

# 生命・生物工学に基づく健康と疾患の研究グループ

## 微生物変換による *Laminaria japonica* からの水素・エタノール生産に関する研究

日大生産工 神野 英毅, 京大院 清水 晶、井上 國世

本研究は、微生物変換によるバイオマスからの水素・エタノール生産の向上を目的とし行われた。平成 17 年度、18 年度は細菌の混合培養による廃糖蜜からの水素生産を行い、平成 19 年度は高水素生産の光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* I-2A-H を湖沼から単離し、平成 20 年度は *Laminaria japonica* からの *Rhodobacter sphaeroides* による水素生産に関する研究が行われた。本年度は、平成 20 年 3 月に出張した沖縄県の湖沼から得られたセルロース分解菌の分離とそのセルロース分解菌を用いた水素生産・バイオエタノール生産を目的としたセルロース分解菌を用いた *Laminaria japonica* の糖化に関する研究の報告を行う。

### 1. 緒言

近年、二酸化炭素排出による地球温暖化と途上国のエネルギー需要による化石燃料の枯渇が大きな問題となっている。現在、化石燃料の代替となる新しい持続可能エネルギーの研究が盛んに行われており、水素やエタノールをエネルギーに利用する方法が注目されている。すでにエタノールは米国やブラジルにおいて自動車の燃料として、また水素は事業用の燃料電池システムとして市場に投入されつつあり、今後の需要は高まると考えられる。しかし、水素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ことや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実際的でないこと、エタノールはトウモロコシなど食料を原料とすることから食料との競合による価格の高騰など新たな問題が生じている。

そこで、我々は海洋での成育可能な昆布に

着目し、これを原料とした水素・エタノール生産の研究を行っている。昆布は穀物類などに比べ短期間で収穫でき、養殖場所の確保が容易である。さらに、森林が年間に吸収する CO<sub>2</sub> 量の約三倍の量を昆布は生育期に吸収することが報告されている。また、食料として昆布を消費する国は、世界的にみて日本および中国などごく一部であり、食料との競合が少ないため、バイオエネルギー源に適していると考えられる。

さらに、再生可能なエネルギーを利用してそれらを製造する技術、微生物の機能を用いた生物学的製造技術を用い、水素・エタノールを生産することにより再生可能なエネルギーを製造することが期待できる。

本研究では、海洋で養殖した昆布からの水素・エタノール生産を目的とし、土壌からのセルロース分解菌の分離、セルロース分解菌を用いた昆布の前処理（糖化）の検討、高収率水素生産の検討を行った。さらに、得られた水素を燃料電池と組み合わせることにより社会で新エネルギーとして使用できるような環境調和型水素生産プロセスの構築を目的とする。

### 2. 実験方法

#### 2-1. セルロース分解菌の分離・同定

セルラーゼ産生菌の探索と、セルラーゼ活性測定は Murao 等の研究<sup>1)</sup>に従って行った。

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。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。

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、培養液を遠心分離し、得られた上清中の糖鎖濃度をフェノール硫酸法を用いて測定し、菌株のセルラーゼ活性の指標とした。また、高いセルラーゼ活性を示した菌株は、遺伝子解析システム(CEQ8800, Beckman Coulter)にて遺伝子配列を決定し、菌の同定を行った。

次に、高いセルラーゼ活性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。その際、5%小麦ふすま溶液(pH 6.0)にグルタミン酸ナトリウム 5.0 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5.0 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.0 g/L, NaCl 2.0 g/L, Yeast Extract 5.0 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.4 g/L,  $\text{NaNO}_3$  2.0 g/L, Urea 3.0 g/L, Peptone 0.8 g/L, Tween80 1.0 g/Lをそれぞれ一種類ずつ添加した培養液を用いて行った。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、5日間、37℃で培養を行った。培養液中に生成されたセルラーゼの活性測定から、セルロース分解における至適pHを決定した。

## 2-2. *Laminaria japonica* の糖化実験

実験には、バイオマスとして東京湾で生産された真昆布(*Laminaria japonica*)を用いた。

*Streptomyces violaceoruber* (NBRC No. 15146)のコロニーを1つ釣菌し継代用の培地5 mlが入った試験管に継代し、200 rpmで振とうしながら30℃で48時間培養を行った。培養液1.0 mlを継代用の培液200 mlが入ったフラスコに植え継ぎ、さらに200 rpmで振とうしながら30℃で48時間拡大培養を行った。pH 6.0~8.0に調整した実験用培地(*Laminaria japonica* 10 g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  6 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 g/L, NaCl 0.5 g/L,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1 g/L) 200 mlが入った三

角フラスコに拡大培養液1.0 mlを加え30℃、200 rpmで120時間振とう培養しアルギン酸の分解実験を行った。経時的にサンプリングを行い、培養液中に生成されたグルクロン酸濃度をHPLCにより定量した。さらにアルギン酸分解実験後の培養液のpHを4.0に調整し、Cellulaseによる糖化実験を行い、Glucoseの生成を調べることにより、*Streptomyces violaceoruber*によるアルギン酸分解の至適pH条件検討の指標とした。また、Alginate lyaseとCellulaseの混合酵素を用いた実験用培地の糖化量と比較検討した。

*Streptomyces violaceoruber*による昆布分解物のセルロース分解菌(*Bacillus halodurans*)<sup>2)</sup>による糖化実験は、継代用の培地で生育させた*Bacillus halodurans*のコロニーを1つ釣菌し継代用の培地5 mlが入った試験管に植え継ぎ30℃、200 rpmで48時間振とう培養を行った。培養液1.0 mlを継代用の培液200 mlが入ったフラスコに植え継ぎ30℃、200 rpmでさらに48時間の拡大培養を行った。拡大培養液1.0 mlを*Streptomyces violaceoruber*によるアルギン酸分解後の実験用培地が200 ml入った三角フラスコに加え30℃、200 rpmで120時間振とう培養し、培養液をHPLCで分析した。

## 2-3. 水素発生実験

分離した*Rhodobacter sphaeroides* I-2A-H株と*Rhizopus oryzae*を順次拡大培養し、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で再懸濁し、分光光度計を用いて波長600 nm時の吸光度からI-2A-H株のODを1.5、*Rhizopus oryzae*のODを0.15, 0.30, 0.45, 0.60, 0.75, 0.90にそれぞれ調製し、全量を15 mlとした。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。その後、外液として水素生産用培地(有機酸、グ

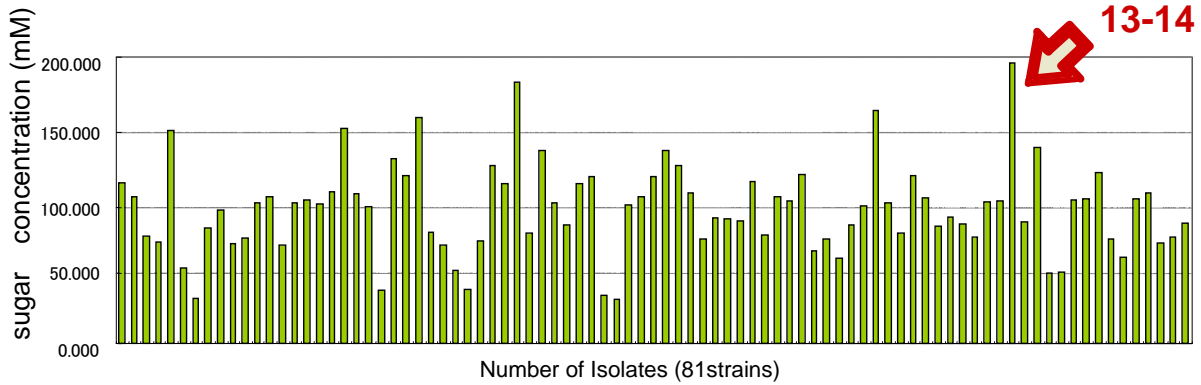


Fig. 1. セルロース分解菌の分離

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 klux) で発生した水素を測定した。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. 結果および考察

#### 3-1. セルロース分解菌の同定と培養条件の検討

沖縄県のサンプルより、81株がセルロース寒天培養液にて分離された。さらにそれらの菌株のセルロース分解能を比較検討した結果、13-14株が最も活性が高いとわかった (Fig. 1)。また 16S rDNA を用いて遺伝子解析を行い 13-14 株を同定した結果、*Bacillus halodurans* であることがわかった。本菌株の培養条件の検討を行った結果を Fig. 2 に示す。この Fig の pH 6.0 の状態を通常状態と考えると、塩化カルシウム、イーストエクストラクト、カザミノ酸の3種の添加物にのみ収率の向上が見られた。この中で塩化カルシウムはカルシウム源として機能していると考えられ、イーストエクストラクトとカザミノ酸は有機窒素源として機能していると考えられる。また、pH による影響では、pH 8.0 のときに最もよい収率を示し、7.70 mM であった。ここから *Bacillus halodurans* によるセルロース分解にお

ける培養は塩化カルシウム、イーストエクスト

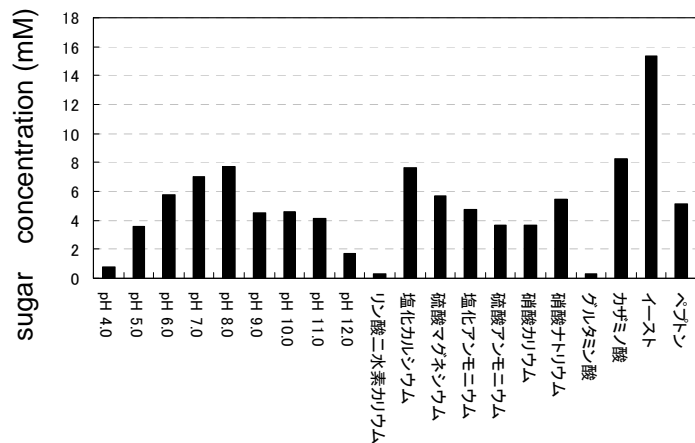


Fig. 2 *Bacillus halodurans* のセルロース分解における培養条件の検討

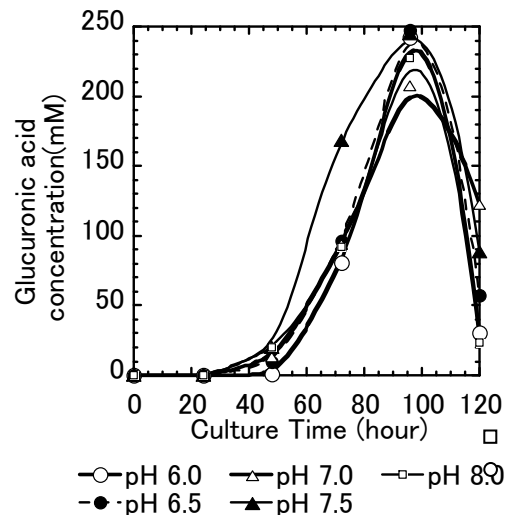


Fig. 3 *Streptomyces violaceoruber* による *Laminaria japonica* のアルギン酸分解条件の検討

ラクトを添加し、pH 8.0 に調製したものを用いることとした。

### 3-2. *Laminaria japonica* の糖化実験

*Streptomyces violaceoruber* を用いて pH 6.0 - 8.0 に調整した昆布培養液のアルギン酸分解培養を行った結果、すべての pH 条件においてグルクロン酸が生成され、その生成量に大きな差は見られなかった (Fig. 3)。しかし、その分解産物を pH 4.0 に調整し Cellulase により糖化した結果、生成されたグルコース濃度は pH 8.0 でアルギン酸を分解した培養液が最も高いことがわかった (45.5 mM)。よって、*Streptomyces violaceoruber* による昆布分解の至適 pH は 8.0 であると示唆された。

さらに、*Streptomyces violaceoruber* により分解物された昆布を *Bacillus halodurans* を用いてグルコースへ糖化させた結果を Fig. 4 に示す。pH 7.5 において最もグルコースを生成し、培養 24 時間で 85.5 mg/l 生成された。

### 3-3. 水素発生実験

*Rhizopus oryzae* の OD をそれぞれ検討した結果、OD=0.75 のときが水素生産量、対糖収率共に最も高く、それぞれ 404 ml, 7.14 mol H<sub>2</sub>/mol glucose であった。しかし、この値は RV を用いた研究に比べ、対糖収率は低くないものの、水素生産量は低く、更なる培養条件の検討が必要といえる。

## 4. 結論

高セルロース分解能を有する微生物の分離に成功し、それらの更なる培養条件の検討を行い、収率を向上させる幾つかの条件を発見すると共に、I-2A-H 株と *Rhizopus oryzae* の混合培養実験に成功した。また、微生物の生育や代謝に影響を与える物質や外的因子は今回の報告で示したものの以外にも、存在していることから、以降も継続して培養条件の検討を行っていくことで、更なる収率の向上が見込めるものと考えられる。

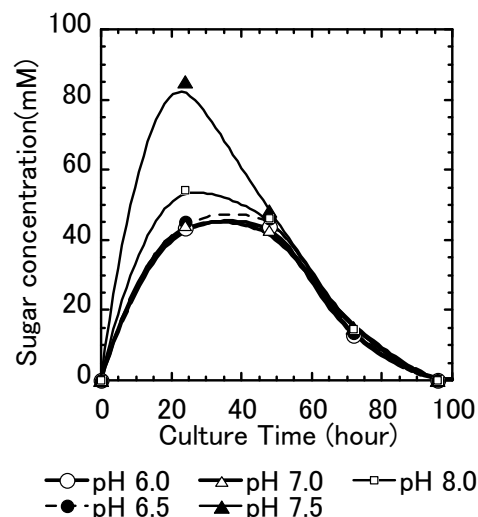


Fig. 4 *Streptomyces violaceoruber*による昆布前処理液の *Bacillus halodurans* を用いた糖化実験

さらに、バイオエタノール生産における昆布の糖化研究においては、*Streptomyces violaceoruber* によって pH 8.0, 120 時間 *Laminaria japonica* を分解させたものにおいて、最適な糖化条件は pH 7.5 で 24 時間 *Bacillus halodurans* に分解物を代謝させることだと言える。グルコースを 85.5 mg/l 生成した。

本研究により、昆布やふすま等のセルロース分からのバイオエタノールやバイオ水素の生産は有効な細菌を混合培養することにより可能であることを示唆した。

## 参考文献

- 1) Sawao Murao, Jinshu Kanamoto, and Motoo Arai., *J. Ferment. Technol*, **57**, 151-156 (1979)
- 2) Susumu kohata, Toshihisa sumi, Kohei, Tanemura, Takashi sakamoto, Makoto shimada, Makiko asakawa, *J. Technology and Education*, **15(1)**, 1-10 (2008)
- 3) 三宅 統, 山崎正幸, 河井重, 橋本 渉, 三上文三, 村田幸作, 応用微生物学研究, **2(2)**, 103-111 (2004)