

光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* RV株  
による水素生産能に関する研究

平成 20 年 度

三重大学大学院生物資源学研究科  
博士前期課程 資源循環学専攻

水 野 浩 路

複写可

平成 20 年度

修士論文

光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* RV 株  
による水素生産能に関する研究

平成 21 年 3 月

三重大学大学院生物資源学研究科

水野浩路

## 目次

### 第1章 緒論

### 第2章 光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* RV による水素 生産

#### 第1節 目的

#### 第2節 材料と方法

1. 使用した光合成細菌
2. 光合成細菌の前培養
3. ルー flas コを用いた水素生産
4. 大量培養装置を用いた水素生産
5. 測定項目
  - (1) 菌体増加量の測定
  - (2) 有機酸濃度の測定
  - (3) ガス発生量の測定

#### 第3節 結果

#### 第4節 考察

#### 第5節 図表

### 第3章 光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* RV 株の水素生産における光透過率確保のための培養液からの菌体回収の有効性

#### 第1節 目的

#### 第2節 材料と方法

##### 1. 前培養

##### 2. 大量培養装置を用いた水素生産

##### 3. 測定

##### 4. 菌体回収

#### 第3節 結果

#### 第4節 考察

#### 第5節 図表

### 第4章 光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* RV 株の水素生産における光透過率確保のためのグルタミン酸制限の有効性

#### 第1節 目的

#### 第2節 材料と方法

#### 第3節 結果

#### 第4節 考察

#### 第5節 図表

### 第5章 総合考察

### 参考文献

### 謝辞

## 第1章 緒論

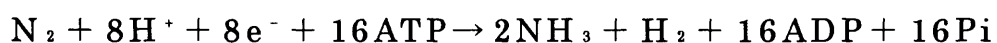
化石燃料の使用によって二酸化炭素など温室効果ガスの大気中濃度の上昇により地球規模の温暖化が問題となっている。また大量消費による資源枯渇も同時に問題となっている。これらの問題を解決するために、化石燃料への依存を脱却し、地球環境への負荷が少なく、資源循環型で得られるエネルギーの早期獲得が必須である。

化石燃料に代わるエネルギーとして注目されているエネルギーのひとつに水素がある。水素は燃焼効率がよく、燃焼後には水しか残らず環境に負荷を与えない。また燃料電池の利用によって電気に直接変換できるなどの利点がある。しかし、地球上では水素は主に化合物として存在し、大気中では **1ppm** を下回る程度しか存在しない。現在水素を生産する一般的な方法はメタンガスを主成分とする天然ガスの水蒸気改質である。この方法では化石燃料に依存しているため、冒頭に挙げた問題の根本的解決にはならない。そのため水素の生産方法について、これまでに多くの研究がなされてきた。その中でもバイオプロセスを経て水素を生産する方法は、その生産過程で環境への負荷が少なく、廃棄されている未利用資源の利用の可能性という点で検討の対象となっている。

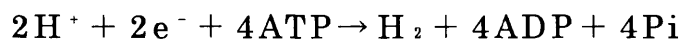
バイオプロセスを経て水素を生産する方法のひとつに光合成細菌による水素生産が挙げられる。光合成細菌とは、太陽からの光エネルギーを利用して生育する通性嫌気性細菌である。生理生態学的特徴により、主に緑色硫黄細菌・紅色硫黄

細菌・紅色非硫黄細菌に分類される。緑色硫黄細菌・紅色硫黄細菌は光合成の反応に硫黄が関与するが、紅色非硫黄細菌は硫黄が関与しない。自然界では土壌・水圏など幅広く存在し、環境条件によって炭酸同化・脱炭酸・窒素固定・脱窒・硫黄化合物の循環などの多くの働きをしている。光合成細菌の紅色非硫黄細菌は酸素を発生しない非酸素発生型光合成を行う。通常は太陽からの光エネルギーを利用して炭素源から還元力を得て、その還元力をもって窒素固定をし、窒素からアンモニアを生成するが、1949年に Gest らによって、窒素制限下で光合成細菌が光合成をすると主にニトロゲナーゼの働きにより水素を生産することが確認された (Gest ら、1949[1])。以来、光合成細菌の水素生産能は持続可能な水素生産システムへの応用が期待されている。

光合成細菌の水素生産は主にニトロゲナーゼによるところが大きい。本来、ニトロゲナーゼは分子状窒素存在下では窒素固定反応を触媒しているが、



窒素非存在下では、



となり、窒素存在下に比べ水素生産を大量に触媒する。

光合成細菌は還元力を得るための炭素源に有機酸・アミノ酸・炭水化物など幅広く代謝することが出来るため、廃水処理に利用されている。光合成細菌の水素生産では、この幅広い基質利用能力を活用して、高いエネルギー利用価値を有しているにもかかわらず、利用されずに廃棄されている未利用

資源から水素を生産する可能性を見出すことが出来る。これまでに廃棄物を利用して水素を生産したという研究報告は以下のものがあげられる。Turkarislan らは *Rhodobacter sphaerodes* O.U.001 株を用いて牛乳工場の廃水からの水素生産を研究した。廃牛乳を単一の炭素源として培養したとき菌の生育は確認できなかったが、廃牛乳とリンゴ酸を混合して培養したとき菌の生育がされただけでなく水素の生産が確認できた[2]。Yetis らは製糖工場からの廃水を炭素源として培養したが、Turkarislan らと同様の結果となった。しかし希釈した廃水をリンゴ酸と混ぜて培養したところリンゴ酸単独での培養と比較できうる速度で水素を生産した[3]。Zhu らは *Rhodobacter sphaerodes* RV 株を用いて豆腐工場の廃水から水素生産を検討した。菌体を寒天に封じ込めて培養を行ったところ水素の生産を確認した[4]。Sasikala らは乳酸発酵工場の廃水から *R.sphaerodes* O.U.001 株を用いて水素生産を行った。水による 0～100% の希釈のすべてで水素生産が確認できた[5]。Eroglu らは *R.sphaerodes* O.U.001 株を用いてオリーブ工場の廃水から水素生産を行った。1～12% の希釈で生育が見られ、4% 以下の希釈で水素の生産が見られた[6][7][8]。

また光合成細菌は水素生産の他に幾つの特長を有している。光合成細菌において光補集の役割をしているポリフィリン核は制癌剤・肝臓薬として利用されており、また飼料として家畜に与えると成長促進・肉質の向上が期待できる。ポリ-3-ヒドロキシ酪酸 (poly(3-hydroxybutyrate):PHB) は光合成

細菌の細胞内に蓄えられるポリエステルで、生分解性プラスチックの原料として利用されている。以上のように光合成細菌の水素生産能と利用できる基質の多様性、またこれらの特長から、光合成細菌の水素生産が注目されている理由となっている。

しかし光合成細菌による水素生産には幾つかの抑制因子があり、その培養はそれらを取り除いた状態で行わなければいけない。水素を生産するニトロゲナーゼは酸素・分子状窒素・アンモニアによって抑制される。酸素はニトロゲナーゼを不可逆的に破壊し、分子状窒素存在下でニトロゲナーゼは窒素固定反応を優先的に行い、水素生産を抑制するのは既に述べたとおりである。よって水素生産を目的とした光合成細菌の培養の気相はアルゴンガスやヘリウムガスなどの不活性の気体で置換される必要がある (Sasikala、1990[9])。またアンモニアは光合成細菌の生育に非常に適した窒素源であるが、アンモニアの存在はニトロゲナーゼの合成を抑制し、ニトロゲナーゼの活性を阻害する (Gest ら、1950[10])。しかし、アンモニアによるニトロゲナーゼへの阻害は可逆的で、アンモニアが消費されたり、取り除かれたりすると活性を回復することがわかっている (Zhu ら、2001[11])。このほかにも培地中の炭素／窒素の比率や、前培養での菌体の活性状態、効率的な光照射など光合成細菌の水素生産を促進するために調整しなければならない条件が多数存在する。また光合成細菌の代謝系は複雑であり、水素生産・好気呼吸・嫌気呼吸・発酵・光独立栄養成長といった代謝パターンを有しているので



培養条件などの違いによって異なった代謝を行ってしまう。  
以上より光合成細菌の水素生産は阻害因子を取り除き、代謝の全体の概観をもって行わなければならない。また光合成細菌によって生産された水素が化石燃料にとってかわるためには、大規模で継続的に生産される必要がある。

本研究では、持続可能な水素生産システムの実用化のため、光合成細菌による水素生産の効率の改善を目的とした。具体的には、有機酸を多く含んだ廃水からの水素生産、または他の微生物の嫌気発酵による水素生産の際に多量に生産される有機酸を含んだ培養液からの水素生産を行うことを考え、有機酸からの水素生産効率の改善と有機酸の消費について検討した。第2章で4リットル容培養装置を用いて、乳酸を主成分とする gL 培地で光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* RV 株を大量培養し、水素生産を行った。これを基本実験とし、条件を変えて行った第3章・第4章での実験結果と比較した。水素生産量の増加や有機酸から水素への基質転換率の上昇を検討し、実験条件の変更の有効性を考察した。

## 第 2 章 光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* RV による水素生産

### 第 1 節 目的

本実験では、第 3 章以降の実験の結果と、水素生産量や基質から水素への転換効率などを比較するために一般的な方法で光合成細菌を培養し、水素生産をおこなった。培地には炭素源として乳酸を含んだ gL 培地（組成は表 1 参照）を用いて、4 リットル容培養装置で培養を行った。培養後の乳酸残量と水素生産量を測定し、水素生産量の増加や基質転換率の基本となるデータを提供する。

### 第 2 節 材料と方法

#### 1. 使用した光合成細菌

本研究では *Rhodobacter sphaeroides* RV 株（以下、*R. sphaeroides* RV 株とする）を使用した。

#### 2. 光合成細菌の前培養

30ml バイアル瓶（マルエム）に 20ml の aSy 液体培地（組成は表 2 参照）を入れた。バイアル瓶内を嫌気状態にし、光合成細菌の水素生産の抑制因子である酸素、および窒素を除去するために、アルゴンガスを培養液と気相に噴入し、ブチルゴム栓で栓をした。アルミキャップ（マルエム）をかぶせ

ハンドキャッパーにて密栓し、加圧滅菌した。1 ml シリンジ（テルモ）を用いて *R.sphaeroides* RV 株を接種した。ハロゲンランプ（仲興産業株式会社）を用いて光を照射した。光度計（LI-COR,Inc.）を用いて光量が 300～350W/m<sup>2</sup>になるように調節して培養を行った。以後、同じ方法で培養・植え継ぎを行った。

### 3. ルーフラスコを用いた水素生産

gL 液体培地を作成し、加圧滅菌した。エタノール殺菌した 200ml のルーフラスコ（株式会社フラット）に 180ml の gL 液体培地を入れ、前培養した *R.sphaeroides* RV 株を培養液とともに接種した。アルゴンガスを充填し、シリコンチューブにつないだロック基吸上針を刺したシリコンキャップで栓をした。アクリル水槽に水を溜め、ヒーターと水流ポンプを用いて水を循環させ、ルーフラスコ内が熱を持ちすぎないように水温を 30℃になるように設定した。ハロゲンランプを用いて光量が 300～350W/m<sup>2</sup>になるように光を照射し、培養した。発生した気体は水上置換で 200ml メスシリンダーに集めた（図 1）。

### 4. 大量培養装置を用いた水素生産

4 リットル容大量培養装置 Bioneer500・5L MDL-8C 制御タイプ（丸菱バイオエンジニアリング）（図 2）を用いて培養を行った。酸化還元電位（ORP）電極と pH 電極 InPro3030（ともにメトラー・トレド株式会社）をそれぞれ校正し培養槽に

取り付けた。gL 液体培地を 4 リットル作成し、培養槽に入れた。培地を入れた培養槽を加圧滅菌した。1N HCl（塩酸（和光純薬株式会社、以下 Wako））と 1N NaOH（水酸化ナトリウム（Wako））を作成し pH 調節剤とした。ルーフラスコを用いた培養で水素の発生が確認できたものを 2 本選び、培養液を 8,000rpm で 10 分間遠心分離をした。上澄みを取り除き沈殿した菌体を gL 液体培地で懸濁した。培養槽にアルゴンガスを充填して嫌気状態にし、溶かした菌体を接種した。培養装置のコントローラーで pH6.8・温度 30℃・攪拌速度 40rpm で培養するように設定した。光量を 300～350W/m<sup>2</sup> に調節にし、外部から中心角が 120 度と等間隔となるように 3 方向よりハロゲンランプを照射し培養した。1 日に 1 回培養液を、5ml シリンジ（テルモ）で採取した。

## 5.測定

### （１）菌体増加量の測定

菌体増加は分光光度計 UV-VIS SPECTROPHOTOMETER UVmini 1240（島津製作）を用いて、採取した培養液を 600nm における吸光度で測定した。

### （２）有機酸濃度測定

培養液中の有機酸濃度の測定は高速液体クロマトグラフィーで測定した。採取した 0.5ml の培養液に 1.5ml の 6% 過塩素酸（Wako）を加え、ボルテックスミキサーを用いて攪拌し 4℃ で 2 時間冷蔵した。5,000rpm で 5 分・5℃ で遠心分離を

した。0.45  $\mu$  m 滅菌フィルターとフィルターホルダー（共に ADVANTEC）を用いて上澄みを濾過してタンパクを除去し、これをサンプルとした。カラムには SCR-102(H)を、検出器には CDD-10Avp（SHIMADZU）を使用した。移動相として 5mM *p*-トルエンスルホン酸一水和物（Wako）を用いた。緩衝液として 5mM *p*-トルエンスルホン酸一水和物、0.1mM Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid（以下 EDTA）（Wako）20mM Bis-Tris（Wako）の組成のものを使用した。

### （3）ガス生産量の測定

ガス生産量は体積式流量計のミリガスカウンター（精度 1ml）（日本フローコントロール株式会社）で測定した。

## 第 3 節 結果

培養期間中の積算ガス生産量（図 3）・ガス生産速度（図 4）・菌体増加量（図 5）・乳酸濃度（図 6）・有機酸濃度（図 7）・酸化還元電位（図 8）・pH（図 9）の推移をそれぞれ第 5 節 図表に示した。光合成細菌 *R.sphaeroides* RV 株をバイアル瓶に入れた光合成細菌生育用の aSy 液体培地で光を照射しながら培養したところ、培養液の色が赤褐色に変わった。続いてルーフラスコに入れた水素生産用の gL 液体培地で培養した。培養開始後から 1 日に 50ml 程度のガスの発生が確認できた。5 日間の培養で 300ml ほどのガスの生産が確認できた。大量培養槽での培養では pH6.8・温度 30℃・攪拌速度 40rpm と

設定された条件で培養することができた。培養開始後からすぐに菌体の増加が、吸光度測定から確認できた。2日目には菌の増加が鈍くなり3日目からはほとんど菌の増加が見られなかった。ガスの発生は1日目から確認できた。図4のガス生産速度のグラフから見られるように、2日目までは盛んに生成していたがそれ以降は鈍くなり、4日目にはほとんど停止していた。図8より酸化還元電位値は水素を生産しているときは $-700\text{mV}$ の値を示していたが、水素の生産が鈍くなるにつれて上昇し、生産が停止したときは $-400\text{mV}$ の値を示していた。pHは培養中6.8から7.0の間を示しており、pH調節が適切に行われていることが確認できた。

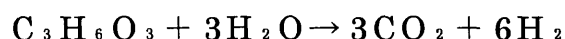
最終的には2.35リットルのガスの発生が確認できた。図4より有機酸濃度の測定では、培養が進むにつれて乳酸が消費されていくのが確認できた。培養開始時の $83.3\text{mM}$ から $65.2\text{mM}$ まで減少していた。また酢酸が $2.80\text{mM}$ 、イソ酪酸が $6.99\text{mM}$ 生成されているのが確認できた。

#### 第4節 考察

aSy 培地の入ったバイアル瓶での培養で、培養液が赤褐色に変化した。光合成細菌 *R.sphaeroides* RV 株はその生態生理学的特徴により紅色非硫黄細菌に分類されており、赤色のカロテノイドの蓄積によって菌体は赤褐色を呈色する。よって *R.sphaeroides* RV 株が生育・増殖したために培養液が赤褐色へと変色したと考えられる。

ルーフラスコでの培養でも培養液が赤褐色に変色しており、*R.sphaeroides* RV 株が生育・増殖したと考えられる。

大量培養装置での培養では乳酸濃度が 83.3mM から 65.1mM まで減少し、18.2mM 消費された。乳酸から水素への転換を最も単純な化学式で表すと以下のようになる。



1 モルの乳酸から 6 モルの水素が生産される。培養液 4 リットルにおいて 18.2mM の乳酸がすべて水素に変換されたとすると 9.79 リットルの水素が生産されることになる。実験値は 2.35 リットルであり、すべて水素であると仮定すると、この値は理論値（水素転換率）の 24.0% にしか相当しない。これは乳酸が菌体増殖や酢酸・イソ酪酸などの副生成物に使われたと考えられる。

また消費された乳酸は培養開始時の値の 21.9% に相当し、培養液中に乳酸が十分残余していることがわかった。これは乳酸が十分残余しているにもかかわらず水素生産が停止したことを意味する。原因のひとつとして、菌体増殖による光透過の遮断が挙げられる。つまり菌体が増殖しすぎたことにより、菌体自身がブラインドとなって光の透過を妨げる。その結果光が内部の菌に届かなくなり、光合成を行うことができず、ガスの発生が停止してしまったと考えられる。

## 第 5 節 図表

表 1. gL 培地組成

### Basal 培地組成（蒸留水 1 リットルあたり）

リン酸水素二カリウム(Wako)	0.75g
リン酸二水素カリウム(Wako)	0.85g
ホウ酸 (Wako)	2.8mg
モリブデン(IV)酸二ナトリウム二水和物(Wako)	0.75mg
硫化亜鉛七水和物（半井化学薬品株式会社）	0.24mg
硫酸マンガン四水和物(Wako)	2.1mg
硫酸銅三水和物(Wako)	0.04mg
塩化カルシウム二水和物(ナカライテスク)	0.75mg
EDTA(Wako)	2.0mg
硫酸マグネシウム七水和物(Wako)	0.2g
硫化鉄七水和物(Wako)	10mg
ビタミン B <sub>1</sub> (ナカライテスク)	3.783mg
ビオチン(Wako)	3.566mg
p・アミノ安息香酸(Wako)	5.25mg
ニコチンアミド(ナカライテスク)	6.48mg

### gL 培地（Basal 培地 1 リットルあたり）

L-グルタミン酸 (Wako)	1.872g
乳酸ナトリウム(Wako)	9.34g
炭酸水素ナトリウム(Wako)	1.5g

pH6.8 に調整



表 2. aSy 培地組成

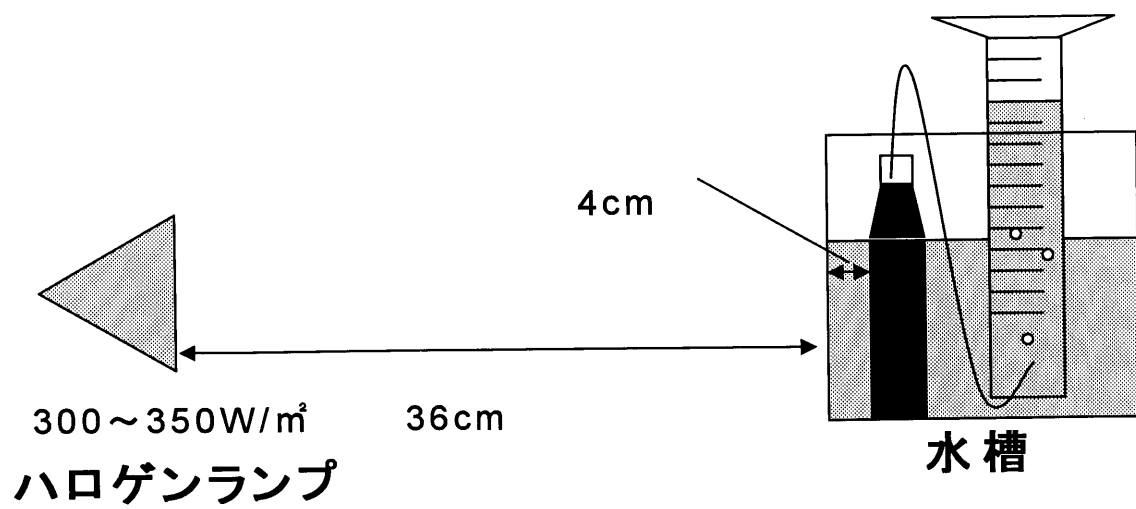
aSy 培地 (Basal 培地 1 リットルあたり)

硫酸アンモニウム(Wako)	1.25g
----------------	-------

コハク酸ナトリウム(Wako)	9.8g
-----------------	------

イーストエクストラスト(ナカライテスク)	1.0g
----------------------	------

pH6.8 に調整



200mlルーフラスコ

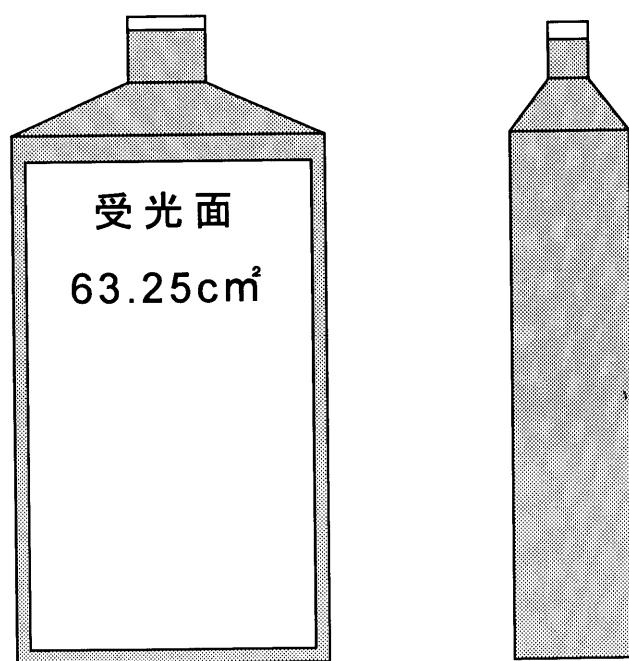


図 1. 実験装置概略図と用いたルーフラスコの仕様

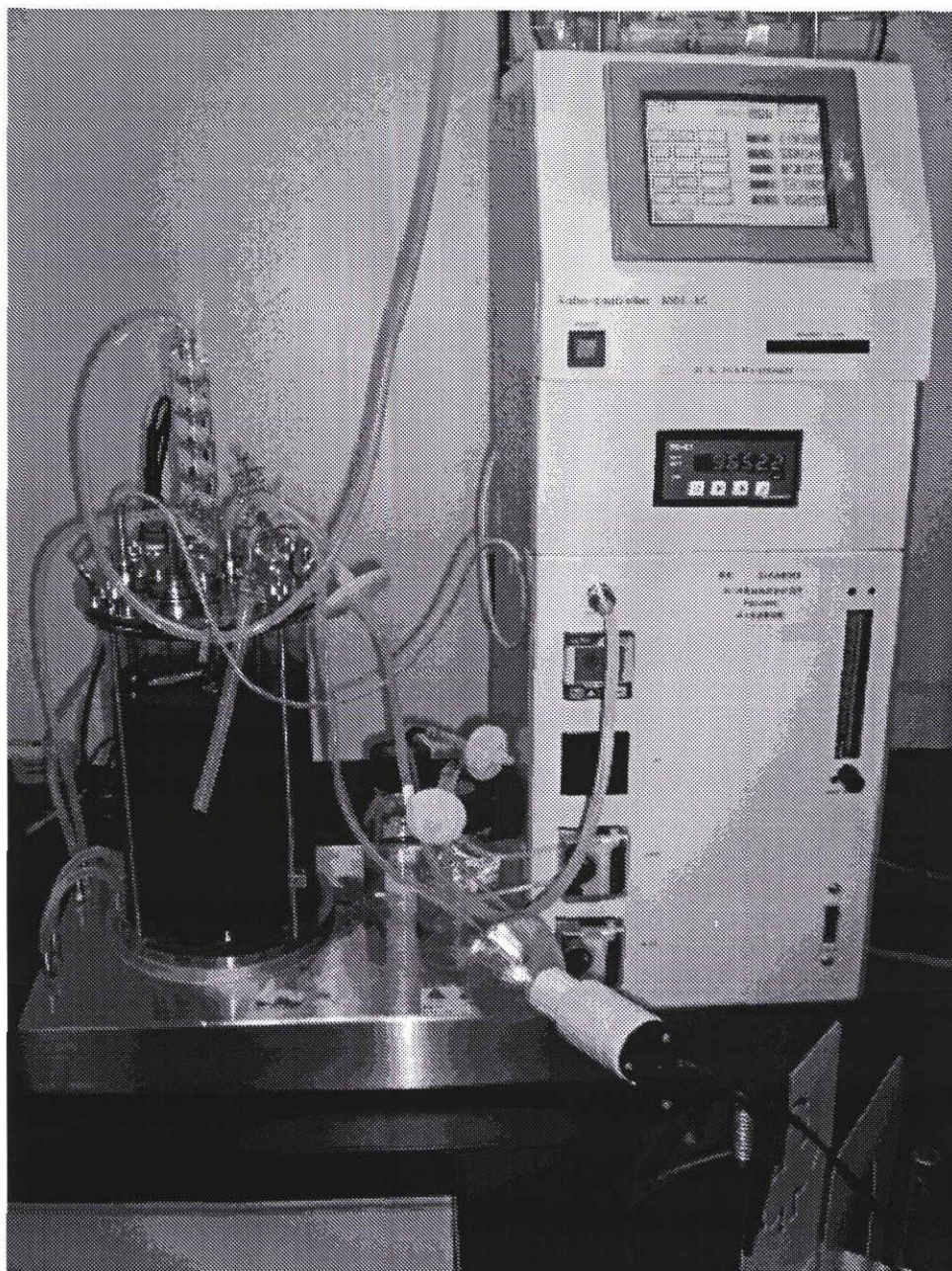


図 2. 使用した大量培養装置  
Bioneer500-5L MDL-8C 制御タイプ  
(丸菱バイオエンジニアリング)

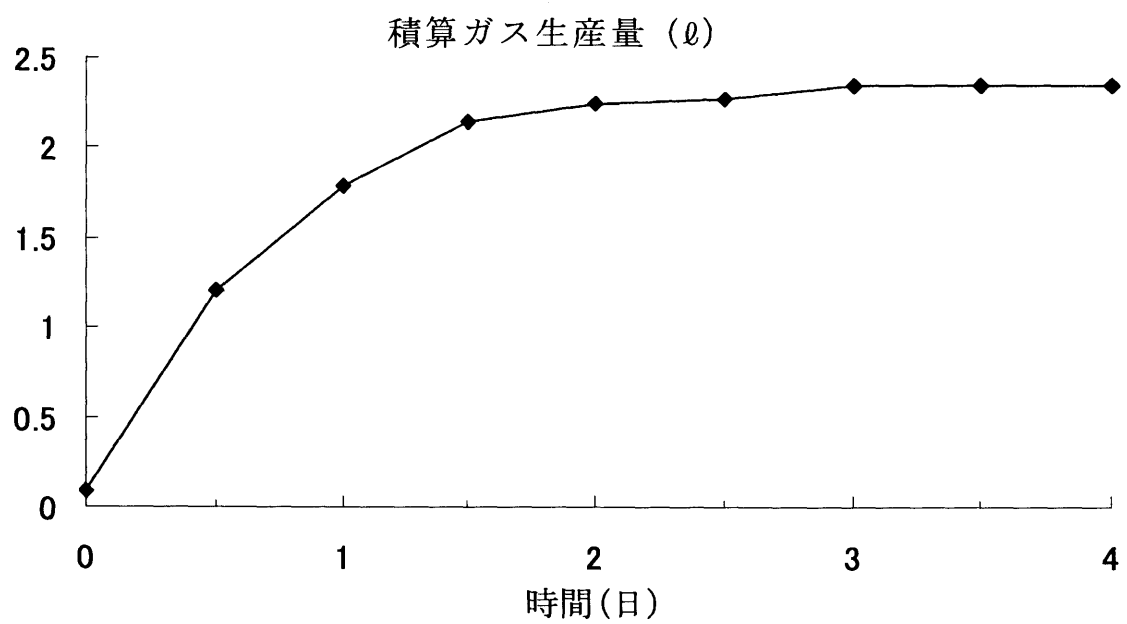


図 3. 培養期間中の積算ガス生産量の推移

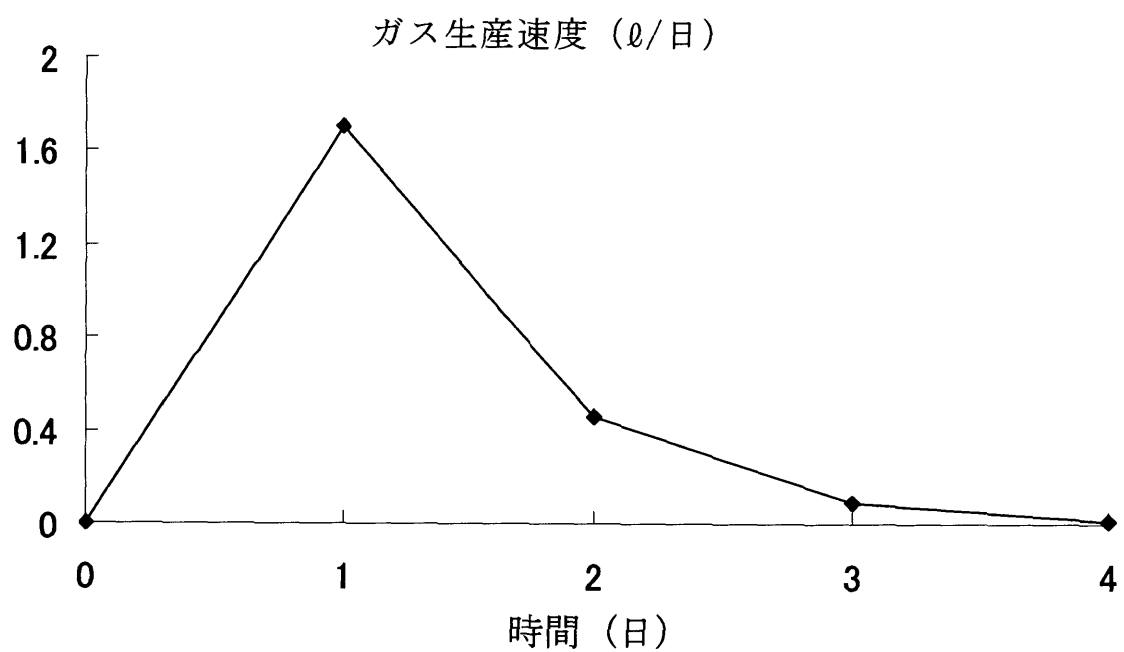


図 4. 培養期間中のガス生産速度の推移

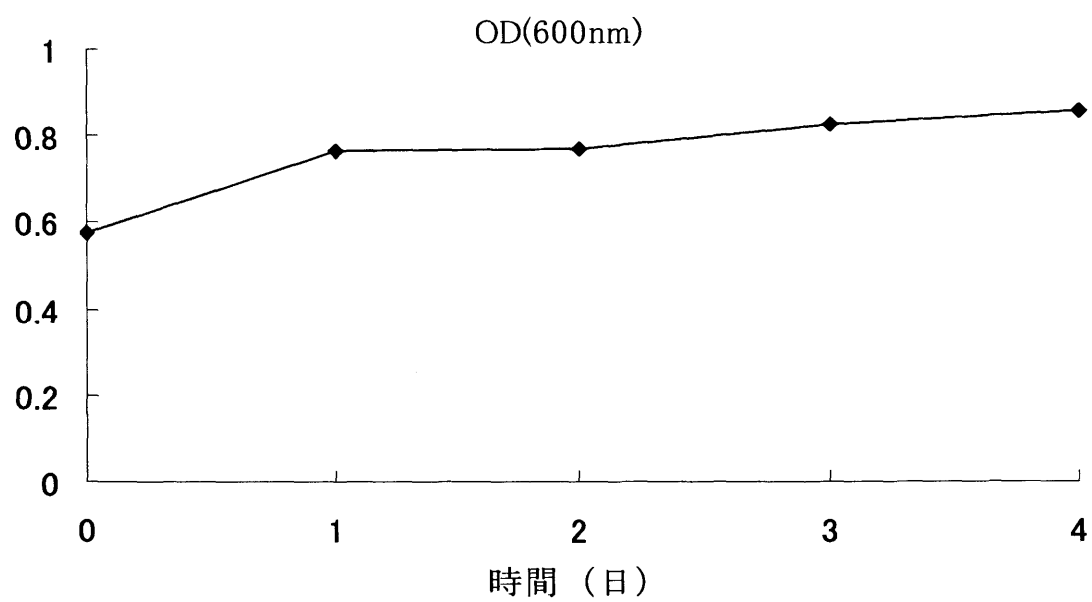


図 5. 培養期間中の菌体増加量の推移

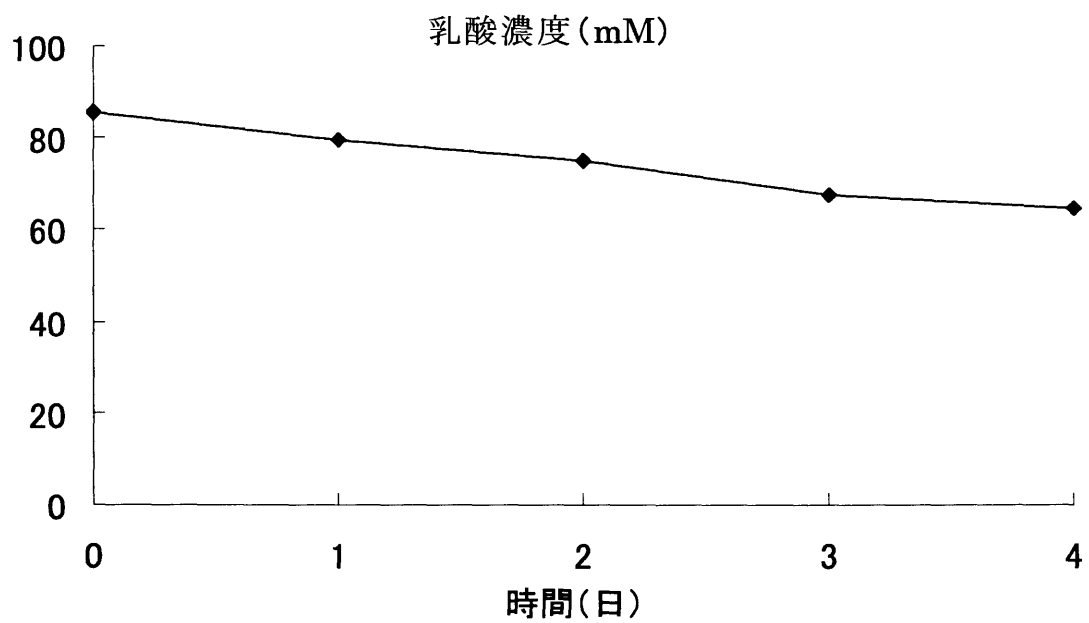


図 6. 培養期間中の乳酸濃度の推移

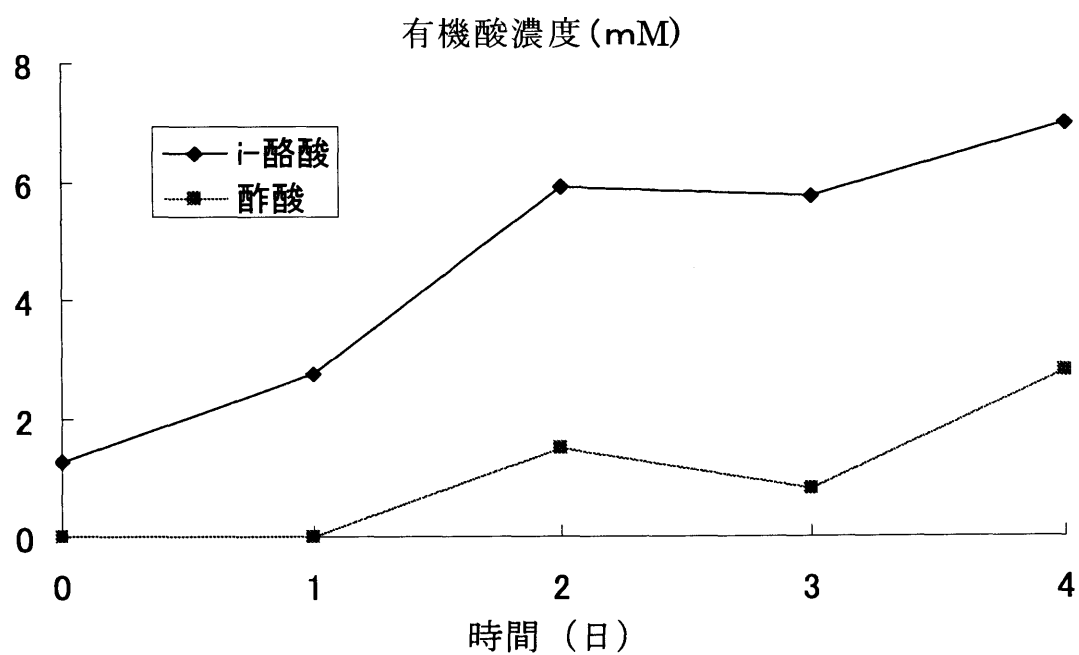


図 7. 培養期間中の培地内の有機酸濃度の推移



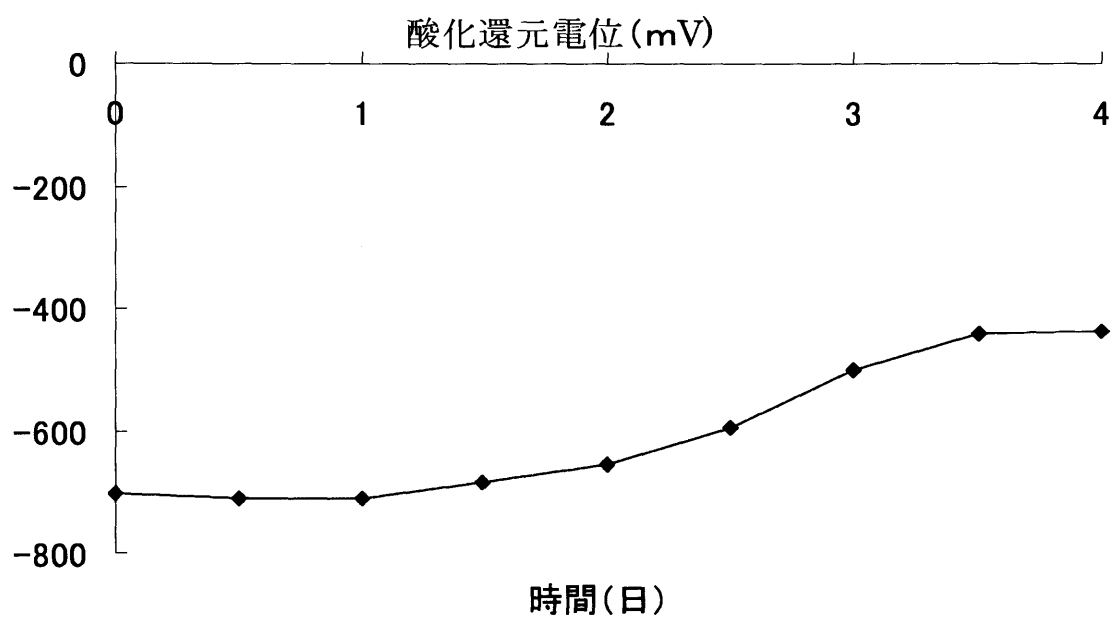


図 8. 培養期間中の酸化還元電位の推移

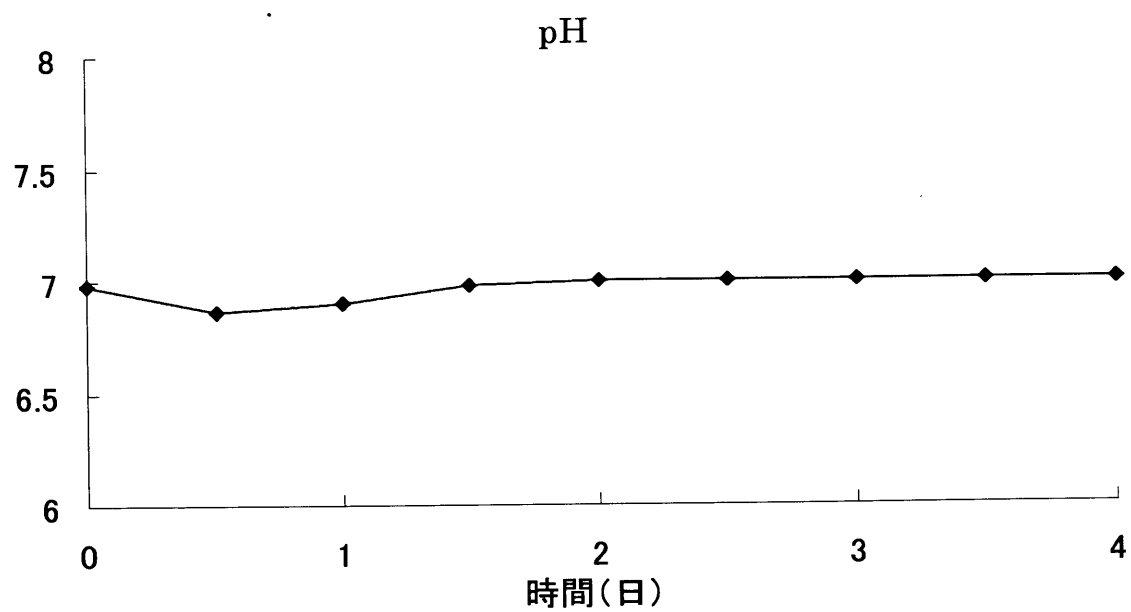


図 9. 培養期間中の pH の推移

### 第 3 章 光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* RV 株の水素 生産における光透過率確保のための培養液からの菌 体回収の有効性

#### 第 1 節 目的

光合成細菌の菌体数が増加することにより遮光され、内部の菌体に光が届かなくなり受光面積が小さくなる。その結果 *R.sphaeroides* RV 株が光合成をしなくなり水素生産が停止したことが第 2 章の実験結果から示唆された。そこで培養開始後水素生産が停止したら培養液から菌体を回収して培地中の菌体密度を小さくし、光の透過率を確保して培養を再開した。この方法が実験結果にどのような影響を与えるかを考察し、第 2 章の実験結果と比較して有効であるかどうかを検討した。

#### 第 2 節 材料と方法

##### 1. 前培養

前述の方法で *R.sphaeroides* RV 株をバイアル瓶で培養し、続けてルーフラスコで培養した。

##### 2. 大量培養装置を用いた水素生産

前述の方法で大量培養装置を用いて培養を行った。1 日に 4 回 6 時間ごと 1 時・7 時・13 時・19 時に培養液を採取した。

### 3.測定

菌体増加量・有機酸濃度・積算ガス生産量を前述の方法で測定した。

### 4.菌体回収

ガスの発生が停止したら、100ml シリンジを用いて培養槽のサンプル採取口より全体量の半分にあたる 2 リットルの培養液を回収した。培養液は 8,000rpm・10 分で遠心分離し、沈殿した菌体を取り除いた。菌体を取り除いた培養液を培養槽に戻し、培養及び培養液の採取を再開した。この操作をガスが生産されなくなるまで繰り返した。

## 第 3 節 結果

培養期間中の積算ガス生産量(図 1)・ガス生産速度(図 2)・菌体増加量(図 3)・乳酸濃度(図 4)・有機酸濃度(図 5)・酸化還元電位(図 6)・pH(図 7)の推移を第 5 節 図表に示した。

今回の実験では実験開始から 3 日目にガスの生産が停止し、菌体回収の操作を行って、培養を再開した。次に実験開始から 5 日目にガスの生産が停止し、菌体回収の操作を行なって培養を再開した。実験開始から 27 日目にガスの生産が停止した。このとき乳酸が完全に消費されていたため、実験を終了した。

1 回目の培養では、培養開始から菌体の増加が見られ、ガ

スの生産も盛んに行われた（図 1）。培養液中の乳酸濃度は培養が進むにつれて減少し、ガスの生産が停止した時には 83.3mM から 67.8mM に減少しており、15.5mM の乳酸が消費されていたことがわかった（図 4）。その他にはイソ酪酸（8.55mM）・酢酸（2.97mM）・酪酸（0.56mM）が生成されていた（図 5）。酸化還元電位値はガスを盛んに生産しているときは  $-700\text{mV}$  の値を示しており、ガスの生産が停止した時は  $-620\text{mV}$  の値を示していた（図 6）。ガスの生産は実験開始から 3 日目で完全に停止した。最終的なガスの発生量は 2.50 リットルであった（図 1）。

2 回目の培養（3 日目から 5 日目の期間）では菌体の増加はほとんど見られなかった。ガスの生産は培養開始から見られた（図 1）。培養液中の乳酸濃度は培養開始時の 66.0mM から 60.5mM まで減少し、5.50mM ほど消費した（図 4）。イソ酪酸（0.05mM）・酢酸（2.45mM）・酪酸（0.46mM）がそれぞれわずかに生成された（図 5）。実験開始から 5 日目にガスの生産が停止した。最終的なガスの生産量は 1.23 リットルであった（図 1）。

3 回目の培養（5 日目から 27 日目の期間）では菌体の増加がわずかにみられた。ガスは培養開始から盛んに生産されているのが確認できた（図 1）。培養液中の乳酸濃度は減少し続け、培養開始から 13 日目に全て消費されているのが確認できた（図 4）。酢酸（13.0mM）・プロピオン酸（11.4mM）・イソ酪酸（6.94mM）が生成されているのが確認できた。乳酸が全て消費された後、酢酸・プロピオン酸濃度が減少していき、

それぞれ  $6.61\text{mM} \cdot 2.59\text{mM}$  となっているのが確認できた（図 5）。酸化還元電位値はガス生産の時は  $-700 \sim -600\text{mV}$  を示していた、徐々に上昇していき、ガスの生産が停止したときは  $-500\text{mV}$  程度まで上昇していた（図 6）。実験開始から 27 日目にガスの発生が停止した。乳酸が全て消費されていたため実験を停止した。

全体的にまとめると、培養期間は 27 日間に及んだ。ガスの生産量の合計は 17.8 リットルとなった。乳酸は全て消費されていた。pH は培養全体を通じて設定した値を示していた（図 7）。

#### 第 4 節 考察

培養開始後すぐに菌体の増加・ガスの生産・乳酸の消費が確認できた。ガスの生産が停止したところで培養を停止し、乳酸が残余していることを確認した。菌体を取り除いて光の透過率を上げて培養を再開したところ、培養再開後からガスの生産を確認することができた。このことからガス生産の停止の原因が菌体増殖による光透過の遮断であることがわかった。

1 回目の培養で消費した乳酸は  $15.5\text{mM}$  で全体の 18.6% に相当する。ガスの発生量は 2.50 リットルですべて水素であると仮定すると、消費された乳酸から得られる水素発生量の理論値の 30.0% に相当し、これらの乳酸消費率・水素転換率の値は第 2 章での実験の値と大差がないことがわかった。

そこで菌体を回収して 2 回目の培養を行い、再びガスの生産が停止して、再度菌体を回収し 3 回目の培養を行った。

3 回の培養の結果、乳酸はすべて消費された。ガスの生産量は 17.8 リットルとなり、消費された乳酸からの得られる水素発生量の理論値の 39.7% に相当する。

また培養開始から 20 日目に乳酸がすべて消費された後も、ガスの発生が見られた。このとき酢酸・プロピオン酸の減少が見られたことから、*R.sphaeroides* RV は乳酸を消費した後も、酢酸・プロピオン酸から水素を生産していることが示唆された。

これらのことから、菌体を回収して光の透過率を上げる培養方法は効率的かつ継続的な水素生産に有効な方法であるといえる。

一方で、乳酸から水素への転換率が 39.7% と低い値になった。これは、菌体増加や酢酸 (10.1mM)・プロピオン酸 (8.84mM)・イソ酪酸 (14.0mM) といった副生成物の生成に乳酸が使われたと考えられる。

## 第 5 節 図表

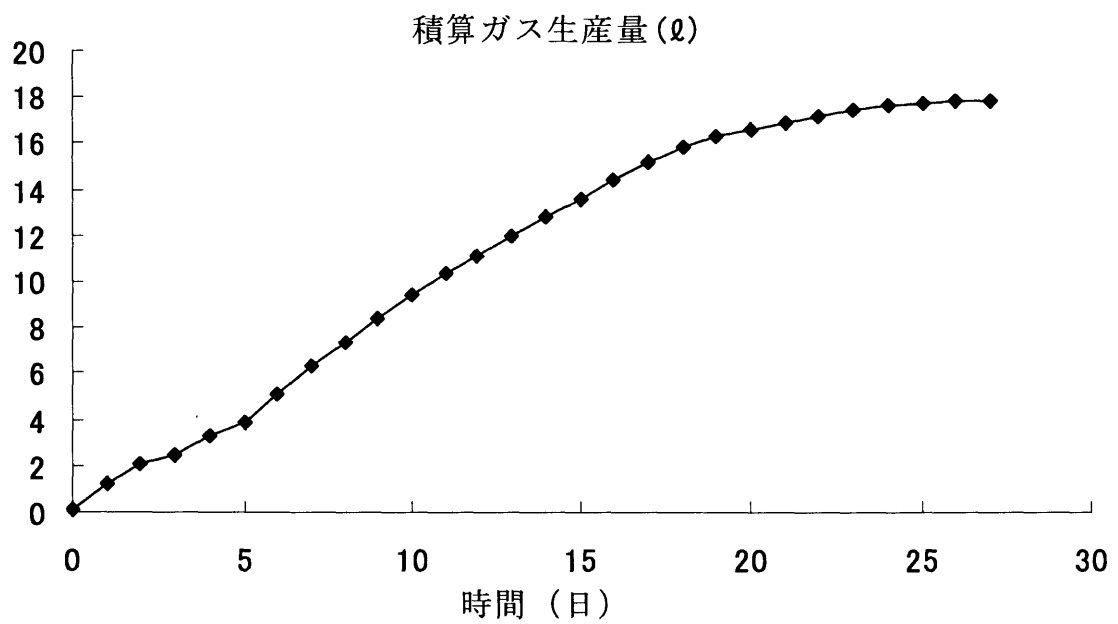


図 1. 培養期間中の積算ガス生産量推移



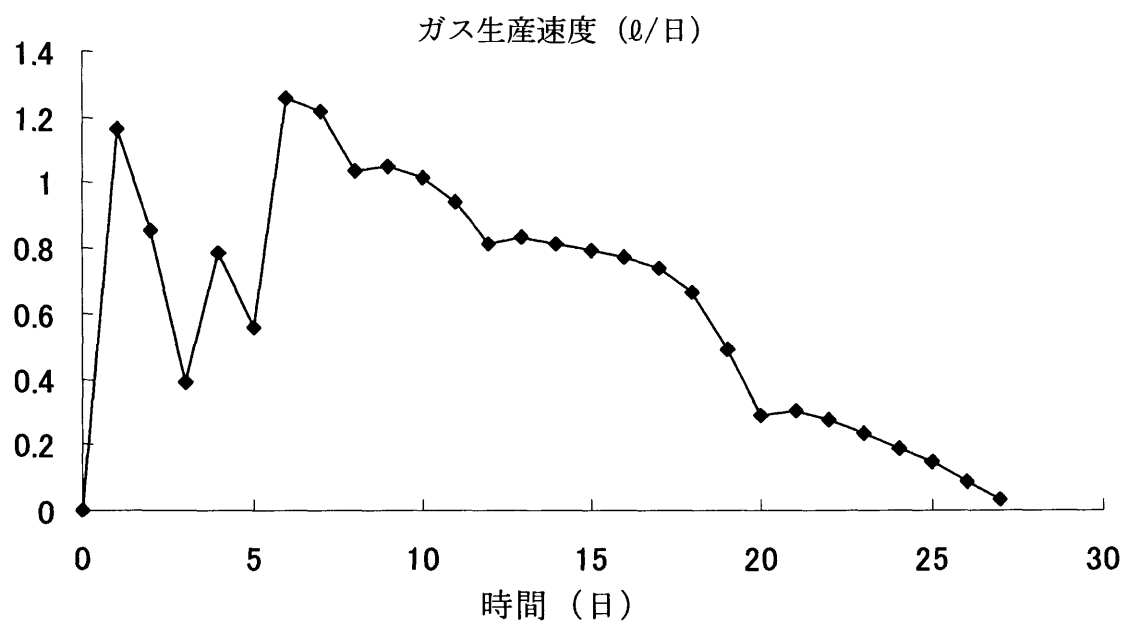


図 2. 培養期間中のガス生産速度の推移

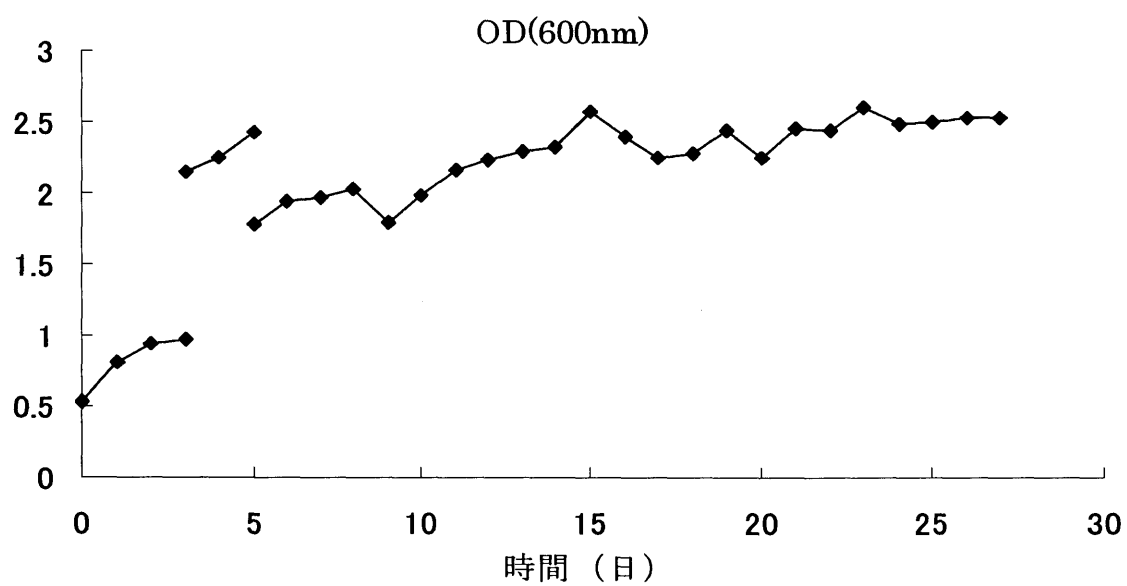


図 3. 培養期間中の菌体増加量の推移

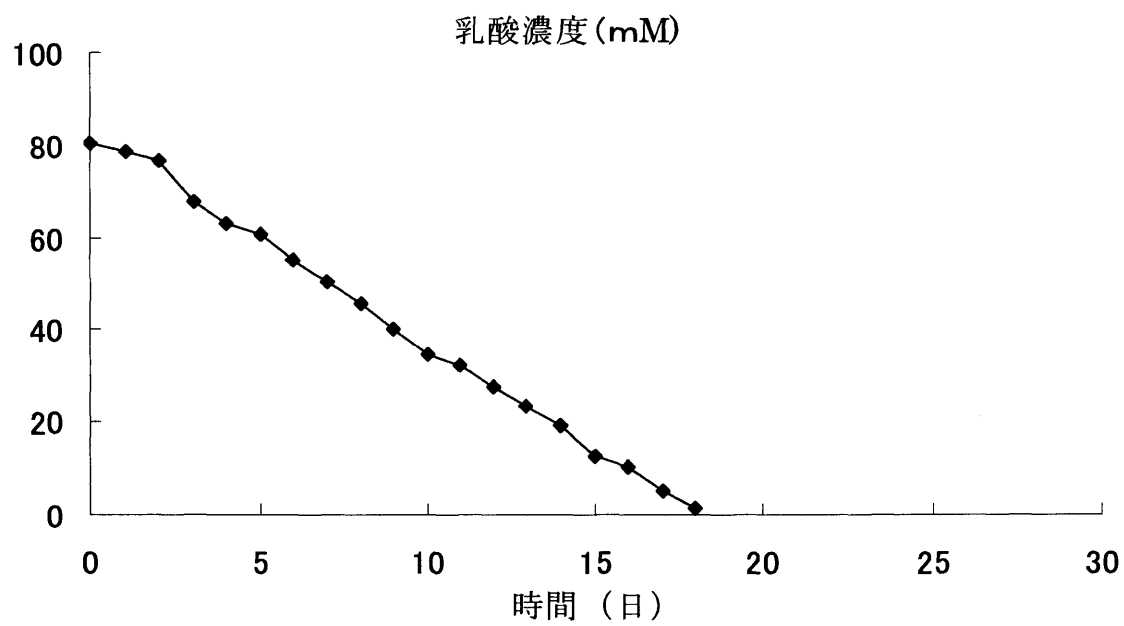


図 4. 培養期間中の乳酸濃度の推移

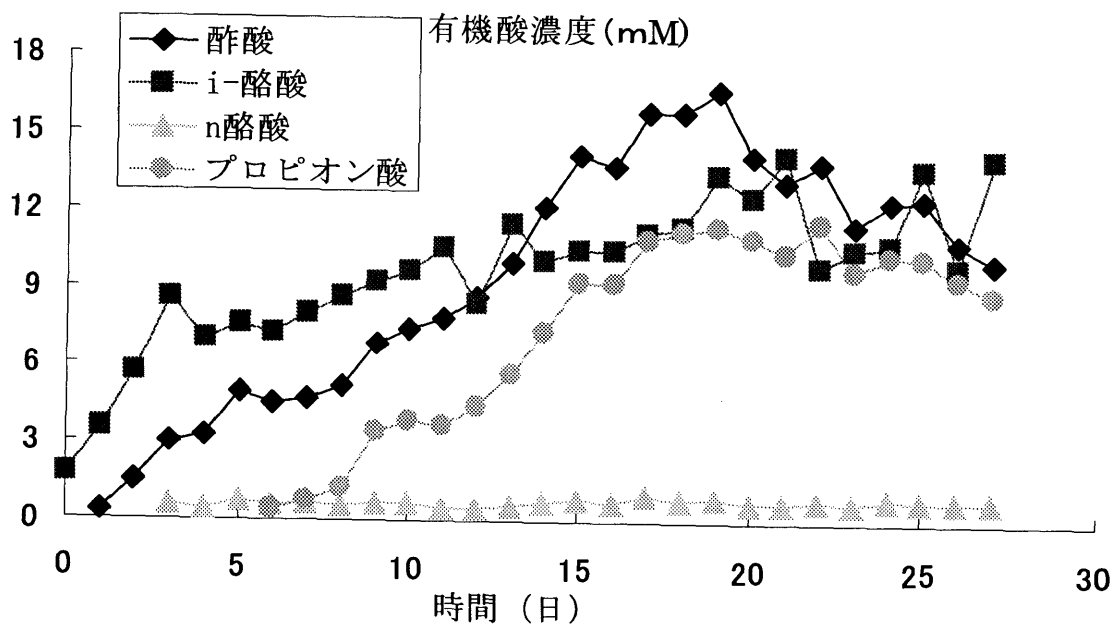


図 5. 培養期間中の有機酸濃度の推移

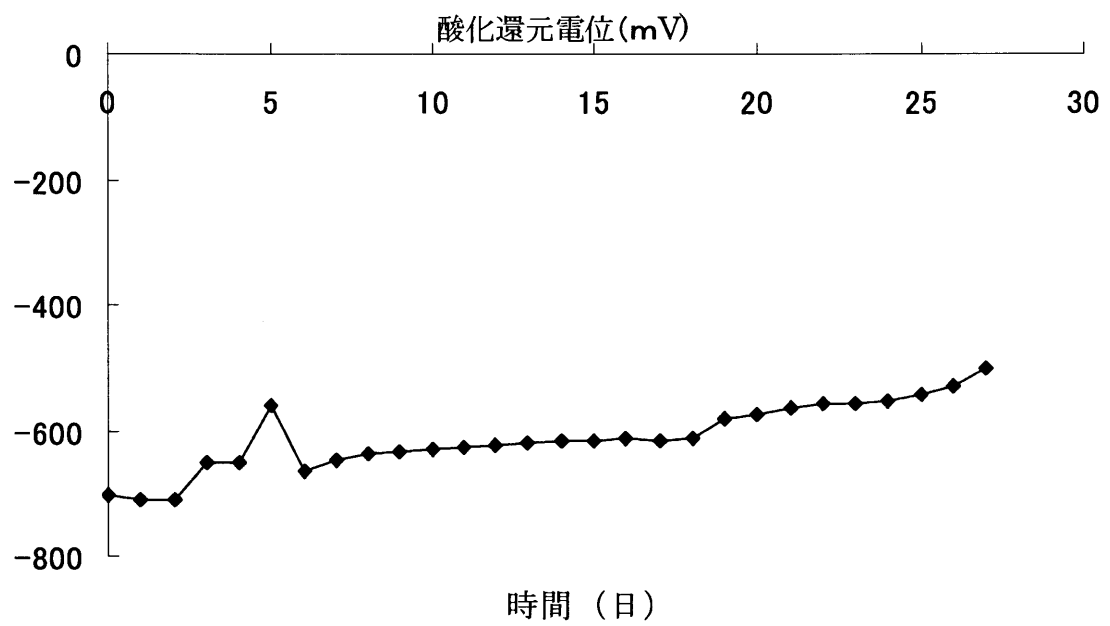


図 6. 培養期間中の酸化還元電位の推移

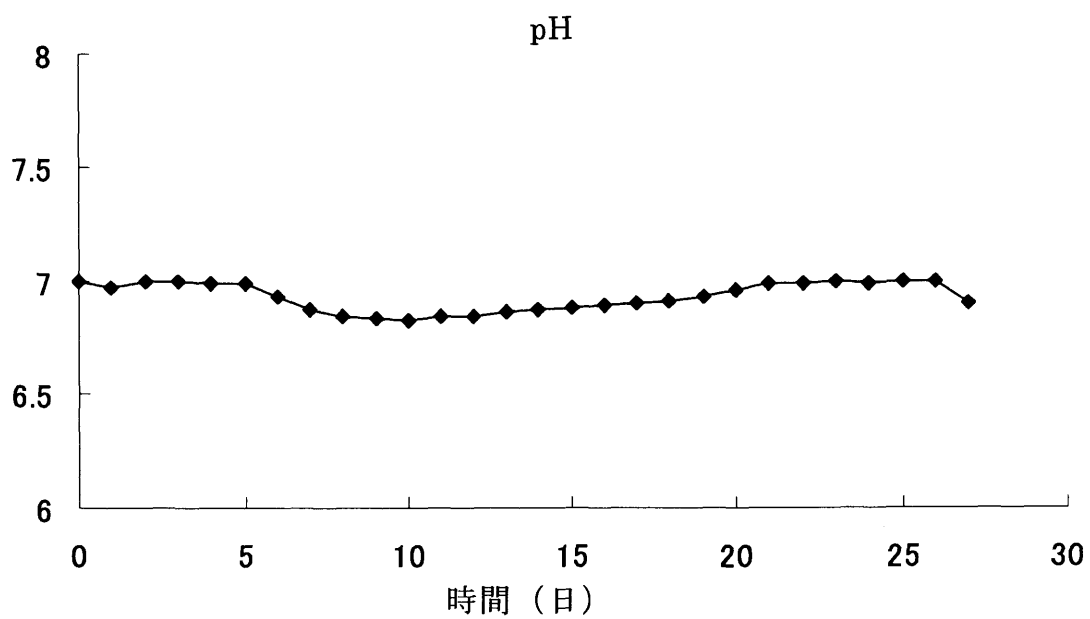


図 7. 培養期間中の pH の推移

## 第4章 光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* RV 株の水素生産における光透過率確保のためのグルタミン酸制限の有効性

### 第1節 目的

第3章の実験結果より、乳酸が過剰な菌体増加や酢酸・プロピオン酸・イソ酪酸といった副産物の生成に使われ、水素転換率の上昇を抑制している事が示唆された。そこで乳酸の水素生産以外への消費を少なくするために、菌体生成の窒素源となる L-グルタミン酸を制限し、菌体増加を抑制した。そのとき水素生産にどのような影響を与えるかを観察することを目的とした。

### 第2節 材料と方法

#### 1. 前培養

前述の方法で *R.sphaeroides* RV をバイアル瓶で培養し、続けてルーフラスコで培養した。

#### 2. 大量培養装置を用いた水素生産

g/L 培地から L-グルタミン酸を除き、乳酸濃度を 2 分の 1 (42.5 mM) にした培地 (以下 g/L (-L-Glu) 培地) を 4 リットル作成した。酸化還元電位電極と pH 電極を取り付けた培養槽に g/L (-L-Glu) 培地を入れ、加圧滅菌した。1 N の

HCl と NaOH を作成し pH 調節剤とした。ルーフラスコを用いた前培養で水素の発生が確認できたものを 2 本選び、培養液を 8,000rpm で 10 分間遠心分離して上清を取り除き、沈殿した菌体を gL (−L-Glu) 培地に溶かした。培養槽内にアルゴンガスを充填して嫌気状態にし、溶かした菌体を接種した。以下は前述の方法で培養及び培養液を採取した。

### 3. 測定

#### (1) グルタミン酸濃度

培養液中のグルタミン酸濃度はニンヒドリンとアミノ酸の反応によって起きる呈色反応を利用して測定した。ニンヒドリン試薬 0.5ml をサンプル 1ml に加えた。15 分間煮沸し、水道水で冷却した。60% エタノール 5ml 加え懸濁した。分光光度計 UV-VIS SPECTROPHOTOMETER UVmini 1240 を用いて、570nm における吸光度で測定した。ニンヒドリンによるアミノ酸呈色反応の原理を図 1 に示した。

ニンヒドリン試薬の組成

ニンヒドリン 0.1g (Wako)

ヒドリンダンチン 0.015g (Wako)

メチルセロソルブ 3.75ml (Wako)

4M 酢酸ナトリウムバッファー 1.25ml

(酢酸ナトリウム三水塩 136.08g (Wako)、酢酸 60.08ml (Wako) (pH5.5))



## (2) その他

菌体増加量・有機酸濃度・ガス生産量は前述の方法で測定した。

### 4. グルタミン酸の投入

培養槽内の培養液のグルタミン酸濃度が **3mM** になるように **gL** 培地を **500ml** 作成した。ガスの生産が確認できたら作成した **gL** 培地を培養槽に投入し、アルゴンガスを封入して嫌気状態にして培養を再開した。

## 第3節 結果

培養期間中の積算ガス生産量(図 2)・ガス生産速度(図 3)・菌体増加量(図 4)・乳酸濃度(図 5)・L-グルタミン酸濃度と有機酸濃度(図 6)・酸化還元電位(図 7)・pH(図 8)の推移をそれぞれ第 5 節 図表に示した。

培養開始直後からガスを生産したので、グルタミン酸濃度が **3mM** になるように **gL** 培地を投入した。抑制されていた菌体増加量がグルタミン酸投入後、増加していくのが確認できた(図 4)。グルタミン酸は投入後すぐに消費された(図 6)。乳酸濃度は培養開始から減少し続け、9 日目にはすべて消費されていた。副生成物は酢酸・イソ酪酸・プロピオン酸であった。酢酸・プロピオン酸はその後消費された(図 6)。ガスの生産量は **19.8** リットルであった。ガスの発生期間は **16** 日間であった(図 2)。

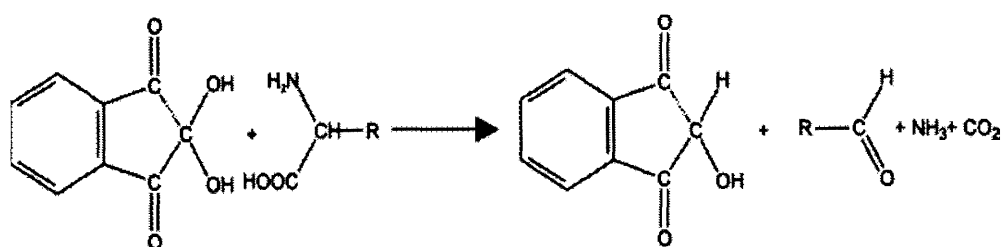
#### 第4節 考察

培養開始からガスを発生したので、培養開始から 22 時間後に全体のグルタミン酸濃度が 3mM になるように調整した。グルタミン酸濃度調整後、菌体の生成が開始されて 600nm における吸光度の値は上昇していった。培地中のグルタミン酸は調整後 2 日目にすべて消費され、吸光度の値も同じ時期にピーク (1.6) を示した。調整後培養開始時に、菌体生成の窒素源であるグルタミン酸を取り除き、ガス発生後に全体のグルタミン酸濃度が 3ml になるように調整したことで、ガスを盛んに発生しているときの 600nm における吸光度の値は第 3 章での 2.0~2.5 から 1.6 程度に低下し、菌体増加を抑制することができた。ガスの発生は菌体の増加とともに増加し、以前の実験結果に比べ、2.53 リットル/日と大きい発生速度を示し、またガスの生産が鈍くなる 9 日目まで 1.00 リットル/日以上生産速度を示した。培養液中の乳酸は培養開始から 9 日目に消費された。同時にガスの発生も乳酸の消費にあわせて 9 日目以降は発生速度が小さくなった。第 3 章では培地中の乳酸濃度は 83.3mM であり、本実験では半分の 42.5mM に調整されていた。にもかかわらずガスの発生量は 19.8 リットルになり、前回の実験でのガス発生量を上回った。

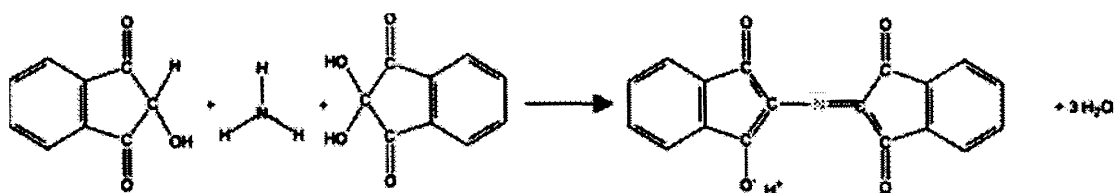
副生成物にはイソ酪酸・酢酸・プロピオン酸が生成されていた。イソ酪酸は 16.9mM 程度生成されていたが、酢酸・プロピオン酸はピーク時にそれぞれ 2.97mM・2.38mM の値を示したが、最終的には消費されていた。

以上より、今回の実験結果では従来に比べて菌体増加・副生成物の生成を抑制し、乳酸から水素への転換率が 77.1%と高い数値を示した。これは培養初期にグルタミン酸を制限したこと、また菌体が十分に光を受けとったことにより、*R.sphaeroides* RV が菌体生成を行わず、光合成を盛んに行って水素生産体制に入ったことにより、副生成物を抑制し、高い乳酸転換率を実現したのではないかと考えられる。今回の実験方法は乳酸から水素への転換率において効果を挙げたといえる。

## 第 5 節 図表



1. ニンヒドリンとアミノ酸が反応し、ニンヒドリンが酸化されアミノ酸はアルデヒドに変化する。この際アンモニアと二酸化炭素が発生する。



2. 還元されたニンヒドリンは発生したアンモニアを介して縮合し、ルーヘマン紫という色素が生成される。

図 1. ニンヒドリンによるアミノ酸呈色反応

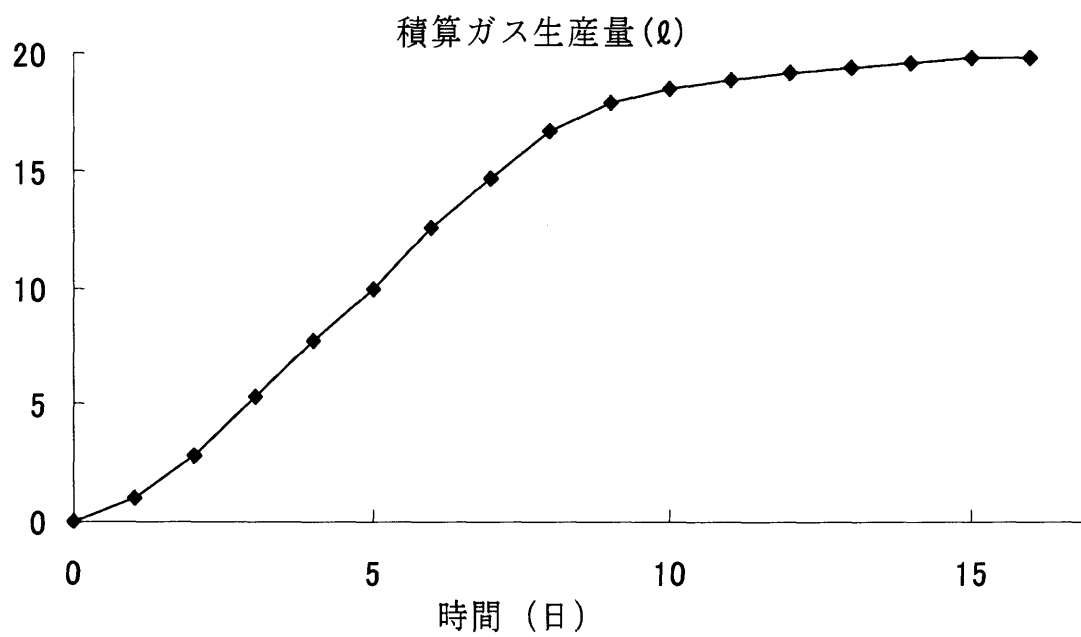


図 2. 培養期間中の積算ガス生産量の推移

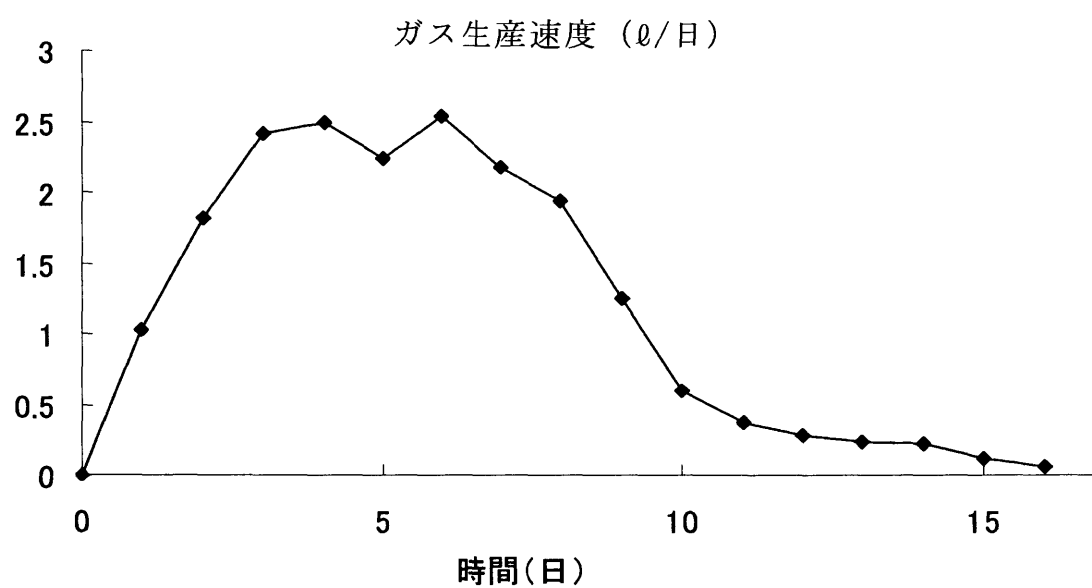


図 3. 培養期間中のガス生産速度の推移

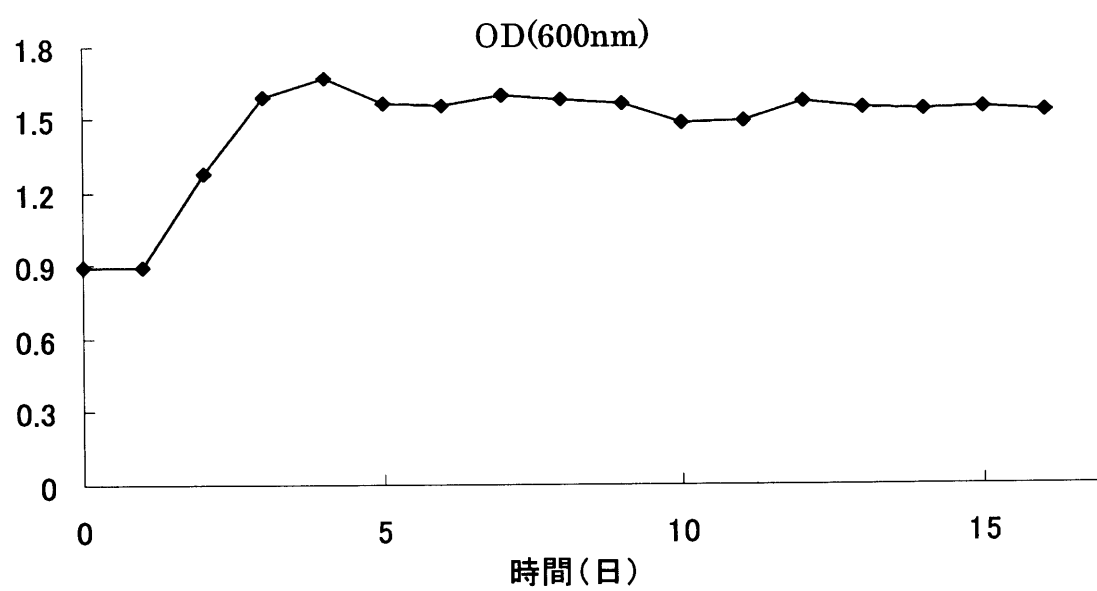


図 4. 培養期間中の菌体増加量の推移

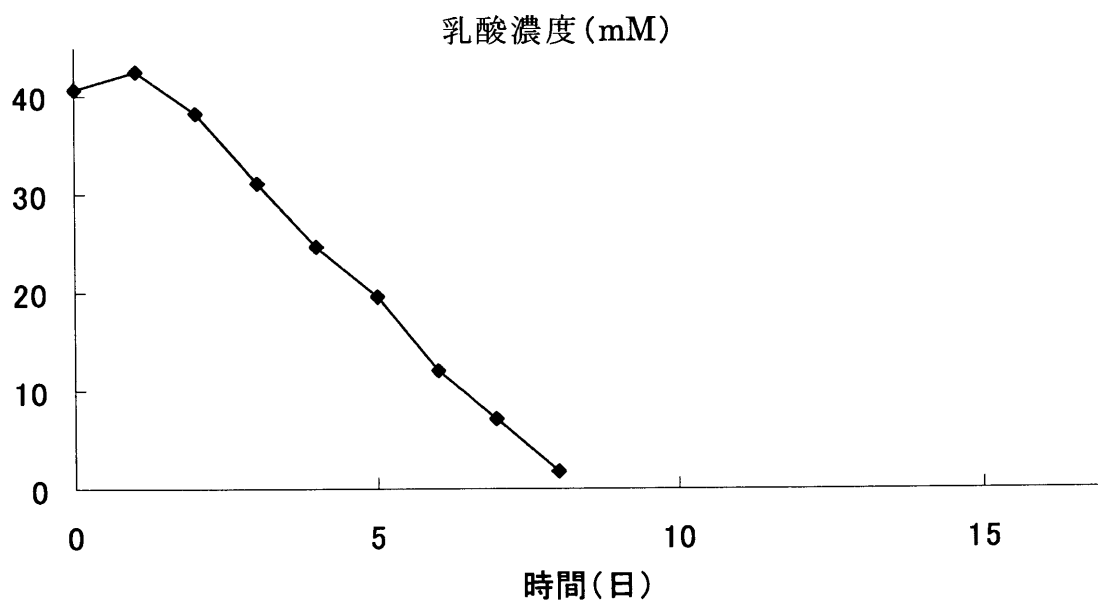


図 5. 培養期間中の乳酸濃度の推移



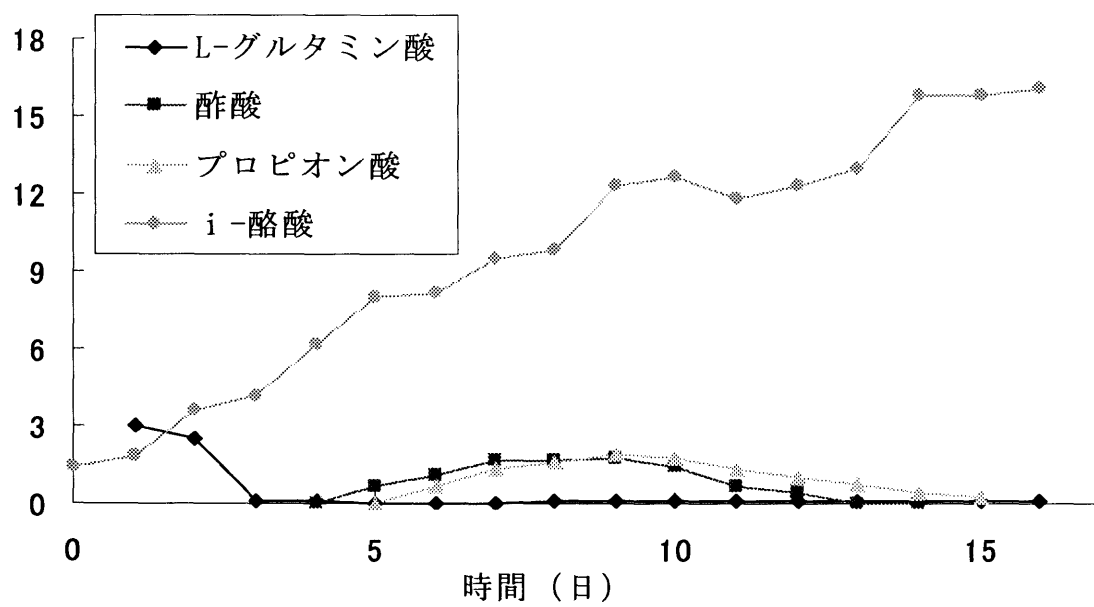


図 6. 培養期間中の L-グルタミン酸濃度、有機酸濃度の推移

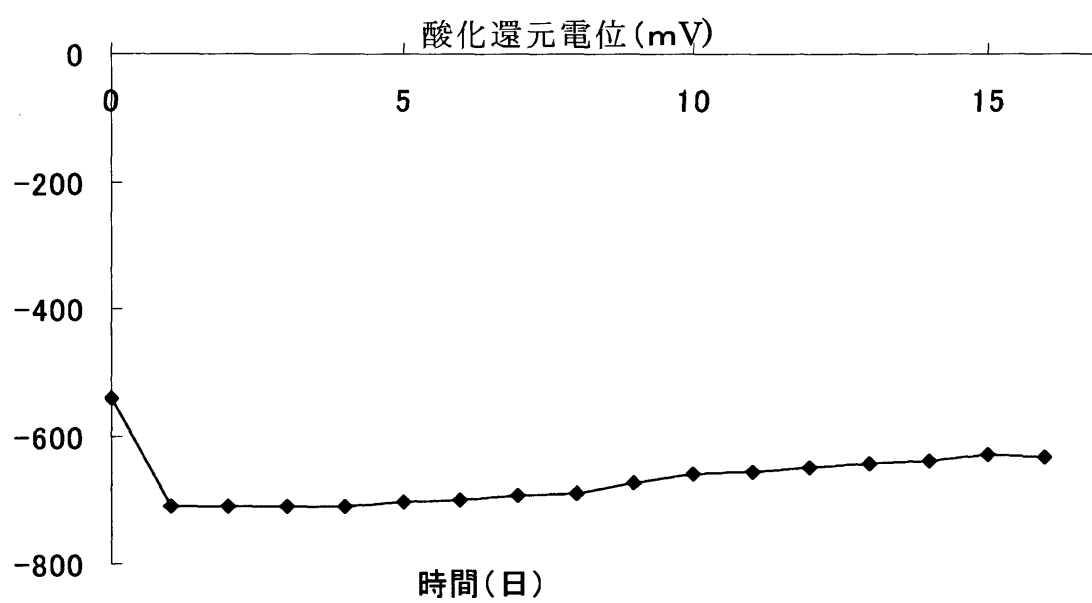


図 7. 培養期間中の酸化還元電位の推移

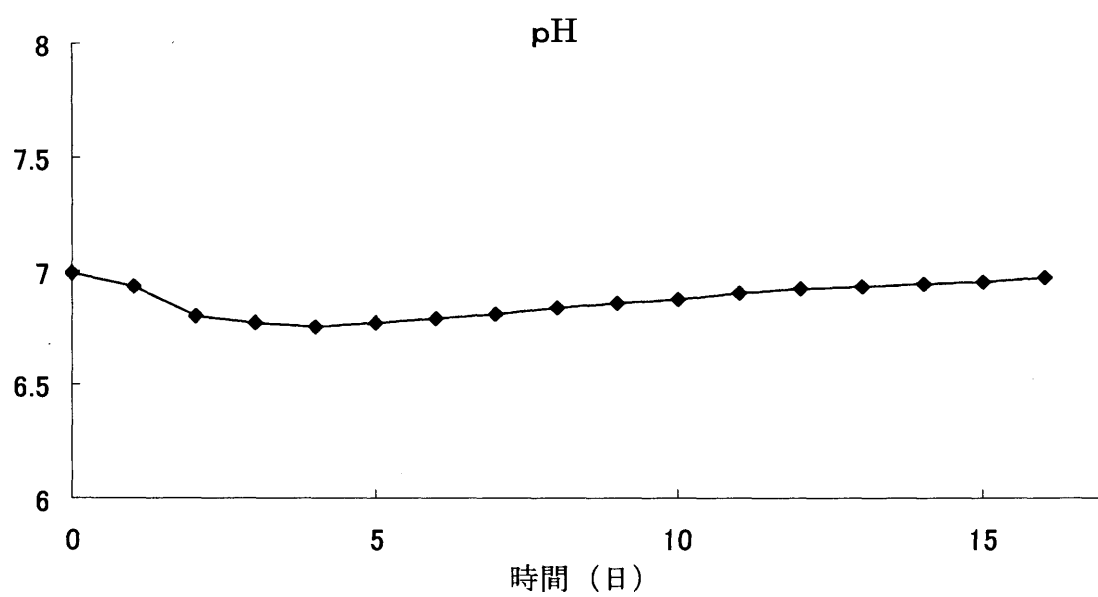


図 8. 培養期間中の pH の推移

## 第5章 総合考察

本研究で行った基本実験の結果より、乳酸が水素生産に用いられず培地中に残存していたことや、培地内の  $OD_{600}$  が高くなったことから、菌体増加による光透過の遮断による水素生産の停止が推察された。より効率的に水素を回収するために次の2つの方法で解決を図った。

1. 培養液を遠心分離し、菌体を回収して光透過率を確保した。
2. 培養液の窒素源を制限し、菌体増加を抑制して光透過率を確保した。

その結果 1. の方法では、水素生産継続期間が基本実験の4日間から27日間に延長され、炭素源である乳酸を100%消費し、17.8 リットルの水素を生産した。しかし過剰な菌体生成や酢酸・プロピオン酸・イソ酪酸などの副生成物に乳酸が使われ、乳酸の水素転換率は39.7%にとどまった。2. の方法では水素生産が16日間続けられ、乳酸を100%消費し19.8 リットルの水素を生産した。また過剰な菌体生成を抑制し、副生成物の生成を抑制した。しかしイソ酪酸の生成は上昇傾向にあった。このイソ酪酸の生成量の増加とその他の有機酸生成量の抑制について、以下の考察をした。まずその他の有機酸生成量の抑制についてであるが、本研究で用いた *R.sphaeroides* RV 株が属する紅色非硫黄細菌は完全な TCA 回路を有している。TCA 回路における炭素の流れは光合成細菌の水素生産の重要な要素である。第4章の実験では L-グルタミン酸（窒素源）を制限したことにより、菌体生成が制限

されていた。このときの TCA 回路上での、乳酸を出発点とする炭素の流れは、ニトロゲナーゼによる水素生産に強く向かっていたと思われる。その結果、その他の有機酸の生成が抑制されたのではないかと考察した。TCA 回路の炭素の流れを図 1 に示した。次にイソ酪酸生成量の増加についてであるが、*R.sphaeroides* RV 株の培養におけるイソ酪酸生成については、以下のものが考えられる。光合成細菌の菌体に含まれるアミノ酸のひとつにバリンがある（北村ら、1984[12]）。光合成細菌が死んで、菌体が分解される。窒素飢餓の状態では菌体に含まれるバリンが分解され、脱アミノによってアンモニアが生じ、残りのものはその後脱炭酸をしてイソ酪酸となる（Sandeda ら、2003[13]）。第 4 章の L-グルタミン酸制限の実験では窒素飢餓であったためこの反応が活発に進んでいた可能性があったと考察した。

過剰な菌体生成と副生成物生成の抑制されたため、水素生産が活発に行われ、濃度 42.5mM の乳酸を単一炭素源とする 4 リットルの gL 液体培地から 19.8 リットルの水素生産をした。乳酸からの水素転換率は 77.1% となった。また最大水素生成速度は 2.53 リットル／日と他の実験方法に比べ、高い値となった。実験の結果のまとめを表 1 に示したので参照されたい。

今回の研究によって、光透過率を確保するなど環境を整えることで光合成細菌による水素生産能に改善が可能であることがわかった。さらに、緒論に記したように廃水からの水素生産の研究は過去になされており、廃水を希釈するなど前処

理を行うことによって、廃水を炭素源とした水素生産にも改善の余地が多分にあることが示唆されている。

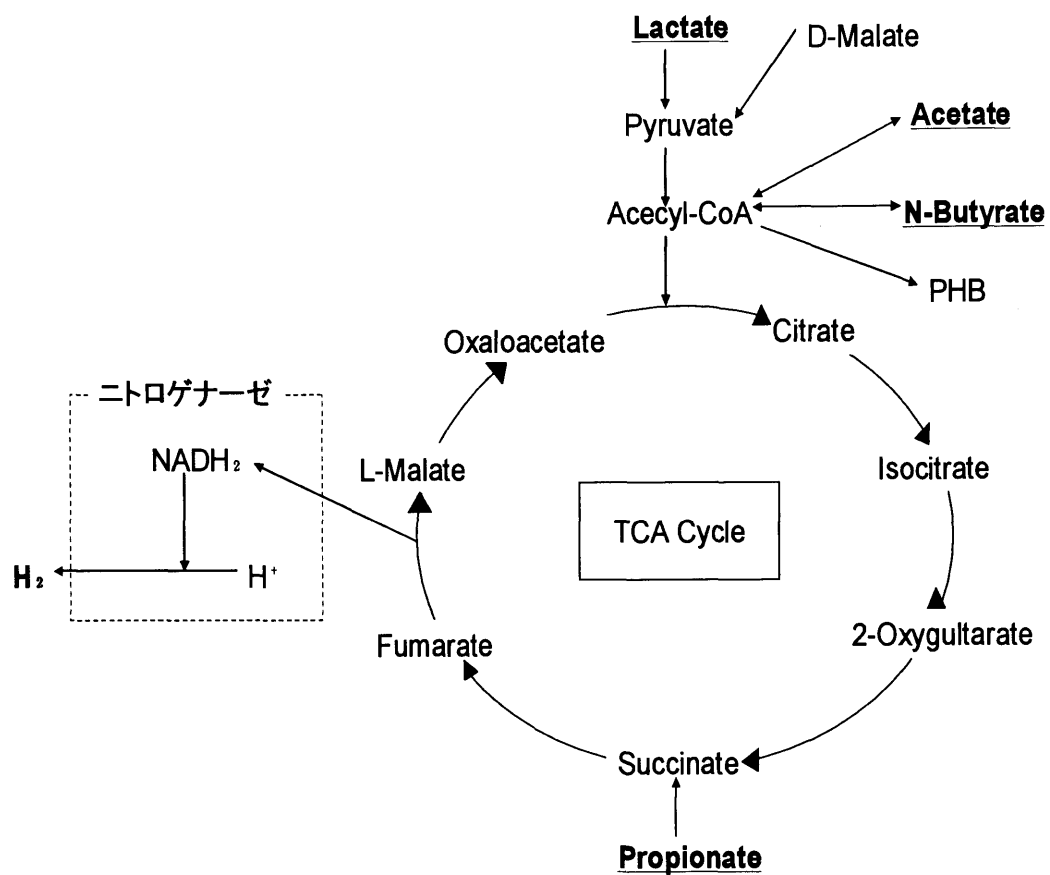


図 1. 光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* RV 株の  
TCA 回路における炭素の流れと水素生産

表． 各実験結果のまとめ

	基本実験	菌体回収	グルタミン酸制限
ガス生産量(ℓ)	2.35	17.8	19.8
生産日数(day)	4	27	16
最大生産速度(ℓ/day)	1.70	1.26	2.53
乳酸消費量(mM)	18.2	83.3	42.5
乳酸消費率(%)	21.9	100	100
水素転換率(%)	24.0	39.7	77.1
OD <sub>600</sub>	—	2.5	1.6
酢酸(mM)	2.80	16.7	—
Iso 酪酸(mM)	6.99	14.1	16.9
N 酪酸(mM)	—	0.99	—
プロピオン酸(mM)	—	11.4	—



## 参考文献

- [1] Gest, H., MD. Kamen. (1949) Photoproduction of molecular hydrogen by *Rhodospirillum*. Science 109:558-559
- [2] Turkarslan, S., Yigit, D.O., Aslan, K., Eroglu, I., Gunduz, U. (2000) Photobiological hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 by utilization of waste water from milk industry. In O.R. Zabrosk, Editor, Biohydrogen, Plenum Press, New York
- [3] Yetis, M., Gunduz, U., Eroglu, I., Yucel, M., Tureker, L. (2000) Photoproduction of hydrogen from sugar refinery wastewater by *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001. Int J Hydrogen Energy 25:1035-1041
- [4] Zhu, H., T.suzuki, Tsygankov, A.A. (1999) Hydrogen production from tofu wastewater by *Rhodobacter sphaeroides* immobilized in agar gels. Int J Hydrogen Energy 24(4):305-310
- [5] Sasikala, K., Ramana, C.V. (1991) Photoproduction of hydrogen from waste water of a lactic acid fermentation plant by a purple non-sulfur photosynthetic bacterium, *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001. Indian J Experimental Biol 29:74-74

- [6] Eroglu, E., Eroglu, I., Gunduz, U., Yucel, M., Turker, L.  
(2002) Biological Hydrogen production from olive mill  
wastewater by *Rhodobacter sphaeroides*  
O.U.001. In: Gokcekus H, editor. International Conference  
on Environmental Problems of Mediterranean  
Region (EPMR-2002) in Near East  
University, Nicosia-Northern Cyprus, Book of Abstracts: 62
- [7] Eroglu, E., Gunduz, U., Yucel, M. (2001) Photobiological  
hydrogen production by using olive mill wastewater as a  
sole substrate source. Int J Hydrogen Energy 26(2):45-53
- [8] Eroglu, E., Eroglu, I., Gunduz, U., Turker, L., Yucel, M.  
(2006) Biological hydrogen production from olive mill  
wastewater with two-stage processes. Int J Hydrogen  
Energy 31(11):1527-1535
- [9] Sasikala, K., Ramana, CV., Rao, PR., Subrahman, M. (1990)  
Effect of gas phase on the photoproduction of hydrogen and  
substrate conversion efficiency in the photosynthetic  
bacterium *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001. Int J  
Hydrogen Energy 15(11):795-797

[10] Gest, H., MD. Kamen., Bregoff. (1950) Studies on metabolism of photosynthetic bacteria. V. Photoproduction of hydrogen and nitrogen fixation by *Rhodospirillum rubrum*. J Biol Chem 182:153-170

[11] Zhu, H., T. Wakayama, Y. Asada, and J. Miyake (2001) Hydrogen production by four cultures with participation by anoxygenic phototrophic bacterium and anaerobic bacterium in the presence of  $\text{NH}_4^+$ . Int J Hydrogen Energy 27:1315-29

[12] 北村博、森田茂廣、山下仁平 編. 1984. 光合成細菌. 学会出版センター

[13] Sanceda, N.G., E. Suzuki, T. Kurata. (2003) Branched chain amino acids as source of specific branched chain volatile fatty acids during the fermentation process of fish sauce. Amino Acids 24:81-87

## 謝 辞

本研究の遂行にあたり、終始適切かつご丁寧な指導を受け賜りました三重大学大学院生物資源学研究科生物循環機能学研究分野の後藤正和先生、荻田修一先生、近藤誠先生に深く感謝申し上げます。

実験装置の提供等ご協力いただきました独立行政法人 産業技術総合研究所の皆様に深く感謝いたします。

最後に生物循環機能学研究室の皆様に深くお礼申し上げます。