

水素生産を目的とした環境微生物からの有用菌
の分離・同定及びその活性に関する研究

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. はじめに

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、ここ十数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、化石燃料の代替物としての観点から考えた場合大きく矛盾しており、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な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。

これまで Miyake らによる光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum* 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 には及ばなかった。そこで平成 19 年度では、

RV に代わる新たな光合成細菌の分離・同定を行った。本年度は、光合成細菌が有機廃棄物を資化できるようにするためのセルロース分解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。

2. 実験方法

2.1 光合成細菌の分離

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。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 (1500~3000 lux) ・嫌気条件下で呈色するまで (約 10 日程度) 培養する。次にその培養液を aSy 寒天培地 (Basal Medium 1,000 ml, (NH₄)₂SO₄ 1.25 g, Sodium Succinate·6H₂O 9.80 g, Yeast Extract 1.00 g) 上に塗布し、30℃・好気・暗条件下で約 2 週間程度の培養を行う。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。

2.2 セルロース分解菌の分離

沖縄県で採取した土壌試料を滅菌水に溶解させ、セルロース含有寒天平板培地に塗布し、約 10 日間 30℃ で好気培養を行った²⁾。それにより形成されたコロニーを採取し、同様の培地上に塗布することで分離を行った。

2.3 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。その後 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を用いて遺伝子解析システム (SEQ8800) 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。

2.4 水素生産実験

分離した光合成細菌を aSy 培地を用いて3日ごとに計9日間順次拡大培養し(10,000 lux、嫌気条件、30℃)、遠心分離にかけて集菌した(9000 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分間静置した後、外液として水素生産用培地(各種有機酸、グルタミン酸)を加え、恒温水槽中(30℃)でハロゲンランプを用いた照射下(10 klux)で、7日間の培養を行った。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法にて水素を採取し、時間ごとに生産量(ml)をプロットした。

2.5 I-2A-H 株を用いた最適条件の検討

I-2A-H 株を用いて、実験方法2.4と同様の方法で前培養と水素生産実験を行った。このとき乳酸濃度を25, 50, 75, 100 mM の場合で水素生産を行い、最適な基質濃度条件を検討した。その後 I-2A-H 株の OD を1.0, 1.5, 2.0, 2.5 の場合で水素生産を行い、最適な菌体濃度条件を検討した。

また、上述の検討により決定した基質濃度と菌体濃度を用いて、*Rhizopus oryzae* との混合固定化実験を行った。

2.6 分離菌株とセルラーゼ活性測定

分離により得られた菌株のコロニーを、5%小麦ふすま溶液100 ml に加え、200 ml 三角フラスコ中で5日間振とう培養を行った。その後、

培養液を遠心分離にかけて得られた上清を適宜希釈し、フェノール硫酸法を用いて呈色させ、480 nm 波長での糖鎖濃度を測定した。

2.7 有用菌株における培養条件の検討

実験方法2.6において最もよい結果を示した菌株を用いてさらなる培養条件の検討を行った。

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'-GTATTACCGCGCTGCTGG-3'
r2L	5'-CATCGTTTACGGCGTGGAC-3'
r3L	5'-TTGCGCTCGTTGCGGGACT-3'
r4L	5'-ACGGGCGGTGTGTACAAG-3'
926f	5'-AAACTCAAAGGAATTGACGG-3'
f3L	5'-GTCCCGCAACGAGCGCAAC-3'

その際、5%小麦ふすま溶液にグルタミン酸ナトリウム 5.0 g/L, KH₂PO₄ 5.0g/L, MgSO₄ · 7H₂O 1.0 g/L, NaCl 2.0 g/L, Yeast Extract 5.0 g/L, (NH₄)₂SO₄ 1.4 g/L, NaNO₃ 1.0 g/L, KNO₃ 1.0 g/L Urea 1.0 g/L, Peptone 1.0 g/L, Casamino Acid 1.0 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 1.0 g/L, CaCl₂ · 2H₂O 0.4 g/L, Tween80 1.0 g/L をそれぞれ種類ずつ添加したのを用い、好気条件、5日間、30℃でしんとう培養を行い、生成した糖の濃度を硫酸フェノール法を用いて測定した。また、pH による影響を調べるために、pH 4.0 ~12.0 まで0.5 ずつ変化させた5%小麦ふすま溶液を調製し、同様に培養と糖濃度の測定を行った。

2.8 有用菌株を用いた長期間培養実験

実験方法2.6で決定した培地を用いて、好気条件、30日間、30℃でしんとう培養を行い、糖濃度の変化を調べた。また、培養液を遠心分離にかけた際の沈殿物の質量を比較した。

3. 果及び考察

3.1 光合成細菌の分離とその活性評価

東京都及び千葉県内から採取した試料から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。

3.2 セルロース分解菌の活性測定

分離に成功した91種の分離菌株全てにおいて活性測定を行い、その結果の一部をTable 3に示した。表1では生成糖鎖濃度が最も高かった順に5種について示してある。この結果13-14株が最も高い活性を示したことから、以降の実験ではこの13-14株を用いて行った。

3.3 菌株の同定

今回分離した5種の光合成細菌の遺伝子解析の結果、いずれの菌株についても*Rhodobacter sphaeroides*種であることが判明した。また、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。

同様にセルロース分解菌として分離された13-14株の遺伝子解析の結果、*Bacillus halodurans*種であることが判明した。

3.4 分離光合成細菌を用いた水素生産

分離された5種の光合成細菌とRVを用いて乳酸、酢酸、酪酸、コハク酸、リンゴ酸、プロピオン酸、グルコース、及びそれらの混合物を基質として用いた水素生産を行い、その結果をTable 4に示した。全ての菌株において酪酸及びプロピオン酸では水素生産が見られなかった。これは、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。水素生産量で見た場合、乳酸における生産量が全ての菌において最も高く、その次が酢酸または混合物であった。以降はそれぞれの菌株において前後している。全ての菌株が同一の種であることからほぼ同一の代謝経路を有していることが考えられるが、ニトロゲナーゼや有機物の分解に関わる酵素群の活性が異なるために、このような生産量の違いになるものと考えられる。これらの結果から、水素生産能であればI-2A-Kが平均値、混合物共に最も高い値を示したが、最も変換効率がよいのは従来のRVであった。

ただし、実際の有機廃棄物からの水素生産を考えた場合、乳酸からの水素生産が最も高い水素生産量を示していることから、糖質を乳酸発酵で乳酸にまで分解し、光合成細菌で水素を生産させる方法が最も収率のよい生産法であることが考えられる。そのため、今回乳酸からの水素生産量で最も高い値を示したI-2A-H株を今

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

Table 3. Sugar Chain Production of Isolates

	Sugar Chain Concentration (mM)
13-14	6.273
11-10	5.646
11-8	5.075
11-4	4.805
23-10	4.748

Table 4. Hydrogen Production from Organic Acids by The Selected

	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 conversion efficiency (%)	Mixture
RV	262/52	199/59	0/0	192/59	157/51	0/0	190/30	162/36	202/-
I-2A-K	268/53	194/54	0/0	188/44	203/53	0/0	232/25	171/33	268/-
H-1A-I	265/56	215/61	0/0	195/63	74/22	0/0	187/23	150/32	261/-
H-1A-J	233/37	263/81	0/0	199/61	116/37	0/0	208/28	162/35	241/-
I-1A-R	284/46	237/68	0/0	182/49	148/49	0/0	188/25	170/34	254/-
I-2A-H	289/46	196/61	0/0	174/53	180/53	0/0	137/18	168/34	200/-

後の検討に用いることとした。

3.5 I-2A-H 株を用いた最適条件の検討

乳酸濃度の検討では 100 mM の場合が、菌体濃度の検討では OD が 2.5 の場合が最も高い水素生産量を示した。また、これらの結果を用いた *Rhizopus oryzae* との混合固定化実験においては、いずれの場合もほとんど水素の生産がみられない結果になった。これは *Rhizopus oryzae* の活性が高すぎたことによる、培地中の乳酸濃度に伴う pH の上昇が原因であると考えられる。

3.6 セルロース分解菌の培養条件の検討

最も高い活性を示した 13-14 株を用いた培養条件の検討を行った結果、Urea を除く全ての添加物に対して収率の向上が見られた。Sodium Glutamate, Urea, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 , KNO_3 は無機窒素源として、Yeast Extract, Peptone, Casamino Acid は有機窒素源として用いられているものと考えられ、中でも KNO_3 と Yeast Extract が最もよい結果を示した。その他の添加物は無機塩として利用されているものと考えられ、それぞれに収率の向上が見られた。また、pH による影響を調べた結果、pH 7.0 のときに最もよい収率を示した。

以上の結果から、本菌株では、小麦ふすま 50 g/L, KNO_3 1.0g/L, Yeast Extract 1.0g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g/L, KH_2PO_4 5.0 g/L, Tween 80 1.0 g/L, pH7.0 に調製した培地を今後の研究で用いることとした。

3.7 セルロース分解菌を用いた長期間培養実験

結果及び考察 3.6 で決定した培地を用いた 30 日間の培養結果を図 1 に示した。この図から、3 日目をピークに糖濃度が減少し始めていることが分かる。最初期における糖濃度の増加は、フェノール硫酸法では全ての中性糖が検出されてしまうため、菌株が培地中に元から存在していた多糖を単糖に分解したことによって、見かけの糖濃度が増加したためであると考えられる。以降の糖濃度の減少は、菌株そのものの増殖及び生育のために、生成した単糖を分解、消費したためであると考えられる。ただし、培地中不溶性成分は、30 日間で 40.74 g/L から 15.40 g/L へと減少しており、培養液中の不溶性成分であ

るセルロース分を約 62% 分解している。このことから、実際にはセルロースの分解は進んでいたものの、それにより生じた糖の分解が予想以上に速く進んでいたことが分かった。

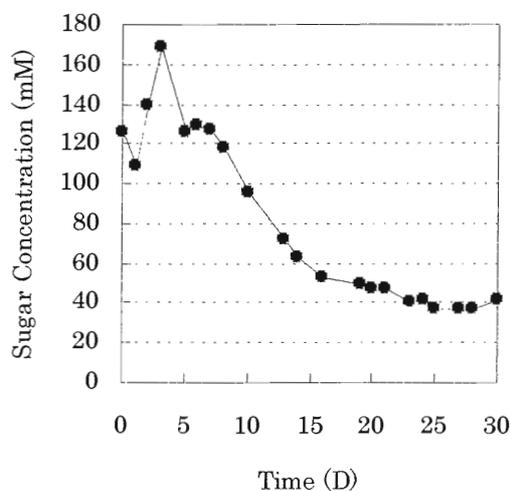


Fig. 1. Long time cultivation of 13-14 strain

4. 結論

高い水素生産能を有する光合成細菌の分離に成功し、その生産条件の検討を行った。しかし、混合固定化については最適条件の決定までは行かず、今後更なる研究が必要である。

また、高セルロース分解能を有する微生物の分離に成功し、その培養条件を決定した。また、この結果を用いて 30 日間の培養実験を行ったが、最終的には予想されていた収率を大きく下回る結果になってしまった。そのため今後、本菌株と乳酸発酵を行う菌との混合培養を行うことで、早い段階から糖を乳酸まで分解させ、培養液中の糖を菌株の増殖及び生育に用いさせない培養方法の検討を行っていくつもりである。

5. 参考文献

- 1) P. P. Edwards, V. L. Kuznetsov and W. I. F. David., "Hydrogen Energy", Philos Transact A Math Phys Eng Sci, (2007) Apr 15:365(1853) p.1043-56
- 2) Sawao Murao, Jinshu Kanamoto, and Motoo Arai., "Isolation and Identification of a Cellulolytic Enzyme Producing Microorganism", J Ferment Technol, (1979) :57: p.151-156