

## 水素生産菌の探索

上田 早紀, 岸田 有乃, 細井 桃花, 谷津 絵里, 宮崎 悠衣, 本郷 敦

埼玉県立熊谷女子高等学校 〒360-0031 埼玉県熊谷市末広2丁目131

キーワード: 水素生産, グルコース, マンニトール, グルロン酸

### 1. 緒言

現在日本で利用されているエネルギー資源は、そのほとんどが海外からの輸入に頼っており、資源輸入量軽減と多角化を目的として導入した原子力発電も、東日本大震災により安全性を問題視されている。今日では、経済的にも環境的にも問題を抱えた火力発電への回帰、および代替運転が実施されている。よってこれらに代わるエネルギーの開発が急務となっている。その一環として、環境に優しい新エネルギーの開発も重要な課題の一つである。

現在世界で注目されている新エネルギーとして、水素燃料がある。生産の効率化を図ることによって、クリーンで環境にやさしい循環型エネルギーとなるため、水素をエネルギー源とした水素社会の到来も期待されている。

一般的な水素の生産方法は、水蒸気改質法が主であり、電気分解法も用いられている。しかし、今のところ両方法とも化石燃料を原料として用いること、また二酸化炭素等が発生するなどの問題がある<sup>1)</sup>。

本研究では、環境問題の原因となる化石燃料を原料として用いずに水素を得る方法として、水素を生産する細菌に注目した。細菌の中には、糖を分解する過程で水素を生産する経路を持つものが存在する<sup>2-4)</sup>。よって、水素を大量に生産する細菌を発見できれば、将来的にバイオマスから水素の生産が可能になる。現在までに、微生物を用いて水素を生産する研究は多数行われている。しかし、まだ実用化できていないのが実情である。もっとも実用化に近い施設として、沖縄にある廃糖蜜を原料とした水素生産実験プラントや、島根県海士町で海藻を原料とした実験プラントを用いて、バイオ水素技術株式会社が実証実験を進行中である。

様々な種類の糖を基質として、効率的に水素生産が可能となる菌を単離できれば、実用化に一步近づくと期待できる。例えば、生ゴミなどにはグルコースが多く含まれているが、グルコースを利用して効率的に水素を生産する菌が発見できれば、生ゴミから効率よく水素を取り出すことが可能となる。日本は島国であり、海藻などの海洋資源(海洋バイオマス)に恵まれている。そこで、海藻に多く含まれるマンニトールやグルロン酸から、水素を効率よく生産する菌を単離できれば、海藻を含んだ生ゴミから水素を生産することも可能となる<sup>5)</sup>。

よって本研究では、将来のクリーンで安定したエネルギー供給を実現すると同時に、地球温暖化の抑制を目指して、様々な糖から高収率で水素を生産する細菌の探索を行った。探索は3年間にわたり、全校生徒を挙げて行った。延べ1200検体を採取し、その中から菌の選抜を行った。また、選抜された菌株に対し、単糖であるグルコース、海藻由来の単糖であるマンニトール、多糖であるデンプン、海藻由来の多糖であるアルギン酸、およびその分解産物で単糖のグルロン酸を基質に用いて回分培養を行い、水素生産能を調べた<sup>6)</sup>。

### 2. 実験方法

#### 2.1 菌の採取と選別

##### 菌の採取

菌体は、生徒が各自学校から自宅までの間の任意の場所で採取した。1年目は2012年11月に第2学年の生徒約200人、2年目は2013年3月に第1学年の生徒360人、3年目は2014年9月に第1学年の生徒280人と2学年の生徒360人が1人1検体の採取を行い、延べ1200検体の培養選抜を行った。

採取はバクテリア探索キット(バイオ水素株式会社製)を用い、水素やエネルギーに関する講義の後に配布した<sup>7)</sup>。バクテリア探索キットとその使用方法を(図1)に示す。バクテリア探索キットに用いられている培地組成はGlucose 10 g, ABCM糖分解用培地(栄研化学株式会社) 45 g, Agar 2 g, Ion-Exchange Water 1000 ml, pH 6.8である。

##### 選抜①: バクテリア探索キットによる選抜

回収したバクテリア探索キットを、37.0°Cで24時間振盪培養し、3目盛り以上の気体発生が確認されたものを気体発生菌として選抜した。3目盛り以上を選抜した理由として、現在最も高収率に水素を発生する菌をこのキットで培養すると、3目盛りになるため、さらに高収率の菌を探索することを目標としたためである。

##### 選抜②: 簡易水素発生装置による選抜

選抜①で気体発生が確認されたサンプルから、菌の単離を行った。単離は、選抜した微生物を試験管で培養後、1 µlをピペットマンで採取し、生理食塩水を用いて1000倍希釈した。そこから1 µl採取して寒天平板培地に植菌し、コロニー形成を行った。出現した各コロニー

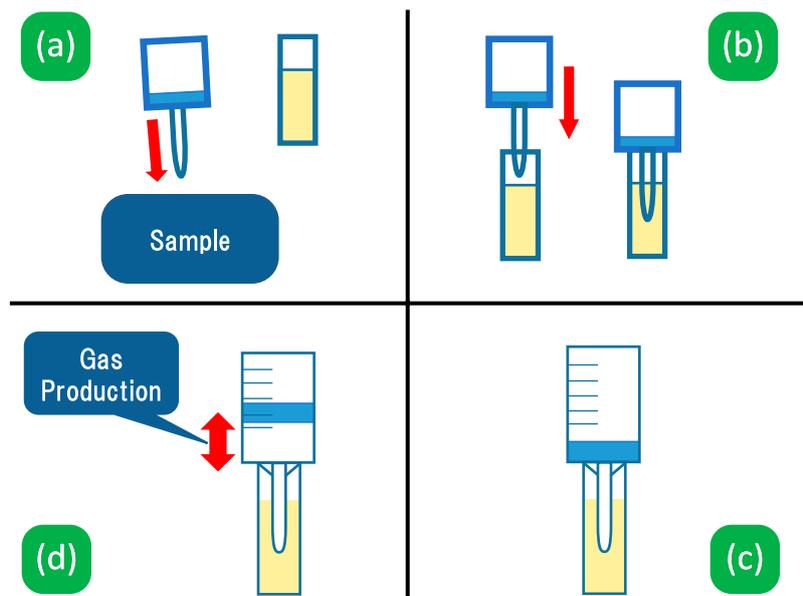


図1. バクテリア探索キットの使用法  
 (a) バクテリアを採取する  
 (b) 培地に差し込む  
 (c) 恒温槽で培養を行う  
 (d) 発生した気体量を確認する

の菌に対し、簡易水素発生装置を用いて水素発生を調べ水素を発生する菌を特定した。簡易水素発生装置は、試験管を2本用意し、片方の試験管には植菌した培地を、もう片方の試験管にはNaOHを入れ、植菌した試験管で発生した気体が、NaOHの入っている試験管側に収集されるような仕組みになっている(図2)。コロニー形成が認められた菌を、簡易水素発生装置に植菌し、37.0°Cで24時間培養して気体発生実験を行った。菌の培養と簡易水素発生装置に使用した培地はGlucose 10 g, ABCM糖分解用培地(栄研化学株式会社) 45 g, Agar 2 g, Ion-Exchange Water 1000 ml, pH 6.8で、コロニー形成に用いた平板培地はグルコース(C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) 10 g, ABCM糖分解用培地 45 g, Agar 20 g, Ion-Exchange Water 1000 ml, pH 6.8である。気体収集側の試験管に付けられたセプタムから、気体発生をシリンジで採取し、ビニール袋にいったん貯め、気体検知管(GASTEC社製)に通すことにより、水素の発生と硫化水素ではないことを確認した。

## 2.2 各種糖を基質にした分解能の検証

選抜された菌株に対して、多様な糖を基質とした水素生産能を確認するため、500 mlの培養液を用いて、回分培養を行った(図3)。回分培養装置の写真を(図3)に示す。検定を行った基質として、単糖ではグルコース、マンニトール、グルロン酸、多糖ではデンプン、アルギン酸を用いた。培養は37.0°Cで行い、培地は各糖を1%添加したABCM糖分解用培地 45 g, Ion-Exchange Water 1000 ml, pH 6.8を用いた。pH調整はHaOHを用いて行った。

## 2.3 16S rRNA 遺伝子解析による分離菌の同定

2.2で単離した菌体に対し、16S rRNA 遺伝子解析を

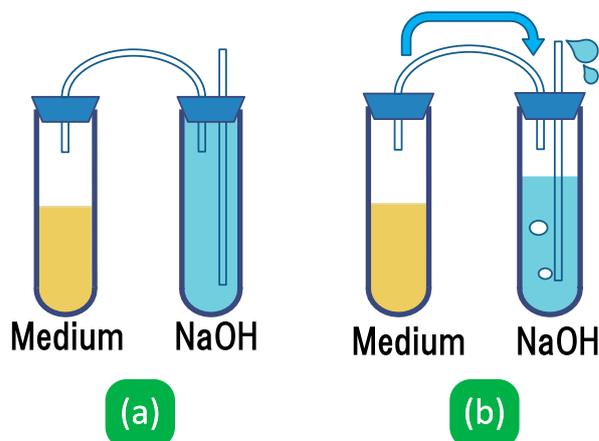


図2. 簡易水素発生装置の構造

- (a) 気体発生前  
 (b) 気体発生後

左の試験管には植菌した培地を、もう片方の試験管にはNaOHを入れ、左の試験管で発生した気体が、NaOHの入っている右の試験管側に収集されるような構造になっている。

行った。シーケンス解析は東洋紡株式会社 GMP グループに委託した。

## 3. 結果

### 3.1 選抜の結果

2012年11月に採取された200検体から4サンプル、2013年3月に採取された360検体から1サンプル、2014年9月に採取された640検体から1サンプルが気体発生菌として選抜された。

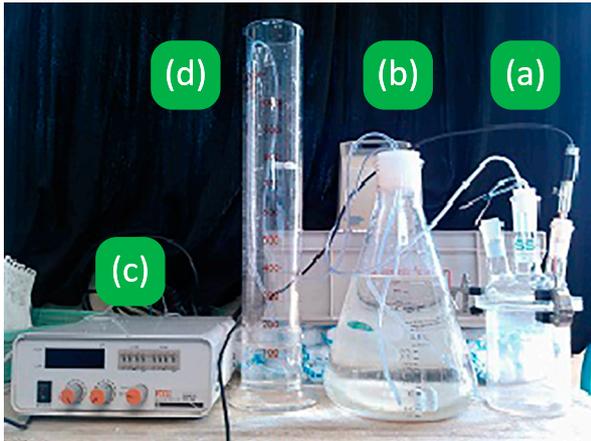


図3. 回分培養実験装置写真

- (a) Chemostat : 閉鎖系になっているが、スターラーにより内部の培地を攪拌することができる。また、pHメーターにより常にpHを確認できるようになっている。  
 (b) NaOH  
 (c) Gas production  
 (d) pH-meter

選別②の選抜を経て、最終的に1菌株が選抜された。

### 3.2 水素生産に及ぼす各種糖基質の影響

3.1で選抜された菌株の、各基質に対する水素収率を以下に示す。グルコースに対しては水素収率1.5 (mol-H<sub>2</sub>/mol-glucose), マンニトールに対しては水素収率1.1 (mol-H<sub>2</sub>/mol-mannitol), デンプンに対しては水素収率0.2 (mol-H<sub>2</sub>/mol-starch), アルギン酸に対しては水素収率0 (mol-H<sub>2</sub>/mol-alginate), グルクロン酸に対しては水素収率0.5 (mol-H<sub>2</sub>/mol-gulucuronic acid)を示した。

### 3.3 16S rRNA 遺伝子解析による分離菌の同定

16S rRNA 遺伝子の800 bpをシーケンス解析した結果、*Enterobacter asburiae* (ATCC = 35953) と99.78%の相同性を示すことが分かった。この遺伝子情報を日本DNAデータバンク (DDBJ) のデータベース検索ツール getentry (<http://getentry.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) に *Enterobacter asburiae*KUMAJO として登録した。Accession number は、LC041128である。

## 4. 考 察

今回選抜された菌株の水素生産能について、グルコースを基質にした場合、一般的に用いられている *Enterobacter aerogenes* st.E.82005 の収率が1.0 (mol-H<sub>2</sub>/mol-glucuronic acid) であることから<sup>8,9)</sup> 本菌は、1.5倍収率が高いことが分かった。また、デンプンを基質にし

た水素生産は、グルコースからの収率に比べて低いことから、選抜された菌はデンプンを単糖化しグルコースにするアミラーゼなどの酵素を生産しない、もしくは生産量が少ないと考えられた。また単糖であるマンニトールとグルロン酸を基質にした場合、双方から水素生産が確認された。マンニトールはコンブなどの海洋バイオマスに含まれる単糖類である。グルロン酸は海洋バイオマスの主成分の一つである多糖類のアルギン酸を構成している単糖である。多糖類であるアルギン酸からの水素生産は見られなかったため、アルギン酸を単糖化するアルギナーゼやアルギン酸リアーゼなどの酵素を保有していないと考えられた。マンニトールとアルギン酸は海洋バイオマスの約15%を占める成分である<sup>10)</sup>。よって海洋バイオマス中のアルギン酸を分解し単糖化する、酸やアルカリを用いた加水分解や、超臨界や亜臨界状態の水を用いた熱分解による前処理を行えば、本菌によって海洋バイオマスを水素生産基質として利用可能ではないかと考えられた。

## 謝 辞

本研究は、スーパーサイエンスハイスクール (SSH) として独立行政法人科学技術振興機構 (JST) の助成を受けたものである。

This research was partially supported by Japan Science and Technology Agency, 2012–2014.

## 文 献

- 1) 社団法人発明協会. 2006. 水素製造技術, pp. 3–19. 独立行政法人工業所有権情報・研修館.
- 2) 化学大辞典出版委員会. 1993. 化学大辞典 3, p. 141. 共立出版.
- 3) 化学大辞典出版委員会. 1993. 化学大辞典 8, p. 924. 共立出版.
- 4) 谷生重晴. 2004. バクテリアはなぜ水素を発酵で発生するのか, またエネルギー生産利用における問題点はなにか. 水素エネルギーシステム, 29(1): 2–6.
- 5) 本郷 敦. 2011. 発酵水素生産に適した隠岐に生育する海藻の選択の研究. 環境バイオテクノロジー学会誌, 11(1-2): 89.
- 6) Wong, T.Y., L.A. Preston, and N.L. Schiller. 2000. Alginate Lyase: Review of Major Sources and Enzyme Characteristics, Structure-Function Analysis, Biological Roles, and Applications. Annu. Rev. Microbiol. 54: 289–292.
- 7) 本郷 敦. 2014. 簡易水素生産発生装置の教育現場での活用. エネルギー環境教育研究, 8(2): 119–126.
- 8) Tanisho, S. 1994. Continuous hydrogen production from molasses by the bacterium *Enterobacter aerogenes*. 19: 807–812.
- 9) 谷生重晴. 1989. *Enterobacter aerogenes* の発酵水素発生と利用基質について. 水素エネルギーシステム, 67: 29–34.
- 10) Sanbonsuga, Y. 1986. Studies of the growth of forced *Laminaria*, Bull. Hokkaido Reg. Fish Res. Lab, 12.