

## 4. 研 究 論 文

### Microbial Production of Hydrogen

Shigeharu Tanisho

Department of Materials Science and Chemical Engineering,  
Yokohama National University, Yokohama 240, Japan

#### Abstract

Fermentative hydrogen evolution by Enterobacter aerogenes strain E.82005 was studied under controlled pH. The pH of culture was found to have significant influences on the hydrogen evolution and cell growth. The optimum pH for hydrogen evolution was around pH 6.0. The evolution rate of hydrogen was 520 ml/( $\lambda$ -culture·h) at pH 6.0 and 40.5°C. This rate seemed to be the fastest as compared with the other microorganisms. Mechanism of hydrogen evolution from excess NADH was discussed binding with the pH activity.

## 微生物を利用した水素生産

横浜国立大学物質工学科 谷生重晴

### 序 論

生物を利用した水素発生が多くの人達によって研究されている。これらの生物を利用した水素発生は、大きく分けると二通りの方法に分けられる。一つは光合成微生物を利用する方法で、もう一つは発酵を利用する方法である。最もよく知られた光合成水素発生微生物に、マイアミ大学のMituiらによって発見された*Oscillatoria speceis* Miami BG7がある。<sup>1)</sup>この微生物は海に棲む藍藻の一種で、光照射下窒素源を欠いた培地から、約  $0.38 \text{ mmol}/(\text{g-dry cell}\cdot\text{h})$  の速さで水素を発生した。<sup>2)</sup>この他に、光合成バクテリアの一種で、*Rhodospseudomonas capsulata* という菌がよく研究されている。このバクテリアは、乳酸を電子供与体を使用して、 $5.3 \text{ mmol}/(\text{g-dry cell}\cdot\text{h})$  の速さで水素を発生することができる。<sup>3)</sup>一方、発酵水素発生微生物では、クロストリディウム属の菌と *Escherichia coli* がよく研究されている。*Clostridium butyricum* は、アルコール工場の廃糖 (BOD = 10,000 ppm) を使用した研究で、 $7.3 \text{ mmol}/(\text{g-dry cell}\cdot\text{h})$  の速さで発生することが報告されている。<sup>4)</sup>発酵水素発生は、光合成水素発生よりも発生速度が速いという利点を持つとともに、他にも次のような利点を持っている。

- (1) 太陽光を必要としないから、暗所で24時間連続して発生させることができる。
  - (2) 発生量は、光を利用すると面積に比例するが、発酵では体積に比例するから、装置を小さくできる。
  - (3) 光合成産物を発酵の基質として利用できる。これは太陽エネルギーの間接利用である。
  - (4) グルコースなど糖類を基質とした場合には、水素以外の産物も利用できる。
- これらのことから、発酵水素発生は工業生産に適した方法であるといえる。

筆者らは、発酵水素発生をする菌で、発生能の非常に高い (*Enterobacter aerogenes* st. E.82005) を草の葉から単離した。<sup>5)</sup>この菌は *Enterobacteriaceae* 科に属する通性嫌気性菌であるから、利用するうえで、絶対嫌気性菌の *C. butyricum* に比べて大きな利点を持っている。好氣的に培養すれば菌体収量が増し、<sup>6)</sup>嫌氣的に培養すれば水素を発生するので、生物水素発生で常に細心の注意を要求される酸素リーク、窒素リークの防止にたいし、あまり過敏になる必要がない。培養液の溶存酸素程度であれば、速やかに酸素を消費して、水素発生にほとんど影響をおよぼさない。したがって、連続培養における脱気装置が不用になるばかりでなく、装置全体を簡素化できる。

本報では *Enterobacter aerogenes* st. E.82005 の水素発生速度と至適 pH、至適温度の測定、および他の微生物の水素発生速度との比較を行なった。また、水素発生のメカニズムについて検討した。

## 1. 実験方法

### 1.1 菌と培養条件

使用した菌は *Enterobacter aerogenes* st. E. 82005 で、筆者らが草の葉から単離した菌である。<sup>5)</sup> 前培養は寒天培地上のコロニーを次の組成をもつ培養液に植えつけて、38℃、20時間好氣的にかくはん培養した。

glucose 1.5%, peptone 0.5%,  $K_2HPO_4$  1.4%,  $KH_2PO_4$  0.6%,  $(NH_4)_2SO_4$  0.2%, citrate·2H<sub>2</sub>O 0.1%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.02%。

本培養は、250mlのグルコースとペプトンのみで構成された培養液(GP培地)に、それぞれ10mlの前培養菌液を注入して行なった。GP培地にはグルコースが1%、ペプトンが5%含まれている。培養液のかくはんにはマグネチックスターラを使用した。培地のpH調節はpHコントローラで30%のNaOHまたは30%のH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>液を滴下して行なった。

### 1.2 水素発生速度と乾燥菌体重量

水素発生速度は発生したガスをメスシリンダーに集めて30%のNaOHによる水上置換法で測定した。置換したガスの成分は、ガス発生速度が速いときは30分置きに、遅いときは1時間置きにガスシリンジで抜取り、ガスクロで分析した。CO<sub>2</sub>の分析には活性炭を、H<sub>2</sub>の分析にはモレキュラーシーブ5Aを用いた。CO<sub>2</sub>はアルカリ液によくとけるので、置換したガスからはCO<sub>2</sub>のピークは現われなかった。そこで、この水上置換で測ったガス発生速度を水素の発生速度とした。

菌体は、30mlの培養液をステンレスチューブで10,000 r.p.m., 10分間遠心分離し、イオン交換水で洗浄したあと再度遠心分離して集めた。この菌をステンレスチューブごと105℃の乾燥器に入れ、乾燥前後の重量差から菌体量を測定した。

## 2. 結 果

### 2.1 菌体収率と培地 pH

培養温度を37.5 ± 0.5℃に保ち、培地 pH と各種収率との関係を調べた。Table 1 にその結果を示す。嫌気培養における菌体の生産性は、培地 pH が7.0のとき最大になった。これは好気培養における至適 pH と同じである。菌体の生産速度、グルコース1 mol 当たりの菌体収量についても pH 7.0 で最大であった。Hadjipetrou<sup>6)</sup>らは1 mol-ATP 当たりの *E. aerogenes* の菌体収量が約10.5 g-dry cellであることを報告しているので、基質による菌体収量から ATP 収率を計算すると、pH 7.0 で約3であり pH 5.0 で約1になった。このように、嫌気条件でも、菌体の成育には pH 7 が最も適していることが分かった。

### 2.2 水素の収率

この菌は、グルコースを基質としたとき、Table 1 に示したように、約1 mol/mol-glucose の水素収率であった。Clostridium 属の菌が約2 mol の収率であるのに比べ、水素収率はあまり良くなかった。グルコースの燃焼熱は673 kcal であるから、水素へのエネルギー変換は約10%でしかない。従って、水素収率を改善するための菌の改良が、今後の課題となるであろう。

Table 1. 増殖と水素発生におよぼす pH の影響

pH	培養時間 h	増殖量 <sup>1)</sup>	増殖速度	菌体収率	ATP収率 <sup>2)</sup>	水素収率	水素発生速度	
		g-dry cell	$\frac{\text{mg-cell}}{\text{h}}$	$\frac{\text{g-cell}}{\text{mol-glucose}}$	$\frac{\text{mol-ATP}}{\text{mol-glucose}}$	$\frac{\text{mol-H}_2}{\text{mol-glucose}}$	$\frac{\text{ml-H}_2}{\text{l-culture}\cdot\text{h}}$	$\frac{\text{ml-H}_2}{\text{g-dry cell}\cdot\text{h}}$
5.0	6.0	0.168	27.9	12.1	1.1	0.75	54	80
5.5	9.0	0.241	26.8	17.3	1.7	1.02	264	274
6.0	6.75	0.356	52.7	25.6	2.4	1.07	388	272
6.5	7.42	0.455	61.4	32.8	3.1	1.10	374	205
7.0	5.0	0.468	93.6	33.7	3.2	0.38	182	97
7.5	5.25	0.426	81.1	30.7	2.9	0.19	59	35
free <sup>3)</sup>	7.33	0.241	32.9	17.3	1.7	0.99	264	274

- 1) 1%グルコースと5%ペプトンからなる培地 250ml で増殖した菌体量。
- 2) Hadjipetrouらのデータから<sup>6)</sup>  $Y_{ATP}$  が 10.5 g-cell/mol-ATP であるとして  $Y_{X/S}$  より計算した。
- 3) pH調節を行わない培養結果。培地 pH は 6.45 から 5.82 まで変化した。

### 2.3 水素発生と培地 pH

図1は水素の累積発生量と培養時間の関係を示したものである。水素発生は、菌が増殖しているにもかかわらず、いずれの pH の場合も植菌後 3~4 時間たつとほぼ一定の発生速度を保った。その後、

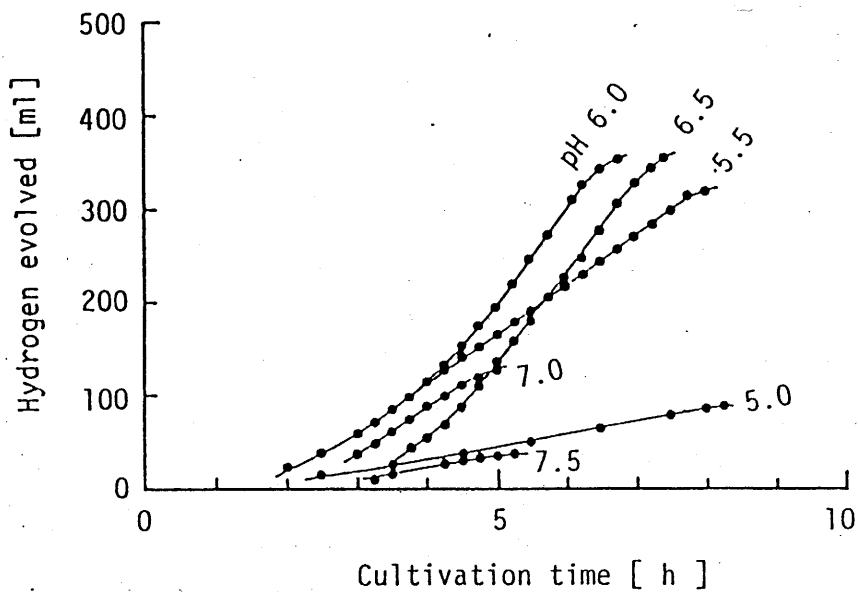


図1. 累積水素発生量の時間変化

基質が消費されたために、ある時から急に発生が遅くなった。バッチ培養ではこのように菌体濃度にかかわらず発生速度が一定になることから、培養槽単位体積当たりの発生速度を用いれば、装置の利用効率が分かる。また、菌体重量当たりの発生速度で現わすと、菌の水素発生活性が分かる。図2に、これらの発生速度と pH の関係をしめした。この図から水素発生速度は培地 pH に非常に影響されることが良く分かった。

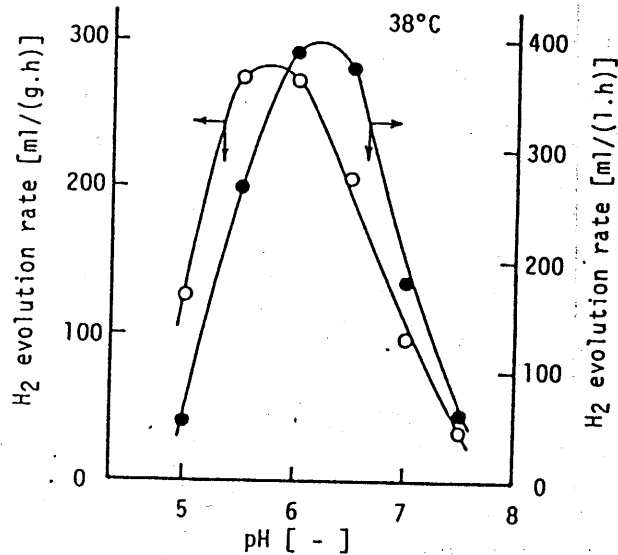


図2. 水素発生速度と pH の関係

菌体重量当たりの発生速度から、菌体にとっての水素発生の活性は 6.0 ~ 5.5 が至適 pH であることがわかる。けれども、培養槽体積当たりの発生速度から評価すると、装置を有効に利用するには、pH 6.5 ~ 6.0 で水素発生を行なう方がよいと言えるだろう。

#### 2.4 水素発生と温度の効果

*Enterobacter* 属は 37°C を成育至適温度とするが、培養温度によって水素発生速度がどのように変わるか調べた。培地 pH は 6.5 と 6.0 に保った。結果を図3に示す。最大水素発生速度は 40.5°C で得られた。このとき発生速度は約 520 ml/(l-culture·h) つまり、約 21 mmol/(l-culture·h) にもなることが分かった。温度の影響は、40.5°C より低い方では 1°C 当たり約 8% 程度の速度減少であるが、高い方では約 25% の割合で減少した。また、至適温度より高い方への偏移はバクテリアの生存にも厳しい影響をおよぼした。従って、温度の制御も重要なファクターであることが分かった。

### 3. 考 察

#### 3.1 発酵水素発生のメカニズム

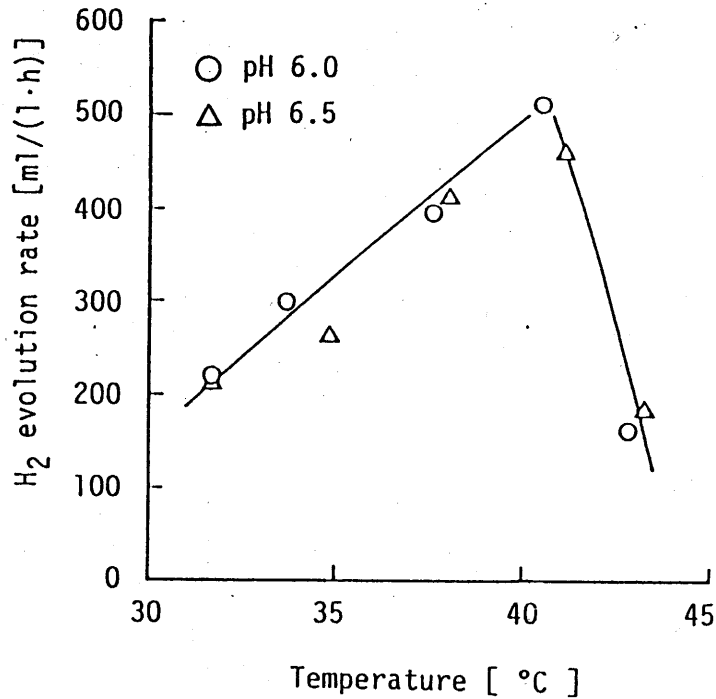


図3. 水素発生速度と培養温度

発酵でグルコースから水素が発生される代謝経路として、図4に示す3経路が言われている。

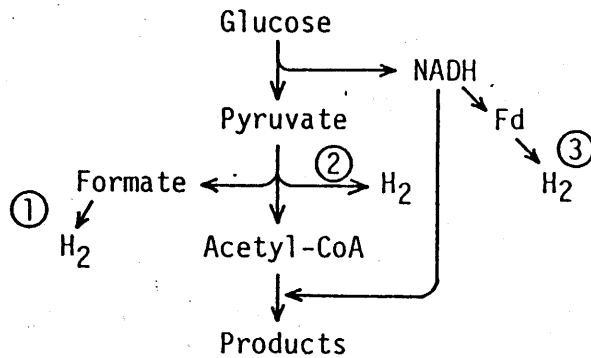


図4. 微生物の水素発生経路

1973年に、Jungermannらは電子がNADHから Ferredoxinを通してプロトンに渡され、水素が発生することを実験で示した。<sup>7-11)</sup>しかし、NADH/NAD<sup>+</sup>の酸化還元電位 ( $E_{m7} = -0.320V$ )は水素 ( $E_7 = -0.413V$ )や Ferredoxin ( $E_{m7} = -0.398V$ )の酸化還元電位よりはるかに正の電位であるので、熱力学的には説明がつかなかった。この反応は、もし、細胞中の  $[NADH]/[NAD^+]$ の濃度比が1000以上であるか、水素分圧が  $10^{-3} atm$  以下であれば、進む。しかし、 $[NADH]/[NAD^+]$ の濃度比は約0.3であることが報告されており、<sup>12)</sup>水素分圧も *E. aerogenes* や *Clostridium* 属では  $0.5 \sim 0.3 atm$  程

度になる<sup>5,7)</sup>。そのため、NADHから水素が発生するメカニズムを説明するための新しい実験事実が待たれていた。その後、細胞膜の内外でpH勾配があること<sup>13,14)</sup>、膜結合ヒドロゲナーゼの活性とpHの関係<sup>15-19)</sup>など多くの新事実が明らかになり、さらに今、水素発生に培地pHが影響することが明らかになった。これらの実験事実を総合して、水素発生メカニズムを考えてみたい。

菌体細胞内のpH 1976年にPadan<sup>13)</sup>らとRamos<sup>14)</sup>らは、それぞれ独立に、E. coliの細胞内pHについて興味深い報告をした。それは、細胞外のpHが5.5から9.0の広い範囲にわたって変化しても、細胞内のpHは約8に保たれているというものである。それまで、中性pHが生化学反応にとって好ましいと考えられていたが、実際にはアルカリ側に片寄っていただけでなく、細胞外のpHにも影響されずに反応が進んでいたわけで、これは酸化還元反応について二つの点で重要な意味を持つ。一つは細胞内の酸化還元電位をpH 8における値で考えなければならないこと。一つは培地pHに影響される反応は、培地のpHにおける酸化還元電位を考える必要があるのではないか、ということである。

水素発生に関与するNADの酸化還元電位は次の式で計算される

$$E = E_0 + \frac{RT}{2F} \ln \frac{[NAD^+][H^+]}{[NADH]}$$
$$= E_0 - \frac{2.303RT}{2F} \text{pH} + \frac{RT}{2F} \ln \frac{[NAD^+]}{[NADH]}$$

但し、 $E_0$ はpH 0, 25℃における中点電位である。pH 7における中点電位( $E_{m7}$ )は-0.320Vであるから、 $E_0$ は-0.113V<sup>20,21)</sup>、pH 8における中点電位( $E_{m8}$ )は-0.349Vと計算される。

一方、水素の酸化還元電位は次式で計算される。

$$E = - \frac{2.303RT}{F} \text{pH} - \frac{RT}{2F} \ln(P_{H_2})$$

但し、かぎカッコは分圧を表わす。2.303RT/Fは25℃で約0.0592Vであるから、水素発生の至適pH 6.0における水素の酸化還元電位は-0.355V ( $P_{H_2} = 1 \text{ atm}$ )になる。E. aerogenesは水素と炭酸ガスを約1:2の割合で発生する<sup>5,22)</sup>から、水素分圧を0.3 atmであるとすると、酸化還元電位は-0.340Vになって、この電位はNADの $E_{m8}$ より高い。つまり、細胞の内外のpHで酸化還元電位を計算すると、熱力学的に好ましい電位が与えられる。

細胞膜に結合したヒドロゲナーゼ 1979年、AdamsらはE. coliの原形質膜に結合しているヒドロゲナーゼを分離し、その活性について報告した。<sup>15)</sup>分子量113,000のこのヒドロナーゼは二つのサブユニットで構成されており、水素発生と水素取り込みのpH活性が、それぞれ、6.5と8.5にピークを持っていた。これらの活性至適pHは、それぞれ、生菌の水素発生の至適pHと細胞内pHに極めて近いといえる。このヒドロゲナーゼはその後多くの研究者によって詳しく調べられ、分子量60,000前後のサブユニットに30,000前後のサブユニットが結合してひとつのユニットを形作る分子量

180,000の四量体であることがわかった。<sup>17-19)</sup> Adamsらは大きい方のサブユニットを分離していたわけである。ところで、このヒドロゲナーゼは膜に結合しており、反応基は大きい方のサブユニットにあったのだから、各々のサブユニットに一つづつ活性基があり、その活性基は細胞の原形質膜の内側と外側に開いていると考えるならば、ヒドロゲナーゼと生菌との活性pHの相当性は非常によく説明できる。

NADHから水素が発生するメカニズムの提案 幾つかの仮定を設ける。(1)数値分類法によると、*E. aerogenes*は*E. coli*と75%の相似性があるので、*E. aerogenes*は*E. coli*と同じヒドロゲナーゼを持っている。(2)膜結合ヒドロゲナーゼは細胞膜の内側と外側にそれぞれ活性基を持つ。(3)NADHは膜内側の活性基で酸化され、膜を横切って膜外側に運ばれた電子は、外側の活性基でプロトンに渡される。

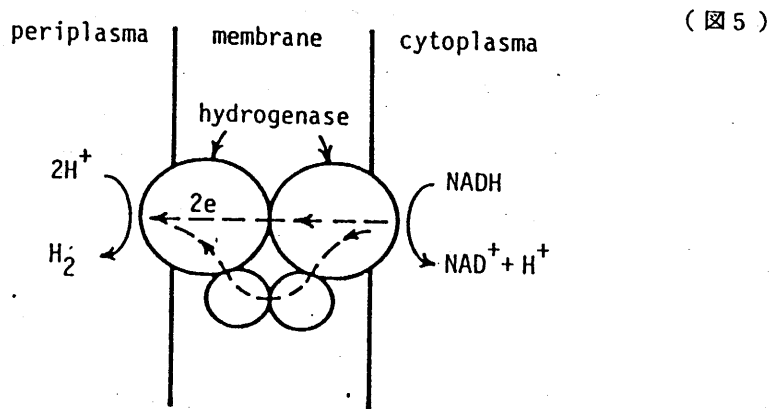


図5. プロトンとNADHとの酸化還元反応の略図。点線は電子の流れの可能性を表す。

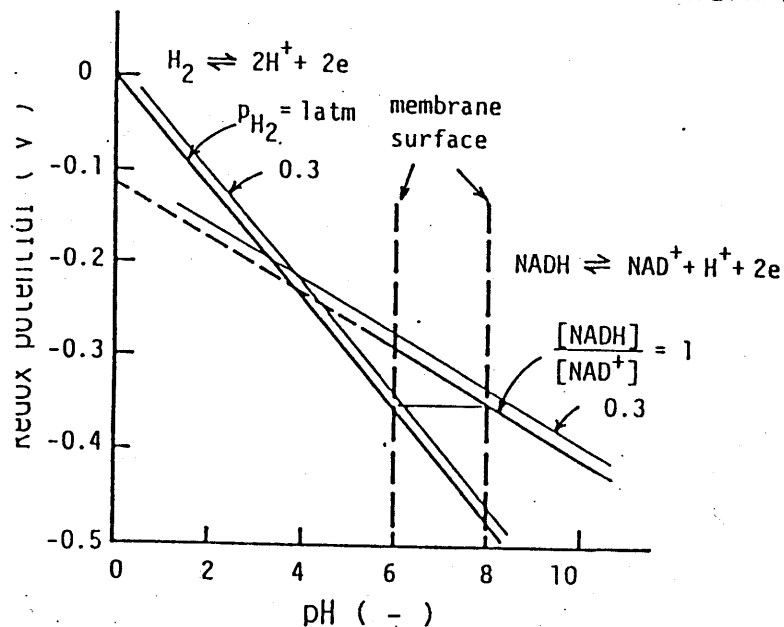


図6. 酸化還元電位とpHの関係



図6は酸化還元電位とpHの関係を示している。二本の縦の鎖線は、細胞の内側と外側の原形質膜表面を表わしており、外側はpH6であるとしている。もし、ヒドロゲナーゼの水素取り込みと発生  
の活性基がどちらも内側にあるとすれば、NADと水素の電位差はpH7にあるときよりもさらに開  
いて、NADHから水素が発生するのは極めて難しい。しかし、もし水素発生の活性基が外側にあるな  
ら、電位差は非常にわずかになる。この電位差は、 $[NADH]/[NAD^+]$ の濃度比や水素分圧の変化に  
よって容易に変わるばかりでなく、外側の活性基の周辺pHが酸性側にわずかに移るだけでも負に変  
わる。

このように、幾つかの仮定を設けるだけで、NADHから水素が発生することを化学熱力学的に説明  
できることから、この発酵水素発生のメカニズムは十分な妥当性を持っているのではなかろうか。

### 3.2 他の微生物の水素発生速度との比較

非常に多くの微生物が水素を発生することが知られている。<sup>24-29)</sup>バクテリア類では、22科57属が発  
生し、種の数にいたってはどれくらいになるか握みきれない。藻類を含むこれらの微生物を、光を利用  
する光合成微生物と光を利用しない発酵微生物に分けて、それぞれのカテゴリーで水素発生速度が  
速いものをTable 2に示した。光を利用する微生物はさらに二つのカテゴリーにわけられる。一つは  
光反応中心を二つ持つもので、水を分解して水素を発生する。一つは光反応中心を一つだけ持つもの  
で、有機酸を電子供与体としてこれを分解して水素を発生する。水素発生速度は前者よりも後者のほ  
うが速いようである。最近Miyakeらは20,000 lxという非常に強い光照射の下ではあるが、  
262 ml/(g-dry cell·h)の速さで光水素発生をするRhodobacter sphaeroides 8703という菌を発見し  
ている。<sup>30)</sup>一方、発酵水素発生も絶対嫌気性菌と通性嫌気性菌による発生とにわけられる。発酵水素発

Table 2. 代表的微生物の水素発生速度

カテゴリー	$\frac{\text{mmol-H}_2}{\ell\text{-culture}\cdot\text{h}}$	$\frac{\text{mmol-H}_2}{\text{g-dry cell}\cdot\text{h}}$	pH調節法	文献
I. 光合成微生物				
二つの光反応中心を持つもの				
Oscillatoria sp. Miami BG 7	0.4	0.4	tris-HCl NaHCO <sub>3</sub> -CO <sub>2</sub>	[ 2 ] [ 31 ]
Anabaena cylindrica	1.2	1.3		
一つの光反応中心を持つもの				
Rhodospseudomonas capsulata	5.3	5.3	リン酸	[ 3 ]
Rhodospirillum rubrum	3.0	2.5	リン酸	[ 32 ]
Rhodobacter sphaeroides 8703	-	10.4	調節なし	[ 30 ]
II. 発酵微生物				
絶対嫌気性菌				
Clostridium butyricum	-	7.3	-	[ 4 ]
	-	7.0	リン酸	[ 33 ]
通性嫌気性菌				
Citrobacter intermedius	11	9.5	自動	[ 34 ]
Enterobacter st. E.82005	11	17	調節なし	[ 35 ]
	11	11	調節なし	[ 35 ]
	21	11	自動	[ 本報 ]

生菌の発生速度の研究については、光水素発生の研究にくらべて論文の数が少ないが、発生速度はかなり速いようである。なかでも、本報で明らかにされた *E. aerogenes* st. E.82005 の水素発生速度は最も速い。

#### 4. 結 論

適当な基質からバクテリアを使用して工業的に水素を生産する場合には、水素発生速度は重要なファクターであり、速いことが要求される。Table 1 から、*Enterobacter* st. E.82005 は、pH をコントロールしなくても、他の微生物より速い速度 ( $11 \text{ mmol}/(\text{g-dry cell}\cdot\text{h})$ ) で水素発生できることがよくわかる。pH をコントロールすると水素発生の条件はさらに良くなって、pH 6.0, 4.0-5.0℃ で発生速度は  $21 \text{ mmol}/(\text{l-culture}\cdot\text{h})$  にも達している。この発生速度は、筆者らの知るかぎりでは、最も速い水素発生速度である。酸素阻害から速やかに回復できること、pH をコントロールしなくてもよいこと、毒性が少ないことなど、多くの利点を持っていることから、*Enterobacter aerogenes* st. E.82005 菌は大量水素発生に最も希望のもてる菌であるだろう。

#### 付 言

この論文の一部は *International Journal of Hydrogen Energy* に投稿され、印刷中である。

#### 参 考 文 献

1. Kumazawa, S. and A. Mitsui, *Int. J. Hydrogen Energy* 6, 339(1981)
2. Phillips, E. J. and A. Mitsui, *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1212(1983)
3. Hillmer, P. and H. Gest, *J. Bacteriol.* 129, 724(1977)
4. Karube, I., S. Suzuki, T. Matsunaga and S. Kuriyama, *Annals New York Academy of Sciences* 369, 91(1981)
5. Tanisho, S., N. Wakao and Y. Kosako, *J. Chem. Eng. Japan* 16, 529(1983)
6. Hadjipetrou, L. P. and A. H. Stouthamer, *J. Gen. Microbiol.* 38, 29(1965)
7. Jungermann, K., R. K. Thauer, G. Leimenstoll and K. Decker, *Biochim. Biophys. Acta* 305, 268(1973)
8. Jungermann, K., R. K. Thauer, E. Rupprecht, C. Ohrloff and K. Decker, *FEBS Lett.* 3, 144(1969)
9. Thauer, R. K., K. Jungermann, E. Rupprecht and K. Decker, *FEBS Lett.* 4, 108(1969)
10. Jungermann, K., E. Rupprecht, C. Ohrloff, R. Thauer and K. Decker, *J. Biol. Chem.* 246, 960(1971)
11. Jungermann, K., G. Leimenstoll, E. Rupprecht and R. K. Thauer, *Arch. Mikrobiol.* 80, 370(1971)

12. Decker, K. and S. Pfitzer, Anal. Biochem. 50, 529(1972)
13. Padan, E., D. Zilberstein and H. Rottenberg, Eur. J. Biochem. 63, 533(1976)
14. Ramos, S., S. Schuldiner, and H. R. Kaback, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73,1892(1976)
15. Adams, M. W. W. and D. O. Hall, Biochem. J. 183, 11(1979)
16. Adams, M. W. W., L. E. Mortenson and J. S. Chen, Biochim. Biophys. Acta, 594, 105(1981)
17. Hornhardt, S., K. Schneider and H. G. Schlegel, Biochim. 68, 15(1986)
18. Sawers, R. G. and D. H. Boxer, Eur. J. Biochem. 156, 265(1986)
19. Ballantine, S. P. and D. H. Boxer, Eur. J. Biochem. 156, 277(1986)
20. Kondratieva, E. N. and I. N. Gotogov, In: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology (Fiechter, A. ed) (1983) vol.28, pp139-191, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
21. Clark, W. M., Oxidation-Reduction Potentials of Organic Systems, (1960) Williams & Wilkins, Baltimore
22. Neish, A. C. and G. A. Ledingham, Can. J. Research, B, 27, 694(1949)
23. Johnson, R., R. R. Colwell, R. Sakazaki and K. Tamura, Int. J. Syst. Bacteriol. 25, 12(1975)
24. Gray, C. T. and H. Gest, Science 148, 186(1965)
25. Zajic, J. E., N. Kosaric and J. D. Brosseau, Adv. Biochem. Eng. 9, 57(1978)
26. Weaver, P. F., S. Lien and M. Seibert, Solar Energy 24, 3(1980).
27. Adams, M. W. W., L. E. Mortenson and J. S. Chen, Biochim. Biophys. Acta 594, 105(1981)
28. Kondratieva, E. N. and I. N. Gotogov, Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 28, 139(1983)
29. Vignals, P. M., A. Colbeau, J. C. Willison and Y. Jouanneau, Adv. Microb. Physiol. 26, 155(1985)
30. Miyake, J. and S. Kawamura, Int. J. Hydrogen Energy 12,147(1987)
31. Weissman, J. C. and J. R. Benemann, Appl. Envir. Microbiol. 33, 123(1977)
32. Ormerod, J. G., K. S. Ormerod and H. Gest, Arch. Biochem. Biophys. 94, 449(1961)
33. Miyake, J., X. Y. Mao and S. Kawamura, J. Ferment. Technol. 62, 531(1984)
34. Brosseau, J. D. and J. E. Zajic, Biotechnol. Bioeng. 24, 1469(1982)
35. Tanisho, S., Y. Suzuki and N. Wakao, Int. J. Hydrogen Energy, (1987)  
In printing