

バクテリアはなぜ水素を発酵で発生するのか、また エネルギー生産利用における問題点はなにか

谷生重晴

横浜国立大学教育人間科学部

tanisho@ynu.ac.jp

The Reason for Bacterial Evolution of Hydrogen by Fermentation and the Problems to be Solved for Utilization on Energy Production

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; $\text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{H}_2$. 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. Maximum values on hydrogen production properties were estimated from the theoretical point of view.

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

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。原核生物に分類されるバクテリアは、Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 第8版(1978)では、245属(Genus)が記載されているが、バクテリア研究の進展とともに、属名は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 *Enterobacter* 属や *Clostridium* 属など代表的なバクテリアの発生経路は、図1のように3経路ある。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、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、解糖を再び進めるために、この過程で還元生成された NADH をピルビン酸と反応させ、再酸化して NAD を利用する。水素発生の一つの理由は、NADH を再酸化するためである。

本報では発酵水素発生メカニズムと、工業的利用における問題点について述べたい。

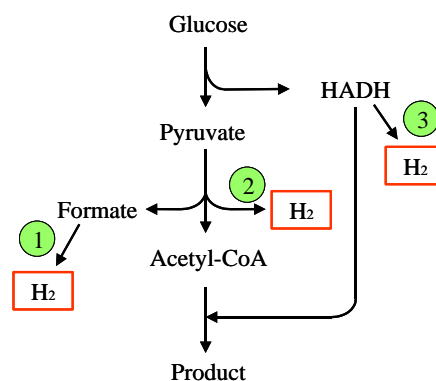


図1. 代表的な水素発生経路

2. 発酵水素発生のメカニズム

2.1 ギ酸経路の水素発生

- (1) $2H^+ + 2e \rightarrow H_2$ $E_0' = -0.414 V$
- (2) $HCOO^- + H^+ \rightarrow CO_2 + 2H^+ + 2e$ $E_0' = -0.432 V$
- (3) $HCOO^- + H^+ \rightarrow CO_2 + H_2$ $\Delta E_0' = 0.018 V$

酢酸やエタノールなど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に示した(2)式の酸化還元電位から、この分解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、pH 6.4より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。

ギ酸濃度が高くても、中性付近ではほとんど水素を出さないから、ギ酸経路の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。

2.2 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観測されたので、直接水素を発生する経路と言われているものである。

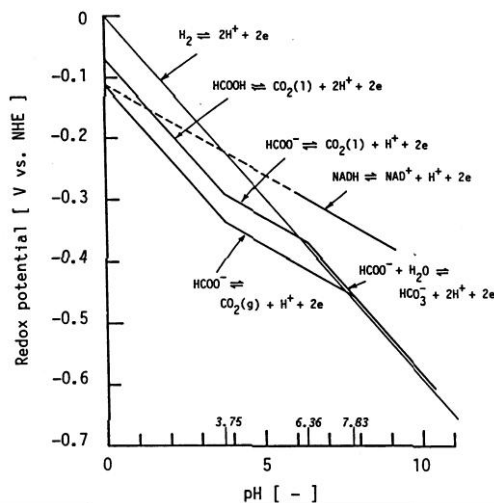


図2. ギ酸、水素の酸化還元電位と pH の関係

- (1) $2H^+ + 2e \rightarrow H_2$ $E_0' = -0.414 V$
- (4) $Pyruvate + H-CoA \rightarrow$
 $Acetyl-CoA + CO_2 + 2H^+ + 2e$
 $E_0' = -0.52 V$
- (5) $Pyruvate + H-CoA \rightarrow Acetyl-CoA + CO_2 + H_2$
 $\Delta E_0' = 0.11 V$

ただ、直接水素を発生したのであるなら、Pyruvate → Acetyl-CoA の標準酸化還元電位差 ($\Delta E_0' = 0.11 V$) が非常に高いので、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、*C. butyricum* などでは水素発生に培地 pH の影響を受ける。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、あるいは *C. butyricum* では $NADH$ が副生成されて水素が発生したとも考えられる。したがって、③の $NADH$ 経路で水素発生の理由を考えるのが適当である。

- (6) $NAD^+ + 2H^+ + 2e \rightarrow NADH + H^+$
 $E_0' = -0.320 V$
- (7) $Fd_{red} \rightarrow Fd_{ox} + 2H^+ + 2e$ $E_0' = -0.38 V$
- (8) $NAD^+ + Fd_{red} \rightarrow Fd_{ox} + NADH + H^+$
 $\Delta E_0' = 0.06 V$

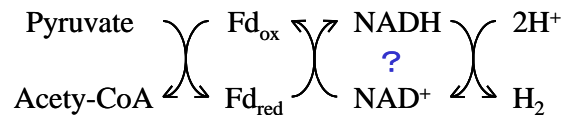


図3. Fd を介した H^+ への電子伝達系

2.3 $NADH$ 経路

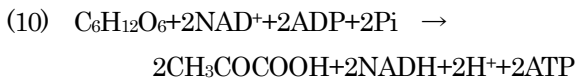
- (1) $2H^+ + 2e \rightarrow H_2$ $E_0' = -0.414 V$
- (6) $NADH + H^+ \rightarrow NAD^+ + 2H^+ + 2e$
 $E_0' = -0.320 V$
- (9) $NADH + H^+ \rightarrow NAD^+ + H_2$ $\Delta E_0' = -0.094 V$

$NADH$ 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、(9)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。

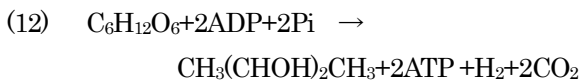
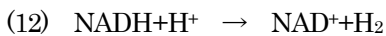
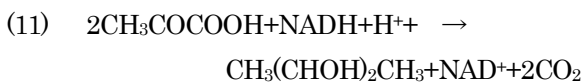
たとえば、図1で、グルコースからピルビン酸が生

成されるまでの反応は解糖系と呼ばれ、総括反応式は(10)式で表される。この反応系では 2mol の NADH と 2mol の ATP が生成される。*E. aerogenes* は酸性下では 1mol のグルコースから 1mol のブタンジオールと 1mol の水素を発生するが、その代謝反応では(11)式のように NADH は 1mol しか使われない。その結果、1mol の未反応 NADH が残り、これを再酸化するために(12)式の反応で 1mol の水素を発生する。

[解糖系]



[ブタンジオール生成反応]



しかし、NADH からの水素発生は、(9)式に示すように $\Delta E_0'$ がかなり大きな負の値になるから、pH=7.0 における平衡定数 K は(14)式のように非常に小さいものになる。

$$(14) \quad K = \frac{[NAD^+](P_{H_2})}{[NADH]} = 6.7 \times 10^{-4} \Rightarrow P_{H_2} \doteq 1/2000 \text{ 気圧}$$

NAD は生体反応の重要な補酵素であるから、濃度比 $[NAD^+]/[NADH]$ 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、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。しかし、連続発酵水素発生では水素分圧が 0.6 気圧の下でも活発に水素発生している。1976 年には、*E. coli* の細胞内 pH が、外部 pH 5.5~9.0 の広い範囲にわたって、ほぼ 8.0 に保たれていることが明らかになり、中性 pH を好むバクテリアの細胞内 pH はアルカリ側に偏っていることが一般的に認識された。図 4 から容易に考えられるように、細胞内で水素発生反応が進んでいるなら、pH 7.0 よりさらに低い水素分圧で平衡に達してしまうことになる。化学量論的には 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。Tanisho らは、NAD は細胞外に出ることはないから、この事実は、水素の生成反応(1)式が細胞外で起きていることを示すものであるとして、図 5 に示す細胞膜結合ヒドロゲナーゼ水素発生メカニズムを 1989 年に提案し、実験値と理論値が良く合うことを示した。図 4 から分かるように、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、分圧問題は解決する。さらに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。

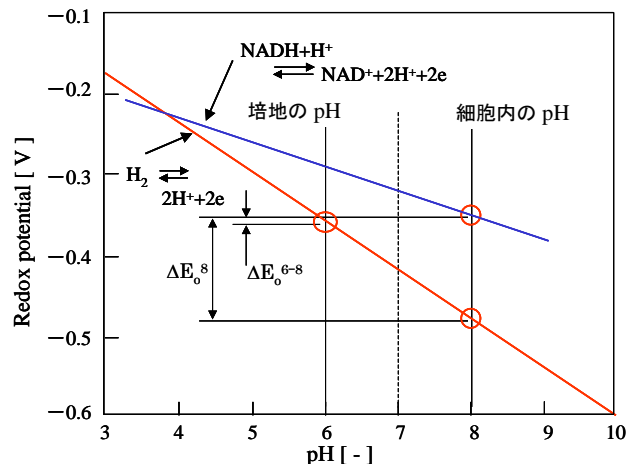


図 4. pH と酸化還元電位の関係

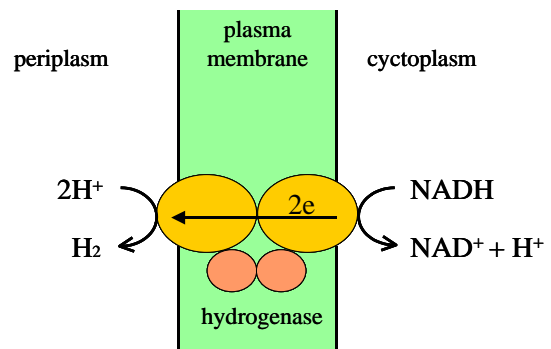


図 5. 膜結合ヒドロゲナーゼの反応機構

2. Clostridium butyricum の水素発生例

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酪酸、酢酸の濃度は非常に小さく、水素収率も同様に非常に小さい。しかし、培地 pH が低くなるに従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。

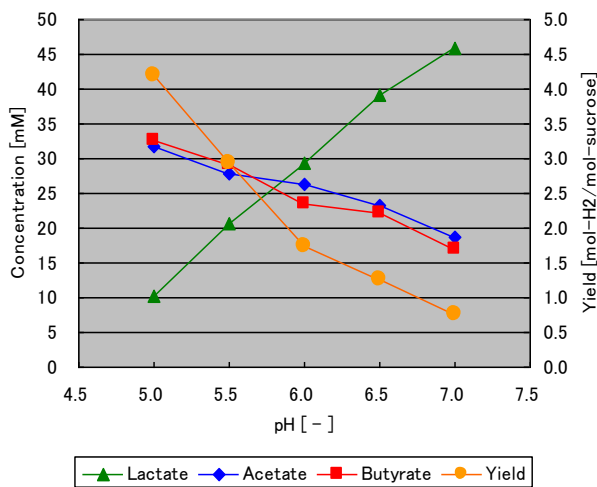


図6. スクロースを基質にしたときの *C. butyricum* の代謝産物濃度と培地 pH の関係

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7に乳酸、酪酸、酢酸の生成経路と途中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。水素が直接(5)式したがって発生するならば、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ば、NADH の再酸化が NADH 経路の水素発生機構にしたがうため、結果として酪酸経路の反応が培地 pH に制御され、直線的な pH 応答の説明がつく。

この場合にも、NADH の再酸化が、細胞内外の pH 差を利用して水素発生した方が進めやすいから、と考えることができる。

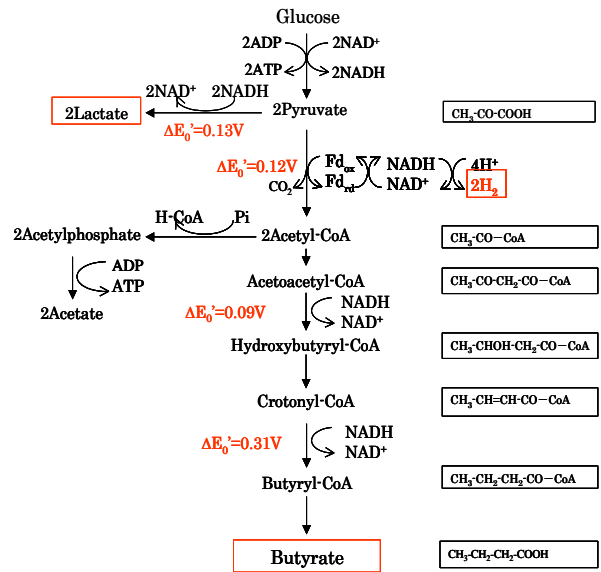


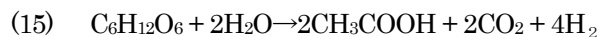
図7. 酪酸発酵の代謝経路と酸化還元電位の関係

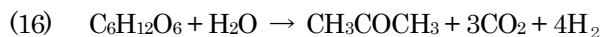
3. 工業利用における問題点

発酵による水素生産の問題点は、水素収率が小さく基質の持つエネルギーを十分利用していないこと、そのためエネルギー変換効率が低いこと、水素発生速度が触媒反応などに比べて遅いことである。ここでは、これらの諸問題点について理論的最大値について考えてみよう。

3.1 理論的最大水素収率

発酵は、上に述べたように、嫌気状態で NADH を再酸化するための反応であるから、必ず何か代謝産物を生産しなければならない。したがって、NADH から水素が生産されるならば、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、発酵における最大水素収率が得られることになる。そのような系の一つは酢酸生成経路で、総括反応式は(15)式のようなになる。また、(16)式のアセトン生成経路もそのような系の一つであるが、これは図8に見られるように、グルコースを基質に利用して酪酸、酢酸を生成した後、二次反応としてこれらの代謝産物からアセトン・ブタノールを生成したと思われるので、酪酸発酵と組み合わせて利用することになる。





これらの系が発酵水素生産の最大収率を示す総括反応で、これより多くの水素を発生することはできない。すなわち、4 mol-H₂/mol-glucose が最大収率である。

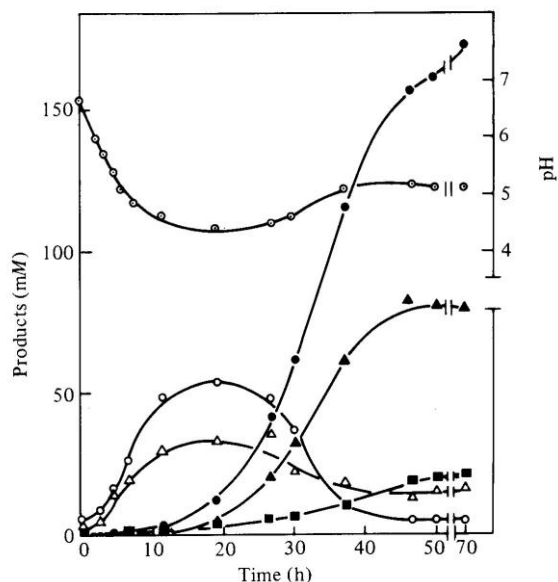


図8 *C. acetobutylicum* の代謝産物。● Butanol, ▲ acetone, ■ ethanol, ○ butyrate, Δ acetate

3.2 最大エネルギー変換効率

サトウキビは非常に効率よく太陽エネルギーを変換し、スクロースとして蓄える。その年間エネルギー変換効率は、バイオマス全量からは約2%、スクロース生産量からはおよそ1%と見なすことができる。グルコースの燃焼熱は2,817kJ/mol、水素の燃焼熱は286kJ/molであるから、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は約40%である。スクロースはグルコースの二量体と考えれば、サトウキビのサトウからの発酵水素発生太陽エネルギー変換効率は、結局、0.4%といえるであろう。全バイオマスが利用できれば0.8~1%になる。

(17) $\eta = (4)(286)/(2817) \times 100 = 40.6\%$

3.3 最大水素発生速度

40°C以下における *E. aerogenes* の倍加速度は約20分であるが、バクテリアの中でもっとも速い倍加速度は約15分である。酢酸生成反応では、1 molのグルコースから4 molのATPができる。バクテリアの増殖収率

は約10 g/mol-ATPであるから、グルコースの最大消費速度は0.10 mol-glucose/(g-dry cell.h)と計算される。

(18) $V = 4(1/hr)/10(g/ATP)/4(ATP/mol-glucose) = 0.1 mol-glucose/(g-dry cell.h)$

したがって、もっとも増殖速度の速いバクテリアに酢酸だけを生成する代謝反応をさせることができれば、水素発生速度は最大0.4 mol-H₂/(g-dry cell.h)、すなわち9 L-H₂/(g-dry cell.h)が期待できる。これは、現状の *E. aerogenes* や *C. butyricum* が発生している速度の約20倍の発生速度にあたる。

化学反応速度は反応温度が高くなると Arrhenius の式にしたがって速くなる。*E. aerogenes* の見かけの活性化エネルギーは約76 kJ/molであるから、35°Cの水素発生速度を基準に、培養温度を高くしたときの反応速度上昇を計算すると、図のようになる。したがって、もし、65°Cでも生育できる *E. aerogenes* が選別できれば、現在の発生速度の約10倍の速度で水素生産できることになる。

このように、水素発生速度は成長速度を速くすることでも、培養温度を高くすることでも速くできるので、今後の課題であろう。

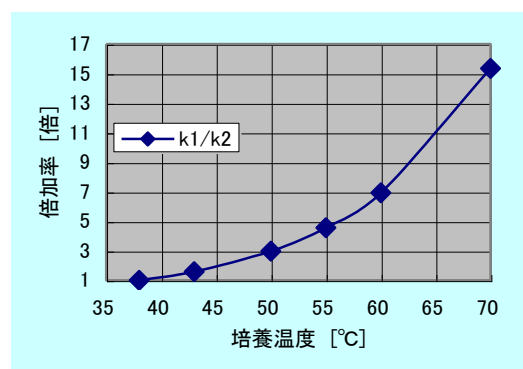


図9 培養温度と反応速度の倍加率の関係。(活性化エネルギーが76 kJ/molの場合の例)

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、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、培地のpHの強い影響を受ける。④発酵でのグルコースからの最大水素収率は4であり、⑤最大エンタルピー回収率は40%、⑥水素発生速度は、現状の20倍以上が理論的上限である。