

水素生産を目的とした環境微生物からの光合成細菌の 分離・同定及びその水素生産能に関する研究

神野 英毅 (応用分子化学科)

清水 晶 (京都大学大学院)

井上 國世 (京都大学大学院)

1 緒言

水素は燃焼による炭酸ガスの発生が無い、クリーンエネルギーとして注目されているだけでなく、ここ数十年の急速な燃料電池の発展と共に潜在的なエネルギーキャリアとしての重要性も増してきている¹⁾。しかし、水素は化石燃料や自然エネルギーとは異なり一次エネルギーではないため、何らかの方法で変換または加工を行うことで生産する必要がある。今現在、工業的に水素を生産する方法として、天然ガスの水蒸気改質法や石炭や重炭化水素の部分酸化法が用いられている。しかし、このような方法は経済面での恩恵が大きい一方、天然資源を生産に用いていることから、将来的な不安が大きいといえる。また、これらの方法は副産物として二酸化炭素を排出することから、環境面でも問題を抱えている。

一方、微生物を用いた生物学的水素生産が近年のエネルギー研究で重要な分野として認識されるようになってきている。このような水素生産は化石燃料を使用しない点、二酸化炭素の排出が少ない、またはほとんどない点、有機廃棄物の処理も兼ねている点など、現在の工業的生産法に比べて環境面での利点が多い一方、生産に時間がかかり大量生産が苦手であるという点において改良・改善の余地がある。Fig. 1 に循環型社会の模式図を示した。

これまで Miyake らによる光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* RV (以下 RV) と発酵菌による混合固定化を用いた水素発生実験で、7.0 mol H₂/mol glucose と高い収率を得ることに成功している。しかし様々な発酵菌との混合固定化が検討されてきたにもかかわらず、この値は理論収率である 12.0 mol H₂/mol glucose

には及ばず、更に検討が必要であるそこで我々は RV に代わる新たな光合成細菌を環境微生物から分離し、更なる水素生産効率の向上を目的とする研究を実施した。



Fig. 1 循環型社会の模式図

2 実験方法

菌の分離

自然界における光合成細菌は湖、池、沼、下水、水田、沿岸水、温泉、灌水土壌といった富栄養化した水界に比較的多く存在する。よって、このような場所から採取してきた試料を酢酸基本培地で窒素ガス存在・光照射 (1,500~3,000 lux) ・嫌気条件下で呈色するまで (約 10 日程度) 培養を行った²⁾。次にその培養液を aSy 寒天培地(コハク酸)上に塗布し、30℃・好気・暗条件下で約 2

週間程度の培養を行った。上記の方法により形成されたコロニーを採取し、aSy 寒天培地上に塗布し、嫌気・明条件 (1,500~3,000 lux) で生育するものを選択し、水素発生用菌体として用いた。

菌株の同定

本研究では分離した菌株の同定方法として、16S リボソーム RNA (rRNA) 遺伝子のシーケンス解析を行った。菌体から抽出した DNA を Table 1 に示される 27f、1525r の 16S rRNA 遺伝子増幅用プライマーを用いて PCR を行うことで、16S rRNA 遺伝子を増幅した。

アガロースゲル電気泳動により生成物が単一であることを確認し、精製を行った、後 PCR 生成物を複数のシーケンシング用プライマー 800R、r1L、r2L、r3L、r4L、926f、f3L を用いてシーケンサーによる遺伝子解析を行った。それにより得られた塩基配列データをつなぎ合わせ、日本 DNA データバンク (DDBJ) のホームページを通じて BLAST 検索を行うことで相同性の確認を行った。

水素発生実験

分離した菌体を 3 日ごとに順次拡大培養し、遠心分離にかけて集菌した (9,000 rpm×15min)。その後上清を捨て、Basal medium で再懸濁させ、分光光度計を用いて波長 600 nm 時の吸光度から OD を 1.5、全量 15 ml に調製した。ルー型培養瓶に懸濁液と、寒天を 4% 溶解させた Basal medium 15 ml を加え、固まるまで約 10 分間静置した (Fig. 2)。その後、外液として水素生産用培地 (有機酸、グルタミン酸) を加え、恒温水槽 (30 °C) に設置し、ハロゲンランプを用いた光照射下 (10,000 lux) で発生した水素を時間ごとにプロットした。発生した水素はチューブを通して水酸化ナトリウム水溶液中に水上置換にて採取した。

3 果及び考察

菌株の分離とその評価

東京都及び千葉県内から採取した試料の培養を行い、76 菌株を分離した。また、それらの菌株を乳酸を基質とした水素生産を行うことで、その水素生産能を評価した。その結果から水素生産能の高い順に 5 種の菌株を選び、Table 2 に示し

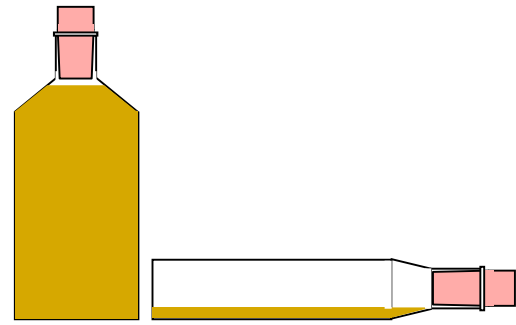


Fig. 2 Immobilization of the microorganisms in Roux bottle

Table 1. Primers for 16S rRNA gene

プライマーの名称	塩基配列
27f	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTAG-3'
1525r	5'-AAAGGAGGTGATCCAGCC-3'
800R	5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3'
r1L	5'-GTATTACCGCGGCTGCTGG-3'
r2L	5'-CATCGTTTACGGCGTGGAC-3'
r3L	5'-TTGCGCTCGTTGCGGGACT-3'
r4L	5'-ACGGGCGGTGTGTACAAG-3'
926f	5'-AAACTCAAAGGAATTGACGG-3'
f3L	5'-GTCCCGCAACGAGCGCAAC-3'

Table 2. Hydrogen production, dry weight and hydrogen production rate of 6 strains including RV

	Hydrogen production (ml)	Dry weight (mg)	Hydrogen production rate (ml/mg h)
RV	663	15.091	262
I-2A-K	568	12.623	268
H-1A-I	600	13.453	265
H-1A-J	555	13.136	251
I-1A-R	635	13.320	284
I-2A-H	676	13.994	289

た。この Table から、5 種中 4 種の菌株が RV よりも高い生産能を示したことがわかる。しかし、生産量のみを考慮した場合、RV を上回ったのは I-2A-H 株のみであった。

菌株の同定

今回分離した 5 種の菌株について Table 3 に示した。解析を行ったいずれの菌株についても *Rhodobacter sphaeroides* 種と 99%以上の相同性を示していることと、100%の相同性を示す株が存在しないことから、これらの菌株は *Rhodobacter sphaeroides* 種の未登録株であるといえる。また、いずれの菌株も互いに異なる配列を示していたため、それぞれ別株である。

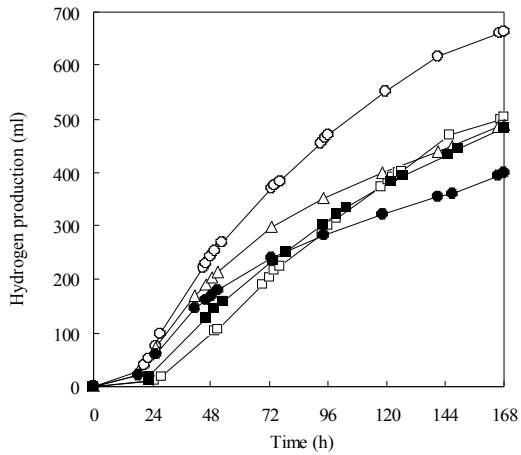


Fig. 3. Time course of hydrogen production in RV strain. Symbols: Lactate, \diamond Acetate, \square Succinate, \triangle Malate, \bullet Glucose, \blacksquare

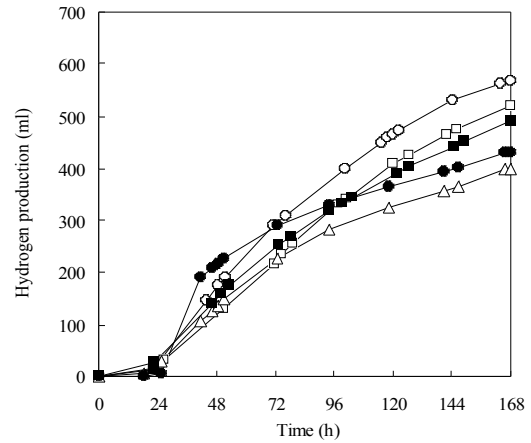


Fig. 4. Time course of hydrogen production in I-2A-H strain. Symbols: Lactate, \diamond Acetate, \square Succinate, \triangle Malate, \bullet Glucose, \blacksquare

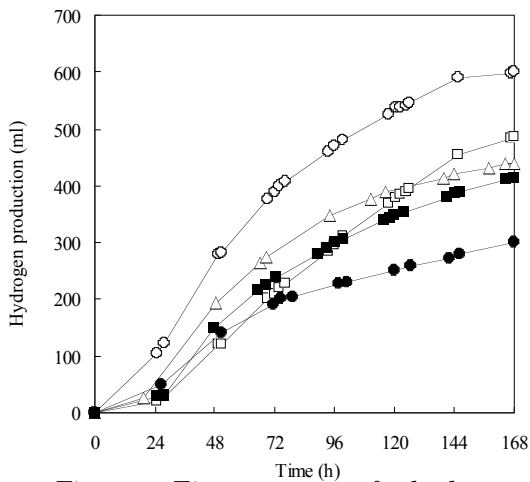


Fig. 5. Time course of hydrogen production in H-1A-I strain. Symbols: Lactate, \diamond Acetate, \square Succinate, \triangle Malate, \bullet Glucose, \blacksquare

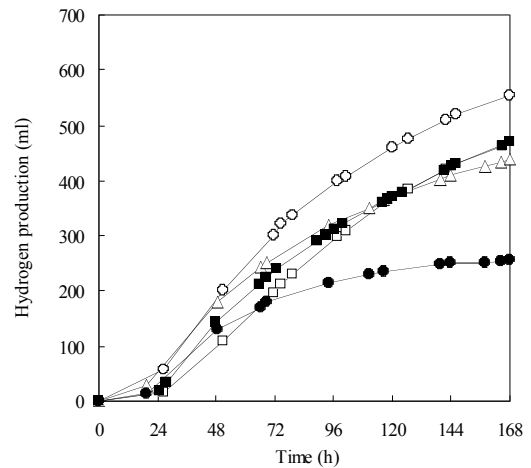


Fig. 6. Time course of hydrogen production in H-1A-J strain. Symbols: Lactate, \circ ; Acetate, \square ; Succinate, \triangle ; Malate, \bullet ; Glucose, \blacksquare

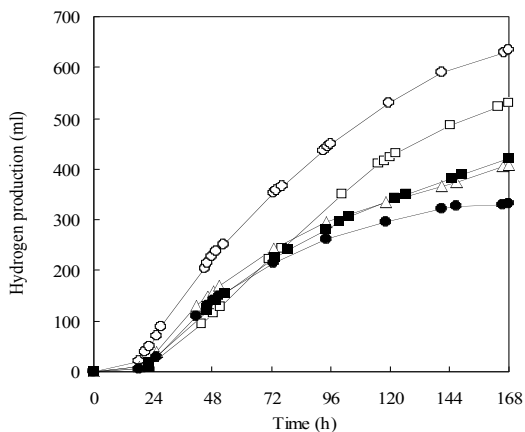


Fig. 7. Time course of hydrogen production in I-1A-R strain. Symbols: Lactate, \circ ; Acetate, \square ; Succinate, \triangle ; Malate, \bullet ; Glucose, \blacksquare

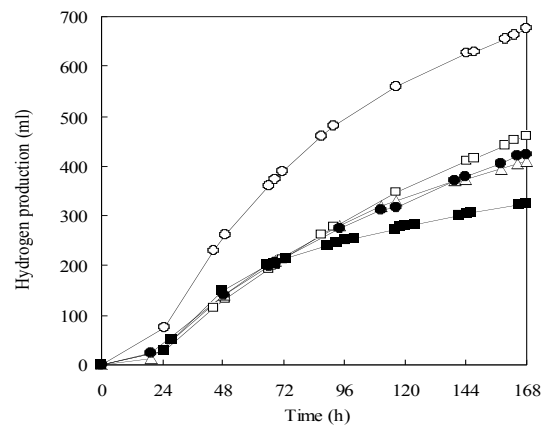


Fig. 8. Time course of hydrogen production in I-2A-H strain. Symbols: Lactate, \circ ; Acetate, \square ; Succinate, \triangle ; Malate, \bullet ; Glucose, \blacksquare

Table 4. Hydrogen production from organic acids by the selected strains

	Lactate (hydrogen production rate(ml/mg h))	Acetate (hydrogen production rate(ml/mg h))	Butyrate (hydrogen production rate(ml/mg h))	Succinate (hydrogen production rate(ml/mg h))	Malate (hydrogen production rate(ml/mg h))	Propionate (hydrogen production rate(ml/mg h))	Glucose (hydrogen production rate(ml/mg h))	Average (hydrogen production rate(ml/mg h))
RV	262/52	199/59	0/0	192/59	157/51	0/0	190/30	162/36
I-2A-K	268/53	194/54	0/0	188/44	203/53	0/0	232/25	171/33
H-1A-I	265/56	215/61	0/0	195/63	74/22	0/0	187/23	150/32
H-1A-J	233/37	263/81	0/0	199/61	116/37	0/0	208/28	162/35
I-1A-R	284/46	237/68	0/0	182/49	148/49	0/0	188/25	170/34
I-2A-H	289/46	196/61	0/0	174/53	180/53	0/0	137/18	168/34

分離菌株を用いた水素生産

これらの5種の菌株とRVを用いて酢酸、酪酸、コハク酸、リンゴ酸、プロピオン酸、グルコースを基質として用いた水素生産を行い、同様に水素生産の評価を行った。その結果を基質として乳酸を用いた場合も合わせて、Table 4及びFig. 3~7に示した。

なお、いずれの菌株においても酪酸及びプロピオン酸では水素生産が見られなかったため、Fig. 2-7では省略している。これはおそらく、前述の通り、いずれの菌株も同一の種であるため、水素生産に利用可能な基質と不可能な基質が一致しているためであると考えられる。

最もよく水素を生産したのは乳酸であり、その次は酢酸であった。ただし収率で見た場合、全てにおいて乳酸よりも酢酸のほうがより高い収率が得られた。コハク酸とリンゴ酸はTCAサイクル中に存在する有機酸であるが、収率は乳酸や酢酸を基質にした場合に比べて、半分程度という結果であった。これは乳酸や酢酸の場合、TCA サ

イクルに入る前の段階で、乳酸脱水素酵素などの分解酵素によりプロトンを生じているためであると考えられる。またコハク酸とリンゴ酸で収率に相違が見られる場合、L-リンゴ酸と、D-リンゴ酸で代謝経路が異なることによるものと考えられる。また、グルコースを基質とした場合は総じて収率が低い結果となったが、これは光合成細菌の場合、通常は生育や水素生産を有機酸から行っており、グルコースなどの糖を分解する解糖系があまり活発ではないためと考えられます。

結論

全ての基質または、それらを総合した場合にRVよりも高い水素生産能を示す菌株をそれぞれ発見することができた。また遺伝子解析の結果、それらの菌株はいずれも*Rhodobacter sphaeroides*種に属する新規の株であることが判った。

参考文献

- 1) P. P. Edwards, V. L. Kuznetsov and W. I. F. David. 2007. Hydrogen Energy. Philos Transact A Math Phys Eng Sci. 2007 Apr 15;365(1853):1043-56. Review.
- 2) Nakada E, Kaji Y, Aoyama K, Nishikata S, Asada Y, Miyake J. Photosynthetic bacterial hydrogen production combined with a fuel cell for light energy conversion to electricity. In: Ohta T, Homma T, editors. New energy systems and conversions (Proceedings of the first international conference on new energy systems and conversions, Yokohama, Japan 27-30 June). Tokyo, Japan: Universal Academy Press; 1993. pp. 225-8.
- 3) Xing-Yi Mao, Jun Miyake, and Sugio Kawamura. 1986. Screening Photosynthetic Bacteria for Hydrogen Production from Organic Acids. J. Ferment. Technol., Vol. 64, No.3, 245-249. 1986