

好気呼吸による「発酵」を行う酢酸菌

松下 一信

酢酸菌は食酢製造やビタミンC合成のためのソルボース発酵などに関わる重要な微生物でありながら、その生態や発酵の特徴について十分に理解されているとは言えない。古くに酵母や乳酸菌と同様、パスツールによって発見され、かのBeijerinckによって同定された由緒ある微生物であり、加えて朝井勇宣先生の *Gluconobacter* の研究を始めとして多くの日本人研究者による優れた研究が酢酸菌について行われてきた。しかし、後述するように、「培養しにくい」「形質がわかりやすい」「発酵様式が違う」などの理由であろうと思われるが、国内だけでなく海外も含め、その研究者人口はあまり多くない。2008年11月に名古屋大学で開かれた第2回国際酢酸菌会議での参加者をもみても、学生を省いた研究者数で国外39名、国内39名（別途、企業製造関係者24名参加）と決して多くない。最近になって、その生態学的特徴、系統学的特徴、多様なバイオコンバージョン能の利用の視点から研究者が増加し始めているが、まだまだ多くの人に愛されていると言うにははばかりがある。ここでは、多くの研究者に、魅力的な酢酸菌の特徴を知っていただき、また興味をもっていただくために、この小文をまとめることにした。

酢酸菌は培養がむずかしいと言われているが

「酢酸菌は培養がむずかしいのでは？」と良く聞かれることがある。確かに、大腸菌やコリネ型細菌に比べ、液体培養での生育が遅かったり、寒天培地上での保存が難しいことは確かである。しかし、その培地条件や培養条件を注意すれば、特に扱いにくい菌ではない。筆者らが使用している典型的な保存培地の組成を表1に示す。ここには、酵母エキス (YE)、ペプトン、糖質に加えて、ポテトエキスが含まれている。ポテトエキスは、生育に必須のビタミン類およびアミノ酸を供給するYEを補完するものとして、飴山實先生の教唆で、自前で調製し加えている。今では、Difcoからポテトエキスを含む寒天培地も市販されている。酢酸菌の生育にとって、このポテトエキスは必ずしも必要ではなく、本培養の培地からは省かれるが、その添加は酢酸菌の生育を促進するため、特に生育の悪い菌株の場合には有効である。糖質は他の

表1. 酢酸菌の保存や培養に用いるポテト培地

(1 lに含まれる組成)
10 g of Yeast extract
10 g of Polypepton
20 g of Glycerol
5 g of Glucose
100 ml of Potato extract*
(5 g of CaCO ₃)

*調製法は文献 (K. Matsushita and M. Ameyama: *Methods in Enzymology*, Vol.89, p.149-153, ed. by W. A. Wood, Academic Press Inc., New York (1982)) を参照。

保存用平板培地には、炭酸カルシウムと寒天を加える。前培養のための液体培地には、ここから炭酸カルシウムを除いたものを使う。本培養の液体培地は、一般に、ここから炭酸カルシウムとポテトエキスを除き、酵母エキス (0.2~0.5%)、ポリペプトン (0.2~0.5%)、グリセロール (0.2~1.0%)、およびグルコース (0~0.5%) の濃度を下げて用いる。酢酸発酵では、さらに4%エタノールをそれに加える。

生物種と同様、エネルギー源と炭素源であるが、酢酸菌の場合、注意しなければならないのは、それが必ずしも同一でないことである。たとえば、*Acetobacter* 属酢酸菌ではグリセロールは炭素源としては重要であるが、あまりエネルギー源 (プロトン駆動力の生成を導く) にはならない。一方、グルコースやエタノールはエネルギー源として重要であるが、少なくとも生育初期には炭素源にならない。これは後述する酢酸菌の代謝上の特徴である。

酢酸菌の培養において特に注意しなければならないのは、このエネルギー源の代謝に関連した「通気」と「培地 pH の低下」である。酢酸菌の生育のエネルギー源は糖やアルコールの好氣的酸化に完全に依存しているため、通気量の維持が重要である。そのため、培養器の栓は、以前は綿栓を、最近では通気性の良いシリコ栓 (フラスコ用のかぶせ式シリコ栓もしくは試験管用ではバイオシリコ) を用いる。フラスコによる振とう培養でも、通常のフラスコより空気攪拌能の高いバッフル型フラスコを用いた方が酢酸菌の生育はよい。また、培地 pH に関しては、酢酸菌は酸性条件下で生育可能だと思われがちだが、pH 低下に十分に注意する必要がある。それは、酢酸菌がその生育に必要とするエネルギー源 (糖質やア

ルコールなど)の「不完全酸化」のためで、その糖やアルコールから酸が生成され、それは消費されずに蓄積されるため、培地pHは著しく低下することになる。このpHの低下は菌の生育を抑制し、長期間その状態に置かれると酢酸菌といえども死滅してしまう。そのため、保存用の寒天培地には炭酸カルシウム(0.5%)を添加して培地pHを中和する必要がある。また、グルコース存在下での *Gluconobacter* 属菌の液体培養では、その強いグルコース脱水素酵素(GDH)によるグルコン酸の生成がpHを著しく低下させるため、私達は培地中に高濃度のグルコン酸ナトリウム(2%)を加えている。

また、酢酸菌はその形質が変わりやすく、その保存が難しい。筆者らの経験でも、菌膜を生成できる菌株(粗面なRoughコロニーを形成することからR株と呼ばれる)が菌膜をつくらぬ株(滑面なSmoothコロニーを形成することからS株と呼ばれる)に変異することが容易に見られる。分離されたR株は振とう培養を繰り返すと、その中から菌膜形成能を失ったS株が現われ、逆に分離されたS株で静置培養を繰り返すと再びR株が現れる。このRS変換ほど頻繁でないにしても、保存中に2,5-ジケトグルコン酸由来の色素生成能、5-ケトグルコン酸生成能、さらに5-ケトフルクトース生成能の消失などを経験している。こうした酢酸菌の「易変異性」は古くからよく知られていて、*Gluconacetobacter xylinus*のセルロース生成能の消失を始め、酢酸発酵に必須の酢酸生成能や酢酸耐性能など多くの重要な形質が消失することが知られている。最近のゲノム解析から、酢酸菌ゲノムには高濃度のトランスポゾンや変異しやすい「繰り返し配列」いわゆるマイクロサテライトも多く存在することがわかった。加えて、比較的多くのプラスミドも存在していて、これらが酢酸菌の遺伝学的不安性と関係していると考えられている¹⁾。そのため、このような変異の蓄積を防ぐためにも、できるだけグリセロールでの冷凍保存が必要である。筆者らは比較的高濃度のグリセロール(50%)中での-80°C保存を行っている。

しかしながら、この易変異性は酢酸菌の速やかな適応進化能と密接に関連していて、後述するように競合的な微生物フローラでの生き残りに有利に働くと考えられる。筆者らは熱帯環境のタイからその環境(温度)に自然適応した多くの「耐熱性」酢酸菌を分離することができた。さらに、この易変異性を利用して、実験室での適応進化に基づく高温発酵株の育種も行っている²⁾。

酢酸菌は華やかな世界に棲む気難しい利己主義者

酢酸菌は、花や果実に、さらにそれらが酸敗した果実

酒などに好んで生息する。酢酸菌はこれらの花・果実の中に多く存在する糖や糖アルコール、さらには果実酒の中のアルコールなどを利用して生育している。酢酸菌は、バクテリア系統樹の上流に位置するアルファプロテオバクテリアに属していて、その近縁種には動・植物と共生もしくは寄生関係にあるものが多い。そのためか、花や果実や果実酒を主食とするショウジョウバエやミツバチなどの腸内に、多くの酢酸菌が定着していることが最近見つかっている。このような高濃度の糖や糖アルコールの存在する環境では競争者が多く、酢酸菌はカビ・酵母・乳酸菌・*Xanthomonas*・*Ralstonia*など多くの微生物と競合しながら生息している。また、花・果実などから派生する多くの自然発酵食品において、特に酵母や乳酸菌と酢酸菌は共存している³⁾。たとえば、黒酢の発酵系では*Acetobacter pasteurianus*が、チョコレート生産のためのカカオの発酵では*A. pasteurianus*や*Acetobacter aceti*が、カスピ海ヨーグルトでは*Acetobacter orientalis*が、コンブチャ(Kombucha:日本では紅茶キノコと呼ばれていた)ではセルロース生成能を有する*G. xylinus*が、酵母や乳酸菌と共存してその発酵に関与している。

酢酸菌は、後述する「酸化発酵」によって、高濃度の糖やアルコールをさまざまな糖酸・有機酸に変換し培地中に高濃度に蓄積する特徴的な能力をもっている。加えて、一定時間後に、菌株もしくはその生成物によってその時間はまちまちではあるが、生成・蓄積された酸化生成物を資化・利用する能力を持っている。そのため、図1に示すような二段階生育を行う。このように、酢酸菌は糖やアルコールをより利用しにくい糖酸へ急速に変換し、低pH環境の形成と有機酸の蓄積をもたらすことで、

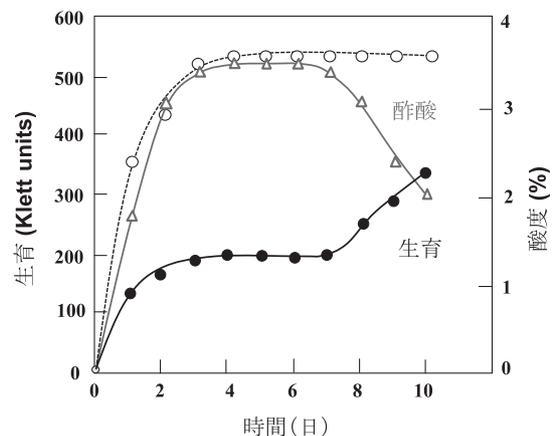


図1. 酢酸発酵にみられる二段階生育. *A. pasteurianus* SKU1108を4%エタノールで培養した場合の生育(●)と酢酸生成(△). PQQ-ADHの欠損株を同じ培地で培養した場合の生育(○), この場合は酢酸はまったく生成されない。

他の微生物に対して排他的な環境をつくっている⁴⁾。酢酸菌の生産する有機酸の中でも、酢酸は他の微生物にとって特に有害である。酢酸は低pH下では非解離型(CH₃COOH)になり、その疎水的性質のために細胞質膜を比較的自由に透過して細胞内に流入することができる(1秒間に1万分子以上の酢酸が膜を透過できる)。細胞内は中性pHに維持されているため、流入した酢酸は速やかに解離型(CH₃COO⁻)になり水素イオン(H⁺)を遊離し、細胞内pHを低下させる。このような作用のため、ほとんどの微生物は0.2~0.5%以上の酢酸存在下で生育することはできない。それ故、酢酸菌は高濃度(4%以上)の酢酸菌に耐えるための特異的なシステムを有している。その全容はまだ十分に解明されていないが、多大なエネルギーを必要とする酢酸排出系が酢酸菌細胞質膜で機能している³⁾。そのため、酸化発酵を行う酢酸菌は、その排他的な生育環境を形成・維持するために、自身の生育を犠牲にしていることになる。このように、酢酸菌は高濃度の糖質やアルコールの存在する「栄養豊富な」競合的環境の中で、「利己的」でありながら、自身も「スローな生活」を行う生存戦略をもっていると考えることができる。

好気呼吸による発酵, 「酸化発酵」

このような高濃度の糖質やアルコールを高速で酸化して、その酸化生成物を蓄積する酢酸菌の反応は、一般的な「発酵」と異なり、その細胞膜の外表面に結合した酸化還元酵素に依存する反応である。これらの酸化還元酵素は、基質酸化によって引き抜いた電子を呼吸鎖に伝達し、その末端で機能するチトクロム・オキシダーゼ(酢酸菌では、ユビキノール・オキシダーゼ)を介して酸素を水に還元することで反応は完結している。この酢酸菌の呼吸反応は、一般の好気細菌で行われている、基質をCO₂までに完全酸化する呼吸と異なり、部分酸化生成物(たとえば、酢酸, グルコン酸, ソルボースなど)を培地中に蓄積する「発酵」のような「不完全酸化」を行う。そのため、「酸化発酵」と呼ばれている(図2)。

しかしながら、エタノールの酸化反応である「酢酸発酵」の場合、長い間、細胞質に存在するNAD(P)依存性アルコール脱水素酵素(ADH)とアルデヒド脱水素酵素(ALDH)によって行なわれると間違っ認識されてきた。筆者らは、1980年代初頭にはこの反応は細胞膜外表面に存在するPQQ(ピロロキノリンキノン)依存性酵素によって行なわれることを明らかにしていた⁵⁾。それにもかかわらず、筆者が微生物学の授業に使っている「Brock Biology of Microorganisms」においても、筆

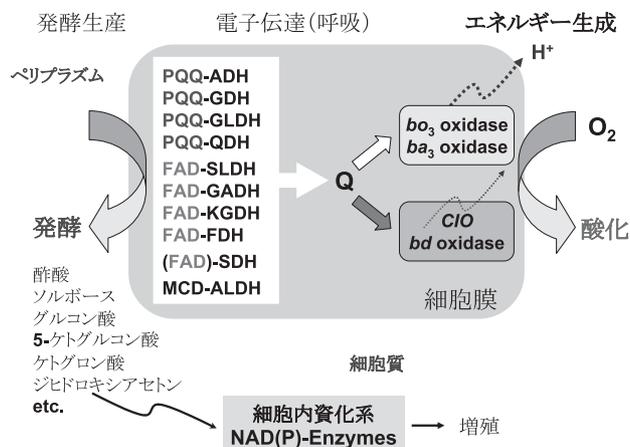


図2. 酢酸菌の「酸化発酵」に関与する酸化還元酵素とその好気呼吸鎖。キノプロテイン(QDH:キナ酸脱水素酵素; ADH, GDH, GLDHの略称は本文に示す), フラボプロテイン(SLDH:ソルビトール脱水素酵素, GADH:グルコン酸脱水素酵素, KGDH:2-ケトグルコン酸脱水素酵素, FDH:フルクトース脱水素酵素; SDHは本文に示す), およびALDHが細胞質膜外表面に結合して存在しユビキノン(Q)を介して、末端ユビキノール・オキシダーゼ(シアン感受性でH⁺ポンプ能をもつ酵素: Cytochrome *bo*₃ oxidase, Cytochrome *ba*₃ oxidase; シアン耐性でH⁺ポンプ能のない酵素: Cytochrome *bd* oxidase, CIO (cyanide-insensitive oxidase))に電子伝達することで機能している。

者の反論で変更される2003年(第10版)まで、NAD-ADHとNAD-ALDHがNADHを介して好気呼吸鎖とリンクしていると描かれていた。

エタノールの酸化反応は、細胞膜の表面に存在する2つの膜酵素、PQQ-ADHとMCD(モリブドプテリンシチジンジヌクレオチド)-ALDHによって行なわれる。ADHは、PQQとヘムcを持つ複合酵素で、エタノールをアセトアルデヒドへ変換する酸化還元反応を行なう。ALDHはMCDと思われる補酵素をもつ複合酵素で、アルデヒドを酸化して酢酸を生成する酸化還元酵素である。これらはともに、膜内に存在するユビキノンを介して、細胞膜に内在するユビキノール・オキシダーゼに電子伝達することで、エタノールから酢酸の生成を行なっている(図2)。この反応は、酢酸の生成と同時に、そのユビキノール・オキシダーゼの機能によって、エネルギー(プロトン駆動力)生成も行っている。もちろん、酢酸菌の細胞内にも、NAD-ADHとNADP-ALDHが存在しているが、これらの細胞内酵素の発現は酢酸発酵条件下では小さく、PQQ-ADHが欠損してエタノールが細胞内に流入するようになって初めて高発現することがわかっている⁶⁾。不思議なことに、PQQ-ADH欠損株の方が野生株に比べてエタノールでの生育ははるかに高い(図1)。すでに述べたように、酢酸菌は自身の生育を抑

えても、あえて酢酸発酵をしていることがわかる。

このように、エタノールからの酢酸生成反応は完全に酸素依存の好気呼吸であり、酸素供給が不十分であると反応が十分に進行せず、生育が抑制される。そのため、酢酸菌は静置発酵を行うと、培地表面に菌膜を張って生育するようになる。酸素は元来水に溶けにくいので、液体培地を静置すると、溶液中の菌株は必要十分量の酸素を受け取ることができなくなる。そのため、酢酸菌は菌膜多糖を生成し、それを利用して浮き上がることで培地表面に膜を張り、空気酸素と接触しやすくしている。先に述べたR株がこれである。R株を寒天培地上で植え継いでゆくと、常に空気酸素と接触しているため、菌膜生成能(多糖合成のために多大なエネルギーが必要である)を失ったS株(自然変異株)が優勢になり、R株が失われる原因になる。一方、空気酸素を積極的に巻き込むことができる振盪培養でも、酸素の溶存率はあまり高くないので、酢酸菌の培養には高速度の通気攪拌が必要である。そのため、短期間の通気の遮断でも、有害な酢酸存在下では菌の死滅が速やかに起こる。

酸化発酵に係る酸化還元酵素には 多くの有効利用の可能性がある

酢酸菌には、上述した酢酸発酵に関与するPQQ-ADHやMCD-ALDHだけでなく、その他の酸化発酵(ケトグルコン酸発酵、ソルボース発酵、ジヒドロキシアセトン発酵など)に関連して、細胞質膜外表層にさまざまな膜結合型の酸化還元酵素を有している(図2)。それらは、ALDHを例外として、PQQを補酵素とするキノプロテインとFADを補酵素とするフラボプロテインである⁷⁾。フラボプロテインはソルボースの酸化に関与するソルボース脱水素酵素(SDH)を除いて、すべてシトクロムc(3ヘムC)と複合体を形成している。

これらの酵素のうち、キノプロテインは、その特徴的な構造から立体特異性は高いが、一般に基質特異性が低く多くの基質と反応できる。その典型がグリセロール脱水素酵素(GLDH)であり、グリセロールだけでなく、R配座をもつ2級アルコールを広く基質とすることができる。そのため、GLDHは、広範の糖アルコール(アラビトール、ソルビトール、マンニトールなど)に含まれる「2級アルコール」やグルコン酸の5位の「2級アルコール」をも酸化でき、ソルボース発酵や5-ケトグ

ルコン酸発酵など多くの酸化発酵に関与している。その他のキノプロテインである酢酸菌のGDHやADHなども同様にその基質特異性の多様性から、それぞれラクトビオン酸やグリセリン酸の生産に利用できることがわかってきた。また、酢酸菌は、その存在が極めて限定的であるキノプロテインを数多く含有する唯一のバクテリアであり、*Gluconobacter oxydans*の場合、ADH、GDH、GLDH以外に機能未知のキノプロテインが4種存在している。加えて、そのゲノム中には、数多くの機能未知のフラボプロテイン・シトクロム複合体ホモログが見つかっている。このように、酢酸菌からまだまだ多くの新規な酸化反応が見つかる可能性がある。事実、酵素の特定には至っていないが、最近4-ケトアルドペントースや4-ケトペント酸を生成する酵素も酢酸菌細胞膜に見つかった。

酢酸菌の酸化発酵に絡む酸化還元酵素は、高い立体選択性・広い基質特異性・不可逆な酸化反応・高い反応速度などの特性を有している。それ故、今後種々の新規な酸化酵素が見つかり、さまざまなバイオコンバージョンに利用されると期待している。加えて、シトクロムをもつこれらのフラボプロテインやキノプロテインは電極反応性も高く、今後、バイオセンサや燃料電池への利用も期待されている⁷⁾。

酢酸菌は、酸化発酵を中心にした「発酵生理学」、植物・昆虫・発酵食品などでの「生態学」と「進化」、そして種々の新規な発酵系の開発や酵素利用など、基礎から応用にわたる多くの重要な課題が残されている。多くの人がこのような酢酸菌に興味をもっていただければ、幸いである。

文 献

- 1) Azuma, Y. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **37**, 5768 (2009).
- 2) 松下ら: 醸協, **105**, 730 (2010).
- 3) 松下一信: 地域資源活用食品加工総覧 追録6号, p.508, 農山漁村文化協会 (2009).
- 4) Matsushita, K. *et al.*: *Survival and Death in Bacteria*, p.169, Research Signpost (2005).
- 5) Matsushita, K. *et al.*: *Advances in Microbial Physiology*, Vol. 36, p.247, Academic Press (1994).
- 6) Chinnawirotpisan, P. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **96**, 564 (2003).
- 7) 葉師ら: バイオサイエンスとインダストリー, **67**, 308 (2009).