

第3章 *Enterobacter aerogenes* strain E.82005 の バッチ培養における水素発生特性

単離菌 *E. aerogenes* st. E.82005 は非常に優れた水素発生能を持つことが第2章で明らかになった。CO₂発生とH₂発生は同時反応ではないことが、ガス発生成分の経時分析から考えられた。しかし、CO₂で飽和した培地と飽和していない培地ではガス発生状態に顕著な違いがみられたことから、水素発生に影響をおよぼす諸因子の解明が、今後この微生物を利用するに当たって必要になる。そこで、まず懸濁菌の自由増殖における水素発生特性を調べ、その結果を基にして水素発生に影響をおよぼす因子の解明を試みた。

3.1 自由培養における水素発生

光合成微生物による光水素発生では、培地として緩衝液を使用しているものが多い¹⁻⁶⁾。実験の始めに測定した pH が維持されるためには、代謝産物によって緩衝効果が失われないように、使用する微生物量やグルコースなどの基質量を少なくしなければならない。しかし、そのような実験では発生する水素の量もわずかであり、かつ、代謝産物の分析、菌体量の測定などにも細心の注意を払わなければならないであろう。筆者らは分析に関する技術が未熟であるから、分析資料が微量しか得られないような実験は不向きである。そこで、緩衝効果を期待するのではなく、培地 pH を経時的に測定して水素発生との関係を調べることにした。

代謝産物の生成速度に関しては菌体単位重量当りで評価することが多い。したがって、菌体重量を測定しなければならない。前章では菌体個数を計測したが、*E. aerogenes* 菌は容易に連鎖状態になり、また、菌の大きさが 0.5~1.5 μm と小さいので、正確な個数を計測するのは非常に困難であった。故に、菌体個数-乾燥重量検定曲線を使用するよりも、乾燥重量を毎回測定するの

第3章 水素発生特性

が望ましい。しかし、菌体個数を測定するのに必要なサンプル量は高々1 ml もあればよいが、乾燥菌体重量を計測するには、秤量の誤差を考慮すると数十 ml のサンプル量が必要である。幸い、筆者は昭和 60 年度科学研究費補助金の交付を受け、大型の高速冷却遠心機を購入することができた。そこで、菌体重量は 30 ml の培地で増殖した全量を遠心分離し、それを乾燥して測定することにした。

水素発生に影響をおよぼす因子としては、菌体量の他に、基質濃度、培地 pH、培養温度、栄養条件などが考えられる。そこで、自由培養では、菌の増殖を経時的に調べるために、同時に 14 ~16 個のサンプルに菌を植え付け、培養の進行とともに2個のサンプルを取り出して、水素発生量、菌体量、培地 pH、グルコース濃度をそれぞれ測定した。

3.1.1 実験方法

培養条件

寒天培地に植え継いできた E.82005 のコロニーを、表 2.3-1 に示した SP 培地の組成を持つ前培養液に植え付け、マグネチックスターラーで攪拌しながら、38℃、20 時間培養した。

水素発生実験は、1,000 ml のイオン交換水に 10 g のグルコースと 50 g のペプトンを含んだ培地（以後 GP 培地と言う）を使用した。前培養した菌液 250 μ l を 30 ml の GP 培地に植え付け、図 3.1-1 に示したように、ガス取り出しパイプのついたシリコン栓をして、マグネチックスターラーで攪拌しながら、38℃で培養した。培養器には 50 ml のサンプルビンを使用した。気相の空気はそのまま残し、菌の増殖に役立たせた。

H₂発生量の測定とH₂発生速度

発生したガスは50 ml のメスピペットを改造した水上置換型ガス量測定装置に導き、置換量を経時的に測定した。発生ガス体積は室温で測定している。置換液は 10~30 % の NaOH を使用した。発生ガスには H₂ と CO₂ が含まれているが、CO₂ は NaOH 溶液に吸収される。そのため、置換ガスに CO₂ は含まれていなかった。これは、水素発生速度の測定とは別に同じ実験を行って、ガス発生の活発なときには 30 分おきに、ゆるやかなときには 1 時間おきに、置換されたガス 1 ml をサンプル抜き取り口から抜き取り、ガスクロで分析して確かめた。したがって、置換速度が E.82005 菌の H₂ 発生速度である。図 3.1-2 に H₂ と CO₂ のガスクロ検定曲線の一例を示した。

第3章 水素発生特性

乾燥菌体重量の測定

増殖した菌体は、培地 30 ml を遠心分離機にかけ、10,000 r.p.m.、10 分間遠心分離した沈澱物を、イオン交換水に懸濁させて再度同じ条件で遠心分離して集めた。この一回洗浄した沈澱物を、ステンレスの遠心チューブごと乾燥器にいれ、105 °C で乾燥した。湿度 40~50 % のデシケータ中で温度を下げたあと、遠心チューブの重量を計り、空の重量との差から乾燥菌体重量を求めた。

グルコース濃度の測定

培地のグルコース濃度は、東洋紡績株製のブドウ糖測定試薬「ダイヤカラー・G C」を使用し、分光光度計で測定した。この試薬はグルコースオキシダーゼを用いてグルコースを選択的に酸化するので、他の測定方法よりグルコース濃度を正確に測定できた。筆者らは Park-Johnson 法 [文献 7, II, p1082]、Somogyi-Nelson 法 [文献 7, II, p1084] でのグルコース濃度測定も試みたが、これらの測定法は培地成分にも反応性を持ち、代謝産物中のグルコース濃度だけを測定することはできなかった。ダイヤカラー・G Cを使用したグルコースの検定曲線を図 3.1-3 に示す。

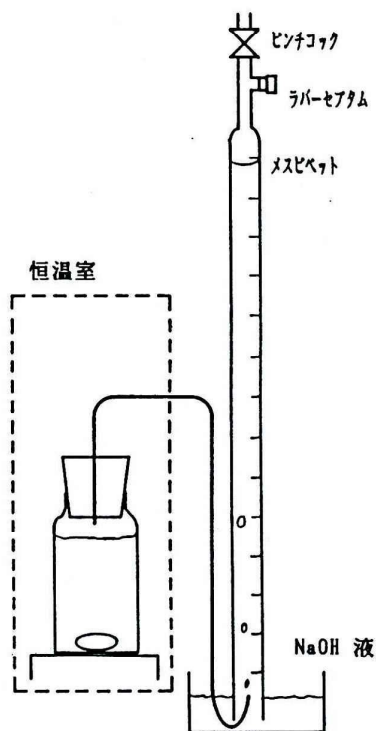


図 3.1-1 水素ガス発生量測定装置略図

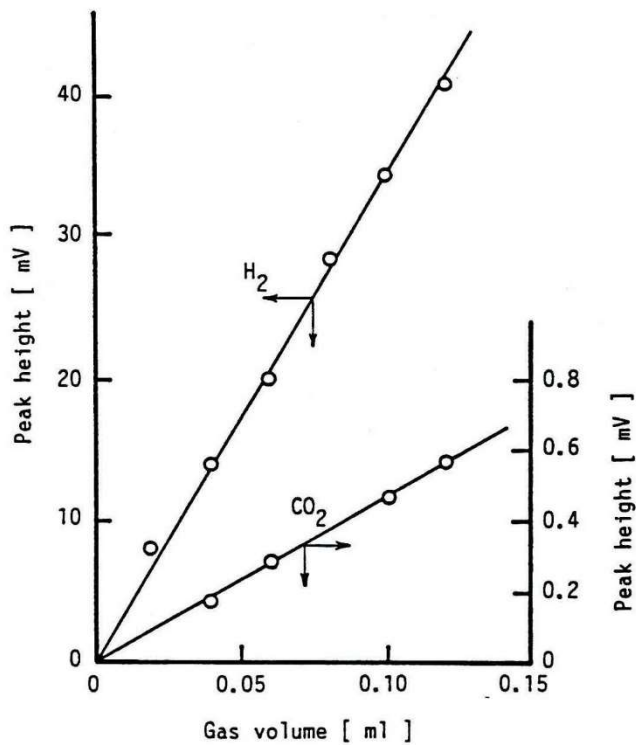


図 3.1-2 ガスクロ検定曲線

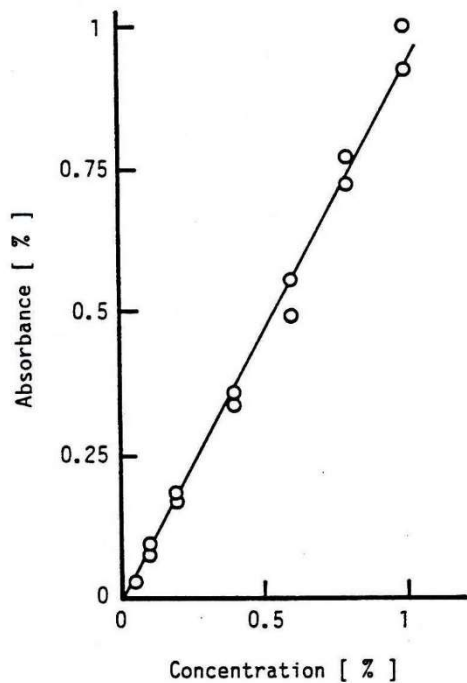


図 3.1-3 グルコース濃度-吸光度検定曲線

第3章 水素発生特性

3.1.2 実験結果

グルコースに対するH₂収率

図 3.1-4 に見られるように、濃度 1 %のグルコース培地における菌のガス発生量は、およそ 10 時間の培養で全ガス発生量の 98 %に達した。そこで、H₂収率は約 24 時間培養後の置換ガス量から水素量を計算して求めた。E.82005 菌はグルコースを含まないペプトンだけの培地からも、わずかではあるが、水素を発生したので、ペプトンに由来すると思われる水素発生量を差し引くと、グルコース濃度に対するH₂収率は、図 3.1-5 に示すように、直線関係が得られた。これによって、1 mol のグルコース当り 1 mol のH₂が発生することがわかった。

菌体増殖の経時測定

菌体増殖、培地 pH、グルコース濃度の経時変化は、30 ml の培地が入った14~16 個のサンプルに同時に植菌し、培養の進行と共に順次 2 個ずつサンプルを取り出して測定した。図 3.1-6 は 30 ml の培地で増殖した菌の乾燥重量と培養時間の関係を表したものである。約 0.3 mg の菌が、2.5 時間後に 3.6 mg に増殖し、8 時間後には 23 mg まで増殖している。図中の実線は最少自乗法で求めた近似曲線で、菌体の増殖と培養時間の関係は次式であらわされた。

$$X = 0.0988 t^3 - 2.143 t^2 + 17.09 t - 27.23 \quad \text{ただし } 3 < t < 7 \quad (3.1.1)$$

図 3.1-6 を片対数グラフにプロットし直した図 3.1-7 から、3 時間までが対数増殖期 (Logarithmic phase of growth) にあたり、3~8 時間は減衰期 (Retardation phase of growth) にあたることがよくわかる。

水素発生量と発生速度

図 3.1-8 には、Run No.A100101~A100116までの 16 個のサンプルのうち、最後に pH、グルコース濃度を測定した No.A100116 の水素発生の経時変化を示した。○は水素発生量、●は実測値の後方差分で計算した単位体積当りの水素発生速度である。水素発生は 2.5 時間頃から観測され始め、4.5 時間頃までは発生速度が速くなるが、それからは菌が増殖を続けているにもかかわらず、ほぼ一定の速さで発生した。この一定速さの発生を培地単位体積当りで表すと、約 270 ml/(l-culture·h)、すなわち、約 11 mmol/(l-culture·h) になった。

一方、菌の水素発生能力を正當に評価するには、発生速度を単位菌体量当りで表すべきである。菌体増殖のデータと同様に、水素発生量のデータも、実測値を直接使用するとバラツキが大

第3章 水素発生特性

きくなるので、最少自乗法で近似し、平滑化するのが適当であろう。水素発生量を最少自乗法による3次曲線で近似すると、次式で表された。

$$P = -0.107 t^3 + 2.085 t^2 - 5.898 t + 3.354 \quad \text{ただし } 3 < t < 8 \quad (3.1.2)$$

実測値と計算値の誤差などは、表 3.1-1 に示した。この表によると、発生量の少ない4時間以前では誤差が2~4% とかなり大きく、近似式を使用するのは不相当と思われる。そこで、4時間以前については図 3.1-8 に示した●印の平均水素発生速度を使用し、それ以後については式 (3.1.1) と (3.1.2) を使用して水素発生速度を計算した。その結果、図 3.1-9 (b) に示すように、4時間付近で最大値を持つ曲線になった。これによって、この菌の水素発生能力は 420 ml/(g-dry cell·h) 以上、すなわち、17 mmol/(g-dry cell·h) 以上にもなることがわかった。

グルコース濃度

図 3.1-9 (c) は Run No.A1001xx におけるグルコース消費量の時間変化を示している。グルコース消費量は菌の増殖と共に急速に増加するが、4.5時間以後はほぼ直線的に増加してをり、菌の増殖曲線とは異なった変化をした。実線は図 3.1-9 (b) の水素発生量を mmol の単位で描いたもので、グルコース消費量のこの変化は水素発生量の変化と非常によく一致しており、このことから、自由培養における水素発生とグルコースの消費とは連動反応であると考えられた。

ところで、グルコースの消費が、菌の増殖のエネルギーと生命維持のエネルギーを供給するために行われているとすれば、複合培地におけるグルコース消費は次のように考えられる^{8,9)}。

$$(\text{グルコースの消費}) = (\text{維持代謝の消費}) + (\text{増殖の消費}) \quad (3.1.3)$$

これは

$$\Delta S = \Delta S_M + \Delta S_G \quad (3.1.4)$$

と書き表される。右辺の各項は

$$\Delta S_M = mX \Delta t \quad (3.1.5)$$

$$\Delta S_G = 1/Y_G \cdot \Delta X \quad (3.1.6)$$

ただし、

$$t : \text{時間 [h]} \quad (3.1.7)$$

$$S : \text{グルコース濃度 [mol-glucose/l]} \quad (3.1.8)$$

$$X : \text{菌体濃度 [g-dry cell/l]} \quad (3.1.9)$$

$$m : \text{グルコースに対する維持定数 [mol-glucose/(g-dry cell·h)]} \quad (3.1.10)$$

$$Y_G : \text{複合培地における真の増殖収率 [g-dry cell/mol-glucose]} \quad (3.1.11)$$

と書き表され、式 (3.1.4) に代入して変形すると、次式のようになる。

$$\nu = m + 1/Y_G \cdot \mu \quad (3.1.12)$$

ただし、

$$\nu : \text{グルコースの比消費速度 [mol-glucose/(g-dry cell \cdot h)]} \quad (3.1.13)$$

$$\mu : \text{比増殖速度、(1/X) \cdot (dX/dt) [h^{-1}]} \quad (3.1.14)$$

さて、グルコースの消費速度が水素発生速度と等しいならば、水素発生量と菌体増殖の近似式 (3.1.1) と (3.1.2) を使用することによって、 μ 、 ν が計算される。計算された μ を横軸に、 ν を縦軸にしてグラフにプロットすると、式 (3.1.12) から、 y 切片がグルコースに対する維持定数 m 、直線の傾きの逆数が複合培地の増殖収率 Y_G 、と推定できる。表 3.1-2 は μ 、 ν の計算結果であり、図 3.1-10 は計算結果をプロットしたものである。図 3.1-10 は μ と ν の関係が 2 本の直線で表されることを示している。 $\mu > 0.14$ では $m=15.7$ 、 $Y_G=196$ を得、 $\mu < 0.1$ では $m=9.0$ 、 $Y_G=15$ を得た。このように直線が折れ曲がったのは、植菌後約 5 時間 ($\mu=0.18$ あたり) で菌の代謝状態が大きく変化したためであると考えられる。これについては、3.1.3 考察で検討する。

E. aerogenes は、培地の pH に応じて、代謝経路を混合酸発酵とブタンジオール発酵に変更することが知られているので、培地 pH の変化との関係を次に調べた。

自由培養による培地 pH の変化

図 3.1-9 (a) には、菌体量と共に培地 pH の培養による時間変化を示している。pH 6.3 から始まった培地 pH は培養が進むにしたがって酸性方向に変化し、pH 6 付近から変化がゆるやかになって pH 5.7 程度に漸近した。*E. aerogenes* は *Escherichia coli* などと同じように混合酸発酵をするので¹⁰⁻¹³、生成した酢酸などによって培地 pH は低下する。しかし、pH 変化のゆるやかになった 5 時間におけるグルコース消費量は、初期量の高々 1/3 程度でしかない。したがって、この現象が基質濃度の減少に起因する酸代謝量の減少によるものでないことは明らかである。また、増殖の停止、水素発生の不活化などによるものでないことも、図 3.1-9 (a), (b), (c) から明らかである。

細菌の同定方法 (第 2 章、2.2.2) で述べた性状検査の VP 試験は、MR 試験と一緒に使用して、2,3-ブタンジオール発酵を判定するものである。*E. aerogenes* は、表 2.2-2 と 2.2-3 に見られるように MR (-)、VP (+) の性状を示すので、2,3-ブタンジオール発酵をおこなう。2,3-ブタンジオール発酵は、酸生成が少ないので、培地の酸性化を抑えることができる発酵で、この

第3章 水素発生特性

発酵を行うことができるということは、バクテリアが自己の酸代謝によって培地環境を棲息に不適当な pH に至らしめたとき、それまでの代謝経路を変更して、酸生成の少ない別の経路を選択できることを意味している¹⁴⁻¹⁶⁾。Mickelson と Werkman¹⁷⁾は 2,3-ブタンジオール発酵をする *Aerobacter indologenes* を使用して、pH 6.3 より大きい培地では 2,3-ブタンジオールの生成量が少なく(約 20 mmol/100 mmol-glucose)、pH 6.3 より小さい培地では非常に大きくなること(約 78 mmol/100 mmol-glucose)を報告した。Wood¹⁴⁾は Neish と Ledingham の実験結果¹⁰⁾も考慮して、pH 6.2~6.3 でこの反応がスイッチすると考えている。

以上のことを考慮すると、図 3.1-9 (a) に現れた pH 変化は、*E. aerogenes* st. E.82005 が代謝経路を混合酸発酵から 2,3-ブタンジオール発酵に切り替えたために生じた結論できる。したがって、この菌は培地の pH 調節をおこなう機能を持つことがわかった。

3.1.3 考察

(1) 培地の pH 変化から、*Enterobacter aerogenes* st. E.82005 は混合酸発酵からブタンジオール発酵に代謝経路を変更することが明らかになった。この変更は、Run No. A 1001xx では、図 3.1-9 (a) から 4.5~5 時間付近で行われたと考えられ、一方、図 3.1-10 のグルコースの比消費速度と比増殖速度の関係が 2 本の直線で表されるその変化は 5 時間あたりから始まっているように見受けられることを考慮すると、混合酸発酵からブタンジオール発酵への変更は、グルコースの比消費速度と比増殖速度の関係も変えたと考えるべきである。したがって、図 3.1-10 の 2 本の直線から求めたグルコースに対する維持常数 m と増殖収率 Y_G は、混合酸発酵とブタンジオール発酵の維持常数と増殖収率であると考えられる。表 3.1-3 にこれをまとめた。ただ、混合酸発酵の増殖収率 195 g-dry cell mol-glucose は嫌気培養であるとするとき大きすぎるようである^{8,18-23)}。培養器の空気をそのまま残したので、好気培養になっていたのかもしれない。これは、今後の検討課題としたい。

(2) *E. aerogenes* のグルコース発酵は、混合酸発酵とブタンジオール発酵であることが知られている。この発酵は、図 3.1-11 (a) と (b) に示す反応によって、多くの種類の発酵産物を生成する。混合酸発酵だけを行うバクテリアでは、自身が生成した酸によって、やがて棲息できない pH 環境に至り、死滅する。しかし、ブタンジオール発酵では、酸の生成が少なくなるだけでなく、ギ酸がさらに分解されて H_2 と CO_2 になるため、培地 pH が低くならない。ただし、ブタンジオール発酵をするバクテリアはすべてギ酸を分解するかというと、表 3.1-4 に示すように、ギ酸分解できないものもあるようである²⁴⁾。したがって、*E. aerogenes* st. E.82005 は、数少ないブタンジオール発

第3章 水素発生特性

酵をする菌の中でも、pH 調節のできる特殊な能力を持った菌であり、さらに水素発性能の非常に高い菌であることが以上の実験から明らかになった。

(3) 培地の pH 調節を人為的に行わなくてもよいと言うことは、発酵装置のコスト面からも実用において好都合である。

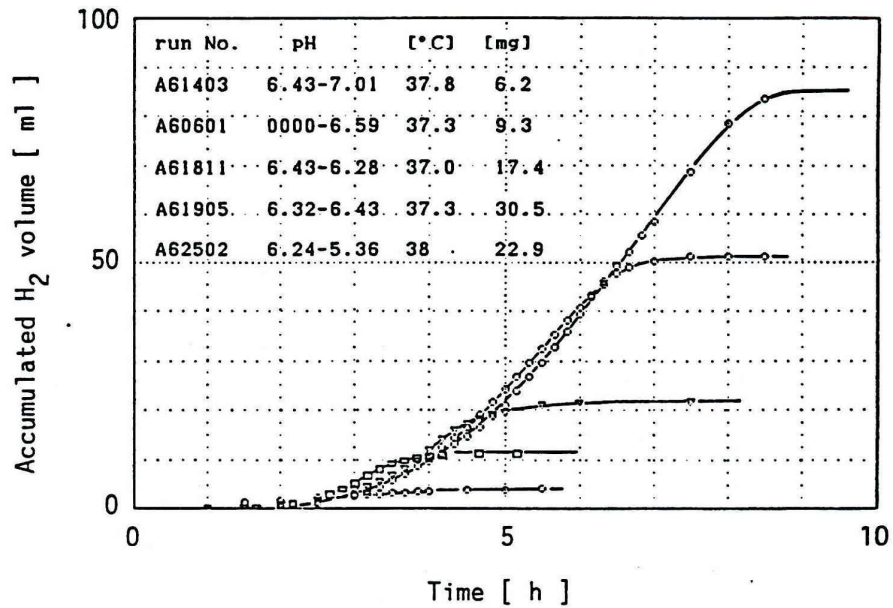


図 3.1-4 GP培地におけるグルコース濃度と水素発生量の関係

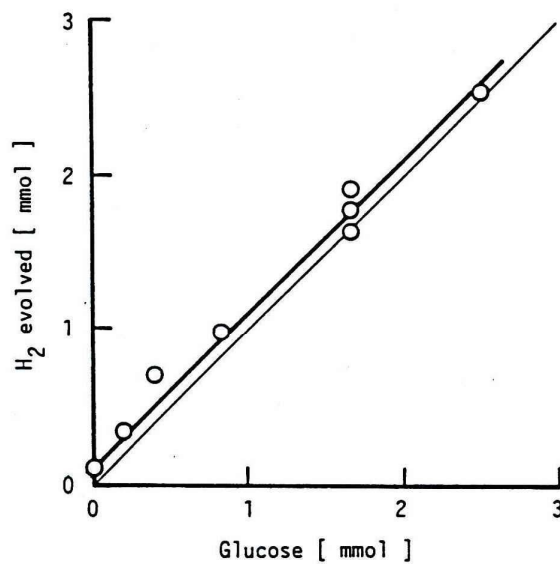


図 3.1-5 グルコース基質の水素収率

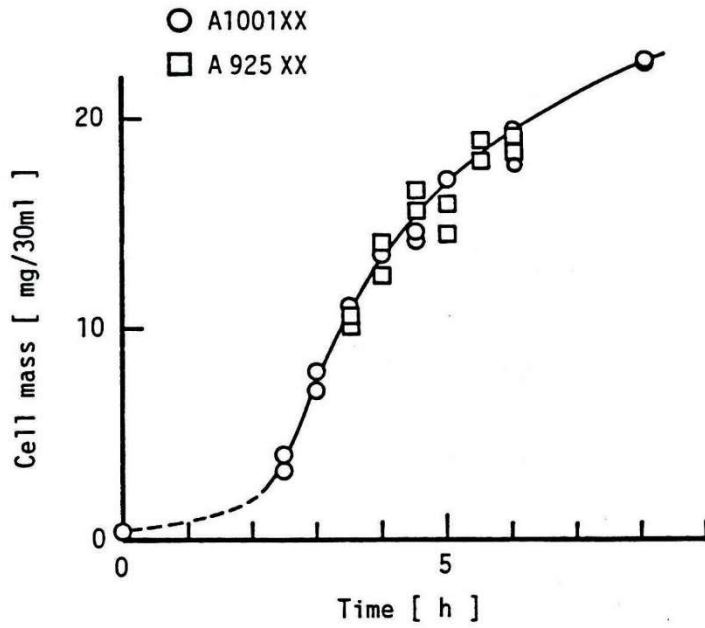


図 3.1-6 菌体量の時間変化

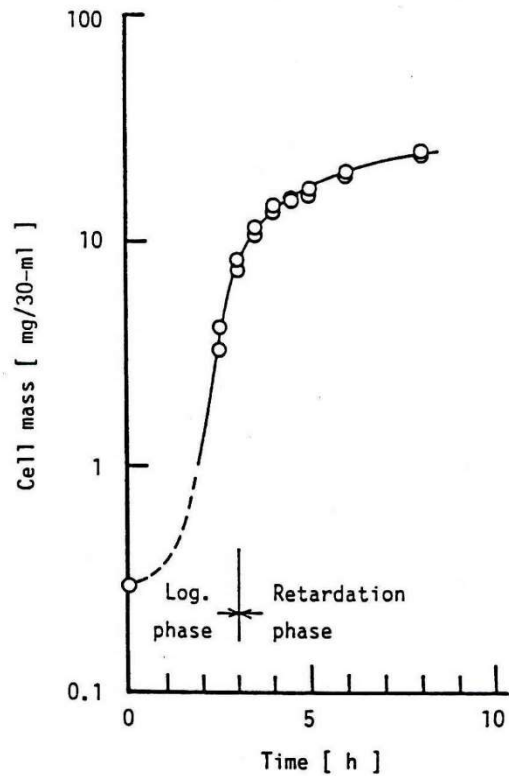


図 3.1-7 片対数表示による菌体量の時間変化

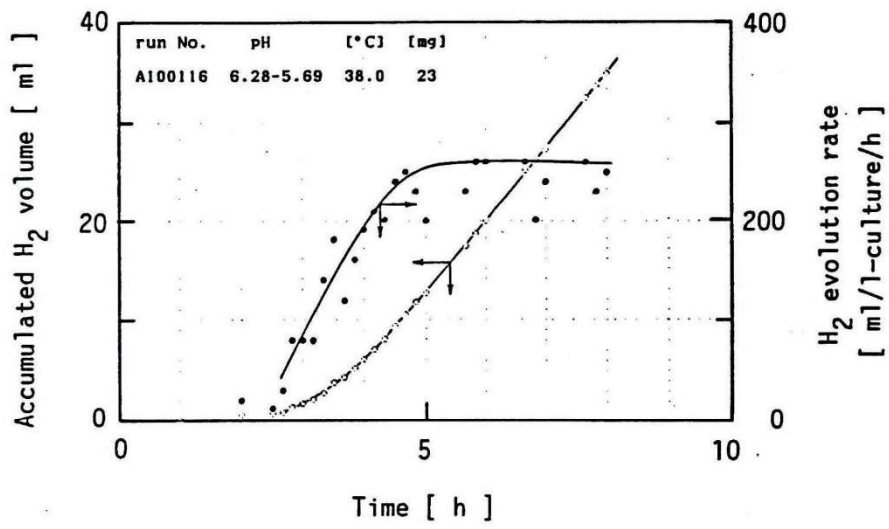


図 3.1-8 水素発生量と培溶液当たりの水素発生速度の変化

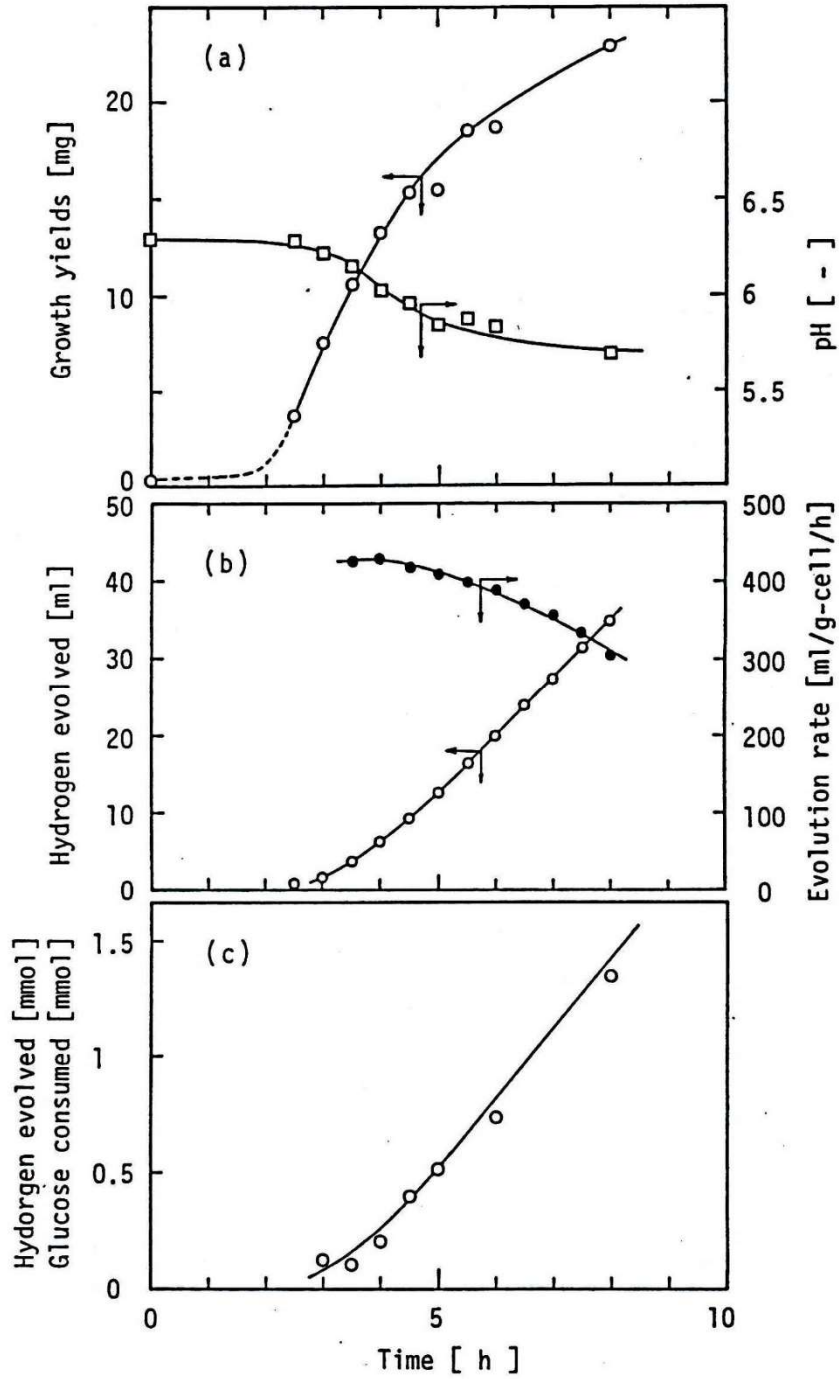


図 3.1-9 *E. aerogenes* st. E.82005 の水素発生特性

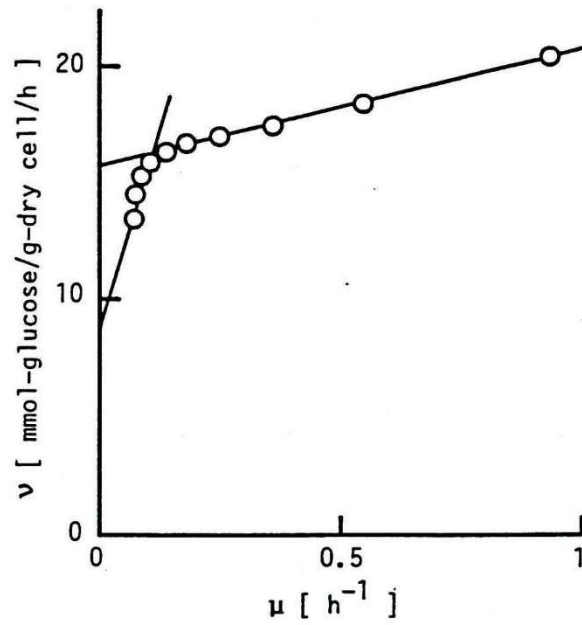


図 3.1-10 比増殖速度と基質取り込み速度との関係

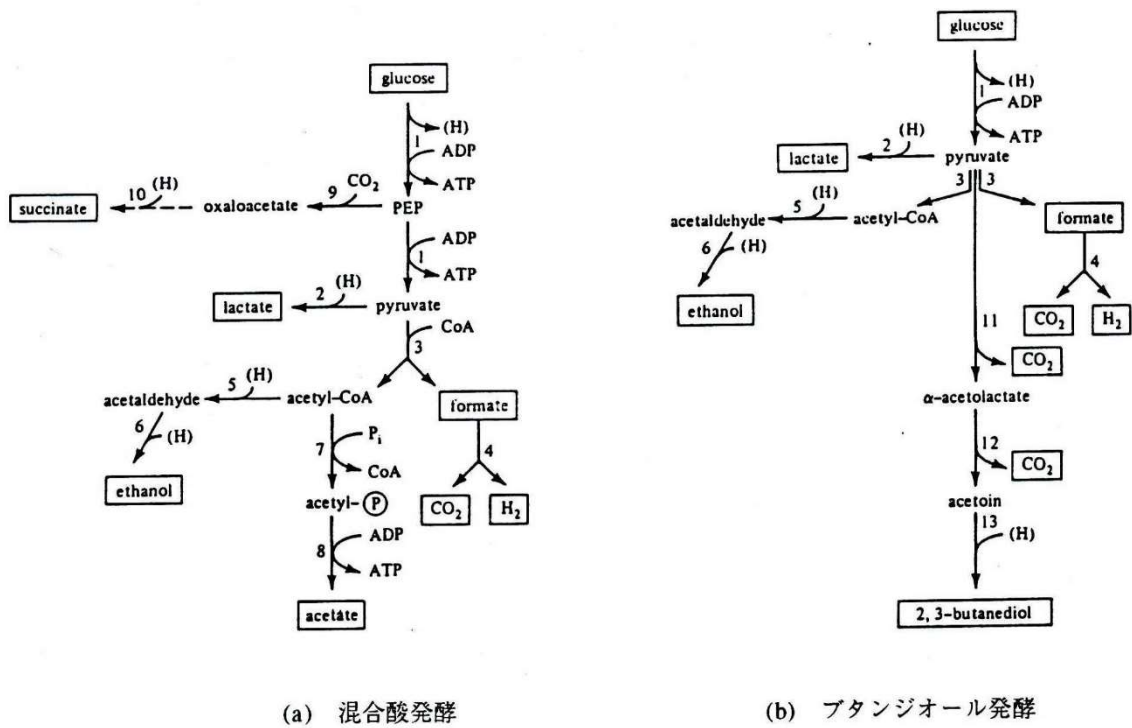


図 3.1-11 腸内細菌の代謝経路

第3章 水素発生特性

表 3.1-1 三次曲線近似による発生速度の計算

培養時間 [h]	水素発生量		誤差 [%]	発生速度 [ml/l·h]
	実測値 [ml]	計算値 [ml]		
3.00	1.75	1.54	12.20	124
3.17	2.15	2.19	-1.77	136
3.33	2.85	2.90	-1.71	148
3.50	3.75	3.67	2.24	159
3.67	4.35	4.49	-3.15	169
3.83	5.15	5.36	-4.04	179
4.00	6.10	6.28	-2.90	188
4.17	7.15	7.24	-1.27	197
4.33	8.15	8.25	-1.17	205
4.50	9.35	9.29	0.65	212
4.67	10.60	10.37	2.18	219
4.83	11.75	11.48	2.29	225
5.00	12.75	12.62	1.00	231
5.67	17.35	17.43	-0.44	248
5.83	18.65	18.67	-0.12	250
6.00	19.95	19.93	0.10	253
6.67	25.15	25.02	0.51	255
6.83	26.15	26.29	-0.55	254
7.00	27.35	27.56	-0.77	253
7.67	32.55	32.51	0.12	241
7.83	33.70	33.70	-0.01	236
8.00	34.95	34.87	0.22	231

表 3.1-2 比消費速度と比増殖速度の計算

培養時間 [h]	水素発生速度 [ml/h]	菌体重量 [mg]	比増殖速度 [1/h]	比消費速度 [mmol/g/h]
2.5	2.52	3.6	2.26	28.3
3.0	3.72	7.4	0.93	20.5
3.5	4.76	10.6	0.54	18.4
4.0	5.65	13.2	0.36	17.5
4.5	6.37	15.3	0.25	17.0
5.0	6.93	17.0	0.18	16.7
5.5	7.33	18.4	0.14	16.3
6.0	7.57	19.5	0.11	15.8
6.5	7.64	20.5	0.09	15.3
7.0	7.56	21.3	0.08	14.5
7.5	7.32	22.1	0.07	13.5
8.0	6.92	23.0	0.08	12.3

表 3.1-3 代謝経路と維持定数、増殖収率の関係

代謝経路	m	Y_G
	$\left[\frac{\text{mol-glucose}}{\text{g-dry cell}\cdot\text{h}} \right]$	$\left[\frac{\text{g-dry cell}}{\text{mol-glucose}} \right]$
混合酸	15.7	196
ブタンジオール	9.0	15

表 3.1-4 混合酸発酵、ブタンジオール発酵をする腸内細菌とガス発生性

I. MIXED-ACID FERMENTATION
A. Produce CO ₂ + H ₂ (contain formic hydrogenlyase):
<i>Escherichia</i>
<i>Proteus</i>
<i>Salmonella</i> (most spp.)
<i>Photobacterium</i> (some spp.)
B. No gas produced (formic hydrogenlyase absent):
<i>Shigella</i>
<i>Salmonella typhi</i>
<i>Yersinia</i>
<i>Vibrio</i>
<i>Aeromonas</i> (some spp.)
<i>Photobacterium</i> (some spp.)
<i>Beneckeia</i> (most spp.)
II. BUTANEDIOL MODIFICATION OF MIXED-ACID FERMENTATION
A. Produce CO ₂ + H ₂ (contain formic hydrogenlyase):
<i>Enterobacter</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>
<i>Photobacterium phosphoreum</i>
B. Produce only CO ₂ (formic hydrogenlyase absent); visible gas formation slight or undetectable:
<i>Serratia</i>
<i>Erwinia herbicola</i> and <i>E. carotovora</i>
<i>Beneckeia alginolytica</i>

第3章 水素発生特性

3.2 pHコントロール培地における水素発生

自由培養において、*E. aerogenes* st. E.82005 は自ら培地の pH を調節した。水素発生は pH 5.7 にはほぼ保たれているときに活発であったが、バクテリアの代謝活性は一般的に pH に依存して変化するようである。そこで、水素発生と培地 pH の関係を pH コントローラを使用して調べた。

図 3.2-1 は実験装置で、pH 調節は自動コントローラ（東京理化工機、FC-1）を使用し、30% NaOH か 30% H_2SO_4 を適宜加えて調節した。培養槽の体積は 300 ml で、250 ml の GP培地（glucose 1%、peptone 5%）に前培養菌液を 10 ml 加えて培養した。 H_2 発生量の測定方法は自由培養の時と同じであるが、メスシリンダーは 500 ml のものを使用した。

表 3.2-1 は 38 °C における培養実験の結果をまとめたものである。

3.2.1 菌体の増殖と至適 pH

菌体は水素発生の活発な期間を通して増殖していることが、3.1節で示された。水素発生は、pH 調節培地においても、活発な発生をした後急激に発生速度が遅くなり、その後は発生がほとんど見られなくなる。図 3.2-2 の例では、7.5 時間の培養で発生した水素量(354 ml)は、24.3 時間の培養で発生した水素量(372 ml)の 95 %にもなっている。このように、多くの場合、水素収量は短い培養時間でもかなり確度の高いデータが得られた。ただ、例外的な発生が pH 5.0 でみられた。表 3.2-1 に示した Run No. S100101 は 8.25 時間までに 87 ml 水素発生した。しかし、その後も発生を続けて、22.5 時間では 254 ml まで増加した。一方、菌体収量に関しては、長時間培養を続けると菌体量は減少し、自己溶解現象が起きていると考えられた。pH 5.0 では 6.0 時間培養後に測定した Run No. S92701 の菌体量は 168 mg あったが、22.5 時間培養した Run No. S100101 ではむしろ 106 mg に減少しており、pH 6.5 でも、24 時間培養後の菌体量は 7.4 時間培養したときの菌体量に比べて約 2/3 に減少していた。したがって、急激な発生速度減少が観察されたあとの長時間の培養は、水素の収率を正確に測定したり、二次代謝反応を調べるとき以外には、あまり必要性がないと考えた。そこで、培養はこの急激な変化が観察された時点で止め、水素収量、菌体収量を測定した。

図 3.2-3 に示したのは菌体収量と培地 pH の関係である。この図から、pH < 6.5 では、菌の増殖は pH に比例して増加し、pH 7 あたりで最も収量が大きくなることがわかる。このことから、菌体増殖の至適 pH は 7 であることが明らかになった。

第3章 水素発生特性

3.2.2 水素発生速度と至適 pH

pH 調節下での水素発生も、図 3.2-4 に示したように、自由培養と同様の経時変化を示した。植菌後 3~4 時間で水素発生が活発になり、活発な発生期間では、菌の増殖と関係なくほぼ一定速度で水素を発生している。そこで、この定速度発生期間の水素発生の経時変化を最少自乗法で一次近似し、傾きから水素発生速度を求めた。

図 3.2-5 は培養液単位体積当りの水素発生速度と pH の関係を示したものである。この図から、至適 pH は 6.2 あたりにあることがわかる。最大発生速度は約 $17 \text{ mmol}/(\text{l-culture}\cdot\text{h})$ 、言い替えると、約 $400 \text{ ml}/(\text{l-culture}\cdot\text{h})$ に達した。自由培養では約 $11 \text{ mmol}/(\text{l-culture}\cdot\text{h})$ であったから、pH を調節する方がかなり速い速度で水素発生させることができる。

一方、pH 調節下においても、菌体重量当りの発生速度は、図 3.1-9 (b)に見られたように、水素発生が加速度的に増加する培養初期において最も速いと考えられる。しかし、菌体量の経時変化を測定するのは困難であったので、培養を止めたときの菌体量を使用して菌体重量当りの水素発生速度を計算した。その結果を図 3.2-6 に示した。この図から、菌体重量当りで表した水素発生速度の至適 pH は 5.8 あたりにあることがわかった。最大発生速度は約 $11 \text{ mmol}/(\text{g-dry cell}\cdot\text{h})$ 、つまり、約 $280 \text{ ml}/(\text{g-dry cell}\cdot\text{h})$ になった。自由培養においても培地 pH は図 3.1-9 (a)に見られるように 5.8~5.7 に保たれており、また、水素発生速度も約 $11 \text{ mmol}/(\text{g-dry cell}\cdot\text{h})$ であるから、自由培養の水素発生はほぼ至適状態で行われていたことがこのことから明らかになった。

培養液体積当りで表したときと菌体重量当りで表したときの水素発生速度の至適 pH について異なった値を得たが、これは、菌体の生育にとっての至適 pH と水素発生にとっての至適 pH が異なるからである。基質を有効に水素に変換させる観点からは菌体重量当りで評価した至適 pH で操作する方が優れている。一方、回分培養における装置効率の観点からは、培養槽当りの発生速度の高いほうが好ましい。しかし、連続培養では菌体が流出するから、菌体の補給を考慮すると、これら二つの評価方法で得た至適 pH の中間にあたる 6.0 あたりで操作するのが適切ではなからうか。

3.2.3 水素収率と至適 pH

グルコースから発生する水素量が培地 pH によってどの様に変化するか、図 3.2-7 に示した。水素収率は菌体重量当りの水素発生速度と非常によく似た曲線を描き、至適 pH は 5.8 あたりであった。pH 5.5~6.0 において、約 1 mol の水素が 1 mol のグルコースから得られることがわかる。これは自由培養と同じ収率である。したがって、pH 調節をしても水素収率を高めることはできない

ことがわかった。注目すべき点は、菌体の生育にとって非常にきびしい pH 5.0 においても 0.7 mol/mol-glu-cose 以上の収率があったが、それに比べて、菌体の増殖にとって最も好ましい pH 7.0 では、わずか 0.4 mol/mol-glucose の収率しかなく、pH 7.5 ではさらに少ない 0.2 mol/mol-glucose 以下しかなかったことである。

このように、増殖の至適 pH と水素発生の至適 pH が異なることは、微生物を使用して水素発生を研究してきた多くの研究者が、これまで気づけなかった重大な意味を含んでいるのではなからうか。なぜなら、この現象は、水素発生が菌の増殖に必要なエネルギー生成反応、つまり、ATP 生産に直接関与しているのではなく、培地の状態にのみ影響を受ける代謝反応であることを意味すると考えられるからである。これについては、第4章「微生物の水素発生とメカニズム」で、詳しく検討したい。

3.2.4 水素発生と増殖の至適温度

腸内細菌 (Enteric bacteria) の増殖に適した温度は一般に 30~37 °C であるといわれている²⁵⁾。Bergey's Manual, 8th ed.²⁶⁾では、*Enterobacter* の増殖の至適温度は 30 °C であるが、野生種のなかには 37 °C で並外れた生化学反応をするものもあると書かれている。草の葉から単離された *E. aerogenes* st. E.82005 が通説どおりの至適温度を示すかどうか、GP 培地で pH を 6.0 と 6.5 に固定して調べた。図 3.2-8 と図 3.2-9 はその結果である。

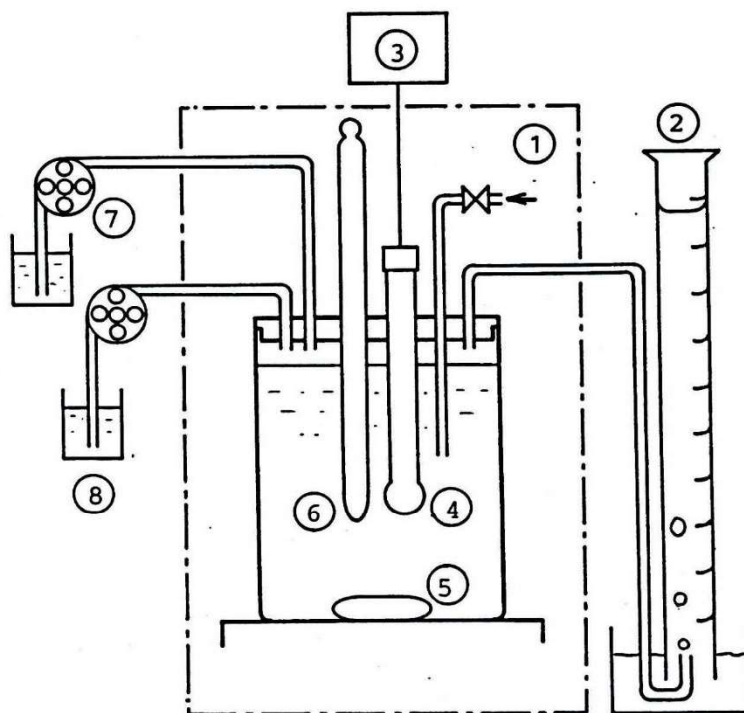
増殖と温度の関係を示した図 3.2-8 から、菌体量は 32 °C から 40.5 °C まで緩やかに増加することがわかる。8.5 °C の温度上昇に対して 50 mg-dry cell 増加し、1.5 % のグルコース量からは 485 mg-dry cell 250 ml-culture つまり 1.9 mg/ml の菌体密度まで増殖することがわかった。しかし、40.5 °C を越えると急速に減少し、2.5 °C の温度上昇で 250 mg-dry cell も減少している。43 °C でも棲息は可能であるが、45 °C を越えると難しいようである。

図 3.2-9 には水素発生速度と温度との関係を示した。この図から、水素発生速度も、至適温度は 40.5 °C であることがわかる。発生速度は菌体濃度が大きいために約 21 mmol/(l-culture·h) にも達した。32 °C における水素発生速度と比べると、40.5 °C における発生速度は約 2.5 倍にもなっている。したがって、水素発生速度に対する温度の影響は、増殖に対する影響よりもきわだって大きい。

以上、pH が 6.0 でも 6.5 でも、40.5 °C が水素発生と増殖の至適温度であることがわかったが、至適温度から高温側への変移に対しては、水素発生速度、増殖のいずれも、変化は非常に大きく

第3章 水素発生特性

現れた。したがって、至適温度で操作する場合には、かなり厳しい温度コントロールを要求されるであろう。



- 1. Incubater, 2. Measuring cylinder, 3. pH controller
- 4. pH electrode, 5. Magnetic stirrer, 6. Thermometer
- 7. Peristaltic pump, 8. pH control liquid

図 3.2-1 pH調節培養装置概略図

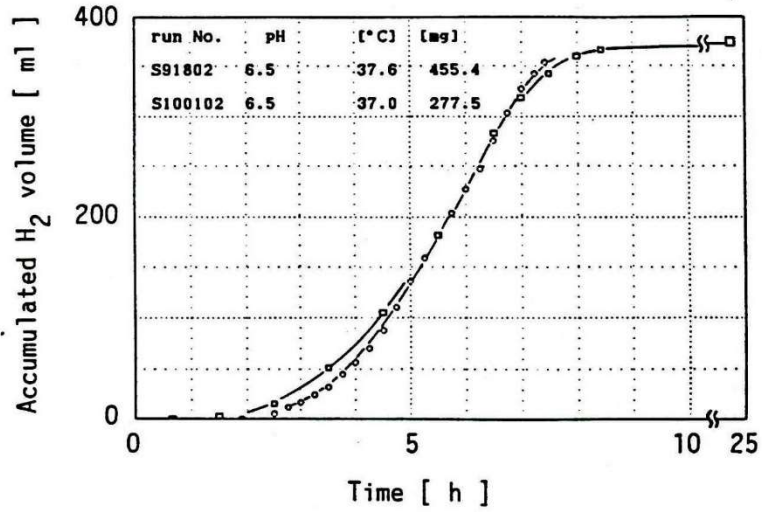


図 3.2-2 pHコントロール下での水素発生の経時変化

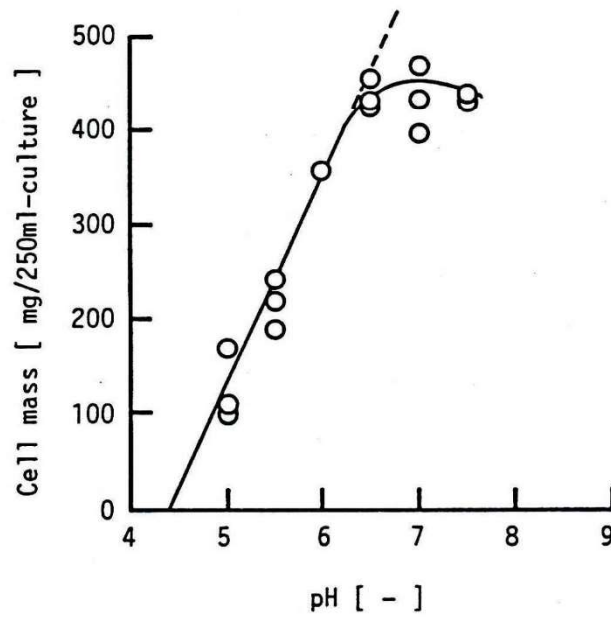


図3.2-3 培地pHと菌体生産量の関係

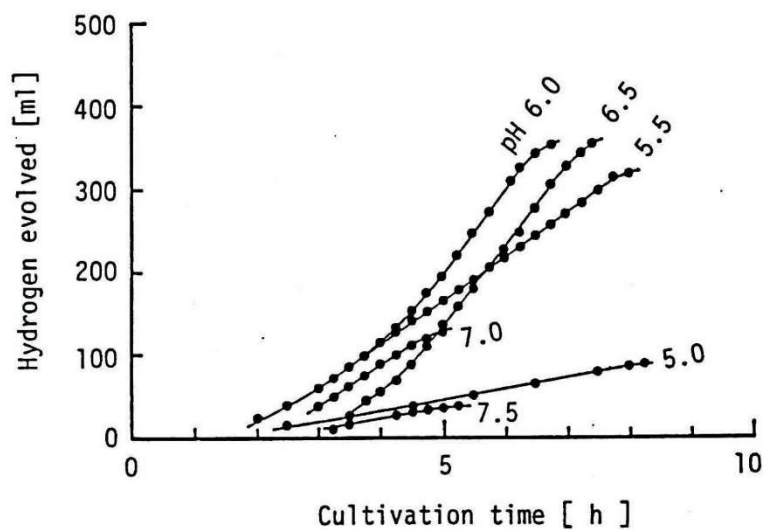


図 3.2-4 pHコントロール培地での水素発生

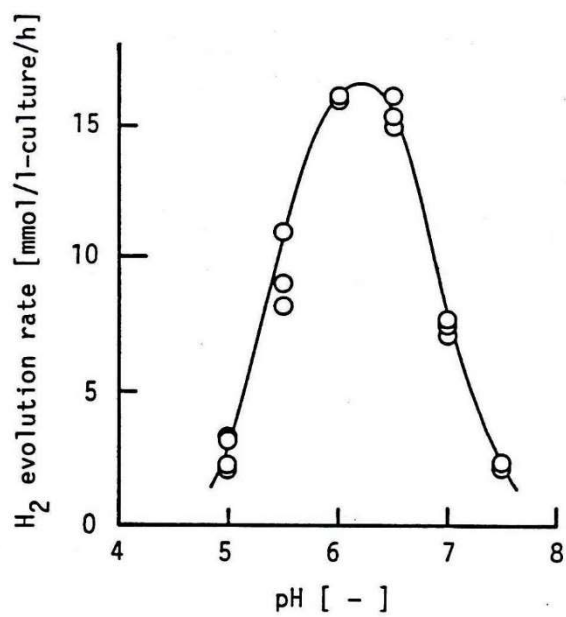


図 3.2-5 培養液当りの水素発生速度と培地pHの関係

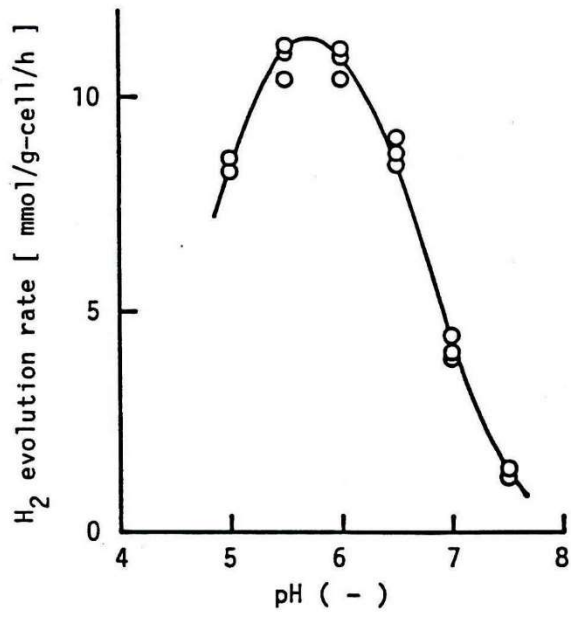


図 3.2-6 菌体量当りの水素発生速度と培地pHの関係

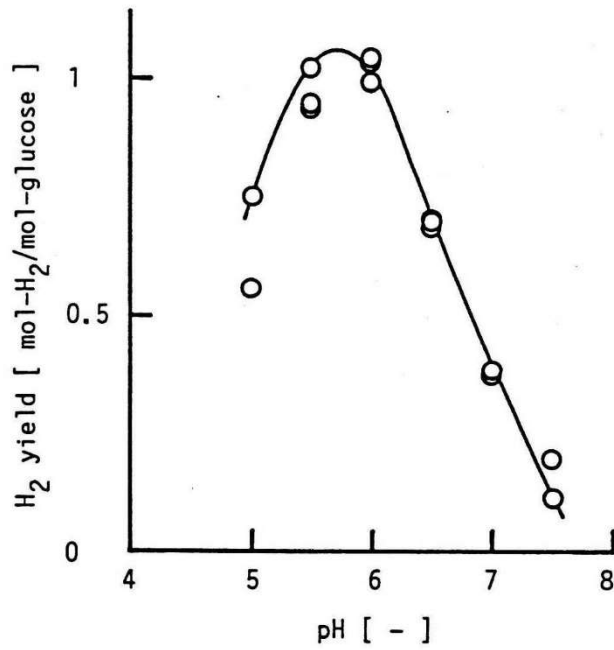


図 3.2-7 グルコースの水素収率と培地pHの関係

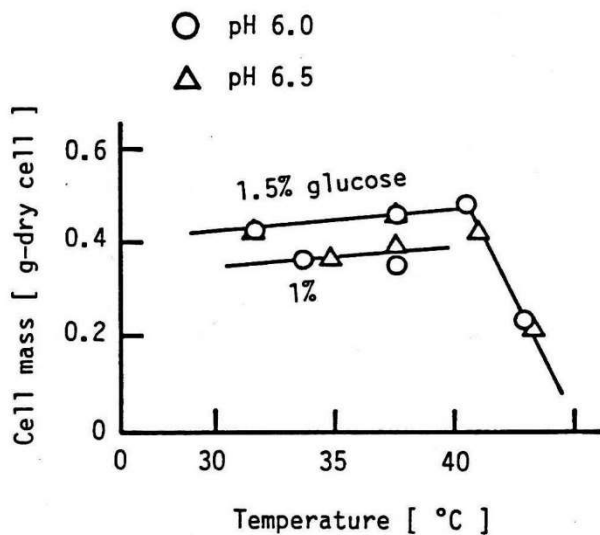


図 3.2-8 培地 250 ml 中で増殖した菌体量と培養温度との関係

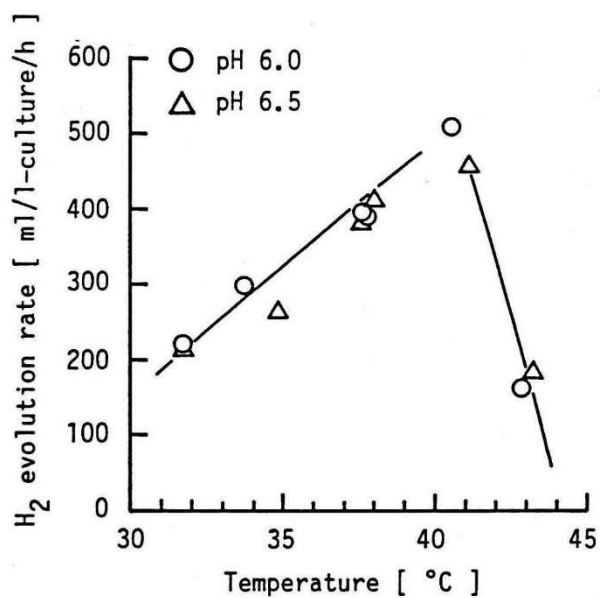


図 3.2-9 水素発生速度におよぼす温度の影響

表 3.2-1 増殖と水素発生におよぼす pH の効果

Run No.	pH [-]	Cultivatn. time [h]	Glucose conc. [%]	H ₂ evolved [ml]	H ₂ yield for glucose [mol/mol]	Dry cell weight [mg]	Product- ivity [mg/h]	H ₂ rate per culture [mmol/(l·h)]	H ₂ rate per dry cell [mmol/(g·h)]	Temperature [°C]
S92701	5.0	6.00	1.5	43		168	27.9	2.13	3.17	35.9
S90301		8.00	1.0	31		92	11.5	3.04	8.26	37.8
S100101		22.5	1.0	254	0.75	106	4.3	2.21	5.23	37.0
S90501		23.5	1.0	189	0.56	97	4.1	3.32	8.55	37.0
S90602	5.5	9.75	1.0	316	0.93	186		8.18	11.0	38.1
S90401		8.00	1.0	318	0.94	217	27.1	8.99	10.4	37.2
S82901		9.00	1.0	347	1.02	241	26.8	10.9	11.2	37.8
S91801	6.0	7.17	1.5	363	0.71	466	65.0	16.1	8.64	37.6
S90302		6.75	1.0	353	1.04	356	52.7	15.9	11.1	37.8
S91802	6.5	7.42	1.5	354	0.70	455	61.4	15.3	8.40	37.6
S82902		5.25	1.0	237	0.70	431	82.0	16.8	9.74	37.8
S100102		24.3	1.0	372	1.10	278	11.6	14.0	12.6	37.0
S82701		5.00	1.0	237	0.70	428	85.6	14.9	8.69	38.0
S91102	7.0	5.25	1.0	130	0.38	432	82.3	7.03	4.07	39.8
S90502		5.00	1.0	129	0.38	468	93.6	7.44	3.98	39.8
S90402		4.50	1.0	104	0.31	395	87.8	7.64	4.46	37.2
S91101	7.5	5.25	1.0	36	0.11	426	81.1	2.40	1.41	38.6
S90601		7.25	1.0	63	0.19	439	60.6	2.13	1.21	37.9
S82702	free	7.33	1.0	335	0.99	241		10.8	11.2	38.8

3.3 ペプトンの影響と合成培地での水素発生速度

光合成、発酵の何れの実験も、菌体増殖をとまなう条件では、多くの場合、窒素源として培地にペプトンかまたはイースト抽出物を加えて行う。その濃度は普通1%以下であることが多い。しかるに、筆者の実験は高濃度のペプトン(5%)を含む培地で行った。ペプトンは主にミルクカゼインや大豆タンパク質を酵素分解して得たもので、各種のアミノ酸、ポリペプチド、ジペプチド、ミネラル等からなっている。しかし、使用する素材、酵素によってそれぞれ異なった品質のペプトンになり、成分については十分に分かっていない²⁷⁾。光合成水素発生や多くの生化学反応では、ビタミン類、補酵素類が反応速度を速めることがあるので^{3,28)}、高濃度のペプトンは単に窒素源としての働き以外に、その未知成分が水素発生に何らかの好影響を及ぼすことも考えられる。つまり、ペプトン5%で得た水素発生速度は、一般性を持たない可能性がある。

そこで、ペプトンは *E. aerogenes* st. E.82005 の水素発生速度にどのような影響を与えるのかを明らかにするために、ペプトン培地、ペプトンを含まない合成培地、および、ペプトンにイースト抽出物またはハートインフュージョンを加えた培地における水素発生を測定した。そして、これらの各種培地における発生状況を比較して、ペプトンの水素発生に及ぼす影響とペプトン添加の効果を調べた。

3.3.1 実験方法

培地組成

水素発生に使用した培地は1%のグルコースを発酵基質として、(1)ペプトンのみを5%含む培地(GP50)、(2)ペプトン濃度が0.25%の培地(GP025)、(3)ペプトン5%にさらにハートインフュージョンを0.5%、NaClを0.1%含んだ培地(GPH05)、そして(4)ペプトンを含まないpH 7.0、6.5、6.0の合成培地(SYN70, 65, 60)を使用した。合成培地は $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2%、クエン酸ナトリウム $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%の組成に、pH調整のために K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 をpH 7.0のとき14%と0.6%、pH 6.5のとき0.7%と1.2%、pH 6.0のとき0.4%と1.6%をそれぞれ加えたものから成っている。

ペプトンとハートインフュージョンは日水製薬(株)の「ペプトン」と「ハートインフュージョンブイオン」を使用した。

実験条件

水素発生は 50 ml のサンプル瓶に 30 ml の培地を入れ、前培養した菌液を 0.25 ml 加えて自由培養下で測定した。本文中で特に記する場合を除いて、同時に 5~10 個の実験を行い、平均値をデータとした。前培養菌液 0.25 ml 中には乾燥重量で約 0.3 mg の菌が含まれていた。

前培養、本培養などの実験条件、水素発生速度、乾燥菌体重量、グルコース濃度の測定法などは、3.1 節と同じである。

3.3.2 実験結果

(1) 水素発生とペプトンの効果

図 3.3-1 に各培地における水素発生の活性を累積水素発生量の経時変化で示した。また、表 3.3-1 には植菌後 1 ml の水素を発生するまでの時間、菌体の生産性、培養時間と培養前後の培地 pH、培養槽単位体積あたりの水素発生速度、およびペプトン 5 % 培地における水素発生速度を 1 としたときの比発生速度を示した。

(a) 水素発生活性発現へのペプトンの影響 植菌後 1 ml の水素発生をするまでの時間を基準にして各培地の水素発生の活性発現を比べると、表 3.3-1 から次のことがわかる。ペプトン 5 % 培地における水素発生に比べ、ペプトン 0.25 % 培地では水素発生の活性発現は遅い。ハートインフュージョンを含んだ培地では植菌後速やかに水素発生の活性が現れ、ペプトン 5 % 培地より早い。イースト抽出物を含んだ培地はペプトン 5 % 培地とほぼ同様の発生を示し、活性発現への影響はみられない。一方、ペプトンを含まない合成培地では、水素発生の活性の発現が著しく遅い。また、この活性発現の遅延は培地初期 pH の影響を受けており、pH 6.06, 6.45, 6.98 の順で活性発現があらわれる。これらの結果は、ペプトン濃度と培地 pH の二つの因子が活性発現に影響を及ぼしていることを示している。

(b) 水素発生速度へのペプトンの影響 図 3.3-1 から、何れの培地の水素発生も、活性発現後はほぼ一定の速度で発生することがわかる。そこで、この定発生速度を培養液単位体積あたりの水素発生速度で表し、ペプトン 5 % 培地を基準にした比発生速度で各培地の水素発生を比べた。

表 3.3-1 を見ると、ペプトン 0.25 % 培地での発生速度は非常に遅く、比発生速度は 0.25 しかない。ペプトン 5 % 培地にハートインフュージョンを 0.5 % 加えた培地では、発生速度は約 7 % 速くなっており、添加効果が現れている。一方、これらペプトンを含む培地に比べ、ペプトンを含まない合成培地では、初期 pH が 6.0 の場合をのぞいて、ペプトン 5 % 培地よりかなり速い速

第3章 水素発生特性

度で水素を発生している。特に、初期 pH が 7.0 であった培地では、1.26 倍の速さで水素を発生しており、初期 pH 6.5 でもハートインフュージョン添加培地より水素発生速度は速い。合成培地は、ペプトンに代わる窒素源として、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を 0.2 % 含んでいるに過ぎず、ビタミン類、補酵素類等特別な成分は存在しない。にもかかわらずペプトン 5% 培地より合成培地での発生速度が速くなった。これらのことから、高濃度ペプトンに含まれる未知成分には水素発生を促進するような特別な成分を含んでいないと結論できる。

(2) 増殖とペプトンの効果

菌自身に優れた水素発生能のあることがわかったけれども、活性発現が合成培地で遅く、ペプトン培地、ハートインフュージョン添加培地で早いことから、菌体の増殖が何等かの影響を及ぼすのではないかと考えられる。また、pH の影響も大きいようである。そこで、同時に植菌した 7~14 個のサンプルから 1 時間~30 分置きに 1~2 個のサンプルを取り出す方法で、菌体量と培地 pH の経時変化を測定し、増殖と pH の影響を調べた。

(a) 菌体増殖と培地の関係 ペプトン 5% 培地、ハートインフュージョン添加培地、合成培地 (pH 7.0, 6.0) での菌体の増殖は図 3.3-2 のようになった。ハートインフュージョン添加培地はペプトン 5% 培地に比べて菌の増殖が速く、菌体密度もペプトン 5% 培地よりかなり大きくなっている。したがって、ハートインフュージョンを添加することによって菌体の生育に非常に適した環境が作られたことがわかる。一方、合成培地はペプトン 5% 培地に比べて誘導期が著しく長く、同じグルコース量で到達する菌体密度も小さい。図 3.3-2 に現れた一定速度で増殖している期間での増殖速度は何れの培地でもほぼ同じ程度であるから、合成培地では菌は増殖条件を整えるのに時間がかかったと考えられる。つまり、ペプトン及びハートインフュージョンは菌体の生育環境を速やかに整え、増殖を活発にする成分を有しているといえる。

(b) 菌体増殖と水素発生速度との関係 代謝産物の生産速度と菌体の増殖速度との関係は次式で表される[文献 29, p109]。

$$1/x \cdot dP/dt = a + b\mu \quad (3.3.1)$$

右辺第一項の a は維持代謝による水素発生を表し、菌体量に依存する発生速度の項である。第二項は増殖速度に比例する水素発生を表しており、傾き b は $(\text{mol-H}_2/(\text{l}\cdot\text{h})) / (\text{g-dry cell}/(\text{l}\cdot\text{h}))$ の単位を持っている。したがって、 a と b の値によって、菌体の増殖に連動して生産速度が増加する増殖連動型、増殖とは全く関係がなく菌体量のみに依存する増殖非連動型、それに増殖と菌体量の両

第3章 水素発生特性

方に関係する増殖連動混合型に分けられる。

ペプトン 5 % 培地、ハートインフュージョン添加培地、合成培地(pH 6.0) における水素発生速度を比増殖速度との関係で表すと、図 3.3-3 に示したように、 μ の小さい範囲で式(3.3.1)の関係がよく当てはまった。 $\mu < 0.5$ の範囲は 4 時間以上培養したときの比増殖速度に相当するので、減衰期から静止期にあたっている。したがって、この期における *E. aerogenes* st. E.82005 菌の水素発生速度は、菌体の増殖速度と菌体量の影響を同時に受ける増殖連動混合型発酵であることがわかった。

図 3.3-3 から a、b を求め、表 3.3-2 に示した。ペプトン培地とハートインフュージョン添加培地とを比較すると、切片 a はほぼ等しいので、維持代謝に依存する発生速度はハートインフュージョンを添加しても変化しない。しかし、傾きはハートインフュージョン添加培地の方が大きいので、増殖速度に連動する水素発生速度がハートインフュージョンを添加することによって速くなったと考えられる。一方、合成培地では切片 a の値が小さく、傾き b がきわめて大きい。したがって、維持代謝に依存する水素発生速度はペプトン培地に比べてかなり遅いけれども、増殖に連動した水素発生はペプトンを添加した培地より非常に速いと言える。

(c) 水素発生速度への培地 pH の変化の影響 水素発生速度の遅速には、菌体量や増殖速度だけでは説明出来ない部分があることと、図 3.3-1 に見られるように、活性発現に pH の影響があることを考え合わせると、水素発生は菌体量や増殖速度よりも培養期間中の培地 pH に対してより強く影響を受けることが考えられる。図 3.2-6 によると、単位菌体量当たりで表した水素発生速度は pH 5.5 から 6.0 で最も速く、pH 6.5 では最大水素発生速度の約 75%、pH 5.0 ではわずか 14 % にまで発生速度は減少している。pH 調節を行わない自由培養では、図 3.3-4 に見られるように、代謝の進行とともに培地 pH は急速に低下し、やがてほぼ一定値を保つ傾向を示す。水素発生は pH の低下が緩やかになる頃から活発になり、pH の低下が緩やかになるのは発酵基質の減少の所為でないことは既に 3.1 節で明らかにしたことである。ペプトン 5 % 培地、ハートインフュージョン添加培地、初期 pH 6.0 の合成培地では、水素発生をしている間、培地は pH 6.0~5.5 の範囲におさまっており、これらの培地では pH が水素発生に適した状態にあったので、菌体量と増殖に連動して水素発生が起こったと思われる。これに比して、初期 pH 7.0 の合成培地では、菌の増殖と共に pH は急速に低下するが、菌体量がかなり多くなっても培地はまだ水素発生に適した pH になっていない。そして、水素発生に適した pH まで低下したときには既に菌体量は大きくなっているため、速い速度で発生したと考えられる。一方、ペプトン 0.25 % 培地では、表 3.3-1 に示したように初期

pH が 6.72 であるにもかかわらず終了時 pH は 5.16 と小さい。また、発生速度が非常に遅いことから、菌体増殖の少ない早い培養時期に培地が水素発生に不適当な pH になっていたと考えられる。

ペプトン 5 % 培地とペプトン 0.25 % 培地ではペプトン濃度だけが異なっているに過ぎないので、このことはペプトン濃度が培地 pH の調節に何らかの役割を担っていることを意味している。そこで、ペプトン濃度と培地の培養終了時 pH の関係について調べた。

(3) ペプトン濃度と pH 変化

図 3.3-5 は培養後の pH がどのように変わるかグルコース濃度とペプトン濃度との比を変数にして表したものである。●印はペプトン濃度を 5 % に保ち、グルコース濃度を 0, 0.12, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 % にそれぞれ変えたときの結果である。○印はグルコース濃度を 0.12 % に保ち、ペプトン濃度を 1.0, 3.0, 5.0, 7.0, 10 % に変えたときの結果である。○印はペプトン 0.25 %、グルコース 1 % の結果を示している。培地は 30 ml、培養時間は約 24 時間、培地の初期 pH は 6.39~6.43 であった。

グルコースを含まないペプトン 5 % 培地 (1.5 g-peptone) では、初期 pH は 6.43 であった。しかし、23.2 時間の培養によって約 4 ml の水素を発生し、pH は 7.02 まで上昇した。菌が、ペプトンに含まれる弱酸性物質を消費した可能性があるけれども、このように培養後の pH が培養前よりも高くなる傾向は、グルコースに比べてペプトンが多量 (約 25 倍以上) にある場合に現れている。*E. aerogenes* はグルコースからギ酸、酢酸、乳酸など種々の酸を代謝生成するので、酸の生成にもかかわらず pH が上昇したことから、ペプトンに含まれる弱酸性物質の消費に依るのではないことは明らかである。ペプトンの割合がグルコースの約 25 倍より少なくなると、培養後 pH は培養前より低くなり、グルコースの割合が増加するにつれて一定の pH 値に収束する傾向を示した。3.1 節で述べたように、酸生成によって培地 pH が 6.3 よりも低くなると、*E. aerogenes* は酸生成経路から酸の生成が少ない経路に代謝経路を変更して、pH の低下を抑える機能を持っている。この pH 調節機能の働きを顕著に示しているのが図 3.3-4 である。したがって、図 3.3-5 で一定値に収束したのはバクテリアの pH 調節機能によると考えることもできる。しかし、グルコース濃度が同じなら代謝によって生成する酸の量は同じであるから、もしこの調節機能によって一定値に収束したのであるならば、グルコースを 0.12 % に保った○印の場合、これらの培地の最終 pH はすべて同じでなければならない。しかるにペプトン濃度によって pH が変化していることから、ペプトンに起因する変化もあることが考えられる。

第3章 水素発生特性

E. aerogenes は pH 6.5~7.0 付近では 1 mol のグルコースから約 0.2 mol 程度の酢酸を生成することが知られている¹⁰⁾ので、1 %のグルコースによって生成される酢酸量を、ペプトンを含まない水溶液とペプトンを含む水溶液に滴下し、それぞれの水溶液が示す pH を測定した。その結果、pH はペプトンを含まない水溶液では 3.45 であったが、ペプトンを 0.25 % 含む水溶液では 4.22、2 % 含む水溶液では 5.15 を示した。これによって、ペプトンは酸に対して pH の低下を緩和する緩衝効果を持つことがわかった。したがって、図 3.3-5 は *E. aerogenes* の持つ pH 調節機能と、ペプトンの緩衝効果の両方によってもたらされた結果であると結論できるであろう。

図 3.3-5 に示した実線は次式による計算曲線で、この pH とグルコース・ペプトン濃度比との関係をよく表わすことができた。

$$\text{pH} = 1.8 \exp\{-10(C_g/C_p)\} + 5.2 \quad (3.3.2)$$

E. aerogenes の酸代謝量は培地 pH によって異なるので^{10,30)}、自由培養での培地 pH を培養液組成で決定できることは、水素などの代謝制御を行う上で便利である。

3.3.3 考察

このように、(イ)維持代謝による水素発生が合成培地で遅くペプトン培地で速かったこと、(ロ)増殖に連動した水素発生が逆に合成培地で速くペプトン培地で遅かったことは、水素発生のメカニズムを考えるうえで興味ある結果である。なぜなら、水素発生にとって、栄養状態は必ずしも必要条件ではないことを意味していると考えられるからである。

ところで、初期 pH が 7.0 の合成培地における菌体の増殖は、pH 6.0 の合成培地における菌体増殖よりも誘導期が短く、菌体量もより早く増加している。それにもかかわらず、図 3.3-1 に示された水素発生では、前節の pH と水素発生との関係と同様 pH 7.0 より pH 6.0 のほうが早く活性が現れており、菌体量や増殖速度よりも、培地 pH の方が水素発生に強い影響を及ぼすことが明瞭になった。

3.3.4 結論

ペプトンやハートインフュージョンの栄養上の役割については既によく知られている²⁷⁾。これらはバクテリアにとって非常に良好な窒素源、ビタミン源、補酵素源である。そのため、菌の発育を促進する物質として細菌培養で広く利用されている。*Enterobacter aerogenes* の増殖にとってもペプトンやハートインフュージョンが非常に効果的であることが本研究でも示された。しかし、

第3章 水素発生特性

水素発生を促進するような特別な成分は含まれていないことが明らかになった。

ペプトンの性質として、菌の代謝生成した酸に対して緩衝効果を持つことが明らかになり、濃度を調節するならば培地を水素発生に適した pH に保てることがわかった。

また、*E. aerogenes* st. E.82005 の水素発生について次のことが明らかになった。

- (1) この菌の水素発生様式は、減衰期から静止期の間では増殖連動混合型である。
- (2) 水素発生速度は培地 pH の影響を強く受け、ペプトン濃度とは直接的な関わりはない。したがって、実用的な水素発生では、菌が増殖でき、かつ水素発生を阻害する物質がない環境であれば、ペプトンがなくても pH を調節することで速い発生速度を得ることができる。

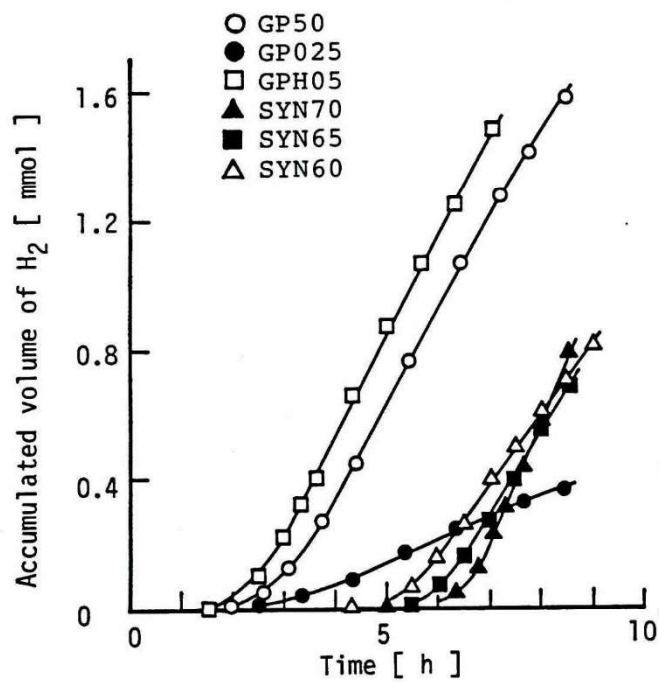


図 3.3-1 異なる培地における水素発生状況

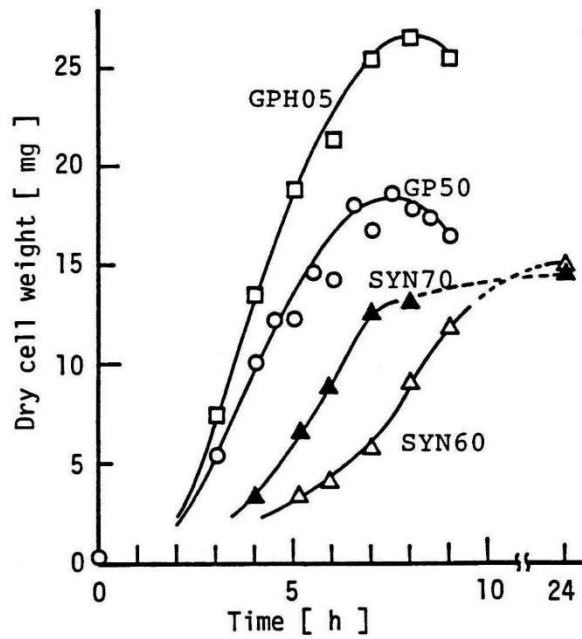


図 3.3-2 異なった培地での菌体量の変化

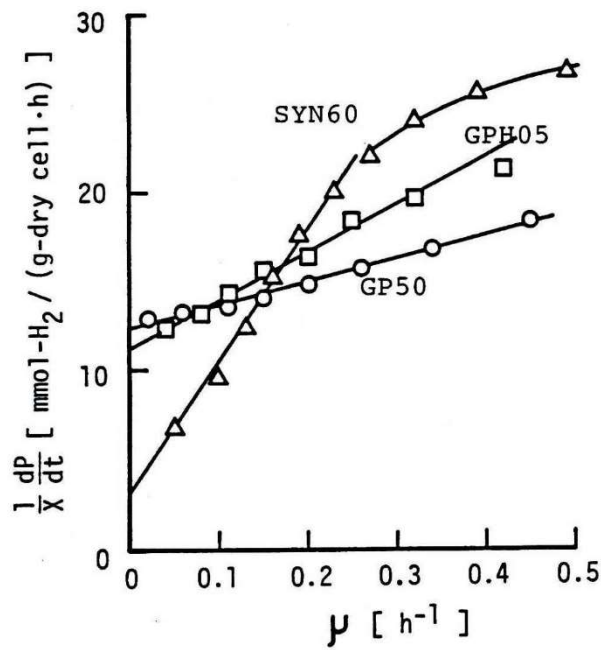


図 3.3-3 水素の比生産速度と比増殖速度との関係

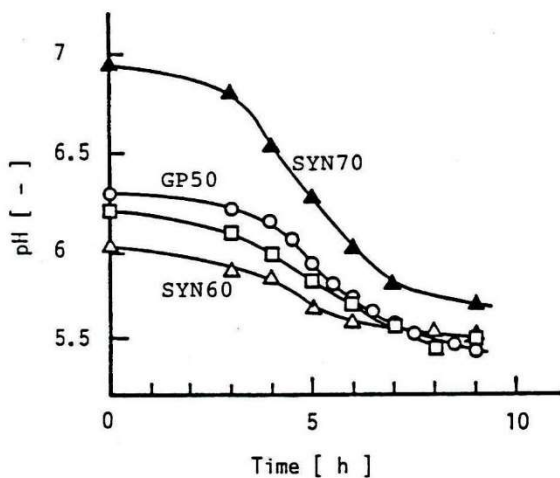


図 3.3-4 異なった培地におけるpH変化の様子

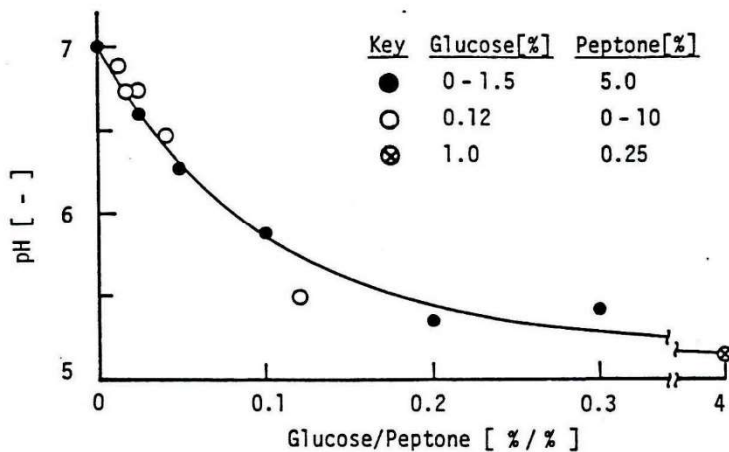


図 3.3-5 38°Cで24時間培養した時のグルコースとペプトンの初期濃度比と培地の最終pHの関係

表 3.3-2 図 3.3-3から式(3.3-1)の定数aとbを計算した結果

Symbol	a	b	u
	[mmol-H ₂ /(g-cell·h)]	[mmol-H ₂ /g-cell]	[h ⁻¹]
GP50	12.4	13.1	<0.5
GPH05	11.3	27.1	<0.3
SYN60	3.1	73.7	<0.2

表 3.3-1 異なった組成の培地における水素発生特性

Symbol	Peptone conc. [%]	Additional materials	Time for H_2 evolving [h]	Biomass productivity, P_x [mg/(l·h)]	Cultivation [h]	pH _i [-]	pH _e [-]	Evolution rate [mmol/(l·h)]	Specific rate [-]
GP50	5.0	none	2.5	85.7	8.5	6.40	5.50	10.1	1
GP025	0.25	none	3.1	43.9	8.4	6.72	5.16	2.6	0.25
GPH05	5.0	heart infusion 0.5% NaCl 0.1%	2.0	119	9.1	6.36	5.58	10.8	1.07
GPY05	5.0	yeast extract 0.5%	2.5	78.3	9.2	6.16	5.64	10.2	1.01
SYN70	0	synthetic culture	6.2	59.3	8.5	6.98	5.76	12.7	1.26
SYN65	0	ibid.	5.8	-	8.5	6.45	5.87	11.2	1.11
SYN60	0	ibid.	5.4	44.3	9.0	6.06	5.58	7.5	0.73

1) Components of the synthetic culture are $(NH_4)_2SO_4$ 0.2%, citrate·2H₂O 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.02% and phosphates. Compositions of KH₂PO₄ and K₂HPO₄ are 1.6 and 0.4 for pH6.06, 1.2 and 0.7 for pH6.45, and 0.6 and 1.4 for pH6.98 respectively.

2) Inoculated cells of ca. 0.3mg in dry weight were cultivated with 1% of glucose in 30ml culture liquid at 38°C.

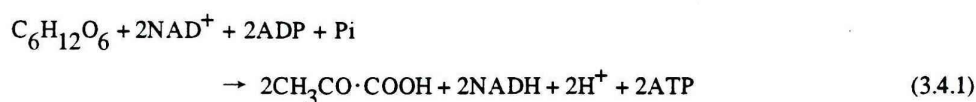
3.4 固定化水素発生とグルコース代謝

3.4.1 混合酸発酵と *Enterobacter aerogenes* のグルコース代謝^{10,31)}

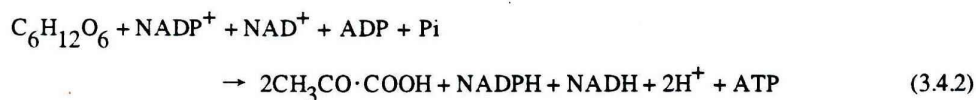
バクテリアがグルコースを嫌氣的にピルビン酸まで分解する経路には、いわゆる解糖系 (Embden-Meyerhof pathway または Glycolysis) と Entner-Doudoroff 経路、それに非常に複雑なサイクルを経るペントースリン酸経路 (Pentose phosphate cycle または Hexose monophosphate shunt) の三経路が知られている (図 3.4-1)³²⁾。

それぞれの総収支式は、

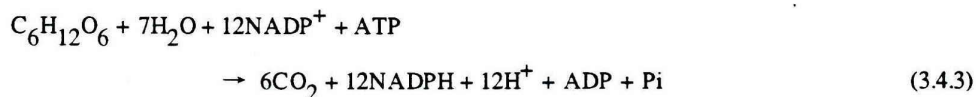
Embden-Meyerhof 経路



Entner-Doudoroff 経路



Pentose phosphate 経路



となる。ただし、ペントースリン酸経路は非常に複雑なサイクルを経るので、好気状態で最終産物のCO₂まで分解されたときの総収支を記している。

ピルビン酸は、好気状態ではクエン酸回路 (Citric Acid Cycle または Krebs Cycle) を通って H₂O と CO₂ まで分解されるが、嫌気状態でもさらに代謝されて図 3.1-11 (a) と 3.1-11 (b) の箱囲いで区別した最終産物に到達する^{15,16,24)}。*Enterobacter aerogenes* は、数種類の酸を代謝生成する大腸菌 (*Escherichia coli*) などと同じように、混合酸発酵をすることが知られている。表 3.4-1 (a), (b) は Neish ら^{10,33)}が測定した *E. coli* と *E. aerogenes* の発酵代謝産物である。どちらのバクテリアも、酪酸、酢酸、ギ酸、コハク酸、乳酸とエタノールを生成しており、pH が酸性側に移るとギ酸の生成量が減少するというよく似た代謝性質をもっている。水素の収率も高々 1 mol/mol-glucose で、よく似ているといえる。これら二種類のバクテリアの顕著な違いは 2,3-ブタンジオールを生成するか否かにあり、*E. aerogenes* は酸性側では 2,3-ブタンジオールを生成するようになるが、*E. coli*

第3章 水素発生特性

ではそのような変化はみられない。

ところで、これらの発酵は、グルコース 1 %、イースト抽出物 0.5 %、リン酸 1 カリ 0.05 %、リン酸 2 カリ 0.05 %、硫酸マグネシウム 0.02 % からなる培地を使用している。イースト抽出物濃度が 0.5 % もあるので、この培地は増殖培地である。たとえば、産業廃液などを利用して水素発生を行うことを想定すると、そのような液の中には増殖に必要な栄養物が含まれていない場合もあるであろう。それでは、増殖ができないような培地でも、*E. aerogenes* は増殖できる培地と同じ様に水素発生し、代謝産物を産生するであろうか。

3.4.2 固定化と水素発生速度

産業廃液のように増殖に必要な栄養物が含まれていない培地、あるいは酵素などを使用して連続的に生産物を得る場合には、培養液や原料液の供給によって微生物や酵素がウォッシュアウトすることを避けるために、これらを固定化して利用している³⁴⁻⁵¹。固定化法にはいろいろあって、それは千畑らの文献^{52,53}に詳しく記載されている。筆者も、 κ -カラギーナン、アルギン酸カルシウム、ポリアクリルアミド、酢酸セルロース、寒天などに菌を包括固定して、水素発生を試みたが、アルギン酸カルシウムで包括固定した場合にのみ良好な水素発生が観察された。そこで、リン酸緩衝液で懸濁培養したときと、アルギン酸カルシウムで包括固定したときの水素発生について、増殖できない培地ではどのような変化が生じるか調べた。

実験方法

培養条件 実験に使用した菌は *E. aerogenes* st. E.82005 で、増殖培養は表 2.3-1 に示した SP 培地のグルコースとペプトン濃度をそれぞれ(A) 0.5 %、0 % (B) 3 %、2 % に変えたものを用いた。(A)培地から集めた菌は懸濁培養実験に、(B)培地から集めた菌は固定培養実験に使用した。

固定化 (B)培地から集めた菌をイオン交換水に懸濁し、菌体濃度が約 1mg/ml のアルギン酸ナトリウム 1 %液を 100 ml 調整した。この懸濁液を直径 1.5 mm のピペットの先端から 0.1 M CaCl_2 溶液中に滴下して、直径 3~5 mm のアルギン酸カルシウム粒子中に菌を包括固定した。

実験装置と方法 装置の略図を図 3.4-2 に示す。気相と液相の空気は Ar で置換した。液の攪拌

第3章 水素発生特性

にはマグネチックスターラを使用した。pH の変動は±0.05 以内におさめ、温度変動は±0.5 °C 以内におさめた。ガス発生速度は、エアートラップに通ずるバルブを 30 分ごとに閉じ、10 %硫酸の入ったマンオメータで 0.1 ml のガスが発生する時間を測定した。ガスシリンジでラバーセプタム部からガスサンプルを抜き取ったのち、このバルブを開いて次の測定に備えた。ガスサンプルの組成はガスクロマトグラフで分析した。液組成は実験終了後培養液から菌を遠心分離し、上澄液をガスクロマトグラフに掛けた。気相成分の分析は TCD で、液相成分の分析は FID で行った。分析条件は表 3.4-2 に示した。

実験結果と考察

懸濁培養 気相体積 150 ml、液体積 1,000 ml の培養槽で、リン酸緩衝液にグルコースのみを 0.1 % (wt) 含む培地から E.82005 菌が発生する全ガスの発生速度は、培地 pH に対して図 3.4-3 のように変化した。グルコース濃度が小さいために、平衡状態にいたる前に発生が止まっていると考えられるが、培地 pH が小さいほどガス発生速度は大きい。グルコース代謝による気体の発生は水素と二酸化炭素だけであった。水素の培地への溶解度 (0.0167 ml/ml-water, 35°C) は小さいが、CO₂ の溶解度は非常に大きく、かつ、pH によっても非常に異なる。たとえば、35 °C、pH 5.0 で 0.619 ml ml-water であり、pH 7.0 では 3.27 ml ml-water にもなる。したがって、発生した CO₂ の多くは培地に溶けていると考えられる。

そこで、グルコース濃度を 1 % にし、発生ガスの分析を行いながら発生速度を測定した結果が図 3.4-4 である。菌の増殖がないので、水素の発生速度は植菌後速やかに一定値になっている。それに比べ、CO₂ の発生速度はゆっくり増加し、約 6 時間後一定値になっている。図 3.4-4 (a) に見られるように、気相中の Ar ガスも約 6 時間で完全に置換されており、以後、気相の CO₂ と H₂ の組成比 (CO₂/H₂) は約 2.3 を保っている。E. aerogenes は、pH 5 付近では、1 mol のグルコースから約 2 mol の CO₂ と約 1 mol の水素を発生することが知られているので¹⁰⁾、気相と液相でほぼ平衡になったと考えられる。したがって、pH 5.0 における休止菌のガス発生速度は、水素が約 28 ml (g-dry cell·h)、CO₂ が約 64 ml (g-dry cell·h) であることがわかった。

図 3.2-6 によると、懸濁増殖菌は pH 5.0 において約 80 ml (g-dry cell·h) の速さで水素を発生する。したがって、懸濁休止菌は増殖菌の約 25 % の速度で水素を発生していることになる。休止菌の場合、生存率によって発生速度が大きく変わる可能性があるが、異化代謝のみでは水素発生が遅いことを示す興味ある結果である。

第3章 水素発生特性

固定培養 休止菌を1%アルギン酸カルシウムに固定したときの水素発生速度と培地 pH の関係を調べた。培養槽体積は250 mlである。培地にはトリス緩衝液を使用し、液温は34℃、pH調節は1 M トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン液を滴下して行った。その結果、図3.4-5に△印で示したように、固定休止培地ではpHの広い範囲(4.5~7.5)にわたって、ほぼ一定の発生速度(58 ml/(g-dry cell·h))で水素を発生することがわかった。図3.4-5には、比較のために、図3.2-6の懸濁増殖菌で測定した水素発生速度を■印で示している。固定休止菌は懸濁増殖菌に比べて安定した水素発生を行っているが、増殖菌の最大水素発生速度の約20%程度の速さしかない。しかし、pHが7より大きい培地、または5より小さい培地においては、増殖菌より早い速度で水素発生を行うことがわかる。3.2節の実験結果から、pH 7.0~7.5は菌体の増殖には非常に適しているが水素発生には不適當な環境であり、また、pH 5.0は菌体の増殖にとっても水素発生にとっても非常に不適當な環境である。pH 4.5では菌の生存さえも困難である。したがって、固定化による水素発生は、このような不適當な環境において発生を維持する場合に、有効な手段になると考えられる。

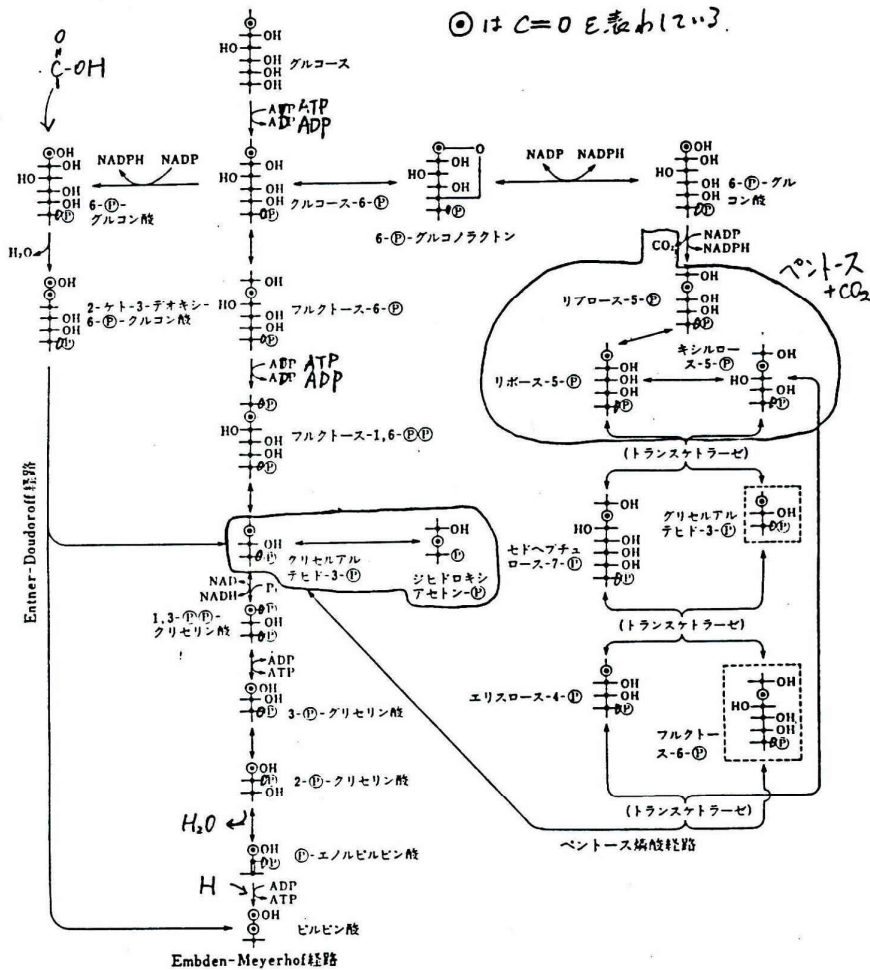
固定化菌によるグルコースの代謝産物のうち、水素、2,3-ブタンジオール、エタノール、酢酸の収率を測定した。図3.4-6に△印で示している。参考のために、NeishとLedingham¹⁰⁾がイースト抽出物を0.5%含む合成培地で測定した発酵収率も●印で示した。固定化による収率の顕著な変化は図3.4-6(a)と(c)の水素と酢酸の収率によく現れている。*E. aerogenes*はpHが6.3より大きい培地では混合酸発酵をし、6.3より小さい培地では2,3-ブタンジオール発酵をするといわれているように、Neishらのデータの酢酸収率はpH 7.6で52.7 mol/100 mol-glucoseにもなる。しかし、固定化菌の酢酸収率は15 mol/100 mol-glucoseしかない。そのうえ、pHが4.5から7.5の広い範囲にわたってその収率はほぼ一定である。また、水素の収率についても、固定化菌はpH 4.5から7.5にわたってほぼ100 mol/100 mol-glucoseの収率を維持しており、懸濁増殖菌で測定した水素収率(■)ではpH 7.5において非常に小さくなっているのと際立った対比を示している。

これら固定化菌の代謝産物の収率がpH 4.5から7.5にわたって影響されないという結果は、菌の生存および水素発生速度もpHに影響されなかったことと考え合わせると、アルギン酸カルシウム粒子内の菌体のまわりのpHが、培地pHの影響を余り受けず、一定になっていると考えらることでよく説明できる。ただ、図3.4-6(d)の2,3-ブタンジオールの収率変化が、水素、酢酸、エタノールの収率変化と異なって、pHの影響を受けているので、その理由の解明が今後の課題となるであろう。

3.4.3 結論

以上の実験結果と考察から、増殖できない条件における *E. aerogenes* st. E.82005 の水素発生について、次のことが明らかになった。

- (1) 増殖できない培地での水素発生速度は非常に小さい (28 ml/(g-dry cell·h))。
- (2) 固定化することによって、pH 4.5 から 7.5 の範囲にわたって安定した水素発生が得られる (58 ml/(g-dry cell·h))。
- (3) pH 5 から菌が死滅するおそれのある pH 4.5 の範囲、また pH 7 から 7.5 の範囲で増殖培地より発生速度が大きくなることから、固定化することは、このような条件下での利用に適している。



ペントース経路中、点線枠内のものは Embden-Meyerhof 経路に合流する

図 3.4-1 微生物にみられるグルコースの代謝経路³²⁾

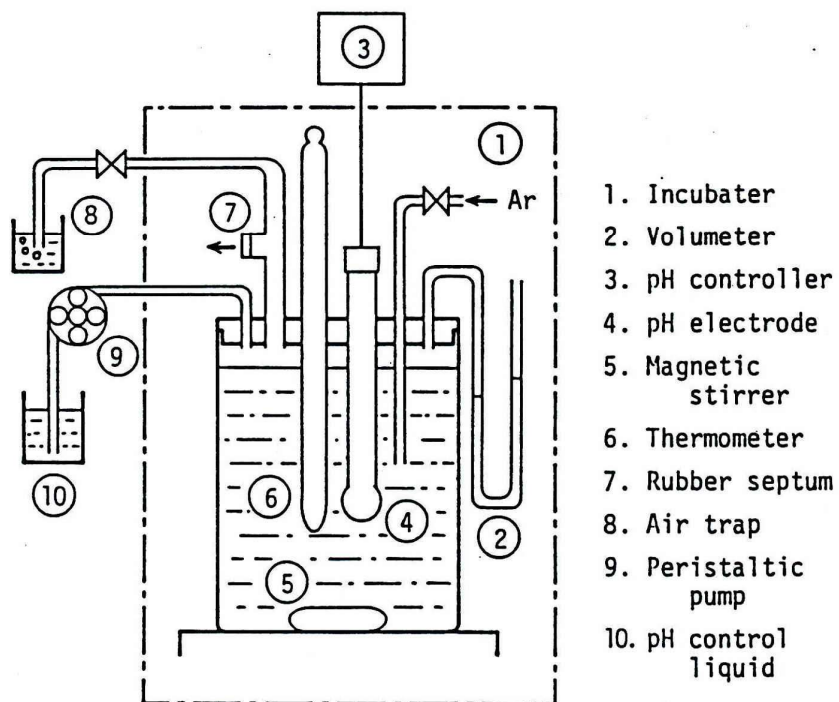


図 3.4-2 pH調節培養の装置略図

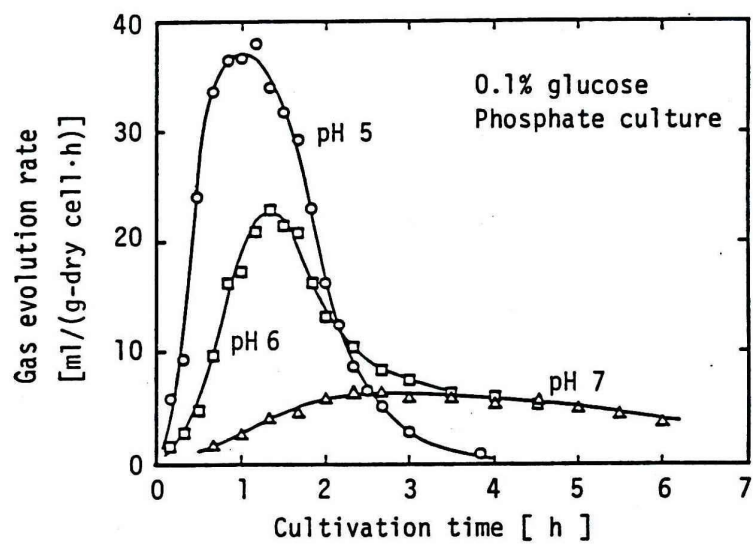


図 3.4-3 懸濁休止菌のガス発生速度

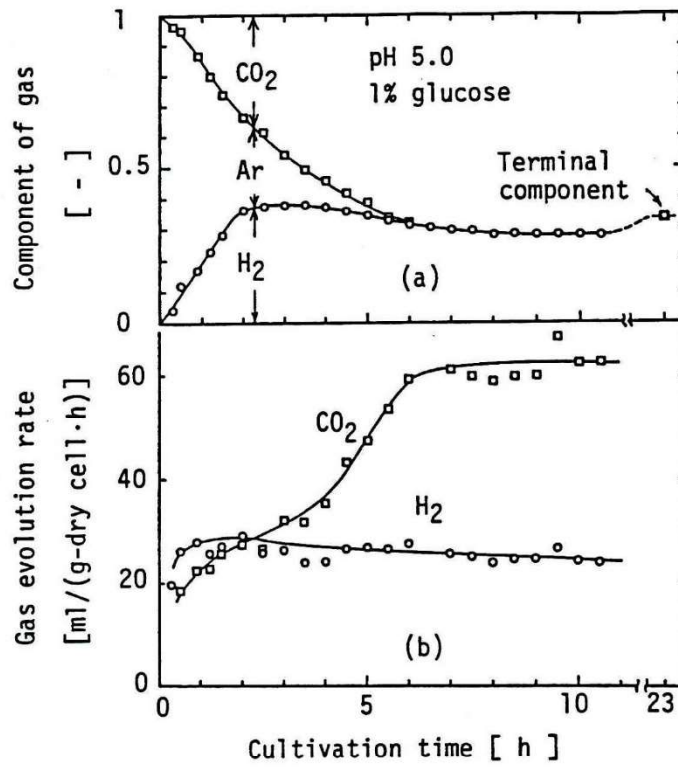
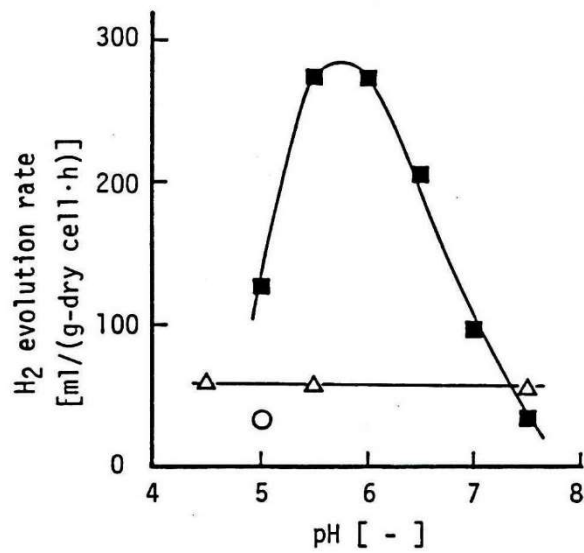


図 3.4.4 ガス発生速度と気相の濃度変化



△; 固定化休止菌、○; 懸濁休止菌、■; 懸濁増殖菌

図 3.4.5 固定化休止菌と懸濁増殖菌の水素発生速度

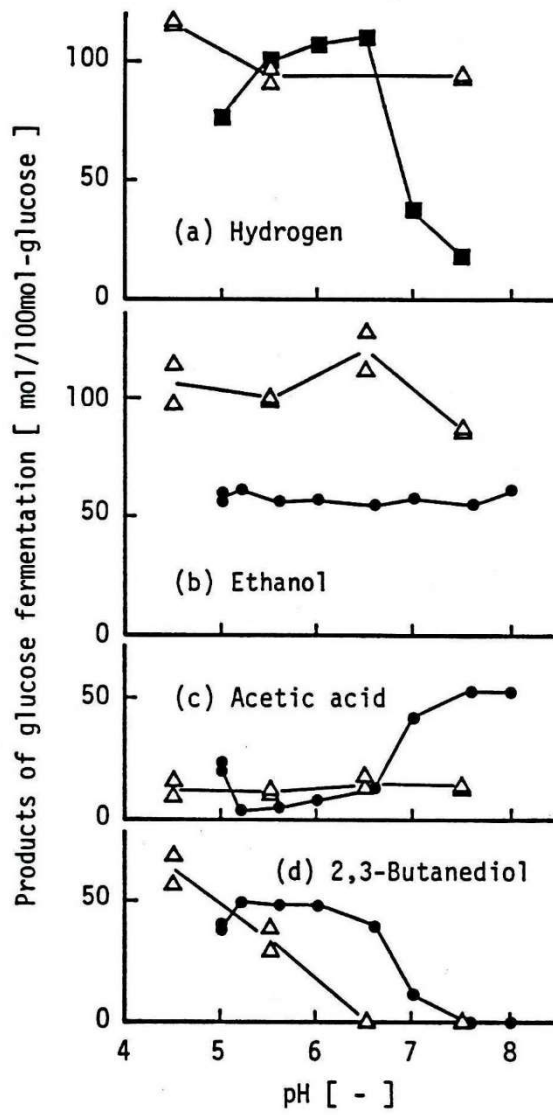


図 3.4-6 固定化休止菌と懸濁増殖菌の代謝産物の比較

表 3.4-1 (a), (b) グルコースの嫌気代謝による産物の収量^{10,14,33)}

(a) TABLE 1
Effect of pH on the anaerobic dissimilation of glucose by *Escherichia aureescens* and *Escherichia coli*

Product	mm Products/100 mm Glucose Fermented							
	<i>Escherichia aureescens</i>						<i>Escherichia coli</i>	
	No. 219		No. 220		Ba		Ba	
	pH 6.3	pH 7.8	pH 6.2	pH 7.8	pH 6.2	pH 7.8	pH 6.0	pH 7.8
2,3-Butanediol.....	0.59	0.49	0.67	0.50	0.39	0.69	0.30	0.28
Acetoin.....	0.11	0.26	0.16	0.29	0.07	0.56	0.059	0.190
Ethanol.....	48.4	41.4	56.9	39.8	56.5	42.7	49.8	50.5
Glycerol.....	0.45	nil	0.33	0.55	0.23	0.78	1.42	0.32
Butyric acid.....	—	3.26	0.16	—	3.94	—	—	7.10
Acetic acid.....	28.1	33.4	37.3	28.4	46.2	36.5	36.5	38.7
Formic acid.....	6.65	78.5	5.23	74.5	5.59	85.0	2.43	80.0
Succinic acid.....	11.4	10.6	10.6	9.30	16.8	8.46	10.7	14.8
Lactic acid.....	62.0	84.0	52.7	75.9	43.4	64.2	79.5	70.0
Carbon dioxide.....	87.6	2.00	106.2	2.47	98.9	4.58	88.0	1.75
Hydrogen.....	71.0	0.18	90.9	0.32	75.0	0.61	75.0	0.26
Fermentation time (hr).....	23	44	23½	30	25	31	23	30
% Glucose fermented.....	98.2	88.8	98	97.9	98	91.5	98.6	87.0
% Carbon recovered.....	80.3	90.5	84.0	83.7	88.0	80.1	91.2	94.7
O/R index.....	1.14	0.96	1.09	1.07	1.11	1.14	1.06	0.91

The bacteria were grown anaerobically at 35 C on a medium containing 5 per cent glucose and 0.5 per cent yeast extract; the pH was controlled by automatic addition of ammonium hydroxide.

(b) ANAEROBIC DISSIMILATION OF GLUCOSE BY *Aerobacter aerogenes*
Fermentations run under the same conditions as for *B. polymyxa* (Table I)

Product	pH 5.00*	pH 5.00	pH 5.20	pH 5.60	pH 6.00	pH 6.60	pH 7.00	pH 7.60	pH 8.00
	Millimoles per 100 millimoles of glucose dissimilated								
2,3-Butanediol	40.2	38.7	48.8	47.9	47.5	38.8	10.78	Nil	Nil
Acetoin	2.43	2.46	1.39	2.39	1.58	2.10	3.08	3.85	5.82
Ethanol	56.4	60.5	61.2	56.3	57.4	55.2	57.7	54.7	60.9
Glycerol	4.13	2.22	1.81	3.91	3.34	4.37	5.79	7.72	6.55
Acetone	Nil	Nil	0.53	Nil	0.07	Nil	Nil	Nil	Nil
Butyric acid	1.07	0.59	0.29	0.07	Nil	0.44	0.68	1.79	3.95
Acetic acid	23.7	20.8	3.89	4.23	7.96	12.95	42.3	52.7	52.6
Formic acid	0.50	0.26	0.43	0.36	0.77	0.44	22.5	52.4	119.6
Succinic acid	1.25	1.29	2.17	2.04	1.80	3.08	6.19	4.10	9.29
Lactic acid	3.15	3.49	2.34	2.64	3.35	7.59	25.0	36.5	9.80
Carbon dioxide	188.0	190.5	183.8	171.1	174.0	167.0	106.8	77.4	19.60
Hydrogen	98.9	103.0	69.8	57.6	74.2	80.7	81.4	69.7	10.37
Glucose carbon assimilated	—	37.6	42.5	66.2	65.1	93.0	87.6	53.2	83.1
Fermentation time, hr.	143	142	94	29½	14½	10½	10	9½	21
% glucose used	65.5	68.0	99.9	100.0	100.0	100.0	100.0	99.9	93.4
% carbon accounted for	91.1	96.9	97.0	97.9	99.0	101.8	98.6	94.9	95.9
O/R index	1.10	1.10	1.07	1.06	1.03	1.06	1.00	1.07	1.07

* Duplicate runs were made at pH 5.00 because the sudden increase in acetic acid and hydrogen was unexpected and needed confirmation.

表 3.4-1 (c), (d), (e)

(c) ANAEROBIC DISSIMILATION OF GLUCOSE BY *Bacillus polymyxa*

All fermentations were incubated at 30° C. using a medium containing 5.0% glucose and 0.5% yeast extract. The pH was controlled by automatic addition of ammonium hydroxide while anaerobic conditions were maintained by bubbling purified nitrogen through the medium.

Product	pH 5.40	pH 5.80	pH 6.20	pH 6.47	pH 6.80	pH 7.17	pH 7.60
	Millimoles per 100 millimoles of glucose dissimilated						
2,3-Butanediol	43.3	51.3	50.5	49.7	44.2	33.2	11.3
Acetoin	2.32	1.77	2.36	1.88	3.48	2.88	4.90
Ethanol	67.4	71.4	73.1	69.3	67.3	75.0	78.9
Glycerol	2.90	3.39	2.84	2.24	3.23	2.02	2.39
Acetone	2.23	0.34	0.38	0.21	Nil	0.33	Nil
Butyric acid	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil
Acetic acid	1.85	2.11	3.15	6.32	16.59	26.45	46.7
Formic acid	0.47	0.22	2.76	1.61	3.56	4.81	82.6
Succinic acid	1.68	0.79	0.64	0.21	1.67	6.65	4.45
Lactic acid	0.75	1.67	2.12	1.67	1.84	3.20	6.52
Carbon dioxide	183.9	186.5	183.1	187.1	175.3	161.2	78.9
Hydrogen	89.2	68.0	70.4	78.0	84.1	82.1	46.0
Glucose carbon assimilated	32.8	—	—	—	31.9	—	29.6
Fermentation time, hr.	53	30	26	26	26	28	53
% glucose used*	99.6	100.0	100.0	100.0	100.0	99.9	9.44
% carbon accounted for	93.9	94.1	94.8	93.5	98.8	95.0	91.6
O/R index	1.01	1.00	0.97	1.01	0.99	0.98	0.99

(d) ANAEROBIC DISSIMILATION OF GLUCOSE BY *B. subtilis* (FORD'S TYPE)

Products	pH 6.00	pH 6.20	pH 6.40	pH 6.60	pH 6.80	pH 7.20	pH 7.60	pH 8.00
	Millimoles per 100 millimoles of glucose dissimilated							
2,3-Butanediol	36.8	39.5	32.3	27.7	20.8	17.65	11.82	Nil
Acetoin	1.31	2.65	0.99	2.89	2.37	1.44	2.99	2.10
Ethanol	20.51	15.05	13.81	15.10	20.2	20.4	22.3	36.9
Glycerol	29.9	31.1	33.5	19.81	18.99	12.61	10.32	17.00
Butyric acid	0.17	0.32	0.46	0.86	0.98	0.89	2.58	1.30
Acetic acid	0.87	1.16	0.74	2.24	2.36	7.44	12.81	49.5
Formic acid	12.38	16.57	11.52	19.00	17.63	27.6	39.6	96.0
Succinic acid	1.08	0.73	0.82	0.98	1.12	0.89	2.24	4.56
Lactic acid	41.4	65.6	70.9	97.1	95.0	106.7	119.0	34.1
Carbon dioxide	91.4	86.4	80.6	60.2	59.6	40.0	32.4	3.47
Hydrogen	0.38	0.48	0.16	1.81	0.49	0.23	0.33	0.78
Glucose carbon assimilated	82.1	15.8	15.2	33.4	28.4	25.3	22.6	21.2
Fermentation time, hr.	71	87	62	31	32	22	23	47
% glucose used	85.2	97.9	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	94.7
% carbon accounted for	100.0	102.0	98.0	104.3	100.3	98.3	105.0	92.8
O/R index	1.06	1.08	1.08	0.98	1.07	0.98	1.05	1.09

(e) FERMENTATION BALANCES FOR CLOSTRIDIA

Products	mMoles/100 mmoles glucose fermented					
	<i>Clostridium butyricum</i> ^a	<i>Clostridium lactoaceto-philum</i> ^a	<i>Clostridium perfringens</i> ^{a, b}	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ^a	<i>Clostridium butyricum</i> ¹⁰⁰	<i>Butyrbacterium rettgeri</i> ¹⁰⁰
Butyric acid	76	73	9 ^a 34 ^b	4.3	17.2	29
Acetic acid	42	28	15	60	14.2	88
Lactic acid	—	—	160	33	—	107
Carbon dioxide	188	190	24	176	221	203.5
Hydrogen	235	182	21	214	135	77.6
Ethanol	—	—	10	26	7.2	—
Butanol	—	—	—	—	56	58.6
Acetone	—	—	—	—	22.4	—
Acetoin	—	—	—	—	6.4	—
Isopropanol	—	—	—	—	—	12.1
Carbon recovered, %	96.0	91.0	98.3	97.1	99.6	96.2
O/R balance	0.97	1.16	0.81	1.05	1.01	1.06

表 3.4-2 ガスクロマトグラフの分析条件

	Ethanol, Acetate	2,3-Butanediol	H ₂	CO ₂
Column				
packing	Porapak-T	Chromosorb 101	molecular sieve 5A	activated carbon
dimension	φ 4 × 2000 mm	φ 3 × 2000 mm	φ 3 × 1000 mm	φ 3 × 500 mm
Temperature				
injection	200 °C	200 °C	room temp.	room temp.
column	170 °C	170 °C	room temp.	room temp.
Carrier gas	He	He	Ar	He
Flow rate	50 ml/min	50 ml/min	33 ml/min	33 ml/min
Detector	FID	FID	TCD	TCD

3.5 光合成、発酵水素発生微生物の発生速度比較

水素を発生する微生物は、第1章、表 12-1 と 12-2 に光合成微生物と発酵微生物に分けてまとめられている。光合成水素発生微生物は、光化学反応系を I だけしか持たないバクテリアと、I と II の二つを持つ藍藻、緑藻といったバクテリアより進化した微生物とに大別できる。発酵水素発生バクテリアもまた偏性嫌気性バクテリアと、それより進化したと考えられる通性嫌気性バクテリアとに大別できる。これらの微生物の多くは、代謝性質の研究過程で水素を発生することが認められただけであり、水素発生速度を測定した文献は少ない。測定条件がそれぞれ異なるので、単純に比較することはできないが、表 3.5-1 にそれぞれの系で比較的発生速度の速い微生物の速度を示した。

光化学反応系を二つ持つ微生物は、水分解で水素を発生するという利点があるが、水素発生速度は他の微生物に比べて遅いようである^{42,54-56)}。Miami大学の Mitui ら^{5,57)}が単離した *Oscillatoria* sp. Miami BG7 は海水中に棲む藍藻で、人工海水培地で実験した結果である。厳しい基質条件下での発生速度であるから、実用に一步近づいた微生物であると評価されている。*Anabaena cylindrica* は淡水産藍藻で、水素発生速度の速いことでよく知られている⁵⁸⁻⁶²⁾。緑藻類は藍藻に比べて発生速度がかなり遅い^{6,63)}。

光化学反応系を一つしか持たない光合成バクテリアは、水を分解して水素発生するのではなく、有機酸（電子供与体）を分解して水素発生する^{1-3,5,58,64-71)}。そのため、有機酸をどのように手当するかという問題があるが、藍藻類に比べると非常に速い速度で水素発生する⁶⁾。Miyake と Kawamura⁷¹⁾は、最近 *Rhodobacter sphaeroides* 8703 というバクテリアの水素発生速度を測定し、20,000 lux の明るさのもとで 10.4 mmol/(g-dry cell·h) の速さを得ている。

一方、発酵水素発生では、偏性嫌気性の *Clostridium* 属の菌がよく研究されている。この属の菌は、水素収率の大きいことで非常によく知られているが¹⁴⁾、発生速度に関して正確な測定データを報告しているものを見つけることはできなかった。Karube ら⁴¹⁾のグラフから計算した *C. butyricum* の発生速度は、7.3 mmol/(g-dry cell·h) であった。これは、Breure ら⁷²⁾、Miyake ら⁷³⁾の測定値とかなりよく一致しているので、*C. butyricum* はこの程度の発生速度であると思われる。

通性嫌気性菌では、*E. coli* の代謝性質が非常によく調べられている^{22,23,33,34,74-77)}。しかし、水素発生速度を測定したものは見つからなかった。ただ一つ Zajic と Brosseau⁷⁸⁾が廃水汚泥から単離した *E. coli* で発生速度を測定しているが、このバクテリアは後に *Citrobacter intermedius* と

訂正された。このバクテリアの水素発生速度は $9.5 \text{ mmol}/(\text{g-dry cell}\cdot\text{h})$ であった^{79,80)}。

実験条件などについてまったく記載の無いデータの中には非常に速いものも見られる。Jouanneau ら³⁾は *Rhodopseudomonas capsulata* B10 の水素発生速度として $260 \text{ ml}/(\text{g-dry cell}\cdot\text{h})$ を発表しており、同じバクテリアで Kondratieva と Gogotov⁶³⁾は $300\sim 500 \text{ ml}/(\text{g-dry cell}\cdot\text{h})$ という速度を発表している。

以上が水素発生速度の速い微生物である。これらの微生物に比べると、筆者らが単離したバクテリアは、より速い速度で水素発生する微生物（懸濁自由培養において $420 \text{ ml}/(\text{g-dry cell}\cdot\text{h})$ または $17 \text{ mmol}/(\text{g-dry cell}\cdot\text{h})$ ）であることが明らかになった。

表 3.5-1 *E. aerogenes* st. E.82005 と代表的な微生物の水素発生速度

Category	$\frac{\text{mmol}\cdot\text{H}_2}{\text{l-culture}\cdot\text{h}}$	$\frac{\text{mmol}\cdot\text{H}_2}{\text{g-dry cell}\cdot\text{h}}$	pH control method	Reference
I. Photosynthetic bacteria				
Double photosystems				
<i>Oscillatoria</i> sp. Miami BG 7	0.4	0.4	Tris-HCl buffer	[57]
<i>Anabaena cylindrica</i>	1.2	1.3	NaHCO ₃ -CO ₂ buffer	[59]
Single photosystem				
<i>Rhodopseudomonas capsulata</i>	5.3	5.3	phosphate buffer	[58]
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	3.0	2.5	phosphate buffer	[67]
II. Fermentative bacteria				
Strict anaerobe				
<i>Clostridium butyricum</i>	—	7.3	—	[41]
	—	7.0	phosphate buffer	[73]
Facultative anaerobe				
<i>Citrobacter intermedius</i>	11	9.5	automatically controlled	[80]
<i>Enterobacter</i> st. E.82005	11	17*	uncontrolled	(this work)
	11	11	uncontrolled	(this work)
	21	11	automatically controlled	(this work)

* Dry cell weight of this data was measured at an appropriate instant of the cultivation. Dry cell weight in all other data was measured at the end of the cultivation.

3.6 結論

筆者らが草の葉から単離した通性嫌気性のバクテリア *E. aerogenes* st. E.82005 の水素発生を詳しく調べた結果、バッチ培養に関して次のようなことが明らかになった。

(1) 自由培養における水素発生速度は菌体増殖の減衰期に最も速く、培養温度 38℃では、420 ml/(g-dry cell·h) 以上、すなわち 17 mmol/(g-dry cell·h) 以上の速さで水素発生する。この発生速度は、これまでに詳細が報告されたとの微生物の水素発生速度よりも速い。

(2) このバクテリアは、代謝産物によって培地 pH が小さくなると、代謝経路を変更して培地の酸性化を抑える機能を持つ。

(3) 菌体の増殖にとって、培地 pH は 7.0 が最も適している。pH 7.0 より小さい pH 値では、増殖量は培地 pH に対して直線的に変化し、pH 5.0 より酸性側での増殖は非常に難しい。

(4) 水素発生にとっては、pH 5.5~6.0 が最も適している。これより大きい pH 値でも小さい pH 値でも、水素発生速度は遅くなる。pH 7.0 における水素発生速度は、pH 6.0 における発生速度の 40%程度にしかない。

(5) 増殖の至適温度は 40.5℃である。至適温度から低い方への温度変化に対しては影響の度合は少ないが、高温側への変異に対しては非常に強い影響を受け、45℃では棲息することも難しいようである。

(6) 水素発生の至適温度も 40.5℃である。増殖に対する温度の影響と同じように、至適温度から低い方への温度変化に対しては発生速度への影響の度合は少ないが、高温側への変異に対しては非常に強い影響を受ける。

(7) グルコース 1 mol から得られる水素量は、pH 5.5~6.0 において約 1 mol である。

(8) ペプトンやハートインフュージョンなどは菌体の増殖促進に非常に効果があるが、水素発生速度を速める効果はほとんど無い。水素発生速度は、培地 pH に対して強い影響を受ける。

(9) 菌を固定化することによる水素発生への効果は、増殖に不適當な酸性 pH、あるいは増殖に適しているけれども水素発生に適していない pH において現れる。しかし、水素発生速度は至適 pH における水素発生速度の約 20%程度しか得られない。

以上、*Enterobacter aerogenes* strain E.82005 の水素発生に関して多くのことが明らかにされたが、なかでも、このバクテリアの水素発生速度が他の研究者によって報告されたとの微生物の水素発

第3章 水素発生特性

生よりも速いことは、特筆されるべきことではなかろうか。また、工業的利用では装置の利用効率の観点から発生速度の速いものが望ましいので、このバクテリアは、生物を使用した水素発生において、最も有望な微生物の一つになると考えられる。

参考文献

- 1 Gest, H. and M. D. Kamen; *J. Bacteriol.*, 58, 239-245(1949)
"Studies on the metabolism of photosynthetic bacteria."
- 2 Ormerod, J. G., K. S. Ormerod and H. Gest; *Arch. Biochem. Biophys.*, 94, 449-463(1961)
"Light-Dependent utilization of organic compounds and photoproduction of molecular hydrogen by photosynthetic bacteria; Relationships with nitrogen metabolism."
- 3 Jouanneau, Y., J.C. Willison, A. Colbeau, P.H. Hallenbeck, C et al. ;
Photochemical, Photoelectrochemical and Photobiological Processes, Hall and Paltz eds., 174-179(1982)
"Enhancement of the photoproduction of H₂ by *Rhodospseudomonas capsulata*:"
- 4 Kovas, K.L., C. Bagyinka and L.T. Serebriakova; *Curr. Microbiol.*, 9, 215-218(1983)
"Distribution and orientation of hydrogenase in various photosynthetic bacteria."
- 5 Mitsui, A., T. Matsunaga, H. Ikemoto and B. R. Renuka; *Dev. Ind. Microbiol.*, 26, 209-222(1985)
"Organic and inorganic waste treatment and simultaneous photoproduction of hydrogen by immobilized photosynthetic bacteria."
- 6 Vignais, P. M., A. Colbeau, J. C. Willison and Y. Jouanneau; *Adv. Microb. Physiol.*, 26, 155-234(1985)
"Hydrogenase, nitrogenase and hydrogen metabolism in the photosynthetic bacteria."
- 7 日本化学会; 新実験化学講座, 20, 丸善, (1978)
"生物化学 [1]"
- 8 Aiba, S. and S. Nagai; 生物化学工学:反応速度論, 科学技術社, (1975)
"生物科学工学:反応速度論"
- 9 Pirt, S. J.; *Proc. Royal Society : ser.*, 163, 224-231(1965)
"The maintenance energy of bacteria in growing cultures."
- 10 Neish, A. C. and G. A. Ledingham; *Can. J. Research, Sec. B*, 27, 694-704(1949)
"Production and properties of 2,3-butanediol"
- 11 Neish, A. C. and F. J. Simpson; *Can. J. Biochem. Physiol.*, 32, 147-153(1954)
"The anaerobic dissimilation of D-glucose-1-C₁₄, D-arabinose-1-C₁₄, and L-arabinose-1-C₁₄ by *Aerobacter aerogenes*."
- 12 Altermatt, H. A., F. J. Simpson and A. C. Neish; *Can. J. Biochem. Physiol.*, 33, 615-621(1955)
"The anaerobic dissimilation of D-ribose-1-C₁₄, D-xylose-1-C₁₄, D-xylose-2-C₁₄, and D-xylose-5-C₁₄ by *Aerobacter aerogenes*."
- 13 Altermatt, H.A., F.J. Simpson and A.C. Neish; *Can. J. Microbiol.*, 1, 473-478(1955)
"The fermentation of D-allose and D-glucose by *Aerobacter aerogenes*."
- 14 Wood, W.A.; in *The Bacteria*, vol.2, (Gunsalus, I.C. and R.Y. Stanier eds), Academic Press, New York, 59-150(1961)
"Fermentation of carbohydrates and related compounds."
- 15 Gottschalk, G.; *Bacterial Metabolism*, Springer-Verlag, New York, (1979)
- 16 Doelle, H.W.; *Bacterial Metabolism*, 2nd ed. Academic Press, Inc., New York,

(1975)

""

- 17 Mickelson, M. and C. H. Werkman; J. Bacteriol., 36, 67-76(1938)
"Influence of pH on the dissimilation of glucose by *Aerobacter indologenes*."
- 18 Bauchop, T. and S. R. Elsdon; J. gen. Microbiol., 23, 457-469(1960)
"The growth of micro-organisms in relation to their energy supply."
- 19 Hadjipetrou, L. P., J. P. Gerrits, F. A. G. Teulings and A. et al.; J. gen. Microbiol., 36, 139-150(1964)
"Relation between energy production and growth of *Aerobacter aerogenes*"
- 20 Hadjipetrou, L. P. and A. H. Stouthamer; J. gen. Microbiol., 38, 29-34(1965)
"Energy production during nitrogen respiration by *Aerobacter aerogenes*"
- 21 Hernandez, E. and M. J. Johnson; J. Bacteriol., 94, 991-995(1967)
"Anaerobic growth yields of *Aerobacter cloacae* and *Escherichia coli*."
- 22 Macy, J., H. Kulla and G. Gottschalk; J. Bacteriol., 125, 423-428(1976)
"H₂-dependent anaerobic growth of *Escherichia coli* on L-malate: Succinate formation."
- 23 Mode, P. and D. Rittenberg; Biochemistry, 6, 69-80(1967)
"Measurement of the activity of the hexose monophosphate pathway of glucose metabolism with the use of [18O] glucose. Variations in its activity in *Escherichia coli* with growth conditions."
- 24 Stanier, R.Y., E.A. Adelberg and J.L. Ingraham; The Microbial World, 4th ed., Prentice-Hall, INC., Englewood Cliffs, New Jersey, (1979)
""
- 25 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"
- 26 Buchanan, R.E., and N.E. Gibbons; Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed., Williams and Wilkins, (1974)
"Bergey's manual of determinative bacteriology."
- 27 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)"
- 28 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"
- 29 Aiba, S., A.E. Humphrey and N.F. Millis; 生物化学工学,
東京大学出版会, (1972)
"生物化学工学"
- 30 Mortlock, R. P. and W. A. Wood; J. Bacteriology, 88, 838-844(1964)
"Metabolism of pentoses and pentitols by *Aerobacter aerogenes*: I. Demonstration of pentose isomerase, pentulokinase, and pentitol dehydrogenase enzyme families"
- 31 Mortlock, R. P. and W. A. Wood; J. Bacteriology, 88, 845-849(1964)
"Metabolism of pentose and pentitols by *Aerobacter aerogenes*: II. Mechanism of acquisition of kinase, isomerase, and dehydrogenase activity"
- 32 Yanagida, T.; 微生物科学, 1, (1980)
"分類・代謝・細胞生理"
- 33 Blackwood, A. C., A. C. Neish and G. A. Ledingham; J. Bacteriol., 72, 497-499(1956)

- "Dissimilation of glucose at controlled pH values by pigmented and non-pigmented strains of *Escherichia coli*."
- 34 Bang, W. G., U. Behrendt, S. Lang and F. Wagner; *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 1013-25(1983)
"Continuous production of L-tryptophan from indole and L-serine by immobilized *Escherichia coli* cells."
- 35 D'Souza, S. F. and G. B. Nadkarni; *Biotechnol. Bioeng.*, 22, 2179-89(1980)
"Continuous conversion of sucrose to fructose and gluconic acid by immobilized yeast cell multienzyme complex."
- 36 Ginkel, C. G., J. Tramper, K.Ch.A.M. Luyben and A. Klapwijk; *Enzyme Microb. Technol.*, 5, 297-303(1983)
"Characterization of *Nitrosomonas europaea* immobilized in calcium alginate."
- 37 Karube, I., T. Matsunaga, T. Otsuka, H. Kayano and S. Suzuki; *Biochim. Biophys. Acta*, 637, 490-495(1981)
"Hydrogen evolution by co-immobilized chloroplasts and *Clostridium butyricum*"
- 38 Karube, I., S. Kuriyama, T. Matsunaga and S. Suzuki; *Energy Developments in Japan*, 3, 141-152(1980)
"Biogas production by immobilized whole cells"
- 39 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*"
- 40 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*"
- 41 Karube, I., S. Suzuki, T. Matsunaga and S. Kuriyama; *Annals New York Academy of Sciences*, 369, 91-98(1981)
"Biochemical energy conversion by immobilized whole cells"
- 42 Kayano, H., T. Matsunaga, I. Karube and S. Suzuki; *Biochim. Biophys. Acta*, 638, 80-85(1981)
"Hydrogen evolution by co-immobilized *Chlorella vulgaris* and *Clostridium butyricum* cells"
- 43 Kim, I. H., D. H. Nam and D. D. Y. Ryu; *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 8, 195-202(1983)
"Cephalixin synthesis using immobilized *Xanthomonas citri* cells."
- 44 Nazly, N. C.J. Knowles, A.J. Beardsmore, W.T. Naylor and E.G et al. ; *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 33B, 119-126(1983)
"Detoxification of cyanide by immobilised fungi."
- 45 Ooshima, H. and Y. Harano; *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 143-155(1983)
"Effects of mass-transfer resistance on apparent stability and performance of fixed-bed immobilized enzyme reactors: Theory and experiments with immobilized invertase"
- 46 Sato, T., T. Tosa and I. Chibata; *Eur. J. Appl. Microbiol.*, 2, 153-160(1976)
"Continuous production of 6-aminopenicillanic acid from penicillin by immobilized microbial cells."
- 47 Simon, H., P. Egerer and H. Gunther; in *Hydrogenase: Their Catalytic*

- Activity, Structure and Function, (Schlegel, H.G. and K. Schneider eds), Erich Goltze KG, Goettingen, 235-251(1978)
"Some mechanistic aspects and immobilization of soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus*."
- 48 Wheatley, M. A. and C. R. Phillips; *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 583-589(1984)
"Enzymatic properties of immobilized *Alcaligenes faecalis* cells with cell-associated B-glucosidase activity."
- 49 Yamamoto, K. T, Tosa and I. Chibata; *Biotechnol. Bioeng.*, 22, 2045-2054(1980)
"Continuous production of L-alanine using *Pseudomonas dacunhae* immobilized with carrageenan."
- 50 Yamamoto, K. T. Sato, T. Tosa and I. Chibata; *Biotechnol. Bioeng.*, 16, 1589-1599(1974)
"Continuous production of L-citrulline by immobilized *Pseudomonas putida* cells."
- 51 Yamamoto, K., T. Sato, T. Tosa and I. Chibata; *Biotechnol. Bioeng.*, 16, 1601-1610(1974)
"Continuous production of urocanic acid by immobilized *Achromobacter liquidum* cells."
- 52 Chibata, I.; 固定化酵素 (千畑一郎編),
講談社サイエンティフィック, (1975)
"固定化酵素"
- 53 Chibata, I.; 固定化生体触媒 (千畑一郎編),
講談社サイエンティフィック, (1986)
"固定化生体触媒"
- 54 Belkin, S. and E. Padan; in *Hydrogenase; Their Catalytic Activity, Structure and Function*, (Schlegel, H.G. and K. Schneider eds), Erich Goltze KG, Goettingen, 387-394(1978)
"Sulfide dependent hydrogen evolution and CO₂ photoassimilation by cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*."
- 55 Bothe, H. and G. Eisbrenner; in *Hydrogenase; Their Catalytic Activity, Structure and Function*, (Schlegel, H.G. and K. Schneider eds), Erich Goltze KG, Goettingen, 353-369(1978)
"Aspects of hydrogen metabolism in blue-green algae."
- 56 Kerfin, W., H. Spiller, A. Ernst and P. Boger; in *Hydrogenase; Their Catalytic Activity, Structure and Function*, (Schlegel, H.G. and K. Schneider eds), Erich Goltze KG, Goettingen, 381-386(1978)
"Properties of the hydrogen producing system in the blue-green alga *Nostoc muscorum*."
- 57 Philips, E.J., and A. Mitsui; *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 1212-1220(1983)
"Role of light intensity and temperature in the regulation of hydrogen photoproduction by the marine cyanobacterium *Oscillatoria* sp. strain Miami BG7"
- 58 Gest, H. and M. D. Kamen; *Science*, 109, 558-559(1949)
"Photoproduction of molecular hydrogen by *Rhodospirillum rubrum*."
- 59 Weissman, J. C. and J. R. Benemann; *Appl. Environ. Microbiol.*, 33, 123-131(1977)
"Hydrogen production by nitrogen-starved cultures of *Anabaena cylindrica*"
- 60 Tel-Or, E. and L. Packer; in *Hydrogenase; Their Catalytic Activity,*

- Structure and Function, (Schlegel, H.G. and K. Schneider eds), Erich Goltze KG, Goettingen, 371-380(1978)
 "The hydrogenase of *Anabaena cylindrica* and *Nostoc muscorum* in heterocysts and vegetative cells."
- 61 Miyamoto, K. and Y. Miura; 化学工学, 45, 314-319(1981)
 "光合成微生物による太陽エネルギーの変換利用:水素生産を中心として"
- 62 Asada, Y., N. Tomizuka and S. Kawamura; J. Ferment. Technol., 63, 85-90(1985)
 "Prolonged hydrogen evolution by a Cyanobacterium (Blue-green alga), *Anabaena* sp."
- 63 Kondratieva, E. N. and I. N. Gogotov; Adv. Biochem. Eng./Biotechnol., 28, 139-191(1985)
 "Production of Molecular Hydrogen in Microorganisms"
- 64 Sergers, L. and W. Verstraete; Biotech. Bioeng., 25, 2843-2853(1983)
 "Conversion of organic acids to H₂ by Rhodospirillaceae grown with glutamate or dinitrogen as nitrogen source"
- 65 Weetall, H.H., B.P.Sharma and C.C.Detar; Biotech. Bioeng., 23, 605-614(1981)
 "Photometabolic Production of Hydrogen from Organic Substrates by Free and Immobilized Mixed Cultures of *Rhodospirillum rubrum* and *Klebsiella pneumoniae*"
- 66 Gest, H.; J. Bacteriol., 63, 111-121(1952)
 "Properties of cell-free hydrogenases of *Escherichia coli* and *Rhodospirillum rubrum*."
- 67 Gest, H., J.G. Ormerod and K.S. Ormerod; Arch. Biochem. Biophys., 97, 21-33(1962)
 "Photometabolism of *Rhodospirillum rubrum*: light-dependent dissimilation of organic compounds to carbon dioxide and molecular hydrogen by an anaerobic citric acid cycle."
- 68 Jungermann, K. and G. Schon; Arch. Microbiol., 99, 109-116(1974)
 "Pyruvate formate lyase in *Rhodospirillum rubrum* Ha adapted to anaerobic dark conditions."
- 69 Wall, J. D. and H. Gest; J. Bacteriology, 137, 1459-1463(1979)
 "Derepression of nitrogenase activity in glutamine auxotrophs of *Rhodopseudomonas capsulata*"
- 70 Gogotov, I.N., N.A. Zorin and T.V. Laurinavichene; in Hydrogenase; Their Catalytic Activity, Structure and Function, (Schlegel, H.G. and K. Schneider eds), Erich Goltze KG, Goettingen, 171-182(1978)
 "Comparison of properties and function of hydrogenase and NADP-reductase isolated from *Thiocapsa roseopersicina*."
- 71 Miyake, J. and S. Kawamura; Int. J. Hydrogen Energy, 12, 147-149(1987)
 "Efficiency of light energy conversion to hydrogen by the photosynthetic bacterium *Phodobacter sphaeroides*."
- 72 Breure, A. M., W. A. Duetz, G. R. Zoutberg, R. Mulder and J. et al.; FEMS Microbiol. Lett., 33, 289-292(1986)
 "Measurement of the rate of hydrogen production by *Clostridium butyricum* using an amperometric method."
- 73 Miyake, J., X-Y. Mao and S. Kawamura; J. Ferment. Technol., 62, 531-535(1984)
 "Photoproduction of hydrogen from glucose by co-culture of a photosynthetic

- bacterium and *Clostridium butyricum*."
- 74 Farkas, A., L. Farkas and J. Yudkin; Proc. Roy. Soc. (London), B115, 373-379(1934)
"The decomposition of sodium formate by *Bacterium coli* in the presence of heavy water."
- 75 Ordal, E. J. and H. O. Halvorson; J. Bacteriol., 38, 199-220(1939)
"A comparison of hydrogen production from sugars and formic acid by normal and variant strains of *Escherichia coli*."
- 76 Stokes, J. L.; J. Bacteriol., 57, 147-158(1949)
"Fermentation of glucose by suspensions of *Escherichia coli*."
- 77 Strecker, H. J.; J. Biol. Chem., 189, 815-830(1951)
"Formate fixation in pyruvate by *Escherichia coli*."
- 78 Zajic, J. E. and J. D. Brosseau; Dev. Ind. Microbiol., 18, 637-647(1977)
"Hydrogen gas production by *Escherichia coli* isolated from sewage sludge on acetate"
- 79 Brosseau, J. D. and J. E. Zajic; Dev. Ind. Microbiol., 19, 553-567(1978)
"Hydrogen gas production and growth of *Citrobacter intermedius* on glucose"
- 80 Brosseau, J.D. and J.E.Zajic; Biotech. Bioeng., 24, 1469-1472(1982)
"Agitation Effects on Hydrogen Gas Production by *Citrobacter intermedius*"