

中温水素発生菌による発酵水素生産の研究

西山大紀^{*}、谷生重晴
横浜国立大学環境情報学府
E-mail : cakeisdog@yahoo.co.jp

Fermentative Hydrogen Production by a Newly Isolated Mesophilic Bacterium HN001

Hiroki NISHIYAMA, Shigeharu TANISHO
Graduate School of Environment and Information Sciences, Yokohama National University

Abstract

Experiment of fermentative hydrogen production by Mesophilic bacterium HN001 was carried out on glucose medium at pH6.0. H₂ yield, H₂ production rate and metabolites such as ethanol, lactate and butyrate were affected by cultural temperatures. The effect of substrate concentration was also investigated under various glucose concentration as 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, and 5.0% (w/v) at 47°C and pH6.0. High substrate concentration decreased both maximum H₂ production rate and H₂ yield, and the optimum concentration was seemed to be 1.5%. Additionally, the effect of Fe ion as an additive on the hydrogen production was examined. FeCl₃ was used as for Fe ion source and its concentration was set at 0(as control), 100, 200, and 400mg L⁻¹. Temperature, pH, glucose concentration were set at 47°C, 6.0, 2.0% respectively. There were significant differences between control and FeCl₃ added cultures on lactate production, H₂ production rate and H₂ yield. The addition of Fe ion increased both H₂ yield and H₂ production rate, and the maximum H₂ production rate of 3.6L-H₂ L-culture⁻¹ h⁻¹ was obtained at 100mg L⁻¹.

Key words: Mesophilic bacterium HN001, Hydrogen production rate, Hydrogen production yield, Glucose concentration, Fe ion

1. まえがき

発酵水素生産は生ごみのような廃棄物や多糖類を多く含む海藻などから水素を生産することができるため、これから迎える循環型社会において非常に有望な技術であると思われる。発酵水素生産の技術は以前から研究が行われているが、近年は中温や高温での発酵水素生産の研究が盛んに行われている。これは理論的に水素生産速度が高まること、また高温菌には水素収率が高い細菌が多いことなどが主な理由として挙げられる[1, 2]。本研究で用いている Mesophilic bacterium HN001 株はとても速い水素生産速度を持つ有望な水素発生細菌である[3]。しかし Mesophilic bacterium HN001 株の水素発生特性についてはまだ明らかではないことが多いため、温度が代謝産物に及ぼす影響を調べた。さらに発酵水素生産において負荷量は重要な要素であるため、糖濃度が水素発酵に及ぼす影響を調べた。また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いくつか報告されている[4, 5, 6]。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 FeCl₃を培地に添加して調べた。

2. 実験方法

2.1. 温度が水素発酵に及ぼす影響

HN001 株を 16mL の 2 本の ABCM 半流動培地 (栄研化学株式会社) 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。本培養液は表 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、液量は 350mL、攪拌速度 30rpm、pH6.0、バッチ培養とした。温度が代謝産物に及ぼす影響を調べるため、温度は 32、37、41、44、47、50°C で実験を行い、代謝産物の分析は液体クロマトグラフィー(カラム: GL-C610H-S 日立化成)を用いた。

2.2. 糖濃度が水素発酵に及ぼす影響

グルコース濃度を 1.5、2.0、3.0、4.0、5.0%(w/v) の各濃度に調整した。温度と pH は 47°C、pH6.0 に固定して実験を行った。

2.3. 鉄イオンが水素発酵に及ぼす影響

鉄イオンの供与体として FeCl₃ を用いた。FeCl₃ の濃度はそれぞれ 0、100、200、400mg L⁻¹ とした。温度は 47°C、pH は 6.0、グルコースの濃度は 2.0%(w/v) に固定して行った。また窒素源はカゼインペプトンの代わりに、アミノ酸以外の栄養分をほとんど含んでいないカザミノ酸を 25.0g L⁻¹ 用いた。

表 1. YNU 嫌気培地の組成 (g L⁻¹)

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	15.0	和光純薬工業株式会社

※鉄イオンが水素発酵に及ぼす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「ダイゴ」(日本製薬株式会社)を 25.0g L⁻¹ 用いた。

3. 結果

3.1. 温度が水素発酵に及ぼす影響

図 1 に温度が水素生産に及ぼす影響を示す。代謝産物生成反応が温度によりさまざまな影響を受けたことがわかった。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ことがわかった。ギ酸生成量は温度が高くなるにつれて増加した。水素収率は 41°C から 44°C 付近で最も低くなり、それより温度が上昇しても下降しても収率は高くなる結果となった。ギ酸は pH6.0 以下に下げると H₂ と CO₂ に分解される[7]ので、pH をわずかに下げれば 40°C 以上ではギ酸分解によりさらに水素収率を上げることが可能だろう。50°C ではエタノール生成量と水素収率がともに高いため、エタノールを有効に活用すること、そして廃液処理をすることを考慮するとエネ

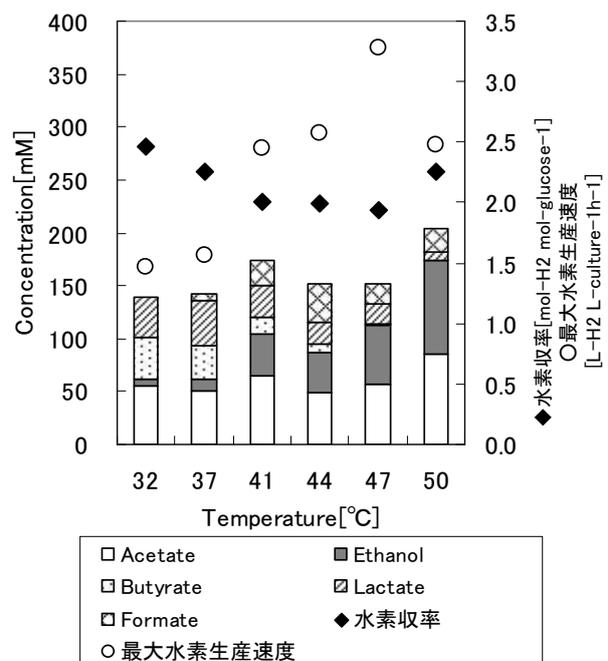


図 1. 温度が水素発酵に及ぼす影響

ルギー効率は最も有利となるかもしれない。水素生産速度は 47°C で最も速くおよそ $3.3\text{L-H}_2\text{ L-culture}^{-1}\text{ h}^{-1}$ であった。これは 47°C が Mesophilic bacterium の生育に適していたことと、水素を含めた代謝産物のバランスが最適であったと考えられる。

3.2. 糖濃度が水素発酵に及ぼす影響

図 2 に糖濃度が水素発酵に及ぼす影響を示す。最大水素生産速度と水素収率は糖濃度が増加するにつれて直線的に減少した。それに対して水素の生成を伴わない乳酸生成は糖濃度が増加するにつれて直線的に増加した。酢酸、エタノール、酪酸、ギ酸は糖濃度による大きな変化は見られなかった(酪酸、ギ酸濃度は低くほぼ一定だったのでデータは示していない)。このことから HN001 株による発酵水素生産は基質の濃度が低い方が適しており、糖濃度が高いと乳酸を生成してしまい最大水素生産速度と水素収率を減少させることがわかった。

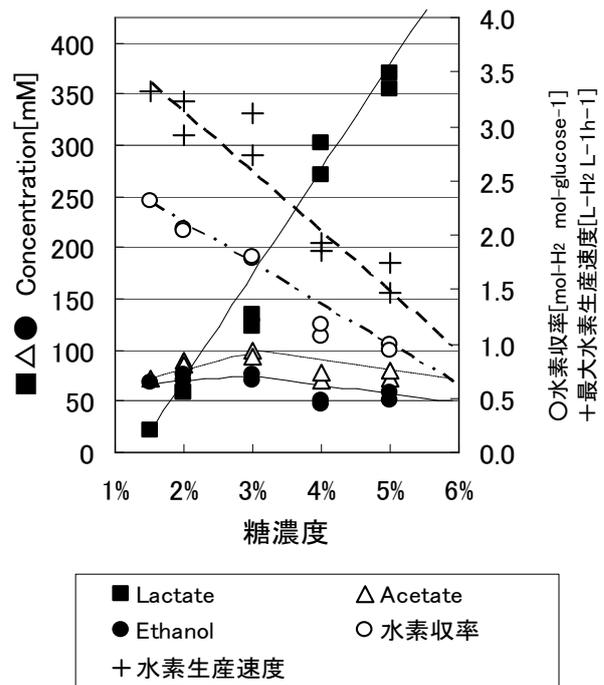


図 2. 糖濃度が水素発酵に及ぼす影響

3.3. 鉄イオンが水素発酵に及ぼす影響

図 3 に鉄イオンが水素生産に及ぼす影響を示す。データは 2 回の実験の平均値である。この実験は糖濃度 2.0% で行い、さらに窒素源にはカゼインペプトンよりも貧栄養であるカザミノ酸を用いたが[8]、水素収率と最大水素生産速度はどちらも糖濃度 1.5%、窒素源にカゼインペプトンを用いたときと同等であった(図 2 の糖濃度 1.5% 参照)。FeCl₃ を添加した場合とそうでない場合では水素生産に大きな違いが見られた。FeCl₃ を加えた培地では、加えていない培地と比べて水素収率と最大水素生産速度は大幅に向上し、 100mg L^{-1} 添加したとき最大水素生産速度は $3.6\text{H}_2\text{ L-culture}^{-1}\text{ h}^{-1}$ を記録した。また代謝産物にも大きな違いが見られた。FeCl₃ を添加した場合、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[2, 9]。

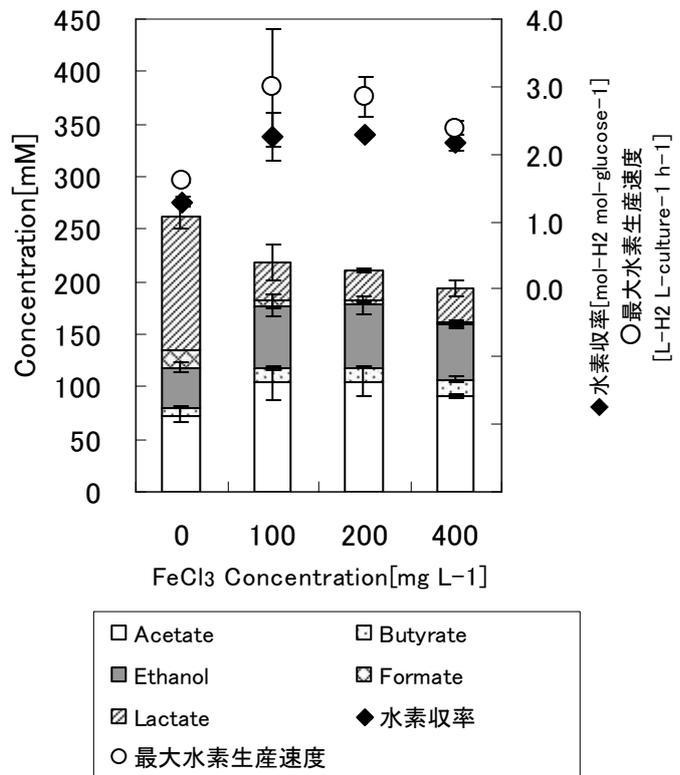


図 3. 鉄イオンが水素発酵に及ぼす影響

FeCl₃ 添加量の影響については、FeCl₃ の濃度は水素収率にはほとんど影響を与えなかったが、最大

水素生産速度は FeCl_3 が低濃度になるにつれて速くなる傾向が見られた。このことから HN001 での水素生産では最適な FeCl_3 の濃度があると考えられ、今後 100mg L^{-1} より低濃度で実験を行う必要がある。また糖濃度を上げて鉄イオンを添加した場合水素発生はどのようになるのか調べる必要がある。

4. まとめ

- ・温度により水素収率、水素生産速度、代謝産物はさまざまな影響を受けた。水素生産速度は 47°C で最も速くなった。水素収率は 32°C 付近でも 50°C でも高くなったが、水素生産速度の観点から高温のほうが有利であると考えられる。
- ・糖濃度の影響について、糖濃度は低いほうが水素生産に有利であり水素収率と最大水素生産速度はともに 1.5% で最もよい結果となった。糖濃度が高くなるにつれて乳酸濃度が直線的に増加してしまうことがわかった。
- ・ FeCl_3 の添加により乳酸の生成が抑えられ、糖濃度が 2.0% であっても糖濃度 1.5% と同等の水素収率と最大水素生産速度が得られることがわかった。 FeCl_3 の濃度が 100mg L^{-1} のとき最大水素生産速度は最高の $3.6\text{L-H}_2\text{L-culture}^{-1}\text{h}^{-1}$ が得られた。

5. 参考文献

- [1] E.W.J. van Niel *et al*: Distinctive properties of high hydrogen producing extreme thermophiles, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermotoga elfii*. Int J Hydrogen Energy. 27 P1391-1398 (2002)
- [2] K.Vijayaraghavan *et al*: Trends in biological hydrogen production-a review. Int J Hydrogen Energy. Available online 23 December (2004)
- [3] 西山大紀、谷生重晴:中温水素発生菌による発酵水素生産の研究. 第24回水素エネルギー協会 予稿集. 水素エネルギー協会 P13-16 (2004)
- [4] Young Joon Lee *et al*: Effec of iron concentration on hydrogen fermentation. Bioresource Technol. 80 P227-231 (2001)
- [5] Youngfang Zhang *et al*: Hydrogen Production in batch culture of mixed bacteria with sucrose under different iron concentrations. Int J Hydrogen Energy. 30 P855-860 (2005)
- [6] Youngfang Zhang *et al*: Effec of temperature and iron concentration on the growth and hydrogen production of mixed bacteria. Int J Hydrogen Energy. Available online 27 June (2005)
- [7] 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はなにか. 水素エネルギーシステム. 29 1 P2-5 (2004)
- [8] 坂崎利一: 『新 細菌培地学講座・上』
- [9] 谷生重晴: バクテリアの発酵水素発生機構, 『エコバイオエネルギーの最前線』, シーエムシー出版 P154-162 (2005)