

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

日大生産工(院) ○小林 淳平

日大生産工 神野 英毅

1 緒言

水素は燃焼による炭酸ガスの発生が無い
ため、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、将来的な不安が大きいといえる。ま
た、これらの方法は副生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大
きい一方、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
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。

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。
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 (1.5~3
klux)・嫌気条件下で呈色するまで (約 10 日
程度) 培養する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 (1500
~3000 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。

Study on screening, identification and evaluation of photosynthetic bacteria from
environment for hydrogen production

Jyumpei KOBAYASHI and Hideki KOHNO

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。

Table 1. Primers for 16S rRNA gene

プライマー の名称	塩基配列
27f	5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTAG-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'

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 (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 分間静置する (Fig. 1)。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) に置

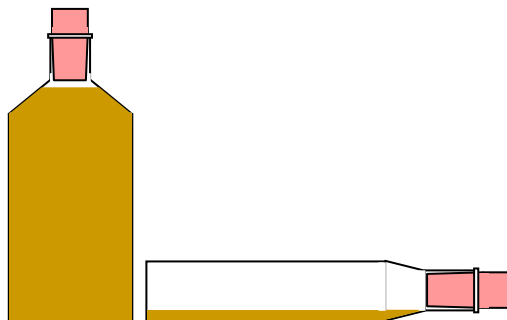


Fig. 1. Immobilization of the microorganisms in Roux bottle

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。

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

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。

Table 3. Identification of isolates

	解析塩基対(bp)	相同性(%)	候補として挙げられる種
I-2A-K	261	100	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>
H-1A-I	1375	99	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>
H-1A-J	1163	99	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>
I-1A-R	1199	99	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>
I-2A-H	1250	99	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>

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. 2-7 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、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、その次が酢酸であるが、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菌種であるため、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それぞれ異なるために、このような生産量の違いとなって現れてく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-H が最も高い値を示したが、最も変換効率がいいのは従来の RV であった。

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

	Lactate	Acetate	Butyrate	Succinate	Malate	Propionate	Glucose	Average
	(hydrogen production rate(ml/mg h)/substrate conversion efficiency (%))							
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

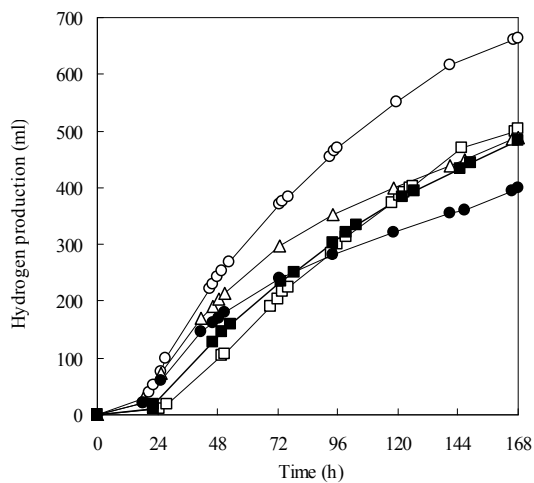


Fig. 2. Time course of hydrogen production in RV strain. Symbols: Lactate, ○; Acetate, □; Succinate, △; Malate, ●; Glucose, ■

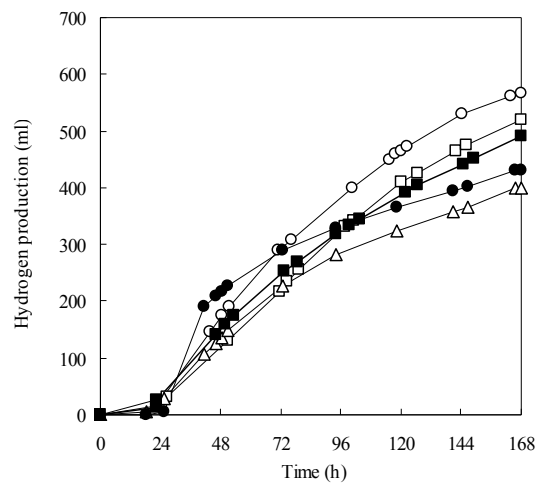


Fig. 3. Time course of hydrogen production in I-2A-H strain. Symbols: Lactate, ○; Acetate, □; Succinate, △; Malate, ●; Glucose, ■

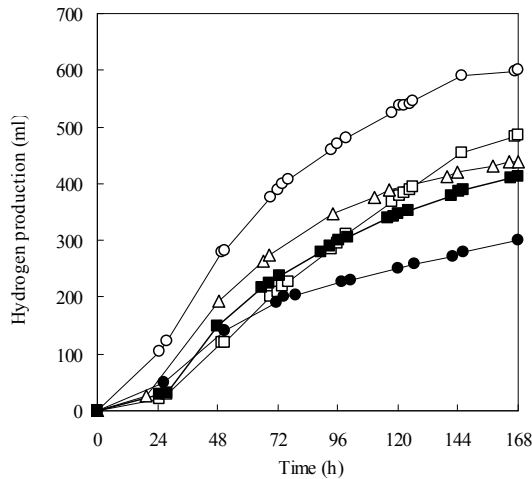


Fig. 4. Time course of hydrogen production in H-1A-I strain. Symbols: Lactate, ○; Acetate, □; Succinate, △; Malate, ●; Glucose, ■

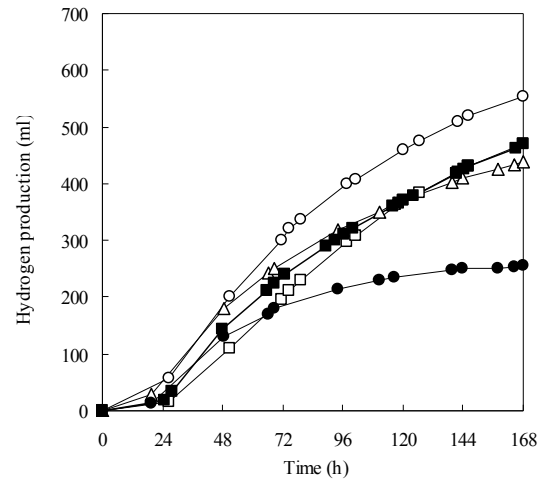


Fig. 5. Time course of hydrogen production in H-1A-J strain. Symbols: Lactate, ○; Acetate, □; Succinate, △; Malate, ●; Glucose, ■

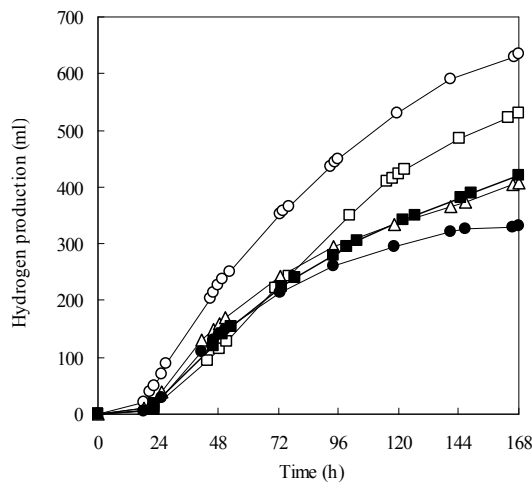


Fig. 6. Time course of hydrogen production in I-1A-R strain. Symbols: Lactate, ○; Acetate, □; Succinate, △; Malate, ●; Glucose, ■

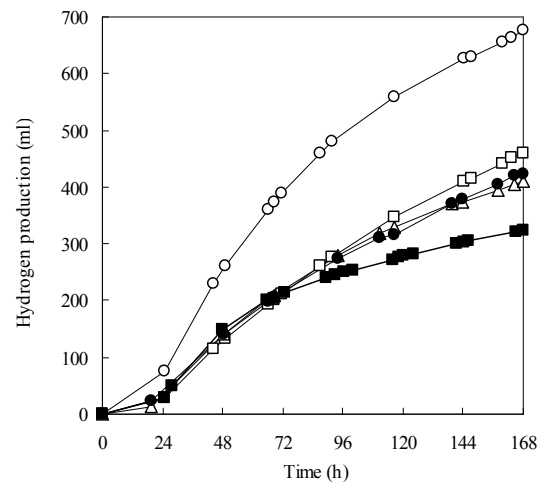


Fig. 7. Time course of hydrogen production in I-2A-H strain. Symbols: Lactate, ○; Acetate, □; Succinate, △; Malate, ●; Glucose, ■

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