

Title	水素細菌によるガス状基質資化の動力学
Author(s)	大井, 清源
Citation	大阪大学, 1979, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32234
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	大井清源
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 4584 号
学位授与の日付	昭和 54 年 3 月 24 日
学位授与の要件	薬学研究科 応用薬学専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	水素細菌によるガス状基質資化の動力学
論文審査委員	(主査) 教授 三浦 喜温 (副査) 教授 上原喜八郎 教授 鎌田 皎 教授 近藤 雅臣

論 文 内 容 の 要 旨

緒 言

水素細菌は、水素の酸化によって生ずるエネルギーを利用して、炭酸ガスを炭素源として菌体合成を行なう細菌群の総称である。そして、混合ガスが絶えず爆発限界内にあるため爆鳴気細菌 Knallgasbakterien ともいわれている。

将来予想される食糧不足特に蛋白質資源の不足のため、新しい微生物蛋白質の開発研究が活発に行なわれてきている。近年、微生物資化原料とくに、SCP(Single Cell Protein) の原料として、メタノールおよびメタンなどが注目をあび活発に研究されている。しかし、これら原料は、有限であり他のエネルギー源としても重要であるなどの点が、将来問題となってくる。ところが、水素は将来、核融合エネルギーや太陽エネルギーにより豊富に生産される二次エネルギー源として注目をあび、活発に研究されている。このように将来、無限になるであろう水素と炭酸ガスにより菌体合成を行なう水素細菌は、SCP などの原料として有望だと思われる。そして、そのようにして水素細菌による菌体生産を行なう場合、基質が、ガス状であるので培養液への溶解度は低く、その供給速度が問題となる。そこで、3種ガスの溶存基質濃度と比増殖速度との関係の定式化を目的として本研究を行なった。さらに、得られたモデル式を用い、菌体生産性の最適化を行なった。

第 1 章 水素細菌の分離および同定

国内外から集めたサンプルより通常集積培養により水素細菌を数株分離した。その中で最も比増殖速度の速い菌株について同定を行なった。分離菌株は、グラム陰性の桿菌であり、好気性菌で、周鞭毛により運動する。Table 1 に形態学的性質、Table 2 に生理学的性質が示されている。形態学

Table 1. Morphological characteristics

shape of cells : Rods.
 Cell size : 0.6 by 0.8 to 2.0 μm .
 Motility : Motile by means of peritrichous flagella.
 Flagellation : More than two peritrichous flagella.
 Spore : None formation.
 Gram stain : Negative.
 Nutrient agar colonies : Circular, smooth, glistening, mucoid,
 white to cream.
 Nutrient agar slant : Abundant growth, smooth, mucoid, white
 to cream.
 Nutrient broth : Turbid, soft ring pellicle, soft and easily
 dispersed sediment. No pigment and no fluorescence.

Table 2 . Physiological characteristics

Gelatin and starch : Not hydrolyzed.
 Litmus milk : Slightly alkaline.
 Indole production : Negative.
 Hydrogen sulfide production from TSI : Negative.
 Acid but no gas from fructose and glycerol.
 Nitrites produced from nitrates.
 Catalase : Negative.
 Oxidase : Positive.
 Urease : Positive.
 Denitrification : Positive.
 Nitrogen sources : Ammonium salts, nitrate and urea were
 utilized. Nitrite and gaseous nitrogen were
 not utilized.
 Optimal temperature : 30 to 35 $^{\circ}\text{C}$
 Optimal pH : 6.5 to 7.5
 Oxygen demand : Aerobic.
 Tolerance to 40% O_2 with H_2 : Positive.

的性質および生理学的性質より, Bergey's Manual (第8版)を参考にすると, *Alcaligenes* 属に属する菌種であった。さらに, 同属に属する既存の菌株の中で, 本菌株と菌学的性質の似ている菌株と比較検討を行なった。その結果, 有機物の資化性および DNA の G-C (Guanine + Cytosine) 含量が既存の菌株と大きく異なり新種であることがわかったので, *Alcaligenes hydrogenophilus*

nov. sp. 1978と命名した。本菌株の G-C 含量は、70.2mol %であった。

第2章 水素細菌 *Alcaligenes hydrogenophilus* nov. sp. の生育条件

水素細菌 *A. hydrogenophilus* について、autotrophic growth条件下の最適生育条件の検討を行った。

培養温度を18℃から40℃まで変化させて、増殖に対する影響を調べたところ、30~35℃において良好に増殖した。18℃および40℃では増殖は遅く、増殖誘導期も非常に長かった。そして、Arrheniusの式より、比増殖速度と絶対温度の関係から、菌体の増殖に対する活性化エネルギーを求めると、22℃から30℃の温度範囲において、10.7(kcal/mol)であった。

0.05 Mのリン酸緩衝液を使って、初期pHを4.5から8.0まで変化させ、30℃で培養を行なったところ、pH 6.5~7.5において良好に増殖し、pH 7.0が最適であった。

窒素源の資化性について、アンモニウム塩、硝酸塩、亜硝酸塩および尿素を窒素源として与えてその資化性を調べた。アンモニウム塩、硝酸塩および尿素を良好に利用して増殖した。窒素ガスを窒素源として利用する水素細菌^{1,2)}が報告されているので、本菌についても検討を行なったが、利用しなかった。さらに窒素源の濃度の影響を検討した。窒素源として塩化アンモニウムの濃度を色々変えて与えた場合、0.5~3.0g/lの濃度では良好に増殖するが、5.0g/lの濃度では、増殖が阻害され始めた。これに反して、尿素の場合、5.0g/lの濃度においても良好に増殖し、阻害は起こらなかった。

求めた最適生育条件下において、 $H_2 : O_2 : CO_2 = 55.8 : 19.3 : 20.9$ の混合ガスを培養器に満たし、閉鎖系で回分培養を行なった。Fig. 1に示されるように、菌の生育とともに総内圧が減少し、水素分圧も減少してきた。増殖は、水素制限により停止したと思われる。この時の最大比増殖速度は、 0.26 hr^{-1} であった。

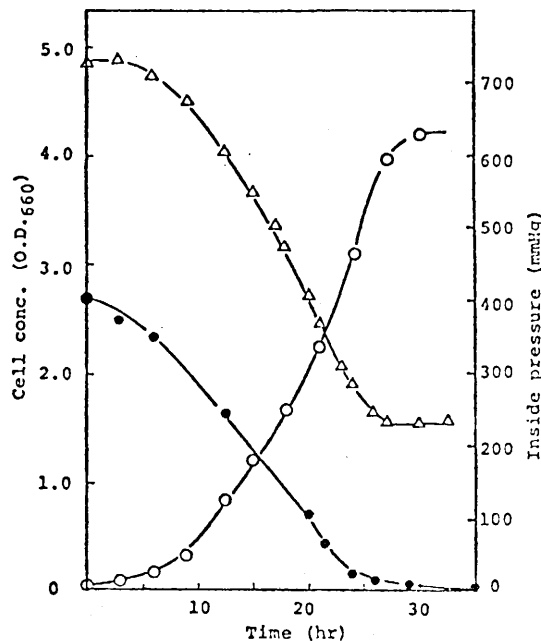


Fig. 1. Typical time courses of *A. hydrogenophilus*. Initial concentration of gas mixture; $H_2 : O_2 : CO_2 = 55.8 : 19.3 : 20.9$.

- : Growth.
- : Partial pressure of hydrogen.
- △ : Total pressure.

第3章 A. *hydrogenophilus* の培養特性ならびに溶存水素濃度の測定方法

A. *hydrogenophilus* は、任意化学独立栄養生物である。そして、heterotrophic growth は、グリセロールの場合が非常に遅く、肉汁培地の場合が大へん速かった。そして、色々な有機化合物と mixotrophic growth を行なうと、有機化合物の種類により、増殖の型が、ジオキシー型を示したり、同時資化型を示したりした。その中の一つとして、酢酸を与えた場合、Fig. 2 に示されるように、ジオキシー型増殖をした。

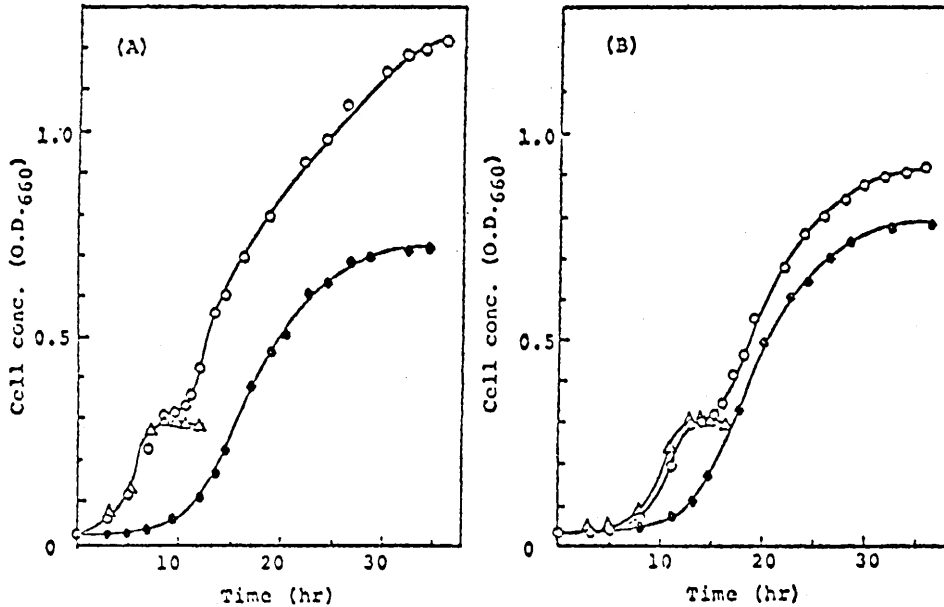


Fig. 2. Mixotrophic growth on acetate and hydrogen.

- : Autotrophic growth condition ($H_2 + O_2 + CO_2$)
- △ : Heterotrophic growth condition (acetate, air)
- : Mixotrophic growth conditions (acetate, $H_2 + O_2 + CO_2$)

Acetate concentration was 0.05 %.

(A) : Heterotrophic preculture for 48 hr.

(B) : Autotrophic preculture 48 hr.

水素細菌の培養に関しては、若干の報告がされているが、^{3) - 6)} 溶存水素濃度の測定に関する報告は非常に少ない。Kodama らが培養液中の溶存水素を窒素ガスにより追い出し、その窒素ガス中の水素濃度をガスクロマトグラフィーにより測定し、水素移動容量係数を測定している。⁷⁾ しかし、培養中の溶存水素濃度の簡便な測定方法に関する報告はない。そこで、水素細菌の培養および速度論的解析に際して重要な因子である溶存水素濃度を半連続的に測定する簡便な方法を見出した。Fig. 3 に装置図が示されている。テフロンチューブをジャーファーメンター内に装着し、拡散によりチューブ内に透過してくる溶存水素をキャリアーガスクロマトグラフィーにより測定した。

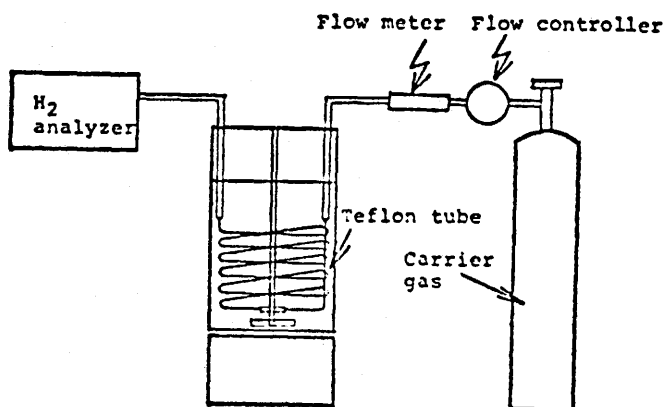


Fig. 3. Apparatus for H₂-sensor of Teflon tube.

第4章 水素細菌によるガス状基質(H₂, O₂, CO₂) 資化のモデル化

水素制限下の連続培養を行ない、希釈率 (D) を種々変えて、各定常状態の溶存水素濃度をテフロンチューブセンサーにより測定した。連続培養の結果、求めた溶存水素濃度と希釈率を Lineweaver-Burk のプロットを行なうと、Fig. 4 に示されるように、直線関係が得られ Monod 式に適合することがわかった。飽和定数は、 $2.94 \times 10^{-6} \text{ M}$ であり、最大比増殖速度は、 0.30 hr^{-1} であった。次に、水素の比消費速度 (ν_A) と比増殖速度の関係を求めると、Fig. 5 に示されるように、次式で表わすことができた。

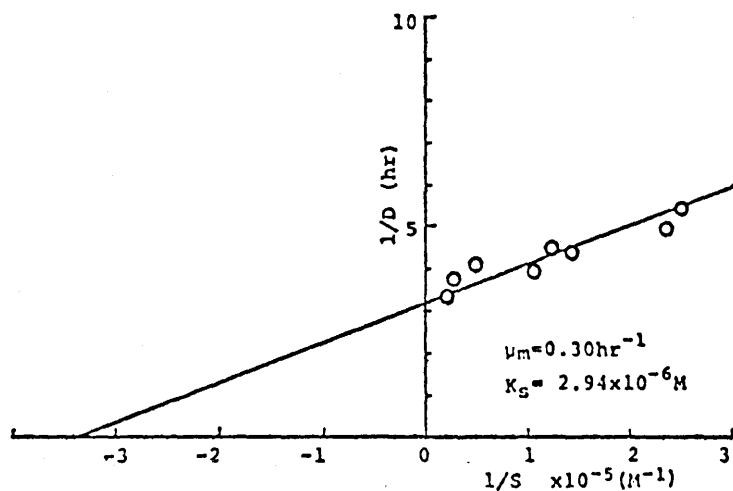


Fig. 4. Lineweaver-Burk's plot of dilution rate and dissolved hydrogen conc. by *A. hydrogenophilus*.

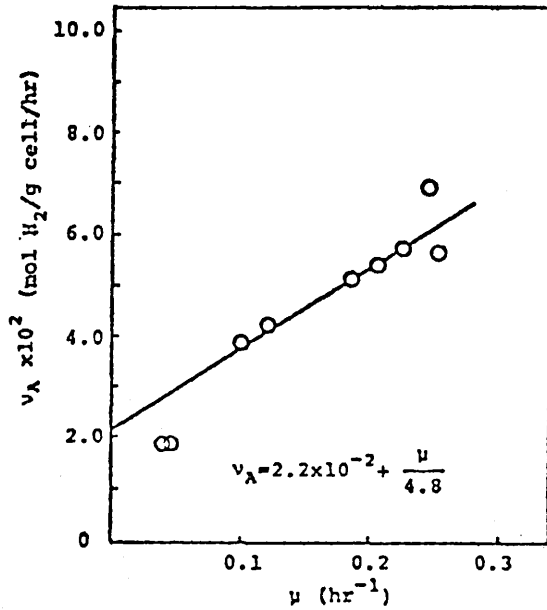


Fig. 5. Specific utilization rate for hydrogen.

$$\nu_A = 2.2 \times 10^{-2} + \frac{\mu}{4.8}$$

酸素資化については、酸素制限のかかる混合ガスで飽和した培養液中の溶存酸素濃度の減少曲線より、酸素資化が、Monod 式に適合することがわかった。次に、酸素の比消費速度 (ν_B) と比増殖速度の関係を求めると、次式で表わすことができた。

$$\nu_B = 2.0 \times 10^{-3} + \frac{\mu}{7.4}$$

水素細細について、一般に、高酸素分圧になると増殖が阻害されることがいわれている⁸。本菌株についても同様に阻害が現われた。そこで、この阻害様式を定式化すると、非拮抗型基質阻害の式で表わすことができた。

一般に、溶存炭酸ガス濃度と重炭酸イオン濃度は、pH 変化に依存し、Henderson-Hasselbach の式によって表わされる。この式により溶存炭酸ガス濃度および重炭酸イオン濃度を求めた。溶存炭酸ガス濃度と重炭酸イオン濃度の総和と比増殖速度を Lineweaver-Burk プロットを行なうと直線関係が得られた。飽和定数は、 4.0×10^{-4} M であった。次に、炭酸ガスに対する菌体収率を求めると、24.0g-cell/mol であった。

以上の結果より、水素細菌によるガス状基質資化のモデル式として、(1)-(4)式を実験的に得た。

$$\mu = \mu_m \left(\frac{a}{K_{SA} + a} \right) \left(\frac{b}{K_{SB} + b} \right) \left[\frac{1}{1 + \frac{U_f(b-b_i)}{K_i}} \right] \left[\frac{(C_1 + C_2)}{K_{SC} + (C_1 + C_2)} \right] \quad (1)$$

$$\nu_A = m_A + \frac{\mu}{Y_{GA}} \quad (2)$$

$$\nu_B = m + \frac{\mu}{Y_{GB}} \quad (3)$$

$$\nu_C = \frac{\mu}{Y_{GC}} \quad (4)$$

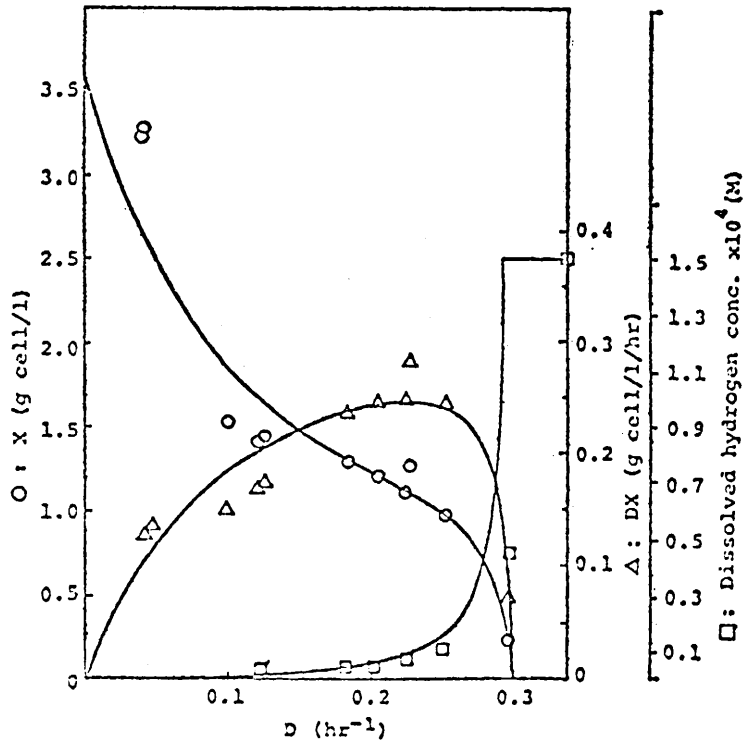


Fig. 6. Profiles of continuous culture under limiting condition of H₂

第5章 モデル式の妥当性および菌体生産性の最適化

水素制限下において連続培養を行なった実験結果と計算結果を Fig. 6 に示した。モデル式(1)-(4)と物質収支ならびに設定条件などの(5)-(13)式を使い、補間法により数値計算を行なった。計算値と実験値を比較すると、Fig. 6 に示されるようによく一致した。

$$\frac{dx}{dt} = \mu X - DX \quad (5)$$

$$\frac{da}{dt} = (K_L a)_A (a^* - a) - \nu_A X - Da \quad (6)$$

$$\frac{db}{dt} = (K_L a)_B (b^* - b) - \nu_B X - Db \quad (7)$$

$$\frac{dc}{dt} = (K_L a)_C (C_1^* - C_1) - \nu_C X - D(c_1 + c_2) \quad (8)$$

$$c_2/c_3=K \quad (9)$$

$$(K_L a)_A = (V_{mB}/V_{mA})^{0.6}(K_L a)_B \quad (10)$$

$$(K_L a)_C = V_{mB}/V_{mC})^{0.6}(K_L a)_B \quad (11)$$

(V_m : Molecular volume of solute at the normal boiling point)

$$a^* = P_A \alpha, \quad b^* = P_B \beta, \quad c_1^* = P_C \gamma \quad (12)$$

(α, β, γ : Bunsen absorption coefficient)

$$P_A + P_B + P_C = 1, \quad R1 = \frac{P_A}{P_B}, \quad R2 = \frac{P_C}{P_B} \quad (13)$$

次に、同様にモデル式を使い、菌体生産性(DX; 単位容積・単位時間当りの菌体生産量)の最適化を行なった。すなわち、最大菌体生産性を得るD, R1, R2を求めたところ、Fig. 7に示されるように、 $D=0.21 \text{ hr}^{-1}$, $R1=2.25$, $R2=0.09$ ($\text{H}_2 : \text{CO}_2 = 67.4 : 29.9 : 2.7$)で最大の生産性が得られることがわかった。

得られた最適条件を参考にして、実際に実験を行なったところ、実験値と計算値は、ほぼ一致した。しかし、Fig. 8に示されるように、R1の大きいガス比すなわち、酸素分圧の低いガス比において、計算値より高い生産性が得られた。但し、曲線(A)が計算結果である。この実験値との不一致につ

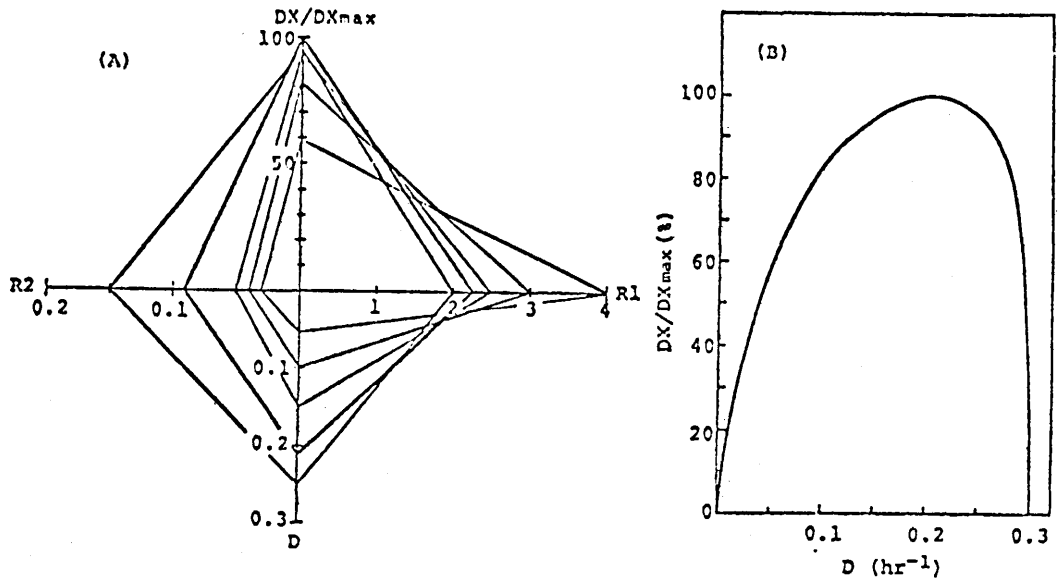


Fig. 7. R1, R2 and D of maximum productivity

いて種々検討を行なったところ、酸素に対する収率を増加させて計算を行なうと、曲線(B) --(E) が得られ、実験値とよく一致した。そこで、実験的に連続培養を行ない、3基質ガスのみかけの収率を調べたところ、Fig. 9に示されるように、酸素に対するみかけの収率が増加することがわかった。従って、混合ガス比の変化に伴う酸素に対するみかけの収率の変化が、主要因だと思われる。

記号

μ : 比増殖速度

μ_m : 最大比増殖速度

a : 溶存水素濃度

b : 溶存酸素濃度

b_i : 阻害のかけ始める溶存酸素濃度

c_1 : 溶存炭酸ガス濃度

c_2 : 重炭酸イオン濃度

K_{SA} : 水素に対する飽和定数

K_{SB} : 酸素に対する飽和定数

K_i : 酸素阻害定数

U_f : $b > b_i$ のとき $U_f = 1$, $b \leq b_i$ のとき $U_f = 0$

K_{SC} : 溶存炭酸ガスと重炭酸イオンに対するみかけの飽和定数

ν_A : 水素に対する比消費速度

m_A : 水素に対する維持代謝定数

Y_{GA} : 水素に対する増殖収率定数

ν_B : 酸素に対する維持代謝定数

m_B : 酸素に対する維持代謝定数

Y_{GB} : 酸素に対する増殖収率定数

ν_C : 炭素源に対する比消費速度

Y_{GC} : 炭素源に対する増殖収率定数

K : Henderson-Hasselbach の式において、pH一定の場合の溶存炭酸ガス濃度と重炭酸イオン濃度の割合

$(K_L\alpha)_A$: 水素移動容量係数

$(K_L\alpha)_B$: 酸素移動容量係数

$(K_L\alpha)_C$: 炭酸ガス移動容量係数

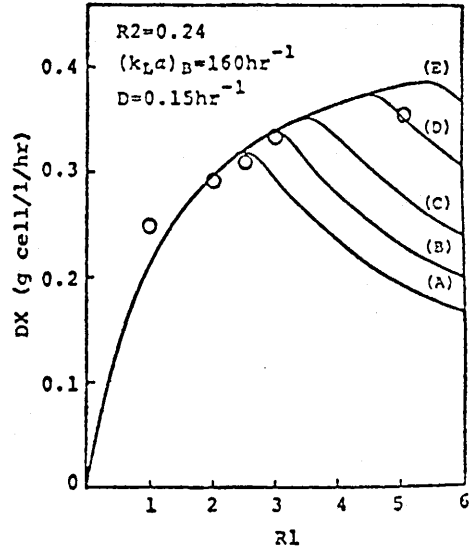


Fig. 8. Model fitness to the experimental data of relationship between biomass productivity and R1
 (A) : $Y_{GB} = 7.4$, (B) : $Y_{GB} = 9.0$,
 (C) : $Y_{GB} = 11.1$, (D) : $Y_{GB} = 14.8$,
 (E) : $Y_{GB} = 18.5$

P_A : 水素分圧

P_B : 酸素分圧

P_C : 炭酸ガス分圧

V_{mA} : 水素の沸点分子容

V_{mB} : 酸素の沸点分子容

V_{mC} : 炭酸ガスの沸点分子容

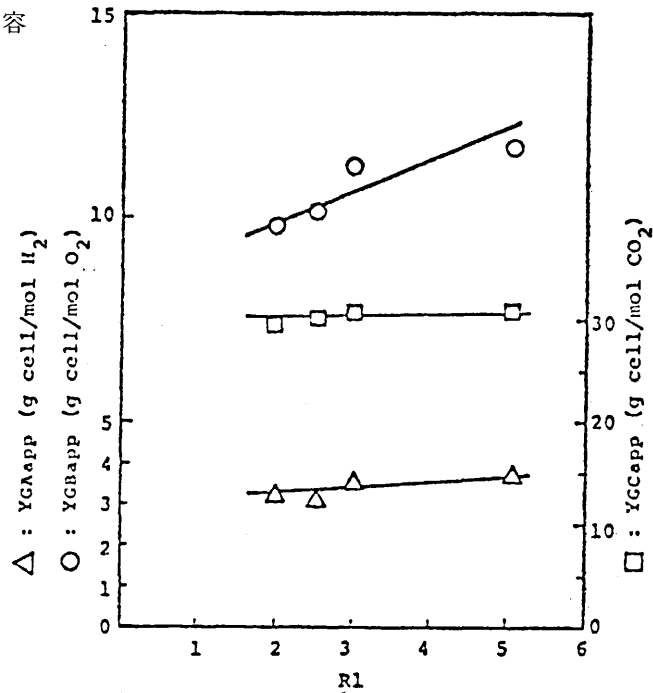


Fig. 9. Apparent yields to gaseous substrates under various gas ratios

引用文献

- 1) Y. Ooyama : *Rep. Ferment. Res. Inst.*, **39**, 41 (1971).
- 2) J. N. Gogotov, H. G. Schlegel : *Arch. Microbiol.*, **97**, 359 (1974).
- 3) Y. Morinaga, S. Yamada, A. Ishizaki, Y. Hirose : *Agri. Biol. Chem.*, **42**, 439 (1978).
- 4) E. Schuster, H. G. Schlegel : *Arch. Mikrobiol.*, **58**, 380 (1967).
- 5) E. Goto, K. Suzuki, T. Kodama, Y. Minoda : *Agri. Biol. Chem.*, **41**, 521 (1977).
- 6) J. F. Foster, J. H. Litchfield : *Biotech. Bioeng.*, **6**, 441 (1964).
- 7) T. Kodama, E. Goto, Y. Minoda : *Agri. Biol. Chem.*, **40**, 2373 (1976).
- 8) H. G. Schlegel, H. Kaltwasser, G. Gottschalk : *Arch. Mikrobiol.*, **38**, 209 (1961).

論文の審査結果の要旨

将来予想される食糧不足、特に蛋白資源の不足の対策の一つとして微生物の細胞蛋白、SCP (Single Cell Protein) の開発が世界的に検討されているが、その炭素源は人間の食糧と競合しない炭化水素が注目され、n-パラフィンを初めとしてメタノール、メタンのような低分子が用いられているが、炭酸ガスを唯一の炭素源とし、水素をエネルギー源とする水素細菌も将来の水素の大量生産より有望視されている。この研究では先ず生理学的、形態学的性質より新種と考えられる水素細菌を見出し、その生育条件、培養特性について調べた、さらに主要な基質、水素、炭酸ガス、酸素(すべて常温、常圧ではガス)の資化速度、及びそれらの濃度と増殖速度との関係を定式化した。さらにそれらのモデル式を用いて水素細菌の生産性の最適化を行なった。水素細菌によるSCPの生産の基礎を確立した本研究論文は学位論文に値するものである。