

B06

バクテリアはなぜ、またどれくらいの量の水素を
発酵で発生するか

谷生重晴
横浜国立大学教育人間科学部
tanisho@ynu.ac.jp

Why and How much Amount Bacteria Evolve Hydrogen by Fermentation

Shigeharu TANISHO
Department of Environmental Sciences, Yokohama National university

Hydrogen evolution by fermentation is very general metabolism for bacteria. Almost 25% of Genera listed in the Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th edition, were recognized to evolve hydrogen, no matter what the amount of evolution. The reason is mainly to re-oxidize NADH to NAD⁺ to get more energy for their growth and living like follows; NADH+H⁺ → NAD⁺+H₂. For the case of *Clostridium butyricum*, the evolution was clearly explained from the point of chemical thermodynamics. The metabolism is regulated by the redox potential of H₂ at the cultural pH. Hydrogen evolution from formate is also regulated by the culture pH because of the redox potential-difference between formate and hydrogen.

1. 発酵水素発生メカニズム

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。原核生物に分類されるバクテリアは、Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th edition (1978)には、属 (Genus) の数で 245 属が記載されているが、属名は、バクテリア研究の進展とともに、絶えず改名増加している。1990 年に、このマニュアルを基準にして水素発生が観察報告された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、実に約 25%にもものぼる属で水素発生が観察されていたのである。

このように、水素発生はバクテリアにとっては非常に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、種々報告されている。そのうち、現在、発酵水素生産に利用できるのはが期待される代表的なバクテリアの発生経路としては図 1 のような 3 経路が挙げられる。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、エネルギー源になる 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) ではこの過程で還元生成された NADH を再酸化するために、さらに反応が進んで最終代謝産物を生成する。

1. 1 ギ酸経路の水素発生 最終産物生成の途中、①の経路で大腸菌類の多くはギ酸を生成するが、生育環境が酸性になると、ギ酸を分解して水素を発生する。図 2 から分かるように、この反応は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、酸性側ではギ酸分解反応の酸化還元電位が水素生成反応の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。ギ酸濃度が高くて

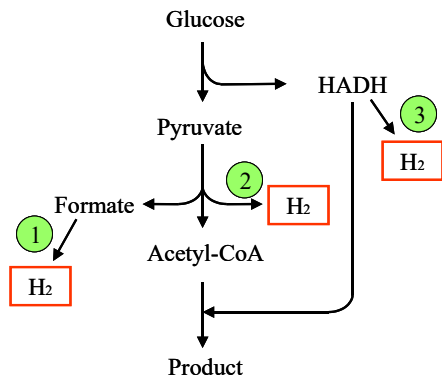


図 1. 代表的な水素発生経路

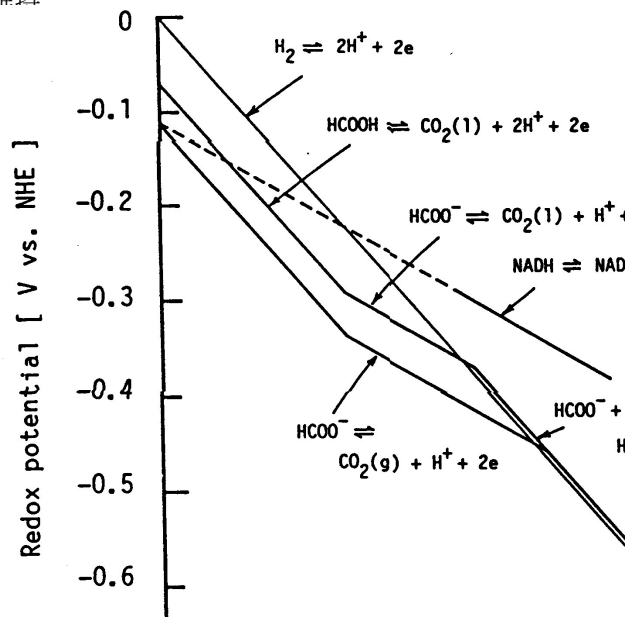
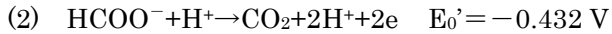
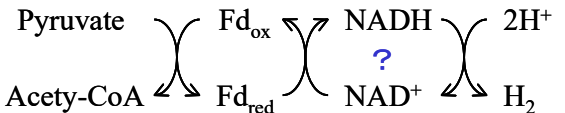
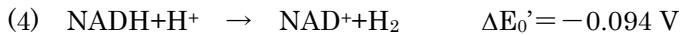
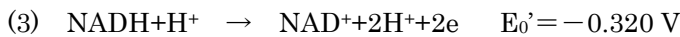


図 2. ギ酸、水素の酸化還元電位と pH の関係



も、中性付近ではほとんど水素を出さないから、水素発生はピルビン酸の反応を促進するための反応ではなく、 H^+ 濃度を低くして生育環境を良くするための反応といえる。

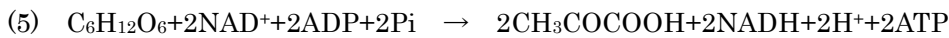
1. 2 直接経路 ②の経路はギ酸を生成することなく酪酸、ブタノールなどを生成するクロストリディウム属に特徴的な経路である。中性付近では水素も酪酸もあまり生産しない。しかし、環境が酸性になると活発に水素を発生し酪酸濃度も高くなる。ヒドロゲナーゼによりフェレドキシン (Fd) の還元体から水素発生が見られたので、直接水素を発生する経路と言われているものである。しかし、Fd還元体は図3のように NAD^+ (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、酸化体) を還元することもできるので、 NADH が副生成されて水素が発生したとも考えられる。そこで、③の NADH 経路で理由を考えよう。



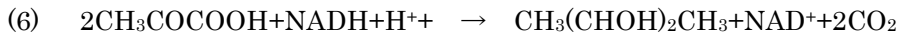
1. 3 NADH 経路 NADH から膜結合ヒドロゲナーゼの働きで水素が発生することはかなり早くから知られていた。代謝生成物のマスバランス計算をおこなえば、グルコースの分解反応で生産された NADH が残り、(4)式の総括反応で水素発生すると考えれば、量論的に良く説明がつくと同時に、実験的にも確かめられたからである。

たとえば、図1で、グルコースからピルビン酸生成までの反応は解糖系と呼ばれ、総括反応式は(5)式で表される。この系では 2mol の NADH が生成される。*E.aerogenes* はブタンジオールを代謝生成するが、その反応では(6)式のように NADH 1mol が使われないで残る。その結果、未反応の NADH を再酸化する必要が生じ、(4)式の反応も 1mol の水素が発生すると考える。酪酸生成でも同様に考えられる。

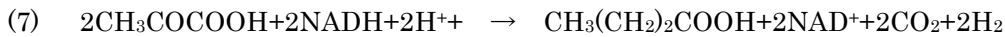
[解糖系]



[ブタンジオール生成反応]



[酪酸生成反応]



しかし、 NADH からの水素発生は、(4)式に示すように $\Delta E_0'$ はかなり大きな負の値になるから、 $\text{pH} = 7.0$ における平衡定数 K は(8)式のように非常に小さいものになる。

(8) $K = \frac{[\text{NAD}^+](\text{P}_{\text{H}_2})}{[\text{NADH}]} = 6.7 \times 10^{-4}$
 $\Rightarrow \text{P}_{\text{H}_2} \approx 1/2000 \text{ 気圧}$

NAD は生体反応の重要な補酵素であるから、濃度比 $[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}]$ は細胞内では 1 前後に保たれている。したがって NADH から水素発生が確認できても、化学熱力学的には水素分圧が約 $1/2000$ 気圧で反応は平衡に達してしまう。1976年には、*E.coli* の細胞内 pH が、外部 $\text{pH} 5.5 \sim 9.0$ の広い範囲にわたって、ほぼ 8.0 に保たれていることがわかり、図4から考えられるように、細胞内で反応が進むならさらに低い水素分圧で平衡に達してしまうことになった。化学量論から NADH により水素発生すると考えられるにもかかわらず、化学熱力学的には説明できないことに研究者たちは永く苦しんでいたが、それは、生物化学者たちが、この反応が細胞内の均一 pH 状況下で進むと考えていたことと、水素発生速度に注意を払っていなかったことによる。

実際、バクテリアの生育が中性 pH 付近でもっとも活発

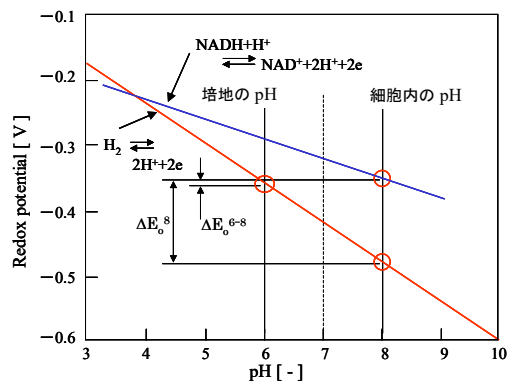


図4. pH と酸化還元電位の関係

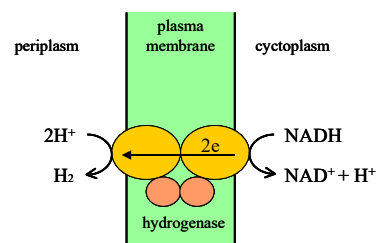


図5. 膜結合ヒドロゲナーゼの反応機構

になるのに対し、発酵水素発生では、発生速度は培地 pH の影響を強く受け、酸性側で至適 pH が観察される。NAD は細胞外に出ることはないから、これは、水素の(1)式が細胞外で起きていることを示すものである(図5参照)。図4からも分かるように、細胞外で(1)式の反応が起きているなら、pH が小さくなるにつれ ΔE が正の値を持つ方向に変化するので、平衡定数は大きくなり、分圧問題が解決するだけでなく膜結合ヒドロゲナーゼが水素発生を触媒することの説明もつく。

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り、NADH の再酸化に利用できるような酵素反応系を作り上げたといえる。

2. *Clostridium butyricum* の水素発实例

図6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。図に見られるように、pH7.0 では乳酸が主産物で水素収率も非常に小さく、pH が低くなるに従って乳酸の生産量が少なくなり収率が大きくなる。

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を示している。図7は乳酸、酪酸、酢酸生産経路と途中の反応の標準酸化還元電位差を示している。NADH が関わる二つの反応の電位差を比べると、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り、この電位差だけを見ると、pH 7 付近でも乳酸、酪酸の等量生産が可能であると考えられる。しかし、 Fd_{red} から Fd_{ox} への再酸化反応を仲立ちする NAD が NADH 経路の水素発生機構にしたがうため、培地 pH で酪酸経路の反応が制御され、pH に対して直線的な応答をするのである。

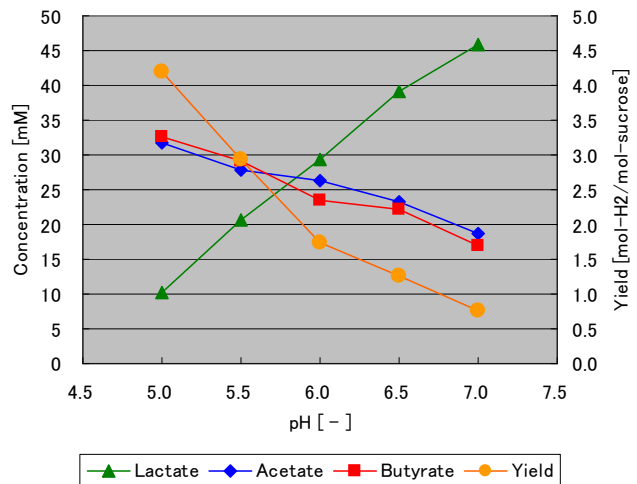


図6. スクロースを基質にしたときの *C. butyricum* の代謝産物濃度と培地 pH の関係

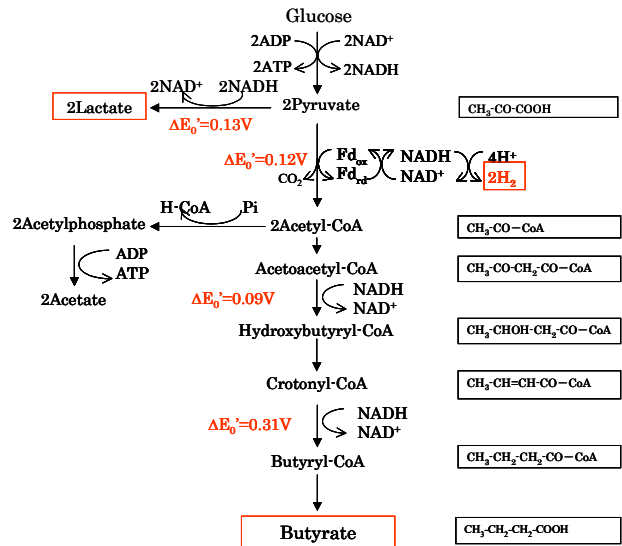
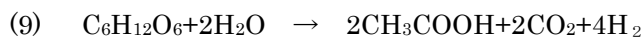


図7. 酪酸発酵の代謝経路と酸化還元電位の関係

3. 発酵で達成可能な水素収率とエネルギー変換効率

発酵は、上に述べたように、嫌気状態で NADH を再酸化するためであるから、必ず何か代謝産物を生産しなければならない。NADH から水素が生産されるなら、代謝産物生産に NADH を用いず、かつ、NADH がもっとも多く生産される反応系だけを発現できれば、最大水素収率が得られることになる。そのような系は酢酸生成経路で、(9)式の総括反応式から収率4が最大になる。したがって、発酵によるグルコースからの水素エネルギーへの最大エンタルピー回収率 η は40%である。



$$(10) \quad \eta = (4)(68.3)/(678) \times 100 = 40.3\%$$

4. 結言

上述のように、発酵水素発生は、①エネルギー獲得サイクルを回すための NADH 再酸化反応の結果である。同時に、②水素発生反応は細胞膜の培養液側で進行し、③水素の酸化還元電位が pH で変化するため、④培地の pH の強い影響を受ける。⑤発酵でのグルコースからの最大水素収率は4であり、⑥最大エンタルピー回収率は40%である。