

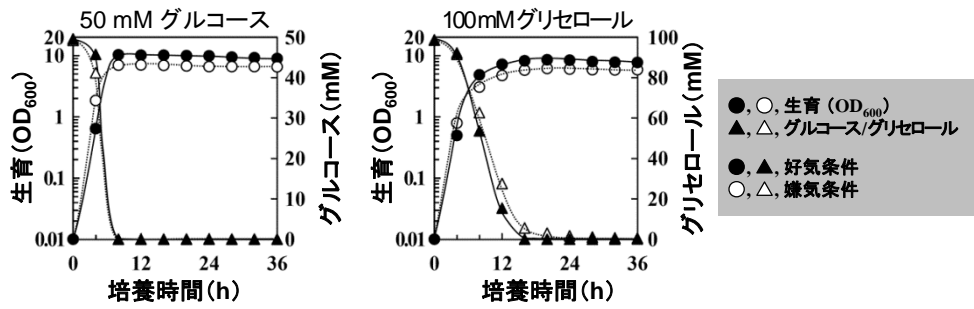
— 研究の目的 —

高濃度のグリセロールを炭素源に用いて好気培養された乳酸菌 *Enterococcus faecalis* は、その代謝産物としてアセチン、酢酸、エタノールなどをほとんど産生せず、L-乳酸のみを盛んに産生する。本課題では、この好気性乳酸発酵が発現するメカニズムを解明すると共に、それを用いてバイオディーゼル燃料の製造過程で副生される廃棄グリセロールからL-乳酸を高生産する系の構築を目的とした。

Enterococcus faecalis (エンテロкокカス フェカリス)

ラクトバシルス目に属する乳酸菌。ヒトなどの動物の腸内に常在する腸内乳酸菌としても知られている。高塩濃度・高pH・高温などに耐性を示すほか、優れたグリセロール資化性を持つ。

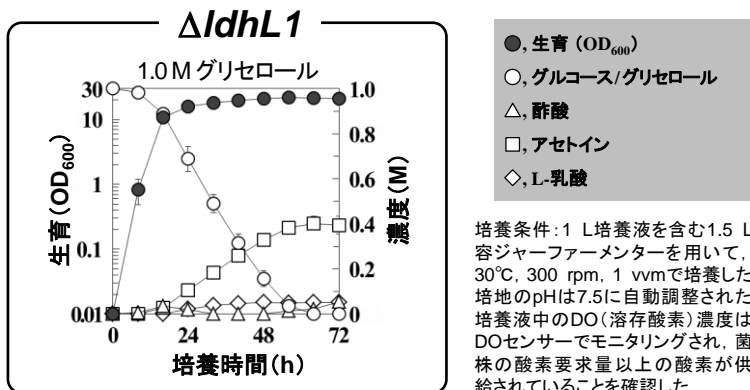
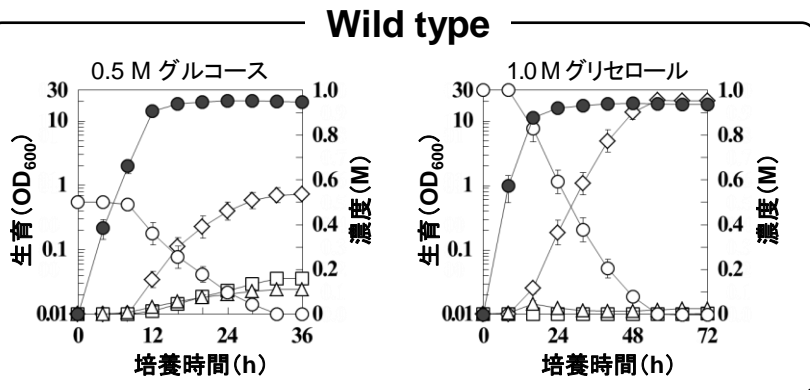
一般的な炭素源濃度下における *E. faecalis* の代謝



炭素源 (濃度)	培養環境	代謝産物 (mM)						炭素収支 (%)
		酢酸	アセチン	エタノール	ギ酸	D-乳酸	L-乳酸	
グルコース (50 mM)	好気	35.1	19.1	<0.1	0.2	0.1	18.5	92
	嫌気	<0.1	0.3	6.2	11.7	0.1	78.8	88
グリセロール (100 mM)	好気	55.0	12.9	<0.1	0.1	0.2	7.7	89
	嫌気	<0.1	0.3	61.3	62.1	0.2	33.8	96

培養条件: 100 ml 培養液を含む 500 ml フラスコを用いて、30°C、120 rpm で振盪培養した。嫌気条件下で培養を行う際は、フラスコ内の気相を窒素を用いて置換した後にゴム栓で密封した。

高濃度の炭素源濃度を添加して好気培養すると...

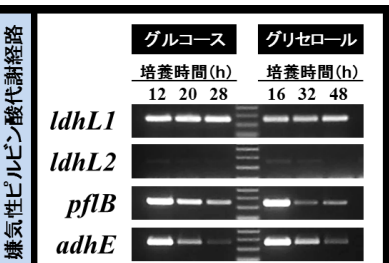
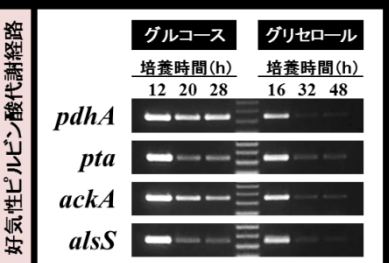


培養条件: 1 L 培養液を含む 1.5 L 容ジャーファーマンターを用いて、30°C、300 rpm、1 vvm で培養した。培地の pH は 7.5 に自動調整された。培養液中の DO (溶存酸素) 濃度は DO センサーでモニタリングされ、菌株の酸素要求量以上の酸素が供給されていることを確認した。

高濃度のグリセロールを好気代謝している *E. faecalis* では、なぜ、その代謝経路が乳酸発酵のみに限定されるのか？

酵素遺伝子の発現

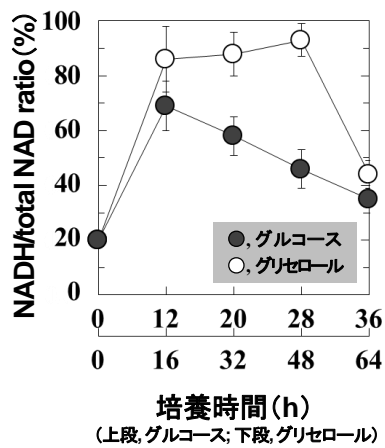
ピルビン酸から各最終代謝産物への変換を担う酵素遺伝子の発現を、逆転写-PCRを用いて解析。



各培養時間の間の転写レベルは、16S rRNA 遺伝子を用いて基準化された。遺伝子名の詳細は、右図「好気性乳酸発酵の発現メカニズム」を参照。

レドックスバランス

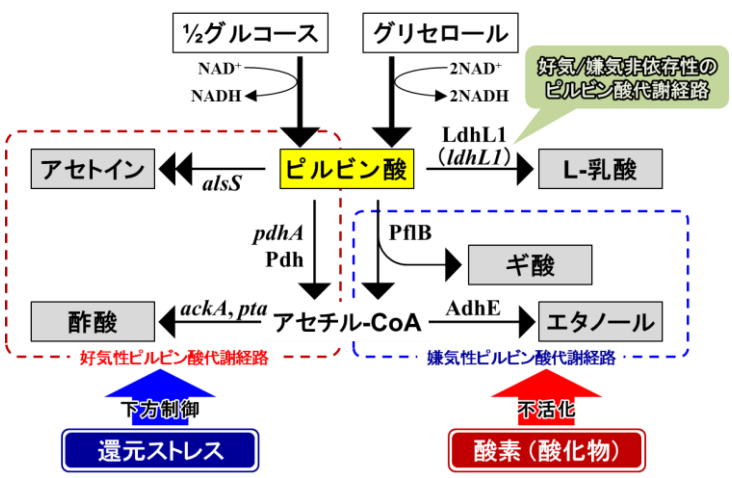
細胞内の全ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (total NAD) に対する還元型 NAD (NADH) の比を測定。



これらの結果から導かれた発現メカニズム

好気性乳酸発酵の発現メカニズム

E. faecalis の好気性乳酸発酵は、乳酸発酵 (LdhL1 反応) 以外のピルビン酸代謝経路の抑制および機能不全に起因。



<遺伝子>

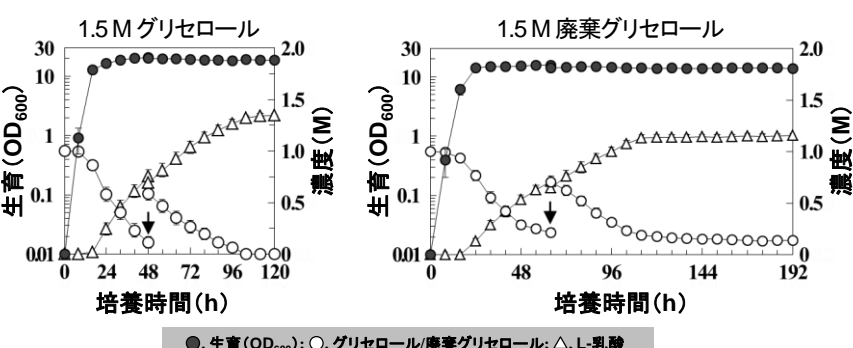
pdhA, pyruvate dehydrogenase E1α component
pta, phosphate acetyltransferase
ackA, acetate kinase
alsS, acetolactate synthase
ldhL1, L-lactate dehydrogenase 1
ldhL2, L-lactate dehydrogenase 2
pflB, pyruvate formate-lyase
adhE, acetaldehyde/alcohol dehydrogenase

<酵素>

Pdh, pyruvate dehydrogenase complex
LdhL1, L-lactate dehydrogenase 1
PflB, pyruvate formate-lyase
AdhE, acetaldehyde/alcohol dehydrogenase

■ ピルビン酸代謝経路における NAD の酸化還元反応
Pdh: ピルビン酸 + CoA + NAD⁺ → アセチル-CoA + CO₂ + NADH
LdhL: ピルビン酸 + NADH → L-乳酸 + NAD⁺
AdhE: アセチル-CoA + 2NADH → エタノール + CoA + 2NAD⁺

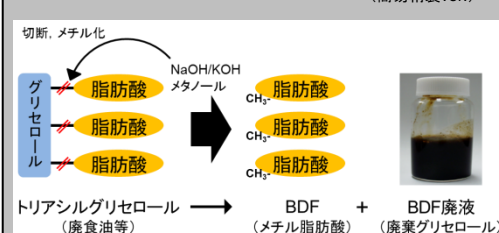
好気性乳酸発酵を利用したグリセロール/廃棄グリセロールからのL-乳酸の高生産



生産条件: 1 L 培養液を含む 1.5 L 容ジャーファーマンターを用いて、30°C、300 rpm、1 vvm、pH 7.5 で培養した。培養開始時の培養液には 1.0 M のグリセロール/廃棄グリセロールが含まれ、その後、0.5 M 当量のそれらがそれぞれ追加された (図 矢印)。

— 廃棄グリセロールとは —

トリアシルグリセロールからバイオディーゼル燃料 (Bio Diesel Fuel, BDF) を化学製造する過程で副生される廃液 (BDF 廃液) に含まれるグリセロール (右)。



1.5 M (138 g/L) のグリセロールおよび廃棄グリセロールから、120時間の培養でそれぞれ約 1.4 M (126 g/L) および 1.15 M (104 g/L) のL-乳酸を発酵生産することに成功。