

中温水素発生菌による発酵水素生産の研究

西山大紀^{*}、谷生重晴
横浜国立大学環境情報学府
E-mail : cakeisdog@yahoo.co.jp

Fermentative Hydrogen Production by a Newly Isolated Mesophilic Bacterium

Hiroki Nishiyama, Sigeharu Tanisho

Graduate school of Environment and Information Sciences, Yokohama National University

Abstract

Fermentative hydrogen production at high temperature has been required because of high H₂ production rate, high H₂ yield and blocking the contamination of feedstock. Thermophile produce hydrogen with high yield from glucose but the H₂ production rate is not high as expected. So we had been looking for new bacteria that produce H₂ at a high production rate at high temperature and we could fortunately get a new mesophilic bacterium. The bacterium produced H₂ at a rate more than 100mmol L⁻¹h⁻¹ near at 50°C by way of batch culture and shifted the metabolic pathway by the shift of the temperature and pH.

Keywords: Mesophilic bacterium, Hydrogen production rate, Hydrogen production yield
Metabolic pathway

1. まえがき

高温水素発酵法は、水素生産速度の向上、水素収率の向上、また雑菌による基質の汚染を防ぎやすいことなどから、近年盛んに研究が行われている。しかし高温水素発生菌である *Thermotoga maritima* は、80°Cの回分培養で理論上の最大水素収率である 4 mol/mol-glucose を達成しているが、水素生産速度は 10 mmol L⁻¹h⁻¹ と遅く、期待通りの結果は得られていない。これらの理由として、高温での高い水素収率は、乳酸などのような好ましくない副産物の代謝が抑制されているからであると考えられている。一方、高温での水素生産速度の遅さは、菌の細胞密度が低いからであると説明されている[1][2]。

我々は、中温で水素を発生する菌のスクリーニングを行い、50°Cの回分培養で 100 mmol L⁻¹h⁻¹以上と、高温菌 (thermophilic bacterium) の 10 倍の速度で水素を発生する中温菌 (mesophilic bacterium) (図 1)を得ることに成功した。本報では Mesophilic bacterium の水素発生特性を調べるため、温度と pH が水素発生にどのような影響を及ぼすのか研究を行ったので報告する。

2. 実験方法

Mesophilic bacterium を 16mL の ABCM 半流動培地 (栄研化学株式会社) の高層培地に植え付け、十分に菌を増殖させた。高温に順化させるため、本培養液に植菌する 30 分前に 45°Cの高温槽に入れ、活発に泡を発生するものを前培養液とした。本培養液は表 1 に示した YNU 嫌気培地を用いた。その組成は表 1 のようになっている。本培養は容積 500mL のジャーファーメンターで行い、液量は 350mL、攪拌速度 30rpm、バッチ培養とした。水素生産に及ぼす温度の影響を調べるため、温度は 41°C、44°C、47°C、50°Cに設定した。培地 pH はそれぞれ pH6.0 と pH6.5 とし、培養中は自動調節によって一定に保った。また水素生産に及ぼす pH の影響を調べるため、培養温度を 50°Cに設定し、培養 pH5.5、6.0、6.5、7.0 で実験を行った。代謝産物の分析には高速液体クロマトグラフィーを用いた。菌体濃度は吸光度で測定した。泡が大量に発生し、吸光度は正確に測れなかったため、本培養液を 4 倍に希釈して測定した。

表 1. YNU 嫌気培地の組成 (g/L)

カゼインペプトン	25.0	日水製薬株式会社
Dried Yeast Extract-S	22.0	和光純薬工業株式会社
L-システイン塩酸塩-水和物	0.3	純正化学株式会社
メルカプト酢酸	0.3	純正化学株式会社
D (+) - グルコース	15.0	和光純薬工業株式会社

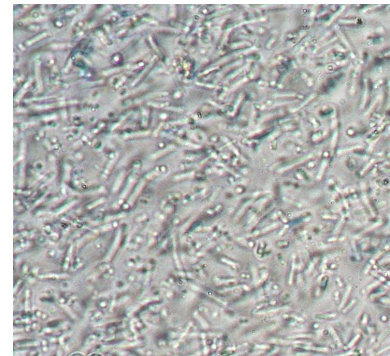


図 1. Mesophilic bacterium の写真

3. 結果と考察

3.1 水素生産に及ぼす培養温度の影響

表 2 は水素生産速度と水素収率の温度による推移を示している。表 2 からわかるように、最大水素生産速度は pH6.0、pH6.5 のいずれにおいても 47°C で最速となり、それぞれ 119.2 mmol L⁻¹h⁻¹ と 91.1 mmol L⁻¹h⁻¹ を示した。また水素収率は pH6.0、pH6.5 のいずれにおいても 50°C が最高となり、それぞれ 2.22 mol/mol と 2.12 mol/mol であった。このことから、この Mesophilic bacterium での水素生産は、47°C~50°C 付近が最も適していると言える。

また図 2 に pH6.0 のときの代謝産物の推移を示す。図 2 から酢酸とエタノールは温度が上昇するにつれて増加したことがわかる。また乳酸と酪酸は温度が上昇するにつれ、生産量は減少した。また図 3 に pH6.5 のときの代謝産物の推移を示す。図 3 から酢酸、乳酸、エタノールについては pH6.0 と同じ傾向であったが、pH6.5 ではギ酸が多く代謝されたことがわかった。またギ酸の生成量は、温度が上昇するにつれて減少する傾向があることがわかった。

図 4 に培養液の菌体濃度を示す。図 4 より、菌の増殖速度は pH6.0 と pH 6.5 のどちらでも 44°C が最も速かったことがわかる。このことは、この Mesophilic bacterium の生育の最適温度が 44°C 付近であることを示している。47°C での増殖速度はいずれの pH でも 44°C の次に速かった。これらのことから、この Mesophilic bacterium の増殖速度は、必ずしも水素生産速度と比例しないことがわかった。収率が最も高くなった 50°C での増殖速度は、2 時間までの立ち上がりを見ると、pH6.0 は 7 番目に速く、pH6.5 は 5 番目であ

表 2. 水素生産速度と水素収率の温度による推移

	Temp (°C)	H ₂ production rate (mmol L ⁻¹ h ⁻¹)	H ₂ yield (mol/mol-glucose)
pH6.0	41	59.8	1.30
	44	94.2	1.93
	47	119.2	2.15
	50	111.2	2.22
pH6.5	41	41.1	0.82
	44	71.4	1.39
	47	91.1	1.42
	50	80.4	2.12

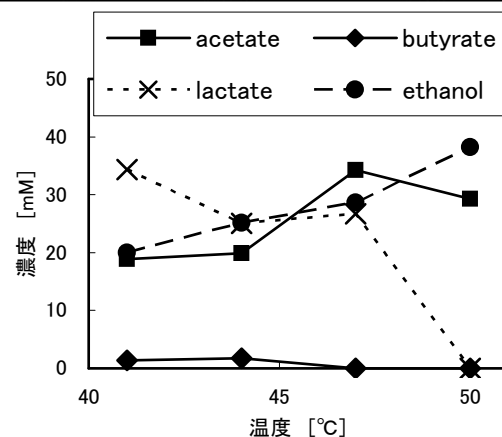


図 2. pH6.0 のときの代謝産物の推移

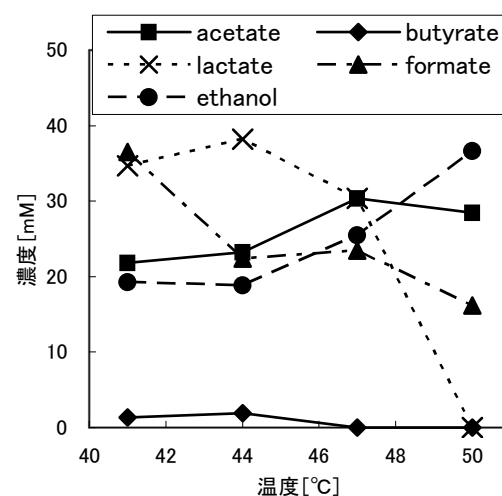


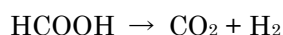
図 3. pH6.5 のときの代謝産物の推移

った。温度が低く、pH が高い方が菌の増殖速度が速い傾向があるが、41℃は増殖速度が遅くなった。また 41℃、pH6.5 は菌の増殖の立ち上がりが特に遅くなったが、これは最初に投入した菌体量が少なかったのかもしれない。

以上の結果から、この Mesophilic bacterium は温度により代謝経路をさまざまに変化させ、温度が低く、pHが高いほどさまざまな有機酸を生産する傾向があることがわかった。また pH6.0 のとき、47℃と50℃で水素生産速度と水素収率は同じような結果となったが、代謝産物と菌体濃度の変化には大きな違いが見られた。これは生育の最適温度に近かった 47℃の方が、50℃よりも速く増殖し、47℃の代謝産物では、酢酸が多かったが乳酸も多く、50℃では乳酸が生産されなかったことが主な理由であると考えられる。

3.2 水素生産に及ぼす pH の影響

表3は水素生産速度と水素収率の pH による推移を示している。水素生産速度と水素収率はいずれも pH6.0 で最大となり、それぞれ 111.2 mmol L⁻¹h⁻¹ と 2.22 mol/mol であった。このことから、この Mesophilic bacterium によって水素生産を行う場合、pH6.0 が適していることがわかる。図5に代謝産物と pH の関係を示す。図5から pH6.0 では、各種の有機酸の生産量が最も少なかったことがわかる。また pH6.5 では、酢酸とエタノールの生産量は pH6.0 とあまり変わらなかったが、ギ酸は pH6.0 より多く、16.2mM 生産された。このギ酸が全て H₂ になっていたとしたら、pH6.5 の時の水素収率は 2.18mol/mol になり、pH6.0 とほぼ同等になったことがわかる。これらのことから、pH6.0 で水素生産速度と水素収率が高くなったのは、pH6.0 では乳酸のように NADH を消費する代謝産物を生じなかったこと、また酢酸・エタノールの代謝生産の過程で生じたギ酸が、



のように分解されたことが主な理由として考えられる。また今回の実験では、ギ酸以外の代謝産物は pH が 6.0 と 6.5 で底打ちし、図5のように凹型の関係になり、pH との比例や反比例の関係は見られなかった。この点についてはさらに追試が必要である。

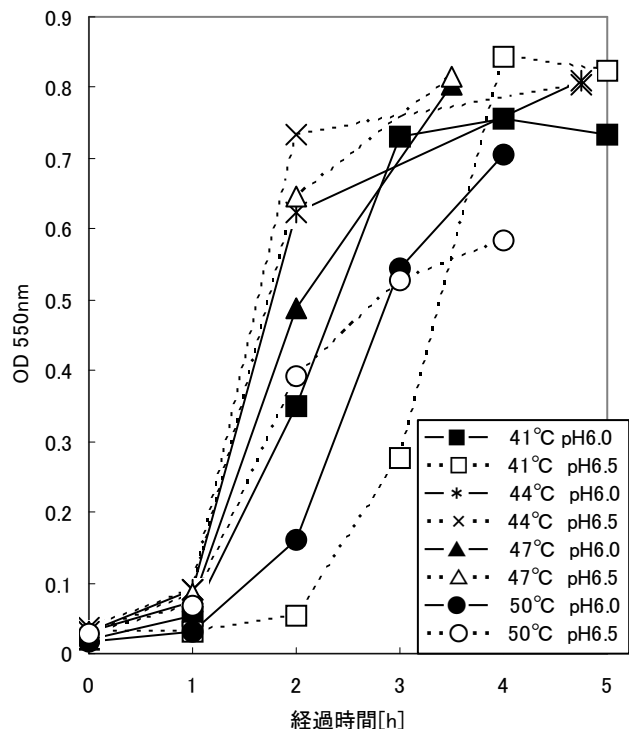


図4. 培養液の菌体濃度

表3.水素生産速度と水素収率の pH による推移

pH	H ₂ production rate (mmol L ⁻¹ h ⁻¹)	H ₂ yield (mol/mol-glucose)
5.5	33.9	1.96
6.0	111.2	2.22
6.5	80.4	2.12
7.0	38.4	1.29

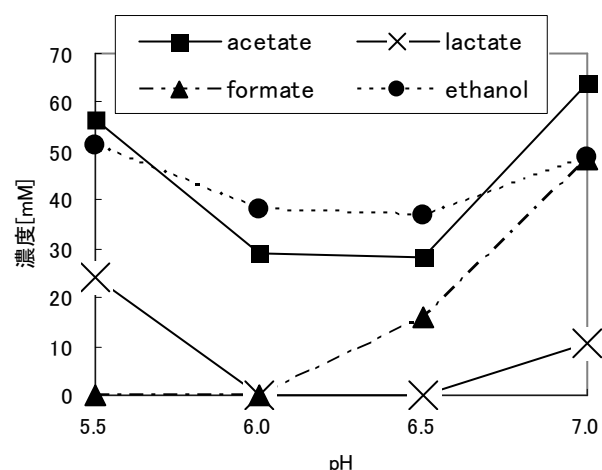


図5.代謝産物と pH の関係

3.3 他の文献値との比較

表4に代表的な発酵バクテリアの水素収率、水素発生速度を示した。条件が異なるために単純に比較はできないが、表4からこの Mesophilic bacterium の水素生産速度は、*Enterobacter aerogenes* のバッチ培養の10倍、連続培養の約2倍であることがわかる。すなわち今後、連続培養でさらに水素生産速度を向上させることができる可能性を秘めている。

表4. 他の文献値との比較

microorganism	culture	D, h ⁻¹	pH	T, °C	substrate H ₂ yield(mol/		H ₂ production rate(mmol/L/h)	reference
					mol-hexose)			
Mesophilic bacterium	batch		6.0	47	glucose	2.15	119.2	This study
<i>Thermotoga maritima</i>	batch		uncontrolled	80	glucose	4.0	10.0	[3]
<i>Thermotoga elfii</i>	batch		7.4	65	glucose	3.3	2.7	[2]
<i>Caldocellulosiruptor saccharolyticus</i>	batch		7.0	70	sucrose	3.3	8.4	[2]
<i>E.aerogenes</i> E.82005	batch		uncontrolled	38	glucose	1.0	11	[4]
<i>E.aerogenes</i> HU-101 m AY-2	continuous	0.67	uncontrolled	37	glucose	1.1	58	[5][6]
<i>C.butyricum</i> IFO13949+	continuous	1.0	5.2	36	starch	2.6	53	[5][6]
<i>E.aerogenes</i> HO-39								

この表は[1]を元に作成した。

破線以下は37°C以下での発酵である。

4 結言

1. この Mesophilic bacterium による水素生産の最適温度は47°C~50°Cである。
2. この Mesophilic bacterium による水素生産の最適 pH は pH6.0 付近であった。
3. この Mesophilic bacterium の最大水素生産速度は47°Cで 119.2 mmol L⁻¹h⁻¹であり、*E.aerogenes* のバッチ培養の10倍、連続培養のおよそ2倍であることがわかった。また最大水素収率は50°Cで 2.22mol/mol-glucose であった。

5 参考文献

- [1] T.de Vrije and P.A.M.Classen “Dark hydrogen fermentations” in Bio-methane & Bio-hydrogen ed J.H.Reith et al. (2003) 103–21 ISBN: 90–9017165–7
- [2] E.W.J van Niel et al.”Distinctive properties of high hydrogen producing extreme thermophiles, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *thermotoga elfii*” Int J Hydrogen Energy 27(2002) 1391–1398
- [3] Schroder C et al. “Glucose fermentation to acetate, CO₂ and H₂ in the anaerobic hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*; involvement of the Embden – Meyerhof pathway” Arch Microbiol 161(1994) 460–470
- [4] Tanisho S et al. “Fermentative hydrogen evolution by *Enterobacter aerogenes* E.82005.” Int J Hydrogen Energy 12,623–627
- [5] Yokoi H et al. “H₂ production from starch by a mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Enterobacter aerogenes*.” Biotechnol Lett 20(1998) 143–47
- [6] Yokoi H et al.”Microbial hydrogen production from sweet potato starch residue” J Bioscience Bioengineering 91(2001) 58–63