

微生物を利用した発酵水素発生

目次詳細	ii
第1章 緒論	1
第2章 水素発生微生物の探索	27
第3章 <i>Enterobacter aerogenes</i> strain E.82005 の バッチ培養における水素発生特性	43
第4章 バイオマス資源を基質にした水素発生	97
第5章 E.82005 菌株を利用した微生物電池	139
第6章 変異株選別による水素発生速度の改良	157
第7章 発酵水素発生とメカニズム	175
第8章 結言	221

微生物を利用した発酵水素発生

目次詳細

第1章 緒論	
はじめに	1
1.1 バイオマスエネルギー	2
1.1.1 植物の生産性	2
1.1.2 光合成反応と水素生成反応	6
1.2 水素発生微生物と水素発生研究の状況	7
1.2.1 発酵による水素発生の研究	7
1.2.2 光水素発生の研究	11
1.2.3 微生物を利用した水素生産の研究	12
1.3 研究の目的と各章の概要	13
参考文献	17
第2章 水素発生微生物の探索	27
2.1 水素発生微生物の探索	27
2.2 水素発生菌の単離と同定	28
2.2.1 単離方法	29
2.2.2 同定方法	30
2.2.3 同定結果	32
2.2.4 考察	32
2.3 水素発生速度の測定	35
2.3.1 実験方法	35
2.3.2 実験結果	37
2.3.3 考察	39
2.4 結論	39
参考文献	41

第3章	<i>Enterobacter aerogenes</i> strain E.82005 のバッチ培養における	
	水素発生特性	43
3.1	自由培養における水素発生	43
3.1.1	実験方法	44
3.1.2	実験結果	47
3.1.3	考察	50
3.2	pHコントロール培地における水素発生	58
3.2.1	菌体の増殖と至適 pH	58
3.2.2	水素発生速度と至適 pH	59
3.2.3	水素収率と至適 pH	59
3.2.4	水素発生と増殖の至適温度	60
3.3	ペプトンの影響と合成培地での水素発生速度	67
3.3.1	実験方法	67
3.3.2	実験結果	68
3.3.3	考察	72
3.3.4	結論	72
3.4	固定化水素発生とグルコース代謝	77
3.4.1	混合酸発酵と <i>Enterobacter aerogenes</i> の グルコース代謝	77
3.4.2	固定化と水素発生速度	78
3.4.3	結論	81
3.5	光合成、発酵水素発生微生物の発生速度比較	88
3.6	結論	90
	参考文献	91
第4章	草木・生ゴミを基質とした水素発生	97
4.1	各種基質と <i>Enterobacter aerogenes</i> の発酵水素発生	100
4.1.1	実験方法	100
4.1.2	実験結果と考察	101
4.1.3	結論	104
4.2	草木を基質とした水素発生	108
4.2.1	実験方法	108
4.2.2	実験結果	109

4.2.3 考察	109
4.3 台所生ごみからの水素発生	111
4.3.1 実験方法	111
4.3.2 実験結果と考察	112
4.3.3 結論	118
4.4 廃糖蜜を利用した連続水素発生	119
4.4.1 実験方法	119
4.4.2 実験結果と考察	121
4.4.3 結論	128
4.5 ウレタンフォームをフロックの担体を使用した連続発酵	129
4.4.1 実験方法	129
4.4.2 実験結果と考察	129
4.4.3 結論	134
4.6 結論	135
参考文献	137
第5章 E.82005 菌株を利用した微生物電池	139
5.1 微生物電池のこれまでの研究	140
5.2 E.82005 菌株を利用した微生物電池	142
5.2.1 実験方法	142
5.2.2 実験結果と考察	144
5.3 電極活物質の分析	146
5.3.1 実験方法	146
5.3.2 実験結果と考察	147
5.4 考察	152
5.5 結論	153
参考文献	154
第6章 変異株選別による水素発生速度の改良	157
6.1 突然変異菌の一般的選別方法	157
6.1.1 突然変異の発現	157
6.1.2 栄養要求変異株、薬品耐性菌の選別方法	158
6.1.3 ガス産性菌の判別方法	159

6.2	水素発生菌選別方法の開発と選別結果	160
6.2.1	選別方法	160
6.2.2	選別実験と結果	162
6.2.3	選別株の水素発生速度	164
6.2.4	選別株の生物化学的性状検査	165
6.2.5	考察	166
6.3	確率論による混合数と釣菌数の理論的決定法	169
6.3.1	混合資料から目的資料を 取り上げるために必要なサンプル数	169
6.3.2	労力削減のための最適混合数	172
6.3.3	考察	173
6.4	結論	174
	参考文献	174
第7章	発酵水素発生とメカニズム	175
7.1	水素発生の化学熱力学と問題点	175
7.2	<i>Enterobacter aerogenes</i> の水素発生経路	179
7.3	酸化還元電位と pH の関係	186
7.3.1	水素の酸化還元電位	186
7.3.2	細胞内 pH と培地 pH の関係	187
7.3.3	NAD の酸化還元電位	187
7.3.4	膜結合ヒドロゲナーゼの活性の至適 pH	188
7.3.5	膜結合ヒドロゲナーゼの構造	188
7.4	NAD 経路の水素発生メカニズムの提案	191
7.4.1	細胞膜の両側で反応する水素発生メカニズムの仮説	191
7.4.2	考察	195
7.5	ギ酸経路の水素発生メカニズムの提案	197
7.5.1	ギ酸-水素発生の研究の歴史	198
7.5.2	ギ酸の標準酸化還元電位	199
7.5.3	ギ酸-水素発生のメカニズム	203
4.5.4	考察	208
7.6	結論	209
	参考文献	212

第8章 結言	221
8.1 サトウキビを原料とした発酵水素生産の プロセスとエネルギー生産量	222
8.2 エネルギー基準単価による評価	225
8.3 結言	227
参考文献	227
本研究に関連して発表した論文	228
その他学会誌、総説誌、国際会議などで発表した論文	229
謝辞	230

第1章 緒 論

はじめに

1973年10月、OPEC は突然石油価格をそれまでの 3.01 ドル/バレルから 3.65 ドル/バレルに値上げすることを発表した。3ヶ月後の1974年1月には 11.65 ドル/バレルと約4倍に暴騰し、安い石油価格に胡座をかいていた先進各国は強烈なショックを受けた。以来、各国は石油代替エネルギーの開発に真剣に取り組むようになった。日本においては、1974年7月、さっそく通産省工業技術院に「サンシャイン計画推進本部」が設置され、原子力関係を除く新しいエネルギー技術の開発に力が注がれることになった。

「サンシャイン計画」では、太陽エネルギー、地熱エネルギー、石炭のガス化・液化、水素エネルギーが主要な新エネルギー源として位置付けられ、これらのエネルギーの新技术開発が計画の重要課題とされた。当時、横浜国立大学工学部電気工学科の教授であった太田時男先生(前同大学学長)は、この「サンシャイン計画」の水素エネルギー部門において、「光化学・熱化学混成水素製造」の技術開発を担当しておられた。筆者は、幸いにも太田先生の勧誘を受けて、光化学・熱化学混成水素製造プロセスの研究に加わることができた。筆者が担当したのはこのプロセスの中のヨウ化水素から水素を分解分離する部分であったが、太陽光を利用してヨウ化水素を製造するこの研究にたずさわる間に、生物の光合成機能を利用して水素発生ができないものであろうか、と考えるようになった。1978年8月、スイスのチューリッヒで開かれた第2回世界水素エネルギー会議に出席し、既にそのような試みがなされていることを知った時の驚きは、いまでも忘れられない思い出である。

生物の機能を利用して水素製造をしたいと言う考えは、その後長く筆者の胸にわだかまっていたが、1982年若尾研究室の一テーマとして取り上げられ、爾来約 13 年に渡る研究を、「微生物を利用した発酵水素発生」として、此処にまとめた。

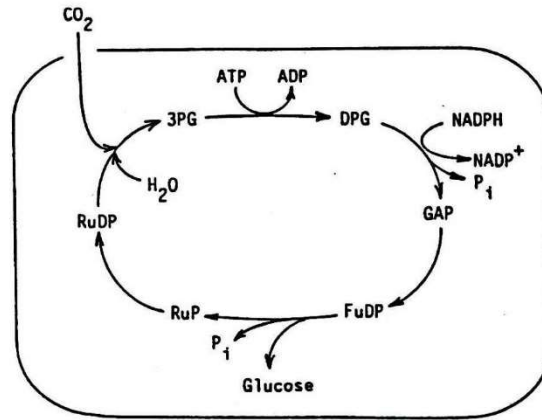
第1章 緒論

1.1 バイオマスエネルギー

地球に降り注ぐ太陽エネルギーは、太陽常数を 1.395 kW/m^2 であるとすれば、約 1.73×10^{14} kW と計算される。この入射エネルギーのうち、約 30 % は直接反射で放射され、約 47 % は大地、海洋などを暖めるのに、また約 23 % は蒸発、融雪などに使われると見積もられている。そして、入射エネルギーのわずか 0.02 % 約 4×10^{10} kW、年間にして約 3.6×10^6 億 kWh が植物の光合成によるバイオマス生産に利用されているにすぎない¹⁾。すなわち、ほとんど総ての入射エネルギーは光合成以外の自然現象に消費されている。しかし、昭和60年度の日本の火力発電電力量は 4,240 億 kWh であるから²⁾、このバイオマス生産に利用された太陽エネルギー量は、日本の火力発電電力量の約 850 倍に相当する莫大な量である。古来、バイオマスのエネルギー利用は、炭を除けば、直接燃やすだけであり、炊飯、給湯などその利用量は非常にわずかであった。したがって、化石燃料に代わる新しいエネルギー源の開発のために、植物の光合成機能あるいはバイオマスを利用したエネルギー変換技術の開発が待たれる訳である³⁻²⁷⁾。

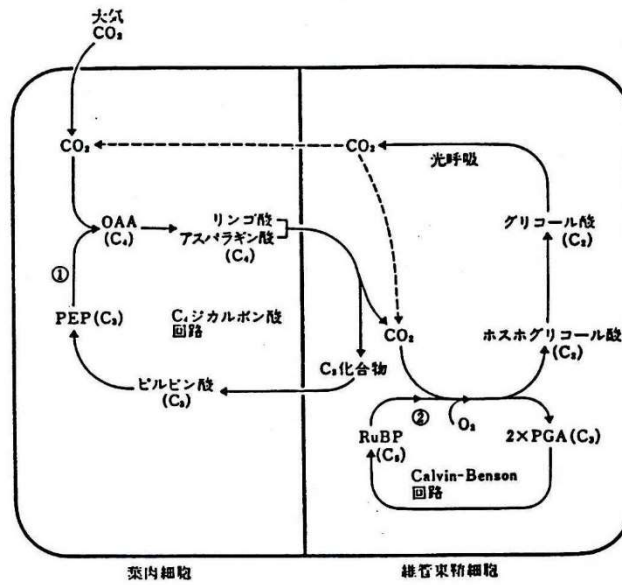
1.1.1 植物の生産性

植物の光合成による CO_2 固定経路には、 C_3 回路と C_4 回路のあることが知られている。 C_3 回路は Calvin-Benson 回路と呼ばれている反応系で、5 単糖のリブローズ 1,5-二リン酸 (RuDP, Ribulose 1,5-diphosphate) と大気中の CO_2 が、RuDPカルボキシラーゼの酵素作用によって 2 分子の 3 炭素化合物ホスホグリセリン酸 (PGA, Phosphoglyceric acid) を形成する炭酸固定回路のことである (図 1.1-1(a))。 C_4 回路は、Kortschak らがハワイでサトウキビの葉の炭酸固定を調べているときに発見し²⁸⁾、Hatch と Slack ら^{29,30)} によって明らかにされた回路である。 C_4 回路では、図 1.1-1(b) に示したように、大気中の CO_2 はまず 3 炭素化合物のホスホエノールピルビン酸 (PEP, Phosphoenolpyruvate) と結合して 4 炭素化合物のオキザロ酢酸に固定される。オキザロ酢酸は還元されてリンゴ酸またはアスパラギン酸になり、別の細胞系に運ばれてピルビン酸と CO_2 に分解さる。 CO_2 はそこではじめて Calvin-Benson 回路に取り込まれ、再び炭酸固定されてグルコースを生産する。このように、大気中の CO_2 を C_3 回路で固定する植物を C_3 植物、 C_4 回路で固定する植物を C_4 植物と呼んでいる。



3PG : 3-phosphoglycerate
 DPG : 1,3-diphosphoglycerate
 GAP : glyceraldehyde 3-phosphate
 FuDP : fructose 1,6-diphosphate
 RuP : ribulose 5-phosphate
 RuDP : ribulose 1,5-diphosphate

図1.1-1 (a) Calvin-Benson 回路 (C₃ 回路)



C₄ 植物の炭酸固定系と光呼吸系
 PEP: ホスホエノールピルビン酸, OAA: オキサロ酢酸, RuBP: リブ
 ロース 1,5-ニリン酸, PGA: 3-ホスホグリセリン酸, ①: PEP カルボ
 キシラーゼ, ②: RuBP カルボキシラーゼ.

図1.1-1 (b) C₄ 植物の炭酸固定

表1.1-1 C₃植物、C₄植物の生産性比較^{31,32)}

植物名	測定地	固定系	純生産量 [t/ha/yr]	栽培日数 [d]	平均CGR [g/m ² /d]	maxCGR [g/m ² /d]
ネピアグラス	フエルトリコ	C4	85.9	365	23.5	60
サトウキビ	ハワイ	C4	67.3	365	18.4	38
ソルガム(トウキビ)	カリフォルニア	C4	46.6	210	22.2	-
テンサイ	札幌	C3	22.9	175	13.1	28
	カリフォルニア		42.4	290	14.6	-
	イギリス		-	-	-	31
キャッサバ	シヤリ	C3	41.0	365	11.2	-
トウモロコシ	イタリア	C4	34.0	140	24.3	-
	塩尻		26.5	128	20.7	52
	福岡		-	-	-	55
	カリフォルニア		-	-	-	52
	ニューヨーク		-	-	-	52
アルファルファ	カリフォルニア	C3	29.7	250	14.1	-
イネ	フィリピン	C3	20.0	125	16.0	55
	福井		19.7	161	12.2	-
	筑後		-	-	-	36
ハレイショ	カリフォルニア	C3	22.0	-	-	37
パールミレット	A. C. Tオーストラリア	C4	21.7	117	18.5	-
	N. Tオーストラリア		-	-	-	54
サツマイモ	鹿児島	C3	20.5	169	12.1	21
タピス	盛岡	C3	9.4	113	8.3	27
	アイオリ		10.4	110	-	-

C₄植物は熱帯原産のイネ科の栽培植物に多くみられ、主な作物には、サトウキビ、トウモロコシ、ソルガム（モロコシ類）、シコクビエ、ハトムギ、アワ、キビ、ヒエ、パールミレット（トウジンビエ）、ネピアグラス（チカラシバの一種）などがある^{14,31-33)}。これらの植物は、表 1.1-1、図 1.1-2 に示したように、C₃植物に比べて光合成能力が大きい^{31,32)}。生育日数を勘案した平均CGR（Crop Growth Rate）は、C₃植物ではおよそ 12 g/(m²・day) である。それに対し、C₄植物ではおよそ 20 g/(m²・day) もある（図 1.1-2）。また、高緯度地方でも生産力は高い。そこで、C₄植物をエネルギー生産に利用することが広く考えられている^{23,33,34)}。

ところで、C₄植物のサトウキビは茎に 15 %ほどの甘蔗糖（Saccharose または Sucrose）を含み、純生産量も大きい。そのため、砂糖の生産だけでなく、アルコール発酵によるエネルギー生産植物としても有望視されている。サッカロースの生産量をグルコース換算で 9 ton/(ha・yr) と見積ると、グルコースの完全酸化による自由エネルギー変化（ΔG）は -677.5 kcal/mol (H₂O(gas)) または -689.8 kcal/mol (H₂O(liquid)) であるから、1 km²あたりの利用可能エネルギー量は、

$$\begin{aligned}
 Q_{\text{eff}} &= 689.8 \times 9,000,000 / 180 \times 100 \\
 &= 3.45 \times 10^9 \text{ kcal/(km}^2 \cdot \text{yr)}
 \end{aligned}$$

第1章 緒論

になる。昭和61年度の日本の石油消費量は 2.2×10^{15} kcal/yr であった¹³⁾から、もし、全石油量をグルコースの自由エネルギー変化で賄うとすれば、サトウキビの栽培面積は、

$$\begin{aligned} S_{\text{cult}} &= 2.2 \times 10^{15} / (3.45 \times 10^9) \\ &= 6.38 \times 10^5 \\ &= 63.8 \text{ 万km}^2 \end{aligned}$$

必要になる。これは、日本の面積 (37万km^2) のおよそ2倍の面積、ボルネオ島 (74.6万km^2) くらいに相当する栽培面積である。したがって、バイオマスの利用は、生産するエネルギー量だけではなく、バイオマス生産によって派生する種々の効果を含めて、総合的に評価しなければならないであろう。

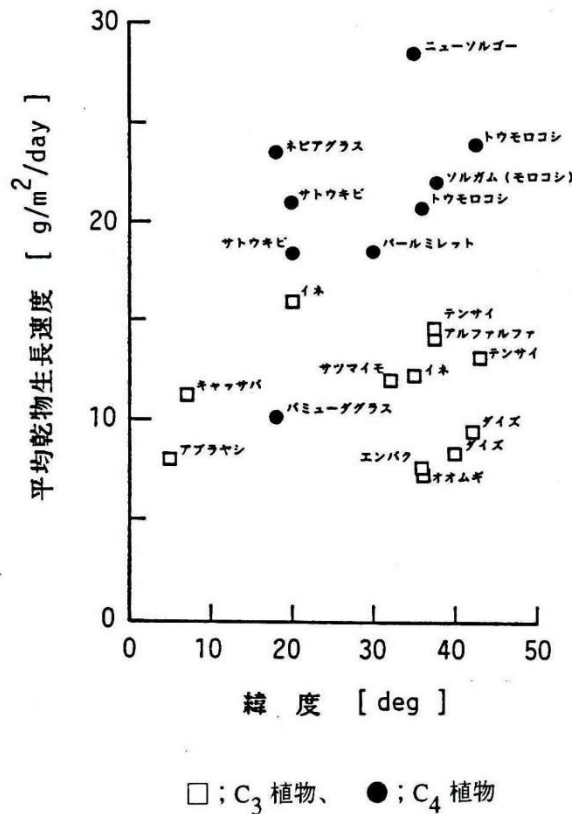


図 1.1-2 C₃ 植物と C₄ 植物の平均乾物成長速度

1.1.2 光合成反応と水素生成反応

植物は生長のためあるいは甘蔗糖合成などエネルギー貯蔵のために、太陽エネルギーを非常に効率よく化学エネルギーに変換するプロセスを持っている³⁵⁻⁴²⁾。このエネルギー変換プロセスの第一ステップは、光エネルギーによって電子を励起し、フェレドキシン (Feredoxin, Fd) や NADP (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) を還元することから始まっている⁴³⁾。近年の研究で、藻類、バクテリア類の或るものは、Fd あるいは NADP の還元体からヒドロゲナーゼを介して水素を発生していることが知られるようになった^{41,44-46)}。したがって、この変換機構を利用すれば、生長のためにエネルギーを消費したり蔗糖に変換するまでもなく、太陽エネルギーを直接水素エネルギーに変えることができるであろう^{45,47-50)}。特に、水素は燃焼すると水になるだけであり、化石燃料、バイオマス燃料のように、CO₂を排出することがない。したがって、現在、地球規模で問題になっているCO₂による温暖化、あるいは酸性雨などによる環境破壊の恐れがない^{21,51,52)}。つまり、クリーンエネルギーという利点がある。

このような観点から、光合成機能を利用した太陽エネルギーの直接水素変換、あるいはバイオマス資源を利用した間接水素変換を目的とした微生物による水素発生の研究が数多く進められている。

1.2 水素発生微生物と水素発生研究の状況

ある種の微生物が水素を発生することは、かなり以前から知られていた。1887年に、Hoppe-Seylerはギ酸カルシウム水溶液に川泥を加えると、水素と炭酸ガスが等量発生することを観察している⁵³⁾。当時は、まだ分類学が余り発達していなかったため、この微生物を特定することはできなかったが、現在では、バクテリアに関しては、Bergey's Manual^{54,55)} など同定マニュアルが整備され、かなり正確に特定できるようになっている。水素を発生するバクテリアは、多くの総説に詳しく述べられており⁵⁶⁻⁵⁹⁾、これらの総説から、重複しないと思われるバクテリアを数えると、22科57属にもなる (Bergey's Manual 8th ed. に基づいた分類で、全48科245属)。種で数えるとどれくらいになるか想像もつかない。シアノバクテリア (藍藻)⁶⁰⁻⁶⁷⁾、ユーグレナ (みどりむし)⁶⁸⁾、緑藻⁶⁴⁾ など藻類の光合成による水素発生も多数報告されており^{44,69-71)}、水素発生は微生物にとって必ずしも特殊な性質と言うものではないようである。表 12-1 と 12-2 にその一覧を示した。

1.2.1 発酵による水素発生の研究

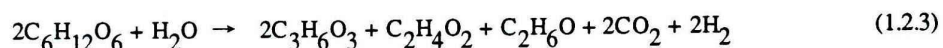
水素発生の研究は、したがって、古くから行われている。バクテリアの発酵水素発生に関しては、1892年に Frankland らが *Bacillus ethaceticus* の代謝研究を行い、マンニトールから水素と炭酸ガスを発生することを報告した^{72,73)}。1901年になると、Pakes と Jollyman⁷⁴⁻⁷⁶⁾ は *Bacillus coli communis* など4種類のバクテリアを使って、ギ酸ナトリウムから発生するガスの定量分析を行っている。培地に溶存している炭酸ガスを煮沸して追い出し水素量と比較すると、実験誤差の範囲で1:1になることから、これらのバクテリアは



あるいは



の反応でギ酸を分解すると結論した⁷⁵⁾。また、おなじ1901年に、Harden は *Bacillus coli communis* を使ってグルコースの発酵産物を分析し、乳酸、コハク酸、酢酸、エタノール、ギ酸、炭酸ガス、水素が産生されることを報告した⁷⁷⁾。彼は量論的考察から



で表すと、 CO_2 と H_2 を実測値より幾分過大に見積りすぎているけれども、この反応をよく説明できるとした。さらに、ギ酸を分解してガスを発生するバクテリアは、同じくグルコースを分解

表 1.2-1 水素発生することが認められたバクテリアの分類

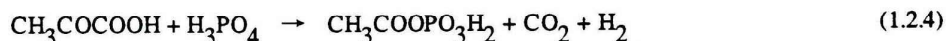
Section 1. The spirochetes Family I. Spirochaetaceae Genus I. Spirochaeta	Section 12. Gram-positive cocci Family I. Micrococcaceae Genus I. Micrococcus
Section 2. Aerobic/microaerophilic, motile, helical/vibrioid Gram-negative bacteria Genus Azospirillum Genus Campylobacter	Other genera Streptococcus Peptococcus Peptostreptococcus Ruminococcus Sarcina
Section 4. Gram-negative aerobic rods and cocci Family I. Pseudomonadaceae Genus I. Pseudomonas Family II. Azotobacteraceae Genus I. Azotobacter Genus II. Azomonas Family III. Rhizobiaceae Genus I. Rhizobium Family IV. Methylococcaceae Genus II. Methylomonas	Section 13. Endospore-forming gram-positive rods and cocci Genus Bacillus Genus Clostridium
Other genera Xanthobacter Alcaligenes	Section 14. Regular, nonsporling, gram-positive rods Genus Lactobacillus
Section 5. Facultatively anaerobic gram-negative rods Family I. Enterobacteriaceae Genus I. Escherichia Genus III. Salmonella Genus IV. Citrobacter Genus V. Klebsiella Genus VI. Enterobacter Genus VIII. Serratia Genus IX. Hafnia Genus XI. Proteus Family II. Vibrionaceae Genus II. Photobacterium Genus III. Aeromonas	Section 15. Irregular, nonsporling, gram-positive rods Genus Eubacterium Genus Acetobacterium Genus Thermoanaerobacter
Section 6. Anaerobic gram-negative straight, curved and helical rods Family I. Bacteroidaceae Genus I. Bacteroides Genus II. Fusobacterium Genus IV. Butyrivibrio Genus IX. Selenomonas	Section 16. The mycobacteria Family Mycobacteriaceae Genus Mycobacterium
Section 7. Dissimilatory sulfate- or sulfur-reducing bacteria Genus Desulfovibrio	Phototrophic bacteria Family I. Rhodospirillaceae Genus I. Rhodospirillum Genus II. Rhodopseudomonas Genus III. Rhodomicrobium Family II. Chromatiaceae Genus I. Chromatium Genus V. Thiocapsa Genus X. Ectothiorhodospira Family III. Chlorobiaceae Genus I. Chlorobium Genus III. Chloropseudomonas Genus IV. Pelodictyon
Section 8. Anaerobic gram-negative cocci Family I. Veillonellaceae Genus I. Veillonella Genus III. Megaspheera	Methane producing bacteria Family I. Methanobacteriaceae Genus I. Methanobacterium Genus III. Methanococcus Genus Methanotherix
Section 10. The mycoplasmas Family I. Mycoplasmataceae Genus I. Mycoplasma	The others Genus Syntrophobacter Genus Syntrophomonas Genus Thermoanaerobium Genus Thermobacteroides

表 1.2-2 光水素発生をする藻類⁵⁸⁾

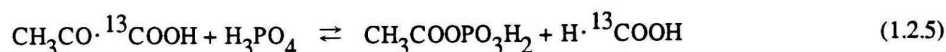
Genera	Species
	Cyanobacteria
<i>Anabaena</i>	<i>An. azollae</i> , <i>An. cylindrica</i> , <i>An. flos-aquae</i> , <i>An. variabilis</i>
<i>Calothrix</i>	<i>Cal. membranacea</i> , <i>Cal. scapulorum</i>
<i>Chlorogloea</i>	<i>Chlorogloea</i> sp.
<i>Gloeocapsa</i> (= <i>Chroococcus</i>)	<i>Gloeocapsa</i> sp.
<i>Gloeotheca</i>	<i>Gloeotheca</i> sp.
<i>Lyngbya</i>	<i>Lyngbya</i> sp.
<i>Mastigocladus</i>	<i>Mas. laminosus</i> , <i>Mas. thermophilus</i>
<i>Nostoc</i>	<i>Nostoc</i> sp., <i>Nos. muscorum</i>
<i>Oscillatoria</i>	<i>O. limnetica</i>
<i>Plectonema</i>	<i>Plectonema</i> sp., <i>Pl. borianum</i>
<i>Scytonema</i>	<i>Scytonema</i> sp.
<i>Spirulina</i>	<i>Sr. maxima</i> , <i>Sr. platensis</i>
<i>Stygonema</i>	<i>Stygonema</i> sp.
<i>Synechococcus</i>	<i>Syn. elongatus</i> , <i>Synechococcus</i> sp. (= <i>Anacystis nidulans</i>)
<i>Tolypothrix</i>	<i>Tolypothrix</i> sp.
	Green algae
<i>Ankistrodesmus</i>	<i>Ankistrodesmus</i> sp., <i>Ank. brauni</i> , <i>Ank. falcatus</i> , <i>Ank. stripitatum</i>
<i>Chlamydomonas</i>	<i>Chlamydomonas</i> sp., <i>Chl. debaryana</i> , <i>Chl. disosmos</i> , <i>Chl. eugametos</i> , <i>Chl. humicola</i> , <i>Chl. moewussii</i> , <i>Chl. reinhardi</i>
<i>Chlorella</i>	<i>Ch. autotrophica</i> , <i>Ch. fusca</i> , <i>Ch. homosphaera</i> , <i>Ch. kessleri</i> , <i>Ch. protothecoides</i> , <i>Ch. pyrenoidosa</i> , <i>Ch. sorociniana</i> , <i>Ch. vacuolata</i> , <i>Ch. vulgaris</i>
<i>Codium</i>	<i>Codium</i> sp., <i>Cod. fragilis</i>
<i>Coelastrum</i>	<i>Cl. proboscideum</i>
<i>Dunaliella</i>	<i>Dunaliella</i> sp., <i>Dun. salina</i>
<i>Kirchneriella</i>	<i>Kir. lunaris</i>
<i>Scenedesmus</i>	<i>Sc. obliquus</i> , <i>Sc. quadricauda</i>
<i>Selenastrum</i>	<i>Selenastrum</i> sp., <i>Sel. gracile</i>
	Diatom algae
<i>Nitzschia</i>	<i>Nz. ovalis</i>
	Red algae
<i>Ceramium</i>	<i>Ceramium</i> sp., <i>Cer. rubrum</i>
<i>Chondrus</i>	<i>Cd. crispus</i>
<i>Corallina</i>	<i>Corallina</i> sp., <i>Cor. officinalis</i>
<i>Callithamnion</i>	<i>Callithamnion</i> sp.
<i>Porphyridium</i>	<i>Pd. aeragineum</i> , <i>Pd. cruentum</i> , <i>Porphyridium</i> sp.

してガスを発生するが、ギ酸からガスを発生しないバクテリアはグルコースからもガスを発生しないことを示し、このことから、バクテリアの水素発生は、ギ酸分解に因ると結論した⁷⁷⁾。

1942年 Koepsell と Johnson は、*Clostridium butylicum* の細胞抽出物を使って、ピルビン酸を酢酸、炭酸ガス、水素に変換した⁷⁸⁾。この変換には無機リン酸が関与しており、その反応によって不安定なアセチルリン酸ができるので、



この反応はホスホロクラスティック反応 (Phosphoroclastic reaction) と呼ばれた⁷⁹⁾。1945年には、Utter らがトレーサーに ¹³C を使って、このホスホロクラスティック反応が *Escherichia coli* では可逆反応であることを示した⁸⁰⁾。



これに対して、1948年 Wilson らは、*C. butylicum* が式 (1.2.4) の反応中間産物としてギ酸を生成しないことを示し、このことから、*E. coli* と *C. butylicum* はそれぞれ異なったホスホロクラスティック反応で水素と炭酸ガスを発生しているとした^{81,82)}。

1969年になって、Jungermann らは、*Clostridium kluyveri* の細胞抽出物とフェレドキシンを使って、NADPHあるいはNADHから水素が発生することを示した^{83,84)} (図 1.2.1)。

この他にも、エタノールからの水素発生⁸⁵⁾や、プリン (Purine、尿酸) からの水素発生の報告もある^{86,87)}が、これらはいずれもデヒドロゲナーゼとヒドロゲナーゼの複合酵素系による発生であると考えられている⁴⁵⁾。

したがって、バクテリアの発酵による水素発生は、現在では図 1.2-2 の3経路のいずれかで発生すると考えられている。

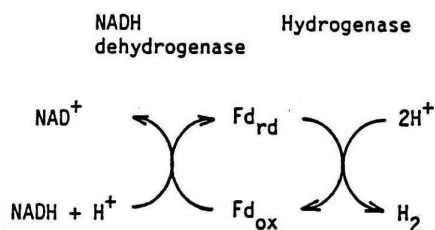


図 1.2-1 NADH-水素発生の電子伝達経路

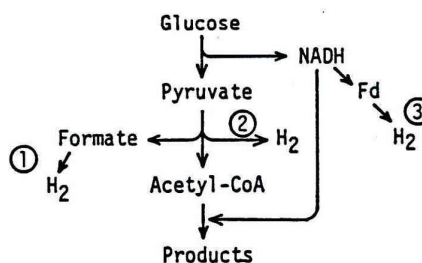


図 1.2-2 発酵水素発生の経路

1.2.2 光水素発生の研究

光合成微生物が水素を取り込み、利用することを報告した最も早い論文の一つは、1934年にみられる⁸⁸⁾。このころすでに、光合成細菌が有機物または硫黄化合物を電子供与体として利用していることが知られていたが、この論文は、光照射下で、CO₂固定のためにH₂もまた電子供与体として利用されることを報告したものである。水素発生については、1937年、*Chromatium*の一種が暗所でギ酸から水素と炭酸ガスを発生することを、Nakamuraが *Acta Phytochimica, Japan* に報告しており⁶⁸⁾、これが最も早い研究のようである。

明水素発生は、1942年 Gaffron と Rubin の論文にみられる^{69,89)}。彼らは緑藻のCO₂還元でH₂が利用されることを研究していた⁶⁹⁾が、炭素源としてCO₂の代わりにグルコースを用いると、光照射下で水素が発生することに気づいた。

光合成系には、図 1.2-3 に示したように、細菌型光合成系と酸素発生型光合成系の二種類ある^{38,40,43,46)}。細菌型光合成系では、電子供与体は有機物かまたは硫黄化合物で、光化学反応系 I (PS I) のみから成る。一方、酸素発生型光合成系の電子供与体はH₂Oであり、光化学反応系 I と II (PS I と PS II) の二系からなっている。水素発生はこれら細菌型、酸素発生型のいずれも、光化学反応系 I の電子伝達の過程でフェレドキシンが還元され、プロトンに電子が渡されて水素が発生するようである^{41,45,52,65,68)}。しかし、まだそのメカニズムについてはよくわかっていない。

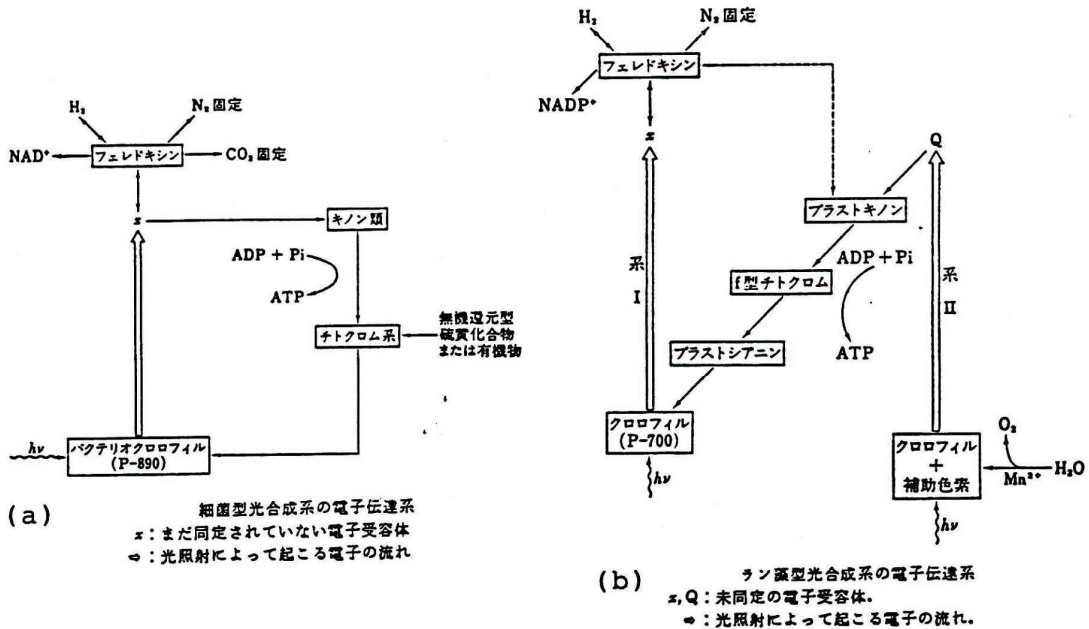


図 1.2-3 細菌型光合成と酸素発生型光合成の電子伝達系³⁸⁾

1.2.3 微生物を利用した水素生産の研究

ところで、以上に述べた研究の歴史は、水素発生の代謝反応を追求した研究の歴史であった。

発酵で水素発生するバクテリアの報告は非常に多いけれども、それは基質の代謝研究の結果として発生を確認した程度に留まっている。また、研究の多くは水素発生のメカニズムを追求したものが多^{48,75,83,90-125})。水素そのものを取り出すことを追求した研究についてはその数が非常に少なく、Zajic と Brosseau らの *Citrobacter intermedius* を使った研究^{57,126-128})と、鈴木と軽部らの *Clostridium butyricum* を使った研究^{64,129-137})などがみられる程度である。

一方、光水素発生の研究は、「太陽エネルギーの利用」の観点から、非常に多くの人たちによって研究されている^{60-63,66,67,138-144})。マイアミ大学の Mitsui は¹⁴⁵⁻¹⁴⁸)海洋に棲息する微生物を精力的に集め、NASAの支援の下で大規模な光水素発生を計画している。理化学研究所においては、「アルガトロン計画」と名付けて、光合成水素発生藻類および微生物の検索と、水素発生機構の研究に力を注いでいる¹⁴⁹)。また、工業技術院微生物工業技術研究所の三宅は^{150,151})、発酵水素発生バクテリアの代謝産物を光合成バクテリアの基質に利用し、発酵-光合成混成水素発生の研究を行っている。その他光水素発生の研究は、総説に詳しく述べられているので、割愛する。

第1章 緒論

1.3 本研究の目的と各章の概要

本論文は「微生物を利用した発酵水素発生」と題し、8章から成っている。

1973年の第一次石油ショック以来、石油代替エネルギーの開発が日本のみならず世界の重要な研究課題となった。本研究は、その石油代替エネルギー開発を念頭に置いて、代替エネルギーとして有望視されている「水素」を、微生物を利用して発生することを目的として行った。

微生物が水素を発生することは前世紀末から知られており、その発生形態に、発酵と光合成の二種類あることが今世紀半ば頃から知られるようになった。光合成水素発生は太陽エネルギーの直接変換であるが、発酵も光合成で作られたグルコースなどを基質にして水素発生するので、間接的太陽エネルギー変換である。

光合成水素発生は非常に多くの研究者によって研究されているが、発酵水素発生の研究は、基質からのエネルギー変換効率が、例えばグルコースを基質とする場合で10%～40%と、悪いためにあまり行われていない。しかし、光合成水素発生は太陽光を利用するために、日中しか発生させることができないという欠点があり、また、水分解による光合成水素発生は、一般的に、非常に発生速度が遅いという欠点がある。それに比べて、発酵による水素発生は太陽光を必要としないので、一日中水素発生させることができ、発生量も装置体積に比例するから、装置効率の観点からは優れている。また、水素発生速度も、発酵微生物はかなり速いという利点を持っている。

本研究では、このような発酵水素発生の利点に着目し、水素発生速度の速い微生物を自然界から単離して、微生物による大量水素生産の基礎的データを得るとともに、微生物の水素発生を化学熱力学的観点から考察し、そのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

本論文の第1章は「緒論」で、植物による太陽エネルギーの利用状況と、水素発生微生物の研究の歴史、微生物を利用した水素生産の既往の研究について述べ、本研究の目的設定を行った。

第2章は「水素発生微生物の探索」と題し、自然環境から水素発生速度の非常に速い微生物を発見するに至った探索の過程について述べた。

探索は水棲微生物から始めたが、草の葉に棲む微生物に水素発生の活発なバクテリアのいることがわかり、このバクテリアの単離と同定を行った。単離したバクテリアのグルコース発酵における水素発生速度を測定することによって、このバクテリアが、水素発生速度が非常に速いといわれている既知微生物の水素発生速度と同じ程度か、あるいは、それより速い速度で水素発生することを示した。この菌株を *Enterobacter aerogenes* strain E.82005 と名付けた。

第3章は「*Enterobacter aerogenes* strain E.82005 のバッチ培養における水素発生特性」と題し、単離したバクテリアのバッチ培養における水素発生特性を詳しく調べることによって、この菌株が現在報告されている他のどの微生物よりも速い速度で水素発生することを明らかにした。

まず、自由培養でグルコースに対する水素収率を測定し、 $1 \text{ mol-H}_2/\text{mol-glucose}$ の収率であることを示した。菌体増殖の経時変化と水素発生を測定し、菌体単位量当りの水素発生速度が増殖の減衰期において最も速くなること、このバクテリアの水素発生速度は $17 \text{ mmol}/(\text{g-dry cell} \cdot \text{h})$ 以上であることを明らかにした。培地単位体積当りの発生速度は菌体の増殖によらずほぼ一定で、約 $11 \text{ mmol}/(\text{l-culture} \cdot \text{h})$ になることがわかった。このバクテリアには、代謝経路を変更して、培地の pH を自己の棲息に適するように保つ性質のあることがわかった。

つぎに、培地の pH を一定に保ち、pH と水素発生の関係を調べた。菌体の増殖にとっての至適 pH は 7.0 前後であるが、水素発生の至適 pH は 5.8 あたりであることが明らかになった。至適温度は $40.5 \text{ }^\circ\text{C}$ であることが明らかになった。

培地に使用したペプトンの影響を調べ、ペプトンには菌の増殖を活発にする養分が含まれているが、水素発生を促進する補酵素の類は含まれていないことを明らかにした。

アルギン酸カルシウムに菌を固定して、増殖ができない培地での水素発生速度の測定と代謝産物の分析を行った。固定化することで水素発生の至適 pH における発生速度は非常に遅くなったが、菌の生存が難しい $\text{pH} < 5.0$ あるいは増殖に適した $\text{pH} > 7.0$ における発生速度は、逆に固定化することによって速くなることが明らかになった。代謝産物の分析から、固定化菌の周囲の pH がほぼ一定になっていると考えられた。

光合成、発酵水素発生微生物の水素発生速度を文献から調べ、この菌株が、現在報告されている他のどの微生物よりも速い速度で水素発生することを明らかにした。

第4章は「バイオマス資源を基質にした水素発生」と題して、各種有機物、バイオマス、台所生ゴミからの水素発生を測定し、基質として利用可能な有機物、バイオマス、生ゴミなどを示すとともに、精白糖製造の際にでる廃糖蜜を水素基質、窒素源に使用して、20日以上連続して水素発生を試みた結果について述べた。

まず、糖類および糖類似物、カルボン酸類、アルコール類、アミノ酸類、それにビタミンなどを基質とした水素発生を測定し、どの様な物質が水素発生の良質の基質になるか調査した。その結果、糖類ではサッカロースの水素収率が 2.5 mol/mol と大きいことが明らかになった。次に、雑草、木の葉、野菜などを基質かつ窒素源とした水素発生を測定し、どの様なバイオマスが水素発生の基質として利用できるか調べた。バイオマスではイネ科の植物が概してよく水素を発生す

第1章 緒論

る基質を含むことがわかった。さらに、台所生ゴミを水素基質あるいは窒素源に使用して、水素基質、窒素源としての特性を調べた。その結果、リンゴの皮や芯がよい水素基質に、サバ、イワシなど魚のハラワタと味噌が非常によい窒素源になることが明らかになった。

廃糖蜜による連続培養では、回分培養と異なる代謝反応を行い、乳酸が最大代謝産物であることが明らかになった。また、バクテリアがフロックを形成し菌体密度が高くなって、培養槽体積当たりの水素発生速度が回分培養より速くなることがわかった。糖濃度2%での最大水素発生速度は $36\text{mmol}/(\text{l-culture}\cdot\text{h})$ に達した。しかし、平均水素収率は、期待値 $2.4\text{mol-H}_2/\text{mol-sugar}$ よりかなり低い $1.5\text{mol-H}_2/\text{mol-sugar}$ にしかならなかった。

菌体密度を高くするための試みとして、ウレタンフォームの小片を培養液中に浮遊させて連続培養を行った結果では、担体としての効果はあまり大きくないものの、水素収率を高くする効果が顕著に現われ、最高収率 $3.5\text{mol-H}_2/\text{mol-sugar}$ 、平均収率 $2.2\text{mol-H}_2/\text{mol-sugar}$ を得ることができた。代謝産物と糖消費量から物質収支を計算することで、このバクテリアの水素発生経路がNADH経路であることが明らかになった。

第5章は「E.82005 菌株を利用した微生物電池」と題し、グルコースの発酵廃液を電気エネルギーに変換する試みについて述べた。

培地侵漬型微生物電池としては既往の研究よりかなり大きい電流密度で出力を取り出すことに成功し、定期的に養分を加えることで長期間働くことを確かめた。しかし、電極活物質の分析から、電池出力には水素だけが寄与しており、他の代謝産物の寄与は期待できないことを明らかにした。この結果から、水素を発生する微生物では、気体の代謝産物を集めて他の型式の燃料電池に供給する方が、実用的であることが明らかになった。

第6章は「変異株選別による水素発生速度の改良」と題し、*E. aerogenes* st. E.82005 から水素発生速度の速い株を選り分ける選別手法の開発と、選別結果について述べた。

高層培地を利用して選別する方法を考案し、選別実験を行って水素発生速度の速い株を選り分けることに成功した。最も速い株は、親株のE.82005より22%速くなっていた。

第7章は「発酵水素発生とメカニズム」と題し、水素発生反応の化学熱力学的検討から、細胞膜を挟んだ細胞の内側、外側でそれぞれ酸化反応、還元反応する新しいメカニズムの提案を行い、このメカニズムを利用することによって実験結果が理論的に説明できることを明らかにした。

E. aerogenes の水素発生がNAD経路であることを示し、水素/NADの酸化還元電位を従来のpH 7.0に固定して考えるのではなく、培地および細胞の内側のpHと結び付けて決める新しい考え方を導入した。その結果、水素発生の至適pHにおける水素の酸化還元電位は、細胞内pHにおけ

第1章 緒論

るNADの酸化還元電位とほぼ等しくなることを示した。これは、NAD経路の水素発生の自由エネルギー変化が、従来のように細胞内で起こるとすれば+4.5 kcal/molにも達する逆反応であるのに対し、細胞膜を挟んだ細胞の内外で反応が進むと考えれば、自由エネルギー変化からも容易に説明がつくことを意味しており、このことから、膜結合ヒドロゲナーゼの活性の至適pHと膜結合ヒドロゲナーゼの構造に関する既往の研究を結び付けて、*E. aerogenes*の水素発生は、「細胞内でNADHが NAD^+ に酸化され、細胞膜を挟んだ細胞の外側で H^+ が H_2 に還元される」というNAD経路の水素発生メカニズムを提案した。さらに、このメカニズム案に第3章で得たpHと菌体増殖の関係を結び付けることで、水素発生活性の実験結果を理論的に説明することに成功した。

水素発生の別の経路としてギ酸分解による発生が知られているが、NAD経路で導入した酸化還元電位をpHとの関連で捉える新しい考え方を利用して、ギ酸経路の水素発生メカニズムの提案を合わせて行った。このメカニズム案でも、pHと菌体増殖の関係を結び付けることで、pHと水素発生の活性との関係を熱力学的に良好に説明できた。

「細胞膜を挟んだ細胞の内外で、内外のpHの違いを利用して酸化還元反応が進む」という仮説がNAD経路の水素発生をよく説明できることから、これまで熱力学的に説明の困難であった酸化還元反応のなかには、細胞膜を間に置いて反応している可能性があることを、幾つかの例について簡単に示した。

第8章は「結言」であり、発酵水素発生の利点と欠点、アルコール発酵とのエネルギー回収率の比較、電気分解による水素発生とのコスト面での比較を簡単に行い、今後の問題点を述べた。

参考文献

- 1 Hubbert, M.K.; サイエンス, 1, No.12, 38(1971)
"地球のエネルギー資源"
- 2 Ueki, S.; エネルギー・資源, 8, 447-454(1987)
"電力統計"
- 3 Benemann, J. R., J. C. Weissman, B. L. Koopman and W. J. Osw et al. ;
Nature, 268, 19-23(1977)
"Energy production by microbial photosynthesis"
- 4 Benemann, J. R., K. Miyamoto and P. C. Hallenbeck; Enzyme Microb. Technol.,
2, 103-111(1980)
"Bioengineering aspects of biophotolysis."
- 5 Bringer, S., H. Sahm and W. Swyzen; Biotech. Bioeng. Symp., 14,
311-319(1984)
"Ethanol production by Zymomonas mobilis and its application on an
industrial scale"
- 6 Cseh, T., L.Czako, J.Toth and R.P.Tengerdy; Biotech. Bioeng., 26,
1425-1429(1984)
"Two-Phase Anaerobic Fermentation of Liquid Swine Waste to Methane"
- 7 Drapeau, D., H.W. Blanch and C.R. Wilke; Biotech. Bioeng., 30,
946-953(1987)
"Economic assessment of plant cell culture for the production of
ajmalicine."
- 8 Erickson, L. E.; Biotech. Bioeng., 22, 451-456(1980)
"Biomass elemental composition and energy content."
- 9 Fujime, K.; エネルギー・資源, 9, 237-239(1988)
"エネルギーの輸送"
- 10 Hall, D. O.; Solar Energy, 22, 307-328(1979)
"Solar energy use through biology - past, present and future"
- 11 Kawasima, A.; エネルギー・資源, 9, 42-46(1988)
"21世紀のエネルギー需給展望"
- 12 Kibune, H.; エネルギー・資源, 7, 409-417(1986)
"産業用エネルギー消費の構造的変貌"
- 13 Kubo, H.; エネルギー・資源, 8, 440-446(1987)
"我が国の石油統計"
- 14 Matsuda, S., H. Kubota and H. Iwaki; 科学, 52, 735-741(1982)
"バイオマスエネルギー"
- 15 Mullins, J. T.; Biotech. Bioeng., 27, 321-326(1985)
"Enzymatic hydrolysis and fermentation of corn for fuel alcohol."
- 16 Nagashima, M., M. Azuma, S. Noguchi, K. Inuzuka and H. Samej et al. ;
Biotechnol. Bioeng., 26, 992-997(1984)
"Continuous ethanol fermentation using immobilized yeast cells."
- 17 Peterson, W.H. and E.B. Fred; Ind. Eng. Chem., 24, 237-242(1932)
"Butyl-Acetone Fermentation of Corn Meal"
- 18 Pipyn, P. and W.Verstraete; Biotech. Bioeng., 23, 1145-1154(1981)
"Lactate and Ethanol as Intermediates in Two-Phase Anaerobic Digestion"
- 19 Rogers, H.J.; in The Bacteria, vol.2, (Gunsalus, I.C. and R.Y. Stanier
eds), Academic Press, New York, 257-318(1961)
"The dissimilation of high molecular weight substances."
- 20 Saiki, T.; 微生物, 3, 555-563(1987)
"エタノール発酵の新技术"
- 21 Shibata, Y.; エネルギー・資源, 5, 270-275(1984)

第1章 緒論

- "代替エネルギー開発テーマの評価手法"
- 22 Shimizu, H.: エネルギー・資源, 5, 97-102(1984)
"バイオマス熱利用の現状と将来"
- 23 Taguchi, T.: エネルギー・資源, 6, 50-53(1985)
"生物資源の現状と研究の方向"
- 24 Tonomura, K. and H. Yanase; 発酵と工業, 42, 180-189(1984)
"Zymomonas細菌のアルコール発酵と菌株の改良"
- 25 Tonomura, K.: 微生物とその応用, (鈴木周一編著), 共立出版,
62-74(1979)
"メタン発酵"
- 26 Yamamoto, T.: 化学工学, 45, 285-291(1981)
"生物資源と微生物によるアルコールその他燃料化合物の生産およびその展望"
- 27 Zeikus, J. G.; Bacteriol. Rev., 41, 514-541(1977)
"The biology methanogenic bacteria."
- 28 Kortschak, H.P., C.E. Hartt and G.O. Burr; Plant Physiol., 40,
209-213(1965)
"Carbon dioxide fixation in sugarcane leaves."
- 29 Hatch, M.D. and C.R. Slack; Biochem. J., 101, 103-111(1966)
"Photosynthesis by sugar-cane leaves: A new carboxylation reaction and the
pathway of sugar formation."
- 30 Hatch, M.D., C.R. Slack and H.S. Johnson; Biochem. J., 102, 417-422(1967)
"Further studies on a new pathway of photosynthetic carbon dioxide fixation
in sugar-cane and its occurrence in other plant species."
- 31 Murata, Y.; 育種学最近の進歩, 15, 3-12(1975)
"太陽エネルギー利用効率と光合成"
- 32 Cooper, J.P.; Photosynthesis and Productivity in Different Environments
(Cooper, J.P. ed), Cambridge University Press, Cambridge, (1975)
""
- 33 Takahashi, Y.: エネルギー・資源, 3, 241-248(1982)
"植物による物質固定効率の向上"
- 34 Shibata, K.: バイオマス:生産と変換 <上・下> (柴田和雄/木谷収編), 学会出版センター, (1981)
"バイオマス:生産と変換 <上・下>"
- 35 Eisenstein, K. K. and J. H. Wang; J. Biol. Chem., 244, 1720-1728(1969)
"Conversion of light to chemical free energy : I. Porphyrin-sensitized
photoreduction of ferredoxin by glutathione."
- 36 Geller, D.M.; in The Bacteria, vol.2, (Gunsalus, I.C. and R.Y. Stanier
eds), Academic Press, New York, 461-478(1961)
"Bacterial photosynthesis."
- 37 Gest, H.; Adv. Microb. Physiol., 7, 243-282(1972)
"Energy conversion and generation of reducing power in bacterial
photosynthesis."
- 38 Ishida, M.: 光合成器官の細胞生物学 (石田政弘/植田勝巳/遠山益編), 共立出版, (1952)
"光合成器官の細胞生物学"
- 39 Jones, C.W.; Bacterial Respiration and Photosynthesis, Thomas Nelson and
Sons Ltd, (1982)
""
- 40 Katoh, S.: 光合成研究法 (加藤栄/宮地重遠/村田吉男編),
共立出版, (1981)

第1章 緒論

- "光合成研究法"
- 41 Katoh, S.; 微生物とその応用, (鈴木周一編著), 共立出版,
7-38(1979)
"光合成における光エネルギーの化学的エネルギーへの変換"
- 42 Mitsui, A.; Biological Solar Energy Conversion (Mitsui, A., S. Miyachi,
A.S. Pietro and S. Tamura eds), Academic Press, New York, (1977)
""
- 43 Miyachi, S.; 光合成と物質生産 (宮地重遠/村田吉男編),
理工学社, (1980)
"光合成と物質生産"
- 44 Tonomura, K.; 微生物とその応用, (鈴木周一編著), 共立出版,
39-61(1979)
"光エネルギーを利用する微生物とその作用"
- 45 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"
- 46 Miyachi, S.; 葉緑体 (宮地重遠/田中一郎/加藤栄編),
理工学社, (1980)
"葉緑体"
- 47 Yagi, T.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 2947-2949(1976)
"Separation of hydrogenase-catalyzed hydrogen-evolution system from
electron-donating system by means of enzymic electric cell technique"
- 48 Yagi, T., A. Endo and K. Tsuji; in Hydrogenase; Their Catalytic Activity,
Structure and Function, (Schlegel, H.G. and K. Schneider eds), Erich
Goltze KG, Goettingen, 107-124(1978)
"Properties of hydrogenase from particulate of *Desulfovibrio vulgaris*."
- 49 Krasna, A.I.; in Hydrogenase; Their Catalytic Activity, Structure and
Function, (Schlegel, H.G. and K. Schneider eds), Erich Goltze KG,
Goettingen, 423-437(1978)
"Photoproduction of hydrogen from water in algae and coupled system of
chloroplasts and hydrogenase."
- 50 Miura, Y., K. Yagi, M. Shoga and K. Miyamoto; Biotechnol. Bioeng., 24,
1554-1563(1982)
"Hydrogen production by a green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, in an
alternating light/dark cycle."
- 51 Van Koppen, C.W.J.; エネルギー・資源, 3, 44-50(1982)
"西ヨーロッパにおける太陽エネルギー利用の現状と将来"
- 52 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"
- 53 Hoppe-Seyler, F.; Zeit. Physiol. Chem., 11, 561-568(1887)
"Die Methangahrung der Essigsäure."
- 54 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."
- 55 Krieg, N.R., and J.G. Holt; Bergey's manual of systematic bacteriology,
Williams and Wilkins, Baltimore, (1984)
"Bergey's manual of systematic bacteriology."
- 56 Gray, C. T. and H. Gest; Science, 148, 186-192(1965)
"Biological formation of molecular hydrogen"
- 57 Zajic, J. E., N. Kosaric and J. D. Brosseau; Adv. Biochem. Eng., 9,

第1章 緒論

- 57-109(1978)
"Microbial production of hydrogen"
- 58 Kondratieva, E. N. and I. N. Gogotov; Adv. Biochem. Eng./Biotechnol., 28, 139-191(1985)
"Production of Molecular Hydrogen in Microorganisms"
- 59 Vatsala, T. M. and C. V. Seshadri; Proc. Indian Natl. Sci. Acad., B51, 282-295(1985)
"Microbial production of hydrogen - A review."
- 60 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.."
- 61 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*."
- 62 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."
- 63 Gest, H. and M. D. Kamen; Science, 109, 558-559(1949)
"Photoproduction of molecular hydrogen by *Rhodospirillum rubrum*."
- 64 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"
- 65 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*."
- 66 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."
- 67 Weissman, J. C. and J. R. Benemann; Appl. Envir. Microbiol., 33, 123-131(1977)
"Hydrogen production by nitrogen-starved cultures of *Anabaena cylindrica*"
- 68 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."
- 69 Gaffron, H. and J. Rubin; J. Gen. Physiol., 26, 219-240(1942)
"Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae."
- 70 Weaver, P. F., S. Lien and M. Seibert; Solar Energy, 24, 3-45(1980)
"Photobiological production of hydrogen"
- 71 Kessler, E.; in Hydrogenase; Their Catalytic Activity, Structure and Function, (Schlegel, H.G. and K. Schneider eds), Erich Goltze KG,

- Goettingen. 415-422(1978)
"Hydrogenase in green algae."
- 72 Frankland, P.F., and W. Frew; J. Chem. Soc., 61, 254-275(1892)
"A pure fermentation of mannitol and dulcitol."
- 73 Frankland, P.F., and J.S. Lumsden; J. Chem. Soc., 61, 432-444(1892)
"Decomposition of mannitol and dextrose by the *Bacillus ethaceticus*."
- 74 Pakes, W.C.C. and W. H. Jollyman; J. Chem. Soc., 79, 322-329(1901)
"The collection and examination of the gases produced by bacteria from certain media."
- 75 Pakes, W.C.C. and W. H. Jollyman; J. Chem. Soc., 79, 386-391(1901)
"The bacterial decomposition of formic acid into carbon dioxide and hydrogen."
- 76 Pakes, W.C.C. and W. H. Jollyman; J. Chem. Soc., 79, 459-461(1901)
"The bacterial oxidation of formates by nitrates."
- 77 Harden, A.; J. Chem. Soc., 79, 610-628(1901)
"The chemical action of *Bacillus coli communis* and similar organisms on carbohydrates and allied compounds."
- 78 Koepsell, H.J. and M.J. Johnson; J. Biol. Chem., 145, 379-386(1942)
"Dissimilation of pyruvic acid by cell-free preparations by *Clostridium butylicum*."
- 79 Koepsell, H.J., M.J. Johnson and J.S. Meek; J. Biol. Chem., 154, 535-547(1944)
"Role of phosphate in pyruvic acid dissimilation by cell-free extracts of *Clostridium butylicum*."
- 80 Utter, M.F., F. Lipmann and C.H. Werkman; J. Biol. Chem., 158, 521-531(1945)
"Reversibility of the phosphoroclastic split of pyruvate."
- 81 Wilson, J., L.O. Krampitz and C.H. Werkman; Biochem. J., 42, 598-600(1948)
"Reversibility of a phosphoroclastic reaction."
- 82 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."
- 83 Jungermann, K. R. K. Thauer, E. Rupprecht, C. Ohrloff and K. et al. ; FEBS Lett., 3, 144-146(1969)
"Ferredoxin mediated hydrogen formation from NADPH in a cell-free system of *Clostridium kluyveri*."
- 84 Thauer, R. K., K. Jungermann, E. Rupprecht and K. Decker; FEBS Lett., 4, 108-112(1969)
"Hydrogen formation from NADH in cell-free extracts of *Clostridium kluyveri*."
- 85 Reddy, C.A., M.P. Bryant and M.J. Wolin; J. Bacteriol., 110, 126-132(1972)
"Ferredoxin- and nicotinamide adenine dinucleotide-dependent H₂ production from ethanol and formate in extracts of S organism isolated from *Methanobacillus omelianskii*."
- 86 Whiteley, H.R.; J. Bacteriol., 63, 163-175(1952)
"The fermentation of purines by *Micrococcus aerogenes*."
- 87 Whiteley, H.R. and H.C. Douglas; J. Bacteriol., 61, 605-616(1951)
"The fermentation of purines by *Micrococcus lactilyticus*."
- 88 Roelofsen, P.A.; Acad. Sci. Amsterdam, 37, 660-669(1934)

第1章 緒論

- "Metabolism of purple sulfur bacteria."
- 89 Gaffron, H.; *J. Gen. Physiol.*, 26, 241-267(1942)
"Reduction of carbon dioxide coupled with the oxyhydrogen reaction in algae."
- 90 Westwood, A. W. and H. W. Doelle; *Microbios*, 9, 143-165(1974)
"Glucose 6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases and their control mechanisms in *Escherichia coli* K-12."
- 91 Adams, M. W. W. and D. O. Hall; *Biochem. J.*, 183, 11-22(1979)
"Purification of the membrane-bound hydrogenase of *Escherichia coli*."
- 92 Adams, M. W. W. and D. O. Hall; *Arch. Biochem. Biophys.*, 195, 288-299(1979)
"Properties of the solubilized membrane-bound hydrogenase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*."
- 93 Adams, M. W. W. and D. O. Hall; *Biochem. Soc. Trans.*, 6, 1339-41(1978)
"Solubilization and partial purification of the membrane-bound hydrogenase of *Escherichia coli*."
- 94 Ballantine, S. P. and D. H. Boxer; *Eur. J. Biochem.*, 156, 277-284(1986)
"Isolation and characterisation of a soluble active fragment of hydrogenase isoenzyme 2 from the membranes of anaerobically grown *Escherichia coli*."
- 95 Ballantine, S. and D.H. Boxer; *J. Bacteriol.*, 163, 454-459(1985)
"Nickel-containing hydrogenase isoenzymes from anaerobically grown *Escherichia coli* K-12."
- 96 Bell, G.G., J. Legall and H.D. Peck, Jr.; *J. Bacteriol.*, 120, 994-997(1974)
"Evidence for the periplasmic location of hydrogenase in *Desulfovibrio gigas*."
- 97 Bernhard, T. and G. Gottschalk; in *Hydrogenase: Their Catalytic Activity, Structure and Function*, (Schlegel, H.G. and K. Schneider eds), Erich Goltze KG, Goettingen, 199-208(1978)
"The hydrogenase of *Escherichia coli*, purification, some properties and the function of the enzyme."
- 98 Cammack, R., V. M. Fernandez and K. Schneider; *Biochimie*, 68, 85-91(1986)
"Activation and active sites of nickel-containing hydrogenases."
- 99 Chen, J. S. and L. E. Mortenson; *Biochim. Biophys. Acta*, 371, 283-298(1974)
"Purification and properties of hydrogenase from *Clostridium pasteurianum* W5."
- 100 Chen, J.S.; in *Hydrogenase: Their Catalytic Activity, Structure and Function*, (Schlegel, H.G. and K. Schneider eds), Erich Goltze KG, Goettingen, 57-81(1978)
"Structure and function of two hydrogenases from the dinitrogen-fixing bacterium *Clostridium pasteurianum*."
- 101 Fredricks, W.W. and E.R. Stadtman; *J. Biol. Chem.*, 240, 4065-4071(1965)
"The role of ferredoxin in the hydrogenase system from *Clostridium kluyveri*."
- 102 Fromherz, P and E.-M. Ruhr; in *Hydrogenase: Their Catalytic Activity, Structure and Function*, (Schlegel, H.G. and K. Schneider eds), Erich Goltze KG, Goettingen, 263-268(1978)
"Incorporation of the membrane-bound hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* into lipid vesicles."
- 103 Gest, H.; *J. Bacteriol.*, 63, 111-121(1952)
"Properties of cell-free hydrogenases of *Escherichia coli* and

- Phodospirillum rubrum."
- 104 Gest, H. and H. D. Peck, Jr.; J. Bacteriol., 70, 326-334(1955)
"A study of the hydrogenlyase reaction with systems derived from normal and anaerogenic coli-aerogenes bacteria."
 - 105 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."
 - 106 Hatchikian, E.C., M. Bruschi and J. Legall; in Hydrogenase; Their Catalytic Activity, Structure and Function, (Schlegel, H.G. and K. Schneider eds), Erich Goltze KG, Goettingen, 93-106(1978)
"Characterization of the periplasmic hydrogenase from Desulfovibrio gigas."
 - 107 Hornhardt, S., K. Schneider and H. G. Schlegel; Biochimie, 68, 15-24(1986)
"Characterization of a native subunit of the NAD-liked hydrogenase isolated from a mutant of Alcaligenes eurtrophus H16."
 - 108 Kim, B. H. and J. G. Zeikus; Dev. Ind. Microbiol., 26, 549-556(1985)
"Importance of hydrogen metabolism in regulation of solventogenesis by Clostridium acetobutylicum."
 - 109 Klibanov, A. M., N. O. Kaplan and M. D. Kamen; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 3640-3643(1978)
"A rationale for stabilization of oxygen-labile enzymes: Application to a clostridial hydrogenase."
 - 110 Lee, C.-M.; in Hydrogenase; Their Catalytic Activity, Structure and Function, (Schlegel, H.G. and K. Schneider eds), Erich Goltze KG, Goettingen, 281-286(1978)
"Solubilization of the membrane-bound hydrogenase of Pseudomonas pseudoflava."
 - 111 Lichstein, H. C. and R. B. Boyd; J. Bacteriol., 65, 617-618(1953)
"The formic hydrogenlyase system of Aerobacter aerogenes."
 - 112 Mayhew, S.G., C. Vandijk and H.M. Vander Westen; in Hydrogenase; Their Catalytic Activity, Structure and Function, (Schlegel, H.G. and K. Schneider eds), Erich Goltze KG, Goettingen, 125-140(1978)
"Properties of hydrogenases from the anaerobic bacteria Megasphaera elsdenii and Desulfovibrio vulgaris."
 - 113 Packer, L.; Arch. Biochem. Biophys., 78, 54-65(1958)
"Respiratory carriers involved in the oxidation of hydrogen and lactate in a facultative autotroph."
 - 114 Peck, H. D. Jr. and H. Gest; J. Bacteriol., 71, 70-80(1956)
"A new procedure for assay of bacterial hydrogenases."
 - 115 Peck, H. D. Jr. and H. Gest; J. Bacteriol., 73, 706-721(1957)
"Formic dehydrogenase and the hydrogenlyase enzyme complex in coli-aerogenes bacteria."
 - 116 Pichinoty, F.; Biochim. Biophys. Acta, 64, 111-124(1962)
"Inhibition by oxygen of the biosynthesis and activity of hydrogenase and hydrogenlyase in some anaerobic bacteria"
 - 117 Sawers, R. G. and D. H. Boxer; Eur. J. Biochem., 156, 265-275(1986)
"Purification and properties of membrane-bound hydrogenase isoenzyme 1 from anaerobically grown Escherichia coli K12."
 - 118 Sawers, R.G., S.P. Ballantine and D.H. Boxer; J. Bacteriol., 164,

第1章 緒論

- 1324-1331(1985)
"Differential expression of hydrogenase isoenzymes in *Escherichia coli* K-12: evidence for a third isoenzyme."
- 119 Schink, B.; in *Hydrogenase: Their Catalytic Activity, Structure and Function*, (Schlegel, H.G. and K. Schneider eds), Erich Goltze KG, Goettingen, 253-261(1978)
"Membrane-bound hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus*: Biochemical and immunological characterization of the solubilized and purified enzyme."
- 120 Schneider, K. and H. G. Schlegel; *Biochim. Biophys. Acta*, 452, 66-80(1976)
"Purification and properties of soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H 16."
- 121 Schneider, K., D. S. Patil and R. Cammack; *Biochim. Biophys. Acta*, 748, 353-361(1983)
"ESR properties of membrane-bound hydrogenases from aerobic hydrogen bacteria."
- 122 Schneider, K. and R. Cammack; in *Hydrogenase: Their Catalytic Activity, Structure and Function*, (Schlegel, H.G. and K. Schneider eds), Erich Goltze KG, Goettingen, 221-234(1978)
"Soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus*, an iron-sulfur flavoprotein."
- 123 Strekas, T. and A.I. Krasna; in *Hydrogenase: Their Catalytic Activity, Structure and Function*, (Schlegel, H.G. and K. Schneider eds), Erich Goltze KG, Goettingen, 141-150(1978)
"Nature of the iron sulfur core and stability of *Chromatium hydrogenase*."
- 124 Tsuji, K. and T. Yagi; *Arch. Microbiol.*, 125, 35-42(1980)
"Significance of hydrogen burst from growing cultures of *Desulfovibrio vulgaris*, Miyazaki, and the role of hydrogenase and cytochrome c3 in energy production system."
- 125 Valentine, R.C., L.E. Mortenson and J.E. Carnahan; *J. Biol. Chem.*, 238, 1141-1144(1963)
"The hydrogenase system of *Clostridium pasteurianum*."
- 126 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"
- 127 Brosseau, J. D. and J. E. Zajic; *Dev. Ind. Microbiol.*, 19, 553-567(1978)
"Hydrogen gas production and growth of *Citrobacter intermedium* on glucose"
- 128 Brosseau, J. D., N. Kosaric and J. E. Zajic; *Biotechnol. Letters*, 2, 93-98(1980)
"The effect of pH on hydrogen production with *Citrobacter intermedium*"
- 129 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*"
- 130 Karube, I., S. Kuriyama, T. Matsunaga and S. Suzuki; *Energy Developments in Japan*, 3, 141-152(1980)
"Biogas production by immobilized whole cells"
- 131 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*"

第1章 緒論

- 132 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*"
- 133 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"
- 134 Suzuki, S. I. Karube and T. Matsunaga; *Biotech. Bioeng. Symp.*, 8, 501-511(1978)
"Application of a biochemical fuel cell to wastewaters"
- 135 Karube, I., T. Matunaga, S. Tsuru and S. Suzuki; *Biotechnol. Bioeng.*, 19, 1727-1733(1977)
"Biochemical fuel cell utilizing immobilized cells of *Clostridium butyricum*"
- 136 Karube, I. and S. Suzuki; *化学工学*, 45, 319-323(1981)
"微生物電池"
- 137 Suzuki, S. and I. Karube; *微生物とその応用*, (鈴木周一編著), 共立出版, 119-171(1979)
"微生物電池"
- 138 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."
- 139 Benemann, J.R. and P.S. Hallenbeck; in *Hydrogenase; Their Catalytic Activity, Structure and Function*, (Schlegel, H.G. and K. Schneider eds), Erich Goltze KG, Goettingen, 395-413(1978)
"Basic and applied studies of hydrogenase in cyanobacteria."
- 140 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."
- 141 Hillmer, P. and H. Gest; *J. Bacteriol.*, 129, 724-731(1977)
"H₂ metabolism in the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata*: H₂ production by growing cultures"
- 142 Vanheerikhuizen, H., S.P.J. Albracht, B. Ten Brink, L. Evers et al. ; in *Hydrogenase; Their Catalytic Activity, Structure and Function*, (Schlegel, H.G. and K. Schneider eds), Erich Goltze KG, Goettingen, 151-158(1978)
"Purification and some properties of the soluble part of hydrogenase from *Chromatium vinosum*."
- 143 Adams, M. W. W. and D. O. Hall; *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 77, 730-737(1977)
"Isolation of the membrane-bound hydrogenase from *Rhodospirillum rubrum*."
- 144 Adams, M.W. and D.O. Hall; in *Hydrogenase; Their Catalytic Activity, Structure and Function*, (Schlegel, H.G. and K. Schneider eds), Erich Goltze KG, Goettingen, 159-169(1978)
"Physical and catalytic properties of the hydrogenase of *Phodospirillum rubrum*."

第1章 緒論

- 145 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."
- 146 Mitsui, A.; Hydrogen energy system, Proceedings of the 2nd world hydrogen energy conference, Zurich, 1267-1291(1978)
"Bio-solar Hydrogen production."
- 147 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"
- 148 Kumazawa, S., and A. Mitsui; Int. J. Hydrogen Energy, 6, 339-348(1981)
"Characterization and optimization of hydrogen photoproduction by a saltwater blue-green alga, *Oscillatoria* sp. Miami BG7."
- 149 Inoue, Y.; 毎日新聞, 10/18, (1982)
"水素の製造めざして"
- 150 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*."
- 151 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*."