

## 5 バクテリアの発酵水素発生機構

谷生重晴\*

### 5.1 はじめに

非常に多数のバクテリアが水素発生していることが知られている。Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 第8版(1978)では、245属(Genus)が記載されているが、1990年に、このマニュアルを基準にして文献等に水素発生が記載されているバクテリアの属を数えたところ、57属が数えられた。ガス発生は、必ずしも分類上の特性として測定が規定されていたものではないにもかかわらず、実に23%にもものぼる属で水素発生が観察されていたのである。このことから、バクテリアにとっては水素発生はメタン発酵ほどには特殊な代謝反応ではないと考えられる。

このように、水素発生はバクテリアにとっては極めて日常的な代謝反応であるが、発生反応は単一経路ではなく、種々の経路が報告されている。そのうち、現在、発酵水素生産での利用が期待されているエンテロバクター属やクロストリディウム属など代表的なバクテリアの発生経路は、おもに図1の3経路、すなわちギ酸経路、Fd経路(直接経路)、NADH経路である。生物細胞は、細胞の生命維持や増殖のため、解糖系でグルコースを酸化し、同時にNAD(ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)を還元して(NADHと表す)、エネルギー源であるATP(アデノシン3リン酸)を生産する。酸化されたグルコースはピルビン酸になり、酸素が無い状況下(嫌気状態)では、解糖を再び進めるため、NADHとピルビン酸はさらに反応を続けて最終反応物の代謝産物と酸化状態のNAD(NAD<sup>+</sup>と表す)になる。この嫌気代謝過程でバクテリアは水素を発生している。ここでは発酵水素発生のメカニズムとその理由について述べる。

**Keyword: Fermentation, hydrogen production, NADH, *Enterobacter*, *Clostridium***

### 5.2 発酵水素発生のメカニズム

#### 5.2.1 ギ酸経路の水素発生

大腸菌類の多くは酢酸やエタノールを代謝生産する。これらの代謝反応は、(1)式のようにアセチル-CoAを経て進み、このときギ酸を生成する<sup>1)</sup>。

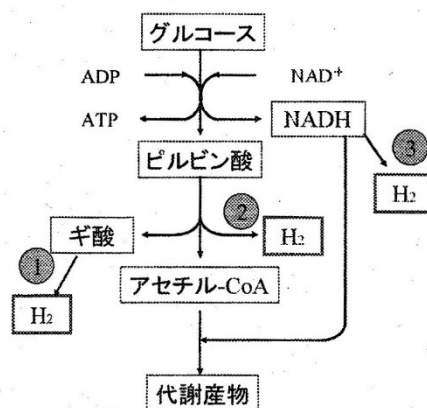


図1 代表的な水素発生経路

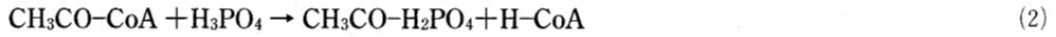
\* Shigeharu Tanisho 横浜国立大学 教育人間科学部 教授

## 第2章 エコ水素

ギ酸生成反応



酢酸生成反応



酢酸やギ酸の生成で生育環境が酸性になると、図1の①の経路で水素を発生するバクテリアは(4)式のようにギ酸を分解して水素を発生する。



ギ酸の標準酸化還元電位とpHの関係は、分解生成されるCO<sub>2</sub>の状態によって図2のように複雑に変化する。また、ギ酸分解で水素発生する *Escherichia coli* は、細胞外のpHが5.5から9.0の広い範囲にわたって変化しても、細胞内のpHをほぼ8.0に保っていることが実験により明らかにされた最初のバクテリアである<sup>2)</sup>。したがって、水素発生が細胞内で生じているとしても、図2および(7)式に示したように、pH 8.0における標準酸化還元電位差はわずか-0.007Vだから、(8)式のように平衡定数は1に近く、水素分圧が大きくなっても十分ギ酸分解反応は進行する。



$$\begin{aligned} K_{\text{eq}}^8 &= [\text{HCO}_3^-] (\text{P}_{\text{H}_2}) / [\text{HCOO}^-] = \exp \left[ \frac{nF}{RT} \Delta E_0' \right] \\ &= 0.580 \end{aligned} \quad (8)$$

しかし、ギ酸からの水素発生がpHの影響を強く受けるということは、図2に示した(5)式、(6)式の酸化還元電位線図から、この分解反応が細胞膜の外側で起きている酵素反応と考えるならば、非常に良く説明がつく。なぜなら、pH 7あたりより酸性側ではギ酸分解反応の標準酸化還元電位が水素生成反応の標準酸化還元電位より低くなるので、水素が発生しやすくなるからである。

ギ酸分解のみで水素を発生しているバクテリアでは、培地のギ酸濃度が高くてもpH 7付近での水素発生活性はpH 6での活性に比べ50%程度であるから、ギ酸経路の水素発生はH<sup>+</sup>濃度を低くして培地の生育環境を良くするための反応といえる。

### 5.2.2 Fd経路（直接経路）での水素発生

②の経路はアセチル-CoAを経て代謝反応が進むけれども、代謝産物としてギ酸を生成することなく酪酸、ブタノールなどを生成するクロストリディウム属に特徴的な経路である。この経路はヒドロゲナーゼ存在下でフェレドキシン(Fd)の還元体から直接水素を発生することが観測されたので<sup>3)</sup>、図3(a)のような電子伝達で直接水素を発生する経路と言われているものである。

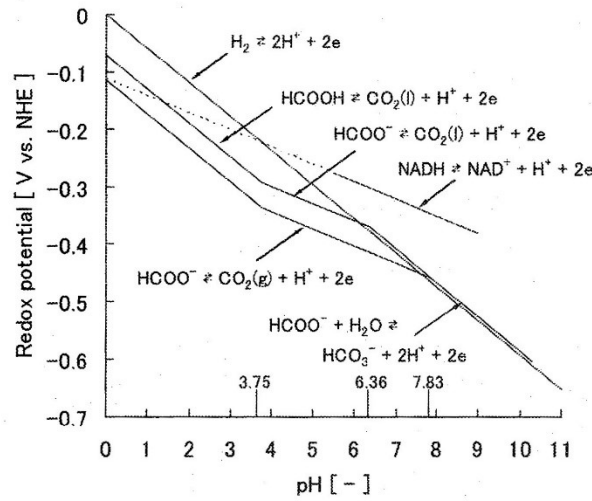


図2 ギ酸、水素の酸化還元電位とpHの関係

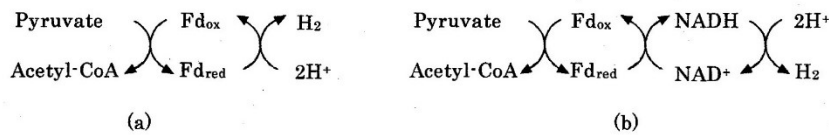


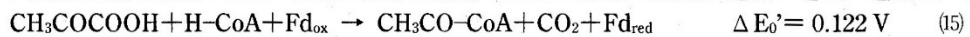
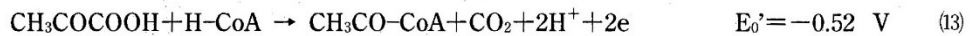
図3 Fd経路の電子伝達系

フェレドキシン酸化によるH<sub>2</sub>発生の平衡定数



$$K_{eq}' = \frac{[Fd_{ox}](P_{H_2})}{[Fd_{red}]} = \exp\left(\frac{nF}{RT} \Delta E_0'\right) = 0.288 \quad (12)$$

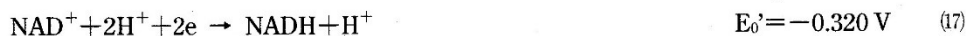
ピルビン酸-アセチル CoA 反応による Fd 還元平衡定数



$$K_{eq}' = \frac{[CH_3CO-CoA][Fd_{red}](P_{CO_2})}{[CH_3COCOOH][H-CoA][Fd_{ox}]} = \exp\left(\frac{nF}{RT} \Delta E_0'\right) = 1.34 \times 10^4 \quad (16)$$

## 第2章 エコ水素

ただ、ピルビン酸/アセチル-CoA反応の標準酸化還元電位 ( $E_0' = -0.52 \text{ V}$ ) が非常に低く、かつFd ( $E_0' = -0.398 \text{ V}$ ) と  $\text{H}_2$  ( $E_0' = -0.414 \text{ V}$ ) の標準酸化還元電位差 ( $\Delta E_0' = -0.016 \text{ V}$ ) がかなり  $0 \text{ V}$  に近い値なので、水素分圧が  $0.2 \sim 0.3$  気圧になってもピルビン酸→アセチル-CoA反応は容易に進む。したがって、フェレドキシンを介して直接水素を発生したのであるなら、培地pHの影響を受けることなく高いpHから低いpHまで、ほぼ一様に水素発生が起きなければならない。しかし、クロストリディウム属の多くの種の水素発生は培地pHの影響を強く受ける。たとえば *Clostridium butyricum* はpHが中性付近では水素をあまり生産しないが、培地環境が酸性になるにつれ活発に水素を発生し、pH 5.5前後でもっとも発生速度が速くなる。Fd還元体は  $\text{NAD}^+$  を還元することもできる<sup>4)</sup> ので、図3(b)のように、*C. butyricum* も  $\text{NADH}$  を介して水素発生していることが考えられる。



$\text{NADH}$  経路による水素発生は次項で述べるようにpHの影響を受けるので、pHの影響を受ける水素発生では③の $\text{NADH}$ 経路と同じメカニズムで水素を発生し、培地pHの影響を受けない水素発生のみがFdからヒドロゲナーゼをへて直接水素を発生していると考えるのが適当であろう。

### 5.2.3 $\text{NADH}$ 経路による水素発生



$\text{NADH}$  から膜結合ヒドロゲナーゼの働きで水素が発生することはかなり早くから知られていた。代謝産物のマスバランス計算をおこなえば、グルコースの分解反応で生産された $\text{NADH}$ があまり、(19)式の総括反応で水素発生したと考えれば量論的に良く説明がつくと同時に、酵素実験からも確かめられたからである。たとえば、図1で、グルコースからピルビン酸が生成されるまでの反応は解糖系と呼ばれ、総括反応式は(20)式で表される。この反応系では  $2 \text{ mol}$  の $\text{NADH}$  と  $2 \text{ mol}$  の $\text{ATP}$  が生成される。*Enterobacter aerogenes* は酸性下では  $1 \text{ mol}$  のグルコースから  $1 \text{ mol}$  のブタンジオールと  $1 \text{ mol}$  の水素を発生するが、その代謝反応では(21)式のように $\text{NADH}$  は  $1 \text{ mol}$  しか使われない。その結果、 $1 \text{ mol}$  の未反応 $\text{NADH}$  が残り、これを再酸化するために(19)式の反応で  $1 \text{ mol}$  の水素を発生する。

[解糖系]



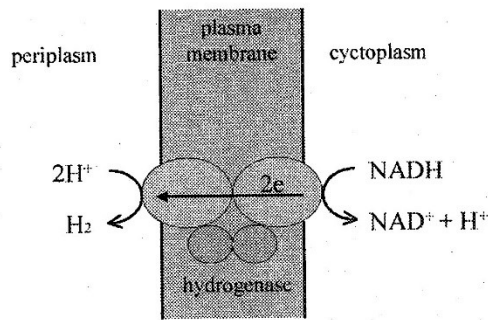


図4 膜結合ヒドロゲナーゼの反応機構

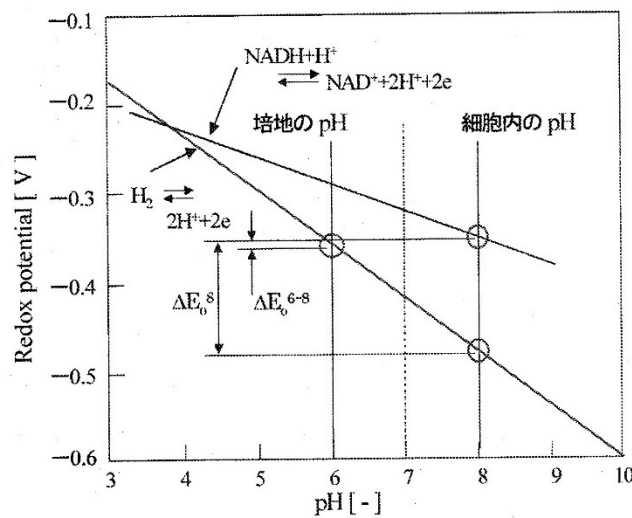
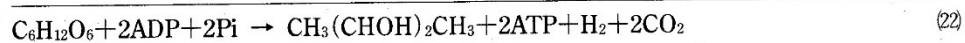
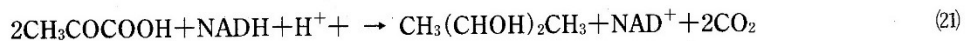


図5 pHと酸化還元電位の関係

[ブタンジオール生成反応]



この経路での水素発生は、図4のように細胞膜に結合したヒドロゲナーゼの細胞の内と外に開かれた反応基を使って行われる<sup>5)</sup>。内側でNADHがNAD<sup>+</sup>に酸化され、細胞外に伝達された電子がH<sup>+</sup>に渡されてH<sub>2</sub>になる。なぜなら、増殖にpH7付近を好む多くのバクテリアの細胞内のpHはほぼ8.0に保たれているために、NADの標準酸化還元電位は図5でわかるようにpH 7.0での電位-0.320Vより0.030V低い-0.350Vほどに下がっており、もしpH 8.0の細胞内で水素発生すると、水素の標準酸化還元電位も0.059V低くなって-0.473Vになるから、ΔE<sub>0</sub><sup>s</sup>は-0.123V、

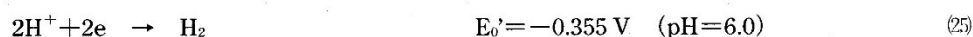
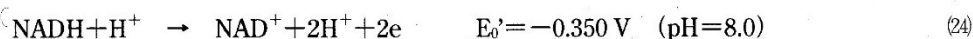
## 第2章 エコ水素

平衡定数 $K_{eq}^{8-8}$ は $6.9 \times 10^{-5}$ になるからである。これは水素が発生してその分圧がおよそ $1/14,000$ 気圧になると平衡に達することを意味し、とてもNADHを酸化する反応は進まない状況になる。

$$K_{eq}^{8-8} = \frac{[NAD^+](P_{H_2})}{[NADH]} = \exp\left[\frac{nF}{RT} \Delta E'_0\right]$$

$$= 6.9 \times 10^{-5} \quad (\text{すなわち } P_{H_2} \approx 1/14,000 \text{ 気圧で平衡に達する}) \quad (23)$$

そこで、水素が細胞の外のpHで持つ標準酸化還元電位を利用して、バクテリアは巧みにNADHを酸化しているのである。細胞外で水素発生反応が進めば、培地pHが6.0では $\Delta E_0^{6-8}$ は $-0.006$  Vになり、平衡定数は水素を発生しながらでも十分NADHを酸化できる値になる。



$$K_{eq}^{6-8} = \frac{[NAD^+](P_{H_2})}{[NADH]} = \exp\left[\frac{nF}{RT} \Delta E_0^{6-8}\right]$$

$$= 0.67 \quad (\text{すなわち } P_{H_2} = 0.4 \text{ 気圧で } [NAD^+]/[NADH] \approx 1.7 \text{ の平衡に達する}) \quad (27)$$

このように、培地が発酵の代謝産物で酸性になればなるほど、外部のpHに依存する水素の酸化還元電位は高くなり、その結果、酸化還元電位差は負から正に変化して水素分圧が高くなってもNADHの酸化反応が進みやすくなる。

結局、NADH経路で水素発生する微生物は、自身が生産する代謝産物で環境pHが低くなると、水素の酸化還元電位が高くなることを感じ取ってNADHの再酸化に利用する酵素反応系を作り上げたといえる。

### 5.2.4 NADH 経路水素発生へのpHの影響

細胞内のpHが8.0で細胞外のpHが変化するとき、 $\Delta E$ は細胞外pHを変数として次式のように表される。

$$\Delta E = 0.350 - 0.0592 \text{ pH} - 0.0296 \log \left\{ (P_{H_2}) \frac{[NAD^+]}{[NADH]} \right\} \quad (28)$$

この関数では、 $\Delta E$ はpHが低くなればなるほど大きくなるので、バクテリアの水素発生も培地pHが低くなればなるほど活発にならなければならない。しかし、実際には水素発生速度は至適pHを持ち、それより低いpHでは遅くなる。

これは、水素発生が $\Delta E$ のみによって決まるのではなく、バクテリアの増殖へのpHの影響が関係しているからである。図6は*C. butyricum*の菌体生産性を示したもので、増殖速度はpH7前後が最も速く、pHが低くなるにつれ遅くなっている<sup>6)</sup>。増殖速度はATPの生産性( $P_{ATP}$ )でもあり、それは解糖系におけるNADHの生産速度でもある。したがって、水素発生速度は $\Delta E$ と $P_{ATP}$ との積に比例して変化することになる。すなわち、水素発生の活性( $f_a$ )は(29式)のように

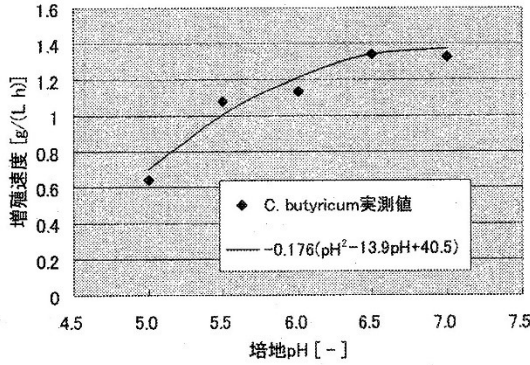


図6 *C. butyricum*の培地 pH と増殖速度の関係

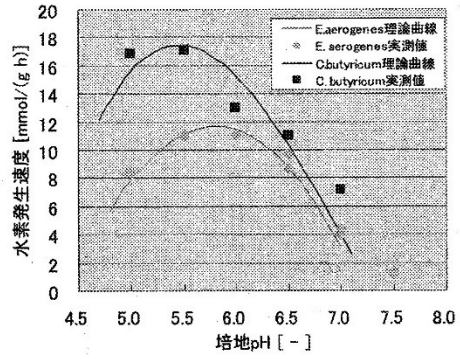


図7 水素発生速度の実測値と理論値の比較

表される。

$$f_a \propto (\Delta E) (P_{ATP}) \quad (29)$$

図7は、 $P_{H_2}$ が0.1atm、 $[NADH]/[NAD^+]$ が約50としたときの $\Delta E$ と、 $P_{ATP}$ として*E. aerogenes*、*C. butyricum*の増殖曲線をそれぞれ $y = 37 (pH - 4.4)$ 、 $y = -0.176 (pH^2 - 13.9pH + 40.5)$ で表したときの理論計算曲線を示している。いずれの場合にも、 $pH < 6.5$ では非常に良く実測値と一致しており、この考え方の正しさを示しているといえる。

### 5.2.5 *Clostridium butyricum*の水素発生例

図8はスクロースを基質にしたときの*C. butyricum*の代謝産物濃度、水素収率と培地pHの関係を示したものである<sup>7)</sup>。図に見られるように、 $pH 7.0$ では乳酸が主産物で、酪酸、酢酸の濃度は非常に小さく水素収率も同様に小さい。しかし、培地pHが低くなるにしたがって乳酸の生産量が少なくなり、それに反比例するように酪酸、酢酸の生産量が増えている。さらに、この酪

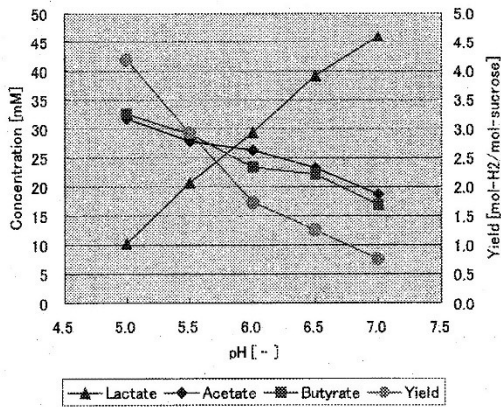


図8 スクロースを基質にしたときの*C. butyricum*の代謝産物濃度および水素収率と培地pHの関係

## 第2章 エコ水素

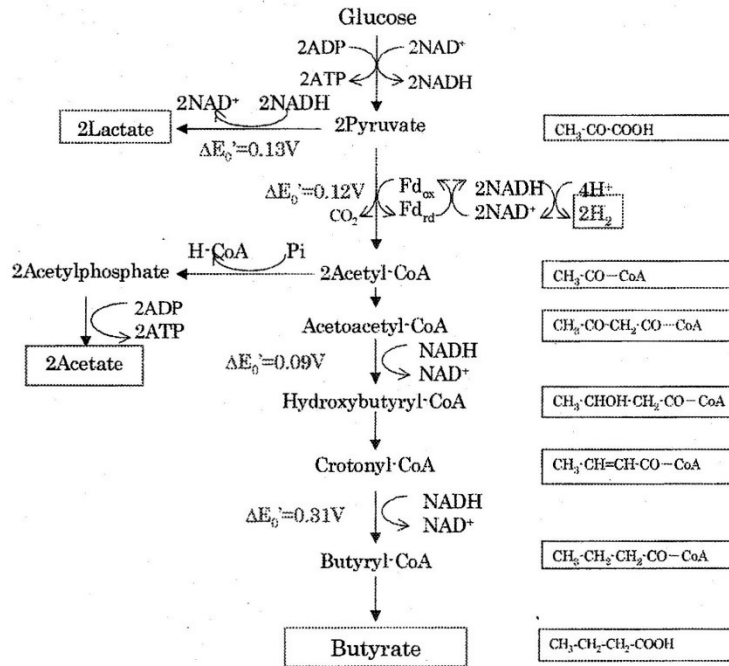


図9 酪酸発酵の経路と酸化還元電位

酸、酢酸の生産量増大に比例して水素収率も大きくなっており、これらの物質の生成経路と水素発生が密接な関係を持つことを明瞭に示している。

この代謝反応の pH に対する変化は、水素の発生が *C. butyricum* にとってどのような意味と役割を持っているかを化学熱力学的に考える良い例である。図9に乳酸、酪酸、酢酸の生成経路と途中の反応の標準酸化還元電位差を示した。ピルビン酸から分岐する反応にはどちらも NADH が関わっており、二つの反応経路の  $\Delta E_0'$  を比べると、ピルビン酸/乳酸の電位差と酪酸経路のアセチル-CoA/ピルビン酸のそれはほぼ同じである。水素が図3(a)の反応により直接  $Fd_{red}$  から電子を受け取って細胞内で発生するなら、pHの影響を受けることなく反応が進むから、乳酸と酪酸の生産も pHの影響を受けることなく同じ生産比率で進むと考えられる。しかし、 $Fd_{red}$  から  $Fd_{ox}$  への再酸化反応が直接水素発生ではなく、NADの還元反応を仲立ちにして進むなら、NADHの再酸化が NADH 経路の水素発生機構にしたがうため、pHが低いほどピルビン酸→アセチルCoAの反応が進み易くなる。結果として酪酸経路の反応が培地 pH に制御されるので、直線的に代謝産物濃度と水素収率が変化していることの説明がつく。

この場合にも、バクテリアの水素発生の理由として、NADHの再酸化が細胞内外の pH 差を利用すると進め易いから、と考えることができる。



### 5.3 結言

上述のように、バクテリアの発酵による水素発生は、強く培地pHの影響を受けているが、酸化還元電位を考察することで発生の必然性と理由が明らかに理解される。とりわけ、NADH経路は化学熱力学の原理を巧みに利用した生物反応であるから、今後バイオ反応の応用が盛んになると、必ず利用されるバイオミメティックメカニズムになるとと思われる。

### 文 献

- 1) M. T. Madigan *et al.*, "Bolck Biology of Microorganisms", 10<sup>th</sup> ed., p.121, Prentice Hall, (2003)
- 2) E. D. Padan *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, **63**, 533 (1976)
- 3) R. C. Valentine *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **238**, 1141 (1963)
- 4) K. Jungermann *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **305**, 268 (1973)
- 5) S. Tanisho *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **973**, 1 (1989)
- 6) 谷生重晴ら, 未発表データ
- 7) 谷生重晴, 水素エネルギーシステム, **29**, No.1, 2 (2004)

# エコバイオエネルギーの最前線

—ゼロエミッション型社会を目指して—

*Frontier of Eco-Bioenergy*

*—Construction of Sustainable Society Systems Oriented Zero Emission—*

監修：植田充美，近藤昭彦

*Supervisor : Mitsuyoshi Ueda, Akihiko Kondo*

**シーエムシー出版**