

(83) 耐塩性紅色非硫黄単離細菌による長波長LED光照射下での光合成水素生成

川越 保徳^{1*}・沖 幸憲²・中野 一誠¹・藤本 綾¹・高橋 弘和²

¹熊本大学大学院自然科学研究科 (〒860-8555 熊本市黒髪二丁目39-1)

²アタカ大機株式会社エンジニアリング本部 (〒550-0012 大阪市西区立売堀2-1-9)

* E-mail: goshi@kumamoto-u.ac.jp

水素は、燃料電池の原料となり燃焼時に二酸化炭素を発生しないこと等の利点から、次世代のエネルギーの一つとして期待されている。本研究では、有機酸を炭素源として生育でき、発光ダイオード(LED: light-emitting diode)光照射下で水素を生成可能な耐塩性光合成水素生成細菌を単離した。単離細菌は、細菌学的諸性質と16S rRNA配列から、*Rhodobacter shaeroides*に近縁な紅色非硫黄細菌*Rhodobacter* sp. KUPB1と同定された。KUPB1は、0~3%のNaCl濃度条件下で有機酸を分解し水素を生成したが、3%のNaCl濃度下では水素生成量が大きく低下した。また、極大波長が850nmの長波長LED光照射下においても、有機酸を完全分解して良好に生育し、タングステン光照射と同等以上の水素を生成することが明らかとなった。

Key Words : *photosynthetic hydrogen fermentation, isolation of halotolerant photosynthetic bacteria, purple non-sulfur bacterium, light-emitting diode (LED), long-wavelength LED*

1. はじめに

水素ガスは、エネルギー転換効率がが高く、燃焼しても炭酸ガスを生成しないクリーンなエネルギーである。また、燃料電池の原料になることから比較的容易に電気エネルギー等の汎用エネルギーに転換できることから、将来有望なエネルギー源として期待されている¹⁾。水素ガスは、天然ガスの改変や水の電気分解などの化学反応で生成できるが、有機物を用いた微生物反応でも生産でき、*Biohydrogen*と呼ばれている。*Biohydrogen*は、メタン発酵と同じく有機性廃棄物や廃水を原料として生産できるため、サーマルリサイクル技術の一つとして廃棄物や廃水処理の観点からも注目される。

*Biohydrogen*の生産方法については、嫌気性水素発酵と光合成水素発酵が知られている^{2,3)}。嫌気性水素発酵は、主に炭水化物を基質にする酸発酵の過程で水素が得られるが、最終副産物として有機酸やアルコール等が残存し処理としては完結しない³⁾。このため、現時点では、メタン発酵における一次酸発酵の代替プロセスとしての活用が最も現実的な実用化方法かも知れない⁴⁾。一方、光合成水素発酵では、幅広い基質を利用可能な光合成細菌を活用するため、嫌気性水素発酵で残存する有機酸など

も無機化処理して水素を生成できる。しかしながら、水素ガス生成に必要な還元力が特定の波長を有する光エネルギーに依存することから、蛍光灯の様に波長の偏った光による水素生成は不可能である⁵⁾。このため、一般には幅広い波長を有するタングステンランプ光などが、使われるが、消費電力、コストの点で実用化は難しい

筆者らは、これまでに、食品排水など高い塩分濃度を含む排水にも対応可能な光合成水素生成細菌の集積⁶⁾、と連続光合成水素生成に関する知見を報告してきた⁷⁾。一方、耐塩性を有する光合成水素生成細菌の単離についてはいまだ報告例が極めて少なく⁸⁾、省エネ・低コスト型光源の探索に関する研究事例も太陽光利用などが検討されているに過ぎない⁹⁾。そこで本研究では、耐塩性の光合成水素発酵細菌を単離するとともに、省エネ・低コスト型の光源として長波長発光ダイオード(LED: light-emitting diode)に注目し、長波長LED光照射による光合成水素生成の可能性を検討した。

2. 材料および方法

(1) 干潟試料からの耐塩性光合成水素生成細菌の集積

培養

熊本新港近傍の有明海干潟⁷⁾から干潟泥と海水試料を採取し、光合成細菌の集積、単離用の植種源とした。湿重量3gの干潟泥試料を、100mlの海水に懸濁し、超音波発信機 (JS-150T, NISSEI) にて2.5分間の超音波処理を施し、これを1mmメッシュの金属製スクリーンに通した。スクリーンを通過した試料を10,000g×5分の遠心分離にて回収し、これを200mlのSalt-PHB培地 (20 g/l NaCl, 1.5 g/l KH_2PO_4 , 1.0 g/l K_2HPO_4 , 170 mg/l グルタミン酸, 200 mg/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 70 mg/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5.0 mg/l チアミン-HCl, 5.0 mg/l ニコチン酸, 0.05 mg/l ビオチン, 2.0 mg/l $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 20 mg/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.95 mg/l $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1.0 mg/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3.0 mg/l H_3BO_3 , 0.24 mg/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.04 mg/l $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.02 mg/l $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 20 mg/l 酵母エキス, pH 7.0) を入れた300ml容の三角フラスコに投入した。Salt-PHB培地には光合成細菌生育用の炭素源として、嫌気性水素発酵の主要副産物である3種類の有機酸 (乳酸: 20mmol/l, 酪酸: 25mmol/l, 酢酸: 20mmol/l (35mM: 単離後の培養時)) を添加した。フラスコはガラス管を取り付けたゴム栓で密栓し、ガラス管を通じてアルゴンガスで培地を5分間以上曝気して溶存酸素を除いた。これを恒温浴槽内に設置し、スターラーにて緩やかに攪拌した (約100rpm)。温度は30°Cで一定制御し、タングステンランプ光をフラスコ壁面で6000lxになるように照射した。図-1に実験装置の概要を示す。培養開始後は、目測にて細菌の増殖と考えられる培地の十分な濁りを確認できた時点で、その培養液を新鮮な培地に10% (v/v) 植菌し、培養を再開した。以降、これらの操作を繰り返して光合成水素生成細菌の集積を図った。

(2) 耐塩性光合成水素生成細菌の単離

集積培養液0.1mlをSalt-PHB液体培地で希釈して 10^3 ~ 10^{10} の希釈系列試料を作成し、Salt-PHB寒天培地に塗布した。これをアクリル製嫌気ジャーに入れ、酸素吸収剤 (アネロパック, 三菱ガス化学) にて酸素を除いた後、30°C, 6000lxの光照射条件下で嫌気培養した。生成した赤色系のコロニーを任意に選び、寒天培地上でのコロニー生成を繰り返すことで純化し、単一コロニーを得た。

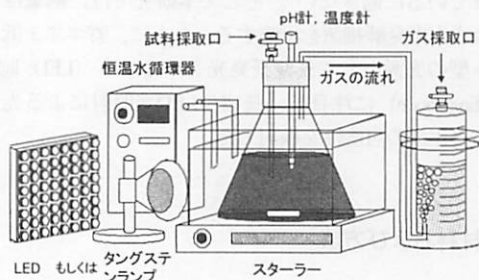


図-1 実験装置概図

各々のコロニーはSalt-PHB液体培地に接種し、図-1の実験装置を用いて水素生成能を確認した。

(3) タングステンランプおよび長波長LED光照射下での単離細菌の生育と水素生成

単離された光合成水素生成細菌について、図-1の実験装置にて液体培養し、NaCl濃度による増殖や水素生成量、および有機酸消費への影響などを調べた。また本研究では、バクテリオクロフィルaの吸収波長特性を鑑み、新たな光源として、極大波長が850nmで800~900nmの波長成分を有する長波長LED (ISL-150 x 150-II85, CCS Inc.) を検討した。本LEDランプには、縦×横が各々15cmのパネルに20個×18個、計360個の長波長LED球が取り付けられている。LED球部分は殆ど発熱せず、ランプからの放熱による培養への影響は小さいため、パネルを培養フラスコ側面にできるだけ近づけ、培養フラスコ壁面での照度を約2000lxとしてLED光を照射した。なお、各回分培養実験は計3回行い、1回目と2回目の培養時に一日毎の菌体濃度と水素発生量および有機酸を測定することで再現性を確認した後、3回目の回分培養にて詳細な経時変化を追跡し結果とした。

(4) 分析方法

適時に培地サンプルを採取し、菌体濃度と有機酸濃度を測定した。菌体濃度は波長660nmでの光学密度 (OD_{660}) を測定し、有機酸については、酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸、乳酸の濃度を高速液体クロマトグラフ (HPLC) にて測定した。また、発生ガスは培養フラスコ内のヘッドスペースに通したガラス管を通じて水上置換法にて回収し、シリンジにて生成量を測定した。また、ガス中の水素、二酸化炭素、メタン、窒素、酸素の濃度は熱伝導度検出器を備えたガスクロマトグラフ (GC-TCD) にて測定した。各々の分析条件などの詳細は既報に準じた⁸⁾。

単離細菌について、グラム染色試験、カタラーゼ試験などの細菌試験の実施と走査型電子顕微鏡 (JSM-5310LV, 日本電子) 観察および写真撮影を行った。これらの分析は既報および成書に準じて実施した⁸⁾¹¹⁾。また、16S rRNA配列解析については以下の様に行った。単離細菌からDNAを抽出し、細菌用ユニバーサルプライマー (27fと1492r¹²⁾) を用いてPCR (polymerase Chain Reaction) により約1500bpsのDNA断片を増幅、精製した。DNA配列は、DNAシーケンサー (CEQ8000, Beckman Coulter Inc.) にて分析し、配列解析用ソフトのClustal W¹³⁾およびMega¹⁴⁾を用い、遺伝子・アミノ酸配列データベースFASTA¹⁵⁾を参照して相同性比較を行った。これら一連の操作、解析は既報¹⁶⁾に準じて行った。

3. 結果および考察

(1) 耐塩性光合成水素生成細菌KUPB1株の単離

Salt-PHB液体培地に干潟試料を接種し、光照射下での嫌気回分培養を繰り返した。2回目の培養時までは、細菌増殖と推定される培地の濁りは認められたものの水素発生はみられず、培地色の変化もなかった。しかし、3回目の培養時に培地色の赤変と若干の水素ガス生成が認められ、その後は培養を重ねる毎に水素ガス量が増加、6回目培養時には発生ガスにおける水素ガス濃度が35%となった。7回目培養時にも同様に培地の赤変と水素ガス発生が認められたことから、光合成水素生成細菌が集積されたものと判断した。そこで、本培養液の希釈系列試料をSalt-PHB寒天培地に接種して嫌気明条件下で培養し、コロニーを形成させた。光合成細菌と推定される赤色系のコロニーの中から任意の20コロニーを選抜し、同寒天培地で画線培養を繰り返して純化し、細菌を単離した。これらの単離細菌の中で、酪酸、乳酸、酢酸を分解し、最も高い水素生成を示した細菌をKUPB1株と名付け、以降の実験に供した。

図-2に、タングステンランプ照射下での嫌気培養におけるKUPB1の生育 (OD_{600}) と累積水素生成量、および残存有機酸濃度の経時変化を示す。3種類の有機酸はいずれもKUPB1の増殖に伴って消費されたが、酪酸濃度の減少は酢酸と乳酸が残存している間は緩やかであり、それらの消費後に加速される傾向がみられたことから、基質利用における優先順位が示唆された。水素の発生は、菌体濃度が上昇して、約24時間経過後から認められ、有機酸が消費されるまで続いた。

図-3に、KUPB1の電子顕微鏡写真を示す。本細菌は、卵形で、カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陽性を示すグラム陰性細菌であった。また、16S rRNAの部分配列について既知細菌との相同性を比較した結果、*Rhodobacter sphaeroides* ATCC17029 (CP000577) と1450bpsの範囲にて

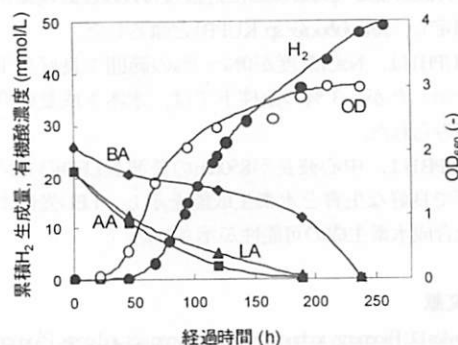


図-2 KUPB1 の生育と累積水素生成量および有機酸濃度の変化

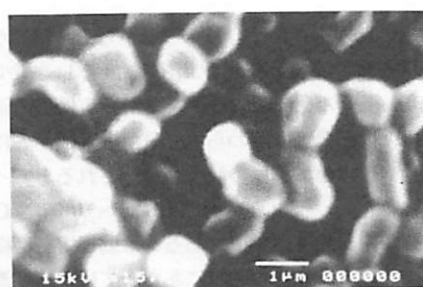


図-3 KUPB1 株の電子顕微鏡写真 (×15,000)

99.6%の相同性が得られた。これらの結果から、本単離細菌KUPB1は、*Rhodobacter sphaeroides*に近縁な紅色非硫黄細菌と同定し、*Phodobacter* sp. strain KUPB1と命名した。これまでに沿岸環境試料からの単離細菌を用いた水素生成に関する研究例は少なく¹⁷⁾、貴重な成果が得られた。しかし、酢酸と乳酸消費後の水素生成量と酪酸消費量から求めたKUPB1による消費酪酸あたりの水素収率は約1.0 mol/molとなり、筆者らやこれまでの報告値(1~4 mol/mol)よりも低い¹⁸⁾。水素収率の向上、生育条件の最適化等が課題である。

(2) KUPB1の生育と水素生成に与える塩分濃度の影響

高濃度の有機物を含む食品工場廃水などでは、同時に塩分濃度も比較的高い場合があることから、本研究では、広い塩分濃度に対応可能な耐塩性細菌に着目し、汽水域環境である干潟泥に着目しKUPB1が単離された。ここでは、KUPB1の増殖と水素生成への塩分濃度の影響を調べた。図-4に、Salt-PHB培地のNaCl濃度を各々(a) 0%、(b) 1.0%、(c) 2.0%、(d) 3.0%に調製したSalt-PHB培地におけるKUPB1の生育と累積水素生成量および有機酸濃度の経時変化を示す。いずれの培地でも、KUPB1は、良好な生育を示し、3種類の有機酸が全て消費された。ただし、3.0%のNaCl濃度条件下では、有機酸が消費され菌体濃度が定常になるまでの時間が他に比べて短いといった結果が得られ、KUPB1の生育には2.0%以上のNaCl濃度が適し

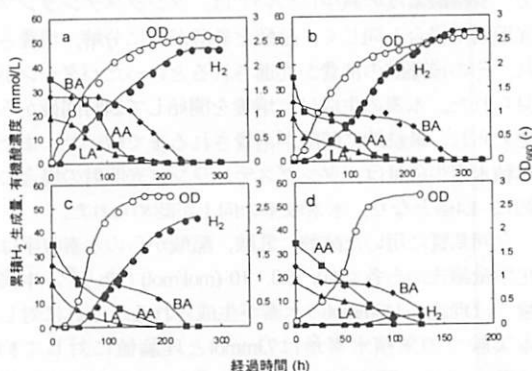


図-4 各 NaCl 濃度での KUPB1 の生育と累積水素生成量および有機酸濃度の変化

ているものと推定された。しかしながら、最終的な累積水素生成量は、NaClが3.0%の培地では著しく減少し、他の約10%程度の量に留まった。また、有機酸の消費については、NaCl濃度に関わらず、酢酸と乳酸が先に消費され、その後酪酸濃度の減少が加速されるといった傾向がみられた。以上より、KUPB1は0~3.0%のNaCl濃度下で生育可能な耐塩性細菌、あるいは弱好塩細菌様の性質を示すが、水素ガスの回収にあたっては、NaCl濃度として2.0%程度の塩分濃度以下にする必要があることが分かった。NaCl濃度が高い場合に水素収率が低下する原因については、光合成細菌の水素生成能に深く関わっているニトロゲナーゼやハイドロゲナーゼ等の酵素活性、あるいは光合成反応関連の代謝活性への塩分濃度の影響が推察されるが現時点では不明である。

(3) 長波長LED照射下でのKUPB1株による光合成水素生成

光合成細菌はバクテリオクロフィルを有しており、中でも*Rhodobacteraceae*に属する細菌は、バクテリオクロフィルaを有しているものが多い²⁷⁾ことが知られている。今回単離されたKUPB1は、細菌学的諸性質と16S rRNA配列から、*Rhodobacter*属細菌と同定され、バクテリオクロフィルaを有しているものと推定した。そこで、850nmの波長を中心にバクテリオクロフィルaの吸収極大波長域である800nm~900nmの光を照射可能な長波長LEDを光源に用い、KUPB1の生育と水素生成の可能性を検討した。図-5に、長波長LED照射下、嫌気培養におけるSalt-PHB培地でのKUPB1の生育と累積水素生成量および有機酸濃度の経時変化を示す。図-5から明らかに、菌体濃度は培養開始後急激に上昇し、長波長LED照射下でのKUPB1の増殖が確認された。培地色は、菌体濃度の上昇にしたがって赤変したが、24時間後には暗く濃い赤紫色を呈し、タングステンランプ照射下での培養時にみられる濃赤色とは異なる色調となった。一方、有機酸濃度の減少については、タングステンランプ照射の場合と同じく、酢酸と乳酸が先に分解、消費され、その後酪酸の消費が促進されるといったパターンが見られた。水素の生成は、培養を開始して24時間後から認められ、最終的に酪酸が消費されるまで続いた。また、累積水素生成量は、タングステンランプ照射の場合の約1.2~1.4倍となり、水素収率の向上が認められた。

今回基質に用いた酢酸、乳酸、酪酸からの水素収率は化学量論式から各々4.0、6.0、10 (mol/mol)であり¹⁹⁾、本実験では理論上440mmolの水素が生成される。これに対し、本実験での累積水素量は73mmolと理論値に対して約16.5%であり、既往文献値3~70%¹⁹⁾と比べて特に高い値ではなかった。これについては他の波長帯を有するLED

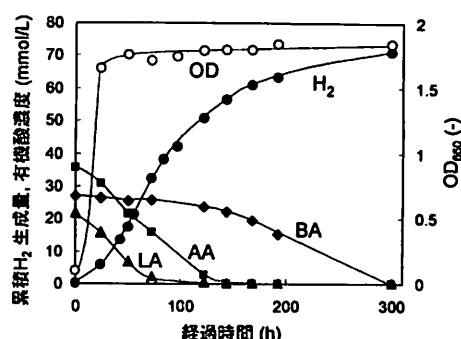


図-5 長波長 LED 照射下での KUPB1 の生育と累積水素生成量および有機酸濃度の変化

光による検討や、LED光以外の条件最適化、他光合成細菌の探索も含めた検討が必要と考えられる。

以上の結果から、KUPB1による長波長LED照射下での光合成水素生成の可能性が示されたが、利用する光合成細菌のバクテリオクロフィルや生育に適した波長特性を有するLEDを用いることで、他の光合成細菌への展開も期待でき、今後、より効率の高い水素生成が実現できる可能性が示された。また、LEDは、タングステンランプなどと比べると、消費電力は約1/10、寿命は10~100倍程度長い。筆者らは、太陽光集光器とタングステンランプ光を組み合わせた連続光合成水素生成について報告している⁹⁾が、タングステンランプの代わりにLEDを用いることで、さらなる光源コストの削減が期待できる。今後は、LED光の波長特性や照射時間と光合成水素生成との関係、LED光-太陽光照射による連続水素生成等を検討課題である。

4. まとめ

- 1) 干潟泥試料から、2%のNaCl濃度下で3種類の有機酸（酢酸、乳酸、酪酸）を炭素源として生育し、水素を生成可能な耐塩性光合成水素生成細菌を単離した。
- 2) 単離細菌は、16S rRNA配列の相同性解析等の結果から*Rhodobacter sphaeroides*に近縁な*Rhodobacter*属細菌と同定し、*Rhodobacter* sp. KUPB1と命名した。
- 3) KUPB1は、NaCl濃度が0%~3%の範囲で良好な生育を示したが、3%の条件下では、水素生成量の低下がみられた。
- 4) KUPB1は、中心波長が850nmの長波長LEDの光照射下で良好な生育と水素生成能を示し、LED光による光合成水素生成の可能性が示された。

参考文献

- 1) Boyles D.: Bioenergy technology-thermodynamics and costs. Bioenergy technology-thermodynamics and costs Wiley, New York, Vol. pp. 1984.
- 2) Levin D. B., Pitt L. and Love M.: Biohydrogen production: prospects and

- limitations to practical application. *Int. J. Hydrogen Energy*, Vol.29, pp.173-185, 2004.
- 3) Nath K. and Das D.: Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol.65, pp.520-529, 2004.
 - 4) Ustak S., Havrland B., Munoz J.O.J., Fernandez E.C. and Lachman J.: Experimental verification of various methods for biological hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy*, Vol.32, pp.1736-1741, 2007.
 - 5) Kawagoshi Y., Hino N., Fujimoto A., Nakao M., Fujita Y., Sugimura S. and Furukawa K.: Effect of inoculum conditioning on hydrogen fermentation and pH effect on bacterial community relevant to hydrogen production. *J. Biosci. Bioeng.*, Vol.100, pp.524-30, 2005.
 - 6) Ueno Y., Tazara M., Fukui H., Makiuchi T., Goto M. and Sode K.: Production of hydrogen and methane from organic solid wastes by phase-separation of anaerobic process. *Bioresour. Technol.*, Vol.98, pp.1861-1865, 2007.
 - 7) 北村博: 光合成細菌. 学会出版センター, 1984.
 - 8) Kawagoshi Y., Takahashi H., Okazaki Y., Hasegawa J., and Furukawa K.: Hydrogen production with volatile fatty acids by enrichment culture of halotolerant photosynthetic bacteria from tideland sediment. *Japan J. Water Treat. Biol.*, Vol.42, pp.9-16, 2006.
 - 9) 川越保徳、高橋弘和、藤本綾、古川憲治: 耐塩性光合成水素発酵細菌の集積と太陽光集光照射による複数の有機酸からの連続水素生成. *環境工学研究論文集*, Vol.45, pp.475-480, 2008.
 - 10) Ike A., Murakawa T., Kawaguchi H., Hirata K., and Miyamoto K.: Photoproduction of hydrogen from raw starch using a halophilic bacterial community. *J. Biosci. Bioeng.*, Vol.88, pp.72-77, 1999.
 - 11) 高田邦昭、斉藤尚亮、川上速人: 染色・バイオイメージング実験ハンドブック. 羊土社, pp.88-92, 2006.
 - 12) Weisburg W.G., Bams S.M., Pelletier D.A. and Lane D.J.: 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *J. Bacteriol.*, Vol. 173, pp.697-703, 1991.
 - 13) Thompson J. D., Higgins D. G. and Gibson T. J.: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, Vol.22, pp.4673-4680, 1994.
 - 14) Tamura K., Dudley J., Nei M. and Kumar S.: MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, Vol.24, pp.1596-1599, 2007.
 - 15) Pearson W.R. and Lipman D.J.: Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol.85, pp.2444-2448, 1988.
 - 16) Kawagoshi Y., Takahashi H., Fujimoto A., and Furukawa K.: Enrichment of salt-tolerant photosynthetic hydrogen fermentation bacteria and continuous hydrogen production with multiple volatile fatty acids under sun-light irradiation by solar lighting system. *Environ. Eng. Res.*, Vol.44, pp.605-612, 2007.
 - 17) Maeda I., Mizoguchi T., Miura Y., Yagi K., Shioji N. and Miyasaka H.: Influence of sulfate-reducing bacteria on outdoor hydrogen production by photosynthetic bacterium with seawater. *Corr. Microbiol.*, Vol.40, pp.210-213, 2000.
 - 18) Koku H., Eroglu I., Gunduz U., Yucel M., and Turker L.: Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*. *Int. J. Hydrogen Energy*, Vol.27, pp.1315-1329, 2002.
 - 19) Miyake J., Mao X.-Y., and Kawamura S.: Photoproduction of hydrogen from glucose by a co-culture of a photosynthetic bacterium and *Clostridium butyricum*. *J. Ferment Technol.*, Vol.62, pp.531-535, 1984.

(2009. 5. 22 受付)

Phototrophic Hydrogen Production by isolated halotolerant purple non-sulfur bacterium in the light of long-wavelength light emitting diode (LW-LED)

Yasunori KAWAGOSHI^{1*}, Yukinori OKI², Issei NAKANO¹, Aya FUJIMOTO¹, and Hirokazu TAKAHASHI²

¹ Graduate School of Science & Technology, Kumamoto University

² Environmental Business Division, Daiki Ataka Engineering Co. Ltd.

Biohydrogen is currently expected as one of the alternative promising energy to fossil fuel. In this study, halotolerant photosynthetic hydrogen producing bacteria (ht-PHB) was isolated from the sediment at tideland, and their hydrogen producibility from mixed volatile fatty acids (VFAs) using the light of long-wavelength light emitting diode (LW-LED) was investigated. The isolated ht-PHB produced hydrogen with complete consumption of mixed three kinds of VFAs (lactic acid, acetic acid, butyric acid) at NaCl concentration in the 0 % to 3 % range in the light of tungsten lamp, and was phylogenetically identified *Rhodobacter* sp. KUPB1. The KUPB1 showed well cell-growth and hydrogen production under the irradiation of the LW-LED light, indicating the applicability of LW-LED to photosynthetic hydrogen production as an energy-saving light source.