

# Enterobacter aerogenes 固定化休止菌の水素発生速度<sup>†</sup>

谷生重晴・島崎 健\*・若尾法昭

横浜国立大学工学部 物質工学科<sup>††</sup>

微生物の発酵を利用して水素を生産する方法は、光合成を利用する方法に比べ、1) 太陽光を必要としないから、暗所で24時間連続発生が可能である。2) 発生量は受光面積ではなく槽体積で増加するから装置が小さくてすむ、という利点を持っている。著者らが草の葉から単離した発酵水素発生菌<sup>3)</sup>は、*Enterobacter aerogenes* の一種 (strain E. 82005) で、好気状態でも、嫌気状態でもよく増殖する通性嫌気性菌である。この菌は大腸菌と同じ *Enterobacteriaceae* 科に属し、人間や動物の腸内、草木、土の中に棲んでいる毒性の少ない菌であるから、取扱いが非常に容易であるという利点も持っている。この菌は増殖に適した培地ではグルコースから  $274 \text{ ml}/(\text{g-dry cell}\cdot\text{h})$  ( $38^\circ\text{C}$ ) という早い発生速度で水素を発生することがわかっている<sup>4)</sup>。しかし、産業廃液のように、栄養条件の厳しい培地での発生速度についてはまだわかっていない。

本研究では、そのような栄養条件における水素発生速度を知ることが目的として、炭素源(グルコース)のみ存在し、増殖に必要な栄養源を含まない培地における水素発生について調べた。また、増殖できない培地で連続的に水素を生産するには、ウォッシュアウトを避けるために菌を固定化する必要が生じるので、菌を包括固定することによって、発生と代謝がどのような影響を受けるかを調べた。

## 実験方法

**菌と培養条件** 実験に使用した菌は *Enterobacter aerogenes* E. 82005 である<sup>3,4)</sup>。寒天培地上の菌を増殖培養液に移植し、 $37^\circ\text{C}$ 、22時間通気攪拌培養して増菌した。菌はリン酸緩衝液で二回洗浄—遠心分離して本実験に使用した。増殖培養はイオン交換水 1000 ml あたり、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  14g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2g, クエン酸ナトリウム  $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2g の無機塩類に、グルコースを 5g だけ加えた(A)培地とグルコース 30g, ペプトン 20g を加えた(B)培地の二種類用いた。

水素発生速度の実験は緩衝液にグルコースのみを加えた培地で行った。(A)培地から集めた菌は懸濁培養実験に、(B)培地から集めた菌は固定培養実験に使用した。

**固定化** (B)培地から集めた菌をイオン交換水に懸濁し、菌体濃度が約  $1\text{mg}/\text{ml}$  のアルギン酸ナトリウム 1% 液を 100 ml 調整した。この懸濁液を直径 1.5 mm のピペットの先端から 0.1 M  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  溶液中に滴下して、直径 3~5 mm のアルギン酸カルシウム粒子中に菌を包括固定した。

**実験装置と方法** 装置の略図を Fig. 1 に示す。気相と液相の空気は Ar で置換した。液の攪拌にはマグネチックスターラを使用した。pH の変動は  $\pm 0.05$  以内におさめ、温度変動は  $\pm 0.5^\circ\text{C}$  以内におさめた。ガス発生速度は、エアートラップに通ずるバルブを 30 分ごとに閉じ、10% 硫酸の入ったマンオメータで、0.1 ml のガスが発生する時間を測定した。ガスシリンジでラバーセプタム部からガスサンプルを抜き取った後、このバルブを開いて次の測定に備えた。ガスサンプルの組成はガスクロマトグラフで分析した。液組成は実験終了後培養液から菌を遠心分離し、上澄液をガスクロマトグラフに掛けた。気相成分の分析は TCD で、液相成分の分析は FID で行った。分析条件は Table 1 に示した。

## 実験結果と考察

**懸濁培養** 気相体積 150 ml, 液体積 1000 ml の培養槽で、リン酸緩衝液にグルコースのみを 0.1% (wt) 含む培地から E. 82005 菌が発生する全ガスの発生速度は、培地 pH に対して Fig. 2 のように変化した。グルコース濃度が小さいために、平衡状態に至る前に発生が止まっていると考えられるが、培地 pH が小さいほどガス発生速度は大きい。グルコース代謝による気体の発生は水素と炭酸ガスだけである。水素の培地への溶解度 ( $0.0167 \text{ ml}/\text{ml-water}$ ,  $35^\circ\text{C}$ ) は小さいが、 $\text{CO}_2$  の溶解度は非常に大きく、かつ、pH によっても非常に異なる (例えば、 $35^\circ\text{C}$ , pH 5 で  $0.619 \text{ ml}/\text{ml-water}$ , pH 7 で  $3.27 \text{ ml}/\text{ml-water}$ )。したがって、発生した  $\text{CO}_2$  の多くは培地に溶けていると考えられる。

そこで、グルコース濃度を 1% にし、発生ガスの分析を行いながら発生速度を測定した結果が Fig. 3 である。菌の増殖がないので、水素の発生速度は植菌後速やかに

<sup>†</sup> 1987年3月24日受理；化学工学協会第50年会（横浜，1985年3月）にて一部発表

<sup>††</sup> 〒240 横浜市保土ヶ谷区常盤台 156

\* 日揮 ㈱

Table 1 Analytical conditions of gas chromatograph

	Ethanol, Acetate	2,3-Butanediol	H <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>
Column				
packing	Porapak-T	Chromosorb 101	molecular sieve 5A	activated carbon
dimension	φ 4 × 2000 mm	φ 3 × 2000 mm	φ 3 × 1000 mm	φ 3 × 500 mm
Temperature				
injection	200 °C	200 °C	room temp.	room temp.
column	170 °C	170 °C	room temp.	room temp.
Carrier gas	He	He	Ar	He
Flow rate	50 ml/min	50 ml/min	33 ml/min	33 ml/min
Detector	FID	FID	TCD	TCD

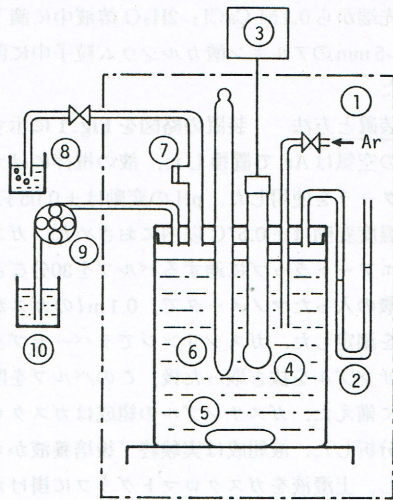


Fig. 1 Schematic diagram of equipment : 1. incubator, 2. volumeter, 3. pH controller, 4. pH electrode, 5. magnetic stirrer, 6. thermomometer, 7. rubberseptum, 8. air trap, 9. peristaltic pump, 10. pH control liquid

一定値になっている。それに比べ、CO<sub>2</sub>の発生速度はゆっくり増加し、約6時間後一定値になっている。Fig. 3(a)に見られるように、気相中のArガスも約6時間で完全に置換されており、以後、気相のCO<sub>2</sub>とH<sub>2</sub>の組成比(CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>)は約2.3を保っている。E. aerogenesは、pH 5付近では、1 molのグルコースから約2 molのCO<sub>2</sub>と約1 molの水素を発生することが知られているので<sup>2)</sup>、気相と液相でほぼ平衡になったと考えられる。したがって、pH 5.0における休止菌のガス発生速度は、水素が約28 ml/(g-dry cell · h)、CO<sub>2</sub>が約64 ml/(g-dry cell · h)であることがわかった。

Tanisho らは懸濁増殖菌が pH 5.0において80 ml/(g-dry cell · h)の速さで水素を発生することを報告してい

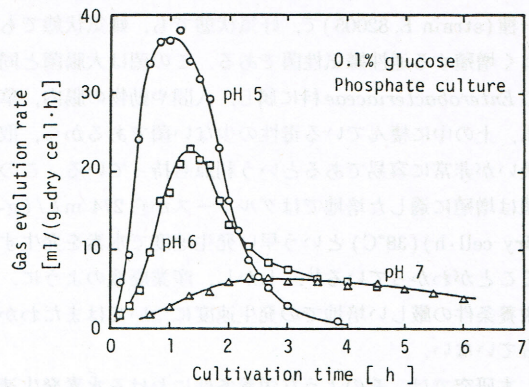


Fig. 2 Gas evolution rate of resting cell under various pHs of culture liquid

る<sup>4)</sup>。したがって、pH 5.0にける懸濁休止菌は増殖菌の約25%の速度で水素を発生していることになる。休止菌の場合、生存率によって発生速度が大きく変わる可能性が残されているが、異化代謝のみでは水素発生が遅いことを示す興味ある結果である。

**固定培養** 休止菌を1%アルギン酸カルシウムに固定したときの水素発生速度と培地pHの関係を調べた。培養槽体積は250 mlである。培地にはトリス緩衝液を使用し、液温は34°C、pH調節は1M-トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン液を滴下して行った。その結果、Fig. 4に△印で示したように、固定休止培地ではpHの広い範囲(4.5~7.5)にわたって、ほぼ一定の発生速度(58 ml/(g-dry cell · h))で水素を発生することがわかった。Fig. 4には、比較のために、Tanisho らが懸濁増殖菌で測定した水素発生速度<sup>4)</sup>を■印で示している。固定休止菌は懸濁増殖菌に比べて安定した水素発生を行っているが、増殖菌の最大発生速度の約20%程度の速さしかない。しかし、pHが7より大きい培地、または5より小さい培地においては、増殖菌より速い速度で水素発生を行うことがわかる。Tanisho らによると、pH 7.0~7.5は菌体

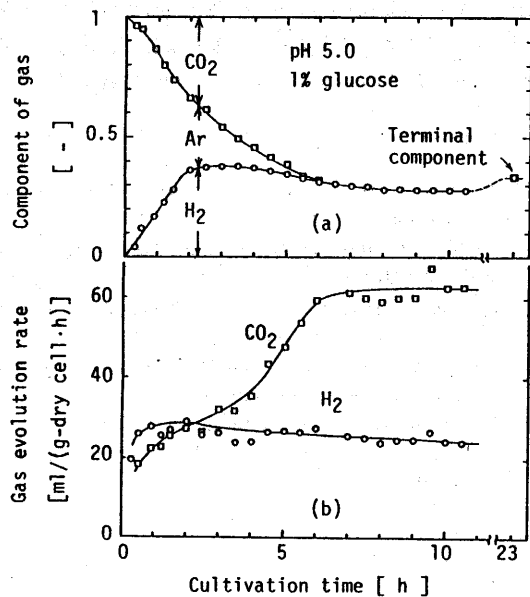


Fig. 3 Gas evolution rate and component of gas phase

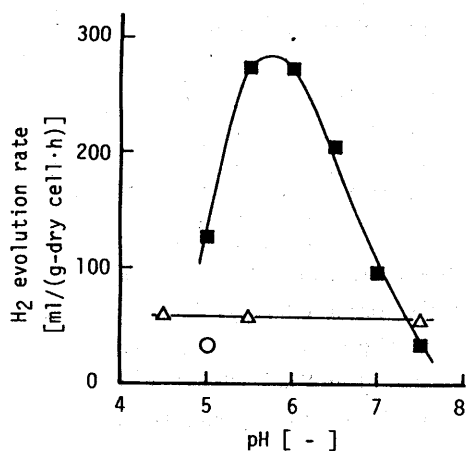


Fig. 4 Effect of pH on the evolution rate of hydrogen :  
 -△- immobilized resting cell,  
 -○- suspended resting cell,  
 -■- suspended growing cell by Tanisho et al.<sup>4)</sup>

の増殖には非常に適しているが水素発生には不適当な環境であり、また、pH 5.0は菌体の増殖にとっても水素発生にとっても非常に不適当な環境である<sup>4)</sup>。pH 4.5では菌の生存さえも困難である。したがって、固定化による水素発生は、このような不適当な環境において発生を維持する場合に、有効な手段になると考えられる。

固定化菌によるグルコースの代謝産物のうち、水素、2,3-ブタンジオール、エタノール、酢酸の収率を測定し

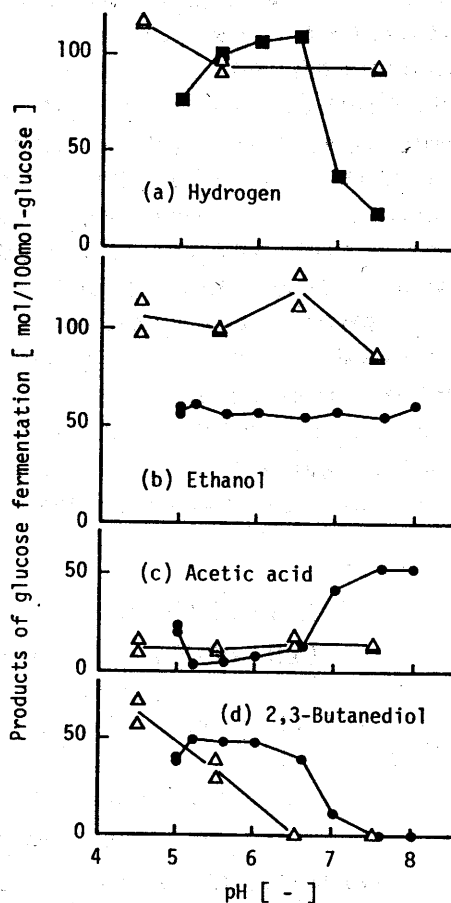


Fig. 5 Products of glucose fermentation :  
 -△- immobilized resting cell,  
 -●- suspended growing cell by Neish et al.<sup>2)</sup>,  
 -■- suspended growing cell by Tanisho et al.<sup>4)</sup>

た。Fig. 5に示している(△印)。参考のために、Neishらがイースト抽出物を0.5%含む合成培地で測定した発酵収率<sup>2)</sup>(●印)も示した。固定化による収率の顕著な変化は水素と酢酸の収率(Fig. 5(a), (c))によく現われている。*E. aerogenes*菌はpHが6.3より大きい培地では混合酸発酵をし、6.3より小さい培地では2,3-ブタンジオール発酵をするといわれている<sup>1,5)</sup>。Neishらのデータによれば、酢酸の収率はpH 7.6では100 mol-glucoseあたり52.7 molにもなるが、固定化菌の酢酸収率はわずか15 molしかない。そのうえ、pHが4.5から7.5の広い範囲にわたってその収率はほぼ一定である。また水素の収率についても、固定化菌はpH 4.5から7.5にわたってほぼ1 mol-H<sub>2</sub>/mol-glucoseの収率を維持しており、Tanishoらの懸濁増殖菌の水素収率<sup>4)</sup>(Fig. 5(a) ■印)がpH 7.5において非常に小さくなっていると際立った

対比を示している。これら固定化菌の代謝産物の収率が pH 4.5 から 7.5 にわたって影響されないという結果は、菌の生存および水素発生速度も pH に影響されなかったことと考え合わせると、アルギン酸カルシウム粒子内の菌体の回りの pH が、培地 pH の影響をあまり受けず、一定になっていると考えることでよく説明できる。ただ、Fig. 5 (d) の 2,3-ブタンジオールの収率変化が、水素、酢酸、エタノールの収率変化と異なって、pH の影響を受けているので、その理由の解明は今後の課題であろう。

以上から、増殖できない条件における *E. aerogenes* str. E. 82005 の水素発生について、次のことが明らかになった。増殖できない培地での発生速度は非常に小さい (28 ml/(g-dry cell·h))。固定化することによって、培地 pH 4.5 から 7.5 の範囲にわたって安定した水素発生 (58 ml/(g-dry cell·h)) が得られる。pH 5 から菌が死滅す

るおそれのある pH 4.5 の範囲、また pH 7 から 7.5 の範囲で増殖培地より発生速度が大きくなることから、固定化することはこのような条件下での利用に適している。

#### Literature cited

- 1) Mickelson, M. and C.H. Werkman : *J. Bacteriol.*, 36, 67 (1938)
- 2) Neish, A.C. and G.A. Ledingham: *Can. J. Research*, B 27, 694 (1949)
- 3) Tanisho, S., N. Wakao and Y. Kosako : *J. Chem. Eng. Japan*, 16, 529 (1983)
- 4) Tanisho, S., Y. Suzuki and N. Wakao : *Int. J. Hydrogen Energy*, 12, 623 (1987)
- 5) Wood, W.A. : "The Bacteria", I.C. Gunsalus and R.Y. Stanier eds. vol.2, p.59, Academic Press, New York (1961)

## Rate of Hydrogen Evolution by Immobilized Resting Cells of *Enterobacter aerogenes*

Shigeharu Tanisho, Takeshi Shimazaki\* and Noriaki Wakao

Dept. of Material Science and Chem. Eng., Yokohama  
Nat'l. Univ., Yokohama 240

**Key Words** : Hydrogen Evolution, Resting Cell, Immobilized Cell, Glucose Fermentation

Resting cells of *E. aerogenes* strain E. 82005 evolved hydrogen at a speed of 28 ml/(g-dry cell·h) from glucose. The evolution rate of the resting cells was stabilized by immobilization with calcium alginate in a wide range of pH from 4.5 to 7.5. Since the rate (ca. 58 ml/(g-dry cell·h)) was greater than that of growing cells below pH 5 and above pH 7, hydrogen evolution under these particular conditions could be enhanced by immobilizing the cells.

\* JGC Corporation