

〔醸酵工学会誌〕〔第67巻 第1号 29-34, 1989〕

ノ ー ト

Enterobacter aerogenes の発酵水素発生と 利用基質について

谷生 重晴*・涂 慧萍・若尾 法昭

横浜国立大学工学部物質工学科

(昭和63年7月26日受付 昭和63年10月18日受理)

Fermentative hydrogen evolution from various substrates by *Enterobacter aerogenes*.
—Note—SHIGEHARU TANISHO, TU Hui-Ping, and NORIAKI WAKAO (*Department of Materials Science and Chemical Engineering, Yokohama National University, Tokiwadai 156, Hodogaya-ku, Yokohama 240*) *Hakkokogaku* 67: 29-34, 1989

Several kinds of substrates were examined to find whether *Enterobacter aerogenes* strain E. 82005 could evolve hydrogen from these substrates with peptone as a nitrogen source. Among some carbohydrates and their related compounds, pentoses and saccharides were generally good sources of hydrogen evolution. Above all, gluconic acid which is an oxide of glucose, was degraded to hydrogen about 1.4 times faster than glucose. Yield of hydrogen from mannitol or sorbitol was about 1.6 mol/mol-substrate, though about 1.0 mol/mol-substrate from glucose. In case of sucrose or maltose, the hydrogen yield of substrate was about 1.5 times larger than that of glucose per weight. Thus, these substrates were very efficient in energy conversion. The bacteria could grow in lactose under aerobic conditions, though with difficulty under anaerobic conditions. Formate was slowly degraded to hydrogen. The rate of hydrogen evolution was about one half of that of glucose. Some carbonates were used for growth of the bacteria, though not degraded to hydrogen. Yields of cell mass from L-ascorbic acid, gluconic acid, and mannitol were very large. Particularly, the yield from mannitol was about twice that from glucose.

微生物を利用した水素発生の研究が盛んに行われている。¹⁻³⁾ これらの研究は光合成細菌・藻類を利用した光水素発生^{4,5)} と、化学合成従属栄養細菌を利用した発酵水素発生⁶⁾ に大別できる。光水素発生は太陽光を直接エネルギー変換するのに対し、発酵水素発生は間接的にエネルギー変換していると考えられる。なぜなら、発酵に使用される基質は、植物が太陽光のエネルギーを保存するために作りだしたものだからである。したがって、発酵水素生産も太陽エネルギーの変換による水素生産である。

Tanisho らが単離した発酵水素発生バクテリア⁷⁾ は、これら水素発生微生物の中でも、特に発生速度が速く、培養条件によっては 17 mmol/(g-dry cell·h) の速さで水素発生する。⁸⁾ しかも、通性嫌気性であるから培養操作も容易である。したがって、利用に適したバクテリアの一つであると言える。これまでグルコースを基質にした水素収率、水素発生速度などの諸性質を調べてきた^{6,8)} が、グルコースに対する水素収率が小さい(約 1 mol/mol-glucose) という欠点があった。そのため、基質に対する水素収率の大きい物質を探索する必要があった。また、グルコースは高価であるから、安価な基質の探索と、そのような基質からもグルコー

* 連絡先, Corresponding author.

Table 1. Carbohydrates and related compounds. a)

Material	Formula	mol-w	Cell mass ^{b)} production [mg]	Hydrogen evolved [mmol]	Specific ^{c)} rate [—]	$Y_{H_2/S}^d$ [mol/mol]	$Y_{H_2/S}^d$ [mmol/g]	Cultiv. hours [h]	pH _i ^{e)} [—]	Δ pH ^{f)} [—]
Trioses										
DL-Glyceraldehyde	C ₃ H ₆ O ₃	90.1	*	0.50	*	0.1	1.2	23.0	5.43	*
Dihydroxyacetone			*	0.72	*	0.2	1.9	23.0	5.32	*
Pentoses										
D-Arabinose	C ₅ H ₁₀ O ₅	150.1	8.7	0.31	0.2	0.1	0.5	26.3	5.86	-0.48
L-Arabinose			16.1	1.54	0.6	0.7	4.7	26.3	5.90	0.38
D-Xylose			15.9	0.95	0.4	0.4	2.7	23.0	5.67	0.04
D-Ribose			*	0.55	*	0.2	1.3	23.0	6.20	0.18
Hexoses and related compounds										
Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.2	24.5 (7.0)	1.88	1	1.0	5.7	24.0	6.24	0.59
Galactose			12.3 (9.3)	1.80	0.8	1.0	5.6	21.2	6.14	0.40
D-Fructose			26.7 (8.0)	2.15	0.9	1.2	6.8	21.2	6.39	0.52
D-Mannose			25.3 (7.8)	2.19	1.0	1.2	6.9	21.2	6.20	1.14
L-Sorbose			7.9	0.06	—	—	—	20.0	6.30	-0.39
Mannitol	C ₆ H ₁₄ O ₆	182.2	43.8 (7.0)	2.79	1.2	1.6	8.9	20.0	6.50	0.59
D-Sorbitol			22.5 (7.0)	2.78	1.2	1.6	8.9	28.0	6.54	0.68
Gluconic acid	C ₆ H ₁₂ O ₇	196.2	33.2 (8.5)	1.38	1.4	0.9	4.6	23.3	6.39	0.32
Saccharides										
Sucrose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.3	22.7 (9.9)	2.33	1.0	2.5	7.4	23.5	6.31	0.71
Maltose			23.3 (8.5)	2.56	0.9	2.9	8.6	23.5	6.46	1.15
Lactose			9.2	0.40	0.1	0.3	0.9	20.5	6.33	-0.19
Polysaccharides and structural polysaccharide										
Amylose	(C ₆ H ₁₀ O ₅) _n	—	*	0.19	—	—	0.1	23.0	6.41	0.19
Glycogen			*	0.22	—	—	0.4	23.0	6.50	*
Starch			12.1	0.19	—	—	0.1	25.5	6.51	0.17
Dextrin	(C ₆ H ₁₀ O ₅) _n ·xH ₂ O	—	*	0.35	—	—	0.7	47.5	6.52	*
Chitin	(C ₆ H ₁₃ NO ₅) _n	—	*	0.16	0.0	—	0.0	23.0	6.35	*
Peptone	—	—	6.5 ^{g)}	0.16 ^{g)}	*	—	0.1	23.2	6.39	-0.35

a) Symbols: *, data not measured in the experiments; —, data difficult to define or evaluate.

b) Expressed in dry weight of cell mass grown in 30 ml culture liquid containing 1% substrate. That in parentheses means cultivating hours. Unless otherwise noticed, the cell mass was measured at the end of the cultivation.

c) Evolution rate of hydrogen from substrate referred to the rate from glucose as unity, where the rate from glucose was estimated at 11 mmol/(l-culture·h).

d) Yield of hydrogen from substrate calculated by subtracting the amount due to peptone from apparent yield.

e) Initial pH of culture liquid.

f) Subtracted final pH from initial pH.

g) Yield obtained by the cultivation under 5% peptone alone.

スと同じ速さで水素発生するかどうか知る必要があった。

そこで、糖質、脂質、アルコール類など幾種類かの物質を基質として、水素収率、水素発生速度および菌体収量を調べたので報告したい。

使用したバクテリアは、筆者らが草の葉から単離した *Enterobacter aerogenes* st. E. 82005 である。⁷⁾ 前培養は 38°C, 20時間, 好氣的に攪拌培養した。この培養によって、菌体濃度は約 1.2 mg-dry cell/ml になった。培養液は glucose 1.5%, peptone 0.5%, K₂HPO₄ 1.4%, KH₂PO₄ 0.6%, (NH₄)₂SO₄ 0.2%, sodium citrate·2H₂O 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.02% の組成であった。

水素発生の実験は、窒素源としてペプトン（日水製薬）を 5% 加え、これに水素発生を調べる基質を 1% 添加した培地で行った。培養は、30 ml の培養液を入れた 50 ml のサンプル瓶に前培養菌液を 0.25 ml 植え付け、嫌気下で行った。攪拌にはマグネチックスターを使用した。温度は 38°C であった。一基質あたり 5~10本のサンプルを用意し、同時に実験を行って平均値を測定結果とした。

グルコースを基質とした嫌気培養では、*E. aerogenes* は気体代謝産物として炭酸ガスと水素を約 2:1 の割合で発生する。水素発生量を経時的に測定するために、発生したガスは 10% NaOH 水溶液を満たした 50 ml のメスピペットに導き、水上置換した。約 10 時間で 1% 濃度のグルコースを消費するので、⁶⁾ 特殊な場合を除いておよそ 20 時間培養した後、ガス発生が止まっていることを確認してから水素収量を測定した。このとき、水上置換したガスの成分を、活性炭とモレキュラーシーブ 5A をそれぞれ充填した二台のガスクロで分析したが、CO₂ のピークは現れなかった。また、水素以外の気体の発生も認められなかった。活発にガス発生している時期については、あらかじめグルコースで発酵実験を行って、30分~1時間毎に置換ガス成分を分析したが、CO₂ のピークは認められず、NaOH 液に完全に吸収されることを確認した。

増殖した菌体は、30 ml の培養液全量をステンレスの遠心チューブに移し、10,000 rpm, 10分間遠心分離した。イオン交換水で菌を洗浄したのち、再度遠心分離した菌をステンレスチューブごと 105°C の乾燥器にいれ、乾燥前後の重量差から菌体量を測定した。菌体収量は培地 30 ml 当たりの乾燥重量で表している。

実験に使用した糖質類などの一部の基質では、植

菌後数時間で水素を活発に発生するようになる。その後数時間は、菌体の増殖の影響をあまり受けないで、ほぼ一定速度で水素を発生し、基質の減少によって急に発生速度が遅くなる。⁶⁾ この一定速度発生区間の発生量と時間の関係を最小自乗法で一次近似し、傾きから発生速度を決定した。発生速度の減少が顕著に現れた基質については、菌体量の測定を発生速度減少の時期に行った。その他の基質では培養終了時に行った。窒素源に使用したペプトンは、それ自身基質として使用される成分もあり、5% ペプトンだけで培養すると、菌体の収量は 6.5 mg, 水素発生は 0.16 mmol あった。水素収率は見かけの水素発生量からペプトンに由来すると考えられる量を差し引いて計算した。

Table 1 に糖質類の実験結果をまとめて示した。グルコースを基質とした嫌気培養では、7時間で 24.5 mg の菌体生産があった。他のヘキソースを基質とした増殖では、D-フラクトース、D-マンノースの菌体生産がグルコースと同じ程度であった。しかし、L-ソルボースでは増殖が認められず、基質特異性を示した。ガラクトースはグルコースの約 1/2 の菌体生産性しかないで、弱い基質特異性があるようであった。糖アルコールのマンニトールは非常に菌体生産性が大きく、7時間の培養で 43.8 mg まで増殖した。しかし、20時間培養後の菌体収量は 26.2 mg しか得られず、自己溶解したようであった。グルコン酸の菌体生産性も大きく、8.5時間で 33.2 mg の収量があった。二糖類のスクロースとマルトースはグルコースと同じ菌体生産性であったが、ラクトースの生産性は非常に小さかった。Bergey's Manual によると、⁹⁾ *E. aerogenes* のラクトース資化能は陽性であるので、好気下で培養して

Table 2. Cell mass grown under aerobic cultivation.

Substrate ^{a)}	Cultivation hours [h]	Growth ^{b)} [mg]	ΔpH ^{c)} [-]
Glucose	9.5	38.7	0.46
Lactose	9.5	13.8	-0.65
	29.5	36.5	0.49

^{a)} Culture medium consisted of 5% peptone and 1% substrate.

^{b)} Dry weight of cell mass grown in 30 ml of culture liquid.

^{c)} Subtracting final pH from initial pH.

Table 3. Carboxylic acids, alcohols, amino acids, and other compounds. a)

Material	Formula	mol-w	Cell mass ^{b)} production [mg]	Hydrogen evolved [mmol]	Specific ^{c)} rate [—]	$Y_{H_2/S}$ ^{d)} [mol/mol]	$Y_{H_2/S}$ ^{d)} [mmol/g]	Cultiv. hours [h]	pH _i ^{e)} [—]	Δ pH ^{f)} [—]
Carboxylic acids										
Formic acid	HCOOH	46.0	21.1	1.67	0.5	0.3	7.6	23.3	6.35	-0.85
Acetic acid	CH ₃ •COOH	60.1	3.3	0	0	—	—	22.5	7.14	0.03
Pyruvic acid	CH ₃ •CO•COOH	88.1	12.7	0.76	*	0.2	2.0	25.0	6.36	-0.43
Malonic acid	CH ₂ (COOH) ₂	104.1	23.3	0.26	0.3	0.0	0.3	22.7	6.73	-0.51
Fumaric acid	(:CHCOOH) ₂	116.1	19.2	0.17	0.0	0.0	0.0	24.4	6.44	-0.24
Succinic acid	COOH•(CH ₂) ₂ •COOH	118.1	*	0.06	—	—	—	24.0	6.61	-0.20
DL-Malic acid	COOH•CHOH•CH ₂ •COOH	134.1	18.7	0.31	0.1	0.0	0.4	24.3	6.43	-0.31
L-Malic acid	—	134.1	14.1	0.12	—	—	—	25.4	7.63	0.45
Alcohols										
Methanol	CH ₃ OH	32.0	4.5	0.05	—	—	—	21.0	6.84	-0.07
Ethanol	CH ₃ •CH ₂ •OH	46.1	6.2	0.09	—	—	—	22.7	6.73	-0.40
2-Propanol	(CH ₃) ₂ •CHOH	60.1	6.7	0.13	—	—	—	27.1	6.69	-0.39
Amino acids										
D-Threonine	CH ₃ •CHOH•CH(NH ₂)•COOH	119.1	7.5	0.14	—	—	—	25.5	6.45	-0.33
L-Threonine	—	119.1	12.4	0.86	0.1	0.3	2.3	113	6.49	-0.02
L-Glutamic acid	COOH•(CH ₂) ₂ •CH(NH ₂)•COOH	147.1	14.2	0.15	—	—	—	24.3	6.41	-0.33
Vitamin and Coenzyme										
L-Ascorbic acid	C ₆ H ₈ O ₆	176.1	35.1	2.19	0.6	1.3	7.6	24.4	6.42	-0.03
Inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.2	23.1	0.94	*	0.5	2.6	22.8	6.42	0.33
Peptone	—	—	6.5 ^{g)}	0.16 ^{g)}	*	—	0.1	23.2	6.39	-0.35

a) Symbols: *, data not measured in the experiments; —, data difficult to define or evaluate.

b) Expressed in dry weight of cell mass grown in 30 ml of culture liquid containing 1% substrate.

c) Evolution rate of hydrogen from substrate referred to the rate from glucose as unity, where the rate from glucose was estimated at 11 mmol/(-culture•h).

d) Calculated by subtracting the amount due to peptone from apparent yield.

e) Initial pH of culture liquid.

f) Subtracted final pH from initial pH.

g) Yield obtained by the cultivation under 5% peptone alone.

菌体生産性を測定した。その結果、Table 2 に示すように、グルコースに比べると生産性は小さいが、ゆるやかに増殖した。多糖類では、デンプンを基質としてわずかに増殖した。しかし、可溶性デンプンを炭素源とする寒天平板培地での観察では、コロニーの成長はグルコースに比べて非常に遅かった。

E. aerogenes st. E. 82005 はグルコースから約 11 mmol/(l-culture·h) の速さで水素を発生した。他の基質から水素を発生する速度をグルコースの発生速度との比で表して比較すると、グルコン酸の水素発生速度が最も速く、グルコースの 1.4 倍の速さで水素を発生した。また、マンニトール、D-ソルビトールからもグルコースの 1.2 倍の速さで水素を発生した。基質からの水素収率は、グルコースの 1.0 mol/mol-substrate に対して、マンニトール、D-ソルビトールでは 1.6 mol/mol-substrate と大きかった。二糖類のスクロースとマルトースも収率は大きく、基質 1 g 当たりで比べると、グルコースの 1.3~1.5 倍の収率になった。しかし、多糖類を直接資化する力は弱いようで、検査した多糖類からは水素発生がほとんど見られなかった。

Table 3 にその他の基質の実験結果をまとめて示した。酢酸と、メタノールを基質とした培養では、ペプトンのみで培養したときより菌体生産量が少なく、増殖を阻害するようであった。測定した多くの基質では菌体生産が見られたが、中でも、L-アスコルビン酸は 8.5 時間の培養で 28.5 mg, 24.4 時間の培養後でも 35.1 mg の菌体収量があり、生産性の高い基質であった。

Escherichia coli では、ピルビン酸のリン酸化分解過程で生じるギ酸が更に分解され、水素と炭酸ガスが発生するといわれている。^{10,11)} *E. aerogenes* と *E. coli* は同じ科に属している⁹⁾ので、*E. aerogenes* もギ酸を分解して水素を発生していると考えられた。しかし、ギ酸の分解による発生速度はグルコースの 1/2 しかなかった。ピルビン酸からの水素発生速度もギ酸とほぼ同じであった。ギ酸・ピルビン酸分解による水素発生の理論水素収率は 1 mol/mol-substrate であるが、これらの基質からの水素収率は約 0.3 と小さかった。L-アスコルビン酸は、水素発生速度こそグルコースより遅かった(約 0.6 倍)けれども、水素収率は 1.3 mol/mol-substrate と大きかった。

基質の水素を有効に利用するということでは、水素収率は大きいほど良い。したがって、マンニトール、D-ソルビトール、マルトース、スクロースなどは、そ

の様な観点からはグルコースより優れた基質であると言える。スクロースの水素収率がグルコースより大きかったことは、粗糖、精製糖の生産過程で排出される廃糖蜜を利用した水素生産に希望を抱かせる。また、マンニトール、D-ソルビトールは、ワカメなど褐藻類に多く含まれている¹²⁾ので、海藻バイオマスの利用が考えられる。さらに、マンニトール、L-アスコルビン酸、グルコン酸は菌体生産性が極めて大きいので、これらの基質を増殖活性剤として利用できるのではなからうか。

デンプンを直接資化する力が弱く、水素を発生しないことから、デンプンやセルロースを利用するには、アミラーゼの添加など分解処理操作を必要とすることが分かった。これは、安価な水素生産を目指す上では短所であると言える。

糖質類の培養では、水素発生の盛んな基質、増殖の盛んな基質の培養後 pH は培養前より酸性に移動した。これは酸を代謝生成したためと考えられる。一方、水素発生、あるいは増殖の少ない基質では培養前よりアルカリ側に变化した。DL-リンゴ酸を基質にしたときにはコハク酸、フマル酸、酢酸を代謝生成していることが液クロ分析で観察された。それにもかかわらず、pH はアルカリ側に移っているので、基質の分解による酸の代謝生成だけでは説明できない部分がある。このような培地の pH 変化は、ペプトンの加水分解による緩衝作用にも起因していると考えられるが、これは今後の課題である。

要約 発酵で水素を発生する *Enterobacter aerogenes* st. E. 82005 が水素発生にどのような基質を利用できるか、ペプトンを窒素源に使用して調べた。糖質類では、多くの単糖・二糖類からグルコースと同じ様に活発に水素を発生した。中でも、グルコースの酸化物であるグルコン酸からは、グルコースの 1.4 倍の速さで水素を発生することが分かった。グルコースの水素収率は約 1.0 mol/mol-substrate であったが、マンニトール、ソルビトールからは 1.6 mol/mol-substrate の収率で水素が得られた。スクロース、マルトースを基質とした場合には、重量当たりで比較して、グルコースの 1.3~1.5 倍の収率があり、変換効率の良い基質であった。ラクトースは嫌気条件では水素発生がほとんど無く、菌の増殖もわずかであったが、好気条件であれば、グルコースより増殖速度は遅いけれども増殖することが分かった。ギ酸の分解による水素発生はグルコース分解による水素発生より遅かった。検査した

カルボン酸類は水素発生には適していなかったが、菌体は増殖した。L-アスコルビン酸、グルコン酸、マンニトールの菌体収量は非常に大きいことが分かった。マンニトールではグルコースの約2倍にもなった。

文 献

- 1) Kondratieva, E. N., Gogotov, I. N.: *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **28**, 139-191 (1983).
- 2) Zajic, J. E., Kosaric, N., Brosseau, J. D.: *Adv. Biochem. Eng.*, **9**, 57-109 (1978).
- 3) Vignais, P. M., Colbeau, A., Willison, J. C., Jouanneau, Y.: *Adv. Microb. Physiol.*, **26**, 155-234 (1985).
- 4) Philips, E. J., Mitui, A.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1212-1220 (1983).
- 5) Miyake, J., Kawamura, S.: *Int. J. Hydrogen Energy*, **12**, 147-149 (1987).
- 6) Tanisho, S., Suzuki, Y., Wakao, N.: *Int. J. Hydrogen Energy*, **12**, 623-627 (1987).
- 7) Tanisho, S., Wakao, N., Kosako, Y.: *J. Chem. Eng. Japan*, **16**, 529-530 (1983).
- 8) 谷生重晴, 島崎 健, 若尾法昭: 化学工学論文集, **14**, 230-233 (1988).
- 9) Brenner, D. J.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. (Krieg, N. R., Holt, J. G.), Vol. 1, pp. 408-420, Williams & Wilkins, Baltimore (1984).
- 10) Stanier, R. Y., Ingraham, J. L., Wheelis, M. L., Painter, P. R.: *The Microbial World, 5th Ed.*, p. 440, Prentice-Hall, Englewood Cliffs (1986).
- 11) Wood, W. A.: *The Bacteria*, (Gunsalus, I. C., Stanier, R. Y.), Vol. 2, pp. 83-86, Academic Press, New York (1961).
- 12) Benson, F. R.: *Encyclopedia of Chemical Technology*, (Mark, H. F., McKetta, J. J., Othmer, D. F.), p. 574, John Wiley & Sons, Inc., New York (1963).