

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

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、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その重要性も増してきている。しかし、水素は化石燃料などとは異なり、一次エネルギーではないため、何らかの方法で生産する必要がある。今現在の工業的な水素生産法では、原料に、天然ガス、石炭や重炭化水素が用いられているが、このような生産法は経済面での恩恵が大きい反面、天然資源を生産に用いているため、化石燃料の代替物としての観点から考えた場合、大きく矛盾しているといえる。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といえる。

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。しかし、生産に時間がかかり大量生産が難しいという点において改良・改善の余地がある。

これまで新規光合成細菌の探索を行い、従来用いられてきた光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* RV よりも高い水素生産能を示す I-2A-H 株を得ることに成功した。

そこで、実質的な水素生産を視野に入れ、

I-2A-H 株と乳酸発酵菌 *Rhizopus oryzae* の混合培養条件の検討と、実際の有機廃棄物の多くをセルロースが占めることから、前年度に分離した高セルラーゼ活性菌の条件検討を行うこととした。

2. 実験方法

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¹⁾に従って行った。

2.1 有用菌株における培養条件の検討

前年度までの実験において、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)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 2.0 g/L、Urea 3.0 g/L、Peptone 0.8 g/L、Tween80 1.0g/L をそれぞれ一種類ずつ添加したものをを用いて行った。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℃で培養を行い、培養液中に生成されたセルラーゼの活性を測定した。

2.2 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)。

Isolation and identification of useful microorganisms for bio-hydrogen production from
environmental microorganisms

Jyumpei KOBAYASHI and Hideki KOHNO

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(図 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) で発生した水素を時間ごとにプロットした。発生した水素を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。

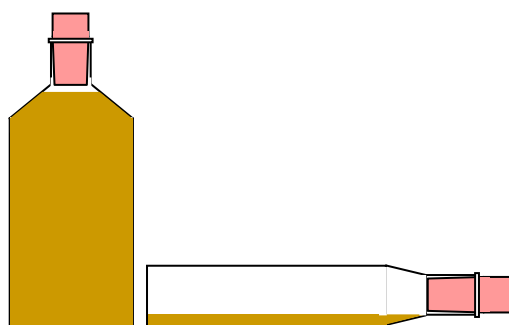


図 1. ルー型培養ビン中での微生物の固定化

3. 結果及び考察

3.1 有用菌株における培養条件の検討

菌株として最も高い活性を示した 31-1 株を用いてさらなる培養条件の検討を行った結果を図 2 に示した。この図の pH 6.0 の状態を通常状態と考え、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、7.700 mM であった。

ここから 31-1 株の培養は塩化カルシウム、イーストエクストラクトを添加し、pH 8.0 に調製したものを以降の研究で用いることとした。

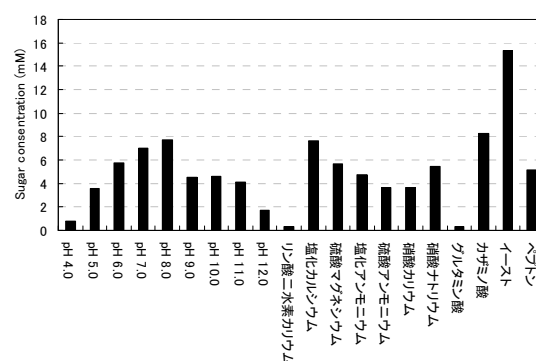


図 2 有用株の培地条件検討

3.2 水素発生実験

Rhizopus oryzae の OD をそれぞれ検討した結果、OD=0.75 のときに水素生産量、対糖収率共に最も高く、それぞれ 404ml、7.14 mol H₂/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。

5. 参考文献

- 1) Sawao Murao, Jinshu Kanamoto, and Motoo Arai. Isolation and Identification of a Cellulolytic Enzyme Producing Microorganism. J Ferment Technol 1979;57:151-156