

博士論文

好熱性嫌気性細菌 *Moorella* sp. を用いたガス基質からの  
エタノール及び酢酸生産に関する研究

(Studies on production of ethanol and acetate from gaseous substrate  
by a thermophilic anaerobic bacterium, *Moorella* sp.)

酒井 伸介

広島大学大学院先端物質科学研究科

2005 年 3 月

## 目次

### 1. 主論文

好熱性嫌気性細菌 *Moorella* sp.を用いたガス基質からのエタノール及び酢酸生産に関する研究

(Studies on production of ethanol and acetate from gaseous substrate by a thermophilic anaerobic bacterium, *Moorella* sp.)

酒井 伸介

### 2. 公表論文

(1) Acetate and ethanol production from H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> by *Moorella* sp. using a repeated batch culture.

Shinsuke Sakai, Yutaka Nakashimada, Kentaro Inokuma, Masayuki Kita, Hideki Okada, and Naomichi Nishio.

Journal of Bioscience and Bioengineering, 99 (2005) 252-258.

(2) Ethanol production from H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> by a newly isolated thermophilic bacterium, *Moorella* sp. HUC22-1.

Shinsuke Sakai, Yutaka Nakashimada, Hideyuki Yoshimoto, Shigeyuki Watanabe, Hideki Okada, and Naomichi Nishio.

Biotechnology Letters, 26 (2004) 1607-1612.

# 主論文

## 主論文目次

主論文目次	1
序論	5
I. バイオマスのガス化利用	5
II. ガス基質の微生物変換	6
III. 酢酸生産菌におけるエタノール代謝	8
IV. エタノール及び酢酸の製造と用途の現状	9
V. 好熱性酢酸生産菌を用いたガス基質からのエタノール及び酢酸生産系	11
VI. 本研究の目的	11
第1部 HUC22-1株の同定、エタノール生産経路の解析	13
第1章 HUC22-1株の同定及び基本的性状の検討	13
第1節 緒言	13
第2節 方法	15
1.2.1. 基本培地、基質溶液の作製	15
1.2.2. バイアルビンを用いた回分培養	16
1.2.3. Roll-tube法による菌株単離	17
1.2.4. 位相差顕微鏡による形態観察	17
1.2.5. グラム染色試験	17
1.2.6. 菌体量の測定	18
1.2.7. 培養液のpH測定	19
1.2.8. 基質糖類・生産物濃度の測定	19
1.2.9. 基質資化性試験	20
1.2.10. 硝酸利用性試験	20
1.2.11. チオ硫酸利用性試験	20
1.2.12. アピケンキAPI 20Aキットによる解析	20
1.2.13. 16S rRNA遺伝子配列の決定と系統解析	21
1.2.14. 真空凍結乾燥による菌株の保存	22
第3節 結果及び考察	23
1.3.1. 単離株の比較	23
1.3.2. HUC22-1株の形態	23
1.3.3. HUC22-1株の同定	26
第4節 要約	32
<16S rRNA 遺伝子配列登録内容>	32

第2章 HUC22-1株の増殖及び生産物特性の解析 .....	34
第1節 緒言 .....	34
第2節 方法 .....	34
2.2.1. Yeast extract 無添加培養 .....	34
2.2.2. 回分培養における各項目の経時変化の測定 .....	34
2.2.3. 比増殖速度の算出 .....	35
2.2.4. 消費 H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> 量の測定 .....	35
2.2.5. 生育温度と生育 pH の検討 .....	37
第3節 結果及び考察 .....	38
2.3.1. Yeast extract 無添加条件におけるエタノール生産 .....	38
2.3.2. 生育温度及び生育 pH 範囲 .....	38
2.3.3. H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> 回分培養における経時変化 .....	40
2.3.4. フルクトース回分培養における経時変化 .....	41
第4節 要約 .....	41
第3章 HUC22-1株におけるエタノール生産経路の解析 .....	44
第1節 緒言 .....	44
第2節 方法 .....	45
3.2.1. 粗酵素液の作製 .....	45
3.2.2. ADH、ACDH 酵素活性測定 .....	46
3.2.3. タンパク質濃度の測定 .....	46
3.2.4. 酵素活性の算出 .....	48
3.2.5. 細胞内 Pyridine nucleotide の抽出 .....	49
3.2.6. 細胞内 Pyridine nucleotide の測定 .....	49
3.2.7. AOR 酵素活性測定 .....	51
第3節 結果及び考察 .....	52
3.3.1. H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> 培養、フルクトース培養における ADH、ACDH 活性の比較 .....	52
3.3.2. H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> 培養、フルクトース培養における Pyridine nucleotide の細胞内プール量の比較 .....	53
3.3.3. H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> 培養、フルクトース培養における AOR 酵素活性の比較 .....	54
3.3.4. ADH、ACDH、AOR の遺伝子情報 .....	55
第4節 要約 .....	56
第2部 酢酸阻害の解析、培養条件の改良によるエタノール及び酢酸の高生産化 .....	58
第4章 HUC22-1株の酢酸及びエタノール阻害の解析 .....	58
第1節 緒言 .....	58
第2節 方法 .....	59

4.2.1.	酢酸耐性試験.....	59
4.2.2.	酢酸による増殖阻害のモデル解析.....	59
4.2.3.	エタノール耐性試験.....	59
4.2.4.	エタノール添加条件下での Pyridine nucleotide の細胞内プール量の測定.....	59
第3節	結果及び考察.....	60
4.3.1.	培養 pH が増殖に及ぼす影響.....	60
4.3.2.	培養 pH と非解離型酢酸が増殖に及ぼす影響.....	63
4.3.3.	添加したエタノールが増殖に及ぼす影響.....	67
4.3.4.	エタノール添加による Pyridine nucleotide の細胞内プールへの影響.....	67
第4節	要約.....	68
	<使用記号一覧>.....	68
第5章	培養条件の検討による酢酸及びエタノールの高生産化.....	71
第1節	緒言.....	71
第2節	方法.....	71
5.2.1.	リアクターを用いた H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> 培養.....	71
5.2.2.	リアクター培養における H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> 消費量の測定.....	73
5.2.3.	リアクターを用いたフルクトース培養.....	74
5.2.4.	リアクターを用いた反復回分培養 (H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> 培養).....	75
5.2.5.	含浸液膜を用いた培養.....	76
第3節	結果及び考察.....	78
5.3.1.	pH 無制御下における H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> 回分培養.....	78
5.3.2.	H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> 培養における pH 制御の効果.....	79
5.3.3.	フルクトース培養における pH 制御の効果.....	79
5.3.4.	リアクターを用いた H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> 培養における比酢酸生産速度について.....	82
5.3.5.	反復回分培養による酢酸生産.....	84
5.3.6.	反復回分培養によるエタノール生産.....	84
5.3.7.	含浸液膜の検討.....	86
5.3.8.	ガス基質からの酢酸生産についての他の酢酸生産菌との比較.....	88
5.3.9.	ガス基質からのエタノール生産についての他の酢酸生産菌との比較.....	88
第4節	要約.....	89
第3部	HUC22-1 株におけるエネルギー代謝の解析、エタノール高生産株の作製.....	92
第6章	HUC22-1 株におけるエネルギー代謝の解析.....	92
第1節	緒言.....	92
第2節	方法.....	94
6.2.1.	各基質における回分培養.....	94

6.2.2. 各基質の測定.....	94
6.2.3. $Y_{ATP/P}$ の算出.....	94
第3節 結果及び考察.....	95
6.3.1. $H_2-CO_2$ 培養における $Y_{ATP/P}$ について.....	95
6.3.2. 各基質における $Y_{ATP/P}$ の比較.....	98
6.3.3. シュウ酸、グリオキシル酸、グリコール酸培養における $Y_{X/S}$ についての他の嫌気性細菌との比較.....	98
6.3.4. HUC22-1株におけるシュウ酸、グリオキシル酸、グリコール酸の代謝経路の推定.....	103
6.3.5. HUC22-1株において推定されるグリオキシル酸代謝経路の $Y_{ATP/P}$ について.....	105
第4節 要約.....	106
<使用記号一覧>.....	108
第7章 エタノール高生産株の作製.....	109
第1節 緒言.....	109
第2節 方法.....	110
7.2.1. NTG処理及び変異株の単離.....	110
7.2.2. Nitro blue tetrazolium (NBT)法.....	111
7.2.3. 硝酸セリウム・アンモニウム法.....	111
7.2.4. Aldehyde indicator plate.....	112
7.2.5. フルオロ酢酸耐性.....	112
第3節 結果及び考察.....	114
7.3.1. NTG変異条件の検討.....	114
7.3.2. エタノール高生産株のスクリーニング法の検討.....	116
7.3.3. 酢酸低生産株のスクリーニング法の検討.....	116
7.3.4. BCP陰性株の単離及び評価.....	118
7.3.5. フルオロ酢酸耐性株の単離及び評価.....	118
7.3.6. エタノール耐性株の単離及び評価（フルクトース基質）.....	120
第4節 要約.....	121
総括.....	122
参考文献.....	125
謝辞.....	140

## 序論

### I. バイオマスのガス化利用

現在の化学工業は、その原料とエネルギー源の大部分を化石資源（石油、天然ガス、石炭）に依存しており、そこから大気中へ排出される二酸化炭素（CO<sub>2</sub>）が地球温暖化の原因となっている。このため、化石資源の消費を節減し、大気中の CO<sub>2</sub> 濃度の増大を抑制することが環境保全、地球温暖化防止のために求められている。化石資源に代わる再生可能な燃料や化学製品の原料としてバイオマスの利用が注目されている<sup>1)</sup>。例えば、農作物廃棄物やおがくず、廃紙、木屑などのリグノセルロース系バイオマスを糖化し、水素（H<sub>2</sub>）や乳酸、エタノールなどの有用物質への変換が試みられている。また、畜産糞尿や下水汚泥、食品残渣などの有機系廃棄物を嫌気発酵させ、H<sub>2</sub>やメタン（CH<sub>4</sub>）を回収・利用する試みも行われ、一部は実用化の動きがある<sup>2)</sup>。

リグノセルロース系バイオマスを有用物質に変換する現在のプロセスは大きく分けて2つのプロセスから成り立っている。最初のプロセスは、酸加水分解や酵素的加水分解を用いて、セルロースやヘミセルロースを微生物が利用可能な糖に変換するプロセスである。得られた糖は、次のプロセスで微生物によって発酵され、H<sub>2</sub>や乳酸、エタノールなど燃料や化学製品の原料として利用可能な有用物質に変換される。しかし、このプロセスには、酸加水分解によって副産物の生産が起ることや加水分解酵素の高いコスト、酵素的加水分解では反応が長時間に及ぶなどいくつかの問題がある。特に、バイオマス中のリグニンは酸や酵素によって加水分解しにくいことからリグニンを除去する工程が必要となってくる。リグニンは、例えば、ペイマツには20% (w/w)含まれており、これら木材廃棄物を利用する上での障害となっている。

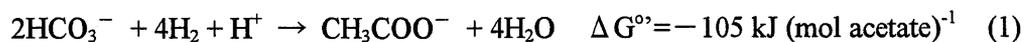
一方、もう一つのプロセスとして、リグノセルロース系バイオマスを水蒸気改質などによって合成ガス [一酸化炭素 (CO)、CO<sub>2</sub>、H<sub>2</sub>] に変換するガス化プロセスが挙げられる。このプロセスはリグニンを含む全てのバイオマス成分に利用することが可能であると考えられる<sup>3)~5)</sup>。ガス化のため高い含水率のバイオマスには乾燥工程が必要となる。しかし、乾燥後のバイオマスや元々低い含水率のバイオマスを用いた場合には効率的な利用が可能である。このようにして得られた合成ガスは、発電用や内燃機関用の燃料を中心に利用が検討されている。そこで、さらに、回収した合成ガスを工業原料やより付加価値の高い物質に変換できれば、新たな資源循環サイクルの構築につながることを期待される。回収されたバイオガスは、物理化学的方法や生物学的的方法によって有用物質への変換が試みられている。一般的に物理化学的方法の方が生物学的的方法よりも反応速度が早いというメリットがある。一方、生物学的的方法には、高い特異性、高い収率、低いエネルギー効率、不純物への耐性が高いなどのメリットがある<sup>6)</sup>。そこで、我々は、生物学的的方法として微生物を用い

たガス基質から有用物質への変換に着目した。

## II. ガス基質の微生物変換

微生物の中には糖だけでなく、 $H_2$  や  $CO_2$ 、メタン ( $CH_4$ ) などのガス基質を利用できるものが知られている。例えば、 $CH_4$  を利用するメタン資化性菌は、好気発酵によってメタンをメタノールに変換することができる。また、メタン資化性菌には、菌体外多糖や生分解性プラスチック原料を生産するものも知られており<sup>7)</sup>、 $CH_4$  を原料とした有用物質生産への応用が期待される<sup>2)</sup>。 $H_2$  もまた、微生物のエネルギー源として利用でき、メタン生産菌には、 $H_2$ - $CO_2$  から  $CH_4$  を生産する菌の存在が知られている<sup>8)-10)</sup>。

一方、Acetogen と呼ばれる嫌気性酢酸生産菌（以降、酢酸生産菌）の一群は、 $H_2$  をエネルギー源（電子供与体）として  $CO_2$  を固定して生育できる。この反応は次式 1 の化学量論式で表され、標準状態における反応の自由エネルギー  $\Delta G^\circ$  が負の値をとるため反応は右側に進むことができる。



このような微生物は 1936 年に初めて報告され、*Clostridium aceticum* と命名された<sup>11)</sup>。しかし、一度研究途中で失われ、1981 年に再発見された<sup>12)</sup>。また、1977 年には第 2 の菌が発見され、胞子を形成しない偏性嫌気性、グラム陽性桿菌で、*Acetobacterium woodii* と命名された<sup>13)</sup>。現在では、酢酸生産菌は、*Acetobacterium* 属や *Clostridium* 属の菌を中心に多岐に渡って知られている<sup>14)</sup>。

$H_2$ - $CO_2$  の代謝経路は Harland G. Wood と Lars G. Ljungdahl によって詳細に研究され、アセチル-CoA 経路 (Wood-Ljungdahl pathway, 図 1, p.7) と呼ばれている<sup>15)-17)</sup>。本経路の特徴は、2 分子の  $CO_2$  から 1 分子のアセチル-CoA を組み立てる点である。図 1 (p.7) 左側の反応系 (Methyl branch) においては、 $CO_2$  のメチル基への還元が触媒されており、図 1 (p.7) 右側の反応系 (Carbonyl branch) においては、 $CO_2$  の活性型 CO への還元が触媒されている。最後に、メチル基、活性型 CO と CoA が結合してアセチル-CoA が生成される。アセチル-CoA から最終的に酢酸を生産し、基質レベルのリン酸化によって ATP を生産することができる。アセチル-CoA 経路には、生化学的に興味深い酵素反応が存在する。図 1 (p.7) の Carbonyl branch で、 $CO_2$  を活性型 CO に還元する反応 (CO デヒドロゲナーゼ反応) と左側のメチル基と CoA を結合する反応 (アセチル-CoA シンターゼ反応) とは、同じ酵素により触媒されている。アセチル-CoA 経路をもつ酢酸生産菌の中には、 $H_2$ - $CO_2$  の他に、ガス基質として CO を利用できるものも知られている。CO からの酢酸生産は次式 2 の化学量論式で表せる。

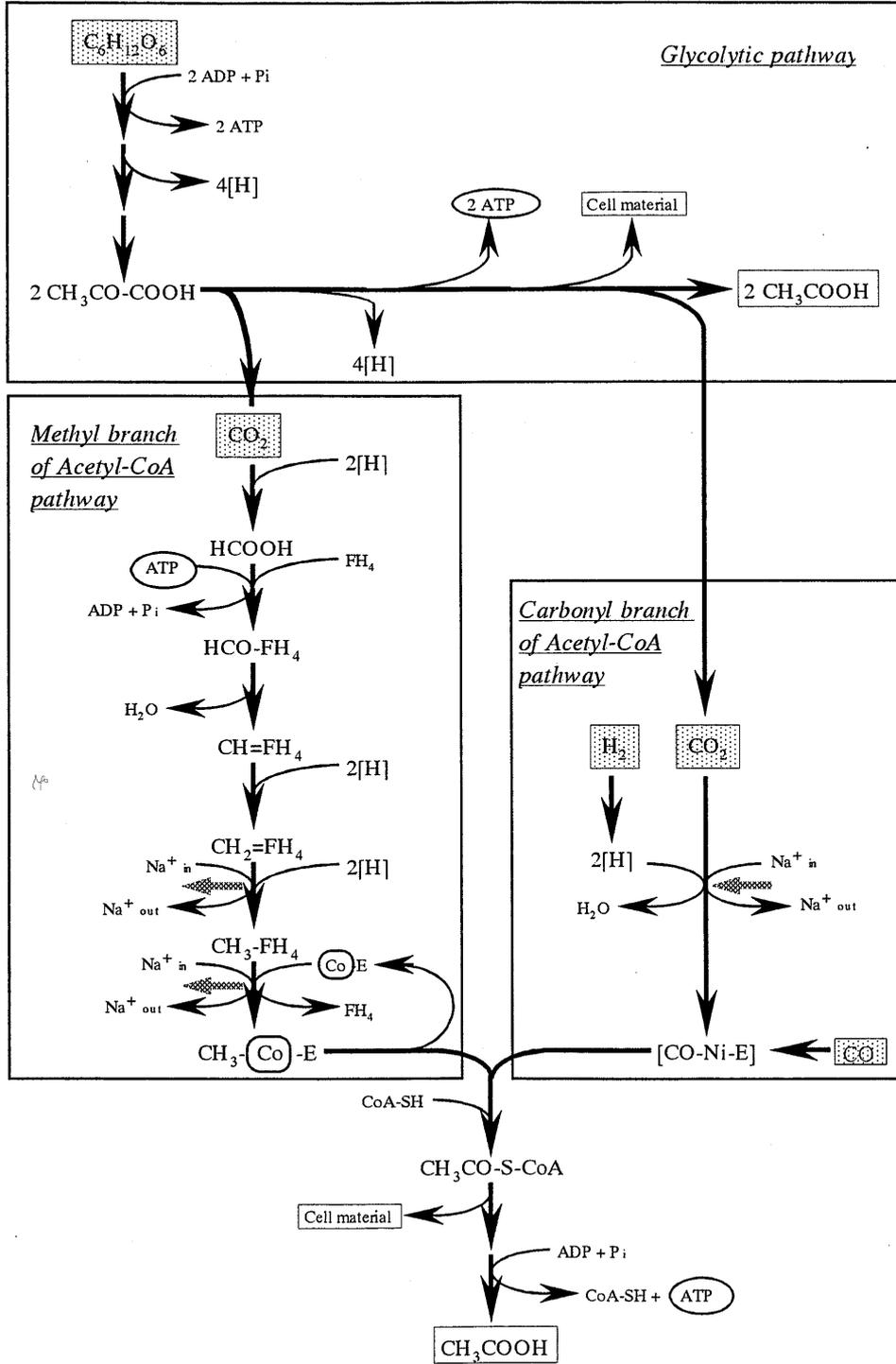
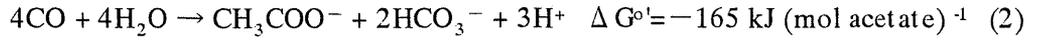
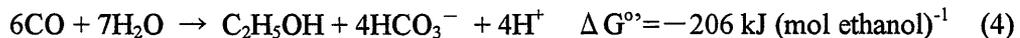


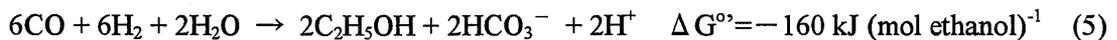
図1 嫌気性酢酸生産菌における代謝経路図

### III. 酢酸生産菌におけるエタノール代謝

前述のように酢酸生産菌は、通常、最終産物として酢酸のみを生産し、「ホモ酢酸菌」とも呼ばれる。しかし、ある種の中温性酢酸生産菌 *C. ljungdahlii* strain PETC<sup>18), 19)</sup> や *C. autoethanogenum*<sup>20)</sup>、Unidentified bacterium P7<sup>21)</sup> においては、合成ガスからエタノールを生産することが報告されている。*C. ljungdahlii* においては、さらに、最適培養条件下 (pH、培地組成) で、基質ガスの液層 (培地) への移動を高めたバイオリクターを用いて培養することによってエタノール生産量を効果的に増加できたことが報告されている<sup>6)</sup>。また、同じ中温性酢酸生産菌である *Acetobacterium woodii* や *A. wieringa*、*A. carbinolicum* においては、グルコースを基質とし、培地中のリン酸濃度を制限して培養を行った時に、エタノール生産の見られたことが報告されている<sup>22)</sup>。これらの報告からアセチル-CoA 経路を持つ酢酸生産菌の中で、ある種の中温性細菌はエタノール生産経路を有し、ある条件において機能していることが示唆される。H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 及び CO からのエタノール生産は、それぞれ次式 3、4 の化学量論式で表され、標準状態の自由エネルギー ΔG<sup>o</sup> は負の値を示すことから可能な反応であることが分かる。



さらに、CO と H<sub>2</sub> を用いた場合、つまり、式 3 と式 4 を組み合わせた場合には、式 5 のようにエタノール収率が単独の場合の 2 倍に増加することが示唆される。



一方で、好熱性酢酸生産菌におけるエタノール代謝については、我々が調べた範囲では、ほとんど報告されていない。その中で、*Moorella thermoacetica* (以前の名称、*Clostridium thermoaceticum*) の一種は、硝酸 (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) を電子受容体として用いた時に、エタノールを資化できることが報告されている<sup>23)</sup>。また、*M. thermoacetica* の休止菌体系や粗酵素液を用いた研究では、炭素の放射性同位体 <sup>14</sup>C を含むアセチル-CoA 経路の中間体 [5-<sup>14</sup>C]methyltetrahydrofolate から <sup>14</sup>C を含むエタノールを生産することが報告されている<sup>24)</sup>。さらに、メチルビオロゲンやベンジルビオロゲン、コバルト錯体などの人工的な電子移動中間体が存在し、CO やギ酸を電子供与体として用いた条件下では、数種の有機酸を同じ炭素数のアルコールへと変換できることが報告されている<sup>25)</sup>。以上のことからある種の好熱性酢酸生産菌もまた、中温性酢酸生産菌と同様にエタノール生産経路を持っている可能性が示唆される。しかしながら、好熱性酢酸生産菌が増殖条件下においてエタノールを生産することを直接示す報告は

なく、それに関わる酵素系などについての情報も全く分かっていない。

#### IV. エタノール及び酢酸の製造と用途の現状

ここでは、本研究で生産を試みたエタノール及び酢酸について現行の製造方法と製品の利用用途について簡単に触れておく。

##### (1) エタノールについて

エタノールは、殺菌性、溶剤としての性質、揮発性、化学薬品としての反応性を利用して多くの分野で利用されている。国内における用途の特徴としては、飲食品工業用が多く、なかでも食品防腐剤用途が多い。その他には、化粧品、食酢、医薬品、洗剤、香料、試薬などに用いられている。

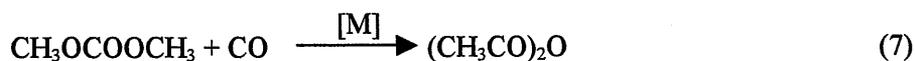
また、エタノールの他の利用としては、自動車燃料への混合が注目されている<sup>1)</sup>。バイオマスを原料とするエタノールをガソリンに添加することによって、ガソリンの消費量を削減し、さらに、CO<sub>2</sub> 排出量の削減にもつながると考えられている。米国では、主にトウモロコシを原料とするエタノールを 10%混合させた「E10 燃料」がシェアの約 1%流通している。また、ブラジルでは、主にサトウキビを原料としたエタノールを 22%前後混合した燃料がシェアの 90%を占める程利用されている。日本においても 2003 年 5 月に揮発油品質確保法が改正され、3%までの混合許容値が定められた。そして、国の政策として、この「E3 燃料」を普及させていく取り組みが開始されている。経済産業省では、2004 年から、石油精製施設など全国 6 箇所で E3 燃料製造の実証実験を開始している。また、環境省は、2012 年までに、E3 燃料の全面普及を目標として掲げている。さらに、E10 への転換を目指すシナリオが環境省や燃料供給側から示されている (<http://www.env.go.jp/earth/ondanka/renewable/>) (<http://www.env.go.jp/earth/report/h15-02>)。そのため、今後、バイオマス由来エタノールの需要については、大幅な増加が見込まれている。

2002 年度のアアルコール出荷量は、30 万 630 キロリットルであり、そのうち、発酵アルコールが 19 万 5296 キロリットル、合成アルコールが 10 万 5334 キロリットルとなっている<sup>26)</sup>。発酵アルコールは、多くの場合、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の改良株を用いて製造されている<sup>27)</sup>。合成アルコールの製造法としては、エチレンを水と直接反応させる直接水和法とエチレンを濃硫酸に吸収させて加水分解する方法 (硫酸法) があり<sup>28)</sup>、ともにエチレンを原料としているが、その供給は輸入に頼っているのが現状である。

## (2) 酢酸について

現在、酢酸は、 $C_1$  化合物としては、メタノールに次ぐ生産量であり、その用途は多岐にわたっている<sup>29)</sup>。最終製品としては、酢酸ビニル (50%、エマルジョン塗料、接着剤、織物等の原料)、酢酸エステル (15%、溶媒として使用)、*p*-キシレンのテレフタル酸への酸化反応に使用される特殊溶媒 (10%) などが挙げられる。その他、食品や医薬品、道路の凍結防止剤などの原料にも用いられている<sup>30)</sup>。日本においては、2002 年に 56 万 8991 トンを出荷したが、年々やや減少する傾向にある<sup>26)</sup>。しかし、誘導品である酢酸エステルやポバール、PTA が好調であり、需要の増加が期待される。

酢酸の製造は、工業的生産が始まった当初 (1850 年代) には発酵法によって主に生産されていた。現在では、60%以上がメタノールのカルボニル化によって供給されている<sup>29)</sup>。この方法では、メタノールと CO を触媒存在、加圧下において反応させることにより酢酸を製造する (式 6)<sup>29)</sup>。また、酢酸メチルと CO の反応によっても製造が行われている (式 7)<sup>29)</sup>。



[M] : ハロゲン化物イオン、特にヨウ化物イオンを反応促進剤とする  
3 価のコバルト(Co), ロジウム(Rh), イリジウム(Ir) 塩に由来する 1 価  
金属による触媒反応

メタノール、CO は合成ガスより製造可能であり、合成ガスの原料としては、石炭が挙げられることから石炭からの酢酸の製造であるといえる。Co 触媒反応では、不純物の  $\text{H}_2$  が大きく影響し、Rh 触媒反応では、 $\text{H}_2$  50%までは、影響がないと言われている。

## V. 好熱性酢酸生産菌を用いたガス基質からのエタノール及び酢酸生産系

前節までのことから、我々は、バイオマス由来とする合成ガスを原料とした微生物的物質生産、特に好熱性細菌の利用に着目した（図2）。

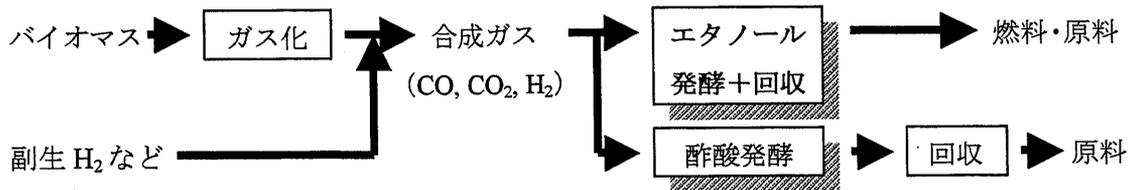


図2 好熱性細菌を用いたエタノール及び酢酸生産プロセス

60°C前後で生育できる好熱性細菌をエタノール生産に利用できれば、培養と蒸留によるエタノール回収を同時に行える効率的なプロセスの開発につながる事が考えられる。また、好熱性細菌の利用には、コンタミネーションリスクが低く、維持温度のコストも小さいというメリットも挙げられる<sup>31)~33)</sup>。さらに、この生産系にはバイオマス以外に様々なガス供給源が考えられる。特に、H<sub>2</sub>については、石油（ナフサ接触改質）、石油化学（ナフサ分解、エチレンプラント）、製鉄（コークス炉）、ソーダ製造（電解）などで副生されるH<sub>2</sub><sup>34)</sup>を利用することも考えられる。そして、この技術が化石資源の利用を削減し、また、CO<sub>2</sub>固定によって地球温暖化防止策の一つとして役立つのではないかと期待される。

## VI. 本研究の目的

当研究室において、これまでにH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>基質からエタノールを生産できる好熱性菌の自然界からの単離が試みられており、吉本によって新たに9株が単離された<sup>35)</sup>。そこで、本研究では、その中からHUC22-1株を選択し、H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>からのエタノール及び酢酸生産への応用を目的とした基礎研究に取り組んだ。

第1章では、本研究で使用する単離株を選択することを目的とした。当研究室において単離されたエタノール生産株のエタノール生産能、H<sub>2</sub>耐性、エタノール耐性、酢酸耐性を整理し、菌株選択の基準とした。また、選択したHUC22-1株の培養条件を決定した。さらに、HUC22-1株について同定試験を行った。

第2章では、HUC22-1株の増殖及び生産物特性を明らかにすることを目的とした。そこで、H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>を用いた回分培養について経時変化を詳細に調べた。また、糖（フルクトース）を基質とした場合についても同様に検討を行った。

第3章では、HUC22-1株におけるエタノール生産経路の解明を目的とした。そこで、 $H_2$ - $CO_2$ 培養及びフルクトース培養における Alcohol dehydrogenase (ADH) 活性、Acetaldehyde dehydrogenase (ACDH) 活性を測定した。また、その補酵素と考えられる Pyridine nucleotide の細胞内プール量についても測定を行った。

第4章では、HUC22-1株の酢酸及びエタノールによる増殖阻害の特徴について明らかにすることを目的とした。そこで、添加した酢酸が増殖に及ぼす影響について、初発 pH 及び酢酸濃度を変えた条件で検討を行った。さらに、その結果を pH と複合させた非拮抗阻害モデルに当てはめて解析を行った。同様に添加したエタノールが増殖に及ぼす影響について検討を行った。さらに、添加したエタノールが Pyridine nucleotide の細胞内プール量に及ぼす影響についても検討を行った。

第5章では、培養条件の検討による酢酸及びエタノールの高生産化を目的とした。そこで、pH 制御及び  $H_2$ - $CO_2$  の連続供給が可能なリアクターシステムを構築し検討を行った。また、フルクトース培養においても同様に検討した。さらに、 $H_2$ - $CO_2$  培養について酢酸濃度の増加を抑制するために、菌体の回収、再利用を伴う反復回分培養を検討した。

第6章では、エネルギー生産面から代謝経路を考察し、HUC22-1株の代謝をより詳細に把握することを目的とし、エタノール及び酢酸の生産性向上に活用することを目指した。そこで、 $H_2$ - $CO_2$  と関連する基質を用いて回分培養を行い、各基質がどのような代謝経路を通り、その際にどのように ATP 生産が行われるのかを考察した。

第7章では、エタノールを高生産する変異株の作製を目的とした。そこで、化学変異剤の処理条件の検討、スクリーニング法の検討を行った。さらに、確立した方法によって変異株の単離を試みた。

## 第1部 HUC22-1株の同定、エタノール生産経路の解析

### 第1章 HUC22-1株の同定及び基本的性状の検討

#### 第1節 緒言

当研究室の吉本らによって、 $H_2$ - $CO_2$  からエタノールを生産する好熱性細菌の探索が行われた<sup>35), 36)</sup>。方法としては、まず汚泥などのサンプル約1g(湿重量)を ATCC1754 PETC medium (1.2.1., p.15) 25 ml に加え、 $H_2$ - $CO_2$  [80:20 (v/v)] の混合ガス(太陽日本酸素)を基質として集積培養を行った(図 1-1)。約2週間の培養後、High performance liquid chromatography (HPLC) 分析(1.2.8., p.19)でエタノール生産が見られたものについて集積培養を数回繰り返した。次に、フルクトースを基質として Roll-tube<sup>37)</sup> を作製してコロニーを形成させた(1.2.3., p.17)。一方、 $H_2$ - $CO_2$  を基質とした場合には、コロニーの形成が見られなかった。3日~8日間培養後に形成されたコロニーを単離し、さらに、確実に純化させるため、Roll-tube の操作を2~3回繰り返したものを単離株とした。温泉の源泉から集めた汚泥などを中心に16箇所(表 1-1, p.14)から得られたサンプルについて探索を行った結果、9株を単離した(表 1-2, p.14)。いずれの株も  $H_2$ - $CO_2$  を基質とした回分培養では、酢酸が主な生産物であった。エタノール生産については、0.2~0.5 mM が検出されたが、菌株間で大きな差は見られなかった。そこで、本章では、単離株の  $H_2$  やエタノール、酢酸に対する耐性を調べ、それを基準として本研究で用いる菌株の選択を行った。そして、選択した株について同定試験を行った。

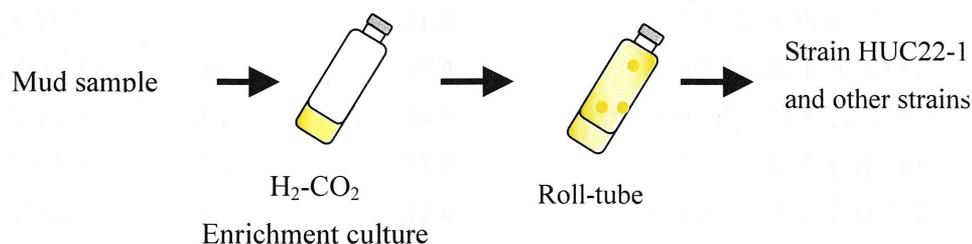


図 1-1 菌株単離方法の概要

表 1-1 本研究で用いた単離源と集積培養結果

エタノール <sup>a</sup>	単離源
+	① T 大学農学部・堆肥集積所、② 殺生石・蒸気吹出口、 ③ 鹿の湯・源泉噴出口横、④ 北の湯・源泉噴出口、⑤ 不動の湯・源泉、⑥ 新湯・源泉吹出口周囲、⑦ 新湯噴火口・蒸気吹出口、⑧ N 化学・地下水採取口 <sup>b</sup> 、⑨ JRA 馬事公苑・堆肥集積所
±	⑩ 殺生石・湯畑横、⑪ 新湯・源泉吹出口
—	⑫ 湯原温泉・薬場、⑬ 湯原温泉・砂場・排水溝、⑭ 湯原温泉・砂場入口、⑮ 三朝温泉・株湯・飲泉場、⑯ 三朝温泉・飲泉所

<sup>a</sup> 集積培養後のエタノール測定結果, +, 1 mM <; ±, < 1 mM; —, Not detected.

<sup>b</sup> HUC22-1 株の単離源

表 1-2 単離株の H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> を基質とした回分培養

単離株	生産物濃度 (mM)		単離源
	エタノール	酢酸	
HUC16-1	0.2	41.8	鹿の湯・源泉噴出口
HUC16-2	0.3	41.2	新湯・源泉吹出口
HUC22-1	<b>0.5</b>	<b>27.9</b>	N 化学・地下水採取口
HUC22-2	0.4	26.9	N 化学・地下水採取口
HUC22-3	0.3	35.2	N 化学・地下水採取口
HUC22-4	0.3	43.4	N 化学・地下水採取口
HUC22-5	0.4	34.7	N 化学・地下水採取口
HUC23-1	0.2	36.9	JRA 馬事公苑・堆肥集積所
HUC23-2	0.1	39.5	JRA 馬事公苑・堆肥集積所

## 第2節 方法

### 1.2.1. 基本培地、基質溶液の作製

本研究では、*C. ljungdahlii* の培養に用いられる ATCC 1754 PETC medium (<http://www.atcc.org>) を改変したものを基本培地として用いた (表 1-3)。改変として Cysteine HCl·H<sub>2</sub>O の量を 0.3 g l<sup>-1</sup> に減らし、Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O を削除した。尚、全ての実験を通じてオリエンタル酵母工業の酵母エキスを使用した。

表 1-3 基本培地組成 (l<sup>-1</sup>) (ATCC 1754 PETC medium 改変)

NH <sub>4</sub> Cl	1 g
KCl	0.1 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaCl	0.8 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.02 g
NaHCO <sub>3</sub>	2 g
Yeast extract	1 g (オリエンタル酵母工業)
Trace elements (see below)	10 ml
Wolfe's vitamin solution (see below)	10 ml
Resazurin (redox indicator)	1 mg
Reducing agent (see below)	10 ml
Distilled water	
Trace elements (l <sup>-1</sup> ) (Nitrilotriacetic acid を添加し、KOH で pH 6.0 に調整後、他試薬を添加する。)	
Nitrilotriacetic acid, 2 g; MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O, 1 g; Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O, 0.8 g; CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O, 0.2 g; ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 0.2 mg; CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O, 0.02 g; NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O, 0.02 g; Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O, 0.02 g; Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub> , 0.02 g; Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> , 0.02 g; Distilled water.	
Wolfe's vitamin solution (l <sup>-1</sup> )	
Biotin, 2 mg; Folic acid, 2 mg; Pyridoxine·HCl, 10 mg; Thiamine·HCl, 5 mg; Riboflavin, 5 mg; Nicotinic acid, 5 mg; Calcium D-(+)-pantothenate, 5 mg; Vitamin B <sub>12</sub> , 0.1 mg; p-Aminobenzoic acid, 5 mg; Thiocetic acid, 5 mg; Distilled water.	
Reducing agent (l <sup>-1</sup> )	
Cysteine·HCl·H <sub>2</sub> O, 30 g; Distilled water.	
Resazurin stock solution (l <sup>-1</sup> )	
Resazurin 1 g; Distilled water.	

嫌氣的に作製する必要はない。遮光保存。

場合によっては、嫌気度を上げるために Ti (III) citrate を 2~3 滴加えた。

#### (1) ATCC 1754 PETC medium 改変

培地作製は、還元剤 (Cysteine HCl·H<sub>2</sub>O, 30 g l<sup>-1</sup>) と基質 (フルクトース等) を別に作製した。嫌氣的に培地を作製する方法として、Hungate の方法<sup>37)</sup>を改変した Miller らの方法<sup>38)</sup>を用いた。まず、計量した各試薬を逆浸透 (Reverse osmosis) 膜処理水 (RO 水) に溶かした後、20 分間ボイルを行った。(レサズリンの色が、青色からピンク色に変わる)。その後、CO<sub>2</sub> を吹き込みながら氷上にて冷却した (20 分間)。CO<sub>2</sub> で置換しながら培地をバイアルビンに分注し、プチルゴム栓とアルミシールで蓋をした (25 ml 培地 / 125 ml バイアルビン)。基質等を添加後の培養初発 pH が 6.3 になるように pH を調整した (この段階で、培地の pH を 6.9 に合わせるとほぼ目的の初発 pH になった)。その後、オートクレーブ滅菌 (121°C, 1 気圧, 15 分間) を行った。

#### (2) 還元剤 [Cysteine·HCl·H<sub>2</sub>O, 3 g (100 ml)<sup>-1</sup>]

先に RO 水だけをボイルし、N<sub>2</sub> で十分に脱気した。その後に、試薬を加えて溶解させた後、N<sub>2</sub> 下でバイアルビンに分注して、プチルゴム栓とアルミシールで蓋をした (50 ml 培地 / 125 ml バイアルビン)。その後、オートクレーブ滅菌 (121°C, 1 気圧, 15 分間) を行った。基本培地の作製時と手順を変えたのは、試薬作製時に還元力を減らさないためである。

#### (3) フルクトース (100 g l<sup>-1</sup>)

還元剤と同様に試薬を作製した後、N<sub>2</sub> で脱気しながら、0.45 μm の Cellulose acetate hydrophilic filter (Dismic-25, Advantec, 東洋濾紙) を通して、バイアルビン (予め、N<sub>2</sub> 置換、オートクレーブ滅菌したもの) に分注した。

#### (4) Ti(III)citrate soln. (還元剤)<sup>39)</sup>

8.5% 三塩化チタン水溶液 (Sigma-aldrich) 10 ml と 0.2M クエン酸ナトリウム水溶液 (N<sub>2</sub> 脱気済み) 50 ml を 500 ml 程度のバイアルビンで N<sub>2</sub> 脱気しながら混合した。次に、N<sub>2</sub> 脱気しながら飽和炭酸ナトリウム水溶液で pH を 6.0 に調整し、バイアルビンに分注して、プチルゴム栓とアルミシールで蓋をした (30 ml 培地 / 70 ml バイアルビン)。その後、オートクレーブ滅菌 (121°C, 1 気圧, 20 分間) を行い、アルミホイルで遮光して保存した。

#### 1.2.2. バイアルビンを用いた回分培養

バイアルビンへの基質の添加や植菌には 22 G×1・1/4、あるいは、23 G×1・1/4 の注射針 (ニプロ) を付けたプラスチック注射器 (テルモ) を用いて嫌氣的に行った。操作は、クリーンベンチで行い、注射針を刺すプチルゴム栓の部分は、アルコールを付け、ガスバーナーであぶって滅菌した。

H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> を基質とした回分培養では、125 ml のバイアルビンに培養容積 25 ml の割

合にして、基質ガス量を十分にとり、かつ、振とうによって効率的に基質ガスが移動できるようにした。還元剤を培養容積 25 ml に対して 0.25 ml 加え(必要に応じて、Ti(III) citrate 溶液を 2~3 滴加えると還元度を上げられる。)、対数増殖期まで増殖させた前培養液を 5% (v/v) 濃度で植菌した。その後、0.45  $\mu$ m の Cellulose acetate hydrophilic filter (Dismic-25, Advantec, 東洋濾紙) を通した H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> [80:20 (v/v)] の混合ガス(太陽日本酸素)でヘッドスペースを置換し、0.2 MPa (2 atm) になるように混合ガスを充填した。55°C のシェーカー (MM-10, タイテック) にて 135 stroke (min)<sup>-1</sup> で振とう培養を行った。

フルクトースを基質とした回分培養では、125 ml のバイアルビンに培養容積が 50 ml (または、25ml) の割合で用いた。還元剤を培養容積 50 ml に対して 0.5 ml、フルクトースを 2.5 ml 添加し [終濃度 27 mM (5 g l<sup>-1</sup>)], H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養と同様に 5% (v/v) 植菌とした。培養は 55°C の恒温槽 (SLI-700, 東京理化工機) にて静置で行った。

### 1.2.3. Roll-tube 法による菌株単離

Roll-tube の作製は、Hungate の方法<sup>37)</sup>に従った。まず、基本培地を分注直前の段階まで作製した。125 ml バイアルビンに 0.35~0.4 g の高温培養用寒天 (ナカライテスク) を計量し、粉末が飛散ないように基本培地 18 ml を分注し、ブチルゴム栓、アルミシールで封をした。オートクレーブ滅菌 (121°C, 1 気圧, 20 分間) 後に 80°C 以上で保温した。使用直前に手で持てる程度まで冷ました後、泡立たないように基質、還元剤を加え、植菌 (適当に希釈したもの) を行った。直ちに、氷水を入れた Roll-tube 作製装置で回転しながら寒天をバイアルビン側面に固めた。

Roll-tube を立てた状態で、恒温槽にて静置培養した。コロニーが形成されたものについては、N<sub>2</sub> 下でバイアルビンの蓋をとって、滅菌したパスツールピペットを使って、コロニーを刺し取った。N<sub>2</sub> 下で 0.4 ml 程培地を入れた滅菌エッペンチューブにコロニーを移し、注射器で懸濁後、新しい液体培地の入ったバイアルビン、または、加圧培養試験管 (三紳工業) に植菌した。実験の詳細は文献<sup>40), 41)</sup>を参照した。

### 1.2.4. 位相差顕微鏡による形態観察

核酸電気泳動用のアガロース (Agarose S, Takara) を 2% 濃度で MilliQ 水に溶解し、スライドガラスの表面に塗抹し、完全に乾燥させた寒天コートスライドガラスを用いた<sup>42)</sup>。寒天コートスライドガラスを用いると菌体を固定化でき、形態を明確に観察できる。位相差顕微鏡 (Eclipse E600W, ニコン) を用い、1000 倍で観察した。位相差顕微鏡の詳細な操作・調整は、文献を参照した<sup>43)</sup>。

### 1.2.5. グラム染色試験

グラム染色は、NCIMB Japan CO., LTD. の分析結果を参考にした。その方法は、Barrow らの方法に従っている<sup>44)</sup>。

### 1.2.6. 菌体量の測定

菌体濃度は、良く攪拌させて採取した培養液をRO水で2~5倍程度に希釈して、分光光度計 (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech) にて吸光度 (Optical density at 660 nm,  $OD_{660}$ ) を測定して求めた。次に、得られた $OD_{660}$ の値から乾燥菌体重量 Dry cell weight ( $g\ l^{-1}$ ) を求めるために、次のように検量線を作成した。まず、 $0.45\ \mu m$ のCellulose Nitrate Membrane filter (Advantec, 東洋濾紙) を耐熱シャーレに入れて、 $80^{\circ}C$ で3時間乾燥後、デシケーターに入れて1時間放冷し、微量天秤で秤量した。このフィルター上で、 $OD_{660}=0.15\sim 0.8$ になるように培養した培養液20~50 mlを吸引ろ過し、RO水で洗浄して水溶性成分を除去した後、耐熱シャーレに入れて、 $80^{\circ}C$ で約1晩乾燥し、デシケーターで1時間放冷した後、秤量した。濾過前と濾過後の秤量差により乾燥菌体重量 (Dry cell weight) を求めた。得られたデータを元に検量線を作成した結果 (図1-2)、式1-1が得られた。

$$\text{Dry cell weight (g l}^{-1}\text{)} = OD_{660} \times 0.46 \quad (1-1)$$

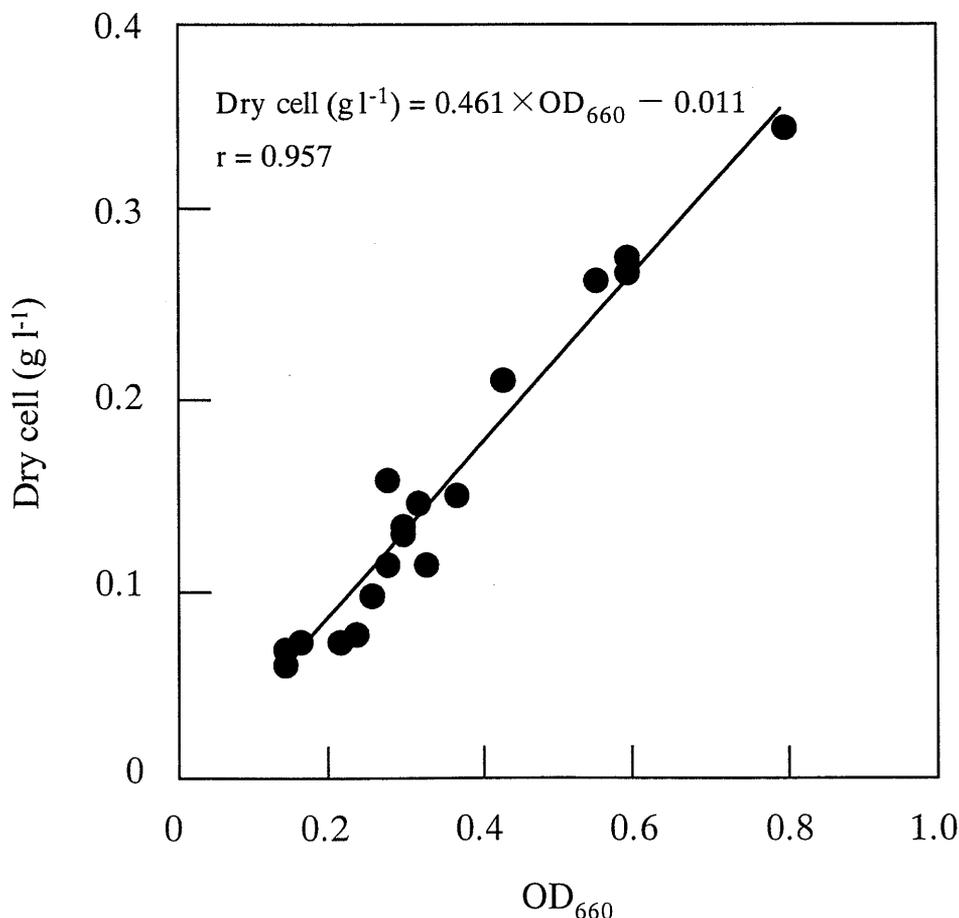


図1-2 培養液の吸光度と乾燥菌体重量の関係

### 1.2.7. 培養液の pH 測定

培養液を 12,000 rpm, 5 分間遠心分離し、得られた上清を用いて pH メーター (F-22, 堀場) にて測定を行った。pH メーター用電極 (IWO57-BNC, アサヒテクノグラス) を用いることによってエッペンチューブに入った上清を測定することが可能である。

### 1.2.8. 基質糖類・生産物濃度の測定

フルクトース、酢酸、乳酸、そしてエタノールは HPLC によって測定した。また、酢酸、エタノールは Gas chromatography (GC) による測定においても確認した。

#### (1) HPLC 測定

HPLC のシステムは、PU-980 pump, RI-930 detector, CO-985 column oven, 851-AS auto sampler (日本分光), C-R3A chromatopac (島津) を用いた。移動相は 5 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$  を用い、 $0.8 \text{ ml min}^{-1}$  の流速で流した [ポンプ圧  $50\sim 60 \text{ kg (cm}^2)^{-1}$ ]。カラムは、 $\text{H}^+$  型のカチオン交換体を充填した Aminex HPX-87H column (Bio-Rad) を用い、イオン排除・交換作用、吸着・分配作用、サイズ排除、そしてリガンド交換によって分離を行った。カラムオープンの温度は  $65^\circ\text{C}$  に設定した。検出は、示差屈折率を検出する Refraction index (RI) detector を用いた。サンプルは、培養液を 12,000 rpm、5 分間遠心して菌体を除去後、 $0.45 \mu\text{m}$  の Mixed cellulose ester filter (Dismic-13, Advantec, 東洋濾紙) で処理した。次に、適宜  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液で希釈を行い、測定対象の終濃度が 10 mM、 $\text{H}_2\text{SO}_4$  が 5 mM になるように調整した。サンプルは、Auto sampler または、Microsyringe (Microliter®#705, Hamilton) を用いて  $20 \mu\text{l}$  を注入した。各成分 10 mM の標準液を測定し、一点検量法にて目的サンプルの濃度を算出した<sup>45)</sup>。

#### (2) GC 測定

GC システムは、GC-1700, AOC-20i auto injector, C-R8A chromatopac (島津) を用い、移動相は  $\text{N}_2$  を用いて流速を  $54 \text{ ml min}^{-1}$  に設定した。カラムは、ポリイミド樹脂でコートしたフューズドシリカチューブの内壁に、極性の強いポリエチレングリコールを固定相 (液相) として結合させたタイプの ULBON HR-20M capillary column (信和化工) を使用した。サンプルは、固定相との相互作用 (分配または吸着) によって分離される。カラムオープンの温度は、 $60^\circ\text{C}$  から  $150^\circ\text{C}$  まで  $10^\circ\text{C min}^{-1}$  の速度で昇温するプログラムを設定した。検出は水素炎中で有機物の一部をイオン化させ、そのイオンが電極間を通る際に生じる電流を検出する Flame ionization detector (FID) を用いた。Injector と Detector の温度は  $250^\circ\text{C}$  に設定した。サンプルの前処理は、HPLC と同様に行い、Auto injector によって  $0.5 \mu\text{l}$  を注入した。Ethanol 10 mM, Acetate 100 mM の標準液を測定し、一点検量法にて目的サンプルの濃度を算出した。

#### 1.2.9. 基質資化性試験

30 ml の加圧培養試験管（三紳工業）に基本培地 10 ml の条件で行った。基質は、オートクレーブ処理、または Cellulose acetate hydrophilic filter (Dismic-25, Advantec, 東洋濾紙) で滅菌したものを表 1-6 (p.23) の濃度で加えた。フルクトースを基質として対数増殖期まで増殖させた前培養液を 5% 濃度で植菌した。培養は、55°C の恒温槽 (SLI-700, 東洋理化学器械) にて静置で行い、2~7 日間培養を行った。また、基質を全く加えていないものをブランクとした。菌体の増殖を  $OD_{660}$  で測定し、 $OD_{660}$  が 0.1 以上のもの、または、ブランクより酢酸生産が高いものを資化性陽性と判定した。ガス基質については、125 ml のバイアルビンを用いた回分培養の条件で行った。

#### 1.2.10. 硝酸利用性試験

$KNO_3$  を終濃度が、0、2.5、5.0、10、25、50 mM になるように添加した条件で、1.2.2. (p.16) に従って  $H_2-CO_2$  を基質とした回分培養を行った。培養終了後、培養液を MilliQ 水で 100~200 倍希釈し、インドフェノール青吸光光度法（アンモニア - テストワコー、和光）にてアンモニア性窒素濃度を測定し、 $KNO_3$  の利用性を調べた。この方法では、試料中のアンモニウムイオンがアルカリ性でフェノール及び次亜塩素酸ナトリウムと反応して、生じる青色（インドフェノール青）の吸光度 ( $OD_{640}$ ) を測定することによってアンモニア性窒素濃度を求めることができる<sup>46)</sup>。また、菌体量、pH、酢酸及びエタノール濃度の測定も行った。

#### 1.2.11. チオ硫酸利用性試験

$Na_2S_2O_3$  を終濃度が、0、2.5、5、10、25、50 mM になるように添加した条件で、1.2.2. (p.16) に従って  $H_2-CO_2$  を基質とした回分培養を行った。培養終了後、培養液 0.2~0.5 ml を用い、メチレンブルー法にて硫化物イオン ( $S^{2-}$ ) を測定し、 $Na_2S_2O_3$  の利用性を調べた。この方法では、試料中の  $S^{2-}$  と *N,N*-ジメチル-*p*-フェニレンジアミンシュウ酸塩が反応してメチレンブルーを形成し青く呈色するので、 $OD_{665}$  を測定することによって  $S^{2-}$  濃度を求めることができる。測定は、DR/2010 測定装置、測定キット (HAC) を用いて行った。また、菌体量、pH、酢酸及びエタノール濃度の測定も行った。

#### 1.2.12. アピケンキ API 20A キットによる解析

アピケンキ API 20A キット（日本ビオメリュー）は、嫌気性菌の同定のために必要な 20 項目の生化学的性状テストをまとめたキットである。フルクトースを基質として前培養を行い、キットに植菌した。培養は高温用アネロパック・ケンキ（三菱ガス化学）を用いて嫌気条件にした嫌気ジャー内で行った。

### 1.2.13. 16S rRNA 遺伝子配列の決定と系統解析

フルクトースを基質として対数増殖期まで培養した培養液 15 ml から G NOME<sup>®</sup> kit (Qbiogene)を用いてゲノム DNA を抽出し、25  $\mu$ g 以上のゲノム DNA が得られた。得られたゲノムを鋳型に Premix Taq kit (Ex Tag version, Takara Bio)、PCR 装置 (PC808, ASTEC) を用いて PCR を行い、16S rRNA 遺伝子を増幅させた。PCR 反応液組成を表 1-4 (p.22)に、PCR 反応条件を表 1-5 (p.22)に示す。PCR の primer は、Forward primer 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', *Escherichia coli*, positions 8-27) と Reverse primer 1492R (5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3', *E. coli*, positions 1510-1492)を用いた<sup>47)</sup>。PCR 産物 25  $\mu$ l 分を 0.8%アガロースゲル (Agarose S, Takara) にて電気泳動 (TAE buffer) し、約 1.5 kb のバンドを切り出し、DNA purification kit (Toyobo) を用いて精製した。Premix Taq kit を用いて PCR を行った場合、PCR 産物の 3'末端に A が一塩基付加され、そのまま TA クローニングを行うことができる。そこで、精製した Fragment を TA クローニングによって p GEM<sup>®</sup>-T easy vector (Promega) に組み込み、*E. coli* DH5 $\alpha$  に導入して形質転換させた。100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> Ampicillin、80  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside (Xgal)、そして 0.5 mM isopropyl thiogalactoside (IPTG)を含む Luria-Bertani plate (LB plate) 上に形質転換させた *E. coli* を培養し、Blue/White selection を行って組換え plasmid を持つ *E. coli* を選別した。選別した *E. coli* から Qiagen mini prep kit (Qiagen)を用いて plasmid 回収し、精製を行った。回収後の plasmid に含まれる 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の決定は、北海道システム・サイエンス株式会社に依頼した。M13 forward primer と M13 reverse primer を用いて両端から配列を決定し、さらに内側の配列については、16sF1 (5'-CCTGGCAAGTCAGATGTGAA-3') と 16sR1 (5'-ACCAGGTTTCGCAGGATGTCA-3') を用いて決定した。

得られた 16S rRNA 遺伝子配列を用い、DNA Data Bank of Japan (DDBJ)の HP (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html>) の BLAST 検索を用い、ホモロジー検索を行った。さらに、ガス基質を資化可能な関連菌と比較するため、関連菌の 16S rRNA 遺伝子配列について DDBJ の HP の CLUSTAL W program<sup>48)</sup>による多重配列の整列と近接結合法解析 (Neighbor-joining method)<sup>49)</sup>を行い、系統樹ファイルを作成した。その際、Bootstrap 解析は 1000 に設定した。系統樹ファイルを元に Tree View program, version 1.6.6 (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>)を用いて、系統樹を作成した。方法の詳細は文献<sup>50)</sup>を参照した。

表 1-4 PCR 反応液組成

組成	$\mu\text{l}$
Genome template (0.05 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ )	1
Primer 27F (10 nM)	2.5
Primer 1492R (10 nM)	2.5
Premix Taq	25
MilliQ water	19
計	50

Negative control: MilliQ water

表 1-5 PCR 反応条件

Temp ( $^{\circ}\text{C}$ )	Time (second)	
95	120	
95	30	} 25 cycle
50	15	
68	40	
68	180	
4	$\infty$	

#### 1.2.14. 真空凍結乾燥による菌株の保存

以下の操作は可能な限り、クリーンベンチ内で無菌的に行った。まず、1.2.2. (p.16) に従って培養した培養液 50 ml を無菌的に遠沈管に移し、8000 rpm で 15~20 分間遠心した。上清を約 1 ml 残して、それ以外を除去した。残した上清で沈殿を穏やかに懸濁し、滅菌済みのエッペンチューブに移した。8000 rpm で 10 分間遠心後、上清を除去した。SM1 分散媒 0.5 ml を加え、穏やかに懸濁し、再び、8000 rpm で 10 分間遠心後、上清を除去した。SM1 分散媒 0.5 ml を加え、穏やかに懸濁し、乾熱滅菌したパスツールを使って、懸濁液約 80  $\mu\text{l}$  (パスツールの先端部分 3/5 程度) ずつを綿栓した細試験管 (予め乾熱滅菌) に分注し、再び綿栓をした。綿栓の先を切ってガスバーナーであぶり、消毒したドライバー等を使って細試験管の底から約 3 cm のところまで押し込み、氷上で保存した。次に、アルコール噴射式ガスバーナーで加熱しながら、試験管の中心よりやや底側の部分をくびれさせた。真空凍結乾燥機 Flexi-dry (FTS system 社、予め準備運転) にセットし、菌液が突沸しないようにゆっくりとバキュームにかけた。約 2~3 時間後にバキュームによって完全に真空になったら、真空にしながらか専用バーナー (Tokyo koshin isee バーナー) で試験管をくびれさせた部分を溶かして、管をふさぎ、さらに、蓋状に溶かした。試験管が冷えたら高周波装置 (Tesla coil) で真空状態を確認した。真空凍結乾燥した菌株は 4 $^{\circ}\text{C}$  で保存した。

### 第3節 結果及び考察

#### 1.3.1. 単離株の比較

当研究室で単離した菌株においてH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>を基質とした回分培養では、0.2~0.5 mMのエタノールが検出された。しかし、菌株間でエタノール生産に大きな差は見られなかった<sup>35)</sup>。そこで、本研究で用いる菌株の選択を行うため、3箇所の単離源毎にエタノール生産の高い株を全部で5株選び、H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>基質下で(1) ヘッドスペース部分を100%H<sub>2</sub>に置換した条件、(2) エタノール200mMを添加した条件、(3) 酢酸ナトリウム100 mMを添加した条件でそれぞれを培養し、増殖を比較した(表1-6)。その中で、千葉県N化学の地下温水源から採取された汚泥を由来とするHUC22-1株は他の菌と比較して、H<sub>2</sub>やエタノール、酢酸に対する耐性全てで、±(OD<sub>660</sub>, 0.1<)を示したことから本研究ではHUC22-1株を選択し、その後の検討に用いることとした。HUC22-4については、HUC22-1株とほとんど同じであったため、若干エタノール生産の高かったHUC22-1株に絞ることとした。尚、H<sub>2</sub>、エタノールで耐性を示したHUC23-2株については、共同研究先のコスモ石油株式会社の方で検討を進めることになった。また、HUC16-1、16-2についてはエタノールに対する耐性が悪かったことから本研究では除外した。

表1-6 単離株のH<sub>2</sub>、エタノール、酢酸耐性の比較

単離株	H <sub>2</sub> (100%)	エタノール (200 mM)	酢酸 (100 mM)
HUC16-1, 16-2	±	—	±
HUC22-1, 22-4	±	±	±
HUC23-2	+	±	—

+: OD<sub>660</sub>, 0.4<; ±: OD<sub>660</sub>, 0.1<; —: OD<sub>660</sub>, <0.1

#### 1.3.2. HUC22-1株の形態

HUC22-1株をH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>基質下で培養し、増殖期にあるものを位相差顕微鏡にて観察を行ったところ、単一菌のように見られた。しかし、同様にフルクトース培養を行った時には、少なくとも2種類以上の菌[菌体の幅が太い菌(A)と細い菌(B)]が混合している可能性が示唆された(図1-3, p.24)。そこで、再度純化を行うため、HUC22-1株をH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>基質下で培養し、継代を3回繰り返す、H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>下で生育できる菌のみに絞り込みを試みた。次に、H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>を基質としてRoll-tubeを作製し、コロニーを形成させたところ通常見られる直径1~2 mm程度の白いコロニーとそれよりも小さいコロニーが観察された。小さい方のコロニーを単離し、H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>基質下で培養後に顕微鏡観察を行ったところ図1-3(p.24)で見られた太い形態の菌ではないかと推察された。一方、大きい方のコロニーについては、H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>下では生育できなかったため、太い

形態の菌株（以下 L 株）に着目して、次の解析を行った。L 株の H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養の生産物を HPLC にて調べたところ、酢酸を主な生産物とし、エタノールを少量生産することが確認された。そこで、L 株について再度 H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> を基質として Roll-tube を作製し、コロニーを単離した株を純化した HUC22-1 株として以降の実験に用いた。

位相差顕微鏡によって観察された HUC22-1 株の形態を図 1-4 (p.25)に示した。図 1-4A (p.25)は H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養下の増殖期の菌体で、形態は直線、あるいは、やや湾曲した桿菌であり、矢印の個所のように孢子形成が見られた。図 1-4B(p.25)はフルクトース培養下の増殖期の菌体で、図 1-4A (p.25)と同様に桿菌であったが、孢子形成は見られなかった。また、グラム染色は、NCIMB Japan CO., LTD.の分析結果から陽性であった。

尚、もう一方の H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> で生育できなかったコロニーの方をフルクトース下で培養した結果、図 1-3 で見られた B の細い方の菌ではないかと推察された（以下 S 株）。S 株の生産物はエタノール、乳酸、酢酸であり、16S rRNA 遺伝子に基づくホモロジー検索では、*Thermoanaerobacterium aotearoense* (Sequence accession number, X93359) に近い結果となった。この菌は Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> を利用し、硫黄粒を形成することが報告されている<sup>51)</sup>。そこで、S 株も同様に Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 存在下で培養したところ硫黄粒と考えられる顆粒を蓄積することが顕微鏡観察によって確認された。そのため、S 株は *Thermoanaerobacterium* の 1 種であると推定された。

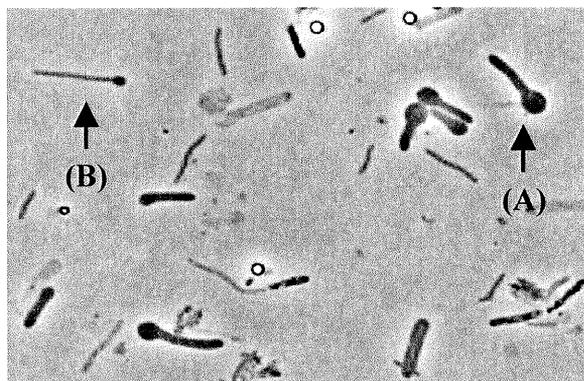


図 1-3 純化前の HUC22-1 株の位相差顕微鏡写真  
培養条件、フルクトース培養。  
(A) 太い形態の菌 (L 株), (B) 細い形態の菌 (S 株).

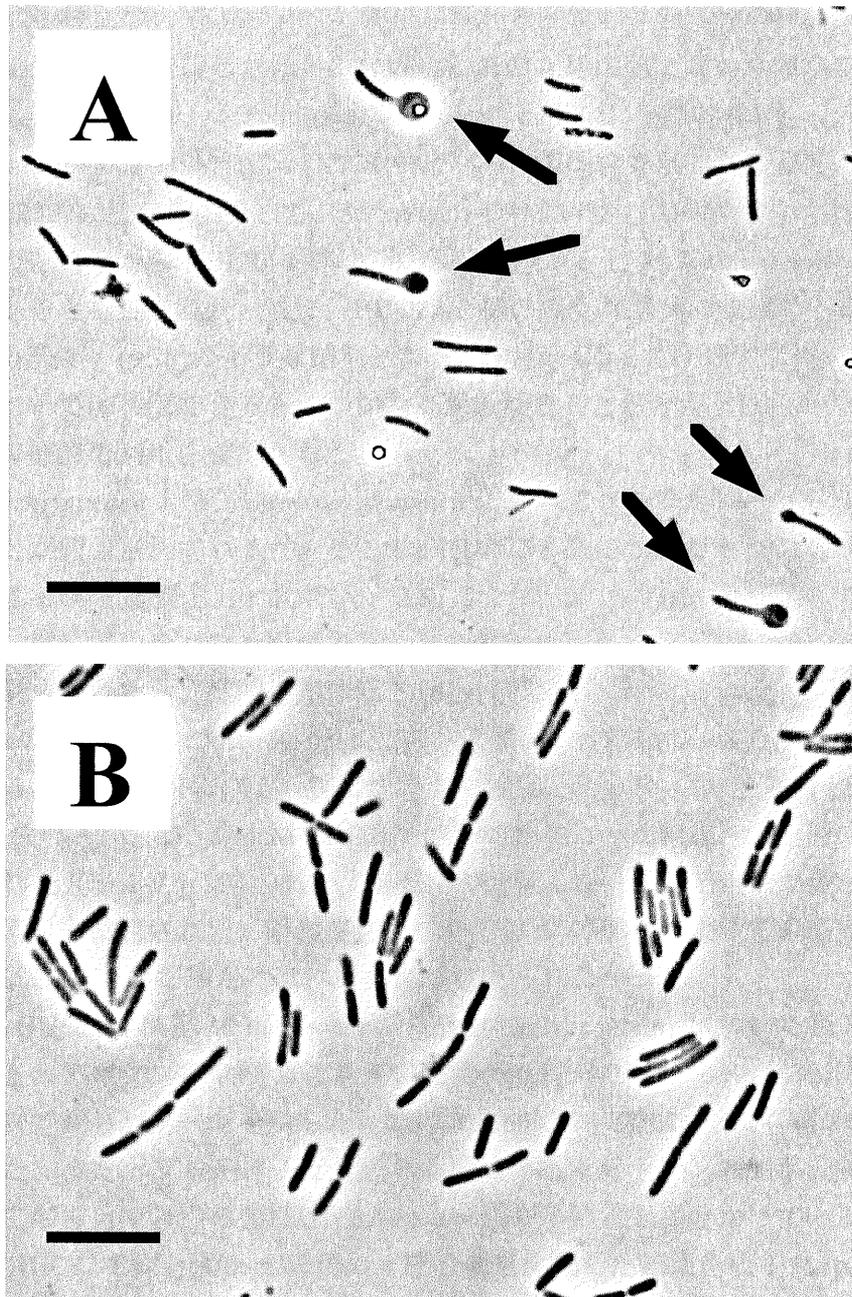


図1-4 純化後のHUC22-1株の位相差顕微鏡写真  
(A)  $H_2$ - $CO_2$ 培養の増殖期, (B) フルクトース培養の増殖期  
矢印は孢子を示す.  
写真内のサイズ線は $5 \mu m$ を示す.

### 1.3.3. HUC22-1 株の同定

HUC22-1 株について 16S rRNA 遺伝子配列を決定し、相同性の比較、系統樹の作成 (図 1-5, p.27) を行った結果、*Moorella* 属の 4 種の菌と高い相同性を示した。*M. thermoacetica* ET-5a (Sequence accession number, AJ242494) と 99%、*M. thermoautotrophica* DSM 1974 (X77849) と 99% の相同性を示した。また、*M. glycerini* YS6 (U82327) と 95%、そして、*M. mulderi* DSM 14980 (AF487538) とは 93% の相同性であったことから HUC22-1 株は、*M. thermoacetica* と *M. thermoautotrophica* のどちらかであると推定された。次に、HUC22-1 株の様々な基質についての資化性を調べたところ表 1-7 (p.28) のような結果となった。 $H_2$ 、 $CO_2$ 、CO のガス基質を利用でき、糖類については利用できるものがかなり限られることが分かった。また、 $C_1 \sim C_4$  の一部の有機酸の利用も確認された。

*M. thermoacetica* と *M. thermoautotrophica* において  $NO_3^-$  を利用しアンモニアを形成することが報告されている<sup>52)</sup>。そこで、HUC22-1 株についても  $NO_3^-$  の利用性を検討した。 $H_2$ - $CO_2$  を基質とし、 $KNO_3$  0、2.5、5、10、25、50 mM を添加して回分培養を行った結果、アンモニアを形成することが確認された (表 1-8, p.29)。また、アンモニアが形成された分、酢酸生産は低下した。

*Moorella* 属を含む Clostridia では、 $SO_4^{2-}$  は還元できないが、 $S_2O_3^{2-}$  を還元して  $S^{2-}$  を形成する。そこで、HUC22-1 株についても検討した。 $H_2$ - $CO_2$  を基質とし、 $Na_2S_2O_3$  を 0、2.5、5、10、25、50 mM 添加して回分培養を行った結果、 $S^{2-}$  を形成することが確認された (表 1-9, p.29)。また、培養中の観察においても培養液が黒色に変化し、硫化水素臭も確認された。酢酸生産については  $S^{2-}$  の形成によってやや低下した。一方、 $Na_2SO_4$  を用いた場合には、 $S^{2-}$  の形成は見られなかった。

次に、HUC22-1 株と *M. thermoacetia* DSM 521 (type strain) について嫌気性菌用の同定キット、アピケンキ API 20A を用いた解析を行った (表 1-10, p.30)。その結果、両方の株で同じパターンを示した。糖の資化性については、表 1-7 (p.28) と同じ結果となった。また、プロテアーゼを調べる項目であるゼラチンの加水分解が陽性を示した。この項目で陽性の菌株は *Clostridium* 属が多いことが分かっている。

以上 HUC22-1 株と *Moorella* 属の 4 種の菌を比較した結果を表 1-11 (p.31) にまとめた。HUC22-1 株は *M. thermoacetica* とほとんど同じ基質資化性のパターンを示した。HUC22-1 株と *M. thermoautotrophica* では、Arabinose と Rhamnose についての資化性が異なり、HUC22-1 株と *M. glycerini* とは、 $H_2$ - $CO_2$ 、CO- $CO_2$ 、そして Glycerol についての資化性が異なっていた。HUC22-1 株と *M. mulderi* では、16S rRNA 遺伝子配列の相同性が他の 3 種に比べて低いことから異なる判断された。これまでの結果を合わせて考えると HUC22-1 株は、*M. thermoacetica* の 1 種であると考えられた。しかし、完全に同定するためには DNA の GC 含量、DNA-DNA 相同性試験を行う必要がある。また、菌体脂肪酸組成、細胞壁成分、酵素や全菌体タンパク質の電気泳動パターンなど<sup>53), 54)</sup>多くの試験結果を合わせて確実性を上げる必要がある。以上のこと

から本研究では、HUC22-1株を*Moorella*属に属するところまでで同定試験を終了し、*Moorella* sp. HUC22-1と報告した。本菌の16S rRNA遺伝子配列は100%の相同性を示す同じ配列がなかったため、新規の配列としてDDBJに登録した (Sequence accession number, AB127110)。

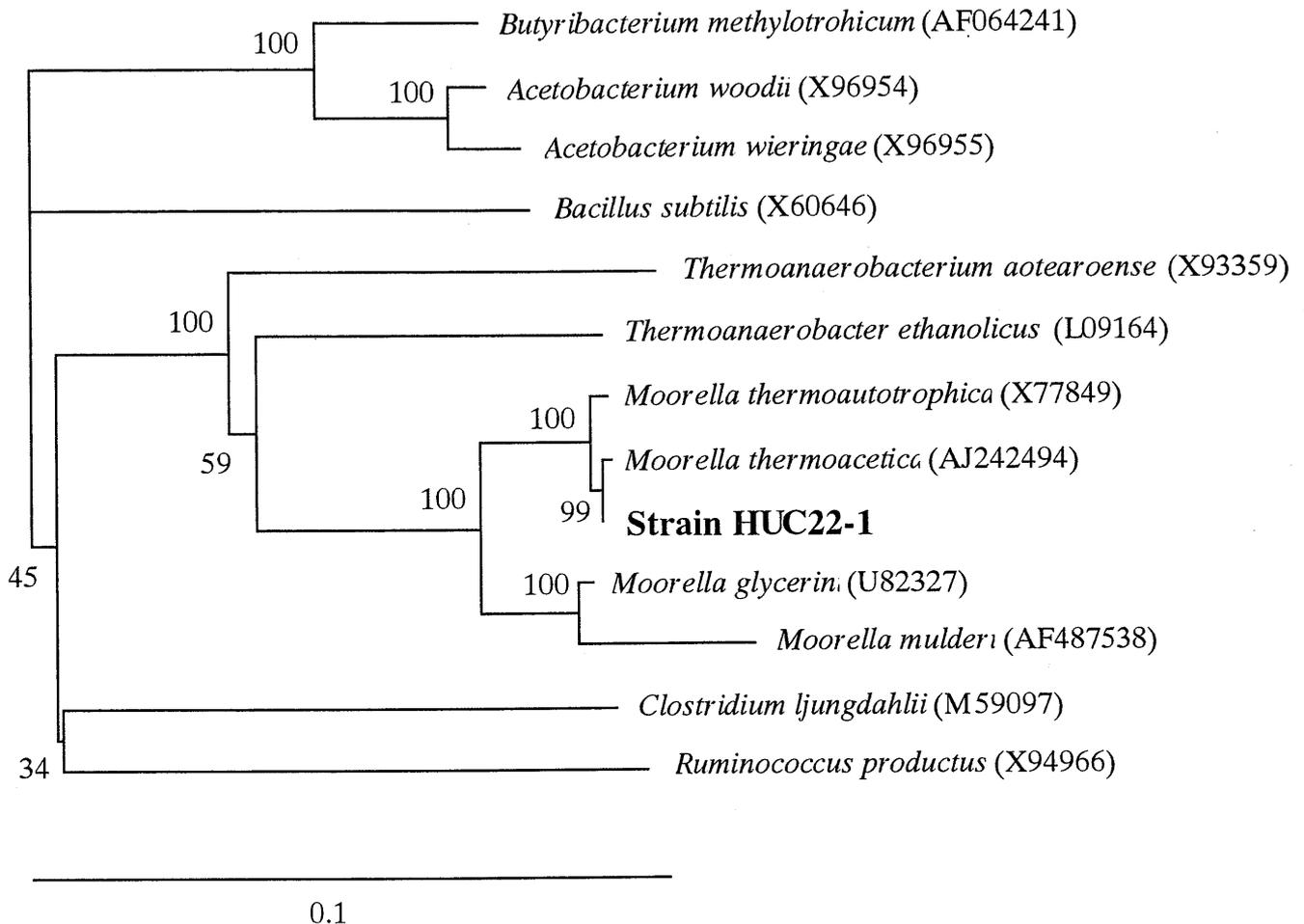


図1-5 HUC22-1株と関連細菌間での16S rRNA遺伝子配列に基づく系統樹  
Sequence accession numbers are indicated.  
Bootstrap values are shown inside the dendrogram (percentage of 1000 bootstraps).  
The scale bar represents the expected number of changes per sequence position.

表 1-7 HUC22-1 株における基質資化性

Substrates used for growth	
Sugars (5 g l <sup>-1</sup> )	Fructose <sup>a</sup> , Glucose <sup>a</sup> , Xylose <sup>a</sup> ,
Alcohols (20 mM)	Methanol <sup>a</sup>
Organic acids (20 mM)	Sodium formate <sup>a</sup> , Glycolic acid <sup>a</sup> , Glyoxylic acid <sup>a</sup> , Lithium DL-lactate <sup>b</sup> , Potassium oxalate <sup>a</sup> , Sodium pyruvate <sup>a</sup> Sodium DL-malate <sup>a</sup>
Gases	H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> [80:20 (v/v)] <sup>a</sup> , CO-CO <sub>2</sub> [30:70 (v/v)] <sup>a</sup>
Substrates tested but not used	
Sugars (5 g l <sup>-1</sup> )	Arabinose <sup>a</sup> , Cellobiose <sup>a</sup> , Cellulose <sup>a</sup> , Galactose <sup>a</sup> , Glycogen <sup>a</sup> , Lactose <sup>a</sup> , Maltose <sup>a</sup> , Mannose <sup>a</sup> , Melibiose <sup>a</sup> , Melezitose <sup>a</sup> , Raffinose <sup>a</sup> , Rhamnose <sup>a</sup> , Ribose <sup>a</sup> , Starch <sup>a</sup> , Sucrose <sup>a</sup> , Trehalose <sup>a</sup> , Xylan <sup>a</sup> , β-methylcyclodextrin (2 g l <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>
Sugar alcohols (5 g l <sup>-1</sup> )	Mannitol <sup>a</sup> , Sorbitol <sup>a</sup>
Alcohols (20 mM)	2,3-Butanediol <sup>a</sup> , 1-Butanol <sup>a</sup> , Ethanol <sup>a</sup> , Glycerol (5 g l <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup> , 1,3-Propanediol <sup>a</sup> , 1-Propanol <sup>a</sup> , 2-Propanol <sup>a</sup>
Organic acids (20 mM)	Sodium acetate <sup>b</sup> , Potassium gluconate <sup>a</sup> , Maleic acid <sup>a</sup> , Malonic acid <sup>a</sup> , Sodium propionate <sup>a</sup> , Succinic acid <sup>a</sup> , Potassium sodium tartrate <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Filter-sterilized substrate. <sup>b</sup> Autoclaved substrate.

表 1-8 HUC22-1 株における  $\text{KNO}_3$  の利用性 (96 時間培養)

$\text{KNO}_3$ (mM)	Dry cell ( $\text{g l}^{-1}$ )	$\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )	Products			
			$\text{NH}_3\text{-N}$ ( $\text{mg l}^{-1}$ )	Acetate (mM)	Formate (mM)	Ethanol (mM)
0	0.17	0.042	226	45.7	N.D.	0.5
2.5	0.08	0.068	273	3.1	7.9	N.D.
5	0.11	0.057	296	N.D.	7.2	N.D.
10	0.12	0.060	308	N.D.	10.8	N.D.
25	0.11		297	N.D.	N.D.	N.D.
50	0.09		264	N.D.	N.D.	N.D.

培養条件 :  $\text{H}_2\text{-CO}_2$  基質、培地中に  $1 \text{ g l}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$  を含む。 N.D. : not detected.

表 1-9 HUC22-1 株における  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  の利用性 (96 時間培養)

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (mM)	Dry cell ( $\text{g l}^{-1}$ )	$\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )	Products			
			$\text{S}^{2-}$ ( $\text{mg l}^{-1}$ )	Acetate (mM)	Formate (mM)	Ethanol (mM)
0	0.23	0.041	0.7	45.0	N.D.	0.4
2.5	0.23	0.035	1.4	47.0	N.D.	0.4
5	0.23	0.033	3.5	38.1	N.D.	N.D.
10	0.32	0.035	8.8	30.6	1.3	N.D.
25	0.31	0.05	27.9	29.4	1.9	N.D.
50	0.31	0.043	37.1	22.7	1.8	N.D.

培養条件 :  $\text{H}_2\text{-CO}_2$  基質。 N.D. : not detected.

表 1-10 アピケンキ API 20A の結果

Strain	HUC22-1	<i>M. thermoacetica</i> DSM 521
基質資化性項目		
ブドウ糖	+	+
D-マンニトール	-	-
乳糖	-	-
白糖	-	-
マルトース	-	-
サリシン	-	-
D-キシロース	+	+
L-アラビノース	-	-
グリセリン	-	-
D-セロビオース	-	-
D-マンノース	-	-
D-メレチトース	-	-
D-ラフィノース	-	-
D-ソルビトール	-	-
L-ラムノース	-	-
D-トレハロース	-	-
その他項目		
インドール生産性	-	-
ゼラチン加水分解 (プロテアーゼ)	+	+
エスクリン加水分解 ( $\beta$ -グルコシダーゼ)	-	-
尿素加水分解 (ウレアーゼ)	-	-
カタラーゼ	-	-

+, 陽性; -, 陰性.

表 1-11 HUC22-1 株と既存 *Moorella* 属 4 種の各性状の比較

Characteristic	HUC22-1	<i>M. thermoacetica</i> <sup>a,e</sup>	<i>M. thermoautotrophica</i> <sup>b,e</sup>	<i>M. glycerini</i> <sup>c</sup>	<i>M. mulderi</i> <sup>d</sup>
Origin	Mud	Horse manure	Mud and soil	Mixed sediment-water	Anaerobic bioreactor
Cell size (μm)	0.4-0.7 × 3.0-7.0	0.4 × 2.8	0.8-1.0 × 3.0-6.0	0.4-0.6 × 3.0-6.5	0.4-0.6 × 2.0-8.0
Spore formation	+	+	+	+	+
Gram stain	+	+	+	+	+
Utilization of substrate:					
H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub>	+	+	+	—	+
CO-CO <sub>2</sub>	+	+S <sup>f</sup>	+ <sup>g</sup>	N.D.	N.D.
Methanol	+	+S <sup>f</sup>	+	—	+
Formate	±	± <sup>h</sup>	±	—	+
Lactate	+	+S <sup>i</sup>	+	+	+
Pyruvate	+	+	—	+	+
Glycerol	—	—	—	+	—
Arabinose	—	—	+S	—	—
Cellobiose	—	—	—	—	+
Galactose	—	±	+S	+	N.D.
Glucose	+	+	+	+	+
Mannose	—	—	±	+	N.D.
Rhamnose	—	—	+	N.D.	N.D.
Reduction of NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	+	+ <sup>j</sup>	+ <sup>j</sup>	—	—
Reduction of S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	+	+	+	+	+

Symbols: +S, some strains positive; N.D., not determined; ±, weak growth.

References: <sup>a</sup>, Fontaine et al.<sup>55</sup>); <sup>b</sup>, Wiegel et al.<sup>56</sup>); <sup>c</sup>, Slobodkin et al.<sup>57</sup>); <sup>d</sup>, Balk et al.<sup>58</sup>); <sup>e</sup>, Cato et al.<sup>59</sup>); <sup>f</sup>, Daniel et al.<sup>60</sup>); <sup>g</sup>, Savage et al.<sup>61</sup>); <sup>h</sup>, Gößner et al.<sup>62</sup>); <sup>i</sup>, Talabardon et al.<sup>63</sup>); <sup>j</sup>, Seifritz et al.<sup>52</sup>).

#### 第4節 要約

これまでに、当研究室で温泉源などより H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> からエタノールを生産する好熱性細菌の単離が試みられ、9 株が単離された。本章では、9 株の中から H<sub>2</sub>、エタノール、酢酸に対する耐性がバランスよく良かった HUC22-1 株を選抜した。HUC22-1 株は、グラム陽性の桿菌で、孢子形成能が見られた。16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統解析と基質資化性のパターンでは、本菌は、*M. thermoacetica* に最も近い性質を示した。しかし、これ以上の同定試験を行わなかったため、本研究では、*Moorella* sp. HUC22-1 として報告した。

#### <16S rRNA 遺伝子配列登録内容>

LOCUS AB127110 1529 bp DNA linear BCT  
27-OCT-2004

DEFINITION *Moorella* sp. HUC22-1 gene for 16S rRNA, partial sequence.

ACCESSION AB127110

VERSION AB127110.1

KEYWORDS

SOURCE *Moorella* sp. HUC22-1

ORGANISM *Moorella* sp. HUC22-1  
Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Thermoanaerobacteriales;  
Thermoanaerobacteriaceae; *Moorella* group; *Moorella*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1529)

AUTHORS Nishio,N. and Nakashimada,Y.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (28-NOV-2003) to the DDBJ/EMBL/GenBank databases.  
Naomichi Nishio, Hiroshima University, Department of Molecular  
Biotechnology, Graduate School of Advanced Sciences of Matter;  
1-3-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima, 739-8530, Japan  
(E-mail:nnishio@hiroshima-u.ac.jp, Tel:81-82-424-7760,  
Fax:81-82-424-7046)

REFERENCE 2

AUTHORS Sakai,S., Nakashimada,Y., Yoshimoto,H., Watanabe,S., Okada,H. and  
Nishio,N.

TITLE Ethanol production from H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> by a newly isolated  
Thermophilic bacterium, *Moorella* sp. HUC22-1

JOURNAL Biotechnol. Lett. 26, 1607-1612 (2004)

COMMENT

FEATURES

Location/Qualifiers

Source

1..1529  
 /db\_xref="taxon:256467"  
 /mol\_type="genomic DNA"  
 /organism="Moorella sp. HUC22-1"  
 /strain="HUC22-1"

rRNA

<1..>1529  
 /product="16S rRNA"

BASE COUNT

375 a            369 c            509 g            276 t

ORIGIN

1 agagtttgat cctggctcag gacaaacgct ggcgcgctgc ctaacacatg caagtcgagc  
 61 ggtctttaat tgggaaatc ttcggatgga accgattaaa gatagcggcg gacgggtgag  
 121 taacgcgtgg gtaatctacc cttcagactg ggataacacc gggaaactgg tgctaatacc  
 181 ggatacggtc tacgggaggc atcttctgta gaagaaaggt ggcgcaagct accgctgaag  
 241 gatgagcccc cgtcccatta gctagtgtgt gaggtaatgg ctaccaagg cgacgatggg  
 301 tagccggcct gagaggggtg tcggccacac tgggactgag acacggccca gactcctacg  
 361 ggaggcagca gtggggaatc ttgcgcaatg ggcgaaagcc tgacgcagca acgccgcgtg  
 421 agcgatgaag gccttcgggt tgtaaagctc tgtcatcagg gacgaagtct taaaggcgaa  
 481 tagtctttaa ggtgacgta cctgaggagg aagccccggc taactacgtg ccagcagccg  
 541 cggtaaaacg tagggggcga gcgttgccg gaattactgg gcgtaaaggc cgtgtaggcg  
 601 gcctggcaag tcagatgtga aaaaccccgg ctaaccggg ggcatgcatt tgaactgcc  
 661 gggcttgagg gcaggagagg agagtggaat tcccgggtga gcggtgaaat gcgtagatat  
 721 cgggaggaac accagtggcg aaggcgactc tctggcctgg ccctgacgct gaggcgcgaa  
 781 agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc tggtagtcca cgccgtaaac gatgggtact  
 841 aggtgtagga ggtatcgacc cttctgtgc cgagtaaac acaataagta ccccgcctgg  
 901 ggagtacggc cgcaaggctg aaactcaaag gaattgacgg gggcccgcac aagcggtgga  
 961 gcatgtggtt taattcgacg caacgcgaag aacctaccg gggtttgaca tcttgcgaac  
 1021 ctggtgaaa cactgggggtg cccttcgggg aacgcagaga caggtggtgc atggtgtc  
 1081 tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag tcccgcaacg agcgcaacc ctaccttag  
 1141 ttgccagcgg gtaaagccgg gcactctaaa gggactgccg gtgacaaacc ggaggaaggt  
 1201 ggggatgacg tcaaatcatc atgcccctta tatccgggc tacacacgtg ctacaatggc  
 1261 ctgtacaaag ggggtcgaag gagcgtaccg gagcgaatcc caaaaagcag gtctcagttc  
 1321 ggattgcagg ctgcaactcg cctgcatgaa gtcggaatcg ctagtaatcg cggatcagca  
 1381 tgccgcgtg aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc cgtcacacca gaaagctgg  
 1441 caacaccga agccggtgac ctaaccgcg agggaaggag ccgtctaagg tggggctggt  
 1501 gattgggggtg aagtcgtaac aaggtagcc

## 第2章 HUC22-1株の増殖及び生産物特性の解析

### 第1節 緒言

第1章では、HUC22-1株が $H_2$ - $CO_2$ 培養においてエタノールを生産することを確認した。しかし、使用した培地には、 $CO_2$ 、 $NaHCO_3$ 以外の主な炭素源としてYeast extract  $1\text{ g l}^{-1}$ を含む。そこで、本章では、生産されるエタノールの由来がYeast extractではないことの確認を行った。次に、本菌の生育温度範囲と生育pH範囲を調べ、今後の培養実験に使用する条件を決定した。決定した条件を元に、 $H_2$ - $CO_2$ を基質とした回分培養の経時変化を調べ、本菌の生育速度や基質消費などの生育特性について検討を行った。さらに、エタノール生産がどの段階から始まるのか、増殖に連動しているのかどうかについても検討した。エタノール生産が増殖に連動しているならば、培養条件の検討によって生産性を向上できると考えられる。また、増殖に連動していないならば、酵素系を利用する休止菌体系への利用が考えられる。最後に、 $H_2$ - $CO_2$ 以外に糖からはエタノール生産が見られないのかを確認するためフルクトースを基質とした回分培養の経時変化を調べ、増殖特性を $H_2$ - $CO_2$ 培養と比較した。本菌は、*M. thermoacetica*<sup>64)</sup>と同様に一般的に用いられるグルコースよりもフルクトースの方が利用しやすいことから本研究では、フルクトースを基質として用いた。

### 第2節 方法

#### 2.2.1. Yeast extract 無添加培養

$H_2$ - $CO_2$ を基質として基本培地で前培養(1.2.2., p.16)を行い、増殖後にYeast extractを含まない基本培地に5% (v/v) で植菌した。さらに、もう一度、Yeast extractを含まない基本培地に5% (v/v) 植菌で継代し、増殖後に生産物をHPLC(1.2.8., p.19)で測定した。Yeast extractを含まない培地は、培地作製時にボイル・脱気操作を行ってもレサズリンが青色のままであった。

#### 2.2.2. 回分培養における各項目の経時変化の測定

$H_2$ - $CO_2$ 培養、フルクトース培養は720 ml バイアルビンに培地が最終的に150 mlになるように調整して行った。1.2.2. (p.16)に従って回分培養を行い、 $H_2$ - $CO_2$ 培養では6~12時間毎に、フルクトース培養では2~3時間毎にサンプリングを行い、 $OD_{660}$ (1.2.6., p.18)、pH(1.2.7., p.19)、ガス消費量(2.2.4., p.35)、生産物(1.2.8., p.19)、フルクトース消費量(1.2.8., p.19)の経時変化を測定した。ガス消費量の経時変化を測定するには、培養液が1回に4~5 ml 必要であることから125 ml より大きいサイズの720 ml のバイアルビンを用いた。

### 2.2.3. 比増殖速度の算出

培養後に得られた菌体量の経時変化を次式 2-1 に基づき、対数 (ln) に換算し、X 軸に時間、Y 軸に菌体対数値をとってグラフを作成した。ラグ時間を除いた培養初期の対数増殖期に直線が得られるので、その直線の傾きを求め、比増殖速度 [ $\mu$ , ( $\text{h}^{-1}$ )] とした。

$$\mu = \frac{\ln(\text{dry cell}_2 / \text{dry cell}_1)}{t_2 - t_1} \quad (2-1)$$

$\mu$ : 比増殖速度 ( $\text{h}^{-1}$ )、dry cell<sub>1</sub>: 時間  $t_1$  における乾燥菌体量 ( $\text{g l}^{-1}$ )、  
dry cell<sub>2</sub>: 時間  $t_2$  における乾燥菌体量 ( $\text{g l}^{-1}$ )。

### 2.2.4. 消費 $\text{H}_2$ - $\text{CO}_2$ 量の測定

バイアルビンを用いた回分培養において消費された  $\text{H}_2$ - $\text{CO}_2$  の量は、バイアルビンのヘッドスペースのガス組成とガス量、培地中の溶存  $\text{CO}_2$  濃度を測定し、それらを合計して求めた。尚、培地中の溶存  $\text{H}_2$  濃度は、ヘッドスペースのガス量に比べて、極めて小さいため本研究では計算には含まなかった。

#### (1) ヘッドスペースのガス組成の測定

ガス組成は GC によって測定した。GC システムは GC-8A, C-R3A chromatopac (島津) を使い、キャリアガスとして He より熱伝導性の高い Ar を圧力  $2 \text{ kg cm}^{-2}$ 、流速  $50 \text{ ml min}^{-1}$  で流した。カラムは、吸着型充填剤で  $\text{CO}$ ,  $\text{CO}_2$  の分離に適した活性炭を充填したステンレススチールカラム (length, 1 m; OD, 4 mm; ID, 3 mm; 信和化工) を用いて分離した。検出は熱伝導度検出器 Thermal conductivity detector (TCD) を用いて行い、60 mA に設定し、ブリッジ回路に組み込まれたフィラメントの抵抗がまわりのキャリアガスとサンプルの熱伝導度の変化に対応して変化することを利用した。Injector の温度を  $140^\circ\text{C}$ 、カラムの温度を  $110^\circ\text{C}$  に設定した。サンプルは、Microsyringe (MS-GAN100, 伊藤製作所) で  $0.6 \text{ ml}$  を採取し注入した。本方法では、酸素は測定できないので、結果は酸素分を除く ( $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{CH}_4$ , and  $\text{N}_2$ ) のガス組成 (%) で表示される<sup>65)</sup>。

#### (2) ヘッドスペースのガス量の測定

ガス量については、サンプリング時、あるいは、培養終了後のガス量を水上置換法によって測定した<sup>66)</sup>。バイアルビンのヘッドスペースのガスを  $22\text{G} \times 1 \cdot 1/4$  針を付けたファーメドチューブを通して放出させ、上下を逆さまにして飽和 NaCl 溶液で満たしたメスシリンダー内に放出ガスを水上置換で捕集した。ガス量はメスシリンダー内のガス量とバイアルビンのヘッドスペースのガス量を合計して算出した。一

方、培養開始、あるいは、サンプリング後に再開する時に充填したガス量は、Digital manometer (pop760, 岡野工業) を用いて測定した。予め同じガス量をDigital manometer と水上置換法で測定し、圧力 (mm Hg) とガス量の相関関係を求め、グラフにした (図2-1)。そこから以下のような換算式2-2を求めた。そして、換算式2-2を用いて実測した圧力値からガス量を求めた。

$$\begin{aligned} \text{Total gas volume (ml)} = & \\ & \{[\text{Gas pressure (mmHg)} \times 0.13 - 0.98] \times \frac{1}{100} \times \text{Head space volume (ml)}\} \\ & + \text{Head space volume (ml)} \quad (2-2) \end{aligned}$$

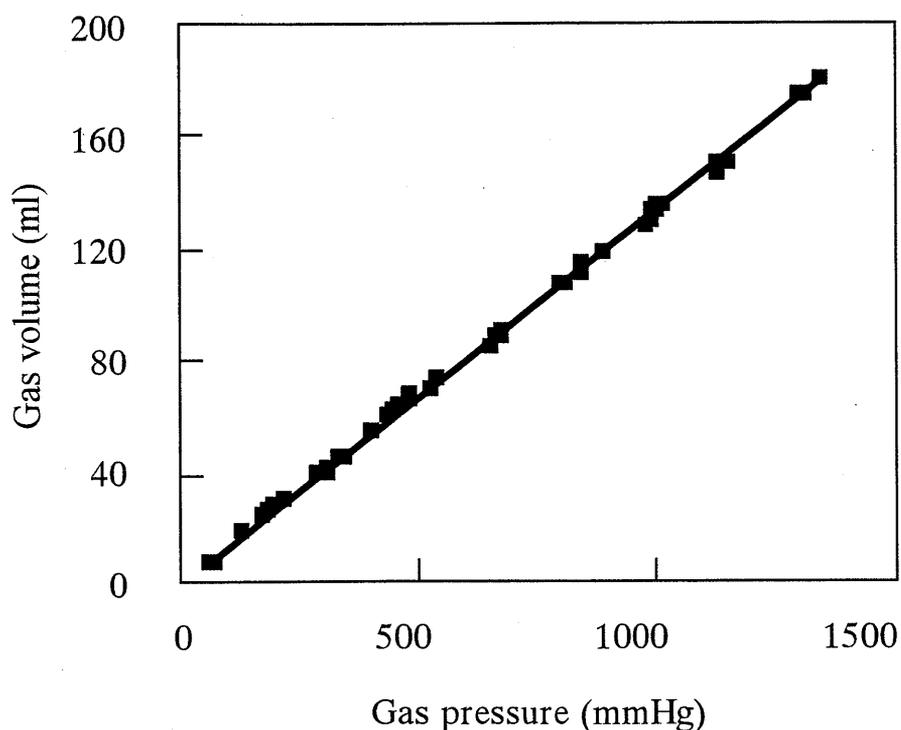


図2-1 マノメーター測定値と水上置換による捕集ガス量の関係  
125 ml バイアルビンに25 ml 培地を入れた条件で測定  
室温  
Gas volume (ml) = 0.133 × Gas pressure (mmHg) - 0.979  
r = 0.999

(3) ヘッドスペースのガス濃度への換算

以上得られたガス組成とガス量から次式 2-3 を用いて培養液 1L あたりの mmol 濃度に換算した。

$$\begin{aligned} & \text{Gas concentration [mmol (l-medium)}^{-1}\text{]}= \\ & \text{Gas composition (\%)} \times \frac{1}{100} \times \text{Gas volume (ml)} \times \frac{1}{1000} \times 1000 \times \frac{273}{293} \\ & \times \frac{1}{22.4} \times 1000 \times \frac{1}{\text{medium volume (ml)}} \quad (2-3) \end{aligned}$$

(4) 培養液中の溶存 CO<sub>2</sub> 濃度の測定

まず、50 ml ビーカーに MilliQ water 30 ml を測り取り、そこに、培養液 3 ml を加えた。さらに、0.5 M Trisodium citrate-HCl buffer (pH 4.5) 3 ml を加え、攪拌しながら溶存 CO<sub>2</sub> 電極 (model 9502, Thermo electron) と Digital ORP controller (MOR-3C, ミツワバイオシステム) を用いて測定した。標準液として 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> を使い、0.5, 1.0, 2.0, 3.0 ml をそれぞれ MilliQ water で 30 ml に希釈した標準系列を測定し、検量線を作成した。得られた検量線から溶存 CO<sub>2</sub> 濃度 [mmol (l-medium)<sup>-1</sup>] を算出した。

(5) 合計ガス濃度

H<sub>2</sub> はヘッドスペースのガス濃度 (mM)、CO<sub>2</sub> はヘッドスペースのガス濃度 (mM) と溶存 CO<sub>2</sub> 濃度 (mM) の合計量とした。合計ガス濃度の経時変化を求めて H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> の消費量とした。

2.2.5. 生育温度と生育 pH の検討

H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養における生育温度範囲を調べるため 40、45、50、55、60、65、70°C の各培養温度で回分培養 (1.2.2., p.16) を行った。培養は 125 ml バイアルビンで行い、初発 pH を 6.3 に調整した。菌体量の経時変化を測定し、比増殖速度 ( $\mu$ ) を算出して (2.2.3., p.35)、各温度間で比較した。

次に、H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養における生育 pH 範囲を調べるため NaOH、または、HCl で初発 pH 3.8、4.5、5.0、5.3、5.7、6.0、6.4、6.7、7.2、7.5、8.0 に調整した培地を用いて回分培養 (1.2.2., p.16) を行った。培養は 125 ml バイアルビンで行い、培養温度を 55°C とした。菌体量の経時変化を測定し、比増殖速度 ( $\mu$ ) を算出して (2.2.3., p.35)、各 pH 間で比較した。

### 第3節 結果及び考察

#### 2.3.1. Yeast extract 無添加条件におけるエタノール生産

生産されたエタノールが培地成分由来ではないことを調べるため、培地中の主要な炭素源である Yeast extract を含まない培地を用いて回分培養を行った。5% (v/v) 植菌で 2 回継代培養を行ったものについてもエタノール生産が見られた。このことから本菌も *C. ljungdahlii*<sup>18), 19)</sup> や *C. autoethanogenum*<sup>20)</sup> と同様に H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> からエタノールを生産すると考えられた。ただし、Yeast extract を含まない場合のエタノール生産量は、通常の 1 g l<sup>-1</sup> を含む場合に比べて若干減少した。この原因としては、Yeast extract を含まないことによって菌体の増殖が悪くなったことが影響しているものと考えられた。

エタノール生産に及ぼす Yeast extract の量は、当研究室の喜多によって pH 無制御の回分培養で検討された<sup>67)</sup>。その結果、基本培地の 5 倍濃度 5 g l<sup>-1</sup> で、若干のエタノール生産の増加が見られた。しかし、他の濃度では大きな影響はなかったことが報告されている。

#### 2.3.2. 生育温度及び生育 pH 範囲

H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養における HUC22-1 株の生育温度範囲を調べた (図 2-2A, p.39)。初発 pH 6.3 の条件で回分培養を行った結果、生育は 45~65°C で見られ、55~60°C で最も良い増殖を示した。次に、H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養における HUC22-1 株の生育 pH 範囲を調べた (図 2-2B, p.39)。培養温度 55°C で回分培養を行った結果、生育は pH 4.5~7.5 で見られ、pH 5.7~6.7 で最も良い増殖を示した。他の *Moorella* 属 4 種の菌との比較を表 2-1 (p.40) に示す。生育温度範囲と最適温度範囲は HUC22-1 株と他の菌で同様な範囲であった。一方、生育 pH と最適 pH については、菌種によって差が見られた。*M. thermoacetica* では表 2-1 (p.40) に示す以外に多くの Strain が存在し、多様性があるので一概には言えないが、HUC22-1 株は *Moorella* 属の中でも pH 酸性側で生育する菌に分類されると考えられた。以降の条件では、基本的に培養温度 55°C、初発 pH 6.3 に設定して培養を行った。

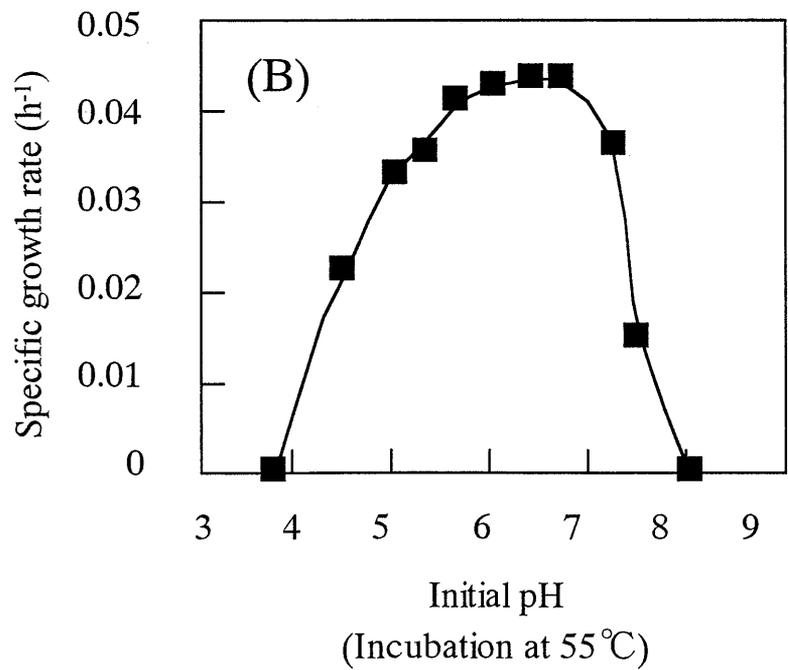
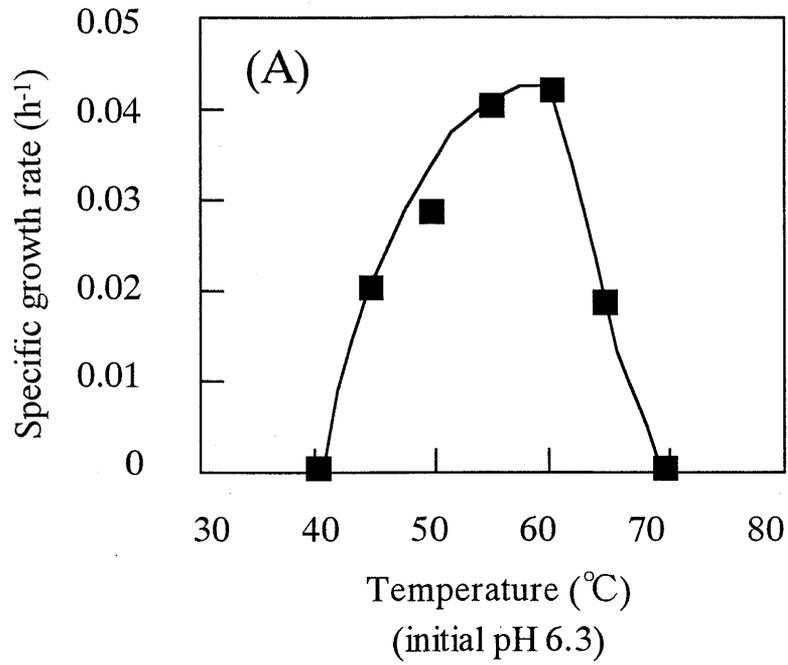


図2-2 H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>培養における生育温度範囲 (A) 及び生育pH範囲 (B) 培養条件, (A) 初期pH 6.3; (B) 培養温度55°C.

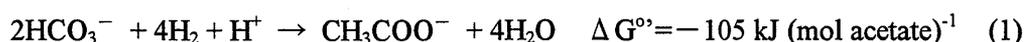
表 2-1 HUC22-1 株と *Moorella* 属における生育温度範囲と生育 pH 範囲

Strain	Temperature (°C)		pH		References
	Range	Optimum	Range	Optimum	
HUC22-1	45-65	55-60	4.5-7.5	5.7-6.7	This study
<i>M. thermoacetica</i>	45-65	55-60	N.D.	6.9	55
Ljd	51-65	60	5.7-7.65		68
JW/DB-2	47-65	58	5.5-8.3		68
JW/DB-4	48-67	59	5.25-8.7		68
<i>M. thermoautotrophica</i>	36-70	55-58	4.5-7.6	5.7	56
701/5	42-66	60	4.8-7.3		68
<i>M. glycerini</i>	43-65	58	5.9-7.8	6.3-6.5	57
<i>M. muideri</i>	40-70	65	5.5-8.5	7.0	58

N.D., not determined.

### 2.3.3. H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 回分培養における経時変化

図 2-3A (p.42)はH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>を基質としたHUC22-1株の回分培養における典型的な経時変化を示す。本菌は増殖期までは酢酸生産のみであったが、定常期からエタノール生産が見られた。培養後 156 時間には 260 mM H<sub>2</sub> と 120 mM CO<sub>2</sub>を消費し、1.5 mM エタノールと 56.7 mM 酢酸を生産した (表 2-2, p.43)。H<sub>2</sub> 1 mol あたりの酢酸生産量を表す Y<sub>P/S</sub> は 0.22 [mol acetate (mol H<sub>2</sub>)<sup>-1</sup>]となり、序論(II)の式 1 からの理論値 0.25 に近い値であった。また、CO<sub>2</sub> 1 mol あたりの酢酸生産量を表す Y<sub>P/S</sub> は 0.44 [mol acetate (mol CO<sub>2</sub>)<sup>-1</sup>]となり、理論値 0.5 に近い値であった。このように本菌の培養結果は量論式とよく一致していた。炭素収支は 95%、電子当量収支は 92%となった。



エタノール生産は定常期に見られたことから対数増殖期には連動していないと考えられた。しかし、菌体量に影響を受けると予想されることから培養条件の検討は必要であると考え、第 5 章で検討を進めた。また、休止菌体系の利用も効果的な方法であると考えられ、現在、当研究室の喜多らによって検討が進められている。

*A. woodii* のグルコース培養においても定常期からエタノールを生産することが報告されている<sup>22)</sup>。その中で、彼らは、リン酸塩濃度の制限がエタノール生産を誘導することを報告している。そのメカニズムはリン酸塩の欠乏によってアセチル-CoA の蓄積が誘導され、その濃度が増加することによってアセチル-CoA からエタノール生産の方向に反応がシフトするために起こると考えている。そして、アセチル-CoA が蓄積されるまでのラグ時間が生じるため定常期からエタノール生産が起こると考

えている。一方、*Butyribacterium methylotrophicum* の CO 培養においてもエタノールとブタノールが定常期から生産されることが報告されている<sup>69)</sup>。*B. methylotrophicum* の場合、*C. acetobutylicum* でよく研究されているアセトン・ブタノール発酵に似たメカニズムによって定常期からアルコール生産が起きているのではないかと考えられている。どのメカニズムが HUC22-1 株の場合に当てはまるのかは、現在のところ不明であり、今後の検討が必要である。

#### 2.3.4. フルクトース回分培養における経時変化

次に、本菌が糖からのエタノール生産能を有するかどうかを調べるため、フルクトースを基質とした回分培養を行った (図 2-3B, p.42)。フルクトースを基質とした回分培養の結果、比増殖速度  $0.25 \text{ h}^{-1}$  が得られ、 $\text{H}_2\text{-CO}_2$  培養 ( $0.035 \text{ h}^{-1}$ ) の 7 倍高かった (表 2-2, p.43)。培養後 27 時間で、生産物の増加がほぼ停止し、33 時間における酢酸生産は  $50.7 \text{ mM}$  に達したが、エタノール生産は検出されなかった。 $\text{H}_2\text{-CO}_2$  培養でエタノール生産が見られ、フルクトース培養では見られなかった原因については、よく分かっていないが、第 3 章で関連酵素、補酵素についての検討を進めた。

フルクトース 1 mol あたりの酢酸生産量を表す  $Y_{P/S}$  は  $2.24 \text{ [mol acetate (mol fructose)}^{-1}]$  と量論式 2-4 から算出された理論値 3.0 と差が見られた。しかし、*M. thermoacetica* のグルコース培養において  $Y_{P/S}=2.55\sim 2.7$  の幅があることが報告されており<sup>30)</sup>、培養条件によって影響を受けているものと考えられる。



#### 第 4 節 要約

HUC22-1 株のエタノール生産は培地成分の Yeast extract 由来ではないことが確認され、 $\text{H}_2\text{-CO}_2$  由来であると推察された。本菌は、 $45\sim 65^\circ\text{C}$ 、 $\text{pH } 4.5\sim 7.5$  で生育可能であり、 $55\sim 60^\circ\text{C}$ 、 $\text{pH } 5.7\sim 6.7$  で最も高い増殖を示した。 $\text{H}_2\text{-CO}_2$  を基質とした典型的な回分培養では、156 時間培養で  $56.7 \text{ mM}$  の酢酸と  $1.5 \text{ mM}$  のエタノールを生産した。一方、フルクトース培養では、エタノール生産は確認されず、 $\text{H}_2\text{-CO}_2$  培養との違いが見られた。

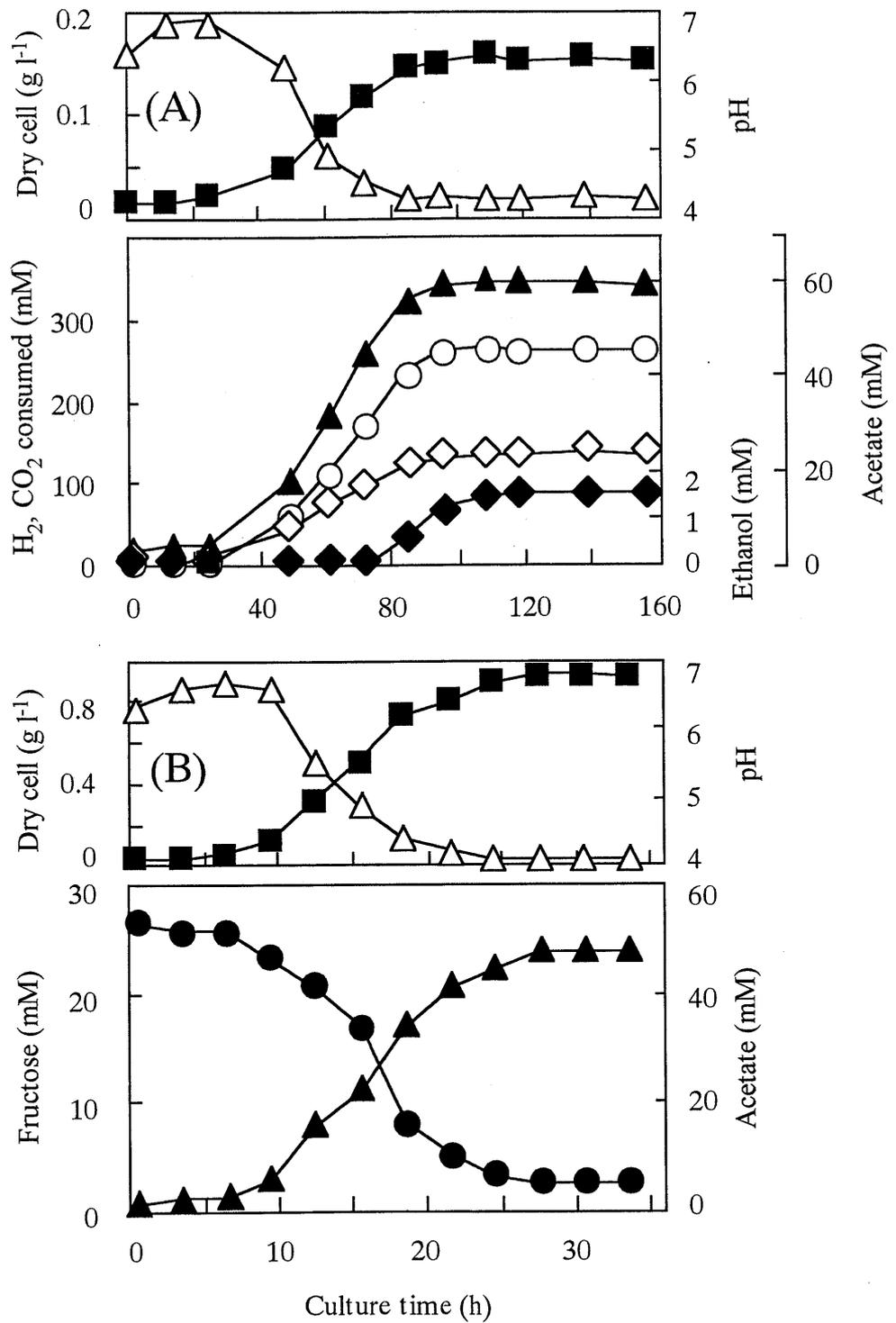


図2-3 HUC22-1株の回分培養における経時変化  
 培養条件, 720 ml バイアルビン, 培養容積 150 ml, 55°C, 初発pH 6.3  
 (A) H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>培養, 0.2MPa, 振とう [135 strokes (min)<sup>-1</sup>].  
 (B) フルクトース培養, 初発フルクトース濃度 27 mM, 静置.  
 ■, 乾燥菌体重量 (g l<sup>-1</sup>); △, pH; ○, H<sub>2</sub>消費量 (mM);  
 ◇, CO<sub>2</sub>消費量 (mM); ▲, 酢酸生産量 (mM); ◆, エタノール生産量 (mM);  
 ●, フルクトース消費量 (mM).

表 2-2 HUC22-1 株における H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> (156 時間培養) 及びフルクトース (33 時間培養) を基質とした回分培養

Substrate	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	Dry cell (g l <sup>-1</sup> )	Substrate (mM)	Product (mM)		$Y_{X/S}^a$ (g mol <sup>-1</sup> )	$Y_{P/S}^b$ (g mol <sup>-1</sup> )	Recovery (%)	
				Acetate	Ethanol			$R_c^c$	$R_e^d$
H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub>	0.035±0.003	0.17±0.02	260±20 (H <sub>2</sub> )	56.7±4.1	1.5±0.2	0.68±0.04 (H <sub>2</sub> )	0.22±0.01 (H <sub>2</sub> )	95±9	92±5
			120±20 (CO <sub>2</sub> )			1.43±0.15 (CO <sub>2</sub> )	0.46±0.04 (CO <sub>2</sub> )		
Fructose	0.25±0.03	0.92±0.06	22.6±2.5	50.7±5.0	N.D.	40.7±1.9	2.24±0.06	75±2	75±2
								104±3°	105±3°

<sup>a</sup> Cell yield for substrate consumed. <sup>b</sup> Acetate yield for substrate consumed. <sup>c</sup> Carbon recovery. <sup>d</sup> Electron recovery.

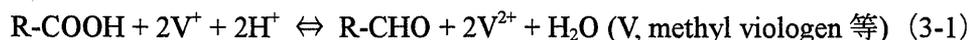
<sup>e</sup> The value was calculated from the cell formula of C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>N<sub>1</sub> and acetate produced. N.D., not detected.

### 第3章 HUC22-1株におけるエタノール生産経路の解析

#### 第1節 緒言

本章では、HUC22-1株の $H_2$ - $CO_2$ からエタノールが生産される経路についての解明を目的として検討を行った。また、 $H_2$ - $CO_2$ 基質下ではエタノールを生産するが、フルクトース基質下ではエタノールを生産しない原因についての考察も行った。これまでに中温性菌を含めた他の酢酸生産菌においても $H_2$ - $CO_2$ からエタノールを生産する経路については詳細には解明されていない。しかし、次の様ないくつかの関連した研究が報告されている。*M. thermoacetica*における放射性同位体を用いた実験では、アセチル-CoA 経路の中間体である methyltetrahydrofolate に由来したエタノール生産が確認されている。このことから酢酸生産菌におけるエタノール生産では、 $H_2$ - $CO_2$ がアセチル-CoA 経路によって利用され、アセチル-CoA を経由し、通常酢酸生産に代謝が進むところを何らかの原因によって一部がアセトアルデヒドを経て、エタノールにまで代謝されているのではないかと考えられた。そして、その経路には、Alcohol dehydrogenase (ADH) と Acetaldehyde dehydrogenase (ACDH) が関与していることが推察された。一方、中温性酢酸生産菌である *A. woodii* においては、グルコースを基質としてリン酸を制限した培地で培養した時にエタノール生産が確認されており、さらに、ADH と ACDH 活性が検出されている<sup>22)</sup>。以上のことから HUC22-1株においても ADH と ACDH によるエタノール生産が行われているのではないかと考え、これら酵素活性の測定を行った。また、ADH と ACDH の補酵素と考えられる Pyridine nucleotide の細胞内プール量についても測定を行った。

*M. thermoacetica* において Aldehyde oxidoreductase/aldehyde dehydrogenase (AOR) の存在が報告されている<sup>70)</sup>。AOR は次式 3-1 の反応を触媒する。



つまり、AOR が存在する場合、酢酸をアセトアルデヒドに変換する反応が起こり、さらに、アセトアルデヒドからエタノールにまで変換される可能性がある。実際、休止菌体系、酵素系を用いた実験では、酢酸からのエタノール生産を含め、十数種の酸をその誘導型のアルコールに変換することが報告されている<sup>25), 71), 72)</sup>。しかし、この反応は、 $CO$ 、 $H_2$ 、ギ酸のいずれかの電子供与体と Methyl viologen 等の人工の電子移動中間体を必要とし、高い還元状態で起こる。また、これまでの報告は、休止菌体系、粗酵素液、あるいは、精製酵素の実験についてのみであり、培養過程において実際に酵素が機能しているかどうかについての知見はないようである。そのため HUC22-1 株の培養において観察されたエタノール生産に関与しているかどうかは

不明である。そこで、本菌においてもAORが存在するかどうかを確認するためAOR酵素活性の測定を行った。

## 第2節 方法

### 3.2.1. 粗酵素液の作製

対数増殖期 ( $H_2$ - $CO_2$ 培養で $OD_{660}$ , 約0.2; フルクトース培養で $OD_{660}$ , 約1.0) まで培養(1.2.2.,p.16)した培養液 ( $H_2$ - $CO_2$ 培養、600 ml、フルクトース培養、100 ml) を3000 x g 10分間、4°Cで遠心して菌体を回収した。Wash buffer (anaerobic 0.5 M potassium phosphate buffer, pH 7.5) で2回洗浄し、沈殿させた菌体を同じbuffer 2 mlに懸濁した。5 ml バイアルビンにLysozyme (Sigma) とTriton X-100 (Sigma) をそれぞれ、 $1\text{ mg ml}^{-1}$ と0.1% (v/v) になるように加え、菌体懸濁液と混合後、 $N_2$ で脱気してシールした。Ti (III) citrateを一滴加え、37°Cで30分間攪拌しながら処理を行った。このリゾチーム処理だけでタンパク質が溶出することが確認された(図3-1)。しかし、さらに、超音波破碎を行うことによってタンパク質濃度が増加したことから以下の超音波処理を行った。処理時間は予め行った予備実験で、タンパク質が十分に抽出された合計2分間の処理時間を採用した(図3-1)。溶解液を2 mlのエッペンチューブ2本に分注し、氷冷しながら超音波破碎機 (VCX-500, Sonics & Materials) を用いて1分間破碎し(1秒破碎、1秒休止のリズム)、1分間の氷冷を繰り返して、計4回の条件で処理を行った(計2分間破碎)。処理した破碎液を20,000 x g, 25分間、4°Cで遠心して未破碎成分を除去し、さらにもう一度遠心して未破碎成分を除去した。上清を回収して粗酵素液とし、次の酵素活性測定とタンパク質濃度測定に用いた。尚、酵素活性測定は粗酵素液を作製したその日に測定を終えるようにした。タンパク質濃度測定分の試料については-20°Cで保存可能とした。上記の操作は、可能な限り $N_2$ 下で嫌氣的に行った。

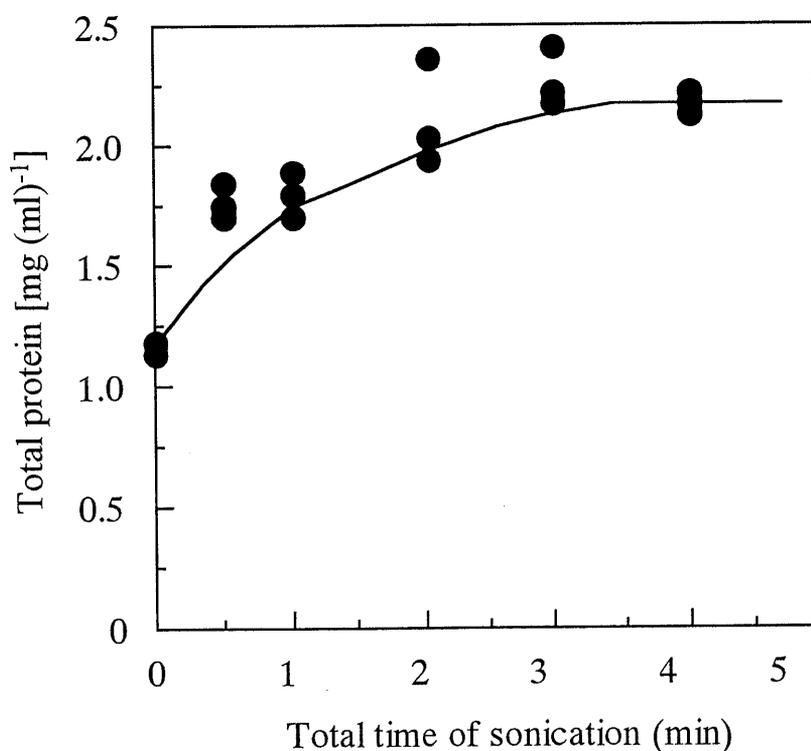
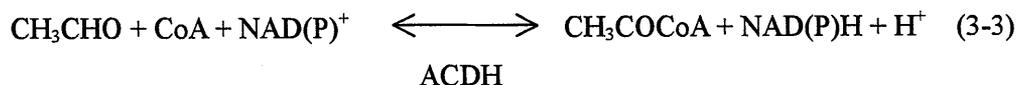
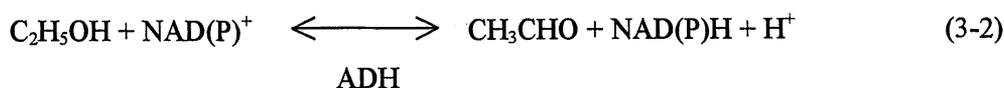


図3-1 超音波破碎における処理時間の検討

### 3.2.2. ADH、ACDH 酵素活性測定

粗酵素液を用いた ADH (EC, 1.1.1.1, 1.1.1.2) と ACDH (EC, 1.2.1.10) の活性測定は、Clark らの方法に従った<sup>73)</sup>。次式 3-2、3-3 のようにこれらの反応は可逆的に反応することから補酵素 NADH、または、NADPH の減少量 (エタノール生産方向) と増加量 (エタノール取り込み方向) を 340 nm の吸光度で測定することによって酵素活性を求めた。それぞれの反応液の組成を表 3-1 (p.47) に示す。N<sub>2</sub> 脱気しながら反応液 3 ml をキャップ付のセルに入れて蓋をし、分光光度計 (UV1600, 島津) を用いて 45°C でインキュベートしながら OD<sub>340</sub> の経時変化を測定し、初発の傾き ( $\Delta OD_{340} \text{ min}^{-1}$ ) を算出した。加熱して失活させた粗酵素液を用いてテストと同様な測定を行い、ブランクとした。本菌は、55~60°C を最適温度とするため酵素活性も同様な温度域を最適とすると考えられた。しかし、用いた反応条件で NADH、NADPH が高い温度下では安定せず、酵素活性の測定への影響が考えられたことから、予め 25、37、45、50、55、60°C で NADH、NADPH の安定性を調べた。その結果、45°C までは比較的安定であったことから酵素活性測定のインキュベーション温度を 45°C とした。



### 3.2.3. タンパク質濃度の測定

粗酵素液中のタンパク質濃度については MilliQ 水で 5 倍~10 倍程度に希釈し、Bradford 法による比色定量 (OD<sub>595</sub>) を行った (Bio-Rad protein assay kit, Bio-Rad)。この方法で用いた色素 Coomassie brilliant blue G-250 は主に塩基性 (特にアルギニン) と芳香族のアミノ酸に結合する。この色素の最大吸光度は、色素がタンパク質と結合すると 465 nm から 595 nm に移動する。また、結合する色素の量はタンパク質の量に比例することから、色素の 595 nm の吸収を測定することによってタンパク質の濃度を求めることができる<sup>74)</sup>。定量のために Bovine serum albumin (BSA) 水溶液 0~0.6 mg ml<sup>-1</sup> を標準タンパク質溶液として測定し検量線を求めた。得られた検量線に当てはめてタンパク質濃度を算出した。

表 3-1 ADH、ACDH 酵素活性測定 of 反応液組成

NAD(P) <sup>+</sup> reduction-ADH (Ethanol→Acetaldehyde)	
0.1 M Pyrophosphate buffer, pH 8.5	1 ml
1 mM NAD <sup>+</sup> or NADP <sup>+</sup> (Sigma)	0.5 ml
3% (v/v) Ethanol (0.52 M)	0.5 ml
1 M Dithiothreitol	3 μl
Cell free extract	0.1-0.2 ml
MilliQ water	0.8-0.9 ml
	3 ml
NAD(P)H oxidation-ADH (Acetaldehyde→Ethanol)	
0.1 M potassium phosphate buffer, pH 6.2	1 ml
1 mM NADH or NADPH (Sigma)	0.5 ml
3% (v/v) Acetaldehyde (0.68 M)	0.5 ml
1 M Dithiothreitol	3 μl
Cell free extract	0.1-0.2 ml
MilliQ water	0.8-0.9 ml
	3 ml
NAD(P) <sup>+</sup> reduction-ACDH (Acetaldehyde + CoA→Acetyl-CoA)	
0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.5	0.8-0.9 ml
1 mM NAD <sup>+</sup> or NADP <sup>+</sup> (Sigma)	0.5 ml
3% (v/v) Acetaldehyde (0.68 M)	0.5 ml
5 mM CoA (Sigma)	1 ml
1 M Dithiothreitol	3 μl
Cell free extract	0.1-0.2 ml
	3 ml
NAD(P)H oxidation-ACDH (Acetyl-CoA→Acetaldehyde + CoA)	
0.1 M potassium phosphate buffer, pH 6.2	0.8-0.9 ml
1 mM NADH or NADPH (Sigma)	0.5 ml
5 mM Acetyl-CoA	1 ml
1 M Dithiothreitol	3 μl
MilliQ water	0.5 ml
Cell free extract	0.1-0.2 ml
	3 ml

### 3.2.4. 酵素活性の算出

得られた吸光度の初発の直線部分の傾きより反応の初速度  $\Delta OD_{340} \text{ min}^{-1}$  を求めた。次に、同様に算出したブランクにおける反応初速度を差し引き、酵素反応の初速度とした。基質濃度が十分に高い場合、初速度と酵素量は比例することから NAD(P)H の 340 nm におけるモル吸光係数 ( $\epsilon_{340}=6.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) を用いて酵素量を算出した。酵素 1 単位 (unit) は、1 分間に 1  $\mu\text{mol}$  の NAD(P)H を生産、または、消費する酵素量を 1 unit として定義される。つまり、次式 3-4 のように  $\Delta OD_{340} \text{ min}^{-1}$  を  $\epsilon_{340}$  で割り、さらに反応液量 (3 ml) あたりに換算して、酵素量 (Unit) を求めた。さらに、粗酵素液中のタンパク質 1 mg 当たりの Unit に換算した比活性 [ $\text{unit (mg of protein)}^{-1}$ ] を求めて比較した。上記反応条件下で  $\Delta OD_{340} \text{ min}^{-1}$  が 0.1 の時、使用した酵素液量を 0.1 ml (2 mg of protein  $\text{ml}^{-1}$ ) とすると 0.238 unit (mg of protein) $^{-1}$  となる。

$$\begin{aligned} \text{酵素比活性 } [\text{unit (mg of protein)}^{-1}] &= \Delta OD_{340} \text{ min}^{-1} \times \frac{1}{\epsilon_{340}} \times \frac{\text{反応液量}}{1000} \times 1000 \\ &\times \frac{1}{\text{タンパク質濃度} \times \text{使用酵素液量}} \quad (3-4) \end{aligned}$$

### 3.2.5. 細胞内 Pyridine nucleotide の抽出

細胞内 Pyridine nucleotide の抽出は Wimpenny らの方法に従った<sup>75)</sup>。対数増殖期 ( $\text{H}_2\text{-CO}_2$  培養で  $\text{OD}_{660}$  約 0.2、フルクトース培養で  $\text{OD}_{660}$  約 1.0) まで培養(1.2.2., p.16) した培養液 ( $\text{H}_2\text{-CO}_2$  培養: 200 ml、フルクトース培養: 100 ml) を  $\text{N}_2$  下で遠心 (10,000 rpm, 5 分間,  $4^\circ\text{C}$ ) して菌体を回収した。2 ml の MilliQ water に懸濁後、1 ml ずつを  $\text{NAD}^+$ 、 $\text{NADP}^+$ 測定用と  $\text{NADH}$ 、 $\text{NADPH}$  測定用に使用した。また、培養液の菌体濃度を  $\text{OD}_{660}$  で測定し、Dry cell weight を求めた (1.2.6., p.18)。

#### (1) $\text{NAD}^+$ 、 $\text{NADP}^+$ の抽出

1 ml の細胞懸濁液に 0.1 M  $\text{HCl}$  0.5 ml を少しずつ加え、 $\text{N}_2$  で置換後、 $55^\circ\text{C}$  で 10 分間インキュベートした。氷水中で  $0^\circ\text{C}$  まで冷却後、0.1 M  $\text{NaOH}$  約 0.65 ml を少しずつ加えて中和した (pH メーターで確認)。遠心 (12,000 rpm, 5 分間,  $4^\circ\text{C}$ ) によって得られた上清を測定に用いた。

#### (2) $\text{NADH}$ 、 $\text{NADPH}$ の抽出

1 ml の細胞懸濁液に 0.5 M  $\text{KOH}$  0.5 ml を少しずつ加え、 $\text{N}_2$  で置換後、 $55^\circ\text{C}$  で 10 分間インキュベートした。氷水中で  $0^\circ\text{C}$  まで冷却後、0.5 M  $\text{HCl}$ -0.25 M phosphate buffer 約 0.45 ml を少しずつ加えて中和した (pH メーターで確認)。2 mg protein  $\text{ml}^{-1}$  の Glutamate dehydrogenase [in 2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  soln, from Beef liver, Roche]  $50\ \mu\text{l}$  と 1 M 2-Oxoglutamate (in 1 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , pH 7.0)  $50\ \mu\text{l}$  を加え、室温で 15 分間反応させた ( $\text{NADH} \rightarrow \text{NAD}^+$ 、 $\text{NADPH} \rightarrow \text{NADP}^+$  に変換する)。3 M  $\text{HCl}$   $50\ \mu\text{l}$  を加え、遠心 (12,000 rpm, 5 分間,  $4^\circ\text{C}$ ) 後に、得られた上清を 3N  $\text{NaOH}$  約  $45\ \mu\text{l}$  で中和したものを測定に用いた。

### 3.2.6. 細胞内 Pyridine nucleotide の測定

細胞内 Pyridine nucleotide の測定は Klingenberg らの方法に従った<sup>76)</sup>。抽出した  $\text{NAD}^+$ 、 $\text{NADP}^+$  について蛍光分光光度計 (FP770, 日本分光) を用い、励起波長 365 nm、蛍光測定波長 450 nm、室温で測定した。また、 $\text{NADH}$ 、 $\text{NADPH}$  の測定は、変換した  $\text{NAD}^+$ 、 $\text{NADP}^+$  を同じ方法で測定した。

#### (1) $\text{NAD}^+$ の測定

$\text{NAD}^+$  の測定は、上清 0.25 ml ~ 1.0 ml を MilliQ 水で 1.0 ml になるように希釈し、0.1 M Pyrophosphate buffer, pH 8.5 (contained semicarbazide hydrochloride,  $5\ \text{g}\ \text{l}^{-1}$ ) 1.0 ml と 100% エタノール  $10\ \mu\text{l}$  をセルに加え、2~5 分後に安定した蛍光強度 (F1) を測定した。次に、1.2 mg protein  $\text{ml}^{-1}$  の Alcohol dehydrogenase [in 3.2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  soln, Roche] を  $10\ \mu\text{l}$  加え、2~5 分後に安定した蛍光強度 (F2) を測定した。さらに、0.5 mM  $\text{NAD}^+$  標準液を  $10\ \mu\text{l}$  加え、2~5 分後に安定した蛍光強度 (F3) を測定した。 $\text{NAD}^+$  の濃度は以下の式 3-5 で算出した。

$$\begin{aligned} \text{NAD}^+ [\mu\text{mol (g dry cell)}^{-1}] &= \frac{(F2-F1)}{(F3-F2)} \times 500 (\mu\text{mol l}^{-1}, \text{NAD}^+ \text{ standard}) \\ &\times \frac{10 (\mu\text{l}, \text{NAD}^+ \text{ standard})}{\text{Sample } (\mu\text{l})} \times \frac{2.1 (\text{ml})}{\text{Cuture volume (ml)}} \times \frac{1}{\text{Dry cell (g l}^{-1})} \quad (3-5) \end{aligned}$$

## (2) NADP<sup>+</sup>の測定

NADP<sup>+</sup>の測定は、上清 0.25 ml~1.0 ml を MilliQ 水で 2.0 ml に希釈し、1 M MgSO<sub>4</sub> 10 μl と 0.2M D-glucose 6-phosphate (オリエンタル酵母) 50 μl をセルに加え、2~5 分後に安定した蛍光強度 (F1) を測定した。次に、2 mg protein ml<sup>-1</sup> の Glucose-6-phosphate dehydrogenase [in 3.2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> soln, from Yeast, オリエンタル酵母] を 10 μl 加え、2~5 分後に安定した蛍光強度 (F2) を測定した。さらに、0.5 mM NADP<sup>+</sup>標準液を 10 μl 加え、2~5 分後に安定した蛍光強度 (F3) を測定した。NADP<sup>+</sup>の濃度は、以下の式 3-6 で算出した。

$$\begin{aligned} \text{NADP}^+ [\mu\text{mol (g dry cell)}^{-1}] &= \frac{(F2-F1)}{(F3-F2)} \times 500 (\mu\text{mol l}^{-1}, \text{NADP}^+ \text{ standard}) \\ &\times \frac{10 (\mu\text{l}, \text{NADP}^+ \text{ standard})}{\text{Sample } (\mu\text{l})} \times \frac{2 (\text{ml})}{\text{Cuture volume (ml)}} \times \frac{1}{\text{Dry cell (g l}^{-1})} \quad (3-6) \end{aligned}$$

### 3.2.7. AOR 酵素活性測定

3.2.1. (p.45)に従って粗酵素液を作製し、3.2.2. (p.46)と同様に吸光光度計を用いて45°Cで、AOR 酵素活性を測定した。反応液の組成を表 3-2 に示す。アセトアルデヒドから酢酸への反応は、Benzyl viologen の還元反応としてOD<sub>578</sub>の増加で測定した。1 unit は1分間に2  $\mu$  mol の Benzyl viologen が還元される酵素量と定義され、 $\epsilon_{578}=8.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を用いて3.2.4. (p.48)と同様に比活性を算出した。

逆反応の酢酸からアセトアルデヒドへの反応は、Sodium dithionite で予め還元した Methyl viologen の酸化反応を OD<sub>604</sub>の減少で測定した。1 unit は1分間に2  $\mu$  mol の Methyl viologen が酸化される酵素量と定義され、 $\epsilon_{604}=13.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を用いて3.2.4. (p.48)と同様に比活性を算出した。

表 3-2 AOR 酵素活性測定の反応液組成

Acetaldehyde $\rightarrow$ Acetate	
0.3 M Tris-HCl buffer (pH 8.5)	1 ml
60 mM Benzyl viologen	0.1 ml
50 mM Sodium dithionite	15-20 $\mu$ l
15 mM Acetaldehyde	0.1 ml
MilliQ water	1.7 ml
Cell free extract	0.1 ml
	3 ml

Acetate $\rightarrow$ Acetaldehyde	
0.9 M Potassium phosphate buffer (pH 6.0)	1 ml
0.6 M Semicarbazide	0.1 ml
0.12 M Methyl viologen	0.2 ml
50 mM Sodium dithionite	0.1 ml
15 mM Sodium acetate (pH 6.0)	0.1 ml
MilliQ water	1.4 ml
Cell free extract	0.1 ml
	3 ml

### 第3節 結果及び考察

#### 3.3.1. $H_2$ - $CO_2$ 培養、フルクトース培養における ADH、ACDH 活性の比較

HUC22-1 株の  $H_2$ - $CO_2$  からのエタノール生産経路の解析と  $H_2$ - $CO_2$  培養の方がフルクトース培養よりもエタノール生産が高い要因を検討するために ADH、ACDH 活性の測定を行った (表 3-3, p.53)。まず、ADH に関して、 $H_2$ - $CO_2$  培養の粗酵素液を用いた酵素活性を測定した結果、NADH と NADPH に依存したアセトアルデヒドからエタノールへの還元反応が確認され、それぞれ、 $53.2 \text{ mU (mg of protein)}^{-1}$  と  $37.0 \text{ mU (mg of protein)}^{-1}$  であった。フルクトース培養の粗酵素液を用いた同じ反応では、 $H_2$ - $CO_2$  培養の時と比べて、それぞれ、約 15 倍、約 3 倍低い活性となった。一方、逆方向の  $NAD^+$ 、 $NADP^+$  依存的にエタノールをアセトアルデヒドに酸化する反応については、 $H_2$ - $CO_2$  培養の粗酵素液を用いた結果、それぞれ、逆反応の約 5 倍、約 6 倍低い結果となった。一方、フルクトース培養においては、両方向の反応ともに同じ程度であった。ここで、 $NAD^+$ 、 $NADP^+$  に依存したエタノールの酸化反応 (エタノール取り込み方向) に対する NADH、NADPH に依存したアセトアルデヒドの還元反応 (エタノール生産方向) の比を算出すると、 $H_2$ - $CO_2$  培養でそれぞれ、6、4.9 とアセトアルデヒドの還元反応の方向にシフトしていることが分かった。一方、フルクトース培養でそれぞれ、0.8、1.6 と差が小さい結果となった。

次に、ACDH 活性に関して、 $H_2$ - $CO_2$  培養の粗酵素液を用いた結果、NADH に依存したアセチル-CoA からアセトアルデヒドへの還元反応の活性は、 $74 \text{ mU (mg of protein)}^{-1}$  を示した。一方、フルクトース培養においては、 $9.3 \text{ mU (mg of protein)}^{-1}$  と低い値になった。一方、逆方向の  $NAD^+$  依存的にアセトアルデヒドを酸化する反応については、 $H_2$ - $CO_2$  培養の粗酵素液を用いた結果、逆反応の約 5 倍低い結果となった。一方、フルクトース培養においては、約 2 倍高い結果となり違いが見られた。ここで、 $NAD^+$  に依存したアセトアルデヒドの酸化反応 (エタノール取り込み方向) に対する NADH に依存したアセチル-CoA の還元反応 (エタノール生産方向) の比を算出すると、 $H_2$ - $CO_2$  培養で 5.2 とアセチル-CoA の還元反応の方向にシフトしていることが分かった。一方、フルクトース培養では 0.5 と差の小さい結果となった。以上の ADH 及び ACDH の結果から両方の反応において、 $H_2$ - $CO_2$  培養ではエタノール生産側に反応がシフトしている結果となった。そのため、 $H_2$ - $CO_2$  培養の方がフルクトース培養よりエタノール生産に有利であることが推察された。

表 3-3 H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養及びフルクトース培養における ADH、ACDH 酵素活性

Enzyme	Specific enzyme activity [mU (mg of protein) <sup>-1</sup> (means ± SD)]	
	after grown on	
	H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub>	Fructose
<b>ACDH</b>		
Acetaldehyde + NAD <sup>+</sup> + CoA → Acetyl-CoA + NADH + H <sup>+</sup>	14.4 ± 0.5	17.3 ± 2.2
Acetyl-CoA + NADH + H <sup>+</sup> → Acetaldehyde + NAD <sup>+</sup> + CoA	74.6 ± 5.7	9.3 ± 1.6
<b>ADH</b>		
Ethanol + NAD <sup>+</sup> → Acetaldehyde + NADH + H <sup>+</sup>	8.8 ± 1.9	4.4 ± 0.5
Ethanol + NADP <sup>+</sup> → Acetaldehyde + NADPH + H <sup>+</sup>	7.6 ± 3.3	8.4 ± 0.4
Acetaldehyde + NADH + H <sup>+</sup> → Ethanol + NAD <sup>+</sup>	53.2 ± 1.2	3.5 ± 1.1
Acetaldehyde + NADPH + H <sup>+</sup> → Ethanol + NADP <sup>+</sup>	37.0 ± 7.8	13.1 ± 2.7
<b>Ratio</b>		
NADH-dependent ACDH <sup>a</sup>	5.2	0.5
NADH-dependent ADH <sup>b</sup>	6.0	0.8
NADPH-dependent ADH <sup>c</sup>	4.9	1.6

<sup>a</sup>The ratio of NADH-dependent acetyl-CoA reduction to NAD<sup>+</sup>-dependent acetaldehyde oxidation

<sup>b</sup>The ratio of NADH-dependent acetaldehyde reduction to NAD<sup>+</sup>-dependent ethanol oxidation

<sup>c</sup>The ratio of NADPH-dependent acetaldehyde reduction to NADP<sup>+</sup>-dependent ethanol oxidation

Cells were grown in a serum bottle at 55 °C to an OD<sub>660</sub> of 0.2 with H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> or 1.0 with fructose. Values represent the averages of at least triplicate determination.

### 3.3.2. H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養、フルクトース培養における Pyridine nucleotide の細胞内プール量の比較

HUC22-1 株の H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> からのエタノール生産経路の解析と H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養の方がフルクトース培養よりもエタノール生産が高い要因を検討するために ADH、ACDH の補酵素と考えられる Pyridine nucleotide の細胞内プール量を測定した (表 3-4, p.54)。Pyridine nucleotide の細胞内プール量については、NADH と NAD<sup>+</sup> の合計プール量が H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養で 2.09 μmol (g dry cell)<sup>-1</sup>、フルクトース培養では 7.54 μmol (g dry cell)<sup>-1</sup> となり、フルクトース培養の方が 3.6 倍高かった。NADPH と NADP<sup>+</sup> の合計プール量については、H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養で 1.0 μmol (g dry cell)<sup>-1</sup>、フルクトース培養では 1.59 μmol (g dry cell)<sup>-1</sup> となり、フルクトース培養の方がやや高かった。しかし、NADH/NAD<sup>+</sup> と NADPH/NADP<sup>+</sup> の存在比に関しては、H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養でそれぞれ、0.75、2.33、フルクトース培養でそれぞれ 0.19、1.21 となり H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養の方がフルクトース培養よりもそ

れぞれ、約4倍、2倍高くなっていた。このように細胞内補酵素の還元型の存在比が高くなっていることは、*Thermoanaerobacter ethanolicus* 39Eにおいても報告されており、その原因としては、ヘッドスペース部分の高いH<sub>2</sub>分圧によると考えられている<sup>77)</sup>。また、*C. acetobutylicum* や *E. coli* などでも細胞内補酵素の還元型の存在比が高いことによってエタノールやアセトン、ブタノールなどの生産が上昇することが報告されている<sup>78), 79)</sup>。以上のことからH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>培養におけるADH、ACDHの高い酵素活性と細胞内の高い還元状態が、フルクトース培養よりも高いエタノール生産の要因になっているのではないかと推察された。

表 3-4 H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>培養、フルクトース培養における Pyridine nucleotide の細胞内プール量

Substrate	Content in cells [ $\mu\text{mol (g dry cell)}^{-1}$ (means $\pm$ SD)]				Ratio	
	NAD <sup>+</sup>	NADH	NADP <sup>+</sup>	NADPH	NADH/ NAD <sup>+</sup>	NADPH/ NADP <sup>+</sup>
H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub>	1.19 $\pm$ 0.25	0.90 $\pm$ 0.13	0.33 $\pm$ 0.09	0.77 $\pm$ 0.11	0.75	2.33
Fructose	6.35 $\pm$ 0.50	1.19 $\pm$ 0.14	0.72 $\pm$ 0.23	0.87 $\pm$ 0.21	0.19	1.21

Cells were grown in a serum bottle at 55 °C to an OD<sub>660</sub> of 0.2 with H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> or 1.0 with fructose. Values represent the averages of at least triplicate determination.

### 3.3.3. H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>培養、フルクトース培養における AOR 酵素活性の比較

HUC22-1株においてもAORの酵素活性が確認された(表3-5, p.55)。H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>培養におけるアセトアルデヒドから酢酸への反応では、30.4 mU (mg of protein)<sup>-1</sup>、酢酸からアセトアルデヒドへの反応では、54.6 mU (mg of protein)<sup>-1</sup>が得られた。低いながらも酵素活性が検出されたことからHUC22-1株においても*M. thermoacetica*と同様にAORの存在が示唆された。酵素反応の方向については、酢酸からアセトアルデヒドへの反応が、逆反応よりも約1.8倍高かった。しかし、3.3.1. (p.52)で行ったADH、ACDHのように反応の方向性で明確な差は見られなかったことから、どちらの方向にも働いている可能性が示唆された。フルクトース培養におけるアセトアルデヒドから酢酸への反応では、22.7 mU (mg of protein)<sup>-1</sup>、酢酸からアセトアルデヒドへの反応では、40.3 mU (mg of protein)<sup>-1</sup>が得られた。これは、H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>培養で得られた値と同じ程度であり、3.3.1. (p.52)で検討したADH、ACDHのようにH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>培養とフルクトース培養で差が生じた結果とは異なっていた。

AORは酢酸からアセトアルデヒドへの変換を触媒すると考えられている。しかし、高い還元状態と人工的な電子移動中間体を必要とすること、反応の進みにくい系であること、増殖に伴う系では機能することが確認されていないことからAORの系は、

HUC22-1 株の増殖過程におけるエタノール生産についての本体ではないと考えられる。

表 3-5 H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養及びフルクトース培養における AOR 酵素活性

AOR	Specific enzyme activity [mU (mg of protein) <sup>-1</sup> (means ± SD)] after growth on	
	H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub>	Fructose
	Acetaldehyde + 2BV <sup>2+</sup> + OH <sup>-</sup> → Acetate + 2 BV <sup>+</sup> + 2H <sup>+</sup>	30.4 ± 5.4
Acetate + 2MV <sup>+</sup> + 2H <sup>+</sup> → Acetaldehyde + 2MV <sup>2+</sup> + OH <sup>-</sup>	54.6 ± 6.5	40.3 ± 2.1

Cells were grown in a serum bottle at 55°C to an OD<sub>660</sub> of 0.2 with H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> or 1.0 with fructose. Values represent the averages of at least triplicate determination.

#### 3.3.4. ADH、ACDH、AOR の遺伝子情報

現在、HUC22-1 株の近縁菌 *M. thermoacetica* ATCC39037 株について USA の The DOE Joint Genome Institute (JGI, <http://www.jgi.doe.gov/index.html>) によってゲノム解析が進められている。2003 年 9 月から公開されているゲノムアノテーションの結果では、3 個の ADH と推定される遺伝子配列と 1 個の ACDH と推定される遺伝子配列の存在が報告されている (表 3-6, p.57)。その中でも好熱性嫌気性菌 *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW200 の NADPH-dependent 1° Fe-ADH や *T. tengcongensis* の 1°ADH と同源性のあった ADH (Contig 307, gene 2290) と *Desulfitobacterium hafniense* の推定遺伝子と同源性のあった ACDH (Contig 297, gene 1386) がエタノール生産に関与しているのではないかと考えた。そこで、当研究室の猪熊によって HUC22-1 株からの単離が試みられ、両遺伝子ともクローニングに成功した。HUC22-1 株から単離された ADH の塩基配列に基づくアミノ酸配列は *M. thermoacetica* で報告されているものと全く同じであり、HUC22-1 株が *M. thermoacetica* であることの裏づけとなった。さらに、大腸菌を使ったタンパク質発現系を用い、クローニングした ADH、ACDH のタンパク質高発現が行われた。精製された酵素活性を測定した結果、ADH は NADPH に依存した酵素活性が、ACDH は主に NADH に依存した酵素活性が確認された。

これまでに好熱性嫌気性菌の ADH については NADPH を補酵素とするものが多く報告されている<sup>80), 81)</sup>。今回、猪熊によって単離された ADH は NADPH を補酵素として利用するタイプであると考えられるので、この酵素が HUC22-1 株のエタノール代謝経路において機能している可能性が高いと推察される。しかし、エタノールの

取り込み側に働く酵素である可能性もあることから、さらに詳細な酵素の機能解析が必要である。また、ACDH に関しては情報が少ないため、よく分からないのが現状である。一方で、*T. ethanolicus* の NADPH-dependent 2° ADH はアセトアルデヒドからエタノールへの反応とアセチル-CoA から直接エタノールに変換する反応も触媒することが報告されており<sup>82)</sup>、HUC22-1 株においても ADH 単独でアセチル-CoA からエタノールへの反応が起きている可能性も考えられる。

本研究において粗酵素液を用いた AOR 活性が低いながら確認された。AOR についても *M. thermoacetica* ATCC 39073 で推定される遺伝子配列の存在が報告されている (表 3-6, p.57)。そして、以前に報告された精製 AOR タンパク質から決定された部分アミノ酸配列との一致が確認されている<sup>70)</sup>。現在、当研究室の喜多によってこの酵素系の利用を想定して、休止菌体系を用いた酢酸からのエタノール生産を検討している。そして、ギ酸を電子供与体、メチルビオロゲンを電子移動中間体として用いた時にエタノールが生産される結果が得られている。AOR の系は、我々が HUC22-1 株で見たエタノール生産には関与していないと考えられる。しかし、酢酸をエタノールに変換できる酵素系として広く応用できると考えられることから、興味深いタンパク質であると思われる。

#### 第 4 節 要約

HUC22-1 株の粗酵素液を用いた検討によって NADH 及び NADPH に依存した ADH、ACDH 酵素活性がそれぞれ検出された。このことから本菌は、アセチル-CoA からアセトアルデヒドを経て、エタノールまで還元する経路によってエタノールを生産している可能性が示唆された。H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養では、エタノール生産方向の活性がエタノール取り込み方向の活性よりも高かった。一方、フルクトース培養では両方向で差が見られなかった。さらに、エタノール生産方向の活性については、H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養の方がフルクトース培養よりも高い結果となった。一方、ADH と ACDH の補酵素と考えられる Pyridine nucleotide の細胞内プール量を調べたところ、フルクトース培養の方が H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養よりも合計プール量は小さかった。しかし、H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養の方がフルクトース培養よりも NADH/NAD<sup>+</sup>、NADPH/NADP<sup>+</sup> の比率が高かった。このことから H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養とフルクトース培養におけるエタノール生産の違いには、酵素活性のレベル、補酵素の酸化還元バランスの影響が示唆された。

一方、本菌において AOR 酵素活性も検出された。この酵素については H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養とフルクトース培養では大きな差は見られず、また、酵素反応の方向性でも大きな差は見られなかった。この酵素の詳細な機能については今後の解析が必要である。

表 3-6 *M. thermoacetica* ATCC 39073 のゲノム解析から予想される

ADH、ACDH、AOR 遺伝子

Enzyme	Gene number	Best hit gene (Blast research)
<b>ADH</b>		
Fe-containing alcohol dehydrogenase	Contig 295 Gene 1247	Hypothetical protein [ <i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405]
<b>Fe-containing alcohol dehydrogenase</b>	<b>Contig 307 Gene 2290</b>	<b>Alcohol dehydrogenase [<i>Thermococcus hydrothermalis</i>]</b>
Zn-binding dehydrogenase	Contig 309 Gene 2706	Alcohol dehydrogenase [ <i>Oceanobacillus iheyensis</i> HTE831]
<b>ACDH</b>		
<b>Acetaldehyde dehydrogenase</b>	<b>Contig 297 Gene 1386</b>	<b>Hypothetical protein [<i>Desulfitobacterium halfhiense</i>]</b>
<b>AOR</b>		
Aldehyde ferredoxin oxidoreductase	Contig 262 Gene 107	Aldehyde ferredoxin oxidoreductase [ <i>Pyrococcus furiosus</i> DSM 3638]

The DOE Joint Genome Institute, USA (JGI, <http://www.jgi.doe.gov/index.html>)

のデータベースより抜粋.

## 第2部 酢酸阻害の解析、培養条件の改良によるエタノール及び酢酸の高生産化

### 第4章 HUC22-1株の酢酸及びエタノール阻害の解析

#### 第1節 緒言

酢酸などの有機酸が様々な微生物の増殖を阻害することはよく知られている<sup>83)</sup>。溶液中において酢酸は、解離型と非解離型に分かれ、その存在比はpHに依存している。つまり、pKaより低いpH条件では、非解離型の酢酸が増加し、逆にpKaより高いpHでは解離型の酢酸が増加する。これまでに微生物の増殖を阻害する本体は、非解離型の酢酸であることが多く報告されている<sup>84)-88)</sup>。つまり、酢酸濃度の増加とpHの低下によって阻害の程度が大きくなっていく。これは、非解離型の酢酸のみが細胞膜を通過することから説明されている。実際、HUC22-1株のH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>(図2-3A, p.42)、または、フルクトースの回分培養(図2-3B, p.42)では、培養液のpHが4.5以下まで低下しており、生産される酢酸とpH低下による増殖阻害が観察されている。そこで、本菌のエタノール及び酢酸の高生産化を目指すためには、まず酢酸阻害についての詳細を明らかにする必要があると考えた。

HUC22-1株の類縁菌である*M. thermoacetica*において、初期pHを7.0とし、グルコースを基質として培養を行ったところ、非解離型の酢酸濃度が40から50 mM (pH 7.0の時、解離型、非解離型の合計濃度で0.8 M)に達した時に、増殖が完全に阻害されることが報告されている<sup>89)</sup>。また、当研究室においても以前に、*M. thermoacetica* 1745 (ATCC 31490) についてグルコース基質阻害モデル式と非拮抗阻害モデル式を組み合わせることで解析を行った結果、阻害定数 $K_p$ は非解離型酢酸濃度として0.22 mMと算出された<sup>90)</sup>。しかし、これらは、グルコース培養の結果であり、我々の知る限りでは、これまでに*Moorella*属のH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>培養下での酢酸による阻害については、詳細な解析が行われていない。そのため、本研究では、HUC22-1株について培養pHと酢酸蓄積の両方を考慮して増殖に及ぼす影響を検討した。検討には、以前に当研究室の中島田によって考案された、pH阻害モデル式と非拮抗阻害モデル式を組み合わせるモデル式を用いて解析を行った<sup>91)</sup>。

一方、HUC22-1株のエタノール耐性については、1.3.1. (p.23)で簡単に検討を行った。しかし、今後、本菌のエタノール生産への利用を考える上で、必要な情報になることが予想されるため本章で改めて詳細な解析を行った。

## 第2節 方法

### 4.2.1. 酢酸耐性試験

酢酸と pH が増殖に与える影響を調べるために、予め各 pH に調整した酢酸ナトリウムを 2~240 mM になるように添加し、それぞれの酢酸濃度で pH 5.3、5.5、5.7、6.4 に調整したものを作製した。これらを用いて H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>、または、フルクトースを基質として回分培養 (1.2.2., p.16) を行い、比増殖速度を求めた (2.2.3., p.35)。

### 4.2.2. 酢酸による増殖阻害のモデル解析

酢酸による増殖阻害は、酵素反応における非拮抗阻害現象と類似しており、モデル式を用いて解析することが可能である<sup>92)</sup>。本実験においては、pH と複合させた影響を調べるため中島田が提案した pH 阻害モデル式と組み合わせた非拮抗阻害モデル式を用いた<sup>91)</sup>。式の詳細は、4.3.1. (p.60)、4.3.2. (p.63)を参照。

### 4.2.3. エタノール耐性試験

H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> とフルクトース基質の両方で、初期 pH を 6.3 とし、エタノールを添加した条件で回分培養 (1.2.2., p.16) を行い、比増殖速度を求めた (2.2.3., p.35)。エタノール添加の条件は、終濃度が H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養で、0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5% (v/v)、フルクトース培養で 0、0.5、1、2、3、4、5、6、7% (v/v) になるように添加して比較した。

### 4.2.4. エタノール添加条件下での Pyridine nucleotide の細胞内プール量の測定

エタノール添加の条件は、終濃度が H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養で、0、0.5、1.5% (v/v)、フルクトース培養で 0、0.5、4.0% (v/v) になるように添加した。それぞれの基質で培養し(1.2.2., p.16)、増殖期 (H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養で OD<sub>660</sub>、0.2、フルクトース培養で OD<sub>660</sub>、1.0) における Pyridine nucleotide の細胞内プール量を測定した。測定の方法は、3.2.5. (p.49)、3.2.6. (p.49)に従った。

### 第3節 結果及び考察

#### 4.3.1. 培養 pH が増殖に及ぼす影響

最初に、酢酸を添加せず、pH のみの効果について検討した。pH は  $H^+$  濃度で示した。H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養では、初発  $H^+$  濃度を  $4.0 \times 10^{-8}$  M (pH 7.4)、 $4.0 \times 10^{-7}$  M (pH 6.4)、 $2.0 \times 10^{-6}$  M (pH 5.7)、 $5.0 \times 10^{-6}$  M (pH 5.3)、 $1.0 \times 10^{-5}$  M (pH 5.0) として、バイアルビンを用いた回分培養を行い、それぞれの比増殖速度を求めた (図 4-1A, p.61)。一方、フルクトース培養では、初発  $H^+$  濃度を  $1.0 \times 10^{-7}$  M (pH 7.0)、 $4.0 \times 10^{-7}$  M (pH 6.4)、 $2.0 \times 10^{-6}$  M (pH 5.7)、 $3.2 \times 10^{-6}$  M (pH 5.5)、 $5.0 \times 10^{-6}$  M (pH 5.3) として、バイアルビンを用いて回分培養を行い、それぞれの比増殖速度を求めた (図 4-2A, p.62)。得られたデータを次式で示す pH 阻害モデル式で解析を行った。

$$\mu = \frac{\mu_{\max}}{K_1/[H^+] + 1 + [H^+]/K_2} \quad (4-1)$$

$\mu$  : 比増殖速度 ( $h^{-1}$ )、 $\mu_{\max}$  : 最大比増殖速度 ( $h^{-1}$ )、 $[H^+]$  : 培地中の  $H^+$  濃度 (M)、 $K_1$  : プロトンの飽和定数 (M)、 $K_2$  : プロトンの阻害定数 (M)

グラフ作製ソフト Kaleida graph の Data-fitting 機能を使って、得られた比増殖速度のデータを式 4-1 に代入させてシミュレーションを行い、図 4-1A (p.61)、4-2A (p.62) のグラフ線を求めた。グラフ線は、データ点とよく一致しており、このシミュレーションが適当であると判断された。H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養 (図 4-1A, p.61) において比増殖速度は、 $4.8 \times 10^{-7}$  M (pH 6.3) まで増加が見られ、以降  $H^+$  が増加するに従って低下した。シミュレーションから  $\mu_{\max}=0.042 h^{-1}$ 、 $K_1=6.5 \times 10^{-9}$  M、 $K_2=3.6 \times 10^{-5}$  M が得られた (表 4-1)。フルクトース培養 (図 4-2A, p.62) も H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養と同様に、比増殖速度は、 $4.3 \times 10^{-7}$  M (pH 6.4) まで増加が見られ、以降  $H^+$  が増加するに従って低下した。シミュレーションから  $\mu_{\max}=0.26 h^{-1}$ 、 $K_1=3.0 \times 10^{-8}$  M、 $K_2=6.0 \times 10^{-6}$  M が得られた (表 4-1)。

表 4-1 HUC22-1 株の  $H^+$  及び酢酸阻害に関する定数

Substrate	Constant				
	$\mu_{\max}^a$ ( $h^{-1}$ )	$K_1^b$ (M)	$K_2^c$ (M)	$K_p^d$ (mM)	$n^e$ (-)
H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub>	0.042	$6.5 \times 10^{-9}$	$3.6 \times 10^{-5}$	$6.2^f$ (164 <sup>g</sup> )	1.5
Fructose	0.26	$3.0 \times 10^{-8}$	$6.0 \times 10^{-6}$	$4.1^f$ (108 <sup>g</sup> )	1.3

<sup>a</sup> The maximum specific growth rate, <sup>b</sup> The saturation constant of proton,

<sup>c</sup> The inhibition constant of proton, <sup>d</sup> The inhibition constant of undissociated acetic acid,

<sup>e</sup> The exponent of inhibition, <sup>f</sup> Undissociated acetic acid concentration.

<sup>g</sup> Total acetate concentration at pH 6.2 (pKa=4.795, 55 °C)<sup>90</sup>.

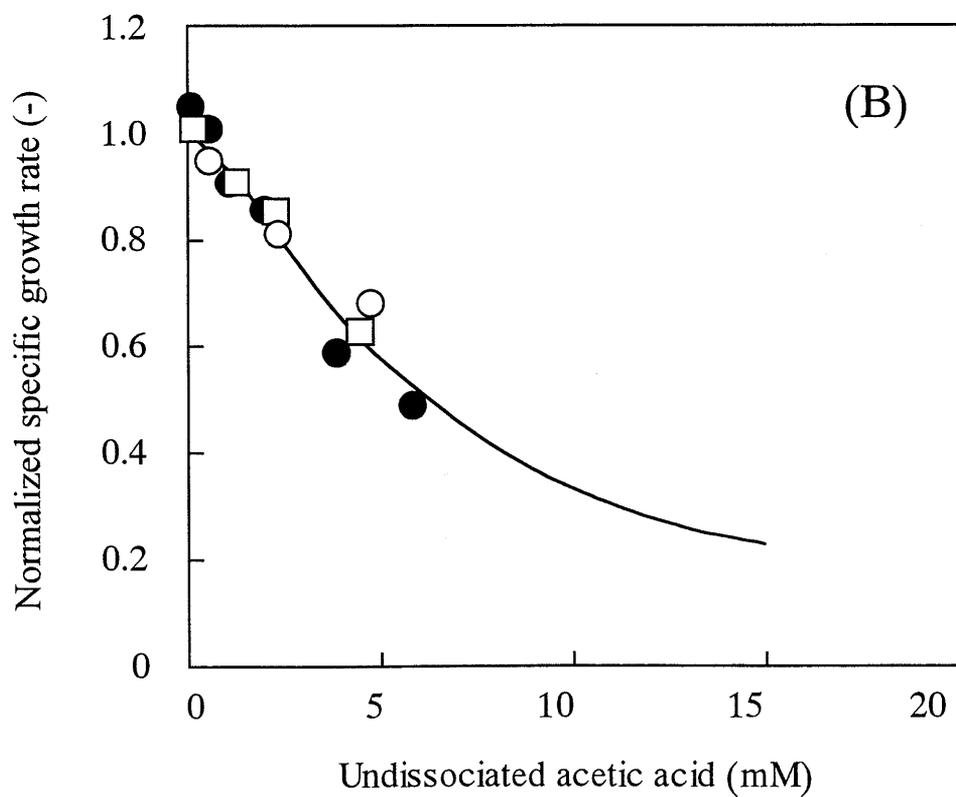
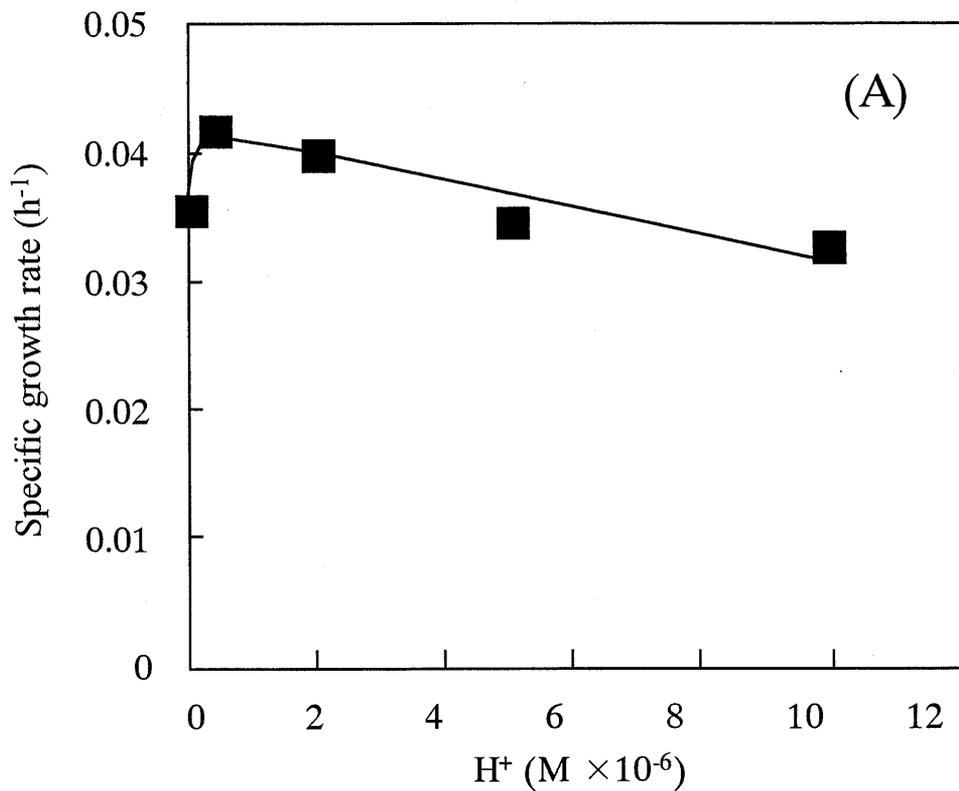


図 4-1  $H_2$ - $CO_2$  培養における水素イオン (A) 及び非解離型酢酸 (B) の増殖に及ぼす影響  
 (A) ■, 水素イオン濃度 (M).  
 (B) ○, pH 5.3; □, pH 5.7; ●, pH 6.4.  
 (A) のグラフ線は式4-1 (p.60) から求めた.  
 (B) のグラフ線は式4-7 (p.64) から求めた.

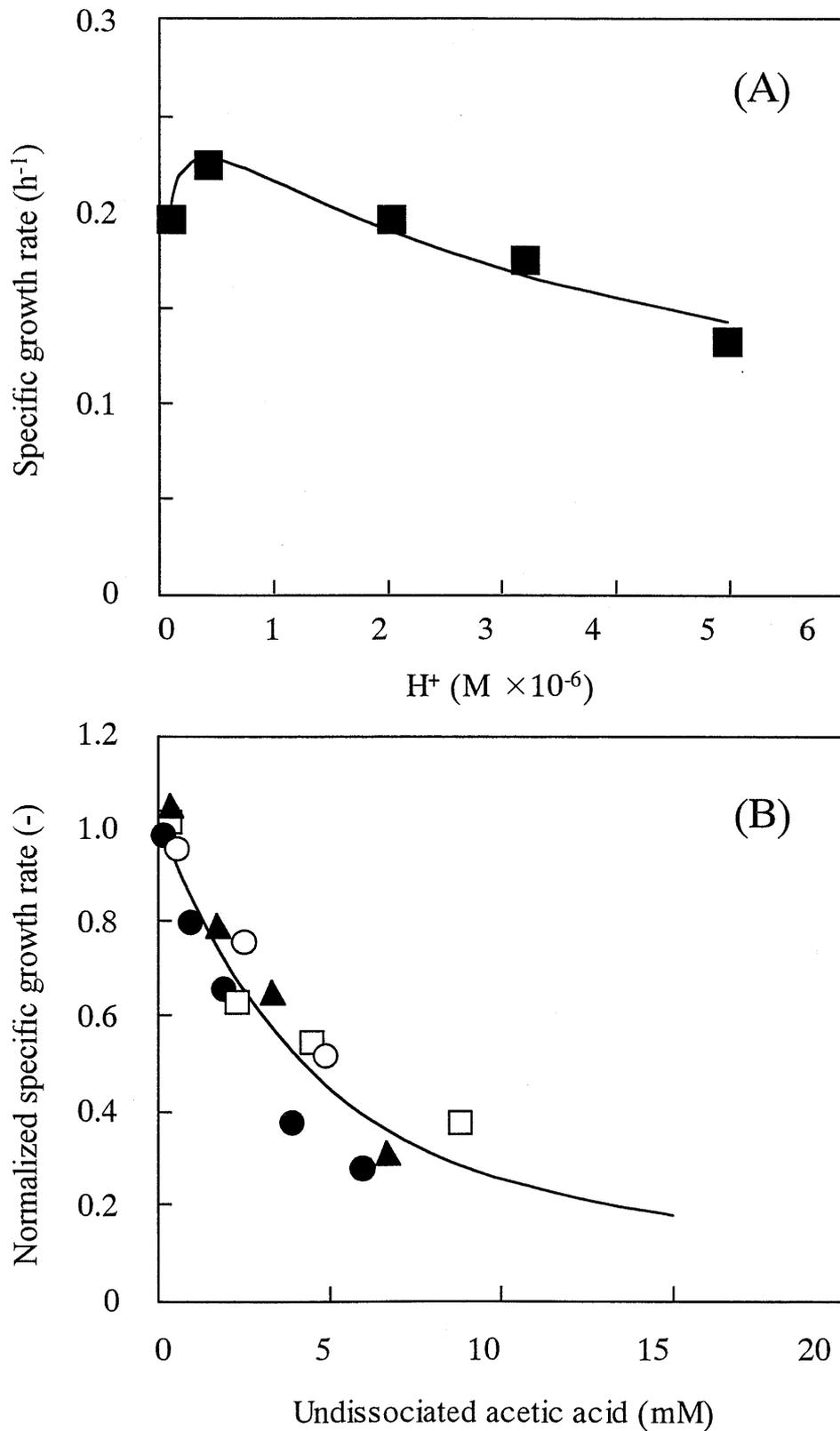


図 4-2 フルクトース培養における水素イオン (A) 及び非解離型酢酸 (B) の増殖に及ぼす影響  
 (A) ■, 水素イオン濃度 (M).  
 (B) ○, pH 5.3; ▲, pH 5.5; □, pH 5.7; ●, pH 6.4.  
 (A) のグラフ線は式4-1 (p.60) から求めた。  
 (B) のグラフ線は式4-7 (p.64) から求めた。

#### 4.3.2. 培養 pH と非解離型酢酸が増殖に及ぼす影響

解離型、非解離型の合計酢酸濃度は、次式 4-2 のように表現される。

$$[C_p] = [HAc] + [Ac^-] \quad (4-2)$$

$[C_p]$  : 合計酢酸濃度 (mM)、 $[HAc]$  : 非解離型酢酸濃度 (mM)、  
 $[Ac^-]$  : 解離型酢酸濃度 (mM)

解離型酢酸濃度、非解離型酢酸濃度は pH 条件、つまりヒドロニウムイオン濃度の間で平衡状態にあり、次のような平衡式 4-3 が成り立つ。

$$\frac{[Ac^-] \cdot [H_3O^+]}{[HAc]} = K_a \quad (4-3)$$

$K_a$  : 酢酸の解離定数、 $[H_3O^+]$  : ヒドロニウムイオン濃度 (mM)

式 4-2 より

$$[Ac^-] = [C_p] - [HAc] \quad (4-4)$$

式 4-4 を式 4-3 に代入することによって非解離型酢酸濃度  $[HAc]$  を次式 4-5 (Henderson-Hasselbalch 式) により求めることができる。

$$[HAc] = \frac{[C_p] \cdot [H_3O^+]}{K_a + [H_3O^+]} = \frac{[C_p] \cdot 10^{-pH}}{K_a + 10^{-pH}} \quad (4-5)$$

次に、非解離型酢酸の増殖に及ぼす影響を pH も考慮して考察するために非拮抗型生産物阻害モデル式と pH 阻害モデル式を組み合わせ用いた。次式 4-6 のように表せる。

$$\mu = \frac{\mu_{max}}{K_1/[H^+] + 1 + [H^+]/K_2} \times \frac{1}{1 + ([HAc]/K_p)^n} \quad (4-6)$$

$[HAc]$  : 実験時の pH 下での非解離型酢酸濃度 (mM)、  
 $K_p$  : 阻害定数 (mM、非解離型酢酸濃度)、 $n$  : 阻害次数 (-)

式 4-6 を以下のように変形した。

$$\mu_n = \frac{1}{1 + ([\text{HAc}]/K_p)^n} \quad (4-7)$$

$\mu_n$  : 式 4-1 より導かれた次式 4-8 を用いて換算した比増殖速度 (—)

$$\mu_n = \frac{\mu}{\mu_{\max}} (K_1/[\text{H}^+] + 1 + [\text{H}^+]/K_2) \quad (4-8)$$

Henderson-Hasselbalch 式 (式 4-5) を用い、 $\text{pK}_a=4.795$  ( $55^\circ\text{C}$ )<sup>90)</sup>として算出した非解離型酢酸濃度と  $\mu_n$  の関係を図 4-1B (p.61)、図 4-2B (p.62)に示した。グラフ作製ソフト Kaleida graph の Data-fitting 機能を使って、得られた  $\mu_n$  のデータを式 4-7 に代入させてシミュレーションを行い、図 4-1B (p.61)、図 4-2B (p.62)のグラフ線を求めた。グラフ線は、データ点に沿って収束しており、このシミュレーションが適当であると判断された。シミュレーションから  $\text{H}_2\text{-CO}_2$  培養では非解離型酢酸濃度で表される阻害定数  $K_p=6.2$  mM (解離型、非解離型酢酸の合計濃度として 164 mM)と阻害次数  $n=1.5$  (—) が得られた (表 4-1, p.60)。フルクトース培養では阻害定数  $K_p=4.1$  mM (解離型、非解離型酢酸の合計濃度として 108 mM)と阻害次数  $n=1.3$  (—) が得られた (表 4-1, p.60)。

初発酢酸濃度に対する比増殖速度の関係をまとめて  $\text{H}_2\text{-CO}_2$  培養、フルクトース培養でそれぞれのグラフを作製した (図 4-3A, p.65、図 4-3B, p.65)。前述のシミュレーションによって得られた表 4-1 (p.60)の定数をグラフ作製ソフト Kaleida graph の Data-fitting 機能を使って式 4-6 に代入し、シミュレーションを行った結果、図 4-3A、B (p.65)に示すグラフの線が得られた。グラフ線は、データ点によく一致しており、このシミュレーションが適当であると判断された。以上の結果より本菌の  $\text{H}_2\text{-CO}_2$  培養、フルクトース培養ともに、pH 5.3 から pH 6.4 の範囲において非解離型の酢酸が阻害の本体であり、増殖を強く阻害していることが示された。また、阻害次数  $n$  は  $\text{H}_2\text{-CO}_2$  培養とフルクトース培養の両方で同じ程度であったのに対して、阻害定数  $K_p$  は  $\text{H}_2\text{-CO}_2$  培養の方がフルクトース培養よりも約 1.5 倍高い結果となった。このことから  $\text{H}_2\text{-CO}_2$  培養の方がフルクトース培養よりも高い濃度の酢酸に対して耐性を示すのではないかと推察された。

表 4-2 (p.66)では、HUC22-1 株と他の微生物における非解離型有機酸の阻害定数を示した。HUC22-1 株は他の微生物と比較して高い値を示し、本菌が他の微生物よりも高い非解離型有機酸に対する耐性を持つのではないかと考えられた。一般的に、細胞内における非解離型有機酸による阻害のメカニズムについてはいくつかの説明が報告されている。例えば、遊離したプロトンによる脱分極作用<sup>83)</sup>、低い pH による DNA へのダメージ<sup>93)</sup>、陽イオンの蓄積による代謝反応の阻害<sup>94)</sup>、そして、遊離した陽イオンによる細胞膜の破

壊<sup>95)</sup>などが考えられている。しかしながら、現在のところ、HUC22-1株がなぜ高い非解離型酢酸耐性を示すのか、なぜ、 $H_2-CO_2$ 培養とフルクトース培養で耐性が異なるのかについては明確にはなっていない。

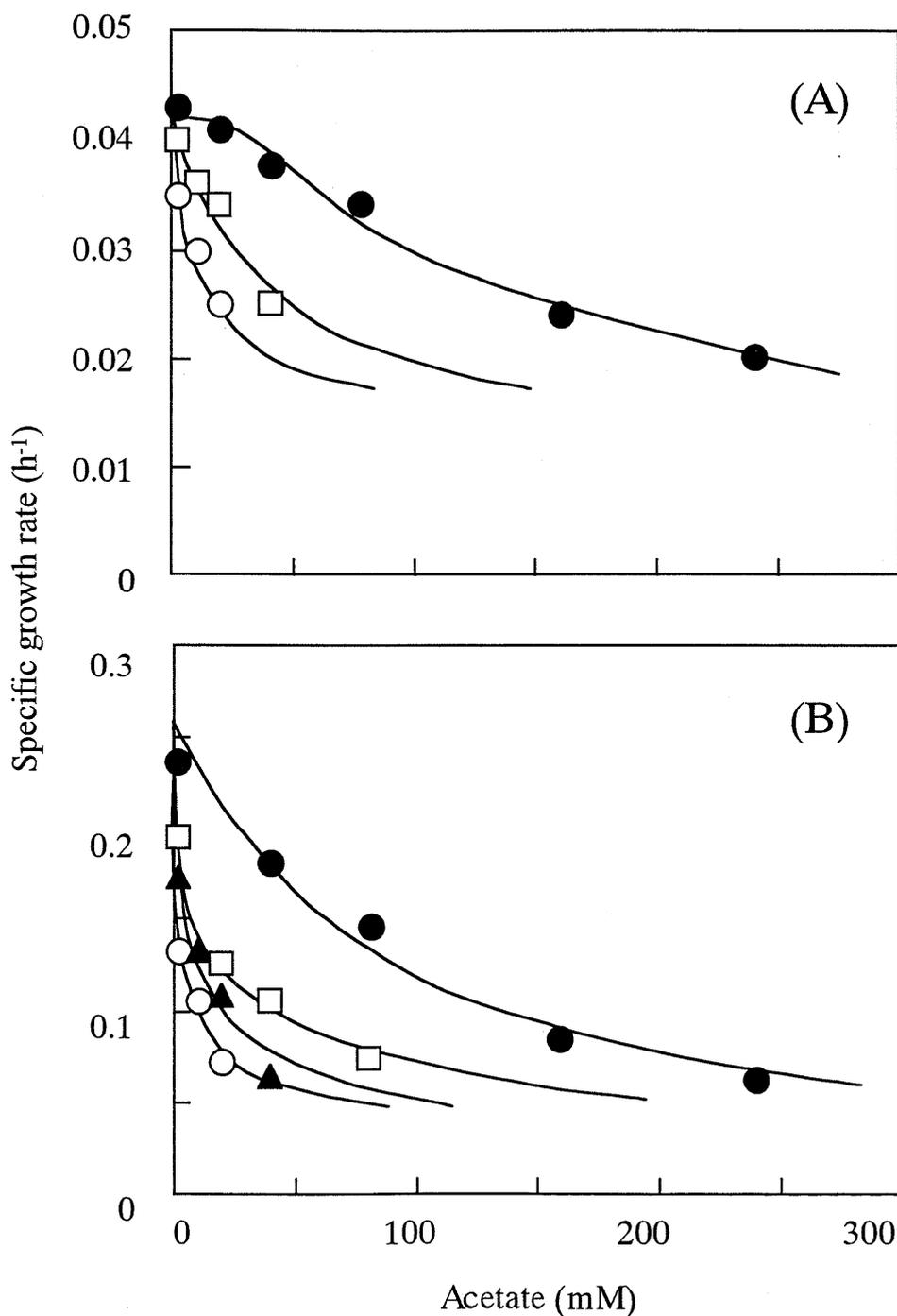


図 4-3 各pH条件下における酢酸添加による増殖への影響  
 (A)  $H_2-CO_2$ 培養, (B) フルクトース培養.  
 ○, pH 5.3; ▲, pH 5.5; □, pH 5.7; ●, pH 6.4.  
 (A), (B) のグラフ線は式4-6 (p.63)から求めた。

表 4-2 HUC22-1 株と他の細菌における非解離型有機酸の阻害定数の比較

Organism	Substrate	Acid type	pH	$K_p^a$ , $K_{iu}^b$ , $K_{ic}^c$ (mM)	Reference
<i>Moorella</i> sp. HUC22-1	H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub>	Acetate	5.3-6.4	6.2 <sup>a</sup>	This study
	Fructose	Acetate	5.3-6.4	4.1 <sup>a</sup>	This study
<i>M. thermoacetica</i> ATCC 31490	Glucose	Acetate	7.1	0.22 <sup>a</sup>	90
<i>Acetobacterium</i> sp. strain 69	Methanol-CO <sub>2</sub>	Acetate	7.2	0.84 <sup>a</sup>	85
<i>Clostridium formicoaceticum</i> ATCC 27076	Lactate	Acetate	7.0-7.6	0.76 <sup>a</sup>	87
<i>Pyrococcus furiosus</i> DSM 3638	Starch	Acetate	5.9-6.9	0.69 <sup>a</sup>	91
<i>Neocallimastix frontalis</i> ATCC 76100	Glucose	Acetate	6.8	0.73 <sup>a</sup>	96
<i>Streptococcus mutans</i> R9	Glucose	Acetate	6.0	4.24 <sup>b</sup> , 4.55 <sup>c</sup>	88
	Glucose	Lactate	5.5	4.45 <sup>b</sup> , 2.28 <sup>c</sup>	88
<i>Propionibacterium shermanii</i> PZ3	Glucose	Propionate	5.2-6.8	2.0 <sup>a</sup>	84

<sup>a</sup> The inhibition constant of undissociated organic acid ( $K_p$  in non-competitive inhibition model).

<sup>b</sup> The inhibition constant of undissociated organic acid ( $K_{iu}$  in uncompetitive inhibition model).

<sup>c</sup> The inhibition constant of undissociated organic acid ( $K_{ic}$  in competitive inhibition model).

#### 4.3.3. 添加したエタノールが増殖に及ぼす影響

バイアルピンをを用いた回分培養によって  $H_2$ - $CO_2$  培養、フルクトース培養におけるエタノール耐性を検討した。 $H_2$ - $CO_2$  培養では、エタノール濃度 1.5% (v/v) まで生育が見られた (図 4-4A, p.69)。一方、フルクトース培養では、エタノール濃度 5% (v/v) まで生育が見られ、 $H_2$ - $CO_2$  培養の方が低い結果となった (図 4-4B, p.69)。本菌と同じような好熱性嫌気性細菌で、糖やセルロースからエタノールを生産する菌についてのエタノール耐性が報告されており、*T. ethanolicus* 39E においてエタノール濃度が 2% (v/v) 以下<sup>97)</sup>、*C. thermocellum* ATCC27405 において 1.6% (v/v) 以下<sup>98)</sup> であり、他の菌においても 2~4% (v/v) とされている。これらの値と比較するとフルクトースで培養した HUC22-1 株は、比較的エタノール耐性の高いことが考えられた。そして、本菌はエタノール生産への利用に有利ではないかと推察された。一方、 $H_2$ - $CO_2$  培養の生育限界はエタノール濃度が 1.5% (v/v) 程度であり、前述の糖やセルロース資化性菌と変わらない結果であった。なぜ、 $H_2$ - $CO_2$  培養とフルクトース培養でエタノール耐性に差が生じたかについてはよく分かっておらず、今後の検討が必要である。

#### 4.3.4. エタノール添加による Pyridine nucleotide の細胞内プールへの影響

HUC22-1 株の  $H_2$ - $CO_2$  培養とフルクトース培養においてエタノール耐性に違いが生じた原因については明確には分かっていない。一方、糖から主にエタノールを生産する *T. ethanolicus* の場合、外部エタノール濃度の増加に伴って外部エタノールの取り込みが増加し、取り込み型の ADH による過剰なエタノールの酸化が、補酵素 Pyridine nucleotide の酸化還元バランスを崩すために高濃度のエタノールでは増殖できないことが報告されている<sup>77)</sup>。そこで、HUC22-1 株についてもエタノール存在下で培養した場合の補酵素 Pyridine nucleotide の酸化還元バランスについて検討を行った。

フルクトース培養において、エタノール濃度を 0、0.5、および生育限界付近の 4% (v/v) まで増加して比較したところ、補酵素 Pyridine nucleotide の酸化型、還元型の合計濃度は一定に保たれていた (図 4-5B, p.70)。しかし、NADH/NAD<sup>+</sup> と NADPH/NADP<sup>+</sup> の比率がエタノール濃度の増加にしたがって上昇する傾向が見られた。これは、*T. ethanolicus* で考えられているエタノール阻害機構と同様な機構を持っている可能性が考えられた。一方、 $H_2$ - $CO_2$  培養においても補酵素の酸化型、還元型の合計濃度は一定に保たれていた (図 4-5A, p.70)。しかし、補酵素の酸化型、還元型の比率はほとんど変動が見られなかった。このことからフルクトース培養では、エタノール添加によって補酵素の酸化型、還元型の比率が変動しても生育が可能である、もしくは、元々、還元型の比率が低いため比率を上昇させても生育が可能であることが考えられた。さらに、 $H_2$ - $CO_2$  培養では、比率の変動に対する感受性が高いため、高いエタノール濃度では生育できない、もしくは、元々、還元型の比率が高いためそれ以上に比率を上昇させることができないため生育できないという可

能性も考えられた。さらに、これには、 $H_2$ - $CO_2$  培養とフルクトース培養での補酵素の合計プール量の違いも関与しているかもしれない。以上の結果だけでは、補酵素の細胞内プールの違いが、 $H_2$ - $CO_2$  培養とフルクトース培養におけるエタノール耐性の違いに関係があるのかは不明であり、今後の検討が必要である。

#### 第4節 要約

培養 pH と酢酸蓄積が増殖に及ぼす影響について  $H_2$ - $CO_2$  培養とフルクトース培養で詳細な検討を行った。その結果、両基質において比増殖速度が酢酸濃度の増加に伴って低下することが示された。特に、pH 酸性側においては阻害が顕著に見られた。pH 阻害モデル式と複合させた非拮抗阻害モデル式を用いた解析では、非解離型酢酸が酢酸阻害の本体であることが示された。また、非解離型酢酸の阻害定数と阻害次数を算出し、阻害定数については、 $H_2$ - $CO_2$  培養の方がフルクトース培養よりも高いことを見出した。

外部エタノールが増殖に及ぼす影響について検討を行った結果、 $H_2$ - $CO_2$  培養の方がフルクトース培養よりも耐性が低かった。また、 $H_2$ - $CO_2$  培養では、エタノールを添加しても  $NADH/NAD^+$ 、 $NADPH/NADP^+$  の比率は変化しなかったが、フルクトース培養では、比率が高くなる傾向が見られた。

#### <使用記号一覧>

$[Ac^-]$  : 解離型酢酸濃度 (mM)

$[C_p]$  : 解離型と非解離型の合計酢酸濃度 (mM)

$[H^+]$  : 培地中の水素イオン濃度 (M)

$[HAc]$  : 非解離型酢酸濃度 (mM)

$[H_3O^+]$  : ヒドロニウムイオン濃度 (mM)

$K_a$ 、 $pK_a$  : 解離定数

$K_{ic}$  : 非解離型有機酸の阻害定数 (mM、拮抗阻害モデル)

$K_{iu}$  : 非解離型有機酸の阻害定数 (mM、拮抗阻害モデル)

$K_p$  : 非解離型有機酸の阻害定数 (mM、非拮抗阻害モデル)

$K_1$  : 水素イオンの飽和定数 (M)

$K_2$  : 水素イオンの阻害定数 (M)

$n$  : 阻害次数 (—)

$\mu$  : 比増殖速度 ( $h^{-1}$ )

$\mu_{max}$  : 最大比増殖速度 ( $h^{-1}$ )

$\mu_n$  : Normalized specific growth rate (—)

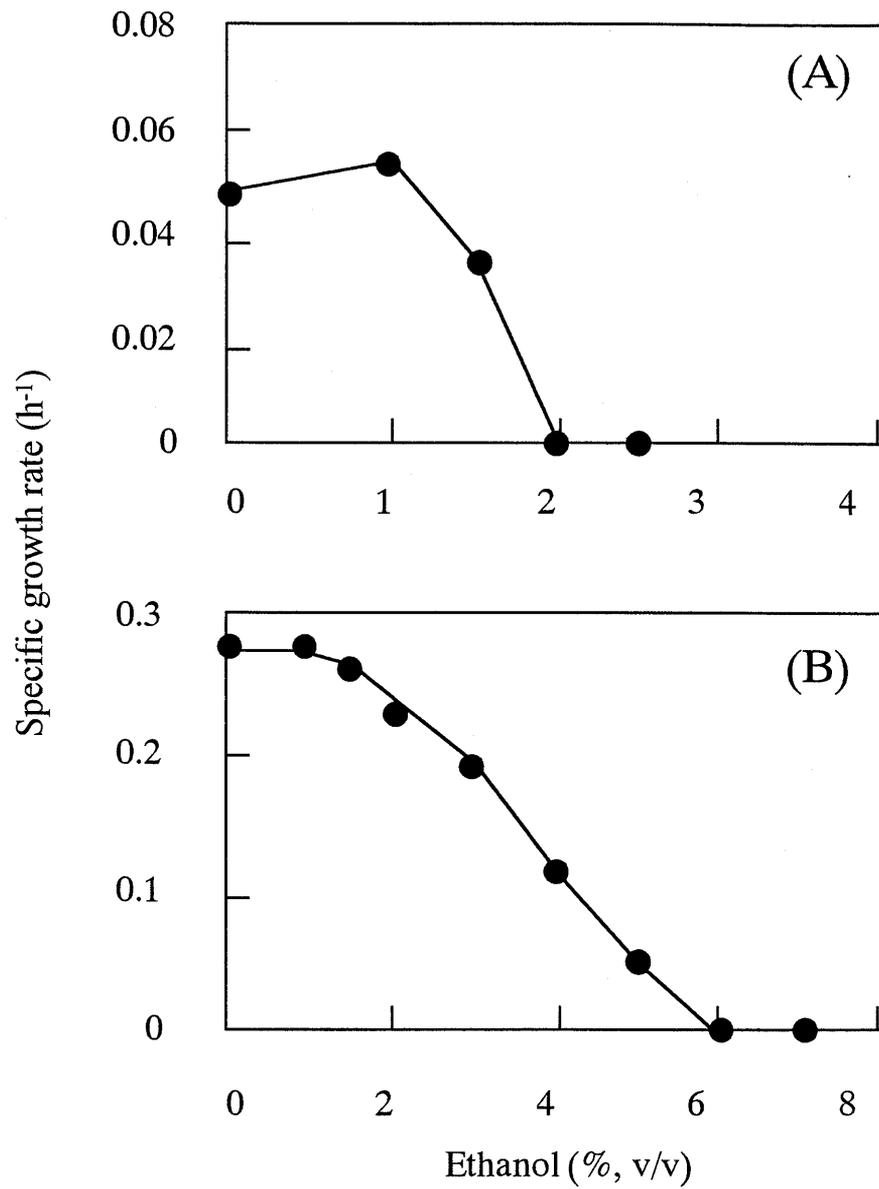


図 4-4 エタノール添加による増殖への影響  
 (A) H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>培養, (B) フルクトース培養.

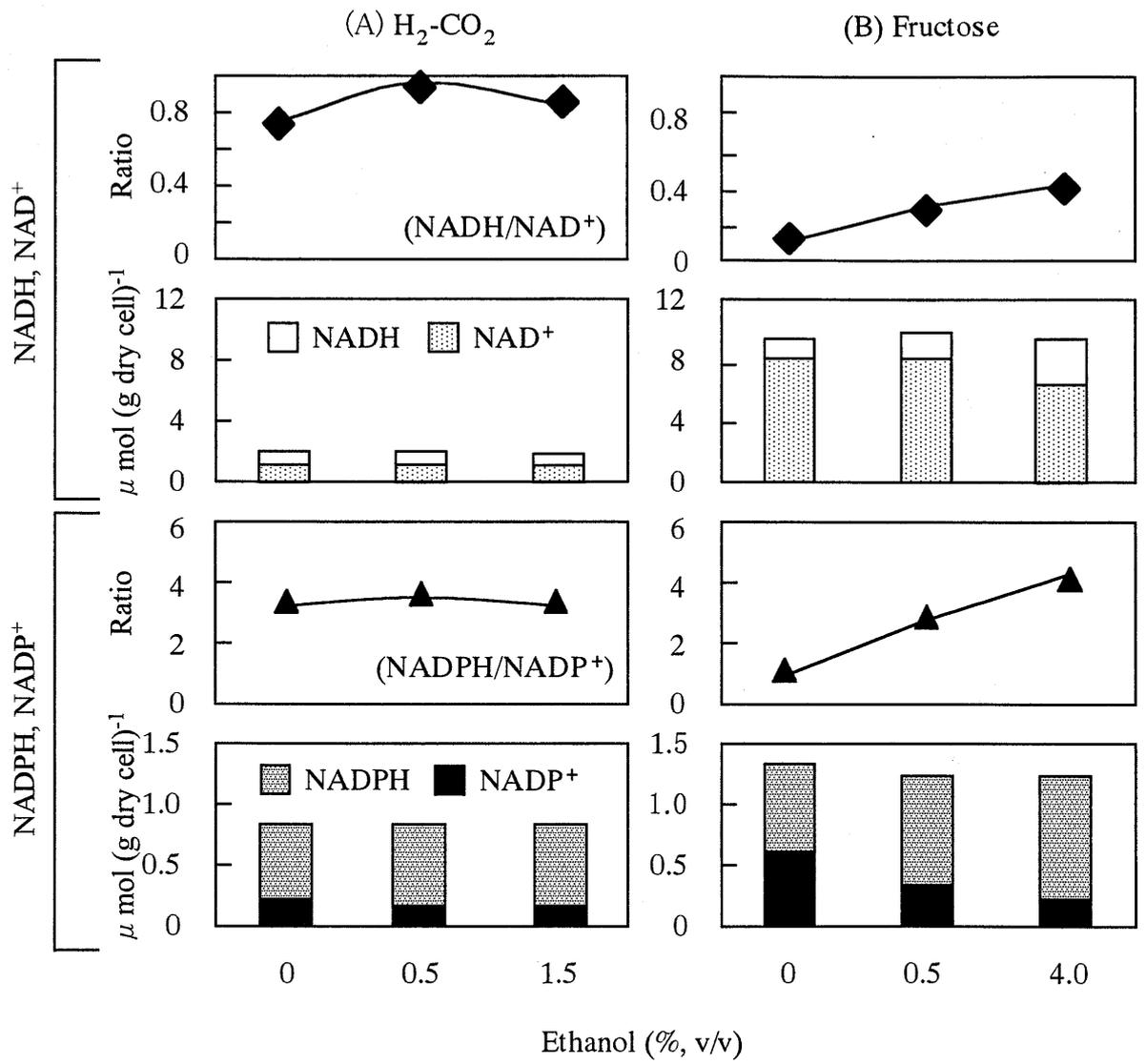


図 4-5 エタノール添加によるPyridine nucleotideの細胞内プール量への影響  
(A) H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>培養, (B) フルクトース培養.

## 第5章 培養条件の検討による酢酸及びエタノールの高生産化

### 第1節 緒言

第4章では、非解離型の酢酸によってHUC22-1株の増殖が強く阻害されることが確認された。これまでに、非解離型の有機酸による増殖阻害を防止するためには、pHが低下しないように制御して培養を行う方法が多く採用されている<sup>30), 89), 99)</sup>。そこで、本研究においてもpH制御及び基質ガスの連続供給が可能なリアクターシステムを構築し、酢酸及びエタノール生産に最適なpHをそれぞれ検討した。さらに、決定した最適pHで、菌体の回収・再利用を伴う反復回分培養を検討した。この培養操作によって培地中の酢酸濃度の増加を防止し、菌体増殖、酢酸及びエタノール生産の向上を目指した。

### 第2節 方法

#### 5.2.1. リアクターを用いたH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>培養

装置全体の概略図を図5-1 (p.72)に、写真を図5-2 (p.73)に示す。リアクターによる培養には、1-LのJar fermentor (MJ-1, Able)を用い、培養容積を500 mlとして55°Cで培養した。外部ガス貯蔵槽として両口Tedlar<sup>®</sup> bag (DD形式10 L, 5 L, GLサイエンス)を用い、入口と出口の2箇所をPharmed<sup>®</sup>チューブ (Tygon<sup>®</sup>, OD: 6 mm, ID: 4 mm, Saint-Gobain performance plastics corporation)でJar-fermentorと接続した。基質ガスの循環は、H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>混合ガスを充填したTedlar<sup>®</sup> bagからJar-fermentorへRoller pump (302S, Watson-Malow limited)を用いて60 ml min<sup>-1</sup>の速度で基質ガスを送り込み、Cellulose acetate hydrophilic filter (Dismic-25, Advantec, 東洋濾紙)を通してJar-fermentor下部より培地中に吹き込んだ。Jar-fermentorの攪拌速度を500 rpmに設定し、基質ガスを培地に巻き込むようにした。基質ガスは自然にJar-fermentorの出口から流出させ、培地の蒸発を防ぐため流出口には、冷却管を取り付けた。次に、飽和NaCl溶液30 mlの入ったメスシリンダー (シリコン栓で密閉)を通過させ、再びTedlar<sup>®</sup> bagに戻るよう設定した。pH測定は、発酵用pH電極 (F-615, Broadley James)とDigital pH controller (MPH-3C, ミツワバイオシステム)を用いて行い、Digital pH controllerにPerista pump (SJ-1211, アトー)を接続して、自動制御で2 M HCl、あるいは、2 M NaOHを流入させてpHを制御した。ORPの測定は、発酵用ORP電極 (PS-827D, 東亜)とDigital ORP controller (MOR-3C, ミツワバイオシステム)を用いて行った。

H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>を基質として対数増殖期まで増殖させた前培養液を15% (v/v)で植菌した (1.2.2., p.16)。培養中には、Tedlar<sup>®</sup> bagの基質ガスの残存量とガス組成を随時確認し、24時間毎に新しいガスに交換した。また、培養液の泡立ちがひどくなった場合には、10倍に希釈した消泡剤エイノール (Able) (N<sub>2</sub>脱気、オートクレーブ滅菌)

を 1 ml シリンジで数滴加えた。

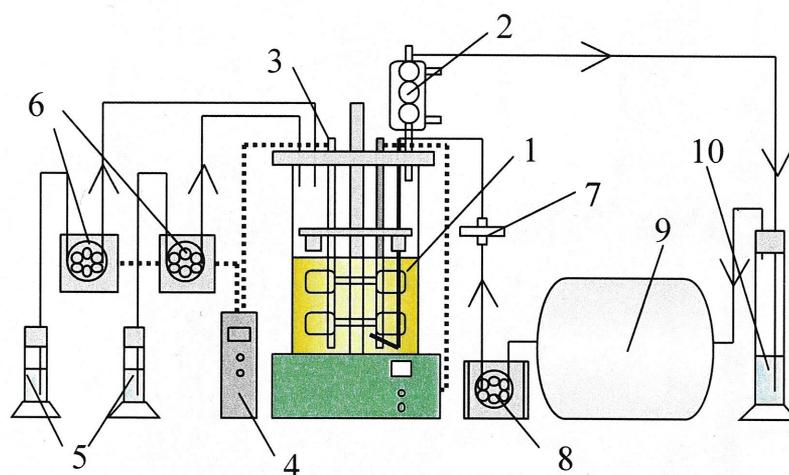


図 5-1 H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>連続供給・pH 制御リアクター概略図

- 1, Jar fermentor (1 L); 2, 冷却管 (ガス出口); 3, pH電極; 4, pHコントローラー;  
5, pH調整用HCl or NaOH soln.; 6, ペリスタポンプ;  
7, 滅菌用フィルター (0.45 μm, ガス入口); 8, ローラーポンプ;  
9, テドラーバック (5~15 L, ガス貯蔵用); 10, 飽和 NaCl soln.

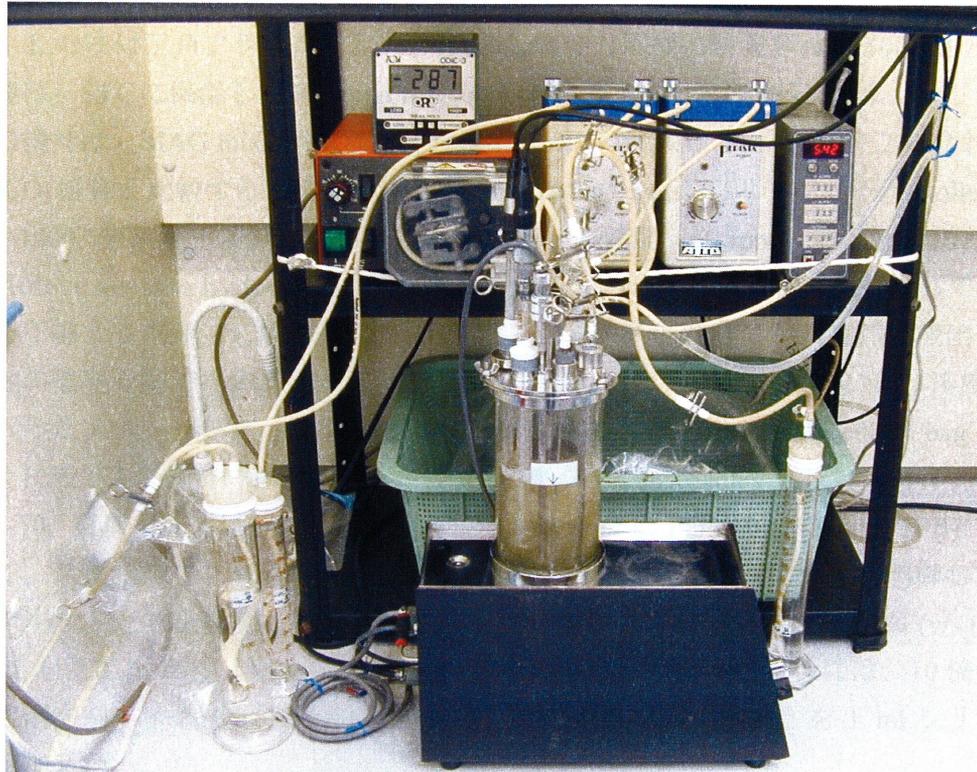


図 5-2 H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>連続供給・pH 制御リアクター

### 5.2.2. リアクター培養におけるH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>消費量の測定

ガス容量の変化は、Tedlar® bag以外のリアクター部分のガス容量が変化しないと仮定し、Tedlar® bagのガス容量を測定することによって求めた。測定方法は、ガスを充填する時にTedlar® bagと予めガスを充填したTedlar® bagを枝分かれたPharmed®チューブに接続し、枝分かれの部分に200 mlシリンダーを接続し、シリンダーで定量しながら空のTedlar® bagにガスを送り込んで充填した。消費後には、再度、200 mlシリンダーを用いてガスを引き抜くことによって消費後に残存した容量を測定した。充填したガス量から残存したガス量を引くことによってガスの消費容量を算出した。ガス組成は、リアクターのヘッドスペースガスをGCによって測定した(2.2.4., p.35)。培地中の溶存炭酸ガス濃度は、溶存炭酸ガス計によって測定した(2.2.4., p.35)。以上、得られたガス消費容量、ガス組成、溶存炭酸ガス濃度からガス消費量 [mmol (l-medium)<sup>-1</sup>]を算出した(2.2.4., p.35)。

### 5.2.3. リアクターを用いたフルクトース培養

装置全体の概略図を図 5-3 に、写真を図 5-4 (p.75)に示す。リアクターによる培養は 1 L の枝付三角フラスコを用い、 $H_2$ - $CO_2$  培養と同様に培養容積を 500 ml とした。培養は、55°C に保温した Thermal robo TRI (井内盛栄堂) 内で行った。また、リアクターの攪拌は、MAG mixer (MD41, ヤマト) を用いて行い、Speed set を 2 に合わせた。 $H_2$ - $CO_2$  培養と比較するため  $CO_2$  を充填した Tedlar<sup>®</sup> bag からリアクターへ Roller pump (PR-1000, 東京理化器械) を用いて  $60 \text{ ml min}^{-1}$  の速度 (60 rpm に設定) で送り込み、Cellulose acetate hydrophilic filter (Dismic-25, Advantec, 東洋濾紙) を通してリアクター下部より培地中に吹き込んだ。 $CO_2$  はリアクターの出口から自然に流出させ、培地の蒸発を防ぐため流出口には、冷却管を取り付けた。次に、飽和 NaCl 溶液 30 ml の入ったメスシリンダー (シリコン栓で密閉) を通過させ、再び Tedlar<sup>®</sup> bag に戻るように設定した。pH 測定は、発酵用 pH 電極 (F-615, Broadley James) と pH controller (FC-10, 東京理化器械) を用いて行い、pH controller に Pump box (Model TPB) を接続して、自動制御で 2 M HCl、あるいは、2 M NaOH を流入させて pH を制御した。

フルクトースを基質として対数増殖期まで増殖させた前培養液を 10% (v/v) で植菌した (1.2.2., p.16)。培養中に培養液の泡立ちがひどくなった場合には、10 倍に希釈した消泡剤エイノール (Able) ( $N_2$  脱気、オートクレーブ滅菌) を 1 ml シリンジで数滴加えた。

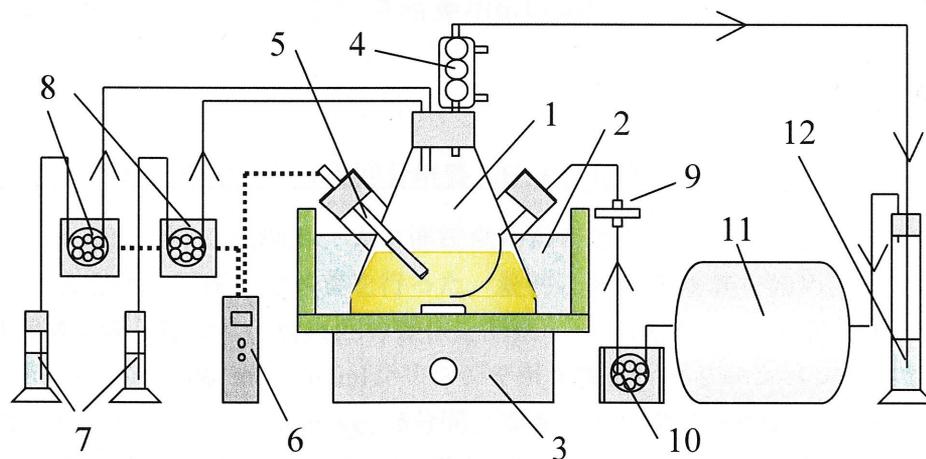


図 5-3 フルクトース培養用 pH 制御リアクター概略図

- 1, 枝つき三角フラスコ (1 L); 2, ウォーターバス; 3, マグネットスターラー;
- 4, 冷却管 (ガス出口); 5, pH 電極; 6, pH コントローラー;
- 7, pH 調整用 HCl or NaOH soln.; 8, ペリスタポンプ;
- 9, 滅菌用フィルター ( $0.45 \mu\text{m}$ , ガス入口); 10, ローラーポンプ;
- 11, テドラーバック (10 L,  $CO_2$  ガス貯蔵用); 12, 飽和 NaCl soln.



図 5-4 フルクトース培養用pH 制御リアクター

#### 5.2.4. リアクターを用いた反復回分培養 ( $H_2$ - $CO_2$ 培養)

5.2.1. (p.71) と同じpH制御、ガス連続供給が可能なリアクターシステムを用いて菌体回収を伴う反復回分培養を行った。最初にpH制御培養を始め、酢酸濃度が約100 mMに達した時に、反復回分操作を開始した。操作は、 $CO_2$ 下で行い、培養容積の約5分の2の200 mlを50 mlシリンジで引き抜き、クリーンベンチ内で50 ml遠沈管に移した。遠心 (3000 xg、5分間、室温) して菌体を回収し、クリーンベンチ内で古い培地は除去して10 mlの新しい培地 (設定したpHに調節済) に懸濁し、再びリアクターに戻した。次に、戻した10 ml以外の除去した分190 mlの新しい培地をリアクターに添加した。この操作を9回、24時間毎に繰り返し行った。

### 5.2.5 含浸液膜を用いた培養

TOPO (Tri-*n*-octylphosphine oxide) が低級脂肪酸を選択的に分離する作用があることに着目し、当研究室において TOPO 20% (w/v) を含むケロシン溶液を含ませたテフロン膜 (hydrophobic polytetrafluoroethylene membrane) を用いた低級脂肪酸の分離方法が開発された<sup>100)</sup>。さらに、この含浸液膜を用いて低級脂肪酸を除去しながら、嫌気性酢酸・酪酸生産菌 strain HU 452 を培養することに成功している<sup>101, 102)</sup>。その原理と培養の概略図を図 5-5 (p.77) に示すが、培養液中の非解離型の低級脂肪酸のみが膜を通過し、膜の反対側のアルカリ液において非解離型から解離型へと変換され、アルカリ液中に分離される。このことから、培養液の pH が低級脂肪酸の pKa より低くなる場合に有効である。HUC22-1 株を培養した場合、pH が酢酸の pKa 付近まで低下することから、この含浸液膜を用いた方法に適しているのではないかと考えた。そして、この含浸液膜装置で酢酸を除去しながら培養を行えば、酢酸による増殖阻害の防止と酢酸の回収を同時に行えるのではないかと考え、5.3.7. (p.86) で検討を行った。

含浸液膜の調整は、テフロン膜 (NFT-5200, 0.2  $\mu$  m pore size, 日東電工) をハイブリパックに入れて、そこに、TOPO (同仁化学) が 20% (w/v) になるように溶かしたケロシン (Sigma-aldrich) を加えて膜を浸漬させた。37°C でゆるやかに振とうしながら 1 時間浸漬を行った。浸漬後の膜をアルコールで殺菌した専用固定装置で固定し、片側の入口と出口の 2 箇所を Pharmed<sup>®</sup> チューブ (Tygon<sup>®</sup>, OD: 5 mm, ID: 3 mm) を用いてリアクターシステム (5.2.1., p.71) に接続した。接続時には N<sub>2</sub> を吹きつけながらできるだけ嫌気状態を維持できるようにした。接続した Pharmed<sup>®</sup> チューブの途中に Perista pump (SJ-1211, アトー) を設置し、最大速度で、リアクターからの培養液を含浸液膜装置の片側で循環させた。含浸液膜装置の反対側も同様に、シリコン栓で密封して嫌気にしたフラスコ [0.1 M NaOH 溶液 500 ml (N<sub>2</sub> 置換、オートクレーブ滅菌)] に接続し、Perista pump (SJ-1211, アトー) でアルカリ液を培養液よりやや遅い速度で、逆向きの流れになるように循環させた。含浸膜液に循環させている間、アルカリ液はスターラーで攪拌した。

アルカリ液中の酢酸濃度は、アルカリ液 1 ml に 0.1% プロモチモールブルー水溶液を 1~2 滴加え、それを指標として 3M と 0.1M の HCl を使って中和した。中和したサンプルに 10 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を全量が 2 ml になるように加え、1.2.8. (p.19) に従い、HPLC にて測定した。

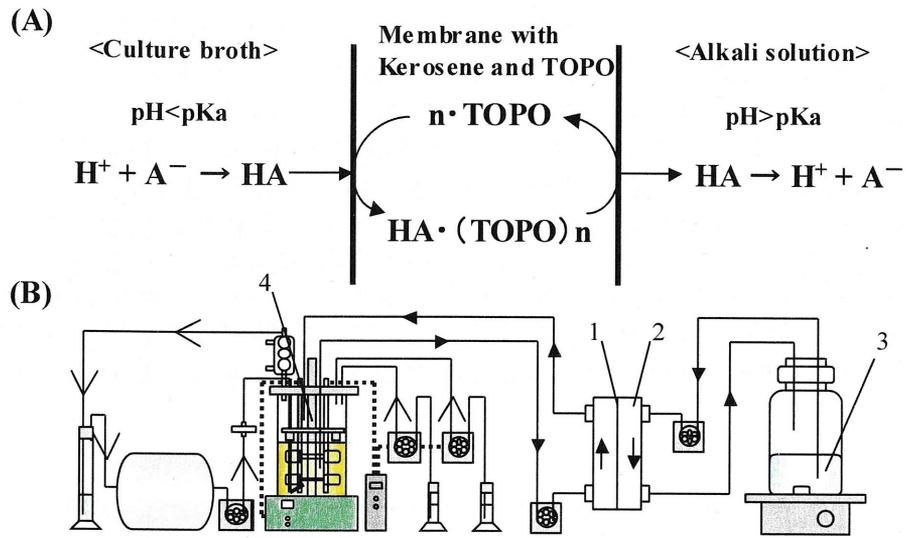


図 5-5 含浸液膜の原理(A)、装置概略図(B)

(A)  $\text{H}^+$ , 水素イオン;  $\text{A}^-$ , 解離型酸;  $\text{HA}$ , 非解離型酸.

(B) 1, 含浸液膜; 2, 膜固定装置; 3, アルカリ抽出液 (0.1M NaOH); 4,  $\text{H}_2\text{-CO}_2$ 用リアクターシステム (図5-1, p.72)

### 第3節 結果及び考察

#### 5.3.1. pH無制御下におけるH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>回分培養

リアクターを使用したpH無制御の回分培養では、基質ガスが連続供給されるため基質ガスの供給不足にはならないと考えられる。この条件においてHUC22-1株は、0.031 h<sup>-1</sup>の比増殖速度で増殖した(図5-6)。これは、バイアルビンを用いた回分培養と同程度であった。培養中にpHが初期値6.3より低下するのに従って増殖も低下し、pH 4.2で増殖が停止した。リアクター培養では、基質ガスを連続供給しているにも関わらず、バイアルビンを用いた回分培養と同様な傾向を示したことから、増殖の停止の原因は、基質ガスの供給不足ではなく、酢酸阻害によることが考えられた。最終的に180時間の培養で、菌体量0.21 g l<sup>-1</sup>、酢酸濃度50.2 mM、エタノール濃度1.3 mMが得られた。

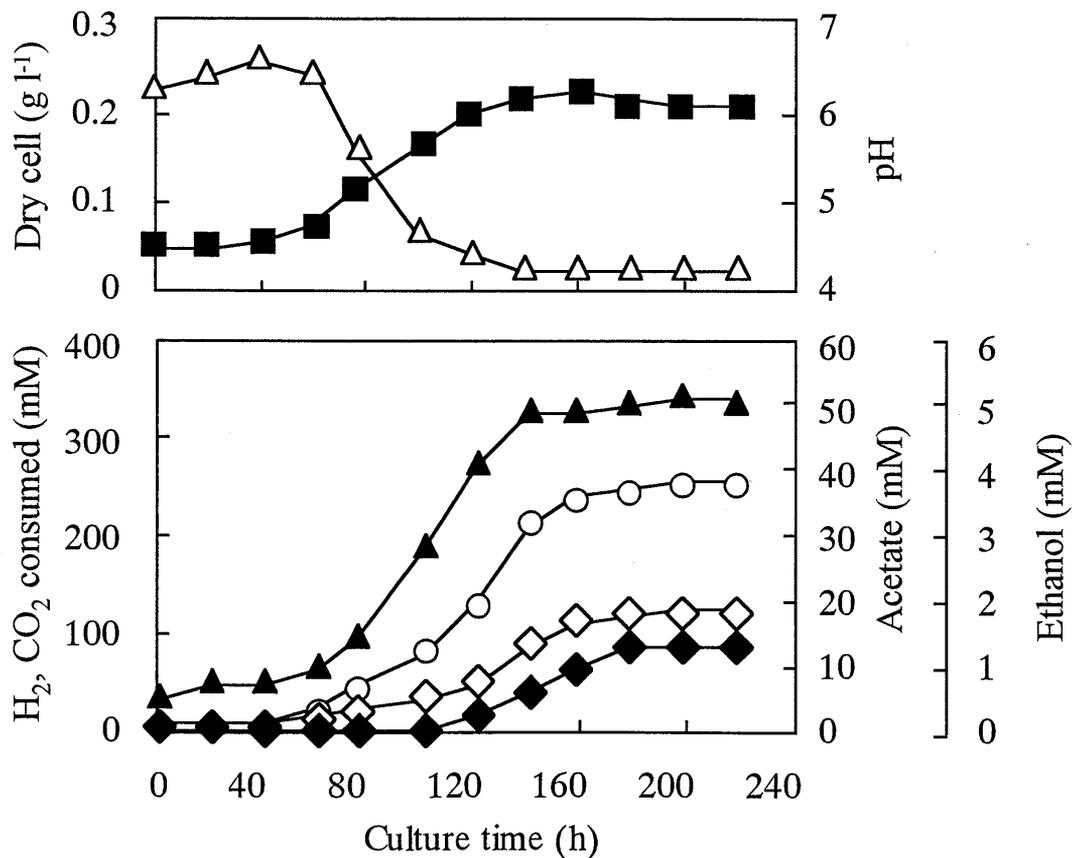


図 5-6 H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>を基質としたpH無制御回分培養における経時変化  
培養条件, リアクター; 55°C.  
■, 乾燥菌体重量 (g l<sup>-1</sup>); △, pH; ○, H<sub>2</sub>消費量 (mM);  
◇, CO<sub>2</sub>消費量 (mM); ▲, 酢酸 (mM); ◆, エタノール (mM).

### 5.3.2. $H_2$ - $CO_2$ 培養における pH 制御の効果

$H_2$ - $CO_2$  培養の酢酸及びエタノール生産に対する最適な pH を検討するため、各 pH 5.0、5.5、5.8、6.2、6.5、6.8、7.3、7.6 で一定に制御したリアクター培養を行った。その結果、pH 5.0 及び 7.6 一定制御では極めて菌体増殖が悪かったが、pH 5.5~7.3 では、菌体増殖と酢酸生産が見られた (図 5-7A, p.81)。pH 6.2 一定制御の時に最大値を示し、菌体量  $0.92 \text{ g l}^{-1}$  と酢酸生産量  $339 \text{ mM}$  が得られた。それぞれ、pH 無制御 (図 5-6, p.78) と比較して 4.4 倍、6.8 倍に達した。また、この  $339 \text{ mM}$  の酢酸生産量は、4.3.2. (p.63) で得られた阻害定数  $K_p=164 \text{ mM}$  (pH 6.2 の時の合計酢酸濃度として、表 4-1, p.60) の約 2 倍に相当することからも限界値の酢酸濃度であることが推察された。

エタノール生産は、培養 pH に強く依存し、pH 5.8 の時に最も高いエタノール生産量  $5.2 \text{ mM}$  が得られた。これは、pH 無制御時 (図 5-6, p.78) の 4 倍となった。増殖と酢酸生産における最適 pH よりも酸性側の pH でエタノール生産が高かった原因については、明確にはわかっていない。

*B. methylotrophicum*<sup>69)</sup> や *C. acetobutylicum*<sup>103)</sup> では、培養 pH による代謝シフトの誘導が報告されている。そこで、HUC22-1 株においても初期 pH 6.3 から pH 5.0 まで低下する間は、pH 無制御で培養し、pH 5.0 まで低下後は pH 5.0 一定で制御した条件を検討した (図 5-8, p.82)。220 時間の培養で、 $590 \text{ mM } H_2$  と  $280 \text{ mM } CO_2$  を消費し、エタノール  $4.8 \text{ mM}$  を生産した。これは、pH 無制御時 (図 5-6, p.78) の 3.7 倍に増加した。このような pH を変化させた培養においてもエタノール生産の増加が可能であったことから、本菌においても外部 pH の変化が、エタノール生産の引き金となっている可能性も示唆された。

### 5.3.3. フルクトース培養における pH 制御の効果

フルクトース培養の酢酸及びエタノール生産に対する最適な pH を検討し、 $H_2$ - $CO_2$  培養と比較した。各 pH 5.5、5.8、6.2、6.5、6.8、7.3 で一定に制御したリアクター培養を行った。pH 5.5~7.3 において菌体増殖と酢酸生産はほとんど差が見られなかった (図 5-7B, p.81)。最大値を示したのは、pH 6.2 一定制御の時で、菌体量  $1.38 \text{ g l}^{-1}$  と酢酸生産量  $121 \text{ mM}$  が得られた。 $H_2$ - $CO_2$  培養より菌体量は高かったが、酢酸生産は低い結果となった。4.3.2. (p.63) で得られた酢酸阻害定数は、 $H_2$ - $CO_2$  培養よりフルクトース培養の方が 1.5 倍ほど低かった。このことより酢酸耐性の違いが、フルクトース培養において pH 間の差が小さく、低い酢酸生産量になった原因の一つとして考えられた。しかし、pH 6.2 一定制御培養で得られた酢酸生産量  $121 \text{ mM}$  は、4.3.2. (p.63) で得られた阻害定数  $K_p=108 \text{ mM}$  (pH 6.2 の時の合計酢酸濃度として、表 4-1, p.60) の 1.1 倍であり、 $H_2$ - $CO_2$  培養が 2 倍程度に達したのに比べて低い値であった。このことから酢酸耐性以外にも原因があるのではないかと考えられた。一方、基質の消費については、初発フルクトース濃度約  $100 \text{ mM}$  で行ったが、各 pH 条件とも完全に消費し切れなかった。最も増殖、酢酸生産の良かった pH 6.2 一定制御の時においても初

発フルクトース濃度97 mMのうち41 mMが未消費であったことから培地条件の問題も考えられた。そこで、Vitamin solutionを2倍濃度にした場合とTrace elementを2倍濃度にした場合を検討したが、菌体増殖、酢酸生産に変化は見られなかった (Data not shown)。現在のところ、フルクトース培養においてpH制御の効果が小さく、低い酢酸生産量になった原因は分かっていない。

フルクトース培養におけるエタノール生産は、バイアルビンを用いた回分培養では検出限界以下であった。しかし、pHを酸性側に制御することによってエタノール生産が検出されるレベルになった。エタノール生産が培養pHに依存し、酸性側で高くなる傾向は $H_2$ - $CO_2$ 培養と同様であった。しかし、エタノール生産量は、最も高かったpH 5.8の時に1.3 mMと低い値に留まった。

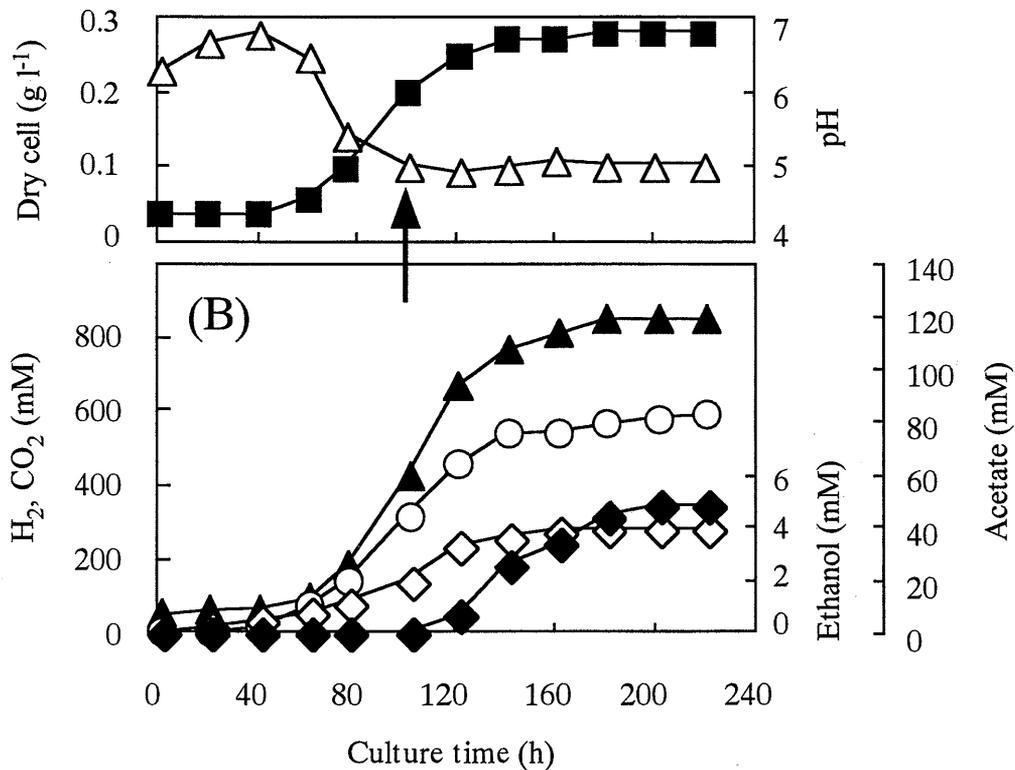


図 5-8 pH無制御とpH制御を組み合わせた $H_2$ - $CO_2$ 回分培養培養条件, リアクター; 55°C.  
pH制御条件, 矢印以前, 無制御; 矢印以降, pH 5.0一定.  
■, 乾燥菌体重量 ( $g l^{-1}$ );  $\Delta$ , pH;  $\circ$ ,  $H_2$ 消費量 (mM);  
 $\diamond$ ,  $CO_2$ 消費量;  $\blacktriangle$ , 酢酸 (mM);  $\blacklozenge$ , エタノール (mM).

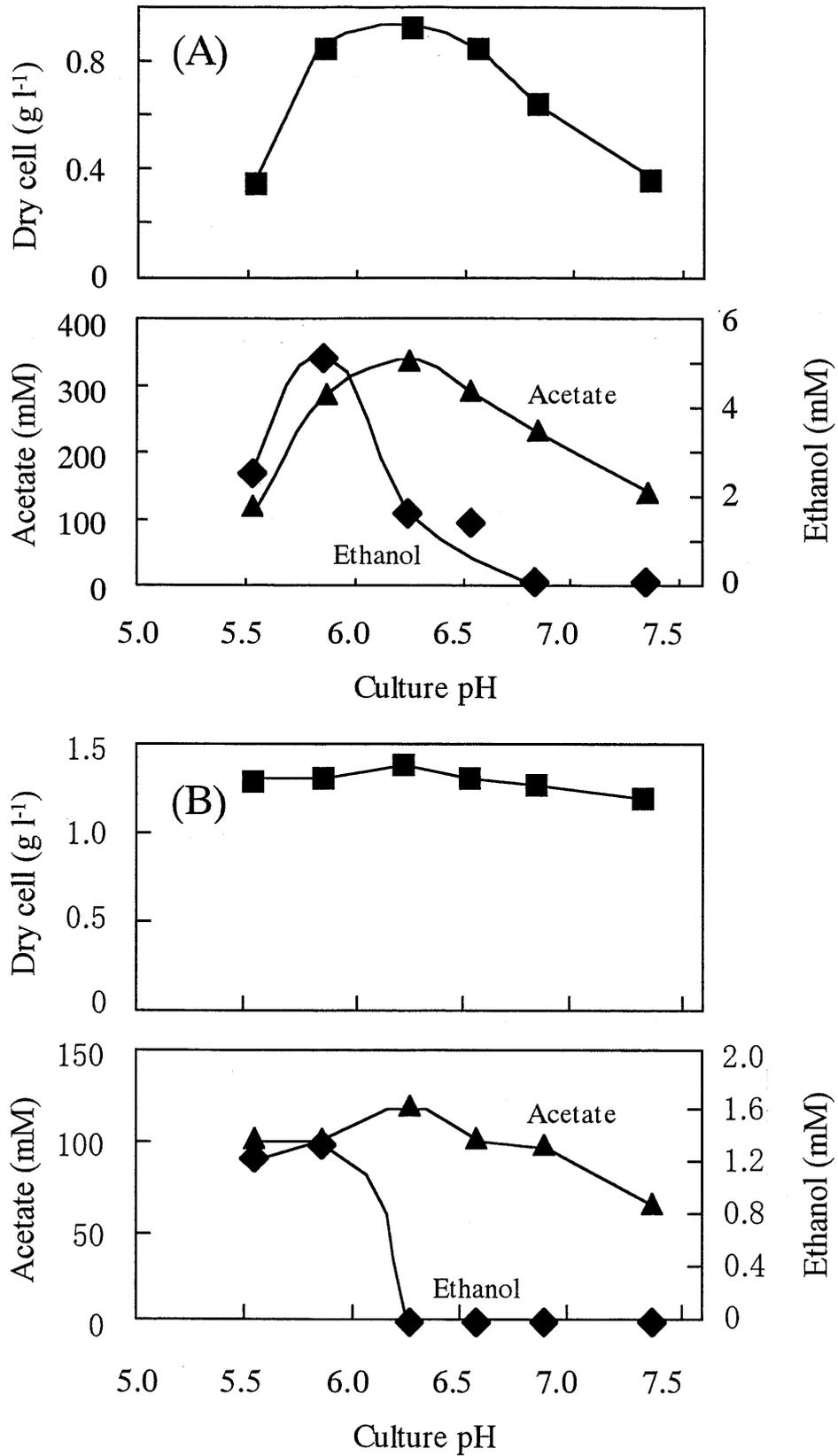


図 5-7 HUC22-1株の酢酸及びエタノール生産における培養pHの効果  
(培養220時間後)  
(A) H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>培養, (B) フルクトース培養.  
培養条件: リアクター, 55°C.

#### 5.3.4. リアクターを用いた H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養における比酢酸生産速度について

5.3.2. (p.79)で行ったリアクター培養における酢酸生産能を評価するため比酢酸生産速度の経時変化を調べた。また、バイアルビンを用いた回分培養についても同様に調べ、リアクター培養との比較を行った。

図 2-3 (p.42)のバイアルビンを用いた回分培養の結果を 12 時間毎に区切り、その中間時間における酢酸生産グラフの接線の傾きから酢酸生産速度 ( $\text{mmol l}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) を求め、さらに、その時の菌体量で割った値を比酢酸生産速度 ( $\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) として算出した。その比酢酸生産速度の経時変化を図 5-9A (p.83)に示す。培養開始後、比酢酸生産速度が徐々に増加し、対数増殖期にあたる培養後 54 時間で最大速度を示した。その後、菌体増殖は続いたが、比酢酸生産速度は徐々に低下が見られた。増殖期間中でその菌体量が維持されている場合は、比酢酸生産速度は少なくとも維持されるはずである。しかし、比酢酸生産速度が低下していることから律速になる要因があると考えられた。使用した培地は Yeast extract を 1% (w/v) 含むため、培地成分が律速になっているとは考えにくいことから酢酸による増殖阻害、もしくは、H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 基質の供給不足が要因として考えられた。

一方、図 5-7A (p.81)で最も酢酸生産と菌体増殖の良かった pH 6.2 一定制御の培養結果 (図 5-9B, p.83) から上記と同様に比酢酸生産速度の経時変化を求めた (図 5-9C, p.83)。その結果、90 時間で最大速度を示し、それ以降は低下した。上記のバイアルビンを用いた回分培養よりも対数増殖期の早い段階で比酢酸生産速度の低下が見られた。pH を制御した培養であり、90 時間では、酢酸濃度は約 50 mM と低い値であることから、酢酸による増殖阻害ではないと考えられた。そのため、実験で用いたリアクターシステムは、H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 基質の連続供給を行っているが、菌体量が増えるに従って、H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 基質が不足してくることが考えられた。同様に、図 5-10A (p.85)で行った反復回分培養においても検討した結果、培養後 130 時間以降に H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 基質の供給不足が起きていると考えられた (Data not shown)。

以上のことから H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 基質の供給不足にならないような供給速度を達成できれば、HUC22-1 株を用いて本実験以上の酢酸及びエタノール生産が可能であると考えられる。そのためには、加圧型リアクターの利用など、培地への H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> の溶解速度を上げるための工夫が必要である。

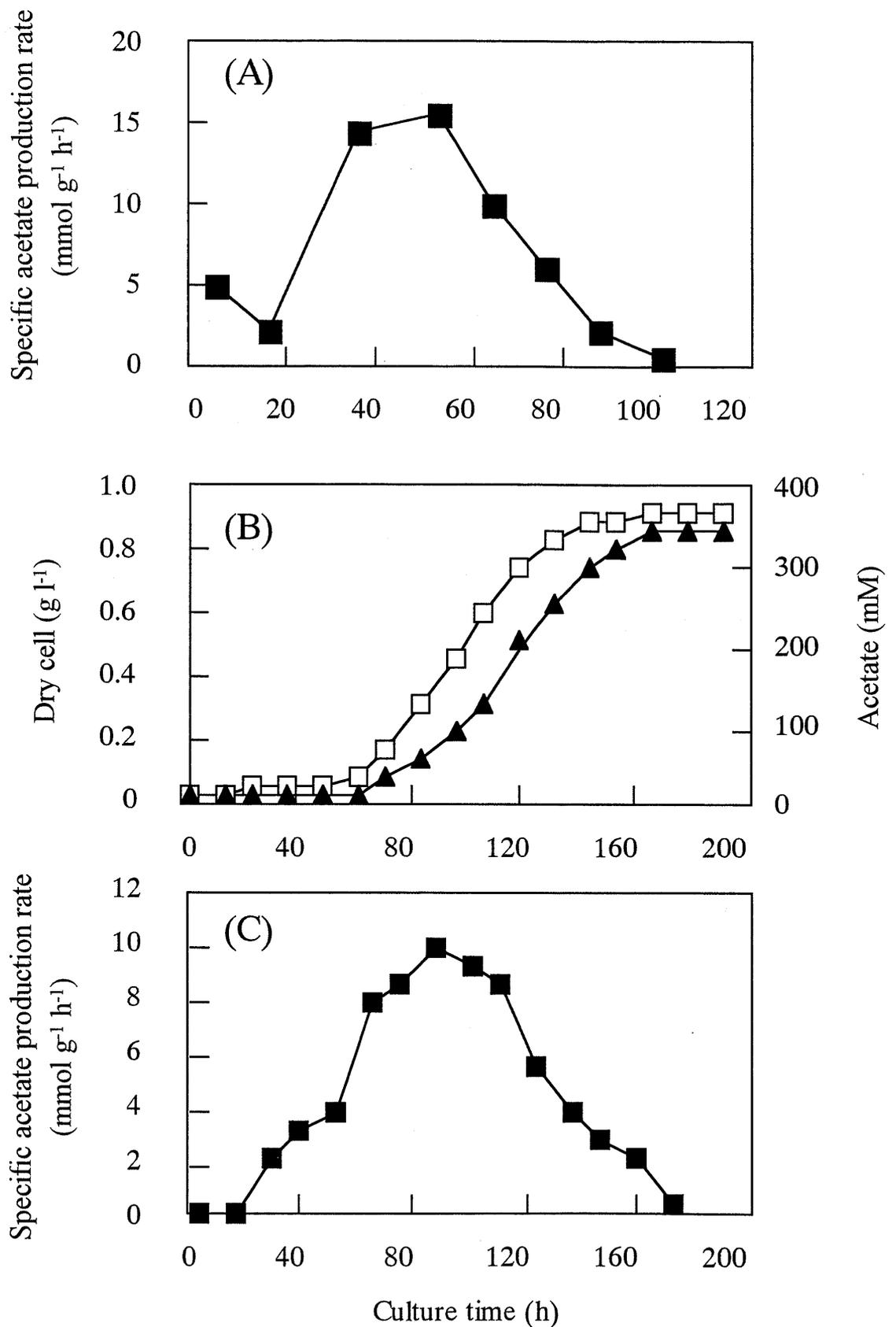


図5-9 H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>培養における比酢酸生産速度の経時変化  
 (A) バイアルブミンを用いた回分培養における比酢酸生産速度 (mmol g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) (図2-3A, p.42のデータより算出)  
 (B) pH 6.2一定制御培養における経時変化 (図5-7A, p.81)  
 □, 乾燥菌体重量 (g l<sup>-1</sup>); ▲, 酢酸 (mM) .  
 (C) (B)より算出した比酢酸生産速度 (mmol g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)

### 5.3.5. 反復回分培養による酢酸生産

培養中に生産される酢酸濃度を減少させて酢酸阻害を回避し、菌体増殖と酢酸及びエタノール生産を増加させるために、菌体回収を伴う反復回分培養を検討した。培地交換と菌体回収の操作は、培地中の酢酸濃度が約 100 mM に達した時に開始し、24 時間毎に 10 日間、9 回繰り返して行った。5.3.2. (p.79) の pH 一定制御の回分培養では、pH 6.2 の時に、最大菌体量と酢酸生産量が得られたことから (図 5-7A, p.81)、反復回分培養を pH 6.2 一定制御で行った。培地交換と菌体回収の操作中には、酢酸濃度は 200 mM 以下に維持され、菌体増殖と酢酸生産の持続が見られた (図 5-10A, p.85)。培養 330 時間後に培地交換を停止した。その後、酢酸濃度は増加し、420 時間で 366 mM に達した。この酢酸濃度は、培地交換を行わなかった pH 6.2 一定制御の回分培養で得られた酢酸濃度と同じ程度であった。除去した分を含めた合計の酢酸生産量をリアクター当たりで換算すると  $840 \text{ mmol (l-reactor)}^{-1}$  となり、pH 無制御培養 (図 5-6, p.78) と比べて 17 倍に達した。菌体増殖は、培地交換を停止後も 380 時間まで増加し、その後減少した。380 時間培養後の菌体量は  $1.51 \text{ g l}^{-1}$  となり、培地交換を行わなかった pH 制御培養の 1.6 倍に達した。

グルコースを基質とした *M. thermoacetica* の pH 6.9 一定制御回分培養では、125 時間の培養後に  $56 \text{ g l}^{-1}$  (930 mM) の酢酸が得られたことを報告している<sup>89)</sup>。また、別の報告では、Yeast extract と塩類の量を増やした培地を用いて回分培養を行い、125 時間後に  $47.8 \text{ g l}^{-1}$  (796 mM) の酢酸を得ている<sup>30)</sup>。一方、HUC22-1 株の  $\text{H}_2\text{-CO}_2$  培養で得られた酢酸生産量は上記の *M. thermoacetica* の研究で得られた量よりも少ない結果となった。この原因としては、HUC22-1 株における増殖と酢酸生産の最適 pH が上記の *M. thermoacetica* における最適 pH よりも低いためではないかと考えている。

### 5.3.6. 反復回分培養によるエタノール生産

エタノール生産を増加させるために pH 5.8 一定制御の条件で、5.3.5. の pH 6.2 一定制御の時と同様に菌体回収を伴う反復回分培養を行った。図 5-10B (p.85) に結果を示すが、pH 5.8 一定制御の時の菌体増殖、酢酸生産は、pH 6.2 一定制御の時よりもやや低い値となった。しかし、エタノール生産に関しては、最終的に 6.9 mM とやや増加し、培地交換を行わなかった pH 5.8 一定制御の回分培養と比べて、約 1.3 倍高くなった。除去した分を含めた合計エタノール生産量をリアクター当たりで換算すると  $15.4 \text{ mmol (l-reactor)}^{-1}$  に達し、pH 無制御培養 (図 5-6, p.78) と比べて、約 12 倍に増加した。

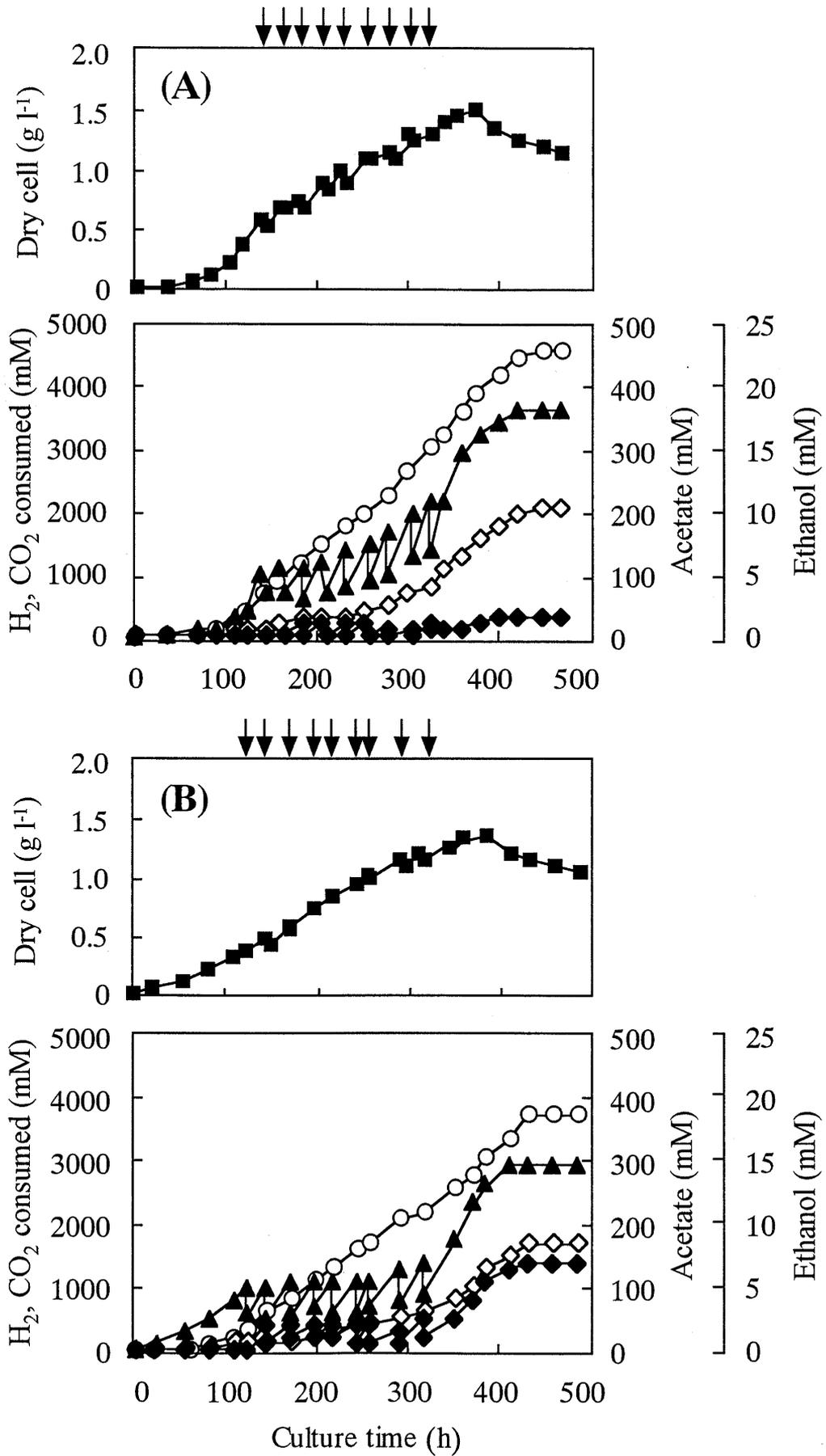


図 5-10  $H_2$ - $CO_2$ を基質とした反復回分培養における経時変化  
 (A) pH 6.2一定制御, (B) pH 5.8一定制御. 培養条件, リアクター; 55°C.  
 (↓), 培地交換. ■, 乾燥菌体重量 ( $g\ l^{-1}$ ); ○,  $H_2$ 消費量; ◇,  $CO_2$ 消費量;  
 ▲, 酢酸 (mM); ◆, エタノール (mM).

### 5.3.7. 含浸液膜の検討

予備実験として、25 mmol 酢酸、12.5 mmol エタノールを添加し、NaOH で pH4.5 に調整した RO 水溶液を含浸液膜装置に接続して検討を行った。その結果、28 時間後には、10 mmol 酢酸がアルカリ液中に移動していることが確認され、約 40% の除去率となった。一方、エタノールも 2 mmol 移動している結果となった。このように酢酸と比較して少量ではあるが、エタノールも分離されることから、この手法においても酢酸とエタノールの分離方法が必要になると考えられた。

次に、 $H_2$ - $CO_2$  を用いたリアクターによる回分培養を pH 無制御で行った場合について検討した (図 5-11, p.87)。矢印の箇所、培養 pH が 5.0 になった培養 62 時間後に含浸液膜装置に接続した。その結果、増殖期であるにもかかわらず、接続後に菌体増殖が低下し、84 時間以降には減少を始めた。一方、酢酸の分離については、予備実験よりも遅い分離速度であったが、110 時間培養後に 8 mmol の酢酸の分離が確認された。また、エタノールに関しては検出されなかった。さらに、pH 5.0 までは pH 無制御で、pH 5.0 からは一定になるように制御して培養を行い、pH 無制御培養の時よりも高い菌体濃度である  $0.2 \text{ g l}^{-1}$  の時に含浸液膜装置に接続したが、上記と同様に菌体増殖の停止が見られた (Data not shown)。増殖が停止した原因としては、(1) 十分な嫌気状態が維持できなかったこと、(2) 含浸液膜成分が増殖を阻害することが考えられた。HUC22-1 株の類縁菌 *M. thermoacetica* ATCC 31490 においてケロシン濃度が 2% 以上の時に増殖が阻害されることが報告されており<sup>104)</sup>、本菌もケロシンによる阻害を受けている可能性が考えられた。以上のことから含浸液膜を利用するには、嫌気度を維持するための装置の改良やケロシンに代わる溶媒の検索が必要であると考えられた。

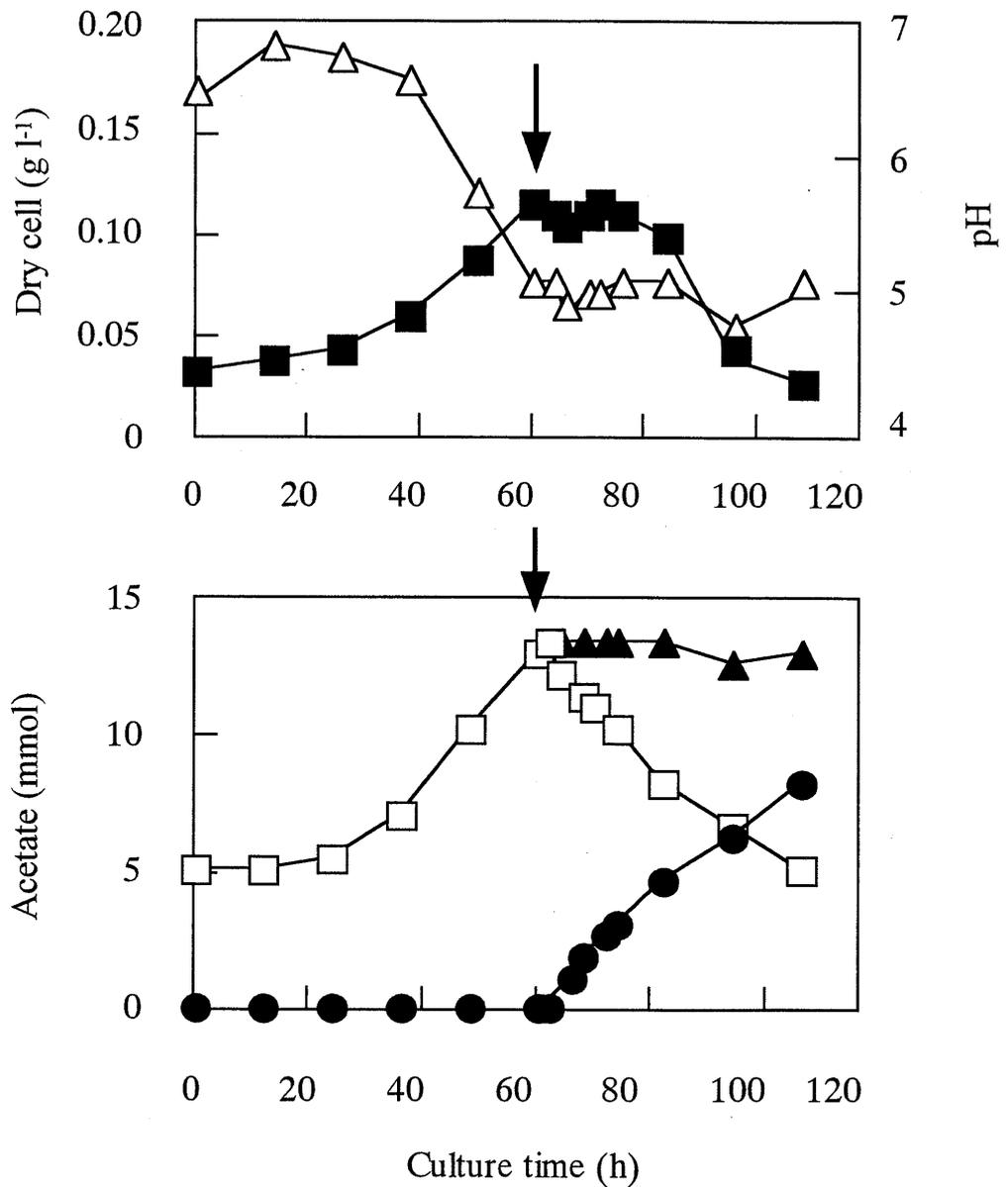


図5-11 H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>培養における含浸液膜の検討  
 培養条件, リアクター; 55°C  
 矢印の箇所で分離膜と接続 (62 h)  
 ■, 乾燥菌体重量(g l<sup>-1</sup>); △, pH; □, 培養液中の酢酸量(mmol);  
 ●, アルカリ抽出液中の酢酸量(mmol); ▲, 合計酢酸量(mmol).

### 5.3.8. ガス基質からの酢酸生産についての他の酢酸生産菌との比較

他の酢酸生産菌においてこれまでに報告のあったガス基質からの酢酸生産についてまとめ、HUC22-1株の結果と比較した(表5-1, p.90)。我々が調べた範囲では、好熱性酢酸生産菌における酢酸生産について生産性を詳細に調べた研究は、グルコースやキシロースなどの糖基質<sup>30), 89)</sup>で報告されているが、ガス基質では報告されておらず、HUC22-1株が最初の報告となった。最大酢酸蓄積量に関しては、HUC22-1株は中温性菌の*Acetobacterium* sp. BR-446<sup>105)</sup>よりも低い結果となった。原因としては、*Acetobacterium* sp. BR-446よりHUC22-1株の方が非解離型酢酸に対する耐性が低い、あるいは、非解離型酢酸の影響を受けやすい酸性側に至適pHがあることが考えられた。また、最大酢酸生産速度に関しても*Acetobacterium* sp. BR-446よりHUC22-1株の方が低い結果であった。*Acetobacterium* sp. BR-446の培養は、高い基質ガス分圧下で行われており、我々が行ったHUC22-1株の培養では、常圧よりやや高い程度であったため、基質ガスの培養液中への移動度に差が生じていると考えられる。そのため、加圧型リアクターを用いた培養によってHUC22-1株の酢酸生産を向上できることが予想された。

*Eubacterium limosum* KIST612<sup>106)</sup>や*Butyribacterium methyrotrophicum*<sup>69)</sup>においては、菌体回収・再利用によって高い菌体濃度が得られたことが報告されている。我々も菌体回収を伴う反復回分培養を行ったが、*E. limosum* KIST612や*B. methyrotrophicum*よりも低い菌体濃度に留まった。そのため、メンブレンフィルターモジュールなどを用いて自動化した菌体回収、再利用システムを用いることによって、さらに菌体濃度、酢酸生産速度を上げられる可能性が考えられた。

### 5.3.9. ガス基質からのエタノール生産についての他の酢酸生産菌との比較

これまでに報告のあった嫌気性酢酸生産菌を用いたガス基質からのエタノール生産についてHUC22-1株と比較を行ったものを表5-2(p.91)に示した。我々が調べた範囲では、好熱性菌におけるガス基質からのエタノール生産は報告されていない。しかし、中温性酢酸生産菌においてはいくつか報告されている。例えば、*C. ljungdahlii*においては、培地中への基質ガス供給を向上させる効率的なリアクター培養と培地組成などの培養条件の最適化によって合成ガスから $2.8 \text{ g l}^{-1}$  (61 mM)のエタノールを生産することに成功している<sup>18)</sup>。また、エタノール生産が $15 \text{ g l}^{-1}$  (326 mM)に達した報告もある<sup>107)</sup>。本研究では、最適pHで菌体回収・再利用を伴う反復回分培養を行うことによってエタノール生産を増加できたが、中温性菌で得られたようなエタノール生産量には達しなかった。好熱性酢酸生産菌を用いた $\text{H}_2\text{-CO}_2$ 、あるいは、合成ガスからのエタノール生産は、培養と蒸留によるエタノール回収を同時に行える効果的なプロセスの開発につながる可能性が考えられる。そこで、我々の単離した好熱性酢酸生産菌のガス基質からのエタノール生産を向上させるためには、遺伝学的手法や代謝工学的手法を用いて本菌の代謝を改変させることが必要であると考

えられる。

#### 第4節 要約

pH制御、ガス連続供給が可能なリアクターシステムを用いて回分培養を行った結果、菌体量、生産物量の増加に成功した。pH 6.2 一定制御の時に菌体量  $0.92 \text{ g l}^{-1}$ 、酢酸生産量  $339 \text{ mM}$  となり、最大値を示した。pH 5.8 一定制御では、 $5.2 \text{ mM}$  のエタノールが得られ、最大値を示した。しかし、比酢酸生産速度の解析からは、構築したリアクターシステムにおける  $\text{H}_2\text{-CO}_2$  基質の供給不足が示唆され、更なる改良を必要とした。一方、フルクトース培養における pH 制御下での回分培養では、 $\text{H}_2\text{-CO}_2$  培養よりも高い菌体量に達したが、酢酸及びエタノール生産量は低い結果となった。また、制御した各 pH 間での差も  $\text{H}_2\text{-CO}_2$  培養と比べて小さかった。

$\text{H}_2\text{-CO}_2$  培養で菌体の回収、再利用を伴う反復回分培養を行った。pH 6.2 一定制御の時に、培地交換の操作によって菌体増殖の持続が見られ、 $1.51 \text{ g l}^{-1}$  まで増加が可能であった。酢酸生産も増加が見られ、最終的に  $840 \text{ mmol (l-reactor)}^{-1}$  に達した。pH 5.8 一定制御では、菌体量、酢酸生産量は pH 6.2 一定制御よりも低い増加に留まったが、エタノール生産は、pH 6.2 一定制御の時よりも増加が見られ、最終的に  $15.4 \text{ mmol (l-reactor)}^{-1}$  に達した。

リアクターを含浸液膜装置に接続し、酢酸を分離しながら培養する方法を検討したが、菌体増殖を維持することができなかった。

表 5-1 HUC22-1 株と他の酢酸生産菌におけるガス基質からの酢酸生産の比較

Organism	Culture mode	Culture time (h)	Substrate (% v/v)	Temp. (°C)	pH	Cell (g l <sup>-1</sup> )	Acetate (mM)	Acetate production rate	Reference
<i>Moorella</i> sp. HUC22-1	Batch	220	H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> (80:20)	55	6.2	0.92	339	9.8 mmol g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	This study
	Cell-recycled repeated batch	420	H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> (80:20)	55	6.2	1.51	366 (840) <sup>a</sup>	7.2 mmol g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	This study
<i>Clostridium</i> sp. ATCC 29797	Batch <sup>b,c</sup>	300	H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> (80:20)	30	6.0 <sup>d</sup>		220	20 mmol g of protein <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	108
<i>Acetobacterium</i> sp. BR-446	Batch <sup>b</sup>		H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> (-)	35	7.3		849	60 mmol g <sup>-1</sup> h <sup>-1 e</sup>	105
	Cell-recycled continuous <sup>f</sup>		H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> (-)	35	7.3			103 mmol l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	105
<i>Eubacterium limosum</i> KIST612	Batch	65	CO (100)	37	6.8	1.35	90 <sup>g</sup>		106
	Cell-recycled continuous	390	CO (100)	37	6.8	4.93-9.59	74 <sup>h</sup>	0.63-0.73 mmol h <sup>-1 i</sup>	106
<i>Butyribacterium methyrotrophicum</i>	Cell-recycled continuous		CO (100)	37	5.5	4.55	27.5 <sup>j</sup>		69
<i>Ruminococcus productus</i> strain U-1	Continuous		CO-CH <sub>4</sub> -CO <sub>2</sub> (63.4:20.6:16.0)	37	7.0-7.4	0.35-0.45		32.8 mmol g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	109

<sup>a</sup> 回収された酢酸生産量 [mmol (l-reactor)<sup>-1</sup>]. <sup>b</sup> 半連続基質ガス供給 <sup>c</sup> 0.21 から 0.69 MPa までガス圧を増加. <sup>d</sup> 最終 pH. <sup>e</sup> pH 無制御.

<sup>f</sup> 基質ガス圧 0.27 MPa. <sup>g</sup> その他, 酪酸 0.7 mM, エタノール 微量. <sup>h</sup> その他, 酪酸 13 mM. <sup>i</sup> その他, 酪酸 0.09-0.13 mmol h<sup>-1</sup>.

<sup>j</sup> その他, ブタノール 36.4 mM, 酪酸 12.5 mM, エタノール 7.2 mM.

表 5-2 HUC22-1 株と他の酢酸生産菌におけるガス基質からのエタノール生産の比較

Organism	Culture mode	Culture time (h)	Substrate (% v/v)	Temp. (°C)	pH	Cell (g l <sup>-1</sup> )	Ethanol (mM)	Reference
<i>Moorella</i> sp. HUC22-1	Batch	220	H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> (80:20)	55	5.8	0.92	5.2	This study
	Cell-recycled repeated batch	420	H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> (80:20)	55	5.8	1.51	6.9 (15.4) <sup>a</sup>	This study
<i>Clostridium ljungdahlii</i>	Batch	96	H <sub>2</sub> -Ar-CO-CO <sub>2</sub> (18.5:15.4:56.1:10)	37	4.0	0.4-0.45	61 <sup>b</sup>	18
	Cell-recycled continuous	960	Synthesis gas	37	4.0	0.4-1.2	326 <sup>c</sup>	107
<i>C. autoethanogenum</i>	Batch		CO-CO <sub>2</sub> -N <sub>2</sub> (60:8:32)	37	6.0 <sup>d</sup>		7.71 <sup>e</sup>	20
<i>Butyribacterium methylotrophicum</i>	Cell-recycled continuous		CO (100)	37	5.5	4.55	7.2 <sup>f</sup>	69
Unidentified bacterium P7	Continuous	240	CO-CO <sub>2</sub> -N <sub>2</sub> (25:15:60)	37	5.75-5.3	0.25 <sup>g</sup>	34.7 <sup>h</sup>	21
	Continuous	276	N <sub>2</sub> -CO-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> (56.8:14.7:16.5:4.4:4.2:2.4:0.8)	37	5.4-6.5	0.20-0.52	34.7 <sup>i</sup>	110

<sup>a</sup> 回収されたエタノール生産量 [mmol (l-reactor)<sup>-1</sup>]. <sup>b</sup> その他, 酢酸 50 mM. <sup>c</sup> その他, 酢酸 100 mM. <sup>d</sup> pH 無制御.

<sup>e</sup> その他, 酢酸 7.96 mM, CO<sub>2</sub> 70.2 mM, H<sub>2</sub> 0.2 mM. <sup>f</sup> その他, 酢酸 27.5 mM, 酪酸 12.5 mM, ブタノール 36.4 mM.

<sup>g</sup> 消費 CO 1 mol あたりの菌体量 [g (mol CO)<sup>-1</sup>]. <sup>h</sup> ブタノール 8.1 mM, 酢酸 5.0 mM. <sup>i</sup> その他, 酢酸、酪酸、ブタノール.

### 第3部 HUC22-1株におけるエネルギー代謝の解析、エタノール高生産株の作製

#### 第6章 HUC22-1株におけるエネルギー代謝の解析

##### 第1節 緒言

第5章では、培養条件の検討によって酢酸及びエタノールの高生産化を試みた。その結果、菌体量と酢酸生産量は高い濃度が得られたが、エタノール生産は、元々の生産量が低いこともあり、高い生産量には至らなかった。その原因の一つとしては、元々本菌が持っているエタノール生産能力の低さが挙げられる。このことは、本菌のエタノール生産に関係すると考えられる ADH や ACDH 活性が、*T. ethanolicus* などの他の好熱性エタノール生産菌と比較して低いことから推察された<sup>31), 82)</sup>。今後、更なるエタノールの高生産化を目指すためには、物理的変異源や化学的変異源を用いた方法や遺伝子工学的手法によって本菌のエタノール生産経路を増強させた変異株の作製が必要であると考えられる。しかし、エタノール生産経路と酢酸生産経路はアセチル-CoA から枝分かれしているため、エタノール生産経路を増強させることによって酢酸生産経路に基づく ATP 生産への影響が懸念される。そのため本菌のエネルギー代謝について詳細に調べる必要があると考えられた。

本菌の予想されるフルクトース及び  $H_2$ - $CO_2$  の代謝経路における ATP 生産の反応段階を図 6-1 (p.93) に示す。1 mol フルクトースから 2 mol のピルビン酸が生産される解糖系で、2 mol の ATP が生産される。次に、2 mol ピルビン酸から 2 mol の酢酸が生産される時に 2 mol の ATP が生産される。さらに、ここまで生産された 4 mol  $H_2$  と 2 mol  $CO_2$  が、アセチル-CoA 経路に入って 1 mol 酢酸を生産する時に 1 mol の ATP が生産されるが、Methyl branch で 1 mol ATP が消費されることによって打ち消し合うため ATP 生産は 0 mol になる。しかし、図 6-1 (p.93) に示すアセチル-CoA 経路の 3 つの反応が、ナトリウムポンプによる膜を介した ATP 生産と連動していると考えられており、それぞれ、1/3 mol ATP 消費、1/3 mol ATP 生産、1/2 mol ATP 生産となり、最終的にアセチル-CoA 経路では、1 mol 酢酸が生産される時に、1/2 mol ATP が生産されると考えられている。そこで、本章では、 $H_2$ - $CO_2$  回分培養の結果から本菌のエネルギー代謝を化学量論的に解析し、実際の代謝でどのような ATP 代謝が行われているかを検討した。それには、酢酸生産 1 mol に対する ATP 生産収率  $Y_{ATP/P}$  を指標として用いた。また、他の酢酸生産菌で報告されている値と比較して本菌のエネルギー代謝の特徴づけを行った。さらに、 $H_2$ - $CO_2$  の他に、アセチル-CoA 経路を利用すると考えられるギ酸、シュウ酸、グリオキシル酸、グリコール酸 (図 6-2) についても検討を行った。

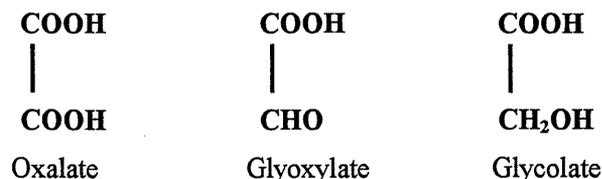


図 6-2 シュウ酸、グリオキシル酸、グリコール酸の構造

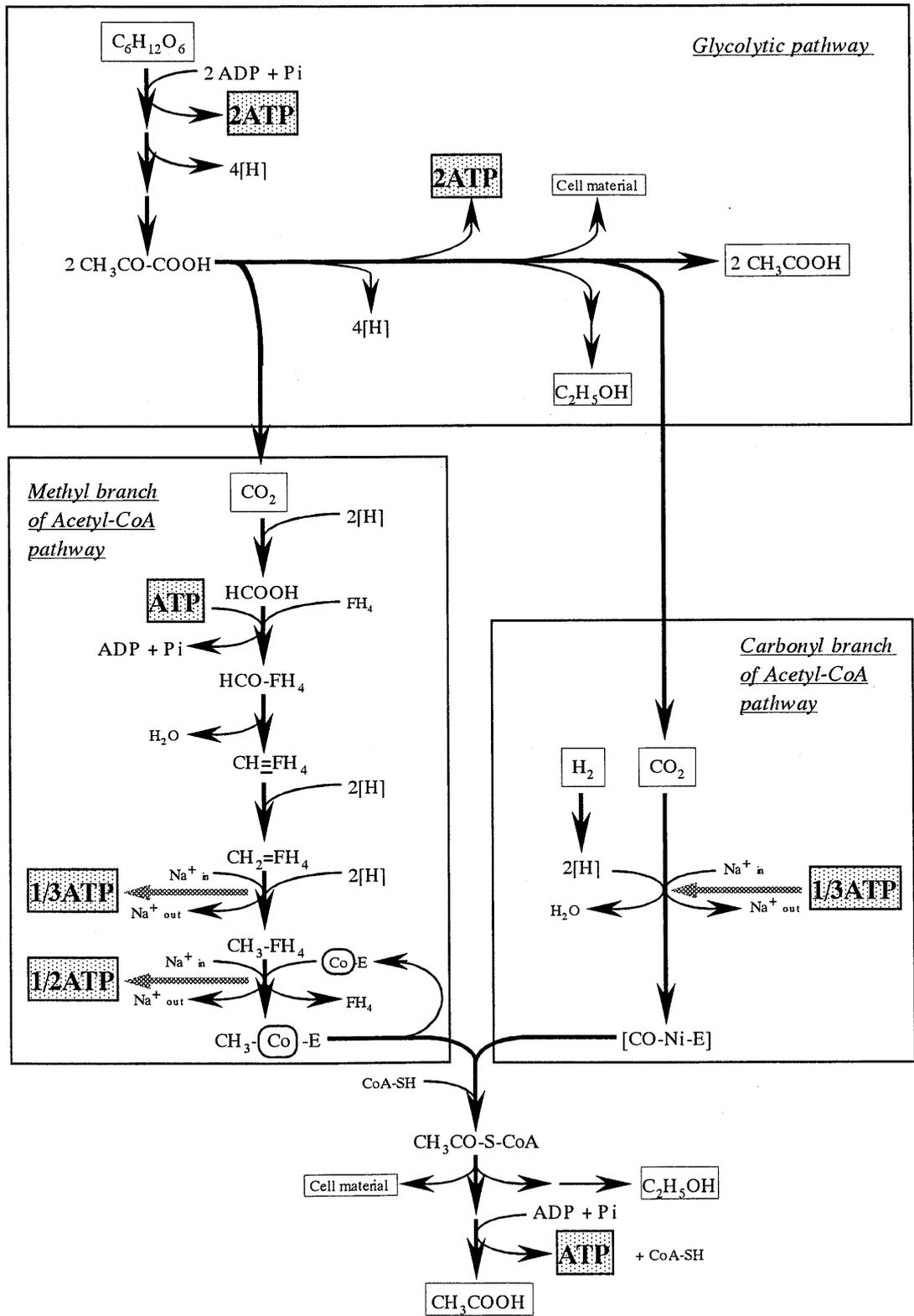


図6-1 HUC22-1 株の予想される代謝経路におけるATP生産と消費

## 第2節 方法

### 6.2.1. 各基質における回分培養

回分培養の方法は 1.2.2. (p.16)に従った。各基質の終濃度は、ギ酸(ナトリウム塩) 40 mM、シュウ酸(カリウム塩) 20 mM、グリオキシル酸 20 mM、グリコール酸 20 mM、リンゴ酸(ナトリウム塩) 40 mM、 $H_2-CO_2$  (80:20) 0.2 MPaで行った。ギ酸、シュウ酸、グリオキシル酸、リンゴ酸は、グリセロール保存菌体を直接、植菌しても増殖しなかったことから、最初に、フルクトースを基質とした培養液を植菌して前培養を行った。フルクトース培養からの継代培養では、増殖が始まるまで1週間以上のラグ時間が見られた。そのため、増殖後にそれぞれの基質で2~3回継代してラグ時間がなくなってから本培養を行った。グリコール酸については、グリオキシル酸を基質とした培養液を用いて上記と同様に前培養を繰り返し、本培養を行った。フルクトース培養からグリコール酸培養へ継代した場合でも増殖は見られたが、約3週間のラグ時間を必要としたため、グリオキシル酸培養液を用いた。シュウ酸、グリオキシル酸、グリコール酸、リンゴ酸の基質溶液の作製は、1.2.1. (p.15)のフルクトース溶液の作製法に従い、オートクレーブ滅菌ではなく、フィルター滅菌を行った。また、予めpHを約6に調整した。

### 6.2.2. 各基質の測定

$H_2-CO_2$ の消費量は 2.2.4. (p.35)に従って測定した。ギ酸、シュウ酸、グリオキシル酸、グリコール酸、リンゴ酸の消費量は 1.2.8. (p.19)に従い HPLC を用いて測定した。RI detectorで測定した場合のリテンションタイムは、ギ酸が約10.6分、シュウ酸が約5.2分、グリオキシル酸が約7.5分(キシロースと同じ)、グリコール酸が約9.5分(乳酸と同じ)、リンゴ酸が約7.6分(キシロースと同じ)であった。シュウ酸、グリオキシル酸、グリコール酸、リンゴ酸標準液の測定は、pHによってピークの大きさが影響を受けることから測定サンプルと同じpHに調整した標準液を用いて行った。

### 6.2.3. $Y_{ATP/P}$ の算出

培養中のATP生産量を正確に測定するのは難しいことから、菌体増殖からATP生産量を推定した。合成培地などを用いて菌体構成成分が十分に供給されている条件では、1 mol ATPによって増殖、維持ができる菌体量(g dry cell)を表す $Y_{ATP}$ が、多くの菌で普遍的に10 [g cell (mol ATP)<sup>-1</sup>]に近い値を取ることが知られている<sup>11)</sup>。そこで、 $Y_{ATP}=10.5$ と仮定して<sup>12)</sup>、各基質における回分培養で得られた菌体量、酢酸生産量から算出した $Y_{X/P}$  [g cell (mol acetate)<sup>-1</sup>]を用いて、次式 6-1 によって $Y_{ATP/P}$ を算出した。

$$Y_{ATP/P} [\text{mol ATP (mol acetate)}^{-1}] = \frac{Y_{X/P} [\text{g cell (mol acetate)}^{-1}]}{10.5 [Y_{ATP}, \text{g cell (mol ATP)}^{-1}]} \quad (6-1)$$

### 第3節 結果及び考察

#### 6.3.1. $H_2$ - $CO_2$ 培養における $Y_{ATP/P}$ について

$H_2$ - $CO_2$ を基質として回分培養を行い、それに基づいて算出した  $Y_{ATP/P}$  は0.29となった(表6-1, p.96)。これまでに報告されている他の嫌気性酢酸生産菌について  $H_2$ - $CO_2$ 培養の結果から  $Y_{ATP/P}$  を調べたところ、8株における11結果では、0.2~0.4の値となり、HUC22-1株もこの範囲に当てはまることが分かった(表6-2, p.97)。また、この結果からは、HUC22-1株を含めた好熱性菌と中温性菌の間で明確な差は見られなかった。以上のことからアセチル-CoA経路で通常に代謝される場合には、普遍的にこの範囲の  $Y_{ATP/P}$  をとることが推察された。

HUC22-1株の  $H_2$ - $CO_2$ 回分培養では、増殖が進むと酢酸蓄積量が増加し、さらに、pHが4.5以下まで低下することから非解離型酢酸が増加する。そのため、細胞内から多くの酢酸を排出する必要が生じ、排出過程でATPを消費している可能性も考えられた。そこで、培養pHによる  $Y_{ATP/P}$  の影響を検討するため5.3.2. (p.79)及び5.3.3. (p.79)で実施したpH制御の回分培養の結果を元に  $Y_{ATP/P}$  を算出した(表6-3)。その結果、pH5.5から7.3の範囲で、pHが低くなるに従って、やや  $Y_{ATP/P}$  が増加する傾向が見られた。しかし、大きな差ではなかったことから  $Y_{ATP/P}$  に対するpHの影響はないと判断された。

表6-3  $H_2$ - $CO_2$ を基質としたpH制御回分培養における  $Y_{ATP/P}$

pH	Dry cell (g l <sup>-1</sup> )	Acetate (mM)	$Y_{XP}$ <sup>a</sup>	$Y_{ATP/P}$ <sup>b</sup>
5.5	0.38	114	3.33	0.32
5.8	0.85	283	3.00	0.29
6.2	0.92	339	2.71	0.26
6.5	0.84	290	2.90	0.28
6.8	0.63	230	2.74	0.26
7.3	0.37	139	2.66	0.25

<sup>a</sup> Cell yield for acetate produced [g cell (mol acetate)<sup>-1</sup>]

<sup>b</sup> ATP yield for acetate produced [mol ATP (mol acetate)<sup>-1</sup>], obtained by  $Y_{XP}$  values and  $Y_{ATP}$  value assumed as 10.5 g dry cell (mol ATP)<sup>-1</sup> <sup>112</sup>.

図5-7A (p.81)のデータより換算。

表 6-1 HUC22-1 株の各基質における回分培養の結果及び収率

Substrate	Dry cell (g l <sup>-1</sup> )	Substrate (mM)	Product (mM)		Y <sub>X/S</sub> <sup>a</sup> (g mol <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub> <sup>b</sup> (mol mol <sup>-1</sup> )	Y <sub>X/P</sub> <sup>c</sup> (g mol <sup>-1</sup> )	Y <sub>ATP/P</sub> <sup>d</sup> (mol mol <sup>-1</sup> )	Y <sub>ave</sub> <sup>e</sup> (g ave <sup>-1</sup> )	Recovery (%)		ΔG <sup>0,h</sup>	Efficiency <sup>i</sup> (%)
			Acetate	Ethanol						R <sub>e</sub> <sup>f</sup>	R <sub>c</sub> <sup>g</sup>		
H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub>	0.17±0.02	260±20 (H <sub>2</sub> )	56.7±4.1	1.5±0.2	0.68±0.04 (H <sub>2</sub> )	0.22±0.01 (H <sub>2</sub> )	3.08±0.07	0.29±0.01	0.34±0.02	92±5	95±9	-105	8.9±0.2
		120±20 (CO <sub>2</sub> )				1.43±0.15 (CO <sub>2</sub> )	0.46±0.04 (CO <sub>2</sub> )						
Formate	0.03±0.006	25.5±3.0	6.2±0.9	N.D.	1.26±0.09	0.24±0.01	5.14±0.25	0.49±0.02	0.63±0.05	98±2		-99	15.7±0.8
Oxalate	0.11±0.02	19.3±1.7	4.2±0.5	N.D.	5.64±0.54	0.22±0.01	26.2±2.3	2.58±0.21	2.82±0.27	86±2		-166	47.8±4.1
Glyoxylate	0.15±0.01	12.8±1.0	5.8±0.7	N.D.	11.7±0.06	0.46±0.02	25.6±1.1	2.44±0.10	2.91±0.02	91±3		-171	45.3±1.9
Glycolate	0.12±0.01	17.5±0.7	11.1±1.2	N.D.	7.02±0.31	0.64±0.05	11.0±0.4	1.05±0.04	0.88±0.04	85±6		-66	50.7±1.8
Malate	0.11±0.01	25.2±0.8	36.1±1.1	N.D.	4.50±0.09	1.44±0.02	3.14±0.1	0.30±0.01	0.38±0.01	96±2		-56	17.0±0.6

<sup>a</sup> Cell yield for substrate consumed. <sup>b</sup> Acetate yield for substrate consumed. <sup>c</sup> Cell yield for acetate produced.

<sup>d</sup> ATP yield for acetate produced in mol ATP (mol acetate)<sup>-1</sup>, obtained by Y<sub>X/P</sub> values and Y<sub>ATP</sub> value assumed as 10.5 g dry cell (mol ATP)<sup>-1</sup> <sup>112)</sup>.

<sup>e</sup> Cell yield for available electrons of substrate. <sup>f</sup> Electron recovery. <sup>g</sup> Carbon recovery.

<sup>h</sup> Gibbs free energy under standard conditions in kJ (mol acetate)<sup>-1</sup>, estimated.

<sup>i</sup> Based on the free energy change of ATP hydrolysis [ΔG<sup>0</sup>=31.8 kJ (mol acetate)<sup>-1</sup>]. The efficiency was calculated as follows: Y<sub>ATP/P</sub> [mol ATP (mol acetate)<sup>-1</sup>] × [31.8 kJ (mol ATP)<sup>-1</sup> / ΔG<sup>0</sup>, [kJ (mol acetate)<sup>-1</sup>]] <sup>112)</sup>.

表 6-2 酢酸生産菌の H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 培養における Y<sub>ATP/P</sub> の比較

Strain	Temp (°C)	Yeast extract <sup>a</sup>	t <sub>d</sub> <sup>b</sup> (h <sup>-1</sup> )	H <sub>2</sub> <sup>c</sup> (mM)	Dry cell (g l <sup>-1</sup> )	Acetate (mM)	Y <sub>X/S</sub> <sup>d</sup>	Y <sub>X/P</sub> <sup>e</sup>	Y <sub>ATP/P</sub> <sup>f</sup>	R <sub>e</sub> <sup>g</sup> (%)	R <sub>c</sub> <sup>h</sup> (%)	References
HUC22-1	55	+	19.8	260	0.17	56.7	0.68	3.08	0.29	92	95	This study
<i>Moorella thermoacetica</i> ATCC 39073	55	+	8.5		0.06	14.6		4.11	0.41			60
	55	—	16.0		0.04	16.6		2.41	0.23			60
<i>M. thermoautotrophica</i> JW 701-3	58	—	33.0		0.06	22		2.73	0.26			61
<i>M. thermoautotrophica</i> ATCC 33924	55	+		53.4	0.054	12.5	1.01	4.32	0.41	94		24
<i>Acetogenium kivui</i> ATCC 33488	55	—	2.7		0.07	14.5		4.83	0.46			60
<i>Ruminococcus productus</i> ATCC 35244	37	+	5.0	222	0.14	54.2	0.65 <sup>l</sup>	2.58	0.25	98		113
<i>Sporomusa termitida</i> DSM 4440	30	+	7.8	100 <sup>i</sup>	50.0 <sup>j</sup>	24.4 <sup>k</sup>	0.5	2.05	0.2		97.6	114
<i>Acetobacterium woodii</i> NZva16	28	—			0.27 <sup>j</sup>	0.1 <sup>k</sup>		2.7	0.26			115
	28	+			0.42 <sup>j</sup>	0.1 <sup>k</sup>		4.2	0.4			115
<i>A. carbinolicum</i> DSM 2925	28	—	8.0	0.4 <sup>i</sup>	0.27 <sup>j</sup>	0.09 <sup>k</sup>	0.675	3.0	0.29		95.6	116
<i>A. malicum</i> DSM 4132	28	—		0.33 <sup>i</sup>	0.39 <sup>j</sup>	0.071 <sup>k</sup>	1.17	5.49	0.52		95	117

<sup>a</sup> Medium composition. <sup>b</sup> t<sub>d</sub>, Doubling time. <sup>c</sup> H<sub>2</sub> consumed. <sup>d</sup> Cell yield for H<sub>2</sub> [g cell (mol H<sub>2</sub>)<sup>-1</sup>]. <sup>e</sup> Cell yield for acetate produced [g cell (mol acetate)<sup>-1</sup>].

<sup>f</sup> ATP yield for acetate produced [mol ATP (mol acetate)<sup>-1</sup>], obtained by Y<sub>X/P</sub> and Y<sub>ATP</sub> assumed as 10.5 [g cell (mol ATP)<sup>-1</sup>]<sup>112)</sup>. <sup>g</sup> Electron recovery.

<sup>h</sup> Carbon recovery. <sup>i</sup> mmol of H<sub>2</sub> consumed. <sup>j</sup> mg of dry cell. <sup>k</sup> mmol of acetate produced. <sup>l</sup> 0.39 g protein (mol H<sub>2</sub>)<sup>-1</sup>.

### 6.3.2. 各基質における $Y_{ATP/P}$ の比較

$H_2$ - $CO_2$  の他に、アセチル-CoA 経路で代謝されると考えられるギ酸、シュウ酸、グリオキシル酸、グリコール酸について検討を行った。各基質を用いて回分培養を行った結果とそれに基づいて算出した  $Y_{ATP/P}$  を表 6-1 (p.96) に示す。算出された  $Y_{ATP/P}$  を比較するとギ酸培養が 0.49 と  $H_2$ - $CO_2$  培養の 0.29 よりも高い値となり、同じアセチル-CoA 経路を通るにもかかわらず差が見られた。このことからギ酸培養では、酢酸生産段階以外にも ATP 生産段階があることが推察された。*Moorella* 属では、ギ酸の代謝経路については、まだ詳細には分かっていないが、同じ嫌気性酢酸生産菌の *Acetobacterium* 属では、アセチル-CoA 経路に入る前に、ギ酸が  $H_2$  と  $CO_2$  に分解される段階で、ナトリウムポンプによる膜を介した ATP 生産と連動していることが提案されている<sup>16), 112)</sup>。HUC22-1 株においてもアセチル-CoA 経路以外に、この段階で ATP 生産が行われていることが予想され、その分、ATP 生産量が多くなり、 $H_2$ - $CO_2$  培養よりも高い  $Y_{ATP/P}$  になっているのではないかと考えられた(図 6-3, p.99)。

一方、シュウ酸、グリオキシル酸、グリコール酸培養では高い  $Y_{ATP/P}$  を示し、 $H_2$ - $CO_2$  培養、ギ酸培養よりも高い値となった。シュウ酸、グリオキシル酸、グリコール酸は近い構造を持つ  $C_2$  化合物であるので、同様な代謝経路によって利用されるのではないかと考えられるが、本菌や他の酢酸生産菌においてはその代謝経路は明らかになっていない。しかし、非常に高い  $Y_{ATP/P}$  を取ることから、通常のアセチル-CoA 経路以外の ATP 生産段階を有する代謝経路を持つものと推察された。

### 6.3.3. シュウ酸、グリオキシル酸、グリコール酸培養における $Y_{X/S}$ についての他の嫌気性細菌との比較

さらに、HUC22-1 株のシュウ酸、グリオキシル酸、グリコール酸培養の特徴を調べるために、これまでに報告されている他の嫌気性菌との比較を行った。それぞれの嫌気性菌によって生産物が異なることから、比較には消費(分解)した基質 1 mol に対する菌体収率を表す  $Y_{X/S}$  [ $g \text{ cell} (\text{mol substrate})^{-1}$ ] を用いた。

シュウ酸培養においては、HUC22-1 株と *M. thermoacetica* ATCC 39073 が *Oxalobacter* 関連菌と比較して高い  $Y_{X/S}$  を示した(表 6-4, p.100)。*Oxalobacter* 関連菌の代謝産物がギ酸、 $CO_2$  であることから、仮に HUC22-1 株や *M. thermoacetica* が同じような代謝経路を持っていた場合には、アセチル-CoA 経路を持つ分、ギ酸と  $CO_2$  を使って、さらに、ATP を生産することができ、高い菌体収率が得られる可能性がある。しかし、HUC22-1 株のギ酸培養の  $Y_{X/S}=1.26$  (表 6-1, p.96) を加えたとしても  $Y_{X/S}$  が 4~6 倍高くなることは考えにくい。HUC22-1 株が *Oxalobacter* 関連菌と近い代謝経路を持つことは考えにくい。

グリオキシル酸培養においては、HUC22-1 株と *M. thermoacetica* ATCC 39073 が *Syntrophobotulus* 関連菌と比較して高い  $Y_{X/S}$  を示した(表 6-5, p.101)。*Syntrophobotulus* 関連菌の代謝産物は、グリオキシル酸と  $H_2$  であることから、仮に HUC22-1 株や *M. thermoacetica* が同じような代謝経路を持っていた場合には、アセチル-CoA 経路を持つ分、 $H_2$  を使って、さらに ATP を生産することができ、高い菌体収率が得られる可能性が

ある。また、 $Y_{X/S}$ が約2倍高いことを考えてもHUC22-1株が*Syntrophobotulus* 関連菌と近い代謝経路を持つことが可能ではないかと考えられた。

グリコール酸培養においては、HUC22-1株と*M. thermoacetica* ATCC 39073が*Lachnospiraceae* sp.と*Desulfofustis glycolicus*と比較して近い値を示した(表6-6, p.102)。しかし、*Lachnospiraceae* sp.の代謝産物は、酢酸、コハク酸であることから、HUC22-1株が同じような代謝経路を持つかどうかは不明である。一方、*Desulfofustis glycolicus*は硫酸還元菌であり、HUC22-1株もまた、チオ硫酸の還元能を持っているが、同様な代謝経路を有することは考えにくい。しかし、各段階における酵素系などには共通性がある可能性は考えられる。

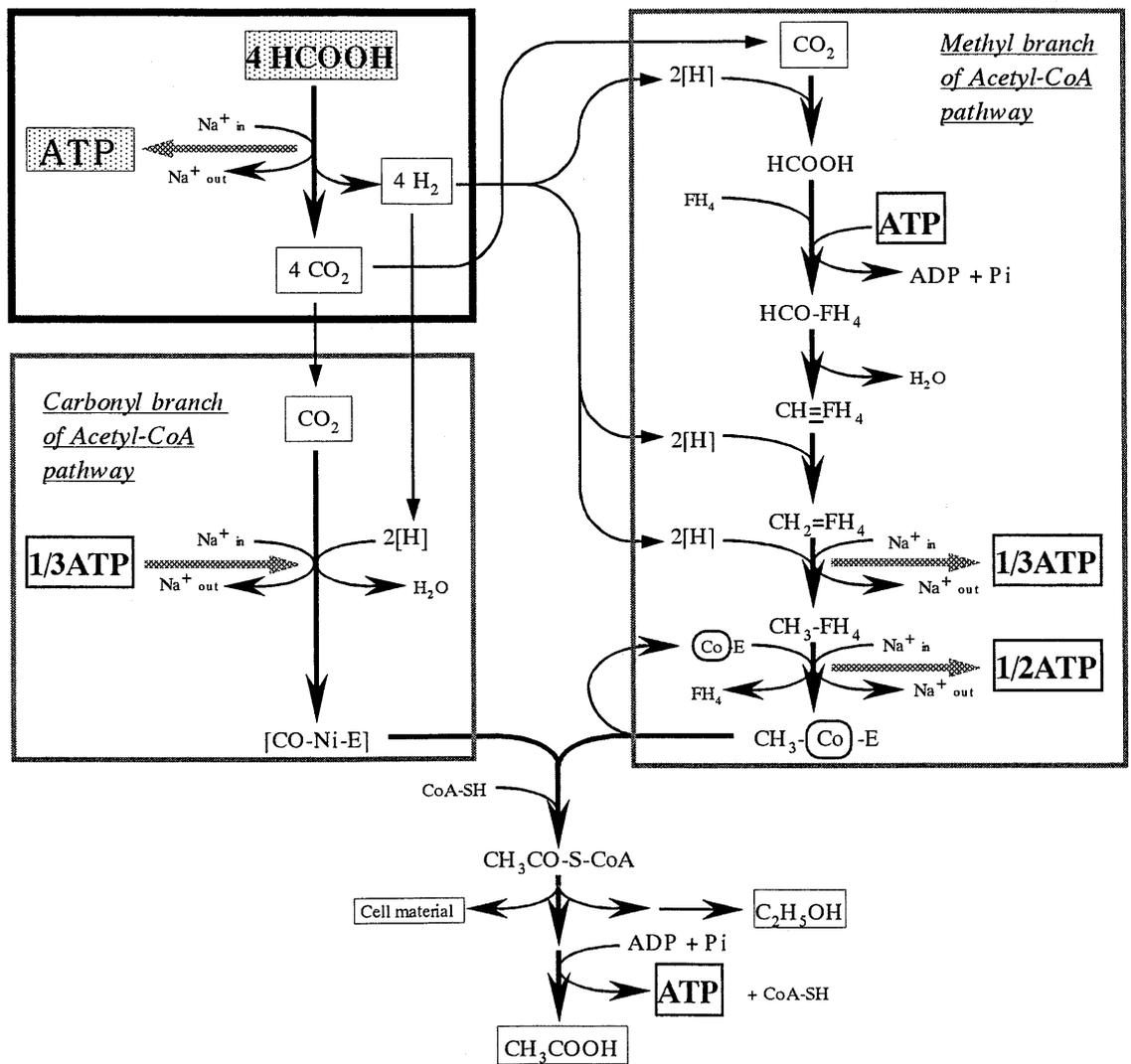


図6-3 HUC22-1株の予想されるギ酸の代謝経路におけるATP生産と消費

表 6-4 嫌気性細菌におけるシュウ酸培養

Strain	Temp (°C)	Substrate (mM)	Oxalate degraded (mM)	Dry cell (mg l <sup>-1</sup> )	Production (mM)	$Y_{x/s}$ <sup>a</sup>	$R_e$ <sup>b</sup> (%)	Reference
HUC22-1	55	Oxalate (19.1)	19.1	110	Acetate (4.2) CO <sub>2</sub>	5.64	86	This study
<i>M. thermoacetica</i> ATCC 39073	55	Oxalate (15)	14.4	71	Acetate (3.8) CO <sub>2</sub>	4.9	106	118
<i>Oxalobacter formigenes</i> strain OxB	37	Oxalate (90)			Formate	1.1		119, 120
<i>Oxalobacter vibrioformis</i> strain WoOx3	30-32	Oxalate (20) Acetate (3)	10.2 <sup>c</sup>	13.1 <sup>d</sup>	Formate (9.2) <sup>e</sup>	1.28	104	121
<i>Oxalophagus oxalicus</i> strain AltOx1	28-30	Oxalate (20) Acetate (3)	10.4 <sup>c</sup>	13.9 <sup>d</sup>	Formate (9.1) <sup>e</sup>	1.42	98	121
<i>Oxalobacter</i> sp. strain Ox-8	20-25	Oxalate (40) Acetate (1)			Formate CO <sub>2</sub>	0.08		122
Unidentified bacterium strain Sox-4	20-25	Oxalate (40) Acetate (1)			Formate CO <sub>2</sub>	1.0		122

<sup>a</sup> Cell yield for oxalate degraded [g cell (mol oxalate)<sup>-1</sup>]. <sup>b</sup> Electron recovery. <sup>c</sup> mmol of oxalate degraded. <sup>d</sup> mg of dry cell. <sup>e</sup> mmol of product.

表 6-5 嫌気性細菌におけるグリオキシル酸培養

Strain	Temp (°C)	Initial glyoxylate (mM)	Glyoxylate degraded (mM)	Dry cell (mg l <sup>-1</sup> )	Production (mM)	$Y_{X/S}$ <sup>a</sup>	$R_e$ <sup>b</sup> (%)	Reference
HUC22-1	55	17.9	12.8	150	Acetate (5.8)	11.7	91	This study
<i>Moorella thermoacetica</i> ATCC 39073	55	10	8.6	103	Acetate (3.6) Glycolate (0.3)	12.0	89	123
<i>Syntrophobotulus glycolicus</i> DSM 8271	30	3	162 <sup>c</sup>	0.93 <sup>d</sup>	Glycolate (70) <sup>e</sup> H <sub>2</sub> (29) <sup>e</sup>	5.7	98	124
	30	7	382 <sup>c</sup>	1.75 <sup>d</sup>	Glycolate (154) <sup>e</sup> H <sub>2</sub> (38) <sup>e</sup>	4.6	84	124
Unidentified bacterium strain Per Glyox I	28	10	512 <sup>c</sup>	0.92 <sup>d</sup>	Glycolate (140) <sup>e</sup> H <sub>2</sub> (547) <sup>e</sup>	1.8	103	125

<sup>a</sup> Cell yield for glyoxylate degraded [g cell (mol glyoxylate)<sup>-1</sup>]. <sup>b</sup> Electron recovery. <sup>c</sup>  $\mu$  mol of glyoxylate degraded. <sup>d</sup> mg of dry cell.

<sup>e</sup>  $\mu$  mol of product.

表 6-6 嫌気性細菌におけるグリコール酸培養

Strain	Temp (°C)	Substrate (mM)	Glycolate degraded (mM)	Dry cell (mg l <sup>-1</sup> )	Production (mM)	$Y_{x/s}$ <sup>a</sup>	$R_c$ <sup>b</sup> (%)	$R_e$ <sup>c</sup> (%)	Reference
HUC22-1	55	Glycolate (17.5)	17.5	120	Acetate (11.1)	7.02		85	This study
<i>Moorella thermoacetica</i> ATCC 39073	55	Glycolate (10)	9.3	46.8	Acetate (6.5)	5.03		93	123
<i>Lachnospiraceae</i> sp. DSM 11261	30		10.2	44.4	Acetate (1.6) Succinate (3.3)	4.35	105		126
	30		19.2	80.7	Acetate (2.5) Succinate (5.9)	4.20	99		126
<i>Desulfofustis glycolicus</i>	28	Glycolate (9.65) Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (20)	212 <sup>d</sup>	0.98 <sup>e</sup>	H <sub>2</sub> S (128) <sup>f</sup>	4.62		92	127

<sup>a</sup> Cell yield for glycolate degraded [g cell (mol glycolate)<sup>-1</sup>]. <sup>b</sup> Carbon recovery. <sup>c</sup> Electron recovery. <sup>d</sup> μ mol of glycolate degraded.

<sup>e</sup> mg of dry cell. <sup>f</sup> μ mol of H<sub>2</sub>S.

#### 6.3.4. HUC22-1 株におけるシュウ酸、グリオキシル酸、グリコール酸の代謝経路の推定

HUC22-1 株のシュウ酸、グリオキシル酸、グリコール酸培養の結果から算出した  $Y_{ATP/P}$  によって、通常のアセチル-CoA 経路以外に ATP 生産段階が存在することが推察された。我々が調べた範囲では、既存の嫌気性細菌で報告されている代謝経路は 4 つ存在した (図 6-4, p.104)。そこで、ここでは、その 4 つの経路の中で HUC22-1 株の  $Y_{ATP/P}$  を満たす経路が存在するかについて考察を行った。まず、C 経路はシュウ酸資化性菌 *Oxalobacter* 関連菌などで提案されている経路であるが<sup>128), 129)</sup>、ATP を消費する経路であることから HUC22-1 株における高い  $Y_{ATP/P}$  は説明できないため不適當であると考えられた。次に、グリオキシル酸資化性菌 *Syntrophobotulus* 関連菌などで提案されている D 経路は<sup>130)</sup>、直接 ATP を生産できる経路があることから HUC22-1 株の高い  $Y_{ATP/P}$  を説明できるのではないかと考えられた。さらに、6.3.3. (p.98) で他の嫌気性細菌と  $Y_{X/S}$  を比較した結果では、*Syntrophobotulus* 関連菌の代謝経路 (D 経路) を持つ可能性が高いことを推察している。以上のことから HUC22-1 株が D 経路を持っている可能性が示唆された。

シュウ酸については、D 経路を適用する場合、シュウ酸からグリオキシル酸に変換される必要がある。しかし、嫌気性細菌では直接シュウ酸をグリオキシル酸に変換する経路の存在は報告されていないことから、Oxalyl-CoA を介する経路の利用が考えられる。しかし、この経路において、Oxalyl-CoA からグリオキシル酸に変換する反応では Oxalyl-CoA 側に偏っているという問題が挙げられる。そのため、シュウ酸は、シュウ酸資化性菌 *Oxalobacter* 関連菌で提案されている A か B の経路によって代謝される可能性も考えられる。A、B 経路は、直接 ATP を生産する段階を有していないが、プロトンポンプ、または、シュウ酸・ギ酸アンチポーターを介した ATP 生産と連動することが提案されている。しかし、HUC22-1 株の高い  $Y_{ATP/P}$  が説明できる程度の ATP 生産が可能かどうかについては不明である。

グリコール酸に関しては、グリコール酸からグリオキシル酸を介して D 経路で代謝されることが報告されている<sup>131)</sup>。しかし、グリコール酸からグリオキシル酸を介さない経路については、これまで報告されていない。また、グリコール酸から直接、シュウ酸に変換する経路の存在についても報告されていない。このことからグリコール酸はグリオキシル酸を介して D 経路、あるいは、グリオキシル酸と Oxalyl-CoA を介して、A、B 経路によって代謝されることが考えられる。しかし、グリコール酸からグリオキシル酸への反応は、グリコール酸生産側に偏っているので反応しにくいことが問題として考えられる。しかし、このことは、HUC22-1 株のグリコール酸培養において、菌体が増殖しにくいことや非常に長いラグ時間を必要とすることと一致していると考えられる。

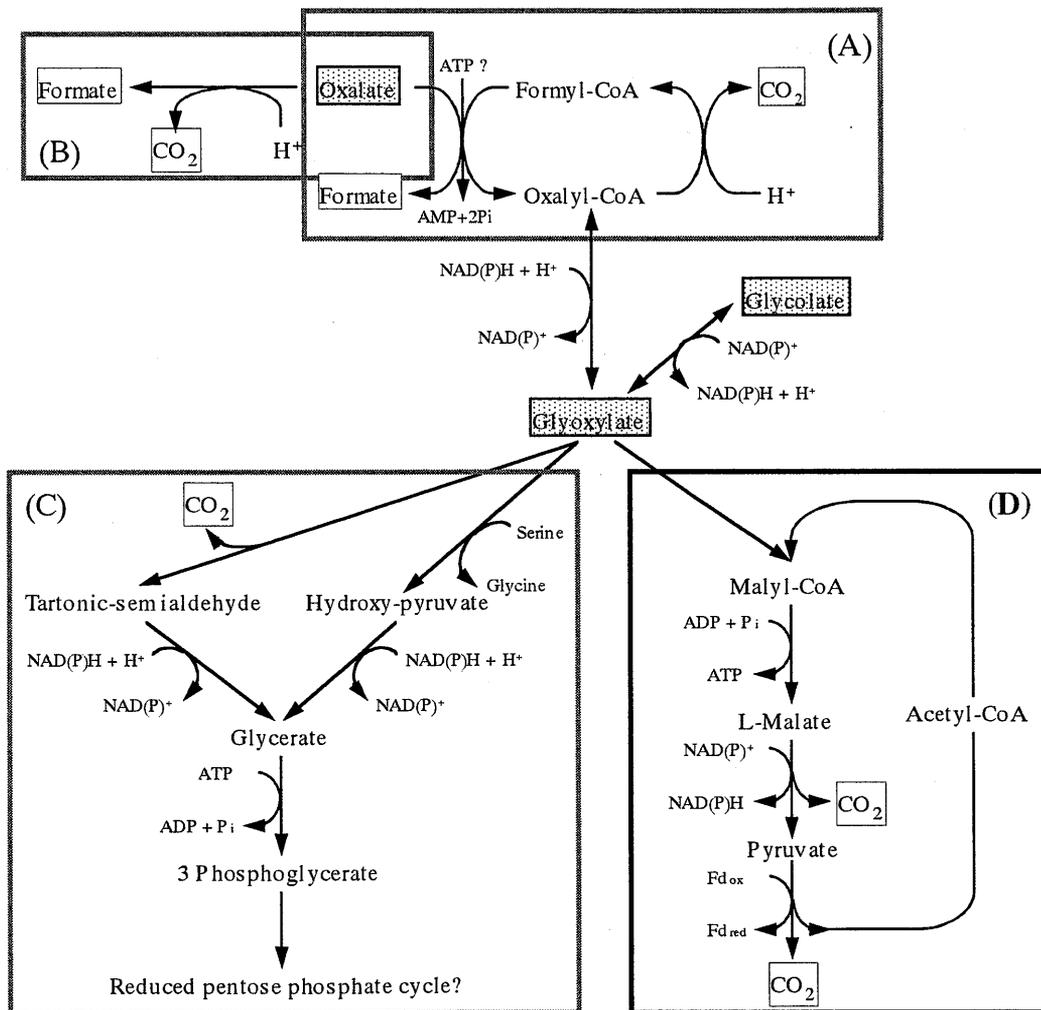
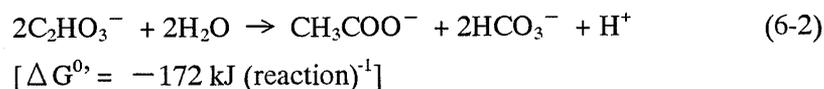


図6-4 既存の嫌気性細菌におけるシュウ酸、グリオキシル酸、グリコール酸の代謝経路 (A)~(D)

### 6.3.5. HUC22-1株において推定されるグリオキシル酸代謝経路の $Y_{ATP/P}$ について

以上のことから HUC22-1 株において、特に、グリオキシル酸に関しては、D 経路によって代謝される可能性が考えられる。そこで、グリオキシル酸が D 経路によって代謝され、さらに生産される  $H_2$  と  $CO_2$  がアセチル-CoA 経路で利用される場合をシミュレーションすると  $Y_{ATP/P}=2.29$  という値が得られた (図 6-5, p.107)。これは、表 6-1 (p.96) で算出した  $Y_{ATP/P}=2.44$  と非常に近い値となり、この仮説を裏付ける結果となった。次に、標準状態における反応の自由エネルギー変化  $\Delta G^0$  の面から考察した。グリオキシル酸から酢酸が生産される反応は次式 6-2 で表され、酢酸生産に進む反応である。



次に、この反応をグリオキシル酸から  $H_2$ 、 $CO_2$  が生産される反応と  $H_2$ 、 $CO_2$  から酢酸が生産される反応に分けて算出すると、それぞれ、次式 6-3, 6-4 のようになる。



図 6-5 (p.107) では、グリオキシル酸から  $H_2$ 、 $CO_2$  が生産される段階では、2 mol グリオキシル酸から 2 mol ATP が生産される。ATP が加水分解される時の  $\Delta G^0=31.8 \text{ kJ (mol ATP)}^{-1}$  (108) を元に、この段階の  $\Delta G^0 = -67 \text{ kJ (reaction)}^{-1}$  からできる ATP 量を計算すると 2.1 mol ATP となり、2 mol ATP 生産が可能であることが裏付けられた。

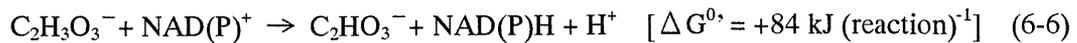
一方、シュウ酸からグリオキシル酸への反応は、そのままでは、次式 6-5 のように 2 mol シュウ酸から 1 mol グリオキシル酸に変換され、 $\Delta G^0 = +17 \text{ kJ (reaction)}^{-1}$  とわずかに正の値となる。



しかし、Oxalyl-CoA を介し、また、NAD(P)H が反応に関与することによって 1 mol シュウ酸から 1 mol グリオキシル酸への反応が進むものと考えられる。表 6-1 (p.91) で算出したシュウ酸の  $Y_{ATP/P}=2.58$  とグリオキシル酸の  $Y_{ATP/P}=2.44$  がほぼ同じ値をとることからも、この反応は ATP を消費せずに反応が進むものと考えられる。

グリコール酸からグリオキシル酸への反応は、NAD(P)H が関与する次式 6-6 が挙げられるが、そのままでは、 $\Delta G^0$  が高い正の値をとり、反応が進みにくいと考えられる。そのため、この段階で ATP を消費して反応を進めているものと考えられる。

このことは、表 6-1 (p.96)で算出したグリコール酸の  $Y_{ATP/P}=1.05$  がグリオキシル酸の  $Y_{ATP/P}=2.44$  より小さい値となっている要因として考えられる。



D 経路の中間産物である L-リンゴ酸に関しては、中温性酢酸生産菌 *Acetobacterium malicum* において資化できることが報告されている<sup>132)</sup>。しかし、*Moorella* 属においてはこれまでに報告されていない。そこで、HUC22-1 株において DL-リンゴ酸ナトリウムを基質として検討を行ったところ、資化できることが確認された(表 1-7, p.28; 表 6-1, p. 96)。回分培養より得られた  $Y_{P/S}$  は 1.44 となり、*Acetobacterium malicum* において報告されている化学量論式から導き出される  $Y_{P/S}=1.5$  とほぼ一致した。以上のリンゴ酸資化性の結果からは、HUC22-1 株における D 経路の存在が裏付けられた。また、*Moorella* 属における  $C_4$  化合物であるリンゴ酸の利用を初めて確認できた。

一方、D 経路に必要な酵素系、Malyl-CoA synthetase (EC, 6.2.1.9) や Malyl-CoA lyase (EC, 4.1.3.24)、Malic enzyme (EC, 1.1.1.38) について、HUC22-1 株の近縁種 *M. thermoacetica* ATCC 39037 で公開されているゲノムデータベース (3.3.4., p.55) からアミノ酸レベルでのホモロジー検索を行ったところ、これらの酵素をコードすると推定される遺伝子の存在が確認された(表 6-7, p.108)。これらの遺伝子はゲノム上で隣り合って同じ方向に並んでおり、オペロンを形成している可能性も考えられ、大変興味深い。以上は、仮説の段階であり、今後、鍵酵素の活性を確認するなどの検討が必要である。

#### 第 4 節 要約

本章では、 $H_2-CO_2$  の他にアセチル-CoA 経路で代謝されると考えられるギ酸、シュウ酸、グリオキシル酸、グリコール酸についてエネルギー代謝面から比較を行った。各基質で回分培養を行い、菌体増殖から ATP 生産量を推測し、酢酸生産 1 mol に対する ATP 生産収率  $Y_{ATP/P}$  を算出した。その結果、 $H_2-CO_2$  培養よりもギ酸培養の方が高かったことから、ギ酸培養では酢酸生産段階以外の ATP 生産段階が想定された。*Moorella* 属におけるギ酸の代謝経路については詳細には分かっていないが、*Acetobacterium* 属で提案されているようにギ酸から  $H_2$ 、 $CO_2$  への分解段階で ATP が生産されている可能性が考えられた。

一方、シュウ酸、グリオキシル酸、グリコール酸については、ギ酸よりも高い値となった。これらの基質についての代謝経路はまだよく分かっていないが、通常のアセチル-CoA 経路以外の ATP 生産段階が存在することが推定された。そこで、既存の嫌気性細菌で報告されている代謝経路から HUC22-1 株に適合するものを検索した結果、グリオキシル酸に関して、算出した  $Y_{ATP/P}$  に見合う ATP 生産が可能な代謝経路を見出した。

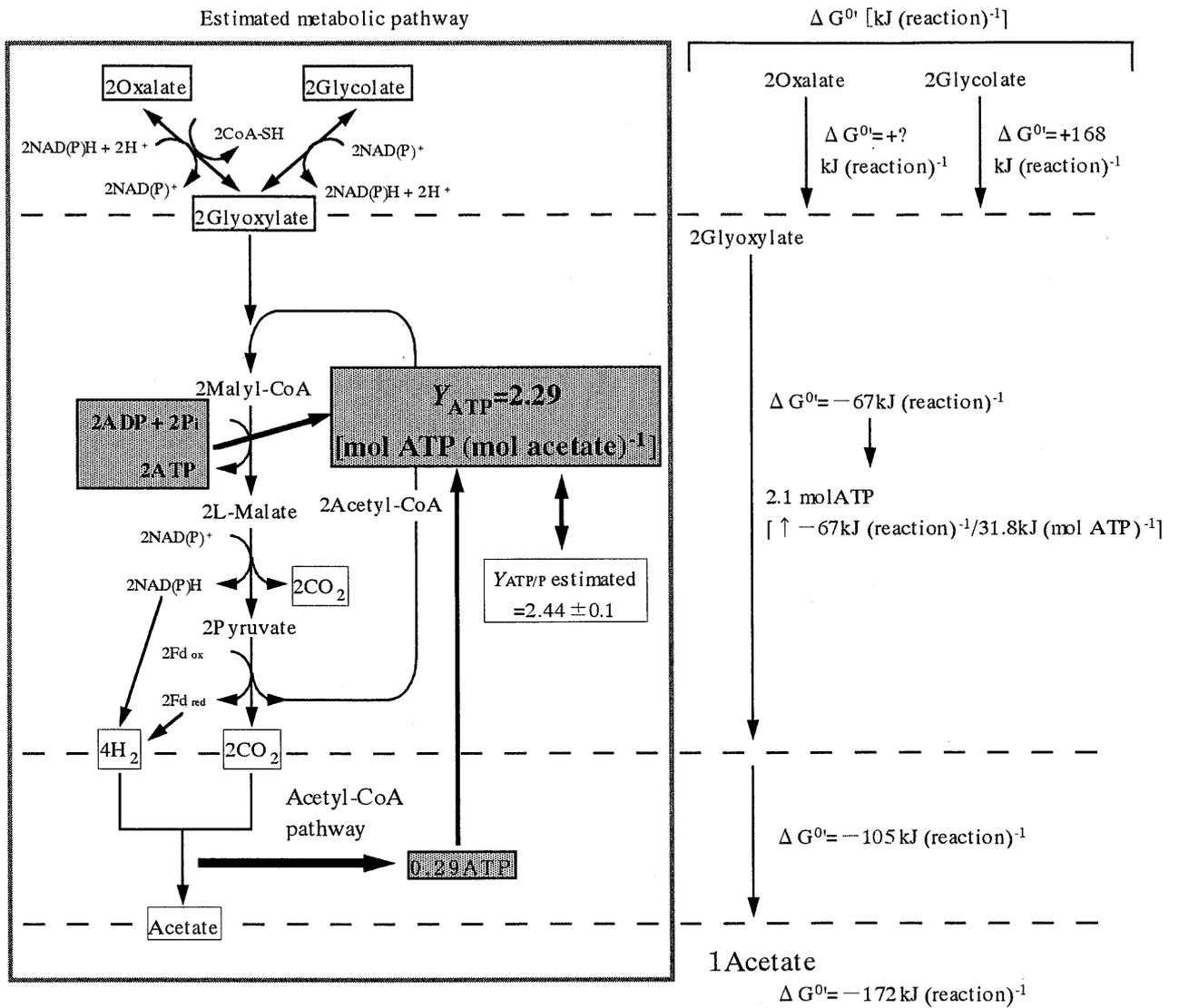


図6-5 HUC22-1株において推定されるシュウ酸、グリオキシル酸、グリコール酸の代謝経路

表 6-7 *M. thermoacetica* ATCC 39073 のゲノムデータベースにおいて予想される  
グリオキシル酸代謝経路の関連遺伝子

Enzyme	Gene number	Reference gene (AA blast research)
Malyl-CoA synthetase $\beta$ chain ?	Contig 306 Gene 2227	Malyl-CoA synthetase $\beta$ chain (EC, 6.2.1.9) [ <i>Methylobacterium extorquens</i> ]
Malyl-CoA synthetase $\alpha$ chain ?	Contig 306 Gene 2229	Malyl-CoA synthetase $\alpha$ chain (EC, 6.2.1.9) [ <i>Methylobacterium extorquens</i> ]
Malyl-CoA lyase ?	Contig 306 Gene 2230	Malyl-CoA lyase (EC, 4.1.3.24) [ <i>Methylobacterium extorquens</i> ]
Malic enzyme ?	Contig 306 Gene 2231	Malic enzyme (EC, 1.1.1.38) [ <i>Clostridium tetani</i> ]

The DOE Joint Genome Institute, USA (JGI, <http://www.jgi.doe.gov/index.html>)  
のデータベースより検索.

<使用記号一覧>

$\Delta G^0$ : 標準自由エネルギー変化 [kJ (mol)<sup>-1</sup>]

$t_d$ : 世代時間 (h)

$R_c$ : 炭素基準による基質の回収率 (%)

$R_e$ : 有効電子基準による基質の回収率 (%)

$Y_{ATP}$ : ATP 基準の増殖収率 [g cell (mol ATP)<sup>-1</sup>]

$Y_{ATP/P}$ : 代謝産物に対する ATP 収率 [mol ATP (mol product)<sup>-1</sup>]

$Y_{ave}$ : 有効電子基準の増殖収率 [g cell (ave)<sup>-1</sup>]

$Y_{P/S}$ : 基質に対する生産物収率 [mol product (mol substrate)<sup>-1</sup>]

$Y_{X/P}$ : 代謝産物に対する増殖収率 [g cell (mol product)<sup>-1</sup>]

$Y_{X/S}$ : 基質消費に対する増殖収率 [g cell (mol substrate)<sup>-1</sup>]

## 第7章 エタノール高生産株の作製

### 第1節 緒言

第5章では、培養 pH を中心とした培養条件の検討によるエタノール及び酢酸の高生産化を試みた。しかし、エタノール生産に関しては、低い生産量に留まる結果となった。そのため、本菌のエタノール生産をさらに増加させるため、本菌の代謝経路自体を改変させる必要があると考えられた。そこで、本章では、エタノールを高生産する変異株の作製を試みた。

変異手法としては、物理的変異源や化学的変異源を用いて突然変異を誘発する方法と遺伝子工学的手法を用いた方法が挙げられた。物理的変異源としては、X 線や紫外線があり、化学的変異源としては、Ethylmethansulfonate (EMS)、*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (NTG)、亜硝酸、アクリジン系色素などが用いられている<sup>133), 134)</sup>。遺伝子工学的手法は、本菌の遺伝子情報がほとんど分かっていなかったこと(2002年当時)や遺伝子導入系が整備されていなかったこと、遺伝子組換え微生物を産業利用するのが困難であったことから、本研究では化学変異剤を用いた方法を選択した。化学変異剤の中で多くの使用例が報告され、*M. thermoacetica*<sup>135)</sup>においても使用実績がある NTG を使用した。

変異株のスクリーニング法については、寒天プレート培地や Roll-tube 上でコロニーを形成させ、生産されたエタノール、または、アセトアルデヒドを直接検出する方法が最も適していると考えられた。そこで、次の3つ方法を検討した。

- (1) Nitro blue tetrazolium (NBT) 法
- (2) 硝酸セリウム・アンモニウム法
- (3) Aldehyde indicator plate

また、本菌の予想される代謝経路では、アセチル-CoA からアセトアルデヒドを経てエタノールを生産する経路と酢酸を生産する経路に枝分かれしている。仮に、変異によってエタノール生産が増加した場合には、酢酸生産が低下して、エタノール生産側に代謝がシフトしている可能性が考えられる。つまり、酢酸低生産株を取得できれば、その中にエタノール高生産株が存在する可能性が考えられる。そこで、次の3つの酢酸低生産株の選別方法についても検討を行った。

- (4) Bromocresol purple (BCP)による判定
- (5) CaCO<sub>3</sub>による判定
- (6) フルオロ酢酸耐性

さらに、エタノール耐性株においてもエタノール代謝経路に変異が起きている例が報告されている。例えば、*T. ethanolicus* のエタノール耐性株では、外部エタノールの取り込みにおいて機能すると考えられる Primary alcohol dehydrogenase の酵素活性の欠失が報告されている<sup>97)</sup>。また、*C. thermocellum* のエタノール耐性株では、エタ

ノール生産の増加と酢酸生産の低下が確認されている<sup>136), 137)</sup>。そこで、本研究においてもエタノール耐性株の取得を試みた。

#### (7) エタノール耐性

### 第2節 方法

#### 7.2.1. NTG 処理及び変異株の単離

NTG の作用機構はよく解明されていないが、ジアゾメタンの生成に起因すると共に、細胞内の DNA 合成系に直接働いて変異を誘発すると考えられている。したがって DNA の複製系が停止するような極端な飢餓状態で変異を行うのは適していない<sup>138)</sup>。そのため、NTG 処理 buffer (Wash buffer) としては、Yeast extract を含まない基本培地 (ATCC 1754 PETC medium 改変, 還元剤 Cysteine-HCl soln., Ti(III) citrate soln. を含む) を用い、NTG 処理温度を 55°C に設定して行った。NTG 処理についての詳細は文献を参照した<sup>139), 140)</sup>。

フルクトースを基質として、1.2.2. (p.16) に従って対数増殖期まで培養した。以下の操作は可能な限りクリーンベンチ内、フィルターを通した N<sub>2</sub> 下で行った。培養液 5 ml を 15 ml の遠沈管に移し、3000 rpm で 10 分間遠心した。上清を捨て、沈殿を 4 ml の Wash buffer に懸濁し、再び 3000 rpm で 10 分間遠心を行った。この洗浄操作を計 2 回繰り返し、最終的に沈殿した菌体を 1.9 ml の Wash buffer に懸濁した。この懸濁液を予め N<sub>2</sub> で置換し、オートクレーブで滅菌しておいた 5 ml のバイアルビンに移し、N<sub>2</sub> で置換後にプチルゴム栓とアルミシールで封をした。7.3.1. (p.114) で決定した条件に従い 0.005 g ml<sup>-1</sup> NTG soln. (in Wash buffer) 0.1 ml を添加した [最終濃度 250 μg (ml)<sup>-1</sup>]。静置で 55°C、1 時間保温して反応後、NTG 処理した 2 ml を 1 ml ずつ 2 ml のマイクロチューブ 2 本に移した。それぞれ、6000 rpm で 5 分間遠心後、上清を捨て、沈殿を 1 ml の Wash buffer で懸濁した。再び遠心して Wash buffer で懸濁する洗浄操作を 2~3 回繰り返し、最終的に 2 ml の Wash buffer に懸濁したものを NTG 処理菌液とした。30 ml の加圧培養試験管 [基本培地 5 ml、フルクトース基質、(三紳工業)] に NTG 処理菌液 0.1 ml ずつ加え、55°C で一晩培養を行った (変異固定培養)。変異剤処理後、突然変異が表現されるまでには、分離遅延と表現遅延の現象があるため、適当に世代増殖させる変異固定培養が必要となる<sup>138)</sup>。また、各試験管からは 1 つの表現型に対して 1 個のコロニーをとるようにし、変異株の重複を防ぐようにする。そのため、できる限り多くの試験管に分けて植菌するようにした。一晩培養した培養液 0.1 ml を Roll-tube (1.2.3., p.17) に植菌して、スクリーニングを行い、コロニーを単離した。フルオロ酢酸耐性でスクリーニングを行う場合は、培養液をそのまま植菌した。一方、BCP のみでスクリーニングを行う場合は、Wash buffer で 10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>6</sup> 倍に希釈して、それぞれを植菌して Roll-tube を作製した。3~14 日間培養後、形成されたコロニーを単離した (1.2.3., p.17)。単離したコロニーを 30 ml の加

圧培養試験管（基本培地 5 ml、H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 基質、または、フルクトース基質）に植菌して、培養後の生産物を HPLC (1.2.8., p.19) にて評価した（1 回目の培養）。さらに、必要に応じて、継代培養を行い、変異株を評価した。

### 7.2.2. Nitro blue tetrazolium (NBT) 法

Nitro blue tetrazolium (Sigma) を始め、様々なテトラゾリウム塩は、ADH や Lactate dehydrogenase などの脱水素酵素の活性測定やタンパク質泳動ゲルの活性染色に利用されている<sup>141), 142), 143)</sup>。その反応を図 7-1 に示す。NADH を補酵素とする ADH を例にとると、エタノールからアセトアルデヒドに酸化される時に NAD<sup>+</sup> が NADH に還元される。還元された NADH がテトラゾリウムを還元し、自らは NAD<sup>+</sup> に酸化される。還元されたテトラゾリウムが色の変化を起こすことによって ADH 活性を検出できる。NBT は無色から青色、または、紫色に変化する。この方法は、非常に感度の高い方法で、ADH が存在すれば、微量なエタノールを検出することができると思われる。

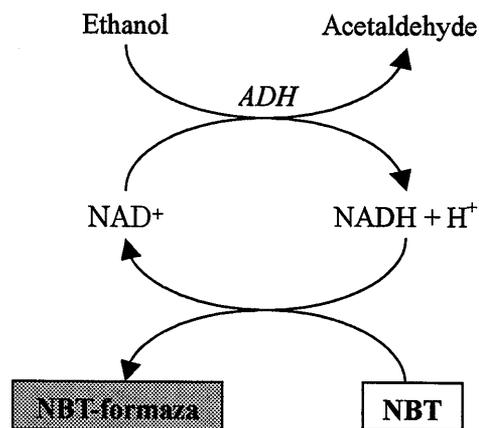


図 7-1 NBT 法の反応概略

### 7.2.3. 硝酸セリウム・アンモニウム法

硝酸セリウム・アンモニウムはアルコール類と反応して赤色の錯アニオンを生成することから、この呈色反応を利用してアルコール類の検出を行うことができる（式 7-1）。硝酸セリウム・アンモニウム [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Ce(NO<sub>3</sub>)<sub>6</sub>] 400 g を 2M 硝酸 1L に溶解したものを反応液とした。反応液 500 μl に対して試料液を数滴～200 μl を加え、色の変化を観察した。アルコールが存在する場合、黄色から褐色に変化する。この方法は、液体培地で培養した菌液の上清を用いて行った。



#### 7.2.4. Aldehyde indicator plate

Aldehyde indicator plate は、Schiff 試薬 (*p*-Rosaniline と Bisulfite の混合物) がアルデヒドを検出することを利用している<sup>144)</sup>。但し、糖タンパク質などにも反応することがある。方法としては、*p*-Rosaniline soln. [12.5 mg (ml)<sup>-1</sup> in 100% Ethanol (片山化学工業)] 0.4 ml、Sodium bisulfite soln. [250 mg (ml)<sup>-1</sup> in MilliQ water (片山化学工業)] 0.2 ml を Roll-tube (20 ml, 1.2.3., p.17)に加えて通常通りに培養を行った。エタノールの前物質であるアセトアルデヒドが存在すれば、培地が無色から赤色に変化する。

#### 7.2.5. フルオロ酢酸耐性

フルオロ酢酸は、酢酸の取り込み経路が存在する場合に、Acetate kinase、Phosphotransacetylase によって取り込まれ、毒性のあるフルオロアセチル-CoA やフルオロクエン酸に変換されて細胞を死滅させる (図 7-2, p.113)。そのため、フルオロ酢酸に耐性を持つ微生物では、その原因の一つとして酢酸生産・取り込み経路、つまり、Acetate kinase や Phosphotransacetylase 活性の低下や欠損が起きていることが考えられる。表 7-1 (p.113) に他の菌におけるフルオロ酢酸耐性株の報告例を挙げる。*T. thermosaccharolyticum* のフルオロ酢酸耐性株では、酢酸生産が野生株の約4分の1に、エタノール生産が2倍に変化したことが報告されている。また、*E. coli* のフルオロ酢酸耐性株では Acetate kinase、Phosphotransacetylase の酵素活性の欠失が確認されている。このようなことから本菌においても酢酸低生産株取得のスクリーニング法としてフルオロ酢酸耐性株の取得が有効であると考えられた。そこで、本研究では、完全に菌が死滅する濃度のフルオロ酢酸 (Merck) を培地に直接添加して Roll-tube を作製し、形成されたコロニーの単離を試みた。尚、フルオロ酢酸は、フィルター滅菌ができなかったことから N<sub>2</sub> 置換してオートクレーブ滅菌した RO 水にフルオロ酢酸の粉末を溶解させた濃厚液を作製して用いた。

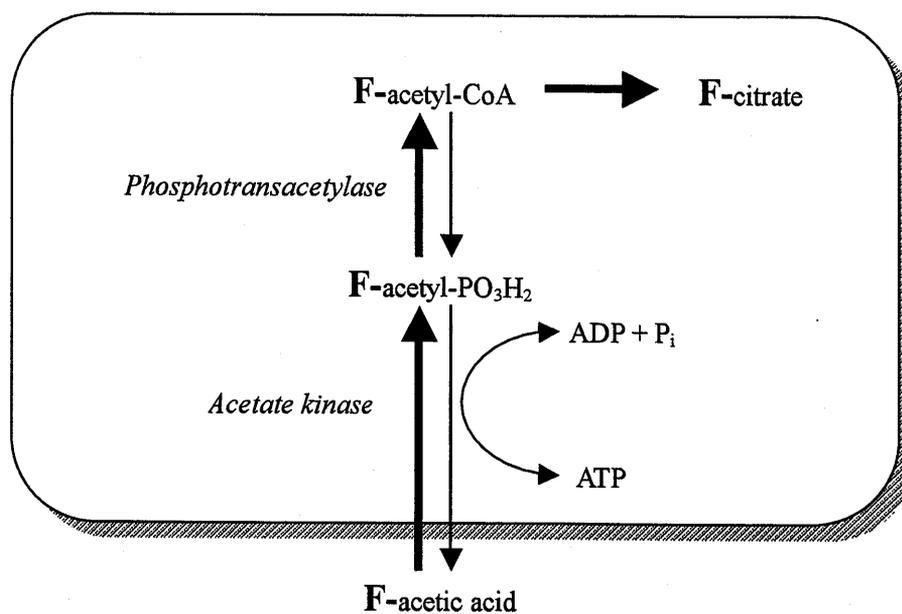


図 7-2 フルオロ酢酸の代謝

表 7-1 他の細菌におけるフルオロ酢酸耐性株

Strain	Substrate	Fluoroacetate (mM)	Products and enzymes	References
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> ATCC 7956	Cellobiose	30	Acetate ( $\times 1/4$ ) <sup>a</sup> Lactate ( $\times 1$ ) <sup>a</sup> Ethanol ( $\times 2$ ) <sup>a</sup>	145
<i>E. coli</i> K12	Pyruvate or proline	10 or 50	$\Delta$ acetate kinase activity <sup>b</sup> $\Delta$ phosphotransacetylase activity <sup>b</sup>	146
<i>Klebsiella aerogenes</i> strain 1033	Lactate	50		147

<sup>a</sup> 野生株と比較した生産量. <sup>b</sup> 酵素活性の欠失.

### 第3節 結果及び考察

#### 7.3.1. NTG 変異条件の検討

変異剤の濃度、処理時間は、一般的に生存率によって決定される。それは、生存率と変異の頻度の関係による。例えば、大腸菌において、50%の生存率になるように NTG 処理を行った場合、0.3%の頻度で、ある変異が生ずるという報告がある<sup>138)</sup>。一般的に、生存率が10%以下になるような条件で NTG 処理を行うことから次のように検討を行った。尚、処理温度を55°Cとし静置で行った。

7.2.1. (p.110)に従い0、150、200、250、300、400  $\mu\text{g (ml)}^{-1}$ の各 NTG 濃度で30分間処理を行い、Roll-tube でコロニーを形成させて菌数を測定した(図7-3, p.115)。そして、NTG 無添加の時の菌数を生存率100%として、それぞれの濃度における生存率を算出した。その結果、250  $\mu\text{g (ml)}^{-1}$ で3.3%と10%以下の生存率を示した。300、400  $\mu\text{g (ml)}^{-1}$ では、1%以下の生存率となり、これらの濃度では得られる変異株の数が少なくなると考え、250  $\mu\text{g (ml)}^{-1}$ を用いることにした。次に、NTG の濃度250  $\mu\text{g (ml)}^{-1}$ の条件で、0、5、15、30、60、120 分間の処理を行い、同様に生存率を調べた(図7-4, p.115)。その結果、15分間で6.1%と10%以下の生存率を示した。しかし、60分間で3.6%と生存率がやや下がったことから処理の確実性を上げるため15分間ではなく、60分間を以降の実験に用いた。

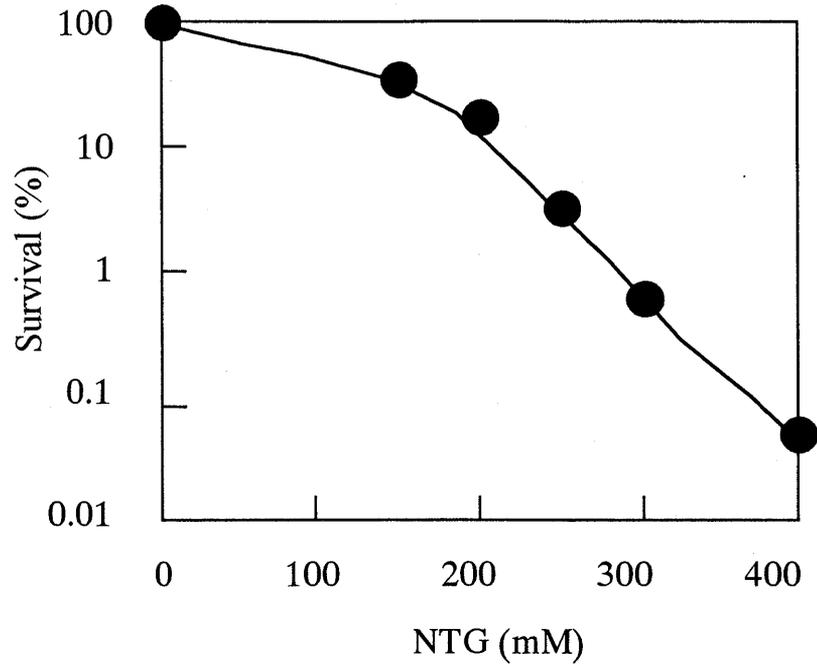


図7-3 NTG処理濃度の検討

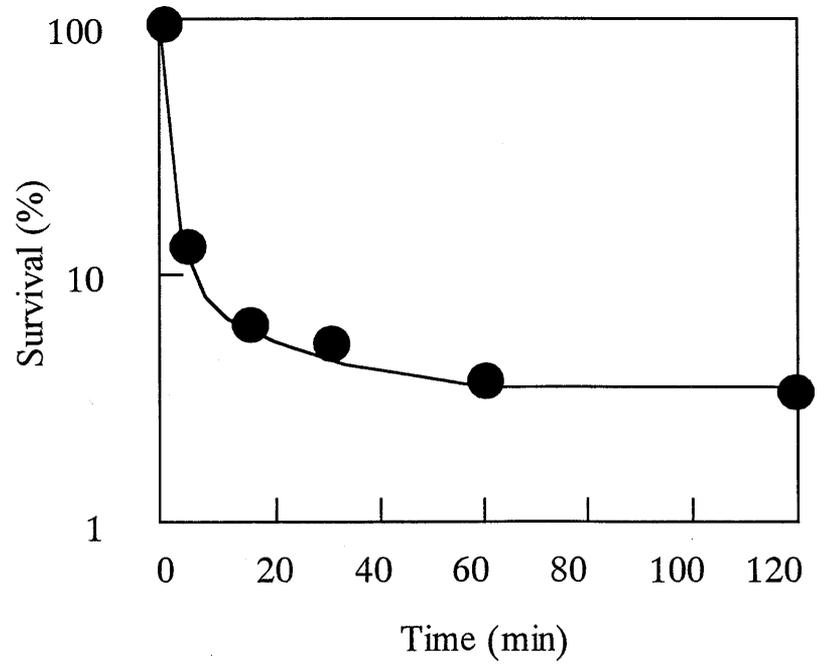


図7-4 NTG処理時間の検討

### 7.3.2. エタノール高生産株のスクリーニング法の検討

#### (1) Nitro blue tetrazolium 法の検討

Bochner らの検討にあった Indicator plate の NBT 濃度 0.0025% を基本として考えた<sup>148)</sup>。0.5% 溶液を Roll-tube (20 ml) に 50、100、250、500、1000  $\mu$ l を添加した。その結果、250  $\mu$ l から添加しただけで、無色から紫色に変化した。50、100  $\mu$ l でもやや色の変化が見られた。この原因は、培地の還元剤による影響を受け、既に還元反応が起きている可能性が考えられた。そのため、この方法は利用できないと判断した。

#### (2) 硝酸セリウム・アンモニウム法の検討

3~100% のエタノール溶液を 20-200  $\mu$ l 用のピペットマンで 1 滴から数滴加えた場合、500  $\mu$ l の反応液は褐色に変化し、エタノールが検出された。さらに、1% では、10 滴加えた場合に検出された。しかし、0.5% 以下では 100  $\mu$ l 以上加えてもエタノールは検出されなかった。このことから約 1% (200 mM) までは判定可能であることが分かった。しかし、実際に想定されるエタノール濃度は 50 mM を超えることはないと考えられたので、この試験法の感度では難しいことが分かった。実際、培養液の上清とそれに 25 mM のエタノールを加えた試料をそれぞれ試験したが、エタノールは検出されなかった。そのため、この方法は利用できないと判断した。

#### (3) Aldehyde indicator plate の検討

*p*-Rosaniline soln. 0.4 ml, Sodium bisulfite soln. 0.2 ml を加えて Roll-tube (1.2.3., p.17) を作製し、基質  $H_2$ - $CO_2$ 、フルクトース、ピルビン酸について検討を行った。その結果、ピルビン酸は、培養前に呈色し、使用できないことが分かった。また、フルクトースも弱い呈色を示す場合があった。さらに、 $H_2$ - $CO_2$  培養、フルクトース培養共に、無添加区と比べてコロニーの形成が遅く、数も少なかったことからこの方法は、菌の増殖への影響があると考えられた。そのため、この方法は利用できないと判断した。

### 7.3.3. 酢酸低生産株のスクリーニング法の検討

#### (1) BCP の検討

pH 指示薬である BCP は pH 5.2~6.8 で紫色を示し、pH 5.2 以下では黄色を示す。この BCP は乳製品検査における乳酸菌の簡易測定用培地の成分として用いられている<sup>149)</sup>。その際に用いられる BCP 加プレートカウント寒天培地の BCP 濃度 0.06 g l<sup>-1</sup> を参考に、Roll-tube (1.2.3., p.17) を作製して検討を行った。目的とする変異株は、酸生産の低い株であることから紫色のまま変化しないコロニーを単離することになる。しかし、0.06 g l<sup>-1</sup> の濃度では、紫色が強く、コロニーが見にくかったことから濃

度 $0.04 \text{ g l}^{-1}$ まで落としてスクリーニングに用いることとした。野生株では、酢酸生産に伴いコロニーと周辺の培地が紫色から黄色に変化することが確認された。また、この濃度では、無添加区と比べて、コロニー形成に差が見られなかったことからスクリーニングに使用できると判断した。

### (2) $\text{CaCO}_3$ の検討

$\text{CaCO}_3$ についても乳酸菌用の培地成分として用いられている<sup>149)</sup>。培地に添加した $\text{CaCO}_3$ はpH中性では不溶性を示し、沈殿して培地全体が白濁している。しかし、生産された酸によって $\text{CaCO}_3$ が可溶化し、コロニー周辺培地が白濁から透明に変化する。これはクリアゾーンと呼ばれ、酸生産能を判定することができる。そこで、乳酸菌で用いられているGYP白垂寒天培地の $\text{CaCO}_3$ 濃度 $5 \text{ g l}^{-1}$ を参考にRoll-tubeを作製し、コロニーの形成を調べた。その結果、野生株では、クリアゾーンの形成が見られ、うまく機能することが分かった。目的とする変異株は、酸生産の低い株であることからクリアゾーンを作らないコロニーを単離することになる。しかし、HUC22-1株のコロニーは白色で、 $\text{CaCO}_3$ の白濁の中では、コロニーが見にくいことから本方法はBCPを用いた方法と比べて不適當であると判断した。

### (3) フルオロ酢酸の検討

フルオロ酢酸を濃度0、2、5、10、20、30、40 mMで添加したRoll-tube (1.2.3., p.17) を作製した。フルオロ酢酸無添加区では $55^\circ\text{C}$ で4日間培養、フルオロ酢酸添加区では7日間の培養を行った。培養後、菌数を測定し、フルオロ酢酸無添加区の菌数を生存率100%として、それぞれの濃度における生存率を算出した(図7-5)。その結果、10 mMで生存率がほぼ10%になった。20 mM以上では、コロニー形成が見られなかった。耐性株の取得には、完全に生育できないフルオロ酢酸の濃度が必要であるため、20 mMより高い30 mMを選択し、阻害効果の確実性を上げてスクリーニングに用いることにした。30 mMの濃度は、他の菌で使用されているフルオロ酢酸濃度の範囲10~50 mM (表7-1, p.113) を考えても妥当であると考えられた。

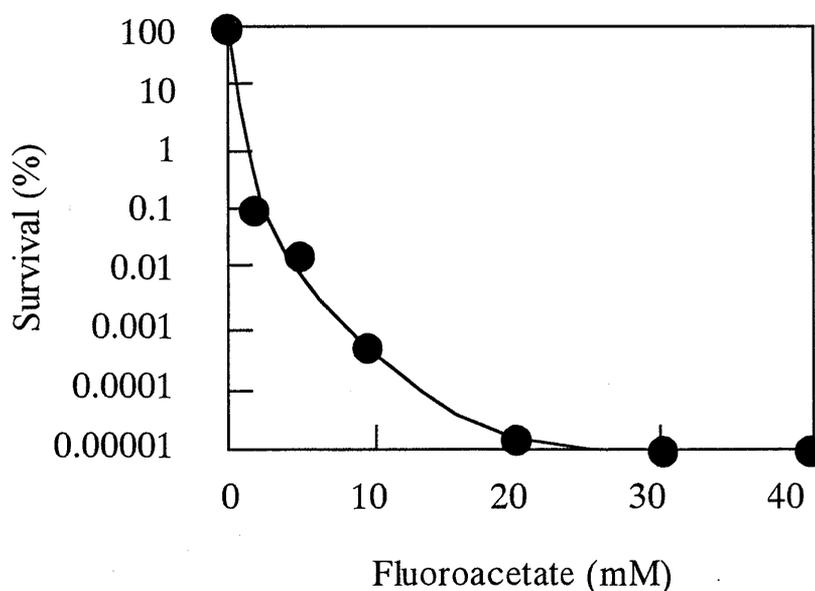


図7-5 フルオロ酢酸処理濃度の検討

#### 7.3.4. BCP 陰性株の単離及び評価

酸生産によって BCP の色に変化した株を陽性株とし、色の変化がなかった株を陰性株として、本実験では BCP 陰性株の取得を試みた。最終的に BCP 陰性株 185 株を単離した。これらの株を  $H_2$ - $CO_2$  基質、または、フルクトース基質においてそれぞれ回分培養を行い、生産物を検討した。BCP 陰性株では、1 回目 (7.2.1., p.110) の  $H_2$ - $CO_2$  回分培養においてエタノール生産が 2 mM 以上の株が、185 株中 1 株得られた (表 7-2, p.119)。また、野生株のエタノール生産量と同じ 0~2 mM の株は、161 株であり、単離株の大半が野生株と変わらない結果であった。さらに、エタノールが検出されなかった株が 21 株あった。エタノールが生産されなかった原因についての詳細は不明である。エタノール生産が高かった 1 株を継代して回分培養を行った。しかし、継代後のエタノール生産は野生株と変わらない量であったことから、この株のエタノール高生産は一過性だったと考えられた。一方、1 回目のフルクトース培養でも、エタノール生産が 1 mM 以上の株が 1 株得られた ( $H_2$ - $CO_2$  培養とは別の株)。しかし、その株のエタノール生産量は、 $H_2$ - $CO_2$  培養と同様に一過性であった。結局、ほとんどの株が、野生株と同じ性質を示す結果となった。

酢酸生産については、酢酸生産が低くなっていると判断される 30 mM 以下の株が、 $H_2$ - $CO_2$  培養では、185 株中 18 株、フルクトース培養では 13 株となり、ほとんど目的のものが得られていない結果となった (表 7-3, p.120)。また、エタノール生産が高かった 2 株についての酢酸生産量は野生株と変わらない結果であった。スクリーニング条件の検討では、BCP はコロニーが形成される数については影響しないと判断された (7.3.3., p.115)。しかし、実際スクリーニングを行っている際には、コロニーの大きさが野生株より小さい状態で留まっている場合が見られ、生育に影響を与えていることが考えられた。さらに、液体培地の回分培養においても  $OD_{660}$  が低い場合が多かったことから生育への影響が考えられた。そのため、菌の増殖が不十分で、酸をあまり生産していない段階のコロニーを変異株として単離した場合が多かったのではないかと考えられた。また、この方法はコロニーが集中している箇所では、周辺のコロニーから影響を受けて、判定が難しいという欠点も見られた。そこで、変異株単離期間の途中で、BCP 陰性株の単離よりもフルオロ酢酸耐性株の単離に絞って検討を続けた。

#### 7.3.5. フルオロ酢酸耐性株の単離及び評価

最終的にフルオロ酢酸耐性株 603 株を単離した。これらの株を  $H_2$ - $CO_2$  基質、または、フルクトース基質において回分培養を行い、生産物を検討した。まず、フルオロ酢酸耐性株については、コロニー単離直後の  $H_2$ - $CO_2$  培養においてエタノール生産が 2 mM 以上の株が 603 株中 5 株得られた (表 7-2, p.119)。また、野生株のエタノール生産量と同じ 0~2 mM の株は 497 株であり、単離株の大半が野生株と変わらない結果であった。さらに、エタノールが検出されなかった株が 101 株あった。エタノ

ールを生産しなかった原因についての詳細は不明である。エタノール生産が高かった5株を継代して回分培養を行った。しかし、継代後のエタノール生産は0~2 mMであり、野生株と変わらなかったことから、これらの株のエタノール高生産は一過性であったと考えられた。

一方、1回目のフルクトース培養でも、エタノール生産が1 mM以上の株が4株得られた。しかし、H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>培養と同様に継代後に生産量を維持するものは得られなかった。尚、H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>培養とフルクトース培養の両方でエタノール生産が高かった株は得られなかった。

変異株の酢酸生産については、酢酸生産が低いと判断される30 mM以下の株が、H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>培養では603株中28株、フルクトース培養では10株であり、ほとんど目的のものが得られていない結果となった(表7-3, p.120)。この原因の一つとしては、フルオロ酢酸耐性の変異が酢酸生産・取り込み経路とは関係のない変化であったことが考えられた。例えば、代謝産物フルオロアセチル-CoAやフルオロクエン酸に対する何らかの抵抗性を持つことが挙げられる。もう一つは、元々本菌のフルオロ酢酸による毒性が酢酸生産・取り込み経路によらないメカニズムであったことも考えられる。例えば、細胞膜などに直接作用して毒性を示すことが挙げられる。これら場合では、変異株の酢酸生産量には影響しないと考えられる。

表 7-2 酢酸低生産株として単離した788株のエタノール生産

Mutant	Substrate	Ethanol production	Isolates
BCP (185 isolates)	H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub>	N.D.	21
		0~2 mM	163
		2 mM <	1
	Fructose	N.D.	161
		0~1 mM	23
		1 mM <	1
Fluoroacetate-resistant (603 isolates)	H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub>	N.D.	101
		0~2 mM	497
		2 mM <	5
	Fructose	N.D.	412
		0~1 mM	187
		1 mM <	4

コロニー単離後に各基質を含む液体培地で1回目の回分培養を行った結果、エタノール生産量2 mM (H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>)、1 mM (Fructose)を基準に分類。

N.D.: not detected.

表 7-3 酢酸低生産株として単離した 788 株の酢酸生産

Mutant	Substrate	Acetate production	Isolates
BCP (185 isolates)	H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub>	< 30 mM	18
		30 mM <	167
	Fructose	< 30 mM	13
		30 mM <	172
Fluoroacetate-resistant (603 isolates)	H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub>	< 30 mM	28
		30 mM <	575
	Fructose	< 30 mM	10
		30 mM <	293

コロニー単離後に各基質を含む液体培地で1回目の回分培養を行った結果、酢酸生産量 30 mM を基準に分類。

#### 7.3.6. エタノール耐性株の単離及び評価 (フルクトース基質)

4.3.3. (p.67)で本菌は、フルクトース培養においてエタノール濃度 5% (v/v) まで生育可能であることを報告した。そこで、終濃度が 6%、7% (v/v) になるようエタノールを添加し、フルクトースを基質として Roll-tube (1.2.3., p.17) を作製し、エタノール耐性株の取得を試みた。最終的に、エタノール濃度 6% (v/v) まで生育可能な株が 8 株得られた。しかし、培養時間は 10~14 日間と通常の 3~4 倍の時間を必要とした。これらのエタノール耐性株についてエタノール生産能を H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 基質、フルクトース基質を用いた回分培養で比較した。その結果、野生株と変わらないエタノール生産量であった。この原因としては、変異株がエタノール無添加の状態におかれた場合に、変異が復帰したことが考えられた。しかし、再び 6% (v/v) のエタノールを添加した培地に継代しても生育できたことから、変異は維持されていると考えられた。そのため、これらの株では、エタノール生産・取り込み経路の酵素系以外で変異が起きていると考えられた。

さらに、エタノール濃度 7% (v/v) 以上で生育する株は取得できなかった。また、6% (v/v) で単離できた 8 株をエタノール濃度 7% (v/v) の培地に継代培養を行ったが、生育は見られなかった。

以上 7.3.4. (p.118)、7.3.5. (p.118)、7.3.6. で 3 種類の変異株の単離を試みた。しかし、単離株の大部分は、野生株と同様な性質を示したことから変異株作製方法に問題があると考えられた。スクリーニング法における問題点については、各項目で記述し

件が適切でないか、元々NTG が利きにくい菌株であることが考えられた。本菌は、胞子形成能をもっていることから、生存が脅かされるような環境では、すぐに、胞子を形成し、NTG の影響を受けにくくなっているのかもしれない。そのため、別の変異方法、例えば、UV 処理などを検討することも必要ではないかと考えられる。

現在、当研究室では、猪熊らによって遺伝子工学的手法を用いたアプローチが検討されている。3 章でも述べたが、ADH や ACDH 遺伝子のクローニングを終了しており、それらの遺伝子を導入するための宿主ベクター系の構築を進めているところである。

#### 第 4 節 要約

本章では、化学変異剤 NTG で変異処理し、3 種類のスクリーニング法 (BCP 陰性、フルオロ酢酸耐性、エタノール耐性) を確立して、エタノール高生産株の作製を試みた。その結果、BCP 陰性株 185 株、フルオロ酢酸耐性株 603 株、エタノール耐性株 8 株を取得した。単離株について  $H_2$ - $CO_2$  培養における 1 回目の生産物評価を実施した。その結果、野生株よりもエタノール生産が高かった株が 6 株得られた (BCP 陰性株, 1 株; フルオロ酢酸耐性株, 5 株)。しかし、継代後にエタノール生産を維持する株は得られなかった。一方、フルクトース培養における 1 回目の生産物評価では、エタノール生産が野生株よりも高かった株が 5 株得られた (BCP 陰性株, 1 株; フルオロ酢酸耐性株, 4 株)。しかし、これらの株も  $H_2$ - $CO_2$  培養と同様に継代後にエタノール生産を維持する株は得られなかった。

## 総括

第1章、第2章において当研究室で新規に単離した HUC22-1 株が、 $H_2$ - $CO_2$  からエタノール生産が可能なることを好熱性細菌では初めて報告した。本菌は、16S rRNA 遺伝子配列の解析によって *Moorella* 属に属することが決定された。*Moorella* 属は、嫌気性好熱性酢酸生産菌の代表的な菌である。さらに、基質資化性のパターンは、*M. thermoacetica* のパターンとほぼ同じであった。これまでに、*M. thermoacetica* については、多くの種類が報告されており、Type strain と性質が変わっているものも知られるが、それらも *M. thermoacetica* に分類されている<sup>60), 68)</sup>。今回の検討において HUC22-1 株は、新種とは判定されなかったが、そのエタノール生産能から *M. thermoacetica* の中でも特異な種であることが推察された。

嫌気性酢酸生産菌においては、酢酸生産経路が主要な経路であり、それは ATP 生産経路の役割を果たすことから理解される。それでは、なぜ、少量でもエタノールを生産するのか、その原因を探索することは本菌の性質を理解する上でも大変興味深い。さらに、ガス基質を利用できないが、同じような好熱性嫌気性細菌で糖からエタノールを生産できる *Thermoanaerobacter* 属や *Thermoanaerobacterium* 属の菌と比較することは細菌の分類や進化の面からも興味を持たれる。例えば、エタノール生産に関係する酵素群の類似性などを比較することによって属間の関係が新たに見出される可能性も考えられる。

中温性酢酸生産菌である *C. ljungdahlii* においては、Yeast extract やある種のビタミンなどの培地成分がガス基質からのエタノール生産に影響を及ぼすことが報告されている<sup>6), 18)</sup>。また、他の *Clostridium* 属の菌においても培地成分の制限によって菌の増殖は低下するが、エタノール生産は増加することが報告されている<sup>150), 151)</sup>。さらに別の例として *Acetobacterium woodii* において、Buschhorn らが高い基質濃度（グルコース）とリン酸を制限した条件で培養した時に、増殖の定常期以降でエタノールを生産したことを報告しており、このリン酸の制限が、アセチル-CoA の細胞内プール量を増加させ、その分が酢酸生産ではなく、エタノール生産に流れているのではないかと考察している<sup>22)</sup>。これらのことから酢酸生産菌におけるエタノール生産は、増殖に何らかの制限を受けた時に起きる代謝の応答反応の一つではないかと考えられる。そこで、喜多によって基本培地成分の Yeast extract、Trace element、Wolf's vitamin solution、塩化アンモニウム、そして、リン酸カリウムの量をそれぞれ変えた条件で、バイアルビンを用いた回分培養を行い、 $H_2$ - $CO_2$  からのエタノール生産量の比較が検討されたが、これらの培地成分による影響はほとんど見られなかった<sup>67)</sup>。しかし、 $H_2$ - $CO_2$  培養においては増殖期でも孢子形成が見られること（図 1-4, p.25）、フルクトース培養より  $H_2$ - $CO_2$  培養の比増殖速度 ( $\mu$ ) が極めて低いこと（表 2-2, p.43）から  $H_2$ - $CO_2$  培養は、フルクトース培養などと比較して、増殖が制限された状態にあるのではないかと考えられる。それゆえ、HUC22-1 株の  $H_2$ - $CO_2$  存在下におけるエタノー

ル生産は、上述した *A. woodii* や他の菌と同じように増殖の制限によって起こっているのではないかと推察される。

第3章では、HUC22-1株においてアセチル-CoAからエタノールを生産する二つの酵素ADHとACDHの活性が検出されたことを報告した。そして、これらの酵素活性、特にエタノール生産側の酵素活性が、フルクトース培養よりも $H_2$ - $CO_2$ 培養の方が高いことを示した。このことは、バイアルビンを用いた回分培養で、 $H_2$ - $CO_2$ 培養の方がフルクトース培養よりもエタノール生産が高いという結果ともよく一致していた。エタノール生産には、還元力が必要であり、ADH、ACDHの反応では、補酵素NADHあるいはNADPHから還元力が供給されていると考えられる。実際、細胞内のNADH/NAD<sup>+</sup>、NADPH/NADP<sup>+</sup>の比率が $H_2$ - $CO_2$ 培養の方が、フルクトース培養よりも高くなっていることを実験によって確かめられ、考察を裏付けることができた。*Thermoanaerobacter ethanolicus* 39Eでは、ヘッドスペースに $H_2$ を加圧充填することによって細胞内のPyridine nucleotideのバランスが影響を受けることが報告されている<sup>m)</sup>。したがって、HUC22-1株においても $H_2$ - $CO_2$ 培養の高い $H_2$ 分圧によって細胞内のPyridine nucleotideのバランスが影響を受け、エタノール生産に有利に働いている可能性が考えられる。

第4章では、本菌の非解離型酢酸による増殖阻害を明らかにし、実際、第5章においてガス連続供給、pH制御、さらに、菌体の再利用を伴う培地交換を繰り返すことによって酢酸阻害を回避した反復回分培養を行った。その結果、培養条件を改良する以前よりも十数倍の菌体量、酢酸生産量の増加に成功した。これまでに*Moorella*属では、グルコース培養における酢酸の高生産化についての検討は行われていたが、 $H_2$ - $CO_2$ 培養では報告されておらず、ガス基質を利用した微生物の応用面で貴重な情報を得ることができたと考えられる。しかし、本菌の特徴であるエタノール生産については、増加には成功したが、不十分な濃度に留まった。

以上のことから本菌によるエタノール生産を高めるためには、本菌の代謝を詳細に把握し、代謝工学的あるいは遺伝学的手法によって本菌の炭素や電子の流れを操作し、エタノールを高生産するように代謝を改変させることが必要であると考えられた。

そこで、第6章では、 $H_2$ - $CO_2$ と関連する基質についてどのような経路で利用され、増殖にどのような特徴があるのかを検討した。特に、ATP生産面について着目した結果、それぞれの基質において通常のアセチル-CoA経路以外にATP生産の役割を果たす代謝経路が存在していることが推察された。これにより本菌において種々のATP代謝が行われていることが示唆された。

また、第7章では、実際に化学変異剤を用いた変異法によって、酢酸生産からエタノール生産にシフトし、酢酸低生産株になった変異株の取得とエタノール耐性株の取得を試みた。しかし、目的とする変異株を得ることはできなかった。今回の検討での反省点は、(1) エタノール高生産株を直接スクリーニングする方法を見つけれ

れなかったこと、(2) 大量に変異株を選別、取得できる方法を確立できなかったこと、(3) 変異条件が適切かどうかの判断が足りなかったことが挙げられた。これらの点を解決した変異株の単離方法が確立できれば、エタノール高生産株の作製につながると期待される。

現在、当研究室の猪熊らによって遺伝子工学的手法を用いた本菌のエタノール代謝の解析が行われている。そして、遺伝子導入系を用いて ADH や ACDH 遺伝子を高発現させることによってエタノール高生産株を作製する試みや、逆に、遺伝子破壊によってその機能を解明する試みが検討されている。このアプローチからは多くの情報が得られることが期待され、より高いエタノール生産能を持つ株を作製するためのストラテジーの構築につながると考えられる。

我々が単離した好熱性細菌をエタノール生産に利用できれば、培養とエタノール回収の両方を同時に行える効率的なプロセスを開発できる可能性が考えられる。そして、最終的には、未利用資源の有効利用法として確立され、環境にやさしい、資源循環型社会構築の一助になることが期待される。

以上

## 参考文献

- 1) Sun, Y. and Cheng, J.: Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.*, 83, 1-11 (2002).
- 2) 中島田豊: 回収されたバイオガスの活用法, *生物工学会誌*, 81, 122 (2003).
- 3) McKendry, P.: Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresour. Technol.*, 83, 37-46 (2002a).
- 4) McKendry, P.: Energy production from biomass (part 2): conversion technologies. *Bioresour. Technol.*, 83, 47-54 (2002b).
- 5) McKendry, P.: Energy production from biomass (part 3): gasification technologies. *Bioresour. Technol.*, 83, 55-63 (2002c).
- 6) Klasson, K. T., Ackerson, M. D., Clausen, E. C., and Gaddy, J. L.: Bioreactor design for synthesis gas fermentations. *Fuel.*, 70, 605-614 (1991).
- 7) Wendlandt, K. D., Jeckorek, M., Helm, J., and Stottmeister, U.: Producing poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular mass from methane. *J. Biotechnol.*, 86, 127-133 (2001).
- 8) Blaut, M.: Metabolism of methanogens. *Antonie van Leeuwenhoek*, 66, 187-208 (1994).
- 9) Deppenmeier, U., Müller, V., and Gottschalk, G.: Pathways of energy conservation in methanogenic archaea. *Arch. Microbiol.*, 165, 149-163 (1996).
- 10) Deppenmeier, U.: Redox-driven proton translocation in methanogenic Archaea. *Cell. Mol. Life. Sci.*, 59, 1513-1533 (2002).
- 11) Wieringa, K. T.: Over het verdwijnen van waterstof and koolzuur onder anaerobe voorwaarden. *Antonie van Leeuwenhoek*, 3, 263-273 (1936).

- 12) Braun, M., Mayer, F., and Gottschalk, G.: *Clostridium aceticum* (Wieringa), a microorganism producing acetic acid from molecular hydrogen and carbon dioxide. Arch. Microbiol., 128, 288-293 (1981).
- 13) Balch, W. E., Schoberth, S., Tanner, R. S., and Wolfe, R. S.: *Acetobacterium*, a new genus of hydrogen-oxidizing, carbon dioxide-reducing, anaerobic bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol., 27, 355-361 (1977).
- 14) Drake, H. L., Küsel, K., and Matthies, C.: Ecological consequences of the phylogenetic and physiological diversities of acetogens. Antonie van Leeuwenhoek, 81, 203-213 (2002).
- 15) Ljungdahl, L. G.: The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria. Ann. Rev. Microbiol., 40, 415-450 (1986).
- 16) Diekert, G., and Wohlfarth, G.: Metabolism of homoacetogens. Antonie van Leeuwenhoek, 66, 209-221 (1994).
- 17) 今井竹夫: アセチルコエンザイム A 経路—嫌気性細菌の CO<sub>2</sub> 固定経路, 生化学, 66, 1335-1339 (1994).
- 18) Vega, J. L., Prieto, S., Elmore, B. B., Clausen, E. C., and Gaddy, J. L.: The biological production of ethanol from synthesis gas. Appl. Biochem. Biotechnol., 20/21, 781-797 (1989b).
- 19) Tanner, R. S., Miller, L. M., and Yang, D.: *Clostridium ljungdahlii* sp. nov., an acetogenic species in clostridial rRNA homology group I. Int. J. Syst. Bacteriol., 43, 232-236 (1993).
- 20) Abrini, J., Naveau, H., and Nyns, E. J.: *Clostridium autoethanogenum*, sp. nov., an anaerobic bacterium that produces ethanol from carbon monoxide. Arch. Microbiol., 161, 345-351 (1994).
- 21) Rajagopalan, S., Datar, R. P., and Lewis, R. S.: Formation of ethanol from carbon monoxide via a new microbial catalyst. Biomass and Bioenergy, 23, 487-493 (2002).

- 22) Buschhorn, H., Dürre, P., and Gottschalk, G.: Production and utilization of ethanol by the homoacetogen *Acetobacterium woodii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1835-1840 (1989).
- 23) Fröstl, J. M., Seifritz, C., and Drake, H. L.: Effect of nitrate on the autotrophic metabolism of the acetogens *Clostridium thermoautotrophicum* and *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol.*, 178, 4597-4603 (1996).
- 24) White, H., Lebertz, H., Thanos, I., and Simon, H.: *Clostridium thermoaceticum* forms methanol from carbon monoxide in the presence of viologen dyes. *FEMS Microbiol. Lett.*, 43, 173-176 (1987).
- 25) Simon, H., White, H., Lebertz, H., and Thanos, I.: Reduction of 2-enoates and alkanooates with carbon monoxide or formate, viologens, and *Clostridium thermoaceticum* to saturated acids and unsaturated alcohols. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 26, 785-787 (1987).
- 26) 化学工業年鑑 2003 年版, 化学工業日報社, (2003).
- 27) 齊木隆, 西惟義: アルコール発酵 (酵母) 「発酵ハンドブック」, pp43-48, 共立出版, (2001).
- 28) 「12093 の化学商品」, 化学工業日報社, (1993).
- 29) R. ホワイマン著, 碓屋隆雄, 山田徹訳: 「有機金属と触媒—工業プロセスへの展開—」, pp39-59, 化学同人, (2003).
- 30) Cheryan, M., Parekh, S., Shah, M., and Witjitra, K.: Production of acetic acid by *Clostridium thermoaceticum*. *Adv. Appl. Microbiol.*, 43, 1-33 (1997).
- 31) Lamed, R. and Zeikus, J. G.: Ethanol production by thermophilic bacteria: relationship between fermentation product yields and catabolic enzyme activities in *Clostridium thermocellum* and *Thermoanaerobium brockii*. *J. Bacteriol.*, 144, 569-578 (1980).
- 32) Zeikus, J. G.: Chemical and fuel production by anaerobic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 34, 423-464 (1980).

- 33) Payton, M. A.: Production of ethanol by thermophilic bacteria. *Trends Biotechnol.*, 2, 153-158 (1984).
- 34) 亀山秀雄: 水素製造技術, 化学工学, 68, 166-171 (2004).
- 35) 吉本秀之: 卒業論文, (2002).
- 36) 吉本秀之: 修士論文, (2004).
- 37) Hungate, R. E.: A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. *Methods Microbiol.*, 3B, 117-132 (1969).
- 38) Miller, T. L. and Wolin, M. J.: A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *Appl. Microbiol.*, 27, 985-987 (1974).
- 39) Zehnder, A. J. and Wuhrmann, K.: Titanium ( III ) citrate as a nontoxic oxidation-reduction buffering system for the culture of obligate anaerobes. *Science*, 194, 1165-1166 (1976).
- 40) 古賀洋介, 森井宏幸, 西原正照: メタン生成細菌の分離・培養法の実際, 発酵工学, 65, 419-430 (1987).
- 41) 稲森悠平: 嫌気性菌の分離と培養「極限環境微生物ハンドブック」, 大島泰郎監修, 今中忠行, 松沢洋編集: pp263-273, サイエンスフォーラム, (1991).
- 42) 福井学: バクテリア「顕微鏡フル活用術イラストレイテッドー基礎から応用までー」, 稲澤譲治, 津田均, 小島清嗣監修: pp147-150, 秀潤社, (2000).
- 43) 田中隆明: 位相差観察「顕微鏡フル活用術イラストレイテッドー基礎から応用までー」, 稲澤譲治, 津田均, 小島清嗣監修: pp34-41, 秀潤社, (2000).
- 44) Barrow, G. I., and Feltham, R. K. A.: *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*, 3rd edn. Cambridge: Cambridge University, pp. 21-42 (1993).
- 45) Marwoto, B., Nakashimada, Y., Kakizono, T., and Nishio, N.: Metabolic analysis of acetate accumulation during xylose consumption by *Paenibacillus polymyxa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64, 112-119 (2004).

- 46) 清水浩, 内山圭司, 永久圭介, 塩谷捨明: 河川の水質調査とモデル解析 「生物工学実験書 改訂版」, 社団法人日本生物工学会編: pp410-414, 培風館, (2002).
- 47) Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., and Lane, D. J.: 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, 173, 697-703 (1991).
- 48) Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J.: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22, 4673-4680 (1994).
- 49) Saitou, N. and Nei, N.: A neighbor-joining method: a new method for constructing phylogenetic tree. *Mol. Biol. Evol.*, 44, 406-425 (1987).
- 50) 篠田吉史, 加藤暢夫, 森田直樹: 16S rRNA 遺伝子解析による細菌の系統分類法, *島津評論*, 57, 121-132 (2000).
- 51) Liu, S. Y., Rainey, F. A., Morgan, H. W., Mayer, F., and Wiegell, J.: *Thermoanaerobacterium aotearoense* sp. nov., a slightly acidophilic, anaerobic thermophile isolated from various hot springs in New Zealand, and emendation of the genus *Thermoanaerobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46, 388-396 (1996).
- 52) Seifritz, C., Daniel, S. L., Gößner, A., and Drake, H. L.: Nitrate as a preferred electron sink for the acetogen *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol.*, 175, 8008-8013 (1993).
- 53) 鈴木健一郎: はじめに「微生物の分類・同定実験法—分子遺伝学・分子生物学的手法を中心に—」, 鈴木健一郎, 平石明, 横田明編: pp1-6, シュプリンガー・フェアラー東京, (2001).
- 54) 河村好章: 医学細菌の分類・命名の情報—9. 分類・同定に有用な方法とその応用範囲—, *感染症学雑誌*, 75, 1003-1006 (2001).
- 55) Fontaine, F. E., Peterson, W. H., McCoy, E., Johnson, M. J., and Ritter, G. J.: A new type of glucose fermentation by *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol.*, 43, 701-706 (1942).

- 56) Wiegel, J., Braun, M., and Gottschalk, G.: *Clostridium thermoautotrophicum* species novum, a thermophile producing acetate from molecular hydrogen and carbon dioxide. *Curr. Microbiol.*, 5, 255-260 (1981).
- 57) Slobodkin, A., Reysenbach, A. L., Mayer, F., and Wiegel, J.: Isolation and characterization of the homoacetogenic thermophilic bacterium *Moorella glycerini* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47, 969-974 (1997).
- 58) Balk, M., Weijma, J., Friedrich, M. W., and Stams, A. J. M.: Methanol utilization by a novel thermophilic homoacetogenic bacterium, *Moorella mulderi* sp. nov., isolated from a bioreactor. *Arch. Microbiol.*, 179, 315-320 (2003).
- 59) Cato, E. P., George, W. L., and Finegold, S. M.: Genus *Clostridium*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G., Eds.), Vol. 2, pp. 1141-1200. Williams and Wilkins, Baltimore, MD (1986).
- 60) Daniel, S. L., Hsu, T., Dean, S. I., and Drake, H. L.: Characterization of the H<sub>2</sub>- and CO-dependent chemolithotrophic potentials of the acetogens *Clostridium thermoaceticum* and *Acetogenium kivui*. *J. Bacteriol.*, 172, 4464-4471 (1990).
- 61) Savage, M. D. and Drake, H. L.: Adaptation of the acetogen *Clostridium thermoautotrophicum* to minimal medium. *J. Bacteriol.*, 165, 315-318 (1986).
- 62) Göbner, A. S., Devereux, R., Ohnemüller, N., Acker, G., Stackebrandt, E., and Drake, H. L.: *Thermicanus aegyptius* gen. nov., sp. nov., isolated from oxid soil, a fermentative microaerophile that grows commensally with the thermophilic acetogen *Moorella thermoacetica*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 5124-5133 (1999).
- 63) Talabardon, M., Schwitzguébel, J. P., and Péringer, P.: Anaerobic thermophilic fermentation for acetic acid production from milk permeate. *J. Biotechnol.*, 76, 83-92 (2000).
- 64) Andreesen, J. R., Schaupp, A., Neurauder, C., Brown, A., and Ljungdahl, L. G.: Fermentation of glucose, fructose, and xylose by *Clostridium thermoaceticum*: effect of metals on growth yield, enzymes, and the synthesis of acetate from CO<sub>2</sub>. *J. Bacteriol.*, 114, 743-751 (1973).

- 65) Nishio, N., Eguchi, S. Y., Kawashima, H., and Nagai, S.: Mutual conversion between H<sub>2</sub> plus CO<sub>2</sub> and formate by a formate-utilizing methanogen. *J. Ferment. Technol.*, 61, 557-561 (1983).
- 66) Nakashimada, Y., Rachman, M. A., Kakizono, T., and Nishio, N.: Hydrogen production of *Enterobacter aerogenes* altered by extracellular and intracellular redox states. *Int. J. Hydrogen Energy*, 27, 1399-1405 (2002).
- 67) 喜多正幸: 卒業論文, (2004).
- 68) Byrer, D. E., Rainey, F. A., and Wiegel, J.: Novel strains of *Moorella thermoacetica* form unusually heat-resistant spores. *Arch. Microbiol.*, 174, 334-339 (2000).
- 69) Grethlein, A. J., Worden, R. M., Jain, M. K., and Datta, R.: Evidence for production of *n*-butanol from carbon monoxide by *Butyribacterium methylotrophicum*. *J. Ferment. Bioeng.*, 72, 58-60 (1991).
- 70) Strobl, G., Feicht, R., White, H., Lottspeich, F., and Simon, H.: The tungsten-containing aldehyde oxidoreductase from *Clostridium thermoaceticum* and its complex with a viologen-accepting NADPH oxidoreductase. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 373, 123-132 (1992).
- 71) White, H., Strobl, G., Feicht, R., and Simon, H. Carboxylic acid reductase: a new tungsten enzyme catalyses the reduction of non-activated carboxylic acids to aldehydes. *Eur. J. Biochem.*, 184, 89-96 (1989).
- 72) White, H. and Simon, H. The role of tungstate and/or molybdate in the formation of aldehyde oxidoreductase in *Clostridium thermoaceticum* and other acetogens; immunological distances of such enzymes. *Arch. Microbiol.*, 158, 81-84 (1992).
- 73) Clark, D., and Cronan, J. E. Jr.: Acetaldehyde coenzyme A dehydrogenase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 144, 179-184 (1980).
- 74) 宗川吉汪: ブラッドフォード法による定量 「生物工学実験書 改訂版」, 社団法人日本生物工学会編: pp17-18, 培風館, (2002).

- 75) Wimpenny, J. W. T., and Firth, A.: Levels of nicotinamide adenine dinucleotide and reduced nicotinamide adenine dinucleotide in facultative bacteria and the effect of oxygen. *J. Bacteriol.*, 111, 24-32 (1972).
- 76) Klingenberg, M.: Metabolites 2: tri- and dicarboxylic acids, purines, pyrimidines and derivatives, coenzymes, inorganic compounds. In: Bergmeyer HU, ed. *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 7, New York, London: Academic Press, pp. 251-267 (1985).
- 77) Lovitt, R. W., Shen, G. J., Zeikus, J. G.: Ethanol production by thermophilic bacteria: biochemical basis for ethanol and hydrogen tolerance in *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *J. Bacteriol.*, 170, 2809-2815 (1988).
- 78) Vasconcelos, I., Girbal, L., and Soucaille, P.: Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH on mixtures of glucose and glycerol. *J. Bacteriol.*, 176, 1443-1450 (1994).
- 79) Berríos-Rivera, S. J., Bennett, G. N., and San, K.-Y.: Metabolic engineering of *Escherichia coli*: increase of NADH availability by overexpressing an NAD<sup>+</sup>-dependent formate dehydrogenase. *Metabolic Eng.*, 4, 217-229 (2002).
- 80) Chen, J.-S.: Alcohol dehydrogenase: multiplicity and relatedness in the solvent-producing clostridia. *FEMS Microbiol. Rev.*, 17, 263-273 (1995).
- 81) Radianingtyas, H. and Wright, P. C.: Alcohol dehydrogenases from thermophilic and hyperthermophilic archaea and bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 27, 593-616 (2003).
- 82) Burdette, D. S., and Zeikus, J. G.: Purification of acetaldehyde dehydrogenase and alcohol dehydrogenases from *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E and characterization of the secondary-alcohol dehydrogenase (2° Adh) as a bifunctional alcohol dehydrogenase-acetyl-CoA reductive thioesterase. *Biochem. J.*, 302, 163-170 (1994).
- 83) Russell, J. B. and Diez-Gonzalez, F.: The effects of fermentation acids on bacterial growth. *Adv. Microb. Physiol.*, 39, 205-234 (1998).
- 84) Nanba, A., Nukada, R., and Nagai, S.: Inhibition by acetic and propionic acids of the growth of *Propionibacterium shermanii*. *J. Ferment. Technol.*, 61, 551-556 (1983).

- 85) Bainotti, A. E., Setogaichi, M., and Nishio, N.: Kinetic studies and medium improvement of growth and vitamin B<sub>12</sub> production by *Acetobacterium* sp. in batch culture. *J. Ferment. Bioeng.*, 81, 324-328 (1996).
- 86) Presser, K. A., Ratkowsky, D. A., and Ross, T.: Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 2355-2360 (1997).
- 87) Tang, I-C., Okos, M. R., and Yang, S.-T.: Effects of pH and acetic acid on homoacetic fermentation of lactate by *Clostridium formicoaceticum*. *Biotechnol. Bioeng.*, 34, 1063-1074 (1989).
- 88) Assinder, S. J., Eynstone, L. V. J., Shellis, R. P., and Dibdin, G. H.: Inhibition of acid production in *Streptococcus mutans* R9: inhibition constants and reversibility. *FEMS Microbiol. Lett.*, 134, 287-292 (1995).
- 89) Wang, G. and Wang, D. I. C.: Elucidation of growth inhibition and acetic acid production by *Clostridium thermoaceticum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 294-298 (1984).
- 90) Koesnandar, Nishio, N., Kuroda, K., and Nagai, S.: Methanogenesis of glucose by defined thermophilic coculture of *Clostridium thermoaceticum* and *Methanosarcina* sp. *J. Ferment. Bioeng.*, 70, 398-403 (1990).
- 91) Nakashimada, Y., Nakae, K., and Nishio, N.: Inhibitory effect of acetic acid on growth of hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Biosci. Bioeng.*, 87, 155-160 (1999).
- 92) 合葉修一, 永井史郎: 「生物化学工学－反応速度論－」, pp182-192, 科学技術社, (1975).
- 93) Steiner, P. and Sauer, U.: Overexpression of the ATP-dependent helicase RecG improves resistance to weak organic acids in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 63, 293-299 (2003).

- 94) Roe, A. J., O'Byrne, C., McLaggan, D., and Booth, I. R.: Inhibition of *Escherichia coli* growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity. *Microbiology*, 148, 2215-2222 (2002).
- 95) Freese, E., Sheu, C. W., and Galliers, E.: Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. *Nature*, 241, 321-325 (1973).
- 96) Srinivasan, K., Murakami, M., Nakashimada, Y., and Nishio, N.: Efficient production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by the rumen anaerobic fungus, *Neocallimastix frontalis*, in a repeated batch culture. *J. Biosci. Bioeng.*, 91, 153-158 (2001).
- 97) Burdette, D. S., Jung, S.-H., Shen, G.-J., Hollingsworth, R. I., and Zeikus, J. G.: Physiological function of alcohol dehydrogenases and long-chain (C<sub>30</sub>) fatty acids in alcohol tolerance of *Thermoanaerobacter ethanolicus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 1914-1918 (2002).
- 98) Sato, K., Tomita, M., Yonemura, S., Goto, S., Sekine, K., Okuma, E., Takagi, Y., Hon-nami, K., and Saiki, T.: Characterization of and ethanol hyper-production by *Clostridium thermocellum* I -1-B. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 2116-2121 (1993).
- 99) Schwartz, R. D. and Keller, F. A. Jr.: Acetic acid production by *Clostridium thermoaceticum* in pH-controlled batch fermentations at acidic pH. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43, 1385-1392 (1982).
- 100) Nuchnoi, P., Yano, T., Nishio, N., and Nagai, S.: Extraction of volatile fatty acids from diluted aqueous solution using a supported liquid membrane. *J. Ferment. Technol.*, 65, 301-310 (1987).
- 101) Nuchnoi, P., Izawa, I., Nishio, N., and Nagai, S.: Extractive acidogenic fermentation by a supported liquid membrane. *J. Ferment. Technol.*, 65, 699-702 (1987).
- 102) Nuchnoi, P., Nishio, N., and Nagai, S.: On-line extraction of volatile fatty acids in acidogenic chemostat culture using a supported liquid membrane. *J. Ferment. Technol.*, 67, 195-199 (1989).

- 103) Jones, D. T. and Woods, D. R.: Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiol. Rev.*, 50, 484-524 (1986).
- 104) 西田有志: 修士論文, (1992).
- 105) Morinaga, T. and Kawada, N.: The production of acetic acid from carbon dioxide and hydrogen by an anaerobic bacterium. *J. Biotechnol.*, 14, 187-194 (1990).
- 106) Chang, I. S., Kim, B. H., Lovitt, R. W., and Bang, J. S.: Effect of CO partial pressure on cell-recycled continuous CO fermentation by *Eubacterium limosum* KIST612. *Process Biochem.*, 37, 411-421 (2001).
- 107) U.S. Department of Energy: Bench-scale demonstration of biological production of ethanol from coal synthesis gas. DOE/PC/92118-T14 Topical Report 5, Process analysis, Distribution category, Washington, DC (1995).
- 108) Schmidt, R. L. and Cooney, C. L.: Production of acetic acid from hydrogen and carbon dioxide by *Clostridium* species ATCC 29797. *Chem. Eng. Commun.*, 45, 61-73 (1986).
- 109) Vega, J. L., Antorrena, G. M., Clausen, E. C., and Gaddy, J. L.: Study of gaseous substrate fermentations: carbon monoxide conversion to acetate. 2. Continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.*, 34, 785-793 (1989a).
- 110) Datar, R. P., Shenkman, R. M., Cateni, B. G., Huhnke, R. L., and Lewis, R. S.: Fermentation of biomass-generated producer gas to ethanol. *Biotechnol. Bioeng.*, 86, 587-594 (2004).
- 111) 永井史郎: 微生物反応における化学量論 「微生物培養工学」, 田口久治, 永井史郎編: pp1-40, 共立出版, (1985).
- 112) Bainotti, A. E. and Nishio, N.: Growth kinetics of *Acetobacterium* sp. on methanol-formate in continuous culture. *J. Appl. Microbiol.*, 88, 191-201 (2000).
- 113) Lorowitz, W. H. and Bryant, M. P.: *Peptostreptococcus productus* strain that grows rapidly with CO as the energy source. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 961-964 (1984).

- 114) Breznak, J. A., Switzer, J. M., and Seitz, H.-J.: *Sporomusa termitida* sp. nov., an H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-utilizing acetogen isolated from termites. Arch. Microbiol., 150, 282-288 (1988).
- 115) Tschsch, A. and Pfenning, N.: Growth yield increase linked to caffeate reduction in *Acetobacterium woodii*. Arch. Microbiol., 137, 163-167 (1984).
- 116) Eichler, B. and Schink, B.: Oxidation of primary aliphatic alcohols by *Acetobacterium carbinolicum* sp. nov., a homoacetogenic anaerobe. Arch. Microbiol., 140, 147-152 (1984).
- 117) Tanaka, K. and Pfennig, N.: Fermentation of 2-methoxyethanol by *Acetobacterium malicum* sp. nov. and *Pelobacter venetianus*. Arch. Microbiol., 149, 181-187 (1988).
- 118) Daniel, S. L. and Drake, H. L.: Oxalate- and glyoxylate-dependent growth and acetogenesis by *Clostridium thermoaceticum*. Appl. Environ. Microbiol., 59, 3062-3069 (1993).
- 119) Dawson, K. A., Allison, M. J., and Hartman, P. A.: Isolation and some characteristics of anaerobic oxalate-degrading bacteria from the rumen. Appl. Environ. Microbiol., 40, 833-839 (1980).
- 120) Allison, M. J., Dawson, K. A., Mayberry, W. R., and Foss, J. G.: *Oxalobacter formigenes* gen. nov., sp. nov.: oxalate-degrading anaerobes that inhabit the gastrointestinal tract. Arch. Microbiol., 141, 1-7 (1985).
- 121) Dehning, I. and Schink, B.: Two new species of anaerobic oxalate-fermenting bacteria, *Oxalobacter vibrioformis* sp. nov. and *Clostridium oxalicum* sp. nov., from sediment samples. Arch. Microbiol., 153, 79-84 (1989).
- 122) Smith, R. L., Strohmaier, F. E., and Oremland, R. S.: Isolation of anaerobic oxalate-degrading bacteria from freshwater lake sediments. Arch. Microbiol., 141, 8-13 (1985).
- 123) Seifritz, C., Fröstl, J. M., Drake, H. L., and Daniel, S. L.: Glycolate as a metabolic substrate for the acetogen *Moorella thermoacetica*. FEMS Microbiol. Lett., 170, 399-405 (1999).

- 124) Friedrich, M. and Schink, B.: Electron transport phosphorylation driven by glyoxylate respiration with hydrogen as electron donor in membrane vesicles of a glyoxylate-fermenting bacterium. *Arch. Microbiol.*, 163, 268-275 (1995a).
- 125) Friedrich, M. and Schink, B.: Fermentative degradation of glyoxylate by a new strictly anaerobic bacterium. *Arch. Microbiol.*, 156, 392-397 (1991).
- 126) Janssen, P. H. and Hugenholtz, P.: Fermentation of glycolate by a pure culture of a strictly anaerobic gram-positive bacterium belonging to the family *Lachnospiraceae*. *Arch. Microbiol.*, 179, 321-328 (2003).
- 127) Friedrich, M. and Schink, B.: Isolation and characterization of a desulfurubidin-containing sulfate-reducing bacterium growing with glycolate. *Arch. Microbiol.*, 164, 271-279 (1995b).
- 128) Sahin, N.: Oxalotrophic bacteria. *Res. Microbiol.*, 154, 399-407 (2003).
- 129) Stewart, C. S., Duncan, S. H., and Cave, D. R.: *Oxalobacter formigenes* and its role in oxalate metabolism in the human gut. *FEMS Microbiol. Lett.*, 230, 1-7 (2004).
- 130) Friedrich, M. and Schink, B.: Hydrogen formation from glycolate driven by reversed electron transport in membrane vesicles of a syntrophic glycolate-oxidizing bacterium. *Eur. J. Biochem.*, 217, 233-240 (1993).
- 131) Friedrich, M., Laderer, U., and Schink, B.: Fermentative degradation of glycolic acid by defined syntrophic cocultures. *Arch. Microbiol.*, 156, 398-404 (1991).
- 132) Strohhacker, J. and Schink, B.: Energetic aspects of malate and lactate fermentation by *Acetobacterium malicum*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 90, 83-88 (1991).
- 133) 関達治: 変異株の分離実験 「生物工学実験書 改訂版」, 社団法人日本生物工学会編: pp135, 培風館, (2002).
- 134) 鈴木智雄監修: 「微生物工学技術ハンドブック」, 朝倉書店, (1990)

- 135) Parekh, S. R. and Cheryan, M.: Production of acetate by mutant strains of *Clostridium thermoaceticum*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 36, 384-387 (1991).
- 136) Tailliez, P., Girard, H., Longin, R., Beguin, P., and Millet, J.: Cellulose fermentation by an asporogenous mutant and an ethanol-tolerant mutant of *Clostridium thermocellum*. Appl. Environ. Microbiol., 55, 203-206 (1989a).
- 137) Tailliez, P., Girard, H., Millet, J., and Beguin, P.: Enhanced cellulose fermentation by an asporogenous and ethanol-tolerant mutant of *Clostridium thermocellum*. Appl. Environ. Microbiol., 55, 207-211 (1989b).
- 138) 荒木弘之: 大腸菌の *N*-メチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアジニン (NTG) 処理による栄養要求変異株の分離「生物工学実験書 改訂版」, 社団法人日本生物工学会編: pp137-138, 培風館, (2002).
- 139) Gene mutation. In: Manual of methods for general bacteriology (Gerhardt, P. et al., Eds.), pp.226-228. American society for microbiology, Washington, D.C. (1981).
- 140) Mutagenesis. In: A short course in bacterial genetics: a laboratory manual for *Escherichia coli* and related bacteria (Miller, J. H., Eds.), pp. 94-97, 143-149. Cold spring harbor laboratory press, Plainview, N.Y. (1992).
- 141) van Ophem, P. W., Euverink, G.-J., Dijkhuizen, L., and Duine, J. A.: A novel dye-linked alcohol dehydrogenase activity present in some Gram-positive bacteria. FEMS Microbiol. Lett., 80, 57-64 (1991).
- 142) Fibla, J. and Gonzalez-Duarte, R.: Colorimetric assay to determine alcohol dehydrogenase activity. J. Biochem. Biophys. Methods, 26, 87-93 (1993).
- 143) Bystrykh, L. V., Govorukhina, N. I., Dijkhuizen, L., and Duine, J. A.: Tetrazolium-dye-linked alcohol dehydrogenase of the methylotrophic actinomycete *Amycolatopsis methanolica* is a three-component complex. Eur. J. Biochem., 247, 280-287 (1997).
- 144) Conway, T., Sewell, G. W., Osman, Y. A., and Ingram, L. O.: Cloning and sequencing of the alcohol dehydrogenase II gene from *Zymomonas mobilis*. J. Bacteriol., 169, 2591-2597 (1987).

- 145) Rothstein, D. M.: *Clostridium thermosaccharolyticum* strain deficient in acetate production. *J. Bacteriol.*, 165, 319-320 (1986).
- 146) Brown, T. D. K., Jones-Mortimer, M. C., and Kornberg, H. L.: The enzymic interconversion of acetate and acetyl-coenzyme A in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.*, 102, 327-336 (1977).
- 147) Brown, T. D. K., Pereira, C. R. S., and Stormer, F. C.: Studies of the acetate kinase-phosphotransacetylase and the butanediol-forming systems in *Aerobacter aerogenes*. *J. Bacteriol.*, 112, 1106-1111 (1972).
- 148) Bochner, B. R. and Savageau, M. A.: Generalized indicator plate for genetic, metabolic, and taxonomic studies with microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33, 434-444 (1977).
- 149) 森地敏樹, 八重島智子: 付録 I 乳酸菌の菌数測定法と培地一覧 「乳酸菌の科学と技術」, 乳酸菌研究集談会編: pp373-386, 学会出版センター, (1996).
- 150) Gottschalk, J. C. and Morris, J. G.: The induction of acetone and butanol production in cultures of *Clostridium acetobutylicum* by elevated concentrations of acetate and butyrate. *FEMS Microbiol. Lett.*, 12, 385-389 (1981).
- 151) Bahl, H., Andersch, W., and Gottschalk, G.: Continuous production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* in a two-stage phosphate-limited chemostat. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 15, 201-205 (1982).

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御指導頂きました広島大学大学院先端物質科学研究科分子生命機能科学専攻 西尾 尚道教授、柿菌 俊英助教授、中島田 豊助手に厚く御礼申し上げます。

また、論文審査に際し貴重な助言とご指導を頂きました分子生命化学研究室 小埜 和久教授、細胞構造機能学研究室 加藤 純一教授に深く感謝致します。

更に、共同研究者として、終始御支援頂きましたコスモ石油株式会社中央研究所 岡田 秀樹博士、渡邊 繁幸氏に深く感謝致します。

最後に、同じ研究グループとして御助力頂きました吉本 秀之君、猪熊 健太郎君、喜多 正幸君、赤星 卓也君を始め、3年間お世話になった代謝変換制御学研究室の皆様に変更御礼申し上げます。

2005年3月

酒井伸介