

## 耐熱性酢酸菌を使った酸化発酵による有用物質生産系の開発

外山 博英<sup>1\*</sup>・松下 一信<sup>2</sup>

酵母や酢酸菌など、現在の発酵産業で利用されている一般的な有用発酵微生物は、生育や物質生産に比較的低温を好み、また生育や生産の限界温度を超えてしまうと生産系が壊滅的なダメージを受けてしまうことから、発酵生産の温度制御が非常に重要となっている。好熱性細菌や超好熱性細菌の生産する熱に強い酵素は産業的に利用されてきているが、もともと酵母や酢酸菌とは異なり発酵生産能力をもたないこれらの好熱菌の中から現在発酵産業で利用されている微生物のような発酵物質生産に有用な形質を持つ微生物を見つけることは困難である。加えて、発酵生産を60°Cや80°Cで行うことはエネルギー的にも無理がある。そこで、常温性の発酵微生物が高い温度に適応した微生物を、自然界から分離するか、もしくは遺伝子工学的に開発することが合理的と考えられる。その開発が可能となれば、冷却コスト削減と二酸化炭素排出量削減とともに、熱帯地域や亜熱帯地域での発酵産業の育成振興にも結びつくと期待される。

こうした考えに基づき、魚に“熱帯魚”がいるように、微生物にも生育温度の上限が高い“熱帯微生物”が存在するのではないかと考えスクリーニングしたところ、実際にタイから多くの“熱帯酢酸菌”が分離できた<sup>1,2)</sup>。この成果を基にして、他の有用微生物について同様な性質を持つ菌株を探索する事業として、JSPS-NRCT拠点大学事業「微生物の生化学的研究」(1998～2007年度)が実施された。日-タイの多くの研究者と学術および人的交流を持つことに恵まれた。その成果は酢酸菌のみにとどまらず、酵母など多くの発酵生産に有用な他の微生物での成果へと発展した<sup>3,4)</sup>。こうした、常温菌でありながら、生育至適温度が同属もしくは同種の常温菌より5～10°Cほど高い微生物を「耐熱性微生物」と呼ぶ。本稿では、耐熱性酢酸菌を利用した高温発酵系の構築の試みについて述べる。

## 酢酸菌

酢酸菌はアルコールから酢酸を生産する能力のある微生物の総称である。分類上は $\alpha$ -プロテオバクテリア綱に属する。細胞膜結合型のアルコール脱水素酵素とアルデヒド脱水素酵素を有しているが、16S rDNA塩基配列に基づいた分類では、それらの酵素を有しない微生物群

も近縁種として含まれることが明らかとなっている。また、 $\gamma$ -プロテオバクテリアの*Frateria*属が例外的にそれら2つの酵素を持っていて酢酸生産することが知られている。

食酢醸造には主に*Acetobacter*属と*Gluconacetobacter*属が用いられている。また糖や糖アルコールの酸化能力の高い菌として*Gluconobacter*属が知られており、ビタミンC生産などに工業的に利用されている。その物質生産過程は「酸化発酵」と呼ばれ、細胞質膜上のペリプラズム側に存在する特徴的な酵素による不完全酸化反応であり<sup>6)</sup>、細胞内への出発物質の取り込み過程が不要であるため、迅速で効率のよい反応である。また酢酸菌は酸化生成物を炭素源として利用しない場合が多いため、生産物が培地中に効率よく蓄積するのも特長である。しかし30°Cを超えると生育や生産性が極端に劣化するため、発酵に伴って発生する発酵熱を冷却して温度上昇を抑制しなければならない。

## 耐熱性酢酸菌

タイから分離された耐熱性酢酸菌<sup>1,2)</sup>の多くの菌株は、16S rDNA塩基配列は常温菌のものとほぼ一致していたが、生育限界温度の差は歴然としていた。たとえば、*Acetobacter pasteurianus*の常温菌は39°Cでは生育できなくなるが、耐熱菌は42°Cでも生育が可能であった<sup>7)</sup>。また、エタノールや酢酸に対する耐性も高いことが明らかとなった。さらに、耐熱性菌株を生育限界温度に近い温度で繰り返し培養すると、さらに高い温度での生育が可能となった。現在この菌株の耐熱性獲得の機構について、ゲノム配列を比較することで解析を進めているところである。また耐熱性菌株の高温感受性変異株を取得し変異箇所を解析することでも、耐熱性獲得機構の解明を進めている<sup>4)</sup>。一般的には、高温で生育可能になるためには非常に多くの酵素タンパク質が耐熱化されなければならないように思われるが、実際にはごく少数の耐熱化で高温での生育が可能になる場合があるようである。大腸菌では1つの酵素の耐熱化で44°Cまで生育可能になることが報告されている<sup>8)</sup>。また異なる微生物において、耐熱性が酸化ストレス耐性と関連していることが示されてきており、耐熱性のメカニズムが共通している可能性

\* 著者紹介 <sup>1</sup>琉球大学農学部亜熱帯生物資源科学科(教授) E-mail: toyama@agr.u-ryukyu.ac.jp

<sup>2</sup>山口大学農学部生物機能科学科(教授)

が見いだされてきた<sup>4)</sup>。メカニズムの一端でも解明されれば、現在発酵産業で利用されている発酵微生物の「耐熱化」を図ることは、意外と簡単にできるのかもしれない。

耐熱性酢酸菌を使った有用物質生産

耐熱性*Acetobacter*酢酸菌の酢酸発酵については既報を参照されたい<sup>3,4)</sup>。

タイで分離された耐熱性*Gluconobacter*酢酸菌の中から、グルコン酸を5-ケトグルコン酸(5KGA)に変換する能力が高い菌株を選抜した<sup>9)</sup>。5KGAはビタミンCや酒石酸の原料となる有用物質である。従来の5KGA高生産常温菌株は37°Cでは生育できず5KGAの生産もできなかったが、スクリーニングで得られた菌株は37°Cでも良好に生育し5KGAを生産できた(図1)。し

かし副産物である2-ケトグルコン酸(2KGA)の生産量が多かった。そこで2KGAを生産する酵素(膜結合型FAD-グルコン酸脱水素酵素)の構造遺伝子をクローニングして、相同組換えによる構造遺伝子破壊をしたところ、5KGAのみを生産させることができたが、37°Cでは変換効率が低かった(図2)。細胞質膜画分の酵素活性の解析から、原因は5KGAを生産する酵素の補欠分子族であるピロロキノリンキノン(PQQ)が解離して酵素活性が低下していたためと判明した。そこで、PQQの解離を抑制するために培地中にカルシウムイオンを添加したところ改善が見られ、変換効率は約90%にまで達した。このように高温での5KGA生産系を開発することができたり、生産された5KGAは酸性にして冷却すれば、容易に純度の高い結晶として回収することができる。

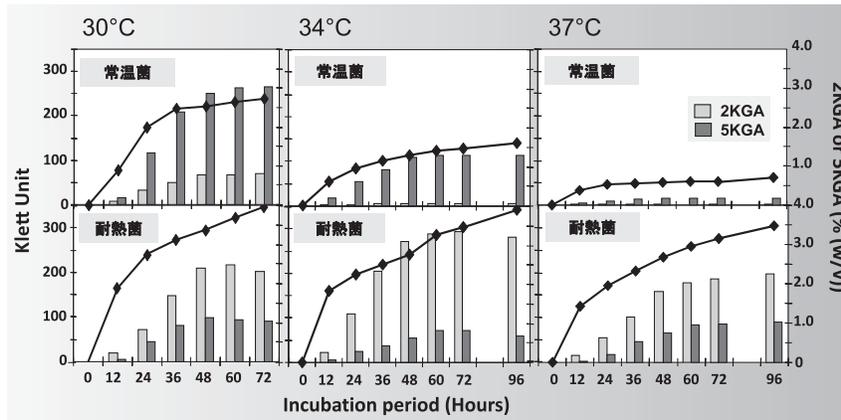


図1. 耐熱性酢酸菌の生育と5KGA生産量。常温菌は37°Cではほとんど生育できず、また5KGA生産もできない。一方、耐熱菌は37°Cでも良好に生育し5KGA生産量も30°Cと遜色ない。しかし副産物である2KGA生産量が多い。

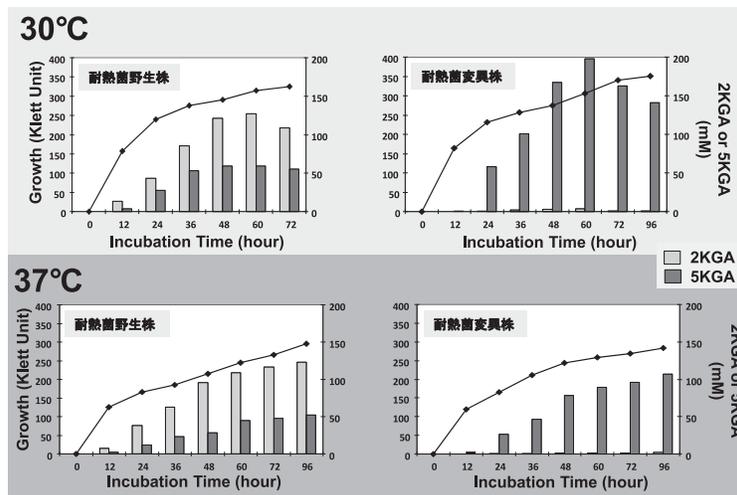


図2. 耐熱性酢酸菌のFAD-GADH欠損変異株での5KGA生産。2KGAの生産は見られなくなったが、5KGA生産量はまだ低い。

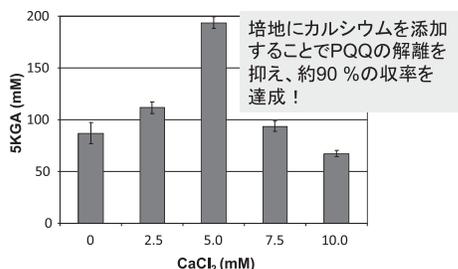


図3. 培養液へのカルシウム添加効果. 培養液中に塩化カルシウムを添加することで, 5KGA生産量は増大した.

耐熱性 *Gluconobacter* 酢酸菌を利用したソルボース発酵についても, PQQの添加で高温での生育と生産性が改善されている<sup>10)</sup>.

### おわりに

タイの研究者との共同研究の過程で, タイには醸造酢がもともとなかったことを知った. そして琉球大学に赴任して, 沖縄にも食酢醸造産業はもともとなく, 現在でも合成酢を使っているところが多いことを知った. 耐熱性酢酸菌の開発で熱帯や亜熱帯地域へ食酢醸造や酢酸菌を使ったその他の発酵産業の普及ができると考えている.

本研究成果は, JSPS-NRCT拠点大学事業 (1998年度~2007年度)を基として, また生研センター基礎研究推進事業「耐熱性発酵微生物の「耐熱性」分子機構の解明と発酵産業への利用」(2006年度~2010年度)の一環として行われたものである. また, 耐熱性酢酸菌の研究は, 山口大学名誉教授足立収生先生とタイ・カセサート大学名誉教授Napha Lotong先生 (故人)により始められ, その後多くの日本とタイの共同研究者とともに進められたものである. ここに感謝の意を表したい.

### 文 献

- 1) Saeki, A. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 138 (1997).
- 2) Moonmangmee, D. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 2306 (2000).
- 3) 松下一信: バイオサイエンスとインダストリー, **66**, 130 (2008).
- 4) 松下一信ら: 化学と生物, **46**, 472 (2008).
- 5) 赤田倫治, 星田尚司: バイオサイエンスとインダストリー, **67**, 418 (2009).
- 6) 薬師寿治, 松下一信: バイオサイエンスとインダストリー, **67**, 308 (2009).
- 7) Kanchanarach, W. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **85**, 741 (2010).
- 8) Mordukhova, E. A. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 7660 (2008).
- 9) Saichana, I. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 4240 (2009).
- 10) 服部浩美ら: 日本農芸化学会大会講演要旨集, p.241 (2011).