

1P-169 水素酸化細菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus* の培養特性と独立栄養代謝活性の解析

○飯塚 久美子¹, 石井 正治², 西原 宏史¹
 (¹茨城大農・資生科, ²東大院・農生科・応生工)
 hiro@mx.ibaraki.ac.jp

水素酸化細菌の特徴である高活性の水素酸化系と炭酸固定系は、環境技術開発への利用が考えられる重要な機能である。*Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1 株は生育至適温度が 50℃ 付近にある好熱性菌であり、独立栄養条件下での倍加時間は約 60 分と速い増殖速度を有する。本研究では、本菌を有用物質生産へ利用するための基盤情報として、各種条件下（独立栄養・従属栄養・混合栄養）での増殖と独立栄養代謝活性について解析することを試みた。独立栄養条件下では完全無機培地（気相／H₂:O₂:CO₂ = 75:15:10）、従属栄養条件下では数種類の複合培地と上記無機培地に有機物を添加した合成培地を使用した。水素酸化系は細胞膜に存在し ATP 生成に関与する膜結合型ヒドロゲナーゼと可溶性の NAD 還元型ヒドロゲナーゼについて、それぞれ水素に依存したベンジルピオローゲンおよび NAD の還元を指標として活性を測定した。炭酸固定系活性は、カルビン回路初期反応酵素であるリプロース-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼの共役による炭酸ガスに依存した NADH 酸化活性を測定した。ヒドロゲナーゼ活性は従属栄養条件下でも高レベルで発現している場合が見られ、合成培地でその傾向が顕著であった。一方、従属栄養条件下での炭酸固定系活性は低いレベルに抑えられていたが、混合栄養条件下で高くなる場合が見られた。

Analysis of growth characteristics and autotrophic activities of a hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenophilus thermoluteolus*

○Kumiko Iitsuka¹, Masaharu Ishii², Hirofumi Nishihara¹
 (¹Dept. Bioresour. Sci., Coll. Agric., Ibaraki Univ., ²Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo)

Key words hydrogen-oxidizing bacteria, hydrogenase, CO₂ fixation, *Hydrogenophilus thermoluteolus*

1P-171 電気化学培養による *Ralstonia eutropha* のポリヒドロキシ酪酸生産性の向上

○西尾 晃一¹, 木元 裕紀¹, 加藤 創一郎^{2,3,4}, 中西 周次⁴, 橋本 和仁^{1,4}
 (¹東大院・工・応化, ²北大院・農・応生科, ³産総研・生物プロセス, ⁴東大・先端研)
 hashimoto@light.t.u-tokyo.ac.jp

電気化学培養は、細胞外電子移動（電極から細胞への電子注入、あるいは細胞から電極へ電子排出）を電気化学的に制御し、微生物代謝の促進や制御を図る培養法である。電気化学培養において、電極電位は微生物体内の酸化還元雰囲気にも多大な影響を与える因子であり、実際に細胞内代謝が電極電位により制御できることがこれまでに見出されている。本研究では、この知見をバイオプラスチック原料となるポリヒドロキシ酪酸 (PHB) の生産性の向上に応用することを目指し、代表的な PHB 生産菌である *Ralstonia eutropha* の電気化学培養を検討した。具体的には、PHB 生産時における細胞内の redox imbalance を細胞外電子移動により解消し、これによる PHB 生産性の向上を試みた。実験においては、三電極電気化学系を使用し、作用極側の培養槽に生体親和型電子メディエーター PMF (1) (酸化還元電位: +0.5 V) と *Ralstonia* を添加し培養した。作用極の電極電位は、+0.6 V または開放電位 (~ +0.3 V) とした。その結果、+0.6 V 印加時は、開放電位の時に比べ、PHB 生産性が 60% 増加した。また、PHB 生産と細胞外電子移動に基づく電流が同期することが確認された。これは、PMF が細胞内の余剰の NADH から間接的に電子を受け取り、電極へと伝達したと考えられ、これにより PHB 生産量が向上したと考えられる。

(1) Nishio et al., *ChemPhysChem*, 2013, in-press

Enhancement of Bioplastic Productivity of *Ralstonia eutropha* by Electrochemical Cultivation

○Koichi Nishio¹, Yuki Kimoto¹, Souichiro Kato^{2,3,4}, Shuji Nakanishi⁴, Kazuhito Hashimoto^{1,4}
 (¹Dept. Appl. Chem., Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo, ²Div. Appl. Biosci., Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ., ³BRI. AIST, ⁴RCast, Univ. Tokyo)

Key words poly(3-hydroxybutyrate), electrochemical cultivation, *Ralstonia eutropha*, extracellular electron transfer

1P-170 乳酸菌存在下における *Megasphaera elsdenii* の水素発酵能の評価

○村山 蘭, 長谷川 裕士, 阿部 新子, 板東 由起子, 大西 章博, 藤本 尚志, 鈴木 昌治
 (東農大・応生科・醸造)
 a1ohnish@nodai.ac.jp

水素発酵法はバイオ水素生産の有効な手法であり、*Clostridium* 属はグルコースなどの糖類から高収率で水素を生産することが知られている。しかし水素発酵法の実用化にはシステムへの雑菌の混入が問題とされており、特に乳酸菌は水素発酵能の停止を招くことが報告されている。このため、基質や植種の熱処理が水素発酵法の安定化技術として用いられているが、熱処理によるエネルギー投入は水素発酵で得られる水素の燃料としての価値を低下させる主因である。我々はこの改善手段として、乳酸を原料として水素発酵可能な *Megasphaera elsdenii* を利用した簡便で安定した水素発酵システムモデルを提案した。本報では、乳酸菌の共存下における *M. elsdenii* の水素生産能について評価した結果を報告する。

乳酸菌共存下における *M. elsdenii* もしくは *Clostridium butyricum* の水素発酵能を回分実験により評価した。乳酸菌と水素発酵菌を同時に接種した混合培養実験では、*C. butyricum* の水素発酵能は著しく低下したのに対し、*M. elsdenii* は安定した水素発酵能を示すことが確認された。また、乳酸菌の培養物に水素発酵菌を添加した場合においても、*M. elsdenii* の水素発酵能は *C. butyricum* に比べて高い値を示し、最大で 1.46 mol-H₂/mol-hexose の収率で水素を得ることができた。このように、*M. elsdenii* は乳酸菌の存在下や乳酸発酵物から安定して水素を生産可能であることから、維持管理の容易な新たな水素発酵システムに繋がる可能性が考えられた。

Evaluation of hydrogen productivity of *Megasphaera elsdenii* cultivated with lactic acid bacteria

○Ran Murayama, Yuji Hasegawa, Shinko Abe, Yukiko Bando, Akihiro Ohnishi, Naoshi Fujimoto, Masaharu Suzuki
 (Dept. Ferment. Sci., Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric.)

Key words *Megasphaera elsdenii*, hydrogen, lactic acid, lactic acid bacteria

1P-172 *Clostridium acetobutylicum* の二相式電気培養によるブタノール生産性の向上

○平野 伸一, 松本 伯夫, 大村 直也
 (電中研)
 s-hirano@criei.denken.or.jp

【背景・目的】我々のグループでは電極反応によって代謝における電子の流れを人為的に変化させ、代謝を制御する「電気培養法」の開発を進めている。これまでに、*Clostridium acetobutylicum* のブタノール発酵に対して電気培養法を適用し、電極から電子を供給することで、ブタノール生産量が約 3 倍向上される現象を見出している。一方、*C. acetobutylicum* の代謝は産物であるブタノールによって阻害を受けるため生産性の向上に限界があることが課題となっている。そこで、本研究では培養液中のブタノールを有機溶媒によって抽出する二相式培養法と電気培養法を組み合わせることによって、さらなるブタノール生産性の向上を目的とした。

【方法・結果】オレイルアルコールを抽出溶媒として選定し、二相式電気培養槽を試作した。この培養槽に基質としてグルコースを 100g/L 含む TYA 培地を加え、作用極に -0.7V (vs Ag/AgCl) を印加することで電極から電子を供給しながら *C. acetobutylicum* の電気培養を実施した。植菌源としては定常期に達した高密度菌体を用いた。経時的にグルコース、ブタノールを含む代謝産物の測定を行い、ブタノール抽出および電気培養の効果を評価した結果、オレイルアルコールを添加した二相式培養法の採用により、グルコース消費の大きな促進が見られ、その消費速度は最大で 1.7 倍となった。また、通常の培養法と比べ、オレイルアルコールの添加によりブタノール生産量は約 2 倍、通電によってさらに 2.5 倍向上した。以上、電気培養による代謝制御とブタノール抽出の相乗効果により顕著にブタノール生産の向上に成功した。

Increase of butanol production of *Clostridium acetobutylicum* by combination of electrochemical cultivation and butanol extraction method.

○Hirano Shin-ichi, Matsumoto Norio, Ohmura Naoya
 (CRIEPI)

Key words *Clostridium*, butanol, electrochemical cultivation, metabolic shift