

平成 17 年度

修士論文

中温水素発生菌による発酵水素生産の研究

横浜国立大学大学院

環境情報学府環境生命学専攻

生命環境コース

04HA037 西山大紀

## 目次

1.緒言	4
2. 中温水素発生細菌のスクリーニング	6
2.1 目的	
2.2 実験方法	
2.3 結果	
3. Mesophilic Bacteria の水素発生実験	7
3.1 目的	
3.2 実験方法	
3.3 結果と考察	
4. 単離	8
4.1 目的	
4.2 実験方法	
4.3 結果と考察	
5. Mesophilic bacterium HN001 のグルコースからの水素発生特性	9
5.1 目的	
5.2 実験方法	
5.3 結果と考察	
6. Mesophilic bacterium HN001 の増殖と乾燥菌体重量	13
6.1 目的	
6.2 実験方法	
6.3 結果と考察	
7. 比増殖速度と活性化エネルギー	16
7.1 目的	
7.2 実験方法	
7.3 結果と考察	
8. 糖濃度の影響	19
8.1 目的	
8.2 実験方法	

8.3 結果と考察	
9. 鉄イオンの影響	21
9.1 目的	
9.2 実験方法	
9.3 結果と考察	
10. 結言	23
11. 参考文献	24
謝辞	29
表	29
図	37
要旨	78

## 1. 緒言

地球環境問題の悪化に警鐘が鳴らされて久しい。日本で生活している限り、地球環境問題の悪化を実感することはない。しかし、石弘之(1998)の『地球環境報告Ⅱ』には、世界規模での種の大量絶滅、南極棚氷の大崩壊、サンゴ礁の死滅などが生々しく記述されており[1]、環境悪化はもう限界に到達している、もしくは限界を超えているのではないかと思わざるを得ない。

2005年2月に京都議定書が発効され、日本は2012年までに1990年の排出量の6%の温室効果ガスを削減する義務が課された。これを受けて化石燃料の使用を低減することは急務となった。一人一人が環境問題に対する意識を持ち、アイドリングなどの日常生活での無駄なエネルギーの使用を無くすことは不可欠である。それと同時に化石燃料に代わる新しいエネルギーシステムを構築していくこともまた不可欠である。新エネルギーとしては太陽電池や風力発電、海洋温度差発電などが有名であるが、循環型社会の形成に向けて再生可能エネルギーである、バイオマスエネルギーの利用も近年急速に注目を集めている。バイオマスとは生物由来の資源であり、その根本となっているのは生物が光合成により固定した二酸化炭素である。それを燃料とすることで二酸化炭素が再度放出される仕組みとなっており、大気中の二酸化炭素量に変化はない。2002年に閣議決定された「バイオマス・ニッポン総合戦略」にはあらゆるバイオマスを積極的に利用する戦略が明記されている。また2001年6月に取りまとめられた総合資源エネルギー調査会新エネルギー部会の報告では、2010年のバイオマスによるエネルギー供給目標は、石油換算で600万kLとされている[2]。

バイオマスはそのままでは利用しにくいいため、バイオマスは通常より利用しやすいものに変換される。代表的な変換技術として、高温ガス化、超臨界水ガス化、メタン発酵、エタノール発酵、水素発酵などがある。メタンやエタノールや水素など各種のエネルギーソースに変換する技術があるが、その中でも水素は燃料電池での需要が最も高く、燃料電池の性能向上により電気エネルギーへの変換効率も高い。そのため化石燃料依存型社会から脱却するために、水素エネルギー社会の構築が現実的になってきている。

バイオマスからの水素生産方法は発酵水素生産法、光合成水素生産法、超臨界ガス化などさまざまなものがある。生物学的生産法は他の熱化学的な方法よりもランニングコストが安く[3]、また発酵水素生産法は光合成水素生産法と比べて水素生産速度が格段に速い[4]。

そのため発酵水素生産法の研究が盛んに行われている。しかし発酵水素生産法も実用化にはまだ水素収率が低く、水素生産速度も十分ではないなどクリアすべき課題がある。これらの課題を克服するために、さまざまな試みがされている。発酵水素生産の最大理論水素収率は以下の式より  $4 \text{ mol} \cdot \text{H}_2 \text{ mol} \cdot \text{glucose}^{-1}$  である。



しかしながら、多くの水素発生細菌の収率は  $4 \text{ mol-H}_2 \text{ mol-glucose}^{-1}$  に届かず、1 または  $2 \text{ mol-H}_2 \text{ mol-glucose}^{-1}$  程度である。そのため、より収率の高い *Rhodospseudomonas palustris* P4(収率  $2.76 \text{ mol-H}_2 \text{ mol-glucose}^{-1}$ ) や、アルコールのような副産物の代謝を止めた *Enterobacter cloacae* II T-BT による水素生産の研究が行われている [5, 6]。さらに Tanisho(2000)は遺伝子組み換え技術により収率は  $10 \text{ mol-H}_2 \text{ mol-glucose}^{-1}$  にまで改善することができることを説明している [7]。

一方水素生産速度は反応速度論により、温度を上げることで向上させることができると考えられる。そのため超高温菌などによる発酵水素生産の研究が、近年数多く行われるようになってきている [8]。しかし理想と異なり水素生産速度はかなり遅い。*Clostridium* 属による  $37^\circ\text{C}$  付近の培養ではおよそ  $0.5 \text{ L-H}_2 \text{ L-culture}^{-1}\text{h}^{-1}$  であるのに対して [9]、Morimoto ら(2004)の汚泥から得た菌による  $60^\circ\text{C}$  での培養では、 $0.13 \text{ L-H}_2 \text{ L-culture}^{-1}\text{h}^{-1}$  [10]、E. W. J. van Niel ら(2002)の実験では *C. saccharolyticus* を用いた  $70^\circ\text{C}$  の培養では  $0.19 \text{ L-H}_2 \text{ L-culture}^{-1}\text{h}^{-1}$  であったと報告されている [11]。この理由として Schroder ら(1994)は *Thermotoga maritima* の研究から、細胞の密度が低いことを指摘している [12]。また超高温菌の場合、発酵槽を加熱するためかなりのエネルギーを要してしまう。このようなことから、本研究では従来の水素発生菌よりも優れた水素発生能力を持つ、新たな中温水素発生細菌の探索を試みた。

## 2. 中温水素発生細菌のスクリーニング

### 2.1 目的

高温水素発酵法は水素生産速度の向上、また雑菌による基質の汚染を防ぎやすいことなどから、近年盛んに研究が行われている。しかし緒言で述べたように水素生産速度はかなり遅い。そのため理論通りの水素生産速度を持ち、同時に過度な熱源を必要としない中温水素発生細菌の探索を行った。

### 2.2 実験方法

野外から土や汚泥といった微生物を含むさまざまなサンプルを数多く採取してきた。

ABCM 半流動培地（栄研器材株式会社）の規定量の半分（本来は 48g/L のところ 24g/L とした）をイオン交換水に溶解し、それにグルコースを 1.5g/L 加えてこれをスクリーニング用の培地とした。

このように調製した培地を 13×80 mm の試験管にいっぱいになるまで注いだ。これに野外から採取してきたサンプルを白金耳で植菌した後、直径 2 mm の穴が開いたシリコン栓で空気が入らないように栓をした。これを試験管立てに逆さまに挿し、50°C の恒温槽に入れて振盪培養した (Fig.2.1)。こうすることによってサンプル中にガスを発生する細菌がいた場合、試験管内でガスが発生することにより試験管内の圧力が高まり培地が外に流出し、試験管内にはガスが溜まる。溜まったガスの量から、高温で成育してなお且つガスを活発に発生する細菌が検体中に含まれているのかどうかの判定を行った。

### 2.3 結果

51 個のサンプルを試験した。多くのサンプルはほとんどガスの発生がみられないか、発生してもごくわずかであったが、1 つだけガスの発生量が多いものがあった。試験管に入っている培地のほとんどを押し出し、ガスが半分以上を占めていた。このサンプルが最も有望であると考えて水素発生実験を行うことにした。またこのサンプルを便宜的に **Mesophilic Bacteria** と呼ぶことにした。

### 3. Mesophilic Bacteria の水素発生実験

#### 3.1 目的

Mesophilic Bacteria が発酵水素生産にどれくらい適しているのかを調べるため、ジャーファーメンターを用いて試験管よりも大きいスケールで水素発生実験を行うことにした。

#### 3.2 実験方法

ABCM 半流動培地を 16mL 入れた高層培地に Mesophilic bacteria を植えつけた。十分に菌が生育したものを前培養液とし、16mL を本培養液に植菌した。

本培養は GAM 糖分解用半流動培地（日水製薬株式会社）で行った。容積が 500mL のジャーファーメンターで行い培養液体積 450mL、糖濃度 1.5%、攪拌速度 30rpm、培養温度 50°C で一定に保った。pH は 6.0 より下がらないように設定し、初期 pH は 6.7 であった。水素の発生量は NaOH で水上置換を行って計測した。

水素収率、水素生産速度などは実測値から以下に示す「A modified Gompertz equation(修正ゴンペルツ式)」によって求めた[13, 49, 50]。

$$H = P \exp \left\{ -\exp \left[ \frac{R_m e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$$

ここで H は積算水素発生量(L·H<sub>2</sub> L·culture<sup>-1</sup>)、Pは予測される水素発生量(L·H<sub>2</sub> L·culture<sup>-1</sup>)、R<sub>m</sub>は最大水素生産速度(mL h<sup>-1</sup>)、λは水素発生に要した時間（ラグタイム h）、tは経過時間(h)、eはexp=2.718である。

#### 3.3 結果と考察

水素の発生は Fig.3.1 のように発生した。水素収率は 2.38mol·H<sub>2</sub> mol·glucose<sup>-1</sup>、最大水素生産速度は 2.3 L·H<sub>2</sub> L·culture<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>であった。Table.3.1 は T.de Vrije and P.A.M.Classen (2003) がまとめたものである[9]。最大水素生産速度が 2.3 L·H<sub>2</sub> L·culture<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>というのは今まで報告されたものと比較して最も速いことがわかった。このことから Mesophilic bacteria は非常に有望であることがわかったため、研究の対象を Mesophilic bacteria に絞り、Mesophilic bacteria がどのような水素発生特性を有しているのか調べることにした。

## 4. 単離

### 4.1 目的

Mesophilic bacteria は野外で取ってきたため、単一の菌ではなくさまざまな菌を含んでいる菌群であると考えられる。この中から高温で活発に水素を発生している菌を得るため、単離を行った。

### 4.2 実験方法

寒天培地に塗抹法を用いて単一の菌によるコロニーを形成させ、単離操作を行った。活発に水素を発生させている菌が通性嫌気性菌か絶対嫌気性菌か不明であるため、寒天培地は好気条件のものと嫌気条件のもの2通り用意した。嫌気条件を保つために、円形ろ紙をシャーレに2枚挿入し、それにピロガロール 9.5g を水 20mL に溶かした液と、KOH 9.5g を水 8.5mL に溶かした液とを使用し先立ち混合したものを 1 mL 染み込ませ、酸素を吸収するようにした [14]。さらにシャーレをタッパーに入れて 40°C の恒温槽に入れた。好気条件のシャーレはとくに嫌気操作はせずに 40°C の恒温槽に入れた。

### 4.3 結果

好気条件のシャーレにはコロニーはできていなかったが、嫌気条件のシャーレにはいくつかのコロニーが形成されていた。きれいな円形を成しているいくつかのコロニーから白金耳で菌を取り、ABCM 半流動培地で作成した高層培地に植えつけた。それらを 50°C の恒温槽にしばらく保管したところ、Fig.4.1 のようにガスを活発に発生するものと発生しないものがあることがわかった。このことから菌群の中から活発に水素を発生している菌を単離することができたと考え、Mesophilic bacterium HN001 と呼ぶことにした。



## 5. Mesophilic bacterium HN001 のグルコースからの水素発生特性

### 5.1. 目的

発酵水素生産に最も大きく影響を与える環境要因として、温度と pH がある。Mesophilic bacterium HN001 による発酵水素生産の最適温度と最適 pH を明らかにするために、グルコースを基質としてさまざまな培養温度と培養 pH で水素発生実験を行った。

### 5.2. 実験方法

HN001 株を 16mL の 2 本の ABCM 半流動培地（栄研器材株式会社）の高層培地に植え付け、十分に菌を増殖させた。高温に順化させるため、本培養液に植菌する 30 分前に 45°C の高温槽に入れた。2 本のうち、より活発に気泡を発生させているものを前培養液とし、そのうち 8 mL を本培養液に植菌した。本培養液は Table.5.1 に示した YNU 嫌気培地を用いた。本培養は容積 500mL のジャーファーマンターで行い、糖濃度 1.5%、液量は 350mL、攪拌速度 30rpm、バッチ培養とした。温度と pH が HN001 株による水素生産に及ぼす影響を調べるため、温度は 41、44、47、50°C、pH は 5.5、6.0、6.5、7.0 に設定して実験を行った。水素収率と水素生産速度については 3.2 節と同様に「the modified Gompertz equation(修正ゴンペルツ式)」により求めた。

代謝産物の分析は液体クロマトグラフィーを用いた。分析条件は以下の通りである。カラム：GL-C610H-S（日立化成工業株式会社）、キャリアー：0.1%リン酸溶液、流速：0.5mL/min、検出器：RI Detector (L-7490 HITACHI)、カラムオーブン：40°C

### 5.3. 結果と考察

#### 5.3.1. 温度の影響

Fig.5.1.(a)に温度が最大水素生産速度に及ぼす影響を示す。糖濃度 1.5%の場合、pH7.0 以外では最大水素生産速度は温度が上昇するにつれて速くなる傾向を示し、47°Cで最も速くなった。50°Cまで温度を上げると、最大水素生産速度は大きく低下するため、50°Cが生育の限界付近であると思われる。pH7.0 では 44°Cで最も速くなり、それ以上に温度を上げると最大水素生産速度は低下した。全ての実験で最も速かったのは 47°Cで  $3.4\text{L-H}_2\text{ L-culture}^{-1}\text{h}^{-1}$ であった。これは Table.3.1 に示した中で最も速い Rachman MA ら[15]による *E.aerogenes* HU101 m AY-2 による実験のおよそ 2.5 倍の速さである。50°Cでの最大水素生産速度は 47°Cよりも低かった。これらのことから Mesophilic bacterium HN001 株を用いた発酵による高速水素生産の最適温度は 47°Cであるとわかった。

Fig.5.2.(a)は温度が水素収率に及ぼす影響を示している。収率は温度の上昇とともに直線的

に増加し、50°Cで最大  $2.5\text{mol-H}_2 \text{ mol-glucose}^{-1}$ であった。Fig.5.1.(a)、Fig.5.2.(a)から温度を50°Cよりさらに上げると収率は上昇するかもしれないが、水素生産速度は大きく下がるのが推察される。

発酵水素生産では水素以外に多くの代謝産物が副生され、それらの多くは酢酸や乳酸などの有機酸や、エタノールやブタンジオールなどのアルコール、そして二酸化炭素がほとんどである。水素以外に代謝される代謝産物の種類は水素生産と密接に関係していることがわかっている[5]。液体クロマトグラフィーによる発酵液の分析から、HN001株は主な代謝産物として酢酸、酪酸、エタノール、乳酸、ギ酸を代謝することがわかった。Fig.5.3にこれらの代謝産物と水素発生の関係図および式を示す。この図と総括反応式より、1モルのグルコースから酢酸のみが生成されるとき、水素は4モル生産されることがわかる。同様に1モルのグルコースから1モルの酪酸が生成されるとき、水素は2モル生産される。またピルビン酸からアセチル-CoAに進むときに、 $\text{NAD}^+$ から  $\text{NADH}$  を生成せず、ギ酸を生成した場合、ギ酸分解により  $\text{CO}_2$ と  $\text{H}_2$ を生じる。ただしこれはpH6.4以下で進む反応である。発酵による水素発生のメカニズムについての詳細は谷生(2004)による「バクテリアはなぜ水素を発酵で発生するのか、またエネルギー生産利用における問題点はなにか」を参照されたい[16]。

Fig.5.4.(a)は温度が酢酸生成に及ぼす影響である。酢酸の濃度は温度が高くなるにつれて上昇し、その傾向はおよそ45°C以上で顕著であった。酢酸生成は理論的に水素発生を伴うため、酢酸の生成量が増したことが高温で水素収率が高まる一因であると考えられる。

Fig.5.5.(a)に温度がエタノール生成に及ぼす影響を示す。エタノールの濃度は温度が高くなるにつれて上昇した。エタノール生成の挙動は酢酸生成のそれとかなり類似していた。Fig.5.3に示したように、グルコースからエタノールを生成するときは水素の発生は起こらない。従ってグルコースがエタノール生成に利用されると、水素の収率は減少することになる。またエタノールはしばしばバクテリアの成長を阻害する因子として働く。しかしエタノールはエネルギーとしての利用も可能である。エタノールを効率的に発酵槽から取り出すことができれば、生成されたエタノールを有効に活用でき、さらにエタノールによるバクテリアへの阻害作用も避けられるかもしれない。

Fig.5.6.(a)は温度が酪酸生成に及ぼす影響である。酪酸濃度は温度が上昇するにつれて直線的に減少し、50°Cではわずか数  $\text{mM}$  のオーダーまで抑制された。酪酸生成は水素発生を伴うため、高温で減少する傾向はあまり好まれないかもしれない。しかし酢酸、エタノールは糖濃度1.5%ではともに70 $\text{mM}$ 程度生成されるのに対して、酪酸は多くて15 $\text{mM}$ 程度しか生成されないため、水素収率には大きく影響していない。

Fig.5.7.(a)は温度が乳酸生成に及ぼす影響である。乳酸の濃度は温度が上昇するにつれて直

線的に減少した。この傾向は酪酸生成の挙動と類似している。乳酸は水素の発生を伴わないため、グルコースを無駄に消費してしまう。そのため、高温で乳酸の生成量が減少するのはとても有利な傾向であると言える。

Fig.5.8.(a)は温度がギ酸生成に及ぼす影響である。温度がギ酸生成に及ぼす影響は確認できなかった。後述するが、pH の影響は顕著に表れていた。

以上のことから高温域では酢酸、エタノールの濃度が増加し、酪酸と乳酸の濃度が減少したことがわかる。これは Fig.5.3 より高温ではグルコースから生成したピルビン酸が、酢酸とエタノール生成の方向に進んだために、乳酸、酪酸の方向に進むピルビン酸の量が相対的に減少したためだと考えられる。このメカニズムについては熱力学的な理由や酵素学的な理由が考えられるため、今後検討する必要がある。いずれにしても、水素生産速度が速く、水素収率も高い高温での培養の方が、HN001 株による発酵水素生産に適している。

### 5.3.2. pH の影響

5.3.1 節では温度の影響を見てきたが、この節では pH ごとにデータをまとめ、それについて結果と考察をまとめた。Fig.5.1.(b)は pH が最大水素生産速度に及ぼす影響である。44℃以外の全ての温度で pH6.0 が最も速く、上に凸型のグラフとなっている。このことから 44℃のデータについて再度実験を行う必要があるが、pH6.0 で最も速い水素生産速度が得られると思われる。

Fig.5.2.(b)は pH が水素収率に及ぼす影響を示している。収率は pH が低くなるにつれて増加した。また pH6.0 より高くなると収率は大きく減少することがわかった。このことから HN001 株による発酵水素生産では、pH が低いほうが適しており、pH6.0 においては水素生産速度も最も速くなることから pH6.0 が最適 pH であると考えられる。

Fig.5.4.(b)は pH が酢酸生成に及ぼす影響である。酢酸生成は pH による顕著な影響は見られなかった。一方他の文献の報告によると、酢酸生成はしばしば pH の影響を受けるようである。H.-S. Shin ら(2004)は pH が高くなるにつれて酢酸濃度が高くなったデータを示している [17]。

Fig.5.5.(b)は pH がエタノール生成に及ぼす影響である。エタノール生成は酢酸生成と同様に pH による影響は受けなかった。5.3.1 節で述べた温度の影響でも、酢酸とエタノール生成の傾向は類似していた。この理由についても検討する必要がある。

Fig.5.6.(b)は pH が酪酸生成に及ぼす影響である。酪酸の濃度は pH が低くなるにつれて増加した。この傾向は温度が低いほど顕著であることがわかった。また図からどの温度でも pH6.5 と pH7.0 では酪酸濃度にあまり差が無いことから、pH が 6.5 以上と高くなると酪酸濃

度がほぼ一定となることが推察される。

Fig.5.7.(b)に pH が乳酸生成に及ぼす影響を示す。データにばらつきがあるが、乳酸の濃度は pH が低くなるにつれて増加する傾向があることがわかった。乳酸生成と酪酸生成は pH に対する挙動はやや異なるが、どちらも pH が低くなるにつれて濃度が増加している。乳酸生成と酪酸生成は 5.3.1 節で述べた温度の影響でも類似しており、酢酸とエタノールと同様である。この理由についても今後検討が必要である。

Fig.5.8.(b)は pH がギ酸生成に及ぼす影響である。ギ酸の濃度は pH が低くなるにつれて急激に減少した。これまでの研究からギ酸は pH が低くなる（およそ pH6.4 以下）と、水素と二酸化炭素に分解されることがわかっている（Fig.5.3） [16]。これらのことから、pH が低くなるほど水素収率が高くなるのはギ酸が分解されることが理由の 1 つであると考えられる。

## 6. Mesophilic bacterium HN001 の増殖と乾燥菌体重量

### 6.1. 目的

半回分培養や連続培養を行う際には、効率を高めるために菌の固定化などを行って高濃度に菌を保ち反応を行わせる手法が取られることがある。この場合水素発生速度は発酵槽の体積当たりで評価(単位は  $L\text{-H}_2\text{ L-culture}^{-1}\text{ h}^{-1}$ )するよりも、菌体重量当たり(単位は  $L\text{-H}_2\text{ g}^{-1}\text{ h}^{-1}$ )で評価の方がより適していると言える。なぜなら菌体をより高濃度に保てば、水素発生速度は発酵槽の体積よりも、菌体密度(菌体重量)により左右されるはずだからである。HN001 株による発酵水素生産を行う場合でも、菌の固定化を行うことは十分想定される。そのため、HN001 株がどの程度の菌体密度で発酵を行っているのかを知ることが重要である。菌の密度は OD によって測るのが一般的であるため、本実験では OD と菌の乾燥重量の相関関係と、OD から HN001 株の乾燥菌体重量を求める検量式を明らかにした。

### 6.2. 実験方法

デシケーターの中に吸湿剤として入っているシリカゲルを取り出し、ビーカーに入れた。それを電子レンジでシリカゲルが青くなるまで5分ほど加熱した後、デシケーターに戻した。シリカゲルは乾燥状態では青く、吸湿している状態では薄い赤紫色を呈するためである。ステンレス秤量管5本をオーブンで  $105^{\circ}\text{C}$ 、24 時間乾燥させた後、デシケーターに 30 分入れて吸湿しないように常温に戻るまで冷却した。常温に戻したステンレス秤量管の質量を、天秤(Chyo Jupiter CP3-200D 株式会社 長量器製作所)で測定した。5.2 節と同じ方法で前培養した HN001 株 8 mL を、450mL の YNU 嫌気培地に植え付け、ジャーファーメンターで培養を行った。温度は  $47^{\circ}\text{C}$ 、pH は 6.0 に固定し、攪拌速度は 30rpm に設定した。菌が増殖して培養液の色が変わっていく度に、培養液を発酵槽からシリンジでおよそ 30mL 取り出し、OD(550nm)を測定した。HN001 株は活発にガスを発生させるため、そのままでは吸光度が正確に測定できない。そのため OD の測定は発酵液をイオン交換水で4倍に希釈して行った。またすぐに取り出した培養液 30mL を正確に量り取り、遠心分離機(SCR18B HITACHI)を用いて、15000rpm で 10 分間遠心分離した。このとき遠心分離後の培養液がきれいに透明になっていることが重要である。遠心分離後、沈殿した菌体が落ちないように静かに上澄み液を捨てた後、菌体が入ったステンレス秤量管を  $105^{\circ}\text{C}$  のオーブンで、24 時間乾燥させた。乾燥させたステンレス秤量管と乾燥菌体は、すぐにデシケーターに 30 分入れて常温に戻した後、天秤で質量を量った。乾燥菌体重量は

$$\text{乾燥菌体重量 (g)} = [\text{ステンレス秤量管と乾燥菌体重量の和(g)}] - [\text{ステンレス秤量管 (g)}] \dots\dots\dots \text{「1」}$$

で求めた。植菌前の培養液も同様の操作を行い、ブランクとして補正した。精度を高めるために、以上の操作を2回を行い、同じグラフにプロットして、OD と乾燥菌体重量の関係式を求めた。

式を求めた後、その式の妥当性を確認するための実験を行った。まず実験に先立ち3本のステンレス秤量管の乾燥した質量を、前述した方法と同じ方法で測定した。HN001 株の培養も前述した実験条件と等しい条件で行った。HN001 株を本培養液に植菌して2時間半後に培養を止めた。その発酵液を 1mL 取り、4 倍に希釈して OD を測定した。またすぐに発酵槽から 30mL を正確に量り取り、ステンレス秤量管にいったものを3本作成した。それらを同時に 15000rpm で 10 分間遠心分離をかけた。沈殿した菌体が落ちないように静かに上澄みを捨てた。沈殿した菌体が入ったステンレス秤量管を 105°C のオーブンで、24 時間乾燥させた。乾燥させたステンレス秤量管は、デシケーターに 30 分入れて常温に戻した後、天秤で質量を量った。植菌前の培養液も同様の操作を行い、ブランクとして補正した。そして式から求めた菌体重量と、実測した菌体重量がどれほど一致するか調べた。

### 6.3. 結果

Table.6.1 および Table.6.2 は実験データの詳細である。Fig.6.1 は2回の実験のデータをプロットしたものである。OD は乾燥菌体重量と比例の関係が見られ、相関係数も  $r^2 = 0.9915$  と非常に高い相関関係があることがわかった。また近似した直線の式は

$$y (\text{乾燥菌体重量}) = 1.1618x (\text{OD}) \dots\dots\dots \text{「2」}$$

となった。

この直線の式の妥当性を調べた結果、Table.6.3 のようになった。誤差は最も大きいもので 7.8%、最も小さいもので 1.7% とかなり誤差は小さく、式[2]は正確に HN001 株の乾燥菌体重量を OD から求められることがわかった。

この式を元に、例として5節で用いた pH6.0、47°C のデータについて菌体当たりの水素発生速度を求めたものを Fig.6.2 に示す。実験開始後2時間後の観測時点で水素発生速度は  $2.67 \text{ L-H}_2 \text{ L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$  に達しており、OD (4倍希釈時) が 0.667 であった。このときの菌体濃度は式「2」より  $3.1 \text{ g L}^{-1}$  となる。そのため水素生産速度は  $0.86 \text{ L-H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  となる。この速度は、*Enterobacter aerogenes* E82005 が  $0.38 \text{ L-H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  [18]、*E. cloacae* II T BT-08 が 0.66

$\text{L}\cdot\text{H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  [19]であることを考えると、かなり速い速度であると言える。M.A.Rachman ら (1998) は packed-bed reactor を用いた *E. aerogenes* AY-2 の実験で、細胞濃度は  $17\text{g L}^{-1}$  であったと報告している[20]。さらにエタノール発酵の研究では、 $48.5 \text{g L}^{-1}$  の菌体濃度を達成したという報告がある[21]。これらのことから、例えば Mesophilic bacterium HN001 株を高濃度に固定し培養を行って、発酵槽内の菌体濃度を  $6\text{g L}^{-1}$  に保てば、水素生産速度はおおよそ  $5.2\text{L}\cdot\text{H}_2 \text{ L}\cdot\text{culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$  となり、2020 年までの生物学的水素生産の目標値である  $5 \text{L}\cdot\text{H}_2 \text{ L}\cdot\text{culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$  をクリアする見通しが立ったと言える。

## 7. 比増殖速度と活性化エネルギー

### 7.1. 目的

Mesophilic bacterium HN001 株の基本的な生態学的特性を知るために、比増殖速度と、水素発生のみかけの活性化エネルギーを求めた。

### 7.2. 実験方法

5 節で実験を行った pH6.0 のデータを利用するために、5 節と等しい方法で培養温度 32°C、37°C で pH を 6.0 に設定して実験を行った。それらの OD と 5 節の pH6.0 のデータを用いて以下の式から比増殖速度 ( $\mu$ ) を求めた。

$$dN/dt = \mu N \quad \dots \dots \dots \text{「3」}$$

$N$ : 生物の個体数,  $\mu$ : 比増殖速度

これを積分すると

$$\ln ( N/ N_0 ) = \mu t \quad \dots \dots \dots \text{「4」}$$

$N_0$ : 最初の個体数

式「4」の両辺を  $t$  で割って

$$\ln ( N/ N_0 ) \times 1/t = \mu \quad \dots \dots \dots \text{「5」}$$

となる[22]。

また菌体の倍加に要する時間  $t_d$  は、倍加時間（世代時間）と呼ばれ、

$$\mu t_d = \ln 2 = 0.693 \quad \dots \dots \dots \text{「6」}$$

より

$$t_d = 0.693 / \mu \quad \dots \dots \dots \text{「7」}$$

本実験では比増殖速度を求めるために式「5」を、倍加時間を求めるために式「7」を利用し



た[22]。

また最大水素発生速度のデータを元に、アレニウスの式から HN001 株の水素発生のみかけの活性化エネルギーを求めた[23]。アレニウスの式は

$$k = A \exp(-E/RT) \quad \dots \dots \dots \text{「8」}$$

$k$ : 反応速度定数  $A$ : 頻度因子  $E$ : 活性化エネルギー

$R$ : 気体定数 (=8.314J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>)  $T$ : 絶対温度

これを自然対数の形にすると

$$\ln(k) = (-E/R)(1/T) + \ln(A) \quad \dots \dots \dots \text{「9」}$$

となり、これは絶対温度の逆数の関数となる。式「9」のグラフを書き、その傾きから活性化エネルギー( $E$ )と、切片から( $A$ )を求めることができる。

活性化エネルギーとは「一つの反応分子系が一般にポテンシャルエネルギーの高い臨界状態を経て、原子の組み合わせの異なる状態、すなわち生成系へ移るものであると考え、この臨界状態を越えるに必要な最小のエネルギーを活性化エネルギーという」と『化学大辞典』(1993)に定義されている[24]。

### 7.3. 結果と考察

Fig.7.1 は YNU 嫌気培地、pH は 6.0 で温度をさまざまに変化させたときの比増殖速度である。水素発生は 47°C で最も速くなる ( Fig.5.1.(a) ) のに対して、比増殖速度は 44°C のとき 1.7h<sup>-1</sup> と最も速くなった。プロットしたものを線で結ぶと、44°C を頂点としてきれいな凸型の曲線となった。Table.7.1 は『日本生化学学会編 生化学データブック II』(1980)より作成した、さまざまな微生物の比増殖速度および倍加時間を示した表である[25]。HN001 株は増殖が速いとされる *Escherichia coli* に次いで速いことがわかった。また倍加時間 0.41h であることから、HN001 株は 25 分に 1 回の速さで分裂していることになる。

次にアレニウスプロット及び、それに用いたデータをそれぞれ Fig.7.2、Table.7.2 に示す。直線の傾きは -7981 であるから、活性化エネルギーは式「9」より

$$(-E/R) = -7981$$

これから

$$E = -(-7981 \times 8.314) = 66354 \text{ J mol}^{-1} = 66.35 \text{ kJ mol}^{-1}$$

となる。従って、pH6.0、YNU 嫌気培地での Mesophilic bacterium HN001 株の水素発生のみかけの活性化エネルギーは 66.35 kJ mol<sup>-1</sup>であることがわかった。またこの活性化エネルギーの値を利用して、温度を変化させると理論的な水素発生速度はどのようになるのか 32°Cの水素生産速度を基準 (k<sub>1</sub>)、他の温度を k<sub>2</sub>として、式「8」より導いた以下の式から計算した。

$$k_2 / k_1 = \exp \{ E / R (1 / T_1 - 1 / T_2) \} \quad \dots \dots \dots \text{「10」}$$

その計算結果を Table.7.3 に示す。37°C、47°Cのデータは実測値とよく一致している (Table.7.2 参照)。実際は 47°C以上に培養温度を上げると、HN001 株の生育に厳しくなり、水素生産速度は下降してしまう。しかし仮にさらなる熱耐性の HN001 株を作出し、57°Cで培養した場合、32°Cの水素生産速度のおよそ 7 倍の 7.5 L·H<sub>2</sub> L·culture<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>で水素発生することになる。

## 8. 糖濃度の影響

### 8.1. 目的

発酵水素生産を工業的に行うためには、一度に与える基質の濃度（一般的に負荷量という）は高いほうが好ましい。なぜなら、基質の濃度を薄くすると必然的に発酵廃液の量が増えてしまい、処理コストが増加してしまう。そのため基質濃度を上げると、最大水素発生速度、水素収率、代謝産物などがどのようになるのかを調べた。

### 8.2. 実験方法

HN001 株を 16mL の 2 本の ABCM 半流動培地（栄研器材株式会社）の高層培地に植え付け、十分に菌を増殖させた。高温に順化させるため、本培養液に植菌する 30 分前に 45°C の高温槽に入れた。2 本のうち、より活発に気泡を発生させているものを前培養液とし、そのうち 8 mL を本培養液に植菌した。本培養液は Table.5.1 に示した YNU 嫌気培地を用いた。本培養は容積 500mL のジャーファーメンターで行い、液量は 350mL、攪拌速度 30rpm、バッチ培養とした。基質濃度の影響を調べるため、グルコース濃度を 1.5、2.0、3.0、4.0、5.0% に設定して実験を行った。また pH は 6.0、培養温度は 47°C に設定した。水素収率と水素生産速度については 3.2 節と同様に「the modified Gompertz equation」により求めた。代謝産物は液体クロマトグラフィーで分析し、分析条件は 5 節と等しく以下の条件とした。

カラム： GL-C610H-S（日立化成工業株式会社）、キャリアー： 0.1%リン酸溶液、流速： 0.5mL/min、検出器： RI Detector (L-7490 HITACHI)、カラムオーブン： 40°C

### 8.3. 結果と考察

Fig.8.1 は糖濃度が最大水素生産速度と水素収率に及ぼす影響である。糖濃度が高くなるにつれて、最大水素生産速度と水素収率のどちらも直線的に減少していくことがわかった。このことから、HN001 株を利用する発酵水素生産では、基質の濃度は低くする（負荷量を下げる）方が適していることがわかった。これは工業的に発酵水素生産をする場合においてはやや不利な性質である。

Fig.8.2 に糖濃度が代謝産物に及ぼす影響を示す。基質のグルコースはほぼ全て消化していた（データは示していない）。糖濃度を上げるにつれて、乳酸の濃度が直線的に上昇し、糖濃度が 5% のとき最大 370mM にも達した。5 節でも述べたように（Fig.5.3）、乳酸が生成されるとき水素の発生は起こらない。従って基質が無駄に消費されたことになる。これが収率を減少させた最も大きな理由であると考えられる。一方興味深いことに糖濃度を上げても酢酸とエタノールの濃度はほぼ一定であった。また酪酸、ギ酸も低い濃度が保たれており乳酸のように

増加しなかった。

糖濃度を上げると水素生産速度および水素収率が下がるのか、その原因を明らかにして改善する必要がある。考えられることとして代謝産物の変化から、代謝産物による阻害の可能性はある。酢酸とエタノール、もしくは酪酸の濃度が増加することにより、Fig.5.3 に示したピルビン酸からアセチル-CoA の経路が阻害されてしまい、乳酸を生成するのかもしれない。そのように考えると、糖濃度を上昇させてもアセチル-CoA を経由して代謝される代謝産物の濃度は一定だが、乳酸の濃度は増加したことの説明がつく。このことは実験的に確かめる必要がある。一方谷生(1995)が行った廃糖蜜を基質に用いた *Enterobacter aerogenes* の実験では糖濃度を上げても、HN001 株のように、水素生産速度が急激に下がることはなかった[26]。これらの事象の説明がつくのかどうかも検討する必要がある。

## 9. 鉄イオンの影響

### 9.1 目的

めたん鉄イオンの培地への添加が、汚泥などから採取した菌による混合培養において水素生産速度や水素収率などの性能を向上させる事例が報告されている[27]。そこで鉄イオンの添加が Mesophilic bacterium HN001 株による発酵水素生産にどのような影響を及ぼすのかを  $\text{FeCl}_3$  を培地に添加して調べた。

### 9.2 実験方法

HN001 株を 16mL の 2 本の ABCM 半流動培地（栄研器材株式会社）の高層培地に植え付け、十分に菌を増殖させた。高温に順化させるため、本培養液に植菌する 30 分前に 45°C の高温槽に入れた。2 本のうち、より活発に気泡を発生させているものを前培養液とし、そのうち 8 mL を本培養液に植菌した。本培養液は Table.5.1 に示した YNU 嫌気培地を用いたが、本実験に限り、窒素源はカゼインペプトンの代わりにカザミノ酸を  $25\text{g L}^{-1}$  用いた。本培養は容積 500mL のジャーファーメンターで行い、糖濃度 2.0%、液量は 350mL、攪拌速度 30rpm、バッチ培養とした。鉄イオン添加の影響を調べるために、培地には  $\text{FeCl}_3$  をそれぞれ 0（コントロール）、100、200、400mg  $\text{L}^{-1}$  添加した。水素収率と水素生産速度については 3.2 節と同様に「the modified Gompertz equation」により求めた。

代謝産物の分析は液体クロマトグラフィーを用いた。分析条件は以下の通りである。カラム：GL-C610H-S（日立化成工業株式会社）、キャリアー：0.1%リン酸溶液、流速：0.5mL/min、検出器：RI Detector（L-7490 HITACHI）、カラムオーブン：40°C

### 9.3. 結果と考察

Fig.9.1 に  $\text{FeCl}_3$  添加が水素収率と最大水素生産速度に及ぼす影響を示す。 $\text{FeCl}_3$  を加えたものとそうでないものでは、収率と最大水素生産速度に大きな違いがあることがわかった。鉄イオンを加えることにより水素収率と最大水素生産速度はともに大きく向上し、 $\text{FeCl}_3$  を 100mg  $\text{L}^{-1}$  加えたとき、最大水素生産速度は  $3.6\text{ L-H}_2\text{ L-culture}^{-1}\text{ h}^{-1}$ 、またそのときの収率は  $2.5\text{ mol-H}_2\text{ mol-glucose}^{-1}$  であった。 $\text{FeCl}_3$  の濃度による違いはあまり見られなかったが、濃度を 100mg  $\text{L}^{-1}$  から 400mg  $\text{L}^{-1}$  に上げていくと若干水素収率と最大水素生産速度は低下する傾向があるかもしれない。ただ、100mg  $\text{L}^{-1}$  以上  $\text{FeCl}_3$  を加えても利点がないことから、工業的に利用する場合は必要最低限の量を添加すればよいだろう。濃度を 100mg  $\text{L}^{-1}$  以下に下げるとどのように水素発生が変化するか調べる必要がある。また本実験は糖濃度 2.0%で行っており、本実験の  $\text{FeCl}_3$  無添加のデータ（0 mg  $\text{L}^{-1}$ ）と 8 節での糖濃度 2.0%のデータを比較すると、

最大水素生産速度と水素収率にはかなり大きな違いがある (Fig.8.1 および Fig.9.1 参照)。これは窒素源として用いたカゼインペプトンとカザミノ酸による違いと考えられる。『新 最近培地学講座 一上ー』(1978)によるとカザミノ酸は除鉄されており、 $\text{FeCl}_3$  無添加では鉄分が不足していたのかもしれない[28]。他にもカザミノ酸は  $\text{NaCl}$  を多量に含むなどの違いがあり、それらも影響している可能性がある。

次に Fig.9.2 に  $\text{FeCl}_3$  の添加が代謝産物生成に及ぼす影響を示す。 $\text{FeCl}_3$  を添加した場合、添加しない場合と比較して乳酸の濃度は大幅に減少した。またギ酸の濃度も減少する傾向が見られた。一方酢酸、エタノール、酪酸の濃度は添加していないものと比べて増加した。乳酸を生成するときは水素の生産は行われなため、乳酸が生成される代わりに酢酸や酪酸生成のような水素の発生を伴う代謝が行われたことが水素収率と最大水素生産速度を向上させた主な理由と考えられる。

鉄イオンの影響に関して Junelles ら(1988)は、鉄制限がヒドロゲナーゼ活性を低下させたため、酸生成を減少させて溶媒生成を増加させたことを実証した[29]。そのため鉄が十分に培地に存在したために、ヒドロゲナーゼの活性が高まったことが考えられる。一方 Dabrock ら(1992)は鉄の制約により水素の生産が減少することはなかった報告している[30]。また鉄イオン添加により水素発生が改善される理由として、フェレドキシンが関与していることが考えられる。代謝経路の中でピルビン酸からアセチル-CoA に進む反応 (Fig.5.3 参照) にはフェレドキシンが関与しており、そのフェレドキシンは鉄を含んでいる。従って鉄が必要である場合、ピルビン酸からアセチル-CoA に進む反応が進みやすくなり、酢酸や酪酸が代謝されて、同時に水素が生産される。一方、鉄が欠乏しているとピルビン酸からアセチル-CoA に進む反応が十分進まず、ピルビン酸は乳酸の方向に進んでしまうのかもしれない。

また  $\text{FeCl}_2$  や  $\text{Cu}$  といった他の金属イオンの添加の影響についても明らかにしたい。

## 10. 結言

- 有望な新規の中温水素発生細菌をスクリーニングにより得ることができた。
- 温度に関して、最大水素生産速度は 47°C の培養で最も速くなることがわかった。一方水素収率は 50°C で最も高くなることがわかった。
- pH に関して、最大水素生産速度は pH6.0 の培養で最も速くなることがわかった。一方水素収率は pH5.5 のときに最も高くなった。
- Mesophilic bacterium HN001 株の増殖は 44°C で最高となり、 $\mu$  は  $1.7 \text{ h}^{-1}$ 、倍加時間は  $0.41 \text{ h}^{-1}$  であることがわかった。
- HN001 株の乾燥菌体重量は、YNU 嫌気培地を用いているとき、
$$y (\text{菌体重量}) = 1.1618x (\text{OD})$$
 の式から求められることがわかった。
- HN001 株の水素発生の活性化エネルギーは pH6.0 のとき  $66.35 \text{ kJ mol}^{-1}$  であることがわかった。
- 基質の糖濃度を 1.5% 以上にすると、糖濃度に乳酸を生成してしまい、水素生産速度と水素収率は低下した。
- 鉄イオン ( $\text{FeCl}_3$ ) を加えることにより、最大水素生産速度と水素収率はともに大きく向上した。

## 11. 参考文献

- [1] 『地球環境報告 Ⅱ』 石 弘之 著 岩波新書 (1998)
- [2] 山地憲治: エネルギーとしてのバイオマスの意義と課題. 高圧ガス 40, 9 (2003) 14-19
- [3] T. de Vrije, G.G. de Haas, G.B. Tan, E.R.P. Keijsers, P.A.M. Claassen: Pretreatment of *Miscanthus* for hydrogen production by *Thermotoga elfii*. *Int J Hydrogen Energy* 27 (2002) 1381-1390
- [4] 谷生重晴: 発酵法による生ごみからの水素生産の可能性, 『生物学的手法を用いた水素関連新技術の可能性調査報告書』水素エネルギー協会, (財)エネルギー総合工学研究所 (2000) 45-64
- [5] Kaushik Nath, Debabrata Das, Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches. *Appl Microbiol Biotechnol* 65 (2004) 520-529
- [6] Kumar N, Ghosh A, Das D: Redirection of biochemical pathways for the enhancement of H<sub>2</sub> production by *Enterobacter cloacae*. *Biotechnol Lett* 23 (2001) 537-541
- [7] Tanisho S: A strategy for improving the yield of hydrogen by fermentation. In: Mao ZQ, Veziroglu TN ( eds ) *Hydrogen Energy Progress X III*, Vol 1, Beijing, China, (2000) pp370-374
- [8] J. W. van Groenestijn, J. H. O. Hazewinkel, M. Nienoord, P. J. T. Bussmann: Energy aspects of biological hydrogen production in high rate bioreactors operated in the thermophilic temperature range. *Int J Hydrogen Energy* 27 (2002) 1141-1147
- [9] T.de Vrije and P.A.M.Claassen “Dark hydrogen fermentations” in *Bio-methane & Bio-hydrogen* ed J.H.Reith et al. (2003) 103–21 ISBN: 90–9017165–7
- [10] M.Morimoto, M. Atsuko, A. A. Y. Atif, M. A. Ngan, A. Fakhru'l-Razi, S. E. Iyuke, A. M. Balir: Biological production of hydrogen from glucose by natural anaerobic microflora. *Int J Hydrogen Energy* 29 (2004) 709-713
- [11] van Niel EWJ, Budde MAW, de Haas GG, van der Wal FJ, Classen PAM, Stams AJM: Distinctive properties of high hydrogen producing extreme thermophiles, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermotoga elfii*. *Int J Hydrogen Energy* 27 (2002) 1391-1398
- [12] Catrin Schroder, Martina Selig, Peter Schonheit: Glucose fermentation to acetate, CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> in the anaerobic hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritime*: involvement of the Embden-Meyerhof pathway. *Arch Microbiol* (1994) 161: 460-470



- [13] Samir Kumar Khanal *et al.* Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. *Int J Hydrogen Energy* 29 (2004) 1123-1131
- [14] 『微生物学実験法』 微生物研究法懇談会編 p43-44 (1981) 講談社
- [15] Rachman MA, Nskashimada Y, Kakizono T, Nishio N: Hydrogen production with high yield and high evolution rate by self-flocculated cells of *Enterobacter aerogenes* in a packed-bed reactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 49 (1998) 450-454
- [16] 谷生重晴: バクテリアはなぜ水素を発酵で発生するのか、またエネルギー生産利用における問題点はなにか. *水素エネルギーシステム* 29, 1 (2004) 2-6
- [17] Hang-Sik Shin *et al.* Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis. *Int J Hydrogen Energy* 29 (2004) 1355-1363
- [18] Tanisho *et al.* Feasibility study of biological hydrogen production from sugar cane by fermentation. In: Veziroglu TN, Winter C-J, Basselt JP, Kreysa G, editors. *Hydrogen energy progress X I*. Proceedings of 11 th WHEC, Stuttgart, (1996), 3, 2601-6
- [19] Narendra Kumar, Debabrata Das: Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* II T-BT 08. *Process Biochem* 35 (1999), 589-94
- [20] M.A. Rachman, Y. Nakashimada, T. Kakizono, N.Nishio: Hydrogen production with high yield and high evolution rate by self-flocculated cells of *Enterobacter aerogenes* in a packed-bed reactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 49 (1998) 450-454
- [21] T.K. Ghose, R. D. Tyagi: Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. Batch versus continuous systems. *Biotech and Bioeng.* 21. 8 (2004) 1387-1400
- [22] 『日本生化学会編 生化学データブック II』 酵素・代謝・栄養・遺伝・微生物・細胞・免疫・生化学的技術 東京化学同人(1980)
- [23] 『化学大辞典 1』 化学大辞典編集委員会編 (1993)
- [24] 『化学大辞典 2』 化学大辞典編集委員会編 (1993)
- [25] 『日本生化学会編 生化学データブック II』 酵素・代謝・栄養・遺伝・微生物・細胞・免疫・生化学的技術 東京化学同人(1980)
- [26] 『微生物を利用した発酵水素発生』 谷生重晴 博士論文 (1995)
- [27] Junelles A. M, Janati-Idrissi. R: Iron effect onn acetone-butanol fermentation. *Curr. Microbiol.*17(1988), 299-303
- [28] 『新 細菌培地学講座－上－』 坂崎利一著 近代出版 (1978)
- [29] Junelles A. M, Janati-Idrissi. R: . Iron effect onn acetone-butanol fermentation. *Curr. Microbiol.*17(1988), 299-303

- [30] Dabrock. B, Bahl H, Gottschalk. G: Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*. Appl. Environ. Microbiol. 58(1992) 1233-1239
- [31] Taguchi F, Mizukami N, Hasegawa K, Saito-Taki T: Microbial conversion of arabinose and xylose to hydrogen by a newly isolated Clostridium sp. No.2. Can J Microbiol 40,(1994)228-233
- [32] Evvyernie D, Morimoto K, Karita S, Kimura T, Sakka K, Ohmiya K: Identification and characterization of *Clostridium paraputrificum* M-21, a chitinolytic, mesophilic and hydrogen-producing bacterium. J Bioscience Bioengineering 89,(2000) 596-601
- [33] Evvyernie D, Morimoto K, Karita S, Kimura T, Sakka K, Ohmiya K: Conversion of chitinous waste to hydrogen gas by Clostridium paraputrificum M-21. J Bioscience Bioengineering 91(2001), 339-343
- [34] Heyndrickx M, Vansteenbeeck A, Vos P de, Ley L de: Hydrogen gas production from continuous fermentation of glucose in a minimal medium with Clostridium butyricum LMG1213tl. Syst Appl Microbiol 8,(1986) 239-244
- [35] Taguchi F, Mizukami N, Saito-Taki T, Hasegawa K: Hydrogen production from continuous fermentation of xylose during growth of Clostridium sp. Strain no.2. Can J Microbiol 41 (1995b) 536-540
- [36] Tanisho S, Suzuki Y, Wakao N: Fermentative hydrogen evolution by *Enterobacter aerogenes* strain E.82005. Int J Hydrogen Energy 12 (1987) 623-627
- [37] Tanisho S, Wakao S, Kosako Y: Biological Hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*. J Chem Eng Japan 16 (1983) 529-530
- [38] Kumar N, Das D: Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* II T –BT 08. Process Biochem 35 (2000) 358-363
- [40] Kumar N, Ghosh A, Das D: Redirection of biochemical pathways for the enhancement of H<sub>2</sub> production by *Enterobacter cloacae*. Biotechnol Lett 23 (2001) 537-541
- [41] Taguchi F, Mizukami N, Hasegawa K, Saito-Taki T: Direct conversion of cellulosic materials to hydrogen by Clostridium sp. No.2. Can J Microbiol 40 (1994) 228-233
- [42] Tanisho S, Ishiwata Y: Continuous hydrogen production from molasses by the bacterium Enterobacter aerogenes. Int J Hydrogen Energy 19 (1994) 807-812
- [43] Yokoi H, tokushige T, Hirose J, Hayashi S, Takasaki Y: H<sub>2</sub> production from starch by a mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Enterobacter aerogenes*. Biotechnol Lett 20(1998) 143-147

- [44] Yokoi H, Saitsu A, Uchida H, Hirose J, Hayashi S, Takasaki Y: Microbial hydrogen production from sweet potato starch residue. *J Bioscience Bioengineering* 91 (2001) 58-63
- [45] Ueno Y, Haruta S, Morimoto M: Hydrogen production from industrial wastewater by anaerobic microflora in chemostat culture. *J Ferment Bioeng* 82 (1996) 194-197
- [46] Lin C-Y, Chang R-C: Hydrogen production during the anaerobic acidogenic conversion of glucose. *J Chem Technol Biotechnol* 74 (1999) 498-500
- [47] Chen C-C, Lin C-Y, Chang J-S: Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic cultures utilizing sucrose as the limiting substrate. *Appl Microbiol Biotechnol* 74 (2001) 56-64
- [48] Mizuno O, Dinsdale R, Hawkes FR, Hawkes DL, Noike T: Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. *Bioresource Technol* 73 (2000) 59-65
- [49] R.Xiong, G.Xie, A.S. Edmondson, R. H. Linton and M. A. Sheard: Comparison of the Baranyi model with the modified Gompertz equation for modeling thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Food Microbiology* 16 (1999) 269-279
- [50] Saumya Bhaduri, Aaron C. Williams *et al.*: Thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in liver sausage slurry. *Food Microbiology* 8 (1991) 75-78

## 謝辞

論文作成にあたり、懇切丁寧にご指導いただいた谷生重晴先生に厚くお礼申し上げます。文章では表せないほど感謝しています。初めて先生にお会いした日のこと、1階の工作室で先生に教わりながら発酵槽を作ったこと、3階のゼミ室でお酒を飲んだこと、真鶴合宿のこと、論文を何度も直していただいたこと、北京のホテルで発表の練習をしていただいたことなど、さまざまなことが昨日のここのように思い出されます。先生に出会い、入学してからの日々は一生忘れません。本当にありがとうございました。

研究室の先輩にも感謝しています。黒河さんのギャグは最高でした。小串さん、私がお酒に酔ったとき本気で心配して頂いてありがとうございました。迷惑をおかけしてすみませんでした。

研究室の仲間たちにも感謝しています。みんな本当に個性的で、みんな本当にいい人たちでした。出来ることならまだまだ研究室に残ってみんなと過ごしたいです。私が本気でこんなことを思ったことは、今まで一度もありませんでした。

この楽しかった2年間は私の人生で最高の宝物です。

Table 3.1 Hydrogen yields and production rates by microorganisms as reported in the literature.

microorganism	conditions				substrate	H <sub>2</sub> yield (mol/ mol-hexose)	H <sub>2</sub> production rate(L/L.h)	Reference
	culture	D,h <sup>-1</sup>	pH	T,°C				
<b>Strict anaerobes</b>								
Clostridium sp. No2	batch		6	36	glucose	2.0	0.54	[31]
	batch		6	36	xylose	2.1	0.49	
<i>C. parapurificum</i> M-21	batch		—	37	GlcNAc <sup>1</sup>	2.5	0.69	[32, 33]
<i>C. butyricum</i> LMG1213tl	cont	0.222	5.8	36	glucose	1.5	0.49	[34]
<i>Clostridium</i> sp. No2	cont	0.18	6	36	glucose	2.4	0.16	[35]
	cont	1.16	6	36	glucose	1.4	0.46	
	cont	0.96	6	36	xylose	1.7	0.47	
<b>Thermophiles</b>								
<i>Thermotoga maritima</i>	batch		—	80	glucose	4.0	0.22	[12]
<i>Thermotoga elfii</i>	batch		7.4	65	glucose	3.3	0.06	[11]
<i>Caldocellulosiruptor</i> <i>saccharolyticus</i>	batch		7.0	70	sucrose	3.3	0.19	[11]
<b>Facultative anaerobes</b>								
<i>Enterobacter</i>								
<i>E. aerogenes</i> E.82005	batch		6.0	38	glucose	1.0	0.47	[36, 37]
<i>E. cloacae</i> II T-BT 08 wt	batch		—	36	glucose	2.2		[38, 6]
	batch		—	36	sucrose	3.0	0.78	
<i>E. cloacae</i> II T-BT 08 m DM <sub>11</sub>	batch		—	36	glucose	3.4		
<i>E. aerogenes</i> E.82005	cont	0.32	6.0	38	molassed	0.7	0.45	[42]
<i>E. aerogenes</i> HU101 wt	cont	0.67	—	37		0.6	0.69	[15]
<i>Eaerogenes</i> HU-101 m AY-2	cont	0.67	—	37	glucose	1.1	1.30	
<b>co-culture</b>								
<i>C.butyricum</i> IFO13949+	cont	1.0	5.2	36	starch	2.6	1.19	[43, 44]
<i>Eaerogenes</i> HO-39								
<b>Mixed cultures from:</b>								
-sludge compost	cont	12	6.8	60	waste water	2.5	0.19	[45]
-sewage sludge	cont	6	5.7	35	sugar factory			
	cont	8	6.7	35	glucose	1.7	0.66	[46]
-fermented soybean meal	cont	8.5	6.0	35	sucrose	1.7	0.59	[47]
					glucose	1.4	0.18	[48]

This figure was made from: T. de Vrije and P. A. M. Classen "Dark hydrogen fermentations" in Bio-methane & Bio-hydrogen ed J. H. Reith et al. (2003) 103 – 21 ISBN: 90 – 9017165 – 7

Table.5.1. Composition of YNU anaerobic medium (g L<sup>-1</sup>)

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

\* Glucose concentration depended on each experiments.

Table6.1 Results of measurement of dry cell weight at first time.

NO	weight of stainless-steel tube [g]	weight of dry cell mass and stainless-steel tube [g]	weight of dry cell mass [g/30mL]	weight of dry cell mass* [g/L]	weight of dry cell mass (4 fold dilution) [g/L]	OD (4 fold dilution)	OD (4 fold dilution)*
1	59.1353	59.1471	0.0118	0.00	0.00	0.032	0
31 2	59.1779	59.1974	0.0195	0.26	0.06	0.076	0.044
3	58.9058	58.9381	0.0323	0.69	0.17	0.187	0.155
4	59.2586	59.3163	0.0577	1.53	0.38	0.397	0.365
5	58.8477	58.9325	0.0848	2.44	0.61	0.579	0.547

\*Compensated from blank

Table6.2 Results of measurement of dry cell weight at second time.

NO	weight of stainless-steel tube [g]	weight of dry cell mass and stainless-steel tube [g]	weight of dry cell mass [g/30mL]	weight of dry cell mass <sup>※</sup> [g/L]	weight of dry cell mass (4 fold dilution) [g/L]	OD (4 fold dilution)	OD (4 fold dilution) <sup>※</sup>
1	59.3071	59.3191	0.012	0.00	0.00	0.022	0
2	59.0571	59.0698	0.0127	0.02	0.01	0.038	0.016
3	59.0886	59.103	0.0144	0.08	0.02	0.046	0.024
4	59.1379	59.1629	0.025	0.43	0.11	0.157	0.135
5	59.2740	59.397	0.123	3.70	0.92	0.776	0.754

※Compensated from blank



Table.6.3. Confirmation of accuracy of found equation<sup>※</sup>.

Error was calculated between dry cell weight from equation and actual dry cell weight.

Number of stainless-steel tube	OD [550nm]	weight from equation <sup>※</sup> [g L <sup>-1</sup> ]	actual weight [g L <sup>-1</sup> ]	error [%]
1			0.516	1.7
2	0.452	0.525	0.566	7.8
3			0.550	4.8

※  $y$  (dry cell weight) = 1.1618x (OD)

Table7.1. Various microbial growth rate.

microorganisms		generation time [h]	$\mu$ [h <sup>-1</sup> ]	temp [°C]	condition
	<i>Pseudomonas natriegens</i>	0.16	4.3	37	complex medium
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	0.18	3.9	60	complex medium
heterotrophic bacteria	<i>Escherichia coli</i>	0.28	2.5	37	bouillon
	<i>Escherichia coli</i>	0.35	2	40	complex medium
	<b>Mesophilic bacterium HN001</b>	<b>0.41</b>	<b>1.7</b>	<b>44</b>	<b>YNU anaerobic culture medium</b>
	<i>Bacillus subtilis</i>	0.43	1.6	40	complex medium
	<i>Bacillus megaterium</i>	0.52	1.3	30	bouillon
	<i>Pseudomonas putida</i>	0.75	0.92	30	synthetic medium
	<i>Vibrio marinus</i>	1.35	0.51	15	complex medium
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6	0.12	37	complex medium
34 photosynthesis bacteria	<i>Rhodospseudomonas spheroides</i>	2.2	0.32	30	complex medium
	<i>Chromatium D</i>	9	0.077	37	synthetic medium
	<i>Nitrobacter agilis</i>	20	0.035	27	synthetic medium
yeast	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2	0.35	30	shake culture
protozoa	<i>Paramecium caudatum</i>	10	0.069	26	bait is bacteria
green algae	<i>Chlorella ellipsoidea</i>	7	0.1	25	light synthetic medium
bacillariophyceae	<i>Tabellaria blocculosa</i>	17	0.041	20	light synthetic medium
red alga	<i>Porphyridium aerugineum</i>	17	0.041	21	light synthetic medium
blue-green alga	<i>Anabaena cylindrica</i>	25	0.028	25	light synthetic medium

This table is made from: 『日本生化学会編 生化学データブックⅡ』酵素・代謝・栄養・遺伝・微生物・細胞・免疫・生化学的技術 東京化学同人 (1980) [25]

Table.7.2. Data used for Arrhenius plot.

	Temp [°C]	1/(Temperature) [1/K × 10 <sup>3</sup> ]	H <sub>2</sub> production rate [L-H <sub>2</sub> L-culture <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	ln(rate)
	32	3.28	1.03	0.03
	37	3.23	1.28	0.25
pH6.0	41	3.18	2.45	0.90
	44	3.15	2.58	0.95
	47	3.12	3.36	1.21
	47	3.12	3.27	1.18

Table 7.3. prospective maximum H<sub>2</sub> production rate.

temperature						$k_2 / k_1$	prospective H <sub>2</sub> rate
°C	[K]	1/T[K]	(1/T <sub>1</sub> -1/T <sub>2</sub> )	E/R × (1/T <sub>1</sub> -1/T <sub>2</sub> )	exp {E/R(1/T <sub>1</sub> -1/T <sub>2</sub> )}	[L-H <sub>2</sub> L-culture <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	
<b>32</b> <sup>※1</sup>	305	3.27 × 10 <sup>-3</sup>				<b>1.03</b> <sup>※2</sup>	
<b>37</b>	310	3.23 × 10 <sup>-3</sup>	0.53 × 10 <sup>-4</sup>	0.42	<b>1.53</b>	<b>1.57</b>	
<b>47</b>	320	3.13 × 10 <sup>-3</sup>	1.54 × 10 <sup>-4</sup>	1.23	<b>3.41</b>	<b>3.51</b>	
<b>57</b>	330	3.03 × 10 <sup>-3</sup>	2.48 × 10 <sup>-4</sup>	1.98	<b>7.26</b>	<b>7.48</b>	
<b>67</b>	340	2.94 × 10 <sup>-3</sup>	3.38 × 10 <sup>-4</sup>	2.69	<b>14.79</b>	<b>15.23</b>	
<b>77</b>	350	2.86 × 10 <sup>-3</sup>	4.22 × 10 <sup>-4</sup>	3.36	<b>28.91</b>	<b>29.78</b>	

※1 32°C is  $k_1$ . The other temperatures are  $k_2$ .

※2 1.03L-H<sub>2</sub> L-culture<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> is actual rate (from Table 7.2).



Fig.2.1. A picture of screening. There is a hole 2mm in diameter on silicon plug. If bacteria produce gases, culture medium is detruded.

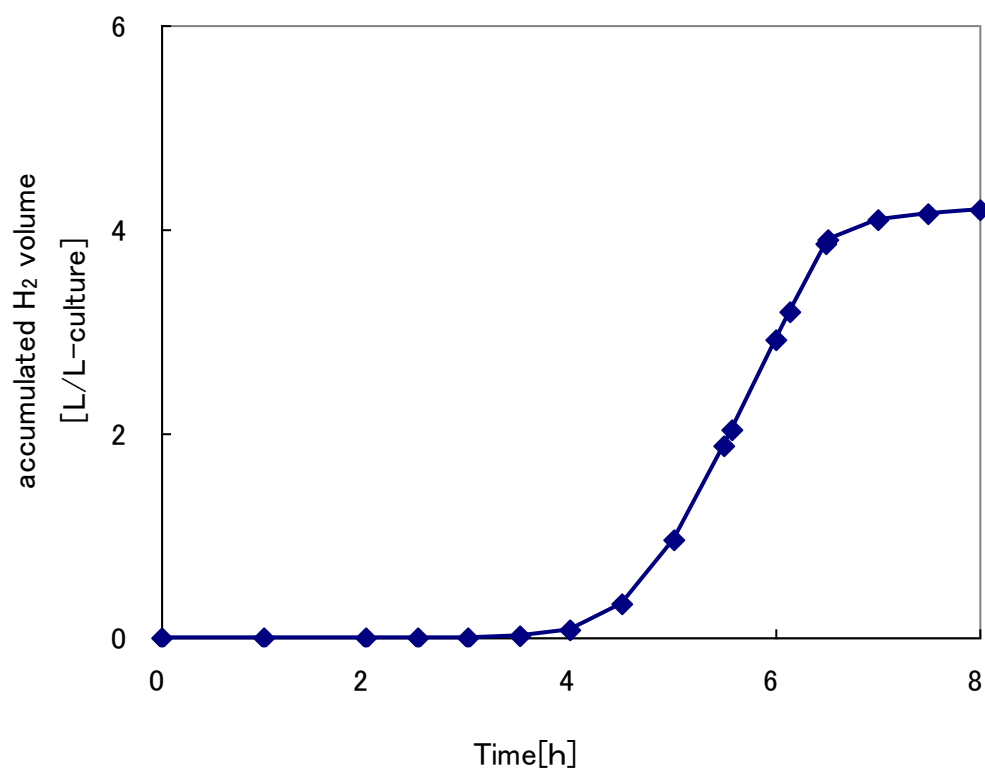


Fig3.1. Time variation of H<sub>2</sub> production

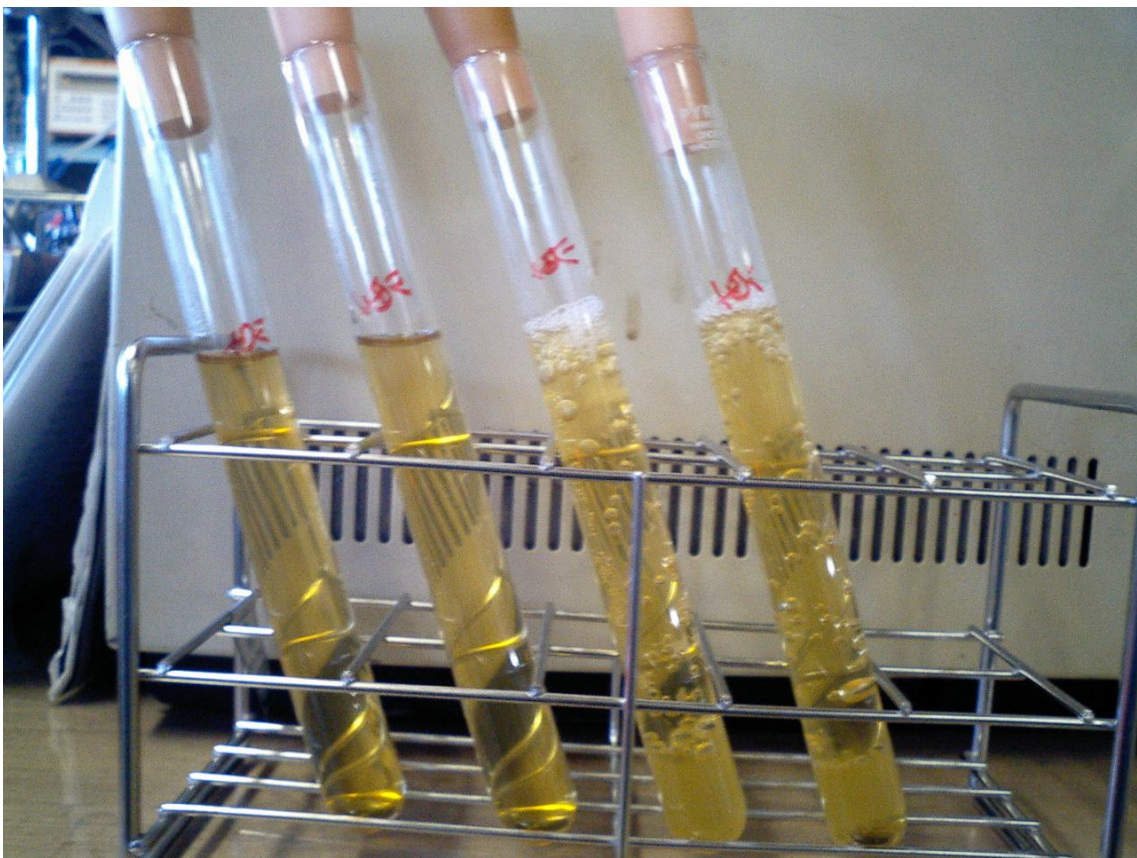


Fig4.1. Picture of the result of the isolation Left side two tubes didn't produce any gases. While right side two tubes produced gases actively.

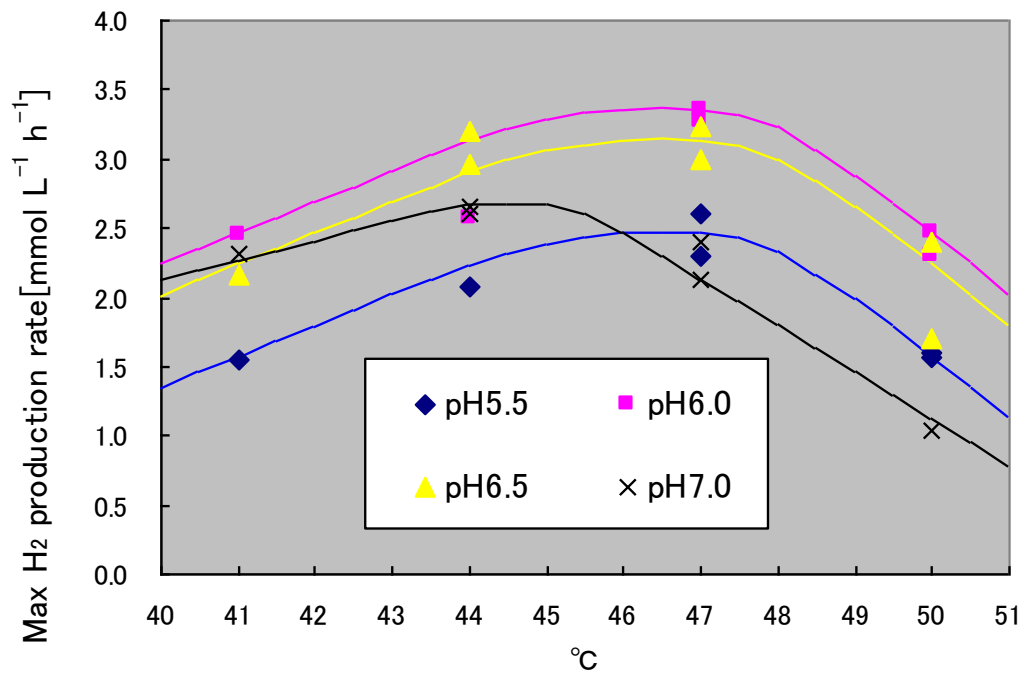


Fig5.1.(a). The effect of temperature on the maximum H<sub>2</sub> production rate.



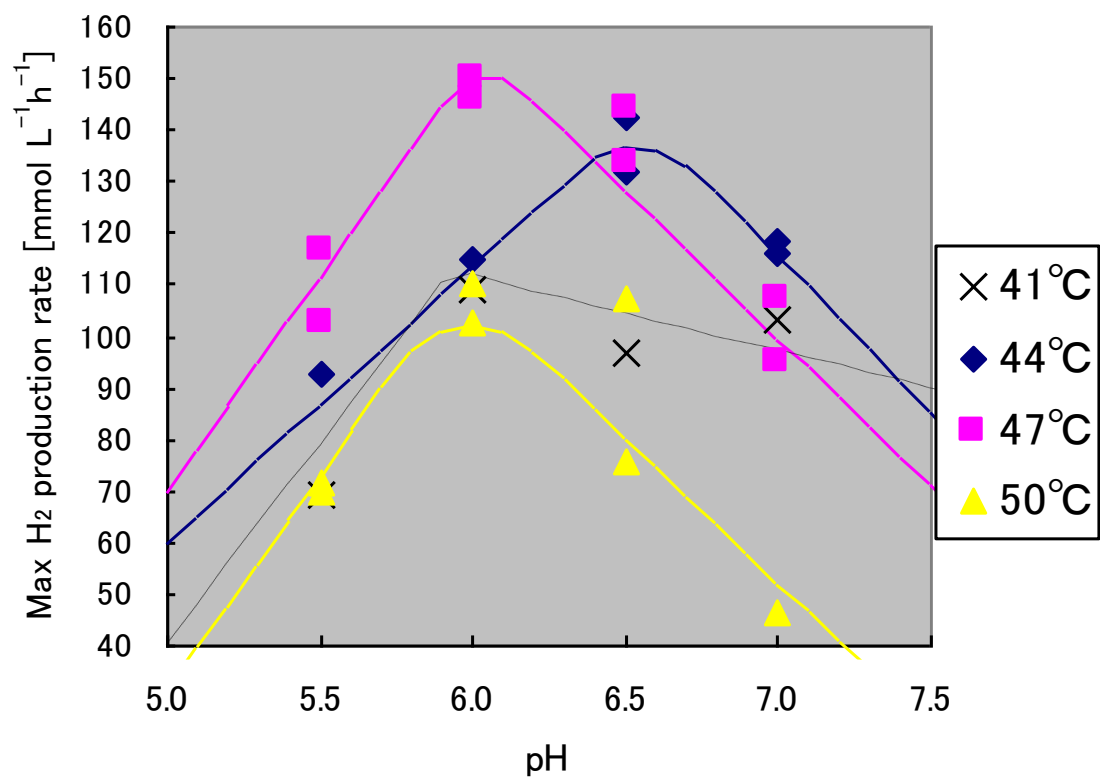


Fig5.1.(b). The effect of pH on the maximum H<sub>2</sub> production rate.

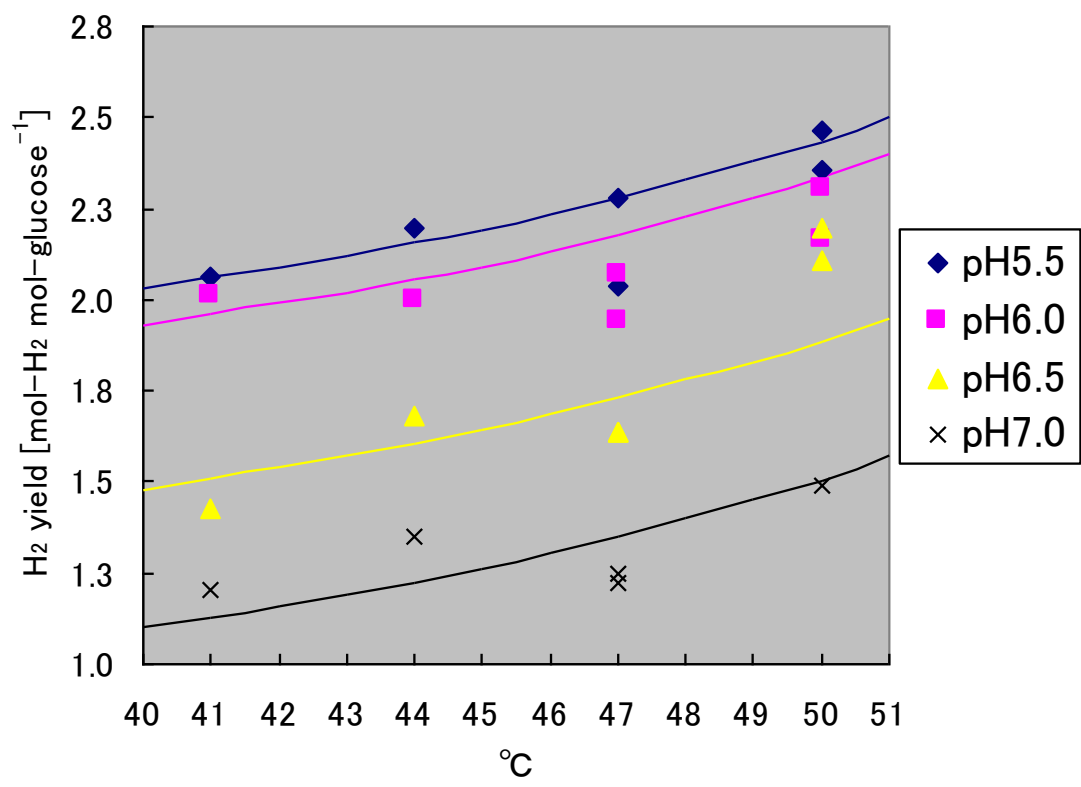


Fig5.2.(a). The effect of temperature on the H<sub>2</sub> yield.

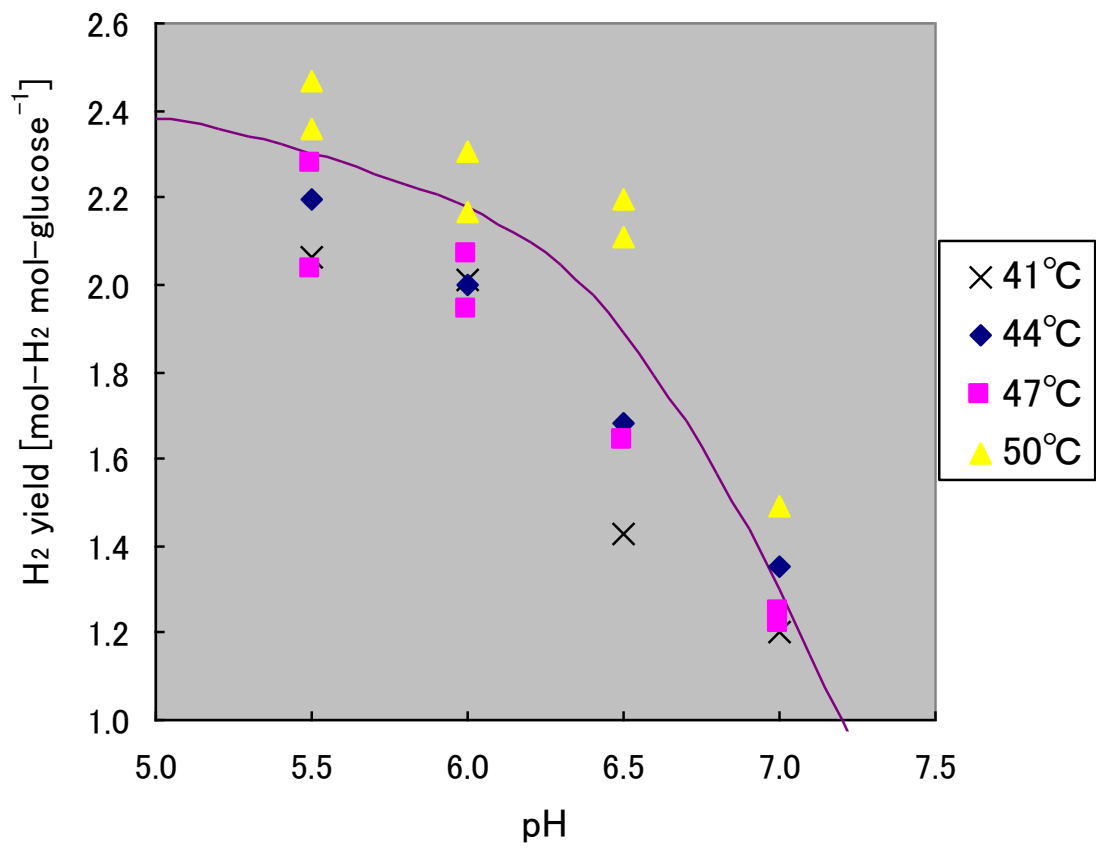
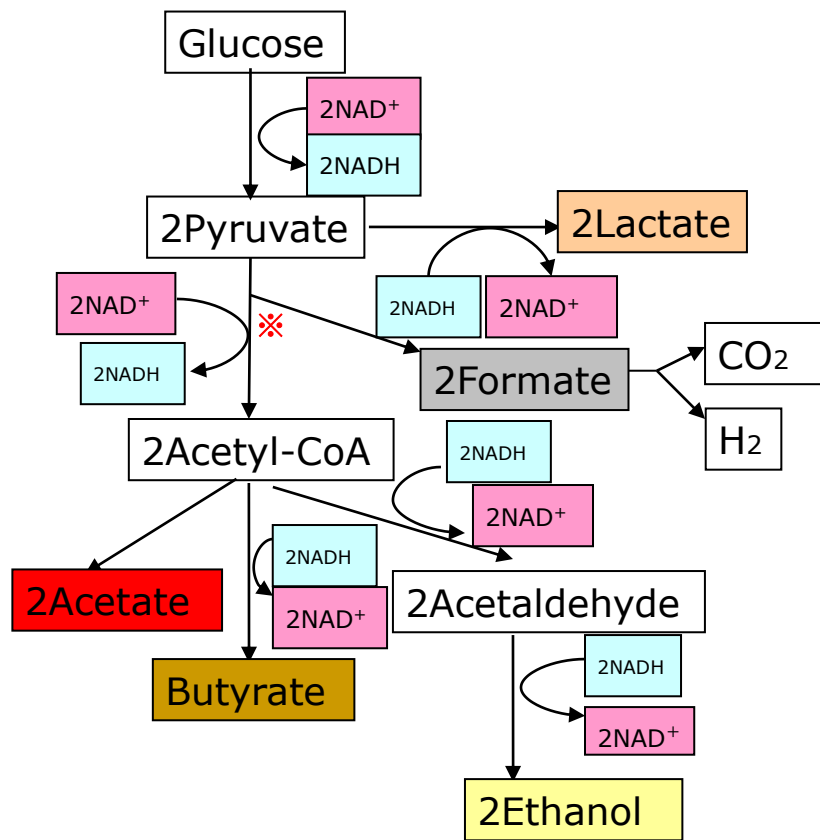
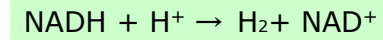


Fig.5.2.(b). The effect of pH on the H<sub>2</sub> yield.



### NADH pathway



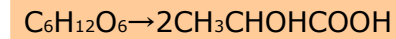
### Acetate



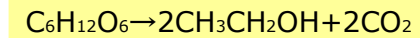
### Butyrate



### Lactate



### Ethanol



### Formate

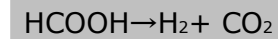


Fig5.3. Metabolic pathway connecting H<sub>2</sub> production.

✖ When pyruvate is changed into Acetyl-CoA, either NADH or formate is produced actually.

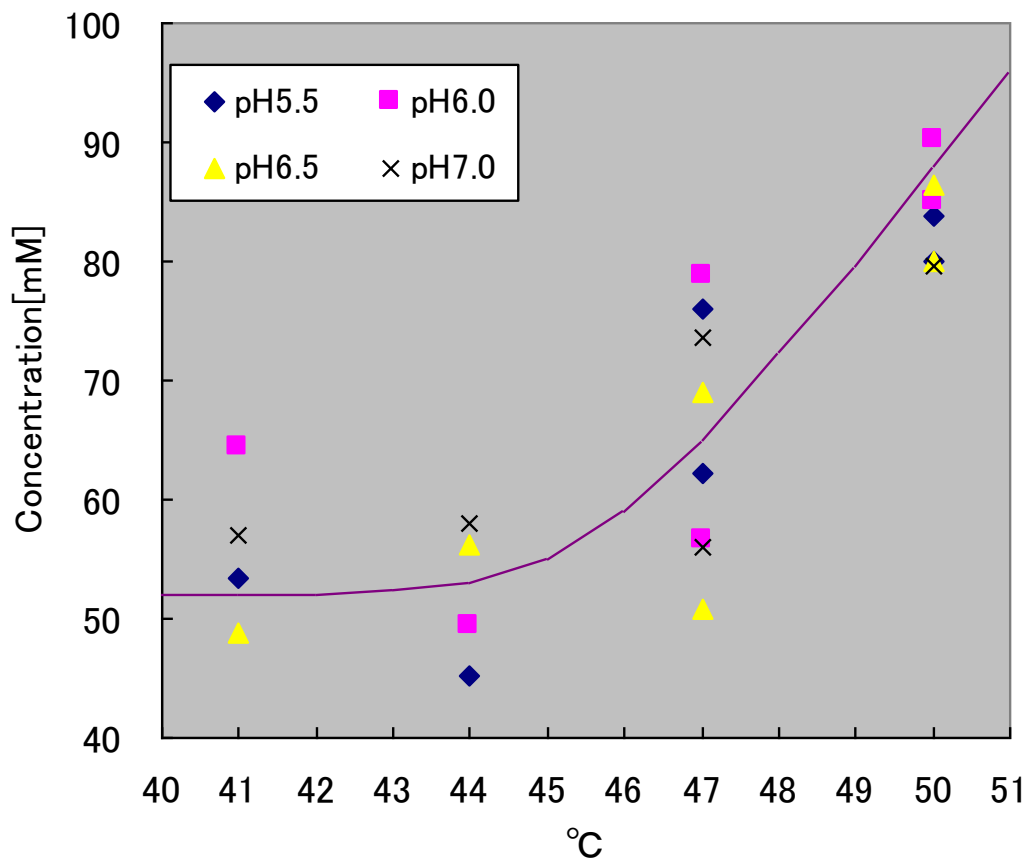


Fig.5.4.(a). The effect of temperature on acetate production.

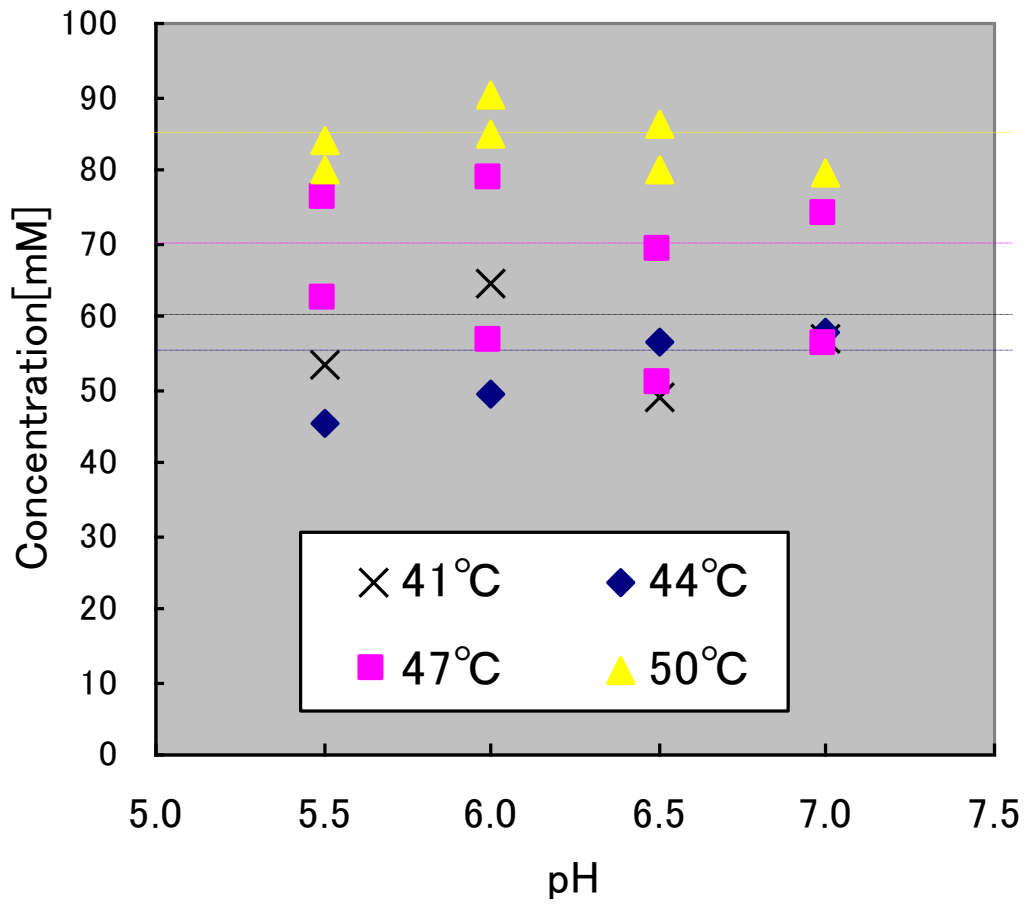


Fig.5.4.(b). The effect of pH on acetate production.

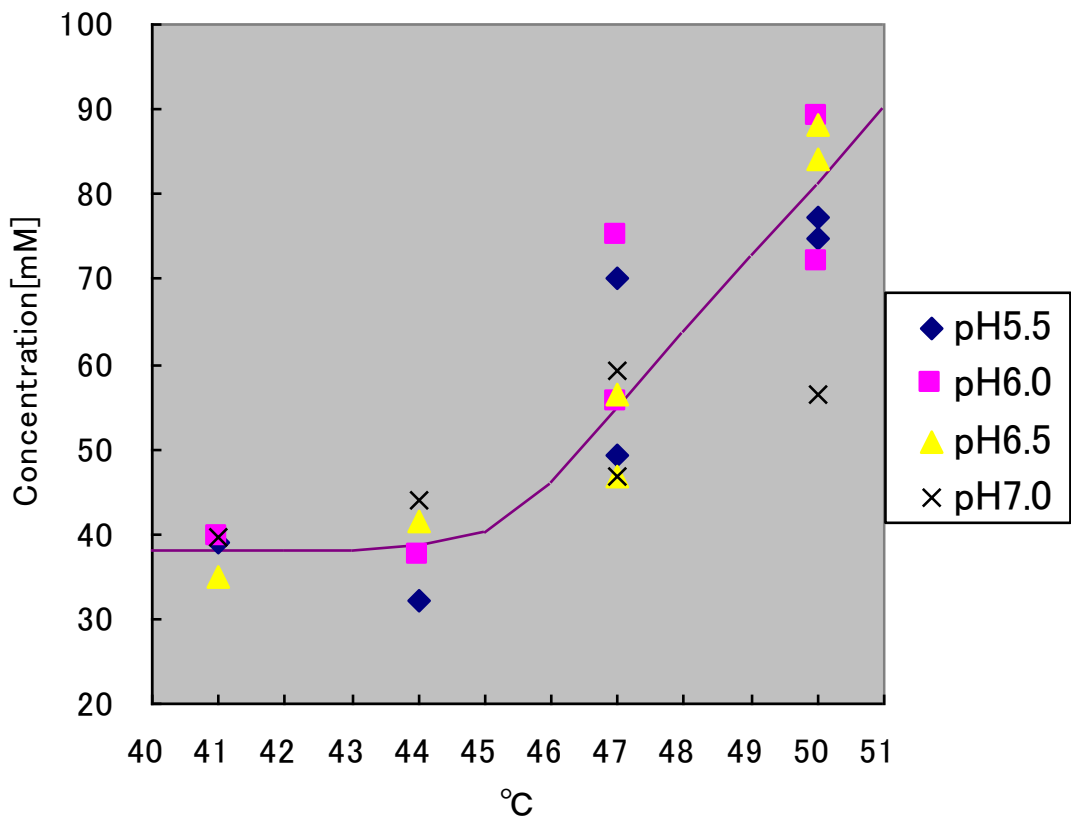


Fig5.5.(a). The effect of temperature on ethanol production.

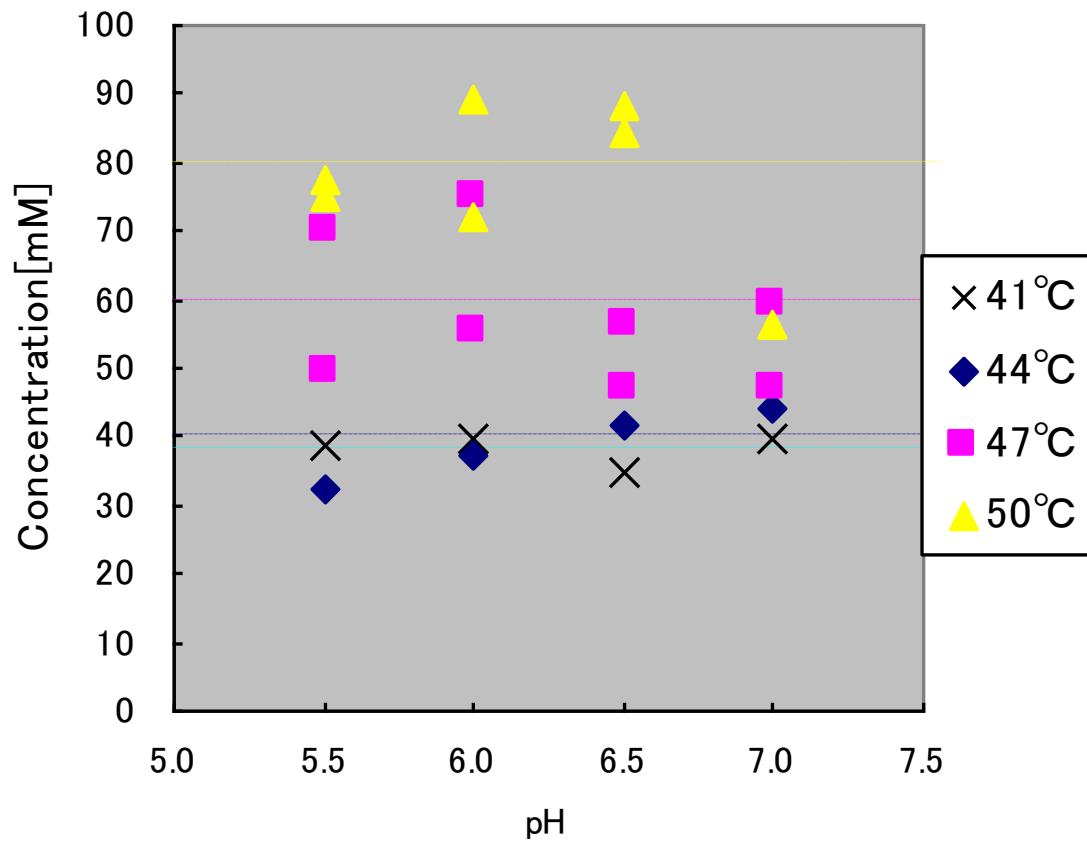


Fig.5.5.(b). The effect of pH on ethanol production.



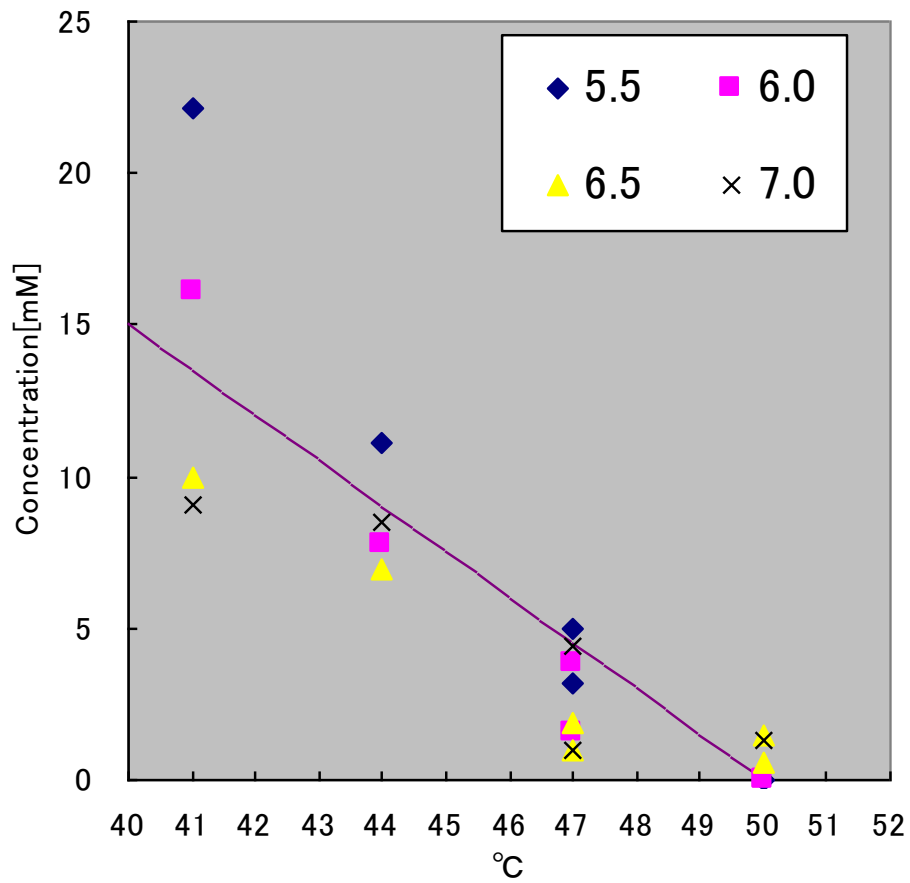


Fig5.6.(a). The effect of temperature on butyrate production.

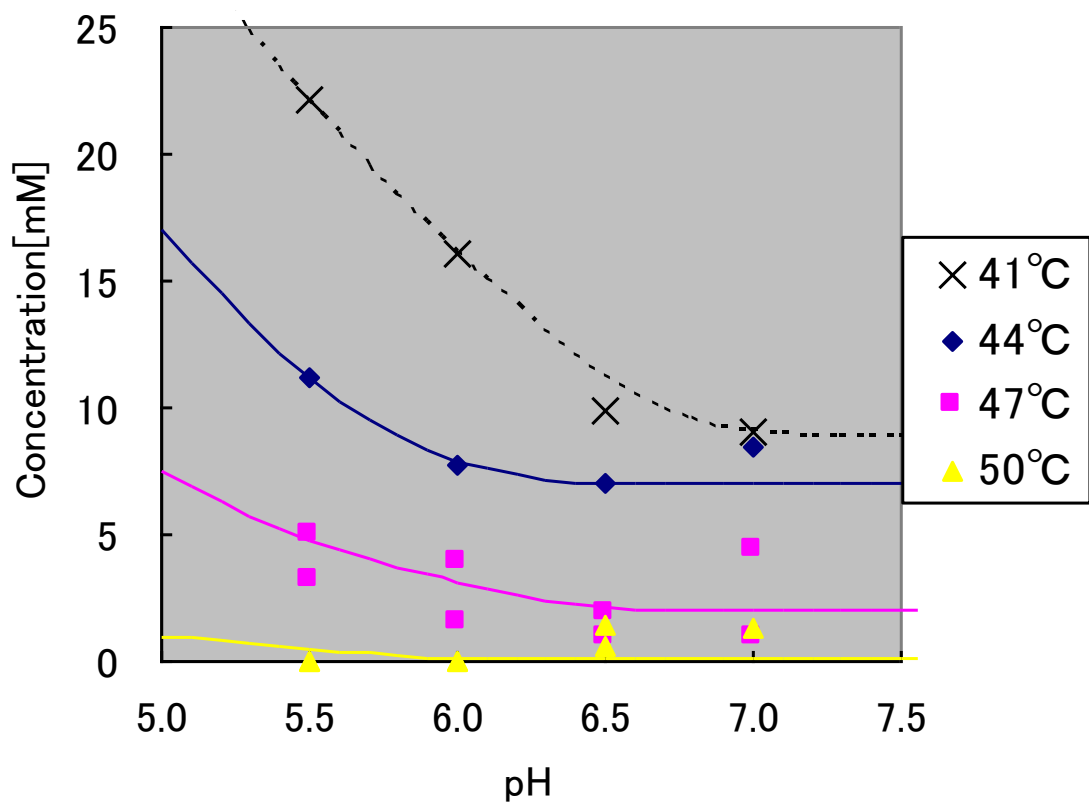


Fig5.6.(b). The effect of pH on butyrate production.

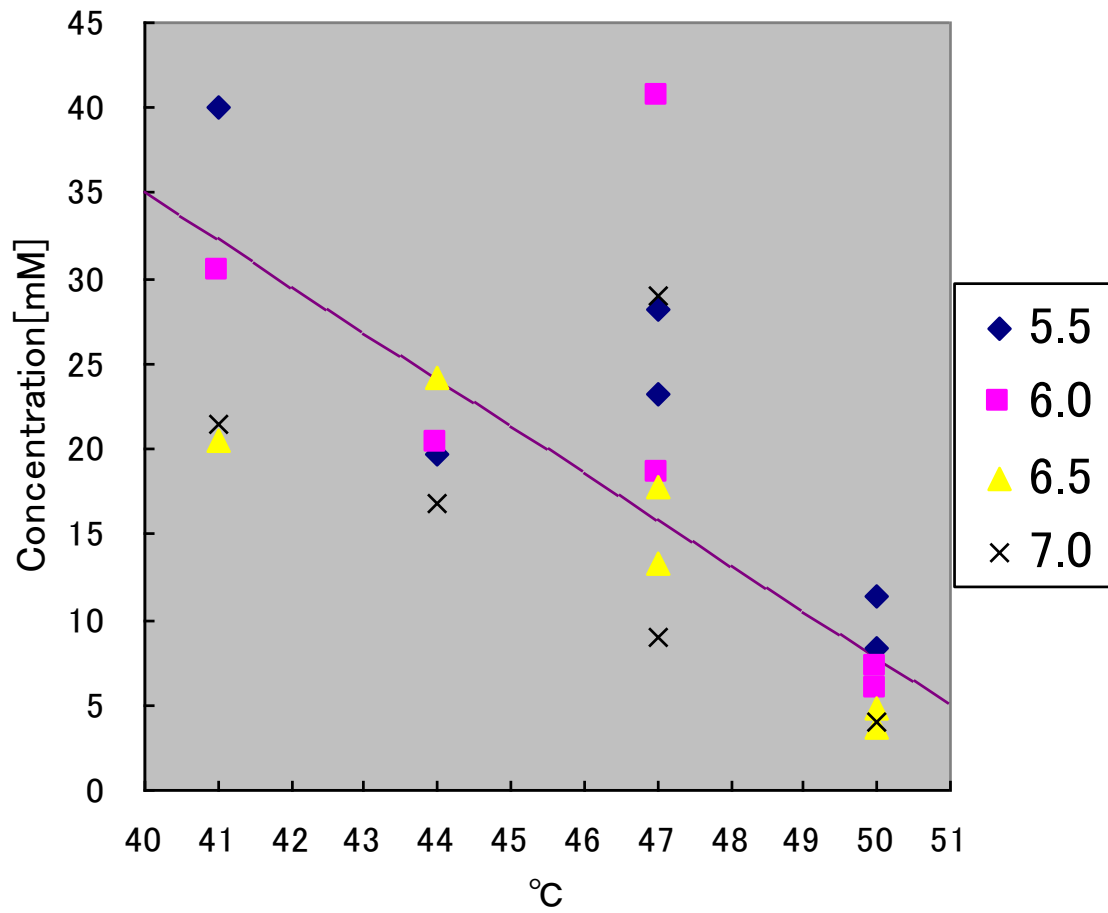


Fig.5.7.(a). The effect of temperature on lactate production.

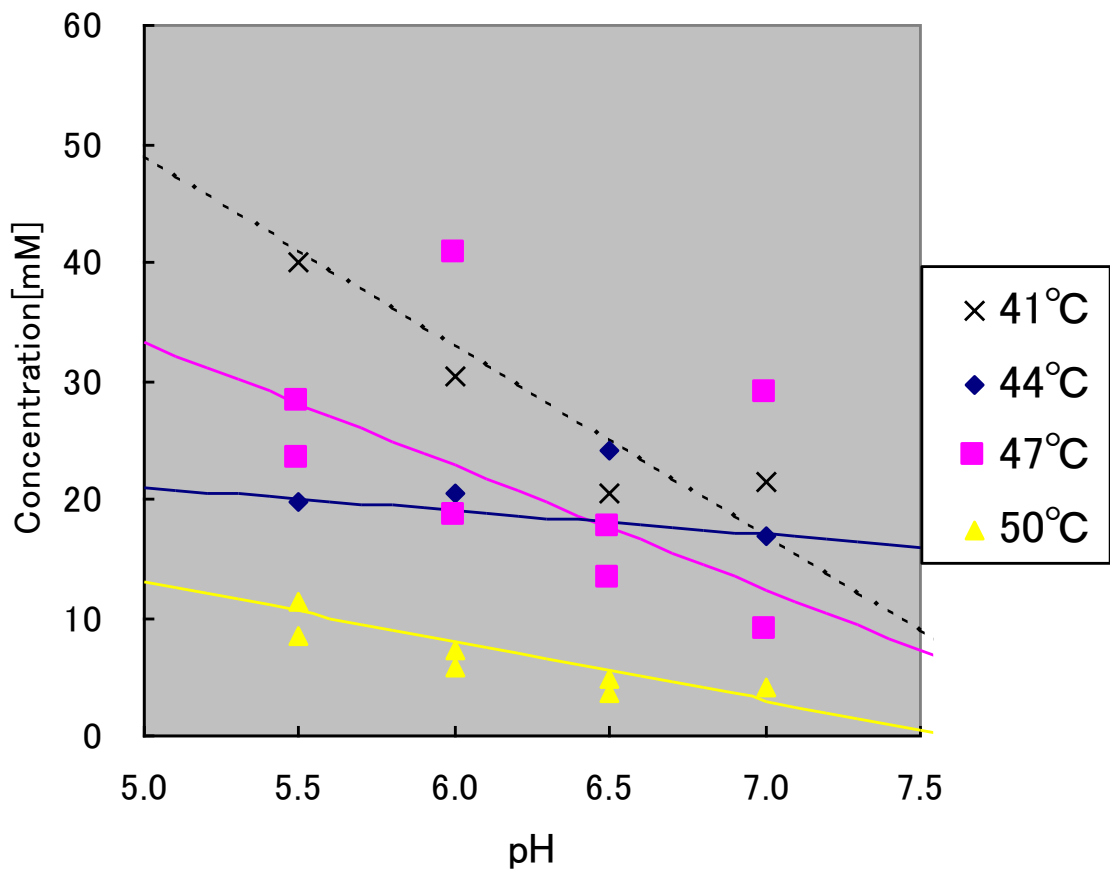


Fig.5.7.(b). The effect of temperature on lactate production.

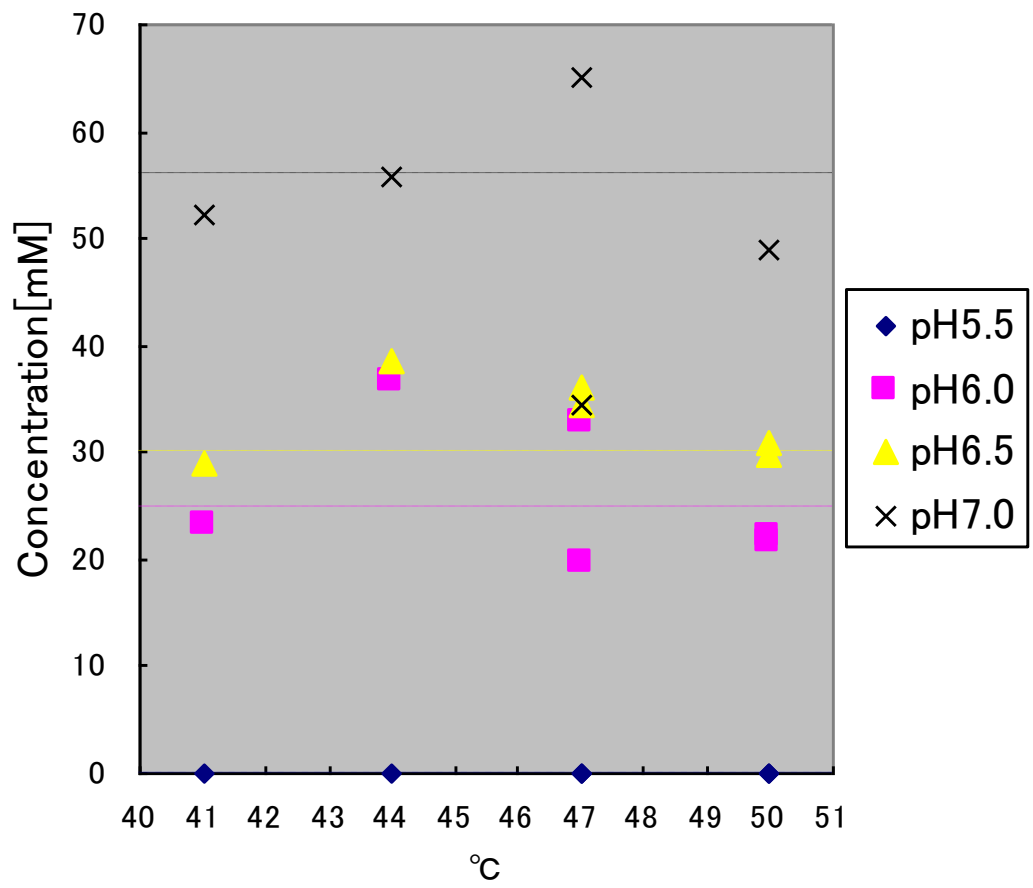


Fig5.8.(a). The effect of temperature on formate concentration.

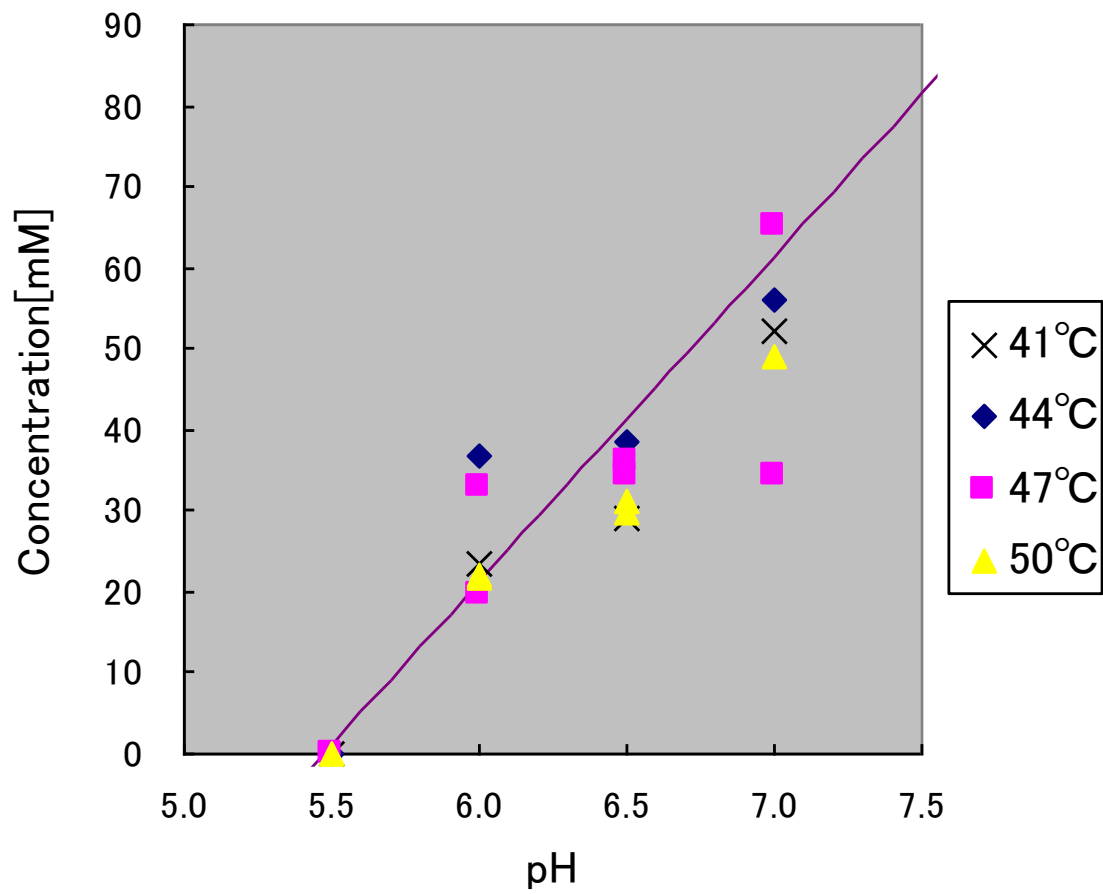


Fig5.8.(b). The effect of pH on formate production.

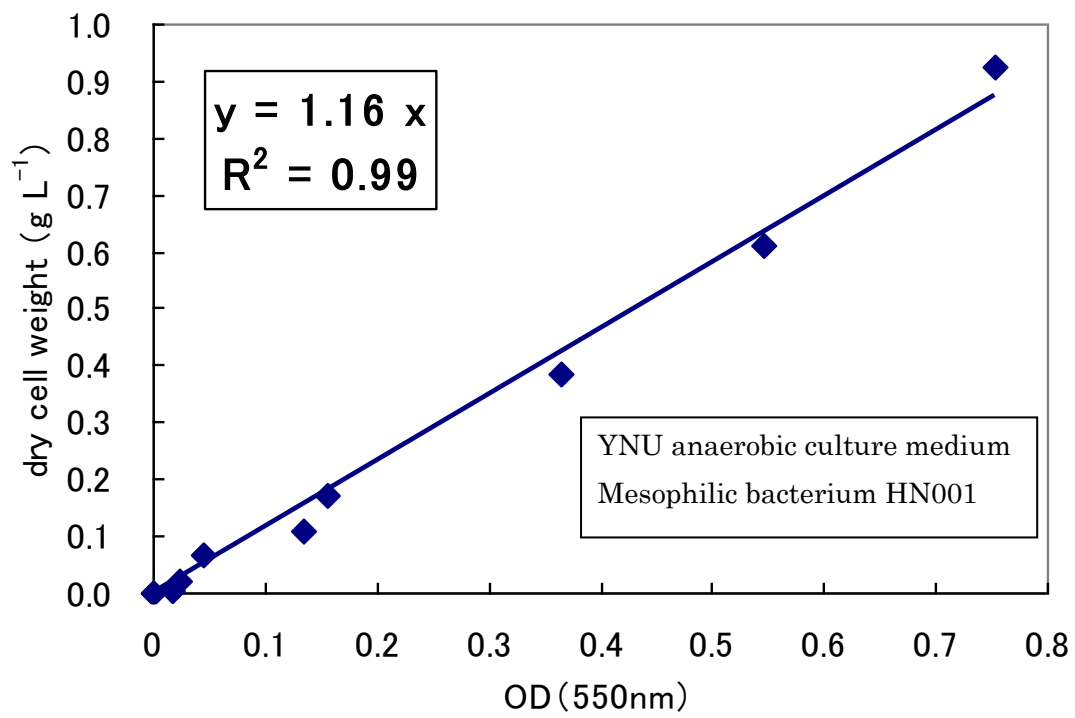


Fig6.1. The relation between OD and dry cell weight.

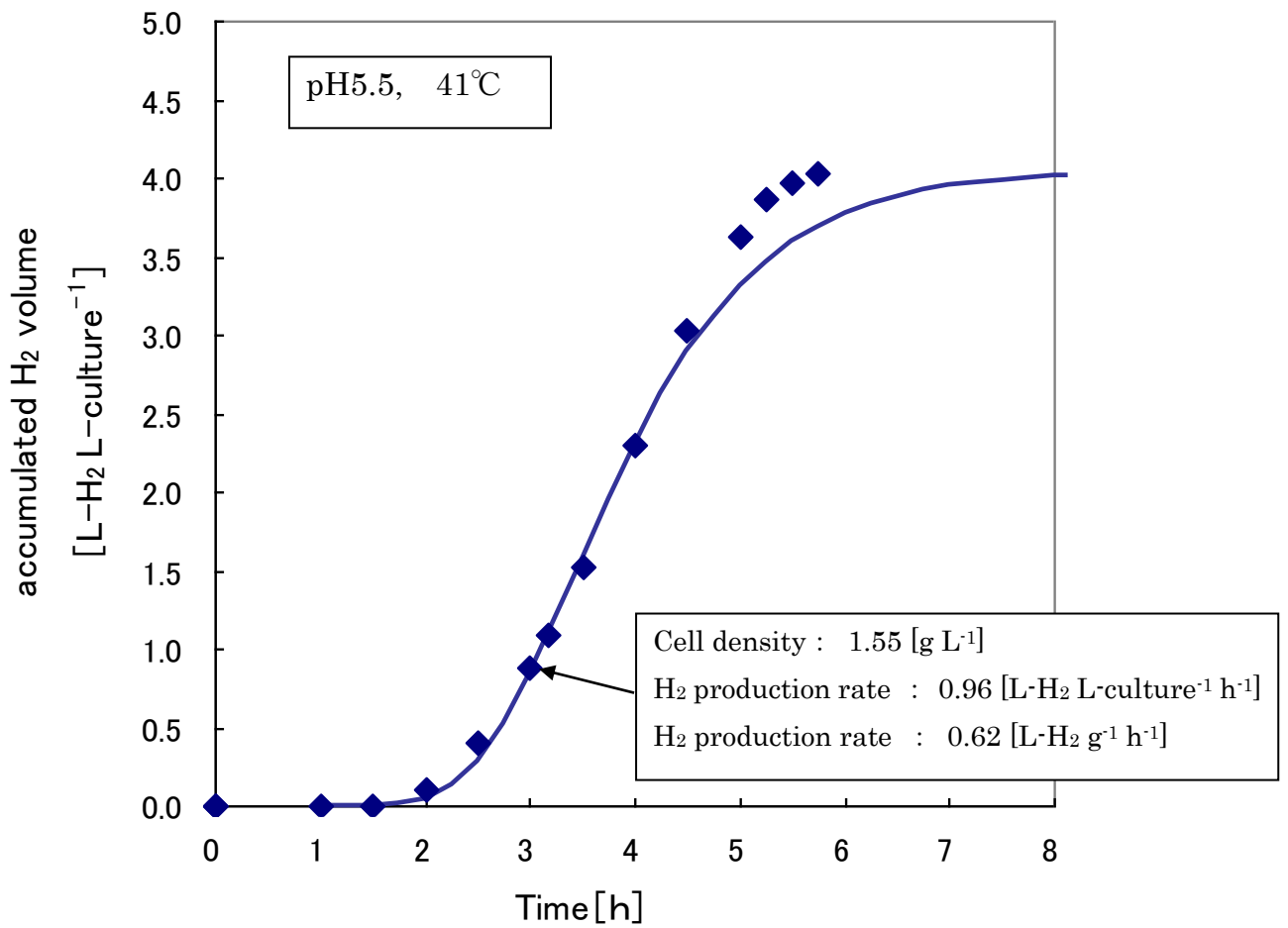


Fig6.2.a. Time variation of H<sub>2</sub> production and H<sub>2</sub> production rate per dry cell weight.



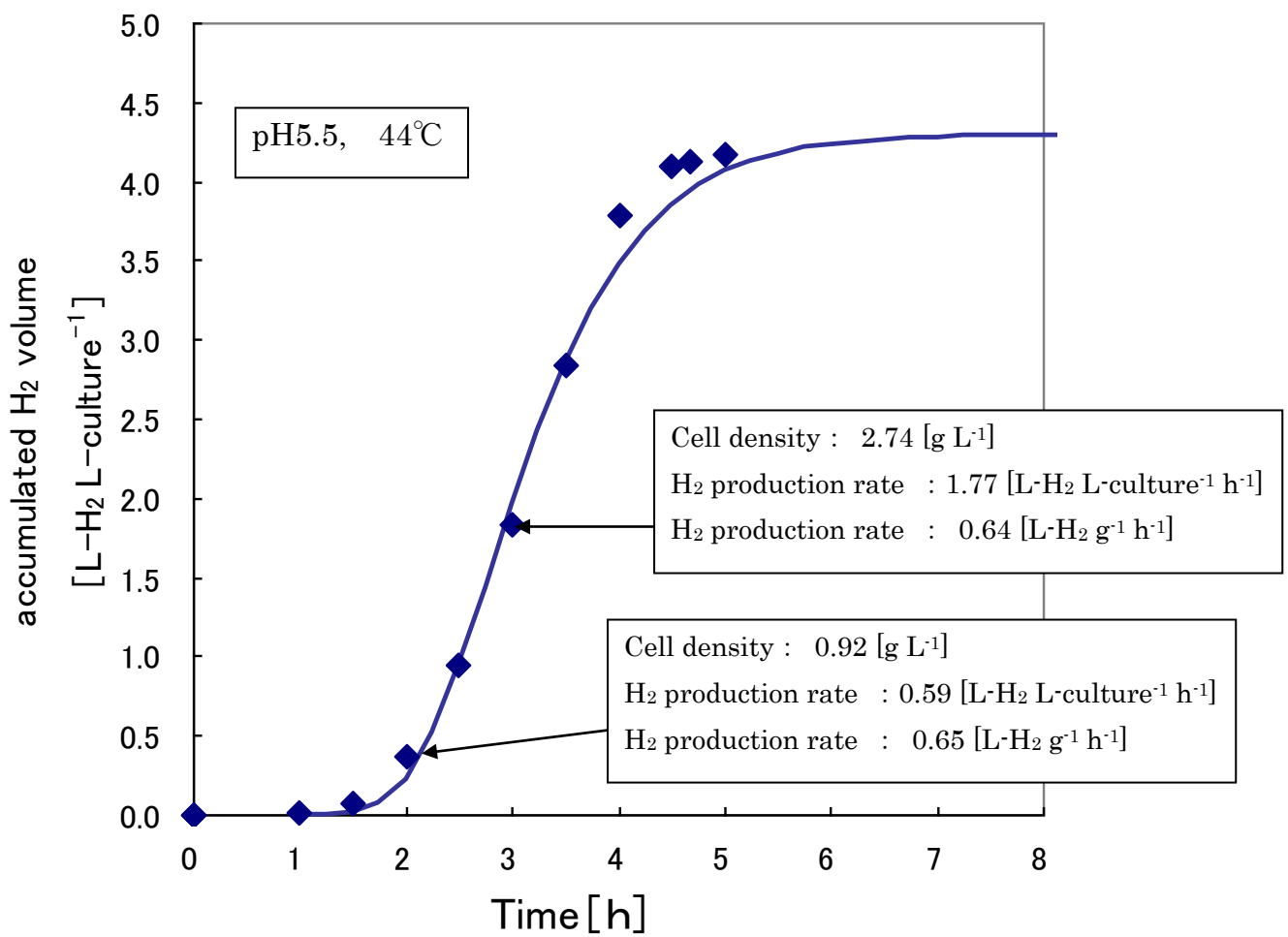


Fig6.2.b. Time variation of H<sub>2</sub> production and H<sub>2</sub> production rate per dry cell weight.

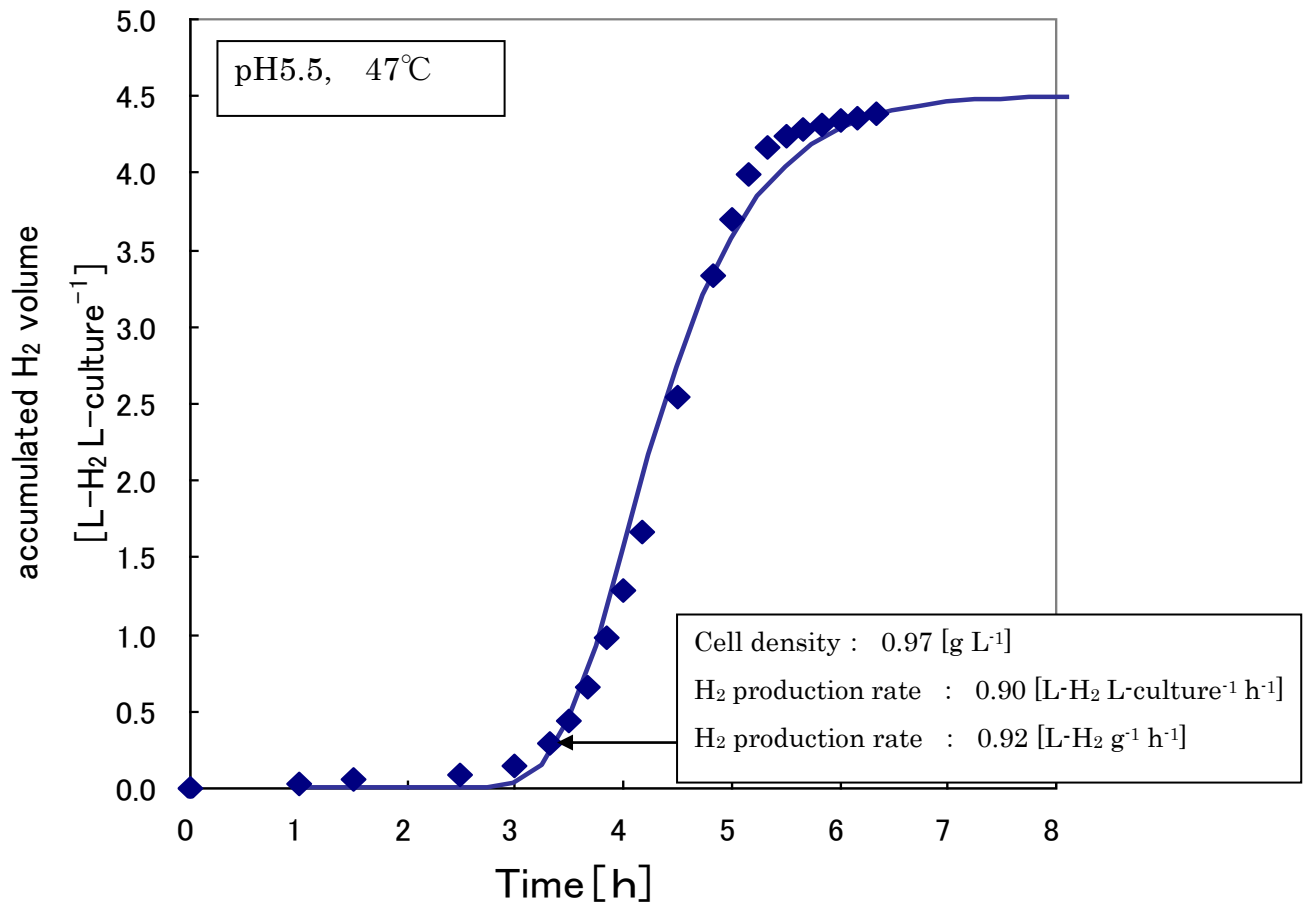


Fig6.2.c. Time variation of H<sub>2</sub> production and H<sub>2</sub> production rate per dry cell weight.

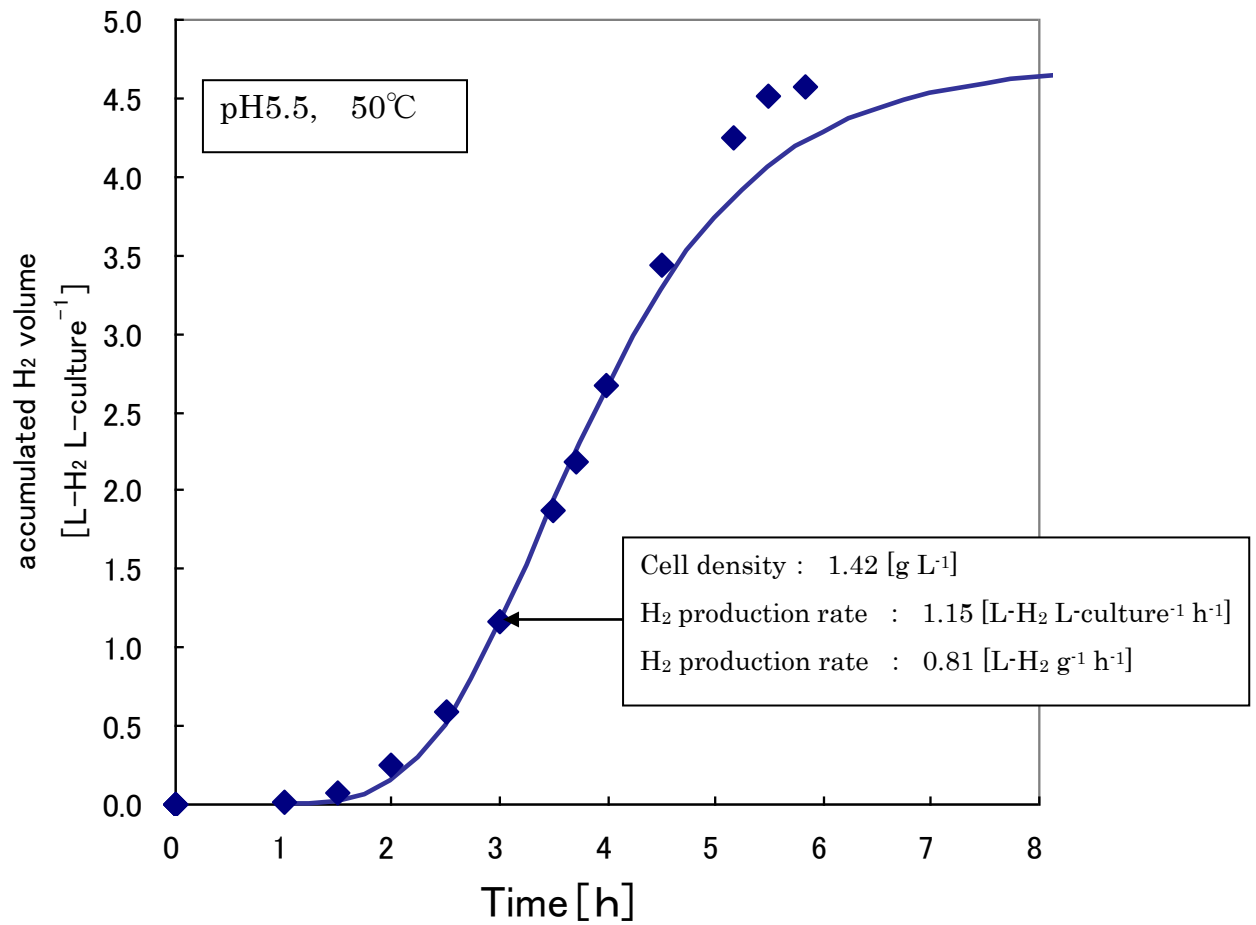


Fig6.2.d. Time variation of H<sub>2</sub> production and H<sub>2</sub> production rate per dry cell weight.

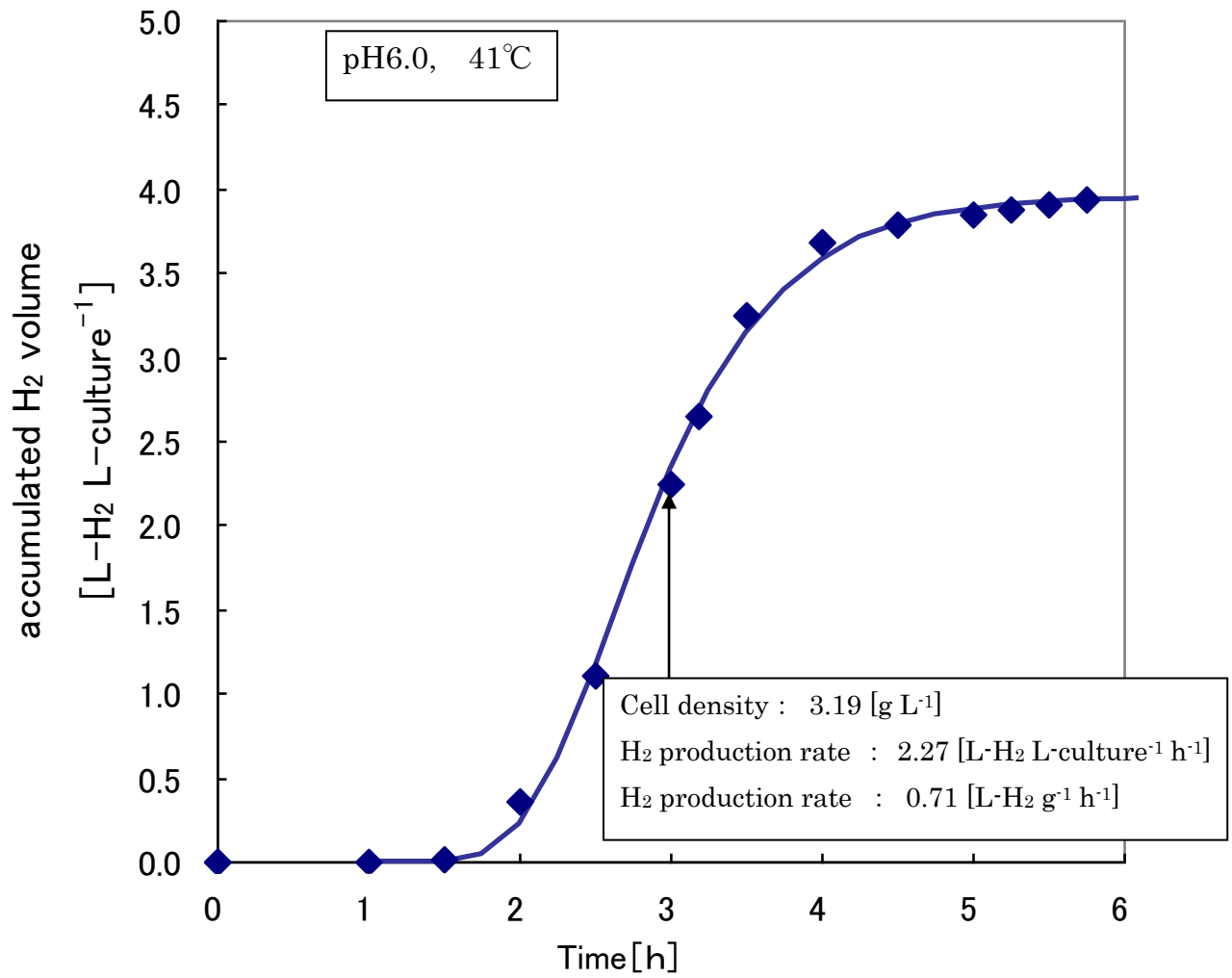


Fig.6.2.e. Time variation of H<sub>2</sub> production and H<sub>2</sub> production rate per dry cell weight.

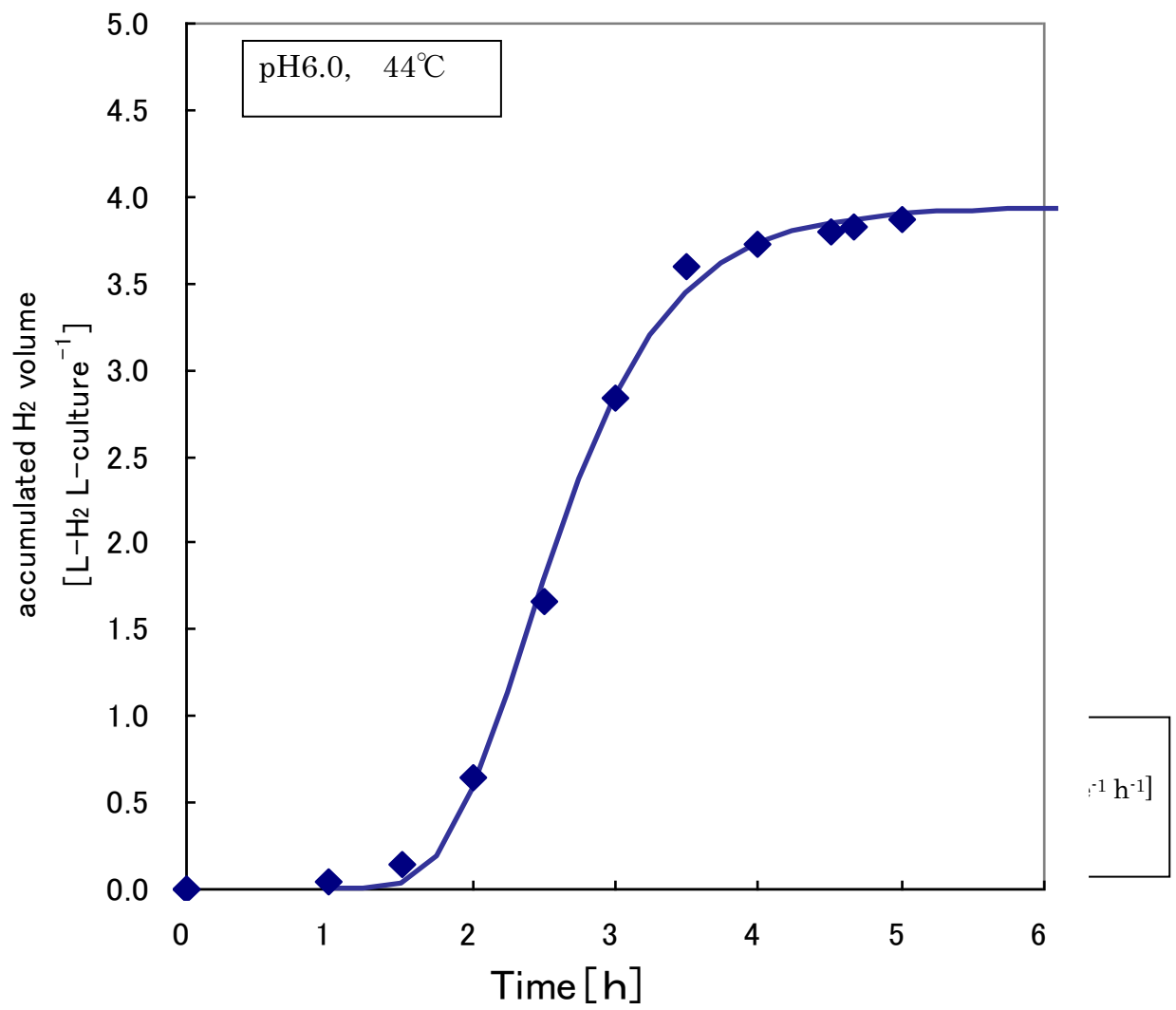


Fig.6.2.f. Time variation of H<sub>2</sub> production and H<sub>2</sub> production rate per dry cell weight.

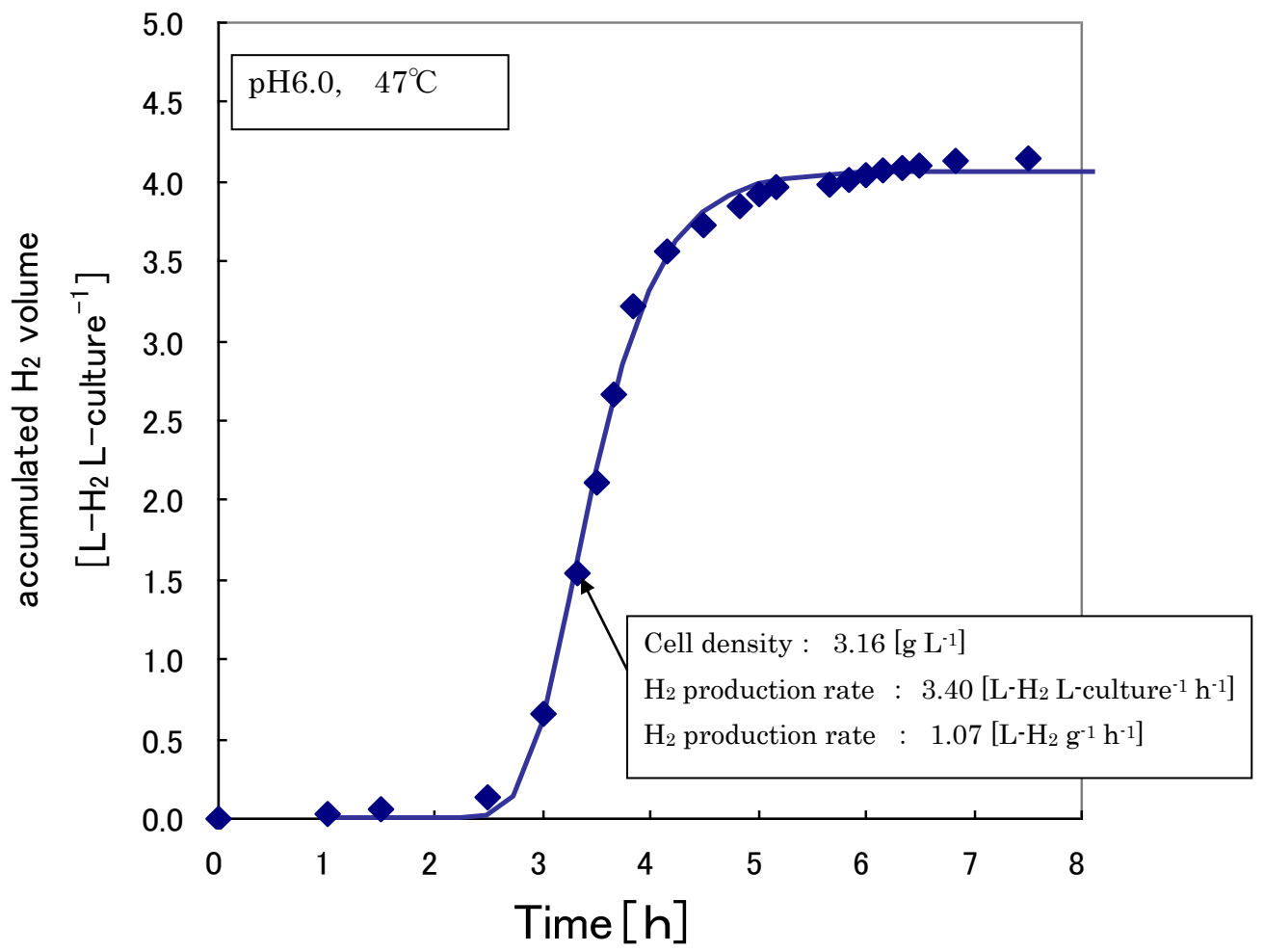


Fig.6.2.g. Time variation of H<sub>2</sub> production and H<sub>2</sub> production rate per dry cell weight.

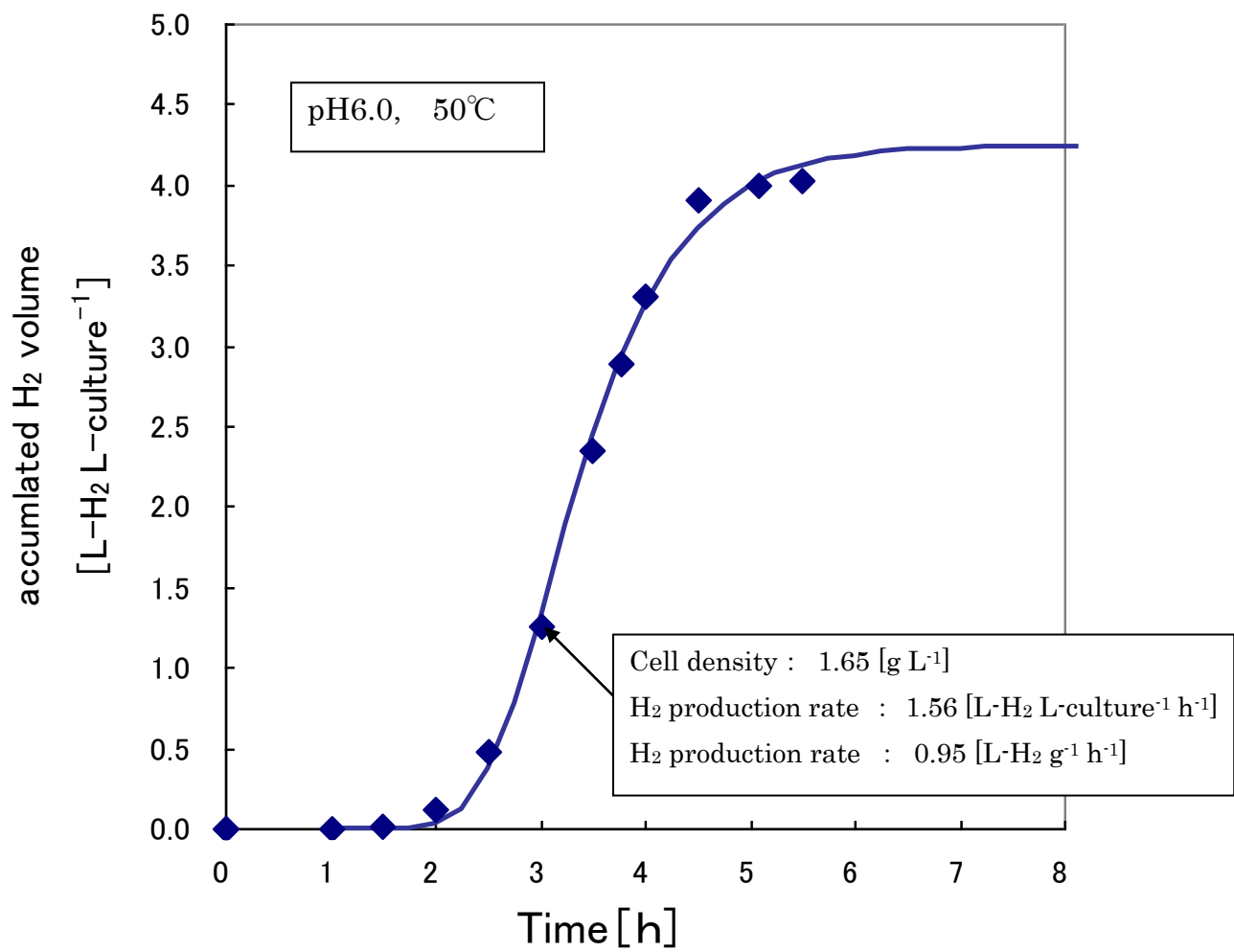


Fig.6.2.h. Time variation of H<sub>2</sub> production and H<sub>2</sub> production rate per dry cell weight.

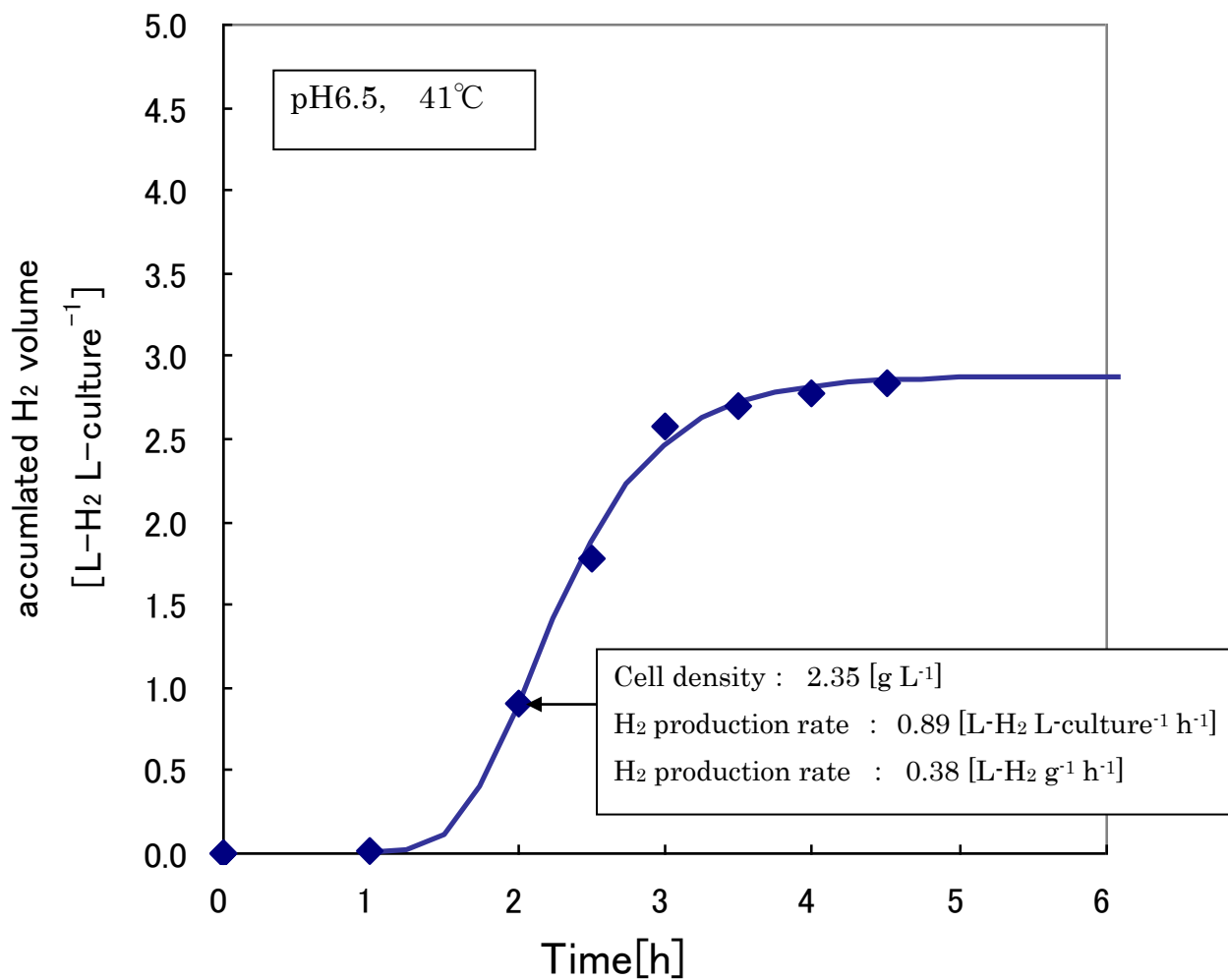


Fig.6.2.i. Time variation of H<sub>2</sub> production and H<sub>2</sub> production rate per dry cell weight.



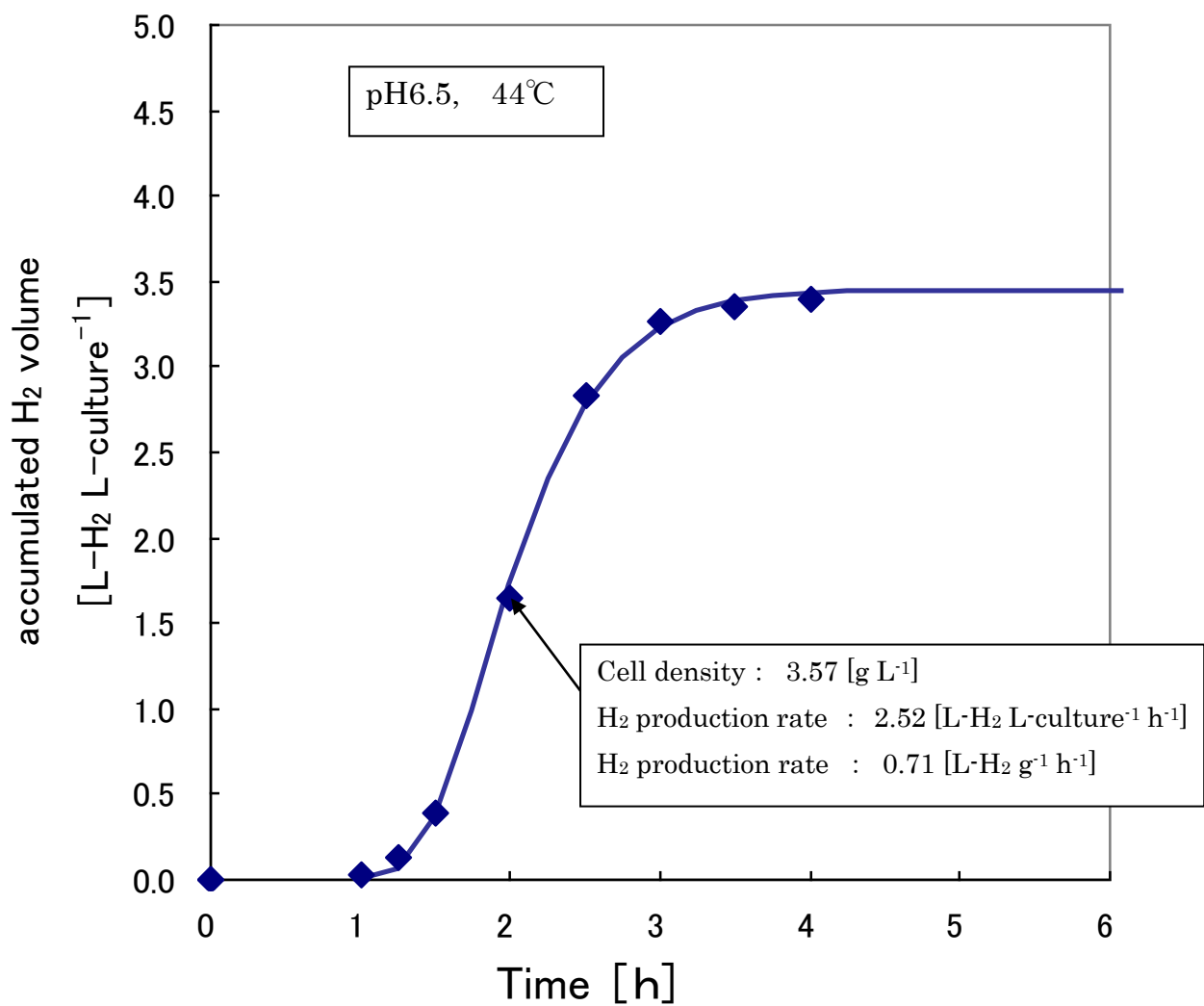


Fig.6.2.j. Time variation of H<sub>2</sub> production and H<sub>2</sub> production rate per dry cell weight.

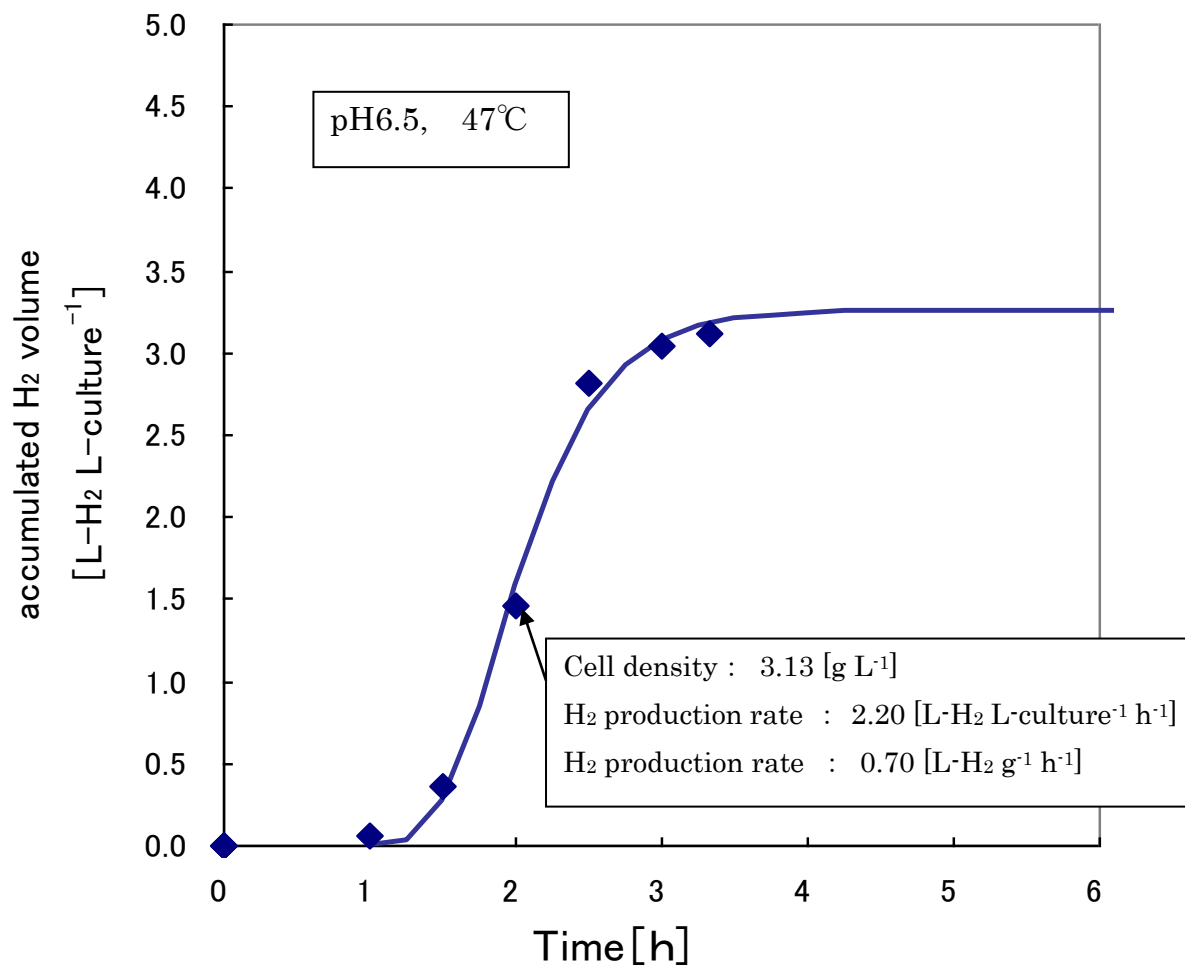


Fig.6.2.k. Time variation of H<sub>2</sub> production and H<sub>2</sub> production rate per dry cell weight.

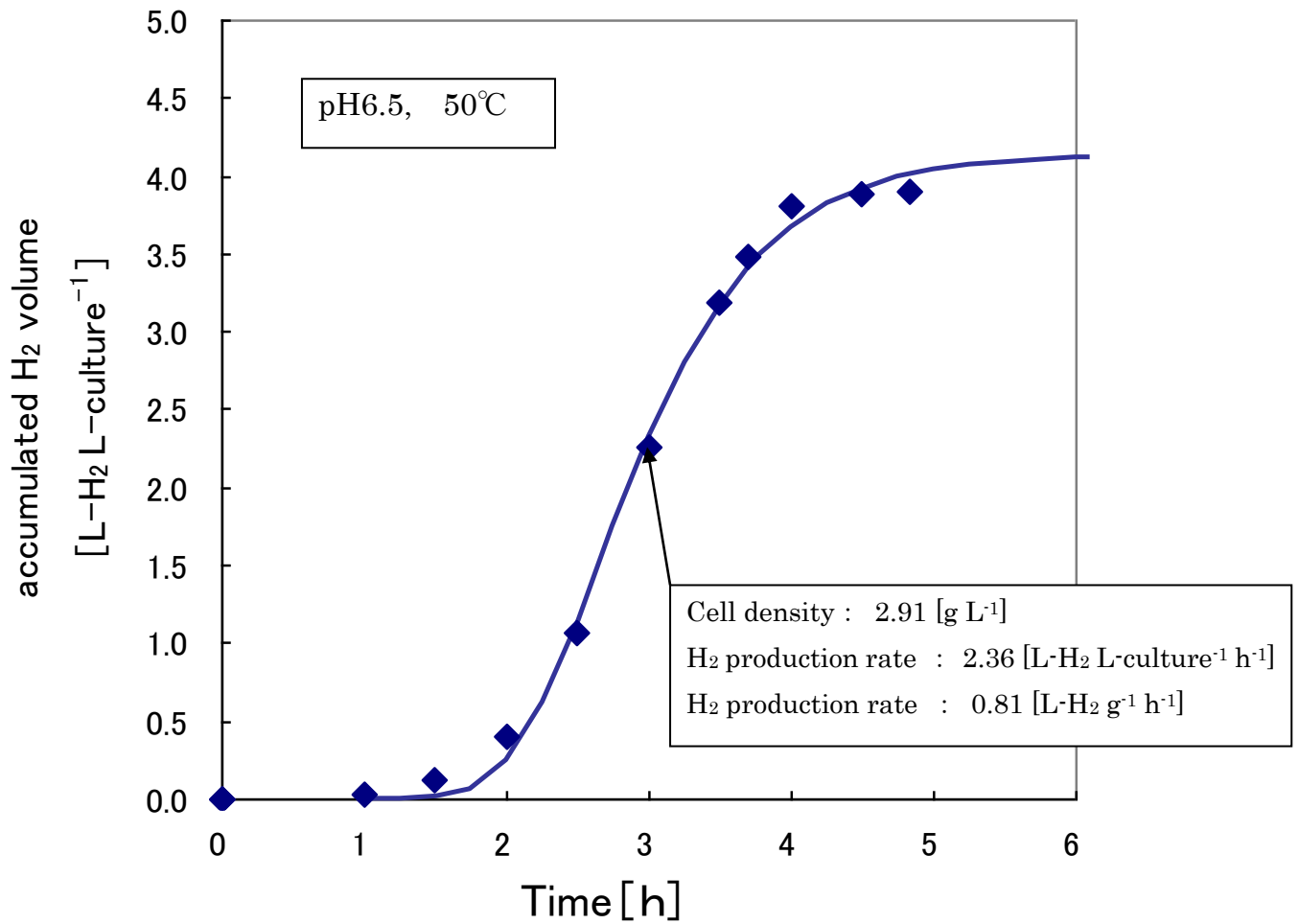


Fig.6.2.1. Time variation of H<sub>2</sub> production and H<sub>2</sub> production rate per dry cell weight.

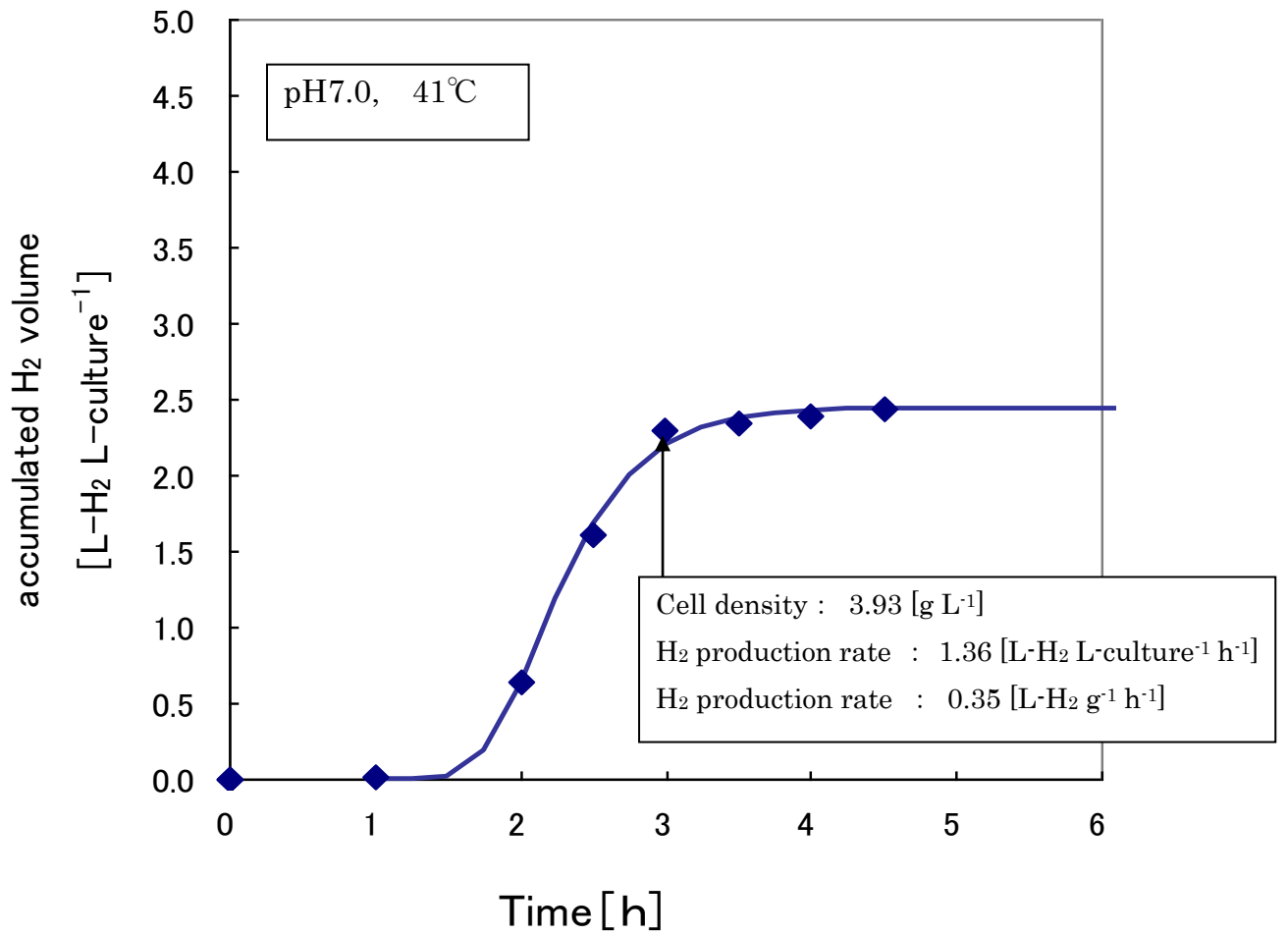


Fig.6.2.m. Time variation of H<sub>2</sub> production and H<sub>2</sub> production rate per dry cell weight.

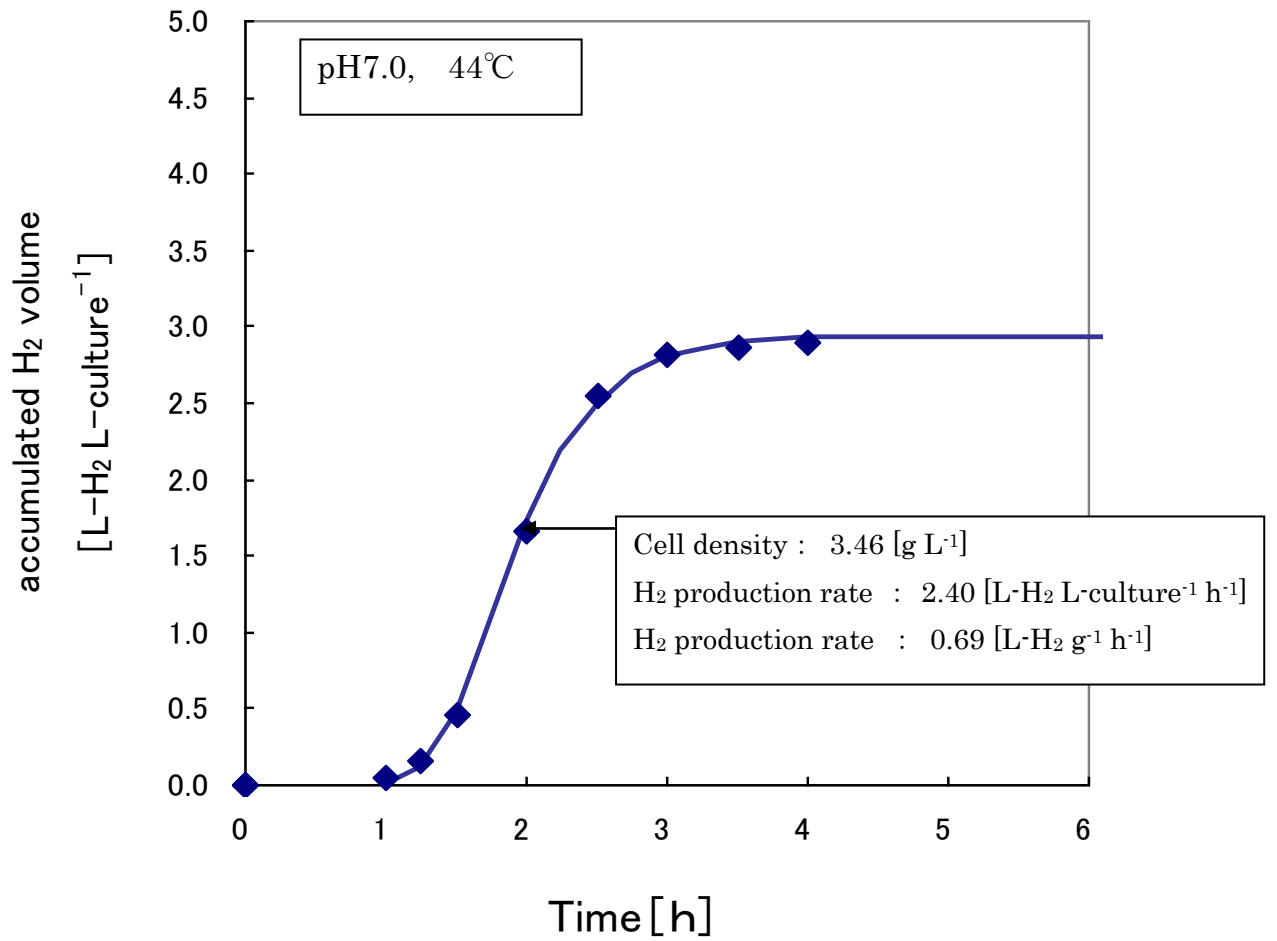


Fig.6.2.n. Time variation of H<sub>2</sub> production and H<sub>2</sub> production rate per dry cell weight.

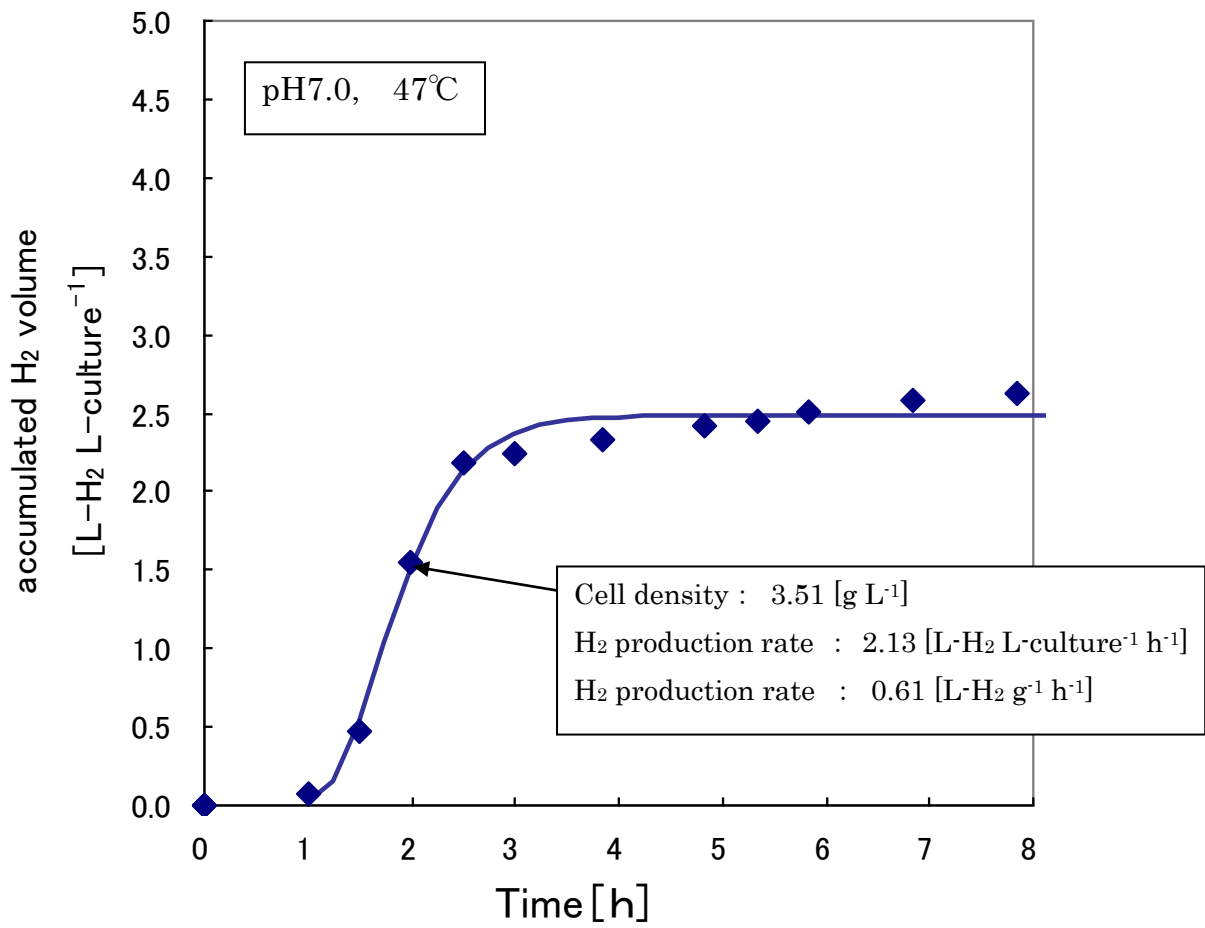


Fig.6.2.o. Time variation of H<sub>2</sub> production and H<sub>2</sub> production rate per dry cell weight.

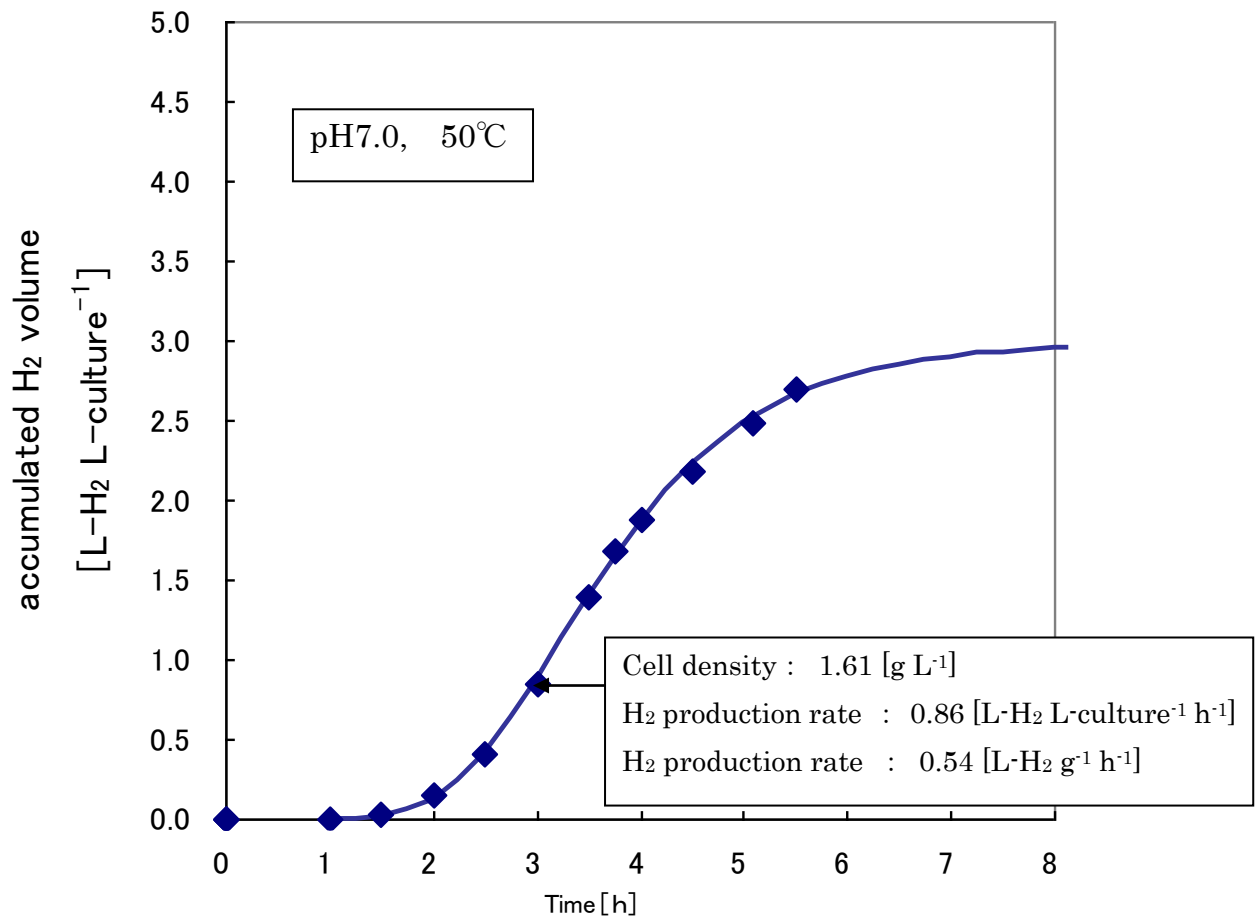


Fig.6.2.p. Time variation of H<sub>2</sub> production and H<sub>2</sub> production rate per dry cell weight.

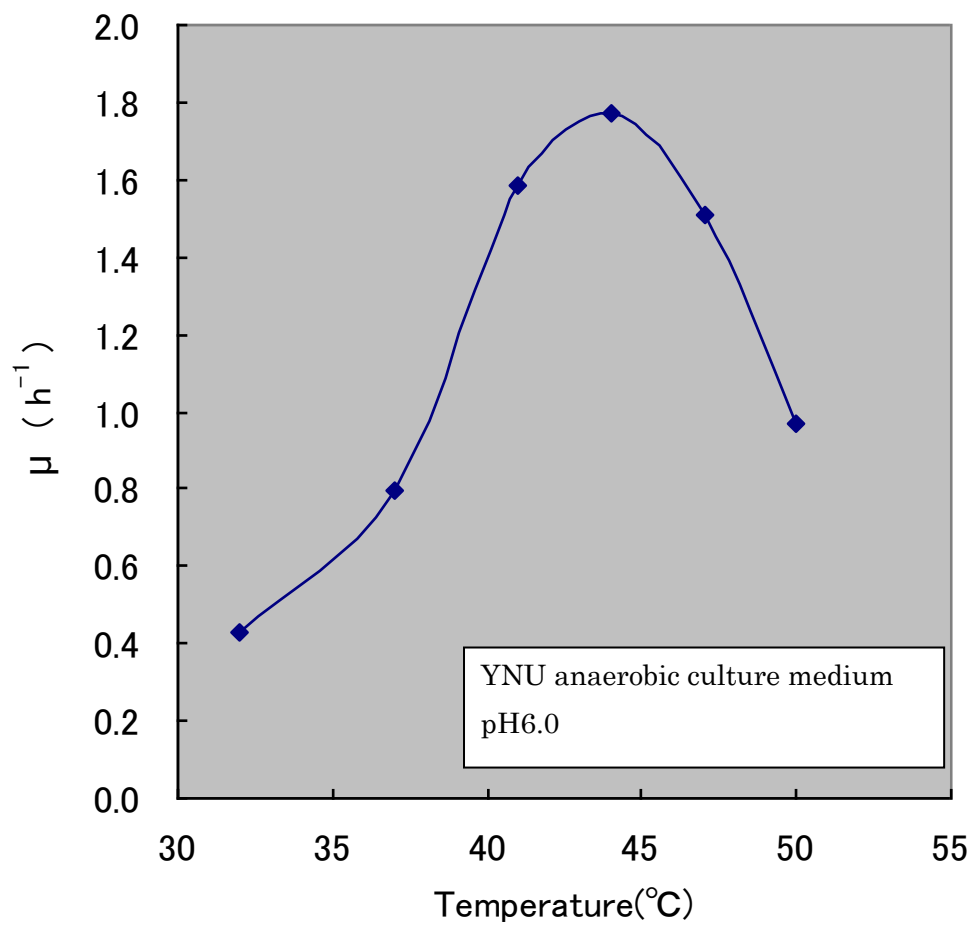


Fig.7.1. Growth rate of Mesophilic bacterium HN001 at various temperature.



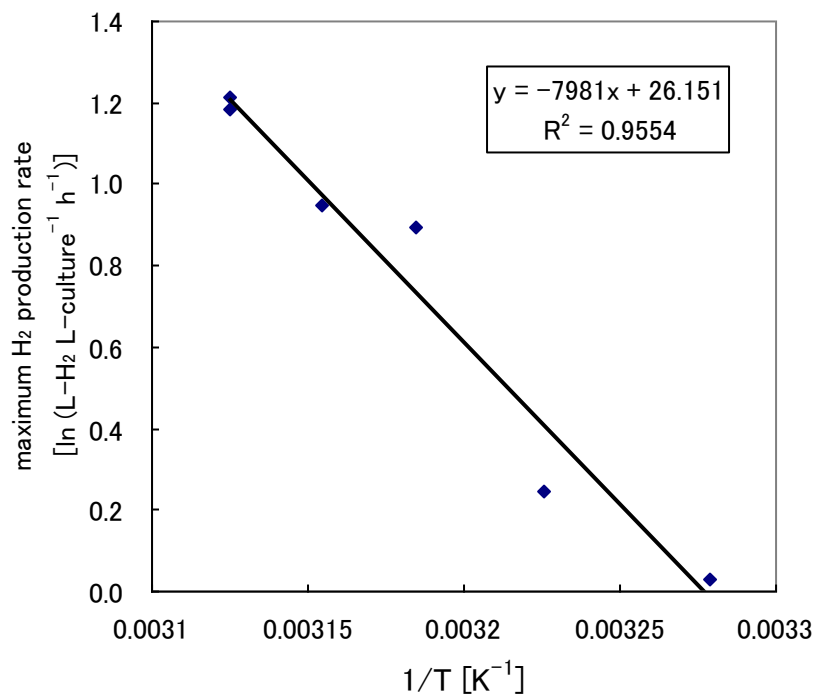


Fig.7.2. The Arrhenius plot to determine the energy of activation of H<sub>2</sub> production.

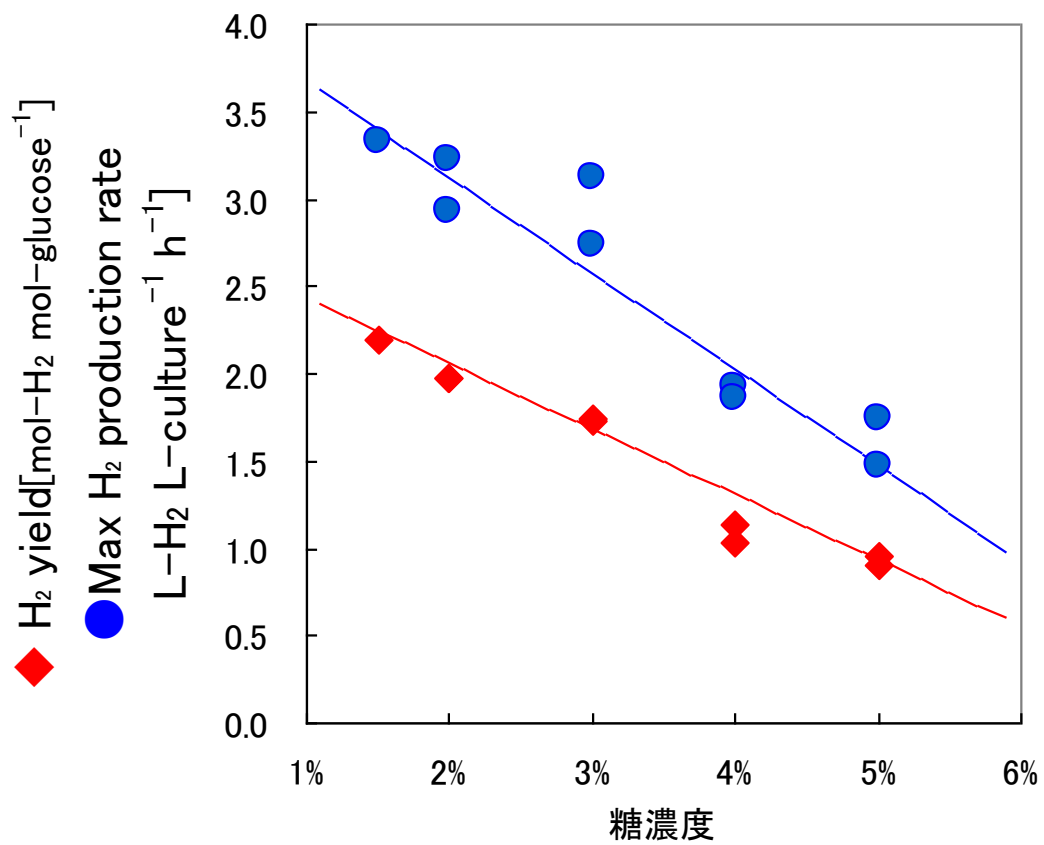


Fig.8.1. The effect of glucose concentration on  $\text{H}_2$  yield and the maximum  $\text{H}_2$  production rate.

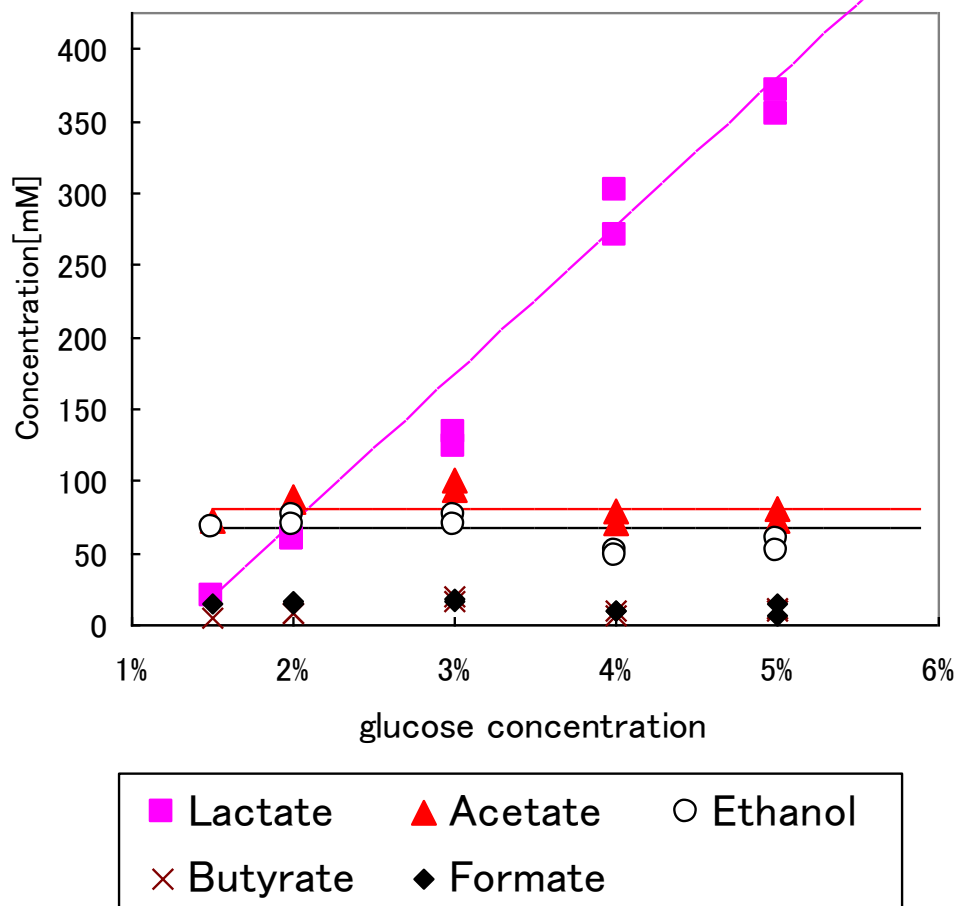


Fig.8.2. The effect of glucose concentration on metabolites.

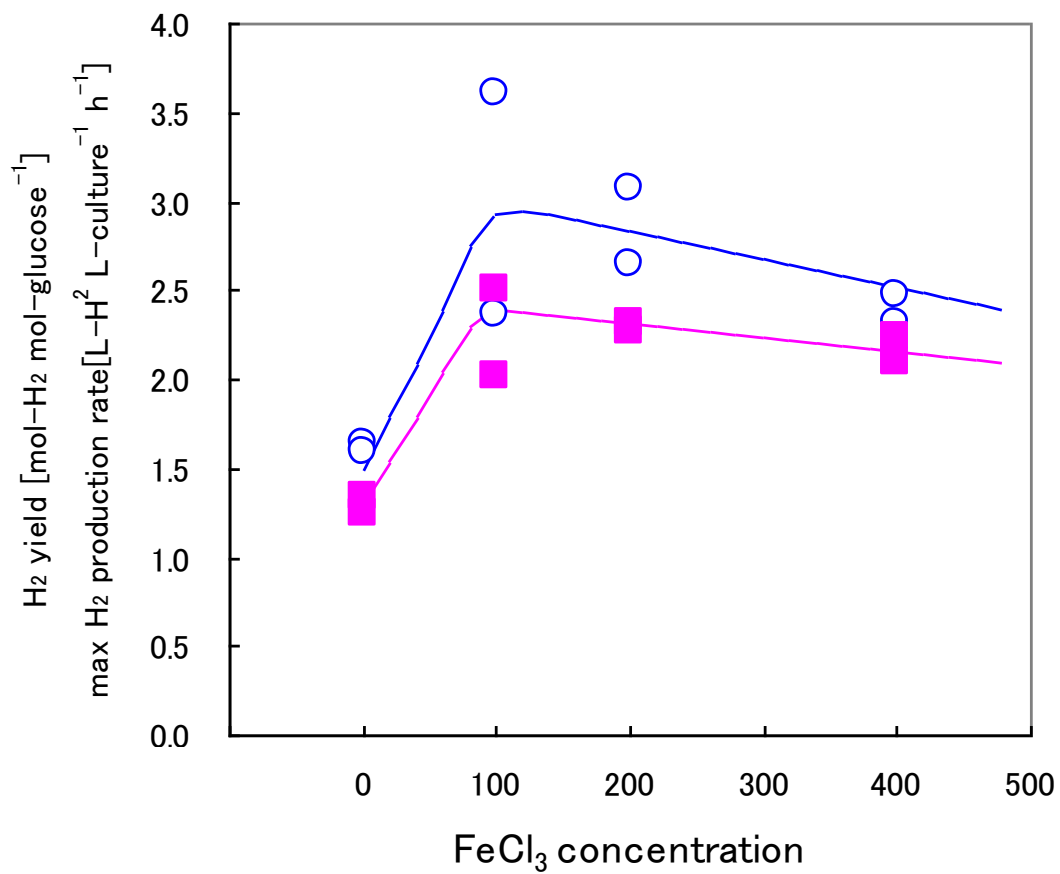


Fig9.1. The effect of FeCl addition on H<sub>2</sub> yield and maximum H<sub>2</sub> production rate.

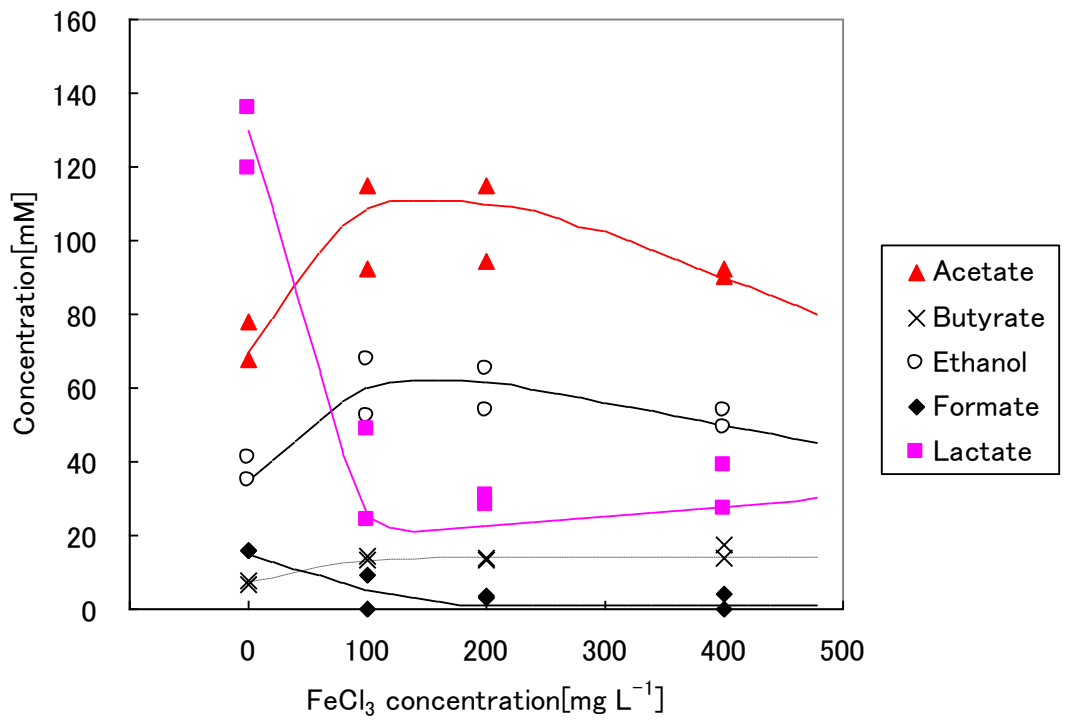


Fig.9.2. The effect of FeCl<sub>3</sub> addition on metabolites.

# 中温水素発生菌による発酵水素生産の研究

環境生命学専攻 生命環境コース 責任指導教員:谷生重晴  
04HA037 西山大紀 (Hiroki NISHIYAMA)

## 1. はじめに

2005年2月に京都議定書が発効され、日本は2012年までに1990年の排出量の6%の温室効果ガスを削減する義務が課された。これを受けて化石燃料の使用を低減することは急務となった。また持続可能な発展を実現するためには化石燃料依存型社会からの脱却が必要である。

2002年に閣議決定された「バイオマス・ニッポン総合戦略」にはあらゆるバイオマスを積極的に利用する戦略が明記されている。バイオマスの利用法のひとつである発酵水素生産は、生ゴミや、廃糖蜜のような含水率の高いバイオマスの利用に適しており、メタン発酵や光合成水素生産よりも反応速度が速いことで知られている。しかし水素収率が低いことや水素生産速度がまだ十分ではないなどの問題がある。このような問題点を解決する研究が盛んに行われており Tanisho は遺伝子組み換え技術により収率は  $10 \text{ mol-H}_2 \text{ mol-glucose}^{-1}$  にまで改善することができると説明している。一方水素生産速度は反応速度論により、温度を上げることで向上させることができると考えられる。そのため超高温菌などによる発酵水素生産の研究が、近年数多く行われるようになってきている。しかし理想と異なり水素生産速度は *Clostridium saccharolyticus* の  $70^\circ\text{C}$  の培養で  $0.19 \text{ L-H}_2 \text{ L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$  とかなり遅い。このようなことから、本研究では従来の水素発生菌よりも優れた水素発生能力を持つ、新たな中温水素発生細菌の探索を試みた。そして有望と思われる水素発生細菌を得ることができたため、その細菌の水素発生特性を調べた。

## 2. 実験方法

### 2.1. スクリーニング

野外から土や汚泥といった微生物を含むさまざまなサンプルを数多く採取してきた。調整した培地に野外から採取してきたサンプルを白金耳で植菌した後、直径2mmの穴が開いたシリコン栓で空気が入らないように栓をした。これを試験官立てに逆さまに挿し、 $50^\circ\text{C}$ の恒温槽に入れて振盪培養した。こうすることによってサンプル中にガスが発生する細菌が含まれていた場合、試験管内でガスが発生することにより試験官内の圧力が上がり培地が外に流出し、試験官内にはガスが溜まる。溜まったガスの量から、高温で成育してなお且つガスを活発に発生する細菌が検体中に含まれているのかどうかの判定を行った。

### 2.2. 水素発生実験: 最適温度、糖濃度、鉄イオンの影響

本培養液は1L あたりカゼインペプトン 25.0g、粉末酵母エキス-S 22.0g、チオグリコール酸 0.3g、L-システイン塩酸塩 0.3gから成るYNU嫌気培地を用いた(鉄イオン添加の影響を調べる実験では、カゼインペプトンの代わりにカザミノ酸を  $25.0 \text{ g L}^{-1}$  用いた)。本培養は容積 500mL のジャーファーメンターで行い、液量は 350mL、攪拌速度 30rpm、pH6.0、バッチ培養とした。HN001 株の水素発生特性を調べる為、糖濃度、温度は実験によりさまざまに設定して実験を行った。また菌の密度( $\text{g L}^{-1}$ )はOD(550nm)により測定した。代謝産物の分析は高速液体クロマトグラフィーで行った。

## 3. 結果と考察

### 3.1. スクリーニング

51 個のサンプルを試験した。多くのサンプルはほとんどガスの発生がみられないか、発生してもごくわずかであったが、1つだけガスの発生量が多いものがあった。試験管に入っている培地のほとんどを押し出し、ガスが半分以上を占めていた。このサンプルが最も有望であると考えて水素発生実験を行うことにした。また、寒天培地に純粋なコロニーを作って単離操作を行い、単離した菌株を便宜的に Mesophilic bacterium HN001 株と呼ぶことにした。

### 3.2. 温度の影響

pH6.0、糖濃度 1.5%に設定して、 $32, 37, 41, 44, 47, 50^\circ\text{C}$ で水素発生実験を行った結果、最大水素生産速度は温度が高くなるにつれて速くなり、 $47^\circ\text{C}$ で最も水素を速く生産できることがわかった。またそのときの最大水素生産速度は  $3.4 \text{ L-H}_2 \text{ L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$ であった。水素収率は凹型となったがあまり大きな違いはなく、平均  $2.2 \text{ mol-H}_2 \text{ mol-glucose}^{-1}$ であった(図1)。

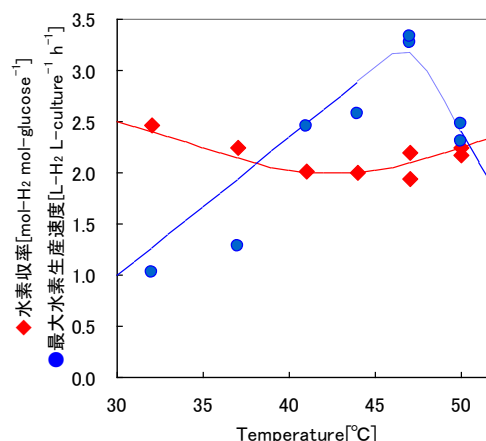


図1. 温度が水素収率と水素生産速度に及ぼす影響

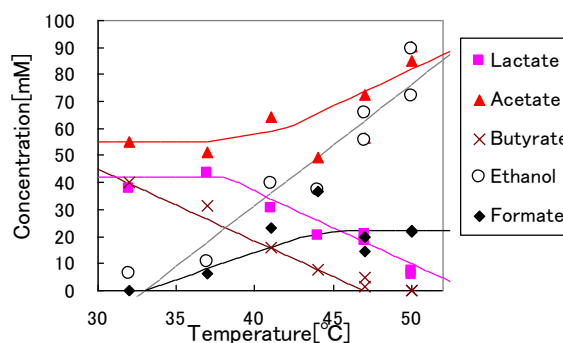


図2. 温度が代謝産物生成に及ぼす影響

また温度が代謝産物生成に及ぼす影響を図2に示す。酢酸とエタノール生成量は温度が上昇するにつれて増加した。特にエタノール生成量はその傾向が大きく、より温度の影響を受けやすいと考えられる。乳酸と酪酸生成は

非常によく似た傾向を示し、温度が上昇するにつれて減少する傾向があることがわかった。ギ酸は温度が高くなるにつれて増加した。

### 3.3. 糖濃度の影響

発酵によるエネルギー生産では、一般的に基質を一度に高濃度で発酵させる方が廃液量が少なくなるために有利である。そのため pH6.0、培養温度は 47°Cとし、糖濃度を 1.5、2.0、3.0、4.0、5.0%と変化させて水素発生実験を行った。図3にその結果を示す。最大水素生産速度、水素収率は糖濃度が高くなるにつれて直線的に下がった。このことから HN001 株による水素生産では糖濃度は 1.5%程度と低いほうが適していることがわかった。またこのときの代謝産物を分析したところ、糖濃度を高くすると酢酸やエタノールの生成が減少する代わりに乳酸の生成割合が増加することがわかった(図4)。

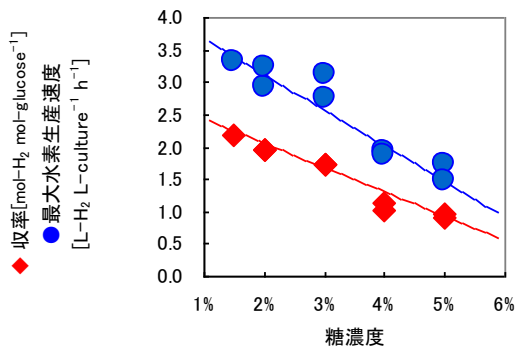


図 3. 糖濃度が最大水素生産速度と水素収率に及ぼす影響

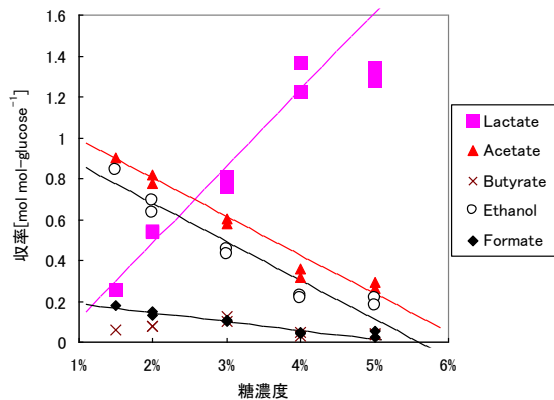


図 4. 糖濃度が代謝産物生成に及ぼす影響

### 3.4. 鉄イオン添加の影響

メタン発酵などでは発酵を促進する目的で添加物として金属イオンが添加される。発酵水素生産でも汚泥などから採取した菌を用いた混合培養で、鉄イオンを添加することにより水素生産速度や水素収率が向上した事例が報告されている。そのため本実験においても鉄イオン添加が水素発生にどのような影響を及ぼすのか調べるために、糖濃度を2%とし、FeCl<sub>3</sub>を培地に100、200、400mg L<sup>-1</sup>添加してその影響を調べ、その結果を図5に示した。

FeCl<sub>3</sub>を加えたものとそうでないものでは、水素収率と最大水素生産速度に大きな違いがあることがわかった。鉄イオンを加えることにより水素収率と最大水素生産速度はとも

に大きく向上し、FeCl<sub>3</sub>を100mg L<sup>-1</sup>加えたとき、最大水素生産速度は3.6L-H<sub>2</sub> L-culture<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>で、そのときの水素収率は2.5mol-H<sub>2</sub> mol-glucose<sup>-1</sup>であった。FeCl<sub>3</sub>の濃度による違いはあまり見られなかったが、濃度を100mg L<sup>-1</sup>から400mg L<sup>-1</sup>に上げていくと、収率と最大水素生産速度は低下するのかもしれない。そのため工業的に鉄イオンを添加する場合は必要最低限の量を添加すればよいだろう。

代謝産物の分析を行った結果、FeCl<sub>3</sub>を添加した場合、添加しない場合と比較して乳酸の濃度は大幅に減少した。一方酢酸、エタノール、酪酸の濃度は添加していないものと比べて増加した。乳酸を生成するときは水素の発生は理論上起こらないため、乳酸が生成される代わりに酢酸や酪酸生成のような水素の発生を伴う代謝が行われたことが水素収率と最大水素生産速度を向上させた主な理由であると考えられる。なぜこのように代謝が変化するのか、いくつか理由が考えられるため、今後の検討が必要である。また FeCl<sub>2</sub>やNiCl<sub>2</sub>といった他の金属イオンの影響を調べることも今後の課題である。

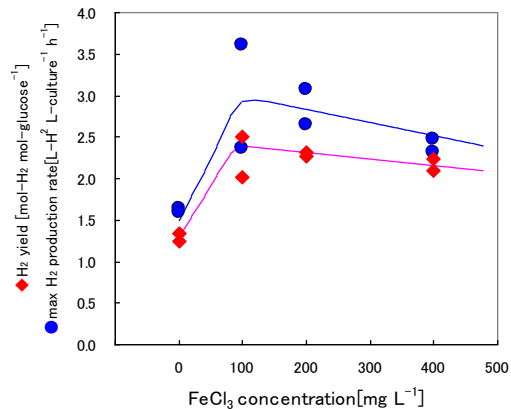


図 5. FeCl<sub>3</sub>添加が水素収率と最大水素生産速度に及ぼす影響

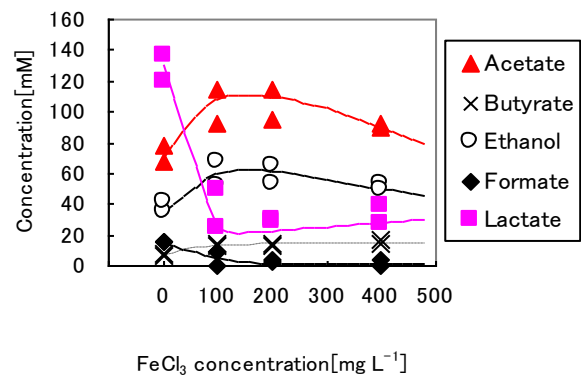


図 6. FeCl<sub>3</sub>添加が代謝産物生成に及ぼす影響

## 4. 結論

- 有望な新規の中温水素発生細菌をスクリーニングにより得ることができた。
- HN001株により水素生産を行うとき、47°Cのとき最も速い水素生産速度が得られることがわかった。
- 糖濃度が低いほど水素生産に適していることがわかった。
- 鉄イオンを添加することにより水素収率と最大水素生産速度は大きく改善されることがわかった。