

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

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菌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、実際の有機廃棄物の多くを占めるセルロースの高分解性菌の探索を行うこととした。

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 菌株の分離

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 °C 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。

2.2 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、480nm 波長での糖鎖濃度を測定した。また、上述の方法と同様にして得られた上清 0.1 ml を 0.02 M 酢酸緩衝液に CM セルロース、微結晶性セルロース、小麦ふすまをそれぞれ溶解させたセルロース溶液 0.1 ml と反応させ、生成された還元糖を同様にフェノール硫酸法を用いて測定した。反応時間は CM セルロースの場合は 10 分間で、微結晶性セルロース、小麦ふすまはそれぞれ 100 分、24 時間であった。

2.3 有用菌株における培養条件の検討

実験方法 2.2、において、菌株、セルラーゼ活性それぞれ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。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、

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

Jyumpei KOBAYASHI and Hideki KOHNO

KH_2PO_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 をそれぞれ種類ずつ添加したものをを用いて行った。

3. 結果及び考察

3.1 菌株の分離

実験方法 2.1 の項で述べた通りに分離操作を行った結果、91 種の菌株を分離することに成功した。コロニーの色や形状から判断して、多種多様な菌種が存在しているものと考えられる。

3.2 分離菌株の活性測定

分離菌株全てにおいて活性測定を行い、その結果の一部を表 1 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。また、表 2 では生成されたセルラーゼ活性測定において、その平均値が最も高かった順に 5 種について示してある。これらの結果を比較すると、両場合においても高い活性を示しているものが居らず、菌そのもののセルロース分解能と、菌体外に産出されたセルラーゼの活性の間に相関が認められないことが分かる。これは菌株の培養条件とセルラーゼ活性測定の条件が異なることに由来しているものと考えられる。

表 1 分離菌株の生成糖鎖濃度

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

表 2 分離菌株セルラーゼ活性

	CM Cellulose (mM)	Micro crystalline Cellulose (mM)	Wheat Bran (mM)	Average (mM)
40-4	2.994	6.610	19.639	9.748
23-2	1.905	9.176	16.175	9.085
31-1	3.772	10.032	10.498	8.100
13-11	2.800	5.793	15.047	7.880
13-5-2	4.083	7.038	11.315	7.478

3.3 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 13-14 株と、セルラーゼとして最も高い活性を示した 40-4 株を用いて、さらなる培養条件の検討を行った結果を表 3 に示した。この表から、13-14 株については全ての添加物に対して収率の向上が見られ、特に Yeast Extract を添加した場合において顕著であった。一方 40-4 株においては、向上が見られたものは KH_2PO_4 と NaCl のみであり、13-14 株と比較した場合全体的に低い結果となった。ただし KH_2PO_4 を用いた場合においては大幅な収率の向上が見られたため、今後の検討次第で、さらなる向上は見込めると考えられる。また、両株での結果の相違に関しては、菌種による、代謝経路の大幅な違いによるものと考えられる。

表 3 有用株の培地条件検討

	Product sugar chain concentration (mM)	
	13-14	40-4
Wheat bran only	6.273	0.836
Sodium glutamate	6.418	0.436
KH_2PO_4	6.600	3.618
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7.273	0.473
NaCl	6.545	1.473
Yeast Extract	8.382	0.200

4. 結論

セルロース分解能、またはセルラーゼ高産生微生物の分離に成功し、それらの更なる培養条件の検討も、収率の向上という結果を示した。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、非常に多く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られ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