

通性嫌気性菌と光合成細菌の 混合培養による水素生産

Study on Enhanced Hydrogen Production by Various Type of Co-cultures of
Facultative Anaerobes and Photosynthetic Bacteria

徳 本 大¹・粟飯原 康 行¹・奥 茉紗代¹
小森谷 友 絵¹・浅 田 泰 男²・神 野 英 毅¹
Masaru TOKUMOTO¹・Yasuyuki AIHARA¹・Masayo OKU¹
Tomoe KOMORIYA¹・Yasuo ASADA²・Hideki KOHNO¹

¹ 日本大学生産工学部応用分子化学科(〒275-8575 千葉県習志野市泉町 1-2-1
e-mail : h5kohno@cit.nihon-u.ac.jp)

² 日本大学理工学部一般教育教室化学系列(〒274-8501 千葉県船橋市習志野台 7-24-1
e-mail : asada@chem.ge.cst.nihon-u.ac.jp)

クリーンなエネルギーキャリアーである水素を、グルコースを原料とし標記の混合培養によって効率良く生産することを目指す。酸素耐性嫌気性細菌として *Enterobacter* と *Lactobacillus* を用い、光合成細菌は *Rh. sphaeroides* RV および *Rh. sphaeroides*. No.7 を用いた。酸素耐性嫌気性細菌は、偏性嫌気性細菌に比して培養が容易であり、また、光合成細菌を酸素から防御できると考えた。*E. aerogenes*+*Rh. sphaeroides* RV では、対糖モル収率は約 3.15 モルであった。収率を下げる原因として、*E. aerogenes* が *Rh. sphaeroides* RV の利用できないエタノール、ブタンジオール、ギ酸などを生成した。このため、これらを利用できる光合成細菌を用い、嫌気性細菌を乳酸菌に変えることにより、乳酸菌+*Rh. sphaeroides* RV で、対糖収率 7.08mol まで達成した。

Key words : Bio hydrogen, Organic waste decomposition, Photosynthetic bacteria,
Co-culture system, Lactic fermenter

2005 年 12 月 8 日受理

1. はじめに

廃棄物の処理が深刻となっている現在、わが国では年間 5 千万 t のごみが家庭から排出されており、そのうちの約 30% は生ゴミである¹⁾。その生ゴミを資源として、コンポスト化や飼料化はリサイクルの例の 1 つであるが、都市には肥料としてのコンポスト化は塩濃度等の問題および輸送コスト等の限界問題があるので、その他の資源化技術が必要であると考えられる²⁾。その資源化技術として、生物の働きを利用して、物質を変換するバイオコンバージョンがある。生ゴミを微生物分解などにより、水素を生産することで、燃料電池を通してエネルギーとして使うことができる。水素は燃焼によって温暖化ガスの原因とされる CO₂ を生じないためクリーンであり、1 次エネルギー

である熱、電気、光などによって再生可能なエネルギーキャリアーである³⁾。

その技術の中で、われわれは酸素耐性嫌気性細菌と光合成細菌を用い水素の高収率生産を試みた。嫌気性細菌類は基質として、各種の糖、澱粉、セルロースなど幅広い利用が可能である。最初に、嫌気性菌の *Enterobacter aerogenes* HU-101^{4, 6)} のヒドロゲナーゼ系を用いて水素を生産し、そこで副産物としてできた有機酸類から光合成細菌の *Rhodobacter sphaeroides* RV のニトロゲナーゼ系でさらに水素を生産することにより高収率の水素を得られると考えた。結果としては 3.15mol /mol glucose の水素を回収することに成功したが、この混合培養には、資化されないアルコール類等の副産物が多く、理論収率には遠く及ばなかった。そこで、対糖収率を上げるためアルコール資

化性光合成細菌 *Rhodospseudomonas sphaeroides*. No.7^{7,8)} を利用した。3 種混合系と、*Lb. delbrueckii* と *Rh. sphaeroides* RV の混合系の 2 方法を検討した。結果は、3 種混合系では菌の成育フェーズに問題があり、低収率であったが乳酸菌と光合成細菌では従来の数値を上回る 7.08 mol/mol グルコースまで水素を回収することができた。

本論文は、高収率の水素を得るための、通性嫌気性菌の菌体機能を活用した、光合成細菌との混合固定化培養法を報告する。

2. 実験方法

(1) 目的

われわれは Fig. 1 に示すようなモデルを考え、食品廃棄物中に含まれる基本物質として挙げられるグルコースを炭素源とし、高収率の水素を得ることを目的とした。

(2) 実験材料としての使用菌体

われわれは通性嫌気性菌である *E. aerogenes* HU-101, *Lb. delbrueckii*, と光合成細菌の *Rh. sphaeroides* RV, *Rh. sphaeroides*. No.7 を用

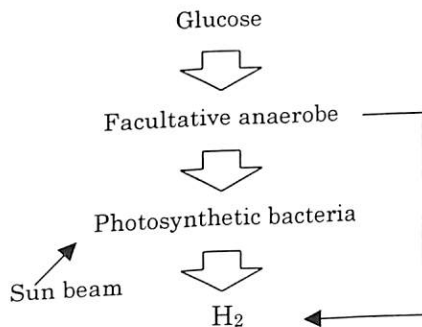
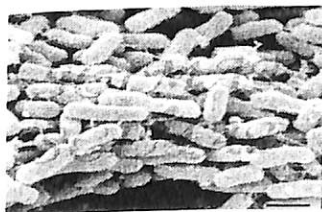


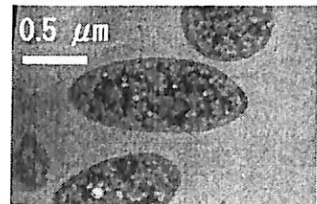
Fig. 1 The model of biohydrogen production



E. aerogenes HU-101



Lb. delbrueckii



Rh. sphaeroides RV

Fig. 2 SEM image of applied bacteria

いて混合培養を行った。それぞれの組み合わせでの混合系を検討した。

(3) 培養方法

1) *E. aerogenes* HU-101

LB 培地 (Table 1) を増殖培地として使用し、pH 6.3, 30°C で培養した。この菌はグラム陰性の運動性を有する通性嫌気性桿菌である。

O₂ による増殖の障害がないため、バツフル付き三角フラスコで攪拌し、好気培養を行い、増殖を促進させた。約 6 時間でプラトー期に到達し、その後、嫌気的な水素発生条件にすぐに対応できた。

2) *Lb. delbrueckii*

増殖培地として GYP 培地 (Table 1) を用い、pH 6.8, 30°C で約 24 時間嫌気培養した。この菌はグラム陽性の運動性の無い酸素耐性嫌気性桿菌であり、1 mol のグルコースから 2 mol の乳酸を作ることでできるホモ乳酸発酵菌である。

3) *Rh. sphaeroides* RV · *Rh. sphaeroides* No.7

増殖培地は aSy 培地 (Table 1) を用い、pH 6.8, 30°C で嫌気明条件下で約 3 日培養した。光の強さは、10000 lux で行った。紅色非硫黄性光合成細菌で、ニトロゲナーゼ系を有しており、有機酸類から水素を発生することができる。RV は主に乳酸・酢酸を基質とする。これに対し、No.7 はアルコール資化性光合成細菌であり、主にエタノールを基質とする。

(4) 水素発生実験

1) 食品廃棄物に含まれる基本物質のグルコースモデル基質を考え高収率の水素発生条件を検討した。

2) 混合培養による培養法

Table 1 The composition of maintenance media

Composition of LB medium		Composition of GYP medium		Composition of aSy medium	
reagent	wt(g)	reagent	wt(g)	reagent	wt(g)
Glucose	10	Glucose	10	(NH ₄) ₂ SO ₄	1.25
Tryptone	10	Yeast extract	10	Disodium Succinate	9.8
Yeast extract	5	Bacto peptone	10	Yeast extract	1
NaCl	5	Sodium acetate	10	KH ₂ PO ₄	0.866
KH ₂ PO ₄	17.4	MgSO ₄	0.1	K ₂ HPO ₄	0.733
K ₂ HPO ₄	13.6	MnSO ₄ ·nH ₂ O	1	MgSO ₄	0.098
distilled water	1000ml	FeSO ₄ ·7H ₂ O	1	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.099
		NaCl	1	Vitamin solution	10ml
		distilled water	1000ml	Inorganic solution	10ml
				distilled water	1000ml

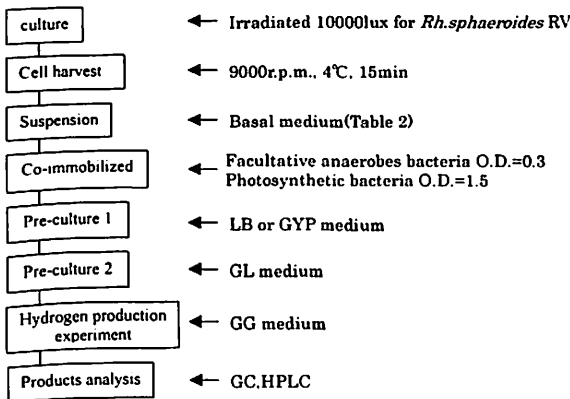


Fig. 3 Scheme of biohydrogen production process

すべての混合固定化実験の操作は Fig. 3 のフローチャートで行った。すなわち、いずれの菌体も pre-culture として十分にその生長期のフェー

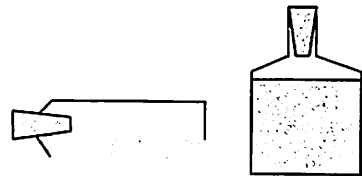


Fig. 4 Fixation of bacteria
100ml of microalgal suspension was fixed into agar in 200ml of roux flask

ズに培養して viability を高めた。次にその生長期の菌体を遠心分離にて集菌をし、Dry weight Cell 0.75mg/ml を使用し以下の培養を行った。

Fig. 4 に示すごとく、寒天培地を利用して固定化し、その培養効率を高めた。固定化後前培養を行い、菌としての生育を充分とし、最後に水素発生培地として、Table 2 にあるような GG 培地の組成で水素の発生実験を行った。

Table 2 Composition of applied medium

Composition of Basal medium		Composition of Vitamin solution		Composition of Inorganic solution	
reagent	wt(g)	reagent	wt(g)	reagent	wt(g)
KH ₂ PO ₄	0.866	Botin	0.005g	FeSO ₄ ·7H ₂ O	1.18g
K ₂ HPO ₄	0.733	Thiamin Hydrochloride	5g	Boric Acid	0.28g
MgSO ₄	0.098	p-aminobenzoic acid	0.00015g	MnSO ₄ ·5H ₂ O	0.227g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.099	Nicotinic acid	5g	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.075g
Vitamin solution	10ml	Nicotinamide	0.00015g	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.024g
Inorganic solution	10ml	distilled water	1000ml	Cu(NO ₃) ₂ ·3H ₂ O	0.004g
distilled water	1000ml			EDTA(2Na)	2.0g
				distilled water	1000ml
Composition of GL medium		Composition of GG medium			
reagent	wt(g)	reagent	wt(g)		
D.L Lactate	6.76	Glucose	4.5		
Glutamate	0.333	Glutamate	1.87		
Basal medium	1000ml	Basal medium	1000ml		

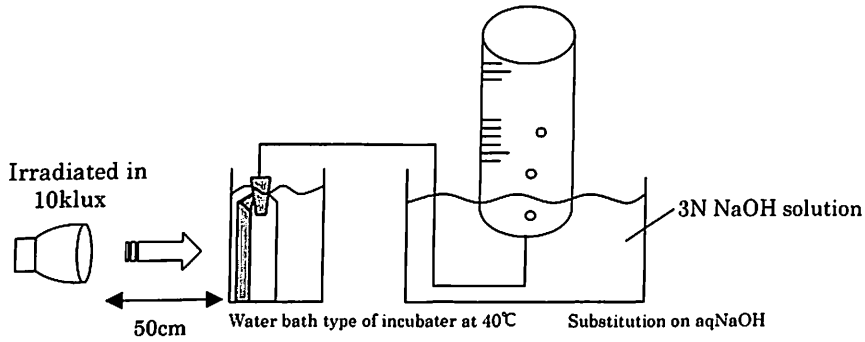


Fig. 5 Bio hydrogen collection
Irradiated 10klux for *Rh. sphaeroides* RV Hydrogen gas was collected by substitution on the aqNaOH

3) 装置図

光照射を行いながら、混合培養によって生育期の固定化菌体から水素発生をする。水素は Fig. 5 に示すごとく、ルー瓶より発生する水素を導管に捕集し、アルカリ溶液を通して CO_2 を捕集し、純粋な水素を水上置換にて捕集した。捕集した水素は測定用メスシリンダーに導き、その発生する水素を経時的に測定した。実際に使用したランプは昼色用ハロゲンランプを用いた。光照射の距離は 50cm であった。

3. 結果

(1) *E. aerogenes* HU-101 · *Rh. sphaeroides* RV 2 種混合培養水素発生実験

この実験では 1:5~1:20 と混合比を変えて比較を行い、最適な混合比を検討した。水素発生実験の結果は Fig. 6 のようになり菌体混合比が 1:5 のとき、最大で対糖収率は 3.15mol/mol glucose となった。

(2) *E. aerogenes* HU-101 · *Rh. sphaeroides* RV · *Rh. sphaeroides* No.7 3 種混合培養水素発生実験

ここでも、混合菌体比を変えて比較を行い、最適な混合比を検討した。そのときの結果を Fig. 7 に示した。1:5:3 のとき、最大で対糖収率 3.01mol/mol glucose となった。さらに、嫌気条件培養はアルゴンガスボンベよりアルゴンガスを通気し、培養器中の酸素をアルゴンで置換することにより、嫌気条件を保ち、収率の改善を行った。その結果は Fig. 8 に記した。結果は 1:5:3 の

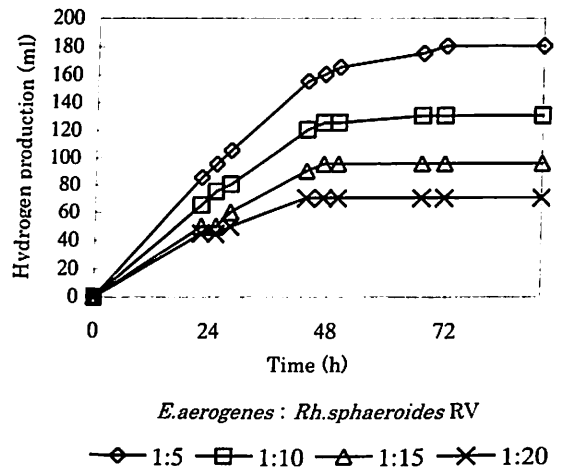


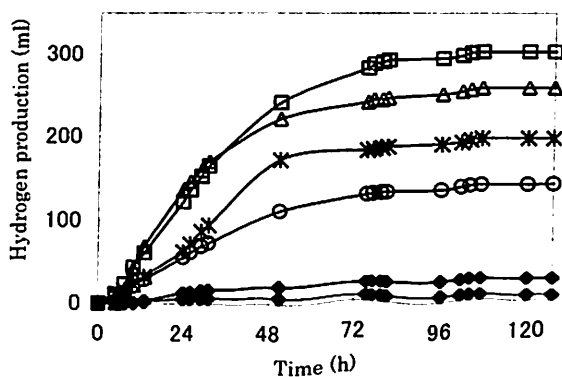
Fig. 6 *E. aerogenes* HU-101 · *Rh. sphaeroides* RV
Time course of hydrogen production in co-culture of 2 type of bacteria.
The maximal yield was 3.15 moles of hydrogen gas per glucose.

とき、前回と同様で生成したときの水素の対糖収率は最も高く、3.11mol/mol glucose となった。

(3) *Lb. delbrueckii* · *Rh. sphaeroides* RV 2 種混合培養水素発生実験

ここでは、乳酸菌の活性を維持することが難しかったため、Pre-culture1 を GYP 濃度 1/5 で行い、48 時間行った。結果は菌対比が 1:5 のとき、最大で対糖収率 7.08mol/mol glucose と理論収率の約 59% と高収率の水素を得ることができた。そのときの結果は Fig. 9 に記した。

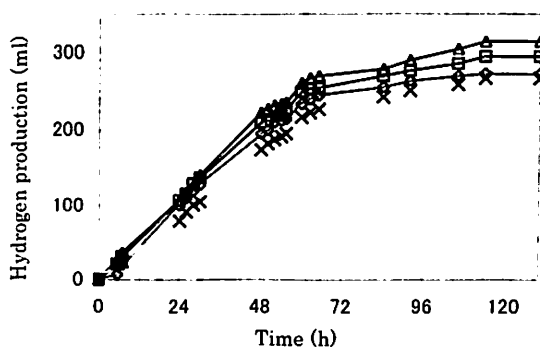
さらに、pH を光合成細菌の至適 pH 6.8 に合わせ同様に実験を行った。結果は Fig.10 のように



E. aerogenes : *Rh. sphaeroides* RV : *Rh. sphaeroides* No.7

● 1:0:0 ● 1:0:5 ▲ 1:5:5
 ■ 1:5:3 ○ 1:5:1 * 1:5:0

Fig. 7 *E. aerogenes* HU-101 · *Rh. sphaeroides* RV
 Time course of hydrogen production in co-culture of 2 type of bacteria.
 The maximal yields was 3.01 moles of hydrogen gas per glucose.



E. aerogenes : *Rh. sphaeroides* RV : *Rh. sphaeroides* No.7

○ 1:5:0 □ 1:5:1
 ▲ 1:5:3 × 1:5:5

Fig. 8 *E. aerogenes* HU-101 · *Rh. sphaeroides* RV · *Rh. sphaeroides* No.7
 Time course of hydrogen production in co-culture of 3 type of bacteria.
 The maximal yields was 3.11 moles of hydrogen gas per glucose.

なり、対糖収率は 6.80mol/mol glucose となり、pH を 6.8 にした条件で、収率は落ちた。そのときの寒天中の菌体数の変化を Table 3 に、グルコースの経時変化を Fig.11 に記した。

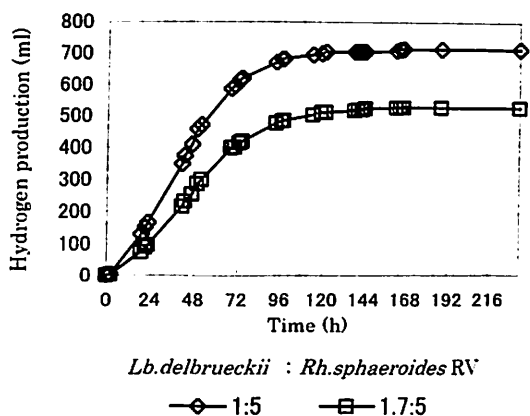


Fig. 9 *Lb. delbrueckii* · *Rh. sphaeroides* RV
 Time course of hydrogen production in co-culture of 2 type of bacteria.
 The maximal yields was 7.08 moles of hydrogen gas per glucose.

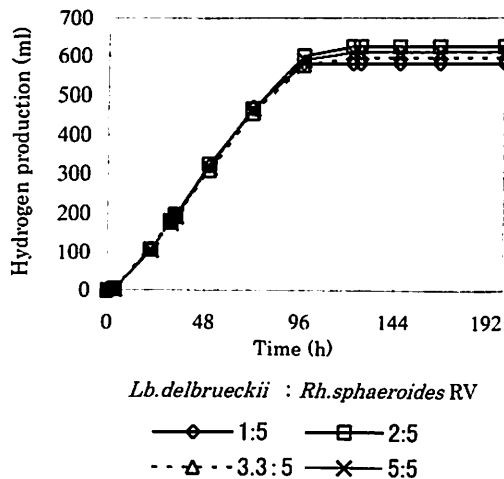


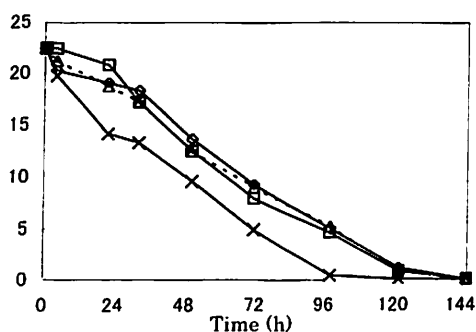
Fig.10 *Lb. delbrueckii* · *Rh. sphaeroides* RV
 Time course of hydrogen production in co-culture of 2 type of bacteria.
 The maximal yields was 6.80 moles of hydrogen gas per glucose.

4. 考 察

光合成細菌は糖を直接利用しないものが多く有機酸などを好んで利用する。Miyakeらは、嫌気性細菌との混合培養系によって糖の還元力を効率良く水素として取り出せる系を確立した。すなわち、Fig. 1 に示すように、糖→H₂+有機酸の発エルゴン反応を嫌気性細菌が行い、有機酸→H₂+CO₂の吸エルゴン反応を光合成細菌が光エネルギー

Table 3 Change of fixed bacterial weight in agar between initial phase and 144 hours incubation

	The initial (mg/ml)	The final (mg/ml)
<i>Lb.delbrueckii</i>	0.160	0.508
<i>Rh.sphaeroides</i> RV	0.595	9.03



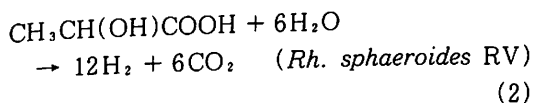
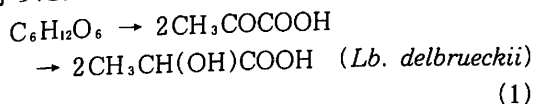
Lb.delbrueckii : *Rh.sphaeroides* RV

—○— 1:5 —□— 2:5 —◇— 3:5 —×— 5:5

Fig.11 Time course of glucose consumption
Glucose was completely consumed within 5 days.

ギーの投入によって行う⁹⁾。

下の式は光合成細菌と乳酸菌の混合培養をモデルとしたときの反応式である。理論的には下の式により、1 mol のグルコースから 12mol の水素を得ることができる。この収率を目標とし、効率的な水素生産系開発のため、基本的培養条件および固定化などによる水素生産条件の基礎的検討を行った。



まず、最初に *E. aerogenes* HU-101・*Rh. sphaeroides* RV 2種混合培養を行った。ここで、理論収率が 12mol/mol glucose であるのに対し、結果は 3.15mol/mol glucose と低収率になったのは RV が酢酸と乳酸しか資化することができず、*E. aerogenes* HU-101 の代謝産物がアルコール類やギ酸に偏ってしまったためであると考えら

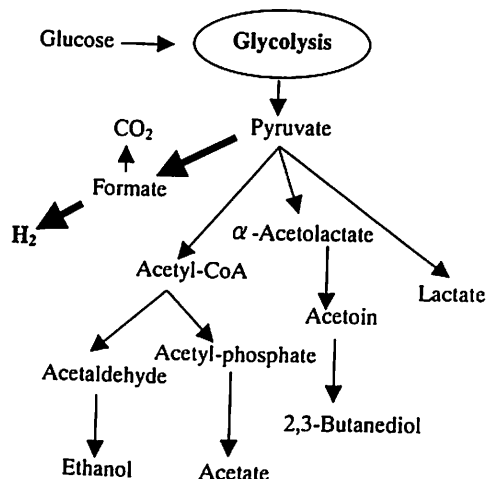


Fig.12 Metabolism of glucose by *E. aerogenes* HU-101

れる。しかし、*E. aerogenes* HU-101 単独培養の水素発生量と比べると、約3倍になっており、混合による成果はみられた。

次に *E. aerogenes* HU-101 が、副産物として、Fig.12 のような代謝経路を経て Ethanol や、2-3butanediol 等のアルコール類を多く産生してしまうため、さらに *Rh. sphaeroides* No.7 を投入し、3種混合系を試みた。ここで、対糖収率は 3.01mol/mol glucose となり、2種混合固定化のときよりも水素の収率は減少してしまった。これは、*Rh. sphaeroides* RV の活性が何らかの理由により下がっていること、また、操作における攪拌の過程で酸素ショックがあるということが考えられる。よって、さらに、菌体を懸濁するときなどにアルゴン置換を行いながら攪拌することにより酸素ショックをできるだけ減らすことを試みた。

Fig. 8 に記したように、アルゴン置換を行ったため、多少の収率の改善は見られたが、対糖収率は 3.11mol/mol glucose と未だ低いままであった。これは、*Rh. sphaeroides* No.7 が酢酸と乳酸から水素を発生する能力が低いことが原因であると考えられる。*Rh. sphaeroides* No.7 の混入割合が高すぎると、*Rh. sphaeroides* RV との競合が起こり、酢酸と乳酸を *Rh. sphaeroides* No.7 が消費してしまうので、全体としての水素発生量は低下したと考えられる。

ここで、われわれは *E. aerogenes* HU-101 との混合は副産物が多く、光合成細菌との混合は向

いていないと考え、また、水素発生には大きく *Rh. sphaeroides* RV のニトロゲナーゼ系が寄与していることが確認されたため、通性嫌気性菌を水素は発生しなくても、副産物をほとんど作らない *Lb. delbrueckii* に変え、混合固定化を試みた。この菌は上の(1), (2)式のように 1 mol のグルコースから 2 mol の乳酸を生成することができ、*Rh. sphaeroides* RV のニトロゲナーゼ系だけでも収率を向上できるのではないかと考えた。結果は Fig. 9 のようになり、対糖収率は 7.08 mol/mol glucose と、かなりの収率の改善が見られた。また、pH 条件を光合成細菌の至適 pH にして、さらに収率向上を考え再実験したが、同程度の収率を安定に得られた。その理由として、菌体の混合比率のバランスが良かったことが挙げられる。グルコースの経時変化は Fig.11 を見ると *E. aerogenes* HU-101 が 24~48h で消費してしまうのに対し、4~5 日かけてゆっくりと消費していた。これは、RV のニトロゲナーゼ系が活性を維持している時間と同じくらいで、コンスタントに乳酸が発生していたため、水素の収率がかなり向上したものと考えられる。つまり、乳酸菌の活性を落とすつつ、光合成細菌の活性を最大限に高めることで、乳酸の生成と消費が過不足なく行われたことが良い結果となった最大の原因であると考えられた。この条件では、*Lb. delbrueckii* と *Rh. sphaeroides* RV が 1:5 で非常にバランスよく混合されていたことが確認できた。また、寒天中の菌体数は Table 7 に示したように *Lb. delbrueckii* が約 3 倍で、*Rh. sphaeroides* RV が約 15 倍となっており、最初から最後まで 1:5 のバランスを保てたため、効率良く水素を発生できたと考えられる。

5. 結 論

1) 乳酸菌と光合成細菌の 2 種混合系から 7.08

mol/mol glucose と最も良い収率を得ることができた。

2) 混合固定化のシステムが菌体の活性化に非常にうまく機能していることが確認された。

3) 微生物的水素生産は、工業的な水素生産に比べ、未だコストと時間がかかってしまうという欠点があり、さらなる高収率化、工程の効率化および時間の削減を考慮していく必要がある。だが、微生物的水素生産は廃棄が困難な生ゴミや有機廃液から、低エネルギーで水素を生成できるというところに大きな社会的意義があり、将来化石資源が枯渇したときには非常に有用な技術となると考えられる。

謝 辞

Rhodobacter sphaeroides RV を分与して頂いた(独)産業技術総合研究所セルエンジニアリング研究部門・三宅淳博士および、*Enterobacter aerogenes* HU-101 を分与して頂いた、広島大学大学院先端物質科学研究科・西尾尚道博士、*Rhodospseudomonas sphaeroides*. No.7 を分与して頂いた千葉大学園芸学部・藤井貴明博士に深く感謝致します。

参考文献

- 1) 矢田美恵子, 川口博子, 佐々木健: "廃棄物のバイオコンバージョンー有機性廃棄物のリサイクル", 地人書館, 東京 (1996)
- 2) 白井義人: "化学装置", 2, p.8-9 (2000)
- 3) Miyake, J., et al., *J. Ferment. Technol.*, 62, 531-535 (1984)
- 4) Rachman, M., et al., *J. Ferment. Bioeng.*, 83, 358-363 (1997)
- 5) Yokoi, H., et al., *Biomass and Bioenergy*, 22, 389-395 (2002)
- 6) Nakashimada, Y., et al., *International J. Hydrogen energy*, 27, 1399-1405 (2002)
- 7) Fujii, T. et al., *Agric. Biol. Chem.*, 47, 2747-2753 (1983)
- 8) Fujii, T. et al., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 47, 2747-2753 (1983)
- 9) 今中忠行: "微生物利用の大展開", p.1106-1113 (2002)

Masaru TOKUMOTO¹ · Yasuyuki AIHARA¹ · Masayo OKU¹
Tmoe KOMORIYA¹ · Yasuo ASADA² · Hideki KOHNO¹

¹ Department of Applied Molecular Chemistry, College of Industrial Technology.,
Nihon University,

² Department General Education, College of Science and Technology., Nihon University

Abstract

In order to produce H₂ gas as clean energy source using biomass conversion, we studied on how the carbon source was converted efficiently by use of our co-culture system of facultative anaerobes and photosynthetic bacteria. For the first stage, *Enterobacter aerogenes* HU-101, was chosen for its rapid hydrogen production from glucose with by-products of organic acids and alcohols, some of which could be further converted into hydrogen by a photosynthetic bacterium, *Rhodobacter sphaeroides* RV. The strains HU-101 and RV were co-immobilized in agar gel, which was pre-cultured in liquid media. Following the pre-culture, the co-cultured gel was irradiated in 10klux and glucose was converted hydrogen gas with the yield of 3.15 moles of hydrogen per glucose. The reason for the low yield attributed to the production of alcohols which were not used by RV strain. By changing the anaerobe to lactic fermenter, we were further improving the yield. It was founded that changing *Lactobacillus* was a significant improvement. Finally, we succesfully achieved at most 7.08moles H₂ gas production from one mole of glucose.