

嫌気性菌によるスターチからの水素エネルギー生産

Hydrogen production from starch in batch culture of
Clostridium beijerinckii strain AM21B

田口 文章、長谷川 勝重
Fumiaki Taguchi and Katsushige Hasegawa

北里大学衛生学部微生物学教室 神奈川県相模原市北里1-15-1

1. はじめに

過去20万年間に生存した累積総人口の1%程度の存在でしかない先進工業国に現在生活している人間が、ここ20~30年という短期間に地球規模での極めて深刻な環境汚染と環境破壊、並びに貴重な天然資源の枯渇問題を引き起こして来た。先進工業国の現在の経済的繁栄は、化石燃料の大量消費によって支えられている。石炭を唯一の例外として、その化石燃料や原子力発電に用いるウラン等は数十年後には枯渇する。一方太陽光、風力、地熱などの無尽蔵な未利用エネルギーでは現在の経済活動は賄えないと言われている。従って、先進工業国では有限のエネルギーを賢く使うことが、21世紀の全人類の生存のために要求される。

小さな生命体である微生物を用いて再生可能な未利用植物性廃棄物を活用することが出来れば、資源である廃棄物を貴重な化石燃料を用いて焼却する必要が無く、その上そこから得られるエネルギーを上手に利用することにより、有限で貴重なエネルギー源の節約にも貢献できる。

そこで、クリーンなエネルギー源としての水素を天然廃棄物から回収するシステムとしての「水素エネルギー回収型廃棄物処理技術」の確立を考えた。この目的を達成するためには、水素発酵の中心的役割を担う、実装置に適用できる新しい水素生成菌を作出する必要がある。そこで、我々は新規な水素生成菌の探索を数年前から展開して来た。その結果、グルコースなどの6炭糖、キシロースなどの5炭糖並びにスターチ、キシランなどの多糖を効率よく水素に変換できる菌株を分離し得た²⁻⁸⁾。またその水素を水素燃料電池を用いて電気に変換することができた(未発表)。本稿では、食品製造工場などから大量に排出される産業廃棄物の代表例としてのスターチとシロアリから分離した嫌気性グラム陽性桿菌の Clostridium beijerinckii AM21B株を用いて、水素を生成させる培養条件を検討した成績を以下に紹介する^{2, 3, 5)}。

2. 糖からの水素産生

将来天然廃棄物を資源として活用し水素を生成させるためには、グルコースを代表とするヘキソースに限らずペントースを含む色々な糖を水素に変換できる菌の確立が望まれる。そこで、グルコースやスターチなどの色々な糖を基質としてAM21B株の水素発酵能を検討した。0.3%糖添加PY培地(ペプトン、酵母エキス、塩類よりなる培地²⁾)1,000 mlにAM21B菌を接種して、36°Cで攪拌培養し水素の生

成量を測定した。

表1に記した糖は全て水素発酵の基質として利用され、培養開始2~3時間後より水素ガスの発生が観察され、4~6時間後に水素生成のピーク(E_{max} と表記)があり、7~8時間後に水素生成反応はほぼ終了した。水素生成量(ml/L)は、スターチではやや少く、スクロースとラクトースで一番多く、その他の糖ではほぼ近似であった。菌体収量当たりの水素生成量(ml/g)は、セロビオースが一番高くスターチが一番低かった。1時間当たりの最大水素発生量(E_{max} , ml/h)はセロビオースが一番多くアラビノースが一番少なかった。以上の結果は、AM21B菌株はヘキソースやペントースからも水素を生成する潜在能力がある事を示した。より具体的には、ヘキソースの単糖(グルコース、ガラクトース)、2糖(スクロース、ラクトース、セロビオース)および多糖(スターチ)、更にペントース(アラビノース、キシロース)をも水素に変換できた。この中で、特に意味があると考えられることは、AM21B菌がアラビノースやキシロースなどのペントース、およびセロビオースやスターチなどを水素発酵の基質として使えることは、将来セルロースやヘミセルロースからなる天然植物性廃棄物をAM21B菌単独で水素に変換できる可能性を示唆することである。AM21B菌が水素発酵の基質として利用できなかった物質は、現在までに検討した限りでは、アビセル(セルロース)、CMセルロース、マンナン、プルラン等の多糖であった。

表1. AM21B株による糖からの水素産生

基質	消費基質当た	水素	菌体収量当	消費基質当	E_{max} ml/h
	りの菌体収量	生成量	たりの水素	たりの水素	
	mg/g	ml/l	生成量ml/g	生成量ml/g	
ガラクトース	313	1140	1210	381	316
グルコース	267	1100	1380	367	380
フルクトース	303	1060	1160	352	305
アラビース	247	1160	1560	385	270
キシロース	270	1160	1430	385	310
スクロース	313	1280	1360	426	360
セロビオース	167	1150	2280	383	403
ラクトース	297	1210	1360	401	365
スターチ	253	820	1080	273	316

0.3%糖添加PY培地 1,000mlからの水素生成量と菌体収量。

E_{max} は単位時間当たりの最大水素発生量を示す。

3. スターチからの水素生成に及ぼす培養温度の影響

次に、1%スターチ添加PY培地1,000 mlにAM21B菌を接種培養し、培養温度(31°C、36°Cと41°C)と水素生成量並びに菌体収量との関係を検討した。比較対照としてグルコースを用いた。結果の概略を表2にまとめて示した。

スターチを基質とした場合(カッコ内にグルコースの数値を記載)、培養開始2~3時間後から水素ガスが発生し、培養温度が41°C、36°Cと31°Cでは5(5)時間後、6(5)時間後と8(7)時間後の順で E_{max} [401(401), 349(349)と251(267)ml/h]が観察され、9(7)時間後、9(10)時間後と11(10)時間後の順で水素発生はほぼ終了(単位

時間当たり100 ml以下)し、総水素生成量は36°C(31°C)が最大で1832(2334)mlであった。一方、1,000ml当たりの41°C、36°Cと31°Cでの菌体収量(mg/L)は、各々880(660)、1390(1150)と1480(1260)となり、菌体収量当たりの最大水素発生量 E_{max} , ml/g-cells·hは455(607)、251(305)と170(211)で、41°C培養が最大値を示した。

これらの結果から次のような結論を導き出せる。スターチとグルコースからの水素産生量、菌体収量と培養温度との関係は多少異なる。AM21B菌は、培養温度が36°Cのときが一番早く増殖し、41°Cでの増殖は芳しくなく、31°Cでは増殖はするが非常に遅かった。しかし、菌体収量は培養温度が低い方が大きかった。一方、水素の発生は、培養温度が高い方が早く開始し、単位時間当たりの E_{max} も多かった。 E_{max} (ml/h) が大きい条件は、水素発酵の反応が速いことを意味する。従って、菌体量を一定に保つことが出来れば、将来廃棄物を効率よく水素に変換する際に41°Cでの水素発酵が非常に有利な条件と考えられる。

表2. 水素生成に及ぼす培養温度の影響

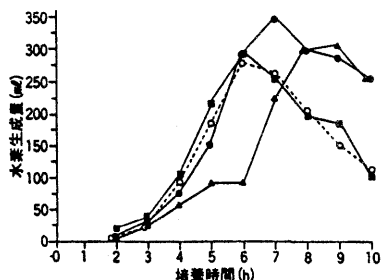
温度	総水素生成量 ml	E_{max}		H 基質消費量		菌体収量		菌体収量当たりの水素生成量 ml/g	消費基質当たりの水素生成量 ml/g	基質 1 mol からの水素生成 mol数
		ml/h	(H) ml/g·h	消費量 g/l	菌体収量 mg/l	消費量 g/l	菌体収量 (mg/g)			
スターチ添加										
31°C	1700	251	8	170	11	8.6	1480 (172)	1150	197	-
36°C	1832	349	6	251	9	8.5	1390 (164)	1317	215	-
41°C	1617	401	5	455	9	7.3	880 (121)	1837	222	-
グルコース添加										
31°C	2334	267	7	211	10	7.9	1260 (160)	1852	296	2.4
36°C	2249	349	5	305	10	7.5	1150 (153)	1955	300	2.4
41°C	1969	401	5	607	7	5.2	660 (127)	1299	251	2.0

基質10gを含むPY培地1,000mlを各温度で攪拌培養し、発生水素量は毎時間測定し、総水素産生量、基質消費量、菌体収量は24時間後に測定した。Hは水素発生量が ≤ 100 ml/hになるまでの培養時間、ml/g·hは菌体収量当たりの E_{max} 、(H)は E_{max} を示した時間。菌体収量は、mg/培養液L(リットル)とmg/消費基質g(グラム)を示す。

4. スターチからの水素生成に及ぼす培養液 pH の影響

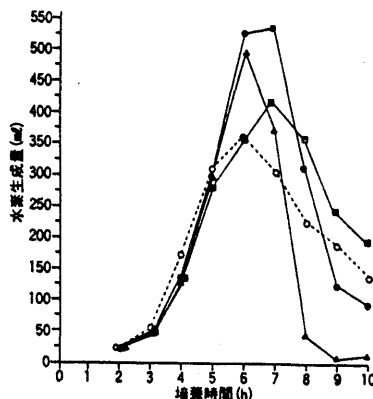
表2に示したように、スターチを10g/Lに加えたPY培地でAM21B菌を31°C、36°Cと41°Cの温度で培養すると、培養開始5~8時間後に最大水素発生があり、その数時間後にはスターチが残存しているにも拘わらず、水素ガスの産生は観察されなくなる。培養終了後の培養液のpHは、5.0よりも多少低くなっていた(成績は記載せず)。この水素ガス発生の急激な中断は、培養液pHの極端な低下による当該菌の増殖抑制による可能性が考えられる。そこで、培養液のpHが当該菌の増殖と水素生成にあたる影響を調べた。

スターチまたはグルコースを10g/Lに添加したPY培地1,000 mlに当該菌を接種し、その後pHを未調整のものと、10% NaOHを用いてpHコントローラーで培地のpHを5.0、6.0および7.0に調整して、36°Cで攪拌培養を開始した。経時的な水素生成についてスターチの結果を図1に、比較対照のグルコースの結果を図2に示し



○●○：pH未調整、—■—：pH5.0、—●—：pH6.0、—▲—：pH7.0
スターチ10gを添加したPY培地1,000mlでの単位時間当たりの水素生成量を示す。

図1. スターチからの水素生成。



○●○：pH未調整、—■—：pH5.0、—●—：pH6.0、—▲—：pH7.0
グルコース10gを添加したPY培地1,000mlにAM21B菌を接種し、培養液のpHをそれぞれのpHに維持し36℃で10時間培養した。それぞれの時間における1時間当たりの水素生成量を測定しプロットした。

図2. グルコースからの水素生成。

表3. 水素生成におよぼす培養液pHの影響

pH値	総水素生成量 ml/l	E max ml/h (H)	菌体収量 g/l	基質消費量 g/l	消費基質当りの菌体収量 mg/l	菌体収量当りの水素生成量 ml/g	消費基質当りの水素生成量 ml/g
未調整	1840	280 (6)	1.41	8.62	164.0	1300	213
5.0	1995	290 (6)	1.53	8.78	174.0	1305	227
6.0	2095	373 (7)	1.55	8.97	172.9	1385	234
7.0	1935	310 (9)	1.09	8.87	126.6	1785	218
グルコース添加							
未調整	2110	360 (6)	1.16	7.75	149.7	1819	272
5.0	2480	420 (7)	1.23	9.97	123.4	2016	249
6.0	2240	535 (7)	0.74	9.98	74.1	3027	224
7.0	1650	490 (6)	0.49	9.98	49.1	3367	165

1%基質添加PY培地1,000mlを各pHに調整して36℃で攪拌培養した。

(H)はE maxを示した時間を表す。

た。培養24時間後の菌体収量、基質消費量、水素生成量、E maxなどは、表3にまとめて示した。

スターチ添加培養からの水素生成の結果(カッコ内にグルコースの数値を記載)について説明する。図1(2)に示してあるように、経時的な水素産生は、培養開始2時間頃から認められ培養液のpHによって6~9(6~7)時間後に単位時間当たりの最大水素発生量E maxが観察された。水素の総生成量は、pH5.0からpH7.0まではpH未調整よりは多かったが顕著な差はなかった(グルコース添加培養では、pH5.0のときが最大値を示したが、pH7.0の培養がpH未調整のときよりも低値を示した)。E maxは、pH6.0(6.0)で培養7(7)時間後が最大で次にpH7.0(7.0)の培養9(6)時間後

で、pH未調整の培養が最小値であった。スターチ添加培養系からの菌体収量は、全体的に比較対照のグルコース添加培養系からよりは有意に多く、pH5.0と6.0(5.0)が一番多く、pH7.0(7.0)が一番少なかった。しかし、スターチは、培養液のpHに関係無く24時間培養後でも9グラム弱しか消費されなかった。従って、スターチ消費量当たりの水素生成量と培養液のpHとには、顕著な相関関係は認められず、全て10%程度の差の範囲内にあった(グルコース添加培養系では、pH5.0のときが最大値を示し、pH7.0の培養が最小値を示した)。以上の結果は、培養時間に無関係に総水素産生量および E_{max} を多くするにはスターチ添加培養液のpHを6.0にコントロールする条件がよい事を示唆している。しかし、グルコースと比較してスターチを基質とした場合は、全ての数値が一般に低値であった。特に、スターチを添加した培養でのAM21B菌は、消費基質当たりの菌体収量がグルコースと比較して有意に高値を示した。従って、その結果、菌体収量当たりの水素生成量は低値となった。

5. アミラーゼ産生と培養条件の影響

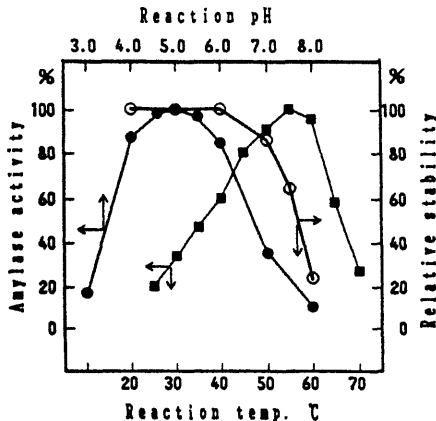


図3. 反応条件とアミラーゼ活性。

1%スターチ添加培地にAM21B菌を接種し36°Cで7時間攪拌培養後の培養液を粗アミラーゼとして用いて、アミラーゼ活性の最適反応条件を検討した。アミラーゼ活性の測定値を比活性値に換算した結果を図3に示した。成績は記載していないが、AM21B菌のアミラーゼはスターチの添加によって誘導される誘導酵素であった。産生されたアミラーゼは、反応液のpHが4.6から5.4の間で高くpH5.0が最大値を示した。反応温度は50°Cから60°Cで高く55°Cで最大値を示した。従って、以後の実験でアミラーゼ活性を測定するための最適条件は、反応液のpHは5.0で反応温度は40°Cであることが判明した。

そこで、1%スターチ添加培地でのアミラーゼ産生と水素生成との関係を調べる実験を実施した(表4)。最初にpH未調整の培養での培養温度とアミラーゼ産生との関係を検討した。アミラーゼ活性は、36°Cと41°Cでの培養では培養開始4時間後、31°Cでは6時間後より検出された。アミラーゼ活性値と総水素生成量は36°Cで最大(135単位と1950 ml)となった。しかし、アミラーゼ産生が最低であった41°Cの培養で水素生成の E_{max} は最大値を示した。

次に、36°Cに培養温度を保ち培養液のpHを変えて培養し、培養液pHの影響を検討した。培養液pHに関係無く、36°Cで培養するとアミラーゼ活性は培養開始4時間後より検出されるようになった。しかし、産生されたアミラーゼの活性値は、培養液のpHによって有意に異なった。アミラーゼの産生は、pH6.0のときが最大で、pH7.0が最低であった。最大活性値と菌体収量当たりの活性値は、pH6.0とpH7.0では3.8倍と2.7倍もの違いが認められた。総水素生成量は、pH5.0(2077ml)と

pH6.0(2150ml)に維持した場合が多く、E_{max}はpH7.0(309ml/h)とpH6.0(374ml/h)の場合が高かった。

以上の結果は、スターチ添加培地にAM21B菌を接種して水素を最大に産生させるには、培養温度を36°Cに培養液のpHを6.0に維持することを示唆する。この培養条件は、アミラーゼの産生にも最適であった。

表4. 培養条件とアミラーゼの産生

培養 条件	アミラーゼ活性 (units)							最大アミ ラーゼ活 性 units	総水素 生成量 ml/l	E _{max} ml/h	菌体 収量 g/l	基質 消費量 g
	培 養 時 間											
	2	4	6	8	10	12	24					
pH 未調整												
31°C	0	0	27.5	51.4	76.0	NT	84.2	84.2	1572	300	1.55	NT
36°C	0	15.5	83.1	133.9	135.0	NT	99.6	135.0	1950	360	1.39	NT
41°C	0	8.1	43.9	41.7	39.3	NT	2.3	43.9	1362	395	0.95	NT
培養温度 36°C												
pH未調整	0	50.2	106.9	138.6	150.5	167.1	137.3	167.1	1870	345	1.41	8.62
pH 5.0	0	55.4	119.5	234.1	349.6	362.7	367.5	367.5	2077	336	1.53	8.78
pH 6.0	0	46.6	135.6	321.9	349.1	402.7	405.5	405.5	2150	374	1.55	8.79
pH 7.0	0	6.1	68.1	105.5	96.1	80.1	0	105.5	1915	390	1.09	8.87

1%スターチ添加PY培地1,000mlを攪拌培養した。

6. 現在までの問題点

以上スターチと対照基質としてのグルコースを中心にAM21B菌による水素生成について述べてきた。Clostridium属の細菌種は、一般に多種類の糖を利用でき、殆どの種が水素を生成する、そのうえ極めて強い分泌能を有する特徴がある¹⁾。AM21B菌は、Clostridium属の細菌種であるがその嫌気度はあまり強くなく、その増殖速度は通常の大腸菌と差ほど変わらない。従って、取り扱いが容易な細菌である。そのうえ、ペントースを含む広範囲な糖を基質として水素を産生することができる^{2, 3, 5)}。スターチを基質として水素を生成する細菌は、未だ報告がなく、文献的にはAM21B菌株が最初であろう。

しかし、表4に示したように、アミラーゼ活性が400単位も検出されるpH6.0の培養系と105単位しか検出されないpH7.0の培養でも、スターチの消費量は約90%と有意な違いがなかった。我々が実験に供したスターチは、溶性デンプン(和光純薬)である。性状は不明ではあるが、この溶性デンプンは、約90%が α -1,4結合で残りの約10%が α -1,6結合と仮定すると、次のようなことが考えられる。AM21B菌は α -1,4結合を完全に消化するアミラーゼは産生する、しかし、 α -1,6結合、即ちブランチオリゴ糖を消化する酵素をあまり産生しないか、またはその活性が弱い可能性が考えられる。そのために、アミラーゼの産生や総水素生成量に関係なく、ほぼ同じ量のスターチが残存した可能性を示唆しているものと考えられる。

成績は記載しなかったが、シロアリから分離したAM21B菌株は、キシロースからの水素生成はグルコースからよりも多く、更にキシラン、デキストランなどが

らも水素を産生するので(未発表)、当該菌を用いて将来廃棄物処理による水素回収が可能かとも期待した。しかし、ヘミセルロースとしてのキシランは分解して水素に変換可能であるが(未発表)、セルロースを分解できない。前に述べたようにスターチも完全には消化できない。ここに当該菌の限界があるように思われる。我々としては、少なくともセルラーゼとヒドロゲナーゼを産生する新しい水素生成菌の探索を継続している。シロアリは新規な微生物の宝庫のようであるので、慎重に検索すれば必ず望の菌候補が得られると考えている。

7. 謝辞

本研究の一部は、顕日本科学財団、顕日本ワックスマン財団と顕セコム科学技術振興財団からの研究奨励金、および文部省科学研究費補助金により行われた。

8. 参考文献

- 1) Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, E.: Clostridium. pp. 1141-1207, In "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". Vol. 2, Williams & Wilkins Co. Baltimore. (1986).
- 2) Taguchi, F. et al. Efficient hydrogen production from starch by a bacterium isolated from termites. *J. Ferment. Bioeng.* 73: 244-245, 1992.
- 3) Taguchi, F. et al. Isolation of a hydrogen-producing bacterium, Clostridium beijerinckii strain AM21B, from termites. *Can. J. Microbiol.* 39: 726-730, 1993.
- 4) Taguchi, F. et al. Microbial conversion of arabinose and xylose to hydrogen by a newly isolated Clostridium sp. No. 2. *Can. J. Microbiol.* 40: 228-233, 1994.
- 5) Taguchi, F. et al. Effect of amylase accumulation on hydrogen production by Clostridium beijerinckii, strain Am21B. *J. Ferment. Bioeng.* 77: 565-567, 1994.
- 6) Taguchi, F. et al. Direct conversion of cellulosic materials to hydrogen by Clostridium sp. strain no. 2. *Enzyme Microb. Technol.* 17: 147-150, 1995.
- 7) Taguchi, F. et al. Hydrogen production from continuous fermentation of xylose during growth of Clostridium sp. strain No. 2. *Can. J. Microbiol.* 41: 536-540, 1995.
- 8) Taguchi, F. et al. Simultaneous production of xylanase and hydrogen using xylan in batch culture of Clostridium sp. strain X53. *J. Ferment. Bioeng.* (in press).