

通性嫌気性菌の発酵水素発生の収率改善

(横浜国立大学大学院工学研究科) 菅沼 剛, 谷生 重晴

Improvement of the Yield of Fermentative Hydrogen Production by Facultative Anaerobic Bacteria

Department of Chemical Engineering, Yokohama National University
Takeshi SUGANUMA and Shigeharu TANISHO

1. 緒 言

現在、温暖化、酸性雨、オゾンホール、熱帯雨林の減少など様々な環境問題が起こっている[1]。中でも最も問題とされているのが地球温暖化で、二酸化炭素の排出量を削減する対策が各国で取られている。二酸化炭素削減の方法として、燃料電池を用いた自動車の導入が検討されているが、水素の供給法は確立されていない。そのため、新たな水素生産技術の開発が必要と考えられる。

バイオマスを利用する水素生産は、水素発生速度が速く昼夜を問わず水素生産可能といった利点を持つ発酵法が非常に工業的にふさわしい方法であると考えられるが、発酵法では最も収率の高い *Clostridium butyricum* でも 2.3mol しか水素を発生せず、基質からの水素収率が悪い[2]。このため基質あたりの水素収率を向上させる必要がある。

ところで NADH 経路で発生するバクテリアは、補酵素 NADH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide, reduced form) からヒドロゲナーゼを介して水素を発生するとされている[3]。嫌気条件下においては解糖系にて 2mol の NADH が生成するが、好気条件下では 10mol の NADH が生成する。しかし好気条件下では、生成した NADH は電子伝達鎖にて酸化されてしまい水素は発生しない。この好気条件下で生成する NADH を水素生産に利用することができれば、最高で 10mol の水素収率まで改善が可能になると考えられる。

そこで本研究では、通性嫌気性菌の *Enterobacter aerogenes* を使用し、好気条件下で生成する NADH を水素発生に利用する方策について理論的に検討し、実験によって証明を試みた結果について報告する。

2. 理論

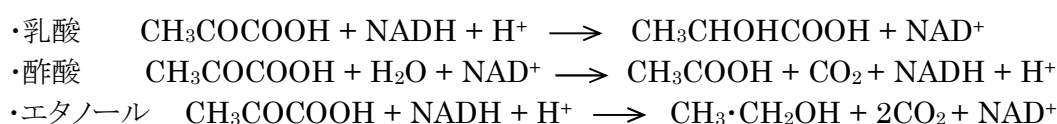
2.1 発酵水素発生

発酵により水素を発生する微生物は、グルコースなどの糖を分解することにより、代謝産物として水素と有機酸を生成する。

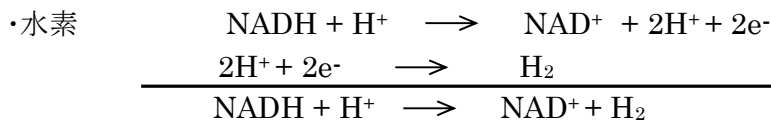
Enterobacter 科のバクテリアは嫌気状態において主に EM 経路でグルコースを分解し、NADH やピルビン酸、ATP をそれぞれ次のように 2 モルずつ生成する。



このピルビン酸を基にした代謝産物の生成反応は、それぞれ次のようになっている。



この代謝産物生成過程において余ったNADHが次のように反応して水素を発生する。



2.2 代謝経路と阻害

図1に通性嫌気性菌における代謝経路図を示す。解糖系において生成されたNADHは、嫌気状態においては、水素や代謝産物を生産して再酸化される。一方、好気状態においては、解糖系やTCAサイクルで生成されたNADHは電子伝達鎖で酸素に電子を渡すことでNADHを再酸化し、同時に多量のATPを生成する。したがって電子伝達鎖を阻害し、NADHの再酸化を水素発生で行うことが出来れば、最大10molの水素収率の向上が見込める。

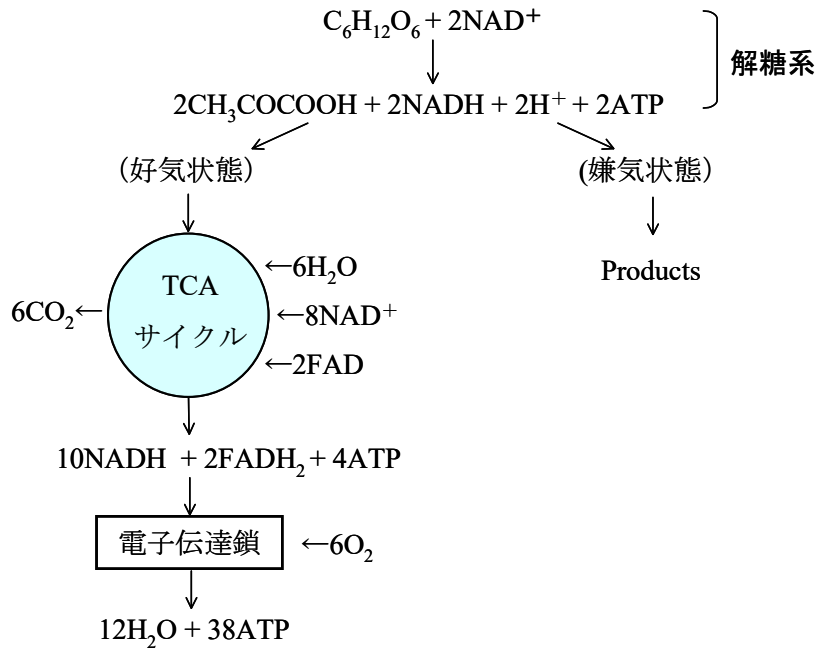


図1 代謝経路図

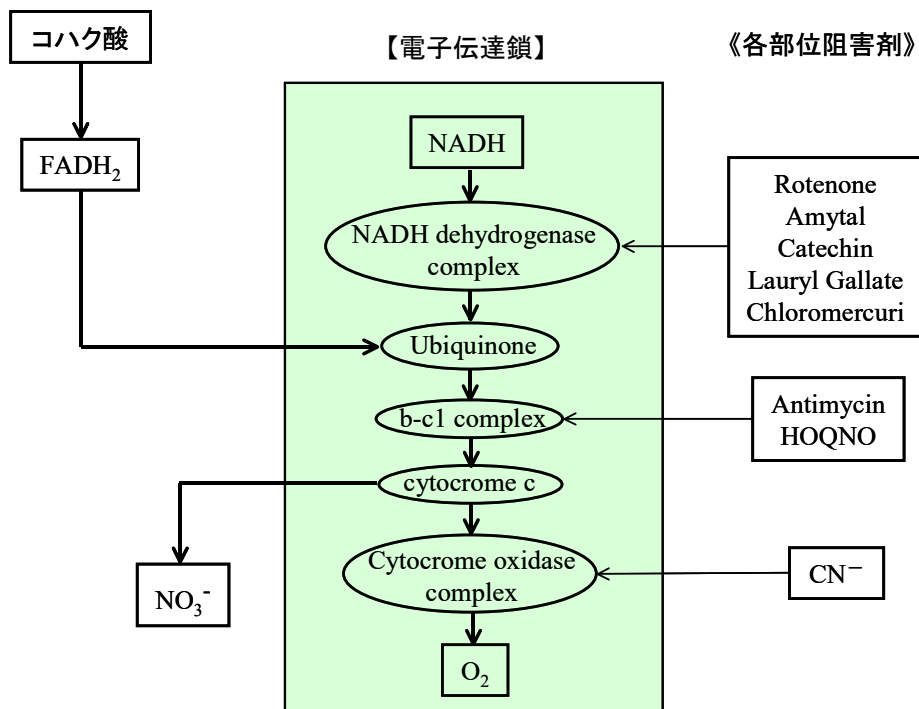


図2 電子伝達鎖を構成する複合酵素群と阻害剤の作用部位

図2に電子伝達鎖を構成する複合酵素群と阻害剤の作用部位[4]を示した。FADH₂の作用部位以下で阻害すると、TCAサイクル中のコハク酸からフマル酸を生成する反応の酸化還元電位が高いことからFADH₂の再酸化が出来なくなるので、阻害箇所としてNADHデヒドロゲナーゼ複合体を選んだ。また本研究ではその部分に作用する阻害剤の中から、特に阻害効果の高いLauryl Gallate[5]を使用した。

表1 培養液組成

C ₆ H ₁₂ O ₆	20.0g
MgSO ₄	0.4g
Pepton	15.0g
Na ₂ HPO ₄	2.0g
KH ₂ PO ₄	2.0g
蒸留水	2.0L

3. 実験方法

培養液組成を表1に示す。滅菌した前培養液 500ml に *Enterobacter aerogenes*を植菌後、38°Cの恒温槽で攪拌しながら約16時間菌体を培養した。この前培養菌液50mlを本培養液2000mlに加え、培養を行った。本培養中は一定時間毎に水素発生量、菌体重量、代謝産物濃度を測定した。

尚、菌体重量はOD法(λ=550nm)で測定し、代謝産物は液体クロマトグラフを用いて分析した。カラムは信和化工(株)製 Ultron PS-80Hを用いた。

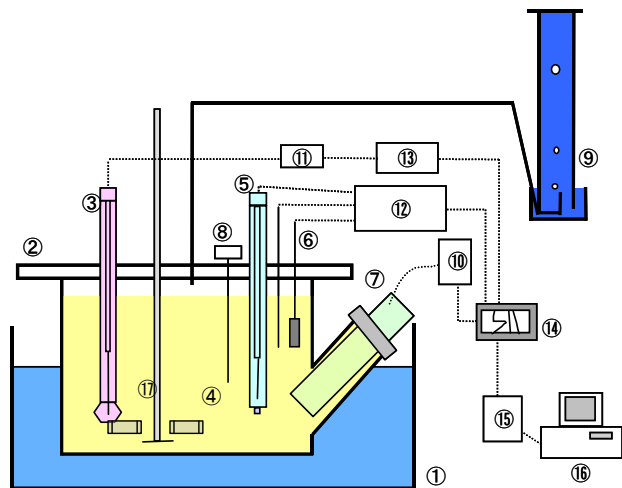
擬似好気状態を作るため、硝酸カリウム 1.0gを純水 10mlに溶かしたものを加えた。

阻害実験には、メタノール 5mlに Lauryl Gallate0.09gを溶かしたものと純水 10mlに硝酸カリウム1.0gを溶かしたものを、菌体重量が0.5[g/l]以上になってから加えた。実験に用いた装置概略図を図3に示す。

4. 実験結果及び考察

図4に培養液中に阻害剤等何も加えなかった場合と硝酸カリウムのみを加えた場合、硝酸カリウムと阻害剤の両方に加えた場合の水素発生量の変化を示した。阻害剤等何も加えなかった場合には、最終的に約100mmolの水素を発生し、グルコース量から計算した水素収率はほぼ1.0になって、良く知られている *E.aerogenes*の水素収率を示した。

硝酸イオンが電子受容体になるとバク



①恒温槽 ②反応槽 ③pHメーター ④銀-塩化銀照合電極 ⑤対極 ⑥電位測定電極 ⑦DO計 ⑧サンプル採取口 ⑨ガス捕集器(KOH) ⑩DOメーター ⑪pHコントローラー ⑫酸化還元電位計 ⑬アンプ ⑭記録計 ⑮A/D変換器 ⑯パソコン ⑰プロペラ型攪拌翼

図3 実験装置図

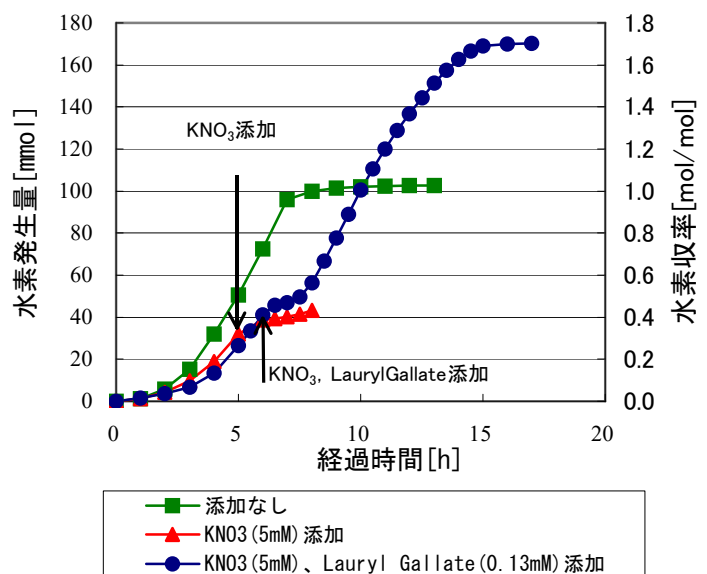


図4 水素発生量の変化

テリアは擬似好気呼吸(硝酸呼吸)を行い、電子伝達鎖にてNADHが再酸化されるようになるため、水素発生量が減少することが予想される。図4によると、硝酸カリウムのみを加えた場合、投与して30分～1時間程してから水素発生量が減少しており、このことから硝酸呼吸の効果が現れるまでには時間遅れのあることがわかった。

硝酸カリウムとLauryl Gallateの両方を加えた場合には、Lauryl Gallateの作用によって電子伝達鎖が阻害されることにより、水素発生能は変化しないか増加することが予想される。図4によると硝酸カリウムを添加した時と同様に、添加後30分～1時間後に水素発生量が減少したが、約1時間30分後からは水素発生能が回復していることがわかる。このことから、まず、硝酸イオンの効果によって水素発生量が減少し、その後Lauryl Gallateによる電子伝達鎖への阻害が効果を現して、水素発生能が元に戻ったと考えられる。

図5は各条件におけるグルコース消費量の変化を示している。菌が硝酸呼吸を行うと、より少ないグルコース消費量で菌体が必要とするATPを獲得できるようになることから、硝酸イオンがない場合と比べてグルコース消費量は減少することが予想される。

図5のグラフによると、硝酸イオンを加えるとグルコース消費量が減少しており、硝酸呼吸を行ったことが明らかに示されている。

硝酸カリウムとLauryl Gallateを加えた場合、硝酸イオンによってグルコース消費量は減少するが、Lauryl Gallateの阻害作用により生成ATP量も減少するため、硝酸カリウムの時と比べてグルコース消費量は増加することが予想される。図5でもグルコース消費量は、添加のない時が一番多く、硝酸カリウムとLauryl Gallateを加えた時にはそれ程消費量が多くないことから、阻害の効果を示していると言える。

図6は硝酸カリウムとLauryl Gallateを加えた場合の水素発生量とグルコース消費量の変化を示している。この図から、硝酸カリウムとLauryl Gallateを加えるまでは、水素発生量とグルコース消費量がほぼ等しくなっているが、添加してから1時間30分以降では阻害効果により水素発生能が元に戻っているのがわかる。

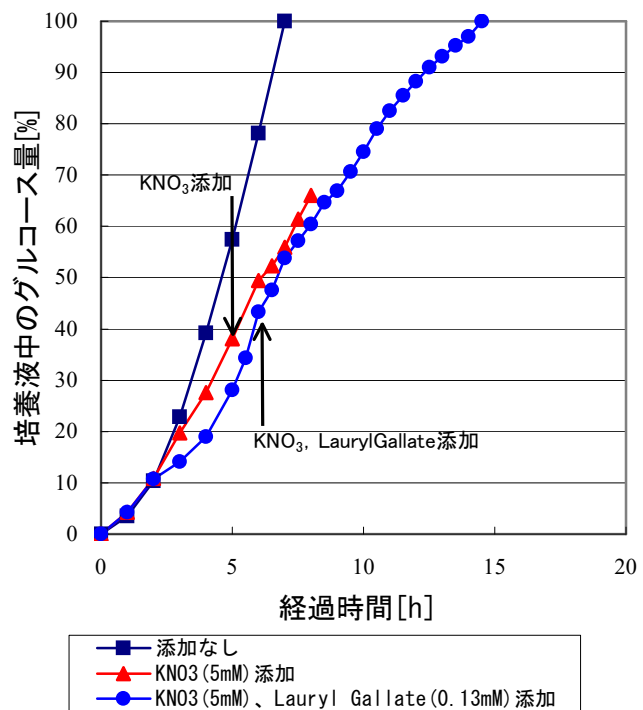


図5 グルコース消費量の変化

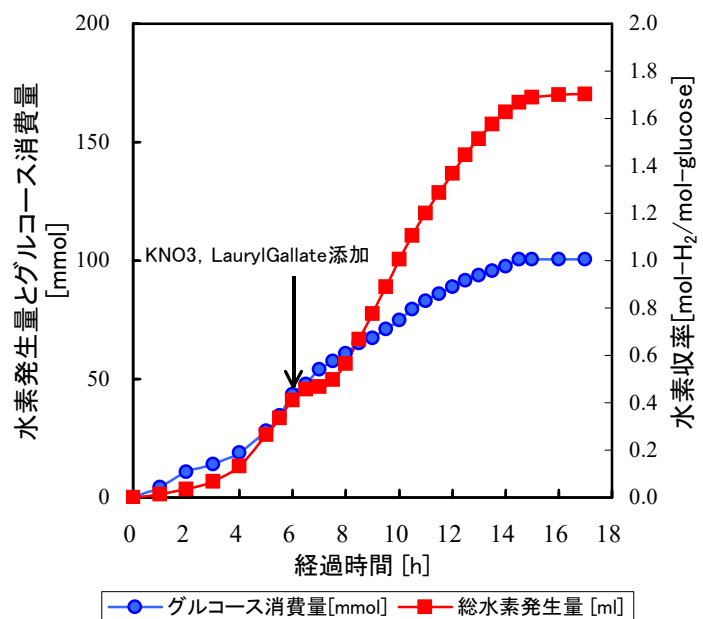


図6 水素発生量とグルコース消費量の変化

図7には阻害の水素収率に及ぼす影響を明瞭にするため、図6から計算した単位時間当たりの水素収率の変化を示した。何も添加していない場合には、単位時間あたりの水素収率はほぼ1.0程度で、*E.aerogenes*の水素収率を示しているが、硝酸カリウムとLauryl Gallateの両方を加えた場合には、添加直後は硝酸呼吸の効果によって水素収率は減少するが、Lauryl Gallateの阻害が効くにつれて水素収率は急激に増加していき、水素収率は約3.0に向上したことが明瞭にわかる。

このように、NADHデヒドロゲナーゼ複合体を阻害することによって水素収率を改善できることが明らかに示されたが、理論で述べたような10molという収率を得ることが出来なかった。この理由は、完全な

好気状態にはなっていないためNADHが代謝産物生成に使われたことやLauryl Gallateの投与量が非常に少なかったため電子伝達鎖を完全に阻害するには至らなかったためと考えられる。これは硝酸カリウムを投与しても代謝産物を生成していることによって説明できる。

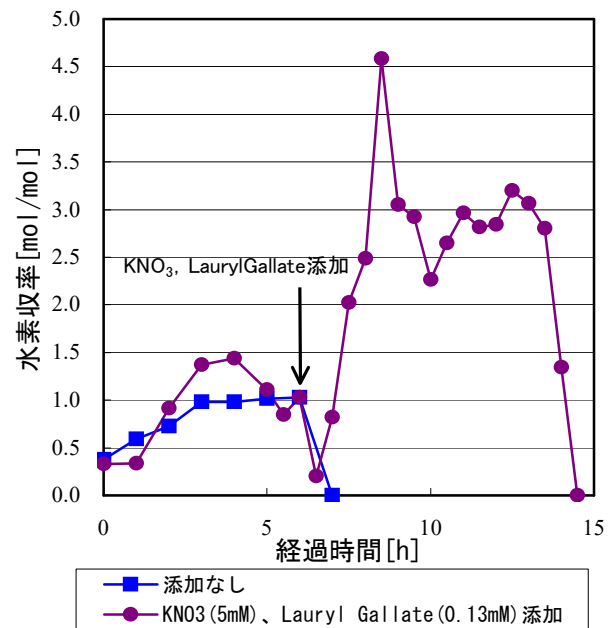


図7 水素収率の変化

5. 結論

- 1.硝酸イオンを加えても、その効果が現れるまでは30分～1時間の時間遅れがあることがわかった。またLauryl Gallateが電子伝達鎖への阻害効果が現れるまでに更に30分程かかることがわかった。
- 2.硝酸呼吸を行うと単位時間当たりのバクテリアのグルコース消費量が減少するが、好気条件下でLauryl Gallateによる阻害効果が現れるとグルコース消費量を増大させることがわかった。
- 3.硝酸呼吸下で電子伝達鎖のNADHデヒドロゲナーゼ複合体を阻害することにより、水素収率が向上することが明らかになった。
- 4.水素収率は、グルコース1mol当たり1molから3molに向上した。

参考文献

- 1)小西誠一,エネルギーのはなし,145-147,日本規格協会,(1995).
- 2)W.A.WOOD, in The Bacteria,vol.2,59-150, Gunsalus and Stanier eds, Academic Press, (1961).
- 3)RUDOLF K.THAYER,KURT JUNGERMANN,and KARL DECKER,Energy Conservation in Chemotrophic Anaerobic Bacteria,Biol. Rev. 41, 100-180 (1977).
- 4)植山光陽編,生体膜実験法 下,293-297,共立出版,(1974).
- 5)KOSINO K,ADATI H,ISHIGAKI N,KANAMURA Y,Inhibitory Effects of Tannins on NADH Dehydrogenases of Various Organisms,Biol. Pharm. Bull. (JPN),16[7],716-718 (1993).