

# 光合成細菌コンソーシアによる水素生成に関する研究

高 仁 範<sup>1</sup>・水 野 修<sup>2</sup>・野 池 達 也<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 工博 東北大学大学院工学研究科土木工学専攻 (〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉)

E-mail: koib@ep1.civil.tohoku.ac.jp

<sup>2</sup> 工博 アタカ工業株式会社環境研究所 (〒619-0223 京都府相楽郡木津町相楽台9-1)

<sup>3</sup> フェロ-会員 工博 東北大学大学院工学研究科土木工学専攻 (〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉)

混合培養の光合成細菌による有機性廃棄物の酸発酵廃水を予想した人工基質のVFAから水素生成に及ぼす $\text{NH}_4^+$ 濃度の影響に関して回分実験を行った。初期 $\text{NH}_4^+$ 濃度は0~12mM間で7階に調節し、培地中のVFA濃度は酢酸1500mg/L, プロピオン酸500mg/L, 酪酸1500mg/Lに調節した。 $\text{NH}_4^+$ 濃度0~6mM間では水素生成が現れた。生成されたガス中水素の割合は $\text{NH}_4^+$ 濃度4, 6mMにおいて88%であった。基質から水素への転換率は12.6~42.7%であった。水素生成速度は6mMの $\text{NH}_4^+$ 濃度で42.3  $\mu\text{L}/\text{mg dry wt}/\text{h}$ で最大となった。8mM以上の $\text{NH}_4^+$ 濃度ではガス発生が現れなかった。

**Key Words :** phototrophic consortia, hydrogen production, nitrogenase

## 1. 序論

二酸化炭素による地球温暖化問題が顕在化している現在、水素ガス(以下水素と略す)は燃焼時に二酸化炭素を排出しないクリーンなエネルギーであるばかりでなく、単位重量あたりの発熱エネルギーは石油の約3倍もあり、次世代の有力なエネルギー源のひとつとして注目されている。特に、水素を都市の有機性廃棄物から回収できれば、環境浄化のみならず水素という有価資源の回収にも貢献できることから、微生物の利用は水素生産の方法の中で最も大きな可能性を秘めた重要なプロセスであると言える。微生物を用いて生産する場合は、嫌気的条件下において*Clostridium*属細菌等の酸生成細菌および光合成細菌を用いる方法が知られている<sup>2)</sup>。酸生成細菌は、主に炭水化物を分解する過程で有機酸やアルコールの生成に伴い水素を生成する。この酸発酵過程では水素の他に数種類の発酵産物を生成するため、一般に水素の収率はさほど高くない。それゆえ、発生した発酵産物をさらに処理する必要があるため、水素回収を主目的とする場合、酸生成細菌による水素回収だけでは十分とは言えない。一方、光合成細菌は有機酸やアルコールなど比較的分子の有機物

質を炭素源として増殖し、水素を生成するため、酸発酵生成物より水素を回収することが可能であり、生成ガス中の水素は86%を越える高含有率である。また、光合成細菌は有機酸およびアルコールを水素と二酸化炭素に分解し、廃水処理の最終段階としても機能する。光合成非硫黄細菌による水素生成に関しては、水素収率および生成速度に関する研究が数多く報告されている<sup>3)-15)</sup>。しかし、これらの研究は総じて、乳酸、リンゴ酸などの単一基質を用い、さらに単一種の細菌によるものであり、実廃水に適用する場合には前処理が必要とされ、未だ実用化の段階には至っていない。これに対して、混合種の基質および光合成細菌を用いた水素生成に関する研究は、まだほとんど報告されていない。混合培養の細菌の中には、生成された水素を消費する可能性を有するものの存在も考えられるが、実用化の見地から実廃水を処理すると同時に水素の回収を目的とする場合、消費される有機物質の種類も多くなるため、処理効率の向上が期待される。

当研究室では、有機性廃棄物からの水素回収を目的として、図-1に示したように酸生成細菌および光合成細菌の水素生成機能を組み合わせた二相式水素生成プロセスを目指した基礎的研究を進めている。これは前段で酸発酵により水素を生成し、さら

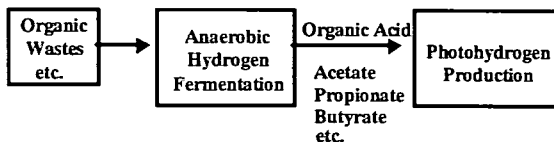


図-1 二相式水素生成プロセス

に、前段の発酵生成物を後段で混合培養の光合成により水素を回収するプロセスである。

二相式水素生成プロセスでは、酸発酵生成物には有機酸やアルコール類の他に  $\text{NH}_4^+$  が含有する可能性が考えられる。 $\text{NH}_4^+$  は光合成細菌の窒素源として利用されるが、同時にニトロゲナーゼの合成を阻害するため、水素生成量が低下する原因となる。光合成細菌は、元来、大気中の窒素の固定に用いる酵素であるニトロゲナーゼを利用して水素生成を行うことが知られている<sup>16)</sup>。ニトロゲナーゼは基質特異性の低い酵素であり、窒素固定以外にも、水素生成、アセチレン還元などを促進することが可能である。従って、 $\text{NH}_4^+$  濃度は水素生成を左右する重要な因子であると言える。

本研究では、混合培養の光合成細菌による水素生成に及ぼす  $\text{NH}_4^+$  濃度の影響を明らかにするため、酸発酵後の廃液を想定した人工基質を用いて回分実験を行った。基質中の初期  $\text{NH}_4^+$  濃度が水素生成、有機酸利用特性およびニトロゲナーゼ活性に及ぼす影響について検討したものである。

## 2. 実験材料および方法

### (1) 光合成細菌の培養

多種類の細菌を含む光合成細菌懸濁液(以下混合培養の光合成細菌と呼ぶ)を用い、表-1に示した組成になるよう蒸留水を用いた培地(無滅菌)で炭素源と窒素源を投入してから培養を行った。培地組成は、Miyakeらの基本培地<sup>10)</sup>を修正したものである。炭素源としてリンゴ酸 10mM(mmol/L)、コハク酸 10mM、ピルビン酸 10mM および窒素源としてグルタミン酸 10mM を添加して、3日間培養してから種菌として実験に用いた。前培養期間中において吸光パターンの変化は見られなかった。種菌の吸光特性を図-2に示した。吸光特性から、種菌には光合成細菌の特徴であるバクテリオクロフィル a (OD 806nm および 856nm) と b (OD 1026nm) を持つ光合成細菌が優占していることがわかる<sup>18)</sup>。

### (2) 回分実験

実験は 120mL のバイアルを用いて、基本培地(表-

表-1 基本培地の組成

Components	Concentration(mg/L)
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	800
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	700
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	400
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	50
EDTA(disodium salt)	20
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	30
$\text{H}_3\text{BO}_3$	3
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.5
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.24
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0.04
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.1
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.02
Biotin, Thiamin, p...Aminobenzoate, Nicotinate, Nicotinamide	0.00015

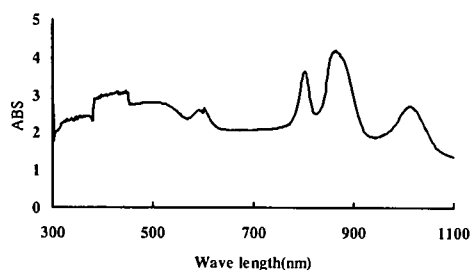


図-2 種菌の吸光特性

1)に炭素源(揮発性脂肪酸)として酢酸 25mM (1500mg/L)、プロピオン酸 6.75mM (500mg/L)、酪酸 17mM (1500mg/L) になるように調整した。この揮発性脂肪酸組成は、前段で酸発酵に伴う水素生成が起こっていることを想定したものである。窒素源として  $\text{NH}_4\text{Cl}$  を用い、初期  $\text{NH}_4^+$  濃度が 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12mM になるように添加した。種菌を OD 600nm において吸光度が 0.8 になるよう接種して全体量を 80mL にした後、初期 pH を 6.8 に調節した。嫌気状態を保つため、バイアルの気相部をアルゴンガスで置換した後、速やかにブチルゴム栓とアルミシールキャップで密栓した。バイアルは、水温を 30℃ に調節した振とう培養器で 60 stroke/min の条件で培養した。光源にはレフランプ(100W, 6個)を用い、バイアル受光面で 5kLux になるように光源の距離を調節した。ガス生成が現れた時点から試料 0.5mL を採集して分析に用いた。

### (3) 分析方法

ガス生成量はガラスシリンジによるガス平衡により測定し、標準状態(0℃, 1atm)に換算した。生成ガスの組成を求めるため  $\text{H}_2$  および  $\text{CO}_2$  に関して、以下

のように分析を行った。H<sub>2</sub>はガスクロマトグラフィー(Shimadzu GC-8A型, 熱伝導度検出器)を用いて測定した。ステンレス製のカラム(2m)を用い、Unibead Cを充填して検出器温度100℃, カラム温度70℃, 窒素キャリアーガス(50mL/min)の条件で分析した。CO<sub>2</sub>はガスクロマトグラフィー(Shimadzu GC-8A型, 熱伝導度検出器)を用いて測定した。ステンレス製のカラム(2m)にPorapakTを充填し, 検出器温度100℃, カラム温度70℃, ヘリウムキャリアーガス(30mL/min)の条件で分析した。

揮発性脂肪酸(VFA)はキャピラリー電気泳動装置(Photal, CAPI-3200)を用いた。泳動液は2, 6-ピリジンジカルボン酸(ジピコリン酸)とセチルトリメチルアンモニウムブロミド(CTAB)の混合液に100mMトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(Tris)を用いてpHを5.8に調整して使用した。測定はキャピラリーカラム(ID75 $\mu$ m $\times$ 805mm, EL680mm)を用いて温度20℃, 電圧-25kVの条件で220nm(インダイレクトUV検出)で検出を行った。

バクテリオクロロフィル(Bchl)濃度はアセトン-メタノール(7:2)混合液を用いて抽出し, 吸光度計(DR/4000, HACH)で790nmの吸光度を測定し<sup>19)</sup>, *R. sphaeroides*から精製したBchl(Sigma, B5906)を標準物質として検量線を作成し換算(Bchl mg/L=13.148 $\times$ OD790, R<sup>2</sup>=0.9982)した。

ニトロゲナーゼ活性の測定はMeyerらの方法<sup>12)</sup>に準じて, 試験管(18 $\times$ 180mm)に培養液2mLを注入し, 20mMのリンゴ酸0.1mL, 20 $\mu$ g/Lのクロラムフェニコル0.2mLを加え, 気相部をアルゴンで満たし, 30℃で10分間, 5kluxで光照射を行った。さらに, アセチレンガスを1ml注入し, 混合した後に再び光照射を続け, 0.5~3.5時間の間, アセチレン還元から生ずるエチレンが直線的に増加する間の生成量をニトロゲナーゼの活性とした。気相中のエチレンの分析は, ガスクロマトグラフィー(Shimadzu GC-8A型, 水素炎イオン検出器)にUnibead Cを充填した2mのステンレス製のカラムを用い, 検出器温度180℃, カラム温度160℃, 窒素キャリアーガス(190mL/min)を用いて分析した。

菌体量は吸光度(OD600)を測定し, 乾菌体量との関係(g dry wt./L=0.58 $\times$ OD600, R<sup>2</sup>=0.9882)を測定して換算した。乾菌体量は試料を遠心分離(1700G, 30min)してから蒸留水で1回洗浄して, さらに遠心分離(1700G, 30min)を行い, 蒸留水で洗浄し, 80℃で24時間乾燥してから重量を測定した。

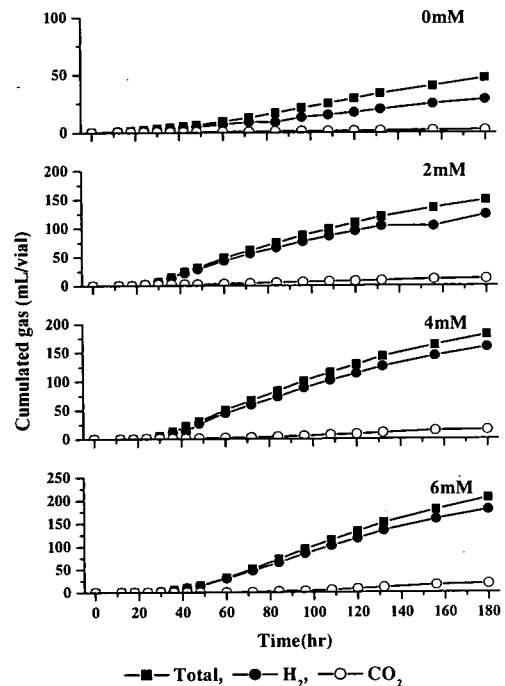


図-3 各NH<sub>4</sub><sup>+</sup>濃度において生成されたガスの累積量

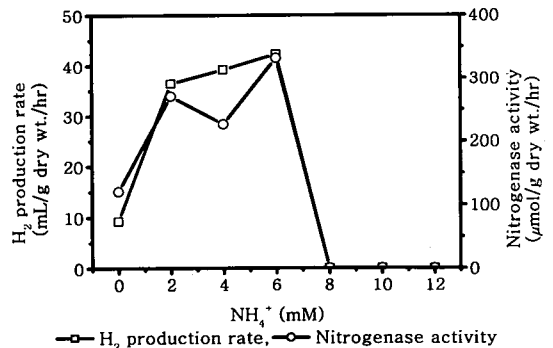


図-4 各NH<sub>4</sub><sup>+</sup>濃度におけるニトロゲナーゼ活性と最大水素生成速度

### 3. 実験結果

#### (1) 水素ガス生成に及ぼすNH<sub>4</sub><sup>+</sup>の影響

図-3に各々のNH<sub>4</sub><sup>+</sup>濃度において生成されたガスの累積生成量を示した。

NH<sub>4</sub><sup>+</sup>濃度が0, 2, 4, 6mMでは水素および二酸化炭素の生成が起こったが, 8mM以上ではガス生成が見られなかった。NH<sub>4</sub><sup>+</sup>濃度が0mMの場合, 滞滞時間が12時間であるのに対して, 2, 4mMでは24時間, 6mMでは30時間であった。生成したガス中の水素の割合は, 0mMのNH<sub>4</sub><sup>+</sup>濃度で60%, 2mMで83%, 4mMおよび6mMで88%であった。累積水素生成量は, 培

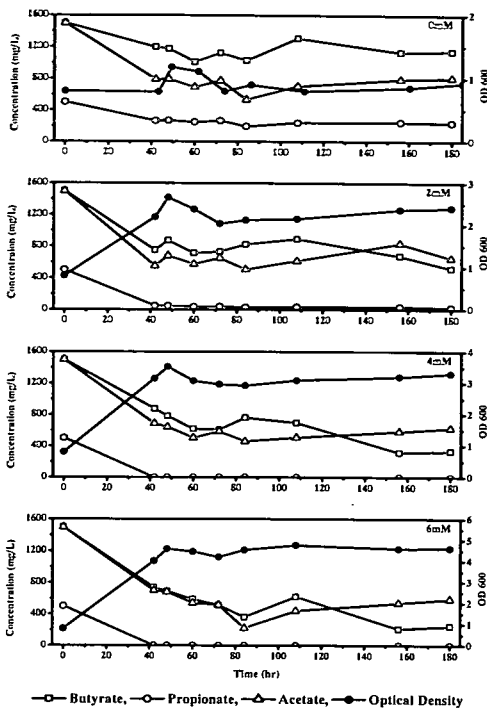


図-5 水素が生成した場合の各NH<sub>4</sub><sup>+</sup>濃度における菌体およびVFAの濃度変化

養180時間において、6mMのNH<sub>4</sub><sup>+</sup>濃度で179mL/vialとなり、4mMの160mL/vial、2mMの149mL/vial、0mMの29mL/vialより大きくなった。

### (2) ニトロゲナーゼ活性と最大水素生成速度

図-4に各NH<sub>4</sub><sup>+</sup>濃度におけるニトロゲナーゼ活性と最大水素生成速度を示した。最大水素生成速度は水素生成曲線の傾きから求めた。最大水素生成速度は、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>濃度が6mMにおいて42.3 μL/mg dry wt./hr、4mMで39.2、2mMで36.4、0mMで9.4 μL/mg dry wt./hrであった。ニトロゲナーゼ活性は6mMのNH<sub>4</sub><sup>+</sup>濃度で332 μmol/g dry wt./hr、4mMで226、2mMで271、0mMで120 μmol/g dry wt./hrとなった。最大水素生成速度とニトロゲナーゼ活性の変化は類似した傾向にあることから、本研究における水素生成はニトロゲナーゼに依存していると考えられる。

### (3) VFAの挙動

図-5に水素が生成した場合の各NH<sub>4</sub><sup>+</sup>濃度における菌体およびVFAの濃度変化を示した。菌体濃度は培養開始から48時間まで急速に増大している。その後はいずれのNH<sub>4</sub><sup>+</sup>濃度においても菌体濃度に変化はほとんど見られなかった。菌体濃度の増大はNH<sub>4</sub><sup>+</sup>濃度が6mMの場合に大きく、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>によって増殖が制

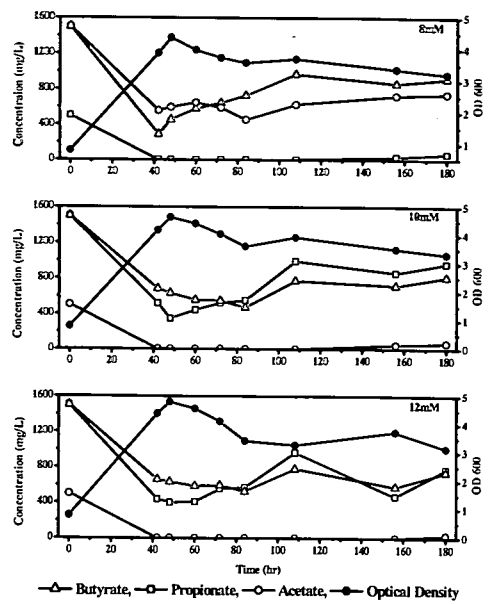


図-6 水素が生成しなかった場合の各NH<sub>4</sub><sup>+</sup>濃度における菌体およびVFAの濃度変化

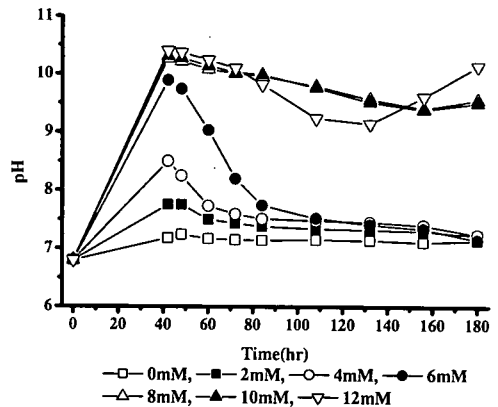


図-7 各NH<sub>4</sub><sup>+</sup>濃度におけるpHの変化

限されていることがわかる。プロピオン酸は細菌の増殖に全部使われている。酢酸と酪酸は細菌の増殖と水素生成に伴い分解されていることが分った。

図-6に水素生成が起こらなかった8mM以上のNH<sub>4</sub><sup>+</sup>濃度におけるVFAおよび菌体濃度の変化を示した。細菌の増殖は培養開始から48時間程度で終了している。細菌の増殖に違いがほとんど見られず、8、10、12mM濃度で同じ傾向になった。VFA濃度の変化も類似した傾向にあり、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>濃度による差異がほとんど見られなかった。

図-7に各NH<sub>4</sub><sup>+</sup>濃度におけるpHの変化を示した。pHは、培養の初期の約40時間までに上昇する傾向にあった。NH<sub>4</sub><sup>+</sup>濃度が高くなるに従い、pHの上昇

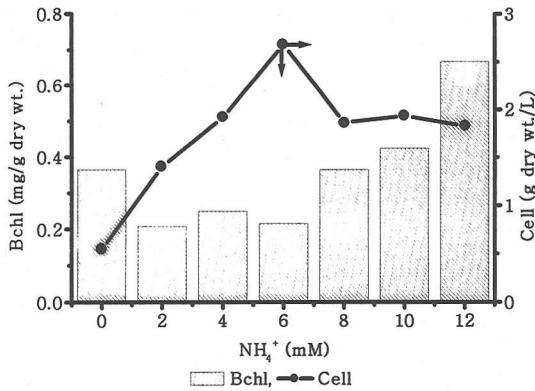
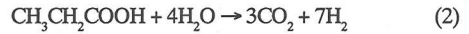


図-8 各NH<sub>4</sub><sup>+</sup>濃度における菌体濃度とBchl含有量

も大きくなった。pHが上昇している期間では、細菌の増殖とVFA消費が起こっている。NH<sub>4</sub><sup>+</sup>濃度が2, 4, 6mMの場合、培養初期にpHは急激に上昇するが、48時間以降は水素生成に伴い初期pH7近辺まで低下している。一方、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>濃度が8mM以上では、pHは上昇したまま低下しなかった。

表-2には消費された基質から水素への転換率を示した。本研究において生成可能な水素量を求めるため、実際利用されたVFA量から求めた値を生成可能な水素量とし、実際に発生した水素量と比較して示した。各VFAから水素への転換率の算出は北島らの報告を参考して次式のように計算した<sup>20)</sup>。



各NH<sub>4</sub><sup>+</sup>濃度における生成可能な水素量からの転換率は、6mMにおける42.7%で最も高い転換率となり、4mMで39.7%、2mMで33.0%、0mMで10.7%であった。

VFAの除去率は水素生成と共に増大し、6mMのNH<sub>4</sub><sup>+</sup>濃度において76.3%が除去された。一方、8mM以上のNH<sub>4</sub><sup>+</sup>濃度においては47.6~56.0%しか除去されていない。

#### (4) バクテリオクロロフィル(Bchl)含有量

図-8に菌体濃度とBchl含有量に及ぼすNH<sub>4</sub><sup>+</sup>濃度

表-2 各NH<sub>4</sub><sup>+</sup>濃度におけるVFAからの水素への転換率およびVFA除去率

NH <sub>4</sub> Cl	VFA	Initial		Final		Capable H <sub>2</sub> production potential (mM)	VFA removal rate (%)	Actual H <sub>2</sub> production (mM)	Conversion rate(%)
		Concentration (mg/L)	H <sub>2</sub> production potential (mM)	Concentration (mg/L)	H <sub>2</sub> production potential (mM)				
0mM	Acetate	1500	100.0	1146	76.4	23.6	37.3	16.0	12.6
	Propionate	500	47.3	238	22.5	24.8			
	Butyrate	1500	170.3	810	92.0	78.3			
	Sum	3500	317.6	2194	190.9	126.7			
2mM	Acetate	1500	100.0	520	34.7	65.3	65.9	69.2	33.5
	Propionate	500	47.3	27	2.6	44.7			
	Butyrate	1500	170.3	647	73.5	96.8			
	Sum	3500	317.6	1194	110.7	206.9			
4mM	Acetate	1500	100.0	330	22.0	78.0	72.8	89.2	39.7
	Propionate	500	47.3	0	0.0	47.3			
	Butyrate	1500	170.3	623	70.8	99.5			
	Sum	3500	317.6	954	92.8	224.8			
6mM	Acetate	1500	100.0	243	16.2	83.8	76.3	100.3	42.7
	Propionate	500	47.3	0	0.0	47.3			
	Butyrate	1500	170.3	585	66.5	103.8			
	Sum	3500	317.6	829	82.7	234.9			
8mM	Acetate	1500	100.0	915	61.0	39.0	50.8	-	-
	Propionate	500	47.3	65	6.1	41.1			
	Butyrate	1500	170.3	744	84.4	85.9			
	Sum	3500	317.6	1724	151.5	166.0			
10mM	Acetate	1500	100.0	962	64.1	35.9	47.6	-	-
	Propionate	500	47.3	65	6.1	41.1			
	Butyrate	1500	170.3	808	91.7	78.5			
	Sum	3500	317.6	1835	162.0	155.6			
12mM	Acetate	1500	100.0	774	51.6	48.4	56.0	-	-
	Propionate	500	47.3	29	2.7	44.6			
	Butyrate	1500	170.3	739	83.8	86.4			
	Sum	3500	317.6	1541	138.2	179.4			

の影響を示した。Bchl含有量は、 $\text{NH}_4^+$ 濃度が6mMまでは菌体濃度が増大する傾向とは反対に減少する傾向を示しているが、6mM以上では菌体濃度が低いにも関わらず増大する傾向にあった。菌体濃度は6mMにおける2.68g dry wt./Lで最も高い値となり、Bchl含有量は12mMにおいて最大値となり0.67mg/g dry wt.であった。

#### 4. 考察

光合成細菌による水素生成に及ぼす $\text{NH}_4^+$ 濃度の影響に関して、Tsygankovらは、硫酸アンモニウムを窒素源として*R. capsulatus*を培養したところ、 $\text{NH}_4^+$ 濃度が4mMまでは水素生成速度が上昇するが、この濃度以上では低下して8mMで0になったと報告している<sup>8)</sup>。また、SegersとVerstraeteは、有機酸からの水素生成のためには1.9~3.8mMの硫酸アンモニウム濃度を維持する必要があると報告している<sup>21)</sup>。本研究でも6mMまでは水素生成速度が増加し(図-4)、8mM以上では0になり、上記の研究結果と一致している。 $\text{NH}_4^+$ は光合成細菌の水素生成に関わるニトロゲナーゼに影響を及ぼすとされる。

液相に $\text{NH}_4^+$ が存在すると、光合成細菌は窒素源として $\text{NH}_4^+$ を優先して利用するため、窒素固定の役割を担うニトロゲナーゼを合成しなくなる。その結果、ニトロゲナーゼからの水素生成が低下または停止すると考えられている<sup>23)</sup>。本研究では、 $\text{NH}_4^+$ 濃度の差によって水素生成に遅滞時間が見られたが、細

菌の増殖は培養40時間内ではほぼ終了している。また、VFAは細菌の増殖に伴い低下し、プロピオン酸はほとんど除去されている。一方、水素生成は増殖がほぼ終了した時点から開始しており、増殖とVFA消費の間に時間差が生じている。このことから、水素生成は同化代謝によって菌体量が増加した後に異化代謝によって生成したと言える。このように $\text{NH}_4^+$ 濃度により水素生成の開始に遅れが見られたのは、 $\text{NH}_4^+$ の存在によってニトロゲナーゼ活性が低下したためであると考えられる。しかし、培地に添加した $\text{NH}_4^+$ 濃度は低いため、細菌の増殖により $\text{NH}_4^+$ が消費され枯渇するとニトロゲナーゼの活性が回復され、水素生成が開始したと考えられる。しかしながら、8mM以上の $\text{NH}_4^+$ 濃度では、 $\text{NH}_4^+$ 濃度が高い上にVFA消費とともにpHが大幅に上昇したため、ニトロゲナーゼの活性が回復されなかったと考えられる。ニトロゲナーゼの活性に関してはpH6.5~7.0の間で最大となり、pHが上昇するに従って低下するため、結果としてpH7.5で水素生成量が減少し、pH8.0で水素生成は起こらないと報告されている<sup>24)</sup>。本研究でもpHが7付近ではニトロゲナーゼの活性が回復され、水素が生成されたが( $\text{NH}_4^+$ 濃度0, 2, 4, 6mMの場合)、pHが9以上に上昇した場合には、ニトロゲナーゼの活性が回復されず、水素が生成されなかった( $\text{NH}_4^+$ 濃度8, 10, 12mMの場合)。

本研究は回分的に行った実験であったため、pHの調節が困難であった。著者らは、pH7にコントロールした連続水素生成に関する研究で $\text{NH}_4^+$ 濃度が10mMまで水素生成が可能であり、これ以上の濃度

表-3 光合成細菌(紅色非硫黄細菌)による水素生成速度

Carbon source	Organism	Hydrogen production rate ( $\mu\text{L/hr/mg dry wt.}$ )	Reference
Acetate	<i>Rhodopseudomonas sp.</i>	104.35	Mao et al. (1986)
Acetate + Butyrate + Lactate	<i>Rhodopseudomonas sp.</i>	146.08	Mao et al. (1986)
Butyrate	<i>Rhodobacter sp.</i>	139.56	Mao et al. (1986)
Fructose	<i>R. capsulatus</i>	100	Hillmer and Gest (1977)
Fumalate	<i>R. sphaerioides</i>	80	Kim et al. (1981)
Glucose	<i>R. sphaerioides</i>	60	Kim et al. (1981)
	<i>R. capsulatus</i>	88	Hillmer and Gest (1977)
Lactate	<i>R. sphaerioides</i>	262	Miyake and Kawamura (1987)
	<i>Rhodopseudomonas sp.</i>	248.64	Miyake et al. (1984)
	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	19.5	Bolliger et al. (1985)
	<i>R. sphaerioides</i>	100	Fascetti et al. (1998)
	<i>R. sphaerioides</i>	190	Nagamine et al. (1996)
Malate	<i>R. rubrum</i>	100.8	Miyake et al. (1982)
	<i>Rhodopseudomonas sp.</i>	282	Miyake et al. (1984)
	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	23.4	Bolliger et al. (1985)
Pyruvate	<i>R. capsulatus</i>	130	Hillmer and Gest (1977)
Succinate	<i>R. sphaerioides</i>	80	Kim et al. (1981)
	<i>R. capsulatus</i>	100	Hillmer and Gest (1977)
	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	22.4	Bolliger et al. (1985)
	<i>R. sphaerioides</i>	116	Tsygankov et al. (1994)
Sucrose	<i>R. capsulatus</i>	60	Hillmer and Gest (1977)
Acetate + Propionate + Butyrate	Mixed culture	42.3	This study

では水素生成が不可能である結果を得ている<sup>27)</sup>。したがって、本研究における水素生成は、 $\text{NH}_4^+$ 濃度及びpHによって影響されたと言える。pHは菌体の増殖やニトロゲナーゼの活性に影響を及ぼすことが知られている。

光合成細菌のBchl含有量の変化は照度に依存するとされる<sup>13),22)</sup>。ManerとOelzeは、照度が強い場合、Bchl含有量の減少に伴いニトロゲナーゼ活性が高くなり、逆に照度が弱い場合はニトロゲナーゼ活性が低下してBchl含有量が増大すると述べている<sup>22)</sup>。本研究においては、 $\text{NH}_4^+$ 濃度の増大に伴いBchl含有量も増大している(図-8)。この現象は菌体増殖により透過する照度が低下したために起こったと考えられる。しかし、菌体濃度は6mMの $\text{NH}_4^+$ 濃度で最大であったが、Bchl含有量は12mMで最大となり、菌体濃度およびBchl含有量が最大となる $\text{NH}_4^+$ 濃度が異なっていた。この結果から、菌体増殖により透過する照度の低下以外に、 $\text{NH}_4^+$ によるニトロゲナーゼの活性阻害とpH上昇でもBchl含有量が変化すると考えられる。

表-3に光合成細菌(紅色非硫黄細菌)による水素生成速度を示した。水素生成速度に関しては、多くの研究が報告されているが、水素生成速度の範囲は22.4~262  $\mu\text{L}/\text{mg dry wt.}/\text{hr}$ であり、それぞれの研究によりかなりの差が見られる。これらの研究は全て純粋培養の光合成細菌による研究成果であるが、本研究では混合培養細菌を用いて行ったものであり、 $\text{NH}_4^+$ 濃度が6mMの場合に水素生成速度は最大となり42.3  $\mu\text{L}/\text{mg dry wt.}/\text{hr}$ であった。Nakadaら<sup>9)</sup>は、*R. sphaeroides* RVを用いた水素生成の研究において、発生したガスの組成は、 $\text{H}_2$  83.2%、 $\text{CO}_2$  5.6%、 $\text{CO}$  0.005%以下、 $\text{CH}_4$  0.009%以下、 $\text{H}_2\text{S}$  0.25ppm以下であると報告しているが、これらの値は本研究の結果とほぼ一致している。Tsygankovらは*R. capsulatus*を用いた研究で、基質から水素への転換率に関して、投入した乳酸の80%弱が消費され、その30%程度が水素生成に使われていると報告している<sup>8)</sup>。また、FascettiとTodiniは*R. sphaeroides* RVを用いた水素生成で、投入した乳酸の75%弱が消費され、59~70%が水素生成に使われたとしている<sup>29)</sup>。本研究の結果、6mMの $\text{NH}_4^+$ 濃度で76.3%の基質が消費され、その42.7%が水素に転換された。これらの研究成果において混合培養の光合成細菌により水素生成が十分可能であることが示された。

光合成細菌の純粋細菌による連続水素生成に関して尾形らは、開放系(基質非滅菌)と閉鎖系(基質滅菌)における連続実験を通して水素生成を行った結果、閉鎖系では安定した水素生成が可能であったの

に対し、開放系では運転開始から400時間経過後からはガス発生速度が急速に低下したと述べている<sup>26)</sup>。その原因として反応槽内のコンタミネーションを指摘している。この結果から純粋細菌による水素生成は前処理が必要であることを示している。一方、著者らは混合培養の光合成細菌による非滅菌系における水素生成に関する研究で、純粋細菌の水素生成速度には及ばないが、1ヶ月以上連続水素生成が可能である結果を得ている<sup>27)</sup>。これらの結果から混合培養による水素生成が、システムの維持管理面において経済的であると考えられる。

今後、連続的かつ安定的な水素生成を行うシステム(リアクター)の開発などの研究が期待される。特に光源として太陽光の利用技術の開発が期待される。

## 5. 結論

混合培養の光合成細菌による水素生成に及ぼす $\text{NH}_4^+$ 濃度の影響を明らかにするため、酸発酵後の廃液を想定した人工基質を用いた回分実験を通して、基質中の初期 $\text{NH}_4^+$ 濃度が水素生成、有機酸利用特性およびニトロゲナーゼ活性に及ぼす影響について検討した結果、以下の知見が得られた。

(1)有機性廃棄物の酸発酵生成物から混合培養の光合成細菌を用いて水素生成が可能であることが明らかになった。また、生成されたガス中の水素の割合は80%以上であった。

(2) $\text{NH}_4^+$ 濃度が6mMまでは水素生成が可能であったが、8mM以上では水素生成が起らなかった。最大水素生成速度は42.3  $\mu\text{L}/\text{mg dry wt.}/\text{hr}$ であった。

(3)基質から水素への転換率は12.6~42.7%であり、6mMの $\text{NH}_4^+$ 濃度で76.3%の基質が消費され、その42.7%が水素に転換された。

(4)水素は酢酸および酪酸の利用に伴い生成した。一方、プロピオン酸は細菌の増殖に利用され、水素生成にはほとんど寄与しなかった。

謝辞：本研究は、科学技術事業団戦略的基礎研究推進事業(CREST)により行なったものである。記して謝意を表す。

## 参考文献

- 1) 野池達也：地球環境の保全に対する嫌気性消化法の重要性。土木学会論文集、667/VII-16、pp.1-12、2000。
- 2) Mizuno, O., Ohara, T., Shinya, M. and Noike, T.: Charac-

- teristics of hydrogen production from bean curd manufacturing waste by anaerobic microflora, *Water Science and Technology*, **42**, pp.345-350, 2000.
- 3) Miyake, J. and Kawahara, S. : Efficiency of light energy conversion to hydrogen by the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*, *Int. J. Hydrogen Energy*, **12**, pp.147-149, 1987.
  - 4) 佐々木 健, 竹野 健次, 江本 美昭 : 光合成細菌による有機酸, 揮発性脂肪酸の消費と水素生産. 水環境学会誌, **19**, pp.63 - 70, 1996.
  - 5) Nakada, E., Kaji, Y., Aoyama, K., Nishikata, S., Asada, Y. and Miyake, J. : Photosynthetic bacterial hydrogen production combined with a fuel cell for light energy conversion to electricity, Proceeding of the First International Conference New Energy Systems and Conversions, pp.225 - 228, 1993.
  - 6) Bolliger, R., Zurrer, H. and Bachofen, R. : Photoproduction of molecular hydrogen from waste water of a sugar refinery by photosynthetic bacteria, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, pp.147 - 151, 1985.
  - 7) Kim, J. S., Ito, K. and Takahashi, H. : Production of Molecular Hydrogen by *Rhodospseudomonas sp.*, *J. Ferment. Technol.*, **59**, pp.185 - 190, 1981.
  - 8) Tsygankov, A. A., Fedorov, A. S., Laurinavichene, T. V., Gogotov, I. N., Rao, K. K. and Hall, D. O. : Actual and potential rates of hydrogen photoproduction by continuous culture of the purple non-sulphur bacterium *Rhodobacter capsulatus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **49**, pp.102 - 107, 1998.
  - 9) 北島洋二, 後藤雅史, 上野嘉之, 大塚誠治 : 環境調和水素製造技術(その2)-光合成水素生産におけるバイオエンジニアリング手法を用いた新理論解析-, 鹿島技術研究年報, **6**, pp.195 - 202, 1998.
  - 10) Miyake, J., Mao, X. X. and Kawamura, S. : Photoproduction of hydrogen from Glucose by a co-culture of a photosynthetic bacterium and *clostridium butyricum*, *J. Ferment. Technol.*, **62**, pp.531-535, 1984.
  - 11) Nagamine, Y., Kawasugi, Y., Miyake, M., Asada, Y. and Miyake, J. : Characterization of photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* RV for hydrogen production, *J. Mar. Biotechnol.*, **4**, pp.34-37, 1996.
  - 12) Tsygankov, A. A., Hirata, Y., Miyake, M., Asada, Y. and Miyake, J. : Photobioreactor with photosynthetic bacteria immobilized on porous glass for hydrogen photoproduction, *J. Ferment. Technol.*, **77**, pp.575-578, 1994.
  - 13) Tsygankov, A. A. and Laurinavichene, T. V. : Influence of the Degree and Mode of Light Limitation on Growth Characteristics of the *Rhodobacter Capsulatus* Continuous Cultures, *Biotechnology and Bioengineering*, **51**, pp.605 - 612, 1996.
  - 14) Mao, X. X., Miyake, J. and Kawamura, S. : Screening photosynthetic bacteria for hydrogen production from organic acids, *J. Ferment. Technol.*, **64**, pp.245-249, 1986.
  - 15) Fascetti, E., D'addario, E., Todini, O. and Robertiello, A. : Photosynthetic hydrogen evolution with volatile organic acids derived from the fermentation of source selected municipal solid wastes, *Int. J. Hydrogen Energy*, **23**, pp.753-760, 1998.
  - 16) Hillmer, P. and Gest, H. : Hydrogen metabolism in the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata*: H<sub>2</sub> production by growing cultures, *J. Bacteriol.*, **129**, pp.724-731, 1977.
  - 17) 小林達治 : 光合成細菌の分類と形態・生理・生態(分類と同定法), 光合成細菌で環境保全, 農山漁村文化協会, 1993.
  - 18) Hara, M., Kaneko, T., Nakamura, C., Asada, Y. and Miyake, J. : Redox properties of an H-subunit-depleted photosynthetic reaction center from *Rhodospseudomonas viridis*, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1363**, pp.199 - 208, 1998.
  - 19) Meyer, J., Kelley, B. C. and Vignais, P. M. : Effect of light nitrogenase function and synthesis in *Rhodospseudomonas capsulata*, *J. Bacteriology*, **136**, pp.201 - 208, 1978.
  - 20) 北島洋二, 森本昌義, 大塚誠治, 坂本育子, 國司はな子, 上野嘉之 : 環境調和型水素製造技術-光合成細菌による水素生成反応-, 鹿島技術研究年報, **44**, pp.295 - 299, 1996.
  - 21) Segers, L. and Verstraete, W. : Ammonium as an alternative nitrogen source for hydrogen producing photobacteria, *J. Appl. Bacteriol.*, **58**, pp.7-11, 1985.
  - 22) Maner, K. and Oelze, J. : Control by light of Whole-cell nitrogenase activity and of nitrogenase and bacteriochlorophyll a formation in *Rhodobacter capsulatus* strain B10S, *Arch Microbiol.*, **171**, pp.243 - 248, 1999.
  - 23) 佐藤敏生 : 光合成細菌の窒素代謝, 光合成細菌(北村博, 森田茂広, 山下仁平編), 学会出版センター, 1984.
  - 24) Sasikala, K., Ramana, CH. V., Rao, P. R. and Kovacs, K. L. : Anoxygenic phototrophic bacteria : physiology and advances in hydrogen production technology, *Advances in Applied Microbiology*, **38**, pp.211-295, 1993.
  - 25) Fascetti, E., and Todini, O. : *Rhodobacter sphaeroides* RV cultivation and hydrogen production in a one- and two-stage chemostat, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **44**, pp.300-305, 1995.
  - 26) 尾形晋治, 佐藤弘和, 水野 修, 野池達也 : 非純粋培養条件下での光合成細菌による連続水素生産の可能性, 第35回日本水環境学会年会講演集, pp.540, 2001.



## STUDY ON HYDROGEN PRODUCTION BY PHOTOTROPHIC CONSORTIA

In-Beom KO, Osamu MIZUNO and Tatsuya NOIKE

The effect of  $\text{NH}_4^+$  concentration on hydrogen production from volatile fatty acids (acetate, propionate and butyrate) by the mixed culture of photosynthetic bacteria was investigated by batch experiments. The initial  $\text{NH}_4^+$  concentrations in the batch cultures ranged from 0 to 12 mM. The concentrations of acetate, propionate and butyrate in the medium were 1500, 500 and 1500 mg/l, respectively. Hydrogen production was observed at  $\text{NH}_4^+$  concentrations ranging from 0 to 6 mM. The hydrogen content in the produced gas ( $\text{H}_2$  and  $\text{CO}_2$ ) was 88% at  $\text{NH}_4^+$  concentrations of 4 and 6 mM. The hydrogen conversion efficiency was between 12.6 and 42.7%. The maximum hydrogen production rate was 42.3  $\mu$  l/mg dry wt/h. At  $\text{NH}_4^+$  concentration above 8 mM, no hydrogen was detected