

## 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  
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  
の発展と共にその重要性も増してきている。  
しかし、水素は化石燃料等とは異なり、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。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大  
きい。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<sup>1)</sup>に従って行った。

#### 2.1 有用菌株における培養条件の検討

以前の研究において、高いセルラーゼ活性  
を示した菌株 *Bacillus halodurans* を用いて  
さらなる培養条件の検討を行った。その際、  
pH を 6.0 に調整した 5 %小麦ふすま溶液に  
1.0 g/L の  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  
 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)\text{Cl}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  
 $\text{KNO}_3$ , sodium glutamate, urea, yeast  
extract, peptone, and casamino acid をそれ  
ぞれで 1 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

---

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

Jyumpei KOBAYASHI and Hideki KOHNO

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。また、産生されたセルラーゼの pH による活性への影響を検討するため、pH を 4.0 から 12.0 まで 1.0 ずつ変化させた 1%小麦ふすま溶液と酵素液を等量混合し、24 h, 37 °C でインキュベートした後、生成された糖濃度を DNS 法を用いて測定した。その後、決定された条件を用いて培養と分解を合計で 30 日に設定し、それぞれ A(5 日、25 日)、B(10 日、20 日)、C(15 日、15 日)、D(10 日、20 日)、E(5 日、25 日)の酵素生成とふすま分解を行い最適な生成期間と分解期間の組み合わせを検討した。

## 2.2 水素生産実験

以前の研究で分離した光合成細菌 *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 0.10 から 1.20 まで 0.10 ずつそれぞれ変化させて調製し、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) で生産され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。また、それにより決定した *Rhizopus oryzae* 濃度を用いて、同様の方法で *Bacillus halodurans* による 30 日間の分解を行った小麦ふすま溶液を用いた水素生産を行った。小麦ふすま溶液はオートクレーブによる滅菌を行った後、遠心分離(9000 rpm×15min)にかけ、その上

清を体積比で 50.0%、25.0%、16.7%、12.5% に希釈して用いた。

## 3. 結果及び考察

### 3.1 有用菌株における培養条件の検討

*Bacillus halodurans* のセルラーゼ生成に pH が与える影響を Table 1 に示した。この表では pH 6.0 の状態を基準として、増加・減少の割合を%で示してある。この表からセルラーゼを最も産生しやすい pH は 9.0 のときであることがわかる。また、全体的に塩基性状況下でセルラーゼ産生量が増加していることがわかるが、これは *Bacillus halodurans* が好塩基性菌であるためと考えられる。次に培地成分の影響を Table 2 に示した。この表から無機塩ではリン酸二水素カリウム、塩化カルシウムが生成量を増加させることが分かった。また無機窒素源では硝酸ナトリウム、有機窒素源ではペプトンが最も生産量を増加させることが分かった。これらの結果からセルラーゼ産生用の培養液の成分を  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0g/L、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1.0g/L、 $\text{NaNO}_3$  1.0 g/L、Peptone 1.0 g/L と決定し、pH を 9.0 とした。このようにして生成されたセルラーゼに pH が与える影響を Table 3 に示した。この表から生成セルラーゼは pH 8.0 のときに最も高い活性を示すことが分かった。以上の検討をもとに決定した培養条件・分解条件を用いて合計 30 日の酵素生成と分解反応を行った結果を表 4 に示した。この結果から条件 C が最も小麦ふすまの分解に適していることが分かった。条件 D、E において極端に糖の生成が減少しているのは、セルラーゼの分解の際に小麦ふすまから副生成物として生じるリグニンによるセルラーゼの阻害によるものと考えられる。

Table 1 The pH Effect of Cellulase  
Producing by *Bacillus halodurans*

| Culture<br>pH | Sugar concentration<br>increase or decrease rate (%) |
|---------------|------------------------------------------------------|
| 4.0           | -100.000                                             |
| 4.5           | -13.208                                              |
| 5.0           | -13.585                                              |
| 5.5           | -14.491                                              |
| 6.0           | 0.000                                                |
| 6.5           | 8.830                                                |
| 7.0           | 42.113                                               |
| 7.5           | 79.245                                               |
| 8.0           | 81.208                                               |
| 8.5           | 99.396                                               |
| 9.0           | 113.660                                              |
| 9.5           | 71.698                                               |
| 10.0          | 69.509                                               |
| 10.5          | 68.679                                               |
| 11.0          | 42.264                                               |
| 11.5          | 14.491                                               |
| 12.0          | -100.000                                             |

Table 2 The Medium Components Effect of  
Cellulase Producing by *Bacillus halodurans*

| Added component                  | sugar<br>concentration<br>increase or<br>decrease rate (%) |
|----------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Potassium<br>dihydrogenphosphate | 70.732                                                     |
| Magnesium sulfate<br>hexahydrate | -17.073                                                    |
| Calcium chloride<br>dihydrate    | 14.634                                                     |
| Sodium chloride                  | -29.268                                                    |
| Potassium nitrate                | 156.098                                                    |

|                   |         |
|-------------------|---------|
| Sodium nitrate    | 61.707  |
| Ammonium sulfate  | 55.610  |
| Ammonium chloride | 70.732  |
| Sodium glutamate  | -21.951 |
| Urea              | -15.122 |
| Yeast Extract     | -43.902 |
| Pepton            | 186.585 |
| Casamino Acid     | 129.268 |

Table 3 The pH Effect of Produced  
Cellulase by *Bacillus halodurans*

| Solution<br>pH | sugar concentration increase<br>or decrease rate (%) |
|----------------|------------------------------------------------------|
| 4.0            | -100.000                                             |
| 5.0            | -9.998                                               |
| 6.0            | 0.000                                                |
| 7.0            | 9.982                                                |
| 8.0            | 129.979                                              |
| 9.0            | 39.993                                               |
| 10.0           | 39.993                                               |
| 11.0           | -40.010                                              |
| 12.0           | -100.000                                             |

Table 4 The pH Effect of cellulase  
producing by *Bacillus halodurans*

|   | Culture<br>(D) | Degradation<br>(D) | Produced<br>sugars (mM) |
|---|----------------|--------------------|-------------------------|
| A | 5              | 25                 | 26.284                  |
| B | 10             | 20                 | 38.256                  |
| C | 15             | 15                 | 64.793                  |
| D | 20             | 10                 | 7.946                   |
| E | 25             | 5                  | 0.611                   |

### 3.2 水素生産実験

*Rhizopus oryzae* の OD をそれぞれ検討した結果、を Table 5 に示した。この表から *Rhizopus oryzae* の OD が 0.60 の場合に水素生産量が 906 ml と最も高かったことがわかる。以上の結果から *Rhizopus oryzae* の OD を 0.60 に設定し、*Bacillus halodurans* による分解小麦ふすま溶液を用いて水素生産を行った結果を Table 6 に示した。その結果、50%と 25%の場合は水素生産そのものが見られなかったが、16.7%と 12.5%の場合にわずかに水素の生産が見られた。ただしこの水素は前培養の段階における GL 培地由来の乳酸による水素と考えられる。50%と 25%の場合に、GL 培地由来の乳酸による水素生産すら見られなかったのは、培地中に生成されていたリグニン等何らかの阻害物質の濃度が高すぎたために菌の代謝・生育が正常に機能していなかったためである可能性が考えられる。また、それ以外にも糖の生成が行なわれていたものの、*Rhizopus oryzae* が乳酸発酵を行える段階まで糖が低分子化されていなかった可能性も考えられる。

Table 5 Effect of *Rhizopus oryzae* OD in co-culture hydrogen production

| OD of <i>Rhizopus oryzae</i> | Hydrogen production (ml) |
|------------------------------|--------------------------|
| 0.1                          | 775                      |
| 0.2                          | 795                      |
| 0.3                          | 823                      |
| 0.4                          | 850                      |
| 0.5                          | 876                      |
| 0.6                          | 906                      |
| 0.7                          | 880                      |
| 0.8                          | 795                      |
| 0.9                          | 763                      |

|     |     |
|-----|-----|
| 1.0 | 720 |
| 1.1 | 685 |
| 1.2 | 652 |

Table 5 Effect of *Rhizopus oryzae* OD in co-culture hydrogen production

| Degradation wheat bran solution dilution percent (%) | Hydrogen production (ml) |
|------------------------------------------------------|--------------------------|
| 50                                                   | 0                        |
| 25                                                   | 0                        |
| 16.7                                                 | 15                       |
| 12.5                                                 | 90                       |

### 4. 結論

高セルロース分解能を有する微生物 *Bacillus halodurans* 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、光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* I-2A-H 株と *Rhizopus oryzae* の混合培養水素生産実験に成功した。しかし、ふすま分解液からの水素生産はほぼ、もしくは全く行われておらず、その原因を確認する必要がある。ふすま分解液の希釈率をさらに高くすることや、それらにグルコースを加えた培地で水素生産が行われるかどうかを確認することで、阻害の有無を確認し、ふすま分解液中に存在する *Rhizopus oryzae* が分解可能な種類の糖を詳細に分析する必要がある。

### 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