

II-471 メタン生成菌によるギ酸の代謝反応と補酵素F 420 の関係

大成建設（株）生物工学研究所 正会員○帆秋利洋 友沢孝

1. はじめに

メタン醗酵は、反応に関与する異種微生物間での基質の逐次連鎖反応によって成立している。これらの最終段階では、水素資化性あるいは酢酸資化性メタン菌が関与するわけであるが、安定した処理性能を得るには、系内の水素分圧を低く保つ必要がある。従って水素資化性メタン菌は、全体プロセスの制御に欠かせない存在である。またこれらのメタン菌には、水素ヒドロゲナーゼやギ酸デヒドロゲナーゼの補因子として電子運搬体の役割をはたす補酵素F 420 という物質が存在する。F 420 は、水素やギ酸の酸化により得られた電子をメチル化反応に供給するための運搬体として機能するものと考えられる。従ってこれらの反応では、F 420 の量あるいは活性度が反応速度を支配することが推察される。

本研究は、このF 420 のギ酸の代謝反応へのかかわりについて検討したものである。

2. 実験方法

供試菌体は、ギ酸を単一炭素源とした培地¹⁾で、ジャーファーマンターを用いて約半年間、集積培養したものを使用した。実験は、125mL バイアルを用いたバッチ実験により評価した。まず、ギ酸の代謝特性とF 420 の挙動に着目した実験を実施した。この実験条件を表-1に示す。次に、ギ酸の代謝反応とF 420 の関係について、Michaelis-Menten式に応用するための実験を行った。これは、菌体中のF 420 含有量と基質濃度を変えた10ケースの条件を設定した。この実験条件を表-2に示す。

双方の実験とも、同一操作のもとで実施した。菌体は嫌気条件下で、0.1Mリン酸緩衝液で洗浄した後、嫌気性グローブボックス内で、菌体と希釈用ミネラル類の設定量を個々のバイアルに調整した。その後、35℃にセットした恒温水槽に設置し120rpm, 3.5cmで振盪培養した。希釈用ミネラルおよびビタミン類の組成は、メタン菌の分離操作マニュアル¹⁾を参考にした。なおpHの変動を抑えるため、これらのミネラル類には、100mMのリン酸バッファーを添加した。調整した基質は300℃の還元銅カラムを通したN₂+CO₂(80:20)ガスで溶存ガスを十分に置換し、指示薬（レサズリン）で還元状態を確認した上で、個々のバイアルにシリンジを通じて分注し、以降経時的にサンプリングした。サンプリングした混合液は、氷冷後ただちに各分析のための前処理を施した。

分析は以下の方法に従った。ギ酸濃度は0.45μmのメンブランフィルターろ過液を液クロマトグラフ（UV210nm）を用いて定量し、F 420 蛍光強度は、J. Dolfing らの方法²⁾により処理した細胞抽出液を蛍光分光光度計（EX; 424nm, EM; 466nm）のピーク高さから求めた。顕微鏡写真は、落射蛍光装置付万能顕微鏡（励起フィルター380～425nm, 吸収フィルター450nm）により撮影した。その他の分析

表-1 実験条件（その1）

Comp. \ No.	Control	No. 1
Cell	10	30
Mineral + Vitamin	50	20
HCOONa 10mM + Yeast Ext. 10mg/g	0	10

単位はmL

表-2 実験条件（その2）

Comp. \ No.	Control	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Cell	10	10	10	10	20	20	20	30	30	5
Mineral		41	47	49	5	36	38	5	25	54.5
Substrate	0	9	3	1	35	4	2	25	5	0.9

単位はmL

Substrate 組成 HCOONa 45mM
Yeast Extract 40mg/g

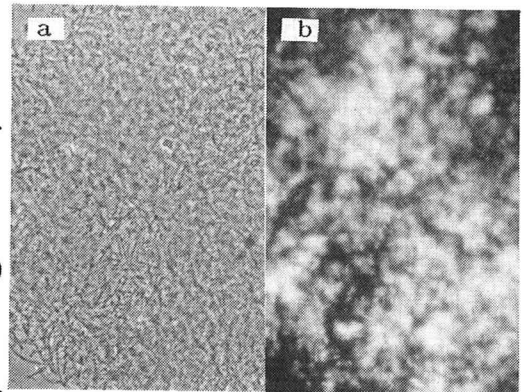


写真-1 供試菌体の顕微鏡像（×200）

a; 位相差、b; 蛍光

は、下水試験方法に従った。

3. 実験結果と考察

写真-1に、供試菌体の顕微鏡写真を示す。F 420 は420nm付近の波長で励起すると、青白い蛍光を発する特性をもつ。従って、メタン菌であるか否かは蛍光顕微鏡による観察で容易に判別できる。本実験に供した菌体は、集積培養したものであるため、硫酸還元菌との共生が懸念されたが、実験に供したギ酸培養菌のほとんどがメタン菌であることが、蛍光写真よりわかる。

図-1は、ギ酸の代謝反応におよぼすF 420の挙動について、これらの経時変化を示したものである。実験結果より、基質が存在する場合（No.1; 0.41g-Formic acid/g-VSS）は、メタン生成反応に伴ってF 420が増加し、また、基質が存在しない場合（Control）は、培養時間とともにF 420が減少していることがわかる。この実験から、ギ酸もしくは水素の酸化反応に伴って、F 420が増加する傾向があるものと推察された。

次に、菌体内F 420含有量とギ酸消費速度との関係を酵素反応でよく使われるMichaelis-Menten式に応用し、代謝にかかわるF 420の重要性について検討した。図-2はこの実験における菌体濃度とF 420蛍光強度の関係をまとめたものである。両者の間には、高い相関（0.953）があることがわかる。図-3は、比基質消費速度（V）と基質濃度（S）の関係をまとめたものである。Michaelis-Menten式は、

$$V = V_m \cdot S / (K_m + S)$$

で表現できる。ここでV_mは最大比基質消費速度、K_mは基質の飽和定数である。本実験では比基質消費速度の算出に際して、ひとつは一般的手法の生物量当たりとして、そしてもうひとつはF 420蛍光強度当たりとして各々について解析した。これらの結果より、両者は同様の双曲線状のカーブを描いていることがわかる。つまりF 420は、ギ酸あるいは水素+二酸化炭素からのメタン生成反応を支配する補酵素と考えられる。

今回の一連の実験結果より、水素分圧の抑制を担う水素酸化性菌の活性向上化には、F 420が直接的に関与していることが推察された。ただし、本実験より求めた基質の飽和定数（図-3参照）からわかるように、供試菌体の活性はかなり低いものである。そこで今後純粋な菌を用いて同様の実験を行うとともに、実プロセスにおける水素分圧抑制の可能性についてさらに詳細に検討してゆく予定である。

本研究は建設省土木研究所汚泥研究室との協同研究の一環として実施したものであることを追記する。

参考文献

- 1) 山一英ら編集 微生物の分離培養 R&Dプランニング pp679～687, 1986
- 2) JAN DOLFIN, JAN-WILLEM MULDER, Comparison of Methane Production Rate and Coenzyme F420 Content of Methanogenic Consortia in Anaerobic Granular Sludge, Appl. Environ. Microbiol. May 1985, pp 1142～1145

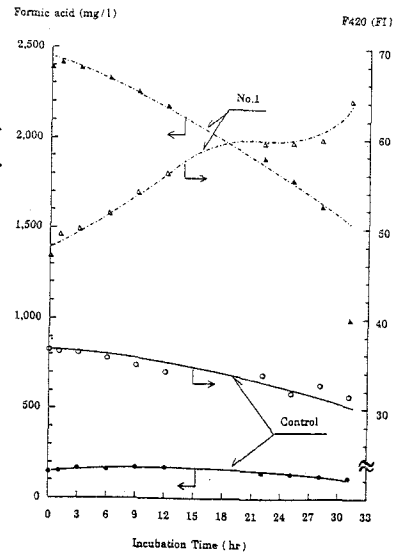


図-1 ギ酸の代謝特性とF 420の挙動

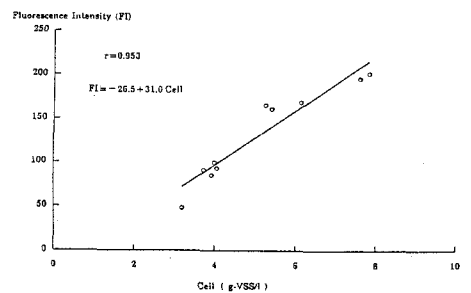


図-2 菌体濃度とF 420蛍光強度の関係

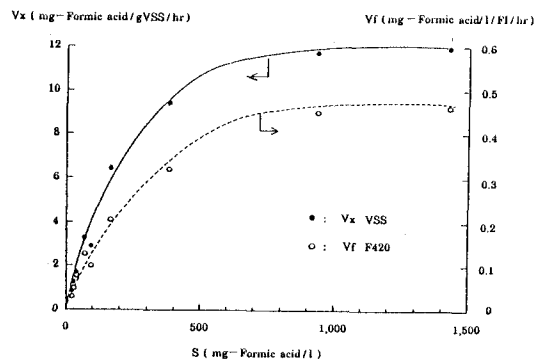


図-3 比基質消費速度と基質濃度の関係