

生命・生物工学に基づく健康と疾患の研究グループ

Rhizopus oryzae と *Rhodobacter sphaeroides* RV の混合培養による 廃糖蜜からの水素生産

神野 英毅（応用分子化学科） 清水 昌（京都大学大学院）
井上 國世（京都大学大学院）

1. 緒言

水素は燃焼によって温暖化ガスの原因とされる二酸化炭素を生じないためクリーンであり、1 次エネルギーである熱、電気、光によって再生可能なエネルギーキャリアである。¹⁾すでに水素は燃料に用いる事業用の燃料電池システムが市場に投入されつつあることから、今後、水素の需要は急速に拡大するものと考えられる。現在、水素の製造は、化石燃料やメタノール、メタンからの変換により製造されている。しかし、化石燃料からの製造は地球温暖化と環境問題の観点から、实际的でなく、これらの解決には至らない。そこで、再生可能エネルギーだけを利用して水素を製造する技術が注目される。それが微生物の機能を用いた生物学的水素製造技術である。特に、光合成微生物を利用した光水素製造技術は、太陽光という究極の再生可能エネルギーを有効に利用できることが最大の利点である。

バイオマスは地球上のさまざまな形で存在し、カーボンニュートラルな再生可能資源であり、莫大で優れた貯蔵性・代替性などの特徴を持つ。しかし、低い単位質量あたりの発熱量、供給量の季節変動性、高価な集約コストの問題があり、これらがバイオマスの活用を拒んでいる。²⁾

これまでに、Miyake らは、発酵菌として *Clostridium butyricum* と光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* RV（以下 *Rh. sphaeroides* RV）との混合培養によってグルコースを効率良く水素に変換したことを報告している。³⁾ *Rh. sphaeroides* RV は乳酸、酢酸を好んで資化する。発酵菌として偏性嫌気性菌を使用すると、培養が難しく、*Rh. sphaeroides* RV が資化することができない有機酸類も生成する場合もあり *Rh. sphaeroides* RV との混合培養に用いる発酵菌については、さらに検討の余地がある。

そこで、発酵菌が水素を発生しなくても *Rh. sphaeroides* RV のニトロゲナーゼ系のみで水素生産できると考え、本研究では発酵菌とし

て偏性嫌気性菌よりも培養が容易であり乳酸発酵を行うカビの一種である *Rhizopus oryzae* NBRC5384（以下 *Rh. oryzae*）³⁾ と *Rh. sphaeroides* RV との混合培養を行い、水素生産の培養条件の検討を行った。

2. 材料および実験方法

2-1. 使用菌体

本研究では、独立行政法人製品評価技術基盤機構、生物遺伝資源部門 (NBRC) より分譲された NBRC 番号 5384、*Rhizopus.oryzae* および Miyake らによって分離された光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* RV を使用した (Fig.1)。

2-2. 実験方法

①前培養、集菌、懸濁

Rh. sphaeroides RV は aSy 培地 (Ammonium sulfate, Sodium succinate, Yeast extract) でハロゲンランプ (10 klux) 照射下嫌気培養、*Rh. oryzae* は PDB (Potato Dextrose Broth) または PS 培地 (Potato-sucrose) で好気培養した。前培養した菌体は遠心分離 (4℃, 15min, 9,000rpm) し、Basal 培地 (*Rh. sphaeroides* RV 用無機塩培地) の 10 倍濃度のリン酸緩衝液で懸濁した。

②寒天固定化

懸濁した 2 種の菌体をルー瓶に寒天で Fig. 3 のように固定化した。(寒天 30ml 4%、空隙 180ml)

③前培養 1 および 2

Rh. oryzae の活性化をするために上記ルー瓶の空隙に PDB 培地または PS 培地を加えて 2 日間培

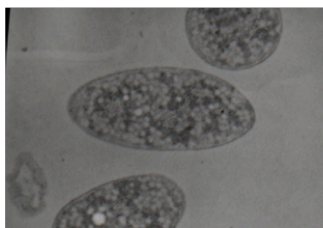


Fig. 1 Electron micrograph of *Rh. sphaeroides* RV



Fig. 2 Scanning electron microscope of *Rh. oryzae*

養し、次に光合成細菌のニトロゲナーゼ系を誘導するために gL (glutamate 1.75mM, Lactate 75mM) 培地で 24 時間培養した。

④水素生産実験

gG 培地 (glucose 25mM, Glutamate 10mM) を用いて水素生産させ、水上置換法により回収した。廃糖蜜は、粘性や着色があるため原液では水素生産培地として使用できない。そのため、フェノール硫酸法⁴⁾により糖濃度を測定し、水素発生培地中の糖濃度が gG 培地と同様のグルコース換算でおよそ 25mM となるように調製をした。

⑤ 分析

回収した水素はガスクロマトグラフィーで純度分析を、培養液中の有機酸などは高速液体クロマトグラフィーにより定量分析を行った。

⑥水素発生装置

実験で使った水素発生装置の写真を Fig. 4 および Fig.5 に示す。ルー瓶を 30℃の恒温槽内に入れ、菌体を固定化した側に 10 klux の光を照射した。また、光合成細菌による水素生産では水素以外に二酸化炭素も発生するため、水酸化ナトリウム水溶液を通して、水素を回収した。

3. 結果

3-1. *Rh. oryzae* と *Rh. sphaeroides* RV のグルコースからの固定化混合培養による水素生産

1) *Rh. oryzae* 菌体濃度の水素発生に及ぼす影響

これまでに行った発酵菌と *Rh. sphaeroides* RV の混合培養は菌体濃度 O.D が 1.5 が適していることがわかっている。よって、本研究でも RV の O.D を 1.5 とし *Rh. oryzae* の菌体濃度が水素発生量に及ぼす影響についての検討を行った。その結果を Fig. 6 に示す。*Rh. oryzae* の菌体濃度 O.D は、0.3 および 0.9 として水素発生を行った。それぞれ水素は約 7 日で 800ml 発生し、対糖収率 8.2mol が得られた。また培養液中の有機酸の経時変化は Fig. 7 に示したようになり、生成した有機酸はどちらも、乳酸、酢酸、コハク酸、ギ酸であった。また、グルコースは約 5 日で完全に資化されて、それに伴い水素発生も止まっていた。

2) 最適条件での水素発生

上記の結果をうけて、*Rh. oryzae* は菌体濃度が 0.3、培養時間が 2 日間、PDB 培地の濃度が 1 倍という条件を用いて再度混合培養を行った。さらに、これまでの混合培養では gL 培地からの持ち込み乳酸の水素生産については考慮はしていなかった。よって持ち込み乳酸からの水素生産実験も行った。

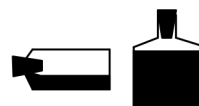


Fig.3 Co-immobilization of the microorganisms in Roux bottle.

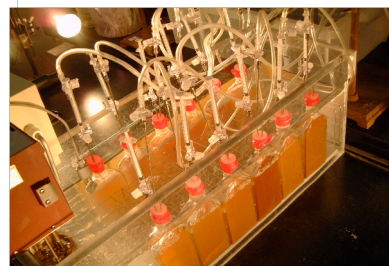


Fig. 4 Photo of photobioreactor

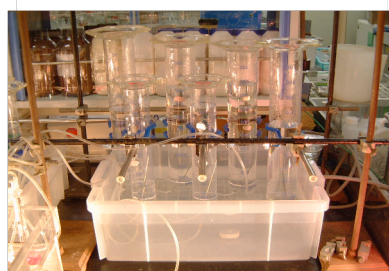


Fig.5 Equipment of entrapped hydrogen

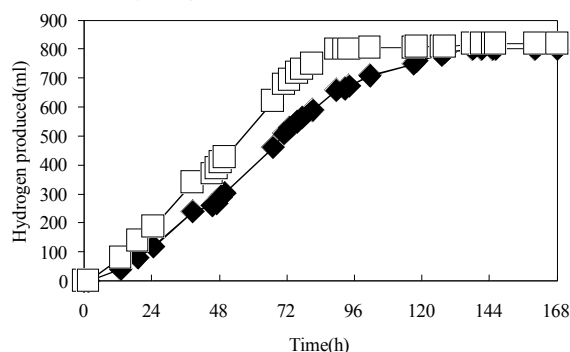


Fig.6 Hydrogen production by co-immobilized cultures in gG medium.

The initial cell concentration of *Rh.oryzae* and RV was 0.3 and 1.5(◇) and 0.9 and 1.5(▲) in OD, respectively

その結果を Fig. 8 に示す。水素は 8 日間で 1000 ml 発生し、対糖収率 9.40 mol が得られた。また、gL 培地の持ち込み乳酸からは 100 ml の水素が発生した。よって、持ち込みの分を差し引くと 8.5mol となり、理論収率の 70%の水素を回収する事ができた。

3-2. *Rh. oryzae* と *Rh. sphaeroides* RV の廃糖蜜からの固定化混合培養による水素生産

*Rh. oryzae*を Potato-sucrose 培地で生育させた場合における廃糖蜜からの水素生産

PDB で培養した *Rh. oryzae* では乳酸発酵が行われなかった。よって、Potato-sucrose 培地で生育させ、RV との混合培養を行った。水素生産の培養

条件は、廃糖蜜を Basal 培地で希釈しグルタミン酸を添加した培地、Basal 培地での希釈のみの培地、さらに廃糖蜜を蒸留水で希釈しグルタミン酸を添加した培地、蒸留水での希釈のみである。この時の水素生産量の経時変化を Fig. 9 および Fig. 10 に示す。

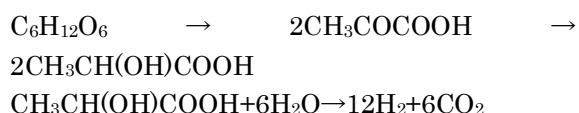
初めに、糖蜜を Basal 培地で希釈し、グルタミン酸を添加した場合と添加しなかった場合では、それぞれ水素は 260 ml、550 ml 発生し、対糖収率はそれぞれ 4.6 mol、7.5 mol であった。また、窒素源としてグルタミン酸を添加したことで水素発生量はおよそ半分に減少してしまった。次に、廃糖蜜を蒸留水で希釈しグルタミン酸を添加した場合と添加しなかった場合であるがそれぞれ水素は 200 ml、560 ml 発生し対糖収率はそれぞれ 2.8 mol、5.4 mol が得られた。水で希釈した場合も Basal 培地で希釈したときと同様に、グルタミン酸を添加することで水素発生量は大きく減少した。生成した有機酸はどちらの場合でも、乳酸、ギ酸、コハク酸であり、乳酸は完全に資化されていたが、ギ酸とコハク酸が最後まで蓄積していた。

4. 考察

4-1. *Rh. oryzae* と *Rh. sphaeroides* RV のグルコースからの固定化混合培養による水素生産

これまでに、通性嫌気性菌である *Enterobacter aerogenes* HU 101、大腸菌、*Lactobacillus* と *Rh.sphaeroides* RV との混合培養による水素生産を行ってきた。⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾しかし、これらの菌体は、実際の水素生産に寄与していなく、また、RV が資化できない副生成物を生成する。そこで、培養が容易かつ *Rh.sphaeroides* RV による水素生産において最適な炭素源である乳酸の生成能が高い *Rh. oryzae* に着目した。

Rh. oryzae による乳酸発酵では、下式のように 1 mol のグルコースから 2 mol の乳酸を生成する。さらに光合成細菌は乳酸から理論収率として 12 mol の水素が生成すると考えられる。



初めに、バイオマスの基本物質であるグルコースを用いて発酵菌の濃度、前培養 1 の培養時間、培地の濃度および最適条件での水素生産を行った。

Rh. oryzae の菌体濃度を O.D = 0.3 および 0.9 として水素生産を行ったところ、菌体比 1:5 の時対糖収率 8.2mol が得られ、O.D を 0.3 よりも高くしてしまうとわずかであるが収率は減少していた。

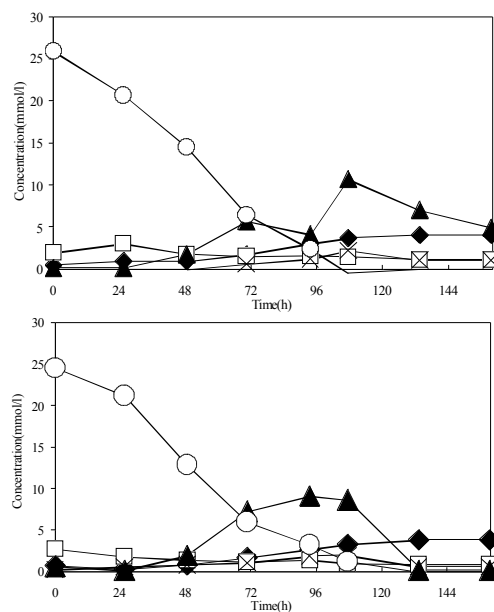


Fig.7 The change of concentration of glucose(○),lactate(■),acetate(▲),succinate (◆) and formate(◇)in gGmedium.

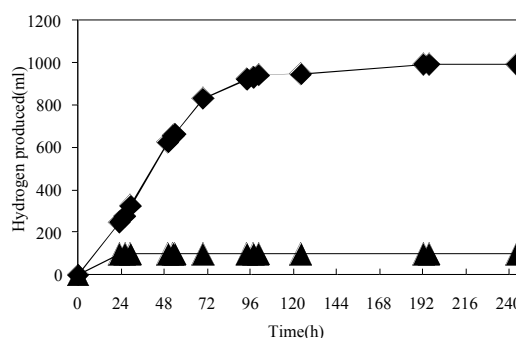


Fig.8 Hydrogen production by co-immobilized cultures in gG medium.

The optimal condition(◆) and hydrogen production from remained lactate in gL medium.(▲)

Fig. 7 の HPLC のグラフより O.D = 0.3 と 0.9 を比べてみると、菌体濃度が高いほうが酢酸が完全に資化されずに残ってしまっていた。このことから、菌体濃度は低いほうが良いと考えられる。さらに *Rh. sphaeroides* RV が資化することができないギ酸が生成し蓄積してしまったため、理論収率である 12mol には達しなかった。よって、*Rh. oryzae* と *Rh. sphaeroides* RV の混合培養では菌体濃度 O.D = 0.3 が適していることが示唆された。最後に、これまでに行ってきた条件を用いて水素生産を行った。*Rh. oryzae* と *Rh. sphaeroides* RV の混合系における水素生産では、光合成細菌のニトロゲナーゼ系が大きく寄与しているため *Rh. sphaeroides* RV の純粋培養を行ったものを使用した。その結果、水素発生量は改善された。また、前培養 2 の gL 培地には乳酸が含まれているため、

gL 培地から gG 培地に持ち込まれる乳酸からの水素生産の検討を行った。発生した水素量は 100 ml であり、寒天中には乳酸がある程度含まれていると考えられる。

4-2. *Rh. oryzae* と *Rh. sphaeroides* RV の廃糖蜜からの固定化混合培養による水素生産

廃糖蜜とは、砂糖作物原料の絞り汁を濃縮し砂糖を晶析分離したあとの母液を指し、糖分を 40 から 60%含有している。さらに原料作物由来のアミノ酸など、微生物の生育に有効な有機物も多く含むため良好な発酵原料となり、糖あたりの価格としては約 100 ドル/t と発酵原料の中では最も安価であるといわれている。

今回使用した廃糖蜜の糖分析を HPLC で行った。含まれている糖分は、一般的な廃糖蜜に含まれている糖分であるスクロース、グルコース、フルクトースと同じである事が確認された。

廃糖蜜からの水素生産は、*Rh. oryzae* を Potato-sucrose 培地で培養後、*Rh. sphaeroides* RV との混合培養にて行った。その結果、水素発生量は大きく改善することができた。

窒素源としてグルタミン酸を添加した場合と添加しなかった場合の水素生産の比較は、グルタミン酸を添加することで水素生産は阻害されてしまった。さらに廃糖蜜を蒸留水で希釈しただけでも、無機塩が入った Basal 培地で希釈したものと同じくらいの水素が発生していた。先ほども述べたが、廃糖蜜中にはニトロゲナーゼを阻害する原料作物由来のアミノ酸（グルタミンなど）や微生物の生育に必須な無機塩が含まれていたためと考えられる。

5. 結論

- ① グルコースからの水素生産では、対糖収率 8.5mol が得られ、理論収率の 70%に達した。
- ② 廃糖蜜から *Rh. oryzae* と *Rh. sphaeroides* RV の混合固定化培養により水素発生できることが確認できた。
- ③ 廃糖蜜からの水素生産では、*Rh. oryzae* を Potato-sucrose 培地で培養することで、水素生産が可能となった。さらに、*Rh. oryzae* は *Rh. sphaeroides* RV が資化することができる乳酸を効率よく生成することができる有用な生体触媒であることが示唆された。
- ④ 廃糖蜜を資源として使用する場合には廃糖蜜の濃度や廃糖蜜中の水素発生を阻害する様々な因子を考慮しその代謝経路を検討しなければならない。

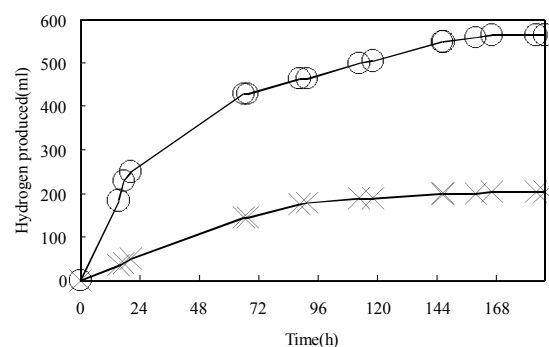


Fig.9 Hydrogen production by co-immobilized cultures in molasses medium.

molasses-glutamate(diluted with distilled water)(■)
molasses(diluted with distilled water)(○)
Sucrose medium-grown *Rh.oryzae* was co-Immobilized and pre-cultured in Sucrose medium

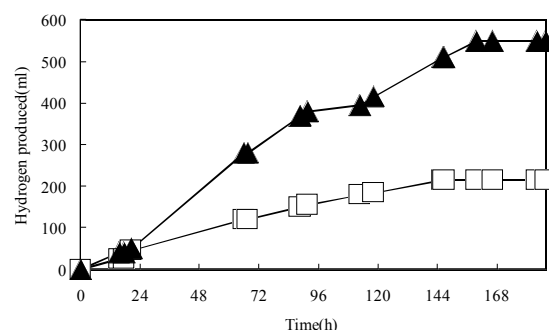


Fig.10 Hydrogen production by co-immobilized cultures in molasses medium.

molasses-glutamate(diluted with Basal medium)(■)
molasses(diluted with Basal medium)(▲)
Sucrose medium-grown *Rh.oryzae* was co-Immobilized and pre-cultured in Sucrose medium

参考文献

- 1)Asada,Y et al.:Journal of Bioscience and Bioengineering 88 1 1-6 (1999)
- 2)今井 忠行 微生物利用の大展開 エヌティーエス p1106-1113
- 3)秋葉 悦男 水素エネルギーと材料技術 シーエムシー出版 p28-39
- 4)Miyake,J.,etal.:J.Ferment.Technol.,62,531-535(1984)
- 5)Hodge.,J.E and Hofreiter.,B.T., Method in Carbohydrate chemistry 1. 338 (1962)
- 6)徳本 大 平成 16 年度 日本大学生産工学部 修士論文 (2004)
- 7)栗飯原 康行 平成 15 年度 日本大学生産工学部 学士論文 (2003)
- 8)奥 茉紗代 平成 15 年度 日本大学生産工学部 学士論文 (2003)
- 9)Asada,Y et al.: International Journal of Hydrogen Energy 31 1509-1513 (2006)