydrogen gas production by *Escherichia coli* formate hydrogenlyase at acidic pH and in the presence of external formate. *Cell Biochemistry and Biophysics* 2004 41 357-365
21. Magalon, A. et al. Dissection of the maturation reactions of the [NiFe] hydrogenase 3 from *Escherichia coli* taking place after nickel incorporation. *Febs Letters* 2000, 473, 254-258
22. Rossmann, R., Sawers, G., Bock, A. Mechanism of regulation of formate-hydrogenylase pathway by oxygen, nitrate, and pH: definition of the formate regulon. *Molecular Microbiology* 1991, 5(11), 2807-2814
23. Leonhartsberger, S. et al. Analysis of the domain structure and the DNA binding site of the transcriptional activator FhlA. *Eur. J. Biochem.* 2000, 267, 3672-3684
24. Boyington, J, C. et al. Crystal structure of formate dehydrogenase H: Catalysis involving Mo, Molybdopterin, Selenocysteine, and an Fe₄S₄ cluster. *Science* 1997, 275, 1305-1308
25. Tanisho, S. A Scheme for developing the yield of hydrogen by fermentation, *Biohydrogen II* 2001: 131-140
26. Konishi, K. et al. Inhibitory effects of tannins on NADH dehydrogenase of various organisms.
27. Falk-Krzesinski, H, J and Wolfe, A, J. Genetic analysis of the nuo locus, which encodes the proton-translocating NADH dehydrogenase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1998, 180(5), 1174-1184
28. Calhoun, M, W. et al. Demonstration of separate genetic loci encoding distinct membrane-bound respiratory NADH dehydrogenase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1993, 175(10), 3013-3019

29. Calhoun, M, W. et al. Energetic efficiency of *Escherichia coli*: Effects of mutations in components of the aerobic respiratory chain. J. Bacteriol. 1993, 175(10), 3020-3025
30. Wolfe, A, J. et al. Mutations in NADH: Ubiquinone oxidoreductase of *Escherichia coli* affect growth on mixed amino acids. J. Bacteriol. 1994, 176(8), 2143-2150
31. Zambrano, M, M. et al. *Escherichia coli* mutants lacking NADH dehydrogenase 1 have a competitive disadvantage in stationary phase. J. Bacteriol. 1993, 175(17), 5642-5647
32. Tran, Q, H. et al. Requirement for the proton-pumping NADH dehydrogenase 1 of *Escherichia coli* in respiration of NADH to fumarate and its bioenergetic implications. Eur. J. Biochem. 1997, 244, 155-160
33. Wang, H. et al. Coordinate regulation of the *Escherichia coli* formate dehydrogenase *fdnGHI* and *fdhF* genes in response to nitrate, nitrite, and formate: Roles for NarL and NarP. J. Bacteriol. 2003, 185(17), 5076-5085
34. Richard, D, J. Transcriptional regulation in response to oxygen and nitrate of the operons encoding the [NiFe] Hydrogenase 1 and 2 of *Escherichia coli*. 1999, 145, 2903-2912
35. Prohl, C. et al. Functional citric acid cycle in an *arcA* mutant of *Escherichia coli* during growth with nitrate under anoxic conditions. Arch. Microbiol. 1998, 170, 1-7
36. Lee, Y, J, Miyahara, T, Noike, T. Effect of iron concentration on hydrogen fermentation. Bioresource Technology 2001,80,227-231
37. Zhang, Y, Liu, G, Shen, J. Hydrogen production in batch culture of mixed bacteria with sucrose under different iron concentrations. International Journal of Hydrogen Energy. www.elsevier.com/locate/ijhydene

38. Tachezy, J. et al Iron-induced changes in pyruvate metabolism of *Tritrichomonas foetus* and involvement of iron in expression of hydrogenosomal proteins. *Microbiology*, 2001, 147, 53-62
39. Peguin, S, Soucaille, P. Modulation of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* by iron limitation and methyl viologen addition. *Applied and Environmental Microbiology* 1995 61(1), 403-405
40. Lin, C. Y, Lay, C. H. A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*. www.elsevier.com/locate/ijhydene
41. Raymond, K, N. et al Enterobactin: An archetype for microbial iron transport. *PNAS* 2003, 100(7) 3584-3588
42. Meganathan, R. et al Anaerobic biosynthesis of enterobactin in *Escherichia coli*: Regulation of *entC* Gene expression and evidence against its involvement in menaquinone (Vitamin K2) biosynthesis. *J. Bacteriol.* 1996, 178(11), 3252-3259
43. Rachman, M.A., Furutani, Y., Nakashimada, Y., Kakizono, T., and Nishio, N. Enhanced hydrogen production in altered mixed acid fermentation of glucose by *Enterobacter aerogenes*. *J. Ferment. Bioeng.* 1997;(4): 358-63
44. Rachman, M.A., Furutani, Y., Nakashimada, Y., Kakizono, T., Nishio, N. Hydrogen production with high yield and high evolution rate by self-flocculated cells of *Enterobacter aerogenes* in a packed-bed reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1998, 49(4), 450-4
45. Nakashimada, Y., Rachman, M.A., Kakizono, T., Nishio, N. Hydrogen production of *Enterobacter aerogenes* altered by extracellular and intracellular redox states. *Int J. Hydrogen. Energy.*, 2002; 27:1399-1405

46. Penfold, D, W, Forster C. Macaskie, L. Increased hydrogen production by *Escherichia coli* strain HD701 in comparison with the wild-type parent strain MC4100. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 33, 185-189
47. Nandi, R, Dey, S, Sengupta, S. Thiosulphate improves yield of hydrogen production from glucose by the immobilized formate hydrogenylase system of *Escherichia coli*. *Biotechnology and bioengineering*, 2001, 75(4), 492-494
48. Tanisho, S. and Ishiwata, Y. Continuous hydrogen production from molasses by the bacterium *Enterobacter aerogenes*. *Int J. Hydrogen. Energy*. 1994; 19(10): 807-812
49. Nandi, R., and Sengupta, S. Involvement of anaerobic reductases in the spontaneous lysis of formate by immobilized cells of *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology* 1996; 19: 20-25
50. Kumer, N et al. Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. *Process Biochemistry* 2000, 35, 589-593
51. Kumer, N et al. Modeling and simulation of clean fuel production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2000, 25, 945-952
52. Kumer, N et al. Continuous hydrogen production by immobilized *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 using lignocellulotic materials as solid matrices. *Enzyme and Microbiol Technol*. 2001, 29, 280-287
53. Vasilyeva, L. et al. Enhanced hydrogen production by a mutant of *Rhodobacter sphaeroides* having an altered light-harvesting system. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 1999, 87(5), 619-624
54. Chen, W, M. et al. Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. *International*

Journal of Hydrogen Energy.

55. Fabiano, B. et al. Thermodynamic study and optimization of hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*. International Journal of Hydrogen Energy. 2002, 27, 149-156

56. Oh, Y, K. et al. Photoproduction of hydrogen from acetate by a chemoheterotrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum* P4.

57. Oh, Y, K. et al. Fermentative hydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum* P4.

58. Wang, C, C. et al. Producing hydrogen from wastewater sludge by *Clostridium bifermentans*. Journal of Biotechnology. 2003, 102, 83-92

59. Noike, T. et al. Inhibition of hydrogen fermentation of organic waste by lactic acid bacteria. International Journal of Hydrogen Energy. 2002, 27, 1367-1371

60. Ueno, Y et al. Hydrogen production from industrial wastewater by anaerobic microflora in chemostat culture.

61. Ueno, Y et al. Characterization of a microorganism isolated from the effluent of hydrogen fermentation by microflora.

62. Ueno, Y et al. Microbial community in anaerobic hydrogen-producing microflora enriched from sludge compost. Applied Microbiol Biotechnol 2001, 57, 555-562

63. Kirkpatrick, C., Maurer, M. L., Oyelakin, E. N., Yoncheva, N. Y., Maurer, R., and Slonczewski, L. J. Acetate and formate stress: Opposite responses in the proteome of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 2001; 183(21): 6466-6477

64. Colin, T., Bories, A., Lavigne, C., and Moulin, G. Effects of acetate and

butyrate during glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*. *Curr. Microbiol.* 2001; 43: 238-243

65. Hakobyan, M. et al. Proton translocation coupled to formate oxidation in anaerobically grown fermenting *Escherichia coli*. *Biophysical Chemistry* 2005, 115, 55-61

66. Sawers, R, G. Formate and its role in hydrogen production in *Escherichia coli*. *Biochemical Society Transactions.*, 2005, 33, part1

67. Voolapalli, R, K. et al. Hydrogen production in anaerobic reactors during shock loads—Influence of formate production and H₂ kinetics

68. Maupin, J, A. Genetic regulation of the formate hydrogenlyase of *Escherichia coli* : Role of the *fhlA* gene product as a transcriptional activator for a new regulatory gene , *fhlB*. *J. Bacteriol.* 1990, 172(9), 4798-4806

69. Gladyshev, V, N. et al. Characterization of crystalline formate dehydrogenase H from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 1996, 271(40), 8095-8100

70. Axley, M, J. et al. *Escherichia coli* formate hydrogenlyase. *The Journal of Biological Chemistry* 1990, 265(30), 18213-18218

71. Goodwin, S., and Zeikus, G. J. Physiological adaptations of anaerobic bacteria to low pH: metabolic control of proton motive force in *Sarcina ventriculi*. *J. Bacteriol.* 1987; 169(5): 2150-2157

72. Roe, J.A., Mclaggan, D., Davidson, I., O'byrne, C., and Booth, R.I. Perturbation of anion balance during inhibition of growth of *Escherichia coli* by weak acids. *J. Bacteriol.* 1998; 180(4): 767-772

微生物の代謝に関する論文（主に酸素、酸化還元電位による影響）

73. Becker, S. et al. Extracellular oxidoreduction potential modifies carbon and electron flow in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 2000; 182(3): 620-626
74. Becker, S. et al. Regulatory O₂ tensions for the synthesis of fermentation products in *Escherichia coli* and relation to aerobic respiration. Arch Microbiol 1997, 168, 290-296
75. Becker, S. et al. O₂ as the regulatory signal for FNR-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 1996; 178(15): 4515-4521
76. Tsygankov, A, A. et al. Effect of O₂, H₂ and redox potential on the activity and synthesis of hydrogenase2 in *Escherichia coli*. Res. Microbiol. 2001, 152, 793-798
77. Enfors, S, O. et al. Physiological responses to mixing in large scale bioreactors. Journal of Biotechnology 2001, 85, 175-185
78. Amans, S, S. et al Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium butyricu* VPI 3266 grown on glucose-glycerol mixtures. J. Bacteriol. 2001; 183(5): 1748-1754

NADH, 好気呼吸、硝酸呼吸に関する論文

79. Unden, G and Bongaerts, J. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli* : energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. Biochim. Biophys. Acta. 1997, 1320, 217-234
80. Wimpenny, J, W, T. et al. The regulation of metabolism in facultative bacteria. Biochim. Biophys. Acta. 1967, 148, 233-242
81. Flecha, B, G. et al. Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing *Escherichia coli*. The Journal of Biological Chemistry 1995, 270(23), 13681-13687
82. Graef, M, R. et al. The steady -state internal redox state (NADH / NAD)

reflects the external redox state and is correlated with catabolic adaptation in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 1999, 181(8), 2351-2357

83. Snoep, J, L. et al. Effect of the energy source on the NADH / NAD ratio and on pyruvate catabolism in anaerobic chemostat cultures of *Enterococcus faecalis* NCTC 775. FEMS Microbiology Letters. 1991, 81, 63-66

生化学、生物化学工学、バイオマスに関する文献

84. 山根 恒夫 (2002) 生物反応工学, 産業図書

85. 合葉 修一, 永井 史郎 (1975) 生物化学工学, 化学技術社

86. 山中 健生 (1999) 微生物のエネルギー代謝, 学会出版センター

87. Lehninger, A, L (1993) レーニンジャー・ネルソン・コックス新生物化学 第2版, 廣川書店

88. Chang, R (2003) 化学・生命科学系のための物理化学, 東京化学同人

89. 島原 健三 (2001) 化学計算、三共出版

90. 日本化学会編 (2003) 化学便覧基礎編 改訂5版 丸善

91. 谷生 重晴 (1989) *Enterobacter aerogenes* の発酵水素発生と利用基質について 発酵工学会誌 67(1) 29-34

謝辞

本研究を行うにあたり御指導いただきました谷生重晴教授に心より感謝いたします。研究上で必要な見識について、レポートの添削やゼミでの質疑応答の中で自然に身につけることできたのは、谷生教授による熱心な御指導によるものです。また、培養槽や高速液体クロマトグラフィーなどの実験装置や実験環境に不備が生じた時に、常に適切な対応をとっていただき大きな支えとなりました。

水素エネルギー協会大会においては、谷生教授より産業総合研究所の若山樹博士を紹介していただきました。この御縁により筑波の産業総合研究所にて若山博士の元で学外研修を受けることができ貴重な経験となりました。若山博士には、マリンバイオテクノロジー国際会議にも推薦していただき、この後に英文論文の投稿につながりました。谷生教授と若山博士の暖かい御支援に感謝いたします。

自由闊達な雰囲気の中で共に研究に励んだ研究室の仲間々に心より感謝します。5年間大学院に在籍して、研究室の学生とお互いの研究について有意義な話をしたことが、大きな励みになりました。また、私自身が様々な困難にあるときに協力、尽力してくれた研究室と少林寺拳法部の先輩、後輩には、人生で何が大切であるのかということをお教えられました。大学院での経験を糧にして、今後も日々努力していく所存です。