

HESS

第18回

水素エネルギーシステム
研究発表会予稿集

1998年

平成10年1月20日(火曜日)

学 士 会 館

(本館320号室、3階)

主催 水素エネルギー協会

電子伝達鎖阻害による 発酵水素発生の収率改善

佐々木寧、谷生重晴

横浜国立大学工学部
〒240 横浜市保土ヶ谷区常盤台79-5

The improvement of the yield of fermentative hydrogen evolution
by inhibitions of the electron transport chain

Yasusi SASAKI, Sigeharu TANISHO

Yokohama National University

79-5 Tokiwadai, Hodogaya-ku, Yokohama 240

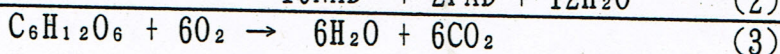
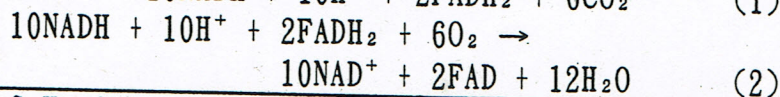
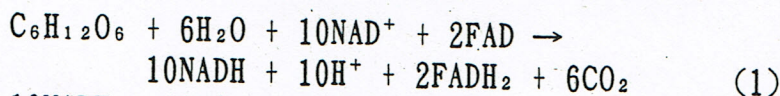
We examined the effect of TTB on ubiquinone(CoQ) of electron carrier in *E. aerogenes*. FAD are reduced to FADH₂ in TCA-cycle and FADH₂ reoxidized to FAD in electron transport system. Inhibitions of FADH₂ cause to stop TCA-cycle work because it can be only oxidized in electron transport system. For hydrogen evolution under aerobic condition we consider there are necessary to inhibit NADH dehydrogenase complex.

1. 緒言

通性嫌気性水素発生菌の *Enterobacter aerogenes* は、嫌気状態ではNADHからピログナレの作用により水素を発生している。NADHは嫌気条件下では1molのグルコースから解糖系で2molしか生成されないが、好気条件下では解糖系とTCAサイクルで10molも生成される。しかし、この多量のNADHは電子伝達鎖を介して酸素により再酸化されるので、好気下では水素は発生しない。発酵水素発生では水素の収率の悪いことが欠点であるので、TCAサイクルで生成されるNADHを水素発生に利用することによる水素収率改善の可能性について検討した。

2. グルコースの代謝反応

グルコースの好気条件下の代謝経路は大きく分けると「解糖系・TCAサイクル・電子伝達系」となる。図1に示すTCAサイクルで生じたNADHとFADH₂は、図3の電子伝達鎖を介して(2)式のように酸素により酸化され元の酸化型に戻る。(1, 2)



このことから、(2)式の反応を阻害すれば多量のNADHが残ることになり、もしその再酸化を水素発生で行わせることができるならば、(4)式のように12 molの水素が得られ、水素収率の著しい向上が可能になると考えられる。(3)

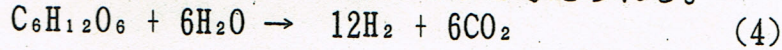


図1で、()の中の数値はkcalで表した標準自由エネルギー変化の値であるが、FADが使われるコハク酸/フマル酸反応の自由エネルギー変化は、+11.7kcalと非常に大きな正の値になっている。

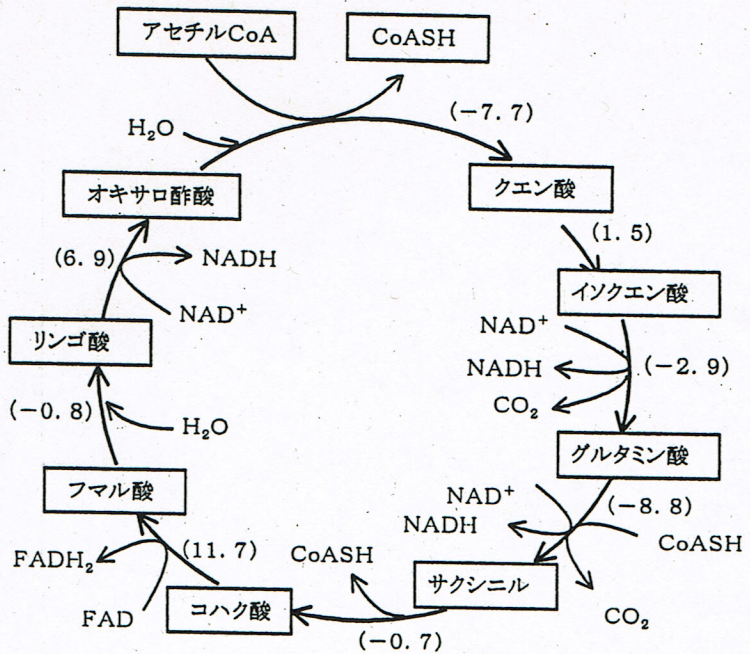


図1 TCAサイクル図

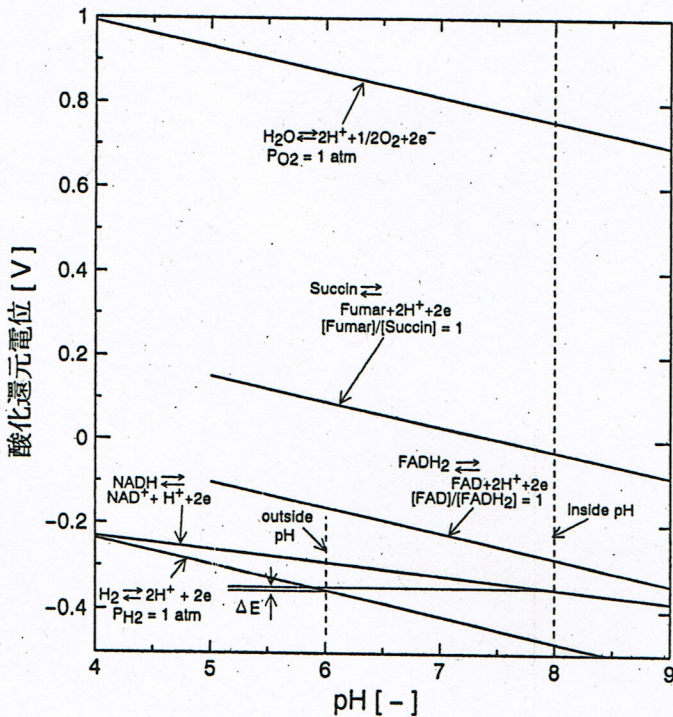


図2 電子伝達系の出発物質と終局物質の酸化還元電位のpHによる変化

図2には電子伝達系の出発物質と終局物質の酸化還元電位を示す。FADの酸化還元電位は220mVでありNADよりも100mVも高く、 O_2/H_2O 系の電位は+820mVである。FADH₂を O_2 で酸化した場合、反応の自由エネルギー変化は、 $\Delta G = -21.6 \text{ Kcal}$ であるから、電子伝達系でFADH₂の再酸化が行われなければ、TCAサイクルを止めてしまうことになるであろう。したがって、TCAサイクルの機能を維持し、多量のNADHを生成させるためには、FADH₂の再酸化を図りながら阻害しなければならないと思われる。

3. 実験方法

実験には *E.aerogenes* E. 82005 を使用した。前培養液は 1.0l の蒸留水に $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0g、 K_2HPO_4 1.0g、 MgSO_4 0.2g、 Na_2HPO_4 14.0g、 KH_2PO_4 6.0g、 $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 15.0g、ペプトン 5.0g を加え滅菌したもので、38℃ の恒温槽で攪拌しながら 20 時間菌を培養した後、この菌液 45ml を遠心分離機にかけ (10,000rpm, 10 分間) 沈殿した菌を生理食塩水 30ml で溶かし本培養液 1.4l に植菌した。本培養液は前培養液と同成分の溶液とした。ただし pH を 6.0 にしてペプトンを 2.0g/l に変更した。

溶存酸素濃度 (DO) は培地に浸漬した DO センサーで、酸化還元電位は白金黒電極を使用し測定した。pH は pH 電極で測定した。発生した気体は水上置換し、置換液として 1N の硫酸を使用した。

4. 結果および考察

図 3 には各阻害剤の作用する箇所を示した。阻害の効果は空気と平衡状態にある溶存酸素濃度 (7.1mg/l) の培養槽に菌を植え付け、DO 濃度が 4.3mg/l のときに薬品を入れて溶存酸素濃度の減少が止まれば有るとした。アミタル・アンチマイシン・ロテノン・(+)カテチン・没食子酸ラリル・p-(クロロメルクリ)安息香酸・TTB (4,4,4-トリフロロ-1-(2-チオニル)-1,3-ブタジエン)・HONQO (n-ヘプチルヒドロキシキノリン-N-オキシド)・KCN (4, 5, 6) について阻害の効果調べたところ、TTB・HONQO・KCN に効果が現れた。表 1 に実験に使用した薬品の濃度とその効果をまとめた。

今回の実験に使用した多くの薬品で効果が無かった理由として、アミタル・アンチマイシン・ロテノン・没食子酸ラリル・p-(クロロメルクリ)安息香酸・TTB (4,4,4-トリフロロ-1-(2-チオニル)-1,3-ブタジエン)・HONQO (n-ヘプチルヒドロキシキノリン-N-オキシド) は脂溶性であり、p-(クロロメルクリ)安息香酸・HONQO はアルカリ性で安定であることなどが挙げられる。また膜断片標本に作用した試薬アミタル・アンチマイシン・ロテノン・p-(クロロメルクリ)安息香酸・TTB・HONQO も含まれるため細菌は種類によって電子伝達鎖が大幅に異なること、電子伝達系には主経路のほか

表 1 電子伝達阻害剤と反応

試薬名 濃度: []	阻害の 効果
TTB [5.0mM]	有り
Rotenone [0.3mM]	無し
Amytal [0.5mM]	無し
(+)Catechin [0.1mM]	無し
Lauryl Gallate [0.1mM]	無し
p-(Chlorolmercuri) benzoic Acid [0.1mM]	有り
Antimycin A [10 μM]	無し
HONQO [0.038mM]	有り
KCN [5.0 μM]	有り

TTB: 4,4,4-トリフロロ-1-(2-チオニル)-1,3-ブタジエン
HONQO: n-ヘプチルヒドロキシキノリン-N-オキシド

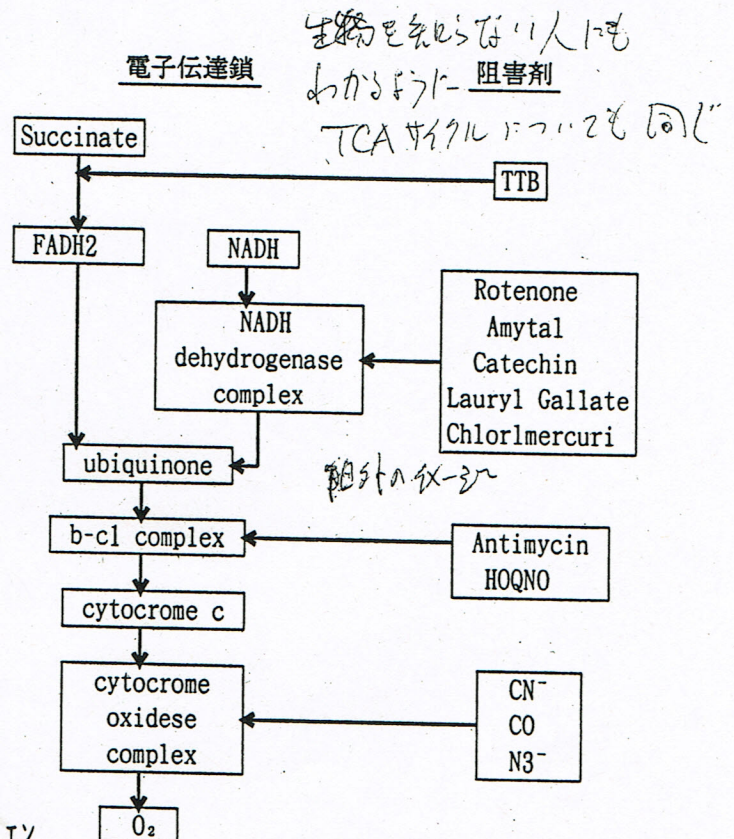


図 2 電子伝達鎖と阻害部位

かに副経路をもつものが多いこと、培養条件によって同じ細菌でも異なる電子伝達系をもつものがあることが考えられる。⁽⁷⁾

図4は気体発生確認後にTTBで阻害し、直ちに空気を3分間吹き込んで、DO濃度、培養液の酸化還元電位、気体発生の変化を調べたものである。

実験開始後、DO濃度は急激に減少し約1時間後には0mg/lの値を示すようになったが、酸化還元電位はその後も減少を続け、約90分後に-0.38Vになってほぼ一定の値を示すようになった。気体発生は75分後(酸化還元電位:+0.06V)から認められたが、この間にもTCAサイクルは機能しているのでCO₂は発生していなければならない。気体発生が確認できなかったのは、CO₂の水に対する溶解度が0.5ml/mlと高いため溶液に溶けたと考えられる。

一方、阻害後に空気を吹き込んだあとは、気体発生が停止しDO濃度と酸化還元電位が増加したことから、CO₂は発生していないと推測するとTCAサイクルは機能していないことになるが、これは今後の検討課題としたい。

また阻害をNADH酸化酵素複合体の部位で行うならば、電子伝達鎖はFADの再酸化機能を残して阻害されると思われる。

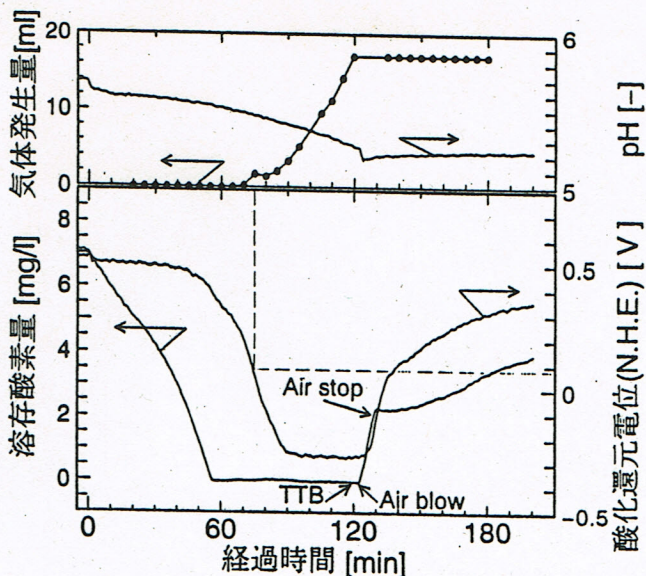


図4 阻害剤TTB(5.0mmol)の効果

参考文献

- (1) E. E. Corn, P. K. Stumpf: OUTLINES OF BIOCHEMISTRY, NEW YORK • WILEY, P. 327-346, (1988)
- (2) E. E. Corn, P. K. Stumpf: OUTLINES OF BIOCHEMISTRY, NEW YORK • WILEY, P. 381-410, (1988)
- (3) 谷生 重晴, 佐々木 寧: 水素製造をともなう廃水処理システムのための *Enterobacter aerogenes* による好気的水素発生, 水素エネルギーシステム, Vol. 22, NO. 1, P. 2-7, (1997)
- (4) 浅野 明: 細胞生物学 第4巻, 理工学社, (1978), P. 179-202
- (5) 浅野 明: 生体膜実験法・下(蛋白質 核酸 酵素 別冊), 共立出版, (1974), P. 293-310
- (6) K. KONISI, H. ADATI: Inhibitory Effect of Tannins on NADH Dehydrogenases of Various Organisms, *Biol Pharm Bull*, Vol. 16, NO. 7, P. 716-718, (1993)
- (7) 浅野 明: 代謝マップ, 日本生化学会編, 東京化学同人, P. 30, (1984)