

第2章 水素発生微生物の探索

2.1 水素発生微生物の探索

1978年8月スイスのチューリヒで開かれた第2回水素エネルギー国際会議で、微生物を利用した水素生産に関する二つの興味ある研究が発表された。ひとつは微生物を利用した太陽水素生産¹⁾であり、もうひとつはヒドロゲナーゼとクロロプラストを組み合わせた光水素発生²⁾であった。どちらの発表も非常に熱のこもった発表で、発生量や発生速度は微々たるものであったが、近い未来に、生物あるいは生物機能を利用した大量水素生産の可能性を感じさせるものであった。

このときの印象が強く残っていたので、筆者が1982年に微生物を利用した水素発生を研究目標に設定したときも、初めは、光化学反応経路の NADH を利用した水素発生を考えていた。八木の総説³⁾によると、ある種のクロレラを暗所嫌気条件に置くと水素発生がみられるらしいので、系統のハッキリしているクロレラ (*Chlorella vruugalis* 11h) を、東京大学応用微生物研究所宮地重遠研究室の都筑幹夫先生に分けて頂いたり、また、野生の微生物から水素発生の活発な藻類を見つけるために、屋外実験水槽の水をビーカーに採取して培養を行って図 2.1-1 の器具で水素発生を観測したが、色々な試行実験を行う中で、オシロイバナ (*Mirabilis jalapa* L.) の葉をすりつぶした液を加えて培養したときに、それまでに観測された水素発生に比べて桁違いに多い水素発生が観測された。

この水素発生は、光水素発生ではなく発酵水素発生であることが判明したので、光水素発生と発酵水素発生の長短を検討した結果、(1)光水素発生は太陽光をエネルギー源とするので発酵水素発生のように有機エネルギー源を必要としない利点を持つが、(2)緑藻、藍藻などの倍加時間は10時間～数10時間と非常に長いので、十数分～数十分で倍加する発酵微生物の方が実験は容易であること、それに対し、(3)これまでの経験から、緑藻、藍藻の培養には熟練を要すること、(4)光水素発生は発生速度が遅いこと、(5)光水素発生は太陽光を必要とするので終日発生はできないが、発酵水素発生なら終日発生が可能であること、(6)発生量は光を利用すると面積に比例するのに対し、発酵では体積に比例することなど、発酵水素発生の方が利点を多く持っているので、発酵水

第2章 水素発生微生物の探索

素発生に研究目標を切り替えることにした。

草の葉に棲む微生物が水棲微生物より活発に水素発生することがわかったので、オシロイバナの葉だけでなく、大学の内外、その他手近にある草木を精力的に採取し、図 2.1-1(b) の器具で水素発生を観察した。実験はすり鉢で資料をすり潰し、濃度などは考慮しないで市水を加えただけの簡単なものであったが、その結果、サツマイモの葉汁やヤマイモの葉汁からはかなり活発な発生がみられ、タンポポ、スズメノテッポウなどからも発生することがわかった。中でも最も活発に水素発生するのは、初めに見つけたオシロイバナの葉汁であった。

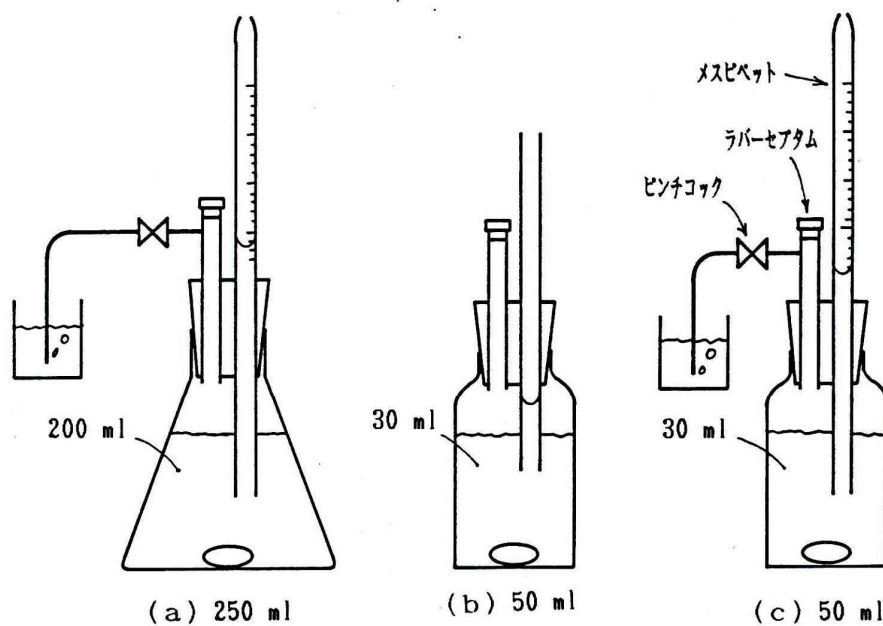


図 2.1-1 ガス発生測定装置概略図

2.2 水素発生菌の単離と同定

活発に水素発生をしているオシロイ花の葉汁を顕微鏡で観察すると、非常に多くの微生物が認められ、どの微生物が水素を出しているのか、その微生物は何という名前なのか単離同定をしなければならなかったことが分かった。当時、筆者には微生物を単離し、同定するための知識や技術がなかったので、若尾法昭教授のお口添えと理化学研究所遠藤勲先生のご紹介により、理化学研究所微生物系統保存施設の小迫芳正氏にこれらの微生物の単離と同定をお願いした。単離同定は次の方法で行っている。

第2章 水素発生微生物の探索

2.2.1 単離方法

オシロイバナ培地の検体を、

- (1)ハートインフュージョンブイヨン増菌培地（Heart Infusion broth）で 37℃12～14 時間培養し、
- (2)増菌培地の検体をマッコンキー寒天培地（MacConkey ager）と血液寒天培地（Blood ager）に植え付けて 37℃1 日培養する。
- (3)それぞれの寒天培地上に生えたコロニーから性質の異なるコロニーを一個ずつ釣菌し、
- (4)もう一度血液寒天培地に植え付けて 37℃1 日テスト培養をする。
- (5)均一なコロニーが生えていれば単離は成功である。

このようにして表 2.2-1 に示した 7 株の菌を単離した。Gram 染色テストから No.82001, 82006, 82007 は Gram 陽性菌、No.82002 から 82005 までは Gram 陰性菌であることが判明した。No.82002, 82003, 82005 はコロニーの形状などから同一の菌であると考えられたので、No.82004 と 82005 について、さらに TSI 寒天培地でガス発生のテストを行った。その結果、No.82004 は硫化水素産生菌であり、No.82005 はグルコースを分解してガスを発生する菌であることがわかった。

表 2.2-1 オシロイバナ培地棲息菌の単離結果

Colony	No.
Bacillus like	82001
Smooth colony	82002
Pink colony	82003
H ₂ S+ colony	82004
H ₂ S- colony	82005
Opaque colony	82006
Translucent colony	82007

補足

培地の組成、機能、目的などは、坂崎利一著「新細菌培地学講座」⁴⁾や「“栄研”マニュアル」⁵⁾に詳しい説明があるが、筆者らが単離に用いた培地についてその機能と使用目的を以下に簡単に記す。

第2章 水素発生微生物の探索

(イ)ハートインフュージョンブイヨン培地は、ウシ心臓浸出液とペプトンを含む流動培地で、多くの菌が増殖する一般的増菌培地である。増菌培養は、菌数が少ない場合などに、菌数を増やしたり混在する菌を抑えて目的菌の増殖を促すために行う。

(ロ)マッコンキー寒天培地は、MacConkey がチフス菌分離培地として開発したものを改良した培地であり、胆汁酸塩によってグラム陽性菌の発育を阻止し、大腸菌と他の病原菌との判別を容易にする。

(ハ)血液寒天培地は、ハートインフュージョン培地かトリプトソーヤ培地 (Tripto-Soya ager) にヒツジ、ウマ、ウサギなどの動物の血液を加えた培地で、血液を添加することで菌の増殖をよくすることと、菌の溶血性を観察するのに適している。

(ニ)トリプトソーヤ寒天培地は一般増殖用の培地で、ペプトンと塩化ナトリウムでできた培地である。筆者は単離した菌の植え継ぎと保存にこの寒天培地を使用した。

(ホ) TSI 寒天培地は Triple Sugar Iron 培地の略称で、ブドウ糖、乳糖、白糖の分解性と、ブドウ糖からのガス産生性および硫化水素産生性を検査する培地である。この培地は半高層につくり、ブドウ糖分解性は高層部の黄変、乳糖および白糖分解性は斜面部の黄変、ガス産生は高層部における気泡または亀裂の有無、硫化水素の発生は高層部の黒変によって判定する。

2.2.2 同定方法

単離した7株の菌のうち、Gram 陰性で硫化水素を発生しない No.82002 と No.82005 を、同定キットの API20E(API System S.A., France; アスカ純薬) で検査した。API20Eは腸内細菌および他の Gram 陰性桿菌をシステマティックに同定するキットで、23 の生化学検査を簡便に行うことによって、その結果から検査菌に最も近い性状を示す菌の名前とその同定確率を与えてくれる。

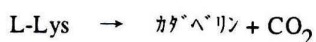
23の生化学検査は次のものである。

ONPG (Ortho-Nitrophenyl-Galactopyranocide) : 乳糖分解に作用する酵素 β -ガラクトシダーゼを細菌が産生するか否かを調べる。酵素が産生されると、ONPG が加水分解されて黄色の O-ニトロフェノールを生ずる。

ADH (Arginine Dihydrolase) : アルギニン加水分解酵素を産生するか否かを調べる。

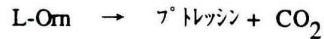


LDC (Lysine Decarboxylase) : リシン脱炭酸酵素を産生するか否かを調べる。



第2章 水素発生微生物の探索

ODC (Ornithine Decarboxylase) : オルニチン脱炭酸酵素を産生するか否かを調べる。



CIT (Citrate de Simons) : 単一炭素源として与えられたクエン酸ナトリウムを利用できるか否かを調べる。シモンズの培地ではリン酸二水素アンモニウムの利用も判定できる。

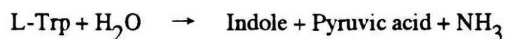
H₂S : 硫化水素産生の判別を行う。

URE (Urease) : 尿素分解酵素ウレアーゼを産生するか否かを調べる。



TDA (Tryptophan Deaminase) : トリプトファンを基質として、脱アミノ反応を行うか否かを調べる。分解によってインドールピルビン酸 (IPA) ができるので、IPA 試験ともいう。脱アミノ反応には、フェニールアラニンを基質に使用して調べる PPA 試験もある。

IND (Indole) : トリプトファン分解酵素であるトリプトファナーゼを産生するか否かを調べる。



VP (Voges-Proskauer) : グルコースよりアセトイン(アセチルメチルカルビノール)を産生するか否かを調べる。アセトインは2,3-ブタンジオール生成の中間産物であり、メチルレッド(MR)試験と一緒に用いて2,3-ブタンジオール発酵か否かを知る。

GEL (Gelatin Hydrolysis) : ゼラチン液化酵素(gelatinase)の産生を調べる。この酵素は菌体外に産出される。

GLU (Glucose) : グルコースを基質とした発酵の可否を調べる。

MAN (Mannitol)、INO (Inositol)、SOR (Sorbitol)、RHA (Rhamnose)、SAC (Saccharose)、MEL (Melibiose)、AMY (Amygdaline)、ARA (Arabinose) : これらは発酵によって培地が酸性になるかどうか調べる糖分解試験である。

OX (Oxidase) : チトクロームオキシダーゼ試験とも言い、電子供与体から電子を酸素に移して酸素を水に還元する酵素の存在を調べる。Gram 陰性桿菌の同定には特に大切な試験である。

NIT (Nitrite Production) : 硝酸塩を還元するか否かを調べる。



CAT (Catalase) : 過酸化水素を水と酸素に分解する酵素の存在を調べる。

細菌の鑑別に用いられる生物化学的性状検査には、大別して1)炭水化物分解試験、2)アミノ酸分解試験、3)呼吸酵素に関する試験、4)菌体外酵素の産生試験、5)有機酸塩の利用試験、6)

第2章 水素発生微生物の探索

硝酸塩還元試験、7)色素産生性、8)菌体外層の構造と機能に関する試験、9)その他の性状検査がある⁶⁾。API20E で検査した各項目では、ONPG、VP、GLU、MAN、INO、SOR、RHA、SAC、MEL、AMY、ARA が炭水化物分解、ADH、LDC、ODC、TDA、IND がアミノ酸分解、OX、CAT が呼吸酵素、GEL が菌体外酵素の産生、CIT が有機酸塩利用、NIT が硝酸塩還元各試験に相当している。菌体外層の構造と機能に関する試験の一つに菌の運動性があるが、これは寒天培地上のコロニーの形状から判定する。

2.2.3 同定結果

API20Eによる生化学検査の結果を表 2.2-2 に示した。No.82002, 82005 は全く同じ検査結果になり、プロファイルインデックスで同定すると、97.5 %の確率で *Enterobacter aerogenes* であることがわかった。Bergey's Manual of Systematic Bacteriology⁷⁾に記載されている *Enterobacter aerogenes* の同定データを抜き出しAPI20 の検査項目と突き合わせても、全く一致していることがわかる。ただし、TDA検査はトリプトファンを基質に使用して脱アミノ反応を調べるのに対し、Bergey's manual ではフェニールアラニンを使用して脱アミノ反応を検査した結果を表示している。また、AMY (Amygdaline)分解検査は Bergey's manual には記載されていない。表 2.2-3 は Bergey's Manual of Systematic Bacteriology に記載されている *Enterobacter* 科の同定表の一部である。

2.2.4 考察

(1)上記の単離同定プロセスによって、オシロイバナから単離した7種の菌株のうち、2株は腸内細菌 (Enteric bacteria) の一種で通性嫌気性菌の *Enterobacter aerogenes* であることが判明した。残りの菌株については同定試験を行わなかったが、これら7菌株は小迫氏のもとで管理され、微生物系統保存施設に保存されている。したがって、必要ならば同定を行うことも可能である。

(2)ところで、この単離同定プロセスには反省すべき点がある。それは、オシロイバナ培地だけでなくヤマモ培地など他の水素発生が活発であった培地にもいたと思われる偏性嫌気性菌の単離を、はじめから除外して行っている点である。偏性嫌気性菌の中には、*Clostridium* 属のように、水素発生をすることでよく知られている菌があり、これらの菌がオシロイバナ培地などで活発に水素を発生していた可能性を否定することはできない。したがって、好気性あるいは通性嫌気性で、Gram 陰性の腸内細菌およびその他の Gram 陰性桿菌だけを同定の対象としたこのプロセスでは、水素発生能のより高い菌を見落としした可能性も残っている。

表 2.2-2 API20E による野生菌株の同定検査

	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL
No.82002	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-
No.82005	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-
Enterobacter aerogenes in Bergey's Manual	+	-	+	+	+	-	-	(-)	-	+	-

GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX
+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
+	+	+	+	+	+	+		+	-

表 2.2-3 Bergy's Manual に記載されている *E. aerogenes* の生化学的性状検査表

Table 5.3. Biochemical identification of Enterobacteriaceae*

Characteristics	<i>Cedrecea dauizae</i>	<i>Cedrecea lupagei</i>	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	<i>Citrobacter diversus</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Eduardasiella hahninae</i>	<i>Eduardasiella ictalur?</i>	<i>Eduardasiella tarda</i>	<i>Eduardasiella tarda</i> biogroup 1	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterobacter agglomerans</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter gergoviae</i>	<i>Enterobacter intermedius</i>	<i>Enterobacter sakazakii</i>	<i>Escherichia adecarboxylata</i>	<i>Escherichia blattae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> , inactive	<i>Hafnia alvei</i>
Indole production	-	-	+	+	-	[-]	-	+	+	-	[-]	-	-	-	-	+	-	+	+	-
Methyl red	+	d	+	+	+	+	-	+	+	-	d	-	d	d	[-]	+	+	+	+	d
Voges-Proskauer	[+]	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	d
Citrate, Simmons'	+	[+]	[+]	+	+	-	-	+	+	+	d	+	+	+	+	-	d	-	-	-
Hydrogen sulfide on TSI	-	-	-	-	[+]	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Urease, Christensen's	-	-	[+]	[+]	d	-	-	-	-	-	[-]	d	+	d	-	d	-	-	-	-
Phenylalanine deaminase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[-]	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Lysine decarboxylase	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Arginine dihydrolase	d	[+]	[+]	d	d	-	-	+	+	-	-	+	d	+	+	-	+	[+]	d	
Ornithine decarboxylase	+	-	+	+	[-]	+	d	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	d	[+]	+
Motility	+	[+]	+	+	+	+	-	+	+	+	[+]	+	+	+	+	+	-	[+]	-	+
Gelatin liquefaction at 22°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-
KCN, growth in	[+]	d	+	-	+	-	-	-	-	+	d	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Malonate utilization	[+]	+	[+]	+	[-]	+	-	-	-	d	+	+	+	+	+	+	+	-	-	d
D-Glucose, acid production	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucose, gas production	[+]	+	+	+	+	d	d	+	+	+	[-]	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Lactose	-	d	d	d	d	-	-	-	-	+	d	+	d	+	+	+	+	+	[+]	-
Sucrose	+	-	[-]	[-]	d	+	-	-	-	+	[+]	+	+	+	+	+	+	+	d	[+]
D-Mannitol	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dulcitol	-	-	-	d	d	-	-	-	-	+	[-]	[-]	-	d	-	+	-	d	d	-
Salicin	+	+	d	[-]	-	d	-	-	-	+	d	[+]	+	+	+	+	-	d	-	[+]
D-Adonitol	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	[-]	-	-	-	+	-	-	-	-
myo-Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	[-]	[-]	-	-	[+]	-	-	-	-	-
D-Sorbitol	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	d	+	+	+	+	-	-	+	+	+
L-Arabinose	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	-	-	-	-	d	-	-	-	-	+	d	+	+	+	+	+	-	d	[-]	-
L-Rhamnose	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	[+]	d	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	[+]	+	+	+	+	+	+	+	[+]	+
D-Xylose	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	[+]	+	+
Cellobiose	+	+	+	+	d	-	-	-	-	+	d	+	+	+	+	+	-	-	-	[+]
α -Methyl-D-glucoside	-	-	-	d	-	-	-	-	-	+	-	[+]	-	d	+	+	-	-	-	-
Esculin hydrolysis	d	+	-	-	-	-	-	-	-	+	d	d	+	d	+	+	-	d	-	-
Melibiose	-	-	[-]	-	d	-	-	-	-	+	d	+	+	d	+	+	-	[+]	d	-
D-Arabitol	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	d	[-]	+	-	-	+	-	-	-	-
Mucate	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	d	[+]	-	d	-	+	d	+	d	-
Lipase, corn oil	[+]	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Deoxyribonuclease at 25°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	[+]	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase, Kovacs'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ONPG (β -galactosidase)	[+]	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	d	+	+	+	-	+	d	+
Yellow pigment	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[+]	-	-	-	+	+	-	-	-	-
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

*Symbols: +, 90-100% of strains are positive; [+], 76-89% positive; d, 26-75% positive; [-], 11-25% positive; -, 0-10% positive. Data are calculated for a 48-h incubation period unless otherwise indicated (gelatin liquefaction and deoxyribonuclease). The incubation temperature was $36 \pm 1^\circ\text{C}$ for all species except *Yersinia ruckeri* and *Xenorhabdus* species, which were incubated at $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

第2章 水素発生微生物の探索

2.3 水素発生速度の測定

単離した7菌株のどの株が水素発生に優れているか知るために、まず TSI 寒天培地でガス発生状況を観察した。高層の亀裂発生状況及びガス発生による寒天の浮上程度などから判断すると、No.82005 が最もよく浮上するようであり、No.82002 が二番目によく亀裂が発生し浮上するようであった。そこで、No.82005 を使用して水素発生速度を測定した。

2.3.1 実験方法

培地の選択

水素発生や代謝など生理化学的研究を行う場合、培地の選択は重要な問題である。増菌して細胞成分を抽出するときには、栄養分が豊富な複合培地を使用すべきであるが、基質に起因する収率などの代謝研究では、合成培地を使用した方が培養後の検討が容易である。単離菌の水素発生速度の測定にあたっては、どのような合成培地を選ぶか考えなければならない。

検討した合成培地、複合培地の組成を表 2.3-1 に示した。KNOP 培地は一般藻類用培地を変形したもの⁸⁾で、BSW23 は同調培地 (W23) を *Bacillus subtilis* 用に改編したもの⁹⁾、Spizizen は枯草菌 (*Bacillus*) 用の最少培地としてよく利用される培地で、大腸菌用の最少培地 Davis-Mingioli 培地を2倍濃くした合成培地である¹⁰⁾。KNOP 培地ではガス発生がみられなかったが、BSW23 培地と Spizizen 培地からは水素ガスが発生した。Fe、Mn 成分を加えた BSW23 培地より Spizizen 培地の方がたくさん水素発生したが、これは、Fe、Mn などの微量無機成分の影響よりも、グルコース濃度に原因があると考えられた。また、ペプトンは市販培地の多くに使用されており、菌の増殖などに良い結果をもたらすようなので、培地成分の種類の少ない Spizizen 培地を基本に、ペプトンを加えた改編培地 (Spizizen-Peptide, SP 培地) で水素発生速度を測定することにした。

菌の準備

トリプトソーヤ寒天培地は菌の増殖に非常に優れているので、No.82005 菌のコロニーを滅菌水に懸濁させ、この液を寒天培地に薄く流して 37 °C、20 時間好氣的に培養した。寒天培地全面に生えた菌をステンレスのヘラでかきとり、滅菌水で洗ったのち遠心分離して集菌した。Helber 計算盤を用いて計算した菌体濃度は [文献12, p.200]、約 1.80×10^{10} 個/ml であった。この菌液 2 ml を 200 ml の本培養液に植え付けて測定を始めた。

表 2.3-1 培地一覧

成分	合成培地			複合培地		
	KNOP	BSW23	Spizizen	SP	GPP	Trypto-Soya
Ca(NO ₃) ₂	5.000					
KH ₂ PO ₄	1.250	6.000	6.000	6.000		
K ₂ HPO ₄		14.000	14.000	14.000	5.000	
(NH ₄) ₂ SO ₄		2.000	2.000	2.000		
Na-Citrate·2H ₂ O		1.000	1.000	1.000		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.250	0.200	0.200	0.200		
NaCl	0.600					5.000
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.001	0.002				
MnCl ₂ ·4H ₂ O		0.002				
Glucose			5.000	15.000	5.000	
Peptone				5.000	7.000	20.000
pH	6.300	6.000	7.000	7.000	6.900	7.300

実験装置と方法

実験装置は図 2.1-1 (a) に示したような構造をしている。250 ml の三角フラスコに 200 ml の SP培地を入れ、2 ml の菌液を加えたあと、1 ml のメスピペットとサンプルガス抜き口、ガス放出パイプのついたシリコン栓をして、メスピペットから Ar を吹き込み気相の空気を置換した。恒温室の温度を 38 ~ 39 °C に保ち、マグネチックスターラーで攪拌しながら培養した。

表 2.3-2 ガスクロマトグラフ分析条件

	A	B
Column		
packing	molecular sieve 5A	activated carbon
dimension	Φ3 x 1000 mm	Φ3 x 500 mm
Temperature	room temp.	room temp.
Carrier gas	Ar	He
Flow rate	30 ml/min	30 ml/min
Detector	TCD	TCD

第2章 水素発生微生物の探索

ガス発生が活発になってから、定時的にガス放出パイプをピンチコックで閉じ、メスピペットのメニスカスが 0.1 ml 上昇する時間を測定した。また、1 ml 以上のガスサンプルを抜き取ることができるようになってからは、サンプル抜き取り口からガスシリンジでガスを抜き取り、ガスクロにかけて気相成分の分析をした。

ガスクロは2台使用し、充填物にはモレキュラーシーブ5Aと活性炭を用いた。表 2.3-2 に諸条件を記している。モレキュラーシーブ5Aで H_2 、 N_2 、 O_2 などを分析し、活性炭で CO_2 、Arなどを分析した。

2.3.2 実験結果

ガス発生速度の測定結果を図 2.3-1 に示した。Run No.12101 と Run No.20201 は Ar で気相の空気を置換したときのガス発生状況である。ガス発生速度は、菌体の発育状況を無視して、培地単位体積当りで表している。Run No.12101 では最大ガス発生速度になったあと、緩やかに発生速度が遅くなっているが、Run No.20201 では急速に発生速度が遅くなった。急速に発生速度が遅くなったのは、グルコースが消費されて濃度が薄くなったためであるが、基質の濃度変化と発生速度の関係は第3章で明らかにする。Run No.12101 と Run No.20201 のいずれも最大ガス発生速度は 675~725 ml/(l-culture·h) であり、*Enterobacter aerogenes* No.82005 菌のガス発生速度と考えられる。

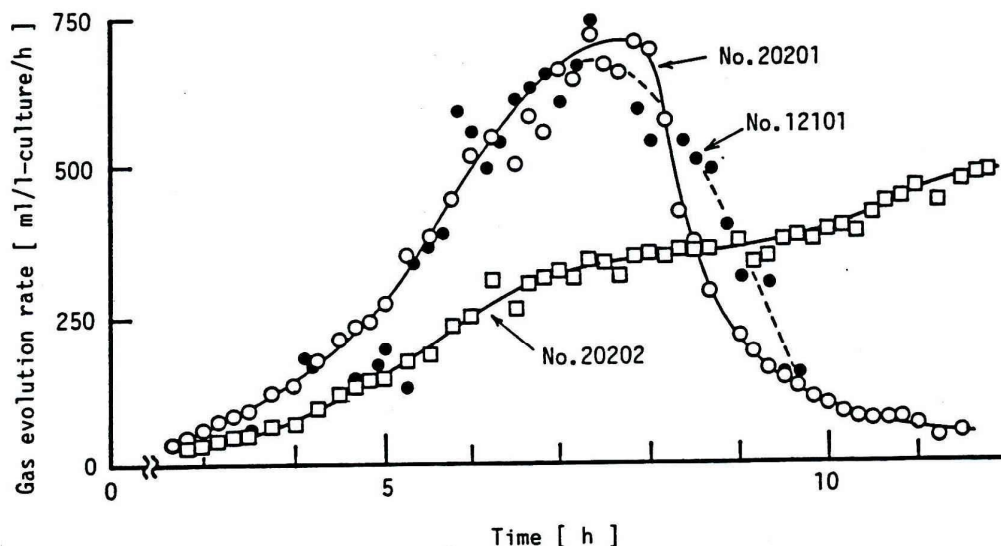


図 2.3-1 *Enterobacter aerogenes* strain E.82005 のガス発生速度

第2章 水素発生微生物の探索

E. aerogenes は SP 培地から 2 種類の気体成分を発生し、それは H_2 と CO_2 であることがガスクロ分析で明らかになった。図 2.3-2 (a) は Run No.12101 の気相成分の分析から H_2 の発生ガスに占める割合を計算して表したものである。気相に現れた H_2 と CO_2 の濃度比は一定ではなく、発酵の経過と共に変化することがわかる。 CO_2 は、水への溶解度が非常に大きいので、発生の初期ではその多くが培養液に解け、そのため水素の割合が多くなったと思われる。また、ガス発生の終期では、 CO_2 の溶解する速度が無視できなくなり、水素の濃度比が再び大きくなったのではなかろうか。

図 2.3-2 (b) は図 2.3-1 の全ガス発生速度から、図 2.3-2 (a) を使用して計算した各成分の発生速度変化を図示している。これによって、No.82005 菌の最大水素発生速度は $210 \text{ ml/(l-culture}\cdot\text{h)}$ 、最大炭酸ガス発生速度は $500 \text{ ml/(l-culture}\cdot\text{h)}$ になることが明らかになった。この最大水素発生速度は、当時(1982年)、鈴木周一東工大教授らが新聞にトピックスとして発表した *Clostridium butyricum* の水素発生速度 $180 \text{ ml/(l-culture}\cdot\text{h)}$ ^{11,12} や *Rhodopseudomonas sphaeroides* の水素発生速度

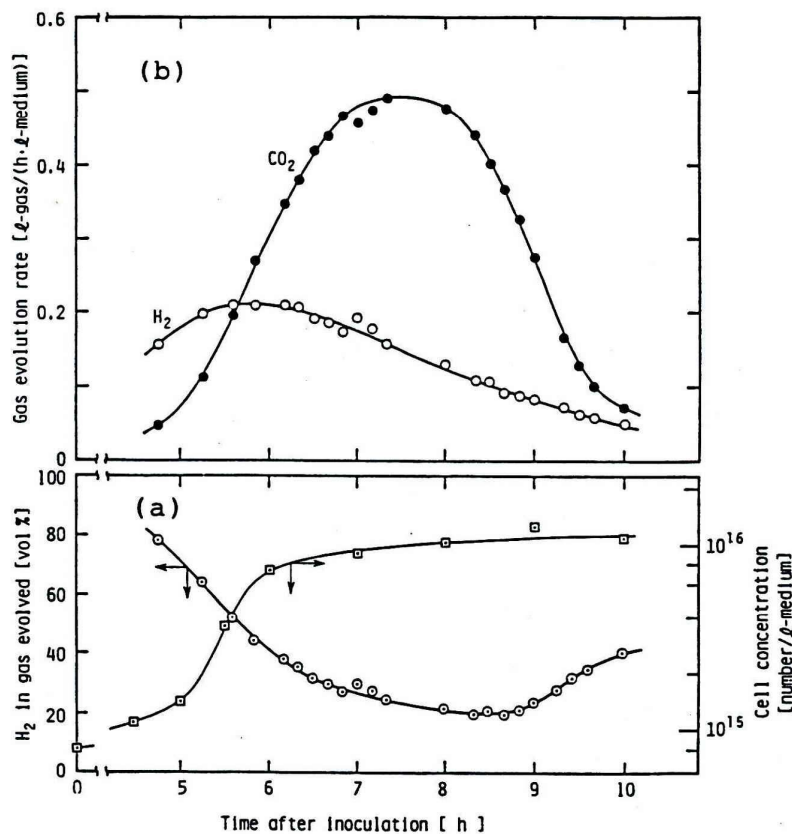


図 2.3-2 *E. aerogenes* st. E.82005 のガス発生速度と菌体増殖

第2章 水素発生微生物の探索

200 ml/(l-culture·h)¹³⁾より速く、今後有力な水素発生微生物になることが期待された。また、(b) 図で水素発生速度が最大になるのは炭酸ガス発生速度が最大になる前であり、最大になったあとは、炭酸ガス発生速度が増加しているにもかかわらず、水素発生速度は漸減している。このことから、H₂発生とCO₂発生は、菌の代謝反応経路の中で、連動していない別々の反応であることが推測された。

図 2.3-2 (a) には Run No.12101 の培養による菌体濃度の変化を一緒に示している。菌を植え付けてから 3~4 時間までは余り菌体増加をしておらず、誘導期であると思われる。5~6 時間で急速に増加しているのでこの期間が対数期であろう。その後、緩やかな増加をする減速期に入り、7 時間以後は定常期であると思われる。水素発生は 5.5 時間前後で最大になっているので、減速期に最も早くなったことがこの図から明らかになった。

2.3.3 考察

図 2.3-1 の Run No.20202 は、植菌後培養液にCO₂を吹き込んで培地のCO₂濃度を始めから高くしておき、気相のCO₂を Ar で置換して実験を行った結果である。No.20202 のガス発生速度は、Ar 置換だけの Run No.20201 とは非常に異なり、No.20201 で発生がほぼ終息している時間においても、なお緩やかな増加を続けている。*E. aerogenes* は自らCO₂を活発に発生しているので、CO₂飽和に近い状況下でCO₂とH₂を発生しているのではないかと考えられたが、CO₂飽和下では全く異なったガス発生を行うことが観察された。CO₂を吹き込むことによって培地の初期 pH が異なっていた可能性があるため、第3章では培地 pH と水素発生との関係などを述べる。

2.4 結論

(1) 従来、*Clostridium* 属の菌の水素発生能が優れていることが知られており、発酵による水素発生の実験では主に *Clostridium* が用いられてきた。鈴木周一ら^{12,14,15)}は、固定化した *Clostridium butyricum* を使用した連続発酵で、約 180 ml/(l-culture·h) の水素発生に成功したことを報告しているが、筆者らが単離した No.82005 菌は、*C. butyricum* に比べておよそ 17 % も発生速度が速いことがわかった。培地体積当りの水素発生速度は菌の正しい水素発生能を表わすものではないが、このことから、最も水素発生能の優れた野生微生物の一つをオシロイバナ培地から発見したと考える。この野生微生物は *Enterobacter aerogenes* の生物化学的性状を持つので、今後は、この菌を *E. aerogenes* strain E.82005 と呼ぶことにした。

第2章 水素発生微生物の探索

(2) *C. butyricum* は偏性嫌気性であるため、酸素の存在に非常に敏感で増殖阻害が生ずるのに対して、*E. aerogenes* は通性嫌気性であるから、酸素があると増殖が活発になるという性質を持つ。また、*E. aerogenes* の水素発生は溶存酸素を消費した後で活性化すると考えられるので、酸素リークに対して *C. butyricum* の培養装置、水素発生装置が払う厳密さを必要としない利点を持っている。このように、偏性嫌気性菌を使用した水素発生よりも通性嫌気性菌を使用する方が多くの利点を持つばかりでなく、水素発生速度においても他の菌に負けない速さを持っていることから、*E. aerogenes* st. E.82005 は、今後、有力な発酵水素発生菌として期待できる。

(3) 微生物による光水素発生を目標に始めた実験から、初めの考えとは異なって、発酵によって水素を発生するバクテリアを見つけるに至ったが、本来の目標である水素発生の速い微生物の探索に成功した。

参考文献

- 1 Mitsui, A.; Hydrogen energy system, Proceedings of the 2nd world hydrogen energy conference, Zurich, 1267-1291(1978)
"Bio-solar Hydrogen production."
- 2 Yagi, T., and H. Ochiai; Hydrogen energy system, Proceedings of the 2nd world hydrogen energy conference, Zurich, 1293-1307(1978)
"Attempts to produce hydrogen by coupling hydrogenase and chloroplast photosystems."
- 3 Yagi, T.; 微生物とその応用, (鈴木周一編著), 共立出版,
75-118(1979)
"水素の発生"
- 4 Nishizawa, K. and M. Chihara; 藻類研究法, , (1979)
"藻類研究法"
- 5 Tamiya, H. and A. Watanabe; 藻類実験法, , (1965)
"藻類実験法"
- 6 Cobley, J. G. and J. C. Cox; Microbiol. Rev., 47, 579-595(1983)
"Energy conservation in acidophilic bacteria."
- 7 Kobayashi, H; 新生物 I, 数研出版, (1980)
"新生物 I"
- 8 Sakazaki, K.; 新細胞培地学講座 (上・下), 近代出版, (1978)
"新細胞培地学講座 (上・下)"
- 9 Eiken; EIKEN Manual, 栄研化学, (1977)
"栄研マニュアル"
- 10 Nasu, M., K. Nishimoto, M. Akashi, T. Oguri, Y. Saito;
新臨床検査技師講座, 医学書院, (1985)
"微生物学"
- 11 Krieg, N.R., and J.G. Holt; Bergey's manual of systematic bacteriology,
Williams and Wilkins, Baltimore, (1984)
"Bergey's manual of systematic bacteriology."
- 12 微生物研究法懇談会; 微生物学実験法, , (1975)
"微生物学実験法"
- 13 東京化学同人; 生化学データブック, , (1980)
"生化学データブック"
- 14 Suzuki, S.; 神奈川新聞, 12/12, (1982)
"微生物使い水素ガス"
- 15 Karube, I., S. Kuriyama, T. Matsunaga and S. Suzuki; Energy Developments in
Japan, 3, 141-152(1980)
"Biogas production by immobilized whole cells"
- 16 Inoue, Y.; 毎日新聞, 10/18, (1982)
"水素の製造めざして"
- 17 Karube, I., T. Matsunaga, S. Tsuru and S. Suzuki; Biochim. Biophys. Acta,
444, 338-343(1976)
"Continuous hydrogen production by immobilized whole cells of Clostridium
butyricum"
- 18 Karube, I., N. Urano, T. Matsunaga and S. Suzuki; Eur. J. Appl. Microbiol.
Biotechnol., 16, 5-9(1982)
"Hydrogen production from glucose by immobilized growing cells of
Clostridium butyricum"

