

平成10年度地球環境産業技術研究開発事業  
新エネルギー・産業技術総合開発機構委託

環境調和型水素製造技術研究開発  
成果報告書

平成11年3月

財団法人 地球環境産業技術研究機構

NEDO 図書・資料室



010013649-8

# 目 次

|              |   |
|--------------|---|
| 成果の要約（和文、英文） | 1 |
|--------------|---|

## 第1章 概 要

|             |    |
|-------------|----|
| 1.1 研究目的    | 7  |
| 1.2 研究開発の概要 | 7  |
| 1.3 研究体制    | 12 |
| 1.4 研究成果の概要 | 18 |

## 第2章 光合成微生物等の探索・育種改良の研究開発

|                          |    |
|--------------------------|----|
| 2.1 様々な受光法を用いた光水素発生の検討   | 24 |
| 2.1.1 概要                 | 24 |
| 2.1.2 背景                 | 24 |
| 2.1.3 屋内における遮光体の検討       | 25 |
| 2.1.4 屋外における遮光体利用の効果     | 28 |
| 2.1.5 総括                 | 30 |
| 2.2 光水素発生における波長依存性の検討    | 43 |
| 2.2.1 概要                 | 43 |
| 2.2.2 緒言                 | 43 |
| 2.2.3 単色光下の水素発生速度を表す式の作成 | 43 |
| 2.2.4 まとめ                | 46 |
| 2.2.5 参考文献               | 46 |

|         |                                                                         |    |
|---------|-------------------------------------------------------------------------|----|
| 2. 3    | <u>Rb.sphaeroides</u> RVにおけるBchl含有量制御の遺伝学的アプローチ                         | 50 |
| 2. 3. 1 | 概要                                                                      | 50 |
| 2. 3. 2 | 緒言                                                                      | 50 |
| 2. 3. 3 | 材料および方法                                                                 | 51 |
| 2. 3. 4 | 結果と考察                                                                   | 52 |
| 2. 3. 5 | まとめ                                                                     | 53 |
| 2. 3. 6 | 参考文献                                                                    | 53 |
| 2. 4    | 藍藻類の育種改良                                                                | 57 |
| 2. 4. 1 | 概要                                                                      | 57 |
| 2. 4. 2 | 背景                                                                      | 57 |
| 2. 4. 3 | 使用菌株及び培養方法                                                              | 58 |
| 2. 4. 4 | 実験方法                                                                    | 59 |
| 2. 4. 5 | 結果と考察                                                                   | 63 |
| 2. 4. 6 | まとめ                                                                     | 65 |
| 2. 5    | 光合成細菌のポリヒドロキシ酪酸代謝系と水素発生の検討                                              | 70 |
| 2. 5. 1 | 概要                                                                      | 70 |
| 2. 5. 2 | 背景                                                                      | 70 |
| 2. 5. 3 | 実験方法                                                                    | 70 |
| 2. 5. 4 | 結果と考察                                                                   | 71 |
| 2. 5. 5 | 参考文献                                                                    | 73 |
| 2. 6    | 水素発生酵素の遺伝子特性と遺伝子組み換えによる                                                 |    |
|         | 光合成細菌の育種改良                                                              | 77 |
| 2. 6. 1 | 要旨                                                                      | 77 |
| 2. 6. 2 | 緒言                                                                      | 77 |
| 2. 6. 3 | <u>R.sphaeroides</u> RVにおける <u>C.pasteurianum</u> [Fe]<br>ヒドロゲナーゼ I の発現 | 78 |
| 2. 6. 4 | <u>R.sphaeroides</u> RVからの取り込みヒドロゲナーゼ突然変異株：                             |    |

|                                                                                                                             |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 廃棄物由来培地を用いる光誘導水素生産試験                                                                                                        | 83  |
| 2.6.5 合成培地を用いるバッチ培養条件における <u>R.sphaeroides</u> RV からの突然変異株の比較評価                                                             | 87  |
| 2.6.6 合成培地を用いる連続培養条件における <u>R.sphaeroides</u> RV からの突然変異株の比較評価                                                              | 90  |
| 2.6.7 <u>R.sphaeroides</u> RVからのPHA／取り込みヒドロゲナーゼ二重突然変異株：廃棄物由来培地を用いる光誘導水素生産試験                                                 | 93  |
| 2.6.8 Mo-ニトロゲナーゼ制御遺伝子 <u>nifA1</u> および <u>nifR2/R1</u> の分離：配列決定、および <u>R.sphaeroides</u> RV 取り込みヒドロゲナーゼ突然変異株SMV089 へのクローニング | 97  |
| 2.6.9 結論                                                                                                                    | 102 |
| 2.6.10 参考文献                                                                                                                 | 104 |

### 第3章 大量培養技術の研究開発

|                                            |     |
|--------------------------------------------|-----|
| 3.1 糖廃液を用いる光合成細菌の大量培養技術                    | 171 |
| 3.1.1 概要                                   | 171 |
| 3.1.2 背景                                   | 171 |
| 3.1.3 水素生産におけるR-1株の特徴                      | 172 |
| 3.1.4 浮体式光合成リアクタ                           | 177 |
| 3.1.5 参考文献                                 | 182 |
| 3.2 セルロースなどを含有した廃水を用いる嫌気性細菌および光合成細菌の大量培養技術 | 210 |
| 3.2.1 概要                                   | 210 |
| 3.2.2 背景                                   | 211 |
| 3.2.3 実験方法                                 | 212 |
| 3.2.4 結果                                   | 216 |
| 3.2.5 考察                                   | 223 |

|       |                         |     |
|-------|-------------------------|-----|
| 3.2.6 | まとめ                     | 229 |
| 3.2.7 | 参考文献                    | 229 |
| 3.3   | 下水汚泥を用いる光合成細菌の大量培養技術    | 256 |
| 3.3.1 | 熱処理廃液の活性炭処理効果について       | 256 |
| 3.3.2 | 内部照射式モジュールリアクタによる水素生産培養 | 260 |
| 3.4   | 生ゴミを用いる光合成細菌の大量培養技術     | 270 |
| 3.4.1 | 要旨                      | 270 |
| 3.4.2 | 緒言                      | 270 |
| 3.4.3 | 試料                      | 274 |
| 3.4.4 | 実験                      | 275 |
| 3.4.5 | 結果                      | 280 |
| 3.4.6 | 参考文献                    | 289 |

#### 第4章 副産物回収技術の研究開発

|       |               |     |
|-------|---------------|-----|
| 4.1   | 副産物回収技術の基礎研究  | 330 |
| 4.1.1 | 概要            | 330 |
| 4.1.2 | 背景            | 330 |
| 4.1.3 | 有用副産物調査研究のまとめ | 330 |

#### 第5章 総合システムの開発

|       |            |     |
|-------|------------|-----|
| 5.1   | I H I システム | 332 |
| 5.1.1 | 概要         | 332 |
| 5.1.2 | 背景         | 332 |
| 5.1.3 | システムの構成    | 334 |

|         |                 |     |
|---------|-----------------|-----|
| 5. 1. 4 | 各構成要素の特徴        | 334 |
| 5. 1. 5 | 全体評価            | 336 |
| 5. 1. 6 | 参考文献            | 336 |
| 5. 2    | 鹿島システム          | 342 |
| 5. 2. 1 | はじめに            | 342 |
| 5. 2. 2 | 物質収支            | 342 |
| 5. 2. 3 | 結論              | 346 |
| 5. 2. 4 | 参考文献            | 346 |
| 5. 3    | クボタシステム         | 351 |
| 5. 3. 1 | 概要              | 351 |
| 5. 3. 2 | システムの構成         | 351 |
| 5. 3. 3 | システムの設備仕様       | 352 |
| 5. 3. 4 | 水素製造コストの評価      | 356 |
| 5. 3. 5 | クボタシステムの環境調和性評価 | 358 |
| 5. 3. 6 | まとめ             | 359 |
| 5. 3. 7 | 参考文献            | 360 |
| 5. 4    | エニシステム          | 368 |
| 5. 4. 1 | 物質収支            | 368 |
| 5. 4. 2 | 大規模リアクタ         | 368 |
| 5. 4. 3 | 経済性予測           | 369 |
| 5. 4. 4 | 結論              | 370 |
| 5. 4. 5 | 参考文献            | 371 |

## 第6章 研究支援調査

|      |                |     |
|------|----------------|-----|
| 6. 1 | ロンドン大学における研究状況 | 374 |
|------|----------------|-----|

|      |                |     |
|------|----------------|-----|
| 6. 2 | 東京農工大学における研究状況 | 376 |
|------|----------------|-----|

|      |               |     |
|------|---------------|-----|
| 6. 3 | ハワイ大学における研究状況 | 377 |
|------|---------------|-----|

|      |              |     |
|------|--------------|-----|
| 6. 4 | 茨城大学における研究状況 | 378 |
|------|--------------|-----|

|      |         |     |
|------|---------|-----|
| 6. 5 | 海外調査報告書 | 379 |
|------|---------|-----|

|         |                            |     |
|---------|----------------------------|-----|
| 6. 5. 1 | 米国技術調査 (バイオテクノロジー/ロジスティクス) | 379 |
|---------|----------------------------|-----|

|         |                      |     |
|---------|----------------------|-----|
| 6. 5. 2 | 南米技術調査 (世界水素エネルギー会議) | 381 |
|---------|----------------------|-----|

|         |                  |     |
|---------|------------------|-----|
| 6. 5. 3 | 欧州技術調査 (国際光合成会議) | 383 |
|---------|------------------|-----|

|         |                          |     |
|---------|--------------------------|-----|
| 6. 5. 4 | 欧州技術調査 (温暖化ガス抑制技術国際会議ほか) | 384 |
|---------|--------------------------|-----|

|         |                    |     |
|---------|--------------------|-----|
| 6. 5. 5 | 欧州技術調査 (エニ分室研究会ほか) | 386 |
|---------|--------------------|-----|

|             |     |
|-------------|-----|
| 目標に照らした達成状況 | 388 |
|-------------|-----|

|                   |     |
|-------------------|-----|
| 研究発表・講演、文献、特許等の状況 | 390 |
|-------------------|-----|

## Appendix

①再委託先報告書 (ロンドン大学)

②再委託先報告書 (東京農工大学)

③再委託先報告書 (ハワイ大学)

④再委託先報告書 (茨城大学)

⑤. 1 海外調査報告書 (米国技術調査、バイオテクノロジー/ロジスティクス)

⑤. 2 海外調査報告書 (南米技術調査、世界水素エネルギー会議)

⑤. 3 海外調査報告書 (欧州技術調査、国際光合成会議)

⑤. 4 海外調査報告書 (欧州技術調査、温暖化ガス抑制技術国際会議ほか)

⑤. 5 海外調査報告書 (欧州技術調査、エニ分室研究会ほか)

# 成果の要約

## 1. 光合成微生物等の探索・育種改良の研究開発

- ・単色光下の光合成細菌の水素発生速度を、菌体の集光色素蛋白質（LH1 または LH2）量、菌体濃度及び光エネルギー強度を変数として表す式を作成した。
- ・チョッパや太陽電池などの光エネルギー変換体を用いて、南中時の過剰な太陽光を分散分配し、系全体としての光エネルギー変換効率を向上させる方法を継続して検討した。
- ・集光色素蛋白質である LH1 をコードする遺伝子群 *puf* オペロンに着目し、この遺伝子群の発現を制御する *puf* プロモータの発現のコントロールを検討し、LH1 合成を長期間抑制するための培養条件の最適化を試みた。
- ・嫌気性細菌由来のヒドロゲナーゼを導入した藍藻について、導入したヒドロゲナーゼ蛋白質は連続して合成されていることが確認された。また、導入したヒドロゲナーゼの活性化には藍藻の機能が利用されている可能性が高いことが推定された。
- ・光合成細菌 RV 株は培養液中の pH が高いと水素より PHB を優先的に生産する。その仕組みについて酵素レベルの検討を行った。

・インターポゾン突然変異により、PHB 合成酵素欠損株、水素消費酵素欠損株、またそれらのダブル変異株を取得し、それらの水素生産能を実験室規模で野生株と対比して測定した。水素生産能は水素消費酵素欠損株、またダブル変異株で増加した。

## 2. 大量培養技術の研究開発

- ・陸上敷地をほとんど使用せずに、光合成細菌による水素製造を行える浮体式光合成リアクタの性能がスケールアップした形で実証された。具体的には、容量 400L、受光面積 8m<sup>2</sup> 規模のリアクタを海上に浮かべて連続試験を行い、光エネルギー変換効率として 0.85%を確認した。
- ・RV 株の光反応工程における素反応を解析し、暗反応による水素消費反応は、エネルギー消費型で光エネルギーを必要とする菌体合成反応と、エネルギー獲得型で光エネルギーを必要としない有機酸生成反応であることを明らかにした。
- ・基質成分の物質収支を詳細に検討し、菌体、有機酸等の副生成物ならびに水素への分配

依存性を明らかにした。これにより、屋内実験データに基づいて、屋外の実プロセスにおける水素生成量を予測することが可能になった。

- ・下水汚泥の熱処理廃液を用いた培養において、活性炭による前処理の効果を検討した。その結果、ロットによらず水素生産量が安定し、生産量が向上した。

- ・生ゴミの酸産生発酵による基質の滅菌手段として、培地にホップ $\beta$ 酸を直接添加による滅菌手段を検討し、その有効性を確認した。

- ・水素消費酵素欠損株を用いた屋外モジュール試験で連続試験を行い、30 日以上の安定した運転が達成され、野生株に対して水素発生量は 70%程度増加し、光エネルギー変換効率も 1.25%を達成した。

## 5. 総合システムの開発

- ・前処理技術、大量培養技術等の研究成果をベースに光合成による水素発生を核とするバイオ水素製造プロセスを構築し、フィージビリティスタディを行った。

- ・構築したトータルシステムについて、各要素工程毎に構成する反応槽、機器類を積算し、水素製造コスト及び累積  $\text{CO}_2$  排出量 ( $\text{LCCO}_2$ ) の推算を行った。 $\text{LCCO}_2$  から見た環境調和性においては、炭化水素の水蒸気改質に比べて優れていることが分かった。

## 6. 研究支援調査

様々な廃水に適合する菌の探索、特殊環境下で水素生産可能な菌の探索、ならびに光合成リアクタや培養技術の基礎的な検討を再委託により実施した。

## Summary of achievements

### 1. R&D on screening and breeding improvement of photosynthetic microorganisms

A mathematical formula to express hydrogen production rate by photosynthetic bacterium under monochromatic light was developed as a function of the amount of light-concentrating chromoprotein (LH1 or LH2), the cell density and the light energy.

Studies on light energy transformer such as chopper and solar cell were continued to improve overall efficiency of the light energy conversion as a total system by defusing and/or utilizing excessive light energy for something useful

*puf* operon which encodes the light-concentrating chromoprotein LH1 was considered to be important. Control of expression of *puf* promoter, which regulates the expression of *puf* operon, was studied trying to optimize cultivation conditions for suppressing the synthesis of LH1 over a long period.

Continuous synthesis of hydrogenase protein was confirmed in cyanobacterium which was introduced with the hydrogenase of anaerobic bacterium. It was also implied with high possibility that the introduced hydrogenase was activated by a mechanism of the cyanobacterium itself.

Enzyme level investigation was conducted on the mechanism of preferential production of PHB over hydrogen by the RV strain in the medium with lower pH.

PHB synthesis negative strain, hydrogen uptake negative strain, and a strain lacking in both were obtained by interposon mutation. Hydrogen production capabilities of these mutants were

compared with the wild strain. It was found that both hydrogen uptake negative strain and double mutation strain produced more hydrogen than the wild strain.

## **2. R&D on large-scale cultivation techniques**

It was demonstrated in the field that a scale-up floating photoreactor system, which hardly requires the use of land, is capable of producing hydrogen under the natural sunlight. The scale-up photoreactor used was 400 L in volume and 8 m<sup>2</sup> in light receiving surface area, and kept afloat on the sea during the experimental period. The maximum light energy conversion efficiency observed was 0.85%.

Basic photoreactions of the strain RV were studied in detail. As the result, it was shown that there are two classes in dark reactions; the synthesis of bacterial cell which is an energy consuming reaction and requires light energy, and VFA production which is an energy generating reaction and requires no light energy.

Light dependency of distribution of substrate to hydrogen and by-products such as bacterial cells and VFA was analyzed by studying material balance. As a result, it was made possible to estimate the amount of hydrogen produced in an outdoor real process based upon experimental data obtained indoor.

Effect of activated carbon on hydrogen production from supernatant of a heat treatment process for sewage sludge was investigated. As a result, both stabilized and greater production of hydrogen was observed regardless the lot of supernatant samples used in the experiments.

Effect of direct addition of beta acids of hops in the medium was studied for prevention of growth

of undesired microorganisms, and its efficacy was confirmed.

A continuous experiment by using hydrogen uptake negative strain and an outdoor photoreactor system was conducted. It was demonstrated that stable operation of more than 30 days was possible. The amount of hydrogen produced was ca. 70% greater than by the wild strain and light energy conversion efficiency observed was 1.25%,

## **5 Development of System Integration**

A bio-hydrogen production system was conceptually established by incorporating findings and accomplishments of R&D on pretreatment system and large-scale cultivation techniques, and used in analyzing feasibility of photosynthetic hydrogen production system.

Life cycle CO<sub>2</sub> production (LCCO<sub>2</sub>) was estimated based upon reactors, and major and auxiliary equipment required for the integrated system. In terms of LCCO<sub>2</sub>, it was shown that the photosynthetic hydrogen production system is more environmentally compatible than the steam reforming hydrogen production system.

## **6 Supporting studies**

Screening of bacterial strains which are suitable for various types of wastewater and/or capable of producing hydrogen under extreme conditions, and basic studies on photoreactor designs and cultivation techniques were conducted as contract research commissioned to outside research organizations.

# 第 1 章 概要

## 1. 1 研究目的

石油精製プロセスあるいは二酸化炭素の有効利用などに必要となる水素を石油などの化石資源を消費することなく、地球環境と調和を図りながら効率的に製造する必要がある、微生物の持つ水素発生能力を活用した効率的な水素製造技術を開発する。

すなわち、水素生産能の優れた光合成微生物等（光合成細菌、藍藻類、嫌気性細菌等）の探索・スクリーニングを行い、宿主・ベクター系の開発などによる遺伝子操作技術確立し、それにより水素生産微生物の水素生産機構に関与する遺伝子を制御することにより水素発生能力の増大を図るなどの育種改良技術を開発する。また、有機性原料、有機性廃水、有機性廃棄物または無機性原料を基質として、探索・育種改良された微生物などを用いて水素生産を行い、生産された水素を分離精製するとともに、副産物として得られる増殖菌体などを活用する水素製造技術の開発と技術的、経済的評価を行う。

## 1. 2 研究開発の概要

### (1) 全体計画

#### a. 光合成微生物等の探索・育種改良の研究開発

国内外で水素生産能の優れた光合成微生物等の探索、スクリーニングを行い、その最適条件を確立するとともに、その水素生産能力を明らかにする。また、突然変異、遺伝子操作などのバイオテクノロジー技術を駆使して、水素発生能力を最大限発揮できるように、微生物の育種改良を行う。

#### ①対象微生物・遺伝子などの選択

既存菌株および自然界から高い機能を有する菌株を探索する。これら菌株の遺伝育種条件を調査し、育種改良に適切な菌株を選択する。

#### ②育種方法の検討

水素発生反応の機能を解析する。最も効果のある要素を選び、当該機能を担ってい

る遺伝子を取得、改良する。

### ③育種

改良された遺伝子などを宿主菌株に組み込み、発現させる方法を開発する。大量培養条件で性能を評価し、さらに育種改良する。

#### b. 大量培養技術の研究開発

光合成微生物の水素発生能を最大限発揮させるための培養・制御技術及び培養装置の開発を行う。さらにその結果を基に大量培養における最適化技術を開発する。基質となる有機物等の前処理技術について研究開発を行う。すなわち、光合成細菌、嫌気性細菌などの単独または混合系、または天然の微生物群集を用いる水素生産バイオリアクタでの菌体の高濃度化や反応速度向上のための装置および運転条件の最適化を検討する。また、供給される基質の最適化のため、汚泥の可溶化、調質方法の検討など前処理技術の開発を行う。

具体的には、想定リアクタの機能を満たす「モジュール」による検討を行い、将来的なスケールアップ及びシステム化のためのエンジニアリングデータを蓄積する。目標値として化石燃料由来のCO<sub>2</sub>排出量を現行法である「炭化水素の水蒸気改質法」以下に抑えるために必要な変換効率の達成を目指す。

#### c. 水素分離技術の調査研究

分離膜等を用い、光合成微生物等が発生した水素ガスをその他のガス成分から分離し、精製する技術の調査、研究を行う。

#### d. 副産物回収技術の調査研究

光合成微生物等から得られる生理活性物質など副産物として有用な化学物質の生産、抽出技術の調査研究、および菌体そのものの有効利用のための調査研究を行う。

#### e. 総合システムの開発

効率の良い生物学的水素製造技術を目指してa～dの各要素技術を総合した水素製造システムを概念設計する。モジュールの実験により蓄積されたエンジニアリング基礎

データを基に、精度の高いフィージビリティスタディを実施し、本技術の産業技術としての見通しを得る。

#### **f. 研究支援調査**

研究開発の効率的推進に資するため、微生物を利用した水素製造技術に関する技術文献の収集・分析を行う。

### **(2) 平成10年度実施内容**

#### **a. 光合成微生物等の探索・育種改良の研究開発**

異種水素発生酵素の導入、水素消費酵素欠損株取得、光合成色素発現調整、PHB合成酵素欠損株の育種を継続し、水素生産能増強への寄与を確認するとともに、問題点の整理を行った。

#### **b. 大量培養技術の研究開発**

「モジュール」によるエンジニアリングデータを引き続き蓄積した。また、ラボスケール、ベンチスケールにおける試験も継続して行い、モジュール試験のための補足データを蓄積した。

#### **c. 総合システムの開発**

モジュール試験によって得られたエンジニアリングデータに基づき、経済性、環境調和性等の観点からFSを実施し、産業技術としての可能性を検討した。

#### **d. 研究支援調査**

本研究に関する国内外の研究開発最新動向の調査を行った。また、引き続き4種類の廃水に適合する菌の探索、特殊環境で水素生産可能な菌の探索、及びフォトリアクターや培養技術の基礎的な検討を再委託により実施した。

### **(3) 研究実施場所**

石川島播磨重工業株式会社

技術研究所（横浜）

神奈川県横浜市磯子区新中原町1番地

技術本部エナジー総合開発センター 東京都江東区豊洲3丁目1番地5

ENIRICERCHE S.p.A (エニリチェルケ：エニ総合研究所) H10.4.1～4.27 旧社名

ENITECNOLOGE S.p.A (エニテクノロジー：エニ総合研究所) H10.4.28～ 新社名

ローマ研究所 Via E. Ramarini 32, 00016 Monterotondo Scalo

ミラノ研究所 Via F. Maritano 26, 20097 S. Donato Milanese

在日連絡事務所 東京都港区北青山2-5-8

鹿島建設株式会社

技術研究所 東京都調布市飛田給2-19-1

株式会社 クボタ

基盤技術研究所 茨城県竜ヶ崎市向陽台5-6

技術開発研究所 (H10.6.1～) 兵庫県尼崎市浜1-1-1

東京ガス株式会社

フロンティアテクノロジー-研究所 神奈川県横浜市鶴見区末広町1-7-7

技術企画部 東京都港区海岸1-5-20

株式会社 富士電機総合研究所

応用装置研究所 神奈川県横須賀市長坂2-2-1

工業技術院 生命工学工業技術研究所

茨城県つくば市東1-1

財団法人 地球環境産業技術研究機構

京都本部 京都府相楽郡木津町木津川台9丁目2番地

東京事務所 東京都港区西新橋2-23-1 第3東洋海事ビル7F

地球環境産業技術研究所 CO<sub>2</sub>固定化等プロジェクト室

東京都港区西新橋2-8-11 第7東洋海事ビル8F

University of London (ロンドン大学)

King's College London

Camden Hill Road, London W8 7AH, U. K.

東京農工大学

工学部生命工学科

東京都小金井市中町 2-24-16

University of Hawaii (ハワイ大学)

Hawaii Natural Energy Institute

2540 Dole Street, Honolulu, Hawaii

茨城大学

農学部資源生物科学科

茨城県稲敷郡阿見町中央 3-21-1

**(4) 実施期間**

自 平成 10 年 4 月 1 日

至 平成 11 年 3 月 31 日

### (5) 研究項目と実施状況

|                        | 月 度 | 1 0 年                       |   |   |   |   |   |     |     |     |   | 1 1 年 |   |  |
|------------------------|-----|-----------------------------|---|---|---|---|---|-----|-----|-----|---|-------|---|--|
|                        |     | 4                           | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 1 0 | 1 1 | 1 2 | 1 | 2     | 3 |  |
| ① 光合成微生物等の探索・育種改良の研究開発 |     | 育種改良変異株の取得                  |   |   |   |   |   |     |     |     |   |       |   |  |
|                        |     |                             |   |   |   |   |   |     |     |     |   |       |   |  |
| ② 大量培養技術の研究開発          |     | モジュール試験によるエンジニアリングデータの取得    |   |   |   |   |   |     |     |     |   |       |   |  |
|                        |     |                             |   |   |   |   |   |     |     |     |   |       |   |  |
| ③ 水素分離技術の調査研究          |     |                             |   |   |   |   |   |     |     |     |   |       |   |  |
|                        |     |                             |   |   |   |   |   |     |     |     |   |       |   |  |
| ④ 副産物回収技術の調査研究         |     |                             |   |   |   |   |   |     |     |     |   |       |   |  |
|                        |     |                             |   |   |   |   |   |     |     |     |   |       |   |  |
| ⑤ 総合システムの開発            |     | エンジニアリングデータを基にしたフィジビリティスタディ |   |   |   |   |   |     |     |     |   |       |   |  |
|                        |     |                             |   |   |   |   |   |     |     |     |   |       |   |  |
| ⑥ 研究支援調査               |     |                             |   |   |   |   |   |     |     |     |   |       |   |  |
|                        |     |                             |   |   |   |   |   |     |     |     |   |       |   |  |

### 1.3 研究体制

### (1) 研究組織および管理体制

体制図を図 1. 3 - 1 に示す。

## (2) 研究者氏名

### a. 財団法人 地球環境産業技術研究機構

| 分室    | 氏 名            | 役 職 | 研究員種別 | 備 考          |
|-------|----------------|-----|-------|--------------|
| コ-ト'  |                |     |       |              |
| 5 0 1 | 川本 輝明          |     | 主任研究員 | (H10. 7. 1～) |
| 5 0 1 | 福永 栄           | 分室長 | 主任研究員 | 技術委員         |
| 5 0 1 | 小林 武男          |     | 主任研究員 |              |
| 5 0 1 | 大月 利           |     | 主任研究員 |              |
| 5 0 1 | 永井 清           |     | 研 究 員 |              |
| 5 0 1 | 内山 茂           |     | 研 究 員 |              |
| 5 0 1 | 市川 富夫          |     | 研 究 員 |              |
| 5 0 1 | 加谷 圭子          |     | 研 究 員 |              |
| 5 0 1 | 大隅 理恵          |     | 研 究 員 |              |
| 5 0 2 | 中山 克彦          | 分室長 | 主任研究員 | 技術委員         |
| 5 0 2 | A. ROBERTIELLO |     | 主任研究員 |              |
| 5 0 2 | E. D' ADDARIO  |     | 主任研究員 |              |
| 5 0 2 | C. TOSI        |     | 研 究 員 |              |
| 5 0 2 | P. PEDRONI     |     | 研 究 員 |              |
| 5 0 2 | G. DELLA PENNA |     | 研 究 員 |              |
| 5 0 2 | M. VALDISERRI  |     | 研 究 員 |              |
| 5 0 2 | G. SCOLLA      |     | 研 究 員 |              |
| 5 0 2 | L. RITORTO     |     | 研 究 員 |              |
| 5 0 2 | E. FRANCHI     |     | 研 究 員 |              |
| 5 0 2 | F. RODRIGUEZ   |     | 研 究 員 |              |
| 5 0 2 | F. SQUADRINI   |     | 研 究 員 |              |
| 5 0 2 | G. PULVIRENTI  |     | 研 究 員 |              |
| 5 0 2 | S. SERENELLINI |     | 研 究 員 |              |
| 5 0 2 | S. DELI        |     | 研 究 員 |              |

|               |                 |     |         |                                        |
|---------------|-----------------|-----|---------|----------------------------------------|
| 5 0 2         | A. BERNARDI     |     | 研 究 員   |                                        |
| 5 0 2         | V. MANCINI      |     | 研 究 員   |                                        |
| 5 0 3         | 後藤 雅史           | 分室長 | 主任研究員   | 技術委員                                   |
| 5 0 3         | 北島 洋二           |     | 研 究 員   |                                        |
| 5 0 3         | 坂本 育子           |     | 研 究 員   |                                        |
| 5 0 3         | 畑野 玉衣           |     | 研 究 員   |                                        |
| 5 0 4         | 鳥山 明夫           |     | 主任研究員   | 分室長、技術委員<br>(H10. 4. 1～H10. 5. 31)     |
| 5 0 4         | 白川 昇            | 分室長 | 主任研究員   | 技術委員 (H10. 6. 1～)                      |
| 5 0 4         | 南 政慶            |     | 主任研究員   |                                        |
| 5 0 4         | 木村 正昭           |     | 研 究 員   |                                        |
| 5 0 4         | 西代 孝志           |     | 研 究 員   |                                        |
| 5 0 4         | 栗秋 創            |     | 研 究 員   |                                        |
| 5 0 4         | 佐野 和恵           |     | 研 究 員   |                                        |
| 5 0 5         | 植村 家顯           |     | 主任研究員   |                                        |
| 5 0 5         | 服部 達雄           |     | 主任研究員   | 技術委員                                   |
| 5 0 5         | 柴田 邦彦           | 分室長 | 主任研究員   |                                        |
| 5 0 5         | 高崎 幸一           |     | 主任研究員   |                                        |
| 5 0 5         | 青山 勝博           |     | 主任研究員   |                                        |
| 5 0 6         | 虎口 信            | 分室長 | 主任研究員   |                                        |
| 5 0 6         | 西方 聡            |     | 主任研究員   | 技術委員長                                  |
| 5 0 6         | 清水 康次           |     | 主任研究員   |                                        |
| 5 0 6         | 中田 栄寿           |     | 研 究 員   |                                        |
| 5 0 7 (5 0 4) | 若山 樹            |     | 研 究 員   |                                        |
| 5 0 7 (5 0 5) | 小池 洋潤           |     | 研 究 員   |                                        |
| 5 0 7 (5 0 6) | L. G. VASILYEVA |     | 研 究 員   | (H10. 4. 1～H10. 7. 31)                 |
| 5 0 7         | E. A. KHATIPOV  |     | 研 究 員   | NEDO産業技術研究員<br>(H10. 4. 1～H10. 11. 30) |
| 5 0 8         | 大塚 誠治           |     | 技 術 部 長 |                                        |
| 5 0 8         | 鬼山 和彦           |     | 技術部次長   |                                        |

5 0 8

張 珠恵

研 究 員

b. ロンドン大学

氏 名

研究員種別

M. J. BAZIN

Professor

D. O. HALL

Professor

K. K. RAO

Professor

V. BORODIN

研 究 員

A. TSYGANKOV

研 究 員

A. FEDOROV

研 究 員

c. 東京農工大学

氏 名

研究員種別

松 永 是

教 授

竹 山 春子

助 手

山 田 晃世

研 究 員

羽 田 野智之

研 究 員

d. ハワイ大学

氏 名

研究員種別

O. ZABORSKY

Professor

J. RADWAY

研 究 員

B. YOZA

研 究 員

Y. WACHI

研 究 員

e. 茨城大学

氏 名

研究員種別

高 村 義親

教 授

西 原 宏史

助 教 授

(3) 経理担当者

財団法人 地球環境産業技術研究機構

地球環境産業技術研究所

CO<sub>2</sub>固定化等プロジェクト室

管理部次長（経理担当） 飯山 好敏

(4) 他からの指導・協力者名および指導・協力事項

a. 指導協力者名

工業技術院 生命工学工業技術研究所

生体分子工学部 部長 国分 友邦

生体分子工学部 エネルギー変換研究室 室長 浅田 泰男

生体分子工学部 エネルギー変換研究室 主任研究官 三宅 淳

生体分子工学部 エネルギー変換研究室 研究員 三宅 正人

b. 指導・協力事項

①共同研究

②研究場所提供

③研究設備使用便宜供与

(5) 評価委員会

本研究開発の当該年度の成果及び次年度の計画に対する評価、指導をいただくため、下記の学識経験者に評価委員会委員を委嘱した。

評価委員長 大阪大学 大学院薬学研究科

教授 宮本 和久 氏

評価委員 東京大学 大学院農学生命科学研究科

教授 五十嵐 泰夫 氏

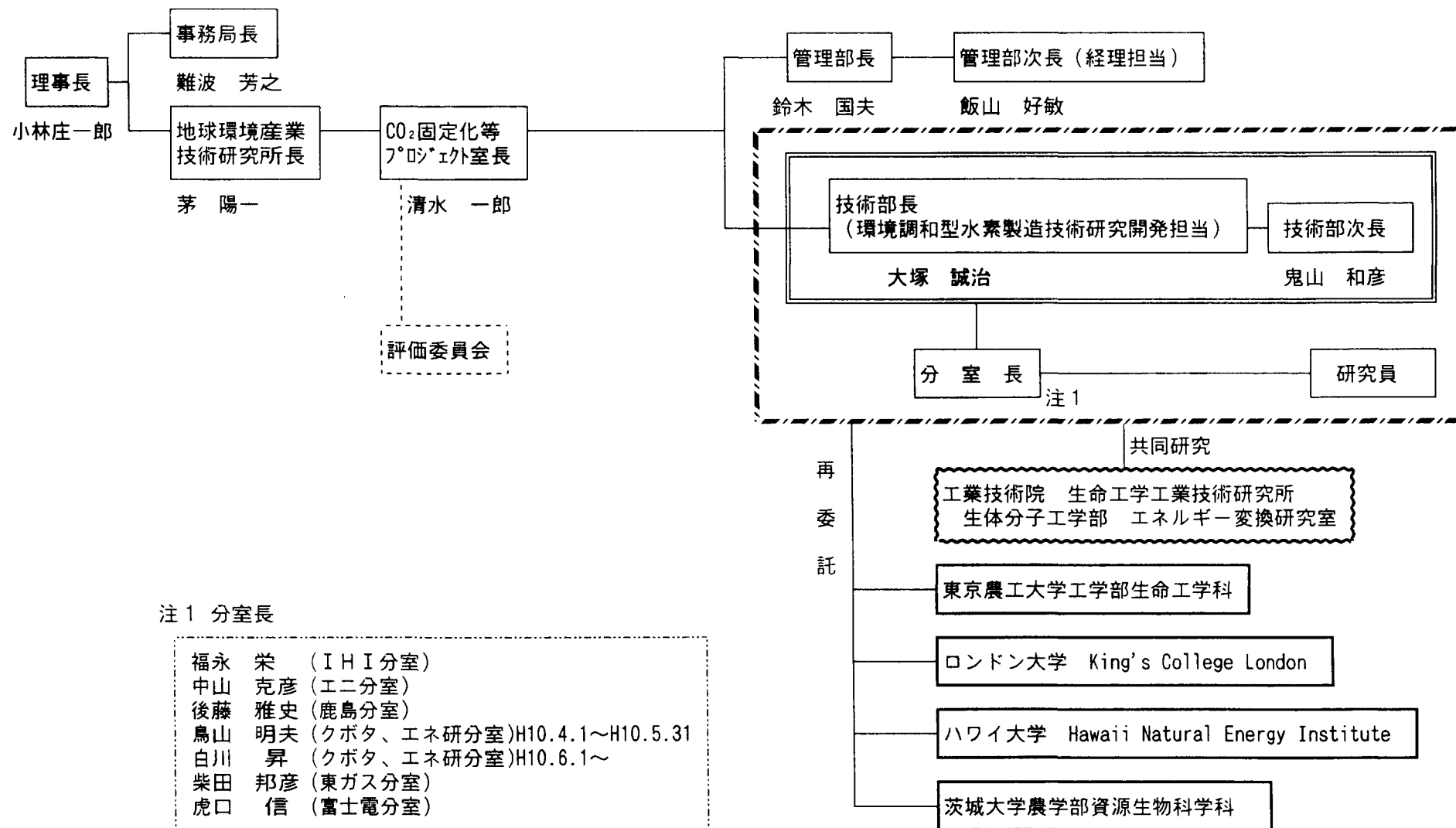
評価委員 東京都立大学

名誉教授 北村 博 氏

評価委員 熊本工業大学 応用微生物工学科

教授 小川 隆平 氏

本年度の第1回評価委員会は平成10年6月16日、第2回評価委員会は平成11年2月23日、プロジェクト室会議室において開催した。



注1 分室長

|       |                             |
|-------|-----------------------------|
| 福永 栄  | （IHI分室）                     |
| 中山 克彦 | （エニ分室）                      |
| 後藤 雅史 | （鹿島分室）                      |
| 鳥山 明夫 | （クボタ、エネ研分室）H10.4.1～H10.5.31 |
| 白川 昇  | （クボタ、エネ研分室）H10.6.1～         |
| 柴田 邦彦 | （東ガス分室）                     |
| 虎口 信  | （富士電分室）                     |

図1. 3-1 研究組織及び管理体制

## 1. 4 研究成果の概要

### (1) 光合成微生物等の探索・育種改良の研究開発

#### a. 水素発生能力の測定

単色光下の光合成細菌の水素発生速度を、菌体の集光色素蛋白質（LH1またはLH2）量、菌体濃度及び光エネルギー強度を変数として表す式を作成し、この式を用いてLH1、LH2量と単色光下の水素発生速度の関係を検討した。この結果、LH1またはLH2が野生株の50、10、1%に減少すると、単色光下（70W/m<sup>2</sup>）の水素発生速度はそれぞれ1.3、1.6、1.8倍に増加することが分かった（ただしLH1やLH2量の減少が、菌体の生育に影響を及ぼさないと仮定している）。

光合成細菌の光水素発生は、南中時近傍の太陽光強度下（1.0kW/m<sup>2</sup>）で飽和するため、この過剰な太陽光を有効に利用する技術の開発について検討を行った。リアクタ受光面に遮光体を設け、過剰な太陽光を空間的に分散・減光させることを試みた。屋内外実験ともに1cm程度の細い遮光体を設ける事で、遮光体を設けないコントロールと比較して単位照射面積当たりの水素発生量が約1.4倍に増加した。また、遮光体を太陽電池などのエネルギー変換体で作成した場合について試算を行った。一般的に入手できる9%の変換効率を持つ太陽電池を併設した場合、単位設置面積当たりの変換効率は約3倍に増加した。

#### b. 光合成色素の遺伝的改変

集光色素蛋白質であるLH1をコードする遺伝子群 *puf* オペロンに着目し、この遺伝子群の発現を制御する *puf* プロモータの発現のコントロールを検討した。これまでに、*puf* プロモータを用いたプロモータ競合法を考案し、この手法で取得した育種改良株は、LH1の合成が短期間だけ抑制されていることが確認された。そこでLH1合成を長期間抑制するため、培養条件の最適化を試みた。この結果、菌体濃度を対数増殖の初期の値で一定に保つ連続培養が有効であることが分かった。

#### c. 異種ヒドロゲナーゼ遺伝子の藍藻への導入

嫌気性細菌 *Clostridium pasteurianum* 由来のヒドロゲナーゼを導入した藍藻について、このヒドロゲナーゼの発現を最適化するため、宿主藍藻内におけるヒドロゲナ

生コミの酸産生により製造した乳酸を主成分とした基質で、連続培養を行った結果、PHBマインナ株でガス量若干の増加、HUPマインナ株、二重変異株の双方で増加がみられ、

白質が発現することは確認できたが、その発現量は少なかった。これまで、インターホゾン突然変異により、PHBを合成できない株（PHBマインナ、SMV071）、取り込みヒドロゲナーゼを合成できない株（HUPマインナ、SMV089）及びこれら両方の特性を併せ持つ二重変異株（PHBマインナ+HUPマインナ、SMV087）を構築し、育種を行ってきた。今回それらの水素生産能を実験室規模で、野生株を対比として測定を行った。

e. 水素発酵の遺伝子特性と遺伝子組み換えによる光合成細菌の育種改良  
ATPを經由しないより効率の高い水素生産をめざして、異種生物のヒドロゲナーゼを *R. sphaeroides* RV株に導入することを検討した。この異種遺伝子発現に用いるベクターを構築し、プロモータを単離し、プラスミドベクターpSM813を構築した。RV株を形質転換後、培養を行った。抗原抗体反応（ウエスタンブロット法）等により、蛋白質が発現することは確認できたが、その発現量は少なかった。

光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum* RV株は培養液中のpHが高いと水素よりPHBを優先的に生産した。今年度はその仕組みについて酵素レベルの検討を行った。PHB合成経路と基質において競争的關係にあるクエン酸合成酵素の活性はNADHによって阻害された。培地中のpHをアルカリ側にシフトさせるとRV株細胞内のNADH濃度は上昇することが明らかとなった。従って、pHの上昇に伴ったPHB合成の促進は、クエン酸合成酵素活性の低下によって引き起こされた可能性が示唆された。

#### d. PHB代謝に関する研究

一ゼの発現の様子を観察した。その結果、導入したヒドロゲナーゼ蛋白質は連続して合成されていることが確認された。また、同形質転換株を嫌気暗条件下に置くことにより、ヒドロゲナーゼ活性が誘導されることが既に明らかとなっていたが、この現象は宿主藍藻の有するヒドロゲナーゼにも観察され、双方の活性が誘導されるパターンがほぼ一致したことから、導入したヒドロゲナーゼの活性化には藍藻の機能が利用されている可能性が高いことが推定された。以前に検討した嫌気明培養と、今回の嫌気処理での誘導をあわせると、通常の培養条件に対しヒドロゲナーゼ活性を50倍程度高めることに成功した。

れた。ただ、培地の種類、培養方法（バッチ、連続）により挙動が変わることが観察され、テストの再現性を含めて、さらに検討が必要である。

また、ニトロゲナーゼ複合体活性化に関与する制御遺伝子の過剰発現に取り組んでおり、今回その制御遺伝子二種の分離及びヌクレオチド配列の決定等を行った。

## (2) 大量培養技術の研究開発

### a. 糖廃液を用いる光合成細菌の大量培養

糖を主成分とする廃液を原料とし、低コスト、環境調和型を目指した嫌気性前処理工程－光合成工程で水素製造を目指すシステムにおいて、光合成工程の検討を行った。検討の主眼は次の二点である。

- ・対象廃液を嫌気性前処理したとき生成する有機酸含有廃液に適合し、本システムの光合成工程で使用する光合成細菌として選定された *Rhodopseudomonas palustris* R-1株の特性を明確に記述できた。
- ・陸上敷地をほとんど使用せずに光合成細菌による水素製造を行える浮体式光合成リアクタの性能を、スケールアップした形で実証した。

R-1株は、酢酸からの水素発生能力に優れ、鉄塩、モリブデン塩濃度が低い条件や弱光下でも比較的高い水素発生能力を保持する実用性の高い株であることが確認された。更に、有機酸の利用されやすさの順序はプロピオン酸、酢酸、酪酸、蟻酸の順であることが分かった。

浮体式光合成リアクタは、受光面積 $8\text{m}^2$ 、容積400Lまでスケールアップし、海上で試験したが、最大で $0.033\text{L}/(\text{L}\cdot\text{hr})$ 、即ち $1.7\text{L}/(\text{m}^2\cdot\text{hr})$ のガス発生（水素含有率70%として変換効率0.85%）を確認できた。攪拌による冷却効果の確認など多くのエンジニアリングデータが得られた。以上より、内湾などに立地した清涼飲料水工場などからの糖を主成分とする廃液から、陸上敷地を余り使わずに海面を有効利用して、生物学的に水素を製造できる可能性が実験的に示された。

### b. セルロース等を含有した廃水を用いる嫌気性細菌及び光合成細菌の大量培養

光エネルギーと光反応工学の素反応の解析を継続し、暗条件で支配的になると考えられる水素（水素ポテンシャル）消費反応は、エネルギー消費型で光エネルギーを必要とする菌体合成反応と、エネルギー獲得型で光エネルギーを必要としない有機酸生

成反応であることがより明確になった。さらに、菌体合成反応は、ここで想定している系では窒素律速であり、基質および光エネルギー存在下で、窒素源が消費されるまで優先的に進行すること等も明らかになった。

基質成分の物質収支を詳細に検討し、体積当たりの光エネルギーに対する、菌体、有機酸等の副生成物ならびに水素への分配依存性を明らかにした。これにより、光リアクタにおいて実際に水素が生成するためには、光合成による真の水素生産量が水素消費量を超過していること、すなわち、光補償点以上の光エネルギーを必要とすることが明らかとなり、屋内実験データに基づいて、屋外の実プロセスにおける水素生成量を予測することが可能となった。

体積ベースの光エネルギーを指標としたLewis式を用いてデータを解析したところ、人工廃水実験データは光条件によらず同一モデルによって表現することが可能であった。また、着色成分の多い実廃水による実験データを同様にLewis式で表現すれば、各パラメータの変化を、主要基質の化学的特性（Gibbsの自由エネルギー）や着色による光透過条件の違いによる結果として十分に説明できることが示された。

実プロセス構築に向けた一次考察として、これまでの成果に基づき、実有機性廃水を原料とする、(1)高温嫌気性前処理、(2)光リアクタ、(3)後処理からなる実規模（水素日生産量1,000m<sup>3</sup>）の「バイオ水素生産プロセス」を想定し、その物質フローを詳細に検討した。

#### c. 下水汚泥を用いる光合成細菌の大量培養

実廃水（下水汚泥の熱処理廃液）を用いた培養において、活性炭による前処理の効果を検討した。その結果、ロットによってバラツキのあった水素生産量が安定し、生産量が向上した。これは活性炭に有機態窒素成分が吸着されることにより、増殖で消費されていた有機酸が、水素生産基質として利用される効率が高まったためと考えられる。しかし必ずしも活性炭処理は必須の前処理条件ではなく、熱処理廃液は活性炭処理したものとしていないもので、水素生産量の差がほとんど見られない場合が多い。従って、システムに組み込む場合はオプションとして取り扱った。

昨年度製作した内部照射式リアクタ（モジュールリアクタ）を用い、実廃水を用いた水素生産培養を行った。培養体積は7Lで太陽光を利用した。この結果、最大光変換効率0.54%を得ることができたが、目標値である1.0%に到達できなかった。これは

採光装置が直達日射光しか利用できず、曇天時などの光が全く得られない時間が生じやすいことが原因と考えられる。しかし0.54%は、屋外での平板式リアクタを用いた結果より高い値である。これは熱処理廃液が褐色を帯びており、光透過性が低いため、平板式と比較して光路長の短い内部照射式リアクタの方が、良い結果を得ることができたと思われる。このように色を帯びた廃水には、光環境が発光体の配置で決定できる特徴を持つ、内部照射式リアクタが適していることが確認された。

#### d. 生ゴミを用いる光合成細菌の大量培養

これまで、生ゴミの酸産生発酵による基質の滅菌手段としては、蒸気による加熱法あるいは、フィルタによるろ過法を用いてきたが、よりコストを含んだ実用的な見地より、培地に薬品直接添加による滅菌（水素産生光合成細菌以外の雑菌の滅菌）につき検討し、ホップβ酸等が有効であることが判明した。

屋外モジュールについては、今年度は、9回の連続運転を実施した。その中で、基質の補充方法や装置の運転ノウハウが得られた。

また、探索育種の研究の中で得られたHUPマイナス変異株を用いて、運転を行った。その結果、30日以上安定した運転が達成され、野生株に対して乾燥菌体当たり水素は70%の増加、光変換効率も1.25%が達成された。

#### (4) 副産物回収技術の調査研究

実廃水（下水汚泥の熱処理廃液）を用いた水素生産培養システムの余剰菌体より回収可能な副産物について、国内年間下水汚泥発生率を基準に生産可能量をシミュレーションした結果、ビタミンB<sub>12</sub>は3.4(t/y)、ビオチンは1.1(t/y)、クロロフィルは86,000(t/y)、カロチノイドは15,000(t/y)、PHBは3,800(t/y)となった。

#### (5) 総合システムの開発

前処理技術、大量培養技術等の研究成果をベースに光合成による水素発生を核とするバイオ水素製造プロセスを構築し、フィージビリティスタディの原資料とした。

構築したトータルシステムについて、各要素工程毎に構成する反応槽・機器類を積算し水素製造コスト及び累積CO<sub>2</sub>排出量(LCCO<sub>2</sub>)の推算を行った。LCCO<sub>2</sub>からみた環境調和性においては、炭化水素の水蒸気改質に比べて優れていることが分かった。

#### (6) 研究支援調査

前年度に引き続き、研究支援調査を行った。再委託により、次の4テーマについて調査研究を行った。

「光合成微生物による水素発生の分子機構及び光利用技術に関する基礎的検討」

「遺伝子組換え光合成微生物による水素発生リアクターの基礎的検討」

「水素生産能を有する海洋性光合成微生物の探索およびスクリーニング」

「特殊環境下で生育する光合成細菌の探索とその水素生産への利用」

## 第2章 光合成微生物の探索・育種改良の研究開発

### 2.1 様々な受光法を用いた光水素発生の検討

#### 2.1.1 概要

光合成細菌を用いた光水素発生は、実用上、屋外において太陽光を利用できることが最大のメリットである。しかし、南中時近傍における太陽光強度において、光水素発生は飽和し、光エネルギー変換効率が著しく低下する。よって、水素発生量や変換効率を低下させずに、過剰な太陽光を有効に利用するための技術の開発が必要である。そこで我々は、様々な受光法について検討を行っている（図2.1-1）。

本研究では、遮光体をリアクタ前面に設置し、過剰な太陽光を空間的に分散・減光させる事を試みた。先ず屋内において、太陽光を模擬した条件のもと、遮光体を用いた光水素発生実験を試みた。コントロールに比べ受光面積当たりの水素発生量が増加した。また、屋外においても遮光体を用いることで水素発生量が増加し、変換効率が向上した。さらに遮光体を太陽電池などのエネルギー変換体で作成した場合の試算を行った。

#### 2.1.2 背景

光合成細菌は、太陽光をエネルギー源として、適当な電子供与体を基質に水素を発生する事ができる。そのため、屋内において数々の研究例が報告されている。しかし、屋内実験に比べ、太陽光を用いた報告例は非常に少ない。且つ、エンジニアリング的観点から光水素発生に太陽光を利用した検討例は少ない。

太陽光利用の問題点の一つは、エネルギー供給の間欠性にある。1日の太陽光強度は、昼夜の明暗周期や気候や季節に左右され、時事刻々と変化する。そこで、屋内に於いて簡易に太陽光をシミュレートする条件について検討を行った。もう一つの問題点は、南中時の太陽光強度である。1日の太陽光強度は、南中時のおよそ $1.0\text{kW/m}^2$ を最大値としたガウス分布様の変化をする（図2.1-1）。しかし、屋内外の実験結果から南中時の太陽光強度 $1.0\text{kW/m}^2$ は、光合成細菌の光水素発生には過剰であることを明らかにしている。よって、高光強度下では、光から水素への変換効率が著しく低下する。

そこで、我々は、水素発生量を減少させずに、変換効率を向上させる事を検討してきた（図2.1-1）。本研究では、屋内外のリアクタ受光面に遮光体を設け、過剰な太陽光を空間的に光を分散・減光させる方法について報告する。また、遮光体は、太陽電池などのエネルギー変換体で作成できることから、総合的に光エネルギー変換効率を向上させることが可能である。

## 2. 1. 3 屋内における遮光体の検討

### (1) 緒言

太陽光下における遮光体の効果を検討する前に、屋内において、遮光体の有効性、設置方法などを検討する必要がある。そこで、先に得られた太陽光模擬条件下、強光下での遮光体設置に関する基礎的検討を行った。遮光体設置の評価は、遮光体を受光面上に設置することから、単位体積当たりではなく単位受光面積当たりで行った。必要に応じて設置面積当たりについても比較した。水素発生量を低下させることなく、過剰な光が有効利用できれば、遮光体を用いて太陽光を空間的に分散・減光させることが可能となり、変換効率の向上が期待される。

### (2) 実験操作

#### a. 供試菌体

実験には、安定して高い水素発生能力を示す光合成細菌  
*Rhodobacter sphaeroides* RV株を供試した。以下RV株と略す（図2.1-2）。

#### b. 光源、照射方法

光源には、RITE水素製造PJ.の標準球に指定されている近藤-シルバニア社製のM-26ハロゲン球を用いた（図2.1-2）。M-26を、個数や照射距離を調整することにより実験に必要な照射エネルギー量を得た。M-26は、点灯時間に伴って照射可能な光量が減少するので、一定時間使用後、新しいものと交換した。

照射エネルギーの測定には、SJI社製のRADIOMETER model 4090を用いた（図2.1-2）。照射エネルギーの測定は、使用リアクタ表面上の5点の平均値とした。照射エネルギーの測定は、実際の太陽光の利用を考え恒温水槽の表面で行った（リアクタに届く実際の光量は、4cm水層を透過するので約半分に減衰する）。また、リア

クタ内の光分布は、実際の実験装置を模した測定専用の装置を作成し、LI-COR社製のLI-250を用いて測定した（図2.1-2）。

光照射方法は、晴天時の一日の太陽光の光強度変化を基準に、過剰な太陽光強度を想定し、1日の照射強度を $1.0\text{kW/m}^2$ 、12時間の明暗周期に設定した。また、光強度の実験では、 $0.3\sim 1.6\text{kW/m}^2$ の間で調整した。

#### c. 実験装置

リアクタには、受光面積が $70\text{cm}^2$ 、内容積が $200\text{cm}^3$ 、光路長が $2.5\text{cm}$ のルーフラスコを用いた（図2.1-3a、b）。ルーフラスコは、外部からの光の影響を防ぐ為に、受光面以外の部分を黒色のシートで覆った。リアクタ受光面積を、各々 $0.5$ から $6.0\text{cm}$ の間隔で、縦もしくは横のストライプ状に遮光した（アルミテープを使用）。遮光体の面積は、受光面積の $1/2$ に設定した。ルーフラスコは、 $30^\circ\text{C}$ に恒温した水槽中に浸漬した。実験装置は、外部からの光の影響を防ぐ為に、全体を黒色ボードで覆った。発生した水素は、メスシリンダ中に捕集し、メスシリンダの目盛りを読むことで発生量を測定した。

30分間毎にサンプリングを行い、水素発生量（ $\text{l/m}^2$ ）、発生速度（ $\text{l/m}^2/\text{h}$ ）、光学濁度（ $\text{O.D.}=660\text{nm}$ ）、培地中の各有機酸濃度を測定した（図2.1-2）。

発生した水素量が持つエネルギー量を投入した光エネルギーで除し、光エネルギー変換効率とした（図2.1-2）。

#### d. 培養条件

RV株は、aSy培地を満たした $15\text{ml}$ 容量の試験管を用いて接種サイズ $15:1$ で継代培養した。必要に応じて、イーストエキストラクト濃度を $0.2\text{w/v}\%$ に増加させたaSy培地で培養することで、菌体活性及び水素発生活性の回復を図った。また、一定期間後には、aSy 平板培地上で高活性株（コロニの大小や色調で経験的に判断）を単離した。

RV株は、炭素源にコハク酸ナトリウムの窒素源に硫酸アンモニウムを含むaSy培地を用いて前培養を行い、炭素源に乳酸ナトリウム、窒素源にグルタミン酸ナトリウムを含む水素発生用gL培地を用いて本培養を2回行った（図2.1-2）。本培養後の菌体を再度、水素発生用gL培地に植菌し、明条件下で12時間培養後、一定以上の水素発生速度が持続して得られた菌体懸濁液を各水素発生実験に供した。

### (3) 結果及び考察

#### a. 異なる受光／遮光面積比における光水素発生

光合成細菌の水素代謝では、暗条件下においてuptake ヒドロゲナーゼによる水素の吸収反応が知られている。よって、遮光体を用いる際、受光部分と遮光部分の比によって水素の発生挙動が異なる可能性が生じる。そこで、遮光部分の面積比を決定するために、異なる受光／遮光面積比のリアクタを用いて光水素発生実験を試みた（図2.1-4）。単位面積当たり水素発生量は、リアクタの受光／遮光面積比に無関係で、一定であった。当初想定していた水素吸収反応は観察されなかった。よって、実験には面積比1：1を選択した。

#### b. 横縞の遮光体を用いた光水素発生

1：1の受光／遮光面積比において、異なる幅の横縞遮光体を受光面に設置して実験を行った。総水素発生量は、遮光幅が狭くなると増大した（図2.1-5）。1.0cmの遮光幅に於いて最大約水素発生量は約70l/m<sup>2</sup>を示した。1.0cmの系では遮光しない系に対して、水素発生量が1.4倍に増大した。受光幅が広くなるに従い、水素発生量は、遮光しない系と同程度にまで減少した。同じ受光面積でも受光幅により水素発生量に差が生じることが確認できた。

#### c. 縦縞の遮光体を用いた光水素発生

横縞の遮光体では、遮光体の設置の方法により対流が生じるなどの影響が考えられた。そこで、対流の影響を受けない縦縞の遮光体についても遮光幅を変化させて実験を行った。縦縞の遮光体に於いても、横縞同様に遮光幅が狭い0.5cmに於いて、最大水素発生量を示した（図2.1-5）。

#### d. 様々な光強度下における遮光体の効果

遮光体を設置しない系に比べ、水素発生量の差が最も大きかった1cmの系で光強度に対する影響を検討した。遮光体無しでは、0.6kW/m<sup>2</sup>以下の弱光下では遮光体有りに比べ、より多くの水素を発生をした（図2.1-6）。しかし、南中時の太陽光強度と同じ、約1.0kW/m<sup>2</sup>以上の光強度において、水素発生量が著しく減少した。水素発生量が減少したのは、強光阻害に依るものと思われた。一方、遮光体を設置した系は、1.6k

$\text{W/m}^2$ 以上の高光強度下においても、光水素発生に関しては飽和・阻害は見られなかった。

#### e. 遮光体を用いたリアクタ内の光強度分布

横縦縞の遮光体共に遮光幅が狭いところで最大水素発生量を示したことから、遮光体による光の回折による光分布の影響が考えられた。そこで、実際のリアクタを模した実験装置を作成し光分布を測定した。遮光体の設置により照射光は減光され遮光体に沿った分布をしていることが測定された。しかし、水素発生量が変化する原因になると思われる様な光分布は、測定されなかった（図2.1-7）。

### 2. 1. 4 屋外における遮光体利用の効果

#### (1) 緒言

2. 1. 3において、リアクタ受光面に遮光体を設けることで、南中時の太陽高強度に相当する高光強度下においても、光合成細菌の水素発生量が飽和しないことを明らかにした（図2.1-6）。そこで、屋外においても、リアクタに遮光体を設置し、実験を試みた。リアクタ受光面を半分覆っても水素発生量が低下しなければ、遮光体を太陽電池や熱媒体等のエネルギー変換体で置き換えることで更なる効率の向上が期待される。

#### (2) 実験操作

##### a. 供試菌株

2. 1. 3.(2).aと同様の菌株を供試した。

##### b. 光源、照射方法

茨城県つくば市（工技院・生命研屋上）において、太陽光を利用した屋外水素発生実験を行った。気象観測装置を屋上に設置し、エネルギー量( $\text{kW/m}^2$ )、光量子数( $\mu\text{E/s/m}^2$ )、照度( $\text{lux}$ )、外気温( $^{\circ}\text{C}$ )、リアクタ内の温度( $^{\circ}\text{C}$ )などを15分毎に自動計測し、コンピュータで解析した（図2.1-8）。エネルギー計は、水平面とリアクタの設置角に合わせて30度に傾けたもの2台を設置した。

##### c. 実験装置

屋外実験は、1996から1998年の夏期に行った。リアクタは、受光面積が $159\text{cm}^2$ 、内

容積が $700\text{cm}^3$ 、光路長が $4.5\text{cm}$ のルーフラスコ（イーグル社製）と、受光面積が $225\text{cm}^2$ 、内容積が $1,000\text{cm}^3$ 、光路長が $5.0\text{cm}$ の亚克力製のリアクタを使用した（図2.1-3c）。ルーフラスコ、リアクタの受光面は長辺を $12,15\text{cm}$ とし、各々 $1.0$ 、 $1.5$ 、 $3.0$ 、 $6.0\text{cm}$ の間隔で、ストライプ状に遮光した（図2.1-3c）。ただし、リアクタ上の遮光体の面積は、受光面積の、 $1/2$ に設定した。リアクタは、設置場所、太陽光高度等を考慮して恒温槽全体を $30$ 度に傾けた。恒温槽は、 $30^\circ\text{C}$ に恒温した亚克力製水槽が用いられた。恒温槽は南に正対するように固定した。

#### d. 培養条件

2. 1. 3.(2).dと同様のプロトコルに従い培養を行った。

### (3) 結果及び考察

#### a. 屋外実験結果

97/8/26/～8/29、異なる遮光体幅による影響について検討した。1日毎の照射エネルギー量は、 $3.2$ 、 $6.0$ 、 $4.8\text{kW}\cdot\text{h}/\text{m}^2$ であった。太陽光を利用した実験においても、受光幅 $1.5\text{cm}$ の系に於いて最大水素発生量を示し、72時間後には約 $601/\text{m}^2$ となった（図2.1-10）。この $1.5\text{cm}$ の系はコントロールに対して水素発生量が $1.2$ 倍に増大した。受光幅の増加に伴い、水素発生量は遮光しない系と同程度にまで減少した。

98/8/18～21、リアクタの設置方法の異なる実験を行った。新たに縦型の平板型リアクタを設置して遮光体の有無について検討を行った。リアクタ容量が、 $1,000\text{cm}^3$ の亚克力リアクタを新たに作成し実験に用いた（図2.1-9）。1日毎の照射エネルギー量は、 $2.0$ 、 $1.3$ 、 $3.5$ 、 $4.5\text{kW}\cdot\text{h}/\text{m}^2$ であった。本実験に関しては設置面積当たりの評価を行った（図2.1-11）。設置面積当たり（リアクタ体積当たりにも相当）の総水素発生量では、遮光体を設けた系はコントロールを下回った。しかし、受光面積が $1/2$ に減少しているにもかかわらず、 $20\%$ の減少で約 $701/\text{m}^2$ に留まった。一日の受光エネルギーが年平均に比べて低いにも関わらず、良好な結果を示した。照射面積当たりの評価では、遮光体を設けた系は、約 $1401/\text{m}^2$ となり、コントロールに比べ $1.5$ 倍となった（データ未載）。縦型リアクタにおいても遮光体の効果が確認された（データ未載）。

## b. 遮光体を太陽電池で作成した場合の試算

細い幅の遮光体を用いることで水素発生量・変換効率が向上したことから、リアクタへの遮光体の設置は、南中時の過剰な太陽光を空間的に分散・減光することに有効であることが確認された。また、遮光体は太陽電池や熱媒体などのエネルギー変換体で作成が可能なことから、遮光体に太陽電池を用いた際の試算を試みた。

太陽電池の起電力は照射エネルギーとシステム効率の積で算出される。システム効率は太陽電池の効率、インバータ効率、熱損失、その他の損失の積で表される。一般的に流通している太陽電池効率は、単結晶16~20%、多結晶13~17%、アモルファス8~13%である。また、各損失等は文献等から10%とした。本試算ではこれらの値から太陽電池の効率を9%とした。太陽電池で作成した遮光体を用いることで約3倍の変換効率が得られた(図2.1-11)。さらに、得られた変換効率を水素発生量に換算して、屋外実験の結果に表した(図2.1-12)。コントロールに比較しても2.2倍の水素が発生する結果となった。

## 2. 1. 5 総括

屋内実験において、1cmの細い遮光体を用いることで、変換効率は、遮光しない系の1.4倍に増大した。また、遮光体を設けることで南中時の太陽高強度に相当する高光強度下においても光飽和や光障害が生じないことが明らかになった。

屋外実験においても、1.5cm付近の細い遮光体を用いることで、変換効率は、コントロールと比較して約1.4倍に増加した。遮光体を設けることで $0.6\text{kW/m}^2$ を超える強光下において水素発生速度が最大値を示した。日中の強光下においても、遮光体を用いることで光合成細菌による光水素発生時の光飽和を回避することが可能であった。

遮光体部分に太陽電池効率9%の太陽電池を併用して、屋外水素発生実験を行うと、光合成細菌と太陽電池の総光変換効率は平均5.5%と大幅に増加し、リアクタの光飽和を回避するのみならず直接的なエネルギー生産が可能であった。

以上のことから、太陽光を用いた光水素発生を行う際、リアクタ受光面に遮光体を併用することは、光水素発生時の光飽和を回避する有効な手法であることが確認された。また、遮光体をエネルギー変換体で作成することにより、太陽光の利用効率を向上させることが可能であることが示唆された。



図2. 1-2 培養プロトコル

## 2. 2 光水素発生における波長依存性の検討

### 2. 2. 1 概要

単色光下の光合成細菌の水素発生速度を、菌体の集光色素タンパク質（LH1またはLH2）量、菌体濃度、および光エネルギー強度を変数として表す式を作成し、この式を用いてLH1、LH2量と単色光下の水素発生速度の関係を検討した。この結果、LH1またはLH2が野生株の50、10、1%に減少すると、単色光下（70W/m<sup>2</sup>）の水素発生速度はそれぞれ1.3、1.6、1.8倍に増加することが分かった（ただしLH1やLH2量の減少が、菌体の生育に影響を及ぼさないと仮定している）。

### 2. 2. 2 緒言

光合成細菌の水素発生速度向上を目的として、菌体のLH1含有量を減らす育種改良を行っている。これまでに紫外線照射法で取得したP 3株（LH1が野生株の35%に減少した変異株）が、800、850nmの単色光下で野生株以上の水素発生速度を示すことが分かっている<sup>1) 2)</sup>。しかし、水素発生速度の向上が確認された育種改良株は、これまでのところP 3株だけである。したがって、LH1量と水素発生速度の関係は、ほとんど分かっていない。またLH1を人為的に減少させるために考案したプロモータ競合法で、育種改良株を取得する場合、LH1をどの程度に減らせば水素発生速度が向上するかを、あらかじめ明らかにしておく必要がある。

さらに、もう一つの集光色素タンパクであるLH2含有量を減らすことも、LH1同様に水素発生速度の向上に有効と考えられる<sup>1)</sup>。しかしLH2量と水素発生速度の関係は、これまでのところまったく分かっていない。

そこで本年度は、単色光下の光合成細菌の水素発生速度を、菌体の集光色素タンパク質（LH1、LH2）量、菌体濃度、および光エネルギー強度を変数として表す式を作成し、これを用いてLH1、LH2量と単色光下の水素発生速度の関係を検討した。

### 2. 2. 3 単色光下の水素発生速度を表す式の作成

#### (1) 式の作成

昨年度報告したリアクタの水素発生速度を、菌体の吸収スペクトル、菌体濃度、光エネルギー、および光源のスペクトルを変数として表わすモデルの原案<sup>2)</sup>（以下モデル原

案、と記す)を基に、単色光下の水素発生速度を表す式を作成した。以下に具体的な変更点を示す。なお本節で用いている記号、単位、およびリアクタの定義を、図2.2-1にまとめた。

モデル原案では、リアクタに連続光を照射した時の水素発生速度(記号 $He$ )を、(1)式のようにバンドパス光に分割して照射した時の水素発生速度(記号 $He_{(h\nu)}$ )の和として算出した。

$$He = \sum_{400-500}^{900-1000} He_{(h\nu)} \quad (1)$$

しかし今回は、リアクタに照射する光は単色光であり、リアクタの水素発生速度(記号 $He$ )は、単色光下の水素発生速度(記号 $He_{(mono)}$ )と見なせることから、(2)式が成立する。

$$He = He_{(mono)} \quad (2)$$

なお、(mono)を付記した記号は、それぞれ単色光下の値を表わす。

集光色素タンパク質は特定の光を吸収することが分かっており、LH1は875nm、LH2は850nmが吸収極大波長である<sup>3,4)</sup>。したがって、これらの波長の光をリアクタに照射した場合、リアクタ内の光エネルギー強度は、菌体に含まれるLH1やLH2の量に依存して減衰する。そこで(3)式に示すLambert-Beer式を用いて、LH1およびLH2の量を表わすこととした<sup>5)</sup>。

$$\ln \frac{I}{I_0} = \alpha_{(mono)} \times C \times X \quad (3)$$

(3)式中の $\alpha$ が集光色素タンパク質の量を示す変数に相当する。しかしこれまでにLH1の減少が確認された育種改良株はP3株だけであり、任意のLH1量に対応する $\alpha$ を実測することは不可能である。そこで、まず野生株の菌体懸濁液に875nmの単色光を照射した時の光透過率を(3)式に代入し、LH1=100%の菌体の $\alpha$ を算出した。さらにこれを基準として任意のLH1量に対応する $\alpha$ を相対的に求めた。同様に、野生株の菌体懸濁液に850nmの単色光を照射して、LH2=100%の菌体の $\alpha$ を算出し、これを用いて任意のLH2量に対応する $\alpha$ を相対的に求めた。

以上の点についてモデル原案を修正し、(4)式に示す単色光下の水素発生速度を表す式を得た。

$$H e_{(m o n o)} = \frac{S \times V m a x_{(m o n o)}}{\alpha_{(m o n o)} \times C} \ln \frac{K m_{(m o n o)} + \alpha_{(m o n o)} \times C \times I_0}{K m_{(m o n o)} + \alpha_{(m o n o)} \times C \times I_0 \times e^{-(\alpha_{(m o n o)} \times C \times L)}} \quad (4)$$

## (2) $K m$ と $V m a x$ の決定

$K m$ と $V m a x$ は、850または875nmの単色光下の水素発生速度を、各種の光エネルギー強度で実測した値（以下、実測値と記す）を用いて算出した。具体的には、水素発生速度の逆数をY軸に、光エネルギー強度の逆数をX軸にプロットし、得られた直線の傾き（ $K m/V m a x$ に相当）と、Y軸の切片（ $1/V m a x$ に相当）から、それぞれを求めた<sup>1)</sup>。

以下に算出した $K m$ と $V m a x$ を示す。

| 波長 (nm) | $K m$ ( $W/m^2$ ) | $V m a x$ ( $mmol/(m^3 \cdot s)$ ) |
|---------|-------------------|------------------------------------|
| 850     | 37.9              | 0.81                               |
| 875     | 22.9              | 0.66                               |

この $K m$ と $V m a x$ を(4)式に代入し、0～80 $W/m^2$ の光エネルギー強度における $H e_{(m o n o)}$ （850nmおよび875nmについて）を算出した。以後、(4)式を用いて求めた値を計算値と呼ぶ。計算値および実測値を図2. 2-2に示した。

## (3) 集光色素タンパク質量と水素発生速度の関係

(4)式を用いて、LH1、LH2量が減少した場合の水素発生速度をシミュレートした。

図2. 2-3は光エネルギー強度を70 $W/m^2$ とした時の結果である（実測値の光エネルギー強度の最大値が70 $W/m^2$ であることから、この光エネルギー強度を選択した）。LH1量が野生株の50%、10%、1%に減少すると、単色光下（875nm）の水素発生速度がそれぞれ1.3、1.6、1.8倍に増加することが分かった。またLH2が減少した場合も、850nmの水素発生速度が同程度向上することが分かった。

このように、菌体のLH1やLH2量が減少すると、水素発生速度が高くなることが確認された。またLH1やLH2の減少が、菌体の生育に影響を及ぼさないと仮定した場合、水素発生速度を最大で1.8倍向上できることが分かった。しかし現実には、生育への影響が予想されることから、今後、LH1やLH2量をどこまで減少できるか、その下限を明らかにすることが必要と考えられる。

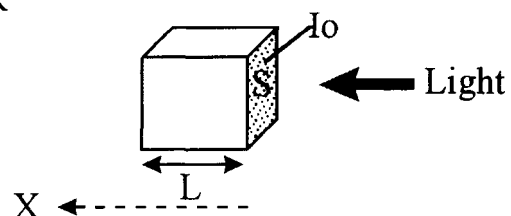
#### 2. 2. 4 まとめ

- ・ LH1、またはLH2が野生株の50、10、1%に減少すると、単色光下（70W/m<sup>2</sup>）の水素発生速度はそれぞれ1.3、1.6、1.8倍に増加することが分かった（ただしLH1やLH2量の減少が、菌体の生育に影響を及ぼさないと仮定した場合）。
- ・ 水素発生速度向上に最適な、LH1、LH2量の決定が今後の課題である。

#### 2. 2. 5 参考文献

- 1) 平成8年度環境調和型水素製造技術研究開発成果報告書（1997）
- 2) 平成9年度環境調和型水素製造技術研究開発成果報告書（1998）
- 3) 北村 博ほか：光合成細菌（1984）、学会出版センター
- 4) C. Hunter et al., Mol. Microbiol., 5, 2649-2661（1991）
- 5) 藤代亮一：バーロー物理化学(下)(1981)、東京化学同人
- 6) 田中誠之ほか：機器分析(1984)、裳華房

• REACTER



$L$ : depth (m)

$S$ : irradiation area( $\text{m}^2$ )

$I_0$ : light intensity at the irradiation surface ( $\text{W}/\text{m}^2$ )

$I$ : light intensity ( $\text{W}/\text{m}^2$ )

$C$ : cell concentration( $\text{g-cell} / \text{m}^3$ )

$\alpha$ : absorptivity ( $\text{m}^2 / \text{g-cell}$ )

$H_e$ :  $\text{H}_2$  evolution rate ( $\text{mmol}/(\text{m}^3 \cdot \text{s})$ )

$H_{e(h\nu)}$ :  $\text{H}_2$  evolution rate under band pass light ( $\text{mmol}/(\text{m}^3 \cdot \text{s})$ )

$H_{e(\text{mono})}$ :  $\text{H}_2$  evolution rate under monochromatic light ( $\text{mmol}/(\text{m}^3 \cdot \text{s})$ )

$V_{\text{max}}$ : Maximum  $\text{H}_2$  evolution rate per volume ( $\text{mmol}/(\text{m}^3 \cdot \text{s})$ )

$K_m$ : Reaction constant ( $\text{W}/\text{m}^2$ )

図 2. 2 - 1 リアクタの定義、記号と単位

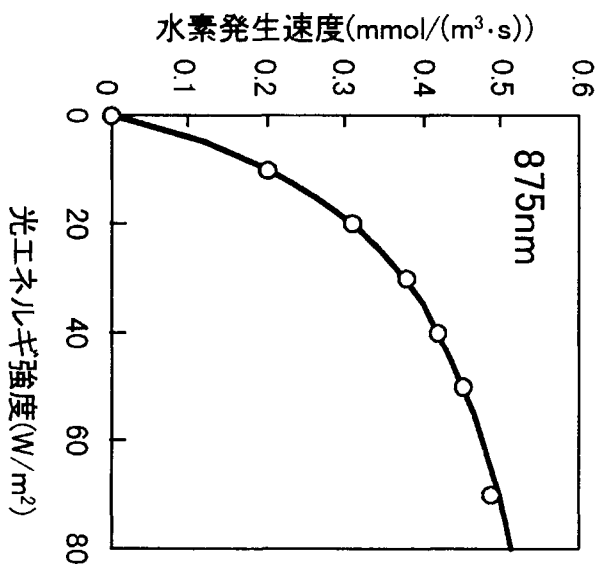
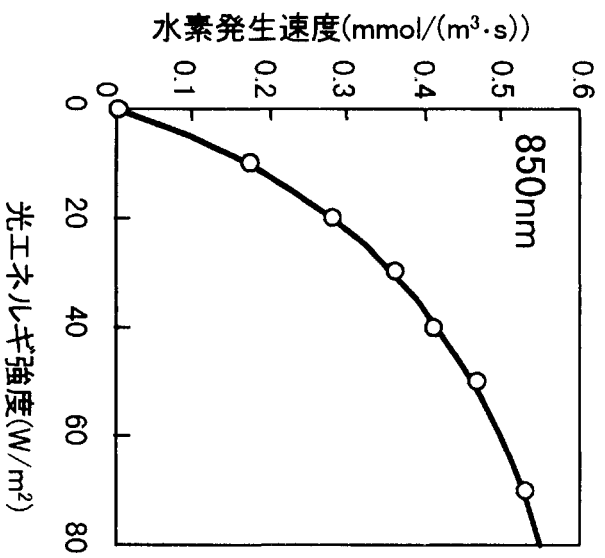


図 2. 2-2 単色光下の水素発生速度 (実測値と計算値の比較)

○ : 実測値      — : 計算値

[条件は実測値、計算値とも同じ]

菌体濃度 : OD<sub>660</sub>=1

リアクタ (受光面 : 1cm<sup>2</sup>, 深さ : 1cm)

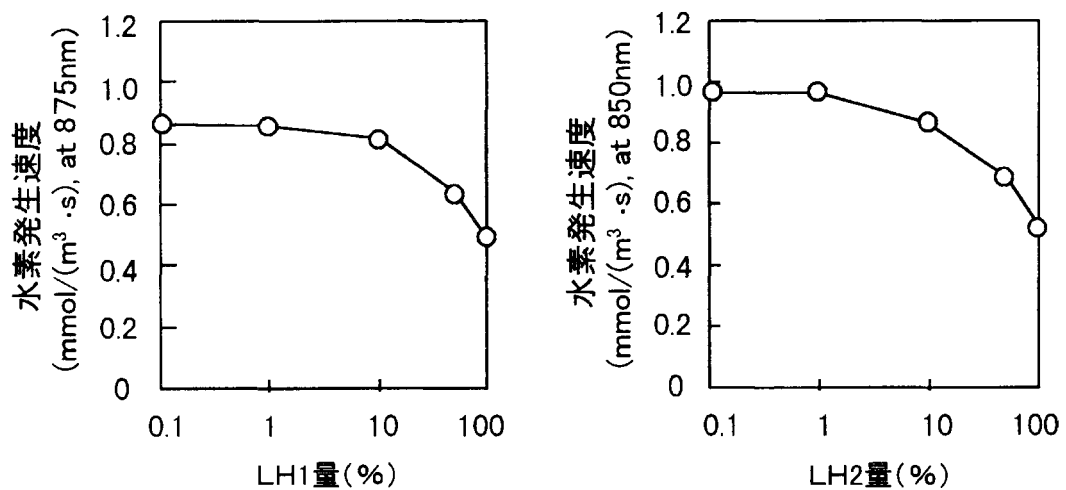


図2. 2-3 集光色素タンパク質量と

単色光下の水素発生速度の関係

[条件] 菌体濃度： $\text{OD}_{660}=1$

光エネルギー強度： $70\text{W}/\text{m}^2$

リアクタ（受光面： $1\text{cm}^2$ ，深さ： $1\text{cm}$ ）

## 2. 3 Rb. sphaeroides RVにおけるBchl含有量制御の遺伝学的アプローチ

### 2. 3. 1 概要

光合成細菌の水素発生能力の向上を目的として、菌体の集光色素タンパク質の一つであるLH1含有量を減らす育種改良を行なっている。これまでに、LH1の発現量を人為的に減少させるため、pufプロモータを用いたプロモータ競合法を考案した。この手法で取得した育種改良株（以下、pufプロモータ競合株と記す）のキャラクタリゼーションを行なった結果、短期間ではあるがLH1発現量の減少が確認された。しかしルシフェラーゼ活性（プロモータ競合法の効果の指標）の低下にともない、LH1発現量は急激に増加し、最終的には対照株の約2倍のLH1が合成されてしまうという問題があった。

そこで今年度は、ルシフェラーゼ活性を長期間維持するため、pufプロモータ競合株の培養条件の最適化を試みた。その結果、菌体濃度を対数増殖期の初期の値で一定に保つ連続培養が有効であることが分かった。

### 2. 3. 2 緒言

光合成細菌は、LH1、LH2という2種類の集光色素タンパク質を菌体内に保有することで、光を吸収している<sup>1)</sup>。我々は水素発生能力の向上を目的として、菌体のLH1含有量を減らす育種改良を行なっている。これまでに紫外線照射法で取得したP3株（LH1が野生株の35%に減少）を用いて、この育種方針の有効性を確認した<sup>2)</sup>。

またLH1の発現量を人為的に減少させるため、pufプロモータを用いたプロモータ競合法を考案した<sup>2)</sup>。図2. 3-1は、この手法で取得したpufプロモータ競合株の菌体量、ルシフェラーゼ活性、LH1、LH2の経時変化を、対照株と比較した結果である（平成9年度成果報告書に記載済み）。LH1量とルシフェラーゼ活性の関係から、以下のことが分かっている。

- ・LH1発現が抑制されるのは、培養開始後からルシフェラーゼ活性が最大になるまでの期間に限られる。
- ・LH1発現量は、ルシフェラーゼ活性の低下にともなって増加し、最終的には対照株の約2倍に達する。

したがって、pufプロモータ競合株のLH1発現量を長期間抑制するためには、ルシフェラーゼ活性を維持させる必要があると考えられた<sup>2)</sup>。

そこで今年度は、ルシフェラーゼ活性を長期間維持するため、pufプロモータ競合株の培養条件の最適化を試みた。

### 2. 3. 3 材料および方法

#### (1) DNA操作

DNA操作は、文献3を参考に行なった。なお、プラスミド精製にはQIAGEN Kitを用い、酵素は宝酒造製を使用した。

#### (2) 育種改良株、宿主、およびプラスミド

育種改良株は、接合伝達法でプラスミドを宿主に導入して取得した<sup>4)</sup>。なお接合伝達には、LB培地中、37℃で振とう培養した大腸菌S17-1を用いた<sup>3)</sup>。取得した育種改良株、および宿主と導入したプラスミドを以下にまとめる。

| 育種改良株        | 分類                  | 宿主   | 導入したプラスミド |
|--------------|---------------------|------|-----------|
| RV(pPLuc-2)  | <u>puf</u> プロモータ競合株 | R V株 | pPluc-2   |
| RV(pRKM-415) | 対照株                 | R V株 | pRKM-415  |

なおプラスミドpRKM-415は、pRK-415のTc耐性遺伝子をKm耐性遺伝子に置換したものである。pPLuc-2の遺伝子マップを図2. 3-2に示した。

#### (3) タンパク質の分析

菌体に含まれる全タンパク質量は、ウシ血清アルブミンを標準溶液とし、標準蛋白アッセイキット（バイオラッド社製）を用いて測定した。

菌体に含まれる集光色素タンパク質は、バクテリオクロロフィル（以下Bchlと記す）を指標として定量した<sup>5)</sup>。Bchlは冷アセトン-メタノール（7:2、体積比）に抽出した後<sup>6)</sup>、文献7を参考に濃度を算出した。

#### (4) ルシフェラーゼ活性の測定

ルシフェラーゼ活性の測定は、菌体を破碎し、Promega Luciferase Assay Systemを用いて行なった。なお蛍光強度の測定にはルミノメータを使用した。

## (5) 連続培養

光合成細菌培養用リアクタ（丸菱バイオエンジニア製、容量2,000ml、光源：ハロゲンランプ）を使用した。培養温度は30℃、攪拌速度は100min<sup>-1</sup>とし、2台のペリスタポンプを用いてリアクタ内の菌体懸濁液の引き抜きと、リアクタ内へのaSy培地の添加を行なった<sup>6)</sup>。

## 2. 3. 4 結果と考察

ルシフェラーゼ活性が最大値となるのは、菌体の増殖フェーズが対数増殖期の初期であることに着目し、菌体の増殖フェーズを制御できる培養、すなわち連続培養を行なうことで、ルシフェラーゼ活性の長期持続が実現出来るかどうか検討した。

まず光エネルギー強度を100、あるいは600W/m<sup>2</sup>として、RV(pPLuc-2)株をバッチ培養した結果、それぞれの光エネルギー強度では対数増殖期の初期の菌体濃度がOD<sub>660</sub>=1、あるいは

2.2となることが分かった。そこで菌体濃度がOD<sub>660</sub>=1(100W/m<sup>2</sup>)、あるいは OD<sub>660</sub>=2.2(600W/m<sup>2</sup>)となるように希釈率を制御して、30時間連続培養を行なった。結果を表2. 3-1に示すが、このような条件で連続培養を行なっている間は、ルシフェラーゼ活性がほぼ一定の値を維持することが分かった。

また30時間培養後の菌体に含まれるBchlを定量したところ、対照株に比べて低い値であった。経時的に定量を行っていないため断言はできないが、おそらく連続培養中は、LH1の発現が抑制されていたものと考えられる。

## 2. 3. 5 まとめ

- ・ pufプロモータ競合株のルシフェラーゼ活性を長期間維持するには、菌体濃度を対数増殖期の初期の値で一定に保つ連続培養が有効であることが分かった。

## 2. 3. 6 参考文献

- 1) W. R. Sistrom, J. Gen. Microbiol., 28, 607-616 (1962)
- 2) 平成9年度環境調和型水素製造技術研究開発成果報告書 (1998)
- 3) J.Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual, 2-nd edit., (1989), Cold Spring Harbor Lab Press, New York
- 4) R.Simon et al., Bio/Technology, 1, 784-791 (1983)

- 5) 北村 博ほか：光合成細菌（1984）、学会出版センター
- 6) R.K.Clayton, Photochem. Photobiol., 5, 669-677 (1966)
- 7) S.Meinhardt et al., Arch. Biochem. Biophys., 236, 130-139 (1985)
- 8) J.Miyake et al., J. Ferment. Technol., 62, 531-535 (1984)

表2. 3-1 連続培養時のルシフェラーゼ活性とBchl含有量

|                                  | 光エネルギー強度<br>(W/m <sup>2</sup> ) | 菌体濃度<br>(OD <sub>660</sub> ) | 希釈率<br>(h <sup>-1</sup> ) | ルシフェラーゼ活性 <sup>1)</sup><br>(unit/mg protein) | Bchl含有量 <sup>2)</sup><br>(mmol/g protein) |
|----------------------------------|---------------------------------|------------------------------|---------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------|
| <u>puf</u> <sup>+</sup> プロモータ競合株 | 100                             | 1                            | 0.14                      | 505                                          | 0.9                                       |
| RV(pPLuc-2)                      | 100                             | 1                            | 0.14                      | 673                                          | 0.7~0.9                                   |
|                                  | 600                             | 2.2                          | 0.18                      | 935                                          | 0.8~1.0                                   |
| 対照株                              | 100                             | 1                            | —                         | 0                                            | 1.5~1.7                                   |
| RV(pRKM-415)                     |                                 |                              |                           |                                              |                                           |

1) 5~10 時間毎に菌体をサンプリングし、測定した値の平均値

2) 30 時間培養後の菌体で測定した値

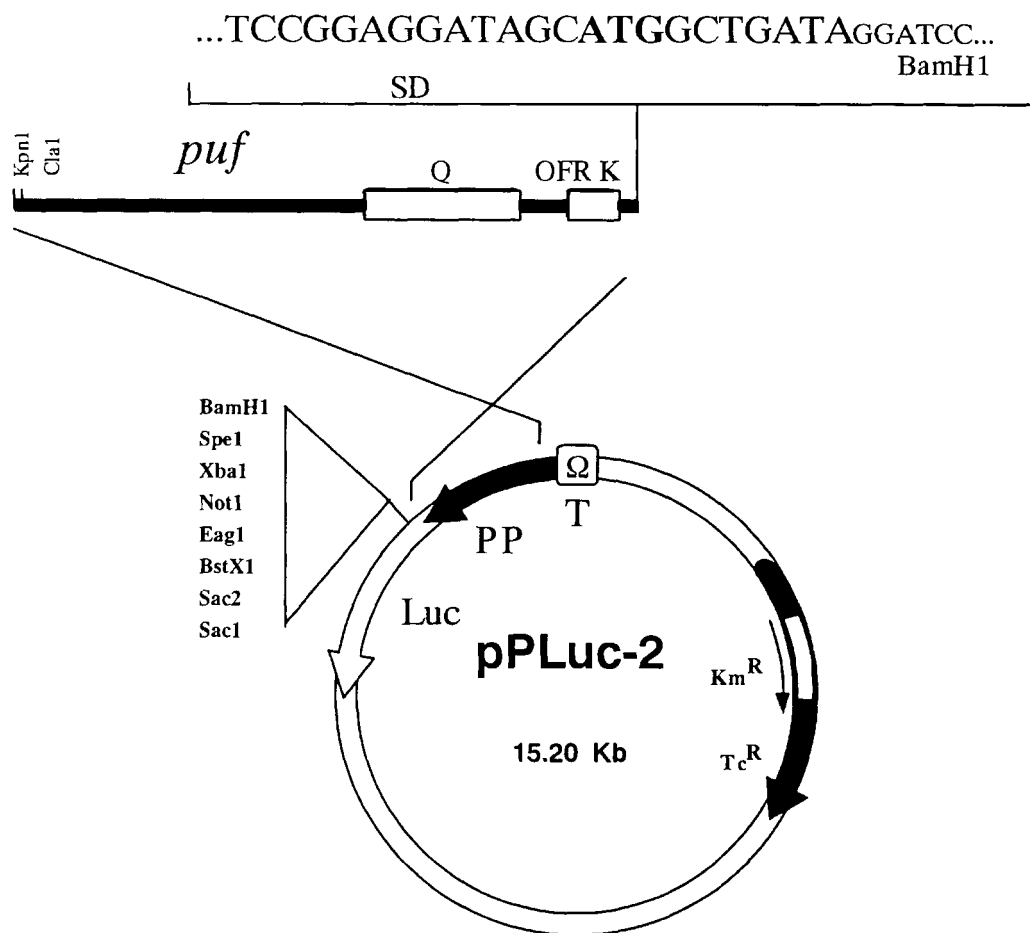


図 2. 3-2 プロモータ競合法用プラスミド

PP : *puf* プロモータ

Luc : ルシフェラーゼ構造遺伝子 (プロモータレス)

T : 転写停止末端

## 2. 4 藍藻類の育種改良

### 2. 4. 1 概要

SD配列（シャインダルガルノ配列）を改変したヒドロゲナーゼ遺伝子をクローニングしたベクタpKE4.9S.Hを用いたことにより、宿主 *Synechococcus* sp. PCC7942における嫌気性細菌 *Clostridium pasteurianum* のヒドロゲナーゼ活性発現が可能となっている。このヒドロゲナーゼの発現を最適化するため、ノーザンブロット、ウェスタンブロットの手法を利用して宿主内におけるヒドロゲナーゼの発現の様子を観察し、そのメカニズムを検討した。また嫌気処理によるヒドロゲナーゼ活性誘導と水素発生の検討も併せて行った。

### 2. 4. 2 背景

シアノバクテリアは高等植物と同様に酸素発生型の光合成を行うことにより、好気条件下で独立栄養的に生育可能な原核生物であり、この特徴から光エネルギー、特に太陽エネルギーを利用した有用物質生産への利用の可能性が期待されるものである。本研究は、シアノバクテリア *Synechococcus* sp. PCC7942に水素発生型である嫌気性細菌 *Clostridium pasteurianum* のFe-S型ヒドロゲナーゼを遺伝子工学的手法を用いて導入発現させることにより、光合成系で発生するエネルギーを直接利用し水分解によって水素を発生させる環境調和型の光分解水素発生系の構築を目的としている。

H 9 年度までに行った研究では、クロストリジウムヒドロゲナーゼ遺伝子のSD配列（シャインダルガルノ配列：リボゾームRNA結合部位）を *Synechococcus* sp. PCC7942に適合するように改変し、同ヒドロゲナーゼ遺伝子をクローニングしたプラスミドpKE4.9S.Hを用いることにより *Synechococcus* sp. PCC7942での同ヒドロゲナーゼの活性発現をメチルビオロゲンを用いた活性染色法により確認するに至っている。ところで、これまでのところ一般的にヒドロゲナーゼは機能発現（活性発現）に至るまでに非常に複雑なステップを必要とすると考えられている。これは、たとえばFe-Niタイプのヒドロゲナーゼであれば、確認されているだけでも30セット以上の遺伝子群が必要である点からも容易に想像できる。しかしながら、我々の検討したケースでは、ヒドロゲナーゼはその構造遺伝子1.7kbpのみをクローニングして用いているにすぎず、にもかかわらず活性が得られたということは非常に興味深い点であった。本研究で用いたヒドロゲナーゼが構造遺伝子だけで機能するものか、或いは宿主である *Synechococcus* sp. PCC7942が備えている何等かの機能を利用

して発現しているのかを知ることは、今後水素発生に向けてヒドロゲナーゼの発現を最適化してゆく上で重要なポイントの一つであると考えられた。そこで本年度は宿主内でのヒドロゲナーゼmRNAやタンパク量の推移を観察し、その発現メカニズムを考察すると共に既に若干の知見が得られている嫌気処理によるヒドロゲナーゼ活性の誘導を中心に水素発生の検討も行ったので報告する。

## 2. 4. 3 使用菌株及び培養方法

### (1) 使用菌株

嫌気性細菌：*Clostridium pasteurianum* (以下*C.pasteurianum*)

藍藻：*Synechococcus* sp. PCC7942 -curing (以下PCC7942又は野生株)

：同 -pKE4.9 形質転換株 (以下PCC7942/pKE4.9)

：同 -pKE4.9S.H 形質転換株 (以下PCC7942/pKE4.9S.H)

大腸菌：*Escherichia coli* DH5 (以下*E.coli*)

：同 -pKE4.9 形質転換株 (以下*E.coli* /pKE4.9)

以下、各形質転換株は藍藻にならう

### (2) 培養方法

#### a. 藍藻 PCC7942 の培養 (明好気条件)

培養はBG-11培地を使用した。液体培養は500ml容のルーフラスコか、或いは1,000 ml容のメディウムボトルに通気針を通したシリコ栓で蓋をし、30℃、15W/m<sup>2</sup>で通気培養を行った。通気はエアーフィルタ(0.2μm Filter Unit、Millipore)を通気針に付け、エアーポンプから空気を送ることにより行った。形質転換株の培養は、アンピシリン(Amp)とクロラムフェニコール(Cm)をそれぞれ、2.0μg/ml、10.0μg/mlの終濃度になるよう添加して行った。プレート培地は、BG-11培地に0.75%(w/v)濃度のアガロースを添加して作成、藍藻菌体を画線植菌しシャーレの縁をパラフィルムで巻き30℃にて2~3週間培養した。

#### b. 藍藻 PCC7942 の培養 (明嫌気条件)

a.の明条件で培養した培養液の一部を回収し、これに新たなBG-11培地を添加し培養開始時の菌体濃度(OD<sub>660</sub>)を調節した。Ar:200ml/min、CO<sub>2</sub>:5ml/minの混合ガスを

エアフィルタ( $0.2\mu\text{m}$ )を通して通気し $15\text{W}/\text{m}^2$ の明条件下で培養した。

#### c. 大腸菌の培養

LB培地を使用して培養した。液体培養は必要に応じてAmp: $100.0\mu\text{g}/\text{ml}$ 、Cm: $10.0\mu\text{g}/\text{ml}$ を添加し $37^\circ\text{C}$ にて8時間振とう培養した。プレート培地はLB培地に $1.5\%$ (w/v)濃度のアガロースを添加して作成、 $37^\circ\text{C}$ にて一晩培養した後、 $4^\circ\text{C}$ にて保存した。

### 2. 4. 4 実験方法

#### (1) 藍藻培養液の嫌気処理

嫌気明条件下或いは、好気明条件下で $\text{OD}_{660}=1\sim 2$ 程度に生育した藍藻を遠心分離( $10,000 \times g$ 、 $30^\circ\text{C}$ 、 $15\text{min}$ )にて回収し、 $\text{OD}_{660}=10$ になるようにBG-11又はTris-glycine buffer pH8.45(Tris: $0.6\text{g}$ 、glycine: $2.88\text{g}$ 以下TG buffer)に再懸濁した(容量は $20\text{ml}$ )。この懸濁液を $50\text{ml}$ 容のガラス瓶に移し、ゴム製の二重栓にて蓋をしアルミホイルにて完全に遮光した。この後アルゴンによるガス置換と脱気を10分づつ3回繰り返した。

$30^\circ\text{C}$ のインキュベータで0~48時間振とうする事により嫌気処理とした。活性測定を行う場合はアルゴンを吹き込みつつシリンジにてサンプルを必要量抜き取り使用した。

#### (2) 藍藻無細胞抽出液(Cell free extract)の調製

藍藻は野性株、形質転換株共に $\text{OD}_{660}=2$ 程度の培養液を集菌しTG bufferを用いて $20\text{ml}$ ( $\text{OD}_{660}=80$ )まで濃縮し、 $50\text{ml}$ 容量の褐色小瓶に入れ、嫌気処理を施し、 $30^\circ\text{C}$ 暗条件下にて一晩振とうした。菌体破碎はフレンチプレス(大岳製作所製)を用いて行った。サンプルのフレンチプレスシリンダへの封入は嫌気箱内にて行い、プレス時( $1,200\text{kg}/\text{cm}^2$ )のサンプルの回収はゴム製のOリング付きの中蓋を利用できる超遠心チューブを使用し、チューブ内にアルゴンを吹き込みつつ行うことで可能な限り嫌気状態を維持した。フレンチプレス終了後素早く中蓋をはめ、しっかりと外蓋をしめた後超遠心( $160,000 \times g$ 、 $1\text{hr}$ 、 $4^\circ\text{C}$ )し、その上清を藍藻無細胞抽出液とした(上清の回収は嫌気箱内部で行った)。

Native-PAGEの泳動サンプルとして用いる場合は無細胞抽出液: 6 に対し70%サッカロース: 1 を加えたものを利用した。

### (3) *C.pasteurianum* 無細胞抽出液(Cell free extract)の調製

*C.pasteurianum* の場合はフレンチプレスでの破碎が困難なため、好気条件ではあるが超音波細胞破碎機 (BRANSON製 SONIFIER-450 /U.S.A.) を利用した。直径5mmのチップで出力 10~20W、50%のインターバルで10分間超音波した後、小型超遠心 (HITACHI製 himacCS120 ロータ:S100AT5) で200,000 x g、4℃、30min遠心分離し上清を無細胞抽出液とした。

### (4) ヒドロゲナーゼ活性測定

#### a. 還元型メチルピオロゲン添加系

水素電極を用い還元型メチルピオロゲン依存の水素生成を測定することによりヒドロゲナーゼ活性とした。水素電極セル内にあらかじめ嫌気処理したリン酸ナトリウムバッファ(50mM pH7.5)1mlを入れ、アルゴンガスを吹き込む。(1)で調製した嫌気処理藍藻培養液(OD<sub>660</sub>=10)をシリンジにて1ml抜き取り電極セルへ添加し、この段階でベースラインを記録した。ここに1Mジチオナイト、1Mメチルピオロゲンを20μlずつ添加し水素発生量を測定した。反応温度は30℃で行い、発生水素量を知るための標準水素としては1.0%の水素ガスを使用した。

#### b. 光水素発生検討系

光水素発生を測定する場合、光源はRITE標準の近藤シルバニア製のM-26ハロゲンランプを使用し、反応系にはメチルピオロゲンを添加せずに測定した。ジチオナイトは場合により添加した。

### (5) SDS-PAGEとウェスタンブロット

#### a. SDS-PAGE

無細胞抽出液(100~500μl)に対し等量の変性バッファ{60mM Tris-HCl(pH6.8)、2% SDS、20% glycerol、10% 2-mercapto-ethanol、0.01% bromophenol blue}を加えて混和し、沸騰水中で5分間熱変性させ、4℃で15,000rpm、15分間遠心して上清をSDS-PAGEに供した。SDS-PAGEはLaemmli法で行い、泳動バッファは{25mM Tris、0.192M glycine、0.1% SDS}を用いた。分子量マーカはBio Rad製を利用した。ポリアクリルアミドゲルは第一化学薬品(株)製の10~20%グラジエントゲルを用いた。電気泳動

後、タンパク質バンドの検出はクマシー染色により行った (coomassie brilliant blue G-250 3g、CH<sub>3</sub>COOH 100ml、ethanol 300ml、H<sub>2</sub>O 600ml ; 脱色液 CH<sub>3</sub>COOH 300ml、methanol 100ml、H<sub>2</sub>O 700ml)。

## b. 抗原抗体反応 (ウェスタンブロット)

### ① ヒドロゲナーゼ抗体の処理

PCC7942培養菌体を濃度1g/mlになるようTBS-Tバッファ(0.1% Tween-20、20mM Tris、137mM NaCl pH7.6 with HCl)で懸濁し、105℃、5分間オートクレーブにかけた後、蒸留水で50倍に希釈した抗体原液1ml (-80℃保存)を約2gの菌体液に加えて混和し、室温で一晩振とうした。4℃で8,000rpm、15分間遠心して上清をTBSバッファで10mlにし、これを500倍希釈マスキング抗体とした(4℃保存)。

### ② ブロットニング処理

ブロットニングは、ホライズブロット(ATTO製)を用いた。ブロットニング膜はクリアブロット・P膜(PVDF膜 ATTO製)を使用しブロットニングバッファはTris/glycine/methanol(0.1M/0.192M/5%)を使用した。ブロットニングの手法はATTOのマニュアルに従いゲル面積1cm<sup>2</sup>当たり2.0mAの定電流で60分通電しブロットニングを行った。

### ③ ヒドロゲナーゼ抗体タンパクの検出

Amersham製 ECLディテクトキットを使用し抗原の検出を行った。使用方法はキット添付マニュアルによった。ブロットニングから発色に至るまでの膜の処理方法は平成9年度成果報告書と同一条件で行った。

## (6) 藍藻トータルRNAの調製とノーザンブロット

### a. RNase free試薬及び器具の調製

まず、RNase freeのミリQ水を調製するため、DEPC(diethylpyrocarbonate)処理を行った。通常のミリQ水を1L容のメディウムボトルに満たし、0.1%のDEPCを添加した後、37℃のインキュベータ内で2hr加温した。その後、オートクレーブ(120℃、20 min)しDEPCを除去し以後DEPC処理水として使用した。電気泳動やブロットニング等に

用いるバッファ、アガロースゲル等はこのDEPC処理水（又はDEPC処理水で調製したバッファ）を用いて調製した。なお調製の際は全て下記の様なRNase freeの器具を使用した。

実験に使用する器具の内、ガラス製のピエカ、フラスコ、メスシリンダ、パスツールピペット等は150℃以上で一晩乾熱処理しRNase free器具とした。また一度RNase freeとした器具等を取り扱う際は必ずポリ手袋を着用し、RNaseのコンタミを防いだ。電気泳動装置や泳動ゲル作成用のプレート等乾熱処理が不可能なものは使用前に過酸化水素水中に浸した上、使用直前にDEPC処理水にて濯いだものを用いた。

#### b. 藍藻菌体からのトータルRNAの抽出

藍藻は嫌気明条件下で培養したものをを用いた。培養開始からOD<sub>660</sub>が0.6、1.0、1.5、2.0、2.4の各時点で菌体を遠心分離（10,000 x g、4℃、10min）により回収した。この時、菌体回収量は最終的に1mlに懸濁した場合にOD<sub>660</sub>=15となる量とした（藍藻はOD<sub>660</sub>=15で菌体が約10<sup>9</sup> cell/ml）。得られた菌体ペレットは一度DEPC処理水にて洗浄した後再び遠心回収し上澄みを除去した後、3～5mlの液体窒素を注いだ15ml容量のフアルコンチューブ内に滴下し凍結させ、全ての菌体サンプルがそろいうまで-80℃にて保存した（この時、液体窒素量が多すぎるとチューブの蓋を閉める際にチューブが破裂する場合があるため注意する）。

各凍結保存菌体を解凍し下記のRNA調製用バッファ1mlに懸濁した。

#### RNA調製用バッファ

0.5M EDTA..... 10  $\mu$ l  
10% Sarcosyl..... 500  $\mu$ l  
3M Sodium acetate.. 50  $\mu$ l  
5.0ml with DEPC処理水

以後作業中は常にポリ手袋を着用した。各サンプルは500  $\mu$ lづつエッペンフレンチチューブに分注し、500  $\mu$ lのTE飽和フェノールを加えボルテックスにより攪拌し60℃にて15minインキュベートした後、氷上にて10min間冷却する。この後15,000rpm、4℃、5min遠心し、水層を回収し等量のクロロホルム/イソアミルアルコール溶液を添加し攪拌した後15,000rpm、4℃、5min遠心してこの操作を3回繰り返す。3回目の抽出が終了した段階で、回収した水層に1/10容量の3M酢酸ナトリウム溶液、2.5倍量のエタノール

ールを添加し-80℃に15min以上おいた。15,000rpm、4℃、20min遠心し、溶液部分を廃棄、ペレットを乾燥させ20 $\mu$ lのTEバッファに懸濁しRNAサンプルとした。サンプルのRNA濃度はOD<sub>260</sub>の吸光度を測定し、計算により求めた（OD<sub>260</sub>=1の場合40 $\mu$ gRNA/mlとして算出）。

## 2. 4. 5 結果と考察

### (1) ヒドロゲナーゼ発現メカニズムの検討

一般的にヒドロゲナーゼは非常に複雑な酵素であるとされており発現調節或いは活性を有する形になるまでの修飾系遺伝子群が数多く必要であることが知られている。中でも最も広く研究されているNi-Fe型ヒドロゲナーゼは現在確認されているだけでも30セット以上の遺伝子が関与しているとされている。本研究で用いているFe-S型ヒドロゲナーゼに関しては今のところこの様な多くの調節遺伝子系は確認されていないが、全く必要としないかどうかは疑問である。しかしながら本研究の昨年までの結果が示すように、クロストリジウムのFe-Sヒドロゲナーゼの構造遺伝子部分1.7kbpだけをクローニングし藍藻に導入することでヒドロゲナーゼの活性発現が得られたことから、2つの可能性が示された。つまり、同ヒドロゲナーゼが他の調節遺伝子系を全く必要とせず構造遺伝子のみで発現可能であるか、又は藍藻の持つ何等かの機能が同ヒドロゲナーゼ活性発現の補助をしているというものである。昨年度実施した同一プラスミドによる大腸菌の形質転換結果では、ヒドロゲナーゼタンパクは確認されたが活性発現は得られておらず、この点も考慮すると、ヒドロゲナーゼ活性発現に藍藻の機能が利用されている可能性が高いと考えられた。藍藻内に導入したクロストリジウム由来のヒドロゲナーゼがどのように発現し、活性化しているかを検討し情報を得ることは今後発現量の増強、或いは最適化を行う上で重要なポイントの一つであると考えられた。そこで、発現の様子を観察し、そのメカニズムを検討するため藍藻内のヒドロゲナーゼmRNA量及びタンパク量変化をノーザンブロット及びウェスタンブロットによって調査した。

藍藻を嫌気明条件で培養し、OD<sub>660</sub>が0.5、1.0、1.5、2.0、2.5の各段階に達したところで培養液の一部を回収し実験方法に示した手法によりトータルRNAの抽出を行った。20 $\mu$ gのトータルRNAを含む各サンプルをアガロースゲルにより泳動、分離し、クロストリジウムヒドロゲナーゼ構造遺伝子（全長約1.7kb）をプローブとしてヒドロゲナーゼmRNAの検出を行った。その結果、図2. 4-1に示すように各生育段階から抽

出したサンプルで同一位置に特異的なバンドが確認されると共に、このバンドの発色強度が生育が進むにつれ（OD値が大きくなるにつれ）で強くなっていることが明らかとなった。これはすなわちヒドロゲナーゼmRNAの量が生育に伴って増加していることを示す結果であった。次に同様に各生育段階の菌体を破碎して得た無細胞抽出液をSDSにより変成処理し、抗原抗体反応（ウェスタンブロット）を実施した。40 $\mu$ gの可溶性タンパクを含むサンプルをSDS-PAGEに供しヒドロゲナーゼ抗体によって検出を行った。この結果RNAの場合と同様に生育に伴ってヒドロゲナーゼタンパク量も増加していることが明らかとなった（図2.4-2）。これらの結果から藍藻に導入したクロストリジウムヒドロゲナーゼは宿主の生育に伴い転写翻訳されていることが明らかとなった。また以前同一ベクタ系で検討されたcat（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ）活性発現の推移も、やはり同様に藍藻の生育に伴って増加することが確認されており、以上の点から本発現系は宿主藍藻から特殊な発現調節を受けておらず、ヒドロゲナーゼは藍藻内で連続的に合成されていると判断できる。

## （2）嫌気処理によるヒドロゲナーゼ活性の誘導

本研究で用いているクロストリジウムヒドロゲナーゼは酸素感受性である。昨年度行った研究でも、活性染色を行うに当たり藍藻菌体を嫌気状態に保つことが重要であることが確認されている。また平成8年度に行った研究では、藍藻を嫌気明条件下で培養した場合にはヒドロゲナーゼ活性が高くなることも示されている。ここで、嫌気明培養とはCO<sub>2</sub>存在下において光合成によって生育を行う系であるため、厳密には細胞内に光合成で生じる酸素が存在しているはずである。そこで細胞を完全に嫌気状態に保つことによりヒドロゲナーゼ活性がどのように変化するのか検討した。

まず嫌気明条件でOD<sub>660</sub>=2.5まで生育した藍藻野生株と、形質転換株のそれぞれを回収し、実験手法に示したように少量のガラス瓶に移しアルゴンによるガス置換と脱気を繰り返すことにより液体中の酸素を完全に取り除いた。更にこれを嫌気暗条件に置くことにより細胞内の酸素を完全に除去できると考えた。暗条件化においたサンプルから逐次必要量を抜き取りメチルピオロゲン(1mM)とジチオナイト(1mM)を添加した上で水素発生能力を測定した結果、図2.4-3に示すように嫌気処理を開始してから12時間程度でヒドロゲナーゼ活性が初期の10倍程度にまで誘導されることが明らかとなった。また、比較のため行った野生株の検討でも12時間程度でヒドロゲナーゼ活性が最大値まで誘導

される現象が見られた。同様の実験を、より若い菌体( $OD_{660}=1.5$ )を用いて比較検討した場合には、活性が最大に誘導されるまでに40時間程度を要することが明らかとなった。また、先の $OD_{660}=2.5$ の場合と同様に、野生株でも40時間程度かかって活性が誘導されてくるとも確認された。野生株と同一のパターンでヒドロゲナーゼ活性が誘導されてくるといふ現象から、発現したクロストリジウムヒドロゲナーゼの活性化に、藍藻野生株の機能が使われている可能性が考えられたが、この点に関しては今のところ詳しいことは解っていない。また生育段階によってヒドロゲナーゼ活性誘導に必要な時間に差が生じるという点に関しては幾つかの可能性が推測された。一つは $OD_{660}=2.5$ の生育がある程度定常状態にさしかかった菌体に比べ、若い菌体は光合成機能がフルに活動していることが予想され、このため菌体内部の酸素量が多いのではないかと推定されている。また別の可能性としては若い菌体は酵素発現が活発に起こっており、40時間の嫌気処理の間にもヒドロゲナーゼタンパクが増加しているためだとも推測された。またヒドロゲナーゼ活性の推移にはピークが存在し、一定以上嫌気処理を続けても後は減少するといった現象が見られたが、この点は嫌気処理による菌体の死滅が原因ではないかと推定している。

#### 2. 4. 6 まとめ

平成8年度の成果報告書に示したように、嫌気明条件で培養した藍藻形質転換株では菌体の生育が進むにつれヒドロゲナーゼ活性（水素発生能力）が増加し、最終的には好気条件下で生育したものに対し4～5倍程度活性が高くなるという結果が得られており、今年度実施した結果で更に嫌気暗処理を施すことにより10倍以上活性誘導が起こることが確認されたことから、通常の明好気培養に比べ40～50倍までヒドロゲナーゼ活性を誘導することが可能になったわけである。

この様に活性誘導を行った菌体を用いて光水素発生の検討を続けているが、これまでのところ有意な結果は得られていない。この原因の一つは導入したヒドロゲナーゼの酸素感受性によるものと推測される。本研究の目的とする光水素発生は光合成によって発生する電子を異種ヒドロゲナーゼに受け渡すことによって成立する系であるが、光合成によって同時に発生する酸素がヒドロゲナーゼに影響を及ぼす可能性が考えられる。この問題点は本研究開始当初より議論されてきた点ではあるが、初期の段階で検討されたシュートランスフォーム（ヒドロゲナーゼタンパクの直接導入）による検討では30分以上安定な光水

素発生が確認されており、これは宿主藍藻内に十分なヒドロゲナーゼが存在すれば光水素発生が可能であることを裏付ける結果である。現段階では直接クロストリジウムヒドロゲナーゼに酸素耐性を付与する、或いは酸素耐性のヒドロゲナーゼを導入するといった試みはヒドロゲナーゼの複雑さと情報不足から非常に困難であるが、今年度の結果で得られたように、発現したクロストリジウムヒドロゲナーゼは宿主藍藻から特別な調節を受けておらず、藍藻内で連続的に合成されていることが確認されているため、転写活性の増強等によりヒドロゲナーゼ過剰発現を計ることにより更なる改良が可能であると考えられる。

1 2 3 4 5



lane1:OD=0.5

lane2:OD=1.0

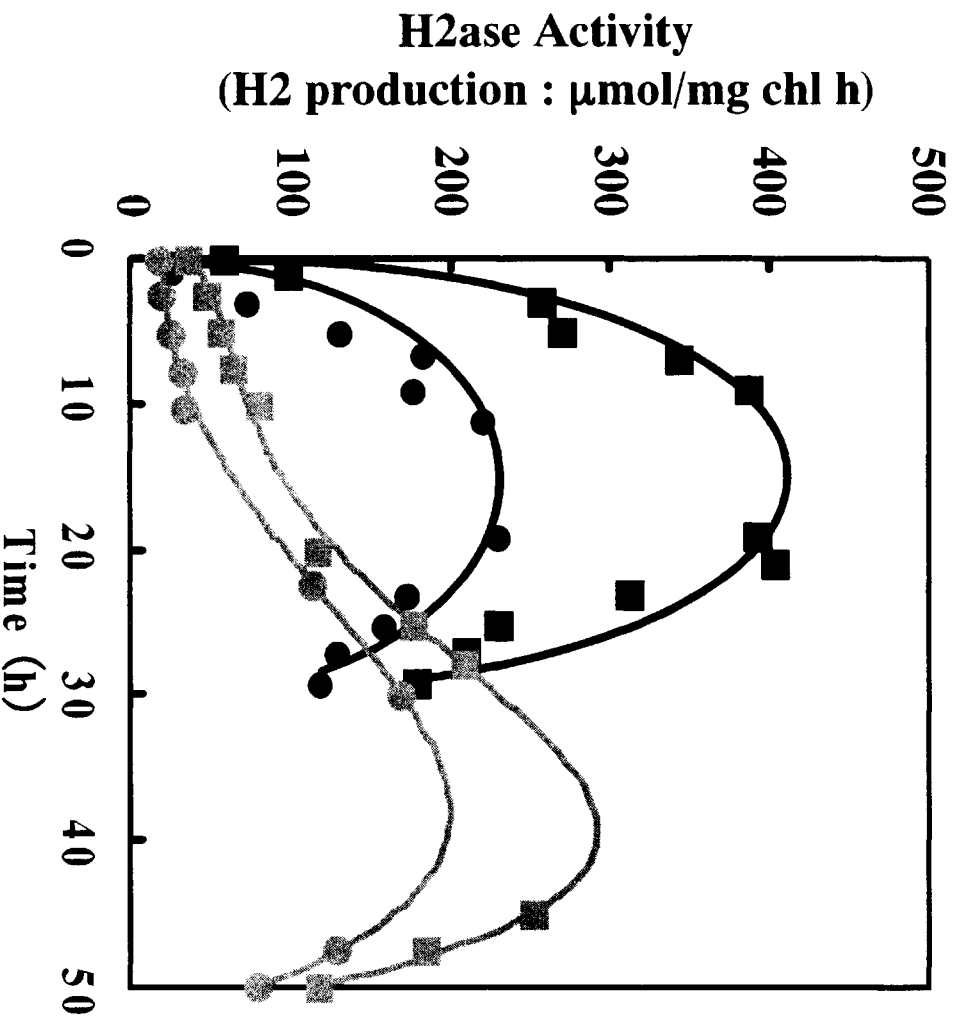
lane3:OD=1.5

lane4:OD=2.0

lane5:OD=2.5

ベクターpKE4.9S.Hを導入したPC7942株でのH<sub>2</sub>aseタンパク量変化を観測した。各サンプルは40mgの可溶性タンパクを含む。プローブは人工的に合成した*C. pasteurianum*ヒドロゲナーゼタンパクの一部を用いて調製したものを使用。

図2. 4-2 藍藻生育に伴うヒドロゲナーゼタンパク量の推移



OD<sub>660</sub>が約1或いは2.5に達した野生株及び形質転換藍藻の培養液の一部を回収しアルゴンによるガス置換を行った後遮光して30℃にてインキュベートした。水素発生量はメタルビオロゲン、ジチオサイトを共に1mM添加した系で水素電極を用いて測定した。

図 2. 4 - 3 暗嫌気処理によるヒドロゲナーゼ活性の誘導

## 2. 5 光合成細菌のポリヒドロキシ酪酸代謝系と水素発生の検討

### 2. 5. 1 概要

クエン酸合成酵素はPHB合成の出発物質であるアセチルCoAを基質とすることが知られており、その活性はPHB生合成に影響を及ぼすと考えられる。In vitroの実験から Rhodobacter sphaeroides RV株のクエン酸合成酵素はNADPHによって阻害されることが判明した。R. sphaeroides RV株細胞内のNADPH濃度について検討したところ、培地中のpH上昇に伴って上昇することが判明した。これらの結果は、培養液中のpHの上昇に伴ったPHB蓄積の促進が、細胞内NADPH濃度の上昇に伴ったクエン酸合成酵素活性の低下によって起こるアセチルCoA濃度の上昇によって起こったことを示唆している。PHB蓄積を抑制することによって水素生産収率を高めるために、あるいは、水素とPHBを共に効率よく製造するような培養システムを構築するために、培地中pHのコントロールが有効であることは、本研究で得られた酵素活性の挙動から説明することができた。

### 2. 5. 2 背景

微生物の貯蔵物質であるポリヒドロキシ酪酸(PHB)は様々な生物工学的なプロセスから得られる有用な副産物である。この高分子の熱可塑性や生分解性は、合成プラスチックの代替物としての利用価値を高めている。紅色非硫黄細菌 Rhodobacter sphaeroides RV株は、研究されている光合成微生物の中では最も水素生産能の高い株の一つである<sup>1)</sup>。それと同時に、この株はPHB高蓄積株としても知られている<sup>2)</sup>。水素とPHBの生合成プロセスは共に細胞内の過剰な還元力を排出するために存在すると考えられている。これら二つ物質の生合成調節機構に関する知見は、二つの物質を効率良く生産するための生物工学的システムを構築する上で必要であると考えられる。昨年度までの研究において、培養液中のpHを上昇させると水素よりむしろPHBの蓄積が優先されることを見い出した。このpHによる二つの物質生産のコントロール技術を開発するために、本研究では、pHの変化がPHB蓄積プロセスに与える分子レベルでの影響について検討することを目的とした。

### 2. 5. 3 実験方法

#### (1) 菌体の維持

R. sphaeroides RV株はgL培地(pH6.8)に6~8%(v/v)の割合で植菌し、2,000luxの連続

光照射下で、光従属栄養的に培養した。

## (2) 光バイオリアクタ

培養液中のpHが細胞に与える効果を調べるために、シリンダ内部光照射型フォトバイオリアクタ（丸菱バイオエンジニアリング）を用いた。特に断わりのない限り、細胞はpH7にコントロールされた条件で培養した。実験は対数期から定常期初期にかけての細胞を用いて行った。培養液中のpHのシフトは、細胞が対数期の約3分の1にさしかかったところで、0.5N NaOHを添加することによりすばやく（10分以内に）pHを9.0まで上昇させることによって行った。培養液サンプルはバイオリアクタから回収し、実験に用いた。

## (3) 分析法

PHB蓄積率と乾燥重量はそれぞれガスクロマトグラフィー<sup>3)</sup>及び重量測定によって決定した。還元型ビリジンヌクレオチド(NADH、NADPH)あるいは酸化型ビリジンヌクレオチド(NAD、NADP)、また、アデニル酸(ATP、ADP、AMP)を0.5N NaOHまたはHClでそれぞれ処理した細胞から抽出した。得られた抽出液を中和し、細胞未破砕物を遠心分離(10,000 x g)によって除去し、測定用サンプルとした。ヌクレオチド類はHPLC（カラム充填剤、Inertsil ODS; カラムサイズ、5 x 250mm; 3.75%のメタノールを含む100 mMカリウム-リン酸緩衝液(pH6.0)で平衡化; 流速、1ml/min; 22°C)で分析した。分析システムはUV(254nm)及び蛍光分光検出器(420nm、励起光350nm)を備えた島津10Aを用いた。

酵素活性測定のための無細胞抽出液は、50mM Tris-Hcl (pH7.5) で洗浄した細胞を超音波破碎(20,000Hz、3min、4°C)し、細胞未破砕物を遠心分離で除去することによって得た。

蛋白質の定量分析はBioRad蛋白質アッセイシステムを用いてBradford 法によって行った。全てのデータは2つの実験結果の平均値として得た。

## 2. 5. 4 結果と考察

### (1) PHB蓄積に与えるpHの影響

フォトバイオリアクタを用いてpH7.0で培養された*R. Sphaeroides* RV株は乳酸を唯一の炭素源として乾燥重量あたり7~9%のPHBを蓄積した（表2.5.-1）。培養液中のpHを

7.0から9.0にシフトさせるとPHBの蓄積率は12~14%へ上昇した。PHB蓄積率の上昇は、細胞内炭素フラックスの増大か、酵素活性の上昇、あるいは、他の律速因子の解消を意味する。PHB合成の生物学的意味は過剰還元力の排出であるところから、ヌクレオチド分子種に着目し、pHシフトとの関連について検討することとした。

## (2) PHB及びヌクレオチドの細胞内含有量

pH-スタット培養及び培養液をアルカリ側へシフトさせた後のそれぞれの細胞中のビリジヌクレオチドとアデニル酸の定量を行った結果、pH変化によって各物質は複雑な挙動を示すことが判明した（表2.5-1、図2.5-1）。培溶液のpHを7.0から9.0にシフトさせるとアデニル酸チャージは低下した（表2.5-1）。NADPHの細胞内濃度はpHシフト直後、いったんは低下したものの、すぐに、pHシフトを行わなかった細胞と同レベルまで戻り、その後変化は見られなかった。NADHの細胞内濃度はpHシフト直後に急激に低下したが、その後、上昇した。一方、pHシフトを行わなかった細胞では生育とともに減少した。以上の結果により、ビリジヌクレオチド、特に、NADHはpHシフトの影響を受けることが判明した。そこで、次に、ニコチヌクレオチドがPHB生合成関連酵素に与える影響について検討した。

## (3) ニコチヌクレオチドによる酵素活性阻害

PHB合成の鍵酵素であるPHBシンターゼ、及びPHB合成系とは基質において競争関係にあるクエン酸合成酵素の活性に与えるビリジヌクレオチドの影響について検討した（表2.5-2）。その結果、ビリジヌクレオチドの添加に伴ったPHBシンターゼ活性の変動は観察されなかった。一方、クエン酸合成酵素の活性はNADHによって阻害された。

## (4) 結論

本研究で得られた結果から、pHシフトはNADHの細胞内濃度変動、特に、上昇を引き起こすことが明らかとなった。また、NADH濃度の上昇は、クエン酸合成酵素活性の抑制を引き起こすことがインビトロ実験から示された。クエン酸合成酵素活性の低下はPHB合成の基質であるアセチルCoAの細胞内濃度を上昇させると考えられ、この炭素フラックスの増大がPHBの蓄積を促進させた原因になっていると考えられた。pHのコントロールによってPHB蓄積調節が可能であることが代謝機構の観点から説明できたことが本研究の意義である。

#### 2 . 5 . 5 参考文献

- 1) Miyake, J. et al., J. Ferment. Technol., 62, 531-535 (1984)
- 2) Suzuki, T. et al., Biotechnol. Lett., 17, 395-400 (1995)
- 3) Braunegg, G. et al., Eur. J. Appl. Microbiol., 6, 29-37 (1978)

表 2 . 5 - 1    pHシフトによる細胞内アデニル酸チャージの変化

| Cell constituents  | control growth, pH-stat 7.0 |            | rapid pH-shift 7.0->9.0 |       |
|--------------------|-----------------------------|------------|-------------------------|-------|
|                    | early phase                 | late phase | before                  | after |
| PHB*               | 4                           | 9          | 5                       | 13    |
| Adenylate charge** | 0.7                         | 0.8        | 0.7                     | 0.4   |

\*PHB蓄積量は細胞乾燥重量当たりの重量%で表した。

\*\*Adenylate charge=(ATP+0.5ADP)/(ATP+ADP+AMP)

表2. 5-2 ピリジンヌクレオチド及びアデニル酸が  
クエン酸合成酵素、PHBシンターゼに与える影響

| Effectors   | concentration, mM | residual activity, % |              |
|-------------|-------------------|----------------------|--------------|
|             |                   | Citrate synthase     | PHA synthase |
| No addition |                   | 100                  | 100          |
| NADH        | 0.1               | 20                   | - *          |
|             | 0.3               | 0                    | -            |
|             | 1.0               | -                    | 83           |
| NAD         | 1                 | 99                   | 55           |
| NADPH       | 1                 | 119                  | 79           |
| ATP         | 1                 | 89                   | 80           |
| ADP         | 1                 | 103                  | 85           |

\* - Not measured

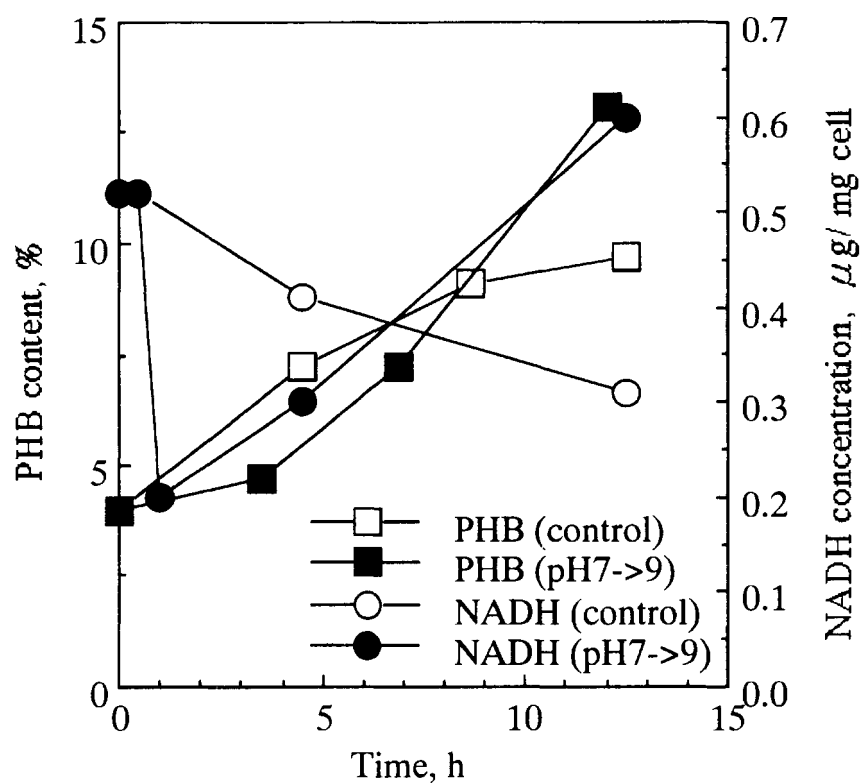


図2. 5-1 pHシフトのPHB及びNADHの細胞内濃度に与える影響

## 2. 6 水素発生酵素の遺伝子特性と遺伝子組み換えによる光合成細菌の育種改良

### 2. 6. 1 要旨

本報告は、平成10年度に、RITEの“生物学的水素生産プロジェクト”について実施されたSIM研究活動について述べる。この期間に得られた主要な結果は下記のように要約できる。

- (1)組換え *C.pasteurianum* ヒドロゲナーゼの嫌気性／明条件における発現および機能性と測定するための実験法を確立、最適化した。得られた結果は、必要な培養条件下での蛋白発現評価（ウェスタンブロット）および機能性評価（水素取り込みおよび発生のための活性ゲル電気泳動）に関して優れた再現性が得られたことを示している。
- (2)以前に *R.sphaeroides* RVから分離した、SMV089（HUPマイナス）と名付けた取り込み突然変異株について、廃棄物を原料とする増殖培地を用いて1Lリアクタ中で水素生産の試験を行った。
- (3)3種の突然変異株、PHAマイナス、HUPマイナスおよび二重突然変異株PHAマイナス／HUPマイナスの性能を、合成培地を培養基質として用いて、バッチ培養条件で野生株の性能と比較した。
- (4)これら突然変異株の性能を、同じ合成培地を培養基質として用いて連続培養で、野生株の性能と比較した。
- (5)二重突然変異株PHAマイナス／HUPマイナスについて、廃棄物を原料とする増殖培地を用いて1Lリアクタ中で水素生産の試験を行った。
- (6)この酵素複合体の活性化に関与するMo-ニトロゲナーゼ制御遺伝子の分離およびヌクレオチド配列決定を行った。特に、酸素検知回路の中心的制御因子である、*R.capsulatus* からの *nifA1* 遺伝子を、*pucBA* プロモータの制御下に発現プラスミド pSM830にクローニングした。この構築物を、接合によって、HUPマイナス突然変異株 SMV089に導入した。窒素検知回路の2成分系である *R.sphaeroides* RVからの *nifR2/R1* 遺伝子を分離し、全配列を決定した。*E.coli* の遺伝子のサブクローニングを、その後の *R.sphaeroides* への導入の予備段階として行った。

### 2. 6. 2 緒言

平成10年度では、“生物学的水素生産プロジェクト”の範囲内で実施した我々の研究活

動は、主に、野性株 *R.sphaeroides* RV の水素生産能力を改善することを目標とする最も有望な戦略に関する決定的所見を示すことであった。

これは、各協同研究者が得た実験結果をすべて統合した最終評価報告書を作成することを最終目標とし、また、特に、光合成細菌と廃棄物由来培地の併用を考慮した生物水素生産の分野における将来の研究プログラム開発の基礎とするために行った。

特に、我々の研究活動は以下の事項に重点を置いた。

- (i) *C.pasteurianum* からの異種ヒドロゲナーゼが *R.shpaeroides* RV 中で発現されて機能を発揮し、ニトロゲナーゼとヒドロゲナーゼ活性の相乗効果によって水素生産能力を改善できるかどうかを確認すること。
- (ii) 突然変異株 HUP マイナスおよび PHA マイナス / HUP マイナスの光合成水素生産に関する比較評価を、廃棄物由来培地を用いて 1L 規模で連続培養装置で行うこと。これは、その後のパイロットプラントによる屋外試験で最善の性能を示す突然変異株を選択するために行った。
- (iii) 我々が分離したすべての突然変異株（PHA マイナス、HUP マイナスおよび PHA マイナス / HUP マイナス）の性能を、バッチ培養と連続培養の双方で合成基質を用いて評価すること。これらの実験の最終目的は、すべての協同研究者が同じ培養条件で異なる株を用いて得たデータあるいは異なるシステムで培養した同じ株で得たデータとの比較を可能にすることであった。
- (iv) 最高の性能を示す突然変異株を母体として、主ニトロゲナーゼ複合体の活性化に関与する制御遺伝子を過剰発現させることによって生産能力を増強した第二世代の水素過剰生産株を作出すること。検討対象の制御遺伝子は、窒素検知回路に関与する 2 成分系の *nifR2/R1* 遺伝子と、酸素検知回路の中心的制御遺伝子の *nifA1* 遺伝子である。

## 2. 6. 3 *R.sphaeroides* RV における *C.pasteurianum*[Fe]ヒドロゲナーゼ I の発現

### (1) 緒言

*Clostridium pasteurianum* からの [Fe]ヒドロゲナーゼは、以前に、集光性複合体 II の誘導 *pucBA* プロモータの制御下に発現ベクタ pSM813 をクローニングしたが、この酵素を選択して、*R.sphaeroides* RV の異種ヒドロゲナーゼの機能的発現を評価に用いた。生理的条件に似た方法で組換え酵素に電子を与えるため、構築物に、天然電子キャリア、即ち 2[4Fe-4S]フェレドキシンをエンコードする遺伝子も含めた。

*R. sphaeroides* RVにおける*C. pasteurianum* ヒドロゲナーゼの発現に関する我々の研究活動の最終目的は、この光合成細菌の水素生産に関与する酵素であるニトロゲナーゼの活性を異種ヒドロゲナーゼと組み合わせて相乗的効果を得ることができる、水素過剰生産組換え株を開発できるかどうかを確認することであった。

前述のように、*C. pasteurianum* 双方性ヒドロゲナーゼを選択した理由は次の通りである。

(i)これは中温性酵素（最適温度30℃）であり、光合成宿主の増殖温度と完全に一致する。

(ii)モノマー構造であるので、構築が容易である。

(iii)これは[Fe]のみを必要とするヒドロゲナーゼであり、この種の酵素では、成熟経路に補助蛋白を必要とするという証拠はこれまでのところ得られていない。

前年度に、我々は、非常に低いレベルではあったが、嫌気性／明条件下で組み換え*C. pasteurianum* ヒドロゲナーゼを*R. sphaeroides* RV(SMV081株)に発現させることに成功した。しかし、その機能性を証明するには至らなかった。

平成10年度では、実験の目的は、技術的問題によって機能的発現が困難になっているという可能性を否定するために、最適かつ再現性のある実験条件を確立することであった。

## (2) 結果および考察

実験は、*pucBA* プロモータの制御下に*C. pasteurianum* ヒドロゲナーゼを発現する組換え株SMV081を好気性／暗条件と嫌気性／明条件の双方で培養して行った。挿入物のない同じベクタを含むSMV083株および*C. pasteurianum* を、それぞれ陰性対照および陽性対照として用いた。

集光性複合体IIの*pucBA* プロモータを選択したが、その理由は発酵実験でよく使用される嫌気性／明条件で強く活性化されるためであった。さらに、酸素が存在しないことは、*C. pasteurianum* ヒドロゲナーゼ I の活性化の必要条件である。選択した増殖培地はaSyであり、この培地では、ニトロゲナーゼ複合体による水素生産が高いアンモニア濃度によって阻害される。*C. pasteurianum* は、0.5%グルコースと20mg/lのFeSO<sub>4</sub>を加えたLB培地で培養した。

*R. sphaeroides* 細胞を、まず、20mg/l FeSO<sub>4</sub>および20μg/ml カナマイシンを添加し

た培地10mlに接種し、30℃で暗所で1～3日間培養した。これらの培養物を新鮮培地で10～20倍希釈し、同じ条件で培養した。菌増殖は600nmの吸光度を指標として監視した。

嫌気性培養は、好気性培養から開始して、ヘリウムでフラッシュした密封ビンで行い、これらの培養物を希釈して最終吸光度(OD<sub>600</sub>)が約0.05～0.2になるようにし、振盪せずに光条件下で30℃で培養した。

既に報告したように、好気性／暗条件では、SMV083およびSMV081は同様の増殖速度を示したが、嫌気性／明条件では、組換え*C.pasteurianum* ヒドロゲナーゼを有する株(SMV081)は陰性対照(SMV083)と比較して遅い増殖速度を示した。

これは、フェレドキシンないしは*C.pasteurianum* 由来ヒドロゲナーゼが存在すると宿主の細胞増殖が抑制されることを示唆しており、二つの組換え蛋白が活性型として合成されることあるいは二つの組換えポリペプチドがFeとSを必要とするためにこれらの原子が*R.sphaeroides* RVの光合成に利用できなくなっていることを示しているのかも知れない。

蛋白抽出物はフレンチプレス破壊または超音波処理によって調製した。超音波処理中の酸素との接触を避けるため、嫌気性チャンバ内で細胞懸濁液を鉱物油で被覆した。

#### a. 水素産生測定のための活性ゲル電気泳動

発生ヒドロゲナーゼの活性測定を行うため、可溶性蛋白抽出物を10%ポリアクリルアミドゲルに負荷した。非変性不連続システムを用いた：分解ゲルの緩衝液は0.375M Tris-Cl pH8.8を含んでおり、濃縮用ゲルは0.125M Tris-Cl pH6.8を含んでいた。すべての溶液を使用前にヘリウムでフラッシュした。電気泳動は、嫌気性チャンバの外で行った。

電気泳動後に、ゲルを、1mMメチルビオロゲン(MV)添加の50mM Tris-Cl pH7.5溶液に入れ、30℃で30～60分放置した。次いで、ゲルを2.5%塩化トリフェニルテトラゾリウム(TTC)を含む溶液に入れて、少なくとも10分間放置した。活性バンドは赤い背景のなかの透明部分として現れる。

この実験法の再現性および最適化は、*C.pasteurianum* 抽出物が常に活性バンドを示し（しばしば、複数のバンドが存在した）、組換え株SMV081では陰性対照のSMV083と同様に活性バンドが検出されなかったという事実によって証明された（図2.6-1）。

#### b. 水素取り込み測定のための活性ゲル電気泳動

さらに、*R. sphaeroides* 細胞に発現された *C. pasteurianum* ヒドロゲナーゼの機能性を評価するため、取り込みヒドロゲナーゼ活性ゲル電気泳動も行った。これらの実験は、工業技術院生命工学工業技術研究所（つくば市）が開発した方法に従って、非変性8%ポリアクリルアミド連続ゲルで行った。

この方法は、最初に、*C. pasteurianum* 抽出物を用いて最適化した。

*C. pasteurianum* の培養は0.5%グルコースと20mg/l FeSO<sub>4</sub>を添加したLB培地で、ヘリウム雰囲気下の密封ビンで行った。嫌気性チャンバ中で試料を採取し、遠心分離し、0.6g/l Tris、2.88g/l グリシンおよび10%蔗糖を含む緩衝液（細胞濃度に応じて1～1.5ml）に再懸濁した。細胞を超音波処理によって破壊した（14μの振幅で1分の処理を4回）。ヘリウムを試験管にフラッシュして嫌気性条件を維持した。次いで、試験管を遠心分離し（10,000rpm、4℃で15分間）、上清をヘリウム雰囲気下で密封試験管に移した。

注入前に、ゲル溶液を密封ビン中でヘリウムで約15分間脱気した。ゲルは嫌気性チャンバ内で調製した。電気泳動前に、泳動用緩衝液を上記のように脱気し、次いで、ヘリウム気流下で、1mM亜ジチオン酸ナトリウムを含む溶液を、上部リサーバチャンバに加えた。加熱による蛋白変性を避けるため、電気泳動中に電源装置を調節した。電気泳動後に、メチルピオロゲン（0.075～0.125%）とTTC（0.1～0.15%）を含むTris-Gly緩衝液にゲルを浸漬した。使用前に、両溶液をヘリウムで少なくとも15分間フラッシュし、次いで、嫌気性チャンバ内に入れて、チャンバ内でプラスチック箱に移した。その後、嫌気性チャンバの外で、ゲルを入れた閉じた箱を水素でフラッシュした。取り込みヒドロゲナーゼ活性が存在する場合は、透明な背景のなかの赤いバンドが数分で現れる。これらの実験では、*C. pasteurianum* 抽出物は少なくとも5回使用でき、良好な結果が得られる。

連続ゲル系では広い蛋白および活性バンドが得られるので、解像度を高めるために不連続ゲル系も設定した。分解ゲルの緩衝液は0.375M Tris-Cl pH8.8と8%アクリルアミドゲルを含んでいた。濃縮ゲルは0.125M Tris-Cl pH6.8と4%アクリルアミドゲルを含んでいた。

実験結果は、試料の負荷量と得られた活性バンドの間に正相関がないことを示した。試料を過剰負荷したレーンでは、インキュベーション時間に応じて、一つの不明瞭な

バンドまたは複数のバンドが現れた。この現象はアーチファクト、蛋白凝集、または他の酸化還元活性の存在に起因するようであり、この条件でだけ検出された。活性バンドを検出できないような臨界閾値があるように思われる。

次いで、取り込みヒドロゲナーゼ活性測定を、*R.sphaeroides* 抽出物を用いて行った。*Rhodobacter* SMV083株およびSMV081株を、前述のようにaSy培地で培養した。光合成増殖後に細胞を採取し、*C.pasteurianum* 培養物と同様に処理した。最初の実験は、種々の量の陰性対照SMV083を、陽性対照として用いた*C.pasteurianum* 抽出物と共に負荷して行った。SMV083株には取り込みヒドロゲナーゼ活性が認められなかった。光合成条件で組換え*C.pasteurianum* ヒドロゲナーゼが合成される、SMV081株を用いて実験を繰り返した。指数増殖の中期および後期に細胞を採取し、7,000rpmで10分遠心分離した。沈渣を、嫌気性チャンバ中で1~1.5mlの試料緩衝液（Tris-グリシン+蔗糖）に再懸濁した。超音波処理によって細胞を破壊した後に試料を遠心分離した。上清と沈渣の双方を分析して、取り込みヒドロゲナーゼ活性の有無を調べた。沈渣をSDS緩衝液（2%SDS、0.125M Tris pH 6.8および2%2-メルカプトエタノール）に再懸濁し、上清と同じ容量とした。

取り込みヒドロゲナーゼ活性を測定するため、150 $\mu$ lの上清を8%不連続ポリアクリルアミドゲルに負荷した。800nmで測定した試料の吸光度( $A_{800}$ )（LH-II複合体の特徴的ピークと一致）は8.0~40.0であった。

電気泳動後、ゲルを前述のように処理した。図2. 6-2に得られた結果を示す。組換え株SMV081の抽出物には取り込みヒドロゲナーゼ活性バンドが検出されず、陰性対照のSMV083と同様のパターンを示した。

#### c. *R.sphaeroides* RVにおける組換え*C.pasteurianum* ヒドロゲナーゼの発現

*C.pasteurianum* ヒドロゲナーゼI遺伝子の発現を、*R.sphaeroides* RV抽出物のウェスタンブロット分析で評価した。一定量を嫌気性/明条件培養物から採取し、細胞抽出物の上清と不溶性画分の双方を分析した。試料をSDS緩衝液に再懸濁し、同等量の上清と不溶性画分をSDSゲルに負荷した。*C.pasteurianum* 抽出物を陽性対照として用いた。

電気泳動後に蛋白をメンブランに移し、このメンブランを、*C.pasteurianum* ヒドロゲナーゼのペプチドに対するポリクローナル抗血清（Dr.Miyakeの好意で供与）と

共にインキュベートした。

ウェスタンブロット実験（図2.6-3）は、この培養条件では、組換え *C.pasteurianum* ヒドロゲナーゼが *R.sphaeroides* RV細胞中に発現されることを示した。発現量は非常に低かったが、50%以上の蛋白が可溶性画分中に含まれていた。

*C.pasteurianum* ヒドロゲナーゼの発現量が低いのは、蛋白の毒性、翻訳開始（Shine-Dalgarno配列）の効率が低いこと、*C.pasteurianum* と *R.sphaeroides* のコドン利用の違い、mRNAの不安定性および組換え蛋白の分解などの多様な要因によるものかも知れない。

#### d.GC分析

*R.sphaeroides* 細胞中に発現された組換え *C.pasteurianum* ヒドロゲナーゼの機能性を評価する別な実験として、嫌気性／明条件で培養した培養物のヘッドスペース中のガス相についてGC分析を行った。図2.6-4に示すように、SMV081株から採取した試料中では水素ピークを検出できなかった。

総合すると、これらの実験データは、使用した実験条件では、組換え *C.pasteurianum* ヒドロゲナーゼが *R.sphaeroides* 細胞中に機能的に発現されないことを示している。

活性が発現されなかったことは、細胞質酸化還元状態の違い、組換え酵素ないしは本来の電子キャリアの立体構造の変化、金属クラスターの不適切な会合、ビルビン酸の酸化およびそれと同時に起こる低電位酸化還元蛋白の還元に関与する酵素である *R.sphaeroides* ビルビン酸-フェレドキシン酸化還元酵素との相互作用欠落などの幾つかの理由に起因するのかも知れない。

恐らく成熟過程に含まれる補助的蛋白の必要性は、同じヒドロゲナーゼをシアノバクテリアで機能的に発現できるという証拠によって否定されている。

### 2.6.4 *R.sphaeroides* RVからの取り込みヒドロゲナーゼ突然変異株：廃棄物由来培地を用いる光誘導水素生産試験

#### (1) 緒言

前年度に、抗生物質トリメトプリムに対する耐性をエンコードするカセットを用いた、大サブユニットをエンコードする遺伝子 *hupL* のインターポゾン突然変異によって、機

能性取り込みヒドロゲナーゼを合成できない*R. sphaeroides* RV突然変異株SMV089を得た。ヒドロゲナーゼ二量体内の大サブユニットの不活化は、この破壊が機能レベルで最も有害であることを考慮すれば、我々の考えでは、取り込みヒドロゲナーゼ欠損株を得る最も効率の高い方法である。大サブユニットは触媒部位を含み、この触媒部位はニッケルと鉄原子の二核性クラスターで構成される。突然変異株SMV089の遺伝的および生理的特性を、サザンブロット分析と種々の培地での培養によって検討した。さらに、機能性取り込みヒドロゲナーゼ合成能力がないこと、すなわち、分子水を消費する能力がないことは、分光光度法によってメチレンブルー還元測定を用いて確認された（平成9年度成果報告書参照）。

平成10年度は、この株を1Lの光バイオリアクターで試験して、特に水素発生速度に関する水素生産機能を評価し、野性株と比較し、種々の実験条件で試験した。以前のPHA欠損株の評価と同様に、発酵試験を、廃棄物由来培地を用いて行った。

## (2) 結果および考察

表2. 6-1に、SMV089株について行った光誘導水素生産試験を示す。

発酵試験、A1、B1、C1およびE2は、3種の市場廃棄物のバッチを用いて標準希釈率(1:10)で行った。これらの実験は、市場廃棄物の基本的成分の濃度がバッチごとに異なるという事実を考慮して、SMV089株の性能を評価するために行った。廃棄物由来培地の各バッチごとに、比較評価を行うために、野性株でも発酵試験を行った。

発酵試験B2、C2およびDは、NaCl(0.3%)の存在下または非存在下に市場廃棄物の希釈率を変えて(1:20)で行い、発酵実験の際に時折り起こる細胞凝集物形成が培地組成と関係があるかどうか、ならびに塩の添加によってこの現象を防げるかどうかを確認するために行った。この点に関して、実験データは、市場廃棄物の希釈率が高い場合に水素発生速度と凝集物形成に好ましい影響を及ぼすが、凝集物形成を完全に防ぐのは不可能であることを示している。我々は、この欠点がバッチ組成に関係があるという結論を下したが、この現象の原因となる成分は特定できなかった。さらに、NaCl塩を加えてもこの細胞凝集を防げなかった。

発酵試験F3、H3およびJ3は、真空またはアルゴン気流下に行い、持続時間でも生産速度でも、光誘導水素生産を促進する実験条件をさらに最適化するために実施した。初期成績は、真空はSMV089株の全般的性能を増強しないが、アルゴン気流は、発酵持続時間

とガス発生速度の双方に好ましい影響を示し、光誘導生産される水素の総量増加をもたらすことを示している。これらの1L規模の試験で用いた発酵条件および測定した分析パラメータは図2. 6-5に挙げている。

得られた最も有意義な結果について、以下の諸節で詳述する。特に、突然変異株SMV089と野性株（両株とも同じバッチの廃棄物由来培地で培養した）の性能の比較評価のために用いた発酵実験E2、ならびに3種のバッチの市場廃棄物（番号1、2、3）を用いた突然変異株SMV089の性能を確認するために用いた試験A1、C1およびE2の結果について詳述する。

#### a. SMV089株と野性株の光誘導水素生産の比較

両株を、グリセロール保存株から10mlのaSy培地に接種し、次いで、好気性/暗条件下に30℃で2日間培養した。次いで、培養物を、その後の一段階ケモスタットで用いる市場廃棄物由来培地を入れた密封バイアルに移して嫌気性/明条件下に30℃で培養した。培養は2日間行った。

発酵培地は、市場廃棄物の酸産生発酵から由来する高含率の乳酸を含むシロップで（平成7年度のLSC活動年次報告参照）、蒸留水で1:10希釈した後に下記の栄養添加を行った。

0.4g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 2.8mg/l  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 0.75mg/l  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0.24mg/l  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  
2.1mg/l  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0.041mg/l  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ; 0.75mg/l  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ;  
0.1g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 10mg/l  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

この培地は0.22 $\mu\text{m}$ のMilliporeフィルタで濾過滅菌した。

培養試験を、マグネチックスターを備えた1リットルの光バイオリアクタで行った（平成7年度のLSC研究活動年次報告参照）。培地を加えた後に、事前に調製しておいた嫌気性培養物を接種し、無菌無酸素アルゴンでフラッシュした。照明は2個のハロゲンランプ（それぞれ100ワット）で行い、照度は6.0kluxに設定した。pHは自動的に1N NaOH または1N HClの添加によって7に維持した。発生したバイオガスをTriton wet testガスメータで定量的に測定した。

培養物はバッチで24時間維持し、水素の生産開始直後に連続培養に切り換えた。

培地の流入量(F)は31ml/時に固定した。リアクタの容積(V)が930mlであるので、希釈率(D=F/V)は0.033/hであった。流水貯留時間(HRT=1/D)は30hであり、これは、理論的には基質の全交換が30時間ごとに起こることを意味する。

特に、次に示すパラメータを発酵実験で評価した。

－細胞密度(OD600nm) (図2.6-6)

－細胞乾燥重量

－Bchl含量(A775nm) (図2.6-7)

－乳酸消費 (g/lリアクタ単位、GC分析による)

－PHB含量 (メタノリシスおよびGC分析による) (図2.6-8)

－発生した水素 (総量) (図2.6-13)

－水素発生速度 (ml/lリアクタまたはg乾燥重量/日) (図2.6-11、図2.6-12)

PHB含量については、GC分析は、両株で $\beta$ -ヒドロキシ酪酸のメチルエステルの特徴的ピークの存在を示した。図2.6-8に示すように、PHB値は最大値であり、発酵の最終日には突然変異株でも野性株でも同じ範囲であった(乾燥重量ベースでの約5%)。しかし、突然変異株では、実験全体におけるPHB蓄積は野性株より低かった。酵素活性については、ニトロゲナーゼをアセチレン還元法<sup>1)</sup>およびGC分析で測定し、取り込みヒドロゲナーゼ活性はメチレンブルー還元法で測定した<sup>2)</sup>。

特に、ニトロゲナーゼ活性測定は次のように行った。アルゴン雰囲気下に維持した光バイオリアクタから培養物を6ml採取し、20mlの試験管に入れてserum栓で密封した。試料を30℃で攪拌下および照明下(200ワット)で5分間インキュベートした。次いで、2mlのアセチレンを加え、ヘッドスペースから50 $\mu$ lのガス相を種々の時点に採取し(0、5、15および20分)、GCで分析した。使用したカラムは、長さ2m、直径1mmのHayeSep<sup>®</sup> Sであった。測定は、Heをキャリアーガス(6ml/分)として用いて45℃で行い、測定時間を5分とした。

得られた結果は、実験時間全体にわたって、突然変異株では野性株よりニトロゲナーゼ活性が高かったことを示している(図2.6-9)。

取り込みヒドロゲナーゼの活性測定では、1mlの20mMトリス塩酸pH8および120 $\mu$ Mのメチレンブルーを、刺入可能セプタムを有するブラインドニップルを付けた糸模様付きガラスキューベットに入れた。このキューベットを密封し、ゴム製セプタムに刺入した針から分子水素を溶液に5分間通気した。50 $\mu$ lの嫌気性培養物をマイクロシリンジで注入し、キューベットを直ちに分光光度計に設置した。570nmで青色消失の推移を追跡した。得られた曲線の勾配は酵素活性と正相関する。図2.6-10に示すように、突然変異株では取り込みヒドロゲナーゼ活性は検出されず、ニトロゲナーゼ複合体によ

って産生された水素をSMV089が消費できないことが確認された。

持続時間については、突然変異株SMV089の性能は野性株と同様であり、最も有意義な結果は、リアクタのリットル数あたりおよび細胞のグラム重量あたりで表した水素発生速度に関するものである。突然変異株は、実際、実験期間全体で、野性株より高い発生速度を示した（図2.6-11および図2.6-12）。この1日発生速度の上昇は、野性株と比較して高い光誘導総水素生産量(+50%)をもたらす（図2.6-13）。これらの結果は、廃棄物由来培地の種々のバッチで確認された。

上記のデータから、突然変異株SMV089の高い生産性は、ニトロゲナーゼ活性が高いことと、取り込みヒドロゲナーゼ酵素不活化による水素再利用能力が消失していることの結果であると結論できる。

#### b. 種々のバッチの市場廃棄物によるSMV089株の光誘導水素生産

次に、培養基質として用いた種々の市場廃棄物に関する多様性を考慮して、突然変異株の性能を評価した。発酵試験は、上記で既に述べたものと同じ実験条件で行った。下記の表に、3種の培地バッチで培養した突然変異株SMV089で測定した光誘導水素生産速度を示す。特に、表2.6-2はリアクタ容積リットルあたりの値を示し、表2.6-3は細胞乾燥重量グラムあたりの値を示す。

これらのデータは、ある程度の変動性があるものの、突然変異株SMV089の高い水素生産能力が確認され、特に培養基質として用いた廃棄物のバッチに関する培養試験の後期で特に顕著であった。同じ条件での野性株の値は平均して常に低かった（通常は、発酵の最初の4〜7日間、リアクタ容積リットルあたりでは1.2ml/日、乾燥重量グラムあたりでは1.8ml/日）。

### 2.6.5 合成培地を用いるバッチ培養条件における *R. sphaeroides* RVからの突然変異株の比較評価

我々の突然変異株の性能評価を野性株と比較して行うため、我々は、固定組成の合成培地を用いて、バッチ条件と連続培養条件の双方で光誘導水素生産試験を設定した。

(2.6.6参照)。

これらの実験の最終目的は、すべての協同研究者が同じ培養条件で異なる株を用いて得たデータあるいは異なるシステムで培養した同じ株で得たデータとの比較を可能にするこ

とであった。表2.6-4に、合成培地を用いてバッチ条件で行った光誘導水素生産について示す。

これらの1.4L規模の試験で用いた発酵条件および測定した分析パラメータは図2.6-14にまとめている。突然変異株と野性株を比較して得られた最も有意義な結果については、以下で詳述する。

培養は、水素生産が零になるまで延長した。即ち、SMV071では7日間、SMV087およびSMV089では8日間、野性株SMV047では10日間である。

培地のpHは、最初に1N NaOH添加によって7に固定したが、検討したすべての株で漸進的に酸性化した(図2.6-15)。この現象は、突然変異株SMV087(PHAマイナス/HUPマイナス)およびSMV071(PHAマイナス)の場合に特に顕著であり、PHA合成酵素欠損との相関性を示唆している。

細胞密度(図2.6-16)については、平均して、突然変異株SMV071(PHAマイナス)およびSMV087(PHAマイナス/HUPマイナス)のOD値は野性株よりやや低く、SMV089(HUPマイナス)のOD値は有意に低く、実験終了時のODは野性株と比較して約50%低かった。

Bchl含量に関しては、SMV047株(WT)で測定した値は、図2.6-17に示すように、突然変異株より高い。特に、SMV047(WT)およびSMV089(HUPマイナス)は同様の挙動を示し、初期値は最終値より高いが、突然変異株SMV071(PHAマイナス)とSMV087(PHAマイナス/HUPマイナス)では逆方向の変化がみられた。この挙動は恐らくPHA突然変異と関係がある。なぜなら、PHA産生とBchl含量が逆相関すると報告されているからである<sup>3)</sup>。

ニトロゲナーゼ活性は、平均で、突然変異株SMV089(HUPマイナス)では野性株より高いが、突然変異株SMV071(PHAマイナス)およびSMV087(PHAマイナス/HUPマイナス)では有意に低い(図2.6-18)。そのタイムコースはSMV047(WT)でもSMV089(HUPマイナス)でも同様であり、酵素活性は実験時間中に上昇し(それぞれ+41%および+67%)、一方突然変異株SMV071(PHAマイナス)およびSMV087(PHAマイナス/HUPマイナス)では変化がみられなかった。

取り込みヒドロゲナーゼ活性はHUPマイナス株だけで測定した。4日間および5日間の培養後に採取した2試料の突然変異株SMV071(PHAマイナス)は対応する野性株の試料より高い値を示した(図2.6-19)。これは、少なくともその期間ではPHAマイナス突然変異株の取り込みヒドロゲナーゼの方が水素再利用に活動的に関与していることを示している。

PHBマイナス株で測定したPHB含量は、平均で、SMV047(WT)およびSMV089(HUP

マイナス)と同様であり、実験期間全体で1%未満であった(図2.6-20)。この低い百分率は、合成培地を用いた場合に水素産生とPHA蓄積の競合が強くないことを示している。PHB蓄積のタイムコースが異なるのは注目に値する。なぜなら、野性株では最終値が低下し、突然変異株では実験中に一貫して上昇し続けるからである。

光誘導水素生産能力については、 $\text{ml}/(\text{lリアクタ} \cdot \text{日})$ および $\text{ml}/(\text{g乾燥重量} \cdot \text{日})$ 単位で表した水素発生速度の比較をそれぞれ図2.6-21および図2.6-22に示し、発生ガス総量を図2.6-23で比較している。

合成培地を用いたバッチ条件での性能の解析を行うため、各株について、種々のパラメータ間の相関関係を考慮し、図2.6-24~27に示した。

これらの実験条件で得られた最も有意義な結果を表2.6-5にまとめた。

バッチシステムは、水素生産能力を評価するための最適条件ではない。実際、攪拌と水素除去が行われず、pHが不安定で、照度とBchl含量が低く、水素阻害が起こる可能性がある。

SMV047(WT)でもSMV089(HUPマイナス)でも同様の量の水素が発生するが、発生速度は突然変異株の方が高い(10日が8日に短縮)。突然変異株SMV071(PHAマイナス)は7日間で、野性株より40%少ない水素を産生し、二重突然変異株SMV087は8日間で野性株より24%少ない水素を産生する。

すべての突然変異株が、平均して、野性株より低い乾燥重量を示す。これはSMV089(HUPマイナス)株に最もよくあてはまり、この株ではOD値が実験中に低下し、実験終了時点では野性株より約50%低い。このOD低下は細胞溶解ないしは細胞沈着現象によるのかも知れない。この挙動を確認するためにさらに研究を行う必要がある。

すべての突然変異株で、平均比水素生産速度は野性株より高い。特に、SMV089(HUPマイナス)ではこの値が70%高い。

突然変異株SMV089(HUPマイナス)だけが野性株と同じ程度の水素収率を示し、他の株では値が低く、特にSMV071(PHA)では顕著である。

野性株と比較すると、平均1日水素生産量はSMV089(HUPマイナス)株では有意に高く(約30%)、SMV087(PHAマイナス/HUPマイナス)株では同様に、突然変異株SMV071(PHAマイナス)の場合はやや低い。

その全般的性能については、我々は、合成培地によるバッチ条件では、SMV089(HUPマイナス)株は、以前に市場廃棄物を増殖培地として用いた連続培養で得られた好ましい結

果を裏付けているが、他の2つの突然変異株の性能は野性株と同様である。これは、恐らく、この培養条件ではPHAマイナス表現型が水素産生能力に関して利点にならないという事実による。なぜなら、低いPHB含量の測定値によって裏付けられているように水素産生とPHA蓄積の競合が強くないからである(1%未満)。

## 2. 6. 6 合成培地を用いる連続培養条件における *R.sphaeroides* RVからの突然変異株の比較評価

前述のように、合成培地を用いる光誘導水素生産比較試験も連続培地で行った。

表2. 6-6に示す実験を行った。

発酵条件および測定した分析パラメータは図2. 6-28にまとめている。突然変異株と野性株を比較して得られた最も有意義な結果については、以下で詳述する。

試験は、水素生産が零になるまで延長し、突然変異株SMV089 (HUPマイナス) およびSMV087 (PHAマイナス/HUPマイナス) については発酵をそれぞれ20日および18日行った。これはそれぞれ、17日しか発酵が続かなかった野性株よりそれぞれ3日および1日長いことを意味する。突然変異株SMV071 (PHAマイナス) の発酵は16日しか続かなかった。

細胞密度に関する限り (図2.6-29)、平均で、突然変異株のOD値は野性株よりわずかに低く、いずれも同様のタイムコースである。バッチ条件とは異なり、連続培養では突然変異株SMV089 (HUPマイナス) の増殖速度は他の株と同じ方向である。これは、バッチ培養が最適条件ではなく、特に突然変異株HUPマイナスの測定では顕著であることを裏付けている。

Bchl含量については、SMV047(WT)の測定値は、図2. 6-30に示すように、平均して突然変異株の値より高い。特に、タイムコースはすべての株で同様であり、突然変異株SMV071 (PHAマイナス) およびSMV087 (PHAマイナス/HUPマイナス) のBchl含量は発酵終了時に上昇傾向を示さない場合でも、最終値が初期値より高い。平均して、Bchl含量はすべての株でバッチ条件より高い。

ニトロゲナーゼ活性の平均値は突然変異株SMV087 (PHAマイナス/HUPマイナス) が最も高く、SMV047(WT)ではそれよりやや低く、突然変異株SMV071 (PHAマイナス) およびSMV089 (HUPマイナス) では大幅に低い (図2.6-31)。そのタイムコースは、SMV047(WT)、SMV089 (HUPマイナス) およびSMV087 (PHAマイナス/HUPマイナス) では同様である。酵素活性は実験中に低下する傾向がある。この酵素活性の低下は野性株で顕著であり(-60%)、

突然変異株SMV089 (HUPマイナス) (-36%)ではそれほど顕著ではなく、SMV087 (PHAマイナス/HUPマイナス) (-19%)ではわずかである。一方、突然変異株SMV071 (PHAマイナス)では酵素活性はほぼ一定していた。

取り込みヒドロゲナーゼ活性測定はHUPマイナス株だけについて行った。平均して、酵素はSMV047(WT)株の方がSMV071 (PHAマイナス) より活性が高い (図2.6-32)。取り込みヒドロゲナーゼのタイムコースは両株とも同様であり、初期活性は最終活性より高い。この活性低下は野性株では約32%で、SMV071 (PHAマイナス) では最終値は初期測定値より約70%低い。

PHBマイナス表現型を有する株で測定したPHB含量の値とそのタイムコースは、概して、SMV047(WT)でも突然変異株SMV089 (HUPマイナス) でも同様である (図2.6-33)。最大値は実験開始時に測定され(約2%)、その後、両株ともPHB含量が低下して1%になる。合成培地を使用した実験で既に述べたように、バッチ条件でも連続培養条件でも、水素産生とPHA蓄積の間の競合は強くない。PHB蓄積のタイムコースについては、連続培養における突然変異株SMV089 (HUPマイナス) の挙動はバッチ条件と異なるが、PHB含量が同じ程度であることは特筆すべきである。

光誘導水素生産能力については、 $\text{ml}/(\text{lリアクタ} \cdot \text{日})$ および $\text{ml}/(\text{g乾燥重量} \cdot \text{日})$ で表した水素発生速度の比較を図2.6-34および図2.6-35に示し、発生ガス総量を図2.6-36で比較している。

合成培地を用いたバッチ条件での性能の解析を行うため、各株について、種々のパラメータ間の相関関係を考慮し、図2.6-37~40に示した。

これらの実験条件で得られた最も有意義な結果を表2.6-7にまとめた。

合成培地を用いた連続培養で得られた上記の実験データから以下の結論を導ける。

水素の総産生量については、突然変異株SMV089 (HUPマイナス) およびSMV087 (PHAマイナス/HUPマイナス) は、それぞれ20日および18日で野性株より60%および15%多い水素を産生するが、SMV071 (PHAマイナス) は16日で野性株より36%少ない水素を産生する。

バッチ条件とは異なり、連続培養では、突然変異株SMV089 (HUPマイナス) と野性株は同様の平均細胞乾燥重量(CDW)を示し、突然変異株SMV087 (PHAマイナス/HUPマイナス) およびSMV071 (PHAマイナス) の値はやや低い。いずれにしても、すべての株でCDW値はバッチ条件で測定した値より高い。これは、阻害性代謝物質が蓄積しないことおよび連続培養に用いた培養条件の双方に関係があるのかも知れない。実際、HRT (30時間) は倍增時

間より長い（8時間、以前に認められたものと同じ）。したがって、この点については、前述のように、バッチ培養は最適培養条件ではない。

平均比水素生産については、両突然変異株SMV089（HUPマイナス）およびSMV087（PHAマイナス／HUPマイナス）が、野性株と比較して優れた性能を示している。実際、平均比水素生産速度は、野生株よりそれぞれ33%および30%高い。一方、突然変異株SMV071（PHAマイナス）の値は野性株より24%低い。

最も高い水素生産量は二重突然変異株SMV087（PHAマイナス／HUPマイナス）で得られ、野性株と突然変異株SMV089（HUPマイナス）では同様の値が得られ、SMV071（PHAマイナス）株は最も低い水素生産量を示す。

平均1日水素生産量は、野性株と比較すると、SMV089（HUPマイナス）株では有意に高く（約34%）、突然変異株SMV087（PHAマイナス／HUPマイナス）では同じ程度、突然変異株SMV071（PHAマイナス）では有意に低い。

したがって、突然変異株SMV089（HUPマイナス）およびSMV087（PHAマイナス／HUPマイナス）では、合成培地を用いて連続培養で得られた結果は以前に同じ培養条件で市場廃棄物を基質として用いて得られたものと一致する。実際、水素産生能力の改善が、特に突然変異株SMV089（HUPマイナス）の場合に得られた。

バッチ条件で行った試験の結論で述べたように、合成培地を用いた場合、PHA蓄積能力を消失させる突然変異は、水素生産能力に関しては利点ではなく、むしろ欠点になる。これは、同じ培養条件で市場廃棄物を基質として用いて認められたものと異なる。後者の場合、実験終了時のPHB含量が約5～25%であったという事実によって裏付けられるように、二つの代謝経路の間の競合は強いが、合成培地を用いる場合は1%以下である。

市場廃棄物由来培地と合成培地の双方で得られた全般的性能に基づけば、突然変異株SMV089（HUPマイナス）およびSMV087（PHAマイナス／HUPマイナス）の連続培養法は突然変異株SMV071（PHAマイナス）の連続培養より実用的であると思われる。実際、SMV071（PHAマイナス）使用の利点は、PHAを誘発する炭素源のない基質を用いる場合は顕著ではない。

## 2. 6. 7 *R.sphaeroides* RVからのPHA/取り込みヒドロゲナーゼ二重突然変異株：

### 廃棄物由来培地を用いる光誘導水素生産試験

#### (1) 緒言

前年度に、機能性取り込みヒドロゲナーゼ合成もPHA蓄積も行えない*R.sphaeroides* RV二重突然変異株SMV087を、水素過剰生産株の分離に向かう一歩として構築した。この二重突然変異株は二段階インターポゾン突然変異によって得られ、この突然変異によってphaC合成酵素遺伝子と取り込みヒドロゲナーゼ大サブユニットhupLがいずれも破壊されている。

SMV087株の遺伝的および生理的特性を、サザンブロット分析と種々の培地での培養によって検討した。そして、我々は、細菌のエネルギー貯蔵と供給の双方に必須の2つの代謝経路に影響するこれらの突然変異が同じ細菌に同時に存在できることを確認できた。

機能性取り込みヒドロゲナーゼを合成できないこと、すなわち、分子水素を消費する能力がないことは、分光光度法によってメチレンブルー還元測定を用いて確認された（平成9年度成果報告書参照）。

平成10年度に、この株を1Lの光バイオリアクタで試験して、特に水素発生速度に関する水素生産機能を評価し、野性株と比較し、種々の実験条件で試験した。これらの発酵試験は、以前にPHAマイナスおよびHUPマイナス欠損株を評価するために行ったのと同様に、廃棄物由来培地を用いて行い、2つの突然変異の組み合わせによって相乗効果が生じるかどうかを確認できた。

#### (2) 結果および考察

表2. 6-8に、SMV089株について行った光誘導水素生産試験を示す。

発酵試験、F2、G2、H2およびL2は、3種の市場廃棄物のバッチを用いて標準希釈率(1:10)で行った。これらの実験は、市場廃棄物の基本的成分の濃度がバッチごとに異なるという事実を考慮して、SMV087株の性能を評価するために行った。前述したように、廃棄物由来培地の各バッチごとに比較評価を行うため、野性株でも発酵試験を行った。二重突然変異株SMV087でも、突然変異株SMV089で行ったのと同様に、アルゴン気流下の発酵試験（G3およびL3）を設定した。これは、持続時間でも速度でも、光誘導水素生産を促進する実験条件を探究するために実施した。初期成績は、HUPマイナス突然変異株SMV089で確認されたように、アルゴン気流は発酵持続時間とガス発生速度の双方に好ま

しい影響を示し、したがって、光誘導生産される水素の総量増加をもたらす。

これらの1L規模の試験で用いた発酵条件および測定した分析パラメータは、2.6.4で既に述べたものと同じであり、図2.6-5に挙げている。

得られた最も有意義な結果について、以下の諸節で詳述する。特に、突然変異株SMV087と野性株（両株とも同じバッチの廃棄物由来培地で培養した）の性能の比較評価のために用いた発酵実験L2、ならびに2種のバッチの市場廃棄物（No.3および4）を用いた突然変異株SMV087の性能を確認するための試験H2およびL2の結果について詳述する。

#### a. SMV087株と野性株の光誘導水素生産の比較

両株を、グリセロール保存株から10mlのaSy培地に接種し、次いで、好気性／暗条件下に30℃で2日間培養した。次いで、培養物を、その後の一段階ケモスタットで用いる市場廃棄物由来培地を入れた密封バイアルに移して嫌気性／明条件下に30℃で培養した。培養は2日間行った。

発酵培地は、市場廃棄物の酸産生発酵から由来する高含率の乳酸を含むシロップで（平成7年度のLSC活動年次報告参照）、蒸留水で1:10希釈した後に下記の栄養添加を行った：

0.4g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 2.8mg/l  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 0.75mg/l  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0.24mg/l  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  
2.1mg/l  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0.04mg/l  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ; 0.75mg/l  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0.1g/l  
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 10mg/l  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

この培地は0.22 $\mu\text{m}$ のMilliporeフィルタで濾過滅菌した。

培養試験を、マグネチックスターラを備えた1リットルの光バイオリアクタで行った（平成7年度成果報告書参照）。培地を加えた後に、事前に調製しておいた嫌気性培養物を接種し、無菌無酸素アルゴンでフラッシュした。照明は2個のハロゲンランプ（それぞれ100ワット）で行い、照度は6.0kluxに設定した。pHは自動的に1N NaOHまたは1N HClの添加によって7に維持した。発生したバイオガスをTriton wet testガスメータで定量的に測定した。

培養物はバッチで24時間維持し、水素の生産開始直後に連続培養に切り換えた。

培地の流入量(F)は31ml/時に固定した。リアクタの容積(V)が930mlであるので、希釈率( $D=F/V$ )は0.033h<sup>-1</sup>であった。流水貯留時間( $\text{HRT}=1/D$ )は30hであり、これは、理論的には基質の全交換が30時間ごとに起こることを意味する。

特に、下記のパラメータを発酵実験で評価した。

(図2.6-47および図2.6-48)。しかし、発酵4～5日目の値は同様である。その後は、野性株の水素発生速度は低下し、二重突然変異株の値は上昇し、高値をより長時間維持し、低下後にプラトーに達する。発酵持続時間の延長と1日生産速度の増加によって、総光誘導水素生産量が野性株と比較して増加した(+223%) (図2.6-49)。

上記のデータと以前に単一突然変異株SMV071およびSMV089で得られた結果から、二重突然変異株SMV087の高い生産性が、ニトロゲナーゼによって発生した水素を再利用する能力とPHA蓄積能力の双方に影響を及ぼす二つの突然変異の相乗効果の結果であると結論できる。

#### b. 種々のバッチの市場廃棄物によるSMV087株の光誘導水素生産

次に、培養基質として用いた種々の市場廃棄物の多様性を考慮して、二重突然変異株の性能を評価した。発酵試験は、上記で既に述べたものと同じ実験条件で行った。

表2.6-9及び表2.6-10で、市場廃棄物培地の2つのバッチで培養した二重突然変異株SMV087による同じ期間の発酵で測定した光誘導水素生産速度を比較した。特に、表2.6-9はリアクタ容積リットルあたりの値を示し、表2.6-10は細胞乾燥重量グラムあたりの値を示す。

基質とした廃棄物の違いから試験開始時と終了時に特に顕著な変動がみられたが、これらのデータによって、二重突然変異株SMV087の高い水素生産能力が確認された。なぜなら、同じ培養条件で培養した野性株の値が、低いかまたは同様に、持続時間が短かったからである。さらに、野生株の光誘導水素生産の持続期間は、一貫して短かった。

結論として、二重突然変異株SMV087の水素発生速度の最高値は、平均して、単一突然変異株SMV089で測定された値より低い、常に野性株より高い(一般に、最初の4～7日間の発酵では、リアクタ容積リットルあたり約1.2ml/日、乾燥重量グラムあたり1.8ml/日)。

2. 6. 8 Mo-ニトロゲナーゼ制御遺伝子 *nifA1* および *nifR2/R1* の分離：配列決定、および *R. sphaeroides* RV 取り込みヒドロゲナーゼ突然変異株 SMV089 へのクローニング

## (1) 緒言

水素発生量に影響を及ぼす酵素活性を取り除いた突然変異株の分離に加えて、我々は、*R. sphaeroides* RV から水素過剰生産株を得るための第2の戦略、主ニトロゲナーゼ複合体活性化に関与する制御遺伝子の過剰発現に取り組んでいる。組換え *C. pasteurianum* ヒドロゲナーゼを *R. sphaeroides* 中に発現させた場合に機能的に不活性であるなら、合成細菌のニトロゲナーゼ活性の改善は、エネルギー的には非効率的であるが、一つの代替案である。

これを考慮して、1L規模光バイオリアクタで最高の性能を示した突然変異株を母体として、さらに生産能力が高い第二世代の突然変異株を作出することを計画した。検討対象の制御遺伝子は、プロモニアが存在しない場合にニトロゲナーゼ酵素の転写活性化に関与する窒素検知回路の二つの成分である *nifR2/R1* 遺伝子と、酸素濃度に反応するニトロゲナーゼ転写の正の制御に関与する酸素検知回路の中心的制御因子である *nifA1* 遺伝子である<sup>1)</sup>。

これらの制御遺伝子の過剰発現のための宿主について、我々は、取り込みヒドロゲナーゼを持たない SMV089 株を選択した。その理由は、その水素発生速度が野生株と比較して大きく改善されているからである。

平成9年度に、 $\Delta$ DNAについて行ったPCR増幅によって、*R. capsulatus* からの完全な *nifA1* 遺伝子と *R. sphaeroides* RV から *nifR1* 遺伝子の中心部分を分離できた。本年度は、この二つの制御遺伝子の分離、配列決定およびサテライトクローニングを完了した。特に、*R. sphaeroides* RV から *nifR2/R1* 遺伝子を分離し、完全に配列を決定し、以後の *R. sphaeroides* への導入の準備段階として *E. coli* へのサテライトクローニングを行った。

*R. capsulatus* からの *nifA1* 遺伝子は、誘導 *pucBA* プロモータの制御下に発現トラスミ PSM830 にクローニングし、次いで、この構築物を接合によって HUP マイナス突然変異株 SMV089 に導入した。

## (2) 結果および考察

### a. *R. sphaeroides* RV *nifR2/R1* 遺伝子の分離および配列決定

前年度は、センサーヒスチジンキナーゼおよび転写活性化因子を同種発現のために利用できるように *nifR2* 遺伝子と *nifR1* 遺伝子を共に含む *R. sphaeroides* RVゲノムフラグメントをPCRによって分離することを試みたが、成功しなかった。

*R. sphaeroides* RV株からの単一 *nifR1* 遺伝子配列に基づくプライマを用いる、もっと小さなPCR産物を増幅するためのもう一つのPCR増幅によって、我々は、転写活性化因子をエンコードする *nifR1* 遺伝子の中央部(約800bp)を *R. sphaeroides* RVから分離することに成功した。

$\sigma^{54}$ 細菌エンハンサー結合蛋白(EBPs)のファミリー制御蛋白に関する構造および機能試験(6)によれば、得られたPCR産物は、全EBPファミリーの共通の特徴である *nifR1* のN-末端領域の一部が保存されており、高度に保存された中央領域の大半を含んでいる。

*nifR1* 遺伝子の配列決定を行うため、また、近縁細菌でみられる物理的構造によれば、そのすぐ上流に存在すると思われる *nifR2* を分離するため、IPCR反応を行った。

以前に決定された *R. sphaeroides* RV *nifR1* の配列に基づいて、二つの方向の異なるプライマを合成した。

R.s.RVnifR1Fw1およびR.s.RVnifR1Rv1と名付けた二つの新しいプライマは下記の通りである。

R.s.RVnifR1Fw1: 5'-CTTCTGGCCGACCATTTCTC-3'

R.s.RVnifR1Rv1: 5'-CACCGGCGCGGGCGCTTCAT-3'

テンプレートとして、数種の酵素(ClaI、PvuI、BamHI、PvuII、BstEII、NdeI、StuI、EcoRI、MscI、SphIおよびApaI)で切断した *R. sphaeroides* RVゲノムDNAを用いた。

IPCR反応は、MasterAmp PCR最適化キット(Epicentre Technologies)を用いて行い、切断して自己結合させた *R. sphaeroides* RVゲノムDNA(500ng)、50pmoleの各プライマおよび2.5単位のAmplitherm DNAポリメラーゼ酵素を最終容量50 $\mu$ lに含んでいた。

この増幅プログラムは、最初の95℃で5分の変性、95℃で1分の2回目の変性、次いで60℃で1分のアニーリング、および72℃で3分の伸長であった。25回の増幅サイクルを行った。下記に述べるPCRおよびIPCRは、特に断らない限り、いずれもこれらの実験条件に従って行った。

アガロースゲル分析（図2.6-50）は、PvuI(約2.9Kb)、StuI(約1.1Kb)、PvuII(約0.8Kb)による切断の場合だけ特異的IPCR産物を示し、EcoRI、MscIおよびSphIで切断したゲノムDNAでは増幅産物は得られなかった。PvuI(2.9Kb)、StuI(1.1Kb)によって生産されたDNAフラグメントを選択して配列決定を行った。これら2つのICPR試料を分取して、同じ増幅プライマを用いる直接配列決定に使用した。この配列分析によって、*R.sphaeroides* RV *nifR1* 遺伝子の3'部分の全配列と5'領域の大部分の配列を決定できた。

*R.sphaeroides* RV *nifR1* 遺伝子の配列決定領域を延長するため、さらにICPR実験を行った。*nifR1* 遺伝子についてすでに決定された配列に基づいて、StuIに加えて2種の酵素(Nae I およびPst I)と下記のプライマを使用した。

R.s.RVnifR1Rv2 : 5'-GGAGGTCGCGTGACCTTGCAGC-3'

R.s.RVnifR1Fw2 : 5'-CATCGTGATCTCGGCGCAGAAC-3'

アガロースゲル分析（図2.6-51）は、NaeI消化では約1.9KbのIPCR産物を示している、PstIで切断したゲノムDNAを用いた場合は約0.8Kbのフラグメント、酵素PstIを用いた場合は約1.2Kbのバンドを示した。最も長いIPCRフラグメント(1.9Kb NaeIおよび1.2Kb StuI)を選択して、同じ増幅プライマを用いる直接配列決定に供した。その配列分析によって、最初に*nifR1* の全配列を決定でき、次いで、予想通り*nifR1* のすぐ上流に位置する*nifR2* 遺伝子の3'領域の配列を決定できた。

次いで、1.9Kb NaeIおよび1.2Kb StuI IPCRフラグメントの配列決定を、既に決定されているDNA配列に基づいてデザインした新しいプライマで行った。

R.s.RVnifR2Rv1 : 5'-AACTGCTCCACCTGCTCGAGAA-3'

R.s.RVnifR2Rv2 : 5'-ACCGGCGCGTCGATCAGGATCC-3'

R.s.RVnifR1Fw4 : 5'-TTTCTCGGACCGGCGGACACTG-3'

この配列決定反応サイクルによって、*nifR2* 遺伝子と*nifR1* 遺伝子の両方を含む*R.sphaeroides* RVゲノムフラグメント全体の配列を決定できた。さらに、*nifR2* のすぐ上流にある*nifR3* 遺伝子の3'-領域の配列を決定した（図2.6-52）。

この配列は、アクセス番号Y17818の下にEMBLヌクレオチドデータライブラリに提出した。

b. *R. sphaeroides* RV *nifR2/R1* 遺伝子および *R. capsulatus nifA1* 遺伝子のベクタ pSM830へのサブクローニング

*R. sphaeroides* SMV089突然変異株の2つの制御遺伝子の過剰発現のためにpSM830を発現ベクタとして選択した。

この発現ベクタは誘導 *pucBA* プロモータを保持し、pSM809（平成8年度成果報告書参照）から出発して、244bpのPvuII-SfiIフラグメントを60bpの多重クローニング部位で置き換えることによって構築された（図2.6-53）。

誘導 *pucBA* プロモータの制御は、光合成に必要な領域をエンコードする遺伝子の制御と同様に、非常に厳密であり、二つの環境刺激、即ち酸素と照度に反応して起こる<sup>7)</sup>。酸素がなく照度が低い条件で、*pucBA* プロモータの活性化が最大限になる。

このプロモータを選択した理由は、制御遺伝子が、*R. sphaeroides* における光誘導水素生産の実験条件である嫌気性／明条件で過剰発現されるからである。

*R. sphaeroides* RV *nifR2/R1* 遺伝子(2502bp)および *R. capsulatus nifA1* 遺伝子(1686bp)のベクタpSM830へのサブクローニングは、IPCR増幅で前述したプロトコールに従って、ゲノムDNAからの対応するDNAフラグメントを増幅することによって行った。

以後のクローニング段階を容易にするため、制限酵素Asp718およびXbaIの認識部位をそれぞれ順プライマおよび逆プライマの端に含めた。

*nifR2/R1* 遺伝子と *nifA1* 遺伝子の増幅に用いたプライマは、これらの遺伝子の発現を最適化するようにデザインとした。即ち、一つのShine-Dalgarno(SD)配列を含むようにし、SDとATG開始コドンの間の距離を最適化した。

*R. sphaeroides* RV *nifR2/R1* 遺伝子のサブクローニングのためのプライマの配列は下記の通りであった。

R.s.RVnifR2Asp718Fw1 : 5'-CGGGGTACCAGGAGGGGGCCGCCGCATGAGCTTCCGT-3'

R.s.RVnifR1XbaIRv1 : 5'-CTAGTCTAGATTACATCAGCTTGCGGCGGCGTGTAC-3'

*R. capsulatus nifA1* 遺伝子のサブクローニングのためのプライマの配列は下記の通りであった。

R.c.nifA1Asp718Fw1 : 5'-CGGGGTACCGGGAGACGACACATGCGCTTTACGAGATCGCGAAGACC-3'

R.c.nifA1XbaIRv1 : 5'-CTAGTCTAGATCAGATCTTGCGCAGCTCGATCTCGAA-3'

PCR増幅後に、両反応試料についてアガロースゲル分析を行い、予想通りのサイズのDNAフラグメントが存在することを確認した（*nifR2/R1* 遺伝子では約2,500bp、

*nifA1* 遺伝子では1,700bp)。

次いで、試料をpSM830へのサブクローニングのために処理した。

フェノール抽出とエタノール析出後に、*R. capsulatus nifA1* 遺伝子に相当するDNAフラグメントの末端を制限酵素Asp718およびXbaIで切断した。次いで、ベクタpUC19への中間的サブクローニング段階とDNA配列決定による挿入物の確認後に、制御遺伝子*nifA1*を誘導*pucBA*プロモータの制御下で発現ベクタpSM830に導入した。

恐らくDNAフラグメントの大きなサイズに起因する、*R. sphaeroides* RV *nifR1/R2* 遺伝子に相当するPCR産物のサブクローニングの技術的困難のため、別の戦略を用いた。この場合は、実際は、pCRIIベクタ(Invitrogen)を中間サブクローニング段階として使い、Asp718およびXbaI制限酵素を使用しなかった。その後、挿入物をDNA配列決定によって確認し、誘導*pucBA*プロモータの制御下の発現ベクタpSM830に導入した。

両方の連結混合物を用いて、電気穿孔法によって*E. coli* XL1-Blu感応細胞を形質転換させた。形質転換物の培養を30 $\mu$ g/mlカナマイシンを含むLB寒天で行った。

組換え物の制限酵素分析によって両構築物の陽性クローンを判定した。これらのクローンを用いて、電気穿孔法によって*E. coli* S17-1感応細胞を形質転換させた。得られたクローンは、*R. sphaeroides* RV *nifR2/R1* 遺伝子を保持する形質転換物の場合はSMC516と名付け、*R. capsulatus nifA1* 遺伝子を保持する形質転換物はSMC518と名付けた。

#### c. *E. coli* SMC518と*R. sphaeroides* RV取り込みヒドロゲナーゼ突然変異株SMV089の接合

*R. capsulatus nifA1* 遺伝子を保持する発現ベクタpSM830の*R. sphaeroides* RV SMV089細胞への移入は接合によって行った。*E. coli* SMC518分取試料を*R. sphaeroides* RV SMV089の分取試料と混合し、細胞を固形aSy培地に塗布し、35°Cで6時間放置して接合させた。接合後に、細胞を集め、リファンピシン(150 $\mu$ g/ml)、カナマイシン(20 $\mu$ g/ml)およびトリメトプリム(25 $\mu$ g/ml)を含むaSy寒天で接合体を選択した。

30°Cで暗所に2日間放置した後に、プレート上に多数の接合体が得られた。10個のコロニーを選択して、詳細な特性検討を行った。

#### d. *R. sphaeroides* RV SMV101の分離および特性検討

選択したコロニーを、最初に、リファンピシン(150 $\mu$ g/ml)とカナマイシン(20 $\mu$ g/

ml)を含むaSyプレートに移し、次いで好気性／暗条件下で30℃で培養した。次いで、カナマイシン(20 $\mu$ g/ml)を含む液体LB培地に接種し、同じ条件で2日間培養した。次いで、2つの培養物を、いずれもカナマイシン(20 $\mu$ g/ml)を加えておいた液体aSy培地または液体水素発生培地で嫌気性／明条件下に移した。培養は、30℃で2日間、野性株と同様の速度で進んだ。コロニーからのプラスミド抽出によって、予想サイズの構築物の存在が確認された。

SMV101と名付けたクローンを選択して、市場廃棄物由来培地を用いて、1L規模のバイオリアクタでの光誘導水素生産の試験を行った。

## 2. 6. 9 結 論

異なる実験条件で行った我々の突然変異株の比較評価は、代謝を修飾した誘導体を開発することが、光誘導水素生産能力に関する野性株の性能を改善するための最も簡単で有効な戦略であることを決定的に示している。実際、我々は、速度と持続時間の双方で*R.sphaeroides* RVの光誘導水素生産性能を改善することに成功した。

この評価は、種々の系、バッチおよび連続培養で行い、廃棄物由来培地または固定組成の合成培地を用いた。

特に、市場廃棄物由来培地を用いて1L発酵装置で行った野性株とHUPマイナス突然変異株の比較によって、この突然変異株では水素発生速度が有意に高く、それに伴って総水素量が50%高くなることを示している。この生産性増強は、高いニトロゲナーゼ複合体活性と水素再利用能力の欠如の双方に起因すると思われる。

同じ培養条件でのPHAマイナス／HUPマイナス突然変異株の性能については、実験結果は、この場合は、二つの突然変異の併合効果によって、水素発生速度と光誘導水素生産の持続時間の双方が改善されたことを示している。量的には、この改善は持続時間の275%延長と総水素生産量の223%増加に相当する。

合成基質を用いてバッチ培養条件で得られた実験データでは、我々の突然変異株の好ましい性能は部分的にしか確認されなかった。これは、恐らく、第一に培養条件、次にPHAマイナス表現型に起因する。バッチシステムは、実際は、水素生産能力を評価するための最適条件ではない。なぜなら、攪拌と水素除去が行われず、pHが不安定で、照度とBchl含量が低く、水素障害が起こる可能性があるからである。さらに、この合成培地を用いると、PHAマイナス表現型は利点ではなく、むしろ欠点になる。なぜなら、低いPHB含量で裏付け

られるように水素発生とPHA蓄積の競合関係が強くないからである。それでも、HUPマイナス突然変異株の性能は野性株のそれよりはるかに高いことが認められた。実際、その平均1日水素生産量は親株より70%高い。これは、HUPマイナス突然変異株が同じ量の水素をより短時間で発生させることを意味している。

一方、同じ合成培地を用いて行った連続培養によって、HUPマイナスとPHAマイナス／HUPマイナスの双方で好ましい性能が示された。両株は、実際、野性株よりそれぞれ60%および15%多い水素を生産し、平均1日生産速度が大きく改善された。したがって、これらの実験条件で得られた結果は、市場廃棄物を培養基質として用いて得られたものと一致する。

市場廃棄物由来培地と合成培地の双方で得られた全般的性能に基づけば、連続培養系に使用する場合、HUPマイナスおよびPHAマイナス／HUPマイナスの方がPHAマイナスより実用的であると結論できる。PHAマイナス突然変異株の使用に関する利点は、PHAを誘発する炭素源を含む基質を用いる場合だけ顕著である。この培養条件では、実際、2つの代謝経路は二者択一的であり、強い競合状態にある。

市場廃棄物を用いて1L規模で行った光誘導水素生産試験によって、水素生産能力をさらに改善した第二世代の突然変異株の開発の母体として今後使用すべき最良の突然変異株を選択できるようになった。

これは、主ニトロゲナーゼ複合体の活性化に関与する遺伝子の二つの制御遺伝子の過剰発現によって達成される。

これら二つの新しい突然変異株について、市場廃棄物由来培地を培養基質として用いて実験室規模のバイオリアクタで光誘導水素生産の試験を行う。これら突然変異株の性能が我々の期待に応えるものと信じている。短期的には、ニトロゲナーゼ活性の改善が*R.sphaeroides* 株の水素発生能力をさらに増強するための唯一の選択肢である。実際、異種ヒドロゲナーゼを機能発現できる可能性は現時点では非常に低いように思われる。

我々の検討した結果では、*R.sphaeroides* RV中に発現した組換え*C.pasteurianum* ヒドロゲナーゼIは、嫌気性／明条件でのその発現と機能性を評価するための実験プロトコルを最適化したにも拘わらず、不活性であることが認められた。

ニトロゲナーゼーヒドロゲナーゼ活性の併用効果による水素生産能力の改善の可能性は、エネルギー的にはより魅力的であるが、生物水素生産の分野における今後の別な研究プログラムで実施される必要がある。

## 2. 6. 10 参考文献

- 1) J.Meyer, et al., J. Bacteriol., 136, 201-208 (1978)
- 2) S.Takakuwa, et al., Arch. Microbiol., 136,20-25 (1983)
- 3) C.Pedros-Alio, et al., Novel Biodegradable Microbial Polymers, p.263 (1990)  
Kluwer Academic Publisher, U.K.
- 4) B.Masepohl and W. Klipp, Arch Microbiol., 165, 80-90 (1996)
- 5) V.Zinchenko et al., FEMS Microbiol. Letters, 147, 57-61 (1997)
- 6) E.Morett and V. Segovia, J. of Bacteriol., 175, 6067-6074 (1993)
- 7) J.M.Pemberton et al., Microbiology, 144, 267-278 (1998)

表 2. 6 - 1 HUP マイナス株 (SMV089) について行なった  
水素生産テスト一覧

| Exp. | DATE                  | 1L-scale<br>Bioreactor | Dilution of market waste<br>(from acidogenic step) | Batch<br>of waste |
|------|-----------------------|------------------------|----------------------------------------------------|-------------------|
| A    | 11/25/1997-12/6/1997  | 1                      | 1:10                                               | 1                 |
| B    | 01/21/1998-2/02/1998  | 1<br>2                 | 1:10<br>1:20 + NaCl 0,3%                           | 1<br>1            |
| C    | 02/17/1998-03/02/1998 | 1<br>2                 | 1:10<br>1:20                                       | 2<br>2            |
| D    | 03/09/1998-03/19/1998 | 1<br>2                 | 1:10 + NaCl 0,3%<br>1:20 + NaCl 0,3%               | 3<br>3            |
| E    | 04/01/1998-04/09/1998 | 2                      | 1:10                                               | 3                 |
| F    | 05/05/1998-05/14/1998 | 3                      | 1:10 under vacuum                                  | 3                 |
| H    | 06/08/1998-07/09/1998 | 3                      | 1:10 under Ar flow                                 | 3                 |
| J    | 09/16/1998-10/05/1998 | 3                      | 1:10 under Ar flow                                 | 3                 |

表 2. 6 - 2 HUP マイナス株 (SMV089) の水素生産テストにおける  
培地種と水素生産速度 (mlH<sub>2</sub>/l reactor/day)

| ml H <sub>2</sub> / l reactor / day |          |          |          |
|-------------------------------------|----------|----------|----------|
|                                     | SMV089   | SMV089   | SMV089   |
| DAY                                 | Batch #1 | Batch #2 | Batch #3 |
| 1                                   | 1.689    | 2.088    | 1.784    |
| 2                                   | 1.334    | 1.502    | 1.675    |
| 3                                   | 1.279    | 1.523    | 1.656    |
| 4                                   | 1.148    | 1.293    | 1.637    |
| 5                                   | 1.502    | 937      | 1.553    |
| 6                                   | 1.400    | 629      | 1.319    |
| 7                                   | 1.789    | 308      | 911      |
| 8                                   | 1.621    | 198      | 443      |
| 9                                   | 1.453    |          | 235      |

表2. 6-3 HUP マイナス株 (SMV089) の水素生産テストにおける  
培地種と水素生産速度 (mlH<sub>2</sub>/g dry weight/day)

ml H<sub>2</sub> / g dry weight / day

|     | SMV089   | SMV089   | SMV089   |
|-----|----------|----------|----------|
| DAY | Batch #1 | Batch #2 | Batch #3 |
| 1   | 2.963    | 3.236    | 3.023    |
| 2   | 3.090    | 2.442    | 3.221    |
| 3   | 2.891    | 2.496    | 3.312    |
| 4   | 2.185    | 2.068    | 2.321    |
| 5   | 2.945    | 1.498    | 2.465    |
| 6   | 1.750    | 983      | 1.638    |
| 7   | 1.195    | 387      | 1.118    |
| 8   | 486      | 232      | 454      |
| 9   | 254      |          | 235      |

表 2. 6 - 4 各種突然変異株について合成培地にて行なった  
水素生産テスト一覧（バッチ培養）

| DATE                  | STRAIN           |
|-----------------------|------------------|
| 07/15/1998-07/24/1998 | SMV047<br>SMV089 |
| 09/16/1998-09/25/1998 | SMV071<br>SMV087 |

表 2. 6 - 5 合成培地を用いたバッチ条件における突然変異株と  
野生株の性能の比較評価

**Comparative evaluation of the performance of the mutants versus  
the wild-type strain in batch conditions using synthetic medium**

|                                                              | SMV047      | SMV089 | SMV071 | SMV087      |
|--------------------------------------------------------------|-------------|--------|--------|-------------|
|                                                              | (wild-type) | (HUP-) | (PHA-) | (PHA-/HUP-) |
| H <sub>2</sub> TOTAL AMOUNT (ml)                             | 3260        | 3258   | 1965   | 2488        |
| AVERAGE CDW (g/l)                                            | 0,74        | 0,55   | 0,59   | 0,58        |
| AVERAGE H <sub>2</sub> PRODUCTION RATE (ml/day/g dry weight) | 489         | 846    | 555    | 613         |
| H <sub>2</sub> Yield (% of SUBSTRATE CONVERSION EFFICIENCY ) | 30,67       | 30,74  | 17,97  | 21,74       |
| AVERAGE DAILY H <sub>2</sub> PRODUCTION (ml/day)             | 362         | 465    | 328    | 355         |
| COMPARATIVE DAILY H <sub>2</sub> PRODUCTION (%)              | 100         | 128    | 91     | 98          |

表 2. 6 - 6 各種突然変異株について合成培地にて行なった  
水素生産テスト一覧（連続培養）

| Exp. | DATE                  | 1L-scale<br>Bioreactor | STRAIN |
|------|-----------------------|------------------------|--------|
| K    | 07/08/1998-07/27/1998 | 1                      | SMV047 |
|      |                       | 2                      | SMV089 |
| J    | 09/16/1998-10/05/1998 | 1                      | SMV071 |
|      |                       | 2                      | SMV087 |

表 2. 6 - 7 合成培地を用いた連続条件における突然変異株と野性株の  
性能の比較評価

**Comparative evaluation of the performance of the mutants versus  
the wild-type strain in continuous cultures using synthetic medium**

|                                                              | SMV047      | SMV089 | SMV071 | SMV087      |
|--------------------------------------------------------------|-------------|--------|--------|-------------|
|                                                              | (wild-type) | (HUP-) | (PHA-) | (PHA-/HUP-) |
| H <sub>2</sub> TOTAL AMOUNT (ml)                             | 13502       | 21561  | 8608   | 15479       |
| AVERAGE CDW (g/l)                                            | 0,81        | 0,82   | 0,73   | 0,67        |
| AVERAGE H <sub>2</sub> PRODUCTION RATE (ml/day/g dry weight) | 1042        | 1384   | 786    | 1359        |
| H <sub>2</sub> Yield (% of SUBSTRATE CONVERSION EFFICIENCY)  | 31,32       | 30,66  | 20,95  | 36,00       |
| AVERAGE DAILY H <sub>2</sub> PRODUCTION (ml/day)             | 844         | 1135   | 574    | 911         |
| COMPARATIVE DAILY H <sub>2</sub> PRODUCTION (%)              | 100         | 134    | 68     | 108         |

表 2. 6 - 8 二種変異株（SMV087）について行なった  
水素生産テスト一覧

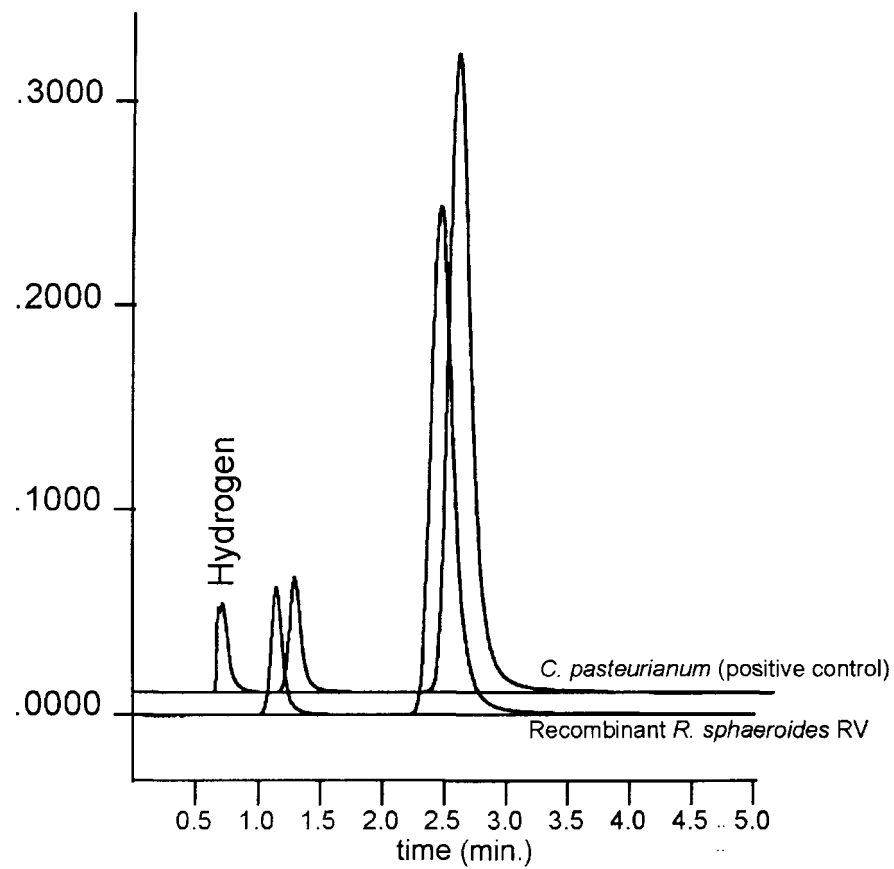
| Exp. | DATE                  | 1L-scale<br>Bioreactor | Dilution of waste<br>(from acidogenic<br>step) | Batch<br>of waste |
|------|-----------------------|------------------------|------------------------------------------------|-------------------|
| F    | 05/05/1998-05/14/1998 | 2                      | 1:10                                           | 3                 |
| G    | 05/19/1998-06/04/1998 | 2                      | 1:10                                           | 3                 |
|      |                       | 3                      | 1:10 under Ar flow                             | 3                 |
| H    | 06/08/1998-07/09/1998 | 2                      | 1:10                                           | 3                 |
| L    | 11/09/1998-12/11/1998 | 2                      | 1:10                                           | 4                 |
|      |                       | 3                      | 1:10 under Ar flow                             | 4                 |

表 2. 6-9 二種変異株 (SMV089) の水素生産テストにおける  
培地種と水素生産速度 (mlH<sub>2</sub>/l reactor/day)

|     | SMV087   | SMV087   |
|-----|----------|----------|
| DAY | Batch #3 | Batch #4 |
| 1   | 0        | 0        |
| 2   | 1159     | 0        |
| 3   | 478      | 1177     |
| 4   | 601      | 1252     |
| 5   | 930      | 1566     |
| 6   | 1260     | 1523     |
| 7   | 1526     | 1739     |
| 8   | 1396     | 1558     |
| 9   | 1589     | 1447     |
| 10  | 1326     | 1343     |
| 11  | 1119     | 1409     |
| 12  | 915      | 1577     |
| 13  | 813      | 1192     |
| 14  | 712      | 1253     |
| 15  | 625      | 1036     |
| 16  | 491      | 1024     |
| 17  | 468      | 1108     |
| 18  | 173      | 905      |
| 19  | 244      | 940      |
| 20  | 197      | 832      |

表2. 6-10 二種変異株 (SMV089) の水素生産テストにおける  
培地種と水素生産速度 (mlH<sub>2</sub>/g dry weight/day)

|     | SMV087   | SMV087   |
|-----|----------|----------|
| DAY | Batch #3 | Batch #4 |
| 1   | 0        | 0        |
| 2   | 2414     | 0        |
| 3   | 659      | 1499     |
| 4   | 791      | 1716     |
| 5   | 1235     | 2145     |
| 6   | 1680     | 2086     |
| 7   | 2049     | 2399     |
| 8   | 1925     | 2512     |
| 9   | 2253     | 2756     |
| 10  | 1842     | 2510     |
| 11  | 1805     | 1854     |
| 12  | 1146     | 2022     |
| 13  | 816      | 1528     |
| 14  | 487      | 1557     |
| 15  | 992      | 1079     |
| 16  | 682      | 1154     |
| 17  | 637      | 1149     |
| 18  | 212      | 962      |
| 19  | 307      | 1020     |
| 20  | 246      | 902      |



GC analysis performed on the gas phases of cultures of *C.pasteurianum* and *R.sphaeroides* RV recombinant strain SMV081cultures.

図 2. 6 - 4 SMV081株培養中気相のガスクロ分析結果

## • FERMENTATION CONDITIONS

PHOTOBIOREACTOR: 1 L

LIGHT INTENSITY: 6,000 lux

CULTIVATION: continuous flow

TEMP: 30°C

MEDIUM: market waste-derived  
flushed with argon

FLOW RATE: 30 ml/h

pH: automatically stabilized at pH 7  
by adding 1 N NaOH

## • ANALYTICAL PARAMETERS

H<sub>2</sub> EVOLVED (total volume)

H<sub>2</sub> EVOLUTION RATE (ml/l reactor/day or g dry weight  
/day by GC analysis)

CELL DENSITY (OD<sub>600</sub>)

Bchl CONTENT (A<sub>775</sub>)

LACTIC ACID consumption (g/l reactor by GC analysis)

PHB CONTENT (by methanolysis and GC analysis)

ENZYMATIC ACTIVITIES:

nifrogenase (by acetylene reduction method and GC  
analysis)

uptake hydrogenase (by methylene blue dye reduction  
and A<sub>570</sub>)

Fermentation conditions adopted and analytical parameters measured during hydrogen photoproduction tests of HUP<sup>+</sup> strain SMV089 and wild-type strain SMV047 with market waste-derived medium.

図 2. 6 - 5 発酵条件・分析パラメータ

|                                                                |     |     |     |                |     |
|----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|----------------|-----|
| 10                                                             | 20  | 30  | 40  | 50             | 60  |
|                                                                |     |     |     |                |     |
| GCCGGCCCTGGCTTCTCGGACAGGTGGCCTCGGCGCTCGACGGGCGCGCGGCACCCGAGG   |     |     |     |                |     |
| R                                                              | P   | W   | L   | L              | G   |
| Q                                                              | V   | A   | S   | A              | L   |
| D                                                              | G   | R   | A   | A              | P   |
| E                                                              |     |     |     |                |     |
|                                                                |     |     |     |                |     |
| 70                                                             | 80  | 90  | 100 | 110            | 120 |
|                                                                |     |     |     |                |     |
| TGCCCGAGGGAGAGGCGCTCGCCGATCTGGTCTGTGGCCATTACGAGGAGATGCTCTCCT   |     |     |     |                |     |
| V                                                              | P   | E   | G   | E              | A   |
| L                                                              | A   | D   | L   | V              | V   |
| A                                                              | H   | Y   | E   | E              | M   |
| L                                                              | S   |     |     |                |     |
|                                                                |     |     |     |                |     |
| 130                                                            | 140 | 150 | 160 | 170            | 180 |
|                                                                |     |     |     |                |     |
| TCTACGGGCGCGACCTCGGGCTGCGCGTCTGCGCGCAAGCATCTCAACTGGTATCTCGAGG  |     |     |     |                |     |
| F                                                              | Y   | G   | R   | D              | L   |
| G                                                              | L   | R   | V   | A              | R   |
| K                                                              | H   | L   | N   | W              | Y   |
| L                                                              | E   |     |     |                |     |
|                                                                |     |     |     |                |     |
| 190                                                            | 200 | 210 | 220 | 230            | 240 |
|                                                                |     |     |     |                |     |
| CCGCGGGTCTGGCGGCGCACCGGGGCCCCATCGTGACCGGAACCGATCCGGCACGGGTGG   |     |     |     |                |     |
| A                                                              | A   | G   | L   | A              | A   |
| H                                                              | R   | G   | P   | I              | V   |
| T                                                              | G   | T   | D   | P              | A   |
| R                                                              | V   |     |     |                |     |
|                                                                |     |     |     |                |     |
| 250                                                            | 260 | 270 | 280 | 290            | 300 |
|                                                                |     |     |     |                |     |
| TGCGTGCGCTGCGGCAGGCCTTCGGCGCACAGGAGGGGGCCCGCCGCATGAGCTTCCGTTTC |     |     |     |                |     |
| V                                                              | R   | A   | L   | R              | Q   |
| A                                                              | F   | G   | A   | Q              | E   |
| G                                                              | A   | A   | A   |                |     |
|                                                                |     |     |     | M              | S   |
|                                                                |     |     |     | F              | R   |
|                                                                |     |     |     | S              |     |
|                                                                |     |     |     | -              |     |
|                                                                |     |     |     | → <i>nifR2</i> |     |
|                                                                |     |     |     |                |     |
| 310                                                            | 320 | 330 | 340 | 350            | 360 |
|                                                                |     |     |     |                |     |
| GCCCTATCCCGTTCCCGGGGTGATCTGGGCCAGCCTTCCGCTTCCCGCGGTGCTCATCAA   |     |     |     |                |     |
| P                                                              | Y   | P   | V   | P              | G   |
| V                                                              | I   | W   | A   | S              | L   |
| P                                                              | L   | P   | A   | V              | L   |
| I                                                              | N   |     |     |                |     |
|                                                                |     |     |     |                |     |
| 370                                                            | 380 | 390 | 400 | 410            | 420 |
|                                                                |     |     |     |                |     |
| CCCCGACGGCATCATCATCGAATCGAACCCGGCGGCCGAGGCCTTCCTCAATGCCTCGTC   |     |     |     |                |     |
| P                                                              | D   | G   | I   | I              | I   |
| E                                                              | S   | N   | P   | A              | A   |
| E                                                              | A   | F   | L   | N              | A   |
| S                                                              | S   |     |     |                |     |

Nucleotide and aminoacid sequence of *nifR2/nifR1* from *R.sphaeroides* RV.

図2. 6-52 RV株よりの*nifR2/nifR1*のヌクレオチドとアミノ酸配列

|                                                              |     |     |     |     |     |
|--------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| 430                                                          | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 |
|                                                              |     |     |     |     |     |
| CAAGAGCCTGCAGGGTCAGCCCGCCTTCGACCGGATCCTGATCGACGCGCCGGTGGACGA |     |     |     |     |     |
| K S L Q G Q P A F D R I L I D A P V D E                      |     |     |     |     |     |
| 490                                                          | 500 | 510 | 520 | 530 | 540 |
|                                                              |     |     |     |     |     |
| GGCCCTGTCGCGGGCGCGGTGCAACCAGTCGCCCATCTTCATCAACGATGTGGACGTGAC |     |     |     |     |     |
| A L S R A R S N Q S P I F I N D V D V T                      |     |     |     |     |     |
| 550                                                          | 560 | 570 | 580 | 590 | 600 |
|                                                              |     |     |     |     |     |
| CTCGGGCGAGCGTCCGCCGGTGCAGTGCAACATCCAGATCGCGCCGTTGCACGACAATGC |     |     |     |     |     |
| S G E R P P V Q C N I Q I A P L H D N A                      |     |     |     |     |     |
| 610                                                          | 620 | 630 | 640 | 650 | 660 |
|                                                              |     |     |     |     |     |
| CGAGATCGTCATGCTGCTGATCTCGCCGCGCGAGATCGCGGACCGGCTGGGGCGGGCCAC |     |     |     |     |     |
| E I V M L L I S P R E I A D R L G R A T                      |     |     |     |     |     |
| 670                                                          | 680 | 690 | 700 | 710 | 720 |
|                                                              |     |     |     |     |     |
| GGCGGCCAAGTCGGCGGCGAAATCCGCCATCGGCATGGCCGAGATGCTGGCGCACGAGAT |     |     |     |     |     |
| A A K S A A K S A I G M A E M L A H E I                      |     |     |     |     |     |
| 730                                                          | 740 | 750 | 760 | 770 | 780 |
|                                                              |     |     |     |     |     |
| CAAGAACCCGCTCGCGGGCATTTCGGGTGCGGCGCAGCTCATTGCCATGAACCTGTCGGT |     |     |     |     |     |
| K N P L A G I S G A A Q L I A M N L S V                      |     |     |     |     |     |
| 790                                                          | 800 | 810 | 820 | 830 | 840 |
|                                                              |     |     |     |     |     |
| GGAGGATCGCGAACTGGCCGATCTGATCGTCGAGGAGACGCGCCGCATCGTGAAACTTCT |     |     |     |     |     |
| E D R E L A D L I V E E T R R I V K L L                      |     |     |     |     |     |

図2. 6-52 (続き)

|                                                                |      |      |      |      |      |
|----------------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|
| 850                                                            | 860  | 870  | 880  | 890  | 900  |
|                                                                |      |      |      |      |      |
| CGAGCAGGTGGAGCAGTTCGGCAATCTCCGCCCGCCCGAACGCCGGGCGGTGAACATCCA   |      |      |      |      |      |
| E Q V E Q F G N L R P P E R R A V N I H                        |      |      |      |      |      |
|                                                                |      |      |      |      |      |
| 910                                                            | 920  | 930  | 940  | 950  | 960  |
|                                                                |      |      |      |      |      |
| CGATGCGCTCGACCGGGCGCGGAAATCGGCGGCGGTGGGCTTTGCCGCCAAGATGCGGAT   |      |      |      |      |      |
| D A L D R A R K S A A V G F A A K M R I                        |      |      |      |      |      |
|                                                                |      |      |      |      |      |
| 970                                                            | 980  | 990  | 1000 | 1010 | 1020 |
|                                                                |      |      |      |      |      |
| CACCGAGGAATACGACCCCTCGCTGCCCCGCGACCTATGCCGACGCGGACCAGCTGATGCA  |      |      |      |      |      |
| T E E Y D P S L P A T Y A D A D Q L M Q                        |      |      |      |      |      |
|                                                                |      |      |      |      |      |
| 1030                                                           | 1040 | 1050 | 1060 | 1070 | 1080 |
|                                                                |      |      |      |      |      |
| GGTGTTCCTGAACCTCATCAAGAATGCGGCCGAGGCCGCGGGCCCCGCAGGGGGGCGCAT   |      |      |      |      |      |
| V F L N L I K N A A E A A G P Q G G R I                        |      |      |      |      |      |
|                                                                |      |      |      |      |      |
| 1090                                                           | 1100 | 1110 | 1120 | 1130 | 1140 |
|                                                                |      |      |      |      |      |
| CCGGCTGCGGACCTTCTACGACATCTCGCTGCGGCTGCGCCGGGCGGACGGGTGCGGGGG   |      |      |      |      |      |
| R L R T F Y D I S L R L R R A D G S G G                        |      |      |      |      |      |
|                                                                |      |      |      |      |      |
| 1150                                                           | 1160 | 1170 | 1180 | 1190 | 1200 |
|                                                                |      |      |      |      |      |
| CGCGCTGCCCCCTGCAGGTTCGAGATCATCGACGACGGCCCGGGCATCGCGCCCGACATCGC |      |      |      |      |      |
| A L P L Q V E I I D D G P G I A P D I A                        |      |      |      |      |      |
|                                                                |      |      |      |      |      |
| 1210                                                           | 1220 | 1230 | 1240 | 1250 | 1260 |
|                                                                |      |      |      |      |      |
| CAAGGAAATCTTCGAGCCCTTCGTCTCGGGGCGCGAGAATGGCACGGGCCTCGGCCTCGC   |      |      |      |      |      |
| K E I F E P F V S G R E N G T G L G L A                        |      |      |      |      |      |

図2. 6-52 (続き)

|                                                              |      |      |      |      |      |
|--------------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|
| 1270                                                         | 1280 | 1290 | 1300 | 1310 | 1320 |
|                                                              |      |      |      |      |      |
| GCTGGTCAACAAGATTATATCCGACCACGGCGGATGGATATCCGTCGATTCCGCCCCCGG |      |      |      |      |      |
| L V N K I I S D H G G W I S V D S A P G                      |      |      |      |      |      |

|                                                             |      |      |      |      |      |
|-------------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|
| 1330                                                        | 1340 | 1350 | 1360 | 1370 | 1380 |
|                                                             |      |      |      |      |      |
| ACGCACCGTGTTCCGGGTCTCGCTGCCGGTGGCGCCCCGGAAGCGGCGTCCAATGACAT |      |      |      |      |      |
| R T V F R V S L P V A P R E A A S N D M                     |      |      |      |      |      |

|                                                              |      |      |      |      |      |
|--------------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|
| 1390                                                         | 1400 | 1410 | 1420 | 1430 | 1440 |
|                                                              |      |      |      |      |      |
| GGAGGTGAAGTGATGGACGGCACTGTTCTCGTGGCGGACGACGATCGCACGATCCGCACG |      |      |      |      |      |
| E V K - M D G T V L V A D D D R T I R T                      |      |      |      |      |      |
| → <i>nifR1</i>                                               |      |      |      |      |      |

|                                                              |      |      |      |      |      |
|--------------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|
| 1450                                                         | 1460 | 1470 | 1480 | 1490 | 1500 |
|                                                              |      |      |      |      |      |
| GTGCTGACGCAGGCCCTGACGCGGGCAGGCTGCAAGGTGCACGCGACCTCCAGCCTGATG |      |      |      |      |      |
| V L T Q A L T R A G C K V H A T S S L M                      |      |      |      |      |      |

|                                                              |      |      |      |      |      |
|--------------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|
| 1510                                                         | 1520 | 1530 | 1540 | 1550 | 1560 |
|                                                              |      |      |      |      |      |
| ACCCTGATGCGCTGGGTCGAGGAGGGCAAGGGCGACCTCGTGATCTCGGACGTGGTCATG |      |      |      |      |      |
| T L M R W V E E G K G D L V I S D V V M                      |      |      |      |      |      |

|                                                              |      |      |      |      |      |
|--------------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|
| 1570                                                         | 1580 | 1590 | 1600 | 1610 | 1620 |
|                                                              |      |      |      |      |      |
| CCCGACGGCAACGGGCTCGAGGCGCTGCCGCGGATCTCGAAGCTGCGCCCGGGGCTGCCG |      |      |      |      |      |
| P D G N G L E A L P R I S K L R P G L P                      |      |      |      |      |      |

|                                                               |      |      |      |      |      |
|---------------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|
| 1630                                                          | 1640 | 1650 | 1660 | 1670 | 1680 |
|                                                               |      |      |      |      |      |
| GTCATCGTGATCTCGGCGCAGAACACGATCATGACGGCGATTTCAGGCCGCCGAGGCCGAG |      |      |      |      |      |
| V I V I S A Q N T I M T A I Q A A E A E                       |      |      |      |      |      |

図2. 6-52 (続き)

|                                                                |      |      |      |      |      |
|----------------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|
| 1690                                                           | 1700 | 1710 | 1720 | 1730 | 1740 |
|                                                                |      |      |      |      |      |
| GCCTACGATTATCTGCCCAAGCCCTTCGATCTGCCCCGACCTGATGAAACGGTCGGCCCCGC |      |      |      |      |      |
| A Y D Y L P K P F D L P D L M K R S A R                        |      |      |      |      |      |
| 1750                                                           | 1760 | 1770 | 1780 | 1790 | 1800 |
|                                                                |      |      |      |      |      |
| GCGCTCGACATGAAGCGCCGCGCGCCGGTGAGCAAGGCGGCCCCGCCGCGCGAAGGCGGG   |      |      |      |      |      |
| A L D M K R R A P V S K A A P P R E G G                        |      |      |      |      |      |
| 1810                                                           | 1820 | 1830 | 1840 | 1850 | 1860 |
|                                                                |      |      |      |      |      |
| GACGACCTGCCGCTCGTCGGACGGACGCAGGCGATGCAGGCGCTCTACCGTCTCGTGGCA   |      |      |      |      |      |
| D D L P L V G R T Q A M Q A L Y R L V A                        |      |      |      |      |      |
| 1870                                                           | 1880 | 1890 | 1900 | 1910 | 1920 |
|                                                                |      |      |      |      |      |
| CGGGTGATGAACACGGATCTTCCGGTGCTGGTCACGGGCGAATCCGGCACGGGCAAATCG   |      |      |      |      |      |
| R V M N T D L P V L V T G E S G T G K S                        |      |      |      |      |      |
| 1930                                                           | 1940 | 1950 | 1960 | 1970 | 1980 |
|                                                                |      |      |      |      |      |
| CTCATCGCCCGCGCGATCCACGATTTCTCGGACCGGCGGACACTGCCCTTCGTGGTGGCG   |      |      |      |      |      |
| L I A R A I H D F S D R R T L P F V V A                        |      |      |      |      |      |
| 1990                                                           | 2000 | 2010 | 2020 | 2030 | 2040 |
|                                                                |      |      |      |      |      |
| CAGGCGGTGACCTGCAGGGCGTCGAGGGGCCGCCTCGCTTCTGTCGCGCGCCAAGGGC     |      |      |      |      |      |
| Q A V D L Q G V E G P A S L L S R A K G                        |      |      |      |      |      |
| 2050                                                           | 2060 | 2070 | 2080 | 2090 | 2100 |
|                                                                |      |      |      |      |      |
| GGCAGCCTCGTCTTCGACGAGGTGGCCGATTACGACGAGGAAACGCAGGCGCGGATCGTG   |      |      |      |      |      |
| G S L V F D E V A D Y D E E T Q A R I V                        |      |      |      |      |      |

図 2. 6 - 5 2 (続き)

|                                                               |      |      |      |      |      |
|---------------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|
| 2110                                                          | 2120 | 2130 | 2140 | 2150 | 2160 |
|                                                               |      |      |      |      |      |
| CGGATGCTCGACATGATGGGCGATAACGCGCCCCGGATCATGTCCACGAGCCAGGTGGAT  |      |      |      |      |      |
| R M L D M M G D N A P R I M S T S Q V D                       |      |      |      |      |      |
|                                                               |      |      |      |      |      |
| 2170                                                          | 2180 | 2190 | 2200 | 2210 | 2220 |
|                                                               |      |      |      |      |      |
| CTGGCCTCGCGGCTGGAGTCGGGGGCCTTCCGGCAGGATCTCTATTACCGGCTGGGCGGC  |      |      |      |      |      |
| L A S R L E S G A F R Q D L Y Y R L G G                       |      |      |      |      |      |
|                                                               |      |      |      |      |      |
| 2230                                                          | 2240 | 2250 | 2260 | 2270 | 2280 |
|                                                               |      |      |      |      |      |
| GTCACGCTGCATGTGCCCTCGCTGCGCGAACGGGTGGACGACATTCCGCTTCTGGCCGAC  |      |      |      |      |      |
| V T L H V P S L R E R V D D I P L L A D                       |      |      |      |      |      |
|                                                               |      |      |      |      |      |
| 2290                                                          | 2300 | 2310 | 2320 | 2330 | 2340 |
|                                                               |      |      |      |      |      |
| CATTTCCCTCGCCCGGGGCGAGCGCGATCTCGGCACCACGCGGCGGCTGTGGAACGAGGCG |      |      |      |      |      |
| H F L A R G E R D L G T T R R L S N E A                       |      |      |      |      |      |
|                                                               |      |      |      |      |      |
| 2350                                                          | 2360 | 2370 | 2380 | 2390 | 2400 |
|                                                               |      |      |      |      |      |
| CGCGACCTCGTGCGGGCCTACAGCTGGCCCGGCAACGTCCGCCAGCTCGAGAACACGCTG  |      |      |      |      |      |
| R D L V R A Y S W P G N V R Q L E N T L                       |      |      |      |      |      |
|                                                               |      |      |      |      |      |
| 2410                                                          | 2420 | 2430 | 2440 | 2450 | 2460 |
|                                                               |      |      |      |      |      |
| CGGCGGCTGATGGTGACGTGCGCCGAGGCCGAGATCACCCGCGCCGAGGTCGAGGCGGTG  |      |      |      |      |      |
| R R L M V T S A E A E I T R A E V E A V                       |      |      |      |      |      |
|                                                               |      |      |      |      |      |
| 2470                                                          | 2480 | 2490 | 2500 | 2510 | 2520 |
|                                                               |      |      |      |      |      |
| CTGGGCAACCAGCCGGCGATGGAGCCGCTGAAGGGAGGCGGCGAGGGCGAGAAGCTGTG   |      |      |      |      |      |
| L G N Q P A M E P L K G G G E G E K L S                       |      |      |      |      |      |

図 2. 6 - 5 2 (続き)

|                                                               |      |      |      |      |      |
|---------------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|
| 2530                                                          | 2540 | 2550 | 2560 | 2570 | 2580 |
|                                                               |      |      |      |      |      |
| TCCTCGGTGGCACGTCATCTGCGGCGCTACTTCGACCTGCATGGCGGGCGCGCTTCCGCCG |      |      |      |      |      |
| S S V A R H L R R Y F D L H G G A L P P                       |      |      |      |      |      |
|                                                               |      |      |      |      |      |
| 2590                                                          | 2600 | 2610 | 2620 | 2630 | 2640 |
|                                                               |      |      |      |      |      |
| CCCGGCGTCTATCAGCGCATCCTGCGCGAGGTCGAGGCGCCGCTGATCGAGATCGCGCTC  |      |      |      |      |      |
| P G V Y Q R I L R E V E A P L I E I A L                       |      |      |      |      |      |
|                                                               |      |      |      |      |      |
| 2650                                                          | 2660 | 2670 | 2680 | 2690 | 2700 |
|                                                               |      |      |      |      |      |
| GATGCAACCGCCGGGAATCAGGCGAAATGTGCCGATCTTCTGGGGATCAACCGCAATACC  |      |      |      |      |      |
| D A T A G N Q A K C A D L L G I N R N T                       |      |      |      |      |      |
|                                                               |      |      |      |      |      |
| 2710                                                          | 2720 | 2730 | 2740 | 2750 | 2760 |
|                                                               |      |      |      |      |      |
| TTGCGCAAGAAGATCACCGACCTCGATATTCGCGTGACACGCCGCCGCAAGCTGATGTAA  |      |      |      |      |      |
| L R K K I T D L D I R V T R R R K L M -                       |      |      |      |      |      |

図 2. 6 - 5 2 (続き)

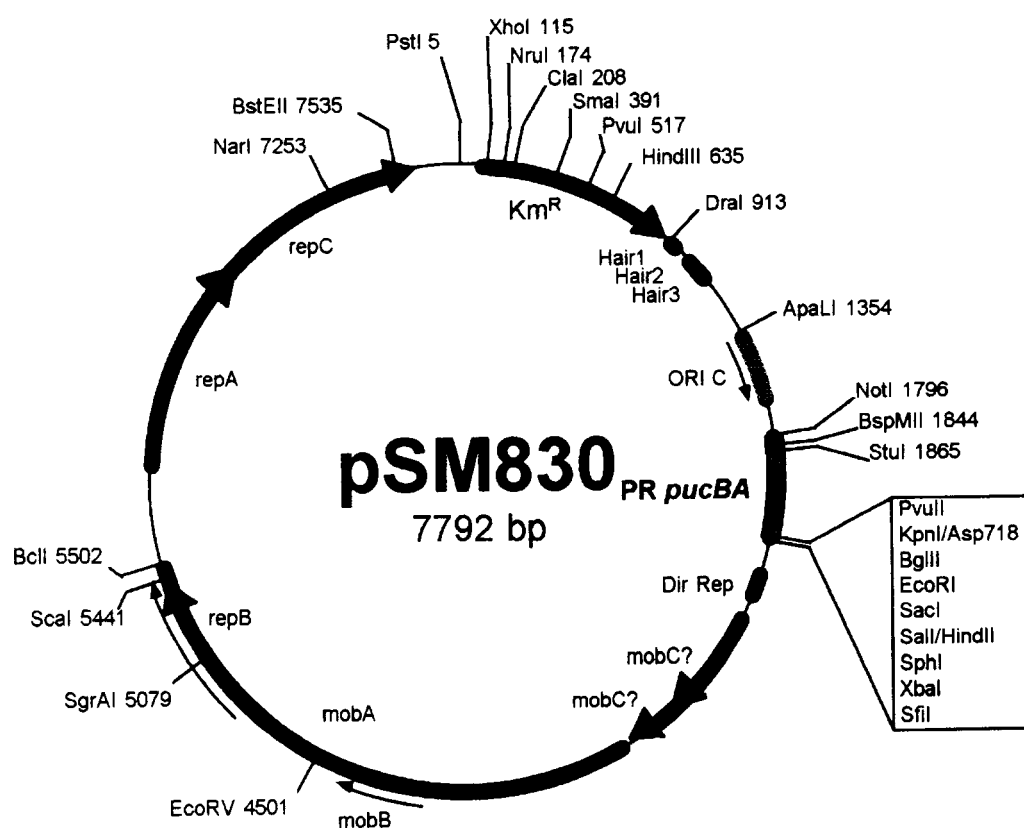


図 2. 6 - 5 3 発現ベクター pSM830 の配列図

## 第3章 大量培養技術の研究開発

### 3.1 糖廃液を用いる光合成細菌の大量培養技術

#### 3.1.1 概要

糖を主成分とする廃液を原料とし、低コスト、環境調和型を目指した嫌気性前処理工程－光合成工程で水素製造を目指すシステムにおいて、光合成工程の部分の検討を行った。検討の主眼は次の二点である。

- 1) 対象廃液を嫌気性前処理したとき生成する有機酸含有廃液に適合し、本システムの光合成工程で使用される光合成細菌として選定された Rhodopseudomonas palustris R-1株の特性を明確に記述すること。
- 2) 陸上敷地をほとんど使用せずに光合成細菌による水素製造を行える浮体式光合成リアクタの性能を、スケールアップした形で実証すること。

実験の結果、R-1株は、酢酸からの水素発生能力に優れ、鉄塩濃度が低い条件や弱光下でも比較的高い水素発生能力を保てる実用性の高い株であることが確認された。また、浮体式光合成リアクタは、受光面積 $8\text{m}^2$ 、容積400Lまでスケールアップし海上で試験したが、最大で $0.8\text{L}/(\text{L}\cdot\text{d})$ 、即ち $40\text{L}/(\text{m}^2\cdot\text{d})$ のガス発生（水素含有率70%として変換効率0.85%）を確認できた。攪拌による冷却効果の確認など多くのエンジニアリングデータが得られた。以上より、内湾などに立地した清涼飲料水工場などからの糖を主成分とする廃液から、陸上敷地を余り使わずに海面を有効利用して、生物学的に水素を製造できる可能性が実験的に示された。

#### 3.1.2 背景

平成9年度まで上記テーマにて検討を積み重ねてきたが、使用するR-1株の分類学的同定とリアクタでの能力確認はされたものの、その菌学的調査は必ずしも充分と言えなかった。R-1株を使用する以上、その生理学的特徴などをより詳細に記述しておく必要がある。また、浮体式リアクタにおいては、海上設置を前提としているが、平成9年度までは、それを模擬した実験しか実施してこなかった。実際に海上にリアクタを設置して水素発生試験を行うのは平成10年度の課題であった。

### 3. 1. 3 水素生産における R-1 株の特徴

#### (1) 実験方法

##### a. 供試菌株

本研究には、東京都江東区隅田川河口付近の日当たりの良好な場所の比較的富栄養化した河川水から分離された紅色非硫黄細菌 Rhodopseudomonas palustris R-1株を用いた。

##### b. 分離菌株の保存

分離菌株の保存には、酢酸ナトリウム 0.5g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  40.4g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.7g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.0g、NaCl 0.1g、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.005g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.05g、酵母エキス 0.2g、ビオチン 0.01mg、塩酸チアミン 0.2mg、寒天 20g を蒸留水 1,000ml に含む培地（0.5N-NaOH を用い、pH6.8 に調整）を用いた。これをねじ口試験管中に注入し、固化後、菌株の 1白金線量を接種（線刺培養）し、30℃ で 5～7 日間、白熱灯（東芝ブルーソフトランプ：60W、100V）を用いて、10千lux の照度下で静置培養し、その後、室温で蛍光灯を用いて、約1千lux の照度下で保存した。継代は、1カ月毎に行った。

##### c. 菌体量の測定

菌体量の測定は、培養液の 610nm に於ける吸光度を調べることにより行われた。なお、吸光度 1.0 は、紅色非硫黄細菌 R-1 株では、菌体重量約 0.354mg/ml に相当した。

##### d. 水素生産のための基本的培養法

水素生産の培地としては、酢酸ナトリウム 0.8g、酪酸ナトリウム 0.8g、プロピオン酸ナトリウム 0.8g、エタノール 0.4g、炭酸水素ナトリウム 2.0g、塩化アンモニウム 0.04g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.15g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.03g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.0g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1g、塩酸チアミン 0.01mg、ビオチン 0.1mg、酵母エキス 0.1g を蒸留水 1,000ml に含む培地を pH7.0 に調整して用いた。

なお、以下に述べる各実験の条件設定は、次のように設定した。

| 実験 | ルー瓶  | 光源 | 光エネルギー               | 温度(℃) | 初期O. D. | 培地組成  |
|----|------|----|----------------------|-------|---------|-------|
| a. | 0.2L | 白熱 | 350 W/m <sup>2</sup> | 30    | 1.1     | GL培地  |
| b. | 0.2L | 白熱 | 350 W/m <sup>2</sup> | 30    | 1.0     | GL培地  |
| c. | 1.4L | 白熱 | 350 W/m <sup>2</sup> | 30    | 1.0     | 上記培地* |
| d. | 1.4L | 白熱 | 350 W/m <sup>2</sup> | 30    | 1.0     | 実廃水   |

\* 場合により一部の有機酸、エタノールを除く。

#### e. 水素発生量の測定法

藤井らの方法<sup>1)</sup>により、水素発生量の測定を行った。

### (2) 課題、経緯及び実験結果

#### a. 前培養組み込み型窒素欠水素発生

これまでもたびたび述べているように、Rhodopseudomonas palustris R-1株（以降、R-1株）は、酸素がわずかに存在するような条件下でも、例えば静置した水槽中などで培養液中に有機質の窒素源（例えば酵母エキス、ペプトン等）が含まれない場合、水面から培養液中に溶け込む空気中の窒素を固定して旺盛に生育することがわかっている。このとき、R-1株の細胞中にはすでに窒素固定に不可欠な酵素ニトロゲナーゼがセットされている。この酵素は、培養液中の窒素源が欠如すると培養液中の糖質（有機酸など）を電子供与体として利用して、水素ガスを発生する事が知られている。従って、空気中の窒素ガスを唯一の窒素源として生育した細胞をそのまま、水素生産用に用いれば、予めセットされたニトロゲナーゼから即時に水素が発生すると考えられることから、ニトロゲナーゼの誘導を待つこれまでの方法に比べて、効率良く水素が生産されと考えられた。種々の実験室内での基礎試験の結果からも、本法によって、効果的な水素生産システムが構築できる可能性も示唆された。そこで、この方法による一連の基礎試験の総まとめとして、本システムを連続式プラントに適用する場合、空中窒素を固定して生育した細胞を含む培養液と、新鮮な培地がどの程度の混合比で最も効率的に水素発生が行われるかを調べた。その結果、細胞を含む培養液と新鮮な培地とがおおよそ同量ずつ含まれる場合に、最も高い水素生産性が認められた（図3.1-1）。

#### b. 水素発生に関わるR-1株の菌学的性質について

IHI方式が用いる糖廃液の嫌気発酵液は、Rhodobacter sphaeroides RV株をはじめとする多くの紅色非硫黄細菌がこれを原料に水素を発生することは難しかった。これまでの研究の結果、同糖廃液中には比較的多量の酢酸を主とする有機酸に富んでいるが、RV株をはじめその他の多くの菌株は酢酸を水素発生のための電子供与体として容易に用いることができなかった。ところが、R-1株は酢酸を唯一の電子供与体として水素を発生することができた。また、RV株が鉄塩欠乏に対して敏感であったのに対し、R-1株は鉄 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) 欠乏培地中でも水素を発生することができた。さらに、R-1株は、RV株が水素発生よりもuptakeヒドロゲナーゼによる水素吸収が上回ってしまうほどのごく弱光条件下においても、光水素発生が可能であるなど、こと水素発生に関しては、他の紅色非硫黄細菌と比較しても特異な性質を示した。そこで、さらに光水素発生の中心となるニトロゲナーゼの活性中心に存在するモリブデンのR-1株の光水素発生に与える影響について調べた。その結果、R-1株は培地中のモリブデン濃度に関係なく水素を発生し、培地中にモリブデンが存在しないときもモリブデンリッチの時と同じように水素を発生した (図3.1-2)。

#### c. 水素発生と有機酸消費の関係について

IHI方式で用いる糖廃液の嫌気発酵液中には、おもに酢酸、プロピオン酸、酪酸の3種類の有機酸がそれぞれおよそ800mg/Lの濃度で含まれている。一般に微生物が複数の糖質を利用する際、グルコース効果のように特定の糖質が消費されるまでは、他の糖質は消費されないような現象が見られるが、光合成細菌による光水素発生のための電子供与体消費においては、必ずしもそのような現象が現れるとは限らない。そこで、R-1株の場合、光合成水素生産の原料中に含まれる3種類の有機酸がそれぞれどのような消費のし方をしているのか、また3種類の有機酸それぞれ単独の場合や2種類の有機酸の組み合わせによっては相乗効果等の変化が現れるのかどうかを確認するための試験を実施した。その結果、まず各有機酸単独で用いた場合は、それぞれの有機酸に相応する水素発生とそれに伴う有機酸の消費が確認された (図3.1-3~図3.1-5)。また、いずれの単独に用いた有機酸の消費においてもその消費とともに、初発の培地中には存在しなかった蟻酸生成が確認され、いずれの場合も水素発生が止まるまでには、生成された蟻酸は再び消費された。次に、プロピオン酸に酢酸、酪酸を組み合わせ

せて2種類の有機酸混合状態における有機酸の消費のしかたについて調べた。その結果、いずれの場合もまず最初にプロピオン酸の急激な消費が始まるとともにその他の有機酸（酢酸及び酪酸）の緩やかな消費が始まり、プロピオン酸が初発濃度の20%以下になるともう一つの有機酸の急激な消費が始まるといった現象が確認された（図3.1-6～図3.1-7）。これらの場合も各有機酸を単独で用いた場合のように蟻酸の生成及び消費が確認された。

さらに3種類の有機酸が混合する培養液中での有機酸濃度の変化を調べた。その結果、まず最初にプロピオン酸の急激な消費が起こり、プロピオン酸の濃度が低下すると、次に酢酸の急激な消費が始まった。酪酸は培養開始時から緩やかに消費され続け、単独で用いた場合は、5～6日で完全に消費され尽くしたが、3種の有機酸混合状態では完全に消費されるまでにおよそ2倍の10日間を要した（図3.1-8）。蟻酸濃度は培養開始時から徐々に高まり、3種類の有機酸ともすべて消費し尽くされた培養10日目頃に最も高い濃度（約150mg/L）に達し、その後は、徐々に濃度が低くなり、水素発生が停止した培養開始17日目頃には、大部分が消費されてしまった。

#### d. 実廃水を用いた水素発生試験（基質特性評価試験の追試験）

昨年度までに実施された基質特性評価試験において、IHI分室の試験結果中に見られた培養時間の経過とともに起こる有機酸の生成は、実廃水中に存在する嫌気性微生物によって起こる糖質の有機酸発酵によるものと考えられた。その場合、昨年度までに得られた実験結果には、嫌気性微生物の水素生産も付加されているために、純粋にR-1株の光合成による水素発生データとは言い難い。そこで、嫌気性微生物による水素発生を抑えるために、実廃水をオートクレーブを用いて121℃で15分間湿熱滅菌処理を施したものを使って、再試験を試みた。その結果図3.1-9のように、昨年度実施した湿熱滅菌処理を施していない場合とほぼ同量の水素発生が確認された。その間の有機酸濃度変化は図3.1-10に示す通りだが、水素発生に伴う各有機酸の明確な消費は確認されず、有機酸濃度は培養期間を通じてほぼ一定レベルに保たれた。この結果から、IHI方式が使用する実廃水は模擬廃水とは異なり、有機酸を効果的にR-1株の光合成水素生産に供給する何らかの機構の存在が示唆された。

### (3) まとめ

これまでの研究結果からR-1株は、水素生産において他の紅色非硫黄細菌とは異なる性質を持つ菌株であることが明らかにされた。それは、酢酸の利用性、弱光の利用性、モリブデンや鉄塩等の光合成水素発生には不可欠と思われる無機塩類によるストレスに強いなどいずれも、光合成水素生産を実用規模で行う場合に有利に働く性質が備わっていると考えられた。また、R-1株光合成水素生産は比較的酸素存在かにおいても安定なことから、窒素源フリーの原料（実廃水）を用いた空中窒素の固定による前培養を組み込んだ水素生産システムが可能であり、これを上記のR-1株の水素生産における性質とを併せれば将来、高効率でしかも低コストの水素生産システムを実現できる可能性が考えられる。

### 3. 1. 4 浮体式光合成リアクタ

#### (1) はじめに

平成9年度に引き続き、嫌気過程からの排水中に含まれる有機酸を電子供与体として、光照射により水素を発生させる試験を行った。本年度は、プロジェクトの最終年度であることから、容積400L（液深 5cm）の海上設置型浮体式リアクタモジュールを用いる水素生産試験を実施し、エンジニアリングデータの取得を目指した。このエンジニアリングデータ取得の手順を図3. 1-11に示す。図3. 1-11には、200mLのルービン基礎試験から400Lのモジュール規模にスケールアップする際の試験課題を抽出し、これらの課題を一つ一つ解決することにより、目標に到達する道筋を示している。

I H I 分室では、海上設置型浮体式リアクタモジュールの開発を目標としているので、リアクタを動揺する効果、リアクタ内液を循環する効果を確認することは重要である。そこで、10L規模（容積5.75L）の動揺型浮体式リアクタによる室内試験で、人工光（ハロゲンランプ）を用いてリアクタの動揺及びリアクタ内液の循環の有無によるガス発生速度を比較した。

さらに、リアクタシステムの実用化を想定し、低コストの海上設置型リアクタの候補となるチューブラ式及びバッグ式の装置を製作し、陸上及び海上試験を実施した。

処理対象となる原水には嫌気性模擬処理水を用いた。

#### (2) 室内動揺型リアクタ、海上設置型リアクタ及び周辺機器の概要

室内試験では、動揺や液の循環による攪拌が水素発生に与える影響を調べるため、容積5.75Lの亚克力製リアクタを用いた。光源に用いたハロゲンランプはプロジェクトの共通品である。このリアクタの形状は、昨年度の成果報告書<sup>2)</sup>に記載したのでここでは省略する。

海上設置型リアクタは、内寸が2,000mm×4,000mm×50mm、容積が400Lで、リアクタ本体はS U S 製、天板はポリカーボネート製（板厚6mm）である。リアクタは鋼製の支持枠上に置き、海上設置後、海水がリアクタ表面を時々覆うように高さを調整した。北、東、西方向は周囲にメンテナンス用の歩廊を設けた。南方向には構造物を置いていない。リアクタで発生したガスは、タイゴンチューブにより陸上の湿式ガスメータに導いて、ガス量を測定した。光エネルギーは全天日射計を用いて常時測定記録した。

チューブラ式リアクタの材質は、透明塩ビでチューブの内径は52mm、内容積は38Lで、

受光面積は約 $1\text{m}^2$ である。

また、バッグ式リアクタは、肉厚0.3mmの軟質透明塩ビのシートを端面溶接してバッグ状にしたものを用い、容積は満水状態で約46L、受光面積は約 $1\text{m}^2$ である。浮力を与えるため、いずれも80Aの塩ビ管で周囲を囲み、塩ビ管底面に溶接した塩ビ板の上に載せて固定した。ガス量の測定は400Lリアクタと同様にして行った。

### (3) 実験条件

#### a. 光合成細菌及び増殖用前培養培地

用いた菌株は、*Rhodopseudomonas palustris* R-1 である。前培養に使用した培地は、表3. 1-1に示す改変星野培地である。前培養期間はこれまでの検討結果にもとづき2日間としている。温度は約35℃に保った。

#### b. 原水（嫌気性模擬処理水）

嫌気過程からの排水中に含まれる有機酸組成に類似させた嫌気性模擬処理水を使用した。

その組成を表3. 1-2に示す。酢酸、酪酸、プロピオン酸を各800mg/L、エタノールを400mg/L含み、アンモニアをほとんど含まないことが特徴である。表3. 1-2にみられるように、本原水には上記主要成分のほかに各種無機塩類、ビタミン、酵母エキス等を含有させているが、これまでの研究でこれら物質が水素生産の阻害要因のひとつであることがわかったので、本年度も $\text{NaHCO}_3$ 以外の各種無機塩類、ビタミン、酵母エキスを除いた。ただし、ニトロゲナーゼの発現用に微量のグルタミン酸ナトリウムを添加することにした。

#### c. リアクタ運転条件

室内試験では、容積5.75Lの亚克力製リアクタを用いた。三角屋根部を除く液深が50mm、透明亚克力製の二重構造で、内部には仕切り板を置き、流れを一方向に迂回させ短絡を防いだ。内壁と外壁の間に冷却水を循環させ、液温を所定温度（通常は約35℃）に保った。動揺させる場合は、低速モータにより、シーソーのように5rpmでリアクタを往復運動をさせた。三角屋根のそれぞれに設けたガス排出口から出たガスは、合—して湿式ガスメータ（シナガワ製、W-NK-0.5）を經由しガス捕集槽に

導いた。また、ガスメータの代わりにメスシリンダを用いた水上置換式のガス捕集槽も用いた。

また、リアクタ内液を循環させる場合は、小型循環ポンプ（三相電機製、PMD-121）を設置し、この循環ラインの途中にpH電極とORP電極を挿入し、pHとORPを計測した。リアクタ内の液温を二箇所計測した。

リアクタ直上の空間部分にランプからの輻射熱が滞留しないように小型ファン（オムロン製、R87F-A1A）を設置した。

光源に用いたハロゲンランプ（近藤フィリップス製、JDR-110V-125W）は、リアクタ上部に設けたドームに24個（3列×8個）、距離約1mの半円状に設置した。いずれもバッチ試験とした。この場合、前培養後に液から分離した菌体を原水に混合してからリアクタに投入した。

400Lリアクタによる海上試験ではバッチ運転のみを実施した。あらかじめ陸上で原水をヘッドスペースを残すよう400Lより若干少なめに投入した。次いで、前培養を繰り返し、遠心分離後室温、弱光下で保存しておいた菌体溶解液4Lを原水の一部に溶解してからリアクタに投入した。その後、10tクレーンでリアクタを吊り上げ、所定の海面に係留した。リアクタで発生したガスは、タイゴンチューブにより陸上の湿式ガスメータに導いて、ガス量を測定した。

チューブラ式リアクタ（容積38L）及びバッグ式リアクタ（容積46L）は、ともに400Lリアクタの海上試験とほぼ同時期に海上に設置し、バッチ運転した。リアクタで発生したガスは、タイゴンチューブにより陸上の湿式ガスメータに導いた。

#### ①前培養後の菌体分離

前培養後、培地中に残存するアンモニアをリアクタに持込まないため、菌体を遠心分離して回収した。回収した菌体をあらかじめ調整しておいた嫌気性模擬処理水に混合してから、リアクタに投入した。400L試験では大量の種菌が必要となるため、24Lの前培養を4回行い、各回の遠心分離菌体を前培養液に溶解して低照度、室温で保存したものを用いた。

#### ②光エネルギー量

動揺効果確認の室内試験では、24個のハロゲンランプを連続照射した。リアクタ表

面での平均光エネルギーは $512\text{W}/\text{m}^2$ であった。光エネルギーの測定には、LI-COR社のライトメータLI-189型を用いた。

太陽光利用の400L試験では、全天日射計（英弘精機製MS-801）を用い、光エネルギー量を連続記録した。気象条件により光エネルギー量が変化した。実験期間中の日照時間は約12hrであった。

また、人工光利用の38Lチューブラリアクタ試験では、12個のハロゲンランプを連続照射し、リアクタ表面での平均光エネルギー量は $165\text{W}/\text{m}^2$ であった。

#### d. 測定項目

##### ①発生ガス

発生ガスの組成（ $\text{H}_2$ 、 $\text{N}_2$ 、 $\text{O}_2$ 、 $\text{CO}_2$ 、 $\text{CH}_4$ の割合）は、ガスクロマトグラフ（島津製作所製、GC-9A、TCD検出器）により求めた。

##### ②水質

リアクタ内部引抜き液の水質としてpH、ORP、OD（660nm、島津製作所製UV-VISスペクトロフォトメータUV-1200）、SS、 $\text{NH}_4^+$ （東亜電波工業製イオンメータIM-5S及びアンモニア電極AE-235）、有機酸（酢酸、プロピオン酸及び酪酸）を測定した。有機酸は液体クロマトグラフ（島津製作所製、LC-10A、イオン排除クロマトグラフィー・ポストカラムpH緩衝化法、Shim-pack SCR-102Hカラム、電気伝導度検出器）により測定した。

#### (4) 実験結果及び考察

##### a. 室内動揺型リアクタによる動揺効果確認試験

本試験は前培養2日後の液3Lから菌体を遠心分離し、原水に溶解してからリアクタに投入した。運転はバッチとした。動揺を与える場合は、5rpmでシーソーのように往復運動させた。動揺を与えない場合はリアクタを水平にした。また、循環は小型ポンプを用い、流量は $7\text{L}/\text{min}$ とした。結果を表3. 1-3に示す。二重構造になっているリアクタ外側に冷却水を流したので、各条件ともリアクタ内の液温はほぼ一定であった。しかし、リアクタの表面（屋根）の温度は動揺と循環の有無により大きく異なり、動揺も循環もない場合は、 $40^\circ\text{C}$ を越えた。このことは、海上設置型リアクタにおいて、

波浪による動揺の効果を強く示唆する。ガス発生量についてみると、次のことが明らかとなった。

- 循環があるとガス発生速度が大きい
- 循環が無くとも動揺していればガス発生速度が大きい
- 循環も動揺も無い場合がもっともガス発生速度が小さい
- 循環も動揺も両方ある場合がもっともガス発生速度が大きい
- 動揺が無くとも循環があればガス発生速度が大きい

以上のことから、リアクタ内の液の運動は不可欠で、静止状態で光を照射してもガス発生は少なく、液温の上昇による菌体の死滅をまねくことが予測される。従って、リアクタに動揺を与え、液の温度を均一化し、併せて周囲の環境水による冷却効果が期待できる海上設置型のリアクタのメリットが明らかになる。動揺や冷却のための動力を必要としないことも強調されてよい。

#### b. 水素連続生産、海上設置型浮体式リアクタ

室内動揺型リアクタで水素連続生産技術をほぼ確立したので、I H I 分室として目標としていた400L規模の平板リアクタによる海上での水素生産に取り組んだ。プロジェクトの最終年度に当たるため、波浪の影響、海水による冷却効果確認等エンジニアリングデータの取得も目指した。

リアクタ本体はS U S 製で、太陽光を取り入れる天板は厚さ6mmの透明ポリカーボネート製とした。海面に浮かせ、またメンテナンスのため、リアクタ周囲に歩廊を設置し、その下にブイを納め、全体を浮かせることとした。歩廊4隅と海底に設置したシンカーとの間に係留索を取り付けた。台風等の気象条件が悪化する場合には、事前にクレーン車により装置全体を陸上に揚収することを想定した。大きな台風が接近することがあったが、ある程度の耐久性があり、幸いにして陸上揚収の事態にはならなかった。

リアクタを海上に設置して運転中の状況を図3. 1-12に示す。また、リアクタの諸元を図3. 1-13に示す。リアクタには温度計を取り付け、リアクタ内と外部海水温度及び大気温度を常時測定記録した。発生ガスはタイゴンチューブを通して陸上の湿式ガスメータに導き、ガス量を測定した。リアクタ内の液を小型マグネットポンプにより循環させたが、ポンプの吐出量が少なく効果は無かった。むしろ波による

動揺で液の攪拌が起こり、濃度及び温度の均一化ができた。試験は、平成10年8月3日から開始し、同月28日に終了した。運転時間は約600時間であった。開始時の初発菌体濃度はODは0.32、SSは166mg/Lであった。終了時のODは1.49であった。試験期間中の太陽光エネルギーと累積発生ガス量の推移を図3. 1-14に示す。200時間以降にガス発生量が増加し、340時間後に最大ガス発生速度0.8L/L・dが得られた。このときの1日の日照時間を8時間(7:50~15:50)、ガス発生量107L、水素濃度70%として、光エネルギーの水素への変換効率を求めると、0.85%が得られた。転換効率を求めるデータシートを表3. 1-4に示す。これは瞬間的な値であるが、プロジェクトの目標値0.8%を達成するものとなった。気温は30~33℃、海水温度26℃、リアクタ内液温は26℃であったので、海水による冷却効果はあったと考えられる。400時間以後も比較的大きなガス発生速度が認められた。しかしながら、表3. 1-5に示すように、オーバーオールの変換効率は0.30%と小さいものとなった。

次に試験前後のリアクタ内液有機酸濃度を液体クロマトグラフで測定したのでその結果を下表に示す。

|              | 試験開始時 | 試験終了時 | 除去率(%) |
|--------------|-------|-------|--------|
| 酢酸(mg/L)     | 647   | 271   | 58     |
| プロピオン酸(mg/L) | 766   | 115   | 85     |
| n-酪酸(mg/L)   | 821   | 306   | 63     |

なお、転換効率の算出には基質からの水素生成の理論式に対する発生した水素の収率で表現する方法もある。上記光エネルギーベースに加えて基質ベースからの転換効率の算出も試みた。

$$(647/1,000 \times 400/60 \times 4) + (766/1,000 \times 400/74 \times 7) + (821/1,000 \times 400/88 \times 10) \\ = 83.55 \text{mol-H}_2$$

期間中のガス発生累積量1062L、H<sub>2</sub>含有率70%、

$$\text{効率: } (1,062 \times 0.7) / (83.55 \times 22.4) \times 100 = 40\%$$

これには、計算に含めていないエタノールの寄与分も加えなければならないので、実際は分母がさらに大きくなり、効率は小さくなると思われる。

#### c. 水素連続生産、チューラ式リアクタ

チューラ式及びバツグ式リアクタには、400Lリアクタに使用した同じ原水と菌体を投入した。400Lリアクタとほぼ同時期に海上に設置したが、両リアクタともガス発生が認められなかった。

チューラ式リアクタを海上に設置した状況を図3. 1-15の右側に、その後陸上の水槽に設置した状況を同図左側に示す。リアクタ内の液は満水にせず、若干のヘッドスペースを持たせたが、波浪による動揺があっても内部の攪拌は十分でなかった。チューラ式においてもポンプによる液の循環が必要であると考えられた。

そこで、チューラ式リアクタを陸上に揚収し、人工光を用いる室内試験で水素生産を試みた。リアクタを床面に置き、距離約1mから12個のハロゲンランプにより連続照射した。海上試験の失敗を踏まえ、小型循環ポンプ（三相電機製、PMD-121）により液を循環させた。前培養液24Lを遠心分離して回収した菌体を50Lの原水に溶解してリアクタに投入し、バツグ運転を実施した。チューラ式リアクタを室内床面に設置した状況を図3. 1-16に示す。リアクタ表面における平均光エネルギー量は165W/m<sup>2</sup>であった。なお受光面積は1m<sup>2</sup>である。運転100時間後からガス発生が認められ、510時間後の累積ガス発生量は90Lに達した。ガス中の水素含有率は76%であった。累積ガス発生量の経時変化を図3. 1-17に示す。また、このときの光エネルギーの水素への転換効率は0.27%と小さかった。転換効率の算出結果を表3. 1-6に示す。

#### d. バツグ式リアクタ

この型式のリアクタは、低コストで製作が可能と思われるため、実プラントの試験計に採用された。本年度の試験では、海上に設置して水素生産を試みたが、残念ながら失敗した。参考のために、海上及び陸上の水槽に設置した状況を図3. 1-18に示す。ガスは中心部の配管から引き抜く構造になっているが、リアクタを軟質塩ビシートで製作したため、ガスが局在化して配管に到達しないことがあった。チューラ式リアクタに比べて波浪による液の攪拌効果は認められたが、観察によれば全体が上下することが多く、攪拌効果は十分ではないように思われた。ガスの引き抜き、攪拌、シートであるが故の破損しやすさなどに改善の余地が見受けられた。

#### (5) 海上設置型浮体式リアクタモジュールのエンジニアリングデータ

本年度は、モジュール試験としてリアクタを実際の海面に設置し、太陽光下で水素生産を確認するとともに、波浪の影響、海水による冷却効果の確認等のエンジニアリングデータを取得し、将来の実用化のための検討課題を抽出することとした。今回の得られたデータをもとに定性的ではあるが下記のようにまとめた。

##### [エンジニアリングデータ]

- 対角線方向2カ所の液温はほぼ同一であったことから、波浪によるリアクタ内の液がよく攪拌されていることがわかった。
- 太陽光入射角に対するリアクタ受光面の角度が固定されていないので、太陽光が均一にリアクタ表面を照射していることがわかった。
- 周囲の海水による冷却効果を確認でき、冷却動力が不要であることがわかった（特に夏季）。
- リアクタの係留方法、海上と陸地間の配管、配線の設置方法についての知見が得られた。台風接近に伴う波高、うねりに対する耐久性もあることがわかった。直撃の場合は、事前にリアクタをクレーンで陸上に揚収することを予定していたが、そのような状況には至らなかった。
- リアクタを支持する構造物には亜鉛メッキを施したので海水に対して十分な耐腐食性のあることがわかった。
- 海生生物が構造物に付着し（特にアオサの幼生）、場所によっては除去の必要があった。受光面はポリカーボネートで鏡面仕上げをしているので、傷が付かなければ生物の付着は少なく、付着しても容易に除去できた。

#### 3. 1. 5 参考文献

- 1) T. Fujii, A. Nakazawa, N. Sumi, H. Tani, A. Ando and M. Yabuki,  
Agric. Biol. Chem. , 47, 2747 ~ 2753 (1983)
- 2) 環境調和型水素製造技術研究開発平成9年度成果報告書 p.178 (1998)
- 3) Sasikala K., et al., Advanced in Applied Microbiology, 38, 211-298 (1993)

表 3. 1 - 1 前培養培地組成

|                   |      |
|-------------------|------|
| Sodium Acetate    | 0.5g |
| Sodium Propionate | 0.5g |
| Sodium Succinate  | 0.5g |
| Sodium Malate     | 0.5g |

|                                                 |        |
|-------------------------------------------------|--------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 0.4g   |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                 | 0.7g   |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O            | 0.2g   |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 1.0g   |
| NaCl                                            | 0.1g   |
| FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O            | 0.005g |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O            | 0.05g  |

|               |         |
|---------------|---------|
| Biotin        | 0.001mg |
| Thiamine HCl  | 0.02mg  |
| Yeast Extract | 1.0g    |

|                 |     |
|-----------------|-----|
| Distilled Water | 1L  |
| pH              | 6.8 |

表 3. 1 - 2 嫌気性模擬処理水組成

|                   |      |
|-------------------|------|
| Sodium Acetate    | 0.8g |
| Sodium Propionate | 0.8g |
| Sodium Butyrate   | 0.8g |
| Ethanol           | 0.4g |

|                                      |       |
|--------------------------------------|-------|
| NaHCO <sub>3</sub>                   | 2.0g  |
| NH <sub>4</sub> Cl                   | 0.04g |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | 0.15g |
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0.03g |
| MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 0.82g |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 0.1g  |

|                                   |         |
|-----------------------------------|---------|
| Biotin                            | 0.001mg |
| Thiamine HCl                      | 0.2mg   |
| Vitamin B <sub>12</sub> succinate | 0.1g    |

|                               |      |
|-------------------------------|------|
| Distilled Water               | 1L   |
| pH                            | 5~6  |
| ※ Sodium Glutamate(temporary) | 0.2g |

表3. 1-3 リアクタ動揺・循環効果

5.75L reactor, Halogen lumps:24, continuous irradiation, Run 27

|                           | Temperature |          | Circulating<br>pump ON/OFF | Gas<br>production<br>rate | ORP          | Remarks                                                                                                                                                                     |
|---------------------------|-------------|----------|----------------------------|---------------------------|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                           | Liquid      | Roof     |                            |                           |              |                                                                                                                                                                             |
| Moving<br>5rpm            | 35~36 °C    | 39~40 °C | ON                         | 197 mL/Hr                 | -541~-555 mV | Much gas production when the liquid is circulated                                                                                                                           |
|                           | 36~40 °C    | 39~48 °C | OFF                        | 125 mL/Hr                 | -559~-608 mV | Much gas production when the reactor is moving even the liquid is not circulated<br><br>Less gas production when the reactor is not moving and the liquid is not circulated |
| No moving<br>(horizontal) | 35~36 °C    | 39~40 °C | ON                         | 125 mL/Hr                 | -568~-605 mV | Most gas production when the reactor is moving and the liquid is circulated                                                                                                 |
|                           | 34~36 °C    | 40~47 °C | OFF                        | 38 mL/Hr                  | -572~-616 mV | Much gas production when the liquid is circulated even the reactor is not moving                                                                                            |

表 3. 1 - 4 光エネルギー転換効率 (Run H10-4、短期)

| Energy of Lamp   | Area           | (conversion)    | (constant)       | Period | Period |
|------------------|----------------|-----------------|------------------|--------|--------|
| W/m <sup>2</sup> | m <sup>2</sup> | 1W=0.239cal/sec | L/mol(0°C, 1atm) | day    | hr     |
| 4~725            | 8              | 0.239           | 22.4             | 1      | 8      |

| Total Light Energy |
|--------------------|
| kJ/m <sup>2</sup>  |
| 12886.776          |

| Total Gas Volume | Total Gas Volume | H <sub>2</sub> Content | Total H <sub>2</sub> Volume |
|------------------|------------------|------------------------|-----------------------------|
| L(26°C, 1atm)    | L(0°C, 1atm)     | %                      | L(0°C, 1atm)                |
| 107.55           | 98.19782609      | 0.7                    | 68.73847826                 |

| H <sub>2</sub> Volume per Area      |
|-------------------------------------|
| L/m <sup>2</sup> , Estimated period |
| 8.592309783                         |

| H <sub>2</sub> Combustion Energy | Combustion Energy of H <sub>2</sub> gained |
|----------------------------------|--------------------------------------------|
| kcal/mol, constant               | kJ/m <sup>2</sup> , Estimated period       |
| 68.3                             | 109.6378728                                |

| Efficiency | period: 7:50~15:50, Aug. 18, 1998 |
|------------|-----------------------------------|
| %          |                                   |
| 0.851      |                                   |

表3. 1-5 光エネルギー転換効率 (Run H10-4、長期)

| Energy of Lamp   | Area           | (conversion)    | (constant)      | Period | Period |
|------------------|----------------|-----------------|-----------------|--------|--------|
| W/m <sup>2</sup> | m <sup>2</sup> | 1W=0.239cal/sec | L/mol(0°C,1atm) | day    | hr     |
| 4~989            | 8              | 0.239           | 22.4            | 25     | 602    |

| Total Light Energy |
|--------------------|
| kJ/m <sup>2</sup>  |
| 360929.45          |

| Total Gas Volume | Total Gas Volume | H <sub>2</sub> Content | Total H <sub>2</sub> Volume |
|------------------|------------------|------------------------|-----------------------------|
| L(26°C,1atm)     | L(0°C,1atm)      | %                      | L(0°C,1atm)                 |
| 1062.5           | 970.1086957      | 0.7                    | 679.076087                  |

| H <sub>2</sub> Volume per Area      |
|-------------------------------------|
| L/m <sup>2</sup> , Estimated period |
| 84.88451087                         |

| H <sub>2</sub> Combustion Energy | Combustion Energy of H <sub>2</sub> gained |
|----------------------------------|--------------------------------------------|
| kcal/mol, constant               | kJ/m <sup>2</sup> , Estimated period       |
| 68.3                             | 1083.126359                                |

| Efficiency |
|------------|
| %          |
| 0.300      |

period: Aug. 4~Aug. 28, 1998

表3. 1-6 チューブラリアクタ光エネルギー転換効率（室内、長期）

| Energy of Lamp   | Area           | (conversion)    | (constant)      | Period | Period |
|------------------|----------------|-----------------|-----------------|--------|--------|
| W/m <sup>2</sup> | m <sup>2</sup> | 1W=0.239cal/sec | L/mol(0°C,1atm) | day    | hr     |
| 165              | 1              | 0.239           | 22.4            | 21.3   | 510    |

| Total Light Energy  |
|---------------------|
| kcal/m <sup>2</sup> |
| 72402.66            |

| Total Gas Volume | Total Gas Volume | H <sub>2</sub> Content | Total H <sub>2</sub> Volume |
|------------------|------------------|------------------------|-----------------------------|
| L (20°C,1atm)    | L(0°C,1atm)      | %                      | L(0°C,1atm)                 |
| 90               | 83.85665529      | 0.76                   | 63.73105802                 |

| H <sub>2</sub> Volume per Area      |
|-------------------------------------|
| L/m <sup>2</sup> , Estimated period |
| 63.73105802                         |

| H <sub>2</sub> Combustion Energy | Combustion Energy of H <sub>2</sub> gained |
|----------------------------------|--------------------------------------------|
| kcal/mol, constant               | kcal/m <sup>2</sup> , Estimated period     |
| 68.3                             | 194.3228242                                |

| Efficiency |
|------------|
| %          |
| 0.268      |

period: Nov.20~Dec.11, 1998

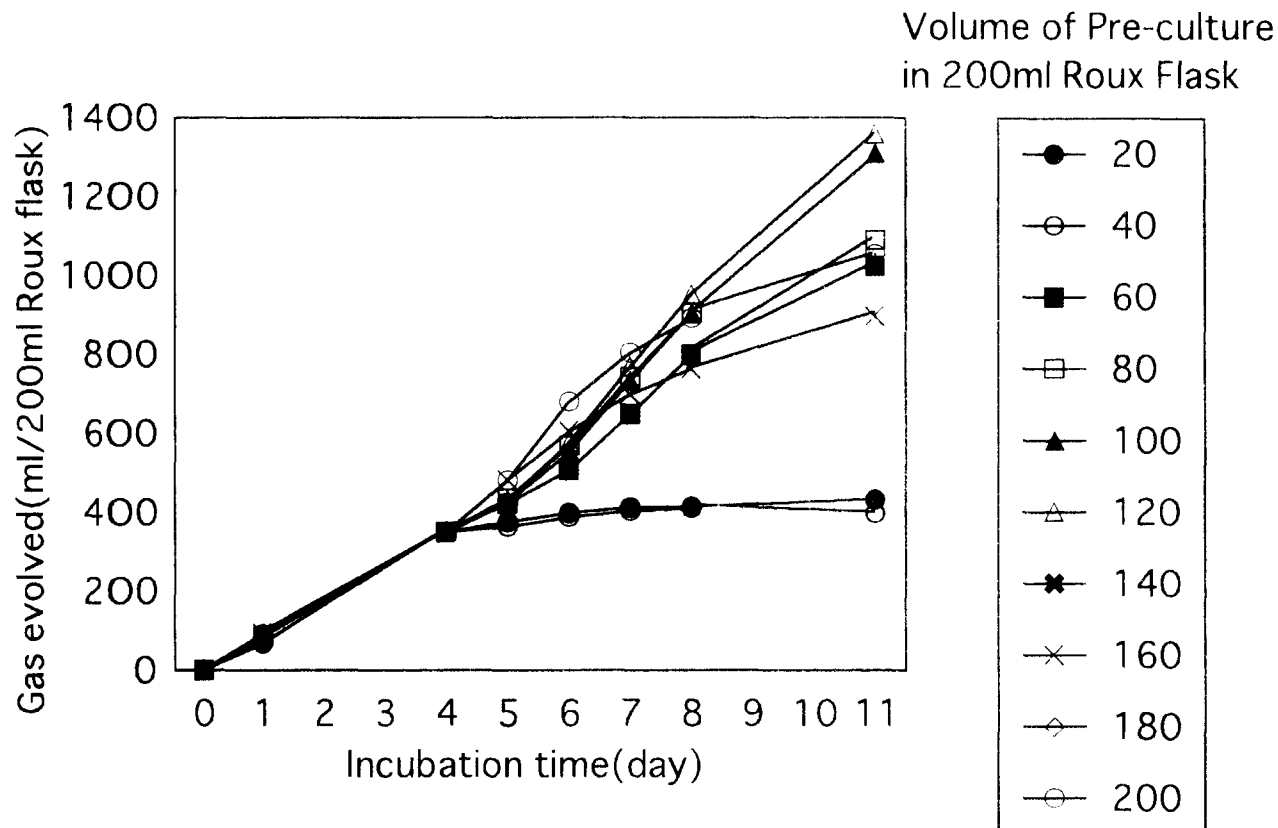


図3. 1-1 培養液中の窒素欠前培養液量がR-1株の水素発生に与える影響

<Condition of Incubation>

Pre-culture : 3 L Reactor、Medium : G L、Incubation time : 3 days、

Organisms : O.D.=1.1、Light Intensity :  $350\text{W}/\text{m}^2 \times 2$ 、  
Temperature :  $30^\circ\text{C}$

Hydrogen Evolution : 200ml Roux flask、Medium : G L

Light Intensity :  $350\text{W}/\text{m}^2$ 、Temperature :  $30^\circ\text{C}$

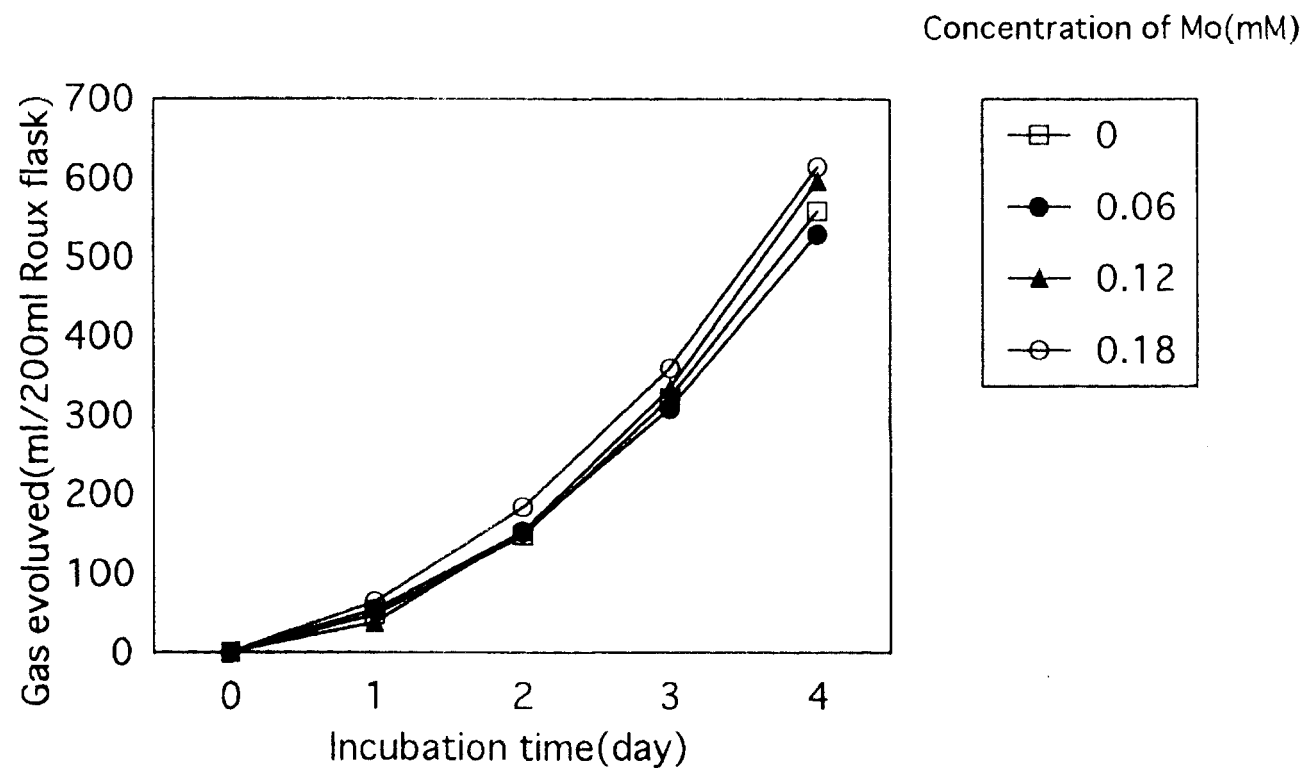


図3. 1 - 2 培養液中のモリブデン濃度がR - 1株の水素発生に与える影響

Medium : GL培地

Temperature : 30℃

Lighting condition : 350w/m<sup>2</sup>

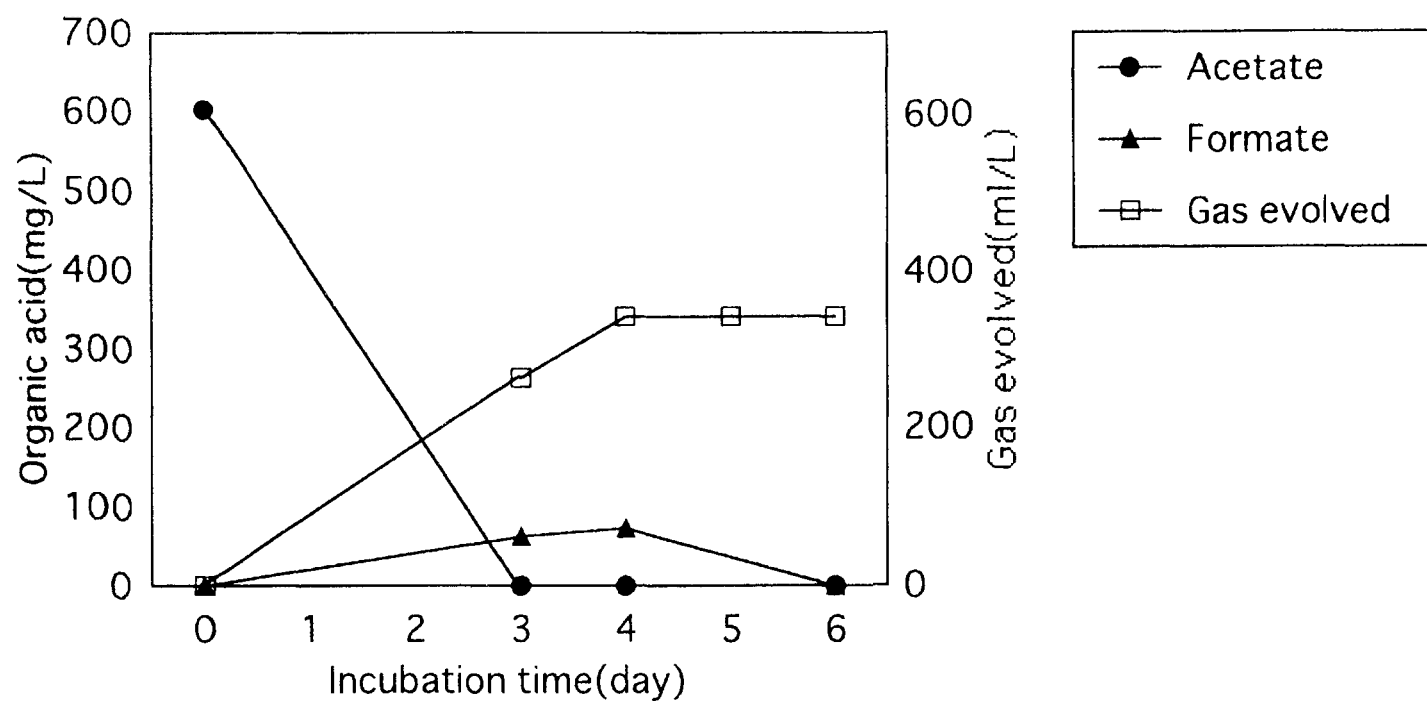


図3. 1-3 R-1株の酢酸培地における水素発生

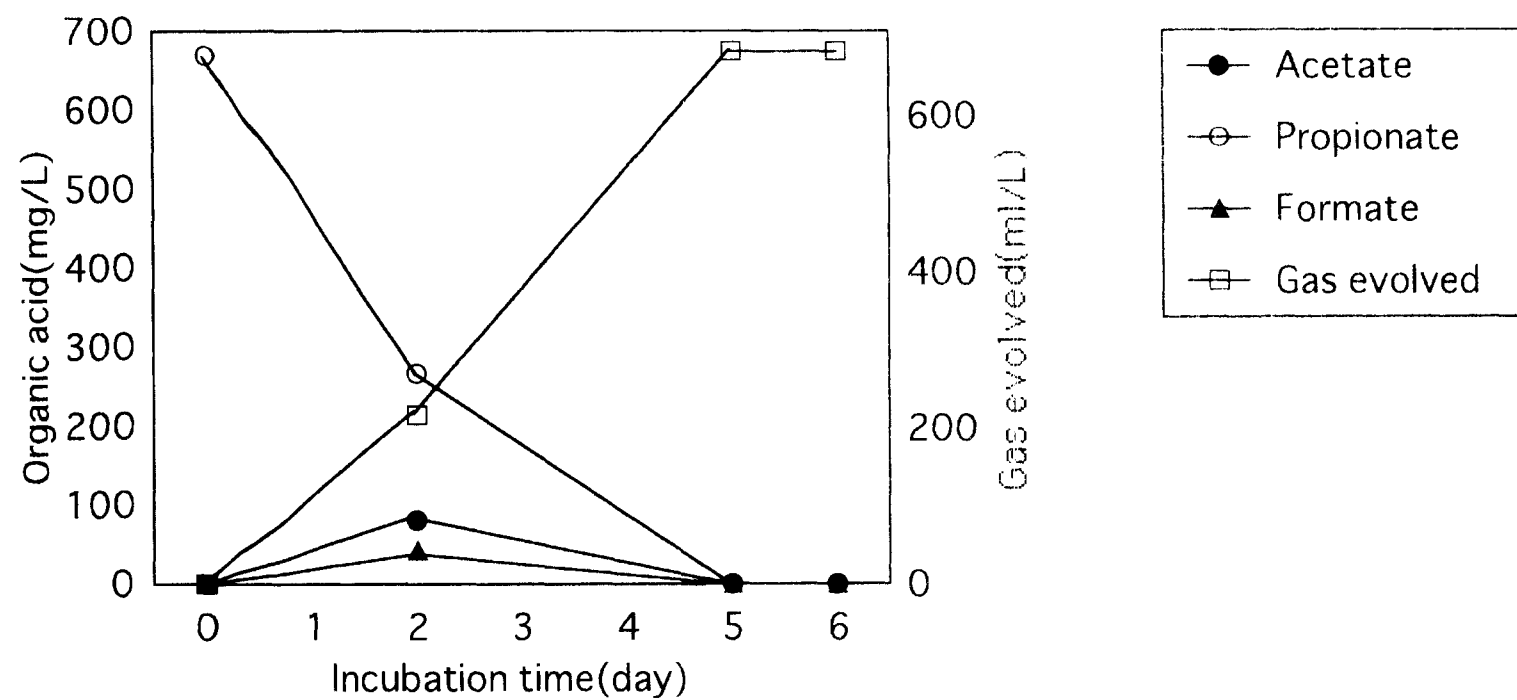


図3. 1-4 R-1株のプロピオン培地における水素発生

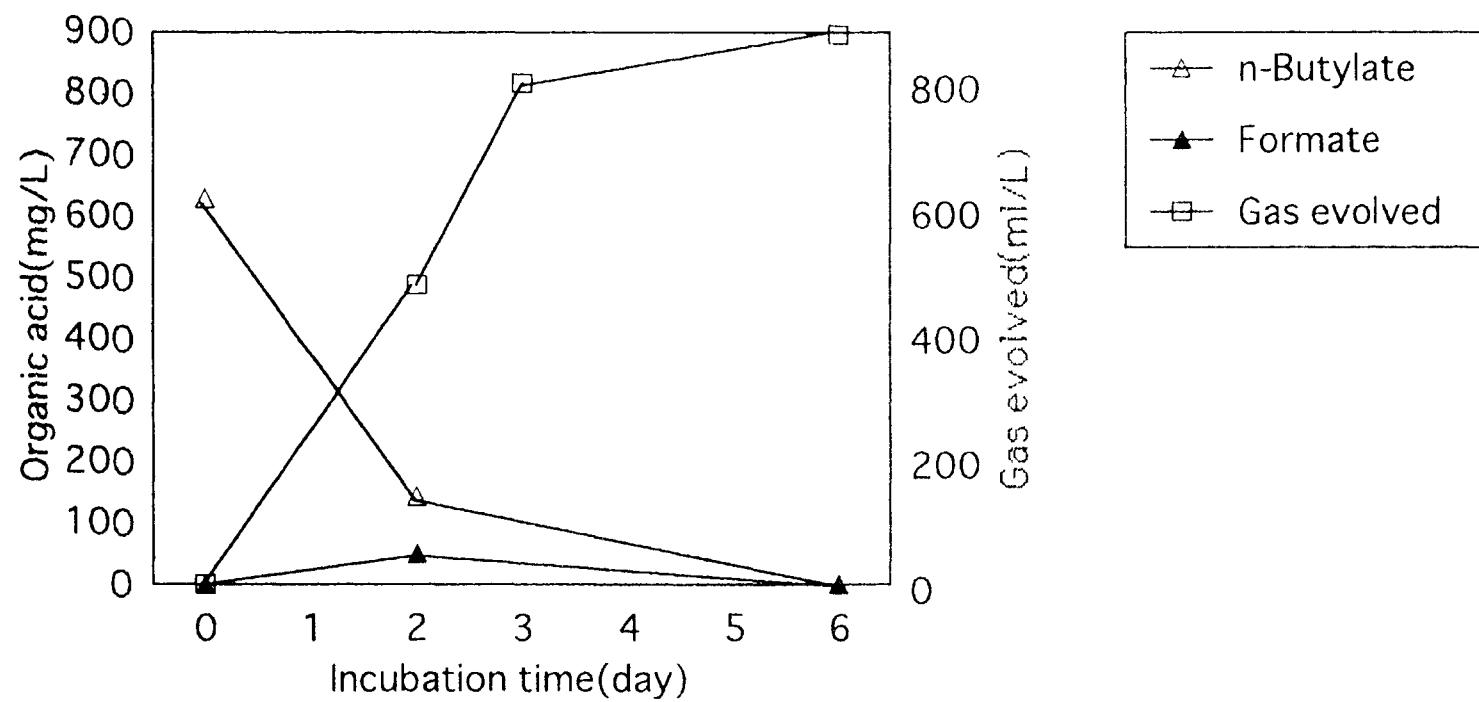


図3. 1-5 R-1株の酪酸培地における水素発生

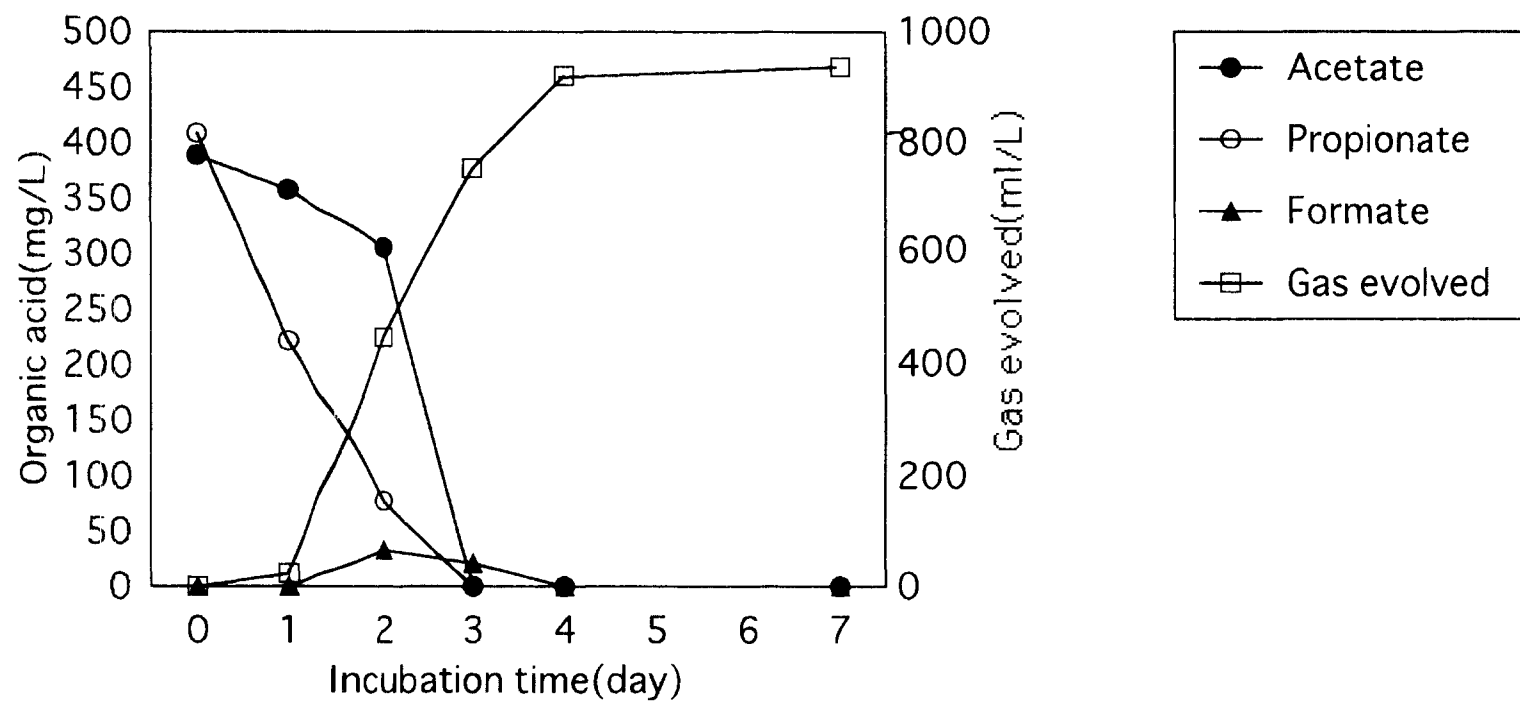


図 3. 1-6 R-1 株の酢酸-プロピオン酸培地における水素発生

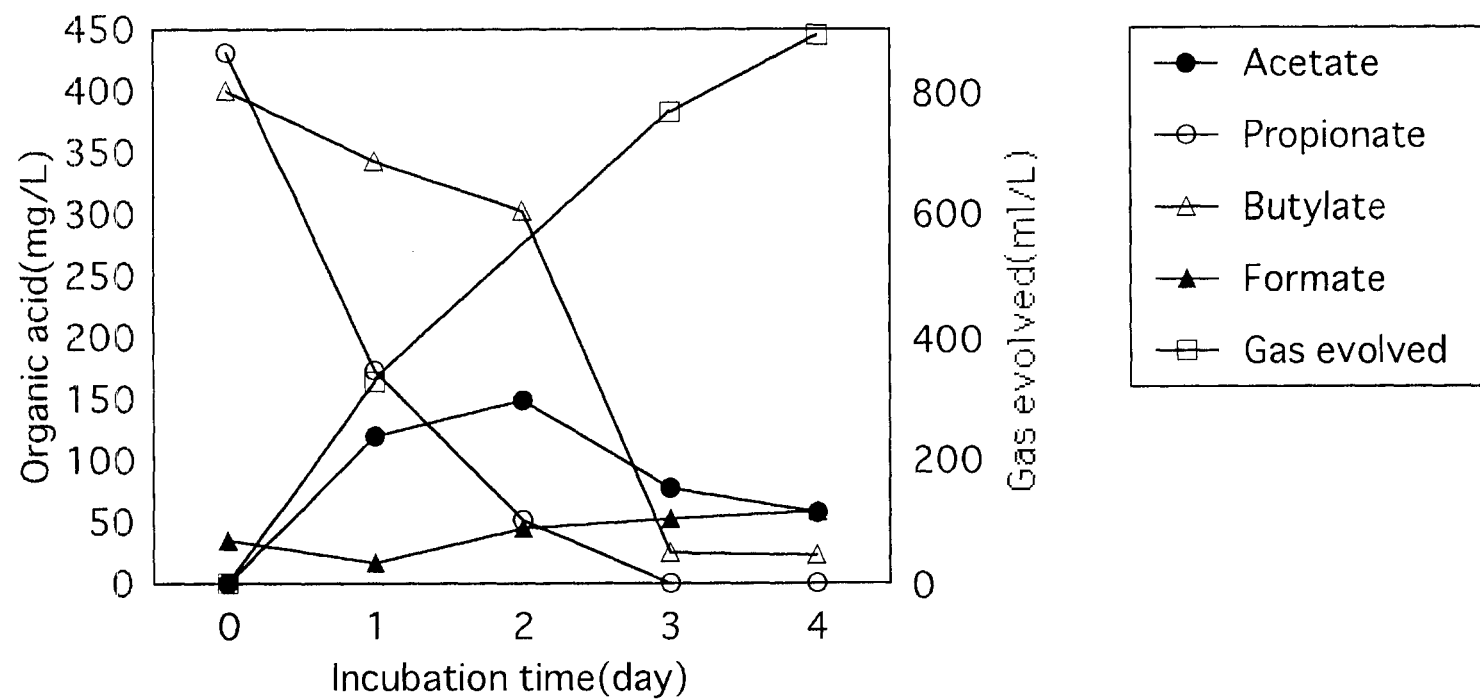


図3. 1-7 R-1株のプロピオン酸-酪酸培地における水素発生

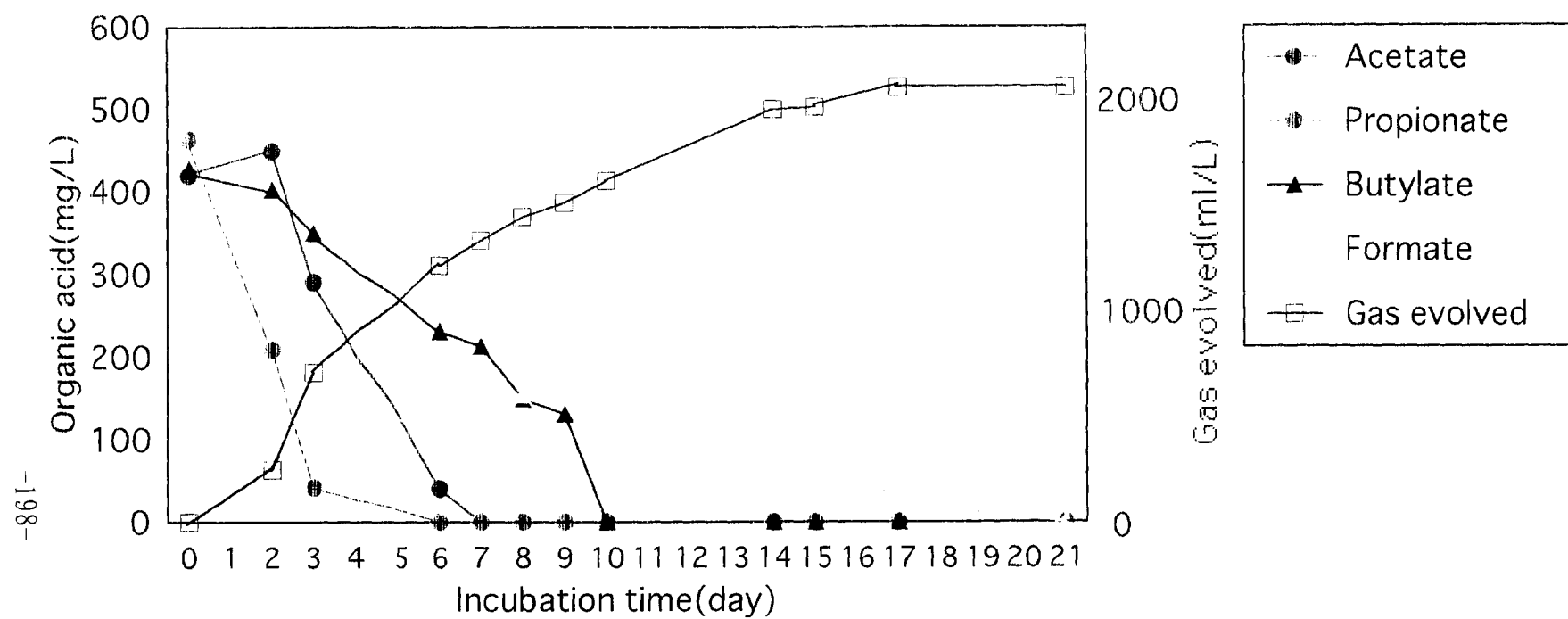


図3. 1-8 R-1株の酢酸-プロピオン酸-酪酸培地における水素発生

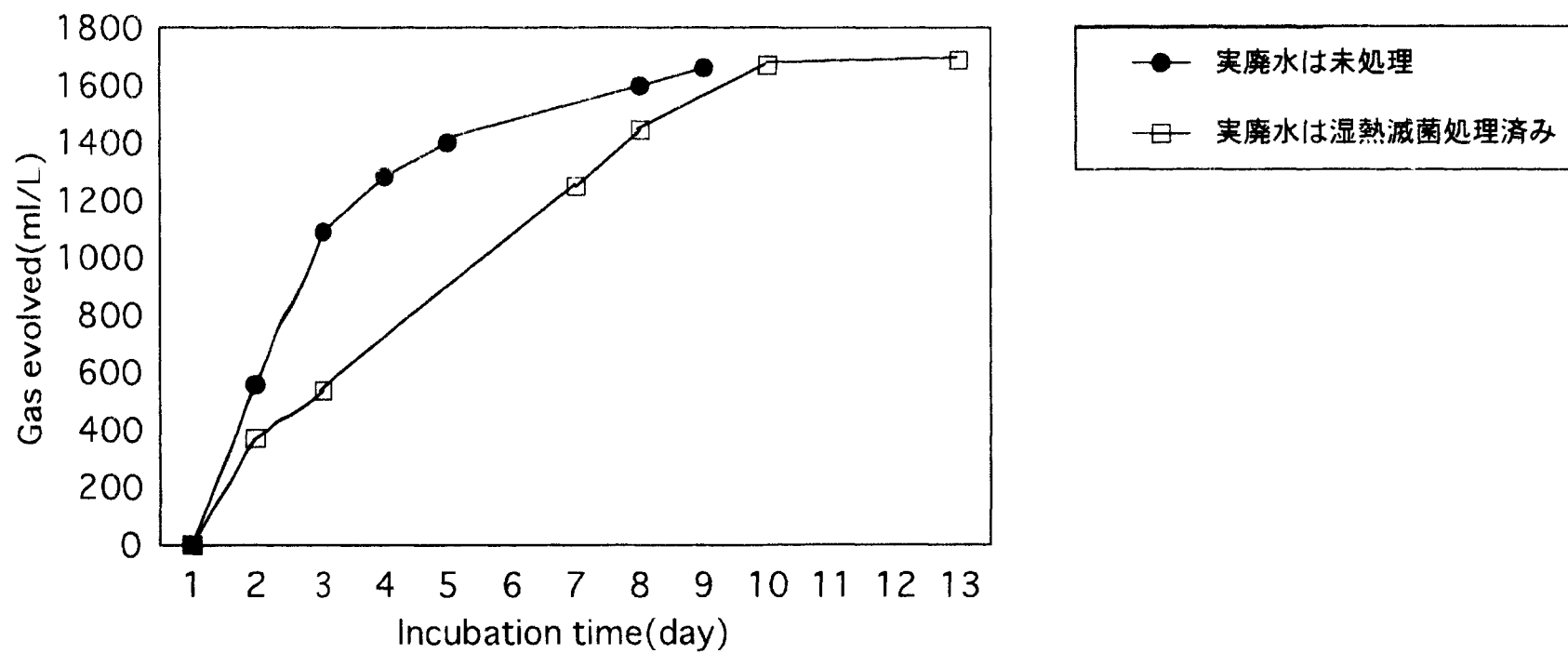


図3. 1-9 R-1株の実廃水からの水素発生

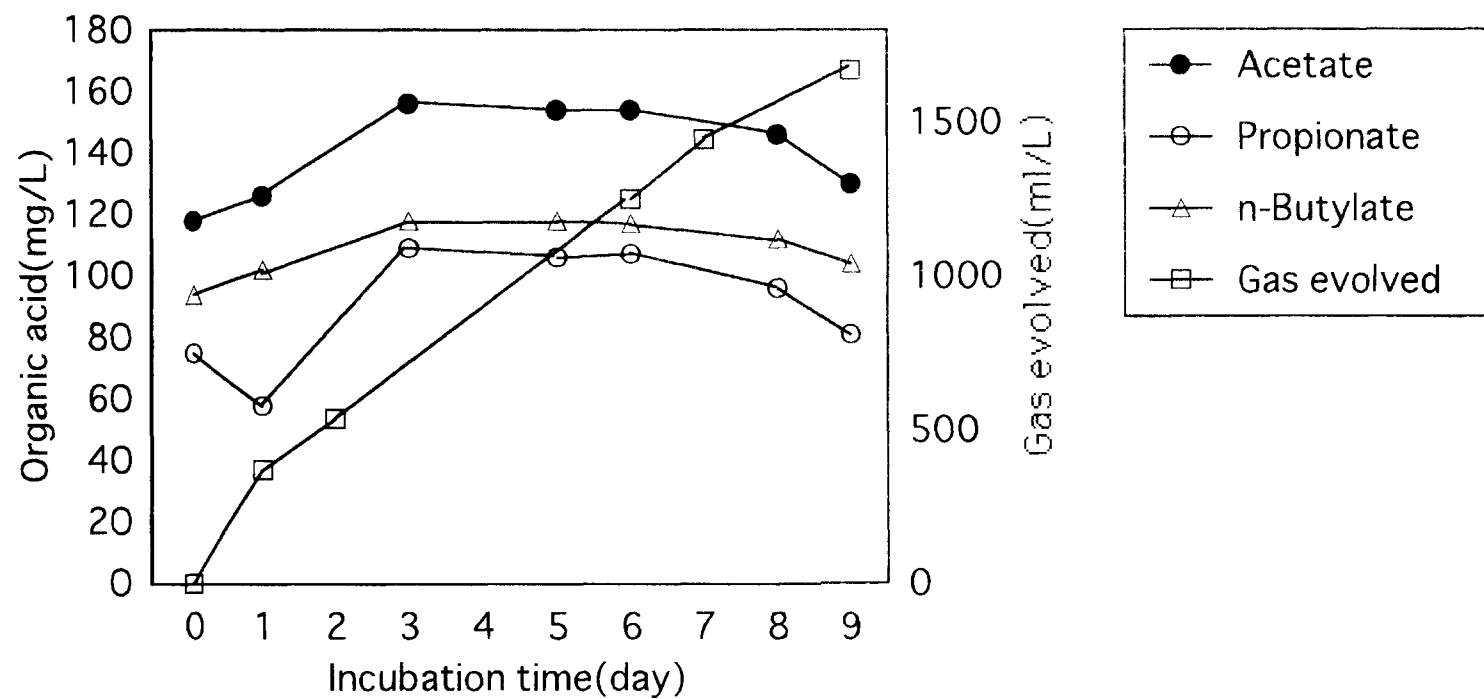


図3. 1-10 R-1株の実廃水における水素発生（有機酸濃度の変化）

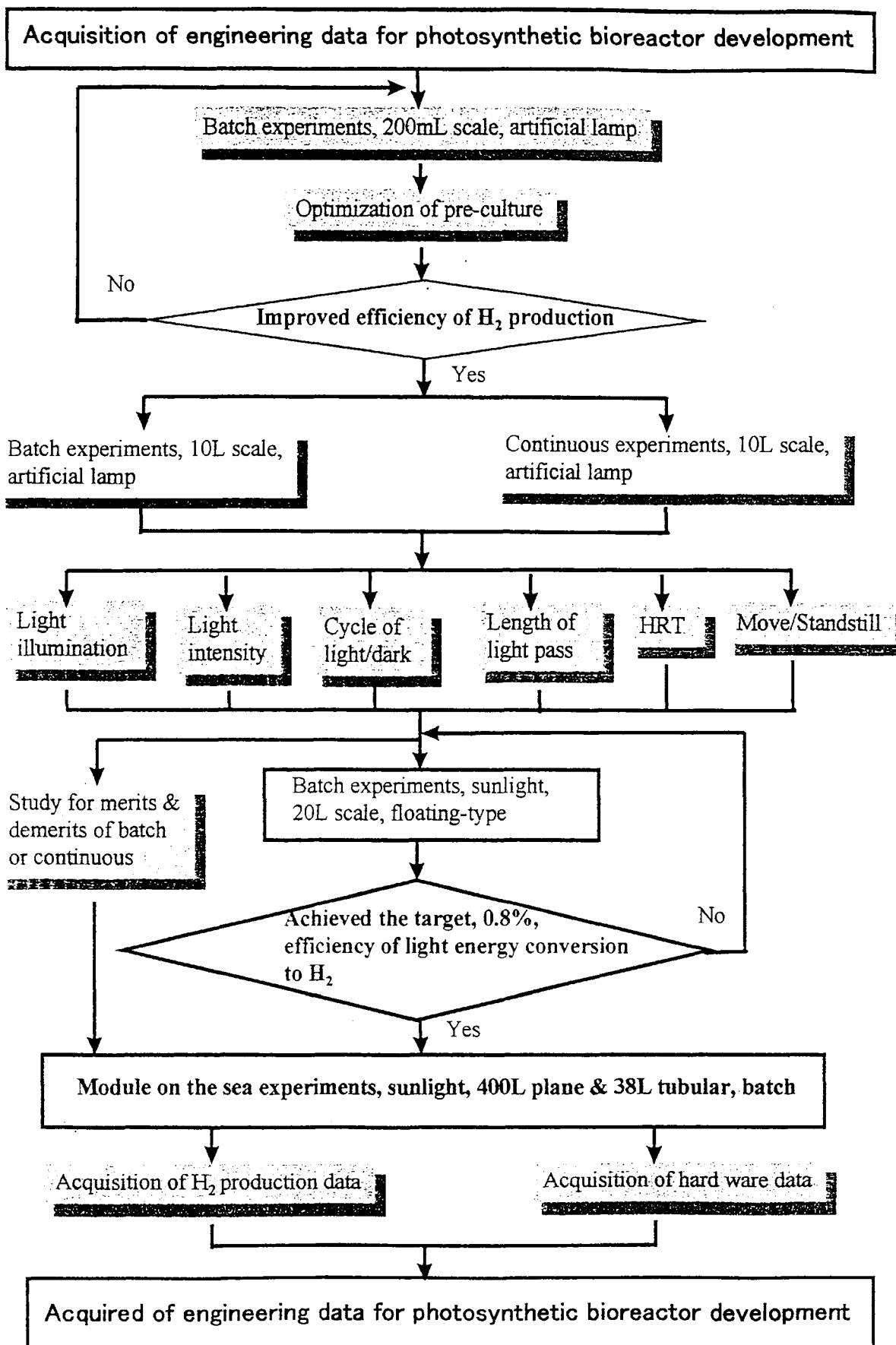
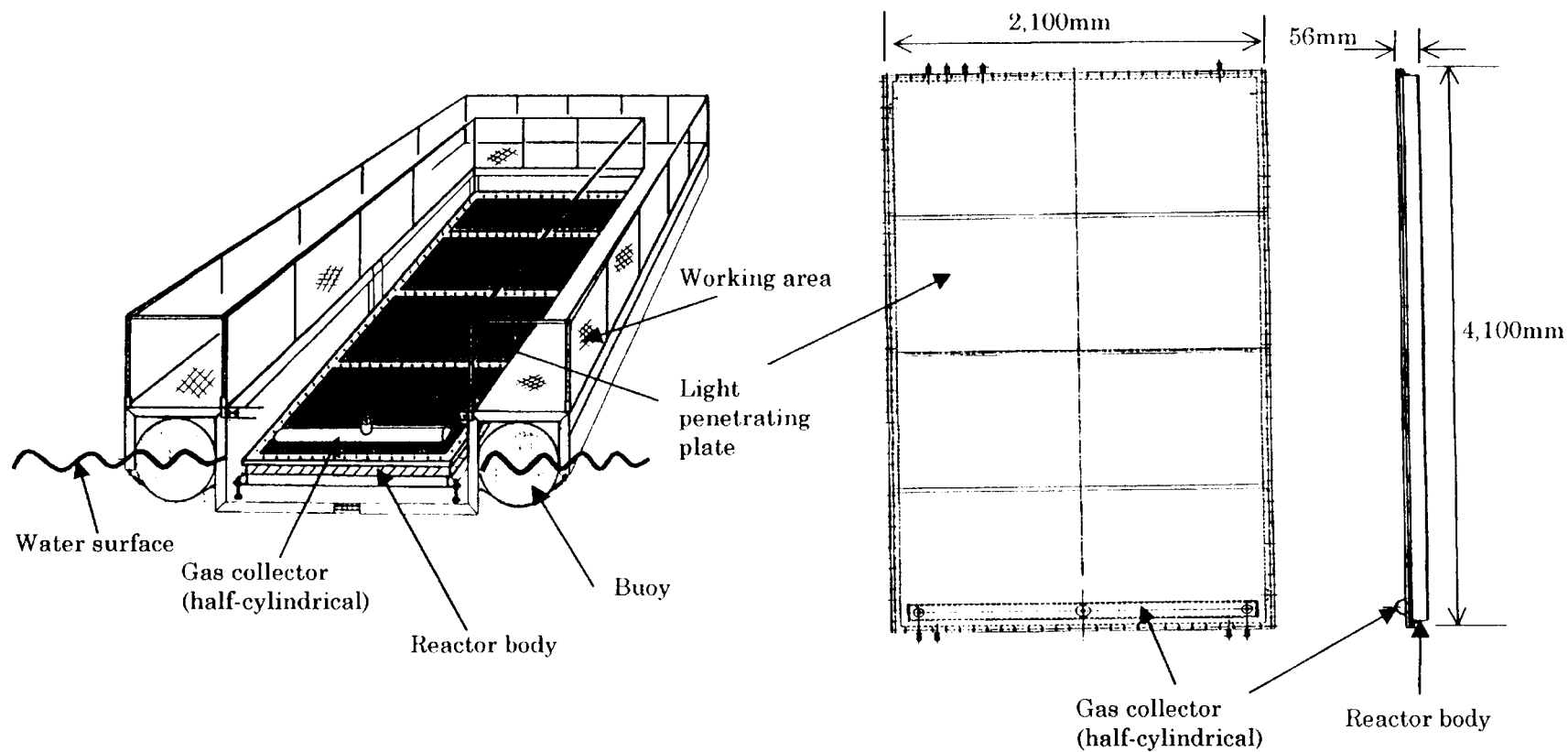
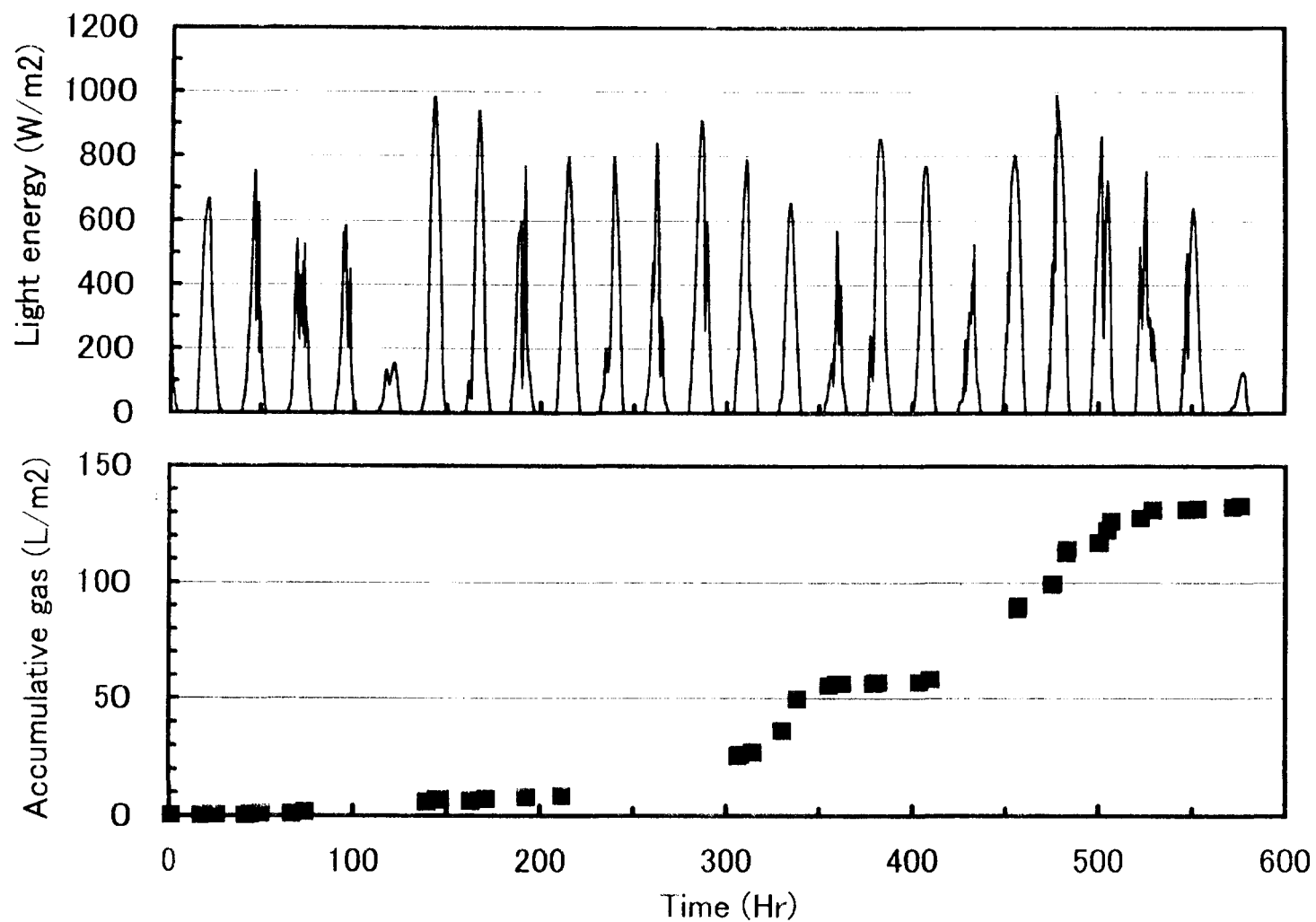


図3. 1-11 浮体式光合成リアクタ開発のためのエンジニアリングデータ取得手順



|                  |                                                                                |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Materials</b> | <b>Body : SUS-316、 Plate thickness : 6mm</b>                                   |
|                  | <b>Light penetrating plate : Polycarbonate 2,100mm×4,100mm×12mm(Thickness)</b> |
| <b>Size</b>      | <b>2,000mm×4,000mm×50mm (Depth)</b>                                            |
| <b>Volume</b>    | <b>400L</b>                                                                    |

図3. 1-13 400L海上設置型浮体式光合成リアクタ諸元



Light energy and Accumulative gas volume, 400L plane reactor, on the sea experiment  
Run H10-4 August 4 ~ 28, 1998

図3. 1-14 太陽光エネルギーと累積ガス発生量の経時変化(海上試験)

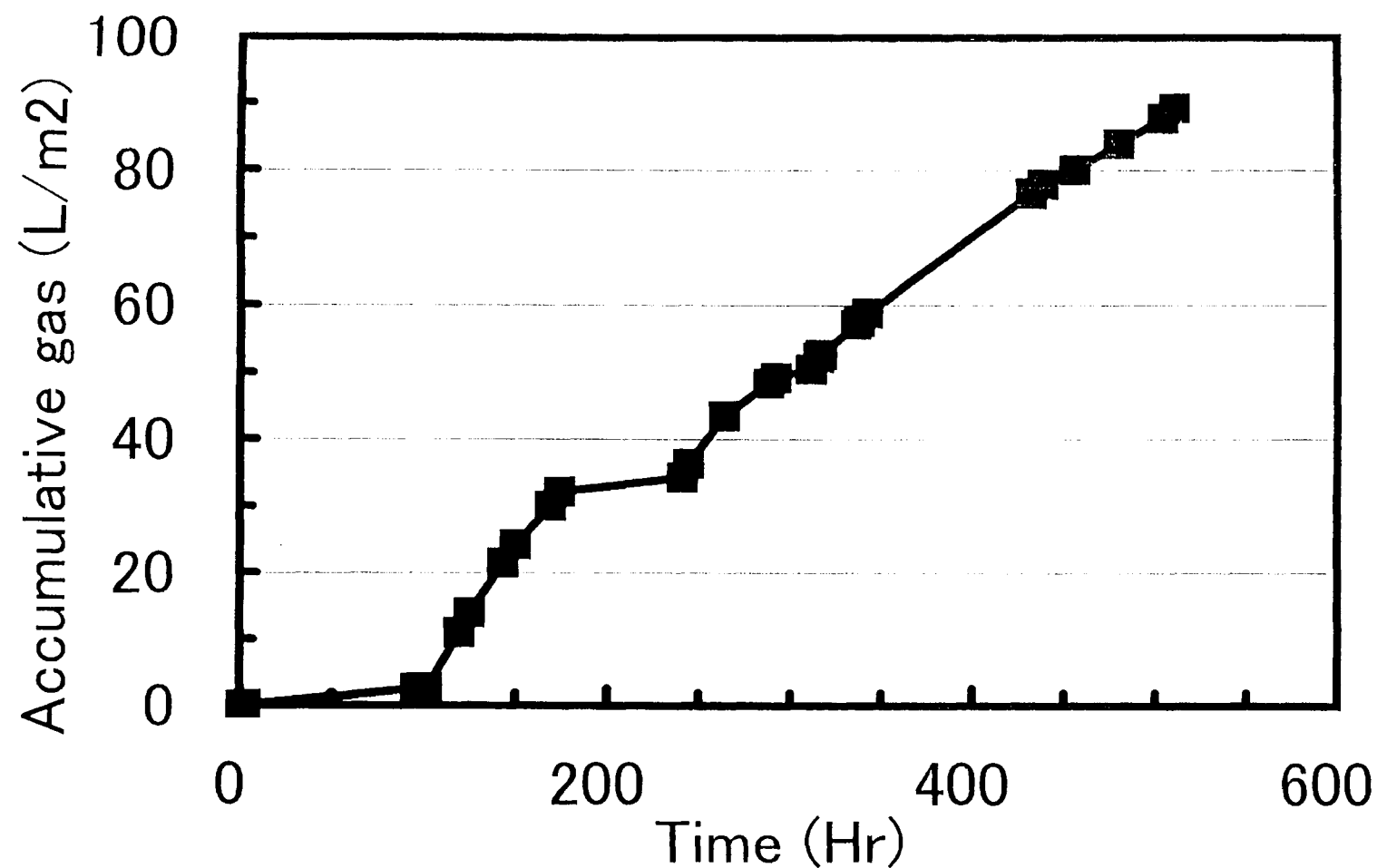


図3. 1-17 チューブラリアクタ累積ガス発生量の経時変化 (室内)

38L tubular reactor, batch

Halogen lamp 165W/m2, continuous illumination

November 20~December 11, 1998

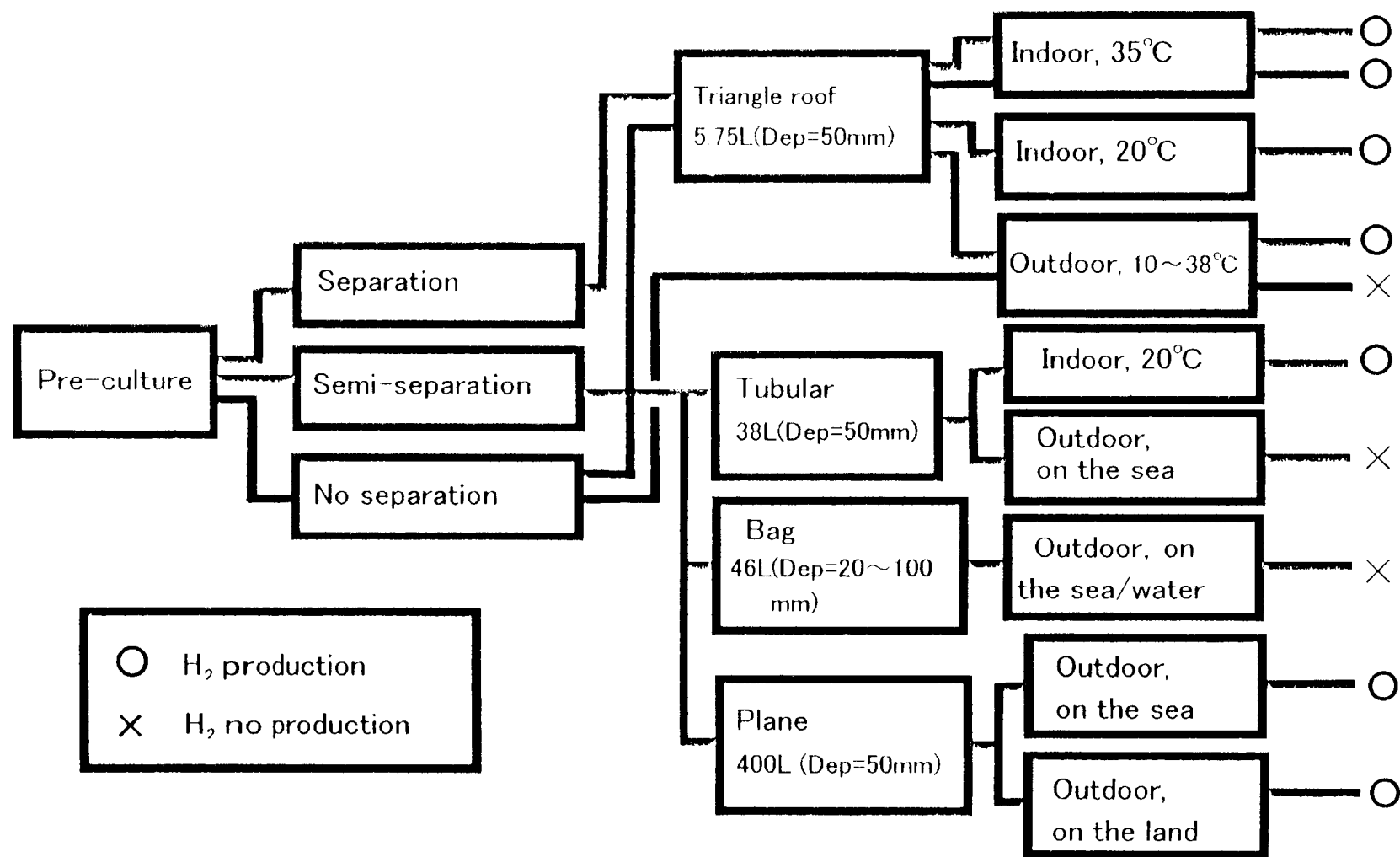


図3. 1-19 リアクタ大きさ別水素発生実績

### 3. 2 セルロースなどを含有した廃水を用いる嫌気性細菌および光合成細菌の大量培養技術

#### 3. 2. 1 概要

我々は、光合成細菌による光水素生産が水素の生成と消費反応のバランスにより成り立っていると考え、光補償点仮説を提唱した。本報告では、光補償点仮説から導き出されるリアクタ内培地体積当たりの光-水素生産曲線が、屋外実験においても成立するか否かを検証した。また、基質高濃度化実験による水素増産を試み、その結果から窒素収支と水素生成ポテンシャルとの関係の解析、さらに、さまざまな培養条件による体積当たりの光-水素生産曲線がどのように変化するか考察した。

その結果、*Rhodobacter sphaeroides* RV株（以下RV株）と乳酸・グルタミン酸を含むGL培地を用いた実験において、後述する模擬太陽光照射下で攪拌培養したところ、リアクタ内培地体積当たりの熱線除去後の照射光エネルギー  $I$  ( $\text{MJ}/(\text{m}^3 \cdot \text{日})$ ) について水素生産速度  $V$  ( $\text{Nm}^3\text{-H}_2/(\text{m}^3 \cdot \text{日})$ ) の数式表現としてはLewis式を適用することが可能であることが分かり、 $V = 1.09 \times \tanh(0.0018 \times I) - 0.19$  を得た。本式から、この系における光補償点エネルギーは約  $95 \text{ MJ}/(\text{m}^3 \cdot \text{日})$  と推定される。屋外実験データを同様に解析したところ、光-水素生産曲線は屋内実験データによる曲線とほぼ一致した。また、C/N比を一定に保持したまま基質を高濃度化した実験の結果、培地中の菌体濃度増加が著しく、最終菌密度が標準系における  $2 \text{ g/L}$  から  $4 \text{ g/L}$  に増加したのに対して、水素生産速度は目立った増大を示さなかった。これは窒素源の増加に伴い、菌体増殖による水素生成ポテンシャルのアップテイクが進行した結果と考えられる。さらにC源のみを増加させた場合、我々の実験系では光律速になり、基質の増加がそのまま水素増産に結び付かないことが示唆された。次いで、RV株と製糖工場から排出されたステフェン廃水を用いた実験系における光-水素生産曲線への諸ファクターの影響を検討した。高温嫌気性前処理後のステフェン廃水は酢酸と酪酸が主要な水素生成基質となっており、これを用いて水素生産を行ったところ、光-水素生産曲線表現式として  $V = 0.99 \times \tanh(0.00054 \times I) - 0.13$ 、光補償点エネルギー値として約  $250 \text{ MJ}/(\text{m}^3 \cdot \text{日})$  を得た。これは、GL培地を用いた系に比して、この実験系では菌体増殖に由来する水素アップテイクはほとんど変わらないが、水素生産に必用な光エネルギーのみが増大していることを示しており、ステフェン廃水中の主成分が水素生成のための  $\Delta G$  が大きい物質であったためか、または、廃水中の着色成分により光透過が阻害されたためと

考えられた。また、PHB合成能欠損株であるSMV株を用いてGL培地における水素生産の比較を行ったが、RV株のPHB蓄積量が最大 $18\text{meq-H}_2/\text{L}$ ( $100\text{mg/g-cell}$ )であった今回の培養条件では、PHB合成抑制による水素消費反応速度の減少は認められなかった。

### 3. 2. 2 背景

近年、地球温暖化の原因となる二酸化炭素を光合成生物を用いて大気から除去しようとする試みが盛んに実施されている。そうした中で、サンゴ礁は光合成により $\text{CO}_2$ を固定しているのか、それとも呼吸と石灰化により $\text{CO}_2$ を放出しているのかに関して、大きな論議となっている。これは相反する2反応が対象となる系内に存在し、そのバランスが条件によりどのように変わってくるのかを解析することが困難だからである。このように、光合成による $\text{CO}_2$ 固定の過程で逆向きの反応系が存在する場合の解析には、例えばLewis式の適用が有効である<sup>1)</sup>。

我々が平成7年度の成果報告書より提唱してきた光補償点仮説によれば、水素の見かけ上の生産反応は、正味の水素生成反応とこれまで考慮されてこなかった水素消費反応の2つにより成り立っていると説明される(図3.2-1)<sup>2, 3)</sup>。この考え方は、微細藻などの光合成による $\text{CO}_2$ 固定機構の解析にLewis式が適用される条件とまったく同じである。すなわち、水素の生成と消費の2つの反応を比べ正味の水素生成反応が水素消費反応を上まわった時にのみリアクタからは見かけ上水素が生産されるが、水素生成反応は光に強く依存しているために、光の弱い条件では水素生成反応が低下してしまう。このため、正味の水素生成反応速度が水素の消費反応速度と釣り合ってしまうと、見かけ上、リアクタからの水素生産が停止する。このときの光エネルギーが水素生産における光補償点である。また、理論上は照射光エネルギーがゼロの時、その光合成リアクタでは水素吸収消費速度のみが観察されることになる。このような現象の解析には、Lewis式の適用が有効であると考え、以下の考察を行った。

実験データの解析において問題となったのが、光エネルギーの取扱いである。光の関与する反応は、受光面積当たりの光エネルギー( $\text{J}/(\text{m}^2 \cdot \text{日})$ )の関数として取り扱うことがこれまでの一般的な手法である(図3.2-2)。その代表的な例としては、例えば太陽電池による光-電気エネルギー変換を挙げることができる。太陽電池では受光面積当たりの光エネルギー( $\text{J}/(\text{m}^2 \cdot \text{日})$ )と、発生した電気エネルギー( $\text{VA}/(\text{m}^2 \cdot \text{日})$ )の相関性を光-電気変換効率として解析している。

これに対して光合成バイオリアクタでは、水素生成反応である光合成は受光面積( $\text{m}^2$ )に依存すると考えられるが、増殖など微生物の機能に直接関わる基質・菌体濃度等の多くのパラメータはリアクタの体積( $\text{m}^3$ )に関するファクターである。従って、先の光補償点仮説で提唱した水素消費反応が光に依存しない反応も含まれると仮定すると、むしろ体積ベースで微生物的なファクターとして光エネルギーを捉え解析を行った方が、これまで把握できなかった屋外での水素消失現象を説明できるものと考えられた。そこで、以下に示すように、各変数の単位系を体積ベースで統一する解析手法を構築した。

$$[\text{見かけ上の水素生産}] = [\text{真の水素生産}] - [\text{水素消費}]$$

ここに、光エネルギーは、体積当たりの光エネルギー  $I$  ( $\text{J}/(\text{m}^3 \cdot \text{day})$ )とした。受光面積当たりの光エネルギー  $I_s$  ( $\text{J}/(\text{m}^2 \cdot \text{day})$ )からの計算方法は以下の通りである。

$$I_s (\text{J}/(\text{m}^2 \cdot \text{day})) \times (S \div L) = I (\text{J}/(\text{m}^3 \cdot \text{day}))$$

$S$  : リアクタ受光面積( $\text{m}^2$ )

$L$  : リアクタ培養体積( $\text{m}^3$ )である。

上に述べた通り、これまでの一般的な光合成反応解析における光エネルギーの概念は太陽電池の場合と同じであり、面積当たりの光合成解析である。その結果、光リアクタ内において深さ方向に急速に減衰する光エネルギーの影響を解析するために、深さ方向に薄いリアクタを何枚も重ねることで実験を実施することが一般的である。これに対して、体積当たりの水素生産解析手法はこれとまったく異なる概念であるが、水素消失現象解明の新たなブレイクスルーになることを期待してLewis式を体積当たりの光－水素生産曲線に適用して解析した結果について報告する。

### 3. 2. 3 実験方法

#### (1) 菌株・培養液

通産省工業技術院生命工學研究所エネルギー変換研究室より分与された紅色非硫黄光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* RV株（以下RV株）を用いた<sup>4) 5)</sup>。また、PHB合成欠損株である *Rhodobacter sphaeroides* SMV株（以下SMV株）はRITEエニテクノロジータムより分与された。

前培養にはASY培地、本培養である水素生成実験では模擬廃水として乳酸を水素生成基質としたGL培地、および、高温嫌気処理済ステフエン廃水を用いた。主要な培地組成を表3. 2 - 1 ~ 3に示す。前培養では、凍結保存していた株を毎回使用前に解凍して

ASY培地に植菌した。これを1,600mL容のルービン(厚さ6cm)に充填し、 $32 \pm 2^\circ\text{C}$ の恒温培養器(YAMATO製、IS82)内で、レフランプ(東芝、RF110V150WN)にて光強度約 $40\text{W}/\text{m}^2$ (850~900Lux)で72時間培養して菌懸濁液を得た。水素生成実験では、この菌懸濁液をGL培地に1:3の割合で植菌した。初期菌濃度は $130 \sim 300\text{mg-dw}/\text{L}$ (OD 660nm $\div 0.26 \sim 0.60$ )である。基質高濃度化実験ではGL培地を基本とし、C/N比を一定のまま乳酸とグルタミン酸の双方を $\times 1.5$ 、 $\times 2$ 、 $\times 3$ 、 $\times 4$ と倍加させた培地を用いて水素生成実験を行った。また、水素生成基質である乳酸のみを $\times 2$ 、 $\times 3$ 、 $\times 4$ と倍加させた培地も用いた。なお、基質高濃度化実験では厚さ3cmの平板形リアクタを用いた。

実廃水を用いた水素生成実験では、精糖工場のステフェン工程から排出されたものを前処理し希釈して用いた。処理方法は平成6、7年度にて報告した高温嫌気性前処理である。本前処理により、光合成細菌の水素生成基質となりうる酢酸、酪酸を主体とした有機酸が蓄積されており、この高温嫌気処理済みのステフェン廃水は、1/3容のASY前培養液を添加した後に嫌気処理後の10倍希釈になるように濃度を希釈調製した(表3.2-4)。

## (2) 光合成リアクタ

室内実験で用いた光リアクタは、受光表面が直径25cmの円筒平板型で、深さ1、3、5、10、20cmのアクリル製リアクタである。攪拌はリアクタ底部に設置した磁気攪拌子によって行った。水素生成実験における光源にはハロゲンランプ(日本フィリップ、JCR110V-125W)を用いた。ソーラーシミュレータ(丸菱バイオエンジ、模擬太陽光照射実験装置)ではハロゲンランプを48個取り付けた照射ユニットを上下運動、および間引き点灯させて、明暗周期：12-12時間で最大強度 $1\text{kW}/\text{m}^2$ の正弦曲線的に強度変化する光を模擬太陽光としてリアクタ上面に照射した。

屋外実験における光合成リアクタモジュールシステムは、受光面側に熱線吸収を兼ねた恒温水槽が付けられたアクリル製の2層式平板型リアクタである(図3.2-3)。内容物の攪拌は、リアクタ底部に設置したツイストロータによる機械攪拌式とした。受光表面以外のリアクタ側面・裏面はアルミシートにて被覆し、光の透過を防いだ。本実験では温度条件をそろえるために受光表面への加温・冷却水の循環により培養水槽内が、常に $30^\circ\text{C}$ になるように制御した。屋外実験平板リアクタモジュールは、受光面の長辺を東西方向に設置し、リアクタ受光表面が南方に傾斜するように設置角度を調整した。光強

度は傾斜したリアクタ受光表面と水平地上面にてLI-COR製のPyranometer Sensor LI-200SBを用いて30分間隔で自動測定した。

なお、一般的なギブスの反応エネルギー $\Delta G$ が(J/mol)の表記となっているために、体積当たりの光エネルギーは $I$  (J/( $\text{m}^3 \cdot \text{day}$ ))で表記し、熱線除去後の光エネルギーとして表した。面積当たりの光エネルギーについては $I_s(\text{kWh}/(\text{m}^2 \cdot \text{day}))$ と表記し、気象データの全天日射量に単位を揃えるために熱線のエネルギーも入っているものとした。

### (3) 物質収支解析方法

#### a. ガス

水素生成実験にて発生したガスは培養容器からトアロンチューブ( $6 \times 10 \text{mm} \phi$ )を介して容器外のガスバッグ(近江オドエアサービス、フレックスサンプラー)、または、水上置換法にて捕集し、組成をガスクロマトグラフ(島津製作所、GC-9A)にて分析した。 $\text{H}_2$ の分析にはモレキュラーシーブ5A(60/80メッシュ)カラムを、 $\text{CO}_2$ の分析にはポラパックQ(50/80メッシュ)カラムを用いた。分析はともにTCD検出器を用い、キャリアーガス(Ar)流速は $30 \text{mL}/\text{min}$ とした。分析温度はインジェクション、カラムオープン、検出部を、それぞれ $50^\circ\text{C}$ 、 $40^\circ\text{C}$ 、 $50^\circ\text{C}$ に設定した。また、簡便測定方法としてガステック検知管による分析も併用した。このときの $\text{H}_2$ 濃度は検知管より得られた $\text{CO}_2$ 濃度から、他のガス成分は存在しないものとして算出した。

なお、ガス体積の測定には $30^\circ\text{C}$ 、水蒸気分圧が存在する状態にて計測しているが、データの解析などで標準状態換算した場合には〔(ノルマル立方メートル)  $\text{Nm}^3\text{-H}_2$ 〕 また〔(ノルマルリットル)  $\text{NL-H}_2$ 〕と表記した。

#### b. 培養液

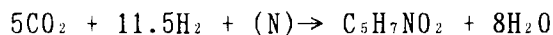
##### ① 菌体量

菌懸濁液を孔径 $0.45 \mu\text{m}$ のフィルタにて濾過後、フィルタに残った残渣を乾熱器にて $120^\circ\text{C}$ で2時間乾燥し、菌体乾燥重量( $\text{g-dw}/\text{L}$ )とした。これをSSとして表示する。また、菌体増殖による濁度変化は、波長 $660 \text{nm}$ における吸光度を測定した。

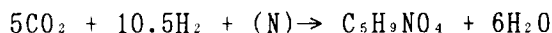
## ②水素収支解析

乳酸および低分子量有機酸類の分析のため、菌懸濁液を孔径 $0.45\mu\text{m}$ のフィルタにて濾過後、高速液体クロマトグラフ（島津製作所、LC-10A）にて濾液成分の分析を行った。分析条件は分析カラムにShim-pack製、SCR-102H( $8\text{mm}\phi\times 300\text{mm}$ )を $37^\circ\text{C}$ 、移動相流速 $0.8\text{mL}/\text{min}$ で用い、検出は $36^\circ\text{C}$ に設定した電気伝導度検出器(CDD-6A)で行った、移動相は $5\text{mM}$  p-トルエンスルホン酸である。詳細は平成7年度成果報告書を参照されたい。

水素収支解析における主要有機酸としては、乳酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、i-酪酸、吉草酸、i-吉草酸、カプロン酸、i-カプロン酸およびグルタミン酸等を計算に用いた。分析によって得られたそれぞれのモル濃度( $\text{mol-H}_2/\text{L}$ )に対して、成分ごとの水素化反応(Hydrogenation)による水素等量係数を掛け合わせることで、各成分を水素等量表示( $\text{meq-H}_2/\text{L}$ )に換算した。水素化反応による水素等量係数（水素ポテンシャル係数）の設定にはR. K. Thauer (1977)の嫌気性化学独立栄養細菌でのエネルギー保存則に関する反応式一覧を参考とした<sup>6)</sup>。表3. 2-5に主要成分の水素等量係数を示す。また、菌体の水素等量係数の推定にはK. Sasaki(1980)、J. E. Bailey(1986)による組成経験式に基づき $\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2$ を用い、以下の式に示されるように水素等量係数は11.5とした(図3.2-4)<sup>7, 8)</sup>。



以下の解析では、初期条件における乳酸の水素等量を100%とし、そこから目的物である水素ガスと残留物および副生成物の水素等量を引いていき、この3成分以外へ消失した水素等量(Lost-Hydrogen)、菌体の推定水素等量とを比較検討した。両者の差が著しい場合には、さらに残りの溶存有機物から主要成分としてギ酸、コハク酸を分析し収支に加えた。なお今回の水素収支には、グルタミン酸の水素生成ポテンシャルを計算に加えている。ここに、以下の反応式に示すように、グルタミン酸の水素等量係数は10.5である。



## ③炭素収支分析

採取した培養液は、菌懸濁液のままで島津製作所TOC-5000A（懸濁液分析用のオプションをセット）により菌懸濁液の全炭素量(TC: Total Carbon)と無機炭素量(IC:

Inorganic Carbon)を測定し、 $TC - IC =$ 有機炭素量(TOC: Total Organic Carbon)とした。次に、懸濁液を遠心分離して得られた上清を同様に分析し、溶存全炭素量(S-TC: Soluble-TC)、溶存無機炭素量(S-IC)、溶存有機炭素量(S-OC)とした。さらに、菌懸濁液と上清の分析値の差を、菌体全炭素量(C-TC: Cell-TC)、菌体無機炭素量(C-IC)、菌体有機炭素量(C-OC)とした。以下の炭素収支解析では、C-TCをバイオマスとして、S-OCを基質由来の可溶性残留炭素として計算に用いた。また、有機炭素の分解生成物は、気相のGas-CO<sub>2</sub>とS-ICである。なお、炭素の単位は(mmol-C/L)である。

炭素収支として初期基質由来の有機物がどのような割合で、バイオマス(C-OC、C-IC)と残留物(S-OC)と分解産物(Gas-CO<sub>2</sub>とS-IC)に変換されたかを炭素の分配比率として算出した(図3.2-5)。

#### ④窒素収支分析

採取した培養液は、菌懸濁液のままでケルダール分析をおこない、菌懸濁液の全窒素量(TN: Total Nitrogen)とアンモニア態窒素量(NH<sub>3</sub>-N)を測定し、 $TN - IN =$ 有機態窒素量(TON: Total Organic Nitrogen)とした。本実験における嫌気条件下では、主要無機態窒素はほとんどアンモニア態窒素(NH<sub>3</sub>-N)であると考えられた。次に、懸濁液を遠心分離して得られた上清を同様に分析して溶存全窒素量(S-TN: Soluble-TN)、溶存アンモニア態窒素量(S-NH<sub>3</sub>-N)、および溶存有機窒素量(S-ON)とした。さらに、菌

懸濁液と上清との差から菌体分の全窒素量(C-TN: Cell-TN)、アンモニア態窒素量(C-IN)、および溶存有機態窒素量(C-ON)とした。窒素の単位は(mmol-N/L)とした。そして、窒素収支として初期の溶存有機態窒素(S-ON)および溶存無機態窒素(S-NH<sub>3</sub>-N)がどのような割合で、菌体(C-ON、C-NH<sub>3</sub>-N)に変換されたかを窒素の分配比率として分析した(図3.2-6)。

### 3. 2. 4 結果

#### (1) 平板型光合成リアクタモジュールシステムによる屋外実験

##### a. RV株とGL培地での場合

##### ①室内実験における光-水素生産曲線の解析

光合成細菌RV株、乳酸を主要水素生産基質としたGL培地(模擬廃水)を用いた屋内

水素生産実験結果を図3. 2-7に示す。ここではリアクタ体積当たりの水素生産速度  $V$  ( $\text{m}^3\text{-H}_2/(\text{m}^3\cdot\text{日})$ ) はバッチ実験における培養開始時から任意の培養時間までの平均水素生産速度の中で最大効率となる水素生産速度 (EMER: Effective Maximum Evolution Rate) を示しており、ある培養時間における瞬間最大水素生産速度ではないことに留意されたい。図に示された  $2,134\text{MJ}/(\text{m}^3\cdot\text{日})$  から  $107\text{MJ}/(\text{m}^3\cdot\text{日})$  の光エネルギーを照射した5台のリアクタと、光を照射せずに水素ガスを充填したリアクタの体積当たりの水素生産速度:  $V$  ( $\text{Nm}^3\text{-H}_2/(\text{m}^3\cdot\text{日})$ ) と培地体積当たりの熱線除去後の照射光エネルギー  $I$  ( $\text{MJ}/(\text{m}^3\cdot\text{日})$ ) についてLewis式を当てはめたところ、水素生産速度として以下の式を得た。

$$V(\text{Nm}^3\text{-H}_2/(\text{m}^3\cdot\text{日})) = 1.09 \times \tanh(0.0018 \times I) - 0.19$$

式より、体積当たりの光補償点:  $I_c = 95 \text{ MJ}/(\text{m}^3\cdot\text{日})$

体積当たりの水素消費速度:  $V_0 = 0.19 \text{ Nm}^3\text{-H}_2/(\text{m}^3\cdot\text{日})$

光飽和時の最大水素生産速度:  $V_{\max} = 0.90 \text{ Nm}^3\text{-H}_2/(\text{m}^3\cdot\text{日})$

図に示されるように、光-水素生産曲線には光エネルギーに対して3つのフェーズがあることが分かる。すなわち、

- I. 光が照射されていても水素が生産されない (水素消費が生成を上まわっている)。
- II. 光を強くするほど水素生産はアップする。
- III. 光が飽和して水素生産は頭打ちになる。

の3つのフェーズである。また、 $V_0$  はI.のフェーズで光エネルギーがゼロの場合の水素吸収速度となる。 $V_0$  値は実験的にも測定可能であったが、水素ガスの液中への溶解速度が律速にならないようにするためには、かなり激しく振とう攪拌して気-液接触を増大させることが必要である。図ではマイナスの速度を示しているが、実際のリアクタでは外から水素を補充しないので水素生産速度はマイナスでなく、見かけ上、生産速度がゼロとして取り扱うことになる。光補償点エネルギー  $I_c$  は、I.とII.のフェーズを分ける光エネルギーとなる。なお、II.とIII.のフェーズを分ける点が培地と菌株との組合せにおいて最も光-水素生産の変換効率が高い光条件となるが、この点については考察に詳細を記述する。

I.のフェーズで光をどんどん強くしていったとしても、光飽和によって越えることのできない水素生産速度の最大値が  $V_{\max}$  である。ただし、ここでは強光阻害によ

る水素生産の低下が起こらないと仮定している。また、ここで示す体積当たりの水素生産速度解析法では、リアクタ内の温度や菌体濃度分布等が一様な均一攪拌状態を前提としており、自然対流や濃度拡散に依存した静置状態の光リアクタにはそのまま適用することはできないと考えられる。静置系の解析ではリアクタの縦置き・横置きによっても熱的対流が異なったり、深さ方向での光強度の不均一さなど、更に複雑な解析を必要とする可能性が高く、ここでは均一攪拌系のみの摘要可能な解析法とした。

## ②屋外実験における光-水素生産曲線の適合性

室内実験より得られたデータを基に、屋外実験での平板型リアクタモジュールにおけるリアクタ面積当たりの平均受光エネルギー値と水素生産速度の関係を解析した。厚さ5cmのリアクタにおける室内実験データは2点しかなく、その間を先の体積当たりの光-水素生産曲線を面積当たりの光-水素生産曲線に変換したものを使って補間した(図3.2-8)。変換式は以下に示すとおりである。

$$V(\text{Nm}^3\text{-H}_2/(\text{m}^3\cdot\text{日})) = 1.09 \times \tanh(0.0018 \times I) - 0.19$$

ここで、受光面積当たりの光エネルギー： $I_s$  ( $\text{J}/(\text{m}^2\cdot\text{日})$ )

受光面積当たりの水素生産速度： $V_s$  ( $\text{Nm}^3\text{-H}_2/(\text{m}^2\cdot\text{日})$ )

リアクタの受光面積： $S$  ( $\text{m}^2$ )；培養体積： $L$  ( $\text{m}^3$ ) とすると

リアクタ深さ： $h$  ( $\text{m}$ )=0.05mであるから

$$I = I_s \times S / L = I_s / h$$

$$V = V_s \times S / L = V_s / h$$

$$V_s / h = 1.09 \times \tanh(0.0018 \times I_s / h) - 0.19$$

従って深さ5cmの平板型リアクタにおける面積当たりの光-水素生産曲線は、

$$V_s = \{1.09 \times \tanh(0.0018 / 0.05 \times I_s) - 0.19\} \times 0.05$$

式より、深さ5cmのリアクタでの面積当たりの光補償点： $I_c \doteq 1.8 \text{kWh}/(\text{m}^2\cdot\text{日})$

図は屋外実験のさまざまな天候での5cmリアクタにおける水素生産速度実測値をプロットしたものである。なお、体積当たりの光エネルギーは  $I$  ( $\text{J}/(\text{m}^3\cdot\text{day})$ ) は熱線除去後の光エネルギーとして表記したが、面積当たりの光エネルギー  $I_s$  ( $\text{kWh}/(\text{m}^2\cdot\text{day})$ ) は、気象データの全天日射量に単位を揃えるために熱線エネルギーも入っているものとした。また、水素生産速度は標準状態の水素ガス量に換算している。

同様に3cmの深さのリアクタについても面積当たりの水素生産速度を計算し、図示

した (図3.2-9)。

深さ3cmの平板型リアクタでの面積当たりの光-水素生産曲線

$$Vs' = \{1.09 \times \tanh(0.0018/0.03 \times Is) - 0.19\} \times 0.03$$

式より、深さ3cmのリアクタでの面積当たりの光補償点： $Ic \doteq 1.1\text{kWh}/(\text{m}^2 \cdot \text{日})$

さらに1cmの深さのリアクタについても面積当たりの水素生産速度を同様に計算し図示する (図3.2-10)。

深さ1 cmの平板型リアクタでの面積当たりの光-水素生産曲線

$$Vs' = \{1.09 \times \tanh(0.0018/0.01 \times Is) - 0.19\} \times 0.01$$

式より、深さ1cmのリアクタでの面積当たりの光補償点： $Ic \doteq 0.36\text{kWh}/(\text{m}^2 \cdot \text{日})$

1cm、3cmと5cmのリアクタの実測値とLewis式を用いた予測曲線を比較すると、多少のばらつきはあるものの、全体として非常に良い相関性が得られた。例えば、深さ5cmのリアクタでは晴天時に高い水素生産を示す半面、3者の中で悪天候により水素生産の低下・停止を最も起こし易いことが光補償点エネルギーの比較から容易に推定される。また、深さ1cmのリアクタでは悪天候時に強い半面、 $2\text{kWh}/(\text{m}^2 \cdot \text{日})$ 付近で光飽和を起こしてしまい、晴天時には光-水素変換効率が低下することも予想される。

こうした深さ別のリアクタにおける受光面積当たりの光-水素生産曲線を、リアクタ体積当たりの光-水素生産曲線としてまとめたものを図3.2-11に示す。屋外実験で得られた実測値を同様に体積当たりで解析したところ、室内実験で得られた体積当たりの光-水素生産曲線にほぼ一致した。ここでは、屋外実験での水素生産実測値では光補償点以下の条件の時に水素ガスを充填しなかったため、光補償点以下と予測される深さ30cmのリアクタでの水素アップテイクの測定ができなかった、また、明確に光飽和した条件での水素生産速度実測データが無い等の問題があり、Lewis式をそのまま適用することができなかった。しかし、深さ30cmのリアクタを除く深さ1cm、3cm、5cmのリアクタでの屋外実測値を最小二乗法により直線化したところ、体積当たりの水素生産速度  $V$  ( $\text{Nm}^3\text{-H}_2/(\text{m}^3 \cdot \text{日})$ )として以下の式を得た。図からも体積当たりの光エネルギー解析手法が屋外において、とくに悪天候時の水素生産低下や大水深のリアクタでの水素生産停止を説明しうるものと検証できた。

$$V = 0.0013 \times I - 0.14 \quad (\text{ただし、} 109 < I < 500 \sim 700 \text{ MJ}/(\text{m}^3 \cdot \text{日}))$$

式より、 $Ic = 109\text{MJ}/(\text{m}^3 \cdot \text{日})$

$$Vo = 0.14\text{Nm}^3\text{-H}_2/(\text{m}^3 \cdot \text{日})$$

### ③基質高濃度化の影響解析

C/N比を一定のまま基質を高濃度化（基本となるGL培地の×1.5、×2、×3、×4倍）して710MJ/(m<sup>3</sup>・day)（模擬太陽光7.7kWh/(m<sup>2</sup>・day)、リアクタ深さ3cm）の照射エネルギーでの実験の結果、光合成産物である水素ガス、副生成有機酸、菌体のうち、菌体濃度の増加がもっとも著しく、菌体終濃度が標準培地における最終濃度である2g/Lから4g/Lに増加した。これに対して、水素生産速度は目立った増加を示さなかった（図3.2-12、13）。これは窒素源の増加に伴い、水素生成ポテンシャルの菌体へのアップテイクが進んだ結果であると考えられる。窒素源であるグルタミン酸から菌体への水素等量変換式を想定すると、以下のようである。



上記の式のように窒素源の増加に伴い、水素生成ポテンシャルの菌体へのアップテイクが進むものと示唆された。

また、水素生成基質である乳酸のみを増加させた場合（基本となるGL培地の乳酸のみ×2、×3、×4倍）についても光エネルギー710MJ/(m<sup>3</sup>・日)にて実験を行ったが、菌体濃度は一定であったにもかかわらず水素生産速度は580Nm<sup>3</sup>-H<sub>2</sub>/(m<sup>3</sup>・日)程度で目立った増加は観測されなかった。しかし、乳酸濃度が3倍の系において光エネルギーを2,134MJ/(m<sup>3</sup>・日)にまで増加させたところ、水素生産速度は1.182Nm<sup>3</sup>-H<sub>2</sub>/(m<sup>3</sup>・日)に増大した。したがって乳酸のみを増加させても、光エネルギーが水素生産速度向上の律速過程となるため、基質の増加がそのまま水素増産に結び付かないことが示唆された。

C/N比が一定の場合を例に窒素収支を解析したところ、図3.2-12に示すとおり、窒素量や光エネルギー密度に関わらず、投入した無機・有機態窒素のほとんど全てが菌体に変換されていた。これは先に行った炭素収支や水素等量収支とは大きく異なる傾向である。

すなわち、GL培地における水素等量収支（図3.2-14、15）や炭素収支（図3.2-16）によると、炭素収支においては投入した全炭素のうち菌体に回る割合は3から4割ほどで一定であり、残りがS-OC（溶存有機炭素）になるかIC（無機炭素）に分解されるかは光エネルギーに依存する。この傾向は水素等量収支についても同様であり、光エネルギーを変えてもGL培地の6割の水素生成ポテンシャルが菌体に回することは変わらず、残りの水素生成ポテンシャルが水素ガスになるか副生成有機酸になるかが光エネ

ルギーに依存する。しかし、窒素収支については窒素濃度に関わらず常に投入した有機・無機態窒素のほとんどが菌体に変換されていることから（図3.2-17）、光合成菌の増殖/水素生産に関し、以下ような仮説を提唱する。

これまでは投入した水素生成基質からどれだけの水素ガスが生産されるかを理論的最大水素生成ポテンシャル： $P[\text{Hydrogen equivalence (eq-H}_2\text{)}]$ とし、水素化反応（Hydrogenation）量論式による水素等量係数に基づいて水素生産量を求めていた。これに対して、実際に水素生成実験により生産が確認できた水素ガス量を実験的最大水素生成ポテンシャル： $P'[\text{eq-H}_2]$ として補正していたが、この $P$ と $P'$ との相関関係は明確ではなかった。例えば、GL培地において、1molの乳酸は理論的には6molの水素を生ずるはずであるが、実験的には光エネルギー充分な条件でも3mol程度しか生産されず、漠然と残りは菌体に変換されるものと考えられていた。ここで、菌体の増殖量を決めているものが培地に含まれている窒素の量であると仮定すると、図3.2-18に示すような計算法が考えられる。すなわち、

I. 廃水（培地）に含まれている窒素源を調べ、その窒素量： $N_s(\text{mol-N})$ から光合成細菌の菌体組成を $\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2$ として菌体の最大増殖量を計算する。

II. 増殖分の菌体組成 $\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2$ から必要となる $\text{H}_2$ 量： $P_s(\text{eq-H}_2)$ を計算する。

：水素等量係数

窒素として： $5\text{CO}_2 + 11.5\text{H}_2 + (\text{N}) \rightarrow \text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2 + 8\text{H}_2\text{O} \quad : 11.5$

有機態窒素の例： $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$ （グルタミン酸） $+ \text{H}_2 \rightarrow \text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \quad : 1$

アンモニア態窒素： $\text{NH}_3 + 5\text{CO}_2 + 10\text{H}_2 \rightarrow \text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2 + 8\text{H}_2\text{O} \quad : 10$

III. 廃水（培地）に含まれる成分（C源を含む）： $P_i(\text{eq-H}_2)$ について

Hydrogenationを行い、総和として理論的最大水素生成ポテンシャル： $P(\text{eq-H}_2)$ を計算する。

$$P = \sum (P_i)$$

IV. 菌体以外に回る余剰分の水素生成ポテンシャルを計算する。この値と実験的最大水素生成ポテンシャル $P'$ は、すでに示したとおりほぼ一致する。

$$P' \doteq P - P_s$$

なお、ここで用いられる窒素源、炭素源はともに微生物により利用可能な成分とし、難分解性物質は除外とする。このように廃水（培地）中に含まれる窒素源、炭素源の成分とその量から水素ガスとして生産可能な最大量予測法を構築した。ただし、ここ

で予測された $P'$ は光エネルギーが十分に供給された場合の生産量であり、光エネルギーの照射量によっては水素生産量はこの値より低下する。例えば、先に示した光補償点以下の光エネルギーしか供給されなければ、水素ガスになるはずの水素生成ポテンシャルは副反応に消費されてしまい、どれだけリアクタを継続運転しても水素ガスの生産はゼロとなることが示唆される。

#### b. RV株とステフェン廃水での場合

次いで、RV株と製糖工場から排出されたステフェン廃水を対象として、諸ファクターの光-水素生産曲線への影響を検討した。高温嫌気性前処理後のステフェン廃水は酢酸と酪酸が主要な水素生成基質であるが、これを用いて得た水素生産実験データについて、培地体積当たりの熱線除去後の照射光エネルギー $I$  (MJ/( $\text{m}^3 \cdot \text{日}$ ))に対してLewis式をあてはめてみたところ、以下の式を得た(図3.2-19)。

$$V' \text{ (Nm}^3\text{-H}_2\text{/(m}^3\text{・日))} = 0.99 \times \tanh(0.00054 \times I) - 0.13$$

式より、体積当たりの光補償点： $I'_{\phi} = 250 \text{ MJ/(m}^3\text{・日)}$

体積当たりの水素消費速度： $V'_{\phi} = 0.13 \text{ Nm}^3\text{-H}_2\text{/(m}^3\text{・日)}$

光飽和時の最大水素生産速度： $V'_{max} = 0.86 \text{ Nm}^3\text{-H}_2\text{/(m}^3\text{・日)}$

GL培地と前処理済みステフェン廃水を比較すると、全窒素濃度は非常に近い値であり、窒素収支の特性から予想された通り菌体濃度は2g/Lと同レベルであった。GL培地によるデータにより同定したLewis式を比較しても菌体増殖に由来する水素アップテイクはほとんど変わらずに、水素生産に必要な光エネルギーのみが増大することが分かる。これはGL培地が乳酸主体であるのに比べて、前処理済みステフェン廃水が酢酸、酪酸、プロピオン酸のように水素生成のための $\Delta G$ が大きい成分だったためか、また、実廃水中の着色成分により光透過が阻害されたためと考えられた。

#### c. SMV株とGL培地での場合<sup>6)</sup>

PHB合成能欠損株であるSMV株を用いてGL培地における水素生産の比較を行い、Lewis式を用いて体積当たりの水素生産速度を解析した結果、以下の式を得た(図3.2-20)<sup>9)</sup>。

$$V'' \text{ (Nm}^3\text{-H}_2\text{/(m}^3\text{・日))} = 1.11 \times \tanh(0.00085 \times I) - 0.12$$

式より、体積当たりの光補償点： $I''_{\phi} = 125 \text{ MJ/(m}^3\text{・日)}$

体積当たりの水素消費速度： $V'_{\text{H}_2} = 0.12 \text{ Nm}^3\text{-H}_2/(\text{m}^3\cdot\text{日})$

光飽和時の最大水素生産速度： $V'_{\text{max}} = 0.99 \text{ Nm}^3\text{-H}_2/(\text{m}^3\cdot\text{日})$

これはRV株による光-水素生産曲線とほぼ同様の傾向であり、MSV株におけるPHB合成抑制による水素消費反応速度の減少は認められなかった。確認実験としてRV株とSMV株のPHB生産実験を行ったところ、GL培地において光エネルギーが2,134~107 MJ/( $\text{m}^3\cdot\text{日}$ )の培養条件では、RV株のPHB蓄積量は最大でも100mg/g-cellであった(図3.2-21)。このPHB蓄積量を水素等量に換算すると18meq-H<sub>2</sub>/Lであるが、GL培地における菌体増殖量は200meq-H<sub>2</sub>/Lに相当しており、今回の培養条件ではもともとRV株のPHB含有率が低かったためにSMV株におけるPHB合成を抑制しても、水素消費反応速度の減少が僅かなために水素生産速度の増加が観測されなかったものと示唆された。

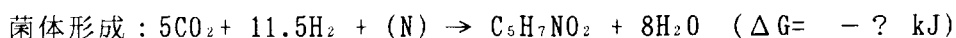
### 3. 2. 5 考察

#### (1) 水素生産に関わる反応進行の解析

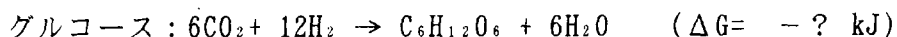
光合成細菌RV株およびSMV株を用いて水素生産を行った。このとき、菌体自身はブラックボックスとして、反応前後の物質と反応エネルギーの増減から全体的な反応の進行を概括的に把握することが可能であると考えられる。そのためには、まず、窒素収支から推定された菌体増殖のための水素等量の算出が必要となる。

##### ①水素消費反応タイプa.：光必要・エネルギー要求型

光合成細菌は廃水(培地)中に含まれる利用可能な窒素のほとんど全てを使って菌体を増殖させていく。このために水素生成ポテンシャルを必要とすると仮定した。これまで、水素ガスのみ加えても光がなければ菌体の増殖は認められなかったことから、以下のように、光を必要とするエネルギー獲得型の水素吸収反応が想定される。



また、光が強い条件で培地中に糖分が検出されている。これは光飽和になり菌体から余剰の還元力が糖の形で放出されていると考えられる。

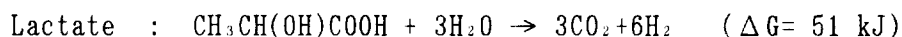


##### ②水素生成反応：光利用型

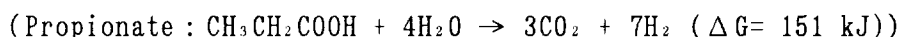
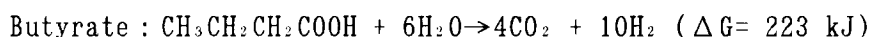
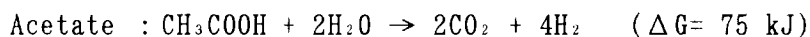
菌体が菌体合成を行うため水素生成ポテンシャルを要求し、光エネルギーを利用し

て有機物を分解することで利用可能な水素生成ポテンシャルを造り出しているものと考え、以下に示す水素化反応式のように、この反応を右へ進行させるためには光エネルギーなどの形で、系外からギブスの自由エネルギーを加える必要がある。

I. GL培地における主要な水素生成反応基質

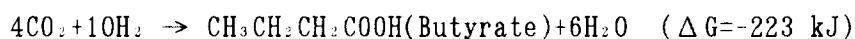
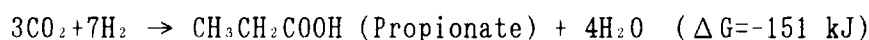
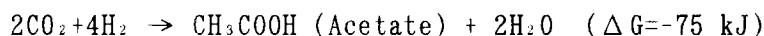


II. 実廃水としてステフエン廃水を前処理したときの主要な水素生成反応基質

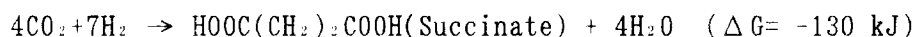
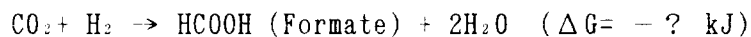


③水素消費反応タイプb. 光不要・エネルギー獲得型

これに対して、昨年度の報告書にも記載したように、水素から有機酸を生成する副反応が観察されている。このタイプb.の反応、すなわち水素から有機酸を生成するタイプの水素消費反応では、反応が進行する場合にギブスの自由エネルギーを放出するので光が不要であり、エネルギー獲得型の水素消費反応であるといえる。



また、基質が高濃度な条件ではギ酸、コハク酸の蓄積が認められた。これまでは、水素生成基質を高濃度化すれば水素増産に結び付くのではないかとの期待もあったが、実験の結果、投入される光エネルギーが一定のままで基質のみを増大しても、以下に示すように、水素ポテンシャルを消費する副反応経路が増えるだけで水素増産にはつながらないことが明らかとなった。



①の水素消費反応のうち、菌体合成に係わるものは窒素量に依存し、理論的水素生成ポテンシャル(P)から菌体に回る分(Ps)を差し引いた値が実験的水素生成ポテンシャル(P')となることが確認された。②の水素生産反応によりリアクタから生産される水素ガス量(Pgas)と③の水素消費反応による副生成有機酸(Pb)との割合は光エネルギーに依存しており、光エネルギーが十分供給されているリアクタでは水素ガスに変換

される割合が高く、光エネルギーが低下してくると副生成有機酸の割合が高くなり、水素ガスは生産されなくなってくる。この水素ガスの生産予測にはLewis式を用いた体積当たりの光-水素生産速度曲線による解析が適していた。以上のことより、まず理論的水素生成ポテンシャルから菌体に回る水素生成ポテンシャルを引き、残ったポテンシャルからさらに水素ガスとして生産される分を引いた残りの水素生成ポテンシャルが、副生成有機酸としてリアクタに残存すると予測される。

$$P' = P - P_s$$

$$P_b \doteq P - P_s - P_{\text{gas}}$$

$$P_{\text{gas}} = f(I)$$

この水素ガスの生産速度を光エネルギーの関数として解析したものがLewis式を用いた体積当たりの光-水素生産速度曲線である。同定されたLewis式から得られるEMERとしての水素生産速度  $V$  ( $\text{eq-H}_2/(\text{m}^3 \cdot \text{日})$ )を用いると、リアクタ内滞留時間(HRT(日))と  $P'$ 、 $V$  の間には以下の関係が成立する。

$$\text{HRT} \leq P' / V$$

ただし、上式において等号が成立するのはになるのは、アプローチ率100%としてであり、実際にアプローチ率を下げればHRTは  $P' / V$  よりやや小さい値となる。

## (2) 光-水素変換効率向上への可能性

図3. 2-22に今回の様々な実験から得られた体積当たりの光-水素生産曲線の遷移を示した。RV株とGL培地における予測曲線を基本に考えたとき、次のような可能性が考えられる。

- ① さらに窒素源を増やした場合、基質高濃度化実験の結果より推定すると、菌体へのアップテイクが増えるため水素ガスへ回る分が減少する。
  - ② さらに光透過が悪くなったり、基質のHydrogenationの $\Delta G$ が大きい場合、前処理済みステフェン廃水実験の結果より推定すると、より光エネルギーを要求する方向に系は遷移する。
  - ③ 副生成物や菌体による水素生成ポテンシャルの消費を減らした場合、PHB合成抑制実験の結果より推定すると、水素生産曲線自体が水素増産の方向にシフトする。
- こうした点をまとめると、以下のような対応策が挙げられる。
- ①' 窒素源を抑え、水素生産過程での菌体増殖を控える。

②' 光透過を妨げる物質や、余剰の菌体内色素を減らし、光の利用率を上げる。

②'' Hydrogenationでの $\Delta G$ の小さい条件の基質を考える。

③' アップテイクとなる酵素系を操作して副反応を抑える。

Lewis式に基づけば、仮にアップテイクが無い場合の最大変換効率も計算可能となる。そのための式を以下に示す。また、RV株とGL培地における実験データよりアップテイクがない場合の最大水素変換効率： $k_{\max}$ を計算した。

体積当たりのLewis式： $V = a \times \tanh(b \times I) - c$  として

$$k_{\max} = a \times b \times \operatorname{sech}^2(b \times I)$$

$$= a \times b \quad (\text{at } I = 0)$$

RV株のGL培地における  $a = 1.09$ 、 $b = 1.83 \times 10^{-3}$  であるが、これは  $V$  が ( $\text{m}^3\text{-H}_2/(\text{m}^3 \cdot \text{日})$ )、光エネルギーが ( $\text{MJ}/(\text{m}^3 \cdot \text{日})$ ) の場合であり、これを光-水素変換効率として計算するためには水素の体積を同モルの燃焼熱量 ( $285.83 \text{ kJ/mol}$ ) に換算しなければならない。そこで、熱線除去後の光エネルギーからの水素エネルギー変換効率は以下の計算から2.6%となった。

$$\begin{aligned} k_{\max} &= 1.09 \times 1.83 \times 10^{-3} / (22.4 \times 10^{-3}) \times (285.83 / 1,000) \\ &\doteq 2.55\% \end{aligned}$$

また、体積当たりの光-水素生産曲線を表すLewis式から、面積当たりの水素生産曲線を算出すると、これまでのリアクタ解析では考えられなかった効率アップの手法も考えられる。すなわち、

体積当たりのLewis式： $V = a \times \tanh(b \times I) - c$

なお、 $a$ 、 $b$ 、 $c$  はLewis式における定数

体積当たりの水素生産速度： $V$  ( $\text{eq-H}_2/(\text{m}^3 \cdot \text{日})$ )

体積当たりの光エネルギー： $I$  ( $\text{J}/(\text{m}^3 \cdot \text{日})$ )

受光面積当たりの水素生産速度： $V_s$  ( $\text{eq-H}_2/(\text{m}^2 \cdot \text{日})$ )

受光面積当たりの光エネルギー： $I_s$  ( $\text{J}/(\text{m}^2 \cdot \text{日})$ )

受光表面に対するリアクタの深さ： $d$  ( $\text{m}$ ) とする。

面積当たりのLewis式に変換すると、

$$V = V_s / d \quad \text{および} \quad I = I_s / d$$

$$\therefore V_s = \{ a \times \tanh(b / d \times I_s) - c \} \times d$$

$$\text{受光面積当たりの光-水素変換効率：} k = 285.83 \times 10^3 \times V_s / I_s$$

平成9年度に提唱した光エネルギーに対応型の可変培養リアクタ、LEAFも培養槽の有効深さを変える一例にすぎない。LEAFはリアクタの受光状態を天候により変化させることで、常に光補償点を上回る条件を維持させようとしたものである。つまり、晴天時で直達光が強いときは光飽和を避けるために深さ30cmになり、また、曇・雨天時には散乱光を集めることで暗反応を避けることができるように深さ1cmに変わる平板型リアクタモジュールとほぼ同義になる。このようにLEAFのライダは、構造的に2枚の標準式の平板型リアクタモジュールと全く同じものである。ただ、平板型という特色を生かして天気の変化にあわせて設置角度に自由度を持たせたことになる。このフレキシビリティ

は無く、リアクタを運転しながら水深をどう変えるかはいくらかでも方策はあるものと考え、リアクタを運転しながら水深を浅くなるように廃水を捨ててしまえば余剰廃水を保存する必要がなくなる。数日の運転を前提にしておき、天候が良いときは深くなるように多量に廃水を充填し、により出したり戻したりすることは現実性がないとの意見もあるが、HRTが2〜>高効率を維持したまま連続運転が可能となる。リアクタを運転しながら廃水を天候を変えられれば、そのリアクタは屋外においても室内の安定した水素生産実験と同じ従って、変換効率 $k$ が天候の変動に関わらず常に最大となるようにリアクタの有効深

$$\begin{aligned} &= \text{一定となる} \\ k &= \{a \times \tanh(b \times (I_s/d)) - c\} \times 285.83 \times 10^3 \div I_s \\ &= \{a \times \tanh(b \times R) - c\} \times 285.83 \times 10^3 \div R \end{aligned}$$

と以下の式が成り立つ。  
し仮に天候変動により $I_s$ が変わったとき、これに対応して $d$ が変化した場合を想定する  
い地方を前提条件とするか、ある程度の効率低下を許容するしかなかった。しかし、も  
ら必ず変換効率の低下を引き起こしてしまう。これを防ぐには天候変動のあまり起きな  
 $d$ を定数として決めてしまうと、そのリアクタは天候により $I_s$ が変動したとき、上式か  
められており、ある日射量( $I_s$ )にもっとも光-水素変換効率( $k$ )が高くなるように  
これまでのところ、一般的な光リアクタの前提条件として深さ( $d$ )は定数として決

$$\begin{aligned} k &= \{a \times \tanh(b/d \times I_s) - c\} \times d \times 285.83 \times 10^3 \div I_s \\ &= \{a \times \tanh(b \times (I_s/d)) - c\} \times 285.83 \times 10^3 \div (I_s/d) \end{aligned}$$

とすると、

(可変性)が、屋外実験における天気の変動という不確定要因に対し、これまでは受動的(passive)であった光合成リアクタに、能動的(active)な即応性を与えることが可能となっている。

### (3) 嫌気処理各過程の水素分圧

前項目では物質収支とエネルギーの関係をすべて光合成細菌RV株由来の働きとして表現している。しかし、リアクタを滅菌しているわけでもなく、リアクタ深部で嫌気性細菌が有機酸を生成していることも十分考えられる。ここで、ある程度のコンタミを前提に入れた系で、どうすれば光合成細菌の菌相の遷移を防ぎ、水素生産を継続させるかを考える。

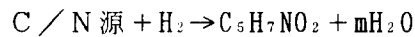
興味深い参考例として図3. 2-23に岡田(1989)の嫌気処理各過程の水素分圧とメタン生成菌の生存範囲を示した図を考察した<sup>10)</sup>。この図は、基質の組み合わせと反応エネルギーによりメタン生成菌が安定して存在する生存範囲が指定されるというものである。逆に言えば、ある基質の組み合わせによればメタンを生産することが最もエネルギー獲得に都合がいい条件があり、たとえ様々な微生物が混在していても、そのうちメタン生成菌群が優占的に形成されるということになる。さらにこの図によれば、縦軸が水素分圧になっている。つまり、この図の上辺は水素分圧 $10^0 \text{ atm} = 1 \text{ atm}$ であり、水素生産に適した環境となる可能性が考えられる。この図の横軸はギブスの自由エネルギー表示となっており、上辺横軸のゼロからマイナス側が、系外からエネルギーを加えなくても反応の進行する嫌気性細菌による水素生産領域であり、ゼロからプラス側が光等のような系外からのエネルギー補給を必要とする光合成細菌の水素生産領域となる可能性が高い。

ここで気をつけなければならないことは、グラフのほとんどの部分を占める水素分圧が低いエリアの存在である。この部分は酸生成菌群の様に水素を生産しないグループが優占種となっている可能性がある。光合成リアクタ内においても水素生産菌種から水素非生産菌種へ優占菌種が遷移する問題点が考えられる。しかし、リアクタ内の基質組成を水素生産菌種が優占域となるように連続供給／老廃物除去を続けてやれば、水素非生産菌種への遷移を防ぐことができると期待される。したがって、メタン生成菌による廃水処理が実用化したように、必ずしも純粋系を前提としなくても、エネルギーと基質の関係のコントロールを把握していけば水素生成菌を優占種として安定的なバイオガス生

産リアクタは構築できるものと予想される<sup>11, 12)</sup>。

### 3. 2. 6 まとめ

1. 室内実験のソーラーシミュレータを用いて計算された体積当たりの光-水素生産曲線は、屋外実験においても成り立った。
2. 窒素量により菌体増殖量は決定し、以下の式のようにその分のH<sub>2</sub>生成ポテンシャルを消費していた。



3. 培養条件や菌株の特性により、体積当たりの光-水素生産曲線は変化した。RV株をGL培地にて用いたとき、もし、アップテイク分のほとんどを無しにすることができれば光-水素変換効率は最大2.6%まで上昇できるものと計算された。
4. 菌株、基質、光エネルギーの条件を与えることで、リアクタの形状や大きさを光補償点仮説から導きだすことが可能になった。

### 3. 2. 7 参考文献

- 1) K. Masuda et al, Marine Biology, 177, 685-691 (1993)
- 2) Y. Kitajima et al, Kajima Technical Research Institute Annual Report, 44, 295-299 (1996)
- 3) Y. Kitajima et al, Proceedings of International Conference on Biological Hydrogen Production, BioHyrdogen97, June 23-26, Waikoloa, Hawaii, USA, 359-368 (1997)
- 4) J. Miyake, et al, J. Hydrogen Energy, 12, 147-149 (1987)
- 5) E. Nakada et al, Journal of Fermentation and Bioengineering, 80, 53-57 (1995)
- 6) R. K. Thauer, et al, Bacteriological Reviews, 41, 100-180 (1977)
- 7) J. E. Bailey, et al, BIOCHEMICAL ENGINEERING FUNDAMENTALS; McGraw-Hill; New York (1986)
- 8) K. Sasaki, et al, Biotechnology and Bioengineering, 12, 2529-2541 (1980)
- 9) 北島 洋二 他：平成9年度日本生物工学会大会講演要旨集、p.89(1997)
- 10) 岡田 光正、大久保卓也：用水と廃水、31、12-27 (1989)

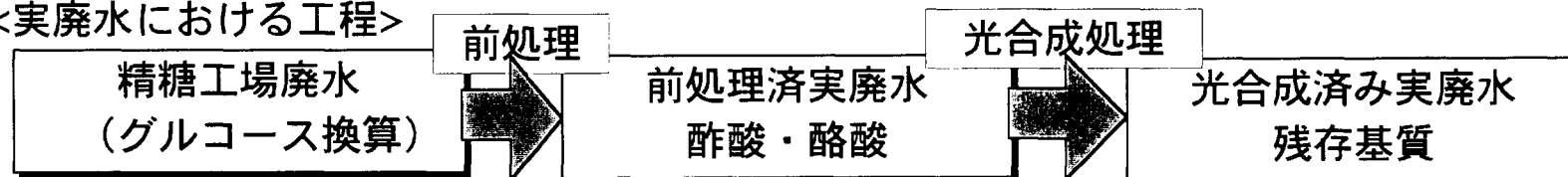
- 11) Y. Ueno et al, Journal of Fermentation and Bioengineering, 79, 395-597  
(1995)
- 12) Y. Ueno et al, Journal of Fermentation and Bioengineering, 82, 194-197  
(1996)

表3. 2-5 H<sub>2</sub>等量表記 [meq-H<sub>2</sub>等量/L] について

$$\left[ \begin{array}{c} \text{廃水中の基質の} \\ \text{水素等量での合計} \end{array} \right] = \sum [\text{有機酸・糖濃度}] \times \text{H}_2\text{等量係数}$$

| 有機酸・糖  | 反応式                                                                                                | [水素mol / 有機酸mol] 係数 | 主要計算工程        |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|---------------|
| 酢酸     | $\text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CO}_2 + 4\text{H}_2$              | 4                   | ←前処理済実廃水      |
| プロピオン酸 | $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2 + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{CO}_2 + 7\text{H}_2$      | 7                   |               |
| 酪酸*    | $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2 + 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{CO}_2 + 10\text{H}_2$     | 10                  | ←前処理済実廃水      |
| 吉草酸*   | $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_2 + 8\text{H}_2\text{O} \rightarrow 5\text{CO}_2 + 13\text{H}_2$  | 13                  | (*: iso-体も同じ) |
| カプロン酸* | $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_2 + 10\text{H}_2\text{O} \rightarrow 6\text{CO}_2 + 16\text{H}_2$ | 16                  |               |
| 乳酸     | $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3 + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{CO}_2 + 6\text{H}_2$      | 6                   | ←G L 模擬廃水     |
| グルコース  | $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow 6\text{CO}_2 + 12\text{H}_2$  | 12                  | ←前処理工程        |

<実廃水における工程>



<模擬廃水による代替実験>  
光合成条件の検討のため



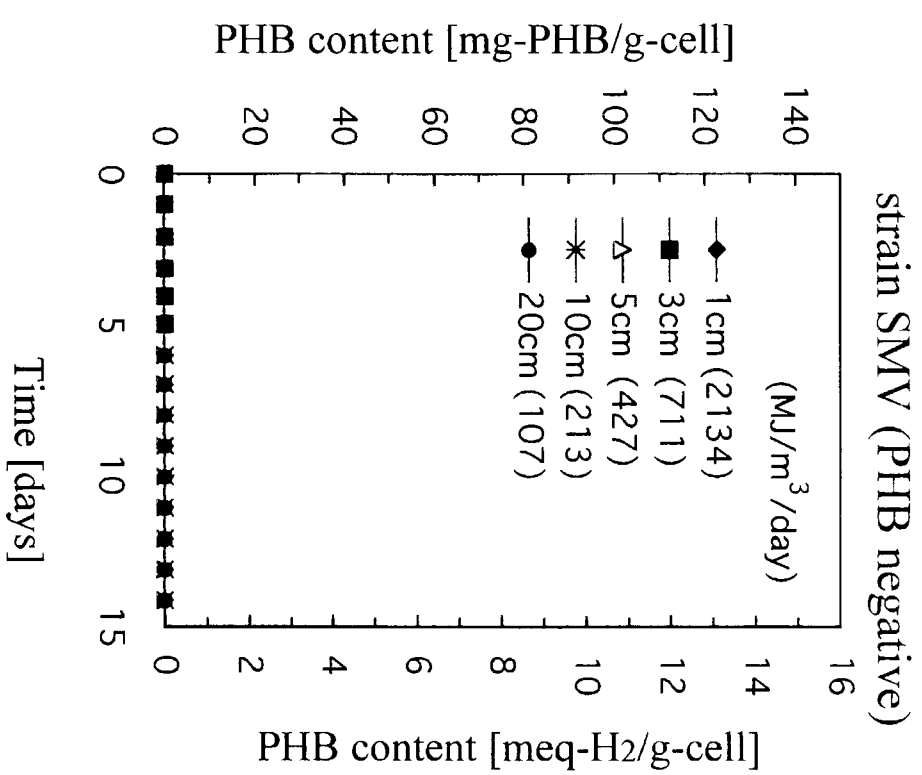
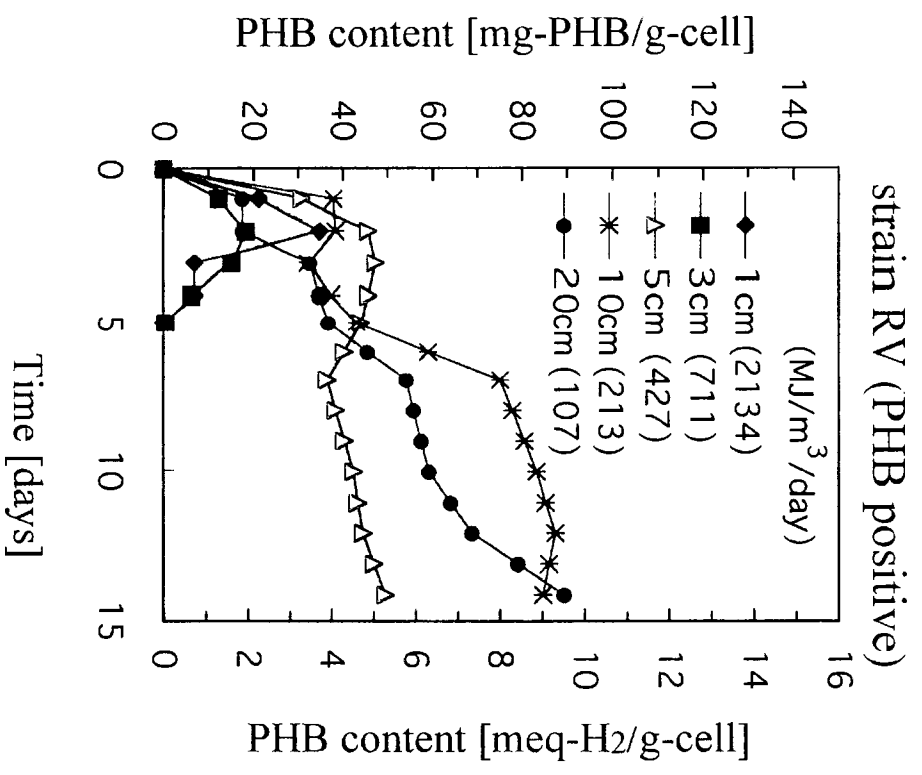


図 3. 2-21 RV株とSMV株によるGL培地でのPHB生産量の比較

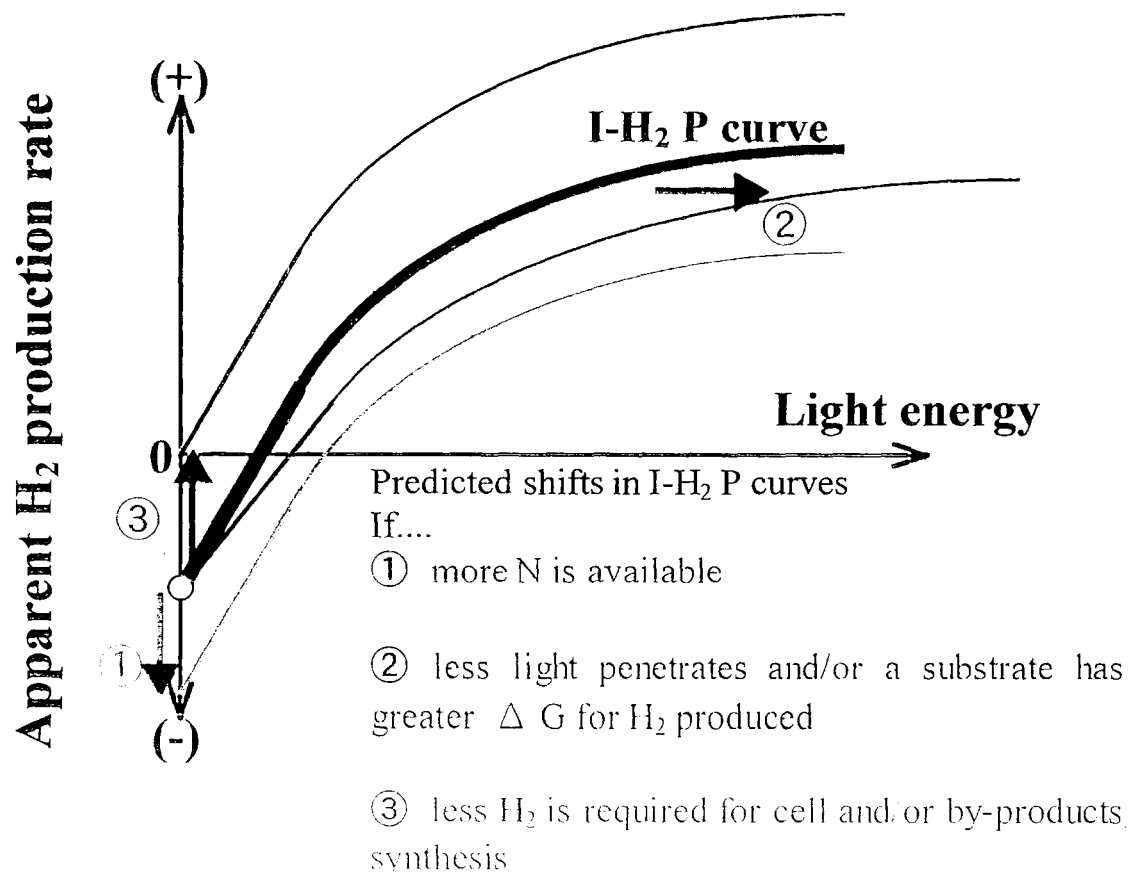


図 3. 2 - 2 2 様々な培養条件による体積当たりの水素生産曲線への影響

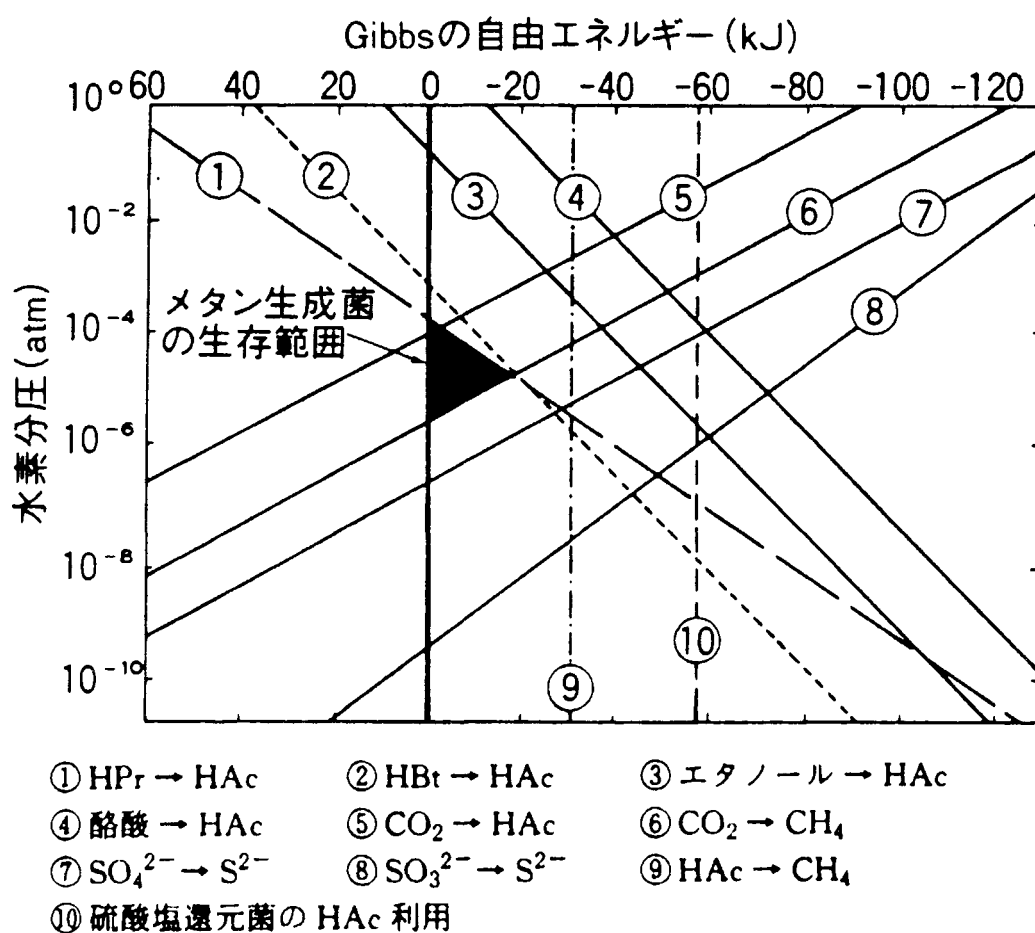


図 3. 2 - 2 3 嫌気処理各過程の水素分圧  
(岡田ら (1989) から引用)

### 3.3 下水汚泥を用いる光合成細菌の大量培養技術

#### 3.3.1 熱処理廃液の活性炭処理効果について

下水汚泥の熱処理廃液は室内実験結果から、光合成細菌の基質として適していることを報告したが、ロット毎の組成の違いによる水素生産量のバラツキがあり、取り扱いづらい面を持っている。この原因としては、水素生産時にはゼオライトによりアンモニア除去して用いるが、廃水ロットによっては有機態窒素が多く、水素生産に必要な有機酸が増殖に利用されるという問題点がある。さらに褐色を帯びているため、光透過性が模擬廃水よりも低い等の問題点もある。そこでこれらを解決するため、熱処理廃液の活性炭処理を試みたので報告する。

##### (1) 熱処理廃液の活性炭カラム処理条件の検討

熱処理廃液を効率よく活性炭処理するため、ゼオライト処理法と同じカラム通液方法を検討した。

##### a. 実験方法

##### ① 実験装置

ガラスカラム（Φ50×500mm）に球状活性炭（タケダ活性炭X-7000）を500mL充填し、蒸留水2Lで洗浄後使用した。また通液にはガラスカラムの下方から、ポンプ（EYELA RP-1000、シリコンチューブΦ4.76×7.94mm）で引く方法を用いた。

##### ② 通液条件

上記ポンプを用いSV値（通液の空間速度＝通水量 $\text{m}^3/\text{h}$ ÷活性炭量 $\text{m}^3$ ）を四系列（SV＝2.0、3.0、4.0、6.0）で通液し、処理液をフラクションコレクタで採取した。

フラクション一本は約20mLで行い、それぞれ色度、有機酸濃度、全窒素濃度、タンパク質濃度とTOC濃度を測定した。

##### ③ 分析方法

##### 1. 有機酸濃度

カラム : SHIMADZU Shim-pack SCR-102H

カラム温度 : 40℃

移動相 : p-トルエンスルホン酸 0.951g/L

緩衝液 : p-トルエンスルホン酸 0.951g/L、Bis-tris 4.185g/L、EDTA 0.029g/L  
流速 : 1.6mL/min (移動相：緩衝液＝50：50)  
検出器 : 電気伝導度計

#### 0. 全窒素濃度

分解剤（ペルオキシ二硫酸カリウム15gとNaOH20gを蒸留水500mLに溶解したもの）と適当な濃度に希釈したサンプルを混合し、121℃・30minのオートクレーブにかける。分解終了後のサンプル1mLと発色試薬（セントラル科学 富栄養計用硝酸イオン酸発色試薬）5mLを混合し5分間室温放置後、測定器（セントラル科学 富栄養計HC-1000）にて硝酸濃度を測定する。得られた値からブランク値を差し引いた後、希釈率を掛け合わせ全窒素濃度とした。

#### ハ. TOC濃度

適当な濃度に希釈したサンプルをSHIMADZU TOC-5000を用いて測定した。

#### ニ. タンパク質濃度

Lowry-Folin法により分析を行った。

#### ホ. 色度

分光光度計により430nmの吸収波長を測定した。

#### b. 結果と考察

四系列の速度でカラム通液を行い、OD<sub>430nm</sub>とTOC、タンパク質濃度を各フラクションで測定した結果、この三つの値は非常によく似た曲線を描くことが分かった（図3.3-1）。これに対して全窒素濃度(T-N)は他の三つの挙動と異なり、早いフラクションから安定した処理効率（約25%）を得ている。また表3.3-1より、全窒素成分はSV値に影響されず、ほぼ一定の処理効率であることから、TOCやタンパク質成分と比較して、活性炭に対し比較的吸着が早い物質であることが予想される。実験前はタンパク質が吸着され減少することにより、全窒素濃度が減少すると予想していたが、この結果からタンパク質以外の窒素源が全窒素濃度に大きく関与していることが

分かった。

活性炭処理は「光透過性の改善」「水素生産時の増殖の抑制を目標とした全窒素濃度の低減」を目的としている。活性炭処理時間が長い（SVが小さい）ほどその効果は大であるが、滞留時間が長くなるためシステム効率の低下をまねき、水素生産に重要な有機酸も吸着させてしまう。酪酸などは酢酸と比較して分子量が大きい（疎水性が高い）ため、処理時間が長い程活性炭に吸着されることが実験から分かっている。

次に横軸をSV、縦軸を色度(OD<sub>430nm</sub>)を対象とした処理フラクション数でグラフを作成した（図3.3-2）。全窒素濃度がSVに左右されないため、光透過性を示す色度で至適条件を検討すると、このグラフからSV=3.0の時に最も処理効率が高いことが分かった。これより活性炭カラムを用いた熱処理廃液の処理条件をSV=3.0に決定した。

## (2) 活性炭処理水による水素生産

活性炭処理により色度や全窒素濃度に改善が見られたので、実際に処理水を用いた水素生産培養を検討した。

実験は活性炭処理をしていない熱処理廃液と処理を施した熱処理廃液を準備し、両者の比率を変えて混合したものを用い、室内にて水素生産バッチ実験を行うことにより活性炭の効果を検討した。

### a. 実験方法

#### ①供試菌株

Rhodobacter sphaeroides RV株（廃水馴養菌）

#### ②培地条件

##### 1. 前培養（増殖）

2.0mLの凍結した馴養保存菌を下記の培地Aで14mLねじ口試験管にて増殖させ、続いて培地Bで70mLのねじ口試験管を用い、人工気象器内で30℃にて増殖させた。さらに熱処理廃液をゼオライト処理し、硫酸アンモニウムを0.55g/L添加後、pHを7.0に調整した増殖培地にて、700mLルーフラスコを用い人工気象器内で30℃で培養した。また人工気象器はEYELA FLI-301NHを用い光強度設定3Lで使用した。

〈培地 A〉

|               |           |
|---------------|-----------|
| 硫酸アンモニウム      | 1.25(g/L) |
| Yeast Extract | 1.00(g/L) |
| コハク酸ナトリウム     | 5.88(g/L) |

〈培地 B〉

|               |           |
|---------------|-----------|
| 硫酸アンモニウム      | 1.25(g/L) |
| Yeast Extract | 1.00(g/L) |
| 酢酸ナトリウム       | 2.74(g/L) |
| プロピオン酸ナトリウム   | 1.31(g/L) |

これらの培地はオートクレーブ(120℃、20min)により滅菌して用いた。

0. 本培養（水素生産）

オートクレーブした熱処理廃液をゼオライトカラムに通液し（平成5年度報告）、酢酸とプロピオン酸をそれぞれ1,300mg/L、1,000mg/Lとなるように調節したものを基本培地とした。

③培養方法

②の基本培地を(1)に示した方法で活性炭処理した熱処理廃液3.5Lと、未処理の熱処理廃液（基本培地）3.5Lを準備し、重曹を1.5mg/L添加後、両者を表3.3-2に示すように混合して5系列の水素生産培地とした。

1.4L容の光路長が約5.6cmのルービンで、光源はハロゲンランプM-26を用い、580 W/m<sup>2</sup>の強度で恒温水槽により30℃で培養した。

④分析方法

1. 菌体量の定量

分光光度計にて660nmの吸光度を測定した。

0. 有機酸濃度

3.3.1(1)a.③と同じ方法を用いた。

## b. 結果と考察

表 3. 3-2 に示した 5 系列のうち、A と E について図 3. 3-3 に経時変化を示し、培養結果を表 3. 3-3 にまとめた。熱処理廃液を利用した水素生産では、活性炭処理の比率が高いほど水素生産量が増えており、光変換効率も高い結果が得られた。これは図 3. 3-4 から、有機酸変換効率の向上が水素生産の向上につながったためと考えられる。培地中に窒素源が多く含まれるほど、炭素源として有機酸を消費して増殖するため、有機酸の水素への変換効率は低くなる。今回の実験では図 3. 3-5 に見られるように、全窒素濃度と菌体濃度は比例関係がみられ、全窒素濃度の減少が水素生産を改善したと言える。しかし活性炭処理は光透過性や水素生産量を改善するが、過度の処理は有機酸を吸着してしまうため、適度な光透過性が得られる処理率の制御が望まれる。そのため活性炭処理は、全窒素濃度が初期の約 75% まで低下したとき（全窒素処理が飽和したとき）を最小限の処理とするが、光強度や菌体活性等の培養条件によって処理条件は変化する。また廃水の性状によっても変化するため、全窒素濃度は活性炭処理条件の目安として用いた方がよいと判断した。

また活性炭処理の効果の一つとして、熱処理廃液ロットによってばらついていた水素生産量の安定が見られた。これは全窒素濃度の平均化、また基質添加により熱処理廃液中の有機酸濃度を揃えたための効果と考えられる。しかし必ずしも活性炭処理は必須の前処理条件ではなく、熱処理廃液は活性炭処理したものとしていないものと水素生産量の差がほとんど見られない場合が多い。従って、システムに組み込む場合はオプションとして取り扱う。

### 3. 3. 2 内部照射式モジュールリアクタによる水素生産培養

昨年度の実廃水を用いた培養では、水素生産が認められなかった。そのため本年度は 3. 3. 1 で記述した活性炭処理法により熱処理廃液を改善し、内部照射式モジュールリアクタに適用した。その結果水素生産が認められたので報告する。

#### (1) 実廃水（下水汚泥の熱処理廃液）を用いたバッチ水素生産培養

##### a. 実験方法

##### ① 供試菌株

Rhodobacter sphaeroides RV 株（廃水馴養菌）

## ②培地条件

前培養は 3. 3. 1 (2)と同じである。

水素生産培養にはロット毎のバラツキを防ぐため、ゼオライト処理を行った実廃水に酢酸・プロピオン酸をそれぞれ1,000mg/Lになるように調整し、先に示した活性炭カラムにより処理を行った熱処理廃液を利用した。これに重曹を1.5g/L添加後、pHを7.0に調整したものを水素生産培地とした。

## ③培養方法

熱処理廃液にて増殖させた菌体を遠心分離(7,000rpm、5min)により集め、活性炭処理廃水1.4Lに懸濁させて植菌した。培養には光路長が約5.6cmの1.4L容のルービンを用いた。光源はハロゲンランプM-26を用い、580W/m<sup>2</sup>の強度で恒温水槽により30℃で培養した。

約20時間の培養後、水素生産を確認した1.4Lルービン5本(7L)を内部照射式リアクタに移植し、培養開始とした。培養方法はバッチ方式である。

## ④分析方法

菌体濃度、有機酸濃度の測定は 3. 3. 1 (2)a.④と同じである。

## ⑤実験装置

水素生産培養は、内部照射式モジュールリアクタを用いた。このリアクタは昨年度製作したもので、人工模擬廃水には10Lのリアクタを用いたが、実廃水は着色による光透過性の低下があるため7Lのリアクタを用いた。この7Lリアクタの仕様を以下に示す。

水素生成槽 : Φ189×直胴部300mm (円筒縦型)

培養体積 : 7 L

マグネット攪拌 : 今回培養時は使用せず

光遮断ユニット (平成7年度既設)

自立型制御板 (平成7年度既設)

各種センサー (温度、pH、DO) (平成7年度既設)

発光体挿入口 : 7口

受光面積 : 0.3007 m<sup>2</sup> (ひまわり受光部)

またこのリアクタの寸法を図3.3-6に示した。

(10Lリアクタは平成9年度成果報告書3.3.6参照)

## b. 結果と考察

昨年度末から本年度当初に利用していた熱処理廃液は、通常と異なり性状が変化しており、水素生産にはあまり適さない状態であった。室内で十分な光環境下においても、これまでの熱処理廃液と比較すると半分以下の水素生産量であった。しかし活性炭処理をすることにより全窒素濃度などが減少し、内部照射式リアクタで水素生産が見られるようになった。

上記培地で数回実験を行ったが、天候に恵まれず、よい結果が得られなかった。内部照射式リアクタは直達光しか利用できないため、薄曇りの状態でもリアクタ内への入射光量はほとんど0になるという問題点があるためである。その中で数日間のみではあるが、水素生産が認められた培養があったので、その培養結果の経時変化を図3.3-7に示した。菌体濃度はOD<sub>660nm</sub>=2.0前後で安定しており、理想的な値で制御できた。さらに表3.3-4には、モジュールリアクタを用いて昨年度行った人工模擬廃水による結果と、本年度の実廃水による培養結果を併記した。実廃水については三回行った実験結果の平均値を示している。その結果、光変換効率は人工模擬廃水には届かないが、実廃水を用いた屋外実験の中で最も高い値となった。

図3.3-7に示すように培養初期の二日間は天候に恵まれ水素が発生しているが、三日目からの日射量不足によりその後の活性がかなり落ち込んでおり、日射量が十分な状態に戻っても回復していない。昨年報告の人工模擬廃水を用いた培養においても、二日間の日射量不足を境に発生速度の低下が認められていた。このことから一日一日の日射変動の幅では水素発生に影響は見られないが、二日間の日射量不足は活性の低下に大きく関与すると考えられる。

## (2)内部照射式リアクタについて

### a. 内部照射式リアクタ

平板式リアクタの設置方向が南向きに固定されている場合、厚さ5cmのリアクタには南中時以外は光が斜め方向から入射するため、リアクタは常に5cmの光路長を持つ

のではなく、太陽の位置により光路長が変動し、5cmは最も短い時の光路長と考えられる。そのため深部に光が届きにくい時間があり、槽内の光分布にムラが生じる。それに対し内部照射式リアクタの場合、利用する直達光の経日変化が小さいため、ほぼ安定した光強度が得られる。その上発光体が均等に光を分散しているため、光路長が一定という特徴をもつ。つまり、直達光しか利用できないという問題点はあるが、光合成細菌の水素発生に適した光環境を作り出しやすい。

#### b. 色を帯びた廃水への適用

厚さ（光路長）5cmの亚克力製平板リアクタを用いて、太陽光で水素生産培養を行った結果、人工模擬廃水では内部照射式リアクタによる培養結果より高い光変換効率が得られたのに対し、実廃水では逆に内部照射式リアクタの方が高い値を得た（表3.3-5）。受光面積に対する培養体積を投入エネルギー量で見たとき、7Lの内部照射式リアクタと平板式はほぼ同じであるが、光変換効率は内部照射式リアクタの方が上回っている。

これは平成8年度の成果報告書3.3.3で報告した「リアクタ光路長と菌体濃度及び光透過率の関係式」から計算すると、強い光で遠くへ届かせる方法より光分散により弱い光を均等に与える方が、光合成細菌にとって効率が良くなるためと考えられる。

つまり、内部照射式リアクタの特徴が「光を均一に分散して供給できる」ことであるため、色を帯びた廃水を用いるときは平板式より内部照射式の方が有利と考えられる。

また、内部照射式リアクタは、廃水の着色や菌体濃度により光透過性が変化する場合、必要な光強度を計算することで光路長の最適化、つまり発光体配置の最適化も図ることができる。

表 3. 3 - 1 熱処理廃液の活性炭処理カラムにおける  
S V別除去率

| SV          | 2.0  | 3.0  | 6.0  |
|-------------|------|------|------|
| 全窒素除去率[%]   | 24.7 | 25.8 | 21.1 |
| TOC除去率[%]   | 37.6 | 25.7 | 23.8 |
| タンパク質除去率[%] | 45.0 | 38.3 | 34.6 |

各除去率はフラクション NO.50(1,000mL 通液後)における値である。

表 3. 3 - 2 熱処理廃液の活性炭処理水の培地混合比

| 名称      | A     | B      | C     | D      | E     |
|---------|-------|--------|-------|--------|-------|
| 比率      | 100:0 | 75:25  | 50:50 | 25:75  | 0:100 |
| 活性炭処理無し | 1. 4L | 1. 05L | 0. 7L | 0. 35L | 0L    |
| 活性炭処理有り | 0L    | 0. 35L | 0. 7L | 1. 05L | 1. 4L |

表 3. 3 - 3 活性炭処理水を用いた水素生産培養結果

|   | 全窒素濃度  | 水素発生量 | 光変換効率 | 有機酸変換 | 菌体濃度(OD660nm) |      |
|---|--------|-------|-------|-------|---------------|------|
|   | [mg/L] | [mL]  | [%]   | 効率[%] | 平均            | 最大   |
| A | 660    | 5,005 | 0.414 | 56.8  | 3.45          | 4.15 |
| B | 588    | 5,575 | 0.461 | 64.3  | 3.12          | 3.72 |
| C | 516    | 5,827 | 0.482 | 71.2  | 2.59          | 3.01 |
| D | 444    | 5,841 | 0.483 | 72.7  | 2.35          | 2.73 |
| E | 372    | 6,016 | 0.497 | 77.1  | 2.08          | 2.40 |

表 3. 3 - 4 内部照射式リアクタによる水素生産バッチ培養結果

|                       | Date                    | Culture Volume [L] | Av. Gas production rate in fine day [mL/h·L] | Conversion Efficiency [%] |
|-----------------------|-------------------------|--------------------|----------------------------------------------|---------------------------|
| Artificial wastewater | '97.10                  | 10                 | 11.9                                         | 0.80                      |
| Real wastewater       | '98.5<br>'98.8<br>'98.9 | 7                  | 8.7                                          | 0.54                      |

### 3. 4 生ゴミを用いる光合成細菌の大量培養技術

#### 3. 4. 1 要旨

基質と共に与えた窒素の阻害作用を最小限に抑えることを目的とした適当な操作条件を選択した後で、太陽光下で持続的水素発生が起こることが45～100mmおよび150mm内径の光リアクタで証明された。

我々の研究室で得られた取り込みヒドロゲナーゼ欠損突然変異株（HUPマイナス）を用いて100mm内径の光リアクタを稼働したところ、最も有望な結果が得られた。この装置を用いて総酸負荷率を $1\text{g}/(\text{L}\cdot\text{d})$ とした場合、総酸除去、水素生産のモル収率および光変換効率は、それぞれ50%、40%および1.1%になった。水素生産1日容量および表面積水素生産速度は $0.30\text{LH}_2/(\text{L}\cdot\text{d})$ および $7.2\text{LH}_2/(\text{m}^2\cdot\text{d})$ である。

これらのデータの、以前に実験室規模で実験した酸産生・光生物併合システム（APCS）へのスケールアップを含む経済的予測、および本年に予備的に検討した非無菌的培養の使用によって、純ガスとしての水素の現在の価格（ $1,000\text{Lit}/\text{Nm}^3$ ）の約3倍の水素振替価格を示した。この目標は、光リアクタの性能を倍増すればほぼ達成される（ $1,650\text{Lit}/\text{Nm}^3$ ）。

この最後の目的では、可能性のある解決法は培地への $\text{CO}$ 通気である。これは、非無菌的培養を用いるためであり、また、文献で報告され我々の研究室でアルゴンを雰囲気ガスとして使用して確認されたものと同じ程度の水素発生速度上昇を得るためである。この仮説は非常に魅力的ではあるが、人工光と自然光の双方で実験することによって確認する必要がある。

いずれにせよ、最終目標価格（ $1,000\text{Lit}/\text{Nm}^3$ ）は、光変換効率および光リアクタコストを改善するために修飾した菌株、あるいは廃棄物処理からの大きな収入（ $100\sim 150\text{Lit}/\text{kg}$ 廃棄物）を必要とする。

#### 3. 4. 2 緒言

我々が最近収集した情報によれば、前年度までに発表された生物学的水素生産に関する研究は多くはないが非常に興味深いものである。これらの研究は、化学有機栄養菌、光合成無機栄養菌および光合成有機栄養菌に関するものである。

最初のクラスに属する細菌として、*Enterobacter aerogenes* が、最近、Rachman et al.<sup>1)</sup>によって研究された。彼らは、連続リアクタでの凝集細胞の使用を研究した。最終目的は、

UASB(Up flow Anaerobic Sludge Bed)として知られている廃水の嫌気性処理に使用されているものと同様のリアクタを開発することであった。彼らは、非常に小さいガラス製リアクタ(直径2.7cm、高さ17cm)をテストして、非常に有望な結果を得た。細胞凝集の程度は、実際、非常に優れているように思われ、0.67/h(水流滞留時間、1.5時間)までの希釈率に達した。この条件では、水素生産速度は、メタン発生汚泥から得られた天然分離株では31mmol/(L·h)、アリルアルコール抵抗性とプロトン自殺法を用いて選択した突然変異株では58mmol/(L·h)であった。上記の水素生産速度は、現在の嫌気性光合成細菌の生産速度と比較して非常に大きい(1~2L/(L·h)対 17~31L/(L·h))。

技術的観点からは、化学有機栄養菌の能力は非常に高いことが確認された。化学有機栄養菌は暗所で非常に高い速度で機能し、従来のバイオリアクタで培養可能である。実用化の観点からは、化学有機栄養菌は収率が低く、蔗糖などの高エネルギー値の電子供与体が必要とすることによって限界があると思われる。上記の結果は、グルコースを電子供与体として得られており、グルコースは1.2mol/molの収率で水素に変換される。しかし、化学有機栄養菌はバイオマスから得られるヘミセルロースやセルロースを含む加水分解物から水素を生産することができることを考慮しなければならない。但し、ヘミセルロースではグルコースより収率が低い<sup>2)</sup>。工業的実用化を行う場合の低収率という欠点は、他の代謝物産生を遮断するか<sup>3)</sup>またはそれらを回収することによって対処できる。この目的では、この種の代謝物が主に揮発性有機酸であり、オクタン価向上剤として販売できるメチルエステルに変換できることを考慮しなければならない<sup>4)</sup>。

光合成無機栄養菌では、シアノバクテリアで主に研究が続けられている。シアノバクテリアは、水素生産だけではなく廃水処理でも考慮されている。例えば、Weisman et al.<sup>5)</sup>は、原子炉の廃水の処理に用いることを目的として、窒素およびリンの除去に窒素固定高温菌*Fischerella*(以前の*Mastigocladus laminosus*)の半連続培養を提案している。

水素生産の場合は、シアノバクテリアは他のバクテリアと共に使用することが考えられている。Bagai and Madamwar<sup>6)</sup>は、非異型細胞性シアノバクテリアである*Phormidium valderianum*を塩抵抗性の*Halobacterium halobium*および*Escherichia coli*と共に使用することを考えている。シアノバクテリアは、細胞がグリコーゲンを蓄積できる機序によって酸素が全く存在しない状態で窒素固定を行う。この細胞を、蓄積されたグリコーゲンの代謝から得られる還元力によってニトロゲナーゼを支援するという嫌気条件での水素生産に使用する。この併用システムでは、*H. halobium*を用いてプロトンを排出し、*E. coli*

中に存在するヒドロゲナーゼによって反応を触媒する。彼らは、併用システムでの水素生産は *P. valderianum* の数倍であると主張している。生産速度をさらに改善ないしは安定化するために、彼らは細胞の固定化も行った。固定化細胞（乾燥重量で、*P. valderianum*、*H. halobium* および *E. coli* の比率が1:1:1）では、2.5L/(g cells·d)という水素生産速度が得られた。この数値は、無酸素光合成細菌で得られている値に近く、非常に興味深い。

この研究によってシアノバクテリアの能力が確認された。なぜなら、CO<sub>2</sub>消費と同時に水素を生産する能力、また、他の細菌を併用した場合に、グルコースなどの基質も利用でき、無酸素光合成細菌と同様に廃水から有機物質を除去する能力があるからである。

光有機栄養菌に関する研究は、基本的に、人工光と自然光の双方でその性能を評価することを目的としている。最初の例では、Tsygankov et al.<sup>7)</sup> は、*Rhodobacter capsulatus* の連続培養および非連続培養の双方で、水素発生速度が気相中の水素濃度の影響を強く受けることを確認した。特に、彼らは、D=0.06/hで稼働した連続1.3リットル光バイオリアクタを用いて、水素が100ml/(L·h)に増加することを発見した。この挙動はまだ検討の余地がある、なぜなら、著者は、細胞ヒドロゲナーゼおよびニトロゲナーゼ阻害による水素取り込みの影響を除外する方向に向かっている。彼らは、気相中のCO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>比またはCO<sub>2</sub>濃度を変化させれば効果が得られるかも知れないと示唆している。なぜなら、CO<sub>2</sub>が *R. capsulatus* による水素生産を大きく促進することが発見されているからである<sup>8)</sup>。

収率の観点から、彼らは、最大水素生産速度では、電子供与体として使用した乳酸が30%まで水素生産に使用され、50%がバイオマス合成に使用されることを発見した。この数値は、75%という乳酸利用率を報告したFascetti and Todini<sup>9)</sup> の所見と比較して非常に低いように思われる。但し、彼らは培地に用いた酵母抽出物の寄与を考慮していない。いずれにせよ、太陽光下では乳酸利用率は低い。実際、Kitajima et al.<sup>10)</sup> は、バッチ法で稼働した3、5および30cmの深さのプレート光バイオリアクタについてそれぞれ38.8%、17.7%および0%という値を報告している。彼らによれば、細胞増殖のための乳酸利用率は3種の光リアクタともほぼ同じで約60%であり、基質は水素に変換されずに、酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸およびカブロン酸などの有機酸として蓄積する。この代謝は光に依存しない反応であり、したがって、深いリアクタほど高度に起こる（30、5および3cmの深さのリアクタでそれぞれ40.8、25.4および4.7%）。浅いリアクタを用いて8月の強い太陽光下で稼働しても少量の酸が存在することは、自然の暗／明サイクルによって酸が蓄積することを示している。

本節の短い文献概要を完結するには、最後に、光バイオリアクタに関する研究も発表されていることを指摘しておかなくてはならない。特に、Hu et al.<sup>11)</sup>は、燃料ガスからの二酸化炭素ガス固定のために、高度のCO<sub>2</sub>抵抗性を有する単細胞緑藻*Chlorococcum littorale*を培養するための平板光バイオリアクタを研究した。この研究は非常に興味深い、なぜなら、彼らは非常に高い最大および最適細胞密度（それぞれ80および15～20g/L）を発表しており、しかも、高いCO<sub>2</sub>濃度（気相中で20%）でも培養を行えるからである。しかし、これは、短い光路（1cm）と強い内部照明（2,000 μmol/(s·m<sup>2</sup>）、約435W/m<sup>2</sup>の連続蛍光灯照明に相当）を必要とした。

上記の簡単な文献概要によって、嫌気性光合成細菌が近い将来の実用化に最も適した候補であることが確認された。実際、嫌気性光合成細菌では容量生産率が化学有機栄養菌より低い、廃水中に含まれる多様な有機分子を電子供与体として利用でき、化学有機栄養菌は蔗糖しか利用できない。同様に、シアノバクテリアでは基質としての廃棄物の利用を確認しなければならず、現時点では、まだ可能性の一つでしかない。

嫌気性光合成細菌の大規模使用に関する主な問題点は下記の通りである。

- ・大規模光リアクタの設計および開発
- ・太陽光下での光リアクタの長期稼働に適した方法の選択
- ・基質滅菌のコストを抑えるための非無菌的培養の利用

本報告では、前述の欠点を克服するために平成10年度まで当研究室で実施された研究の結果を示し、考察する。

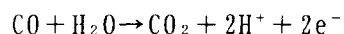
特に、人工光と自然光の双方で行った研究について述べる。人工光下の実験は実験室およびベンチ規模の装置で行った（この装置の技術的特徴については平成8年度および9年度の成果報告書参照）。自然光下の実験は、前年度の報告書で説明したモジュールシステムで、新しいチューブリアクタを構築し、パイプと接続器具を適切に改良して行った（3.4.4参照）。このシステムでは、我々の研究室で得た取り込みヒドロゲナーゼ欠損突然変異株（HUPマイナス）を用いた。

人工光下の研究は、主に、*Rhodobacter sphaeroides* RVの非無菌的培養に関するものである。この目的で、ホップの抽出物に含まれる有機分子であるイソムロンをアセトン産生菌、メタン産生菌および硫酸還元菌の選択的阻害剤として用いた。これは、最初にこの有機分子について実験を行ったLiessens and Werstraete<sup>12)</sup>が報告した所見に従った。

この研究を拡大して培養にCOガスを利用した。これは、二酸化炭素はメタン産生菌や硫

酸還元菌（即ち、*Desulfovibrio*）などの厳密な嫌気性菌ではほぼ対応不能であるが、*Rhodopseudomonas* などの無酸素光合成細菌によって暗条件でも明条件でも唯一の炭素源として使用されるからである<sup>13)</sup>。

CO取り込みの機序は下記の反応に基づいていることを考慮しておくべきである<sup>13)</sup>。



そこで、二つの文献情報に従って、酸産生段階からの残存細菌を抑制し、水素発生を改善できる可能性があることから、培養にCOを用いることを検討した。

### 3. 4. 3 試料

#### (1) 水素生産のための基質

主に乳酸と酢酸（約90：10、w/w）を含む混合物を水素生産のための電子供与体として用いた。

以前と同じ様に、原料混合物は近くの市場で廃棄処分された果実および野菜の酸産生発酵物から作られる。酸産生発酵の後に、非発酵物質と酸産生菌を除去することを目的とした適当な後処理を行った。この処理に関する詳細、ならびにプロセスの各段階での乳酸と酢酸を含む各種液流の組成は、平成7年度および8年度の成果報告書に記載されている。

#### (2) 嫌気性光合成細菌

ほとんどの実験は、工業技術院生命工学工業技術研究所（つくば市）から供与された *Rhodobacter sphaeroides* RVを用いて行った。

この株はRV047と名付けた。ベンチ規模の装置とモジュール施設による実験では、EniTecnologie社S. Donato研究所で得た取り込みヒドロゲナーゼ欠損突然変異株（HUPマイナス、SMV089）を用いた場合もある。

#### (3) 化学薬品

すべての実験を、平成8年度報告に記載されているものと同じ化学薬品を用いて行った。

本年度は、Germino S. p. A. (Cornano, Milan)によってGermocid Plusという商品名で販売されている化学殺菌剤をモジュールによる実験の一つに殺菌剤として用いた。この殺

菌剤は、次に示す化合物の混合物である：2gのグルタラールアルデヒド、1gのo-フェニルフェノール、20mlのイソプロピルアルコールおよび非イオン性界面活性剤。

イソムロンを含むホップ抽出物の2つの試料はWigand Products Lm. td (Worcestershire, UK)から提供された。

最初の試料は40%の $\beta$ 酸を含む粗抽出物であり、第2の試料は $\beta$ 酸の10%水中乳剤であった。

$\beta$ 酸は水には非常に溶けにくい。 $\beta$ 酸の分子構造は図3. 4-1の通りである(Rはルブロン、コルブロン、アドルブロン、プレルブロンおよびポストルブロンの混合物である)。

#### (4) 分析法と光測定

すべての分析を、前年度の報告に記載されている方法に従って行った。

唯一の違いはTOC測定に関するものである。細胞を除去するために事前に10,000rpmで10分遠心分離しておいた培養物の試料を、参考文献番号(14)に記載されている燃焼赤外法、方法番号5310Bに従って直接分析した。分析は、Total Organic Analyzer Mod 5000-A、Schimatzu(Milan, Italy)を用いて行った。

市場廃棄物の酸産生で得られた、水素発生のための無菌基質について、金属酵素の合成に必要な微量元素の量を確認するため、金属の分析を行った。この目的で、EPA方法番号3050に従って500mgの試料を酸処理し、プラズマ分光計Jobin Yvon model JY24で分析した。

### 3. 4. 4 実験

#### (1) 実験室規模

3. 4. 2で述べたように、実験室規模の実験は、酢酸菌、メタン細菌および硫酸還元菌などの*R. sphaeroides* に対する競合菌の阻害物質に関するものである。これらの細菌のほとんどは、廃棄物の酸産生から由来する水素生産のための基質中に含まれている。

実験は以下のものを用いて行った。i)振動篩と遠心分離によって非発酵固形物を除去して基質の試料を得た。(200ppmのカチオン性高分子電解質EM494N、Nymco Groups、Cormano. Milan, Italyの存在下に傾斜型遠心分離装置を稼働；詳細については平成7年成果度報告書参照)、ならびにii)メンブラン滅菌(平成7年度成果報告書参照)して

*R. sphaeroides* RV接種した(i)で述べた試料から由来する無菌乳酸含有溶液。これは、残存酸産生菌、*R. sphaeroides* 自体および酸産生菌と*R. sphaeroides* の混合集団に対する阻害剤の影響を確認するためであった。

上記の試料を、表3. 4-1に従って、粗β酸、β酸乳液およびC0で試験した。

廃棄物の酸産生から得られた乳酸溶液を蒸留水で希釈して表3. 4-1に示す最終濃度とし、水酸化ナトリウムで中和した。試験番号3および4は、培養物に、吸光度2.1の前培養細胞を接種して濃度を10%v/vとして行った。試験番号5および6では接種量を20%v/vに増量した。

粗β酸の水溶性を高めるため、市販製品をエタノールに溶解して8g/Lとした。培養物中のエタノール濃度を一定にするため、β酸乳液もエタノールに溶解して活性成分の濃度を同一にした。

前年度の所見に従って、*R. sphaeroides* RVの培養物に以下のものを事前に添加しておいた：75mg/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、5mg/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.75mg/L  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、1.25g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ および $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.12g/L。

培養物の容量は200mlとした。培養は、35℃の水浴に入れた350mlの耐ガスバイアルで、図3. 4-2に示した装置を用いて行った。いずれも、表3. 4-1に示す各実験セットを同時に実施できるように、多数の光リアクタを含む。

図3. 4-2 Aに示す装置を用いてβ酸の試験を行い、図3. 4-2 Bに示す装置を用いてC0の試験を行った。最初の装置は基本的に水浴、光リアクタ、350mlのガス容器およびガス測定のためのシリンダで構成されている。第2の装置には、C0を入れた別のガス容器があり、この容器を介して光リアクタ中の培養物が再利用される。これは、水素を含む気相とC0を分離することを目的としており、培養物とC0の接触を改善し、C0を飽和させる。光リアクタとガス容器の間のプラスチックによる接続は、水素消失を最小限に抑えるために、Tygon F4040A(ENCO s.r.l., Venice, Italy)で行った。ガス容器中の水はNaClで飽和させ、その置換を指標としてガス産生を観察した。*R. sphaeroides* RVの培養物は、ハロゲンランプ(Sylvania 125W, JDR 110/125 E/N)による584W/m<sup>2</sup>で内部照明した光リアクタで培養した。光は、光リアクタの外部表面で測定した。気体および液体試料を毎日注射器で採取し、これまでのように、水素およびCO<sub>2</sub>含量、pH、揮発性脂肪酸(VFA)濃度、濁度、乾燥重量およびTOCの分析を行った。

光リアクタと培地を120℃で30分間オートクレーブ処理した後に試験番号3.1

(表3.4-1参照)を行った。

試験番号3、4および5は培地にアルゴンを徹底的に通気した後に行った。一酸化炭素の存在下の試験は、培地をCOで飽和させた後に行った。

## (2) ベンチ規模

前年度では、平成7年および8年の年次報告に記載されているベンチプラントを次の目的のために用いた。i)人工光(実験室およびベンチ規模)と自然光(モジュール装置)の双方で試験する新しい乳酸試料を生産するため、ii)モジュールに接種するために必要な*R. sphaeroides* RVおよびその取り込みヒドロゲナーゼ欠損突然変異株(HUPマイナス、SMV089)の多量の培養物を生産するため、ならびにiii)予備的な非無菌的水素生産試験を行うため。

### a. 水素発生のための基質の生産

各200kgの模擬市場廃棄物の試料を本年度に発酵させた。最初の発酵は6月に行い、次いで9月に行った。3.4.3で述べたように、廃棄物発酵、乳酸を含むシロップの分離、および滅菌のための操作を通常通り行う(平成7年度および8年度の成果報告書参照)。

### b. モジュールのための接種物の生産

*R. sphaeroides* RV(野性株SM047)とその取り込みヒドロゲナーゼ欠損突然変異株(HUPマイナス、SMV089)の両方を培養した。

SM047はリアクタRA(深さ3cm、培養物容積6L)で培養し、SMV089はリアクタRB(深さ3cm、培養物容積4L)で培養した。

これらの光リアクタに、廃棄物の酸産生からの基質を炭素源として含むフラスコで培養した4リットルの前培養物を接種した。この基質を蒸留水で1:4希釈し、75mg/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、5mg/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.75mg/L  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.4g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ を加えた。培地を水酸化ナトリウムで中和し、30℃で照明下に最終吸光度が2単位になるまで培養した。3.4.4で述べた特徴を有するハロゲンランプを培養物の内部照明に用いた。

フラスコの外部表面の光エネルギーは584W/m<sup>2</sup>であった。培養物の深さは5.5cmとした(フラスコ、幅14.5cm、高さ17.5cm)。

前培養物は、次に示すものを含む100ml ASY培地（1リットルにつき）で再生した凍結乾燥細胞から開始して調製した：1.25g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、9.8gコハク酸、1.0g酵母抽出物、0.75g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、0.85g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、2mg EDTA、2.8mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ 、0.75mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.24mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1.6mg  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、0.41mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.75mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.2mg  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、10mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。これらの培養物を、30℃で、嫌気条件下に暗所で、150mlエルレンマイヤーフラスコで36時間培養した。

ベンチ規模の光リアクタRAおよび2Bを、市場廃棄物の酸産生から得た基質を蒸留水で種々の率(1:6～1:10)で希釈した溶液を用いて、連続的に稼働させた。ニトロゲナーゼの合成を促進するために必要な通常の微量元素を培地に加えた（3.4.4参照）。

### c. 予備的な非無菌的水素生産試験

実験は、上記のものと同じ株、光リアクタおよび操作法を用いて行った。この場合、光リアクタに加える基質の一部（通常は10%）を、時折り（通常は4日に1回）、非無菌培地と交換した。

この培地は、市場廃棄物の酸産生から、振動篩と傾斜型遠心分離によって固形物を除いた後に得たシロップである。これは、-20℃で保存しておいたシロップを解凍し、蒸留水で1:10希釈し、ニトロゲナーゼ合成に必要な微量栄養素を加えて得た（3.4.4参照）。この培地を室温下に24時間放置して、酸産生菌を再生させ、次いで4℃で保存し、必要な場合に使用した。

### (3) 自然光下のモジュール装置

モジュールに含まれる装置の特徴ならびにその操作については、平成8年度成果報告書に記載されている。前年度に得られた結果に従って、下記のことを目的として、このモジュール装置を改良した。

- ・暗容積を減少させること
- ・全装置を蒸気で滅菌すること
- ・光リアクタの直径を拡大すること

特に、暗容積は、各チューブを連続接続して二つの水平マニフォールドを迂回することによって減少させた。光リアクタを再循環ポンプ、熱交換機および制御機器のブローブと接続させている柔構造パイプを、もっと短い固定したステンレス接続器具に変えた。

この方法でパイプの容積を減少させ、蒸気耐性接続器を用い、非常に単純なプラントを構築した。

これらの改良後のモジュールの模式図を図3. 4-3に示す。この図に従って、乳酸を含む無菌シロップを定容量ポンプP-1 A-B-Cでプラントに送った。基質は、遠心分離ポンプP-3 A-B-Cによって、熱交換機E-1 A-B-Cおよび光リアクタRA-B-Cに再循環した。pH調節のための1N水酸化ナトリウムを定容量ポンプP-2 A-B-Cで各光リアクタに加えた。ガスを容器W-1 A-B-Cのなかで再巡回培養物から分離させた。低圧蒸気(2atm、120℃)を、必要な場合に、プラントの各装置に別個に送って滅菌を行った。滅菌後にプラントに無菌アルゴンを充填した。

本年度までに実現した光リアクタを含む改良モジュールの図を旧型と共に図3. 4-4に示す。

試験した光リアクタの主な特徴を表3. 4-2に示す。この表に従って、前年度には内径10cmおよび15cmの新しい光リアクタと内径4.5cmの旧光リアクタの双方で実験を行った。この旧光リアクタは、基本的に、基質中の有機酸の濃度を高くすることによって水素容量生産率を最大化するために用いた。

実施した試験の一覧を表3. 4-3に示す。この表に従って、光リアクタ中の細胞濃度を上げることによって水素容量生産率を高めるために、試験番号21~24を実施した。この目的では、総酸濃度を4.5~8.5g/Lの範囲に維持した。同じ目的で、光リアクタの内径を45mm(試験番号21、22、24)から100mm(試験番号23)に拡大することによっても追求した。

これらの試験では、培養物の汚染の危険を最小限に抑えるために、多くの殺菌剤を用いた(次亜塩素酸ナトリウム、蒸気および市販殺菌剤)。

実験番号25および26は、太陽光下で、S. Donato研究所で得られた取り込みヒドロゲナーゼ欠損突然変異株(HUPマイナス、SMV089)を試験するために行った。このクローンは、内径100mmのリアクタ(試験番号25)とものと内径の大きいリアクタ(内径150mm、試験番号26)の双方で実験した。これらの実験は、8月末から9月にかけて豊富な太陽光下で行った。これらの好ましい気象条件で、最適稼働法を選択するため、多くの基質添加方法(連続、1日のうち種々の添加時間帯設定による半連続)を試験した。

最後の3つの実験は、次のことを目的として、試験25および26の後に選択した稼働条件で行った。i)同じ気象条件と同じ光リアクタで2種の菌株を比較すること(試験27お

よび28)、ならびに ii)最も内径の大きい光リアクタ (150mm、試験番号29) の能力を確認すること。

すべての実験で、表3. 4-3に示す量の前培養物を光リアクタに接種した。これらの前培養物は、3. 4. 4で述べた方法に従ってベンチ装置で培養した。各接種物の吸光度を表3. 4-6に示す。各実験で温度は温水を熱交換機E-1 A-B-Cに再循環することによって30℃に調節した。ポンプP-3 A-B-Cの流速は100~150L/hとした。光リアクタの稼働圧は3~5mH<sub>2</sub>Oとした。

### 3. 4. 5 結果

#### (1) 実験室での実験

非発酵固形物の除去後に、市場廃棄物の酸産生から得た基質から発生したバイオガスの特徴を図3. 4-5および図3. 4-6に示す。図3. 4-5は一酸化炭素存在下に行った試験、図3. 4-6はホップ抽出物の存在下の試験である（稼働の詳細については、表3. 4-1、試験1および2参照）。これらの図を検討すると以下のことが推論できる。

- ・COとホップ抽出物中のβ酸はいずれも、基質に含まれる残存酸産生菌の活性を抑制する。
- ・COの影響は希釈した基質の方が顕著であるが、恐らく、最初の菌量が低いことと炭素源の濃度が低いことに起因する。
- ・粗ホップ抽出物は培養物中濃度5.0ppmで活性を示し、乳剤中のホップ抽出物は10ppmでも活性を示さない。

表3. 4-4に示すデータから、バイオリアクタ中では、加水分解性発酵相の末期とメタン発生相の前に起こる典型的な複雑な現象が起こると推論できる。CO<sub>2</sub>が発生し、乳酸が消費され、pHが低下する。

しかし、試験1で生産されたバイオガスの総量は試験2で認められたものと同じではないことを指摘しておかなければならない。これは、リアクタ中に含まれる細菌類の特性検討を目的とする適当な微生物学的測定と共に、今後の実験を必要とする。

ホップ抽出物に含まれるβ酸の*R. sphaeroides* RVに対する影響を検討するための最初の試みは、粗β酸の濃度を50ppmとして行った。図3. 4-7に示す結果は、下記のことを示している。

- ・β酸は、試験した濃度で、水素発生をほぼ完全に抑制する。

・乳酸は、水素に変換されず、ほぼ化学量論的に揮発性脂肪酸に変換される。

これらの結果に基づいて、ホップ抽出物濃度がもっと低い場合に非無菌基質で水素発生が起こるかどうかを確認することを目的とした実験を計画した（試験番号4）。

水素、乳酸消費および揮発性脂肪酸産生に関する結果を図3. 4-8および図3. 4-9に示す。この2つの図を検討すると下記のことが示唆される。

- ・非無菌培養で水素発生が起こり得る。
- ・乳化した $\beta$ 酸では高い抑制活性が確認された。
- ・乳酸が揮発性脂肪酸に変換されるため、水素は低い収率で生産される。

この欠点を克服するため、*R. sphaeroides* RVと残存酸産生菌の初期細胞比をもっと好ましいものにして、最終実験を計画した。この目的で、乳酸を含むシロップを希釈して、2.3g乳酸/Lにし、*R. sphaeroides* 接種物を20%v/vに増量した（試験番号5、表3. 4-1参照）。

水素生産に関して得られた結果を図3. 4-10に示し、乳酸消費と揮発性脂肪酸生産に関する結果を図3. 4-11に示す。

これらの2つの図は、次のことを裏付けている。i)非無菌培養物から水素発生が起こり得る、およびii)酢酸だけが得られ、多量のプロピオン酸と酪酸も形成された以前の結果とは異なっている。

図3. 4-10は、モル水素生産の収率が22~27%の範囲であることも示している。この27%という値は、深さ55mmの平底フラスコで行った*R. sphaeroides* の標準的な無菌培養物でみられた値に非常に近い（平成9年度成果報告書参照）。これらのシステムでの水素生産の収率は、初期乳酸濃度によって異なるが、30~40%の範囲である。

最後に、実用化の観点からは、約20ppmの $\beta$ 酸濃度の方が好ましいと考えなければならない。実際、図3. 4-10によれば、この濃度では、*R. sphaeroides* の初期活性（恐らく残存酸産生菌の活性も）は低いが、3日後では照明下に培養した無酸素光合成細菌は他の菌種を圧倒しているように思われ、水素生産が対照と同様に起こる。

## (2) ベンチ規模

### a. 水素発生のための基質の生産

3. 4. 4で述べたように、各200kgの模擬市場廃棄物の試料を本年度に用いた。酸産生発酵の後に得られた溶液の分析、非発酵固形物の除去、および滅菌を表3. 4-5に示す。

この表では、前年度に生産した試料と本年最初から使用している試料についての分析も示した。

この表に示したデータは次のことを裏付けている。i) 生産された基質の組成が非常に安定していること、ii) リンや硫黄などの栄養素、ならびに金属酵素の合成に必要な微量栄養素の含量がかなり低いこと。

### b. モジュールのための接種物の生産

3. 4. 4で述べたことに従って、モジュールに必要な接種物はすべてベンチ装置で生産した。その目的は、多量の接種物を得ることと自然明暗サイクルではかなり不十分な初期細菌増殖を改善することであった（平成9年度成果報告書参照）。ベンチ装置で生産し、モジュールによる種々の実験に用いた培養物の吸光度を表3. 4-6に示す。この表は、菌増殖が炭素源の濃度と厳密に相関すること、ならびに取り込みヒドロゲナーゼ欠損突然変異株（HUPマイナス）の方が増殖度が高い傾向があることを示している（本年度のSIM研究活動報告参照）。

## (3) モジュール装置

基質の濃度を上げることによって水素容量生産率を改善するための最初の試み（試験番号21）の結果を表3. 4-7に示す。この表は、10日目に最大水素生産に達したことを示している(0.29L H<sub>2</sub>/(L·d))。しかし、この値は、前年度に認められたものと比較してかなり劣る。また、乳酸から揮発性脂肪酸への変換率も高い。これらのことはすべて、5日目に起こった好ましくない気象条件に起因する。実際、暗条件での*R. sphaeroides*の増殖は不十分であり（平成9年度成果報告書参照）、揮発性脂肪酸が副産物として生産される<sup>10)</sup>。

光リアクタ中の細胞量を増やすために多くのことを試みたにも拘わらず（8日目と11日目の再接種）、十分な水素発生率は達成できなかった。外部汚染物または残存酸産生

菌が培養物に感染したと考えられた。

このため、基質を再滅菌し、モジュールのパイプを蒸気滅菌し、光リアクタをNaClOの2%水溶液で消毒し、初期接種物を増量した。その後に、新しい実験を行い、表3. 4-8に示す結果が得られた。

この表は、上記の操作手順の使用が水素発生のプロセスに好ましい影響を与えたことを示している。実際、8~12日目に、水素生産率が $0.23 \sim 0.39 \text{ L H}_2/(\text{L} \cdot \text{d})$ 達した。しかし、これらの値も前年の9月および11月( $0.5 \text{ L H}_2/(\text{L} \cdot \text{d})$ )に得た最大値よりは低かった。さらに、11日目頃に、培養物中にプロピオン酸と酪酸が現れ、細胞密度の低下が認められた。

これらの結果に基づいて、さらに二つの実験を計画した。いずれの場合も、培養物への光の透過度を高めるために、最初に光リアクタに加える酸濃度を $4.4 \text{ g/L}$ に下げた。細胞増殖に対する影響や乳酸から揮発性脂肪酸への変換に対する影響を調べるため、このパラメータの値を実験中に高くした。さらに、最初の実験(試験番号23)では、容量生産率を高めるために大きな径(内径 $100 \text{ mm}$ )を持つ光リアクタを用い、第2の実験(試験番号24)では、次亜塩素酸ナトリウムの代わりに化学殺菌剤(3.4.3参照)を用いた。この殺菌剤は、供給者の指示に従って10%の水溶液で用いた。

さらに、両実験で、稼働条件を容易にするため基質を非連続的に加えた。その理由は、自然の明暗サイクルでは、連続添加によって非常に安定な条件を得ることが困難だからである。

これら2つの試験の結果を表3. 4-9および表3. 4-10に示す。これらの表から下記のことを推論できる。

- ・揮発性脂肪酸(VFA)の存在は、確かに暗条件での*R. sphaeroides*の代謝に起因するものであり、汚染細菌の活性によるものではない。実際、VFAは、蒸気滅菌し直径の大きい光リアクタではより早く産生された。
- ・初期細胞濃度は非常に重要である。実際、内径 $100 \text{ mm}$ のリアクタで行った二重接種(試験23)によって細胞増殖が促進され、もっと薄い光リアクタ(試験24)で認められたものと同様の水素発生が得られた。
- ・この最後の点の結果として、試験24では細胞の活性が試験23より高かった。この最後の試験では、最も低い培地添加率で認められた平均水素比生産は $18.0 \text{ ml H}_2/(\text{gdw} \cdot \text{h})$ であり、それに対して試験23で認められた値は $11.68 \text{ ml H}_2/(\text{gdw} \cdot \text{h})$ であ

った。

- ・高濃度の基質を使用しても水素容量生産率は改善しなかった。実際、総酸濃度を6.8g/lとし、さらに1日あたり基質供給量を増やすことで基質添加量を上げると、吸光度が上昇して光の透過性が低下し、揮発性脂肪酸の発生量が増加した。
- ・表面積水素生産率の観点からは、内径100mmのリアクタが優れていることは確実である。試験番号23では表面積水素生産率は7.5LH<sub>2</sub>/(m<sup>2</sup>・d)であり、試験番号24では3.4LH<sub>2</sub>/(m<sup>2</sup>・d)という低い値が得られた。

これらの所見に基づいて、実験室規模試験の結果の裏付けとなる、クローンSMV089を用いた試験を、総酸度を3.3~6g/Lとして、多量の基質を用いて行った（27%容量、試験番号25、表3.4-3参照）。

表面容量生産率を上げるための試みとして、大きな光リアクタ（内径150mm、試験番号26、表3.4-3参照）も試験した。菌の増殖を促進するため、このリアクタについては二重接種を行った。

これら2つの試験の結果を表3.4-11と表3.4-12にまとめている。この表の検討によって次のことが示される。

- ・発生した酢酸、プロピオン酸および酪酸の濃度は内径150mmのリアクタの方が高く、光の透過性が低い培地で*R. sphaeroides* の暗条件代謝が高度に起こったことを裏付けている。
- ・内径100mmの光リアクタでの平均水素容量生産率は内径150mmの光リアクタを用いた場合の約2倍であった(0.29~0.37 対 0.09~0.23LH<sub>2</sub>/(L・d))。
- ・2種の光リアクタでみられた平均細胞濃度はほぼ同じであったが(0.88対0.9gdw/L)、大きなリアクタでは2倍の基質が必要であった。
- ・水素比生産率は内径100mmの光リアクタの方が高かった(14.44対6.85ml/(gdw・L))。

この2つの実験では、水素生産率を改善するために様々な基質添加法を試験した。

表3.4-3に示したように、実験は基質の非連続的な添加によって開始し、毎朝9時に添加を行った。この条件下では非常に安定した結果が得られ、内径100mmの光リアクタでは細胞濃度の上昇が認められた（図3.4-12参照）。実験室規模での結果を裏付けるため、10日後にこの光リアクタで9時から18時までの連続添加を開始した。この連続添加によって水素生産容量が約25%減少し、その結果水素比生産率が低下した（図3.4-12参照）。このような挙動は、基質と共に連続的に供給される窒素の阻害作用

によるものであろう。このことから、朝に二段階に分けて基質を補給する、もとの非連続的な基質添加法（表3.4-3参照）を再開した。この再開によって、水素生産率は、図3.4-12に示すように14日目から24日目までの期間に大きな変動を示した。特にこの期間では、基質の補給直後に水素生産の急激な停止が起こった。これによって先に述べた窒素による阻害という仮説が確認できた。以上のことから、下記の目的のために基質を夜に1日1回補給することとした。i) 夜間と早朝に細胞増殖のために窒素を消費させる。ii) 日中の豊富な太陽光下で細胞内物質を水素生産に使用させる。この方法によって図3.4-12の24日目以降に示されるような安定した水素生産が回復した。

30日目に、実験は目的を達したとして終了した。この最後の期間（9月20日前後）では、図3.4-13の内径100mmの光リアクタの写真にみられるように、培養物の活性が非常に高いように思われた。

内径100mmの光リアクタで種々の補給条件を用いて得られたものと同様の所見が、内径150mmの光リアクタでも認められた（図3.4-14参照）。特に、この図は、朝に2回という非連続的基質補給によって5日目から16日目までの期間に起こった大きな変化を示し、また、基質を夜に補給した試験16日目から試験終了までの期間に光リアクタの性能の2つの指標である水素容量生産率と水素比生産率がいずれも上昇したことを示している。モジュールを用いた最後の試験は10月14日に開始した。この試験は、内径100mmの光リアクタで、同じ気候条件下に上記の基質補給方法を用いて、ヒドロゲナーゼ欠損突然変異株（HUPマイナス、SMV089）とその非変異親株（HUPマイナス、SMV047）を比較することを目的とした（試験番号27、28、表3.4-3参照）。さらに、クローンSMV089については、試験番号26の結果を補足するために、内径150mmの光リアクタでの試験を再度行った（試験番号29、表3.4-3参照）。

これら3つの試験では劣悪な気象条件を考慮して、光の透過性を高めるために2.5g酸/Lに希釈した基質を用いた。さらに、プロピオン酸、酪酸および酢酸の発生を水素に変換するため、8日目以降には生産される水素量に応じて乳酸を添加した。

表3.4-13、3.4-14、3.4-15に示した結果は次のように要約できる。

- ・ 基質の酸濃度を低くした結果（3.4~4.4から2.5g酸/Lへ、表3.4-13、3.4-14、3.4-15を表3.4-11、3.4-12と比較）、細胞濃度が低下した（OD=1.5~1.8 対 2.5~3.1）。
- ・ 希釈接種物と希釈基質によって、この3つの培養物では細胞増殖が低下した（最大吸光度が約1.5、それに対して試験番号25、26では2.5~3）。

- ・細胞濃度が低かったため、水素容量生産率は非常に低くなった(約0.11H<sub>2</sub>/(L・d))。
- ・水素生産は装置の設置場所の影響によっても低下した。3つの光リアクタは日中長時間にわたって近所の建物の陰に入った(午後2時から3時まで)。
- ・1日1回夜の基質補給後に、水素生産量と相関して、プロピオン酸、酪酸、酢酸の濃度が非常に低い流出液が得られた(0.48/L未満、それに対して試験番号25、26では1~1.5g/L)。
- ・この最後の点の結果として、水素生産代謝は恐らく最適状態ではない。なぜなら、代謝活動が乳酸ではなく揮発性脂肪酸を消費する方向であったからである。

## a. 収率および光エネルギー利用率の計算

### ①水素生産の収率

上記の結果に基づいて、乳酸および酢酸から水素への変換収率を計算した。計算は日常的に次の式を用いて行った。

$$A=B+C+D+E \quad 1$$

ここで

A: 添加した酸に相当する水素(6mol/(mol乳酸・d)、4mol/(mol乳酸・d))

B: 発生水素量測定値(実験的、mol/d)

C: 残存基質に相当する水素(6mol/(mol乳酸・d)、4mol/(mol乳酸・d))

D: 副産物として得られた揮発性有機酸に相当する水素(4mol/(mol乳酸・d)、7mol/(molプロピオン酸・d)、10mol/(mol乳酸・d))

E: ロス(細胞による水素消失やその他のロス、mol/d)

式1から下記が得られる

$$1 = \frac{B}{E} + \frac{A - (C + D)}{E} \quad 2$$

下記のように定義すれば

$$\text{収率}(Y, \%) = \frac{B}{A - (C + D)} \text{ および } \text{ロス}(L, \%) = \frac{A - (C + D)}{E} \quad 3$$

下記が得られる

$$Y = 1 - L \quad 3$$

この式にしたがって計算した収率の値を、実施したすべての実験について表3. 4-16~24に示す。

総酸消費の観点から、これらの表を全体的に見ると下記のことが示される。

- ・ 高添加率（2.1～6.7g・総酸/(L・d)、試験21および22）では、低い総有機酸(TOA)消費率が得られた（11～30%、表3.4-15および3.4-16参照）。
- ・ 上記の添加条件によって、多量の残存乳酸、ならびに酢酸およびプロピオン酸が流出液中に存在した。
- ・ 添加率を1～2.5g酸/(L・d)に下げることによって十分な酸消費（50～60%、表3.4-18および3.4-19参照）が得られた。
- ・ この最後の添加条件は、非常に高い総酸濃度の基質によって得られる（4.5～7g TOA/L、表3.4-3参照）。
- ・ 添加率を1g TOA/(L・d)未満の値に下げることによって、非常に高い総酸消費率（60～95%、表3.4-20～24参照）を実現することができる。
- ・ 特に、基質を2.3g TOA/Lに希釈して装置への基質添加を1日1回夜に行うことで、乳酸濃度と酪酸濃度を非常に低く（0.1g/L未満）、またプロピオン酸濃度を低く（0.1～0.4g/L）抑えることができる（表3.4-13、表3.4-14、表3.4-15参照）。

収率の観点からは、下記のように要約できる。

- ・ 非常に低い変換率（6.5%未満）が試験21（表3.4-16参照、好ましくない気象条件で開始）で得られ、また、内径150mmの光リアクタ（表3.4-21）に1～1.5g TOA/(L・d)で基質を添加した場合に得られた。
- ・ 30～60%の範囲の変換率が内径45～100mmの光リアクタを用いて1～2.2g TOAの添加/(L・d)率で得られた（表3.4-17、表3.4-18、表3.4-19参照）。
- ・ より高い変換効率（70～80%の範囲）は、添加率を強く抑えることによって得られる（0.1～0.2g TOA/(L・d)、表3.4-22、表3.4-23、表3.4-24参照）。

## ②光効率

光効率の計算は、去年と同じ仮定に基づいて行った（平成9年度成果報告書参照）。特に、管状リアクタに入る光のエネルギー( $E_i$ , W/h)は下記の式に従って計算した。

$$E_i = S \cdot K_s \int_{t_0}^{t_f} I_0 dt$$

ここで、 $S(m^2)$ は光リアクタの外部表面積、 $K_s$ は光リアクタの管状形状を考慮した

係数、 $I_0$  ( $W/m^2$ ) は瞬間的太陽光照射、 $t_0$  (h) は朝の初期内部照明時間、 $t_f$  (h) は、夜の最終内部照明時間である。

前記式では、KSは前年度の測定に基づいて0.56に等しいと仮定し、光リアクタのガラス壁による光減衰は無視した。

上記の仮説に基づいて行った計算の結果を、モジュールで行った各試験について表3.4-21～24に示す（表3.4-3参照）。これらの表から下記のことを推論できる。

- ・低い光効率(0.3～0.45%)が内径45mmの光リアクタで得られた（試験番号21、22および24、表3.4-16、表3.4-17、表3.4-19参照）。
- ・より高い収率（1.3および0.5g酸/(L・d)の添加率でそれぞれ0.9および1.4%、表3.4-18および表3.4-20参照）が内径100mmの光リアクタで得られる。
- ・内径150mmの光リアクタでは、内径100mmの光リアクタで得られるものより低い平均収率が得られる（表3.4-20と表3.4-21を比較する）。
- ・改善された収率(0.75～1.1%)は、揮発性脂肪酸の形成を抑制するために内径100mmおよび150mmの光リアクタを用いて非常に低い添加率(約0.1g酸/(L・d))で半連続的添加を行えば、得ることができる（表3.4-22、表3.4-23、表3.4-24参照）。揮発性脂肪酸の形成は、主に、1年の内好ましくない期間と午後の光リアクタ周辺の影のために装置に入る光エネルギーが低いことによる。

## b. 考察

前2節で示した結果を基本的に次の目的のために整理した。

i) *R. sphaeroides* RVの性能をその取り込みヒドロゲナーゼ欠損突然変異株（HUPマイナス）の性能を比較すること、ii)最も有望な光リアクタとその稼働条件を選択すること。

最初の目的で、試験番号23および25の最初の部分（添加率1.01～1.04g酸/(L・d)）の結果を表3.4-25に要約した。

この表は、クローンSMV089の性能が親株より優れていることを示した実験室規模で得られた所見（SIM研究活動に関する本年度の報告参照）を裏付けている。この差は、主に水素比生産率および収率にみられ、それぞれ約70%および30%改善されている。しかし、自然の明暗サイクルと異なる添加条件のため、これらの改善は実験室規模で認

められたものとは異なる（SIM研究活動に関する上記の報告参照）。

光リアクタとその稼働条件を選択するため、内径45mm、100mmおよび150mmの光リアクタで0.9～1.14g酸/(L・d)の添加率で得られた結果を図3. 4-15で比較した。詳しく言えば、この図は試験番号24の最初の部分（表3. 4-10及び表3. 4-19参照）、試験25の第2の部分（表3. 4-11及び表3. 4-12参照）、および試験26（表3. 4-12及び表3. 4-11）に関するものである。

これらの表によれば、データは厳密には比較可能ではない、なぜなら、試験25および26はヒドロゲナーゼ欠損突然変異株に関するもので、試験24はその親株に関するものであり、また、修飾クローンの性能が親株で得られたものより高く（表3. 4-25参照）、図3. 4-15に示したデータの全般的傾向が保守的と考えられるからである。

上記の仮定に基づけば、図3. 4-15に提示したデータは、内径100mmの光リアクタが最も有望であり、4～5g酸/Lの基質で得られる約1g酸/(L・d)の添加率で添加することができることを示している。

### 3. 4. 6 参考文献

- 1) M. A. Rachman, et al., Hydrogen production with high yield and high evolution rate by self-flocculated cells of *Enterobacter aerogenes* in a packed-bed reactor, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49, 450-454 (1998)
- 2) S. Tanisho, et al., Continuous hydrogen production from molasses by the bacterium *Enterobacter aerogenes*, *Int. J. Hydrogen Energy*, 10, 807-812 (1994)
- 3) M. A. Rachman, et al., Enhanced hydrogen production in altered mixed acid fermentation of glucose by *Enterobacter aerogenes*, *J. Ferment. Bioeng.*, 83, 358-363 (1997)
- 4) E. D'Addario, et al., Upgrading/disposal of municipal solid waste through the production of methyl esters of volatile fatty acids, *Environmental Technology*, 16, 1115-1124 (1995)
- 5) J. C. Weissman, et al., Growth and production of thermophilic cyanobacteria in a simulated thermal mitigation process, *Bioresource Technology*, 65, 87-95 (1998)
- 6) R. Bagai, et al., Prolonged evolution of photohydrogen by intermittent

- supply of nitrogen using a combined system of *Phormidium valderianum*, *Halobacterium halobium*, and *Escherichia coli*, *Int. J. Hydrogen Energy*, 23-7, 545-550 (1998)
- 7) A. A. Tsygankov, et al., Actual and potential rates of hydrogen photoproduction by continuous culture of the purple non-sulphur bacterium *Rhodobacter capsulatus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49, 102-107 (1998)
  - 8) S. Khanna, et al., The effect of carbon dioxide on nitrogenase-related activities of *Rhodospseudomonas capsulata*, *J. Gen. Microbiol.*, 119, 281-284 (1980)
  - 9) E. Fascetti, et al., *Rhodobacter sphaeroides* RV cultivation and hydrogen production in a one- and two-stage chemostat, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 22, 300-305 (1995)
  - 10) Y. Kitajima et al., Outdoor operation of bioreactor using photosynthetic bacteria and effect of dark reaction, *Proceedings of the 12th World Hydrogen Energy Conference in Buenos Aires, Argentina on 21-26 June 1998*
  - 11) Q. Hu, et al., Ultrahigh-cell-density culture of a marine green alga *Chlorococcum littorale* in a flat-plate photobioreactor, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49, 655-662 (1998)
  - 12) J. Liessens, et al., Selective inhibitors for continuous non-axenic hydrogen production by *Rhodobacter capsulatus*, *Journal of Applied Bacteriology*, 61, 547-557 (1986)
  - 13) P. M. Vignais, et al., Hydrogenase, Nitrogenase, and Hydrogen Metabolism in the Photosynthetic Bacteria, *Advanced in Microbial Physiology*, 26, (1985)
  - 14) A. D. Eaton, et al., *Standard Methods for the Examination of water and wastewater*, 19th Edition (1995), American Public Health Association, New York

表3. 4-1 *R.sphaeroides* RVに対する競合菌に由来する  
阻害物質の試験

Testing of inhibitory products of *R. sphaeroides* RV competitors

| Test n. | <i>R. sphaeroides</i> RV competitor            | Inhibitory product     | Conc. (ppm) | Organic Acids g/l |
|---------|------------------------------------------------|------------------------|-------------|-------------------|
| 1.1.1   | Acidogenic Bacteria                            | Control                | -           | 5.4               |
| 1.1.2   |                                                | CO                     | Saturation  | 5.4               |
| 1.2.1   |                                                | Control                | -           | 10.8              |
| 1.2.2   |                                                | CO                     | Saturation  | 10.8              |
| 2.1.1   | Acidogenic Bacteria                            | Control                | -           | 5.4               |
| 2.1.2   |                                                | $\beta$ acids emulsion | 1           | 5.4               |
| 2.1.3   |                                                | $\beta$ acids emulsion | 10          | 5.4               |
| 2.1.4   |                                                | $\beta$ acids          | 100         | 5.4               |
| 2.2.1   | Acidogenic Bacteria                            | Control                | -           | 5.4               |
| 2.2.2   |                                                | Raw $\beta$ acids      | 0.5         | 5.4               |
| 2.2.3   |                                                | Raw $\beta$ acids      | 5.0         | 5.4               |
| 2.2.4   |                                                | Raw $\beta$ acids      | 50.0        | 5.4               |
| 3.1     |                                                | Control                | -           | 3.4               |
| 3.2     |                                                | $\beta$ acids emulsion | 50          | 3.4               |
| 4.1.1   | Acidogenic Bacteria + <i>R.sphaeroides</i> RV  | Control                | -           | 5.4               |
| 4.1.2   |                                                | $\beta$ acids emulsion | 1           | 5.4               |
| 4.1.3   |                                                | $\beta$ acids emulsion | 10          | 5.4               |
| 4.1.4   |                                                | $\beta$ acids emulsion | 100         | 5.4               |
| 4.2.1   |                                                | Control                |             | 5.4               |
| 4.2.2   |                                                | Raw $\beta$ acids      | 0.5         | 5.4               |
| 4.2.3   |                                                | Raw $\beta$ acids      | 5.0         | 5.4               |
| 4.2.4   |                                                | Raw $\beta$ acids      | 50          | 5.4               |
| 5.1     | Acidogenic Bacteria + <i>R.sphaeroides</i> RV  | Control                | -           | 2.3               |
| 5.2     |                                                | Raw $\beta$ acids      | 5           | 2.3               |
| 5.3     |                                                | Raw $\beta$ acids      | 10          | 2.3               |
|         |                                                | Raw $\beta$ acids      | 20          | 2.3               |
| 6.1     | Acidogenic Bacteria + <i>R. sphaeroides</i> RV | Control                | -           | 2.3               |
| 6.2     |                                                | CO                     | Saturation  | 2.3               |
| 6.3     |                                                | CO                     | Saturation  | 2.3               |

表 3. 4 – 2 試験した管状光リアクタの主な特徴  
**Main characteristics of the tested tubular photoreactors**

| <b>REACTOR</b>                                   | <b>A</b> | <b>B</b> | <b>C</b> |
|--------------------------------------------------|----------|----------|----------|
| Number of tubes                                  | 9        | 2        | 1        |
| Inner diameter (cm)                              | 4.52     | 10       | 15       |
| External diameter (cm)                           | 5.12     | 10.6     | 15.6     |
| Lenght (cm)                                      | 100      | 100      | 80       |
| Total external surface (m <sup>2</sup> )         | 1.44     | 0.66     | 0.39     |
| Total volume (liters)                            | 14.4     | 15.7     | 14.1     |
| Surface/volume (m <sup>2</sup> /m <sup>3</sup> ) | 99.0     | 23.6     | 27.6     |

表3. 4-3 モジュールを用いて行った主要な実験

| Test n. | Clone  | Starting | Sterilizing Agent             | Photoreactor ID, mm | Inoculum % v | Substrate                 |                           | Feeding |        |                         |                                                 |
|---------|--------|----------|-------------------------------|---------------------|--------------|---------------------------|---------------------------|---------|--------|-------------------------|-------------------------------------------------|
|         |        |          |                               |                     |              | Lactate g·l <sup>-1</sup> | Acetate g·l <sup>-1</sup> | Type    | HRT, h | Total l·d <sup>-1</sup> | Loading gAcids·l <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> |
| 21      | SMV047 | 20 March | NaClO                         | 45                  | 10% x 3      | 7.63                      | 0.8                       | C       | 30     | 3.5                     | 1.7                                             |
| 22      | SMV047 | 28 May   | NaClO                         | 45                  | 14% x 2      | 7.63                      | 0.8                       | C       | 30     | 3.5                     | 1.7                                             |
| 23      | SMV047 | 30 June  | Steam                         | 100                 | 13% x 2      | 4.05                      | 0.35                      | S       | (1)    | 3.7                     | 1.04                                            |
|         |        |          |                               |                     |              | 6.23                      | 0.54                      | S       | (1)    | 3.0                     | 1.29                                            |
|         |        |          |                               |                     |              |                           |                           |         |        | 3.7                     | 1.60                                            |
|         |        |          |                               |                     |              |                           |                           |         |        | 4.7                     | 2.03                                            |
| 24      | SMV047 | 3 July   | Germocid<br>(see Section 2.3) | 45                  | 13%          | 4.05                      | 0.35                      | S       | (1)    | 3.7                     | 1.14                                            |
|         |        |          |                               |                     |              | 6.23                      | 0.54                      | S       | (1)    | 3.0                     | 1.42                                            |
|         |        |          |                               |                     |              |                           |                           |         |        | 3.7                     | 1.75                                            |
|         |        |          |                               |                     |              |                           |                           |         |        | 4.7                     | 2.22                                            |
| 25      | SMV089 | 20 Aug   | Steam                         | 100                 | 27%          | 3.0                       | 0.36                      | S       | (1)    | 4.7                     | 1.01                                            |
|         |        |          |                               |                     |              | 3.8                       | 0.30                      | S-C     | (2)-30 | 4.2                     | 1.1                                             |
|         |        |          |                               |                     |              | 4.7                       | 0.34                      | S       | (3)    | 2.5                     | 0.8                                             |
| 26      | SMV089 | 27 Aug   | Steam                         | 150                 | 30%          | 3.8                       | 0.3                       | S       | -      | 4.2                     | 1.22                                            |
|         |        |          |                               |                     |              | 4.7                       | 0.34                      | S       | -      | 1.5-2.5                 | 0.54-0.89                                       |
| 27      | SMV047 | 12 Oct   | Steam                         | 100                 | 27% x 2      | 2.3                       | 0.20                      | S       | (3)    |                         | (4)                                             |
| 28      | SMV089 | 12 Oct   | Steam                         | 100                 | 25% x 2      | 2.3                       | 0.20                      | S       | (3)    |                         | (4)                                             |
| 29      | SMV089 | 12 Oct   | Steam                         | 150                 | 25% x 2      | 2.30                      | 0.20                      | S       | (3)    |                         | (4)                                             |

SMV047 *R. sphaeroides* RV, SMV089 hydrogenase uptake deficient mutant, C continuous, S semicontinuous, (1) Feeding performed in two steps (9.00 and 11.00 in the morning) half of total substrate per step, (2) Feeding in single step (9.00 in the morning), (3) One feeding in the evening, (4) Feeding proportional to the produced hydrogen.

表 3. 4-4 COおよびホップ抽出物の存在下の非無菌基質からの  
バイオガス発生の実験 最終 pH、酸除去および気相中 CO<sub>2</sub>

**Experiments of biogas evolution from not sterile substrates in the  
presence of CO and hop extracts. Final pH, acids removal and CO<sub>2</sub> in the  
gas phase**

| Test n. | pH  | Lactate<br>Removal, % | CO <sub>2</sub><br>% |
|---------|-----|-----------------------|----------------------|
| Control | 5.8 | --                    | --                   |
| 1.1.1   | 6.8 | --                    | 6.5                  |
| 1.2.1   | 6.4 | --                    | 7.0                  |
| Control | 6.3 | --                    | 5.8                  |
|         |     |                       |                      |
| 2.1.2   | 6.5 | 14.8                  | 59.8                 |
| 2.1.3   | 7.0 | 11.4                  | 67.1                 |
| 2.1.4   | 5.5 | 9.90                  | 25.7                 |
|         |     |                       |                      |
| 2.2.2   | 7.0 | 22.0                  | 62.3                 |
| 2.2.3   | 6.0 | 29.4                  | 62.5                 |
| 2.2.4   | 5.0 | 2.6                   | 26.1                 |
| Control | 6.5 | 28.6                  | 67.3                 |

表 3. 4 - 5 水素生産に使用する基質の分析

**Analyses of substrates used for hydrogen production**

| SAMPLE, n.                          | 1    | 2    | 3    |
|-------------------------------------|------|------|------|
| ORGANIC ACIDS, g · l <sup>-1</sup>  |      |      |      |
| Lactate                             | 49.3 | 48.0 | 50.0 |
| Acetate                             | 4.7  | 4.7  | 6.0  |
| Other Acids                         | 0.4  | 0.8  | 0.9  |
|                                     |      |      |      |
| MICROELEMENTS, mg · l <sup>-1</sup> |      |      |      |
| Barium                              | 3.0  | 3.0  | 3.4  |
| Calcium                             | 292  | 363  | 332  |
| Copper                              | <0.5 | <0.5 | <0.5 |
| Ferrum                              | 71   | 52   | 158  |
| Magnesium                           | 107  | 152  | 350  |
| Manganese                           | <0.5 | <0.5 | <0.5 |
| Molybdenum                          | 1.5  | <0.5 | 7.5  |
| Nickel                              | --   | --   | <0.5 |
| Zinc                                | 9    | 12   | 18   |
|                                     |      |      |      |
| NUTRIENTS, mg · l <sup>-1</sup>     |      |      |      |
| Total Nitrogen                      | 600  | 800  | 750  |
| Sulphur                             | 64   | 92   | 240  |
| Phosphorus                          | 88   | 188  | 360  |

1. Produced in fiscal year 97, 2. Produced in June, 3. Produced in September.

表 3. 4 - 6 ベンチ装置で生産し、モジュール光リアクタへの  
接種に用いた培養物の吸光度

**Optical density of cultures produced with the bench system and  
used to inoculate module photoreactors**

| Test <sup>(1)</sup><br>(n.) | Clone  | Substrate<br>g Acids · l <sup>-1</sup> | OD  |
|-----------------------------|--------|----------------------------------------|-----|
| 21                          | SMV047 | 8.43                                   | 4.1 |
| 22                          | SMV047 | 8.43                                   | 4.1 |
| 23                          | SMV047 | 4.40                                   | 2.1 |
| 24                          | SMV047 | 4.40                                   | 2.0 |
| 25                          | SMV089 | 3.36                                   | 3.1 |
| 26                          | SMV089 | 4.10                                   | 2.5 |
| 27                          | SMV047 | 2.5                                    | 1.5 |
| 28                          | SMV089 | 2.5                                    | 1.8 |
| 29                          | SMV089 | 2.5                                    | 1.8 |

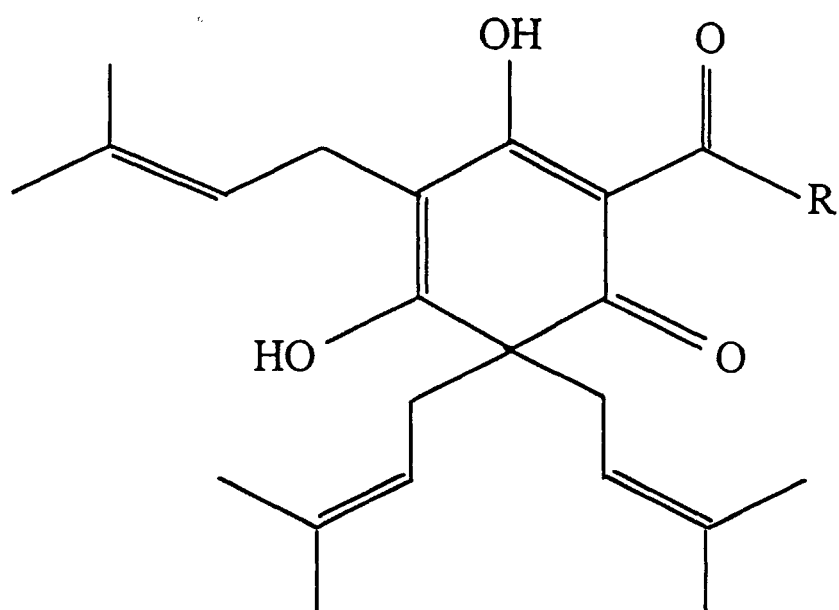
<sup>(1)</sup> See 表 3. 4 - 3

表 3. 4-25 *R. sphaeroides* RV (SMV047) とそのヒドロゲナーゼ欠損突然変異株

**Comparison between *R. sphaeroides* RV (SMV 047) and its hydrogenase deficient mutant (clone SMV 089).  
Tests 23 and 25 (see Tables 3, 9, 11, 18 and 20 loading rate 1 g acids L<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>)**

(クローン SMV 089)の比較。試験 23、25(表 3. 4-3、3. 4-9、3. 4-11、3. 4-18、3. 4-20の  
添加率 1g 酸 · L<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>の 項参照)

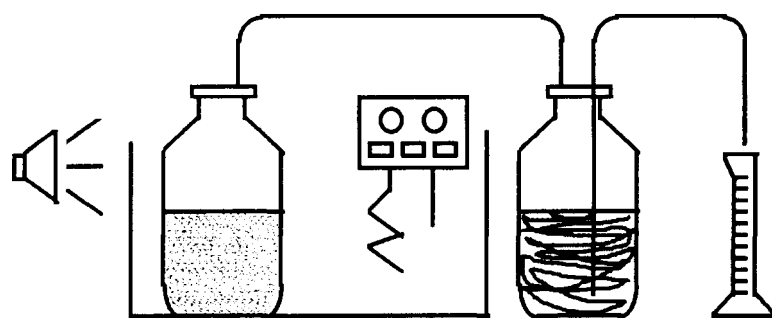
|                             | Acids in<br>g/L | Cells<br>gdw/L | H <sub>2</sub> Evolution Rate<br>LH <sub>2</sub> · L <sup>-1</sup> · d <sup>-1</sup> | H <sub>2</sub> Specific<br>Production Rate<br>ml H <sub>2</sub> · gdw <sup>-1</sup> · h <sup>-1</sup> | Yield<br>% | Light Efficiency<br>% |
|-----------------------------|-----------------|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|-----------------------|
| SMV 047 (A)                 | 4.4             | 1.03           | 0.31                                                                                 | 11.7                                                                                                  | 36.5       | 1.13                  |
| SMV 089 (B)                 | 3.4             | 0.77           | 0.37                                                                                 | 20.0                                                                                                  | 47.7       | 1.25                  |
| $(\frac{B-A}{A}) \cdot 100$ | --              | --             | 19.4                                                                                 | 70.9                                                                                                  | 30.7       | 10.6                  |



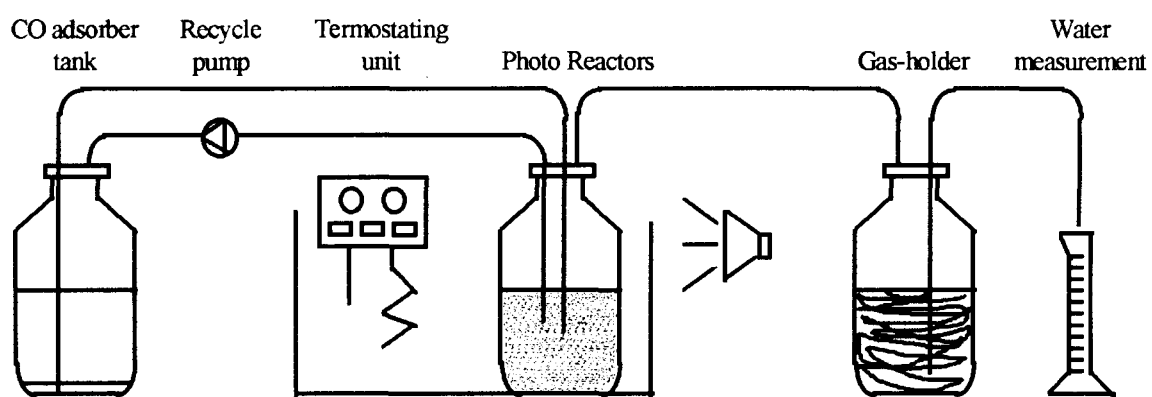
*Hop Beta Acids*

|              |                                                   | %      |
|--------------|---------------------------------------------------|--------|
| Lupulone     | $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$            | 30-55  |
| Colupulone   | $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$                       | 20-55  |
| Adlupulone   | $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$   | 5-10   |
| Prelupulone  | $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ | 1-3    |
| Postlupulone | $-\text{CH}_2\text{CH}_3$                         | Traces |

図 3. 4 - 1 ホップ  $\beta$  酸



(A)



(B)

**Laboratory systems utilized for testing inhibitory products of *R. sphaeroides* RV competitors. Testing of  $\beta$ -acids (A), testing of CO (B)**

図3. 4-2 *R. sphaeroides* RVに対する競合細菌の阻害物質の試験に  
用いた実験装置  $\beta$  酸(A)の試験、CO(B)の試験

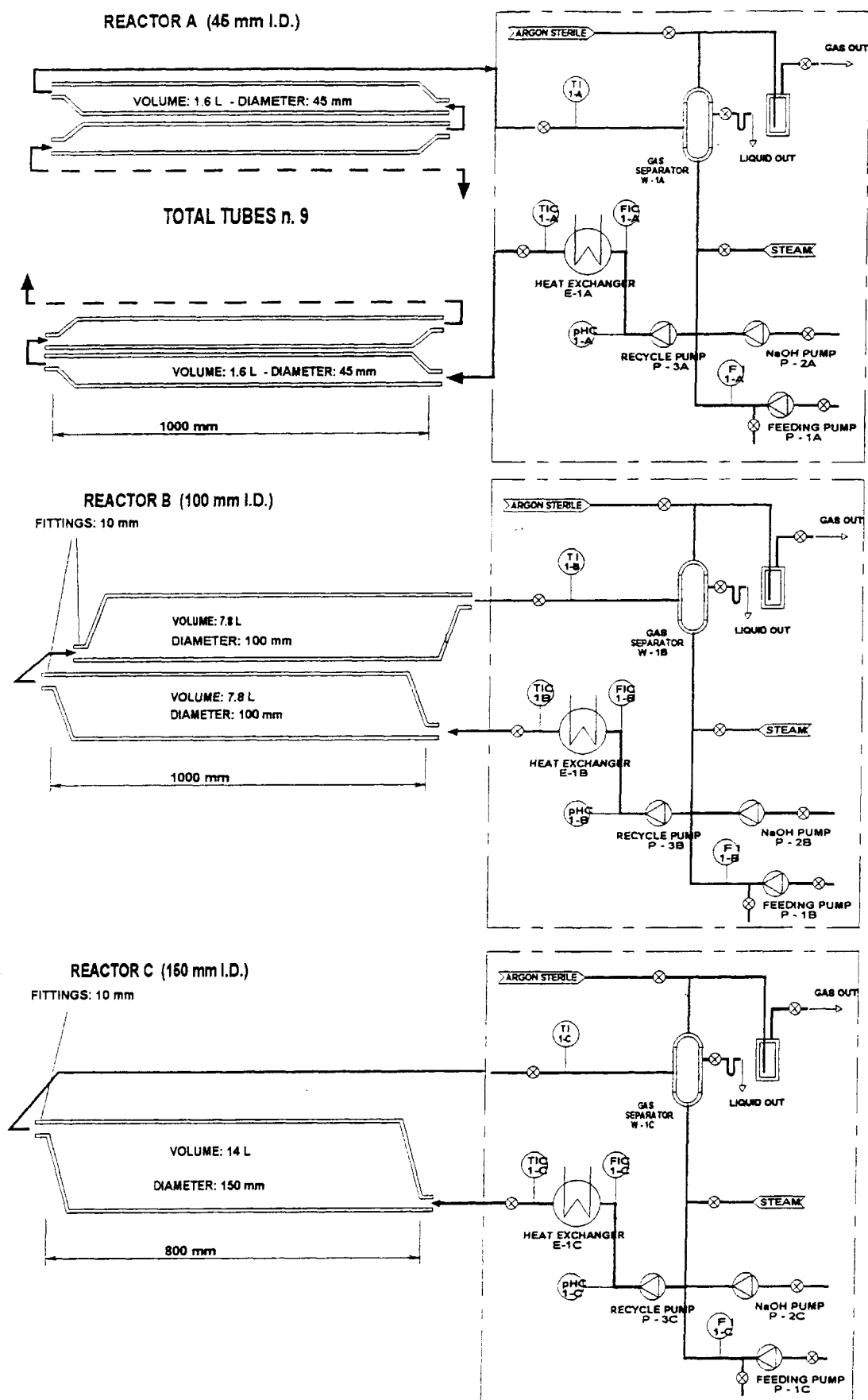


図 3. 4 - 3 45、100および150mm内径の管状リアクタを有するモジュールの模式図

## 第 4 章 副産物回収技術の研究開発

### 4. 1 副産物回収技術の基礎研究

#### 4. 1. 1 概要

本プロジェクトでは、これまで 8 年間の研究期間において、余剰菌体から回収可能な有用物質の調査を行ってきた。本年度は、バイオ水素生産システムから回収可能な有用物質とその回収可能性について調査し、研究成果の総括を行った。

#### 4. 1. 2 背景

光合成リアクタから発生する余剰菌体を有効利用し、有用物質を回収する技術の開発は、システムの付加価値を高めコスト負担を低減するなど、総合的なバイオ水素生産システムを構築する上で重要な課題である。

#### 4. 1. 3 有用副産物調査研究のまとめ

表 4. 1-1 に、下水汚泥を原料廃棄物としたバイオ水素生産システムの余剰菌体より回収可能である有用物質とその年間生産可能性についてまとめた。各有用物質の年間生産量は、年間発生汚泥量を基準として算出したものである。表 4. 1-1 に示すように、バイオ水素生産システムの余剰菌体からは、ビタミン類としてビタミン B<sub>12</sub>、ピオチン、色素類としてクロロフィル、カロチノイド、生分解性樹脂として PHB が回収可能である。これらの有用物質を効果的に回収することによりシステムの付加価値は向上し、コスト負担は低減できると考えられるが、そのためにはこれらの物質の効果的な回収及び精製方法の開発が必要である。

表 4. 1 - 1 バイオ水素システムにおける有用副産物

| 物質名               | ビタミン類                |                      | 色素類    |        | PHB   |
|-------------------|----------------------|----------------------|--------|--------|-------|
|                   | ビタミン B <sub>12</sub> | ビオチン                 | クロフィル  | カロチノイド |       |
| 生産率<br>[g/g-乾燥菌体] | $1.8 \times 10^{-5}$ | $0.6 \times 10^{-5}$ | 0.45   | 0.08   | 0.02  |
| 生産量※<br>[t/年]     | 3.4                  | 1.1                  | 86,000 | 15,000 | 3,800 |

※ 年間生産量は年間発生下水汚泥量(3.2億 t/y)を基準に算出

## 第 5 章 総合システム

### 5. 1 I H I システム

#### 5. 1. 1 概要

微生物を用いた水素製造システムにおいて、低コストおよび敷地削減を目指したシステムを構築した。原料としては糖を主成分とする飲料工場廃水を選び、中温嫌気性発酵による前処理工程、浮体式リアクタによる光合成工程、および活性汚泥法による後処理工程により、水素を発生させる。各要素の特長を記し、嫌気性前処理については代表的データを紹介し、生産物の水素については有力な用途として燃料電池を検討した。またシステムのマテリアルバランスの例、プラント設計の例などを示した。

#### 5. 1. 2 背景

##### (1) はじめに

水素製造システムは原料、製造過程、生産物という 3 要素から構成され则认为られる。以下、各々の一般事項を記し、I H I システムにおいて選定してきた内容とその理由を述べる。

##### (2) 原料

光エネルギーを用いて微生物によって製造する水素の原料（水素供与体）としては、現在、水と有機物とが挙げられている。本プロジェクトでは光合成細菌による有機物からの水素生産に焦点を当てているため、原料の検討は有機物が主対象となる。地球上の有機物は大部分、生物が生産したバイオマスであるが、これらは次の 3 種類に大別される。

- ①利用バイオマス：食料、飼料、工業原料など人類に利用されているもの
  - ②未利用バイオマス：自然界で生産され人類に利用されずに、自然の物質循環の中に戻されているもの
  - ③廃棄物：上記①で人類に利用された残査。環境汚染の原因となることが多い
- これらの原料は全体では無尽蔵に近いが、生産物である水素のコスト（数十円/㎥）

を考えると、現状で経費をかけて処分している③を、製造コストの一部を廃棄物排出者に負担してもらう形で原料に用いるのが最も現実的である。③には生ごみ、汚泥などの固形廃棄物と廃水がある。それらの中で、糖を主成分とし水素製造のための基質に適すると思われた飲料工場廃水を選抜した。

### (3) 製造過程

光合成細菌の基質は主として揮発性脂肪酸（有機酸）である。選抜された原料を光合成細菌に利用しやすい形にどう加工するか（前処理）、光合成細菌として何を用い（光合成細菌の選定）、それをいかに増殖させ供給するか（光合成細菌の増殖）、雑菌の混入をいかに防ぐか（コンタミ防止）、水素をいかに効率よく発生させるか（水素発生リアクタ）、副生成物や水素製造プロセスからの排水をいかに処理するか（後処理）等、製造過程で検討する課題は多かった。それらの課題に対し一部は既存技術が利用でき、一部は要素開発が必要であった。

I H I システムでは各々次のものを選定した。

- ①前処理：酢酸・酪酸発酵による有機酸化
- ②光合成細菌の選定：Rhodopseudomonas palustris R-1株
- ③光合成細菌の増殖：廃水を前処理した液で増殖
- ④コンタミ防止：栄養塩制限によりコンタミ菌の増殖を最小とする
- ⑤水素発生リアクタ：平板型、およびそれを水面直下に浮上させた浮体式リアクタ
- ⑥水素分離：吸収法（既存技術）
- ⑦副産物回収：余剰菌体をそのまま魚の飼料とする
- ⑧後処理：活性汚泥法（既存技術）

### (4) 生産物

主な生産物は当然水素を主成分とするガスであるが、その水素含有率がどの程度のものに用途があるかを検討した。その結果、需要が期待される生産物は次の二つとなった。

- ①水素含有率60%以上のガス：燃料電池
- ②水素含有率99%以上のガス：油脂製造など

### 5. 1. 3 システムの構成

I H I システムの構成を図 5. 1 - 1 に示す。原料の廃水は、前処理プロセスで嫌気性細菌により糖から酢酸・酪酸などへと発酵させる。前処理後の液は光合成リアクタに送られ、光合成細菌によって有機酸から水素へと変換される。光合成リアクタは 2 槽から成り、1 槽（増殖用リアクタ）では光合成細菌の増殖、もう 1 槽（水素発生用リアクタ）では水素発生を行う。前処理後の液は増殖用リアクタへまず流入し、増殖した菌体とともに水素発生用リアクタに流入する。また前処理後の液の一部は増殖用リアクタをバイパスさせて水素発生用リアクタに基質として供給してもよい。発生した水素は一旦ガスホルダに貯えられ、そのまま利用されるか、水素分離工程（吸収法）を経て利用される。光合成リアクタからの流出水は、活性汚泥法による後処理工程に入り、有機物などが浄化されて放流される。活性汚泥法からの余剰汚泥は、魚の飼料として、そのまま利用される。

なお、図 5. 1 - 1 には、実験結果から推定されるマテリアルバランスも記入した。

### 5. 1. 4 各構成要素の特長

#### (1) 原料

ここでは、飲料工場廃水を用いている。これは廃水量としては少ないが、CODの主成分が糖であり（図 5. 1-2 参照）、水素に転換しやすい。高濃度では水素発生を阻害するとされるアンモニアの濃度も低い。また、高濃度の生廃水として回収できるので、水素製造設備の集約化が比較的容易である。

#### (2) 前処理

温度 30～35℃ における酢酸・酪酸発酵を行う。自然の微生物群を用い、微生物接種や滅菌の操作を一切不要とし、コストダウンを図っている。試験結果の一例を図 5. 1 - 2 および図 5. 1 - 3 に示す。微生物菌体をウォッシュアウトさせる完全混合タイプ（リアクタ内 SS50～100mg/L）では、有機酸生成量は小さいが、有機酸のほかにも水素も発生する。微生物菌体をできるだけ槽内に保持する上昇流タイプ（リアクタ内 SS数千 mg/L）では水素発生は無いが有機酸生成量が大きい。完全混合タイプにおける水素発生は、滞留時間（HRT）が短いとリアクタ容積あたりの速度は大きく、原料あたりの速度は小さい。滞留時間を長くすると、その逆の傾向になる。pH を低め（pH5）にコントロールすることにより水素発生の持続時間を長くできる。コストに効くのは攪拌

機、ポンプとこの原料ではアルカリ（そのままではpH4以下に低下する）である。

### (3) 光合成リアクタ

光合成細菌による水素発生のためには一定以上の受光面積が必要となる。そのための敷地を広く確保するのは、我が国の国土の状況からみて困難な可能性が高い。そこで新しい敷地を生み出す手段として浮体構造物が考えられる。浮体式リアクタは比重がほぼ1であるので極端な強度を必要としない。光合成リアクタとして、浮体式リアクタを採用することにより、陸上敷地の削減、周囲の水による自然の冷却・過昇温防止、波による自然の攪拌などの効果が考えられる。

### (4) 生産物

発生した水素主成分のガスを利用するにあたり、用途に応じた分離・精製法について検討を行い、燃料電池による発電が現実的との提案を行ってきた。

燃料電池としては、都市ガス、LPG、消化ガス（メタン濃度60%以上）、バイオガス、副生水素などから水素を取り出し、利用できるようになっている<sup>1)</sup>。バイオガスを燃料とした燃料電池（リン酸型）は、平成10年6月からサッポロビールで稼働している例がある<sup>2, 3)</sup>。サッポロビール千葉工場では、工場廃水処理設備から発生するバイオガス（メタンガス）を燃料にした燃料電池の初発電に成功している。同社では、工場排水処理から発生するバイオガスの全量リサイクルを実施してきているが、今回導入したシステムはより地球環境にやさしいリサイクルエネルギー装置として位置づけられている。この燃料電池は発電量200kWで、工場の廃水処理から発生するメタンガスを燃料として、電気・熱エネルギーを得ている。発電効率40%、熱利用効率41%、総合効率81%と報告されている。大気汚染の原因となるNOx、SOxを殆ど発生させることなく、燃焼効率も高いためCO<sub>2</sub>も抑制できることになり、環境調和型システムといえるであろう。バイオガスを燃料にした燃料電池の発電は世界で初めてであり、省エネルギーや環境保全への新たなリサイクルエネルギーとして、今後国内はもとより世界でも注目されると思われる。この例では、メタンガスを改質し、水素に富んだガス（水素80%、CO<sub>2</sub> 20%）を発生させて、燃料としている。バイオ水素では、この改質工程が不要である。この燃料電池をそのまま利用すると、バイオ水素150Nm<sup>3</sup>/hrで、発電量200kW/hに相当する。

### 5. 1. 5 全体評価

以上述べたシステム構成と各要素の特長を生かして、試みに実プラントを計画した。

図5. 1-1とほぼ同等のマテリアルバランスでフローと機器仕様を試設計したものを図5. 1-4に示す。

とくに光合成リアクタの姿を図5. 1-5に示した。これは、約2,000m<sup>3</sup>/dという水素発生量に対して、少なくとも200,000m<sup>2</sup>という敷地が必要となるので効率が悪いようであるが、未利用の海上を利用することができるという利点がある。ただし、海上へのリアクタ設置は、台風対策（構造の強化、強風時は沈水させる、破損しても安価に交換できる構造にする等）、係留、外面付着生物の清掃作業の必要性があり、課題も残っている。しかし、周囲の水でリアクタの過昇温が十分防止できること、強度も実証されたこと、滅菌操作なしで数週間の水素発生を確認できたことなど、機能が実証された点は、次のステップにすすむ下地となる。

本システムは現状ではイニシャルコスト面で実用には苦しいが、将来の自然や社会の状況変化により、より現実的となる可能性を期待する。

### 5. 1. 6 参考文献

- 1) 東芝ホームページ:[www.toshiba.co.jp/product/fc/pc25c.htm](http://www.toshiba.co.jp/product/fc/pc25c.htm)
- 2) 佐藤弘人:ECO INDUSTRY 3, 12 (1998)
- 3) サッポロビールホームページ:[www.sapporobeer.co.jp/sapporo\\_news/news/](http://www.sapporobeer.co.jp/sapporo_news/news/)

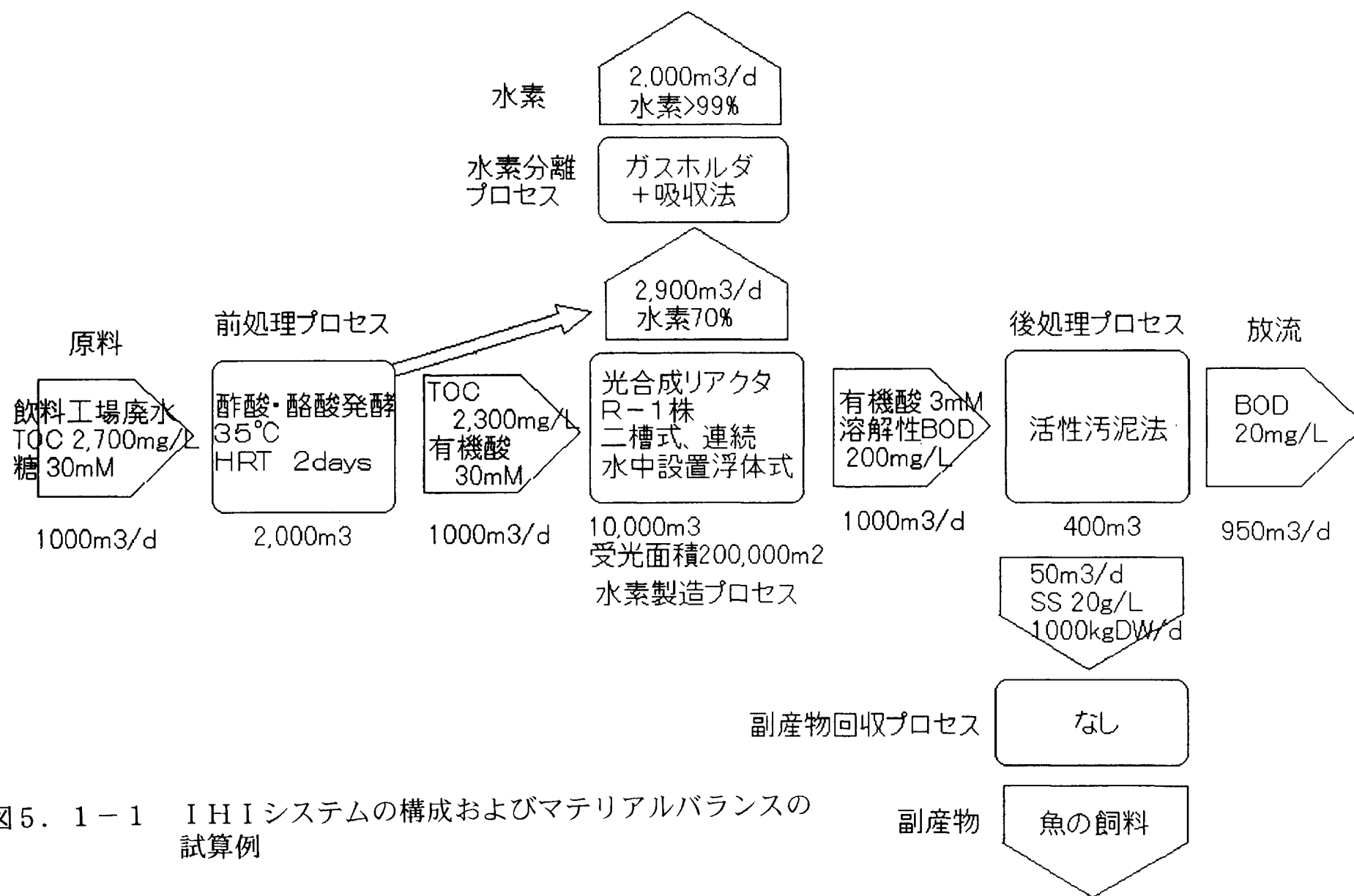
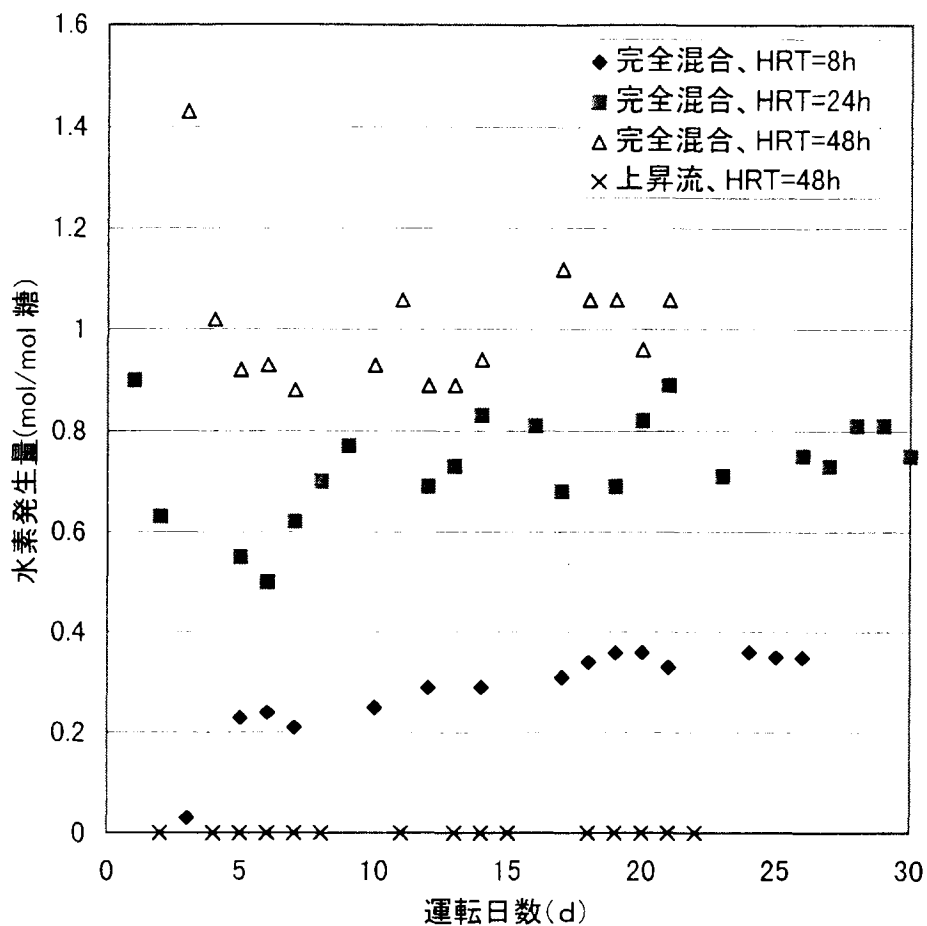


図5. 1-1 IHIシステムの構成およびマテリアルバランスの試算例



糖廃液の性状 (mg/L)

|       | 生廃水     | 希釈後   |
|-------|---------|-------|
| CODCr | 122,500 | 8,170 |
| TOC   | 50,600  | 3,370 |
| Sugar | 102,000 | 6,800 |
| T-N   | 62      | 4     |
| SS    | <10     | <10   |
| pH    | 4.4     |       |

嫌気処理後の性状 (mg/L)

|     | 完全混合  | 上昇流   |
|-----|-------|-------|
| TOC | 2,340 | 1,450 |

嫌気処理後の発酵産物 (HRT=2day)

|                                | 完全混合 | 上昇流 |
|--------------------------------|------|-----|
| Production(mmol/L-reactor/day) |      |     |
| H <sub>2</sub>                 | 20.7 | 0   |
| Formate                        | 7.9  | 0   |
| Acetate                        | 3.1  | 9.8 |
| Propionate                     | 0.2  | 0.8 |
| n-Butyrate                     | 2.8  | 5.4 |

原料は糖を主成分とするTOC約3000mg/Lの廃水を連続通水。処理温度は35℃、pH 4.8。リアクタ容積2L。有機酸生成の状況も記した。

図5. 1-2 嫌気性前処理の試験結果例

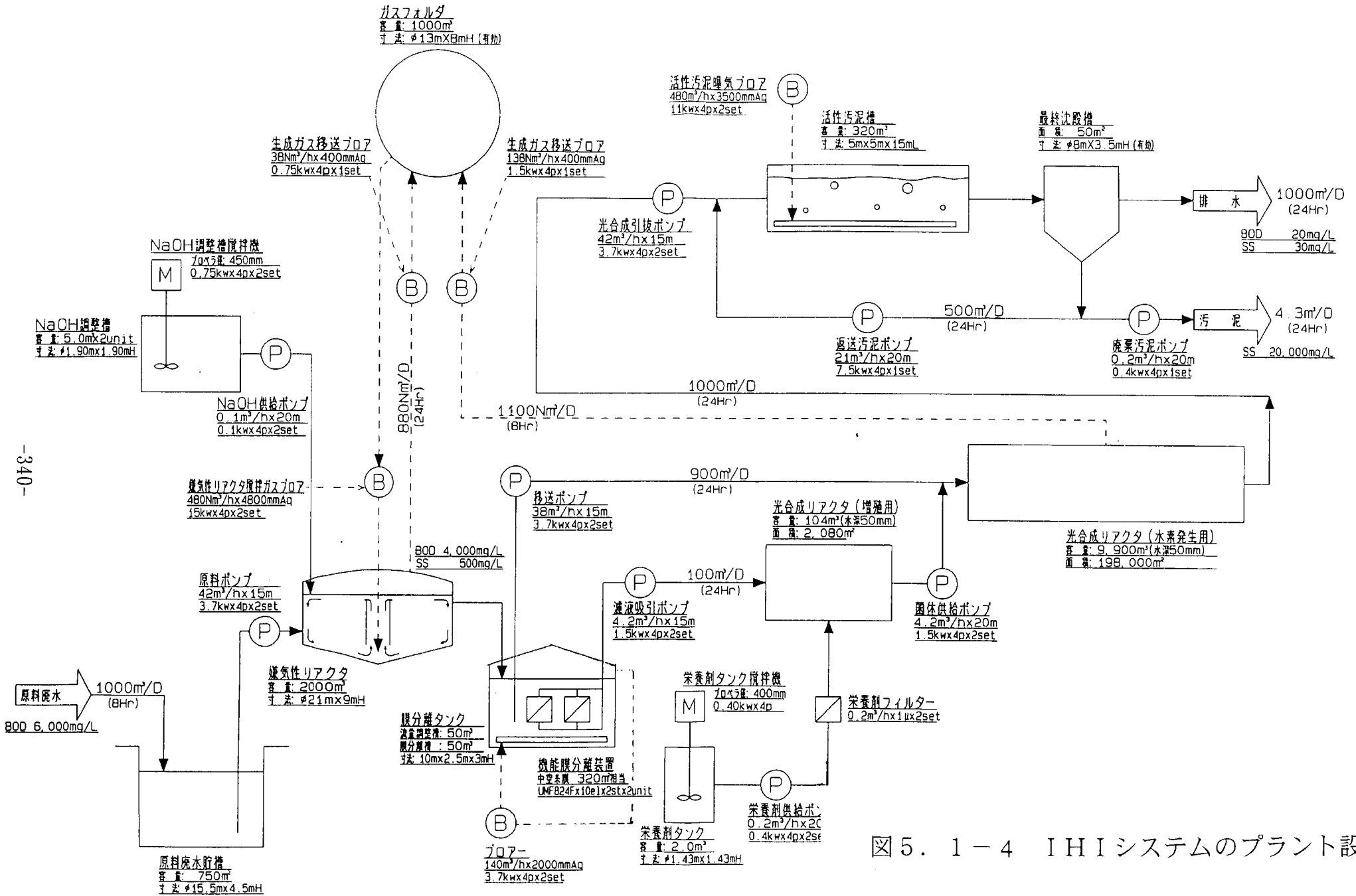
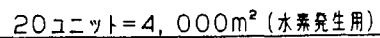
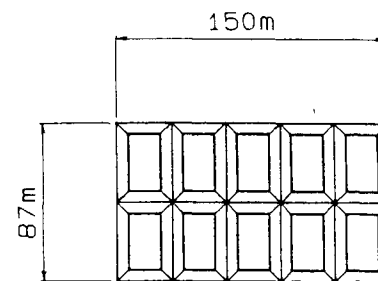


図5. 1-4 IHIシステムのプラント設計例



| MARK | PARTICULARS         | MATERIAL      | NO. REQUIRED |        | MASS (kg) |                             | REMARKS | A4 |
|------|---------------------|---------------|--------------|--------|-----------|-----------------------------|---------|----|
|      |                     |               | KIND         | SPACE  | PER DB    | TOTAL                       |         |    |
| 1    | ユニナット               | PVC, SUS, SS  | 20           | 250    | 50,000    | 1002-001D                   | A3      |    |
| 2    | チェーン #32x120m       | ① SCMn2B      | 32           | 3,080  | 98,960    | ボルト・ワッシャー<br>(黒色アノード処理メッキ材) | A2      |    |
| 3    | ニップルφ20×7 #65x43.5m | ① ナイロン        | 22           | 15     | 2,530     | ナット<br>(黒色JIS A型)           | A1      |    |
| 4    | ニップルφ20×7 #65x30m   | ① ナイロン        | 30           | 81     | 2,430     | *                           | 備考欄     |    |
| 5    | ニップルφ20×7 #65x3m    | ① ナイロン        | 32           | 13     | 416       | *                           |         |    |
| 6    | ニップルφ20×7 #65x8.6m  | ① ナイロン        | 80           | 27     | 2,160     | *                           |         |    |
| 7    | フロート CT-100K-4B     | ① ABS         | 32           | 110    | 3,520     |                             |         |    |
| 8    | アンカーブロック            | コンクリート, SS400 | 32           | 20,000 | 640,000   | 黒色コンクリート (黒色付)              |         |    |
| 9    | 鋼線リング (ワザバ)         | SUS           | 33           | 24     | 792       |                             |         |    |
| 10   | 黒色ワッシャー             | ① PE, *       | 2            | 5      | 10        | (2ヶリ/ワッシャー, 黒色付黒色付)         |         |    |

$$\begin{aligned} T.W. &= 160,418 + 640,000 \\ &= 800,418 \text{ kg} \end{aligned}$$


10ユニット=2,000m<sup>2</sup> (増殖用)

図5. 1-5 浮体式光合成リアクタの設置例

## 5. 2 鹿島システム

### 5. 2. 1 はじめに

昨年度までの成果報告書で述べた通り、鹿島システムはバッチ方式の光リアクタを中心に構成されており、有機性廃水から光合成に適した低分子量有機酸を生産する高温嫌気性前処理システム、光リアクタからの排水の後処理システムを備える。光リアクタの運転方法としてバッチ方式を採用した理由、メリット等については、平成9年度成果報告書に述べた通りである<sup>1)</sup>。

今年度は、これまでの成果をまとめ、精糖工場廃水（ステフェン廃水）を原料とする水素生産量 $1,000\text{Nm}^3/\text{日}$ 規模のバイオ水素生産プロセスを想定し、前処理プロセス、光リアクタ、廃水後処理プロセスを含む一連のシステムにおける物質収支を中心に検討した。

### 5. 2. 2 物質収支

これまでの成果に基づき、日間平均光エネルギーを $3.5\text{kWh}/(\text{m}^2 \cdot \text{日})$ とした場合の水素生成効率を用いて以下の計算を行った。なお、曇天、雨天等天候による照射光エネルギーの変化は考慮していない。

#### (1) 前提条件

表5. 2-1に、本試算で用いた条件、仮定を示す。原料は、精糖工場から排出されるステフェン廃水とし、平均的な水質を代表値として以下の計算に用いた。

#### (2) 製糖工場ステフェン廃水

今回の試算で想定した廃水は製糖工場から排出されるステフェン廃水である。ステフェン廃水の性状は表5. 2-2に示す通りであるが、着色が強くまた有機物や窒素の濃度も非常に高いため、予備実験の結果に基づき、原液を水にて20倍に希釈して前処理に供するものとする。前年度前の実廃水による実験は、全てこの20倍希釈ステフェン原液（以降、ステフェン廃水と記載する）を用いたものである。

#### (3) 前処理プロセス - 高温嫌気性酸生成法 -

鹿島システムでは、ステフェン廃水に含まれる糖類を主体とする有機物から光合成細菌による水素生成に適した低分子量有機酸を得るために、コンポストから集積した高温

嫌気性酸生成菌コンソーシアム (Thermophilic Anaerobic Acidogens) による前処理プロセスを採用した。嫌気性酸生成反応では、廃水中の有機物が低分子量有機酸に変換されると同時に若干量の水素も発生する。

前年度までの研究によれば、連続式高温嫌気性酸生成プロセスでは槽内滞留時間が0.5～3日程度の範囲では低分子量有機酸の生成効率に大きな違いは観察されず、また長期間に渡って安定した有機酸の生成が継続されることが明らかになっている<sup>2)</sup>。そこで、滞留時間が長くなれば、同量のステフェン廃水を処理するために必要な装置が大きくなること、またメタン細菌等の雑菌が増殖する可能性が高くなること等が予想されることから、滞留時間として0.5日を採用した。

表5. 2-2に、ステフェン廃水を高温嫌気性酸生成処理した後の処理液（前処理済廃水と記載する）の平均的な水質も併せて示す。なお、光リアクタには前処理済廃水をさらに10倍希釈したもの（希釈前処理済廃水と記載する）を導入することとする。これは、先述した通り前処理済廃水中の窒素濃度ならびに着色度が高く、光合成細菌への阻害やリアクタ内への光の透過性が悪化することが実験的に観察されたためである。

表5. 2-2に明らかな通り、高温嫌気性酸生成プロセスにおいて酢酸、プロピオン酸および酪酸の濃度が増大しているが、乳酸は有機物・有機酸の低分子量化が進行した結果、濃度が減少している。また、有機酸濃度が増大したためpHも低下している。本前処理プロセスで用いた酸生成細菌コンソーシアムに対する低pHの影響は明らかではないが、メタン細菌の増殖を抑制するためには、反応槽内のpHを低く保つことは一般に有効である。また、反応槽内温度を50～60℃に維持することにより、常温で運転される次段の光水素生産プロセスにおける高温酸生成細菌あるいはその他の高温微生物の増殖を最小限に抑えることも可能であると予想される。

#### (4) 光水素生産プロセス

本プロセスは、多数の透明アクリル樹脂製平板リアクタユニット（深さ1cm）を地表に並べたものを想定しているが、ここでは必要な総表面積（受光面積）ならびに総容積のみを算出した。

前年度までの報告書で述べた通り、バッチ運転における深さ1cmの平板リアクタの有効最大水素生産効率は、累積受光エネルギーが約7kWh/m<sup>2</sup>程度で達成される。従って、一日の受光エネルギーを3.5kWh/(m<sup>2</sup>・日)で一定と仮定した場合、希釈前処理済廃水のリ

アクタ内滞留必要時間は2日間である。なお、実廃水（希釈前処理済廃水）を用いた室外実験結果によると、想定条件下では薄い光リアクタが有利であることが示されている。

しかし、例えば光照射エネルギーが一定であっても、バッチ運転における水素の経時的な発生傾向は一樣ではなく1日目と2日目では大きく異なる。また、連続式である高温嫌気性酸生成プロセスとシステム運転上の整合性の問題も生じる。そこで、1日当たりの水素生産量を平滑化するように光リアクタ配置を2系列とし、系列ごとに運転操作を1日ずらした運転形態を採用する。すなわち、1日目の未明までに系列1に希釈前処理済廃水を導入し、1日目および2日目の昼間に水素を生産した後、2日目の日没から3日目の未明にかけて廃水の排出・新たな前処理済廃水の導入を行う。一方、系列2には2日目の未明までに希釈前処理済廃水を導入し2・3日目の昼間に水素を生産、3日目の日没から4日目の未明までに廃水排出、新たな希釈前処理済廃水の導入を行う体制とする。

なお、希釈前処理済廃水は50～60℃程度の高温液として排出される前処理済廃水を25～30℃程度の水で10倍希釈するため、窒素濃度および色度を適切な値に保つと同時に、Rhodobacter sphaeroides RV株の活性維持に適した30℃前後の液温に下げることができる。

これまでの実験データに基づき上記光条件における平均的な水素生産量原単位を予測し（表5.2-3）、水素日生産量1,000m<sup>3</sup>/日を達成するのに必要な希釈前処理済廃水導入量、光リアクタ総表面積（受光面積）、発生汚泥量等を算出した結果を、表5.2-4に示す。

## (5)後処理プロセス

光リアクタから排出される廃水（光リアクタ廃水と記載する）は、まだかなりの有機物ならびに光合成細菌の菌体を多量に含んでおり、さらに廃水処理を施す必要がある。ここでは、表面曝気による酸化池型の好気性廃水処理プロセスを想定し、5日間以上の滞留時間を設定する。なお、光合成細菌の菌体は有用物回収源として再利用できる可能性があるので、浸漬膜式の固液分離システムにより全量を回収するものとした。また、汚泥を回収、別途有効利用することにより、光リアクタ廃水処理プロセス（後処理プロセス）への有機物負荷はかなり軽減される。

ここでは、有用物の例としてPHBの回収可能量を算出したが、水素の生産性向上とPHBの菌体内蓄積量増大は背反するものであり、実際、水素生産性向上に適した条件で培養

したRV株中のPHB含有量はかなり少なく、実験データによれば乾燥菌体重量比で数%~10%程度であった。従って、より効率の高い光水素生産システムから回収できる余剰菌体内のPHB量は極めて少ないものと予想される。

#### (6) 総合システム

以上をまとめ一つのプロセスにおける物質収支としたものを図5. 2-1に示す。数値は、前に述べたように、水素生産量として $1,000\text{Nm}^3/\text{日}$ となるようにステフェン廃水日処理量等を逆算した結果である。

図に示すように、約 $100\text{m}^3$ のステフェン廃水を処理することによって、2日間で $1,000\text{Nm}^3$ の水素を得ることができる。水素生産量に比してステフェン廃水の必要量がかなり多いが、ステフェン廃水は実際の精糖工場から排出された直後の原廃液を20倍希釈したものであるため、ステフェン原液量としては約 $5\text{m}^3/\text{日}$ である。ステフェン原液は非常に濃厚であり、そのまま前処理システムに投入することは困難であるが、立地的に分散した排出源から有機廃水を収集する必要がある場合には、搬送面からは有利である。

ステフェン廃水 $100\text{m}^3$ を高温嫌気性酸生成前処理することにより、酸生成細菌を主体とする汚泥が $52.7\text{kg}/\text{日}$ 発生する。光リアクタでの雑菌増殖防止の観点からは、先に述べたようにこの汚泥を除去する必要は必ずしも無いものと考えられるが、後段での光透過性を阻害することが無いよう、浸漬膜にて分離し系外に排出する。また、前処理プロセスから嫌気発酵的に発生する水素ガス量は $182.2\text{Nm}^3$ であるが、二酸化炭素および窒素ガス等も混入しているため、水素濃度としては約63% (バイオガス量として $289.2\text{Nm}^3$ ) である。

前処理済廃水はさらに希釈され約 $1,000\text{m}^3/\text{日}$ の希釈前処理済廃水として光リアクタに導入されるが、光リアクタはバッチ運転であるため希釈前処理済廃水の一時貯留槽が必要となる。

与えられた光条件における水理学的滞留時間は、1cm深さの光リアクタの場合2日間である。従って、1系列当たりの光リアクタ総表面積 (受光面積) は $95,880\text{m}^2$  (9.6ha) であり、2系列からなるシステム全体では19.2haとなる。

光リアクタで発生するバイオガス中の水素濃度は98.2%と非常に高い。また、水素の生産量は $817.8\text{Nm}^3/\text{日}$  (2系列の合計生産量) である。

前処理プロセスで発生するバイオガスと合わせると、水素濃度89%のバイオガスとし

て1日当たり $1,308\text{m}^3/\text{日}$ （1気圧、 $30^\circ\text{C}$ 、水蒸気飽和ガスとして）の実発生量を得ることができる。また、光リアクタ廃水中には約 $1,600\text{kg}$ の汚泥が含まれているが、この汚泥は浸漬膜式固液分離により全量を回収し、その一部は次回のバッチ運転のための種菌として光リアクタに返送する。なお、 $1,600\text{kg}$ の汚泥に含まれるPHB量は、実験データに基づいて推定すると約 $35\text{kg}$ 程度である。

光リアクタ廃水には全有機炭素（TOC）として約 $450\text{ppm}$ （ $\text{COD}_{\text{cr}}$ で約 $1,200\text{ppm}$ に相当）程度の有機物が含まれているのでさらに処理を施す必要があるが、水理学的滞留時間5日間以上の酸化池とすると $5,000\text{m}^3$ の容積が必要となる。この時の有機物容積負荷率は $0.24\text{kg-COD}_{\text{cr}}/(\text{m}^3\cdot\text{日})$ 程度となる。

### 5. 2. 3 結論

精糖工場から排出される高有機物濃度廃水であるステフェン廃水を原料として高温嫌気性酸生成前処理システム、RV株を用いた平板型光リアクタシステムを想定し、室内・室外で実施した実験データに基づく数値を用いて全体の物質収支を検討した。現在の系では、実廃水・自然光条件下における光エネルギー・水素転換効率が高くなく、従って広大な受光面積を必要とするシステムにならざるを得ない結果となった。

しかし、今回の試算例は、現在、我々が実験を実施している系において最低限実現できるレベルの効率に基づくものであり、今後、特に微生物的な要素において大いなる改善が期待できるものである。

### 5. 2. 4 参考文献

- 1) 平成9年度環境調和型水素製造技術研究開発 成果報告書, (1998)
- 2) Yoshiyuki Ueno, et al, J. Ferment. and Bioeng., vol. 82 (2), 194-197 (1996)
- 3) Yoji Kitajima, et al, Proceedings of BioHydrogen 97, June 23-26, 1997, Hawaii, USA (in print)
- 4) Yoji Kitajima, et al, Proceedings of the 12th World Hydrogen Energy Conference, June 21-26, 1998, Buenos Aires, Argentina, vol. 3, 2025-2033 (1998)
- 5) 北島洋二他, 鹿島技術研究所年報, 46号, 193-202 (1998)
- 6~11) 平成3~8年度 環境調和型水素製造技術研究開発 成果報告書, (1992~1997)

表 5. 2 - 1 物質収支計算の前提／仮定条件

| 項 目                | 条 件                                             |
|--------------------|-------------------------------------------------|
| 原料                 |                                                 |
| 原料廃液               | 製糖工場廃液(ステフェン廃水)                                 |
| 原料処理               | ステフェン原液を20倍希釈                                   |
| 前処理(低分子量有機酸生成プロセス) |                                                 |
| 方式                 | 高温嫌気性酸発酵                                        |
| 処理温度               | 60℃                                             |
| 運転方式               | 連続式(水理学的滞留時間:0.5時間)                             |
| 前処理汚泥回収            | 浸漬膜式                                            |
| 光リアクタ(光水素生産プロセス)   |                                                 |
| 型式                 | 平板型、1cm深さ、平置き設置                                 |
| 光源                 | 太陽光                                             |
| 光条件                | 3.5 kWh/(m <sup>2</sup> ・日)、明暗周期12時間            |
| 光リアクタ温度            | 30℃                                             |
| 運転方式               | バッチ式(水理学的滞留時間:2日間)                              |
|                    | 前処理済廃水を10倍希釈して投入                                |
| 構成                 | 2系列併設                                           |
| 後処理(光リアクタ廃水処理プロセス) |                                                 |
| 光リアクタ汚泥回収          | 浸漬来膜式(一部は種菌として返送)                               |
| 方式                 | 表面曝気式酸化池                                        |
| 運転方式               | 連続式                                             |
| 水理学的滞留時間           | 5日間以上                                           |
| 有機物容積負荷率           | 0.25kg-COD <sub>Cr</sub> /(m <sup>3</sup> ・日)以下 |

表5. 2-2 ステフェン廃水の性状  
(高温嫌気性酸発酵処理前後)

| 項 目                  | 濃 度 (mg/L) |          |         |
|----------------------|------------|----------|---------|
|                      | ステフェン廃水*   | 前処理済廃水** | 光リアクタ廃水 |
| 一般水質指標               |            |          |         |
| 全有機炭素                | 16,700     | 12,000   | 453     |
| 溶解性COD <sub>Cr</sub> | 34,900     | 29,400   | 2,120   |
| 糖類                   | 10,800     | 560      | 107     |
| ケルダール窒素              | 1,680      | 1,560    | n.a.    |
| アンモニア態窒素             | 14         | 23       | n.a.    |
| 固形分                  | 20         | 550      | 1,850   |
| 有機酸                  |            |          |         |
| 酢酸                   | 1,040      | 3,390    | 0       |
| プロピオン酸               | 4          | 1,140    | 112     |
| 酪酸                   | 15         | 4,640    | 0       |
| 乳酸                   | 5,240      | trace    | trace   |

\* ステフェン原液を20倍希釈したもの

\*\* ステフェン廃水を高温嫌気性酸発酵処理したもの

(光リアクタには、さらに10倍希釈した希釈前処理済廃水を供給)

表5. 2-3 前処理プロセスおよび光リアクタにおける  
発生ガス量原単位

| 項 目               | 前処理   | (Nm <sup>3</sup> -gas/Nm <sup>3</sup> -液体) |        |
|-------------------|-------|--------------------------------------------|--------|
|                   |       | 光リアクタ                                      |        |
|                   |       | 希釈前処理液当り                                   | 前処理液当り |
| H <sub>2</sub>    | 1.90  | 0.853                                      | 8.53   |
| CO <sub>2</sub>   | 1.11  | 0.016                                      | 0.16   |
| N <sub>2</sub> 、他 | 0.001 | trace                                      | trace  |
| 水素純度*             | 63.1% | 98.2%                                      | 98.2%  |

\* 乾きガス換算で算出

表5. 2-4 必要液量およびリアクタ容積、受光面積  
(水素生産量1,000Nm<sup>3</sup>/日当り)

| 項 目           | 必要量、容積等               |
|---------------|-----------------------|
| 液 体           |                       |
| ステフェン原液       | 4.8 m <sup>3</sup>    |
| ステフェン廃液       | 95.9 m <sup>3</sup>   |
| 希釈水(1)        | 91.1 m <sup>3</sup>   |
| 希釈前処理液        | 958.8 m <sup>3</sup>  |
| 希釈水(2)        | 862.9 m <sup>3</sup>  |
| 光リアクタ廃液       | 958.8 m <sup>3</sup>  |
| 気 体           |                       |
| 水素            | 1,000 Nm <sup>3</sup> |
| バイオガス(水蒸気飽和): | 1,308 m <sup>3</sup>  |
| 水素純度          | 89 %                  |
| 固形分           |                       |
| 前処理汚泥         | 52.7 kg               |
| 光リアクタ汚泥       | 1596.3 kg             |
| (内、PHB量)      | (34.6 kg)             |
| リアクタ容積        |                       |
| 前処理**         | 47.9 m <sup>3</sup>   |
| 光リアクタ***      | 1,918 m <sup>3</sup>  |
| 後処理****       | 4,794 m <sup>3</sup>  |
| 受光面積          |                       |
| 光リアクタ*****    | 19.2 ha               |

\* 30℃、1気圧

\*\* 水理学的滞留時間:0.5日

\*\*\* 水理学的滞留時間:2.0日

\*\*\*\* 水理学的滞留時間:5.0日

\*\*\*\*\* リアクタ深さ:1cm

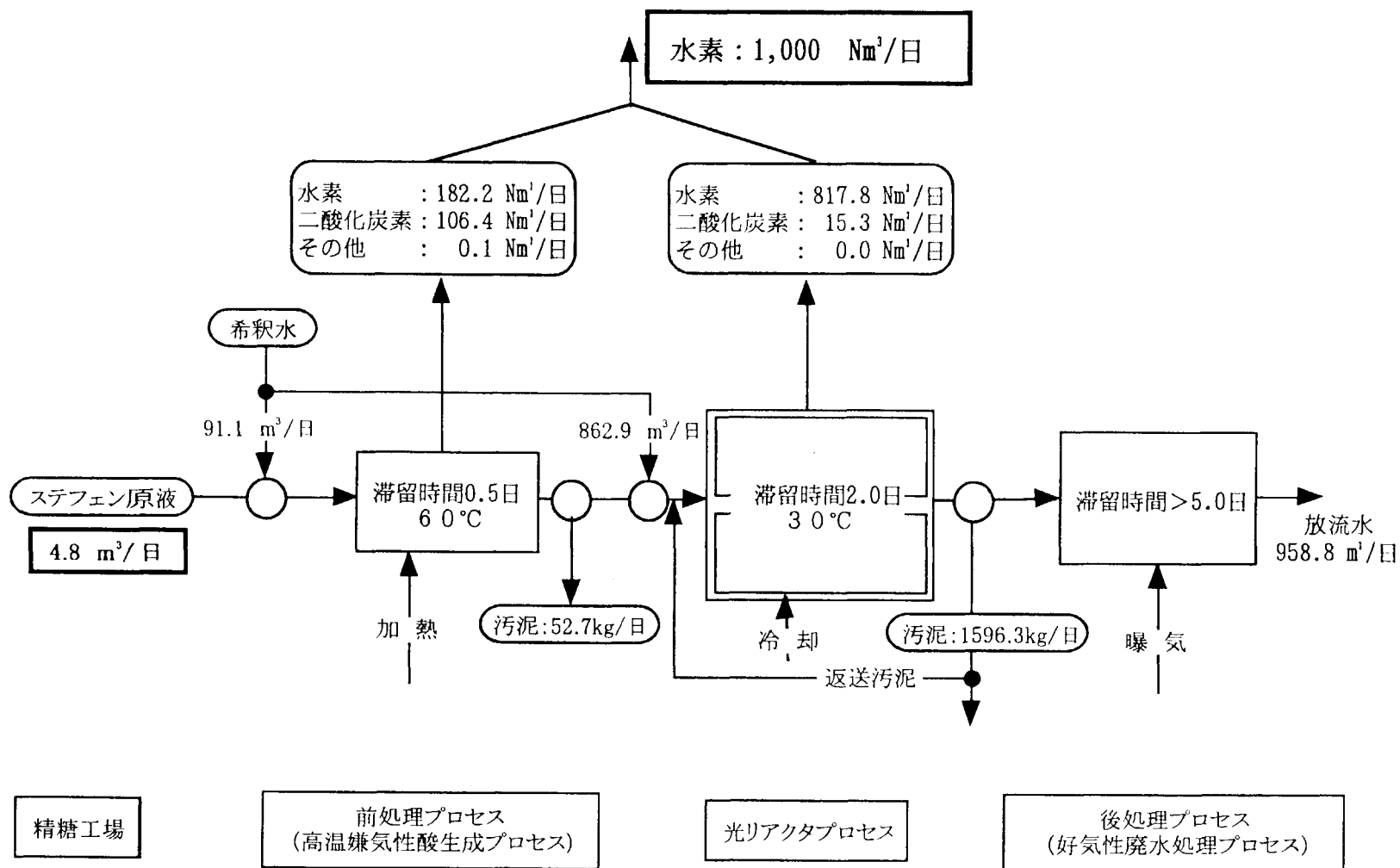


図5. 2-1 鹿島システム物質フロー図

### 5.3 クボタシステム

#### 5.3.1 概要

クボタシステムは、未利用の有機資源である下水汚泥を原料とし、太陽光と光合成細菌を利用した水素エネルギー生産システムである。本システムを従来の廃水処理に組み込むことにより、エネルギー生産を兼ね備えた廃水処理負荷低減システムの開発を目指している。

#### 5.3.2 システムの構成

クボタシステムの概念図を図5.3-1に示す。クボタ分室では、培養様式の異なる一槽式システムと二槽式システムの2つのシステムについて検討した。

##### (1) 原料廃棄物

日本には全国で約1,100以上の下水処理場が存在し、下水道普及率は年々増加している。それに伴い発生する下水汚泥量も年々増加しており、平成7年度には既に年間汚泥発生量が3.2億 $\text{m}^3$ に達している<sup>1)</sup>。これらの下水汚泥は、その殆どが埋め立て処分されており、有効利用されているのは僅かである。下水汚泥の成分はその約98%が水分であるが、残りの約2%の固形物中に約80%の有機物が含まれる。従って、年間500万t程度の有機物が未利用の有機物資源として利用可能である。本システムでは、この未利用有機物資源である下水汚泥を水素生産原料として利用する。

##### (2) 下水汚泥の調質

熱処理は下水汚泥中のタンパク物質を熱変性し、脱水性を改善する目的で開発された方法である。本システムでは、下水汚泥中の有機物を可溶化し、生物資化性有機物に変換する目的で熱処理を利用する。熱処理によって得られた脱離液（熱処理廃液）は、150℃～170℃で加圧加熱処理されているため、殺菌の効果も備えており、コンタミネーションを防止するといった微生物の基質としての優位点を有している。

しかしながら、下水汚泥の熱処理廃液は、光合成細菌の水素生産活性を阻害するアンモニアを約300～400mg/L含有している。光合成細菌は、約80mg/Lのアンモニア存在下で水素生産が完全に阻害される<sup>2)</sup>ため、熱処理廃液を水素生産システムの原料として用いるにはアンモニアの除去が不可欠である。アンモニアの除去方法としてはゼオライトを用いた吸着除去法を利用する。本処理方法により、ゼオライトのコスト及び再生液の処

理等の問題点があるが、簡便に熱処理廃液から光合成細菌の阻害濃度以下にアンモニアを除去することが出来る。

### (3) 光合成リアクタシステム

光合成細菌の水素生産システムとしては、菌体の増殖槽と水素生産槽を分離した二槽式システムが一般的である。二槽式システムの利点は、水素生産槽に外部から菌体を補給する方式をとるため、水素生産槽内において菌体の増殖を伴う必要がなく、しかも菌体のウォッシュアウトの心配がないので希釈率を最大限に設定することができ、太陽光エネルギーを有効に利用できる点にある。しかし、二槽式システムには、増殖槽と水素生産槽の2槽が必要となるため、設備や維持管理も2倍必要となる。そこでクボタ分室では、増殖と水素生産を1槽内で同時に行わせることにより、設備がより単純になり、維持管理も容易となる一槽式システムの検討を行った。その結果、C/N比と希釈率を制御することによりこのシステムが可能となった<sup>3)</sup>。但し、一槽式システムでは、同一槽内で菌体の増殖と水素生産を同時進行させるため、菌体の増殖速度が制限因子となり、ウォッシュアウトが起こることから、希釈率を二槽式システムの1/3にしか設定できなかった。

水素生産リアクタの形式は、採光装置及び伝送装置を利用した内部照射式リアクタを選定した。内部照射式リアクタは、平板式のようなリアクタ本体で直接太陽光を受ける方式と異なり、採光装置及び伝送装置を利用するため、太陽光の赤外や紫外を除いた光合成細菌にとって有効な波長のみを選択的に利用することが出来る。そのため、内部照射式リアクタには、培養液の温度上昇を防止し、冷却設備を必要としない利点がある。さらに、リアクタの形状や設置場所の制限を受けにくい特徴を有しており、地下のような直接太陽光が利用できない場所においても設置出来る利点もある。

### 5. 3. 3 システムの設備仕様

クボタ分室での研究成果に基づき、一槽式システム及び二槽式システムにおける設備仕様を検討した。

#### (1) 一槽式システム

##### a. 水素発生原単位

人工模擬廃水と平板式リアクタ（容量3L，受光面積0.06m<sup>2</sup>，アクリル製）を用いた、

屋外における一槽式システムでの連続水素生産培養試験より、

単位体積あたりの水素生産量 :  $0.148\text{Nm}^3\text{-水素}/(\text{m}^3\text{-リアクタ}\cdot\text{d})$

単位受光面積あたりの水素生産量 :  $0.0074\text{Nm}^3\text{-水素}/(\text{m}^2\text{-受光面積}\cdot\text{d})$

という結果が得られている。また、人工模擬廃水と熱処理廃液の水素生産ポテンシャルがほぼ同じであることが分かっている<sup>4)</sup>。このことから、上記の連続水素生産培養試験結果は、熱処理廃液を用いた場合にも適用できると推測される。内部照射式リアクタを用いる場合、水素生産ポテンシャルは、採光装置及び伝送装置の光伝送効率に依存する。クボタ分室でのモジュール試験に用いた採光装置及び伝送装置の光伝送効率は30%~40%程度（カタログ値）であるが、現在ではその約2倍近くの伝送効率を持つ装置も開発されつつある。従って、近い将来には光伝送効率が60%程度の装置が利用可能になると考えられる。以上のことから、一槽式システムにおける設備仕様の決定に必要である実廃水を用いた内部照射式リアクタによる連続水素生産培養での水素発生原単位を以下のように設定した。

単位体積あたりの水素生産量 :  $0.148 \times 0.6 = 0.09\text{Nm}^3\text{-水素}/(\text{m}^3\text{-リアクタ}\cdot\text{d})$

単位受光面積あたりの水素生産量 :  $0.0074 \times 0.6 = 0.0045\text{Nm}^3\text{-水素}/$   
 $(\text{m}^2\text{-受光面積}\cdot\text{d})$

#### b. 光合成リアクタの仕様

光合成リアクタの設計規模を $1,330\text{Nm}^3/\text{d}$ の水素生産量が得られる規模とすると、必要受光面積と必要リアクタ容積は、a.で求めた水素発生原単位より以下のように求められる。

必要受光面積 :  $1,330/0.0045=296,000\text{m}^2$

必要リアクタ容積 :  $1,330/0.09=14,800\text{m}^3$

上記のように必要受光面積の莫大に大きな本システムにおいて、最もコストの高いものは光伝送装置（光ファイバ）である。従って、建設コストの低減を図るには、採光装置とリアクタ本体を適切に配置し、伝送装置を必要最小限にすることが肝要となる。そこで本システムでは、図5.3-2に示すような、受光面積 $100\text{m}^2$ （ $12\text{m} \times 13\text{m}$ ）の採光装置2,960基に、培養体積 $5\text{m}^3$ の光合成リアクタを各1基ずつ配置した内部照射式リアクタユニットの形態をとる。

プロトタイプの内部照射式リアクタによる予備実験<sup>5)</sup>により、発光体（直径 $0.01\text{m}$ 、

長さ0.3m) 1本に対し、 $0.043\text{m}^2$ の採光装置の受光面積部から光エネルギーが供給された時、その有効培養体積(発光体を取り囲む円柱状)は2.15Lである。本システムでは発光体(直径0.01m, 長さ0.5m)1本あたりの受光面積を $0.086\text{m}^2$ と設定しているため、有効培養体積は4.3Lとなり、光合成リアクタ1基あたりの必要発光体本数は1,162本( $5,000\text{L}/4.3\text{L}$ )となる。また発光体は、図5. 3-3に示されるように、各発光体間の間隔がそれぞれ0.096m(有効半径0.048m)となるように配置する。

また、光合成リアクタの希釈率は、a.の人工模擬廃水を用いた屋外での連続水素生産培養試験より、昼間(12h)のみの供給で0.24/dと設定することができる。この場合、滞留時間は約8日間となり、1日あたり $1,850\text{m}^3$ の原料廃水が必要となる。

#### c. ゼオライト処理カラムの仕様

熱処理廃液中の含有アンモニア濃度を約 $350\text{mg/L}$ (約 $20\text{mM}$ )から $85\text{mg/L}$ (約 $5\text{mM}$ )以下に処理できる操作条件の検討を行った。図5. 3-4に示す予備実験結果より、ゼオライト処理カラムの処理能力は以下のように求められる。

最大処理能力  $10\text{L-廃水/kg-ゼオライト}$

処理速度  $\text{SV}=3.0/\text{h}$

これらの結果から、1日に必要な廃水量 $1,850\text{m}^3$ を処理するためのゼオライト処理カラムの大きさを算出すると以下の様になる。

$$(1,850\text{m}^3/24\text{h}) / \text{ゼオライトカラム容量} = 3.0/\text{h}$$

$$\text{ゼオライトカラム容量} = 25.5\text{m}^3 (\div 25.5\text{t})$$

また、ゼオライトの最大処理能力より、25.5tのゼオライトが処理できる廃水量は、 $255\text{m}^3$ である。従って、1日当たり $1,850\text{m}^3$ の廃水を処理するには185tのゼオライトが必要である。

#### d. 一槽式システムのプロセスフロー

図5. 3-5に一槽式バイオ水素生産システムのマテリアルフローを示す。また、図5. 3-6には、図5. 3-5のマテリアルフローと上記a,b,cの結果を基にした一槽式のバイオ水素生産総合システムのプロセスシートを示す。

## (2) 二槽式システム

### a. 水素発生原単位

屋内での同一環境下における一槽式リアクタと二槽式リアクタでの連続水素生産培養実験結果<sup>3)・6)</sup>より、二槽式リアクタでは一槽式リアクタと比べ、同じリアクタ容積から時間当たり約3倍量の水素生産が観察された。従って、二槽式システムにおける水素発生原単位は、以下のように(1)のa.に示した水素発生原単位の3倍量とする。

単位体積あたりの水素生産量 :  $0.27\text{Nm}^3\text{-水素}/(\text{m}^3\text{-リアクタ}\cdot\text{d})$

単位受光面積あたりの水素生産量 :  $0.0135\text{Nm}^3\text{-水素}/(\text{m}^2\text{-受光面積}\cdot\text{d})$

### b. 光合成リアクタの仕様

(1)のb.と同様に水素生産規模を $1,330\text{Nm}^3/\text{d}$ と設定し、a.で求めた水素発生原単位より、必要受光面積と必要リアクタ容積を以下に求めた。

必要受光面積 :  $1,330/0.0135=100,000\text{m}^2$

必要リアクタ容積 :  $1,330/0.27=5,000\text{m}^3$

ただし上記の値は、水素生産槽のみであり増殖槽は含んでいない。また、採光装置と光合成リアクタの配置と仕様及び発光体の配置と仕様は(1)のb.と同様とする。

(2)のa.の二槽式リアクタでの連続水素生産培養結果より、培地と菌体の供給割合及び希釈率はそれぞれ、培地：菌体＝3：1，希釈率＝ $1.0/\text{d}$ と設定できる。この場合、滞留時間は約2日間、1日当たりの必要廃水量は $1,875\text{m}^3$ 、必要菌体量は、 $625\text{m}^3$ となる。

### c. 増殖槽の仕様

菌体の増殖に必要な滞留時間は約6日間である。従って、水素生産槽に1日あたり $625\text{m}^3$ の菌体を供給するには、 $625\text{m}^3\times 6=3,750\text{m}^3$ の増殖槽容積が必要である。増殖槽には平板式を適用すると、厚さの制限はあるが、増殖槽1基あたりの容積を大きく設定することが可能となる。つまり、増殖槽容積を $375\text{m}^3$ （直径40m×高さ0.3m）とすると、合計10基の増殖槽が必要となる。

### d. ゼオライト処理カラムの仕様

1日当たりの必要廃水量の内、ゼオライト処理が必要となるのは水素生産槽に培地

として供給される $1,875\text{m}^3$ だけである。従って、ゼオライト処理カラムの仕様は(1)のc.と同様とする。

#### e. 二槽式システムのプロセスフロー

図5. 3-7に二槽式バイオ水素生産システムのマテリアルフローを示す。また、図5. 3-8には、図5. 3-7のマテリアルフローと上記a～dの結果を基にした二槽式のバイオ水素生産総合システムのプロセスシートを示す。

### 5. 3. 4 水素製造コストの評価

5. 3. 3の(1)のd.及び(2)のe.に示された一槽式システムと二槽式システムのプロセスフローを基に、両システムにおける水素製造コストの試算を行い、総合システムとしての評価を実施した。

#### (1)一槽式システム

表5. 3-1に、一槽式システムにおける各プロセスの仕様と設備コストについてまとめた。この表より、一槽式システムを用いて、 $1,330\text{Nm}^3/\text{d}$ の水素生産量が得られるプラントを建設した場合、その建設費は、電気計装，配管関連，工事関連の費用を含め総額約1兆360億円と試算された。この建設費の大半（約97%）は、採光装置（2,746億円）と伝送装置（7,331億円）で占められる。

次に、一槽式システムにおける総運転費を試算するため、年間動力費と年間原料費の試算を行った。表5. 3-1より、1日当たりの総消費電力は $1,600\text{kwh}$ となるため、プラントの年間稼働率を70%、電力単価を14円/kwhとした場合、年間動力費は約573万円と試算された。また年間原料費は、約3,575万円と試算され、その大半がゼオライト処理カラムの再生に必要なNaClとHClの費用である。表5. 3-2に、一槽式システムに関わる年間経費についてまとめた。尚、プラントの償却費は残存簿価を建設費の10%とし、20年償却とした。その結果、年間経費の総額は約1,140億円と試算された。また、年間総水素生産量は次の計算より求められる。

$$1,330(\text{Nm}^3/\text{d}) \times 365(\text{d}) \times 0.7 = 342,370(\text{Nm}^3/\text{y})$$

以上のことから、一槽式システムの水素製造コストは、 $333,037\text{円}/\text{Nm}^3$ と試算された。

## (2) 二槽式システム

表5. 3-3に、二槽式システムの各プロセスの仕様と設備コストについてまとめた。この表より、二槽式システムを用いて一槽式システムと同規模の $1,330\text{Nm}^3/\text{d}$ の水素生産量が得られるプラントを建設した場合、その建設費は、電気計装、配管関連、工事関連の費用を含め総額約3,520億円と試算された。この金額は、(1)で試算された一槽式システムの約3分の1である。二槽式システムでは、水素発生原単位が約3倍量になったのに伴い、必要受光面積が減少し、コストの大半を占めている採光装置と伝送装置が約3分の1になったためである。

次に、二槽式システムにおける総運転費の試算を行った。表5. 3-3より、1日当たりの総消費電力は $1,785\text{kwh}$ となるため、一槽式の時と同様に、プラント稼働率を70%、電力単価を14円/kwhとすると、年間動力費は約638万円と試算される。また同様に、年間原料費は約4,331万円と試算された。このように二槽式システムでは増殖槽の維持管理工程が加わるため、一槽式システムと比較して、動力費、原料費といった運転費が高くなる結果となった。

表5. 3-4に、二槽式システムに関わる年間経費についてまとめた。プラントの減価償却条件は一槽式と同様とした。その結果、年間経費は総額約387億円となり、年間水素生産量を一槽式と同規模とすると、二槽式システムにおける水素製造コストは $113,270\text{円}/\text{Nm}^3$ と試算された。

## (3) 水素製造コストの評価

表5. 3-5に、(1),(2)で試算した内部照射式での一槽式システムと二槽式システムの水素製造コストについてまとめた。更に比較対照として、平板式リアクタシステムでの水素製造コストの試算結果を併記した。内部照射式の水素生産システムでは、建設費の約97%を採光装置と伝送装置が占めており、その建設費が、一槽式システムで約1兆360億円、二槽式システムでも約3,519億円と非常に高額である。そのため、水素製造コストもそれに応じて $333,037\text{円}/\text{Nm}^3$ （一槽式）及び $113,270\text{円}/\text{Nm}^3$ （二槽式）と莫大に高くなる。従って、採光装置と伝送装置を利用する内部照射式水素生産システムの現時点における実用化は難しいと思われる。また、採光装置や伝送装置を用いない平板式の水素生産システムでの水素製造コストは、表5. 3-5に示されるように約 $1,152\text{円}/\text{Nm}^3$ と試算される。現在の水素製造コストが約15~40円/ $\text{Nm}^3$ であることを考慮すると、本シ

システムは、内部照射式システムを用いる場合はもちろん、採光装置及び伝送装置を用いない平板式システムにおいてさえ、コスト的に実用化の技術レベルまで達していないと考えられる。以上のことから、本システムを実用化レベルに近づけていくには、建設コスト及びランニングコストを大幅に削減した上で、更に水素生産量を大きく改善するための技術開発が必要である。その一例として、次ようなものが挙げられる。まず、水素生産量改善の大きな鍵となる光合成細菌自体の光変換効率の飛躍的な増大である。そのためには遺伝子工学的手法を用いた光合成細菌の性能改質の他に、自然界からの大規模な再探索が必要であると考ええる。そして、ランニングコストの大部分を占めるゼオライト法に代わるアンモニア除去技術の開発によるランニングコストの大幅な削減も大きな課題である。また、水素製造コスト負担の低減策の一つとして、水素以外の副生成物の回収も考える必要がある。

### 5. 3. 5 クボタシステムの環境調和性評価

CO<sub>2</sub>発生量を基準としたライフサイクルアセスメント値であるLCCO<sub>2</sub>値を用い、クボタバイオ水素生産システムの環境調和性の評価を行った。また、平板式のリアクタにおけるLCCO<sub>2</sub>値の試算を並行して行い、下水汚泥を原料とするシステムとしての評価も行った。

#### (1) 一槽式システムにおけるLCCO<sub>2</sub>値の試算

図5. 3-6のプロセスシートより、プラント建設に関わる総二酸化炭素排出量は約2億855万kg-CO<sub>2</sub>と試算される。そこで、プラントの耐用年数を20年、稼働率を70%とすると、1日当たりの二酸化炭素排出量は約4万kg-CO<sub>2</sub>となる。この約85%が採光装置と伝送装置に依存している。またプラント運転に関わる総二酸化炭素排出量は、プラント運転に必要な消費電力をもとに算出した。5. 3. 4の(1)より、1日当たりの必要消費電力量が約1,600kwhであるので、電力の二酸化炭素排出原単位を0.497kg-CO<sub>2</sub>/kwhとすると、1日当たりのプラント運転に関わる総二酸化炭素排出量は約797kg-CO<sub>2</sub>となる。LCCO<sub>2</sub>値はプラントの建設と運転に関わる総二酸化炭素排出量を総水素生産量で割ったものであるので、一槽式システムにおけるLCCO<sub>2</sub>値は、約31.2kg-CO<sub>2</sub>/m<sup>3</sup>-H<sub>2</sub>と試算された。

## (2) 二槽式システムにおけるLCCO<sub>2</sub>値の試算

図5. 3-8のプロセスシートより、一槽式システムと同様にプラント建設及び運転に関わる総二酸化炭素排出量の試算を行った。二槽式システムでは一槽式システムと比較して必要受光面積及びリアクタ容積が減少するため、プラント建設に関わる総二酸化炭素排出量も約1/3の7,200万kg-CO<sub>2</sub>に減少する。またプラント運転に関わる総二酸化炭素排出量は、増殖槽の維持管理行程が新たに加わり、1日当たりの必要総消費電力が1,785kwh(5.3.4(2)参照)に増加したため、約887kg-CO<sub>2</sub>と増加した。以上のことから、二槽式システムにおけるLCCO<sub>2</sub>値は約11.3kg-CO<sub>2</sub>/m<sup>3</sup>-H<sub>2</sub>と試算された。

## (3) 環境調和性評価のまとめ

(1)、(2)での一槽式システム及び二槽式システムにおけるLCCO<sub>2</sub>値の試算結果より、現在の技術レベルでの内部照射式リアクタを用いたバイオ水素生産システムは、LCCO<sub>2</sub>値が大きく、環境調和性に乏しいといえる。それは、水蒸気改質法でのLCCO<sub>2</sub>値が約1.0kg-CO<sub>2</sub>/m<sup>3</sup>-H<sub>2</sub>であることを考慮した場合、バイオ水素生産システムにおけるLCCO<sub>2</sub>値は少なくともこの数値を凌駕する必要があるためである。そこで、建設時に大きな環境負荷を与える採光装置及び伝送装置を用いない平板式リアクタの場合のLCCO<sub>2</sub>値の試算を行い、下水汚泥を原料とするバイオ水素生産システムの環境調和性について再検討を行った。その結果、平板式リアクタの場合のLCCO<sub>2</sub>試算値は0.94kg-CO<sub>2</sub>/m<sup>3</sup>-H<sub>2</sub>となり、水蒸気改質法よりも小さな値を示した。表5. 3-6に以上の結果をまとめた。このことから、下水汚泥を原料とするクボタシステムは、リアクタ形態の選択次第で現行法よりも環境調和性に優れたシステムになることが示された。

一方、内部照射式リアクタを用いたバイオ水素生産システムが、現行法よりも環境調和性の優れたシステムとなるには、採光・伝送装置の光伝送効率の大幅な向上などのハード面での技術革新や光合成微生物の光エネルギー変換効率の飛躍的な向上による水素生産量の増大などのソフト面での技術革新が望まれる。

## 5. 3. 6 まとめ

水素製造コスト試算及び環境調和性評価の結果より、内部照射式リアクタを用いたバイオ水素生産システムの現在の技術レベルにおける実用化は困難であると思われる。しかしながら、下水汚泥を原料とした本システムはリアクタ形態の選択次第により、現行法（水

蒸気改質法)よりも水素製造コストは依然高いものの環境調和性に優れたシステムであり、将来予想される環境保全型社会での実用化の見通しがあることを示すことができた。

また、日本全国の下水処理場より発生する総汚泥量は年間約3.2億 $\text{m}^3$ であり、それを全て水素生産原料として利用した場合、年間水素生産量は約2.3億 $\text{m}^3$ と試算される。これは、国内の水素総需要量の約2%に値し、水素供給量としては微量である。従って、本システムによる大規模なエネルギー供給は不可能であり、下水処理場を中心とした周辺地域へのエネルギー供給を目的としたローカルシステムとしての利用も困難であると思われる。つまり、本システムを下水処理場に併設した施設とした場合、生産される水素エネルギーは下水処理場内での再利用に止まることが予想される。このことから本システムは、従来の下水処理システムに併設し、下水処理エネルギーの負荷を低減できる『省エネ型下水処理システム』の一部としてのみ利用できる可能性があると考えられる。

#### 5. 3. 7 参考文献

- 1) 平成7年度版 下水道統計—行政編—, 第52号の1, (1997), 日本下水道協会
- 2) 平成5年度 環境調和型水素製造技術研究開発成果報告書 3.3.4 (2)
- 3) 平成6年度 環境調和型水素製造技術研究開発成果報告書 3.3.5 (1)
- 4) 平成6年度 環境調和型水素製造技術研究開発成果報告書 3.3.4
- 5) 平成8年度 環境調和型水素製造技術研究開発成果報告書 5.3.2 (1)
- 6) 平成6年度 環境調和型水素製造技術研究開発成果報告書 3.3.5 (2)

表5. 3-1 一槽式システムの設備仕様とコスト

|     | 装置名        | 仕様                                                                                                                  | 数量    | 価格 千円         |
|-----|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|---------------|
| 1   | 熱処理廃液貯槽    | 容量 600m <sup>3</sup> , 寸法 10.5m×10.5m×H6m                                                                           | 1     | 30,000        |
| 2   | 送液ポンプ      | 容量 80m <sup>3</sup> /h, ヘッド 30m, モータ 22kW                                                                           | 1     | 938           |
| 3   | アンモニア処理カラム | SUS 製円筒型槽, セラミック充填カラム<br>寸法 Φ1.6m×H5.0m, セラミック容積 Φ1.6m×H4.3m                                                        | 6     | 22,500        |
| 4   | 脱色処理カラム    | SUS 製円筒型槽, 活性炭充填カラム<br>寸法 Φ1.6m×H5.0m, 活性炭容積 Φ1.6m×H4.3m                                                            | 6     | 33,720        |
| 5   | PH 調整液貯槽   | 容量 5m <sup>3</sup> , 寸法 Φ1.9m×H1.9m                                                                                 | 1     | 660           |
| 6   | HCl 注入ポンプ  | 容量 0.1m <sup>3</sup> /h, ヘッド 20m, モータ 0.1kW                                                                         | 1     | 700           |
| 7   | 前処理液貯槽     | 容量 1,400m <sup>3</sup> , 寸法 14m×14m×H7.5m                                                                           | 1     | 70,000        |
| 8   | 光合成反応槽     | SUS 製円筒型槽 容量 5m <sup>3</sup> /基, 寸法 Φ3.6m×H0.7m                                                                     | 2,960 | 14,432,960    |
| 9   | 採光装置       | マルチ凹面鏡集光方式, パイレックスガラス凹面鏡<br>アルミ合金キャスト凹面鏡枠, 架台, 受光面積 296,000m <sup>2</sup>                                           | 1     | 274,620,000   |
| 10  | 伝送装置       | 光ファイバー伝送方式, コア系 Φ1.0mm 6 芯バンド型<br>ファイバーケーブル 3,409,92 本<br>棒状アクリル発光体 縦糸加工仕上げ<br>Φ10mm×0.5m×3,409,920 本, ファイバー両端接続金具付 | 1     | 733,132,800   |
| 11  | 送液ポンプ      | 容量 80m <sup>3</sup> /h, ヘッド 10m, モータ 7.5kW                                                                          | 2     | 1,876         |
| 12  | ガス貯留タンク    | 有水式, 容量 840m <sup>3</sup> , 寸法 Φ12m×H7.4m                                                                           | 1     | 117,000       |
| 13  | 反応液貯槽      | 容量 500m <sup>3</sup> , 寸法 10m×10m×H5.5m                                                                             | 1     | 25,000        |
| 14  | 送液ポンプ      | 容量 80m <sup>3</sup> /h, ヘッド 10m, モータ 7.5kW                                                                          | 2     | 1,876         |
| 15  | スクリーンプレス   | 容量 2.0t/h, モータ 5.5kW                                                                                                | 2     | 30,000        |
| 16  | 菌体移送ポンプ    | 容量 1.4m <sup>3</sup> /h, 圧力 32kgf/cm <sup>2</sup><br>ポンプ 駆動モータ 5.5kW, フィータ 駆動モータ 2.2kW                              | 1     | 10,000        |
| 17  | 菌体貯槽       | 容量 12m <sup>3</sup> , 寸法 Φ3m×H2.2m                                                                                  | 1     | 600           |
| 18  | 活性汚泥槽      | 容量 320m <sup>3</sup> , 寸法 5m×15m×H5m, セラミック散気板式                                                                     | 2     | 32,000        |
| 19  | 最終沈殿槽      | 面積 50m <sup>2</sup> , 寸法 Φ8m×H3.5m, 中央駆動懸垂型掻寄機                                                                      | 2     | 96,000        |
| 20  | 活性汚泥曝気ブロワ  | 風量 480Nm <sup>3</sup> /h, ヘッド 3,500mmAq, モータ 11kW                                                                   | 2     | 960           |
| 21  | 返送汚泥ポンプ    | 容量 21m <sup>3</sup> /h, ヘッド 20m, モータ 7.5kW                                                                          | 2     | 6,000         |
| 22  | 廃棄汚泥ポンプ    | 容量 0.2m <sup>3</sup> /h, ヘッド 20m, モータ 0.4kW                                                                         | 2     | 1,240         |
| 23  | 電気計装設備     | リアクト関係を除く装置・機器の 25%                                                                                                 |       | 3,728,507     |
| 24  | 配管関連       | リアクト関係を除く装置・機器の 15%                                                                                                 |       | 2,237,104     |
| 25  | 工事関連       | リアクト関係を除く装置・機器の 50%                                                                                                 |       | 7,457,015     |
| 合 計 |            |                                                                                                                     |       | 1,036,089,456 |

表5. 3-2 一槽式システムの年間経費

| 科目         | 金額 千円       | 備考                   |
|------------|-------------|----------------------|
| <固定費>      |             |                      |
| 償却費        | 46,624,025  | 残存簿価 10%, 20 年償却     |
| 金利         | 20,721,789  | 建設費の 2%              |
| 補修費        | 25,902,236  | 建設費の 2.5%            |
| その他 (保険など) | 20,721,789  | 建設費の 2%              |
| 一般管理費      | 2,146       | 運転費の 15%             |
| 固定費合計      | 113,971,985 |                      |
| <変動費>      |             |                      |
| 原料費        | 35,751      |                      |
| 動力費        | 5,735       | ¥14/kwh×365×0.7×消費電力 |
| 人件費        | 8,000       | 8,000 千円/年・人×1 人     |
| 諸経費        | 573         | 動力費の 10%             |
| 変動費合計      | 50,059      |                      |
| 年間経費総計     | 114,022,044 |                      |

表5. 3-3 二槽式システムの設備仕様とコスト

| 番号  | 装置名        | 仕様                                                                                                                  | 数量    | 価格 千円       |
|-----|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------------|
| 1   | 熱処理廃液貯槽    | 容量 600m <sup>3</sup> , 寸法 10.5m×10.5m×H6m                                                                           | 1     | 30,000      |
| 2   | 送液ポンプ      | 容量 80m <sup>3</sup> /h, ヘッド 30m, モータ 22kW                                                                           | 1     | 938         |
| 3   | アンモニア処理カラム | SUS 製円筒型槽, セラライト充填カラム<br>寸法 Φ1.6m×H5.0m, セラライト容積 Φ1.6m×H4.3m                                                        | 6     | 22,500      |
| 4   | 脱色処理カラム    | SUS 製円筒型槽, 活性炭充填カラム<br>寸法 Φ1.6m×H5.0m, 活性炭容積 Φ1.6m×H4.3m                                                            | 6     | 33,720      |
| 5   | PH 調整液貯槽   | 容量 5m <sup>3</sup> , 寸法 Φ1.9m×H1.9m                                                                                 | 1     | 660         |
| 6   | NaOH 注入ポンプ | 容量 0.1m <sup>3</sup> /h, ヘッド 20m モータ 0.1kW                                                                          | 1     | 700         |
| 7   | 前処理液貯槽     | 容量 1,400m <sup>3</sup> , 寸法 14m×14m×H7.5m                                                                           | 1     | 70,000      |
| 8   | 光合成反応槽     | SUS 製円筒型槽 容量 5m <sup>3</sup> /基, 寸法 Φ3.6m×H0.7m                                                                     | 1,000 | 4,876,000   |
| 9   | 採光装置       | マルチ凹面鏡集光方式, パレックスガラス凹面鏡<br>アルミ合金凹面鏡枠, 架台, 受光面積 100,000m <sup>2</sup>                                                | 1     | 92,777,000  |
| 10  | 伝送装置       | 光ファイバー伝送方式, コア系 Φ1.0mm 6 芯ハット型<br>ファイバーケーブル 1,152,000 本<br>棒状アクリル発光体 縦加工仕上げ<br>Φ10mm×0.5m×1,152,000 本, ファイバー両端接続金具付 | 1     | 247,680,000 |
| 11  | 送液ポンプ      | 容量 80m <sup>3</sup> /h, ヘッド 10m, モータ 7.5kW                                                                          | 2     | 1,876       |
| 12  | ガス貯留タンク    | 有水式, 容量 840m <sup>3</sup> , 寸法 Φ12m×H7.4m                                                                           | 1     | 117,000     |
| 13  | 反応液貯槽      | 容量 500m <sup>3</sup> , 寸法 10m×10m×H5.5m                                                                             | 1     | 25,000      |
| 14  | 送液ポンプ      | 容量 100m <sup>3</sup> /h, ヘッド 10m, モータ 7.5kW                                                                         | 2     | 1,876       |
| 15  | スクリーンプレス   | 容量 2.0t/h, モータ 5.5kW                                                                                                | 2     | 30,000      |
| 16  | 菌体移送ポンプ    | 容量 1.4m <sup>3</sup> /h, 圧力 32kgf/cm <sup>2</sup><br>ポンプ 駆動モータ 5.5kW, フィーダ 駆動モータ 2.2kW                              | 1     | 10,000      |
| 17  | 菌体貯槽       | 容量 12m <sup>3</sup> , 寸法 Φ3m×H2.2m                                                                                  | 1     | 600         |
| 18  | 活性汚泥槽      | 容量 320m <sup>3</sup> , 寸法 5m×15m×H5m, セラミック散気板式                                                                     | 2     | 32,000      |
| 19  | 最終沈殿槽      | 面積 50m <sup>2</sup> , 寸法 Φ8m×H3.5m, 中央駆動懸垂型掻き機                                                                      | 2     | 96,000      |
| 20  | 活性汚泥曝気ブロー  | 風量 480Nm <sup>3</sup> /h, ヘッド 3,500mmAq, モータ 11kW                                                                   | 2     | 960         |
| 21  | 返送汚泥ポンプ    | 容量 21m <sup>3</sup> /h, ヘッド 20m, モータ 7.5kW                                                                          | 2     | 6,000       |
| 22  | 廃棄汚泥ポンプ    | 容量 0.2m <sup>3</sup> /h, ヘッド 20m, モータ 0.4kW                                                                         | 2     | 1,240       |
| 23  | 送液ポンプ      | 容量 50m <sup>3</sup> /h, ヘッド 10m, モータ 7.5kW                                                                          | 1     | 938         |
| 24  | 増殖槽        | SUS 製円筒型槽 容量 375m <sup>3</sup> /基, 寸法 Φ40m×H0.113m                                                                  | 10    | 715,000     |
| 25  | HCl 注入ポンプ  | 容量 0.1m <sup>3</sup> /h, ヘッド 20m モータ 0.1kW                                                                          | 1     | 700         |
| 26  | PH 調整液貯槽   | 容量 5m <sup>3</sup> , 寸法 Φ1.9m×H1.9m                                                                                 | 1     | 660         |
| 23  | 電気計装設備     | リアクタ関係を除く装置・機器の 25%                                                                                                 |       | 1,518,592   |
| 24  | 配管関連       | リアクタ関係を除く装置・機器の 15%                                                                                                 |       | 911,155     |
| 25  | 工事関連       | リアクタ関係を除く装置・機器の 50%                                                                                                 |       | 3,037,184   |
| 合 計 |            |                                                                                                                     |       | 351,998,299 |

表5. 3-4 二槽式システムの年間経費

| 科目         | 金額 千円      | 備考                   |
|------------|------------|----------------------|
| <固定費>      |            |                      |
| 償却費        | 15,839,923 | 残存簿価 10%, 20 年償却     |
| 金利         | 7,039,965  | 建設費の 2%              |
| 補修費        | 8,799,957  | 建設費の 2.5%            |
| その他 (保険など) | 7,039,965  | 建設費の 2%              |
| 一般管理費      | 2,253      | 運転費の 15%             |
| 固定費合計      | 38,722,063 |                      |
| <変動費>      |            |                      |
| 原料費        | 43,312     |                      |
| 動力費        | 6,386      | ¥14/kwh×365×0.7×消費電力 |
| 人件費        | 8,000      | 8,000 千円/年・人×1 人     |
| 諸経費        | 638        | 動力費の 10%             |
| 変動費合計      | 58,336     |                      |
| 年間経費総計     | 38,780,399 |                      |

表5. 3-5 水素製造コストの比較

| 科目                            | 一槽式                              | 二槽式                          | 平板式       |
|-------------------------------|----------------------------------|------------------------------|-----------|
| 建設費<br>(採光・伝達装置)              | 1,036,089,456<br>(1,007,752,800) | 351,998,299<br>(340,457,000) | 3,114,302 |
| 原料費                           | 35,751                           | 43,312                       | 35,751    |
| 動力費                           | 5,735                            | 6,386                        | 5,735     |
| 固定費                           | 113,971,985                      | 38,722,063                   | 344,687   |
| 変動費                           | 50,059                           | 58,336                       | 50,059    |
| 年間経費総計<br>(固定費+変動費)           | 114,022,044                      | 38,780,399                   | 394,746   |
| 水素製造単価<br>(円/m <sup>3</sup> ) | 333,037                          | 113,270                      | 1,152     |

単位 [千円](水素製造単価を除く)

表5. 3-6 LCCO<sub>2</sub>値の比較

|    | バイオ水素製造法      |               |      | 水蒸気改質法 |
|----|---------------|---------------|------|--------|
|    | 一槽式<br>(内部照射) | 二槽式<br>(内部照射) | 平板式  |        |
| 建設 | 30.4          | 10.5          | 0.34 | 0.07   |
| 運転 | 0.75          | 0.82          | 0.60 | 0.99   |
| 計  | 31.2          | 11.3          | 0.94 | 1.06   |

単位 [ kg-CO<sub>2</sub>/m<sup>3</sup>-水素 ]

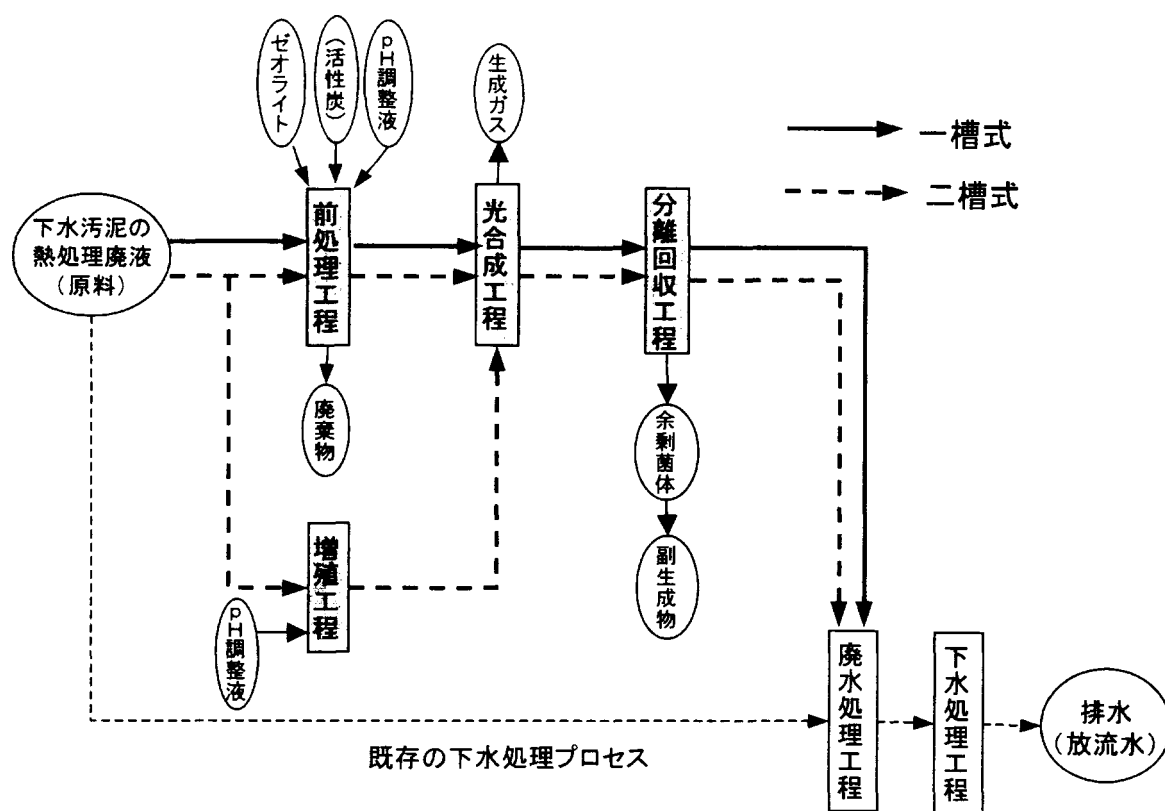


図5. 3-1 クボタシステムの概念図

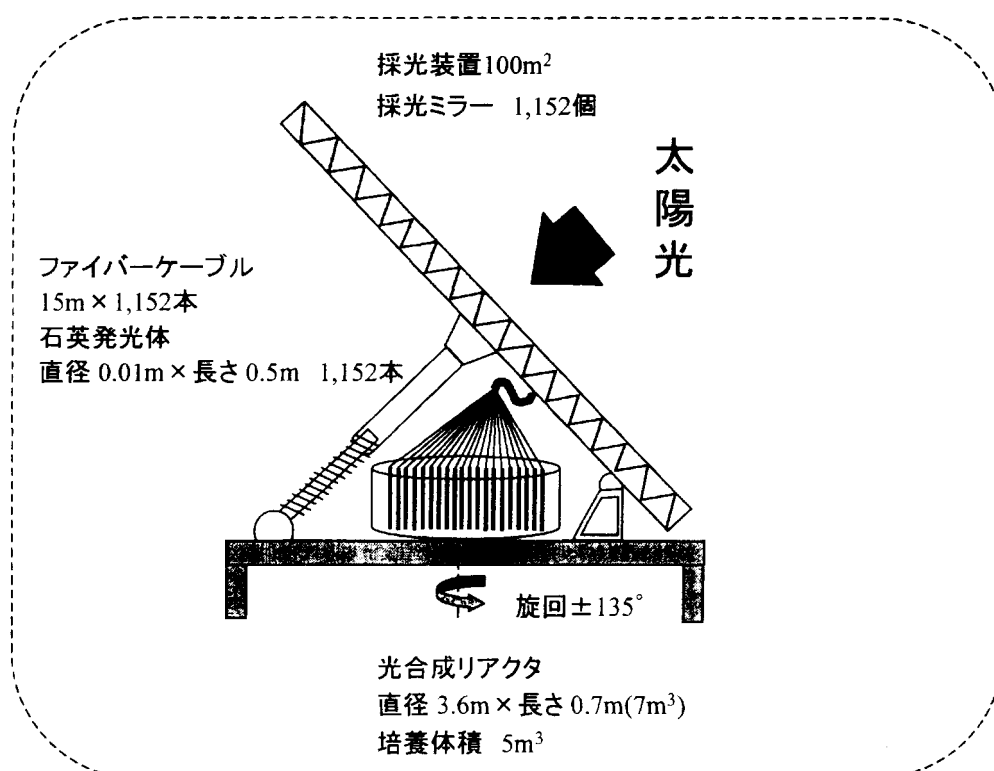


図5. 3-2 内部照射型リアクタユニットの概念図

発光体1本当たり0.086m<sup>2</sup>の  
受光面積より光が入る

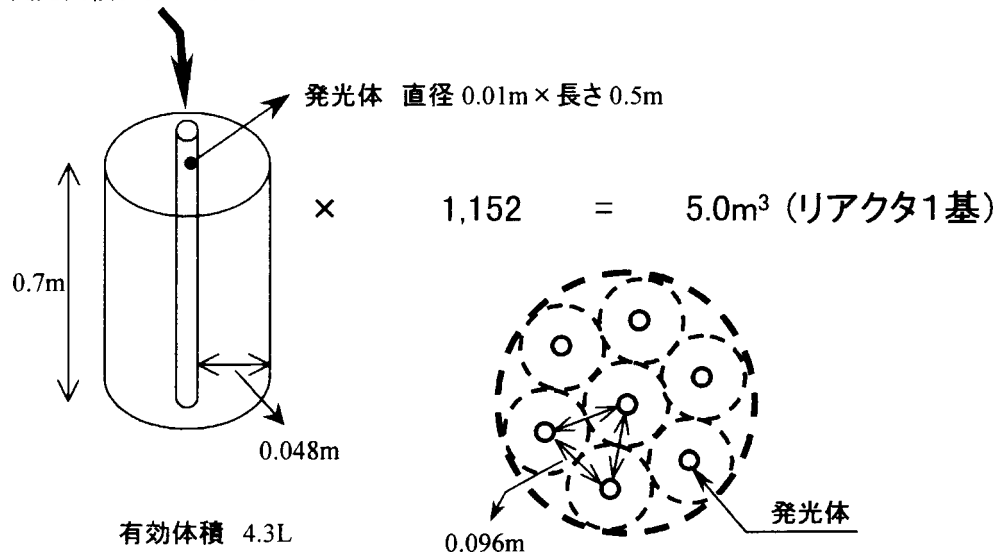


図5. 3-3 内部照射式リアクタの発光体配置設計概念図

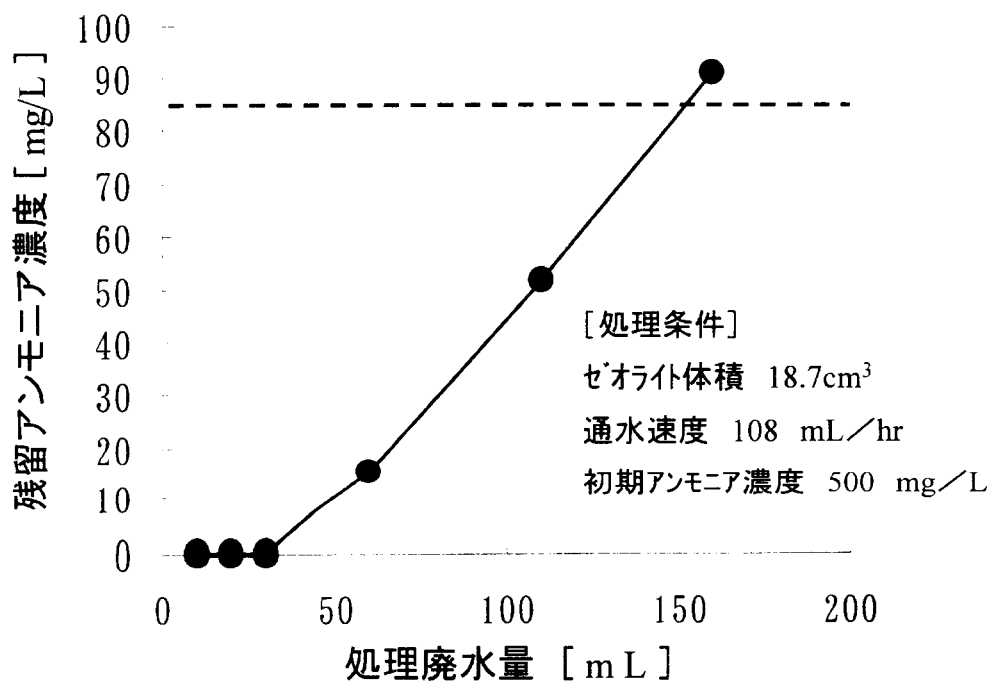


図5. 3-4 ゼオライトによるアンモニア除去条件の検討

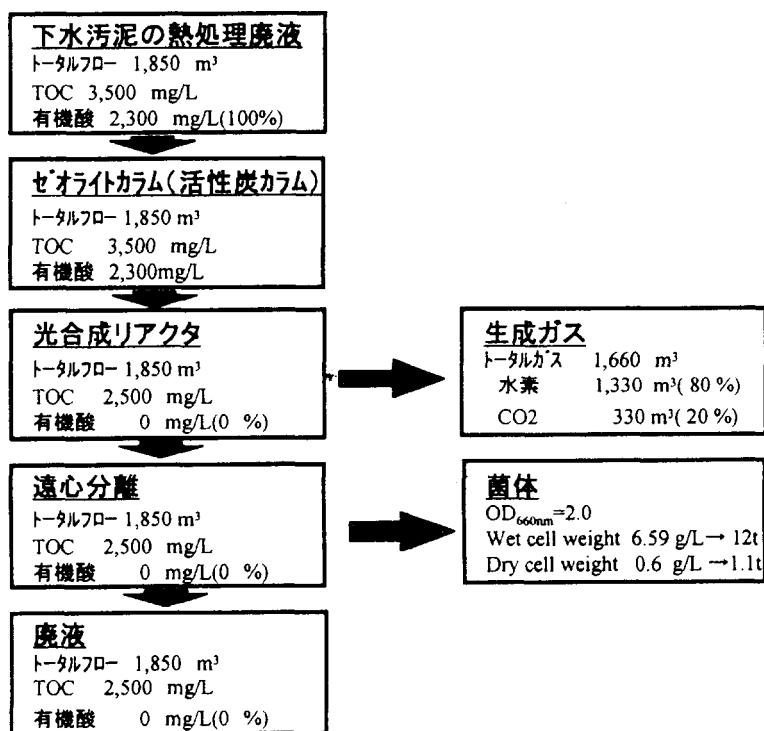
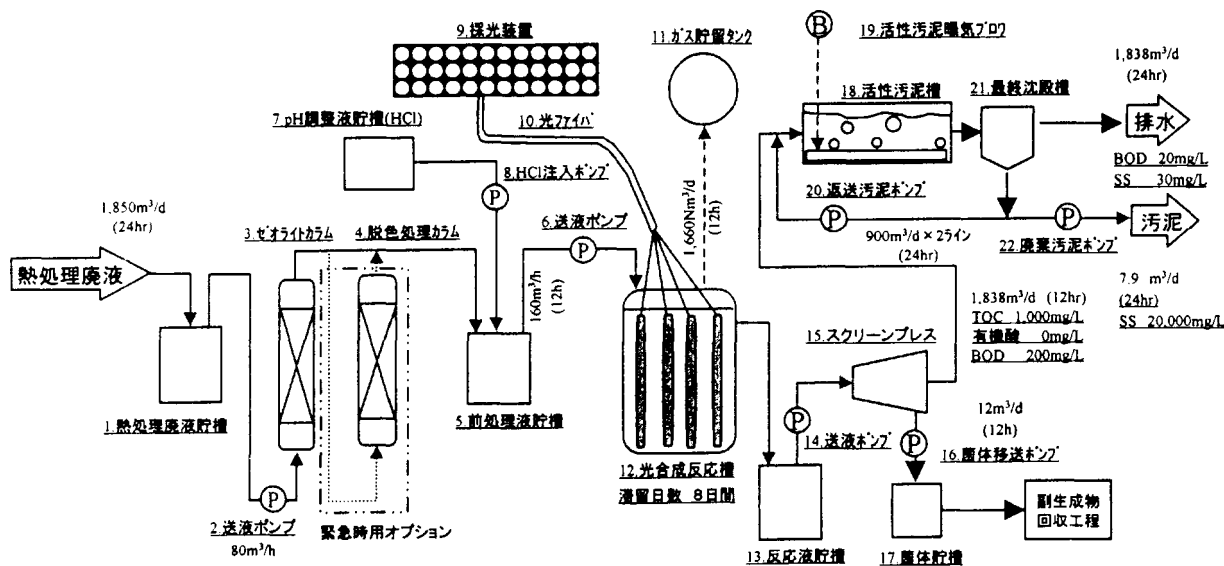


図 5. 3-5 一槽式バイオ水素生産システムのマテリアルバランス



| 1. 熱処理廃液貯槽                                                      | 2. 送液ポンプ                              | 3. ゼオライトカラム                                    | 4. 脱色処理カラム                                                       | 5. 前処理液貯槽                                | 6. 送液ポンプ                               | 7. pH調整液貯槽(HCl)                    | 8. HCl注入ポンプ                                                 |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| 600m <sup>3</sup><br>10.5×10.5×6.0H                             | 80m <sup>3</sup> /h×30m<br>22kW ×2set | 8.5m <sup>3</sup> ×6基<br>Φ1.6×5.0H             | 8.5m <sup>3</sup> ×6基<br>Φ1.6×5.0H                               | 1,400m <sup>3</sup><br>14×14×7.5H        | 80m <sup>3</sup> /h×10m<br>7.5kW ×4set | 5m <sup>3</sup> ×2set<br>Φ1.9×1.9H | 0.1m <sup>3</sup> /h×20m<br>0.1kW ×2set                     |
| 9. 採光装置                                                         | 10. 光774nm                            | 11. ガス貯留タンク                                    | 12. 光合成反応槽                                                       | 13. 反応液貯槽                                | 14. 送液ポンプ                              | 15. スクリーンプレス                       | 16. 菌体移送ポンプ                                                 |
| 凹面鏡集光方式<br>受光面 296,000m <sup>2</sup><br>12×13×1.5H<br>2,960 set | 27系 Φ1mm<br>3,409,920本                | 840Nm <sup>3</sup><br>Φ12×7.4H(有効)             | 7m <sup>3</sup> ×2,960基<br>Φ3.6×0.7H/基<br>棒状774nm発光体<br>1,162本/基 | 500m <sup>3</sup><br>10×10×5.5H          | 80m <sup>3</sup> /h×10m<br>7.5kW ×4set | 2.0t/h<br>5.5kW                    | 1.4m <sup>3</sup> /h<br>32kgf/cm <sup>2</sup><br>7.7kW×2set |
| 17. 菌体貯槽                                                        | 18. 活性汚泥槽                             | 19. 曝気プロット                                     | 20. 返送汚泥ポンプ                                                      | 21. 最終沈殿槽                                | 22. 廃棄汚泥ポンプ                            |                                    |                                                             |
| 12m <sup>3</sup><br>Φ3.0×2.2H                                   | 320m <sup>3</sup> ×2基<br>5.0×5.0×16L  | 480m <sup>3</sup> /h<br>3,500mmAq<br>11kW×3set | 21m <sup>3</sup> /h×20m<br>7.5kW×3set                            | 面積 60m <sup>2</sup> ×2基<br>Φ8.0×3.5H(有効) | 0.2m <sup>3</sup> /h×20m<br>0.4kW×3set |                                    |                                                             |

図 5. 3-6 一槽式バイオ水素生産システムのプロセスフロー

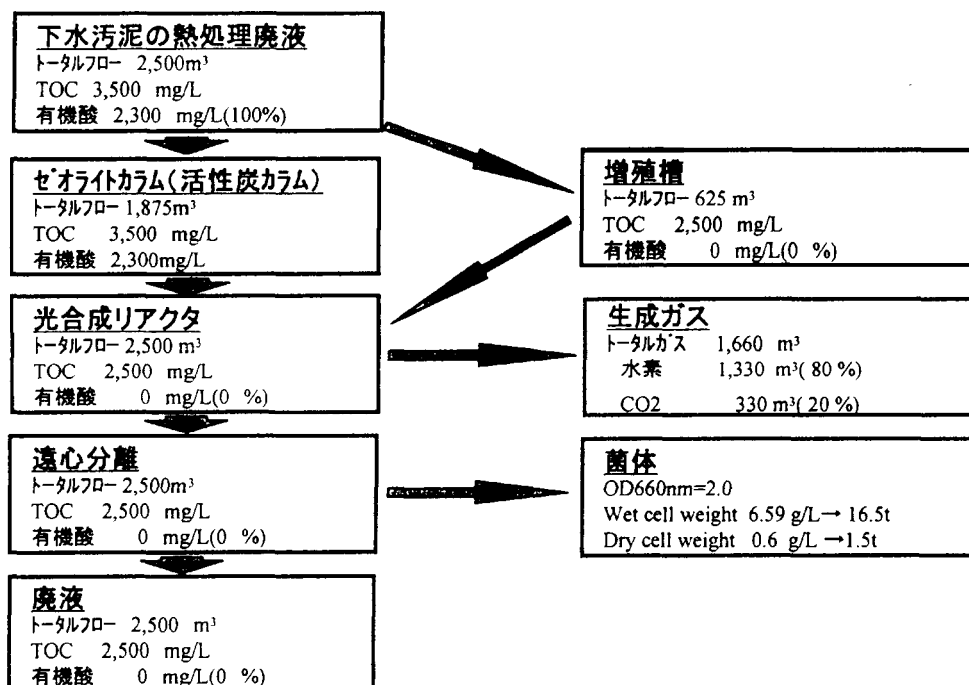
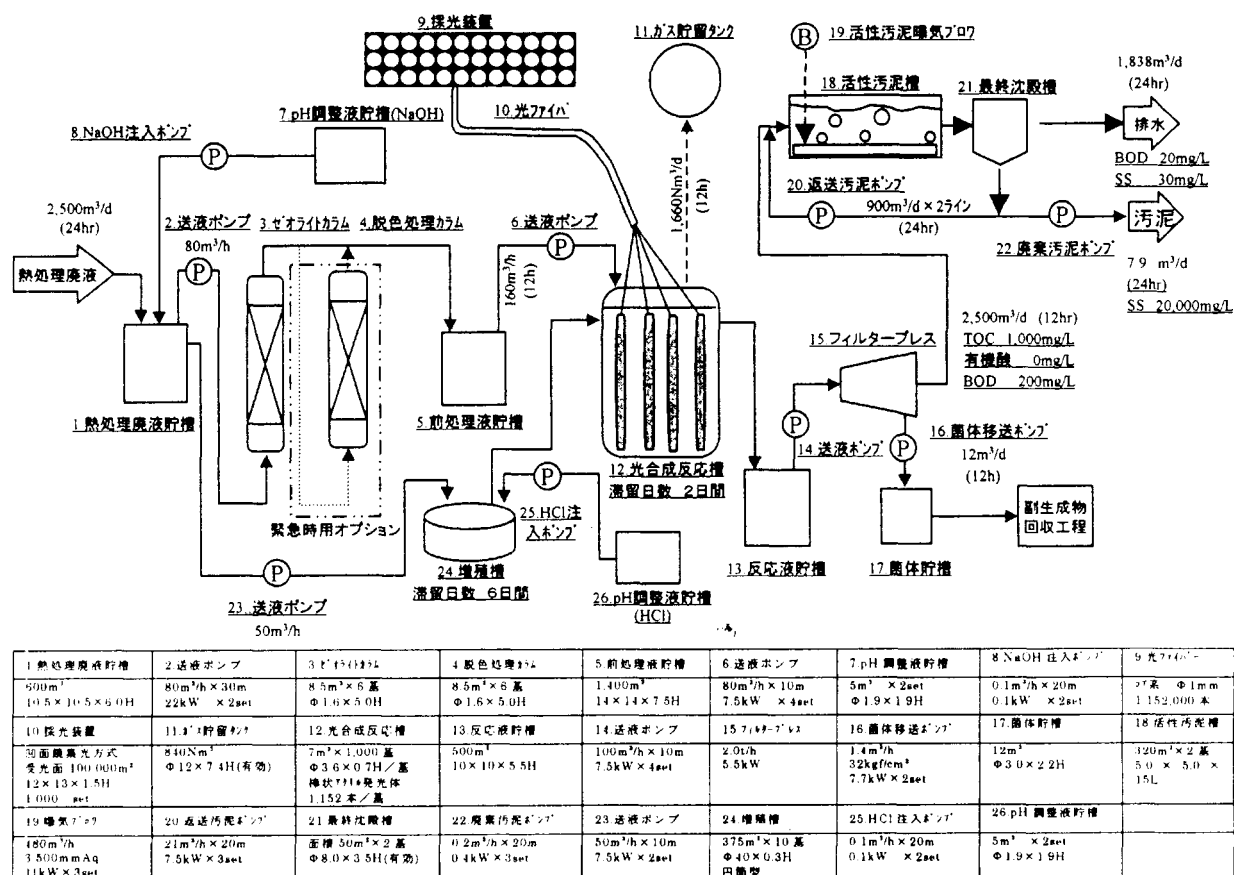


図 5. 3-7 二槽式バイオ水素生産システムのマテリアルバランス



| 1 熱処理廃液貯槽               | 2 送液ポンプ                 | 3 ゼオライトカラム            | 4 脱色処理カラム             | 5 前処理液貯槽              | 6 送液ポンプ                  | 7 pH調整液貯槽             | 8 NaOH注入ポンプ               | 9 採光装置                                             | 10 光ファイバ               | 11 ガス貯留タンク                                        | 12 光合成反応槽           | 13 反応液貯槽                  | 14 送液ポンプ        | 15 フィルタープレス                        | 16 菌体移送ポンプ          | 17 菌体貯槽                 | 18 活性汚泥槽                | 19 活性汚泥曝気プロフ            | 20 返送汚泥ポンプ               | 21 最終沈殿槽      | 22 廃棄汚泥ポンプ                | 23 送液ポンプ                 | 24 増殖槽                        | 25 HCl注入ポンプ               | 26 pH調整液貯槽            |
|-------------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------|---------------------------|----------------------------------------------------|------------------------|---------------------------------------------------|---------------------|---------------------------|-----------------|------------------------------------|---------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------------|---------------------------|-----------------------|
| 500m³<br>10.5×10.5×6.0H | 80m³/h×30m<br>22kW×2set | 8.5m³×6基<br>Φ1.0×5.0H | 8.5m³×6基<br>Φ1.6×5.0H | 1,400m³<br>14×14×7.5H | 80m³/h×10m<br>7.5kW×4set | 5m³×2set<br>Φ1.9×1.9H | 0.1m³/h×20m<br>0.1kW×2set | 75面縦置き方式<br>受光面100,000m²<br>12×13×1.5H<br>1,000set | 840Nm³<br>Φ12×7.4H(有効) | 7m³×1,000基<br>Φ3.6×0.7H/基<br>棒状PHH発光体<br>1,152本/基 | 500m³<br>10×10×5.5H | 100m³/h×10m<br>7.5kW×4set | 2.0t/h<br>5.5kW | 1.4m³/h<br>32kgf/cm²<br>7.7kW×2set | 12m³/d<br>Φ3.0×2.2H | 320m³×2基<br>5.0×5.0×15L | 320m³×2基<br>5.0×5.0×15L | 320m³×2基<br>5.0×5.0×15L | 21m³/h×20m<br>7.5kW×3set | Φ8.0×3.5H(有効) | 0.2m³/h×20m<br>0.4kW×3set | 50m³/h×10m<br>7.5kW×2set | 375m³×10基<br>Φ4.0×0.3H<br>円筒型 | 0.1m³/h×20m<br>0.1kW×2set | 5m³×2set<br>Φ1.9×1.9H |

図 5. 3-8 二槽式バイオ水素生産システムのプロセスフロー

## 5. 4 エニシステム

### 5. 4. 1 物質収支

「3. 4 生ゴミを用いる光合成細菌の大量培養技術」から、物質収支の検討に必要な下記のデータを導出できる（内径100mmの光リアクタ）。

- ・ 総酸濃度 4～5g/L
- ・ 総酸消費率 47.8%
- ・ 水素生産のモル収率 40.2%

これらのデータから、下記のことを目標として昨年度に提案した酸産生・光生物併合システム(APCS)の物質収支を図5. 4-1に示すように修正した。

- ・ 酸濃度：4g/L
- ・ 総酸消費率：60%
- ・ 水素生産のモル収率：56%

図5. 4-1に基づけば、約28LH<sub>2</sub>/kg廃棄物が生産され、実験室データから得られる45LH<sub>2</sub>/kg廃棄物という値とは異なる（前年度の物質収支参照）。これについて、以下のよう  
に考慮する。

### 5. 4. 2 大規模光リアクタ

ここでは、以前に試算した光リアクタの寸法（平成8年度に行った予備的プロセス設計参照）を、5. 4. 1で提示した物質収支とモジュール（内径100mmの光リアクタ、図3. 4-14参照）で得られた実験データに従って変更した。

以前のプロセス試験では7,500kg廃棄物/hの処理を考慮していた。したがって、図3. 4-15によれば、光リアクタに添加する液流(Q<sub>F</sub>)は下記の通りである。

$$Q_F = 0.023 \frac{m^3 \text{基質}}{kg \text{廃棄物}} \cdot 7,500 \frac{kg \text{廃棄物}}{h} \cdot 24 \frac{h}{d} = 4140 \frac{m^3}{d} \text{基質}$$

実験的水流滞留時間(HRT)<sub>exp</sub>は下記の通りである。

$$(HRT)_{exp} = \left( \frac{V}{Q} \right)_{exp} = 15.7 L \cdot \frac{1}{4.7} \cdot \frac{d}{L} = 3.3d$$

大規模光リアクタの総容積(V)<sub>LS</sub>は下記の通りである。

$$V_{LS} = Q \cdot (HRT)_{exp} = 4140 \frac{m^3}{d} \cdot 3.3d = 13.660 m^3$$

下記の主要特徴を持つ単一モジュールを含むモジュール装置を実現すると仮定すれば、  
(平成8年度のプロセス設計参照)

|               |                      |
|---------------|----------------------|
| 個々のチューブの内径    | 100mm <sup>注1)</sup> |
| モジュールあたりチューブ数 | 160                  |
| チューブの長さ       | 50m                  |
| 個々のチューブの容積    | 392.5L               |
| モジュール総容積      | 62.8m <sup>3</sup>   |
| モジュール総面積      | 2,512m <sup>2</sup>  |

注1) 平成8年度のプロセス試験では内径を0.75mmと仮定した。

必要な個々のモジュール単位の数(Nm)は下記のようになる。

$$Nm = 13660m^3 \cdot \frac{1}{62.8m^3} = 218$$

この光リアクタでは、1日容積生産率および表面積生産率(VpおよびSp)は下記の通りである。

$$Vp = 5.000 \frac{m^3 H_2}{d} \cdot \frac{1}{13700m^3} = 0.35 \frac{m^3 H_2}{m^3 \cdot d}$$

$$Sp = 5.000 \frac{m^3 H_2}{d} \cdot \frac{1}{2512} \cdot \frac{\text{モジュール}}{m^2} \cdot \frac{1}{218 \text{モジュール}} \cdot 1000 \frac{L}{m^3} = 9.1 \frac{L}{m^2 \cdot d}$$

これらのデータは、0.3LH<sub>2</sub>/(L・d)および7.2LH<sub>2</sub>/(m<sup>2</sup>・d)が得られた試験25で認められたものとよく一致する。

#### 5. 4. 3 経済的予測

「3. 4 生ゴミを用いる光合成細菌の大量培養技術」で得られたデータを用いて、平成9年度に行った経済的評価を修正した(平成8年度報告参照)。得られた結果を表5. 4-1に示す。この表では、各種選択肢の振替価格も含まれている。目標を達成するためのこれらの選択肢の調査は、既に実験室規模で予備的または徹底的に行われている。この表については、以下のことを指摘しておかなければならない。

・モジュールで得られたデータによれば、提示した水素振替価格は、現在の純ガスとし

ての水素の価格の4倍である。

- ・ 選択肢2は、実験室規模で実験したが、日光下では実験していない。
- ・ 選択肢3は、実験室規模で予備実験を行ったが（C0またはホップ抽出物を用いて）、確認が必要である。
- ・ 選択肢4は、1年を通して光リアクタを 約 $0.6 \text{ LH}_2/(\text{L}\cdot\text{d})$ の1日容積生産率および $15 \text{ LH}_2/(\text{m}^2\cdot\text{d})$ の表面積生産率で稼働することを意味する。これらの値は、モジュールで認められたもののほぼ2倍である。これらの値は培地にC0を通気すれば得られる。このC0通気によって、i)我々の研究室で予備的に確認したものと同一改善が得られた（SIM研究活動の報告参照）。<sup>1)</sup> ii)残存酸産生菌がさらに阻害される。この仮説は非常に魅力的であるが、適当な実験による確認が必要である。
- ・ いずれの場合でも、 $1,000 \text{ Lit/Nm}^3$ の目標振替価格は、遺伝的に修飾した効率の高いクローンまたは廃棄物処理からの収入の増加によって達成することができる（選択肢5参照）。

#### 5. 4. 4 結 論

本報告書で示した主要データは下記のように要約することができる。

- ・ 日光下の持続的水素発生は、内径45mm、100mmおよび150mmの光リアクタで適当な稼働条件を用いれば可能である。
- ・ この条件は、基質を1日1回夜に添加する非連続的添加に基づいており、この非連続的添加によって夜間と早朝の細胞増殖に窒素を消費させて、アンモニアに起因する抑制現象を避けることができる。
- ・ 上記の3種の光リアクタのうち、内径100mmのものを我々の研究室で得たヒドロゲナーゼ欠損突然変異株とあわせて用いれば、より有望であると思われる。
- ・ この光リアクタで、約 $1 \text{ g総酸}/(\text{L}\cdot\text{d})$ の添加率（酸濃度4~5g/L、HRT 3.3d）、約50%の総産消費率と40%のモル水素生産収率が得られた。1日容積水素生産率および表面積水素生産率は、 $0.30 \text{ LH}_2/(\text{L}\cdot\text{d})$ および $7.2 \text{ LH}_2/(\text{L}\cdot\text{d})$ であった。
- ・ 以前のデータをスケールアップした後で評価した水素振替価格は $3,700 \text{ Lit/Nm}^3$ であった。
- ・ この値は、現在の純ガスとしての水素の価格の3.7倍である。

しかし、下記の値に下げることができる。

- ・ 3, 550Lit/Nm<sup>3</sup>、酸産生・光生物併合システム(APCS)を用いることによって可能。これは実験室規模で徹底的に試験したが、自然光下で確認する必要がある。
- ・ 3, 200Lit/Nm<sup>3</sup>、非無菌培養（蒸気滅菌を使用しない）を用いることによって可能。これは、実験室規模で予備的に検討した（ホップ抽出物ないしは一酸化炭素の存在下の培養）。
- ・ 1, 650Lit/Nm<sup>3</sup>、水素生産性を28LH<sub>2</sub>/kg廃棄物から45LH<sub>2</sub>/kg廃棄物に向上させることによって可能。これは光リアクタの性能をモジュールで得られた性能の2倍に向上させることを含む。この目標を達成するための可能性のある手段は、スウィープガスの使用や、光エネルギー利用効率と光リアクタの費用を改善するためのさらに遺伝子改良された菌株の使用などである。
- ・ 1, 000Lit/Nm<sup>3</sup>、廃棄物処理の料金収入が廃棄物1kgあたり100Litから150Litに上昇する、あるいは改良された活性を持つ菌種が使用可能になれば達成可能である。

#### 5. 4. 5 参考文献

- 1) A. A. Tsygankov, et al., Actual and potential rates of hydrogen photoproduction by continuous culture of the purple non-sulphur bacterium *Rhodobacter capsulatus*, Appl. Microbiol. Biotechnol, 49, 102-107(1998)

表 5. 4 - 1 水素の振替価格

| Hydrogen transfer price                             |                                                                                                                                       |
|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                     | Lit · Nm <sup>3</sup>                                                                                                                 |
| 1. BASE CASE                                        | 3700                                                                                                                                  |
| 2. APCS                                             | 3550                                                                                                                                  |
| 3. APCS without sterilization                       | 3200                                                                                                                                  |
| 4. APCS with increased productivity                 | 1650                                                                                                                                  |
| 5. APCS with increased revenues from waste disposal | 1000                                                                                                                                  |
|                                                     |                                                                                                                                       |
| 1.                                                  | Clone SMV089, once through photoreactor 100 mm ID, scale up of module results, stable H <sub>2</sub> evolution through the whole year |
| 4.                                                  | From 28 to 45 LH <sub>2</sub> · Kg waste <sup>-1</sup> (CO + gas separation membrane system)                                          |
| 5.                                                  | From 100 to 150 Lit · Kg <sup>-1</sup> , or genetically improved clones                                                               |

## 第 6 章 研究支援調査

### 6. 1 ロンドン大学における研究状況

光合成微生物による水素発生の分子機構及び光利用技術に関する基礎的検討

1. Studies on  $H_2$  photoproduction by Anabaena variabilis ATTC 2943 and its mutant PK84 in a bench top photobioreactor (PhBR) were continued. Earlier observation that the mutant PK84 is able to produce  $H_2$  during growth under 2%  $CO_2$  + air was confirmed; the native strain evolves only when under argon or in a micro aerobic environment.
2. At its maximum rate of  $H_2$  production in air + 2%  $CO_2$ , PK84 utilised only 13% of energy derived from oxygenic photosynthesis towards  $H_2$  production. The actual rate of  $H_2$  production by PK84 in the bioreactor was only 33% of the potential (maximum realisable) rate by the cyanobacterium.
3. A computer-controlled rooftop (outdoor) photobioreactor (PhBR) was assembled during summer (July-Oct) 1998.  $H_2$  photo-production rates by A.variabilis PK84 grown in  $CO_2$  + air in the bioreactor, in batch and chemostat culture mode, were measured together with other parameters such as temperature, irradiance, pH, dry biomass weight, and  $O_2$  and Chl a concentrations. A maximum rate of 80 ml  $H_2$  per hr per reactor volume (4.35 litre) was obtained on a bright day ( $400\text{ Wm}^{-2}$ ) from a 12 day old PK84 culture grown in batch mode. The total  $H_2$  evolved per day per reactor varied with the insulation on each day, which was quite variable from day to day in London.
4. The maximum efficiency of conversion of light to chemical energy of  $H_2$  in the outdoor photobioreactor was 0.33%. Under optimal conditions PK84 cells grown in argon +  $CO_2$  in a bench top reactor can produce  $H_2$  with a light to  $H_2$  energy conversion efficiency of 1.17%

5. Day-night and night-dark experiments demonstrated conclusively that the H<sub>2</sub> production by PK84 cells was dependent on light.
6. The unicellular cyanobacterium Synechococcus Miami sp 043511 evolved H<sub>2</sub> only under an argon (anaerobic) atmosphere. The actual and potential rate of H<sub>2</sub> production by Synechococcus 043511 were only a fourth of the rates obtained from A.variabilis PK84 growing under argon.
7. The presence of an uptake hydrogenase was detected by biochemical / physiological studies on H<sub>2</sub> production and confirmed by polarographic analysis in a H<sub>2</sub> / O<sub>2</sub> electrode.

## 6. 2 東京農工大学における研究状況

### 遺伝子組み換え微生物による水素発生リアクターの基礎的検討

これまで、当プロジェクトでは海洋光合成細菌における高水素生成株のスクリーニング及びスクリーニングされた株についての水素生成能の評価を行ってきた。また、スクリーニングされた株の水素生成能の向上、及びこの株を用いた水素生成リアクタの構築を目指し、基礎的な検討を行ってきた。

平成4年度は、海洋光合成細菌の遺伝子導入系の開発、高速水素生成リアクタの開発を目的とした光分散型ファイバー上に固定化した菌体による水素生成を行った。平成5年度は、太陽光を利用した海洋光合成細菌による水素生成、有用物生産、及び廃水処理を同時に行うことが可能なシステムの開発を行った。平成6年度、7年度は、新たに海洋からスクリーニングされた高水素生成株 *Rhodovulum* sp. NKPB160471R の吸収型ヒドロゲナーゼ変異株を作製した。さらに、この変異株の水素生成能が野生株に比べて高いことを示した。また、平成8年度は、*nifH* 遺伝子の増幅を指標とした直接PCR法による自然界からの好熱性光合成細菌の検出を試みた。平成9年度は、*Rhodovulum* sp. NKPB160471R の水素生成条件下に於いて、酸素呼吸を行わせATPレベルを増加させることにより水素生成速度の向上を試みた。その結果、微量の酸素の添加を行うことで、水素生成速度は嫌気条件下の水素生成に比べて向上することが見出された。さらに、長期的にもこの効果が維持できることも確認された。

最終年度は、明／暗条件の存在する二相式リアクタの構築を行い、*Rhodovulum* sp. NKPB160471R による水素生成におけるこのリアクタの評価を行った。

### 6. 3 ハワイ大学における研究状況

#### 水素生産能を有する海洋性光合成微生物の検索およびスクリーニング

The goal of this study was to identify strains with superior hydrogen-producing capability under RITE-proposed conditions and standards. Strain HCC 2205 and HCC 2037 demonstrated superior hydrogen production capability during previous tests of 205 photosynthetic bacteria from the Mitsui-Miami Collection.

In addition, we tested HCC 2206, a hydrogen producing Hawaiian isolate, and *Rhodobacter sphaeroides* RV, which had been proposed by RITE as a standard strain.

Hydrogen production capabilities of these strains were compared using lactate, acetate, butyrate, succinate and propionate as substrates. HCC 2037 produced hydrogen from all the acids, but production rates were highest rates with lactate and acetate. Four RITE-specified simulated industrial wastewaters, containing mixtures of organic acids, were used to explore the potential for practical applications of hydrogen production by photosynthetic bacteria. HCC 2037 and *R.sphaeroides* RV both produced hydrogen from all four simulated wastewaters, but maximum hydrogen production rates varied according to the strain and wastewater tested. Overall performance of HCC 2037 compared favorably with that of *R.sphaeroides* RV in these experiments. HCC 2037 was used to examine the effects of reduced glutamate concentrations and periodic lactate addition on hydrogen production. When initial concentrations of glutamate and lactate were decreased, hydrogen production was increased 2.5-fold by daily lactate addition. Hydrogen production by HCC 2037 was also enhanced by immobilization in agar.

#### 6. 4 茨城大学における研究状況

##### 特殊環境下で生育する光合成細菌の探索とその水素生産への利用

光合成細菌の能力を利用した光水素生産は地球環境にとって望ましいシステムであるが、その光エネルギー変換効率は実用化のレベルに至っていない。エネルギー変換効率を改善する方法として、好熱性光合成細菌を探索し、それらを利用して冷却システムのいらない水素生産系を開発することが考えられる。

平成9年度は日本の温泉より取得した42分離株の増殖特性について解析を行った。ほとんどの株が40～43℃に生育至適温度を有し、46℃でも良好に生育することができる株も存在した。このうち、16株について水素生産能の第一次評価を行ったが、*Rhodobacter sphaeroides* RV株の30℃における水素生産量と同等、あるいはそれ以上の生産量を示した株も存在した。40℃における生産量で比較した場合には、分離株はRV株とは比較にならないほど高い水素発生能を示した。従ってこれら分離株の利用により、冷却コストが大きく削減されることが期待された。本年度は分離株の水素生産能の第一次評価を継続すると共に、高い水素発生能を示した株についてはさらに条件を変えて検討を行った。またタイの温泉から得られた55℃で増殖するCM55 strainsは極めて純化が困難で、純粋分離に成功していないが、集積培養の条件により混在する非光合成細菌の数をかなり排除することができたため、本菌による水素生産を行ってみた。

## 6. 5 海外調査報告書

### 6. 5. 1 米国技術調査（バイオテクノロジーシンポジウム）

#### (1) Purpose

Scientific exchange of current information about different aspects of optimization of light energy conversion to biohydrogen.

#### (2) Period

4/30 (Thu.) - 5/8 (Fri) 9 days

#### (3) Researching Items

- a. Presentation and discussion of our results in Connecticut University
- b. Poster presentation and discussion on the Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, Gatlinburg
- c. Discussion with Dr. Greenbaum and visit Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge

#### (4) participant

Lyudmila Vasilyeva, Ph.D

(National Institute of Bioscience and Human Technology, Research Institute of Innovative Technology for the Earth, Fuji Electric Corporate R&D, Ltd.)

#### (5) Schedule

- 4/30 (Thu.) departure from Narita, arrive to Detroit,  
departure from Detroit, arrive to Hartford
- 5/ 1 (Fri.) Connecticut University, visit. Presentation on interdepartment seminar, "Photosynthetic bacteria: applications for biotechnology". Discussion.
- 2 (Sat.) departure from Hartford, arrive to Pittsburg  
departure from Pittsburg, arrive to Knoxville

- transportation from Knoxville to Gatlinburg
- 3 (Sun.) 20th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals
- 4 (Mon.) 20th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals
- 5 (Tue.) 20th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals  
Tour of Oad Ridge National Laboratory
- 6 (Wed.) 20th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals,  
presentation of the poster, discussions
- 7 (Thu.) transportation from Knoxville to Gatlinburg,  
departure from Knoxville, arrive to Detroit,  
departure from Detroit,
- 8 (Thu.) arrive to Narita

## 6. 5. 2 南米技術調査（世界水素エネルギー会議）

### (1) 調査目的

この度アルゼンチン、ブエノスアイレスにて開催される第12回世界水素エネルギー会議（Hydrogen'98）に参加し、オーラル及びポスター発表を行い、生物的水素製造技術に関する研究開発動向について調査するとともに、意見交換・討論を通じて、関連情報の収集を行う。

### (2) 調査概要

#### a. 調査期間

平成10年6月19日（金）～6月29日（月）（11日間）

#### b. 調査項目

第12回世界水素エネルギー会議（Hydrogen'98）参加

場所：Escuela Superior Tecnica del Ejercito

Gral. Div. Manuel N. Savio

Buenos Aires, Argentina

#### c. 調査参加者

大月利 主任研究員 （IHI分室）

高崎幸一 主任研究員 （東ガス分室）

北島洋二 研究員 （鹿島分室）

#### d. 調査日程

6/19（金）成田発 →

20（土）Buenos Aires 着

21（日）第12回世界水素エネルギー会議 第1日

22（月）第12回世界水素エネルギー会議 第2日

23（火）第12回世界水素エネルギー会議 第3日

24（水）第12回世界水素エネルギー会議 第4日

25（木）第12回世界水素エネルギー会議 第5日

2 6 (金) 第 1 2 回世界水素エネルギー会議 第 6 日

2 7 (土) Buenos Aires 発 →

2 8 (日) 機中泊 →

2 9 (月) 成田着

### 6. 5. 3 欧州技術調査（国際光合成会議）

#### (1) 調査目的

8月にハンガリー、ブタペストにて開催される第11回光合成国際会議に参加し、ポスター発表を行い、生物的水素製造技術に関する研究開発動向について調査するとともに、意見交換・討論を通じて関連情報の収集を行う。

#### (2) 調査概要

##### a. 調査期間

平成10年8月16日（日）～8月24日（月）（9日間）

##### b. 調査項目

第11回光合成国際会議への参加

場所：ブタペスト経済大学

##### c. 調査参加者

若山樹 研究員（エネ研分室）

Khatipov Emir 研究員（エネ研分室）

中田栄寿 研究員（富士電分室）

##### d. 調査日程

8／16（日）成田発 → ブタペスト着

17（月）第11回光合成国際会議 第1日

18（火）第11回光合成国際会議 第2日

19（水）第11回光合成国際会議 第3日

20（木）第11回光合成国際会議 第4日

21（金）第11回光合成国際会議 第5日

22（土）第11回光合成国際会議 第6日

23（日）ブタペスト発 →

24（月）成田着

#### 6. 5. 4 欧州技術調査（温暖化ガス抑制技術国際会議ほか）

##### (1) 実施目的

温暖化ガス抑制技術国際会議(4th International Conference on Greenhouse Gas Control Technologies)での研究発表及びチェコ、フィンランドにおける水素エネルギー研究開発動向調査を行う。

##### (2) 調査概要

###### a. 調査期間

平成10年8月29日（土）～9月9日（水）（12日間）

###### b. 調査項目

第4回温暖化ガス抑制技術国際会議への参加発表及び海外の水素エネルギー研究開発動向の調査

###### c. 調査参加者

服部達雄 主任研究員 （東ガス分室）  
青山勝博 主任研究員 （東ガス分室）  
大塚誠治 技術部長 （技術部）

###### d. 調査日程

8 / 29（土）成田発(SR168) → チューリッヒ（スイス）着  
30（日）チューリッヒ発 → インターラーケン着（列車で移動）  
4th International Conference on Greenhouse Gas Control  
Technologies 第1日  
31（月）4th International Conference on Greenhouse Gas Control  
Technologies 第2日  
9 / 1（火）4th International Conference on Greenhouse Gas Control  
Technologies 第3日  
2（水）4th International Conference on Greenhouse Gas Control  
Technologies 第4日

- 3 (木) インターラーケン発 → チューリッヒ着 (列車)  
チューリッヒ発 → ブラハ (チェコ) 着 (飛行機)
- 4 (金) Fuel Research Institute (トジェボン) 訪問  
トジェボン (Trebon) はブラハの南約150kmの都市  
この日はブラハ・トジェボン間を往復する
- 5 (土)
- 6 (日) ブラハ発 → ヘルシンキ (フィンランド) 着 (飛行機)
- 7 (月) VTT Energy (ヘルシンキ) 訪問
- 8 (火) ヘルシンキ発 (AY73) →
- 9 (水) 成田着

## 6. 5. 5 欧州技術調査（エニ分室研究会ほか）

### (1) 調査目的

イタリアのエニ分室を訪問して、エニシステムを評価・検討し、並びに育種研究の進捗状況等を打ち合わせる。その後、イギリスのロンドン大学を訪問して研究の進捗等を打ち合わせる。

### (2) 調査概要

#### a. 出張先（名称・所在地）

##### ①Eni Technologie

00016 MONTEROTONDO (ROMA)

via E. Ramarini 32

##### ②Eni Technologie

20097 S. Donato Milanese (Milano)

via F. Maritano 26

##### ③King's College London

Campden Hill Road

London W8 7AH, U. K.

#### b. 期間

平成10年7月5日（日）～7月12日（日）（8日間）

#### c. 用件

平成10年度エニ分室研究会・ロンドン大学技術打ち合わせ

#### d. 調査参加者

|      |       |         |
|------|-------|---------|
| 後藤雅史 | 主任研究員 | （鹿島分室）  |
| 西代孝志 | 研究員   | （クボタ分室） |
| 服部達雄 | 主任研究員 | （東ガス分室） |

小池洋潤 研究員 (エネ研分室)

中山克彦 主任研究員 (エニ分室)

鬼山和彦 技術部次長 (技術部)

e. 調査日程

7 / 5 (日) 成田発 → ローマ着

6 (月) エニテクノロジー ローマ分室研究会 第1日

7 (火) エニテクノロジー ローマ分室研究会 第2日

8 (水) エニテクノロジー ミラノ分室研究会

9 (木) ロンドン移動

10 (金) ロンドン大学技術打ち合わせ

11 (土) ロンドン発 →

12 (日) 成田着

# 目標に照らした達成状況

## 2. 2 光水素発生における波長依存性の検討

本節では単色光下の光合成細菌の水素発生速度を、菌体の集光色素タンパク質（LH1またはLH2）量、菌体濃度、および光エネルギー強度を変数として表す式を作成し、この式を用いて集光色素タンパク質量と単色光下の水素発生速度の関係を検討した。ここで作成した式は、その対象を水素生産に限定したものである。しかし得られた成果を応用し、対象を有用物質生産とすることで、光合成細菌による物質生産の技術分野の研究開発に寄与できると考える。

## 2. 3 Rb. sphaeroides RV におけるBch1 含有量制御の遺伝子学的アプローチ

本節では、光合成細菌の遺伝子操作技術の向上や、光合成メカニズムの理解を目指した研究開発について報告した。これらは光合成細菌の菌体またはその機能を利用した、物質生産、環境浄化などの技術分野への応用を念頭に置き、実施したものである。

## 3. 1 糖廃液を用いる光合成細菌の大量培養技術

図3. 1-11に示したように、大きさの異なる様々のリアクタを製作し、水素生産試験を試みてきた。最終年度にあたり、定性的ではあるがリアクタごとの水素生産の有無をまとめたので、図3. 1-19に示す。特に本年度は、400Lリアクタを用い、海上試験で水素生産ができたことは収穫であった。これまでの多くの屋外試験を振り返ってみると、運転直後の比較的強い光照射、適度の温度、攪拌等が重要な管理項目であると感じている。今後、機会があれば、大型リアクタによる海上での水素生産試験に挑戦してみたい。

## 3. 3 生ゴミを用いる光合成細菌の大量培養技術

モジュールリアクタによる水素生産培養は、光変換効率 1.0%が目標であったが、培養の結果 0.54%であった。これは実廃水におけるデータであるが、人工模擬廃水で行った結果でも 0.8%とやはり目標は達成できていない。内部照射式リアクタでは直達光しか利用できないために、天候の変動などにより光不足に陥りやすく、光合成細菌の能力を完全に引き出せていないことが原因と考えられる。

#### 4. 1 副産物回収技術の基礎研究

バイオ水素生産システムでは水素を主産物とした培養を行うため、その余剰菌体から回収できる有用副産物は限られる。本年度は8年間の研究成果の総括として、この有用物質について、その年間生産量の推算を行った。その結果、表4. 1-1示す有用物質について、その回収可能量について把握することができた。

#### 5. 3 クボタシステム

当初の目標通り、8年間の研究成果に基づいた総合バイオ水素生産システムの検討を行い、水素製造コスト及び環境調和性（LCCO<sub>2</sub>値）の指標に基づいたシステム評価を実施することができた。

# 研究発表・講演、文献、特許の状況

## (1) 研究発表・講演

No. 1

| 番号   | 発表者                           | 発表題目                                                                                                              | 発表先                                                                  | 発表日        | 備考     | 分室  |
|------|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|------------|--------|-----|
| 9-20 | 西原宏史<br>高村義親                  | 好熱性光合成細菌の探索とその水素生産への応用                                                                                            | 日本農芸化学会 1998年度大会                                                     | H10. 4. 2  |        | 510 |
| 9-19 | 鳥山明夫                          | 光合成細菌による水素生産技術開発                                                                                                  | 日本農芸化学会 1998年度大会                                                     | H10. 4. 3  |        | 504 |
| 9-27 | L. VASILYEVA                  | LIGHT-HARVESTING SYSTEM OF RB. SPHAEROIDES: APPLICATIONAL ASPECTS OF GENETIC STUDIES                              | TWENTIETH SYMPOSIUM ON BIOTECHNOLOGY FOR FUELS AND CHEMICALS         | H10. 5. 6  |        | 507 |
| 10-7 | E. D'ADDARIO<br>M. VALDISERRI | ANOXYGENIC PHOTOTROPHIC BACTERIA FOR HYDROGEN PRODUCTION AND RECYCLING OF ORGANIC WASTES                          | INTERNATIONAL WORKSHOP ADVANCES IN ENERGY STUDIES PORTOVENERE, ITALY | H10. 5. 28 |        | 502 |
| 9-18 | 大月利                           | HYDROGEN PRODUCTION BY FLOATING-TYPE PHOTOBIOREACTOR                                                              | XIIth WORLD HYDROGEN ENERGY CONFERENCE                               | H10. 6. 23 | poster | 501 |
| 9-16 | 高崎幸一<br>大塚誠治<br>服部達雄          | BIOLOGICAL HYDROGEN PRODUCTION AS AN ENVIRONMENTALLY FRIENDLY TECHNOLOGY                                          | XIIth WORLD HYDROGEN ENERGY CONFERENCE                               | H10. 6. 24 |        | 508 |
| 9-17 | 北島洋二                          | OUTDOOR OPERATION OF BIOREACTOR USING PHOTOSYNTHETIC BACTERIA AND EFFECT OF DARK REACTION                         | XIIth WORLD HYDROGEN ENERGY CONFERENCE                               | H10. 6. 25 |        | 503 |
| 10-4 | 若山樹                           | EFFECTS OF LIGHT-DARK CYCLE OF MINUTE-SECOND REGION ON PHOTO-HYDROGEN PRODUCTION BY RHODOBACTER SPHAEROIDES RV    | 11TH INTERNATIONAL CONGRESS ON PHOTOSYNTHESIS                        | H10. 8. 20 | poster | 507 |
| 10-2 | E. KHATIPOV                   | REGULATION OF POLYHYDROXYBUTYRATE ACCUMULATION IN RHODOBACTER SPHAEROIDES                                         | 11TH INTERNATIONAL CONGRESS ON PHOTOSYNTHESIS                        | H10. 8. 20 | poster | 507 |
| 10-1 | 中田栄寿<br>西方聡<br>三宅淳<br>浅田泰男    | HYDROGEN PRODUCTION BY PHOTOSYNTHETIC BACTERIA: THE RELATIONSHIP BETWEEN LIGHT WAVELENGTH AND HYDROGEN PRODUCTION | 11TH INTERNATIONAL CONGRESS ON PHOTOSYNTHESIS                        | H10. 8. 20 | poster | 506 |
| 9-29 | 大塚誠治<br>高崎幸一<br>服部達雄          | BIOLOGICAL HYDROGEN PRODUCTION AS AN ENVIRONMENTALLY FRIENDLY TECHNOLOGY                                          | GHGT-4                                                               | H10. 8. 31 | poster | 508 |
| 9-30 | 青山勝博<br>浅田泰男<br>高崎幸一<br>三宅淳   | CARBON DIOXIDE UTILIZATION AND HYDROGEN PRODUCTION BY PHOTOSYNTHETIC MICROORGANISMS                               | GHGT-4                                                               | H10. 9. 1  |        | 505 |

## (1) 研究発表・講演

No. 2

|        |                      |                                                                                                                                       |                                                                               |            |        |       |
|--------|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|------------|--------|-------|
| 10 - 6 | C. TOSI              | LIGHT-DRIVEN HYDROGEN PRODUCTION SYSTEM USING PYROCOCOCCUS FURIOSUS SULFHYDROGENASE AS A CATALYST                                     | THERMOPHILES '98                                                              | H10. 9. 7  | poster | 5 0 2 |
| 10 - 5 | E. KHATIPOV          | BASIC AND APPLIED STUDY OF POLY-B-HYDROXYBUTYRATE ACCUMULATION BY HYDROGEN PRODUCING PHOTOSYNTHETIC BACTERIUM RHODOBACTER SPHAEROIDES | INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOLOGICAL PHA (ISBP98)                            | H10. 9. 9  | poster | 5 0 7 |
| 10 -22 | E. FRANCHI           | GENETIC CHARACTERIZATION OF MICROBIAL HYDROGENASES AND PHOTOBIOLOGICAL H <sub>2</sub> PRODUCTION                                      | MICROBIAL GENERATION OF COMPOUNDS USEFUL FOR TECHNOLOGY AND ENERGY PRODUCTION | H10. 9. 16 |        | 5 0 2 |
| 10 -20 | 小池洋潤                 | 光水素生産を目的としたシアノバクテリアの育種改良                                                                                                              | 日本化学会第75秋季年会バイテクノロジー-部会シンポジウム                                                 | H10. 9. 16 |        | 5 0 7 |
| 10 -19 | 若山樹                  | 光合成細菌による光水素発生<br>ーリアクターにおける光環境と光エネルギー変換効率の関係ー                                                                                         | 日本化学会第75秋季年会バイテクノロジー-部会シンポジウム                                                 | H10. 9. 17 | poster | 5 0 7 |
| 10 -21 | E. KHATIPOV          | HYDROGEN AND POLYHYDROXYBUTYRATE PRODUCTION BY RHODOBACTER SPHAEROIDES: REGULATORY ISSUE AND FEASIBILITY OF COMBINED PROCESS          | 日本化学会第75秋季年会バイテクノロジー-部会シンポジウム                                                 | H10. 9. 17 | poster | 5 0 7 |
| 10 - 8 | 中田栄寿                 | 光合成細菌の光水素発生 ～光波長と量子収率の関係～                                                                                                             | 日本生物工学会                                                                       | H10. 9. 29 |        | 5 0 6 |
| 10 - 9 | 若山樹                  | 短パルス光照射と光合成細菌による光水素発生の関係                                                                                                              | 日本生物工学会                                                                       | H10. 9. 29 |        | 5 0 7 |
| 10 -10 | 若山樹                  | 部分遮光によるリアクターの効率化：光合成細菌の水素発生リアクターの改良                                                                                                   | 日本生物工学会                                                                       | H10. 9. 29 |        | 5 0 7 |
| 10 -13 | 北島洋二<br>後藤雅史<br>大塚誠治 | 光合成リアクタを用いた屋外実験における水素生産収支                                                                                                             | 日本生物工学会                                                                       | H10. 9. 29 |        | 5 0 3 |
| 10 -11 | E. KHATIPOV          | COMPETITIVE RELATIONSHIP OF HYDROGEN AND POLYHYDROXYBUTYRATE (PHB) PRODUCTION IN RHODOBACTER SPHAEROIDES                              | 日本生物工学会                                                                       | H10. 9. 30 |        | 5 0 7 |
| 10 -12 | 小池洋潤                 | シアノバクテリアにおける異種ヒドロゲナーゼ活性発現                                                                                                             | 日本生物工学会                                                                       | H10. 9. 30 |        | 5 0 7 |
| 10 -23 | 中田栄寿                 | 環境調和型水素製造技術                                                                                                                           | 資材・素材'98 (資材・素材関係学会協会合同秋季大会)                                                  | H10. 11. 5 |        | 5 0 6 |
| 10 -33 | 若山 樹                 | 光合成細菌の色素欠損株による水素発生挙動                                                                                                                  | 日本化学会第76春季年会                                                                  | H11. 3. 30 |        | 5 0 7 |

## (2) 文献

No. 1

| 番号     | 著者                                                                  | 表題                                                                                                                                   | 発表誌                                                                                                                                                                                       | 巻号                | ページ     | 発表年  | 備考    |
|--------|---------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|---------|------|-------|
| 9 -21  | E. KHATIPOV                                                         | ACCUMULATION OF POLY- $\beta$ -HYDROXYBUTYRATE BY RHODOBACTER SPHAEROIDES ON VARIOUS CARBON AND NITROGEN SUBSTRATES                  | FEMS MICROBIOLOGY LETTERS                                                                                                                                                                 | Vol. 162          | 39-45   | 1998 | 5 0 7 |
| 7 -31  | E. FASCETTI<br>E. D'ADDARIO                                         | PHOTOSYNTHETIC HYDROGEN EVOLUTION WITH VOLATILE ORGANIC ACIDS DERIVED FROM THE FERMENTATION OF SOURCE SELECTED MUNICIPAL SOLD WATERS | INT. J. HYDROGEN ENERGY                                                                                                                                                                   | Vol. 23,<br>No. 9 | 753-760 | 1998 | 5 0 2 |
|        | 三宅淳                                                                 | BIOLOGICAL SOLAR ENERGY CONVERSION                                                                                                   | RENEWABLE BIOLOGICAL SYSTEMS FOR ALTERNATIVE SUSTAINABLE ENERGY (FAO AGRICULTURAL SERVICES BULLETEN 128)                                                                                  |                   | 7-17    | 1998 | 生命研   |
|        | 浅田泰男                                                                | HYDROGEN PRODUCTION                                                                                                                  | RENEWABLE BIOLOGICAL SYSTEMS FOR ALTERNATIVE SUSTAINABLE ENERGY (FAO AGRICULTURAL SERVICES BULLETEN 128)                                                                                  |                   | 69-77   | 1998 | 生命研   |
| 10 -16 | 北島洋二<br>後藤雅史<br>上野嘉之<br>大塚誠治                                        | 環境調和型水素製造技術 (その2)<br>ー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ー                                                                             | 鹿島技術研究所年報                                                                                                                                                                                 | Vol. 46           | 195-202 | 1998 | 5 0 3 |
|        | 三宅淳                                                                 | THE SCIENCE OF BIOHYDROGEN: AN ENERGETIC VIEW                                                                                        | BIO HYDROGEN: PROCEEDINGS OF AN INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOLOGICAL HYDROGEN PRODUCTION<br>JUNE 23-26, 1997, WAIKOLOA HAWAII<br>編著: O. R. ZABORSKY ら5名<br>出版社: PLENUM PUBLISHING CORP. |                   | 7-18    | 1998 | 生命研   |
|        | C. TOSHI<br>E. FRANCHI<br>F. RODRIGUEZ<br>A. SELVAGGI<br>P. PEDRONI | MOLECULAR BIOLOGY OF HYDROGENASES                                                                                                    | BIO HYDROGEN: PROCEEDINGS OF AN INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOLOGICAL HYDROGEN PRODUCTION<br>JUNE 23-26, 1997, WAIKOLOA HAWAII<br>編著: O. R. ZABORSKY ら5名<br>出版社: PLENUM PUBLISHING CORP. |                   | 65-72   | 1998 | 5 0 2 |
|        | 三宅正人<br>関根誠<br>L. VASILIEVA<br>中田栄寿<br>若山樹<br>浅田泰男<br>三宅淳           | IMPROVEMENT OF BACTERIAL LIGHT-DEPENDENT HYDROGEN PRODUCTION BY ALTERING THE PHOTOSYNTHETIC PIGMENT RATIO                            | BIO HYDROGEN: PROCEEDINGS OF AN INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOLOGICAL HYDROGEN PRODUCTION<br>JUNE 23-26, 1997, WAIKOLOA HAWAII<br>編著: O. R. ZABORSKY ら5名<br>出版社: PLENUM PUBLISHING CORP. |                   | 81-86   | 1998 | 生命研   |

## (2) 文献

No. 2

|        |                                                           |                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                       |  |         |      |                |
|--------|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|---------|------|----------------|
| 10 -34 | 小池洋潤<br>青山勝博<br>三宅正人<br>山田順子<br>植村家顯<br>三宅淳<br>浅田泰男       | ATTEMPT AT HETEROLOGOUS EXPRESSION OF CLOSTRIDIAL HYDROGENASE IN CYANOBACTERIA                                            | BIO HYDROGEN:PROCEEDINGS OF AN INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOLOGICAL HYDROGEN PRODUCTION<br>JUNE 23-26, 1997, WAIKOLOA HAWAII<br>編著:O. R. ZABORSKYら5名<br>出版社:PLENUM PUBLISHING CORP. |  | 111-115 | 1998 | 5 0 7          |
|        | R. EL SHISHTAWY<br>北島洋二<br>大塚誠治<br>川崎昭三<br>森本昌義           | STUDY ON THE BEHAVIOR OF PRODUCTION AND UPTAKE OF PHOTOBIOHYDROGEN BY PHOTOSYNTHETIC BACTERIUM RHODOBACTER SPHAEROIDES RV | BIO HYDROGEN:PROCEEDINGS OF AN INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOLOGICAL HYDROGEN PRODUCTION<br>JUNE 23-26, 1997, WAIKOLOA HAWAII<br>編著:O. R. ZABORSKYら5名<br>出版社:PLENUM PUBLISHING CORP. |  | 117-122 | 1998 | 5 0 3          |
| 10 -38 | L. VASILYEVA<br>三宅正人<br>原正之<br>中田栄寿<br>西方聡<br>浅田泰男<br>三宅淳 | CHARACTERIZATION OF A NOVEL LIGHT-HARVESTING MUTANT OF RHODOBACTER SPHAEROIDES WITH RELATION TO PHOTOHYDROGEN PRODUCTION  | BIO HYDROGEN:PROCEEDINGS OF AN INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOLOGICAL HYDROGEN PRODUCTION<br>JUNE 23-26, 1997, WAIKOLOA HAWAII<br>編著:O. R. ZABORSKYら5名<br>出版社:PLENUM PUBLISHING CORP. |  | 123-131 | 1998 | 5 0 7          |
|        | E. KHATIPOV<br>三宅正人<br>三宅淳<br>浅田泰男                        | POLYHYDROXYBUTYRATE ACCUMULATION AND HYDROGEN EVOLUTION BY RHODOBACTER SPHAEROIDES AS A FUNCTION OF NITROGEN AVAILABILITY | BIO HYDROGEN:PROCEEDINGS OF AN INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOLOGICAL HYDROGEN PRODUCTION<br>JUNE 23-26, 1997, WAIKOLOA HAWAII<br>編著:O. R. ZABORSKYら5名<br>出版社:PLENUM PUBLISHING CORP. |  | 157-161 | 1998 | 5 0 7          |
|        | 山田晃世<br>羽田野智之<br>松永是                                      | CONVERSION EFFICIENCIES OF LIGHT ENERGY TO HYDROGEN BY A NOVEL <i>Rhodovulum</i> sp. AND ITS UPTAKE-HYDROGENASE MUTANT    | BIO HYDROGEN:PROCEEDINGS OF AN INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOLOGICAL HYDROGEN PRODUCTION<br>JUNE 23-26, 1997, WAIKOLOA HAWAII<br>編著:O. R. ZABORSKYら5名<br>出版社:PLENUM PUBLISHING CORP. |  | 167-171 | 1998 | 東京<br>農工<br>大学 |
|        | 浅田泰男<br>三宅正人<br>青山勝博<br>植村家顯<br>三宅淳                       | HYDROGENASE-MEDIATED HYDROGEN METABOLISM IN A NON-NITROGEN-FIXING CYANOBACTERIUM, MICROCYSTIS AERUGINOSA                  | BIO HYDROGEN:PROCEEDINGS OF AN INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOLOGICAL HYDROGEN PRODUCTION<br>JUNE 23-26, 1997, WAIKOLOA HAWAII<br>編著:O. R. ZABORSKYら5名<br>出版社:PLENUM PUBLISHING CORP. |  | 173-179 | 1998 | 生命研            |

## (2) 文献

No. 3

|        |                                                        |                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                             |  |         |      |       |
|--------|--------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|---------|------|-------|
|        | 青山勝博<br>植村家顯<br>浅田泰男                                   | PHOTOSYNTHETIC BACTERIAL HYDROGEN PRODUCTION WITH<br>FERMENTATION PRODUCTS OF CYANOBACTERIUM SPIRULINA<br>PLATENSIS                                                       | BIO HYDROGEN:PROCEEDINGS OF AN<br>INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOLOGICAL<br>HYDROGEN PRODUCTION<br>JUNE 23-26, 1997, WAIKOLOA HAWAII<br>編著:O. R. ZABORSKYら5名<br>出版社:PLENUM PUBLISHING CORP. |  | 305-309 | 1998 | 5 0 5 |
| 10 -37 | 中田栄寿<br>西方聡<br>浅田泰男<br>三宅淳                             | LIGHT PENETRATION AND WAVELENGTH EFFECT ON<br>PHOTOSYNTHETIC BACTERIA CULTURE FOR HYDROGEN<br>PRODUCTION                                                                  | BIO HYDROGEN:PROCEEDINGS OF AN<br>INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOLOGICAL<br>HYDROGEN PRODUCTION<br>JUNE 23-26, 1997, WAIKOLOA HAWAII<br>編著:O. R. ZABORSKYら5名<br>出版社:PLENUM PUBLISHING CORP. |  | 345-352 | 1998 | 5 0 6 |
|        | R. EL SHISHTAWY<br>川崎昭三<br>森本昌義                        | CYLINDRICAL-TYPE INDUCED AND DIFFUSED<br>PHOTOBIOREACTOR: A NOVEL PHOTOREACTOR FOR<br>LARGE-SCALE H <sub>2</sub> PRODUCTION                                               | BIO HYDROGEN:PROCEEDINGS OF AN<br>INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOLOGICAL<br>HYDROGEN PRODUCTION<br>JUNE 23-26, 1997, WAIKOLOA HAWAII<br>編著:O. R. ZABORSKYら5名<br>出版社:PLENUM PUBLISHING CORP. |  | 353-358 | 1998 | 5 0 3 |
|        | 北島洋二<br>R. EL SHISHTAWY<br>上野嘉之<br>大塚誠治<br>三宅淳<br>森本昌義 | ANALYSIS OF COMPENSATION POINT OF LIGHT USING<br>PLANE-TYPE PHOTOSYNTHETIC BIOREACTOR                                                                                     | BIO HYDROGEN:PROCEEDINGS OF AN<br>INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOLOGICAL<br>HYDROGEN PRODUCTION<br>JUNE 23-26, 1997, WAIKOLOA HAWAII<br>編著:O. R. ZABORSKYら5名<br>出版社:PLENUM PUBLISHING CORP. |  | 359-367 | 1998 | 5 0 3 |
|        | 大月利<br>内山茂<br>福永栄                                      | HYDROGEN PRODUCTION BY A FLOATING-TYPE<br>PHOTOBIOREACTOR                                                                                                                 | BIO HYDROGEN:PROCEEDINGS OF AN<br>INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOLOGICAL<br>HYDROGEN PRODUCTION<br>JUNE 23-26, 1997, WAIKOLOA HAWAII<br>編著:O. R. ZABORSKYら5名<br>出版社:PLENUM PUBLISHING CORP. |  | 369-374 | 1998 | 5 0 1 |
| 10 -32 | 若山樹<br>鳥山明夫<br>河杉忠昭<br>新井孝昭<br>浅田泰男<br>三宅淳             | PHOTOHYDROGEN PRODUCTION USING PHOTOSYNTHETIC<br>BACTERIUM RHODOBACTER SPHAEROIDES RV: SIMULATION<br>OF THE LIGHT CYCLE OF NATURAL SUNLIGHT USING<br>AN ARTIFICIAL SOURCE | BIO HYDROGEN:PROCEEDINGS OF AN<br>INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOLOGICAL<br>HYDROGEN PRODUCTION<br>JUNE 23-26, 1997, WAIKOLOA HAWAII<br>編著:O. R. ZABORSKYら5名<br>出版社:PLENUM PUBLISHING CORP. |  | 375-381 | 1998 | 5 0 7 |

## (2) 文献

No. 4

|  |                                                           |                                  |                                                                                                                                                                                             |  |         |      |       |
|--|-----------------------------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|---------|------|-------|
|  | 河杉忠昭<br>P. PEDRONI<br>三宅正人<br>鳥山明夫<br>福永栄<br>高崎幸一<br>川本輝明 | RITE BIOLOGICAL HYDROGEN PROGRAM | BIO HYDROGEN:PROCEEDINGS OF AN<br>INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOLOGICAL<br>HYDROGEN PRODUCTION<br>JUNE 23-26, 1997, WAIKOLOA HAWAII<br>編著:O. R. ZABORSKYら5名<br>出版社:PLENUM PUBLISHING CORP. |  | 501-505 | 1998 | 5 0 8 |
|--|-----------------------------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|---------|------|-------|

## (3) 特許

No. 1

| 整理 | 分室／発明者                                                                                     | 特 許 名                                                                              | 出願年月日     | 出願番号             | 出願国        | 公開年月日 | 公開番号 | 特許登録<br>年月日 | 特許番号 | 備考 |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-----------|------------------|------------|-------|------|-------------|------|----|
| 1  | エニ分室<br>E. Franchi<br>C. Tosi<br>G. Scolla<br>F. Rodriguez<br>P. Pedroni                   | 水素光産生収率を向上した<br>Rhodobacter sphaeroides<br>RVのポリヒドロキシ<br>アルカノイン酸類<br>(PHAs) 欠損株の単離 | H11. 2. 9 | 特願平<br>11-031475 | 日本<br>イタリア |       |      |             |      |    |
| 2  | エニ分室<br>C. Tosi<br>G. Della Penna<br>E. Franchi<br>F. Rodriguez<br>G. Scolla<br>P. Pedroni | 水素光産生効率を改良した<br>Rhodobacter sphaeroides<br>RVの取り込み型<br>ヒドロゲナーゼ (Hup)<br>欠損株の単離     | H11. 2. 9 | 特願平<br>11-031476 | 日本<br>イタリア |       |      |             |      |    |

## (4) その他の公表（プレス発表等）

なし

**Hydrogen production**  
**by *Anabaena variabilis* PK 84 in an outdoor photobioreactor**  
**and by *Synechococcus* sp. Miami BG 043511 in a bench-top**  
**reactor**

**V.B Borodin, A.A. Tsygankov, A.S. Fedorov, K.K. Rao,**  
**& D.O. Hall**

Division of Life Sciences, King's College London  
Campden Hill Road, London, W8 7AH, UK  
(david.hall@kcl.ac.uk)

TECHNICAL REPORT (NEDO/RITE PROJECT)  
Fiscal year 1998 (1.4.1998 - 31.12.1998)

**January 1999**

## Contents

1. Frontispiece. Outdoor photobioreactor for H<sub>2</sub> production by *Anabaena variabilis* mutant PK 84.
2. Re-entrustment programme for Financial Year 1998.
3. Summary of research 1998.
4. Hydrogen production in photobioreactors.
  - (a) Introduction
  - (b) H<sub>2</sub> photoproduction in batch culture of *Anabaena variabilis* ATCC 29413 and its mutant PK 84: Further studies.
  - (c) Hydrogen photoproduction by *Anabaena variabilis* PK 84 in the outdoor photobioreactor.
  - (d) Light to H<sub>2</sub> conversion efficiencies in the outdoor and indoor photobioreactors.
  - (e) Figures
5. Reports presented to the RITE group during their visit to King's College London on 10 July 1998.
6. Conclusions and future potential for biohydrogen.
7. Reprints and preprints of publications.
8. Appendix. hydrogenases and hydrogen production by *Synechococcus* Sp. Miami BG-043511.

## **SECTION 2. RE-ENTRUSTMENT PROGRAMME FOR FINANCIAL YEAR 1998.**

### **The Programme:**

1. Assemble Hydrogen photobioreactor outdoors
  - a) Study hydrogen production from A. variabilis mutant PK84
  - b) Compare the outdoor photobioreactor with the laboratory scale photobioreactor for hydrogen productivity and performance
2. Compare A. Variabilis mutant PK84 with cyanobacterium Synnechococcus Miami BG-043511 for hydrogen productivity.

### SECTION 3. SUMMARY OF RESEARCH-1998

1. Studies on H<sub>2</sub> photoproduction by *Anabaena variabilis* ATTC 2943 and its mutant PK 84 in a bench top photobioreactor (PhBR) were continued. Earlier observation that the mutant PK 84 is able to produce H<sub>2</sub> during growth under 2% CO<sub>2</sub> + air was confirmed; the native strain evolves only when under argon or in a micro aerobic environment.
2. At its maximum rate of H<sub>2</sub> production in air + 2% CO<sub>2</sub>, PK84 utilised only 13% of energy derived from oxygenic photosynthesis towards H<sub>2</sub> production. The actual rate of H<sub>2</sub> production by PK84 in the bioreactor was only 33% of the potential (maximum realisable) rate by the cyanobacterium.
3. A computer-controlled rooftop (outdoor) photobioreactor (PhBR) was assembled during summer (July-Oct) 1998. H<sub>2</sub> photo-production rates by *A. variabilis* PK84 grown in CO<sub>2</sub> + air in the bioreactor, in batch and chemostat culture mode, were measured together with other parameters such as temperature, irradiance, pH, dry biomass weight, and O<sub>2</sub> and Chl a concentrations. A maximum rate of 80 ml H<sub>2</sub> per hr per reactor volume (4.35 litre) was obtained on a bright day (400 Wm<sup>-2</sup>) from a 12 day old PK84 culture grown in batch mode. The total H<sub>2</sub> evolved per day per reactor varied with the insulation on each day, which was quite variable from day to day in London.
4. The maximum efficiency of conversion of light to chemical energy of H<sub>2</sub> in the outdoor photobioreactor was 0.33%. Under optimal conditions PK84 cells grown in argon + CO<sub>2</sub> in a bench top reactor can produce H<sub>2</sub> with a light to H<sub>2</sub> energy conversion efficiency of 1.17%.
5. Day-night and night-dark experiments demonstrated conclusively that the H<sub>2</sub> production by PK84 cells was dependent on light.
6. The unicellular cyanobacterium *Synechococcus* Miami sp 043511 evolved H<sub>2</sub> only under an argon (anaerobic) atmosphere. The actual and potential rates of H<sub>2</sub> production by *Synechococcus* 043511 were only a fourth of the rates obtained from *A. variabilis* PK 84 growing under argon.
7. The presence of an uptake hydrogenase was detected by biochemical / physiological studies on H<sub>2</sub> production and confirmed by polarographic analysis in a H<sub>2</sub> / O<sub>2</sub> electrode.

## SECTION 4.      HYDROGEN PRODUCTION IN PHOTOBIOREACTORS.

### 4a)    Introduction

Research carried out in the previous year (FY 1997) had demonstrated that Anabaena variabilis PK 84, a mutant of A. variabilis ATCC29413 deficient in uptake hydrogenase activity, had better H<sub>2</sub> production activity under argon and the capacity to evolve H<sub>2</sub> even in a CO<sub>2</sub> enriched - air growth medium compared to the native 29413 strain. These traits made the mutant the choice cyanobacterial strain with potential for use in photobiological H<sub>2</sub> production systems. So, further studies were done in the current year aimed towards optimisation of H<sub>2</sub> production from mutant PK 84 in a lab-scale Ph BR with particular emphasis on the effects of irradiance on the reactor surface and of photosynthetically evolved O<sub>2</sub>. The conversion efficiency of light to hydrogen energy was determined on the basis of the fraction of photosynthetic energy generated by the cyanobacterium that was channelled towards photoproduction.

The final objective of the project is to assess the feasibility of assembling and operating the PhBR under natural environmental conditions for long periods. To achieve this objective, albeit partially, the helical PhBR with all its computer control accessories was transferred from the laboratory bench to the roof of the building in July beginning and H<sub>2</sub> production studies with PK 84 strain were continued till October 1998, when there was reasonable warmth and sunshine in London.

Previous studies on H<sub>2</sub> production with the unicellular cyanobacterium Synechococcus Sp 043511 by Mitsui's group in Miami and by us in King's College London (refer to RITE report 1997) has shown that this strain evolved H<sub>2</sub>, periodically, when grown under argon but very little H<sub>2</sub> was evolved in the presence of air. One explanation for the absence of H<sub>2</sub> in air any H<sub>2</sub> evolved by the nitrogenase activity of the cells would be consumed in a Knall gas-type reaction ( $2\text{H}_2 + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{energy}$ ) catalysed by a membrane bound uptake hydrogenase. As there were no previous reports about the occurrence of an uptake hydrogenase activity in Synechococcus sp 043511 we decided to investigate for the presence of this enzyme in this unicellular cyanobacterium. The objective was that if the uptake hydrogenase activity was detected then to generate mutant strains (with the collaboration of Prof. Shestakov, Moscow State University) which are deficient in uptake hydrogenase and which may turn out to be better H<sub>2</sub> producers compared to the native strain of Synechococcus, a phenomenon we already observed in A. variabilis WT and PK 84 mutants and which was utilised to our advantage in H<sub>2</sub> photoproduction.

A summary of these experiments are presented below and in these experiments are presented below and in the two MSS, Tsygankov et al (1998) and Borodin et al (1999) appended to this report.

## **4b) Hydrogen Production From Batch Cultures Of *Anabaena Variabilis* Atcc 29413 And Its Mutant Pk84 : Further Studies**

### **1) Experimental**

*A. variabilis* ATCC 29413 and its mutant PK 84 were grown in Allen and Arnon medium, both in flask cultures and in the Ph BR (see Tsygankov et al, 1998a); to induce the synthesis of V-containing nitrogenase,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  in the medium was replaced by 2 micromolar  $\text{Na}_2\text{VO}_4$ . The helical Ph BR, 4.35 l in volume, was made up of PVC tubing of 10mm internal diameter. To start with the reactor was sterilised using 0.5% NaOCl, washed repeatedly with autoclaved distilled water and then filled with the medium. The computer-control system of the Ph BR, with built in sensors for monitoring  $[\text{O}_2]$  and regulating pH, temperature and optical density of the reactor contents has been described before (Tsygankov et al, 1998b). The cultures were continuously sparged with 98% air + 2%  $\text{CO}_2$  gas mixture and illuminated by an array of fluorescent lamps; by regulating the number of lamps switched on the irradiance incident on the Ph BR can be varied during the experiment.

The potential nitrogenase and  $\text{H}_2$  production activities of the intact cells i.e. the maximum activity the cells can exhibit under optimal conditions was determined by withdrawing 2 ml samples of cell suspension at intervals from the Ph BR and incubating them in sealed vials under argon (for  $\text{H}_2$  production) or Ar + 20%  $\text{C}_2\text{H}_2$  (for nitrogenase) in an illuminated, thermostated water bath. The actual  $\text{H}_2$  production rates in the PhBR were calculated from the measurements of the  $\text{H}_2$  content of the effluent gas mixture from the reactor. Hydrogen,  $\text{C}_2\text{H}_2$  and  $\text{C}_2\text{H}_4$  were measured by gas chromatography. Other measurements were as described (Tsygankov et al, 1998a)

### **2) Results**

*A. variabilis* ATCC 29413: The specific rate of  $\text{H}_2$  production decreased with increase of cell density presumably due to light limitation. Providing the culture with saturating light intensities allowed maintenance of high nitrogenase and  $\text{H}_2$  evolution activities upto a cell chlorophyll concentration of  $17.5\mu\text{g/ml}$ . During growth under air +  $\text{CO}_2$  by argon + 2%  $\text{CO}_2$  also did not result in  $\text{H}_2$  evolution possibly due to the presence of photosynthetic  $\text{O}_2$  still in culture.  $\text{H}_2$  evolution started when the culture was flushed with pure Ar. Under argon the actual and potential rates of  $\text{H}_2$  production were the same, 25 to  $27\text{ ml h}^{-1}\text{ Ph BR}^{-1}$ . At a  $\text{H}_2$  production rate of 26.6 ml per hour the computed  $\text{O}_2$  evolution rate was  $21.7\text{ ml h}^{-1}$ . Thus,  $(26.6/(21.7*2)) * 100 = 61.3\%$  of photosynthetic reducing equivalents were used in  $\text{H}_2$  production by the native strain.

*A. variabilis* PK 84: The specific nitrogenase and  $\text{H}_2$  evolution activities of cells grown in argon increased with culture density provided saturating light was supplied to the culture. The most important difference from the native strain was the capacity of the mutant to produce  $\text{H}_2$  when grown in 98% air + 2%  $\text{CO}_2$ . In air +  $\text{CO}_2$  the maximum  $\text{H}_2$  production rate observed was  $43.3\text{ ml h}^{-1}\text{ Ph BR}^{-1}$ ; the calculated rate of photosynthesis and this condition was equivalent to  $165\text{ ml O}_2\text{ h}^{-1}\text{ Ph BR}^{-1}$ . So,  $(43.3/(165*2))*100 = 13.1\%$  photosynthetic reducing equivalents were used up for  $\text{H}_2$  production by the mutant when grown in air. The actual rate of  $\text{H}_2$  production by the mutant when grown in air. The actual rate of  $13.1\text{ ml h}^{-1}\text{ Ph BR}^{-1}$  under argon.

#### 4c) Hydrogen Photoproduction By *Anabaena Variabilis* PK 84 Mutant In An Outdoor Photobioreactor.

This search constituted the final phase of the project. The bench top 4.35 l volume helical Ph BR used for H<sub>2</sub> production studies in the laboratory was transferred to a table on the open roof part of the terrace of the building. The table was kept under a temporary slanting cover 3 m wide, 3m high at the top and 1m high at the bottom end, which protected the bioreactor and accessories from rain and wind. (see figure 5)

- The cover was constructed with clear, transparent plastic sheet nailed to timber frames. More than 95% of light incident on the plastic was transmitted to the PhBR.
- The medium reservoir, peristaltic pump heater, and sensors for light intensity, pH, OD and temperature were either inside the reactor or on its outer surface.
- The 'PHOTOWIN' computer control system, gas chromatograph (Hewlett Packard 5890 A, UK) for H<sub>2</sub> measurement, and gas cylinders for supply of air and CO<sub>2</sub> to the reactor were kept in an adjacent room on the terrace.
- Gas, water and electricity connections to the PhBR were provided through ports on the wall of this room.

To start with, the PhBR was sterilised by washing with 0.5% NaOCl followed by sterile distilled water. Allen and Arnon medium, modified by replacing NO<sub>2</sub> MoO<sub>4</sub> with Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, was pumped in to fill the bioreactor. The medium was sparged with a mixture of 98% air + 2% CO<sub>2</sub> inoculated after one day with an exponential phase culture of *A.variabilis* PK 84 grown also in the modified Allen & Arnon medium. The 'PHOTOWIN' computer system was turned on to record continuously the pH, temperature, O<sub>2</sub> content and optical density (OD) of the cell suspension, and the irradiance on the PhBR surface. Chlorophyll a and dry weight were measured by withdrawing aliquots from the reactor at regular intervals. H<sub>2</sub> content of the effluent gas mixture was measured using the gas chromatograph.

##### **Experiment 1:** 18 days from July 8 to July 25, 1998

This was the first attempt to test the performance of the Ph BR outdoors. The weather was reasonably sunny during this period, with cloudy intervals. H<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> production rates, chlorophyll concentration, cell biomass determined as weight and the physiochemical parameters of the culture are shown in figures 1a and 1b. The average irradiance was 300 Wm<sup>-2</sup> and on cloudy days fell down to 100 W<sup>-2</sup> ; on one or two sunny days it went up to 400 Wm<sup>-2</sup> and on cloudy days fell down to 100 Wm<sup>-2</sup>. The chlorophyll concentration increased gradually up to 10 days after inoculation and then rose at a faster rate; the dry weight increased in a parallel manner. The maximum rate of H<sub>2</sub> production, about 80 ml h<sup>-1</sup> PhBR<sup>-1</sup>, was recorded after 12 days of growth when the Chl a concentration was 7µg ml<sup>-1</sup> and irradiance about 400 Wm<sup>-2</sup>. The O<sub>2</sub> concentration in the culture during the experimental period was about 300µ molar; the pH of the culture increased gradually from 7.0 to 8.5. The temperature of the PhBR was maintained in between 26 and 33°C.

The data shows that the rate of H<sub>2</sub> production increased with the cell density and chlorophyll content of the cells. To a certain extent the H<sub>2</sub> production depended on the incident sunlight although no direct correlation between solar irradiance and H<sub>2</sub> production was noticeable.

The reactor was emptied after 3 weeks to start a new experiment since we had to test different characteristics of H<sub>2</sub> production in the PhBR during the short summer time available.

**Experiment 2:** 18 days from 1-18 Aug 1998.

The main purpose of this experiment was to test whether there is any advantage in running the reactor in a chemostat mode rather than in batch mode (studies in our laboratory on *H<sub>2</sub>* production from *Nostoc flagelliforme* has shown that this cyanobacterium evolved *H<sub>2</sub>* at higher rates when grown in a chemostat mode). The data on *H<sub>2</sub>* production, *O<sub>2</sub>* content and other parameters are recorded in Figs 2a and 2b. The cells were grown in batch culture for 9 days and then switched to the chemostat mode at a dilution rate of  $D = 0.01/\text{h}$ . As can be inferred from Fig 2a there was no obvious advantage in switching to chemostat mode as far as *H<sub>2</sub>* production from the cells was concerned. However, the results are not conclusive as we observed that after the 10<sup>th</sup> day there was a rapid rise of chlorophyll and biomass concentration, which was not reflected in *H<sub>2</sub>* production. Contamination of the culture by an alga (possibly *Achromonas* sp) could not be ruled out. This was a sunnier period compared to the first experimental, the incident light intensity on all days being greater than  $400 \text{ Wm}^{-2}$ . The maximum *H<sub>2</sub>* production rate,  $50 \text{ ml h}^{-1} \text{ PhBR}^{-1}$  was observed after the 6<sup>th</sup> day of the inoculation with PK 84 at a Chl a concentration of  $3 \mu\text{l ml}^{-1}$  at an irradiance of  $450 \text{ Wm}^{-2}$ . Due to the higher light incident on the PhBR, the *O<sub>2</sub>* concentration of the cell suspension was also higher (300 to 600  $\mu$  molar); this high *O<sub>2</sub>* may partially account for lower *H<sub>2</sub>* production rates.

**Experiment 3:** 36 days from 19<sup>th</sup> August to 23<sup>rd</sup> September 1998.

This experiment was designed for testing:

- (a) *H<sub>2</sub>* production from PK 84 cells grown in the chemostat mode (repeat of experiment 2),
- (b) the sustainability of *H<sub>2</sub>* production in the PhBR, and,
- (c) the light-dependency of *H<sub>2</sub>* production by the cyanobacterium.

The cells growing in batch culture in the reactor were switched to the chemostat mode after 10 days and the culture was maintained in this mode till the end of the experiment (Fig 3a). The data in Fig 3b show that there was no drop in the volumetric rate of *H<sub>2</sub>* production when the cells were switched from batch to chemostat mode of growth. The *H<sub>2</sub>* production rate of 25 to 35  $\text{ml H}_2/\text{h PhBR}^{-1}$  was sustainable through out the experimental period. Also, there was a noticeable correlation between the density (dry weight) and chlorophyll concentration of cells and *H<sub>2</sub>* production.

The light dependence of *H<sub>2</sub>* evolution by the cyanobacterium was demonstrated in two ways. Firstly, *H<sub>2</sub>* evolution from the PhBR was monitored continuously for 36 hours for two day and one night period in between, from 7 am, 26 Aug to 7 pm, 27 Aug. The data in Fig 3b show conclusively that there was no *H<sub>2</sub>* evolution from the reactor at night and also that the amount of *H<sub>2</sub>* evolved during the days was dependent on the solar irradiance (26 Aug was a cloudy day and 27<sup>th</sup> a bright sunny day).

In a second experiment (Fig 3c), at a time when *H<sub>2</sub>* was evolving continuously from the PhBR was covered completely with black plastic for a short period. It can be seen clearly from Fig 3c that during the period when the reactor was covered completely with plastic there was no *H<sub>2</sub>* evolution from the cells.

**Experiment 4:** 22 days from 23<sup>rd</sup> September to 14<sup>th</sup> October 1998

The main objective of this experiment was to test the dependence, if any, of *H<sub>2</sub>* production by chemostat cultures of PK84 on the dilution rate of the culture. The PhBR was inoculated with *A. variabilis* PK84 and grown in batch culture for 5 days after which the growth was switched to the chemostat mode at  $D = 0.02\text{h}^{-1}$  and maintained at this dilution. On the 12<sup>th</sup> day, the dilution was changed to  $D = 0.03 \text{ h}^{-1}$  and kept at the same level till the end of the experiment. The results are shown in figures 4a to 4c. Unfortunately, on a number of days during this experiment, the sunshine in London was poor (Figure 4a) which resulted in low rates of *H<sub>2</sub>* production from the cells during those days (Figure 4b). However, from the data

#### 4d. Estimation Of Light Energy Conversion To H<sub>2</sub> Energy By Anabaena Variabilis Pk84 In The Outdoor And Indoor Photobioreactors

$$\text{Conversion efficiency} = \frac{\text{Combustion energy of evolved H}_2, \text{EH}}{\text{Energy of incident light, } E_i}$$

##### Energy of light incident on the PhBR:

The energy of incident light was taken as the sum of the direct light from the sun,  $I_s$ , falling on the reactor and of the diffused daylight,  $I_d$ ; both light energies are measured using light sensors.

$E_i = (I_s \times S_{ps} + I_d \times S_{pd})t$  where  $S_{ps}$  is the surface of the PhBR receiving direct light and  $S_{pd}$  is the PhBR surface exposed to diffuse light;  $t$  = time.

$$S_{ps} = Dh \cos \alpha + D \sin \alpha \times Dt \tan \alpha$$

Where  $D$  is the diameter of the PhBR (55cm),  $h$  the height (32cm) and  $\alpha$  the angle of the sun (0 at sunset and sunrise and 51.5 grad at midday on 21 March; the value was assumed to be approx. 55 in July when the measurements were made).

$S_{pd} = 3.14 Dh$  for all outside surface of the reactor.

Units for light energy: 1W per hour = 3,600 joules.

##### A. Calculations for a sunny day, 20 July 1998

The PhBR produced 652.3 ml H<sub>2</sub> on 20 July; the energy of this H<sub>2</sub>, EH = 6,610 joules. Measurements were done for each hour; when H<sub>2</sub> measurements were not recorded the values were interpolated on the basis of the usual pattern of H<sub>2</sub> evolution.

Total light energy incident on the PhBR on that day = 4,669,000 joules.

$$\text{Efficiency of light energy conversion} = \frac{6,610}{4,669,000} \times 100 = 0.142\%$$

##### B. Calculations for 21 July 1998

On this day there was no bright sunshine, yet the temperature was mild. The culture was still active in H<sub>2</sub> production.

Total vol. of H<sub>2</sub> produced during the day = 254 ml

Energy equivalent = 2,938 joules

Total light energy (measured) incident on the Bioreactor surface = 863,540 joules

$$\text{Efficiency} = \frac{2,838}{863,540} \times 100 = 0.329\%$$

The conversion efficiency, as one can expect, is higher in low light compared to that in high light insolation.

We feel that the above efficiency values are underestimated. Firstly, in recording the radiation falling on the bioreactor surface we assumed that the light passing in between the PVC coils is incident on the PhBR. Ignoring this may increase the real efficiency by a factor of 3 to 5%. Secondly the transparency of the PVC tubing decreases gradually as the time progresses (due to the UV light action on the PVC and minute amounts of cyanobacterial biofilm deposited on the walls). This particular experiment was started on the first week of July and the PhBR was in operation for more than two weeks. It is possible to more than double the efficiency using a higher grade (if available) tubing and eliminating completely biofilm adhesion on the inner walls.

#### *Note*

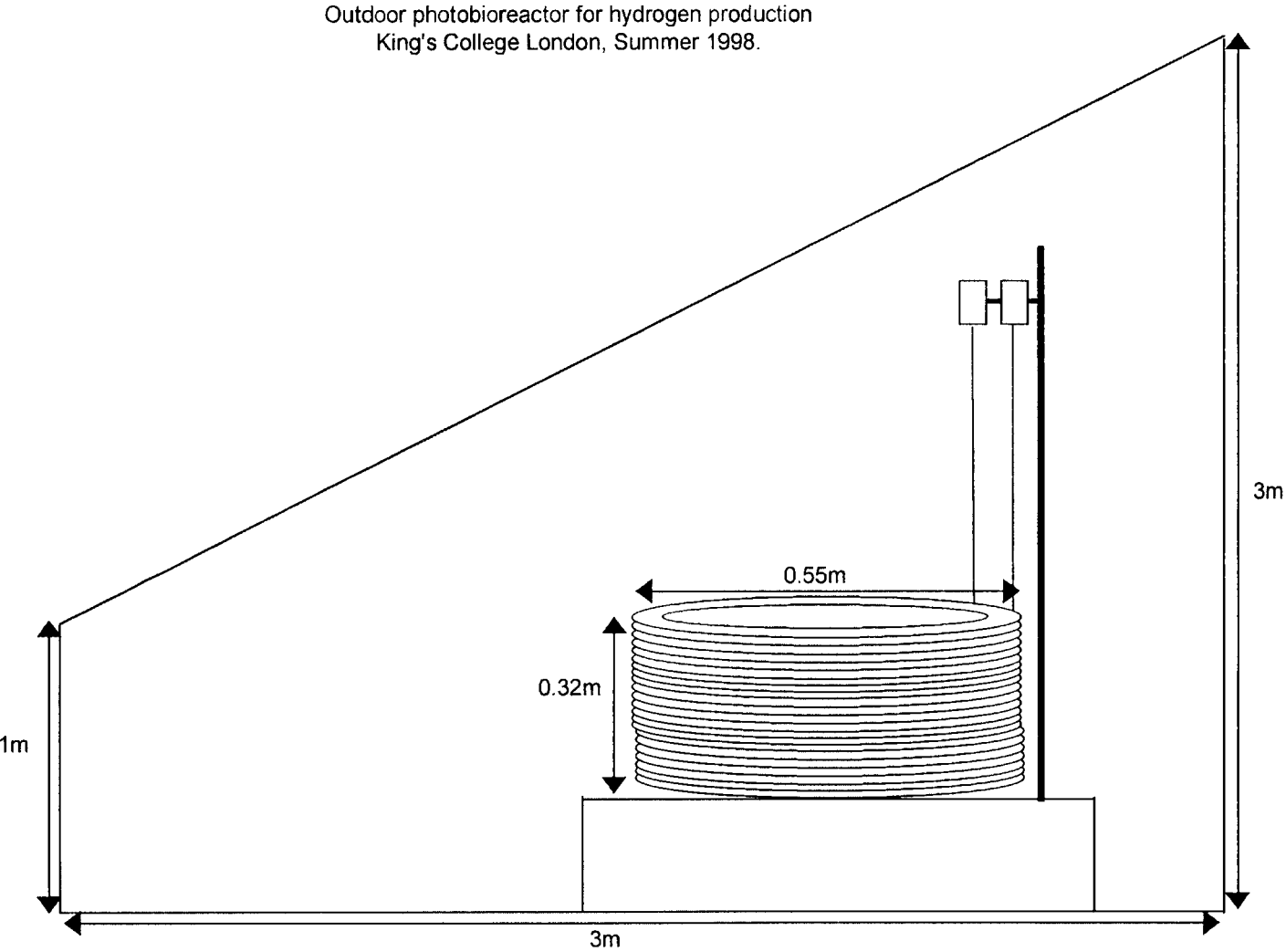
The outdoor photobioreactor for H<sub>2</sub> production by *Anabaena variabilis* PK84 was operated under normal day-night conditions and unlike the bench top bioreactor was never optimised for maximum H<sub>2</sub> production.

#### **Efficiency of light utilisation towards H<sub>2</sub> production by *Anabaena variabilis* PK84 in the indoor photobioreactor**

Hydrogen production rates were studied in the laboratory PhBR under various experimental conditions such as light intensity, cell density and most importantly the gas phase. For comparison with the performance of the PhBR outdoors we will consider only the data obtained with *Anabaena variabilis* mutant grown in air + CO<sub>2</sub> (the same gas phase used outdoors). When grown under air + CO<sub>2</sub>, the mutant PK84 utilised only 13% of its oxygenic photosynthetic energy for H<sub>2</sub> production (see Ms. by Tsygankov *etal* 1998, attached). Assuming that the energetic efficiency of plant type photosynthesis is 9% under optimal growth conditions (Bolton & Hall, Photochem. Photobiol. 53: 545, 1991) the maximum efficiency of light energy conversion into H<sub>2</sub> in the indoor bioreactor was  $0.13 \times 0.09 \times 100 = 1.17\%$ .

As can be seen from the Ms. this value can be exceeded in the laboratory by replacing air with argon and choosing the optimum light intensity.

Fig. 5 X-Section of Outdoor Reactor & Housing



**SECTION 5.           REPORTS PRESENTED TO THE RITE GROUP  
DURING THEIR VISIT TO KING'S COLLEGE  
LONDON ON 10<sup>th</sup> JULY 1998.**

**5a.   RITE Photobiological H<sub>2</sub> Production (1992-98)**

**Re-entrustment Contractor: King's College London**

**Fundamental research results on cyanobacterial H<sub>2</sub> metabolism**

1.   Immobilisation of cells on polymers and hollow fibres. Physiological and morphological characteristics of free and immobilised cells of *Anabaena* and *Nostoc* spp.
2.   H<sub>2</sub> metabolism and nitrogenase activities of cells cultures in Mo M $\delta$ , V+ and no Mo or V media. H<sub>2</sub> metabolism of *A. variabilis* mutant PK84 - possible explanations for increased H<sub>2</sub> evolution by the mutant.
3.   Engineering aspects of photobioreactor design. (a) Horizontal vertical/tubular reactors enclosing hollow fibres, (b) 'Air lift' mechanism for nutrient flow, (c) operation of 'chemostat'-type bioreactors, (d) assembly of helical tubular bioreactors made of PVC or Teflon, (e) Biofilm formation in the inner walls and technique to prevent the cell adhesion to the reactor, (f) withdrawal and measurement of products from the reactor, (g) correlation of optical density of the cells and chlorophyll *a* concentration, (h) development of 'twin' bioreactors for comparing activities of cells grown in 'specified' nutrient or 'ambience' differences etc.
4.   Factors affecting H<sub>2</sub> production in 'batch' and 'bioreactor'-cultured cyanobacteria. Cell density and age, dilution rate, light intensity and duration, temperature, pH, ambient environment e.g. partial vacuum, argon, enriched CO<sub>2</sub>, N<sup>+</sup>C<sup>-</sup> starvation etc.
5.   Development of computer-automation of the bioreactor operation. Hardware and software, data logging etc.
6.   Method for determination of light conversion efficiencies in bioreactors.

***Collaborations and Funding other than RITE:***

- The Royal Society, UK
- INTAS, Brussels
- King's College London Research Fund
- IEA, Annex 10, Biological H<sub>2</sub> production
- EU COST Action 812: Hydrogenases in Biotechnology & Agriculture

## 5b. RITE Photobiological Hydrogen Production (1992-98)

Re-entrustment Contractor: King's College London

### Milestones in R & D on cyanobacterial H<sub>2</sub> production

- 1992: Introduced the concept of using cyanobacterial cell immobilisation on hydrophilic and hydrophobic hollow fibres for the development of photobioreactors to produce H<sub>2</sub>.
- 1993-94: Demonstrated the potential of *Anabaena variabilis* immobilised in hollow fibres in the construction of photobioreactors and in the continuous production of H<sub>2</sub> coupled to CO<sub>2</sub> consumption. Continuous operation of two-phase system of H<sub>2</sub> production/biomass synthesis achieved for more than one year.  
Determination of the efficiency of conversion of light energy to combustion energy of H<sub>2</sub> by *A. variabilis* immobilised on polysulfone hollow fibres in a minireactor enclosed in a light-integrating Ulbright Sphere; calculated efficiency = 3.2%.
- 1994-95: Culturing and isolation of free-living cell filaments of the terrestrial cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* from the polysaccharide sheath of the dry cells. Demonstration of the high H<sub>2</sub> production capacity of this 'novel' strain of cyanobacterium.
- 1995-96: Development of chemostat-bioreactors for H<sub>2</sub> production by filaments of *N. flagelliforme*.  
Culturing of *A. variabilis* ATCC 29413 in V-enriched medium. Demonstration of enhanced H<sub>2</sub> production performance of V-grown cells (with V-nitrogenase) compared to the normal Mo-grown cells under identical growth and assays.  
Assembly of 'air-lift' bioreactors for H<sub>2</sub> production using free and hollow fibre-immobilised *A. variabilis* cells.  
Preliminary studies of H<sub>2</sub> production activities of mutant strains PK84 and PK17R of *A. variabilis* 29413. Mutants deficient in uptake hydrogenase.
- 1996-97: Construction of a bench-top automated helical tubular bioreactor with computer control of growth parameters and data collection. Sustained H<sub>2</sub> production in the bioreactor by *A. variabilis* PK84 under anaerobic and aerobic conditions. First report of H<sub>2</sub> photoproduction in air environment by a cyanobacterium viz *A. variabilis* PK84 (presented at Biohydrogen 1997, Hawaii). Suggestions for scale up of the reactor.
- 1997-98: Optimisation of H<sub>2</sub> production by PK84 in the continuous flow helical reactor. Comparison of H<sub>2</sub> production rates in argon and in air + CO<sub>2</sub>. Comparison of H<sub>2</sub> production activities of *Synechococcus* strain Miami BG043511 (Hawaii culture collection) with *A. variabilis* PK84.
- 1998:  
(In progress) Determination of hydrogenase activities (H<sub>2</sub> consumption and H<sub>2</sub> evolution) of *Synechococcus* 043511. Possible construction of chemical mutants with impaired H<sub>2</sub> uptake activity.  
Assembly and operation of the photobioreactor outdoors.

### 5c) RITE Photobiological H<sub>2</sub> Production (1992-98)

H<sub>2</sub> production by cyanobacteria. Data obtained at Kings' College London 1992-98.

| Organism used                                                     | H <sub>2</sub> production rate                                            | Comments                                                                                                                                                                       | Reference                    |
|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| <i>Anabaena variabilis</i><br>(Kurzing)<br><i>Nostoc muscorum</i> | 1 ml/mg chl a/h                                                           | H <sub>2</sub> production under partial vacuum glass reactor containing cyanobacteria immobilised in hollow fibre. Production phase lasted 6h.                                 | Markov <i>et al</i> 1992     |
| <i>A. variabilis</i>                                              | 0.2 ml/mg dw/h                                                            | Maximum rate, hollow fibre reactor, partial vacuum, lasted for 5 months.                                                                                                       | Markov <i>et al</i> 1993     |
| <i>A. variabilis</i>                                              | 20 ml/g dw/h                                                              | H <sub>2</sub> production coupled to CO <sub>2</sub> (5%) consumption. Photobioreactor ran continuously for 1 years.                                                           | Markov <i>et al</i> 1995     |
| <i>N. flagelliforme</i>                                           | 84 mmol/mg chl a/h<br>43 ml/g dw/h<br>510 ml/day/litre                    | Maximum rates obtained in chemostat cultures under optimised dilution, temperature + N <sub>2</sub> and CO <sub>2</sub> concentrations                                         | Lichtl <i>et al</i> 1997     |
| <i>A. azollae</i>                                                 | 13 ml H <sub>2</sub> /h/litre                                             | Suspension of culture in a photobioreactor                                                                                                                                     | Tsygankov <i>et al</i> 19997 |
| <i>A. variabilis</i><br>wild type and mutant PK84                 | 1.6 µmol/mg protein/h<br>7.0 - ditto -<br>3.1 - ditto -<br>12.6 - ditto - | <i>A. variabilis</i> ATCC 29413 wild type (WT).<br><i>A. variabilis</i> mutant PK84.<br><i>A. variabilis</i> WT under N <sub>2</sub> starvation.<br><i>A. variabilis</i> PK84. | Sveshnikov <i>et al</i> 1997 |
| <i>A. variabilis</i><br>29413                                     | 45 µmol/mg chl a/h<br>64 - ditto -                                        | Cells grown in the normal Mo medium in a cylindrical PhBR.<br>Cells grown in Mo deficient, V-enriched medium in a PhBR.                                                        | Tsygankov <i>et al</i> 1997  |
| <i>A. variabilis</i><br>PK84                                      | 81 µmol/mg chl a/h<br>190 - ditto -                                       | Helical tubular bioreactor, continuous light in air + 2% CO <sub>2</sub><br>tubular bioreactor in argon.                                                                       | Borodin <i>et al</i> 1998    |
| <i>Synochococcus</i><br>Miami 043511                              | 320 µmol/mg chl a/h                                                       | Non-synchronised cells, continuous day/night cycles in argon. Rates compare with 540 µmol/mg chl a/h obtained by Mitsui <i>et al</i> .                                         | Borodin <i>et al</i> 1998    |

## **SECTION 6. CONCLUSIONS AND FUTURE POTENTIAL FOR BIOHYDROGEN.**

A summary of the basic information gained, milestones crossed, and key data collated on H<sub>2</sub> production from different cyanobacterial strains, under various experimental conditions, during the past 6 years of research at KCL was presented to the RITE Technical Experts who visited KCL on the 10th July 1998 (section 6 of this Final Report). In the past 6 months research was focused on the assembly and operation of the 'outdoor' PhBR. Although London did not enjoy a good summer in 1998, our results from the performance of the outdoor reactor show conclusively that PhBRs erected outdoors have the potential to photoproduce H<sub>2</sub> for long periods of time. The essential requirements are reasonably fair sunshine ( $300 \pm 100 \text{ W m}^{-2}$ ) and temperature ( $30 \pm 5^\circ\text{C}$ ). Operations such as sensing the internal (pH, [O<sub>2</sub>], t °C) and external (light, medium flow rate) parameters of the PhBR, and data storage were done by computer automation. We have purchased a sensor for online measurement of biomass in the reactor: it is possible to modify our gas chromatography to measure continuously the H<sub>2</sub> content of the effluent gas from the reactor. It is our objective to introduce these modifications in a scale-up PhBR and operate it in a sunnier climate, e.g. in Spain.

The low efficiency of light to H<sub>2</sub> energy conversion (approx 0.3%) obtained in the 'pilot' outdoor PhBR is a drawback for the immediate adaptation of the H<sub>2</sub> PhBR for commercial application. However, further improvements in the PhBR construction materials and design would undoubtedly improve the efficiency for outdoor operation.

Previously H<sub>2</sub> production, in any significant amount, from cyanobacteria was observed only from cells grown in argon or in a microaerobic environment. Our finding, in early 1997, that *A. variabilis* mutant PK84 can evolve H<sub>2</sub> continuously in CO<sub>2</sub>-enriched air was a 'breakthrough' in cyanobacterial H<sub>2</sub> production research. This discovery considerably reduced the cost of biological H<sub>2</sub> production in "Economic Analyses" of the Project.

What future for Biohydrogen? There are two diverse groups of proponents for biological H<sub>2</sub> production via the use of oxygenic photosynthetic organisms. One group, which includes us, advocates cyanobacteria as the choice of organisms for

water photolysis to  $H_2$ . In filamentous  $N_2$  fixers,  $H_2$  evolution is a by-product of nitrogenase activity; however, the  $H_2$  evolved is mostly consumed by a membrane-bound uptake hydrogenase. Future research should concentrate on the procurement of strains with higher nitrogenase activity (either through screening the natural population or by genetic modification and breeding of existing strains). Genetic engineering of nitrogenases is in progress in a number of laboratories. Our studies with *A. variabilis* ATCC 29413 mutant PK84 have shown that blocking (by deletion or inhibition) the uptake hydrogenase activity allows the cells to produce  $H_2$  in air in a photobioreactor rather than in much more expensive argon.

*Synechococcus* BGD43511 photoproduces  $H_2$  in argon (but not in air) at rates more than twice that from *A. variabilis* PK84. We have identified a reversible hydrogenase in this unicellular organism and have, in collaboration with Prof. Shestakov of Moscow State University, initiated studies to generate mutant strains deficient in  $H_2$  uptake activity. These mutant strains of *Synechococcus* and mutants of *A. variabilis* other than PK84, may prove to be better  $H_2$  producers in air than PK84 which we have used in our PhBR.

An interesting line of research which is in progress in Japan is to introduce the highly active "iron hydrogenase" of *Clostridium pasteurianum* into cyanobacterial cells by genetic transformation and grow successive generations of cyanobacteria incorporating this bacterial hydrogenase. Research on genetic engineering of cyanobacteria should precede or at least coincide with those for solving technical problems such as separation and storage of  $H_2$  and costing land and water availability.

The second group of proponents advocate the use of green algae; e.g. *Chlamydomonas* and *Scenedesmus* spp in biological  $H_2$  production systems. A singular advantage of green algae over cyanobacteria is that the algal  $H_2$  production from water is catalysed by a reversible hydrogenase. This hydrogenase is induced when the cells are grown anaerobically so no waste of photosynthetic energy occurs as is the case with cyanobacterial ATP-dependent, nitrogenase-mediated,  $H_2$  production. However, against this advantage should be considered the relatively lower  $H_2$  evolution activity of algal hydrogenases and their extreme sensitivity to oxygen. Still,

we should continue this line of research along with H<sub>2</sub> production from photosynthetic bacteria until we identify the optimal system for large-scale H<sub>2</sub> production.

Simultaneously, in conjunction with biological H<sub>2</sub> production from phototrophs, research on hybrid photobiological (PC) and photoelectrochemical (PEC) systems incorporating isolated biological components (photosystems, chromatophores, hydrogenase, etc) coupled to semiconductors (Ti O<sub>2</sub>, CdS, etc) and photosensitisers (ruthenyl dyes) should also be encouraged.

There is no doubt in our minds that considerable progress has been made in the last two decades towards our goal of producing biological H<sub>2</sub> as a supplementary fuel. We should be able to reach the goal within two decades.

Organisations such as RITE (NEDO) Japan, DOE (USA), EU (through their PB/PC/PEC H<sub>2</sub> and renewable energy programmes), IEA (Annex 10), and other state-wide R&D programmes have provided financial support and encouragement for H<sub>2</sub> research in the past. The Scientific Community hopes to receive continued support in the future from these organisations and also from industrially-oriented organisations.

## **SECTION 7.        REPRINTS AND PREPRINTS OF PUBLICATIONS.**

### **Papers included:**

1. Rao & Hall (1998)
2. Rao et al. (1999)
3. Sveshnikov et al. (1997)
4. Tsygankov et al. (1998)
5. Tsygankov et al. (1997)
6. Tsygankov et al. (1998)
7. Tsygankov et al. (1999)
8. Borodin et al. (1999)

See below for these papers:

## **EU Cost Action 818 Hydrogenases and Environmental Biotechnology Annual report for 1997-98**

**K K Rao/D O Hall**  
**King's College London**  
**London W8 7AH**

**UK Management Committee Member**  
**Member Working Group 5**

Research on the biotechnology of  $H_2$  production by cyanobacteria was continued using *Anabaena variabilis* ATCC 29413 and its chemical mutant PK84 and *Synechococcus*.

### **1. Assembly of outdoor photobioreactor**

Following our success in sustained  $H_2$  production by *A. variabilis* mutant PK84 in automated benchtop photobioreactors, a similar photobioreactor was assembled outdoors.  $H_2$  production was studied in the outdoor photobioreactor during the summer months, July-October 1998. The mutant PK84 cells were cultivated in Vanadium-enriched medium, in  $CO_2$ -enriched air and the  $H_2$  evolution was monitored by gas chromatography. Hydrogen evolution rates were dependent on insolation and varied with ambient temperature and cell density. Sustained  $H_2$  production, in light, was observed for a number of weeks. The photobioreactor can be scaled up and the whole process has potential for installing  $H_2$  production systems.

### **2. $H_2$ production by *Synechococcus* sp. Miami BG 43511 (HCC 1134)**

The unicellular aerobic marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. Miami BG 43511 (Mitsui collection) was obtained from the Hawaii Culture Collection (HCC 1134) and used for studies on nitrogenase and hydrogenase and associated  $H_2$  evolution. This organism has been reported to have a very high  $H_2$  photoproduction capability during the synchronous phase of growth. Our studies showed that *Synechococcus* HCC 1134 during its growth exhibit reciprocal 24h cyclic changes in net  $O_2$  and  $H_2$  evolution.  $H_2$  production was observed only in an argon atmosphere. The presence of reversible and uptake hydrogenase activities in the organism was shown by biochemical (London) and polarographic (by courtesy of P Lindblad et al. Uppsala) analyses.

We are grateful to COST 818 for awarding a short-term scientific mission fellowship to Dr A A Tsygankov, ISSP, Pushchino to work on this project.

Other researchers: Dr V Borodin & A Fedorov, Institute for the Study of Basic Biological Problems, RAS, Pushchino, Russia. Supported by RITE, Japan.

## H<sub>2</sub> PHOTOPRODUCTION BY *ANABAENA VARIABILIS* ATCC 29413 AND ITS MUTANT PK84 IN INDOOR AND OUTDOOR PHOTOBIOREACTORS

K K Rao, A A Tsygankov, V Borodin, A Fedorov, D O Hall  
King's College London, London, W8 7AH, UK

Heterocystous N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria evolve H<sub>2</sub> as a by product of their nitrogenase activity, during photo-autotrophic growth; this process has potential for the development of large scale photobiological H<sub>2</sub> production systems. *Anabaena variabilis* ATCC 29413 and its mutant PK84 (generated by L E Mikhceva and S V Shestakov, Moscow State University) impaired in uptake hydrogenase were used for H<sub>2</sub> production under laboratory and outdoor conditions. The studies were performed with cells grown in Mo-deficient, V-enriched medium in automated computer-controlled helical photobioreactors (PhBR), 4.35l vol, made of polyvinyl chloride tubing. Indoors the cultures were illuminated by fluorescent lamps while outdoors (during July-October 1998) the cultures received only natural light.

During growth of the cells indoors in 98% Ar+ 2% CO<sub>2</sub>, 61% and 66% of oxygenic photosynthetic energy were realised in H<sub>2</sub> production by the native and PK84 strains respectively. In contrast to the native strain, the mutant was able to liberate H<sub>2</sub>, albeit at a lower rate, during growth in CO<sub>2</sub>-enriched air. The maximum rate of H<sub>2</sub> production was more than one litre per day per reactor volume. H<sub>2</sub> production rate was sustained in the indoor PhBR during months of continuous operation.

H<sub>2</sub> production in the outdoor PhBR by PK84 grown only in CO<sub>2</sub>-enriched air was dependent on daylight, temperature and cell density; these data will be presented. The PhBR was maintained in continuous operation during summer weeks.

Supported by RITE, Japan and COST 818.

## Hydrogen metabolism of mutant forms of *Anabaena variabilis* in continuous cultures and under nutritional stress

D.A. Sveshnikov<sup>a</sup>, N.V. Sveshnikova<sup>b</sup>, K.K. Rao<sup>a</sup>, D.O. Hall<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Division of Life Sciences, King's College London, Campden Hill Road, London W8 7AH, UK

<sup>b</sup> Department of Plant Physiology, Biological Faculty, M.V. Lomonosov Moscow State University, Vorobyevy Gory, 119899 Moscow, Russian Federation

Received 20 September 1996; revised 10 December 1996; accepted 20 December 1996

### Abstract

Nitrogenase activity and H<sub>2</sub> evolution were studied in two mutants of the cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413 which are impaired in molecular H<sub>2</sub>-related metabolism. Evidence was obtained that mutants deficient in uptake and reversible hydrogenases were suitable for biotechnological research on H<sub>2</sub> production. H<sub>2</sub> production by the mutant PK84 in continuous cultures was 4.3 times higher compared to the wild-type. Enhancement in H<sub>2</sub> evolution by all the cultures under N<sub>2</sub> (1.8–1.9 times) and CO<sub>2</sub> starvation (1.4–1.5 times) was observed.

**Keywords:** Hydrogen metabolism; *Anabaena variabilis*; Mutant form

### 1. Introduction

H<sub>2</sub> production using biological materials is one of the goals of renewable energy technology. H<sub>2</sub> evolution is a conservative process inherent in most N<sub>2</sub>-fixing microorganisms and involves the two enzymes – nitrogenase and reversible hydrogenase [1]. Cyanobacteria are suited for biotechnological H<sub>2</sub> production as they are the only photoautotrophic N<sub>2</sub>-fixers capable of producing molecular H<sub>2</sub> with H<sub>2</sub>O as the electron source and they are stable towards various stress factors [2–7].

Several species of cyanobacteria are presently being used in H<sub>2</sub> photoproduction research and development, *Anabaena variabilis* among them [8]. In

addition to simple selection of the strains, genetic methods are being applied to create mutants with altered nitrogenase or hydrogenase systems for enhanced H<sub>2</sub> production capacity. Furthermore, physiological manipulation can be used for optimising H<sub>2</sub> production [9].

Nitrogenase activity and H<sub>2</sub> production in three strains of *A. variabilis* (the wild-type and two mutant forms) are presented here using continuous cultures during the exponential growth phase in a steady-state mode. This phase is characterised by the highest activities of the enzymes involved in H<sub>2</sub> metabolism and is of interest for the practical cultivation of various cyanobacterial species [5,6,8,10,11]. In the present research CO<sub>2</sub> or N<sub>2</sub> starvation was used to establish the possibility of regulation of the H<sub>2</sub> metabolism of *A. variabilis* both for basic knowledge and as a background for applied biotechnology.

\* Corresponding author. Fax: +44 (171) 333 4500.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacteria used

Three strains of the cyanobacterium *A. variabilis* ATCC 29413 were used: the wild-type (the initial form) and two new chemically generated mutant forms, PK84 and PK17R, provided by Professor S.V. Shestakov and Dr. L.A. Mikheeva of Moscow State University, Department of Genetics. The mutations affected regulation of the enzymes of  $H_2$  metabolism, thereby enhancing yields of molecular  $H_2$  evolution. Reversible hydrogenase activity was impaired in the mutant PK84, and both forms were deficient in uptake hydrogenase [12]. However, physiological parameters such as nitrogenase activity, growth rates, heterocyst frequency, etc. were similar in all three forms [12].

### 2.2. Growth conditions

Continuous growth of the cyanobacteria was carried out in thermostated 350 ml glass bioreactors equipped with a pH-control system and permanently illuminated with daylight fluorescent lamps at a limiting light intensity of  $90 \mu E m^{-2} s^{-1}$  [13]. The dilution rate was  $0.03 h^{-1}$ . The gas mixture contained 25%  $N_2$ , 2%  $CO_2$ , and 73% Ar. Total gas flow was  $250 ml min^{-1}$ . Metabolic stress conditions were achieved by lowering the  $N_2$  content to 5% or switching off the  $CO_2$  supply. Modified nitrogen-free Allen and Arnon medium [14] was used for  $N_2$ -fixing growth. A pH of 7.5 was maintained automatically by addition of NaOH.

### 2.3. Heterocyst frequency, assays of chlorophyll, protein and enzyme activities

Heterocysts were counted visually under a microscope taking not less than 500 cells at a time. The frequency in Tables 1–3 is given in percent related to the total number of cells counted.

Chlorophyll content was determined in methanol extracts prepared by incubation of cells in 90% methanol for 3 min at  $75^\circ C$  [15]. An optical density ( $OD_{665}$ ) of 1 corresponded to  $13.4 \mu g Chl a ml^{-1}$  of the culture.

Protein content was determined by the method of Bradford [16]. One unit of optical density ( $OD_{595}$ ) corresponded to  $1.3 \mu g$  of protein  $ml^{-1}$ . All the reagents were the highest grades commercially available.

Enzyme activities in whole cells were determined by assaying  $H_2$  photoproduction and  $C_2H_2$  reduction. The gases were monitored by gas chromatography (Hewlett Packard 5890) after incubation of the samples in glass vials at  $30^\circ C$  for 30 min under daylight lamp fluorescent illumination ( $140 \mu E s^{-1} m^{-2}$ ). The gas phase for  $H_2$  evolution assay contained only Ar, whereas  $C_2H_2$  was added at 10% (v/v) for the  $C_2H_2$  reduction assay and the  $C_2H_4$  produced by nitrogenase was detected.

## 3. Results and discussion

Continuous cultivation is often used in biotechnology for maintaining cultures in the exponential phase of growth, obtaining higher yields of biomass and higher enzyme activity. We have chosen this method since the maximal activity of nitrogenase occurs during the exponential growth phase [8], and it is known that hydrogenase activities in the mutants increased

Table 1  
Growth parameters and enzymatic activity of continuous cultures of the wild-type (W.T.) and two mutants (PK84 and PK17R) of *Anabaena variabilis* (standard deviation did not exceed 10 % of the values)

| Strain | Heterocysts (%) | Chl ( $\mu g ml^{-1}$ ) | Protein ( $\mu g ml^{-1}$ ) | Dry weight ( $\mu g ml^{-1}$ ) | $H_2$ production (nmol $\mu g prot^{-1} h^{-1}$ ) | $C_2H_2$ production (nmol $\mu g prot^{-1} h^{-1}$ ) |
|--------|-----------------|-------------------------|-----------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| W.T.   | 6.4             | 2.75                    | 34.4                        | 151                            | 1.62                                              | 2.84                                                 |
| PK84   | 6.8             | 3.07                    | 33.1                        | 145                            | 6.91                                              | 3.66                                                 |
| PK17R  | 6.6             | 2.93                    | 33.5                        | 148                            | 2.24                                              | 3.25                                                 |

Table 2

Maximal effect of nitrogen starvation (5% N<sub>2</sub>) upon growth parameters and enzymatic activity of the wild-type (W.T.) and two mutants (PK84 and PK17R) of *Anabaena variabilis* measured at 48 h after starting the treatment (standard deviation did not exceed 10% of the values)

| Strain | Heterocysts (%) | Chl (µg ml <sup>-1</sup> ) | Protein (µg ml <sup>-1</sup> ) | Dry weight (µg ml <sup>-1</sup> ) | H <sub>2</sub> production (nmol µg prot. <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) | C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> production (nmol µg prot. <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) |
|--------|-----------------|----------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| W.T.   | 10.2            | 1.93                       | 28.4                           | 121                               | 3.07                                                                     | 6.32                                                                                    |
| PK84   | 10.0            | 2.12                       | 28.2                           | 116                               | 12.60                                                                    | 6.44                                                                                    |
| PK17R  | 10.0            | 2.03                       | 29.3                           | 118                               | 4.10                                                                     | 6.32                                                                                    |

at later stages of growth [12]. The wild-type and two mutants were maintained for not less than three doubling times in chemostats as light-limited continuous cultures in order to establish equivalent conditions for the cultures before the treatment with low levels of N<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>.

### 3.1. Growth parameters in continuous cultures

The data on biomass accumulation (dry weight), protein content, chlorophyll concentration and heterocyst frequency showed that both mutants did not exhibit any noticeable changes in their physiological properties compared to the wild-type while growing as continuous cultures under the same conditions (Table 1). The results were in agreement with the preliminary data obtained for the strains in batch cultures [12] and confirmed the viability of the mutants.

### 3.2. Hydrogen metabolism

#### 3.2.1. Nitrogenase activity of the cells during continuous cultivation

Two aspects of the reducing function of nitrogenase were studied – the reduction of C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> (as a substrate equivalent to molecular N<sub>2</sub>) to C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> and molecular H<sub>2</sub> evolution.

The data showed clear differences between the three strains of *A. variabilis* in the quantitative yield of the gases produced by nitrogenase in continuous cultures (Table 1). Both mutant forms showed higher rates of H<sub>2</sub> evolution than the wild-type. The most pronounced differences were obtained between the mutant PK84 and the wild-type: this mutant evolved 4.3 times more H<sub>2</sub> than the wild-type (Table 1), whereas the amounts of H<sub>2</sub> evolved by the PK17R mutant strain differed from the wild-type by 1.4 times (Table 1).

In the case of C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> reduction (Table 1) the differences between the enzyme activities in different strains during continuous cultivation were less pronounced, although the nitrogenase activity in the mutants was still slightly higher than in the wild-type (about 1.2 times). The impaired H<sub>2</sub> uptake activity of hydrogenases [12] is thus the probable cause of the higher H<sub>2</sub> evolution rates observed in the mutants.

#### 3.2.2. The influence of nitrogen and carbon deficiency

Stress factors (including starvation by the main nutrients – carbon and nitrogen) can lead to a temporary increase of the activities of enzymes involved in the main metabolic pathways. This hypothesis was tested by placing the cyanobacteria under nutritional stress of N<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> starvation.

Table 3

Maximal effect of carbon starvation (0% CO<sub>2</sub>) upon growth parameters and enzymatic activity of continuous cultures of wild-type (W.T.) and two mutants (PK84 and PK17R) of *Anabaena variabilis* measured at 24 h after starting the treatment (standard deviation did not exceed 10% of the values)

| Strain | Heterocysts (%) | Chl (µg ml <sup>-1</sup> ) | Protein (µg ml <sup>-1</sup> ) | Dry weight (µg ml <sup>-1</sup> ) | H <sub>2</sub> production (nmol µg prot. <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) | C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> production (nmol µg prot. <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) |
|--------|-----------------|----------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| W.T.   | 7.2             | 1.76                       | 30.9                           | 136                               | 2.37                                                                     | 4.77                                                                                    |
| PK84   | 7.4             | 1.98                       | 29.5                           | 131                               | 10.85                                                                    | 5.30                                                                                    |
| PK17R  | 7.0             | 1.89                       | 29.9                           | 133                               | 3.39                                                                     | 5.52                                                                                    |

**3.2.2.1. Nitrogen deficiency:** After stable growth in continuous cultures had been reached the  $N_2$  content of the gas phase was decreased from 25% to 5%. This decrease in  $N_2$  supply produced its effect after 24 h with a maximal response after 48 h (Table 2). The nitrogenase activity increased rapidly with the patterns similar for each strain.  $H_2$  production was 1.9 times higher in the wild-type and about 1.8 times higher in PK84 and in PK17R. The patterns of  $C_2H_2$  reduction were also quite similar: 2.2 times increase in the wild-type, and about 1.8 times increase in both mutants (Table 2 versus Table 1).

All the other features – dry weight, protein content, chlorophyll concentration – decreased considerably 48 h after the beginning of the  $N_2$  starvation treatment (Table 2 versus Table 1). All these changes were reversible upon the addition of  $N_2$  to the gas phase and the cultures could restore all the measured parameters to the levels shown in Table 1.

These results show the possibility of the regulation of  $H_2$  metabolism in cyanobacteria by  $N_2$  supply in order to improve the efficiency of light energy conversion for  $H_2$  production.

**3.2.2.2. Carbon deficiency:** The procedure for changing the growth conditions in order to study carbon starvation was similar to that described for  $N_2$ . The carbon stress effect reached its maximum within 24 h after stopping the  $CO_2$  supply, but the rate of  $H_2$  evolution and  $C_2H_2$  reduction (Table 3) was somewhat lower than that achieved after 48 h of  $N_2$  deficiency (Table 2). With decreased  $CO_2$  the  $H_2$  evolution activity increased about 1.5 times in both the wild-type and the mutants. The  $C_2H_2$  reduction activity of the nitrogenase increased also, but to a lesser extent than that observed in the absence of  $N_2$  (a 1.5–1.7 times increase in the wild-type and in the mutants).  $CO_2$  depletion effects after 24 h resulted in an irreversible decrease in the other measured physiological parameters (Table 3 versus Table 1).

### 3.2.3. Conclusion

A comparison of the physiological effects of carbon and nitrogen stress on  $H_2$  metabolism in three strains of *Anabaena variabilis* indicated that the PK84 mutant is the most appropriate form for use in photobioreactors designed for  $H_2$  production. Deficiencies in  $N_2$  and  $CO_2$  resulted in substantial increases in  $H_2$  evolution activity. Continuous cultures

with optimal nitrogenase activity can be established for long-term  $H_2$  production.

### Acknowledgments

The project was supported by RITE (Japan), INTAS (Brussels) and the Royal Society (UK).

### References

- [1] Houchins, J.P. (1984) The physiology and biochemistry of hydrogen metabolism in cyanobacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 768, 227–256.
- [2] Bold, H.C. and Wynne, M.J. (1985) Introduction to the Algae. Structure and Reproduction, Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- [3] Fogg, G.E., Stewart, W.D.P., Fay, P. and Walsby, A.E. (1982) The Blue-green Algae. Academic Press, London.
- [4] Carr, N.G. and Whitton, B.A. (1982) The Biology of Cyanobacteria. Blackwell, Oxford.
- [5] Benemann, J.R. and Weare, N.M. (1974) Hydrogen evolution by nitrogen fixing *Anabaena cylindrica* cultures. *Science* 184, 174–175.
- [6] Lambert, G.R. and Smith, G.D. (1981) The hydrogen metabolism of cyanobacteria (blue-green algae). *Biol. Rev.* 56, 589–660.
- [7] Smith, G.D., Ewart, G.D. and Tucker, W. (1992) Hydrogen production by cyanobacteria. *Int. J. Hydrogen Energy* 17, 695–698.
- [8] Markov, S.A., Bazin, M.J. and Hall, D.O. (1995) The potential of using cyanobacteria in photobioreactors for hydrogen production. *Biochem. Eng. Biotechnol.* 52, 61–86.
- [9] Sasikala, K., Ramana, C.V. and Rao, P.R. (1991) Environmental regulation for optimal biomass yield and photoproduction of hydrogen by *Rhodospirillum rubrum* O.U. 001. *Int. J. Hydrogen Energy* 16, 597–601.
- [10] Jones, L.W. and Bishop, N.I. (1976) Simultaneous measurement of oxygen and hydrogen exchange from the blue-green alga *Anabaena*. *Plant Physiol.* 57, 659–665.
- [11] Tapia, M.I., Deada, J.A.G.O., Llama, M.J. and Serra, J.L. (1996) Changes in intracellular amino acids and organic acids induced by nitrogen starvation and nitrate or ammonium re-supply in the cyanobacterium *Phormidium laminosum*. *Planta* 198, 526–531.
- [12] Mikheeva, L.E., Schmitz, O., Shestakov, S.V. and Bothe, H. (1995) Mutants of the cyanobacterium *Anabaena variabilis* altered in hydrogenase activities. *Z. Naturforsch.* 50, 505–510.
- [13] Tsygankov, A.A., Serebryakova, L.T., Sveshnikov, D.A., Rao, K.K., Gogotov, I.N. and Hall, D.O. (1997) Hydrogen photoproduction by three different nitrogenases in whole cells of *Anabaena variabilis* and the dependence on pH. *Int. J. Hydrogen Energy* (in press).

- [14] Castenholz, R.W. (1988) Culturing methods for cyanobacteria. *Methods Enzymol.* 167, 68–93.
- [15] Subramanian, G., Uma, L., Thajuddin, N., Prabakaran, D., Sekar, S., Sundararaman, M., Sophia Rajini, V. and Thangewaran A. (1992) *Manual of techniques in cyanobacterial research*. NFMC. Bharathidasan University. Tiruchirapalli.
- [16] Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.

## Acetylene reduction and hydrogen photoproduction by wild-type and mutant strains of *Anabaena* at different CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> concentrations

A.A. Tsygankov<sup>a,b,\*</sup>, L.T. Serebryakova<sup>a,b</sup>, K.K. Rao<sup>a</sup>, D.O. Hall<sup>a</sup>

<sup>a</sup> King's College London, Campden Hill Road, London W8 7AH, UK

<sup>b</sup> Institute of Soil Sciences and Photosynthesis RAS, Pushchino, Moscow Region, 142292, Russia

Received 3 August 1998; accepted 5 August 1998

### Abstract

Hydrogen photoproduction by growing cultures of *Anabaena variabilis* and *A. azollae* did not occur under air+CO<sub>2</sub> or argon+CO<sub>2</sub> atmospheres at saturating light but did take place under argon alone. It was shown that CO<sub>2</sub> inhibited photoproduction of H<sub>2</sub> as a result of the photosynthetic production of O<sub>2</sub> whereas photoreduction of C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> by these cyanobacteria was not inhibited by O<sub>2</sub> concentrations up to 20% in the assay gas phase. In contrast to the wild type of *A. variabilis* and of *A. azollae*, H<sub>2</sub> photoproduction by the hydrogenase-impaired mutant *A. variabilis* PK84 showed only a slight dependence on O<sub>2</sub> concentration. Thus, in the wild-type *Anabaena* the decrease in the observed rate of H<sub>2</sub> evolution at elevated O<sub>2</sub> concentrations could be the result of an increase in hydrogenase-mediated uptake of H<sub>2</sub> via an oxyhydrogen reaction. © 1998 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Hydrogen metabolism; *Anabaena variabilis*; Mutant PK84; CO<sub>2</sub> influence on nitrogen fixation; O<sub>2</sub>-dependent H<sub>2</sub> uptake

### 1. Introduction

Much interest is being shown at present in developing biotechnological systems with cyanobacteria for the conversion of light energy into H<sub>2</sub>. However, for optimization of the process, the influence of gaseous substances present during growth (e.g. O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>) on H<sub>2</sub> photoproduction must be understood. Oxygen inactivates nitrogenase which is the main enzyme system involved in H<sub>2</sub> photoproduction.

However, cyanobacteria have developed different mechanisms for the prevention of this inactivation [1,2].

Carbon dioxide assimilation by heterocystous cyanobacteria occurs in vegetative cells whereas molecular nitrogen is fixed mainly in the heterocysts [2–4]. Nevertheless, the concentration of CO<sub>2</sub> has a complex interaction on nitrogenase activity and on H<sub>2</sub> production by heterocysts. Photosynthetic assimilation of CO<sub>2</sub> by vegetative cells of filamentous cyanobacteria produces the reductants which are ultimately required for nitrogen fixation and H<sub>2</sub> production [3]. However, it has been found that CO<sub>2</sub> starvation leads to enhancement of H<sub>2</sub> produc-

\* Corresponding author. Institute of Soil Sciences and Photosynthesis RAS, Pushchino, Moscow Region 142292, Russia. Fax: +7 (967) 790532; E-mail: tt@issp.serpukhov.su

tion and acetylene reduction (equivalent to  $N_2$  fixation) in *Anabaena variabilis* [5]. Moreover, elevated concentrations of  $CO_2$ , much above ambient, inhibited  $H_2$  production in cyanobacteria immobilized on hollow fibers [6].

The aim of the present work was a study of hydrogen photoproduction by *Anabaena azollae* and *Anabaena variabilis* in a photobioreactor under different gas mixtures. We show here that  $H_2$  photoproduction by *A. azollae* and *A. variabilis* did not occur at saturated light with argon+ $CO_2$  in the gas phase due to the presence of increased  $O_2$  in the medium. This  $O_2$  effect was not, however, seen with a mutant of *A. variabilis* which is deficient in uptake hydrogenase. It thus appears that the decrease in  $H_2$  photoproduction at increased  $O_2$  concentrations seen with wild-type *Anabaena* results from enhanced  $H_2$  uptake which occurs simultaneously with  $H_2$  evolution.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cyanobacteria

*A. azollae* originally isolated from the symbiotic association *Azolla pinnata* by Hoa (National center of Scientific Research, Hanoi, Vietnam), *Anabaena variabilis* ATCC 29413, and the chemically generated mutant *A. variabilis* PK84 (provided by Prof. S.V. Shestakov and Dr. L.E. Mikhieva of Moscow State University) were used in this study. The mutant *A. variabilis* PK84 is deficient in uptake hydrogenase and impaired in reversible hydrogenase activity [7].

### 2.2. Growth conditions

Modified nitrogen-free Allen and Arnon medium [8] with replacement of Mo by V [9] was used for growth of the cyanobacteria in continuous turbidostat culture in an automated helical photobioreactor made of PVC tubing with 10 mm inner diameter and 4.35 l volume [10]. Mo was replaced by V because V-nitrogenase containing cells showed high activity and stability in hydrogen photoproduction [9]. The cultures were grown at  $113 \mu E m^{-2} s^{-1}$  using daylight fluorescent lights, pH 7.0 (controlled by automated addition of 0.2 N NaOH),  $30^\circ C$ , with a gas mixture of 2%  $CO_2$ +98% air ( $0.5 l min^{-1}$ ). The steady state

concentration of biomass corresponded to  $12 \mu g Chl a ml^{-1}$  ( $0.8 mg dry weight ml^{-1}$ ).

The rate of hydrogen photoevolution in the photobioreactor was calculated on the basis of the  $H_2$  content in the output gas (measured by gas chromatography) and the gas flow rate.

### 2.3. $C_2H_2$ photoreduction and $H_2$ photoproduction assays

Acetylene photoreduction and  $H_2$  photoproduction assays were carried out in glass vials (14 ml) by incubation of the samples (2 ml) under daylight fluorescent lamp illumination ( $140 \mu E m^{-2} s^{-1}$ ) at  $30^\circ C$ . The gas phase contained Ar in the case of  $H_2$  photoproduction and 20%  $C_2H_2$  in Ar for  $C_2H_2$  reduction. The  $CO_2$  and  $O_2$  concentrations in the gas phase during the experiments were varied as indicated in the text and the figure legends. The gas phase was monitored by gas chromatography (Hewlett Packard 5890) and the rates of  $H_2$  and  $C_2H_2$  photoproduction were calculated on the basis of linear kinetics for the first 30 min.

Simultaneous measurements of  $H_2$  photoproduction (or  $C_2H_2$  reduction) and dissolved  $O_2$  concentration were performed in a chamber designed for  $O_2$  photoevolution measurement (DW2/2 unit, Hansatech, UK) closed at the top by Suba Seal stoppers, with illumination by a halogen lamp ( $200 \mu E m^{-2} s^{-1}$ ) and run at  $30^\circ C$ . The volume of the chamber was adjusted to 1.7 ml; 0.2 ml of cyanobacterial suspension was used. Simultaneously with monitoring of the gas phase for  $H_2$ , the concentration of dissolved  $O_2$  was recorded. Before the measurements, the chamber containing the cells was flushed with Ar for 10 min. In order to assay  $C_2H_2$  reduction,  $C_2H_2$  was added to the gas phase at a final concentration of 20%. The reaction was started by switching the light on. Since the dissolved  $O_2$  content changed during the course of the experiments, the rates of reaction were calculated for the period when the dissolved  $O_2$  was constant for 15 min. Standard deviation did not exceed 10% for  $C_2H_2$  and 15% for  $H_2$  measurements.

### 2.4. Chlorophyll measurements

The chlorophyll *a* content of the cells was deter-

mined spectrophotometrically at 665 nm in 90% methanol extracts [11].

### 3. Results and discussion

During batch cultivation under air+2% CO<sub>2</sub> or argon+2% CO<sub>2</sub> atmospheres, *A. azollae* and *A. variabilis* did not produce molecular hydrogen. Even under the argon+2% CO<sub>2</sub> atmosphere, the dissolved oxygen concentration in the culture was not less than 150 µM (data not shown). After the replacement of air+2% CO<sub>2</sub> by argon alone, *A. azollae* started to evolve hydrogen (Fig. 1). The pH increased, evidently due to CO<sub>2</sub> photoassimilation and degassing by argon, but stabilized after about 1 h. The dissolved O<sub>2</sub> concentration decreased and stabilized at 50 µM after pH stabilization. Hydrogen photoproduction increased rapidly during the decrease of dissolved O<sub>2</sub> but after stabilization of O<sub>2</sub> it increased slowly (Fig. 1). A similar pattern of H<sub>2</sub> photoproduction and O<sub>2</sub> concentration in the photobioreactor was obtained for *A. variabilis* ATCC 29413 (data not shown). It is possible that the absence of H<sub>2</sub> photoproduction under air+2% CO<sub>2</sub> or argon+2% CO<sub>2</sub> was the result of increased levels of dissolved O<sub>2</sub> due to photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation.

In order to check this possibility the influence of

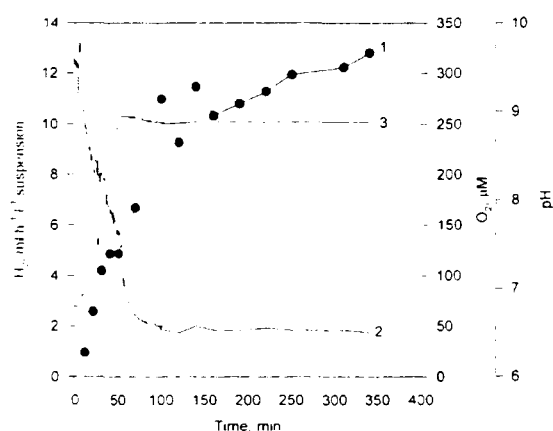


Fig. 1. H<sub>2</sub> production by the photobioreactor incorporating *A. azollae* grown in turbidostat culture. At the start (0 min) the turbidostat was switched to the uncontrolled regime ( $t = 30^\circ\text{C}$ ) and the gas phase was changed from 98% air+2% CO<sub>2</sub> to 100% argon (0.5 l min<sup>-1</sup>). 1: H<sub>2</sub>; 2: dissolved O<sub>2</sub>; 3: pH.

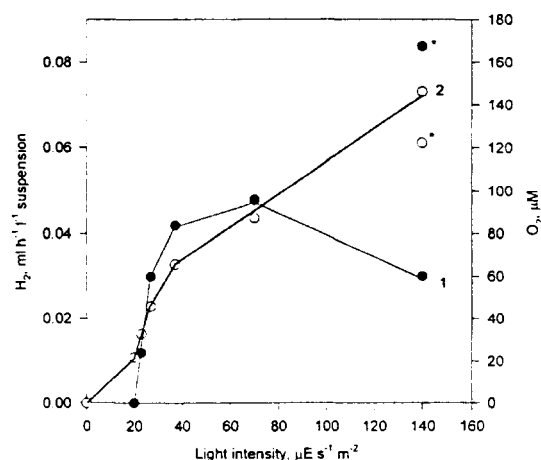


Fig. 2. H<sub>2</sub> production by the photobioreactor incorporating *A. azollae* as a function of light intensity. Gas phase: 98% argon+2% CO<sub>2</sub> (0.5 l min<sup>-1</sup>). Points indicated by asterisk were measured at the rate of argon flow 1.0 l min<sup>-1</sup>. 1: H<sub>2</sub>; 2: dissolved O<sub>2</sub>.

light intensity on H<sub>2</sub> photoproduction by *A. azollae* under an argon+2% CO<sub>2</sub> atmosphere was studied (Fig. 2). At an irradiance of 20 µE s<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup> there was 22 µM O<sub>2</sub> in the medium and no H<sub>2</sub> production. Increasing the irradiance resulted in an increase of H<sub>2</sub> photoproduction and dissolved O<sub>2</sub> in the medium. Increasing the light higher than 70 µE s<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup> resulted in a decrease of H<sub>2</sub> production and an increase in dissolved oxygen. After increasing the gas flow rate (2% CO<sub>2</sub> unchanged) from 0.5 to 1.0 l min<sup>-1</sup> at 140 µE s<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup> the O<sub>2</sub> concentration decreased due to increased dilution by the gas mixture (Fig. 2, point with asterisk) and the hydrogen production increased. This indicates that hydrogen photoproduction by *A. azollae* was inhibited in the presence of CO<sub>2</sub> due to photosynthetically produced O<sub>2</sub> but not by CO<sub>2</sub> itself.

In contrast to H<sub>2</sub> photoproduction, the rate of C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> reduction by *A. variabilis* ATCC 29413 and *A. azollae*, grown under nitrogen-fixing conditions with V<sub>2</sub>, was unchanged under atmospheres with 0–20% CO<sub>2</sub> (data not shown).

The rate of C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> reduction by *A. azollae* was constant with increasing O<sub>2</sub> concentration up to 280 µM (Fig. 3). However, the rate of H<sub>2</sub> photoproduction decreased when dissolved O<sub>2</sub> concentrations were higher than 30 µM and at 280 µM it was only 18% of the initial level.

The measured rate of  $H_2$  photoproduction by cyanobacteria is the net result of  $H_2$  formation by the nitrogenase system and  $H_2$  consumption by hydrogenase. The inhibition of  $H_2$  production by  $O_2$  is probably due either to inhibition of nitrogenase-catalyzed  $H_2$  production or to an increase of  $H_2$  uptake activity catalyzed by hydrogenase. To distinguish between these two possibilities we compared the influence of dissolved  $O_2$  on  $H_2$  photoproduction of *A. variabilis* ATCC 29413 and of the hydrogenase-deficient mutant of this cyanobacterium PK84 (Fig. 4).

Hydrogen photoproduction rates by *A. variabilis* wild type started to decrease at  $O_2$  concentrations higher than 40  $\mu M$ . At 315  $\mu M$   $O_2$  the rate of  $H_2$  photoproduction was 7% of the control (no added  $O_2$ ). Similar data have been reported by other authors for wild-type *Anabaena* [12]. However, in contrast, *A. variabilis* mutant PK84 showed  $H_2$  photoproduction rates not less than 75% of the control even at 315  $\mu M$  dissolved  $O_2$  (Fig. 4).

It is important to note that the rate of  $C_2H_2$  reduction by cells of both *A. variabilis* wild type and mutant PK84 did not depend on the dissolved  $O_2$  concentration up to at least 315  $\mu M$  (Fig. 4), thus supporting the conclusion that  $H_2$  uptake does not protect nitrogenase from inactivation by  $O_2$  in *Anabaena* [13].

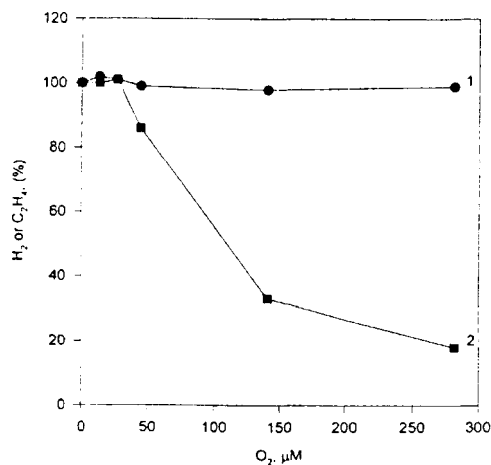


Fig. 3. The influence of dissolved  $O_2$  on photoproduction of  $C_2H_2$  (1) and  $H_2$  (2) by *A. azollae*. The suspension contained 12  $\mu g$  chlorophyll *a*  $ml^{-1}$  in each case. 100% activity corresponded to 10.3  $ml\ h^{-1}\ l^{-1}$  suspension (38.5  $nmol\ h^{-1}\ \mu g^{-1}$  chlorophyll *a*) for  $H_2$  photoproduction and 35  $nmol\ h^{-1}\ \mu g^{-1}$  chlorophyll *a* for  $C_2H_2$  reduction.

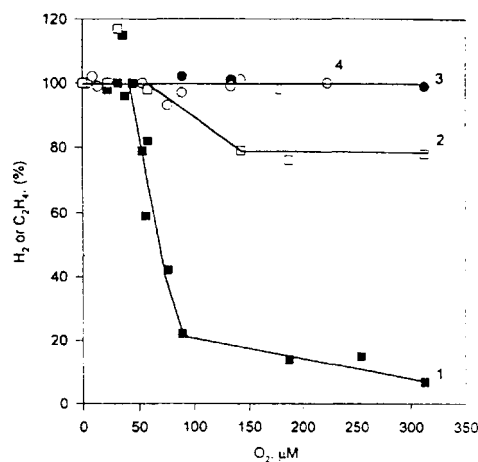


Fig. 4. The rate of  $H_2$  photoproduction (1, 2) and  $C_2H_2$  reduction (3, 4) by *A. variabilis* ATCC 29413 (1, 3) and the mutant PK84 (2, 4) as a function of dissolved  $O_2$  concentration. 100% activity corresponded in the case of  $H_2$  photoproduction: ATCC 29413, 12.0  $ml\ h^{-1}\ l^{-1}$  suspension (39.4  $nmol\ h^{-1}\ \mu g^{-1}$  chlorophyll *a*); PK84, 10.5  $ml\ h^{-1}\ l^{-1}$  suspension (32.3  $nmol\ h^{-1}\ \mu g^{-1}$  chlorophyll *a*); and for  $C_2H_2$  reduction: ATCC 29413, 10.8  $ml\ h^{-1}\ l^{-1}$  suspension (35.6  $nmol\ h^{-1}\ \mu g^{-1}$  chlorophyll *a*); PK84, 8.3  $ml\ h^{-1}\ l^{-1}$  suspension (25.4  $nmol\ h^{-1}\ \mu g^{-1}$  chlorophyll *a*).

To conclude, our results show that the apparent decrease of  $H_2$  photoproduction by wild-type *A. variabilis* (and most probably also by *A. azollae*) in response to increased  $O_2$  concentrations (in photobioreactor and vials) is the result of increased  $H_2$  uptake via hydrogenase in an oxyhydrogen reaction [1,2]. Evidently, at low  $O_2$  concentrations the rate of  $H_2$  uptake by cyanobacteria with hydrogenase is limited by  $O_2$  availability. The  $O_2$  concentration may be increased by direct addition of  $O_2$  (Figs. 3 and 4) or by illumination of the cyanobacteria with  $CO_2$  (as in the photobioreactor). Our data provide an explanation for the light-stimulated  $H_2$  uptake activity found in cyanobacteria [14,15].

#### Acknowledgments

This work was supported by RITE (Japan), INTAS (Brussels) and Royal Society (UK). The authors wish to thank Prof. S.V. Shestakov and Dr. L.E. Mikheeva for the kind gift of *A. variabilis* PK84.

## References

- [1] Fay, P. (1992) Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiol. Rev.* 56, 340–373.
- [2] Gallon, J.R. (1992) Reconciling the incompatible:  $N_2$  fixation and  $O_2$ . *New Phytol.* 122, 571–609.
- [3] Winklenbach, F. and Wolk, C.P. (1973) Activities of enzymes of the oxidative and reductive pentose phosphate pathways in heterocysts of blue-green alga. *Plant Physiol.* 52, 480–483.
- [4] Wolk, C.P. (1996) Heterocyst formation. *Annu. Rev. Genet.* 30, 59–78.
- [5] Sveshnikov, D.A., Sveshnikova, N.V., Rao, K.K. and Hall, D.O. (1997) Hydrogen metabolism of mutant forms of *Anabaena variabilis* in continuous cultures and under nutritional stress. *FEMS Microbiol. Lett.* 147, 297–301.
- [6] Markov, S.A., Bazin, M.J. and Hall, D.O. (1995) The potential of using cyanobacteria in photobioreactors for hydrogen production. *Biochem. Eng. Biotechnol.* 52, 61–86.
- [7] Mikheeva, L.E., Schmitz, O., Shestakov, S.V. and Bothe, H. (1995) Mutants of the cyanobacterium *Anabaena variabilis* altered in hydrogenase activities. *Z. Naturforsch.* 50, 505–510.
- [8] Allen, M.B. and Arnon, D.I. (1955) Studies on nitrogen-fixing blue-green algae. I. Growth and nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica*. *Lemm. Plant Physiology.* 30, 366–372.
- [9] Tsygankov, A.A., Serebryakova, L.T., Sveshnikov, D.A., Rao, K.K., Gogotov, I.N. and Hall, D.O. (1997) Hydrogen photoproduction by three different nitrogenases in whole cells of *Anabaena variabilis* and the dependence on pH. *Int. J. Hydrogen Energy* 22, 859–867.
- [10] Tsygankov, A.A., Hall, D.O., Liu, J.G. and Rao, K.K. (1998) An automated helical photobioreactor incorporating cyanobacteria for continuous hydrogen production. In: *Biohydrogen-97*, Proc. Int. Conference, Hawaii, June, 1997 (Zaborsky, O.R., Ed.). Plenum Press, New York, NY, in press.
- [11] McKinney, G. (1941) Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.* 140, 315–322.
- [12] Jones, L.W. and Bishop, N.J. (1976) Simultaneous measurement of oxygen and hydrogen exchange from the blue-green algae *Anabaena*. *Plant Physiol.* 57, 659–665.
- [13] Smith, R.L., Tabita, F.R. and Van Baalen, C. (1988) Hydrogen uptake in *Anabaena* sp. strain CA does not protect nitrogenase from inactivation by hyperbaric oxygen. *FEMS Microbiol. Lett.* 52, 183–188.
- [14] Daday, A. and Smith, G.D. (1987) The hydrogenase-nitrogenase relationship in a symbiotic cyanobacterium isolated from *Macrozamia communis* L. Jonson. *Aust. J. Plant Physiol.* 14, 318–324.
- [15] Oxelfelt, F., Tamagnini, P., Salema, R. and Lindblad, P. (1995) Hydrogen uptake in *Nostoc* strain PCC 73102: Effects of nickel, hydrogen, carbon and nitrogen. *Plant Physiol. Biochem.* 33, 617–623.



## HYDROGEN PHOTOPRODUCTION BY THREE DIFFERENT NITROGENASES IN WHOLE CELLS OF *ANABAENA VARIABILIS* AND THE DEPENDENCE ON pH

A. S. TSYGANKOV, L. T. SEREBRYAKOVA, D. A. SVESHNIKOV,\* K. K. RAO,\* I. N. GOGOTOV and D. O. HALL\*†

Institute of Soil Science and Photosynthesis, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142292, Russia

\* Division of Life Sciences, King's College London, Campden Hill Road, London W8 7AH, U.K.

**Abstract**—Mo, V and Fe nitrogenases were induced in *Anabaena variabilis*. The influence of neutral and alkaline pHs on nitrogenase activity and rates of  $H_2$  photoproduction by whole cells was investigated to establish the optimum activity for  $H_2$  evolution under varying growth and  $H_2$  production conditions. Growth rates in batch cultures at pH 7 with Mo- or V-nitrogenases were three times higher than the Fe-nitrogenase cultures. The Mo-nitrogenase activity decreased from pHs 7 to 9, and at pH 10, the culture was unable to grow. Fe-nitrogenase cells (no Mo or V) showed similar behaviour over pH 7–8. Cultures expressing V-nitrogenase exhibited the highest resistance to alkaline pHs and grew even at pH 10;  $H_2$  evolution was practically independent of the culture at pH 7–9. With cells grown under more alkaline conditions, the pH optimum for the  $H_2$  production was more alkaline; the maximal rates of  $H_2$  photoproduction were observed with V-nitrogenase containing cells. © 1997 International Association for Hydrogen Energy

### INTRODUCTION

Much interest is being shown at present in developing biotechnological systems for ecologically clean fuels. Cyanobacteria are able to evolve  $H_2$  in light catalysed by nitrogenase activity, with water serving as the primary electron donor. Tsygankov *et al.* [1] showed optimal values of pH, temperature and light intensity and also the interrelation of these factors for maximal development of *in vivo* nitrogenase activity in *Anabaena variabilis* grown in a continuous culture in the presence of Mo.

It is now known that *A. variabilis* can synthesise three types of nitrogenase: Mo-containing, V-containing and an Fe-nitrogenase that contains neither V nor Mo in the active centre [2–4]. As with *Azotobacter vinelandii* [5] the V-nitrogenase of *A. variabilis* is synthesised in the absence of combined nitrogen and Mo, but in the presence of V. The Fe-nitrogenase is synthesised when there is little or no Mo or V in the medium [2]. There is evidence that the cultures of *A. variabilis*, when synthesising the V-nitrogenase, are capable of higher rates of  $H_2$  photoproduction in comparison with the cultures containing

Mo-nitrogenase [3]. Thus, cultures with V-nitrogenase should be preferable for use in systems for the biocatalytic production of  $H_2$  using solar energy. However, there is insufficient data on the stability of V-nitrogenase containing cultures under potentially unfavourable culture conditions such as alkaline pH levels since high light and rapid carbon dioxide assimilation can induce considerable increases in pH. It is also potentially important that Fe-nitrogenase synthesising cultures have yet not been studied in this respect except that such cultures of *A. variabilis* were shown to grow at a slower rate and had a lower nitrogenase activity [2].

The main purpose of the present work is a comparative study of three different nitrogenase activities of *A. variabilis* in whole cells and of their rates of  $H_2$  photoproduction at pHs in the neutral and alkaline range in order to establish an optimum rate of  $H_2$  evolution for both growth and  $H_2$  production conditions.

### MATERIALS AND METHODS

Batch and continuous culturing of *A. variabilis* ATCC 29413 was performed in Allen and Arnon medium [6] in 500 ml photobioreactors comprising cylindrical flasks equipped with connecting pipes for the titrants, medium and gas mixture supply, and for pH sensor installation.

† Author to whom correspondence should be addressed. Fax: +44 (171) 333 4500.

The medium contained  $0.5 \mu\text{M Na}_2\text{MoO}_4$  for cultures to express Mo-nitrogenase,  $1.0 \mu\text{M Na}_2\text{VO}_4$  for cultures to express V-nitrogenase and neither added Mo nor V for cultures to express Fe-nitrogenase. The cultures were bubbled with a mixture of air and  $\text{CO}_2$  ( $250\text{--}300 \text{ ml min}^{-1}$ ). The gas mixture contained 2%  $\text{CO}_2$  in the air for growth at pH 7, 1%  $\text{CO}_2$  at pH 8 and 0.2%  $\text{CO}_2$  at pH 9 and 10. The flasks were placed into a thermostatted water bath and illuminated by fluorescent lamps ( $90 \mu\text{E s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ ). Continuous cultivation and the adjustment of pH level were achieved by connecting the flasks to pH-meters and peristaltic pumps for control of the flow of medium and titrants (Fig. 1). To create identical conditions of medium flow rate in the two photobioreactors, a two-channel peristaltic pump was used. pH was adjusted by automated addition of 0.1 N NaOH to the medium. The volume of added alkali was taken into consideration when calculating the specific flow rate.  $\text{H}_2$  photoproduction was assayed when the optical density of the culture (750 nm) and its nitrogenase activity had remained constant for at least three days.

The rates of  $\text{H}_2$  photoproduction and  $\text{C}_2\text{H}_2$  reduction (equivalent to  $\text{N}_2$  fixation) by cell suspensions were assayed by gas chromatography. 2 ml of cell suspensions were incubated in 14 ml glass vials closed with Suba Seal stoppers in a thermostatted water bath ( $30^\circ\text{C}$ ) mounted over a magnetic stirrer and illuminated with day light

fluorescent lamps ( $140 \mu\text{E s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ ). When assaying  $\text{H}_2$  photoproduction, the gas phase was replaced by argon, whereas in the  $\text{C}_2\text{H}_2$  reduction assays, the gas phase contained argon with  $\text{C}_2\text{H}_2$  at a concentration of 10% for the cultures grown with Mo and 20% for the other two cultures. The different  $\text{C}_2\text{H}_2$  concentrations were used because the  $K_m$  for  $\text{C}_2\text{H}_2$  is higher for the alternative nitrogenases [7].

At regular intervals, gas samples were withdrawn from the vials and injected into a gas chromatograph (Hewlett Packard 5890) fitted with a Porapak Q column and thermal conductivity detector for  $\text{H}_2$  or a molecular sieve column and flame ionisation detector for  $\text{C}_2\text{H}_2$  and  $\text{C}_2\text{H}_4$ . The amounts of gases formed were calculated in comparison to calibration peaks. The heterocyst content was assayed microscopically, using not less than 400 cells. The chlorophyll content was measured spectrophotometrically in methanol extracts at 665 nm [8].

The pH dependencies of  $\text{C}_2\text{H}_2$  reduction and  $\text{H}_2$  evolution were determined in buffers containing 0.05 M MES (pH 5.5–7.5), 0.05 M HEPES (pH 7.0–9.5) and 0.05 M TRICINE (pH 8.0–10.5). To study the nitrogenase activity of the cultures grown at pH 10 at an assay incubation lower than pH 9, the concentrations of MES and HEPES buffers were increased to 0.1 M. It had been observed, in previous experiments, that the chemical nature of the buffer and its ionic strength (up to 0.1 M) had

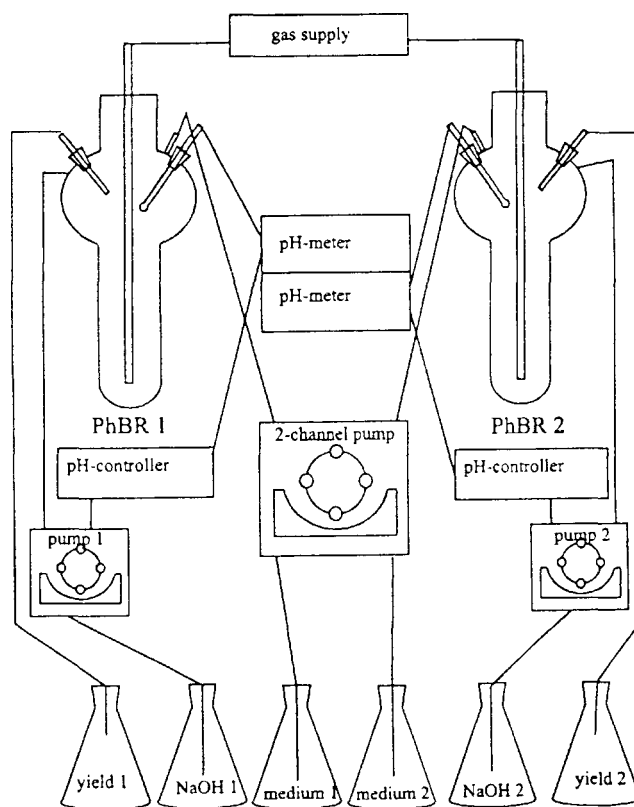


Fig. 1. Scheme of the apparatus used for the culturing of *A. variabilis* in a chemostat mode. PhBR = photobioreactor.

no significant influence on the  $C_2H_2$  reduction and  $H_2$  photoevolution rates. All the reagents were purchased from Sigma (Poole, U.K.), and were the highest grades available.

## RESULTS AND DISCUSSION

The growth rate of *A. variabilis* in batch cultures at pH 7 was  $0.04\text{--}0.05\text{ h}^{-1}$  either in the presence of Mo or in the presence of V without Mo (Fig. 2A and B). Similar values were obtained previously for a continuous culture of this cyanobacterium ( $0.044\text{ h}^{-1}$ ), grown with Mo at saturating light and optimal conditions [1]. At an optical density (750 nm) of less than 0.8 units, the cultures were considered to be growing at non-limiting conditions.

Cultures grown without Mo or V had growth rates

about 1.5 times lower and their growth started only after a lag period (Fig. 2C). The formation of ethane during  $C_2H_2$  reduction by the cultures grown in the presence of V without Mo (Fig. 2B) and without both metals (Fig. 2C) provides evidence for the synthesis of V-nitrogenase and Fe-nitrogenase, respectively [9].

The nitrogenase activity of *A. variabilis* increased at the beginning of the exponential phase of growth and then declined independently of the presence of Mo and V in the medium (Fig. 2A–C). Such a phenomenon is usually correlated with the rate of reductant supply to the heterocysts which, in turn, is determined by the rate of photosynthesis and glycogen accumulation and its breakdown [10]. The maximal nitrogenase activity in growing cultures of *A. variabilis* was achieved during the metabolising of glycogen, which had been accumulated in the course of the first 10 h of growth [11]. Glycogen-

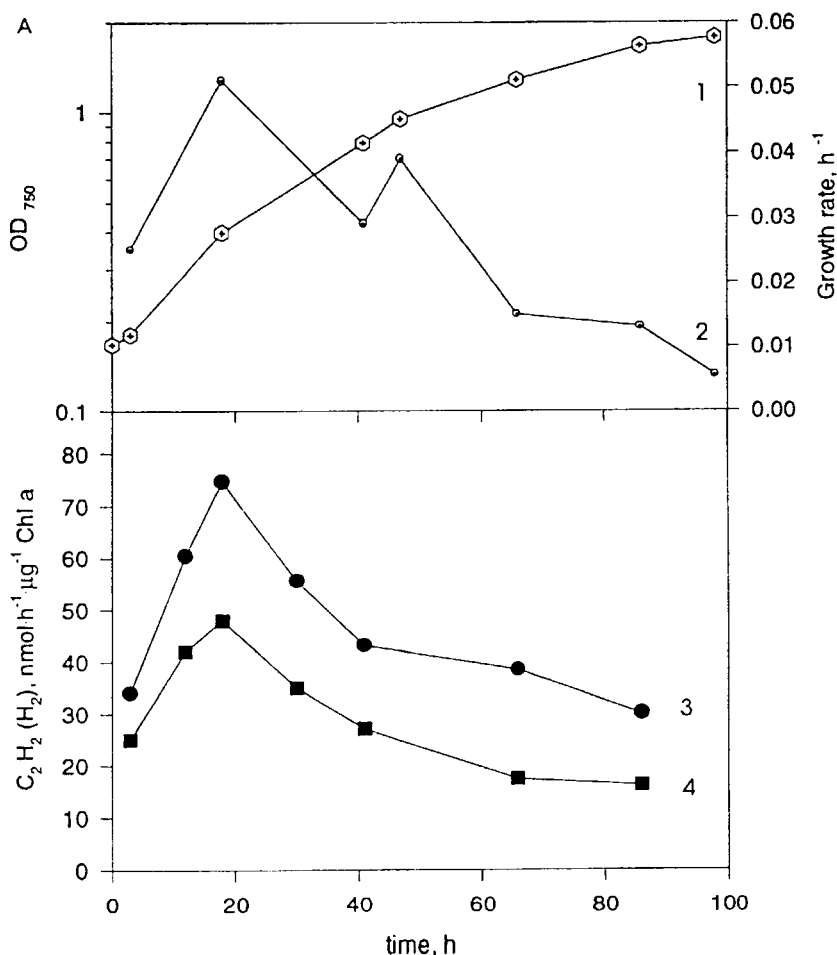


Fig. 2. Growth and nitrogenase activity of *A. variabilis* grown at pH 7. (A) In the presence of Mo, (B) without Mo in the presence of V, (C) without Mo and V. 1 = optical density; 2 = specific growth rate; 3 = ethylene formation; 4 = hydrogen photoproduction; 5 = ethane formation.

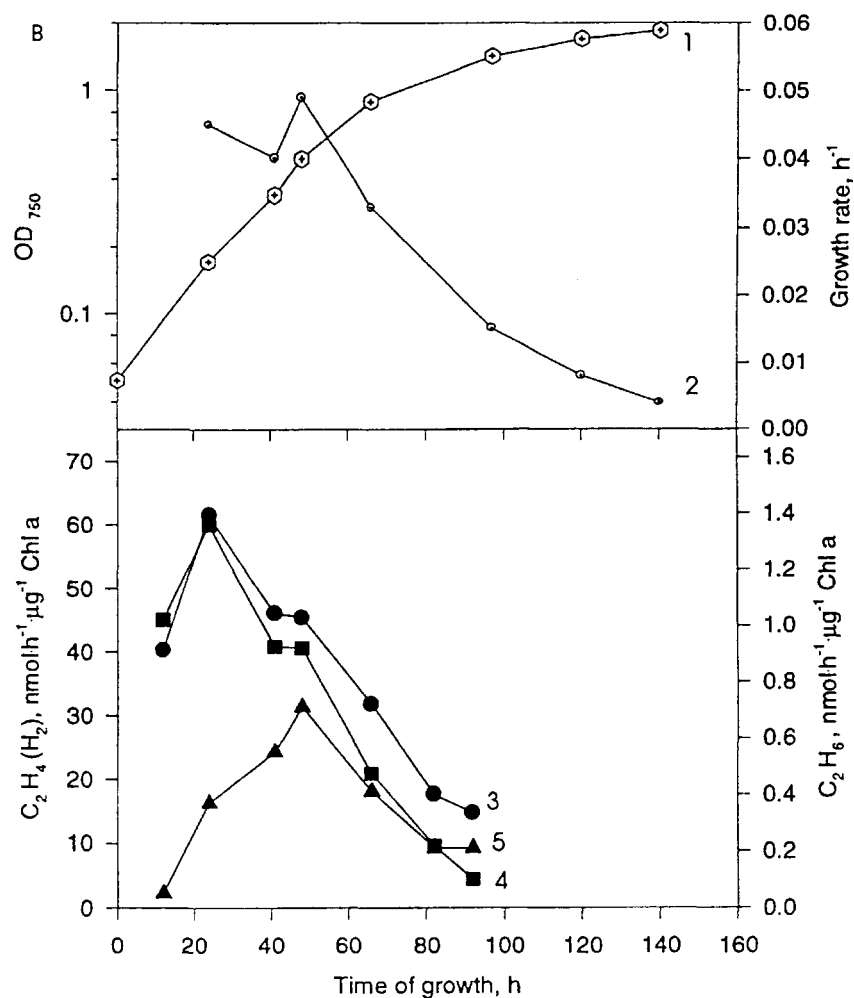


Fig. 2(B).

deficient cells show low levels of nitrogenase activity but this increases after the addition of an exogenous carbohydrate e.g. fructose [10, 12, 13].

The correlation between the rate of photosynthesis, glycogen accumulation and metabolism, and the rate of nitrogen fixation is also confirmed by the observations on the C:N ratio in the cells of *A. variabilis* [14].

The maximal nitrogenase activity was obtained with Mo-nitrogenase containing cells ( $74.7 \text{ nmol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1} \text{ Chl}$  vs  $61.4 \text{ nmol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1} \text{ Chl}$  in V-nitrogenase containing cells), while minimal activity occurred in Fe-nitrogenase containing cells ( $54.5 \text{ nmol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1} \text{ Chl}$ , Fig. 2). At the same time, the maximal rates of  $\text{H}_2$  photo-production were shown in V-nitrogenase containing cells. These observations are supported by the reported ratio of  $\text{C}_2\text{H}_2$  reduction and  $\text{H}_2$  photoevolution in V-grown cultures of *A. variabilis* [3].

To obtain a comparative characterization of the stab-

ility of the cultures containing different types of nitrogenase at physiological and non-physiological pH levels. *A. variabilis* was grown as a chemostat culture under light limitation at different pHs. The cells were not carbon-limited even at the lowest  $\text{CO}_2$  concentration because at high pH, the overall level of inorganic carbon remains high due to higher dissociation of  $\text{H}_2\text{CO}_3$ . Since it was important to use the same specific rate of dilution for all the cultures, a lowered rate of medium flow ( $0.01 \text{ h}^{-1}$ ) was chosen for experiments at pH 9 to enable the Mo cultures to reach a steady state. It had been shown previously that below pH 8.5, *A. variabilis* was able to grow at a rate of  $0.014 \text{ h}^{-1}$  [1].

The increase of pH in the medium, from 7 to 9, lowered the rates of  $\text{C}_2\text{H}_2$  reduction and  $\text{H}_2$  photoevolution in the Mo-grown cultures (Fig. 3). It was also noticed that the cells grown in the presence of Mo at pH 6.5–7.0 exhibited the highest nitrogenase activity [1]. Cells with Mo-nitro-

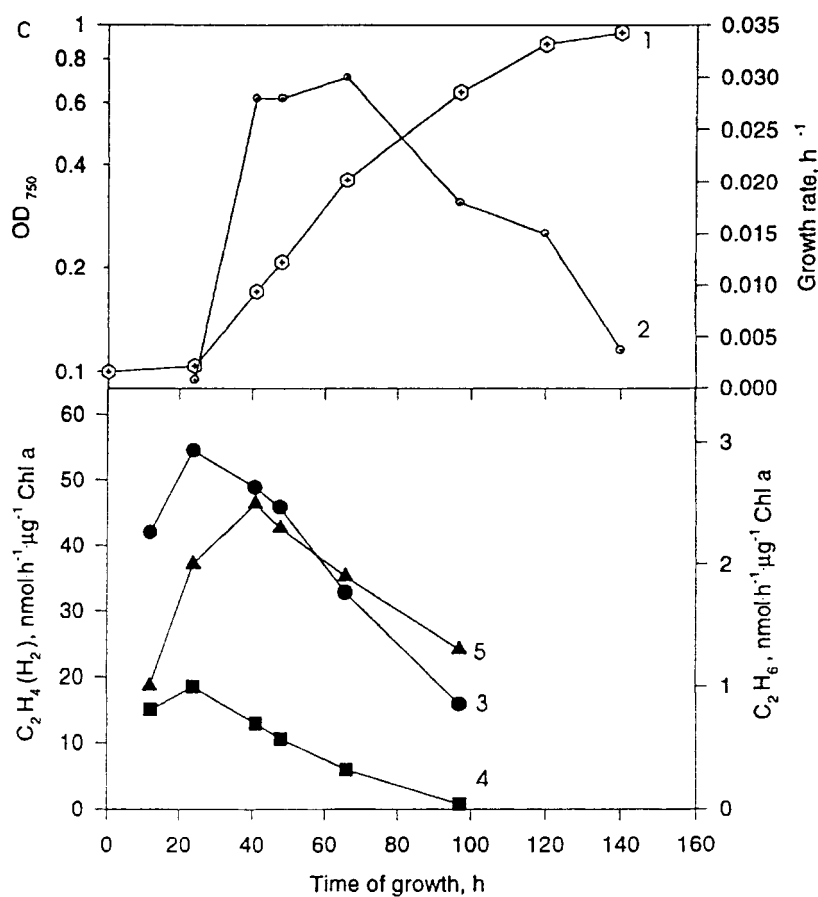


Fig. 2(C).

genase were unable to grow at pH 10. In the absence of Mo and V in the medium, the rates of  $C_2H_2$  reduction due to Fe-nitrogenase decrease if the pH of the culture was increased from 7 to 8; there was almost no  $H_2$  photoproduction at pH 8, while at pH 9 the growth of the cultures ceased (Fig. 3). Cultures expressing the V-nitrogenase showed the highest rates of  $C_2H_2$  reduction at pH 8 (Fig. 3). As distinct from the cells with Mo- or Fe-nitrogenases, the rates of  $H_2$  photoproduction in the V-nitrogenase cells depended only slightly on the culture pH in the range 7–9 and also showed higher rates of  $H_2$  production. Additionally, these V-grown cultures adapted to pH 10 in the process of growth, although the nitrogenase activity in cell suspension was considerably less than at lower pHs. Therefore, V-nitrogenase synthesising cultures appear to be more resistant to alkaline pHs than cultures containing Mo- or Fe- nitrogenases. It was also observed that the cultures grown in the presence of V are distinguishable by their higher heterocyst content (9.3–11.4%) as compared with the cultures

containing Mo-nitrogenase (5.6–7.5%) and Fe-nitrogenase (8.0–9.0%) irrespective of the growth pH.

To examine the short term influence of pH on the activity of the three types of nitrogenase of *A. variabilis*, the cells grown at different pHs were assayed in buffered solutions at pHs 6.5–10.5. All the cultures were able to reduce  $C_2H_2$  in this pH range independently of the pH of the culture medium (Fig. 4). At the same time, the maximal rate of  $C_2H_2$  reduction and its pH optimum depended on the pH during the culture growth. Optimal pH values for  $C_2H_2$  reduction in Mo-nitrogenase containing cells grown at pH 7 was 6.5–8.5, whereas for the cells grown at pH 9 the optimum was 7.5–9.5 (Fig. 4). The cells with V-nitrogenase grown at pH 7 had an optimum for  $C_2H_2$  reduction at pH 6.0–9.5, whereas the optimum for the cells grown at pH 10 was 8.5–10.5 (Fig. 4). Thus cells that are cultured at more alkaline pHs adapt in such a way that shifts the pH optimum of the nitrogenase activity to the alkaline range also.

The rate of  $H_2$  photoproduction in *A. variabilis* with

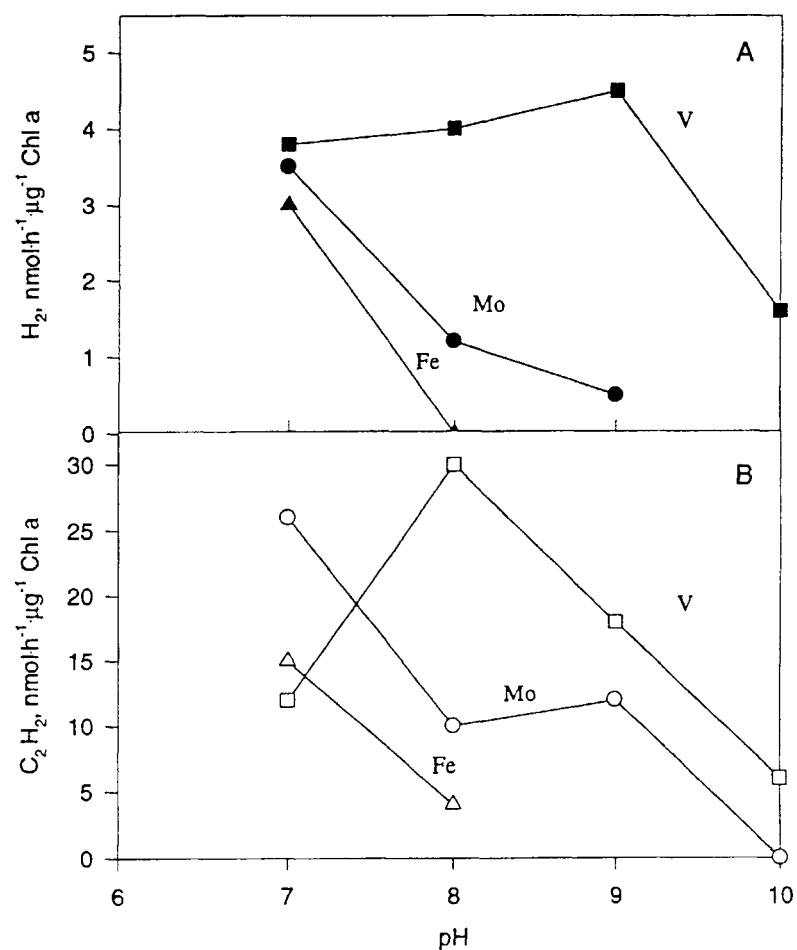


Fig. 3. Maximal rates of (A) hydrogen photoproduction and (B) ethylene photoformation in *A. variabilis* grown at different pHs. Mo = cultures grown in the presence of Mo; V = cultures grown in the presence of V without Mo; Fe = cultures grown without Mo or V.

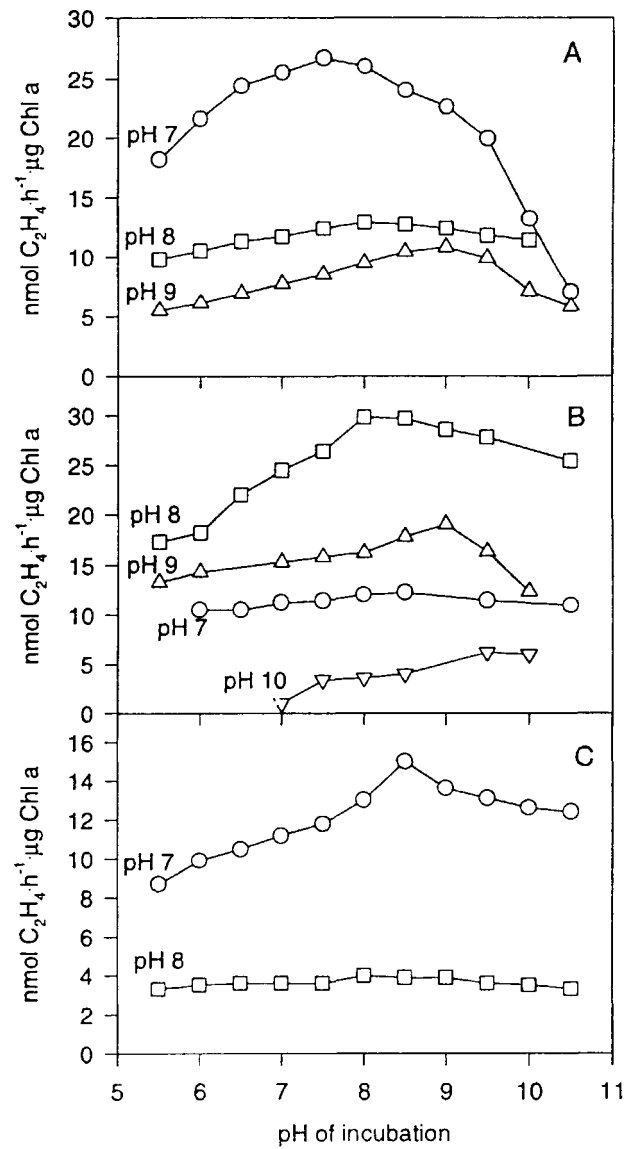


Fig. 4. Influence of pH during incubation reaction for assaying acetylene reduction by cells grown (A) with Mo, (B) without Mo in the presence of V, and (C) without Mo or V. pH of growth is indicated near each curve.

Mo-nitrogenase was maximal in the cells grown at pH 7 (Fig. 5). The cells grown at more alkaline pHs showed lower rates of  $H_2$  photoproduction although the optimal pH range (6–10) for the reaction was unchanged. The rate of  $H_2$  photoproduction in cells containing V-nitrogenase was practically independent of culturing pH in the range 7–9 and decreased only when cultured at pH 10 (Fig. 3). Hence, the optimal pH range for the reaction was 6.5–10.5 for the cells grown at pH 7.0; 7.5–10.5 for the cells grown at pH 8.0; 8.5–10.5 for the cells grown at pH 9.0; and 9.5–10.5 for the cells grown at pH 10 (Fig. 5). The

cells containing Fe-nitrogenase were able to produce  $H_2$  only when grown at pH 7 (Fig. 5).

These results show that the pH optimum for  $C_3H_2$  reduction and  $H_2$  photoproduction in cells of *A. variabilis* is dependent on the pH at which the cells are grown and whether the cells are grown in the presence of Mo or V or in the absence of either. Maximal rates of  $H_2$  photoproduction were observed in cultures grown without Mo, but in the presence of V in the medium when a V-nitrogenase is expressed. These cells also possessed the ability to grow at a wider range of pHs, while the rate of  $H_2$

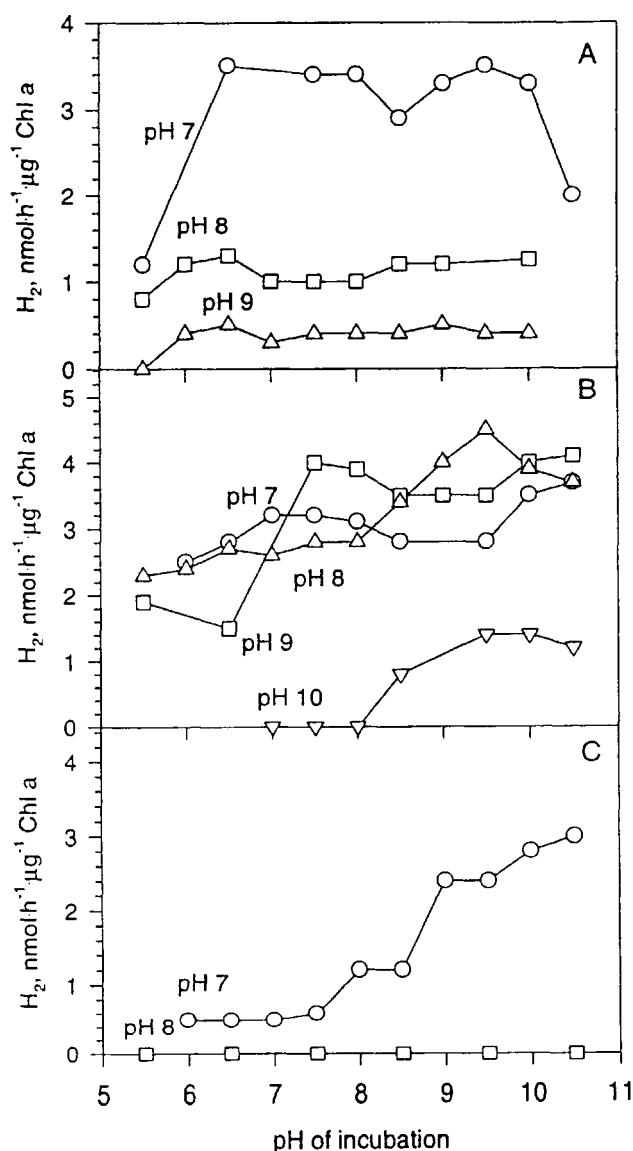


Fig. 5. Influence of pH during incubation reaction for assaying hydrogen photoproduction by cells grown (A) with Mo, (B) without Mo in the presence of V, and (C) without Mo or V. pH of growth is indicated near each curve.

photoproduction was practically independent of culturing pH in the range 7–9. Consequently, the cultures grown under these conditions can be recommended for further research on systems for biological conversion of solar energy to produce  $H_2$ .

*Acknowledgements*—We wish to acknowledge the support from RITE (Japan), Royal Society (U.K.), INTAS and EU.

## REFERENCES

1. Tsygankov, A. A., Ni, C. V. and Gogotov, I. N., Growth and adaptational potential of nitrogenase system of continuous culture of *Anabaena variabilis*. *Mikrobiologiya*, 1991, **60**, 853–858 (in Russian).
2. Kentemich, T., Haverkamp, G. and Bothe, H., The expression of a third nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Zeitschrift Naturforsch.*, 1991, **46c**, 217–222.
3. Kentemich, T., Danneberg, G., Hundeshagen, B. and Bothe, H., Evidence for the occurrence of the alternative vanadium-containing nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *FEMS Microbiological Letters*, 1988, **51**, 19–24.
4. Yakunin, A. F., Ni, C. V. and Gogotov, I. N., Growth and synthesis of different nitrogenases in *Anabaena variabilis* in dependence of presence of Mo, V and W in medium. *Mikrobiologiya*, 1991, **60**, 71–76 (in Russian).
5. Bishop, P. E. and Premakumar, R., In ed. G. Stacey, R. H. Burris and H. J. Evans. *Biological Nitrogen Fixation*, Chapman and Hall, New York 1992, pp. 736–762.
6. Allen, M. B. and Arnon, D. I., Studies on nitrogen-fixing blue-green algae. I: growth and nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica*. *Lemm. Plant Physiology*, 1955, **30**, 366–372.
7. Laurinavichene, T. V., Tsygankov, A. A. and Gogotov, I. N., Similarities and differences of alternative and Mo-containing nitrogenases in *Rhodobacter sphaeroides*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 1994, **30**, 389–395.
8. Mackinney, G., Absorption of light by chlorophyll solutions. *Journal of Biological Chemistry*, 1941, **140**, 315–322.
9. Dilworth, M. J., Eady, R. R., Robson, R. L. and Miller, R. W., Ethane formation from  $C_2H_2$  as a potential test for vanadium nitrogenase *in vivo*. *Nature*, 1987, **327**, 167–168.
10. Ernst, A., Kirschenlohr, H., Diez, J. and Boger, P., Glycogen content and nitrogenase activity in *Anabaena variabilis*. *Archiv Microbiol.*, 1984, **140**, 120–125.
11. Chen, P., Almon, H. and Boger, P., Physiological factors determining hydrogenase activity in nitrogen-fixing heterocystous cyanobacteria. *Plant Physiology*, 1989, **89**, 1035–1038.
12. Ernst, A. and Boger, P., Glycogen accumulation and the induction of nitrogenase activity in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Journal of General Microbiology*, 1985, **131**, 3147–3153.
13. Troshina, O. Y., Serebryakova, L. T. and Lindblad, P., Induction of  $H_2$ -uptake and nitrogenase activities in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC-29413—effects of hydrogen and organic substrate. *Current Microbiology*, 1996, **33**, 11–15.
14. Yakunin, A. F., Troshina, O. Y. and Gogotov, I. N., Relationship between nitrogenase synthesis and the C/N ratio in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Microbiology*, 1995, **64**, 5–6.

# AN AUTOMATED HELICAL PHOTOBIOREACTOR INCORPORATING CYANOBACTERIA FOR CONTINUOUS HYDROGEN PRODUCTION\*

Anatoly A. Tsygankov,<sup>1</sup> David O. Hall,<sup>2</sup> Jian-guo Liu,<sup>3</sup> and K. Krishna Rao<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Soil Science and Photosynthesis  
Russian Academy of Sciences  
Pushchino, Moscow Region, 142292, Russia

<sup>2</sup>Division of Life Sciences  
King's College London  
Campden Hill Road, London W8 7AH

<sup>3</sup>Institute of Oceanology  
Chinese Academy of Sciences  
Qingdao 266071, China

## Key Words

*Anabaena*, cyanobacteria, hydrogen production, nitrogenase, photobioreactor

## 1. SUMMARY

A laboratory-scale, helical tubular photobioreactor, made of polyvinyl chloride tubing, was constructed to study photobiological H<sub>2</sub> production by cyanobacteria catalyzed by cellular nitrogenase. The photobioreactor was connected to a computer, with specially written software and hardware, for automated control of the biochemical and environmental processes regulating H<sub>2</sub> evolution. A basic photobioreactor unit with a photostage volume of 4.35 L and containing *Anabaena azollae* grown in 98% air + 2% CO<sub>2</sub> gas mixture produced H<sub>2</sub> at a rate of 13 mL H<sub>2</sub>·h<sup>-1</sup>·L<sup>-1</sup> culture suspension when the gas phase was

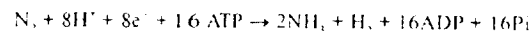
\* Abbreviations: OD, optical density; PhBR, photobioreactor; PVC, polyvinylchloride.

changed to Ar. The  $H_2$  production was sustained for 6 h. No  $H_2$  evolution was observed in the presence of photosynthetic  $O_2$ .

Techniques were introduced for keeping the cyanobacterial suspension in a turbulent state and for scrubbing the inside walls of the PVC tubing during the operation of the photobioreactor. A method for scale-up of the bioreactor is proposed.

## 2. INTRODUCTION

Photobiological  $H_2$  production processes make use of the photosynthetic and enzymatic assemblies in eukaryotic green algae or prokaryotic cyanobacteria and photosynthetic bacteria. While green algal  $H_2$  production is catalyzed by an inducible hydrogenase, the  $H_2$  evolution from photosynthetic prokaryotes is catalyzed mainly by nitrogenase. Cyanobacteria are ideal microorganisms for solar energy conversion to the chemical energy of  $H_2$  because water provides the protons and electrons for  $H_2$  formation (Bothe and Kentemich, 1990; Markov *et al.*, 1995; Hall *et al.*, 1995).  $H_2$  photoproduction studies in our laboratory have been carried out using the aerobic, filamentous, heterocystous, nitrogen-fixers *Anabaena* and *Nostoc* spp.  $H_2$  evolution in these organisms is catalyzed by the nitrogenase located in the heterocysts.  $H_2$  is formed as a co-product along with  $NH_4$  during the ATP-dependent reduction of  $N_2$ .



Although many advances have been reported in the last few years on the technology and yield of  $H_2$  production, the overall conversion efficiencies of light to chemical energy are still much lower than the theoretical (Rao and Hall, 1996). The factors that affect sustained  $H_2$  production include oxygen sensitivity of the nitrogenase and the photosynthetic apparatus, photoinhibition of photosynthesis, oxidation of the  $H_2$  formed by an uptake hydrogenase located in the heterocysts, etc. The cyanobacterial strain selected and the age of the culture are also important for better yields of  $H_2$ . This paper describes the design and assembly of a bench-top photobioreactor (PhBR) for the continuous production of  $H_2$  from water, catalyzed by cyanobacteria.

## 3. EXPERIMENTAL

### 3.1. Organism and Growth

Batch and continuous culturing of *Anabaena variabilis* ATCC 29413, mutant PK84 (Mikheeva *et al.*, 1995), and *A. azollae* Strassburg were performed in Allen and Arnon (1955) medium (30 °C, pH 7.0). The medium contained 1.0  $\mu$ M  $Na_2VO_4$  and no added Mo. In the batch culture mode, the photobioreactor was flushed with a mixture of 98% air and 2%  $CO_2$  (250–300 mL/min). The pH was adjusted by automated addition of 0.1 N NaOH to the medium.

### 3.2. Activity Assays

The rates of  $H_2$  photoproduction and  $C_2H_2$  reduction (equivalent to  $N_2$  fixation) by cell suspensions were assayed by gas chromatography in a Hewlett Packard 5890A. A 2-

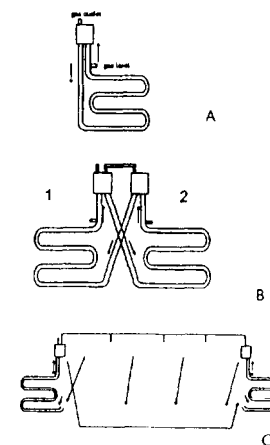


Figure 1. Tubular helical PhBR made of PVC tube: (A) main unit, (B) two main units connected in series; (C) proposed method for connection of any number of units in series.

mL cell suspension was incubated in 14-mL glass vials closed with Suba Seal stoppers in a thermostated water bath (30 °C) mounted over a magnetic stirrer and illuminated laterally with daylight fluorescent lamps (140  $\mu$ E/m<sup>2</sup>/s). When assaying  $H_2$  photoproduction, the air in the gas phase was replaced by Ar, whereas in the  $C_2H_2$  reduction assays, the gas phase inside the vials contained Ar with 20%  $C_2H_2$ . The time of assays was 30–45 min with 5–10 min of measurement intervals.

### 3.3. The Photobioreactor

A helical tubular photobioreactor made of PVC tubing with a 10-mm inner diameter was used in this study (Watanabe *et al.*, 1995) (Figure 1a). This PhBR has a very good surface/volume ratio (200 m<sup>2</sup> without gas exchanger unit) and can provide uniform illumination to the cultures. The main disadvantage of this type of PhBR lies in the separation of the process of photosynthesis and gas exchange. During cyanobacterial photosynthesis,  $O_2$  accumulates and  $CO_2$  decreases inside the photosynthetic section of the PhBR. Hence, the scale-up of this PhBR by enlargement of the photosynthetic section (the length of PVC tube) has limitations: accumulation of  $O_2$  and/or decrease of  $CO_2$  (and pH shift due to  $CO_2$  changes) along the tube will inhibit growth and product ( $H_2$ ) formation by the cells when the length of the tube is too great.

The maximal length of the tube (L) that would cause no inhibition or limitation of cultures can be calculated on the basis of the linear flow rate of the culture (V) and maximal non-inhibiting concentration of  $O_2$  (minimal non-limiting concentration of  $CO_2$ )  $C_{min} \cdot t = Vt$ , where t is time of culture flow along the tube with accumulation of a non-inhibiting concentration of  $O_2$ ;  $t = [C_{min} - C_m]/XP$  where  $C_m$  is the concentration of  $O_2$  ( $CO_2$ ) at the gas exchanger, X is the biomass concentration, and P the specific rate of photosynthesis by the culture (rate of oxygen evolution or  $CO_2$  fixation per unit of biomass per minute).

Thus, for any culture concentration with a known rate of photosynthesis, a maximal length of photosynthetic path exists (Figure 1a). The scale-up procedure must use a modified type of PhBR for enlargement. The PhBR illustrated in Figure 1A was used as the main unit for scaling-up. Two of these units were connected as shown in Figure 1B. Using

this method of unit addition in series, it is possible to construct a PhBR of any volume without causing a decrease in the specific rate of the process (Figure 1C). All the photosynthetic parts of these units can be coiled together into a large, hollow cylinder. Thus, the large-scale PhBR is similar to a single, helical, coiled PVC tube with one difference: it has as many separate gas exchangers as there are units connected in series. This PhBR has only one technical disadvantage: it has many inlets for gas mixtures and many gas exchangers.

### 3.4. Prevention of Biofilm Formation on the Walls

The culture suspension flow in this PhBR is laminar and, thus, with time biofilm formation occurs on the walls that prevents light penetration inside the tube. Also, with the biofilm deposit, it is difficult to control the parameters of the process due to differences in environmental factors inside the biofilm and in the cell suspension. To prevent the deposition of culture on the inside walls, balls made of polyurethane foam were used. The balls were inserted into the PhBR made of two units (Figure 1B) and they circulated (at the rate 16–20 cm/sec) continuously through the reactor, thereby scrubbing the walls. It is essential to keep the inner space of the PhBR uniform and to make the balls with precise diameter to ensure continuous circulation of the balls inside the PhBR.

### 3.5. Installation of Sensors

To control the cultivation parameters, it is necessary to introduce sensors inside the PhBR. The most important place for  $pO_2$  control is at the end of the photosynthetic section of the PhBR because oxygen accumulates there. The  $pO_2$  sensor was introduced in the loop incorporating the cell with an inner diameter greater than the inner diameter of the tube. The circulation of the balls was not stopped in the cell and due to pulsed movements even cleaned the surface of the sensor. However, sensors for temperature, pH, and optical density required more active anti-sedimentation treatment because they prevented circulation of the balls. To overcome this, the sensors were introduced in a special bypass between neighboring loops. The linear rate of suspension flow inside the bypass was equal to the rate inside the loop connected with the bypass in parallel. To prevent the balls passing into the bypass, a grid was added at the entrance of the bypass. To prevent the sedimentation of culture on the sensors, a special type of shaker was installed in series with the chamber of sensors (Figure 2). Pulses of air pressure through the shaker activated pulses of suspension flow through a silicone tube inside the shaker and prevented cyanobacterial sedimentation on the surfaces of the sensors.

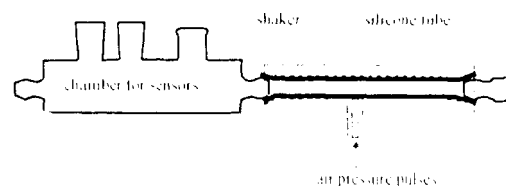


Figure 2. Shaker connected with chamber for sensors (temperature, optical density, pH) in series.

### 3.6. Continuous Culturing

For continuous cultivation, a constant volume of suspension inside the PhBR is essential. Inlets for media and titrants were installed near the gas inlet of one of the units for better mixing of fresh medium and titrants with the suspension. On addition of the medium, the level of suspension in the gas exchanger increased. The gas outlet was through a tube introduced from the top of the gas exchanger (Figure 1A). When the liquid level reached the lower end of this tube, excess liquid together with the gas mixture was pushed out into a culture collector.

### 3.7. Computer Control

Using modern IBM-compatible computers, it is now possible to create very user-friendly hardware and software for computer control of the culturing of microorganisms. Markov *et al.* (1997) were the first to report the design of a computer-controlled photobioreactor for  $H_2$  production from *Anabaena variabilis*. The system we have now set up is much more advanced and versatile and can be used for the control of PhBRs to produce  $H_2$  or for the cultivation of any phototroph.

### 3.8. Hardware

In the present system, computer control was realized at two levels: low-level and high-level. Low-level control was achieved through a device for automation of photobioreactors comprising a digital measurement and control system based on a standard AT286 motherboard. This control system combines preamplifiers of the signals from the sensors and digital processing of data. It uses its own software and works independently of the high-level computer. It is programmed for: (a) measurement of signals from sensors

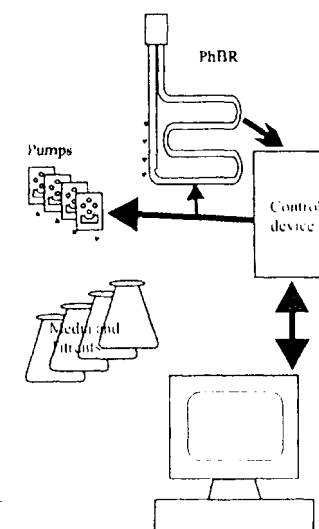


Figure 3. An automated helical photobioreactor incorporating cyanobacteria for continuous  $H_2$  production.

and transformation of data into digital form; (b) storage of data as mean, minimal, and maximal values for every sensor for each hour; (c) realization of several modes of cultivation: uncontrolled regime, batch culture, chemostat, and turbidostat continuous culture (the regime is predefined at the start of the experiment and can be changed by the high-level computer); (d) control of pH, temperature, and optical density (in turbidostat regime) at the set level by switching on and off the pumps to control mode and intensity of illumination; and (e) transfer of the information about the process to the high-level computer.

The high-level computer is programmed for: (a) calibration of sensors and pumps, (b) altering the characteristics of the operation (settings, modes of cultivation, mode of illumination, tuning of sensors, etc.), (c) continuous visual presentation of data of the process as a graph, and (d) quick storage of data as a table of digits or as a graph. The high-level computer is connected with the control device via a RS232 port.

### 3.9. Software

The software has two closely connected parts: low-level software (for the control system) and high-level software for the high-level computer. Low-level software, written in PASCAL, allows the measurement and control of the cultivation parameters to store the data about the process of cultivation and to connect (if necessary) with the high-level computer. High-level software for the computer with Windows 3.1 or more advanced versions is written in DELPHI and enables the investigator to recalibrate the sensors, change any parameter (or regime of cultivation), monitor the operation by visual display unit as a graph or a table, store quick data (with discretion between the points from 2 sec), and file as a table or as an image. The main program has less than 400 KB volume, is friendly, and easy to use. It is possible to use the computer to operate the photobioreactor simultaneously for any other routine application.

### 3.10. Control of the Process

The control device has outputs of 220–240 V and controls the pumps by switching on and off the power supply. It is possible to use any kind of pump, including the simplest type without facilities for flow-rate regulation. In addition to pumps, it controls the valve for cooling water (220–240 V), light (220–240 V) and the additional device inserted specifically for air pulses (24 V, 0.5 A).

## 4. RESULTS AND CONCLUSIONS

### 4.1. Batch Culture of Cyanobacteria

A PhBR was constructed of two basic units with 20 m PVC tubing in each unit with gas and heat exchangers of 0.5 L volume each. Tubes of both units were coiled into one cylinder with a diameter of approximately 50 cm. The overall volume of the PhBR with connecting tubes and accessories was 4.35 L. Inside the tubular cylinder, four 55-W and two 32-W fluorescent lamps were introduced. By switching the lamps on in different combinations, the light intensity incident on the surface of the tubes could be changed from 0 to 230  $\mu\text{E}/\text{m}^2 \text{ sec}$ . At a gas flow rate of 0.3 and 0.2 L/min in unit 1 and unit 2, respectively, (Figure 1b), the linear flow rate of the suspension inside the tube was 22–24 cm/sec. The time for an overall cycle inside the PhBR under these conditions was 6.5–7.0 min.

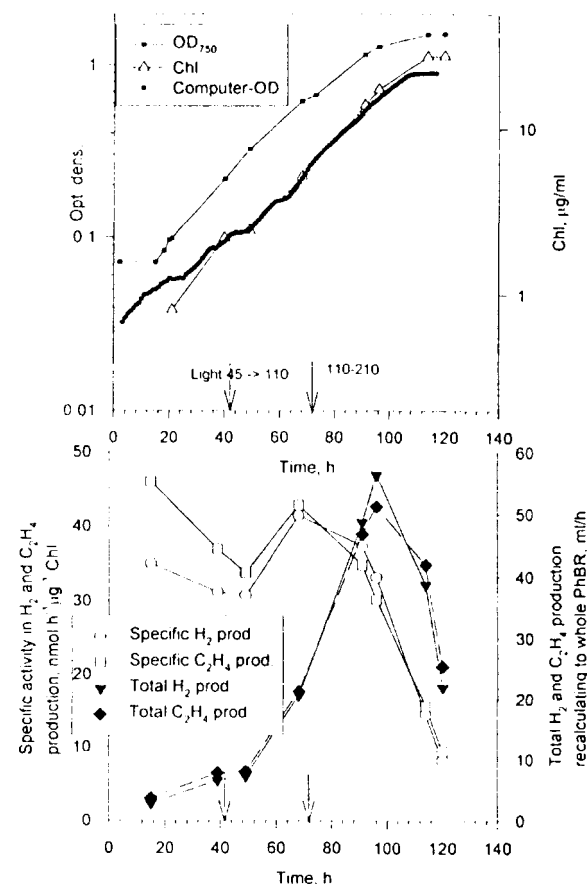


Figure 4. Batch culture of *A. azollae* grown in automated PhBR. Down arrows indicate the times when light intensities ( $\mu\text{E}/\text{m}^2 \text{ sec}$ ) were changed.

A typical growth curve of the vanadium-culture of *A. azollae* in the PhBR is shown in Figure 4. In preliminary experiments, it was found that strong illumination at the start of cultivation inhibited the growth of cyanobacteria; thus, a higher light intensity was applied only later to more dense cultures by switching on additional lamps. Exponential growth was observed up to 15  $\mu\text{g}$  chlorophyll/mL. Kinetics of the OD (at 670 nm) measured on-line by computer was well-correlated with the OD (at 750 nm) of samples simultaneously removed and measured with a spectrophotometer and with the chlorophyll a concentration which was determined separately. We conclude that computerized measurement of OD is a very useful tool for the control of culture density as it can be recalibrated in terms of chlorophyll a concentration.

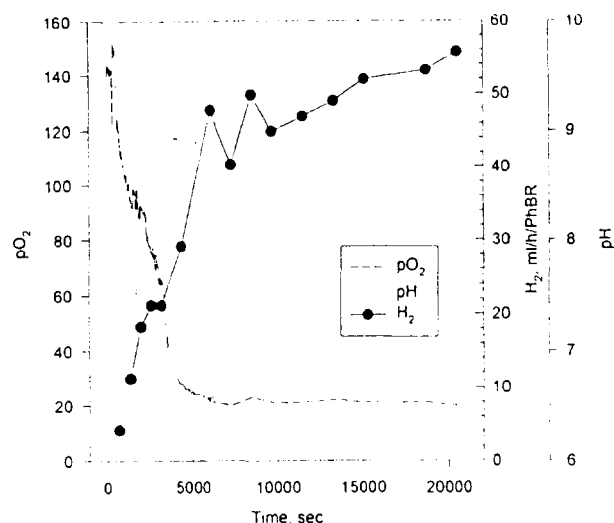


Figure 5.  $H_2$  production by automated PhBR incorporating *A. azollae* grown in turbidostat culture. At the start (0 sec) the gas phase was changed from 98% air + 2%  $CO_2$  to 100% Ar.

## 4.2. Enzyme Activity

Specific nitrogenase activity measured at two intervals did not change significantly during exponential growth (Figure 4), but decreased dramatically after the exponential phase. This differs from the data obtained with batch cultures growing under constant illumination where specific nitrogenase activity had a sharp maximum at the start of growth (Tsygankov et al., 1997). Thus, addition of saturating light to the culture prolonged the maximal nitrogenase activity up to the end of the exponential phase (Figure 4). As a result of high specific nitrogenase activity, the potential activity of whole PhBR in  $H_2$  production reached 57 mL/h/PhBR (13 mL/h L suspension). Compared with other data available (not higher than 5 mL/h L suspension) in the literature (Kentemich et al., 1991; Kentemich et al., 1990; Ni et al., 1990; Yakunin et al., 1991) *A. azollae* grown in the PhBR showed rather high specific and nitrogenase activity for  $H_2$  production.

## 4.3. Hydrogen Production by a Photobioreactor

To investigate the possibility of using the PhBR for sustained  $H_2$  production, *A. azollae* was cultivated in a turbidostat with an OD of 0.7 (computer-monitored) and maximal  $H_2$  evolution (Figure 4). The culture showed stable growth with a rate of  $0.03\ h^{-1}$  (data not shown). Nitrogenase activity measured in the vials was essentially the same as in the batch culture. Thus, the turbidostat regime allowed the culture to be maintained with a high nitrogenase activity for a long period.

After a change of gas phase from 98% air + 2%  $CO_2$  to 100% Ar, the oxygen partial pressure decreased (Figure 5) and the pH increased, probably due to  $CO_2$  loss by the Ar

flush and by consumption by the culture. The presence of  $H_2$  in the outlet gas was observed 10 min after the switch to Ar. After 1.5 h of exposure of culture under Ar, the pH stabilized at 8.9, and the  $pO_2$  stabilized at a low level (showing a lack of photosynthesis due to the absence of  $CO_2$ ), and  $H_2$  production reached 45 mL/h/PhBR. The rate of  $H_2$  production further increased and reached 56 mL/h/PhBR 6 h after the gas phase change, which is essentially the same rate as that measured in small vials (57 mL/h/PhBR). Thus, *A. azollae* produced  $H_2$  under Ar in the PhBR at the same rate as in batch experiments in small vials, indicating that the method of scaling-up from 2 mL to 4.35 L did not cause any decrease in specific or volumetric activity.

After  $H_2$  production under the Ar for 6 h, the culture was bubbled with a mixture of 98% air + 2%  $CO_2$  (Figure 5). The culture then exhibited stable growth (data not shown). After 20 h of turbidostat growth, the gas phase was replaced again with pure Ar and the culture showed increased  $H_2$  production at approximately the same rate as before (Figure 5).

It should be pointed out that *A. azollae* did not produce  $H_2$  after replacement of air +  $CO_2$  with Ar +  $CO_2$  (data not shown). In the presence of  $CO_2$ , the partial oxygen pressure was not lower than 60% of air saturation (100% of air saturation equals  $6.3\ \mu L\ O_2/mL$  suspension). Taking into account the high nitrogenase activity of the cells, it is possible to assume that  $H_2$  was evolved under these conditions but was oxidized by the uptake hydrogenase present in the cells.

## 5. CONCLUSIONS

(1) A method for scaling-up the PhBR without a decrease in specific rate of  $H_2$  production is proposed. (2) Connection of the tubular helical PhBR to a computer with specially written soft and hardware programs for automated control of the process is described. (3) Model experiments with this scaleable PhBR showed the possibility of high rates of  $H_2$  production by the PhBR (up to 13 mL  $H_2/h$  L suspension).

Future investigations should be directed to research on: (a) selection of cyanobacterial strain with the highest rate of  $H_2$  production, (b) optimal interval between time of  $H_2$  evolution and time of culture regeneration, (c) optimal pH, temperature and light intensity during regeneration of culture and during  $H_2$  production, (d) adoption of the process for natural light conditions (high light intensity in the day and darkness at night), and (e) studying the possibility of scaling-up this PhBR to hundreds of liters.

## ACKNOWLEDGMENTS

Financial support for this research from RITE (Japan) and INTAS (Brussels) is gratefully acknowledged. Thanks are also due to D. Sveshnikov for discussions and suggestions on the assembly of the PhBR.

## REFERENCES

- Allen, M.B., and Arnon, D.I., 1955, Studies on nitrogen-fixing blue-green algae. I. growth and nitrogen-fixation by *Anabaena cylindrica* Lemm, *Plant Physiol.*, 30, 366-372.
- Bothe, H., and Kentemich, T., 1990, Potentialities of  $H_2$  production by cyanobacteria for solar energy conversion programmes, in *Hydrogen Energy Progress VIII*, Veziroglu, I.N., and Takahashi, P.K. (eds.), Pergamon Press, New York, pp 729-734.

- Hall, D.O., Markov, S.A., Watanabe, Y., and Rao, K.K., 1995. The potential applications of cyanobacterial photosynthesis for clean technologies. *Photosynthesis Research*, 46:159–167.
- Kentemich, T., Haverkamp, G., and Bothe, H., 1990. The generation of molecular hydrogen by cyanobacteria. *Naturwissenschaften*, 77:12–18.
- Kentemich, T., Haverkamp, G., and Bothe, H., 1991. The expression of a third nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Z. Naturforsch.*, 46c:217–222.
- Markov, S.A., Bazin, M.J., and Hall, D.O., 1995. The potential of using cyanobacteria in photobioreactors for hydrogen production. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 52:59–86.
- Markov, S.A., Thomas, A.D., Bazin, M.J., and Hall, D.O., 1997. Photoproduction of hydrogen by cyanobacteria under partial vacuum in batch culture or in a photobioreactor. *Int. J. Hydrogen Energy*, 22:521–524.
- Mikheeva, L.E., Schmitz, O., Shestakov, S., and Bothe, H., 1995. Mutants of the cyanobacterium *Anabaena variabilis* altered in hydrogenase activities. *Z. Naturforsch.*, 50c:505–510.
- Ni, C.V., Yakunin, A.F., and Gogotov, I.N., 1990. Influence of molybdenum, vanadium, and tungsten on growth and nitrogenase synthesis of the free-living cyanobacterium *Anabaena azollae*. *Microbiology*, 59:395–398.
- Rao, K.K., and Hall, D.O., 1996. Hydrogen production by cyanobacteria: potential, prospects. *J. Mar. Biotechnol.*, 4:10–15.
- Tsygankov, A.A., Serebryakova, L.T., Sveshnikov, D.A., Rao, K.K., Gogotov, I.N., and Hall, D.O., 1997. Hydrogen photoproduction by three different nitrogenases in whole cells of *Anabaena variabilis* and the dependence on pH. *Int. J. Hydrogen Energy*, in press.
- Watanabe, Y., de la Noue, J., and Hall, D.O., 1995. Photosynthetic performance of a helical tubular photobioreactor incorporating the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Biotechnol. Bioeng.*, 47:261–269.
- Yakunin, A.F., Ni, C.V., and Gogotov, I.N., 1991. Growth and synthesis of different nitrogenases in *Anabaena variabilis* in dependence of presence of Mo, V and W in medium. *Mikrobiologiya* (Russian), 60:71–76.

**H<sub>2</sub> photoproduction by batch culture of *Anabaena*  
*variabilis* ATCC 29413 and its mutant PK84 in a  
photobioreactor.**

A.A. Tsygankov<sup>1,2</sup>, V.B. Borodin<sup>1</sup>, K.K. Rao<sup>1</sup>, D.O. Hall<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Kings College London, Campden Hill Rd., London W8 7AH UK

<sup>2</sup>Institute of Basic Biological Problems RAS, Pushchino, Moscow Region,  
142292, Russia

***Corresponding author:***

**A.A. Tsygankov**

Institute of Basic Biological Problems RAS, Pushchino, Moscow Region,  
142292, Russia

Tel: (7)-0967-732831

Fax: (7)-0967-790532

e-mail: [ttt@issp.serpukhov.su](mailto:ttt@issp.serpukhov.su)

**Running title:**

**H<sub>2</sub> production by *A. variabilis* in a photobioreactor.**

Submitted to Biotech. Bioeng.

## Summary

Hydrogen production by *Anabaena variabilis* ATCC 29413 and of its mutant PK84, grown in batch cultures, was studied in a photobioreactor. The highest volumetric H<sub>2</sub> production rates of native and mutant strains were found in cultures grown at gradually increased irradiation. The native strain evolved H<sub>2</sub> only under an argon atmosphere with the actual rate as high as the potential rate (measured in small vials under optimal conditions). In this case 61% of oxygenic photosynthesis was used for H<sub>2</sub> production. In contrast the mutant PK84 produced H<sub>2</sub> during growth under CO<sub>2</sub>-enriched air. Under these conditions at the maximum rate of H<sub>2</sub> production (10 ml h<sup>-1</sup> l<sup>-1</sup>), 13% of oxygenic photosynthesis was used for H<sub>2</sub> production and the actual H<sub>2</sub> production was only 33% of the potential. Under an atmosphere of 98% argon+2% CO<sub>2</sub> actual H<sub>2</sub> production by mutant PK84 was 85% of the potential rate and 66% of oxygenic photosynthesis was used for H<sub>2</sub> production. Hydrogen production under argon+CO<sub>2</sub> by the mutant was strictly light-dependent with saturation at about 300 μE m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup>. However, the rate of photosynthesis was not saturated at this irradiation. At limiting light intensities (below 250 μE m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup>) 33-58% of photosynthesis was used for H<sub>2</sub> production. Hydrogen evolution by PK84 under air+2% CO<sub>2</sub> was also stimulated by light; but was not saturated at 332 μE m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup> and did not cease completely in darkness. The rate of oxygen photoevolution was also not saturated. A mechanism for increasing cyanobacterial hydrogen production is proposed.

**Keywords:** *Anabaena variabilis*, hydrogen photoproduction, photobioreactor, nitrogenase activity

## Introduction

Molecular hydrogen is considered a suitable fuel for a future climate-constrained world. An important advantage of hydrogen is that it can be produced from water and water is also the end product of its combustion. There are different ways of hydrogen production from water with photobiological water splitting being one of them (Benemann, 1997; Kentemich et al., 1990; Rao and Hall, 1996). N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria are promising candidates for the development of photobiological H<sub>2</sub>-producing systems as these microorganisms are able to generate H<sub>2</sub> under autotrophic conditions using solar energy as the driving force of the process.

Reviews on the physiology and molecular biology of cyanobacterial H<sub>2</sub> photoproduction have been published (Hansel and Lindblad, 1998; Markov et al., 1995). The efficiency of light energy conversion into the energy of H<sub>2</sub> has been reported (Markov et al., 1996). The preference of V-containing nitrogenase for hydrogen production has been established (Kentemich et al., 1988; Ni et al., 1991). The optimal pH and temperature for this process were identified (Lichtl et al., 1997; Tsygankov et al., 1991; 1997). The influence of molecular nitrogen and oxygen on cyanobacterial nitrogenase activity and hydrogen photoproduction have also been studied (Fay, 1992; Gallon, 1992; Lichtl et al., 1997). However, all the data were obtained in small-scale vessels using short-term experiments or immobilised cells with the data showing the

potential capacity rather than the actual productivity of cyanobacteria in hydrogen production.

Native strains of cyanobacteria usually do not evolve H<sub>2</sub> during growth under ambient nitrogen and oxygen concentrations due to the recycling of evolved hydrogen by uptake and reversible hydrogenases (Hansel and Lindblad, 1998; Kentemich et al., 1990; Rao and Hall, 1996). A chemically-induced mutant of *Anabaena variabilis* with impaired uptake hydrogenase was recently generated by Mikheeva et al. (1995) and the advantages of this mutant over the native strain in nitrogenase-mediated hydrogen photoproduction were established (Markov et al., 1997; Sveshnikov et al., 1997). However, a detailed analysis of actual hydrogen production in photobioreactors with a volume greater than 1 liter of cyanobacterial suspension has not been reported.

The aim of the present work was to compare hydrogen production by the native strain of *Anabaena variabilis* ATCC29413 and its mutant PK84 under controlled conditions in a photobioreactor.

## **Materials and methods**

### ***Culture conditions.***

The filamentous heterocystous cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413 and its mutant form *A. variabilis* PK 84 were obtained from Prof. S. Shestakov (Moscow State University). Both strains were maintained in Allen and Arnon (1955) growth medium under sterile N<sub>2</sub>-fixing conditions.

To induce synthesis of V-containing nitrogenase in the microorganisms,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  in the medium was replaced by  $2\text{ }\mu\text{M Na}_3\text{VO}_4$ .

Cultivation of the mutant cells in an automated helical photobioreactor (PhBR) made of 10 mm internal diameter PVC tubes with volume 4.35 l (Tsygankov et al., 1998) was performed in Allen and Arnon growth medium under  $\text{N}_2$ -fixing conditions. The computer-controlled system of the PhBR with built-in sensors for pH, temperature, optical density and  $\text{pO}_2$  allowed the monitoring of oxygen and the control of pH, temperature and density of the culture using a thermo- and pH-stat system. pH of the culture was adjusted to 7.0 (8.0 for the mutant) by addition of 0.2 N NaOH and temperature was maintained at  $30^\circ\text{C}$  for native strain and  $36^\circ\text{C}$  for the mutant. During growth the cultures were continuously illuminated by fluorescent lamps and sparged by 98% air and 2%  $\text{CO}_2$  ( $500\text{ ml min}^{-1}$ ). The gas mixture was sterilised by bacterial gas filters with  $0.3\text{ }\mu\text{m}$  pore size (Hepa-Vent, Whatman, UK). Before use, the photobioreactor was sterilised with sodium hypochlorite solution (0.5%) for one hour and then washed 3-4 times with sterile distilled water.

#### *Actual $\text{H}_2$ production by the photobioreactor.*

Hydrogen production rates by the photobioreactor were calculated on the basis of  $\text{H}_2$  content in the effluent gas mixture and the gas flow rate using gas chromatography (Hewlett Packard 5890A, UK).  $100\text{ }\mu\text{l}$  gas samples were withdrawn from a gas sampling port positioned at the outlet of the PhBR.

### **Potential nitrogenase and H<sub>2</sub> production activities.**

In order to determine the potential nitrogenase and H<sub>2</sub> production activities in intact cells, i.e. the maximum activity the cells can exhibit under optimal conditions, a 2 ml sample of the cell suspension was withdrawn from the PhBR and transferred to 12 ml glass vials. The vials were closed with Suba seals (Freeman and Co., UK) and the gas phase inside the vials was replaced by argon for assay of H<sub>2</sub> production or by argon containing 20% C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> for assay of nitrogenase activity. The vials were then incubated in a water bath (30°C) kept over a stirrer and illuminated by fluorescent lamps (120  $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) for 45-60 min.

### **Chlorophyll content and dry weight.**

The chlorophyll a content was measured spectrophotometrically in methanol extracts at 665 nm (Tandeau de Marsac and Hourmand, 1988).

Dry weight of biomass was determined by filtration of 10-80 ml of the culture suspension (Whatman no.1 filter paper, England), washing the filter with distilled water and drying at 85°C to constant weight.

### **Light measurements.**

Photosynthetically active radiation on the surface of the helical tubular part of the PhBR and on the surface of the glass vials was measured with a quantum meter (LI-COR, model LI 189, Lambda Instrument Corp., Nebraska,

USA) and was expressed as the photosynthetic photon flux density (PPFD).

**Determination of the rate of oxygen photoproduction by photobioreactor.**

Changes in dissolved oxygen in the liquid medium of the PhBR ( $O_L$ ) can be described as

$$\frac{dO_L}{dt} = K_L a (C^* - O_L) + PO$$

where  $K_L a$  is the volumetric mass transfer coefficient between gas and liquid;

$C^*$  is the dissolved oxygen concentration when liquid is saturated by gas mixture;  $PO$  is the volumetric rate of photosynthetic oxygen evolution.

During growth of the cyanobacteria the changes of dissolved oxygen due to changes of biomass concentration were very slow, so

$$\frac{dO_L}{dt} \approx 0$$

Thus, when the PhBR was sparged by 98% air + 2%  $CO_2$ ,

$$PO = K_L a (C^* - O_L)$$

When the PhBR was supplied with argon,  $C^* = 0$  and

$$PO = K_L a O_L$$

**Determination of  $K_L a$**

$K_L a$  was calculated from the fitting of experimental data on degasification and aeration of the degassed photobioreactor filled with medium but without cyanobacteria according the equation:

$$\frac{dO_L}{dt} = K_L a (C^* - O_L)$$

During degassing  $C^*=0$  and during aeration  $C^*=240 \mu\text{M}$ .

Fitting the data from degassing the PhBR gave  $K_L a = 1.913 \cdot 10^{-3} \pm 5.817 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ .

Fitting the data from aeration of the degassed PhBR gave  $K_L a = 1.518 \cdot 10^{-3} \pm 3.824 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ . In subsequent calculations we used average value  $K_L a = 1.715 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$

## Results

The rate of hydrogen production by 1 l of cyanobacterial photobioreactor (volumetric rate) depends on the specific nitrogenase activity of the culture and the biomass concentration. However, many investigators have noted a loss in the specific nitrogenase activity and the rate of hydrogen production in the course of batch cultivation of different strains of cyanobacteria (Lichtl et al., 1997; Ni et al., 1990; Tsygankov et al., 1997). The present experiments also showed the decrease of hydrogen production activity of by biomass of *A. variabilis* ATCC 29413 containing 1 mg of Chl a (specific activity) at a Chl a concentration higher than  $3 \mu\text{g ml}^{-1}$  in PhBr (Fig. 1). At the same time an increase of Chl a concentration on a logarithmic scale showed nonlinear behaviour (Fig. 1). We suggest that the decrease in the specific rate of  $\text{H}_2$  production was due to light limitation in the dense culture.

*A. variabilis* ATCC 29413 failed to grow at a continuous irradiation  $240 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$

$^2 \text{ sec}^{-1}$ . Hence in order to check our suggestion we cultivated the cyanobacteria at varying irradiation (Fig. 2) and observed that the Chl a concentration increased linearly on a logarithmic scale up to  $17.5 \mu\text{g Chl ml}^{-1}$  (at 100 h of cultivation). The specific rates of hydrogen production and of  $\text{C}_2\text{H}_2$  reduction decreased slightly between 24 and 52 h of growth. When the irradiation increased both  $\text{H}_2$  production and  $\text{C}_2\text{H}_2$  reduction increased up to 100 h and then decreased sharply. Thus, the decrease in specific nitrogenase activity is a result of light limitation of the culture. Supplying the culture with saturating light allowed the maintenance of a high specific hydrogen production activity at culture concentrations up to  $17.5 \mu\text{g Chl ml}^{-1}$ .

During growth under air the *A. variabilis* native strain did not produce molecular hydrogen. The replacement of air+2%  $\text{CO}_2$  by argon+2%  $\text{CO}_2$  also did not result in hydrogen production by the culture (data not shown) due to inhibition of nitrogenase by photosynthetically produced oxygen. However, after the replacement of air+2%  $\text{CO}_2$  by pure argon the *A. variabilis* native strain started to produce hydrogen (Fig. 3). The potential rate of hydrogen photoproduction measured in small vials and recalculated to the whole PhBR was  $25.4 \text{ ml h}^{-1} \text{ PhBR}^{-1}$ . Thus, under argon the rate of hydrogen production by the PhBR with *A. variabilis* native strain was as high as the potential rate.

After 70 min of argon sparging the concentration of dissolved  $\text{O}_2$  decreased and was stable for more than 30 min (Fig. 3). The rate of  $\text{O}_2$  evolution by the PhBR under this condition was  $21.7 \text{ ml h}^{-1} \text{ PhBR}^{-1}$ . Taking into account that

during water photolysis 2 moles of H<sub>2</sub>O produced 2 moles of H<sub>2</sub> and 1 mole of O<sub>2</sub> we can calculate that at the maximum H<sub>2</sub> production rate (26.6 ml h<sup>-1</sup> PhBR<sup>-1</sup>, Fig. 3)  $26.6/21.7/2*100=61.3\%$  of photosynthetic reducing equivalents were used for hydrogen photoproduction.

Batch culture of *A. variabilis* PK84 grown at higher irradiances also showed high specific nitrogenase and hydrogen production activities measured in the vials up to a high culture density (Fig. 4). C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> reduction and hydrogen production was higher in the mutant than in the native strain (Fig. 2). In contrast to the native strain, the hydrogen production activity was higher than the C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> reduction activity at any stage of batch growth. With both native strain and mutant these activities decreased sharply when the dry biomass and Chl a concentration increased non-linearly (log scale; Fig. 4A). This supports our conclusion that the decline in specific acetylene reduction and hydrogen production activities occurs under light limitation.

*A. variabilis* mutant PK84 produced hydrogen during growth under air enriched with CO<sub>2</sub> (Fig. 4B). The maximum volumetric rate of hydrogen production corresponded to high biomass concentration and specific activity. At the maximum hydrogen production rate (43.3 ml h<sup>-1</sup> PhBR<sup>-1</sup>) the rate of photosynthesis was approximately 165 ml O<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> PhBR<sup>-1</sup>. In this case  $43.3/165/2*100=13.1\%$  of photosynthetic reducing equivalents were used for hydrogen production. During the growth period this value varied from 3.3% (just after the increase of light at 25.5 h) up to 13.1% (at the highest hydrogen

production rate). When the culture produced hydrogen at the maximal rate the potential hydrogen production recalculated for the whole photobioreactor was  $131.1 \text{ ml h}^{-1} \text{ PhBR}^{-1}$ . Thus, during growth under air enriched by  $\text{CO}_2$  the actual rate of hydrogen photoproduction was 33% of the potential ( $43.3/131.1 \times 100$ ).

The rate of  $\text{H}_2$  production by the PhBR incorporating the mutant PK84 increased when air+ $\text{CO}_2$  was replaced by argon (Fig. 5). After 2.5-3.5 h of argon the actual  $\text{H}_2$  production was 78-85% of the potential rate. During argon sparging the dissolved oxygen decreased and the pH increased due to the depletion of  $\text{CO}_2$  in the medium. After 2 h of sparging the pH was stabilised indicating the exhaustion of  $\text{CO}_2$ . This is in contrast to native strain since the dissolved oxygen concentration was not stable thereafter. After 3.5 h of incubation the rate of photosynthesis (calculated on the assumption that dissolved oxygen concentration was unchanged) was  $43.9 \text{ ml h}^{-1} \text{ PhBR}^{-1}$ . The rate of hydrogen photoproduction was  $57.8 \text{ ml h}^{-1} \text{ PhBR}^{-1}$ , thus 65.8% of photosynthesis was used for hydrogen photoproduction. This value was very close to that calculated for the native strain (61.3%).

Hydrogen production under argon+ $\text{CO}_2$  by the mutant was light-dependent; in the dark hydrogen was not produced (Fig. 6). The rate of hydrogen production was saturated at approximately  $300 \mu\text{E m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ . However, the rate of photosynthesis was not saturated at  $330 \mu\text{E m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ . At different irradiances (lower than  $250 \mu\text{E m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ ) 33-58% of the photosynthetic

energy flow was used for hydrogen photoproduction (the higher percentages were observed at lower irradiances).

Hydrogen photoproduction by the PK84 mutant under air+2% CO<sub>2</sub> was also stimulated by light (Fig. 7). In contrast to hydrogen production under argon it was not saturated at 332  $\mu\text{E m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ ; the rate of photosynthetic oxygen evolution was also not saturated. The rate of hydrogen production by the PhBR was 18.9% of potential activity measured in vials under the argon. Surprisingly, there was some hydrogen production in the dark probably due to energy supplied by respiration.

## Discussion

The nitrogenase activity of *A. variabilis* was highest in the exponential phase of growth and declined thereafter (Fig. 1, 2, and 4). Such a phenomenon is usually correlated with the rate of reductant supply to the heterocysts which in turn is determined by the rate of photosynthesis and glycogen accumulation and its breakdown (Ernst et al., 1984). The correlation between the rate of photosynthesis, glycogen accumulation and metabolism, and the rate of nitrogen fixation was also confirmed by the observations on the C/N ratio in cells of *A. variabilis* (Yakunin et al., 1995). Thus, light-saturating conditions are important for high specific nitrogenase activity and hydrogen photoproduction by *A. variabilis*.

Only a few heterocystous cyanobacteria are known to produce hydrogen

during growth under air (Kumar and Kumar, 1992). Hydrogen produced during nitrogen fixation is consumed in the oxyhydrogen reaction with participation of hydrogenases (Rao and Hall, 1996). Replacement of air by argon inhibits hydrogen uptake owing to absence of oxygen. In our experiments under an argon atmosphere approximately two thirds of the photosynthetic electron flow was used by native strain of *A. variabilis* for hydrogen production (Fig. 3). However, these conditions are not appropriate for long-term cultivation of cyanobacteria because of the lack of N and C sources.

*A. variabilis* mutant PK84 produced H<sub>2</sub> under air+CO<sub>2</sub> conditions at a high rate. Yet, only 33% of the potential hydrogen production capacity was realised under these conditions and not more than 13% of oxygenic photosynthesis was used for H<sub>2</sub> production. Assuming that the energetic efficiency of photosynthesis (defined as portion of incident light energy accumulated in heat of combustion of biomass) is 9% under optimal growth conditions (Bolton and Hall, 1991), the maximum efficiency of light energy conversion into H<sub>2</sub> in mutant was not higher than  $0.13 \times 0.09 \times 100 = 1.17\%$ . However, this value is probably overestimated for several reasons. The reported photosynthetic growth efficiency of 9% was calculated for the case when all photons were absorbed, i.e. for light-limited conditions. Under these conditions *A. variabilis* exhibits low nitrogenase activity and, as a consequence, low rate of H<sub>2</sub> production, as seen from our results. In addition, oxygenic photosynthesis

does not take into account the light energy absorbed by heterocysts for anoxygenic photosynthesis.

Under argon alone the actual H<sub>2</sub> production rate was as high as the potential rate for *A. variabilis* native strain and approximately three quarters for mutant PK84. Two thirds of oxygenic photosynthesis was used for H<sub>2</sub> production. However, the portion of photosynthesis used for hydrogen production under anaerobic nitrogen-free conditions was higher than under air+CO<sub>2</sub> mainly due to inhibition of noncyclic photosynthetic electron transport (as a result of CO<sub>2</sub> depletion) and was only partly due to the actual increase of hydrogen production.

Hydrogen production by *A. variabilis* PK84 under the argon+CO<sub>2</sub> atmosphere was saturated at approximately 300  $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  while photosynthetic O<sub>2</sub> evolution was not (Fig. 6). At this light intensity PK84 mutant showed approximately 90% of its potential H<sub>2</sub> production activity. Evidently, at 300  $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , in the presence of 2% CO<sub>2</sub> the rate of photosynthesis (approx. 95 ml O<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> PhBR<sup>-1</sup>) in the vegetative cells was sufficient to provide the heterocysts with saturating levels of reductants, and due to lack of N<sub>2</sub> all nitrogenase electron flow was directed towards hydrogen photoproduction. The PK84 mutant exhibited higher light saturation of H<sub>2</sub> evolution under argon+CO<sub>2</sub> than did native strain of *A. variabilis* (Gogotov et al., 1976) or *Oscillatoria sp.* (Phlips and Mitsui, 1983); we did not observe any light inhibition of the

process in the range of light intensities used. Possibly, an inhibition of hydrogen production by strong light reported for other cyanobacteria (Gogotov et al., 1976; Philips and Mitsui, 1983; Rao and Hall, 1996) was the result of increased dissolved oxygen concentrations and, as a consequence, increased rates of the oxyhydrogen reaction catalysed by hydrogenases.

Oxygen evolution and hydrogen production by *A. variabilis* PK84 under air+CO<sub>2</sub> was not saturated even at 332  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Fig. 7). Due to the presence of N<sub>2</sub> the actual hydrogen production was only 18.9% of potential hydrogen photoproduction activity. In the dark aerobic conditions mutant PK84 produced hydrogen, albeit, in low quantities. Since the nitrogenase activity of *A. variabilis* heterocysts can be supported by respiratory metabolism (Ernst et al., 1983), we suggest that the dark hydrogen evolution by PK84 mutant was catalysed by nitrogenase.

Thus, in terms of biological H<sub>2</sub>-production systems, *A. variabilis* PK84 exhibits much better characteristics than does *A. variabilis* ATCC 29413. This indicates that generation of cyanobacterial mutants can increase the efficiency of H<sub>2</sub> producing systems. Nevertheless, our experiments show that only a small portion of photosynthetically generated energy was used for H<sub>2</sub> production by PK84 under CO<sub>2</sub>-enriched air. This assumes that there is an energy potential in this organism to maintain significantly higher rates of H<sub>2</sub> production than that was observed in our experiments. Such a higher rate of H<sub>2</sub> production could be achieved by an increase of the nitrogenase activity of

the cyanobacterium due to an increase of heterocyst frequency and/or by an increase of activity of each individual heterocyst. An additional means to attain higher productivities of H<sub>2</sub> production would be the avoidance of light regulation of the H<sub>2</sub> production system in cyanobacterial cells. Generation of cyanobacteria with such properties, by using *A. variabilis* PK 84 as the basic form, would be the next step in improvement of the overall efficiency of biosolar H<sub>2</sub> production systems.

### **Acknowledgements**

Authors wish to thank Prof. S. Shestakov and Dr. L. Mikheeva for kind gift of PK84 mutant. This work was supported by RITE (Tokyo) and by INTAS (Brussels). AA Tsygankov thanks COST 818 (EU, Brussels) for a short-term fellowship to King's College London.

### **References**

- Allen, M. B., Arnon, D. I. 1955. Studies on nitrogen-fixing blue-green algae. 1. Growth and nitrogen-fixation by *Anabaena cylindrica* lemm. Plant Physiology **30**: 366-372.
- Benemann, J. R. 1997. Feasability analysis of photobiological hydrogen production. Int. J. Hydrogen Energy **22**: 979-987.
- Bolton, J. R., Hall, D.O. 1991. The maximum efficiency of photosynthesis. Photochem. Photobiol. **53**: 545-548
- Ernst, A., Bohme, H., Boger, P. 1983. Phosphorylation and nitrogenase activity in isolated heterocysts from *Anabaena variabilis*. Biochim. Biophys. Acta **723**:

Ernst, A., Kirschenlohr, H., Diez, J., Boger, P. 1984. Glycogen content and nitrogenase activity in *Anabaena variabilis*. Arch. Microbiol. **140**: 120-125.

Fay, P. 1992. Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. Microbiol. Rev. **56**: 340-373.

Gallon, J. R. 1992. Reconciling the incompatible: N<sub>2</sub> fixation and O<sub>2</sub>. New Phytol **122**: 571-609.

Gogotov, I. N., Kosyak, A. V., Krupenko, A. N. 1976. Hydrogen photoproduction by cyanobacterium *Anabaena variabilis*. Mikrobiologiya. **44**: 941-945 (Rus.).

Hansel, A., Lindblad, P. (1998) Towards optimization of cyanobacteria as biotechnologically relevant producers of molecular hydrogen, a clean and renewable energy source. Appl. Microbiol. Biotechnol. **50**: 153-160

Kentemich, T., Danneberg, G., Hundeshagen, B., Bothe, H. 1988. Evidence for the occurrence of the alternative, vanadium-containing nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. FEMS Microbiol. Lett. **51**: 19-24.

Kentemich, T., Haverkamp, G., Bothe, H. 1990. The generation of molecular hydrogen by cyanobacteria. Naturwissenschaften. **77**: 12-18.

Kumar, D., Kumar, H. D. 1992. Hydrogen production by several cyanobacteria. Int. J. Hydrogen Energy **17**: 847-852.

Lichtl, R. R., Bazin, M. J., Hall, D. O. 1997. The biotechnology of hydrogen

production by *Nostoc flagelliforme* grown under chemostat conditions. Appl. Microbiol. Biotechnol. **47**: 701-707.

Markov, S. A., Bazin, M. J., Hall, D. O. 1995. The potential of using cyanobacteria in photobioreactors for hydrogen production. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. **52**: 59-86.

Markov, S. A., Bazin, M. J., Hall, D. O. 1996. Efficiency of light energy conversion in hydrogen production by cyanobacterium *Anabaena variabilis*. J. Mar. Biotechnol. **4**: 57-60.

Markov, S. A., Weaver, P. F., Seibert, M. (1997) Spiral tubular bioreactors for hydrogen production by photosynthetic microorganisms - Design and operation. Appl. Biochem. Biotechnol. **63-65**: 577-584

Mikheeva, L. E., Schmitz, O., Shestakov, S. V., Bothe, H. 1995. Mutants of the cyanobacterium *Anabaena variabilis* altered in hydrogenase activities. Zeitschrift fur Naturforschung C, **50**: 505-510.

Ni, C. V., Yakunin, A. F., Gogotov, I. N. 1990. Influence of molybdenum, vanadium, and tungsten on growth and nitrogenase synthesis of the free-living cyanobacterium *Anabaena azollae*. Microbiology **59**: 395-398.

Ni, C. V., Yakunin, A. F., Gogotov, I. N. 1991. Effect of bound forms of nitrogen on the growth and synthesis of different *Anabaena variabilis* nitrogenases. Microbiology **59**: 260-263.

Phlips, E. J., Mitsui, A. 1983. Role of light intensity and temperature in the regulation of hydrogen photoproduction by the marine cyanobacterium

- Oscillatoria* sp. strain Miami BG7. Appl. Environ. Microbiol. **45**: 1212-1220.
- Rao, K. K., Hall, D. O. 1996. Hydrogen production by cyanobacteria: potential, problems and prospects. J. Mar. Biotechnol. **4**: 10-15.
- Serebryakova, L. T., Zorin, N. A., Gogotov, I. N. 1992. The hydrogenase activity in filamentous cyanobacteria. Mikrobiologiya. **61**: 175-182 (Rus.).
- Sveshnikov, D. A., Sveshnikova, N. V., Rao, K. K., Hall, D. O. 1997. Hydrogen metabolism of mutant forms of *Anabaena variabilis* in continuous cultures and under nutritional stress. Fems Microbiol. Lett. 147: 297-301.
- Tandeau de Marsac, N., Houmard, J. (1988). Complimentary chromatic adaptation: physiological conditions and action spectra. Methods Enzymol. **167**: 318-328
- Tsygankov, A. A., Ni, C. V., Gogotov, I. N. 1991. Growth and adaptational potential of nitrogenase system of continuous culture of *Anabaena variabilis*. Mikrobiologiya. **60**: 853-858.
- Tsygankov, A. S., Serebryakova, L. T., Sveshnikov, D. A., Rao, K. K., Gogotov, I. N., Hall, D. O. 1997. Hydrogen photoproduction by three different nitrogenases in whole cells of *Anabaena variabilis* and the dependence on pH. Int. J. Hydrogen Energy **22**: 859-867.
- Tsygankov, A. S., Hall, D. O., Liu, J.-G., Rao, K. K. 1998. An automated helical photobioreactor incorporating cyanobacteria for continuous hydrogen production. pp. 431-440. In: O.R. Zaborsky (ed.), Biohydrogen. Plenum Pub. Corp., N.Y.

Yakunin, A. F., Troshina, O. Y., Gogotov, I. N. 1995. Relationship between nitrogenase synthesis and the C/N ratio in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena variabilis*. Microbiology **64**: 5-6 (Rus.).

## Figure legends

Fig. 1. Batch culture of *A. variabilis* ATCC 29413 grown at a PPFD of 110  $\mu\text{E m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ . (1) optical density as measured by on-line sensor; (2) Chl a concentration; (3) specific rate of  $\text{C}_2\text{H}_2$  reduction; (4) specific rate of  $\text{H}_2$  photoproduction.  $\text{C}_2\text{H}_2$  reduction and  $\text{H}_2$  photoproduction were measured in the vials as described in Materials and Methods section. pH during cultivation: 7.0

Fig. 2. Batch culture of *A. variabilis* ATCC 29413 grown at increasing irradiation levels. Arrows indicate the time of switching of irradiation from 44 to 110  $\mu\text{E m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$  (first arrow) and from 110 to 240  $\mu\text{E m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$  (second arrow). Symbols and numbering as in Fig. 1.

Fig. 3.  $\text{H}_2$  production by the photobioreactor incorporating *A. variabilis* ATCC 29413 after switching the gas flow from air+2%  $\text{CO}_2$  to argon. 20 min before the measurements the light was switched off and air+2%  $\text{CO}_2$  (0.5 l  $\text{min}^{-1}$ ) was replaced by argon. The experiment was started by switching the light on.  $\text{H}_2$  production measured in the vials was 25.4 ml  $\text{h}^{-1}$  PhBR $^{-1}$ . (1) rate of  $\text{H}_2$  photoproduction; (2) dissolved oxygen; (3) pH.

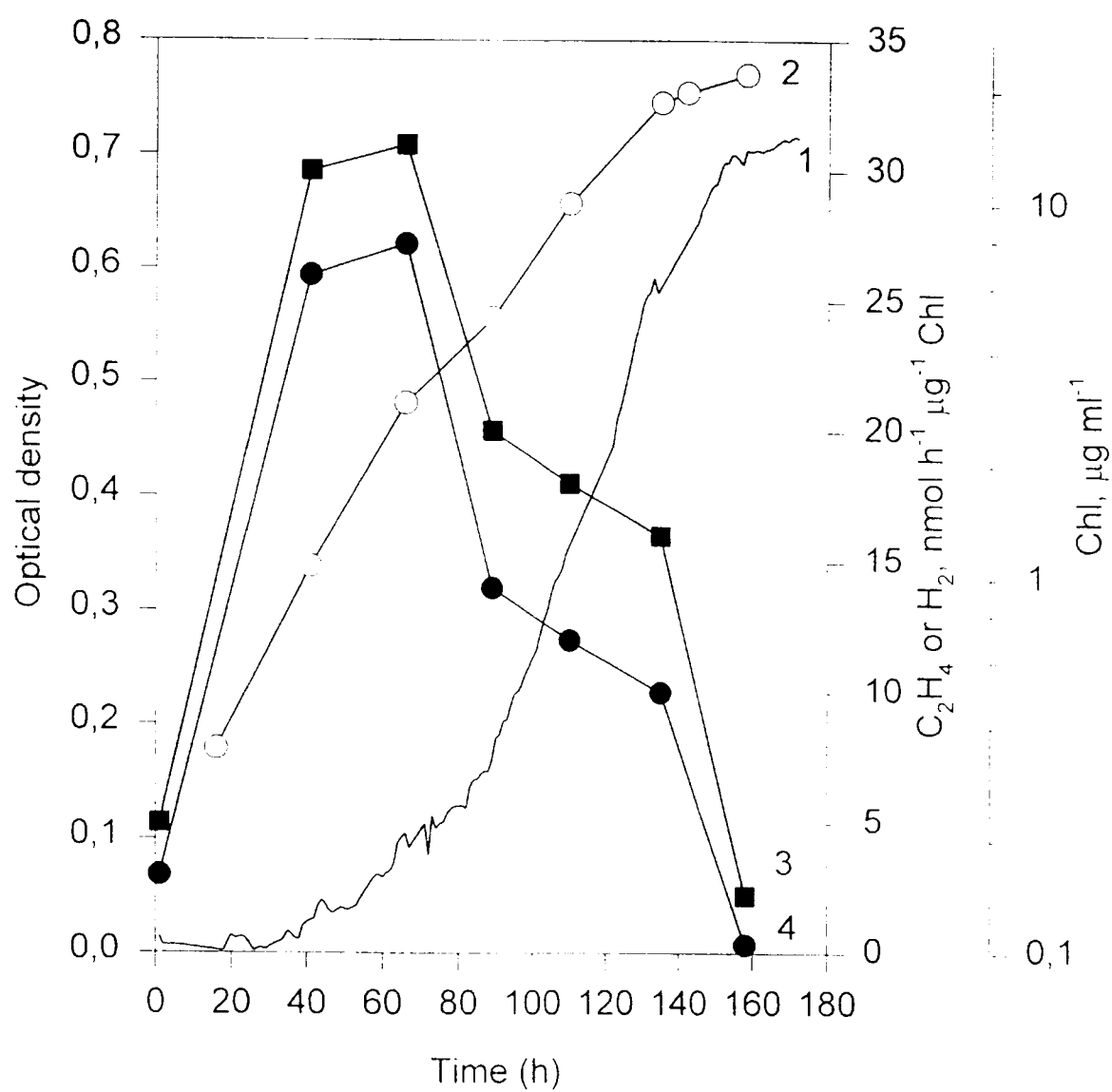
Fig. 4. Batch culture of *A. variabilis* PK84 grown at increased irradiation. Arrow indicates the time of switching of irradiation from 110 to 332  $\mu\text{E m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ . Fig. 4A: (1) dry biomass; (2) Chl a concentration; (3) specific rate of  $\text{C}_2\text{H}_2$  reduction; (4) specific rate of  $\text{H}_2$  photoproduction.  $\text{C}_2\text{H}_2$  reduction and  $\text{H}_2$  photoproduction were measured in the vials as described in Materials and Methods section. Fig. 4B: 1 - dissolved oxygen; 2 - rate of oxygen evolution; 3

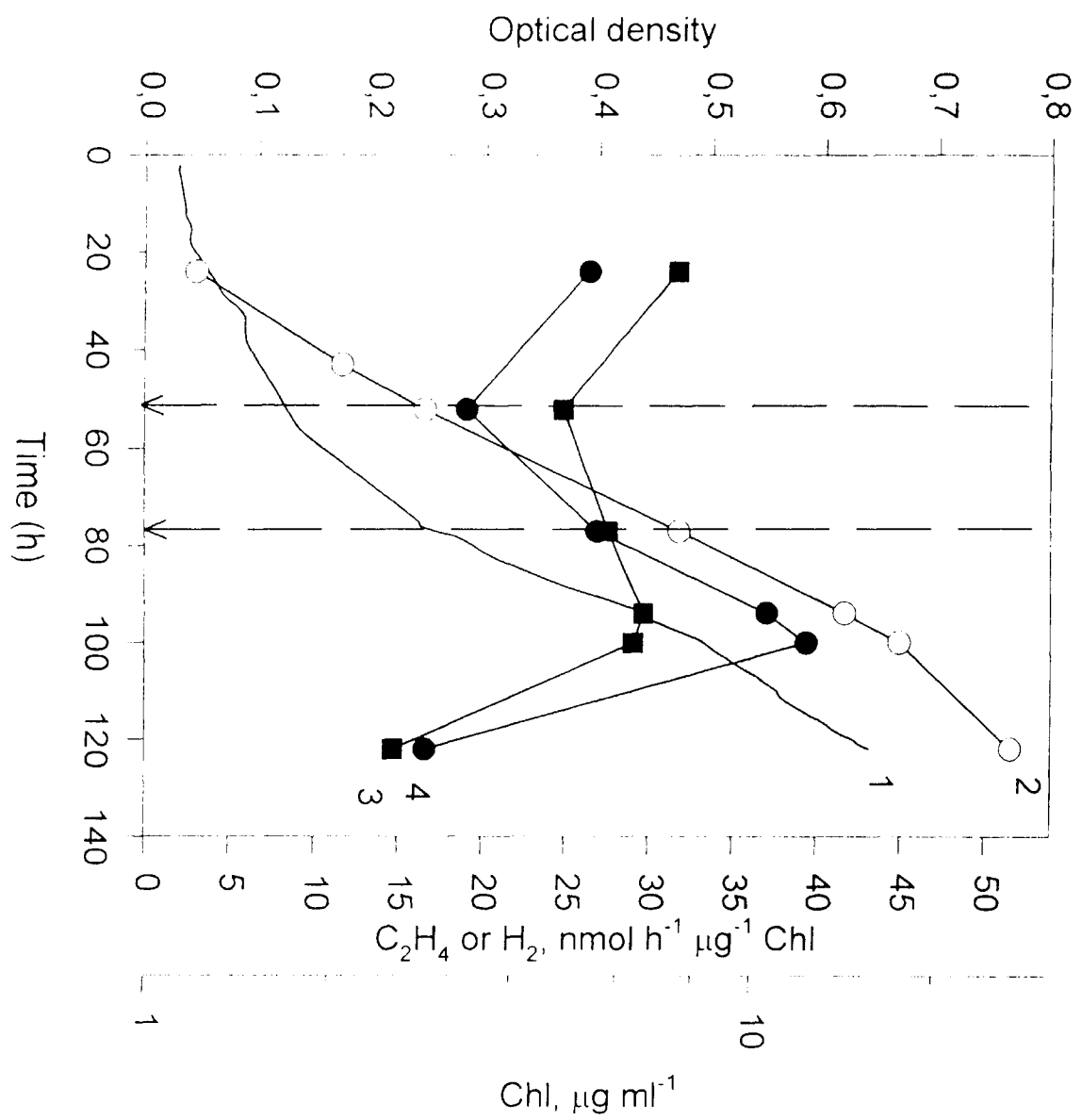
- rate of H<sub>2</sub> photoproduction. For calculation of oxygen photoevolution rate, see Materials and Methods Section. The pH during cultivation was 8.0.

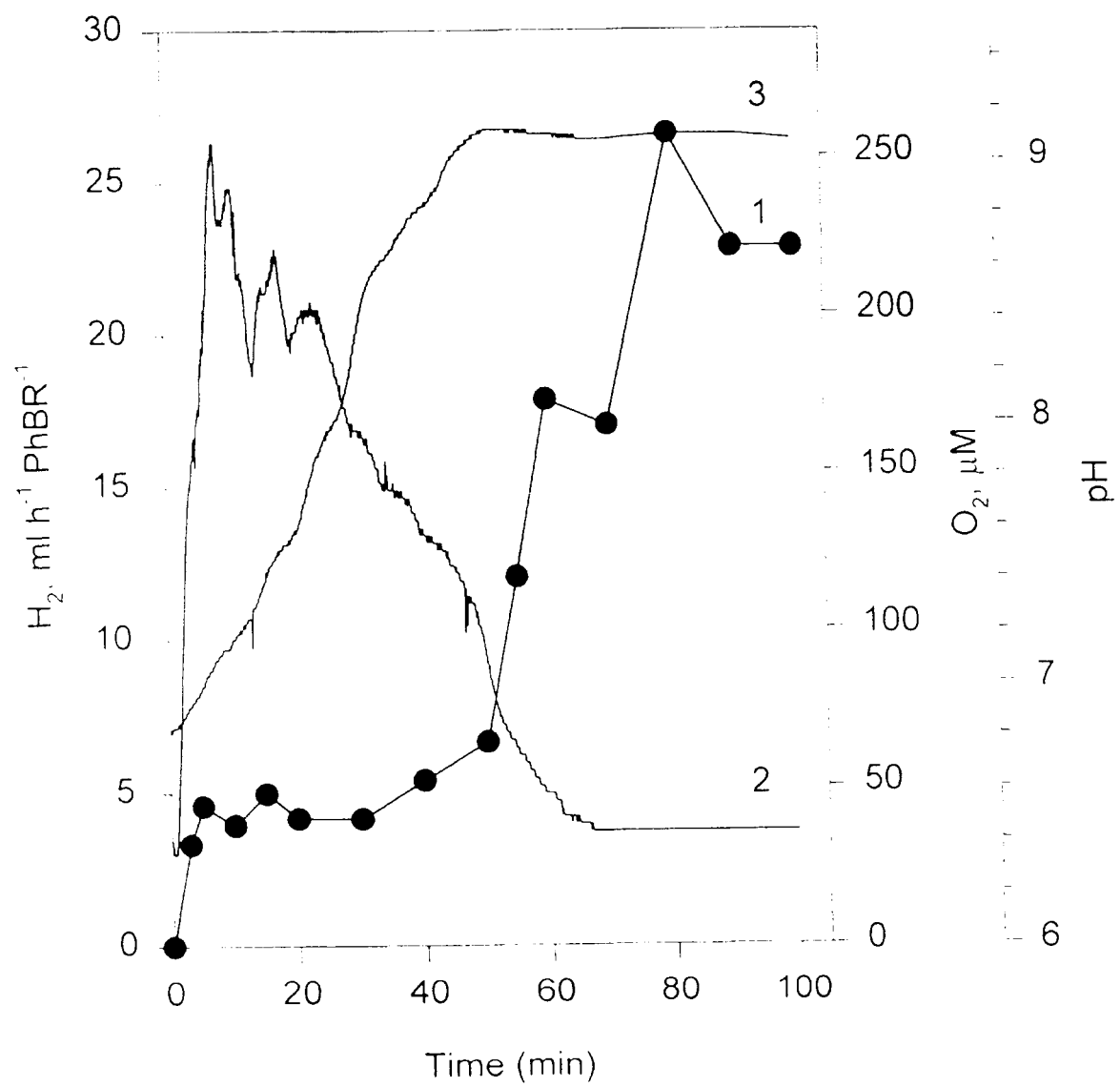
Fig. 5. H<sub>2</sub> production by the photobioreactor incorporating *A. variabilis* PK84 after switching of gas flow from air+2% CO<sub>2</sub> to argon. At the start, air+2% CO<sub>2</sub> (0.5 l min<sup>-1</sup>) was replaced by argon. The H<sub>2</sub> production measured in the vials was equivalent to 77 ml h<sup>-1</sup> PhBR<sup>-1</sup>. (1) rate of H<sub>2</sub> production; (2) dissolved oxygen; (3) pH.

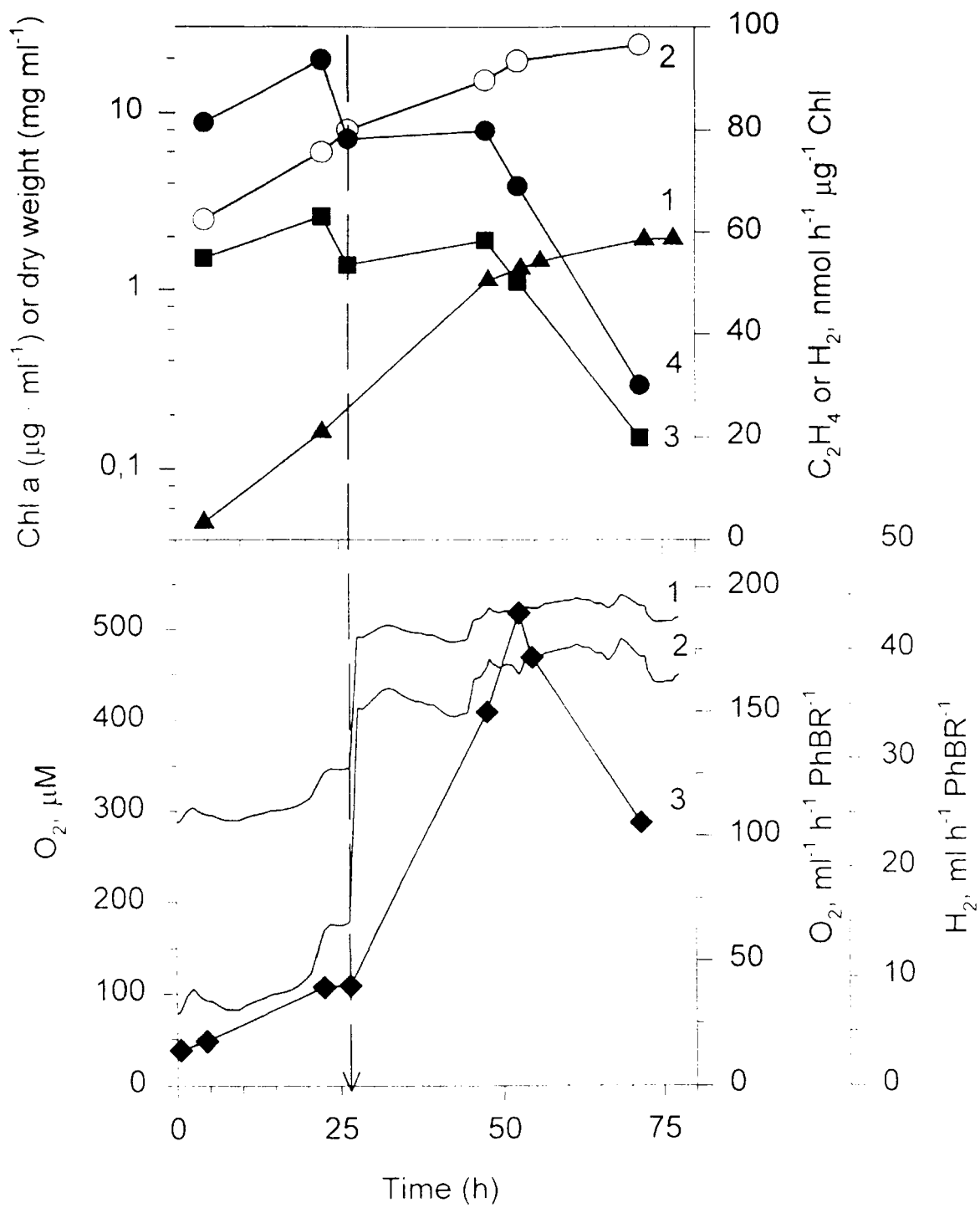
Fig. 6. Hydrogen and oxygen production rates by *A. variabilis* PK84 under argon as a function of irradiation. The potential H<sub>2</sub> production rate was 58.5 ml h<sup>-1</sup> PhBR<sup>-1</sup>. 1 - H<sub>2</sub> production; 2 - dissolved oxygen; 3 - rate of oxygen evolution (consumption). Measurements were started at the highest light intensity with subsequent decrease of irradiation. Each point represents the steady-state rate of H<sub>2</sub> evolution.

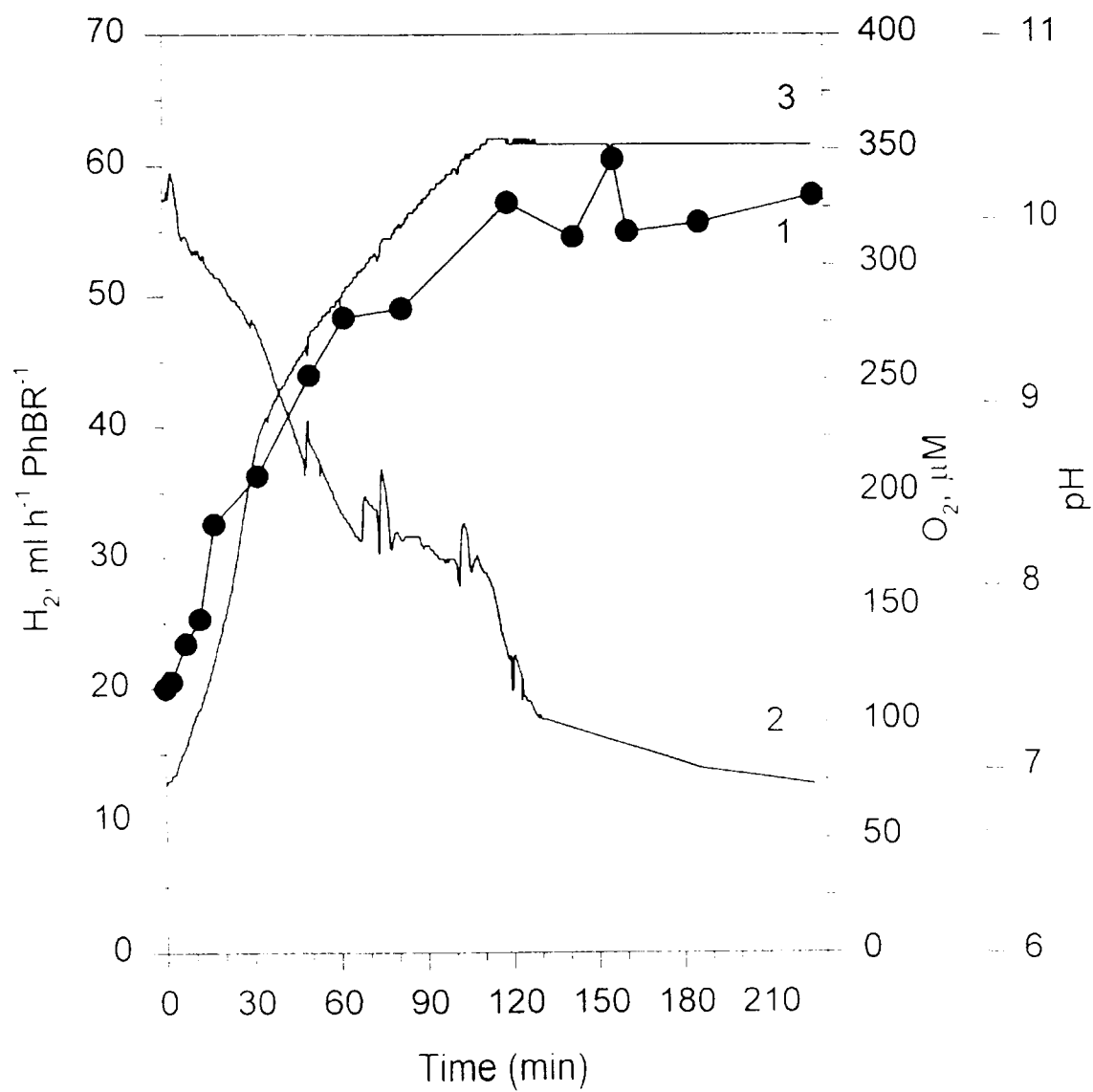
Fig. 7. Hydrogen and oxygen photoproduction rates by *A. variabilis* PK84 under air+2% CO<sub>2</sub> as a function of irradiation. H<sub>2</sub> photoproduction measured in the vials was equivalent to 35.4 ml h<sup>-1</sup> PhBR<sup>-1</sup>. 1 - H<sub>2</sub> photoproduction; 2 - dissolved oxygen; 3 - rate of oxygen evolution (consumption). The PhBR was kept in darkness for 3.5 hours and then the irradiation was successively increased.

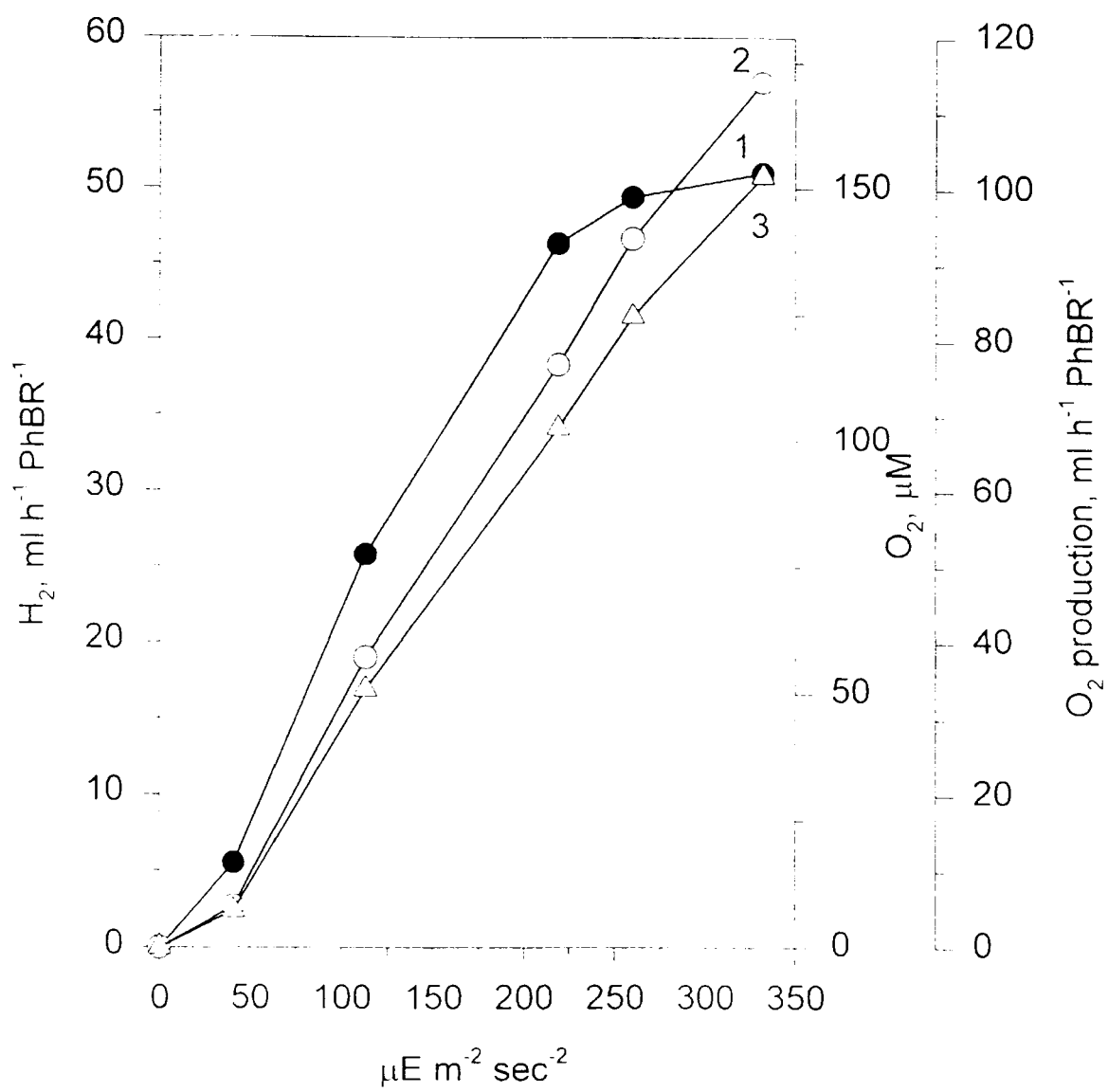


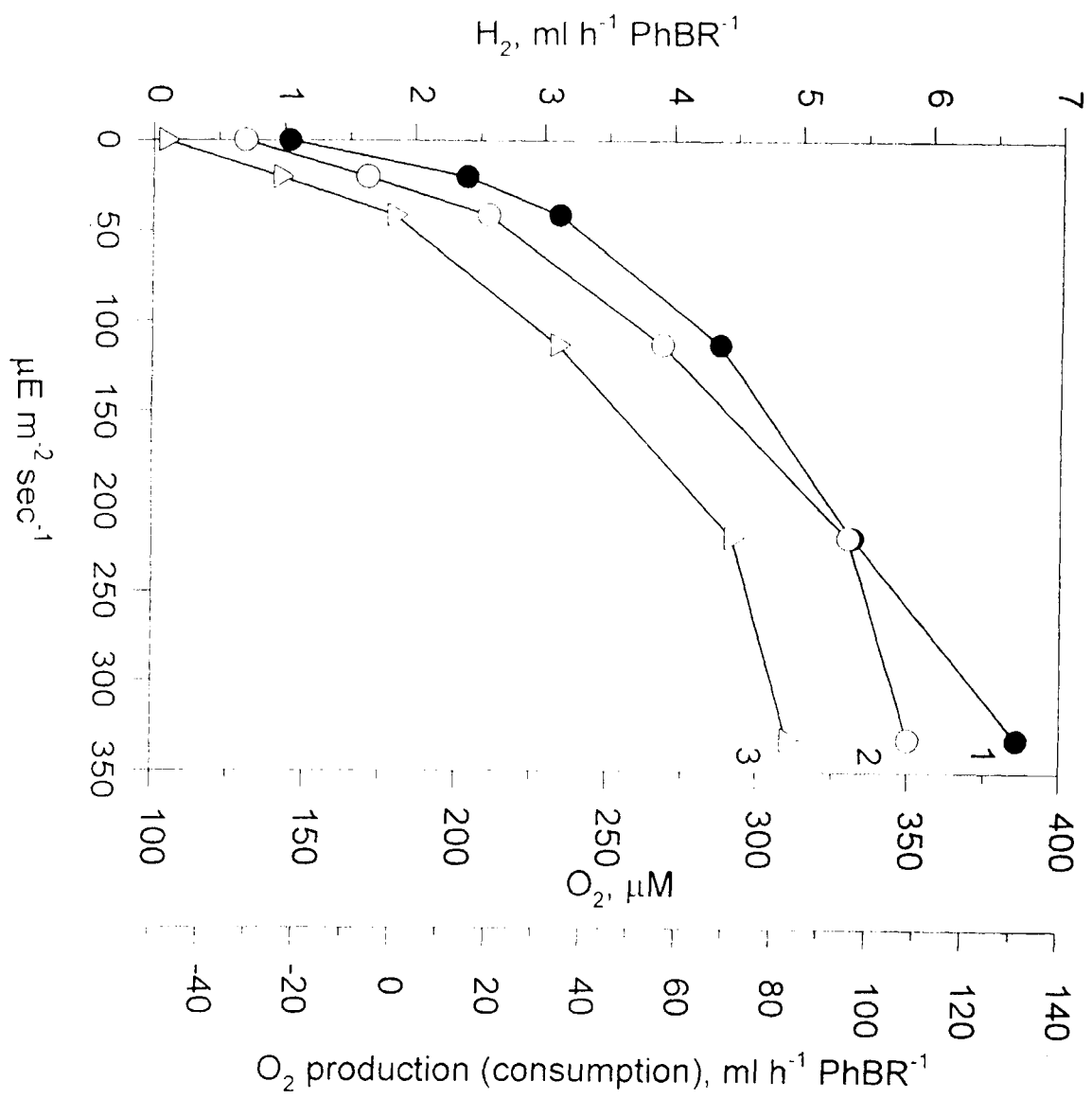












**Hydrogen production by *Anabaena variabilis* PK 84  
under simulated outdoor conditions.**

V.B. Borodin<sup>1</sup>, A.A. Tsygankov<sup>1</sup>, K.K. Rao, D.O. Hall.

King's College London, Campden Hill Rd., London W8 7AH, UK.

<sup>1</sup> Present address: Institute of Basic Biological Problems RAS, Pushchino, Moscow Region, 142292, Russia.

**Corresponding author:**

Dr. V.B. Borodin  
Institute of Basic Biological Problems RAS, Pushchino, Moscow Region, 142292,  
Russian Federation  
Tel.: (7)-0967-732831  
Fax: (7)-0967-790532  
E-mail: borodin@issp.serpukhov.su

**Running title:**

**H<sub>2</sub> production by *A. variabilis* PK 84 under simulated outdoor conditions.**

## Summary

Hydrogen production by *Anabaena variabilis* PK 84, a mutant impaired in the utilisation of molecular hydrogen, under simulated outdoor conditions has been studied. The cyanobacterium produced H<sub>2</sub> continuously during cultivation in an automated helical tubular photobioreactor (4.4 l) under air containing 2% CO<sub>2</sub> and alternating 12-h light(day) and 12-h dark(night) periods for about three months. The maximum H<sub>2</sub> production by the continuously aerated culture was 230 ml · day<sup>-1</sup> · PhBR<sup>-1</sup> which was observed at a growth density corresponding to 3.5 – 4.8 µg Chl a · ml<sup>-1</sup> (1.2 - 1.6 mg dry wt. · ml<sup>-1</sup>). Anaerobiosis during the dark period affected (?) H<sub>2</sub> production by *A. variabilis* PK 84. Replacement of air by an argon atmosphere enhanced H<sub>2</sub> evolution by a factor of 2. This stimulatory effect was caused mainly by N<sub>2</sub> deprivation in the cell suspension. The specificity of H<sub>2</sub> production and some physiological characteristics of *A. variabilis* PK 84 during cultivation in the photobioreactor under the alternative light-dark regime are discussed.

**Keywords:** *Anabaena variabilis*, hydrogen production, photobioreactor, light-dark cycle

## Introduction

The feasibility of photoproduction of  $H_2$  by cyanobacteria-based systems is therefore at present under theoretical and practical consideration (Hansel and Lindblad, 1998; Rao and Hall, 1996). In order to reduce the cost of  $H_2$  production, these systems should operate under the outdoor conditions, i.e. under the natural periodic light and temperature. Although  $H_2$  production by biological systems has been extensively studied, there are no reports of cyanobacterial  $H_2$  production under outdoor conditions.

Thus we undertook a study of  $H_2$  production by *Anabaena variabilis* PK 84 during cultivation in a helical tubular photobioreactor under the outdoor-simulated conditions. This organism was generated by Mikheeva et al. (1995) from the filamentous heterocystous cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413 using a mutagenesis technique. It was impaired in the utilisation of molecular hydrogen and was able to generate  $H_2$  directly under an air atmosphere. Earlier it has been shown that due to the mutation *A. variabilis* PK 84 had essential advantages over the native strain in terms of  $H_2$

production (Mikheeva et al., 1995; Sveshnikov et al., 1997; Tsygankov et al., 1998). It also steadily evolved appreciable amount of  $H_2$  into  $CO_2$ -enriched air during long-term cultivation in photobioreactors under batch growth conditions and continuous illumination (Markov et al., 1997; our unpublished data). Results of our

*A. variabilis* PK 84 had essential advantages over the native strain in terms of H<sub>2</sub> production (Mikheeva et al., 1995; Sveshnikov et al., 1997; Tsygankov et al., 1998). It also steadily evolved appreciable amount of H<sub>2</sub> into CO<sub>2</sub>-enriched air during long-term cultivation in photobioreactors under batch growth conditions and continuous illumination (Markov et al., 1997; our unpublished data). Results of our study are shown in the present publication.

---

**Abbreviations:** PhBR, photobioreactor; dry wt., dry weight; Chl a, chlorophyll a; PPFD, photosynthetic photon flux density.

### **Materials and methods**

The filamentous heterocystous cyanobacterium *Anabaena variabilis* PK 84, a mutant impaired in the utilisation of molecular hydrogen, was obtained from Prof. S. Shestakov (Moscow State University). The cyanobacterium was maintained and grown in Allen and Arnon (1955) medium in the absence of fixed nitrogen. Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> in the medium was replaced by 2 µM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> with the aim of synthesis of the V-containing nitrogenase (Kentemich et al., 1991; Tsygankov et al., 1997).

Cultivation of the cyanobacterium was performed in an automated helical photobioreactor (Tsygankov et al., 1998). The photobioreactor (PhBR) was constructed using PVC tubing (10 mm ID) with a total volume 4.35 l. The volume and area of a illuminated part of the PhBR were 3.17 l and 0.53 m<sup>2</sup>, respectively.

## Materials and methods

The filamentous heterocystous cyanobacterium *Anabaena variabilis* PK 84, a mutant impaired in the utilisation of molecular hydrogen, was obtained from Prof. S. Shestakov (Moscow State University). The cyanobacterium was maintained and grown in Allen and Arnon (1955) medium in the absence of fixed nitrogen.  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  in the medium was replaced by 2  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_3\text{VO}_4$  with the aim of synthesis of the V-containing nitrogenase (Kentemich et al., 1991; Tsygankov et al., 1997).

Cultivation of the cyanobacterium was performed in an automated helical photobioreactor (Tsygankov et al., 1998). The photobioreactor (PhBR) was constructed using PVC tubing (10 mm ID) with a total volume 4.35 l. The volume and area of a illuminated part of the PhBR were 3.17 l and 0.53 m<sup>2</sup>, respectively. Circulation of the culture in the PhBR was provided by an air-lift system. Before use the PhBR was sterilised with sodium hypochlorite (0.5%) for one hour and then washed several times with sterile distilled water.

*A. variabilis* PK 84 was cultivated in the PhBR under air containing 2%  $\text{CO}_2$  and alternating 12 h light and 12 h dark. The cultivation during the light/dark periods was performed under the controlled/uncontrolled conditions. The temperature of the culture was 36°/14-30°C (light/dark periods). During the light periods cells were illuminated by fluorescent lamps (manufacturer, type, wattage ?) and the pH of the culture was maintained at 8.0 by NaOH. The culture was provided with sterile  $\text{CO}_2$ -

enriched air ( $500 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ) via the air-lift system. Growth conditions in the PhBR were controlled by a computer system connected to built-in pH-, temperature-, optical density and  $\text{pO}_2$  sensors. When necessary 1-2 polyurethane balls were circulated along with the culture in the PhBR to clean off the inner surface of the PVC tubes.

The actual (net)  $\text{H}_2$  production by the culture was calculated on the basis of the  $\text{H}_2$  content in the effluent gas and the gas flow rate in the PhBR. The  $\text{H}_2$  content in the effluent gas was measured by a gas chromatograph (Hewlett Packard 5890).

The potential  $\text{H}_2$  production by the organism was calculated on the basis of the rate of  $\text{H}_2$  evolution by a 2-ml culture in 12-ml glass vials. The continuously stirred culture in the vial was incubated at a PPFD of  $120 \mu\text{E} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$  (type, wattage ?) and  $36^\circ\text{C}$  for 45-60 min. The cells incubated under air+2%  $\text{CO}_2$  were directly transferred from the PhBR to the vial. To avoid alkalization of the culture due to the lack of  $\text{CO}_2$  under incubation with ordinary air, Ar+20%  $\text{O}_2$  or pure Ar, the cyanobacteria, were pelleted, resuspended in the fresh growth medium (pH 8.0) to the initial density and then placed in vials. The  $\text{H}_2$  content in vials was measured by the gas chromatography (Define specific and volumetric rates of  $\text{H}_2$  production).

Heterocysts frequency was determined visually under a microscope counting not less than 600 cells. The chlorophyll content was measured spectrophotometrically in methanol extracts at 665 nm (Tandeau de Marsac &

Houmard, 1988). Dry weight of biomass was determined by filtration of the culture suspension (Whatman no.1 filter paper, UK), washing the cell mass with distilled water and drying at 85°C to constant weight.

Photosynthetically active incident radiation was measured by a quantum meter (model LI 189, LI-COR, Nebraska, USA) and expressed as the photosynthetic photon flux density (PPFD).

## Results

It has been found in preliminary experiments it was found that cell adhesion to the inner surface of the PVC tubing was significantly reduced during cultivation of *A. variabilis* PK84 at pH 8 compared to pH 7 (data not shown). Therefore to ensure normal operation of all sensors in the PhBR and correct maintenance of experimental conditions, the long-term cultivation of the cyanobacterium in the current work was performed at pH 8.

At first *A. variabilis* PK 84 was cultivated under alternating light-dark cycles and continuous aeration. Transition of the PhBR from the light to darkness was accompanied by switching off the thermostat, pH-stat and light systems in the PhBR. Under darkness the oxygen concentration in the culture fell rapidly due to cessation of photosynthetic O<sub>2</sub> evolution and consumption of O<sub>2</sub> by the respiratory system of the cyanobacteria (Fig. 1a). Similarly, photosynthetic CO<sub>2</sub> consumption was halted in

darkness, resulting in an increase of dissolved CO<sub>2</sub> concentration and acidification of the culture by extra CO<sub>2</sub> (Fig. 1b). In darkness the temperature of the culture was determined by the laboratory ambient temperature; its minimum value varied from the dark to dark cycle in the range of 14 - 30°C (Fig. 1c).

Hydrogen production by the continuously aerated culture was not constant during the day. It increased gradually during the first 3-5 h of illumination and then either kept constant or usually slightly decreased thereafter (Fig. 2a). At the onset of the dark period the rate of H<sub>2</sub> production decreased rapidly down to a very low level. The potential volumetric and specific rates of H<sub>2</sub> production measured in the vials both under CO<sub>2</sub>-enriched air and argon were significantly higher than the actual (net) H<sub>2</sub> production measured in the PhBR, but the time courses of all three parameters were similar (data not shown).

The dependency of H<sub>2</sub> production by the PhBR culture on the growth density are shown in Fig. 3. In this experiment illumination during the light periods corresponded to 332  $\mu\text{E} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ . Regardless of the gas composition, both the actual and potential specific H<sub>2</sub> production rates depended on cell density in a similar manner. They were both greatest at the lowest cell density and declined significantly thereafter as the concentration of cells in the PhBR increased (Fig. 3a). Time patterns of the actual and potential volumetric H<sub>2</sub> production rates under the gas mixtures were also quite similar (Fig. 3b). However, in contrast to the specific activities, the

volumetric rates of H<sub>2</sub> production increased as the cell mass of the culture increased and reached the maximum value at a growth density corresponding to 3.5 – 4.8 µg Chl a · ml<sup>-1</sup> (1.2 - 1.6 mg dry wt. · ml<sup>-1</sup>). Further increase of the cell concentration had a clear negative effect on H<sub>2</sub> production by the culture. It is interesting that the ratio of potential rates under argon (curve 1) to those under air+2% CO<sub>2</sub> atmosphere (curve 2) was two. The ratio of potential (curve 2) to actual (curve 3) rates under air+2% CO<sub>2</sub> atmosphere was two as well.

The heterocyst frequency did not change very much during cultivation of *A. variabilis* PK 84 in the PhBR at various cell concentrations. It gradually declined from 11.5% to 8.5 % as the growth density of the culture increased in the range of 3 – 7 µg Chl a · ml<sup>-1</sup>. As with the heterocysts, the chlorophyll content of the cells changed somewhat. It decreased from 4.4 to 2.7 µg Chl a · mg<sup>-1</sup> dry wt. as the growth density increased from 2.8 to 6.7 µg Chl a · ml<sup>-1</sup>.

Fig. 4 demonstrates the importance of the light factor for H<sub>2</sub> production by *A. variabilis* PK 84 under the alternative light-dark regime. A change of light intensity from 332 to 223 µE · s<sup>-1</sup> · m<sup>-2</sup> led to more than a 2-fold decrease in the rate of H<sub>2</sub> production by the PhBR.

Since the use of nonaerating conditions with the culture during the night would reduce the practical cost of H<sub>2</sub> fuel produced by outdoor systems, the effect of the

absence of aeration during the dark periods on  $H_2$  production by *A. variabilis* PK 84 was therefore further studied.

After the cultivation at various concentrations of cells under continuous aeration, the culture in the PhBR was diluted by fresh medium to a density of  $4 \mu\text{g Chl a} \cdot \text{ml}^{-1}$  (the optimum density seen in Fig. 3) and the continuous aeration was replaced by periodic aeration. Fig. 5a shows that in contrast to continuous aeration, the oxygen concentration in the culture in the absence of aeration during the dark very rapidly reached zero levels. Meanwhile changes in pH (Fig. 5b) and temperature (Fig. 5c) in the culture after transition from light (aerated) to the dark (nonaerated) periods were similar to that during continuous aeration. The dark-induced decrease of pH in the absence of aeration was the result of saturation of the culture with extra  $\text{CO}_2$ , as the gas flow in the PhBR was always stopped several minutes after switching off the light. Similarly, the sudden change of pH at the beginning of light periods was the result of the transient increase of  $\text{CO}_2$  concentration in the culture until the system reached equilibrium.

The time course of the actual  $H_2$  production by the periodically aerated culture during the light period (Fig. 2b) was similar to that of the continuously aerated culture (Fig. 2a). Typically, however, the former reached maximum  $H_2$  production activity over a shorter time interval (within 1.5 - 2.0 h of illumination) than did the latter (within 3 - 5 h of illumination). During the dark, since sparging of the culture

was halted, it was not possible to determine the actual H<sub>2</sub> production by the periodically aerated culture.

Fig. 6 shows that the transition of *A. variabilis* PK 84 from continuous to periodic aeration did not affect actual H<sub>2</sub> production instantly. However, after 7 days of cultivation the negative effect of the periodic aeration on H<sub>2</sub> production by the organism became evident.

Fig. 3 shows that CO<sub>2</sub>-enriched air inhibited H<sub>2</sub> production by *A. variabilis* PK 84. To identify factor(s) affecting H<sub>2</sub> production by the cyanobacterium under CO<sub>2</sub>-enriched air, the effect of the gas phase on H<sub>2</sub> formation in incubation vials was studied (Table 1). Rates of H<sub>2</sub> evolution were similar both under the pure argon and argon containing 20% oxygen. However, there was a reduction in the rates of H<sub>2</sub> evolution under air and air +2% CO<sub>2</sub>, indicating that during cultivation under air conditions H<sub>2</sub> production by *A. variabilis* PK 84 was mainly affected by atmospheric nitrogen. Table 1 also shows the 2-fold decrease in rates of H<sub>2</sub> evolution by the mutant in the presence of atmospheric nitrogen when compared to its absence. Table 1 also shows that the high CO<sub>2</sub> concentration in air had a slight stimulatory effect on H<sub>2</sub> evolution by *A. variabilis* PK 84.

## Discussion

The present study revealed that *A. variabilis* PK84 continuously sparged by CO<sub>2</sub>-enriched air steadily generated appreciable amounts of H<sub>2</sub> during cultivation in the PhBR under alternating light and darkness for about three months. The microorganism evolved H<sub>2</sub> both during the light and dark periods.

It is well known that certain cyanobacteria can fix N<sub>2</sub> during heterotrophic growth in the dark as well as to continue to fix N<sub>2</sub> at a decreased rate in darkness after autotrophic growth in the light (Fay, 1992). *A. variabilis* is among them (Jensen and Cox, 1983). Dark N<sub>2</sub> fixation in these organisms is O<sub>2</sub> dependent, indicating that the requirements for N<sub>2</sub> fixation are met by respiration (Donze et al., 1971; Weare and Benemann, 1973; Jensen and Cox, 1983; Markov and Krasnovsky, 1985). Hence nitrogenase-mediated H<sub>2</sub> evolution by *A. variabilis* PK84 during dark periods could have been expected but, in fact, it was negligible compared to the light period (Fig. 2a). This allowed us to neglect dark H<sub>2</sub> production in the present research.

The maximum actual and potential specific rates of H<sub>2</sub> production were found at the lowest growth density of the culture (Fig. 3a). The value of both rate characteristics decreased as the growth density of the culture increased. This inverse dependence of the specific rate on the cell mass (*Nostoc flagelliforme*) was also observed earlier (Lichtl et al., 1997). It was ascribed to the progressive light limitation of cultures due to self-shading of the cells.

As in the case of *N. flagelliforme* (Lichtl et al., 1997), there was a gradual reduction of the heterocysts frequency in *A. variabilis* PK84 (from 11.5% to 8.5 %) as the growth density of the culture increased from 3 to 7  $\mu\text{g Chl a} \cdot \text{ml}^{-1}$ . However, the change in heterocyst frequency was not so pronounced as the (%) inhibition of  $\text{H}_2$  production in the cyanobacterium under the same conditions (Fig. 3a). It seems therefore that the effect of the cell concentration on  $\text{H}_2$  production was exerted in *A. variabilis* PK84 mainly via regulation of the nitrogenase activity rather than via regulation of the number of heterocysts in cyanobacterial filaments.

There was a decrease in the Chl a content in *A. variabilis* PK84 from 11–15 to 2.7–4.4  $\mu\text{g Chl a} \cdot \text{mg}^{-1}$  dry wt after transition of the cyanobacterium from the continuous illumination to the alternating light-dark periods (the PPFD in both cases was  $332 \mu\text{E} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ ). Owing to this reduction in the amount of chlorophyll, the microorganism showed a high rate of  $\text{H}_2$  production under argon ( $272 \mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  Chl a; Fig. 3a).

Since the rate of  $\text{H}_2$  production by the overall cyanobacterial system depends on both the specific activity of the cells and the total cell mass,  $\text{H}_2$  production by the PhBR increased in our experiments as the density of the culture increased (Fig. 3b). The optimal cell concentration for both the potential and actual hydrogen production rates by the continuously aerated system corresponded to  $3.5 - 4.8 \mu\text{g Chl a} \cdot \text{ml}^{-1}$  ( $1.2 - 1.6 \text{ mg dry wt.} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). However, a further increase in the cell mass had a clear

negative effect on H<sub>2</sub> production by the culture, probably due to light limitation. The maximum actual H<sub>2</sub> production by the PhBR during continuous aeration of the culture was 230 ml · day<sup>-1</sup> · PhBR<sup>-1</sup> while the maximum potential under air+2% CO<sub>2</sub> and argon atmosphere were 430 and 810 ml · day<sup>-1</sup> · PhBR<sup>-1</sup>, respectively.

Light is an essential factor for H<sub>2</sub> production by cyanobacteria, however, too high a light intensity including natural midday illumination was found to suppress generation of H<sub>2</sub> (Markov et al., 1995). It has been recently shown that exposure of our PhBR to the light higher than 70 μE · s<sup>-1</sup> · m<sup>-2</sup> resulted in an inhibition of H<sub>2</sub> production by *A. azollae* during sparging with CO<sub>2</sub>-enriched argon (Tsygankov et al., 1998). Similarly, the inhibition of H<sub>2</sub> evolution in *A. variabilis* (Gogotov et al., 1976) and *Oscillatoria* sp. (Phlips and Mitsui, 1983) was observed at light intensities higher than 2.5-6.0 W · m<sup>-2</sup> (about 12.5-30 μE · s<sup>-1</sup> · m<sup>-2</sup>) and μE · s<sup>-1</sup> · m<sup>-2</sup>, respectively. H<sub>2</sub> evolution in *A. cylindrica* (Kosiak et al., 1978) was more resistant to high irradiation but it was saturated at as low light intensity as 40 W · m<sup>-2</sup> (about 200 μE · s<sup>-1</sup> · m<sup>-2</sup>). Although the optimal light intensity for H<sub>2</sub> formation by *A. variabilis* PK84 is still a matter of future investigations, the more than 2-fold increase of H<sub>2</sub> production after the increase of PPFD from 223 to 332 μE·s<sup>-1</sup>·m<sup>-2</sup> indicates one advantage of this mutant over the native strains in terms of construction of outdoor systems.

In contrast to the light periods, the actual H<sub>2</sub> production by *A. variabilis* PK84 in darkness in the absence of aeration is unknown (Fig. 2b). As there was no oxygen

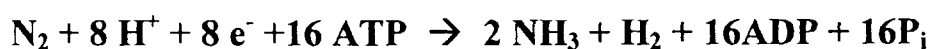
in the culture (Fig. 5a), an activation of the fermentation process in cyanobacterial cells was presumed in the dark periods. It is well known that some cyanobacteria are able to fix  $N_2$  in darkness in the absence of  $O_2$ , while others do not (Fay, 1992). Requirements for  $N_2$  fixation are met in the former through fermentative metabolism. However, in accordance with the oxygen dependence of the nitrogenase activity (Weare and Benemann, 1973; Jensen & Cox, 1983; Markov & Krasnovsky, 1985),  $H_2$  production by the cyanobacteria in the absence of oxygen should be less than under aerobic conditions and can be therefore be neglected. Meanwhile utilisation of previous products of fermentation would accelerate light-induced activation of  $H_2$  production in the beginning of the light period (Fig. 2).

Although the absence of aeration during dark periods reduced the above mentioned induction period and would also decrease the future cost of produced  $H_2$ , it had a negative effect on long-term  $H_2$  production by *A. variabilis* PK84 (Fig. 6). This implies that anaerobic conditions are unfavourable for  $H_2$  production by *A. variabilis* PK84 and should be avoided during operation of outdoor systems. However, the mechanism of action of the “nocturnal” anaerobiosis on diurnal  $H_2$  evolution is not clear.

The reported  $H_2$  evolution activity of *A. variabilis* PK84 depended on the composition of the gas phase and the means of determination of the activity. Fig. 3 shows that rates of  $H_2$  production under  $CO_2$ -enriched air in incubation vials (curve

2) were generally about twice as high as those in the PhBR (curve 3), indicating some limitation of H<sub>2</sub> production in the PhBR. We attribute this limitation mainly to the extent of the nonilluminated areas in the PhBR i.e. two vertical air-lift systems of total volume of 1.18 l. Transition of cyanobacterial cells from illuminated to the nonilluminated segments of the PhBR slowed down overall H<sub>2</sub> formation by the PhBR.

The rate of H<sub>2</sub> production in *A. variabilis* PK84 was also enhanced about 2-fold by the replacement of the gas phase in vials with argon instead of air (Fig.3, Table 1). This stimulatory effect was caused mainly by N<sub>2</sub> deprivation in the culture (Table 1). However for some unknown reason it was almost twice less than that predicted by the stoichiometry of the nitrogenase reaction:



In addition, there was a stimulatory effect of high CO<sub>2</sub> concentrations on H<sub>2</sub> production by *A. variabilis* PK84 (Table 1) probably due to the activation of CO<sub>2</sub> fixation in vegetative cells and subsequent increased flux of freshly synthesised carbohydrates to heterocysts.

In conclusion, the results of our study are consistent with the idea of hydrogen production by cyanobacteria being based on outdoor biosolar systems. Growth and development of *A. variabilis* PK84 during cultivation under the simulated outdoor

conditions for about three months was accompanied by steady production of appreciable amounts of hydrogen.

### Acknowledgements

Authors thanks Prof. S. Shestakov and Dr. L. Mikheeva of Moscow State University for the kind gift of the PK84 mutant. This work was supported by RITE (Tokyo).

### References

Allen, M.B., Arnon, D.I. 1955. Studies on nitrogen-fixing blue-green algae. 1. Growth and nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica* Lemm. Plant Physiol., **30**: 366-372.

Donze , M.H.J., van Gorkom, Raat, A.J.P. 1971. Light-dark transients in nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica*. J. Gen. Microbiol. **69**: xiv-xv.

Fay, P. 1992. Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. Microbiol. vol? Rev. p. 340-373.

Gogotov, I. N., Kosiak, A. V., Krupenko, A. N. 1976. Hydrogen production by the cyanobacterium *Anabaena variabilis* in the light. Mikrobiologia. **45**: 941-945 (Rus.).

Hansel, A., Lindblad, P. 1998. Towards optimization of cyanobacteria as biotechnologically relevant producers of molecular hydrogen, a clean and renewable energy source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**: 153-160.

Jensen, B.B., Cox, R.P. 1983. Effect of oxygen concentration on dark nitrogen fixation and respiration in cyanobacteria. *Arch. Microbiol.* **135**: 287-292.

Kentemich, T., Haverkamp, G., Bothe, H. 1991. The expression of a third nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Z. Naturforsch.* **46c**: 217-222.

Kosiak, A.V., Gogotov, I.N., Kulakova, S.M. 1978. Hydrogen photoevolution by the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *Mikrobiologia.* **47**: 605-700 (Rus).

Lichtl, R.R., Bazin, M.J., Hall, D.O. 1997. The biotechnology of hydrogen production by *Nostoc flagelliforme* grown under chemostat conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**: 701-707.

Markov, S.A., Bazin, M.J., Hall, D.O. 1995. The potential of using cyanobacteria in photobioreactors for hydrogen production. *Adv. Biochem. Engineer. Biotechnol.* **52**: 59-86.

Markov, S.A., Krasnovsky, A.A. 1985. The capacity for nitrogen fixation in a blue-green alga upon transition from heterotrophic to autotrophic carbon metabolism. *Sov. Plant Physiol.* **32**: 562-?.

Markov, S.A., Weaver, P.F., Seibert, M. 1997. Spiral tubular bioreactors for hydrogen production by photosynthetic microorganisms. Design and operation. Appl. Biochem. Biotechnol. **63-65**: 577- 584.

Phlips, E. J., Mitsui, A. 1983. Role of light intensity and temperature in the regulation of hydrogen photoproduction by the marine cyanobacterium *Oscillatoria* sp. strain Miami BG7. Appl. Environ. Microbiol. **45**: 1212-1220.

Rao, K.K., Hall, D.O. 1996. Hydrogen production by cyanobacteria: Potential, problems and prospects. J. Mar. Biotechnol. **4**: 10-15.

Sveshnikov, D.A., Sveshnikova, N.V., Rao, K.K., Hall, D.O. 1997. Hydrogen metabolism of mutant forms of *Anabaena variabilis* in continuous cultures and under nutritional stress. FEMS Microbiol. Lett. **147**: 297-301.

Tandeau de Marsac, N., Houmard, J. 1988. Complementary chromatic adaptation: physiological conditions and action spectra. Methods Enzymol. **167**: 318-328.

Tsygankov, A.S., Hall, D.O., Liu, J.-G., Rao, K.K. 1998. An automated helical photobioreactor incorporating cyanobacteria for continuous hydrogen production. In: Biohydrogen 97, (O.R. Zaborsky ed.), Plenum Pub., N.Y. pp. 431-440.

Tsygankov, A.A., Serebryakova, L.T., Rao, K.K., Hall, D.O. 1998. Acetylene reduction and hydrogen photoproduction by wild-type and mutant strains of *Anabaena* at different CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> concentrations. FEMS Microbiol. Lett. **167**:13-17.

Tsygankov, A.A., Serebriakova, L.T., Sveshnikov, D.A., Rao, K.K., Gogotov, I.N., Hall, D.O. 1997. Hydrogen photoproduction by three different nitrogenases in whole cells of *Anabaena variabilis* and the dependence on pH. Int. J. Hydrogen Energy, **22**: 859-867.

Weare, N.M., Benemann, J.R. 1973. Nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica*. I. Localization of nitrogen fixation in the heterocysts. Arch. Mikrobiol. **90**: 323-332.

### Figure legends

Fig. 1. Changes in O<sub>2</sub> concentration, pH and temperature in a continuously aerated culture of *A. variabilis* PK 84 after transition of the PhBR from the light to dark conditions and vice versa.

Traces were recorded at the growth density of 4 µg Chl a · ml<sup>-1</sup> and PPFD of 332 or 0 µE · s<sup>-1</sup> · m<sup>-2</sup> (light/dark periods).

Fig. 2. Time-courses of the actual H<sub>2</sub> production by *A. variabilis* PK 84 under CO<sub>2</sub>-enriched air.

(a), continuous aeration, curves 1 and 2 were determined at  $4.0$  and  $5.6 \mu\text{g Chl a} \cdot \text{ml}^{-1}$  respectively; (b), in the absence of aeration during dark periods, the growth density was  $4 \mu\text{g Chl a} \cdot \text{ml}^{-1}$ . The onset of the light period ( $332 \mu\text{E} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ ) was at zero time. Vertical dotted lines indicate the onset of darkness. SD ( $n=3$ ) less than 5%.

Fig. 3. The dependence of  $\text{H}_2$  production on growth density by a continuously aerated culture of *A. variabilis* PK 84.

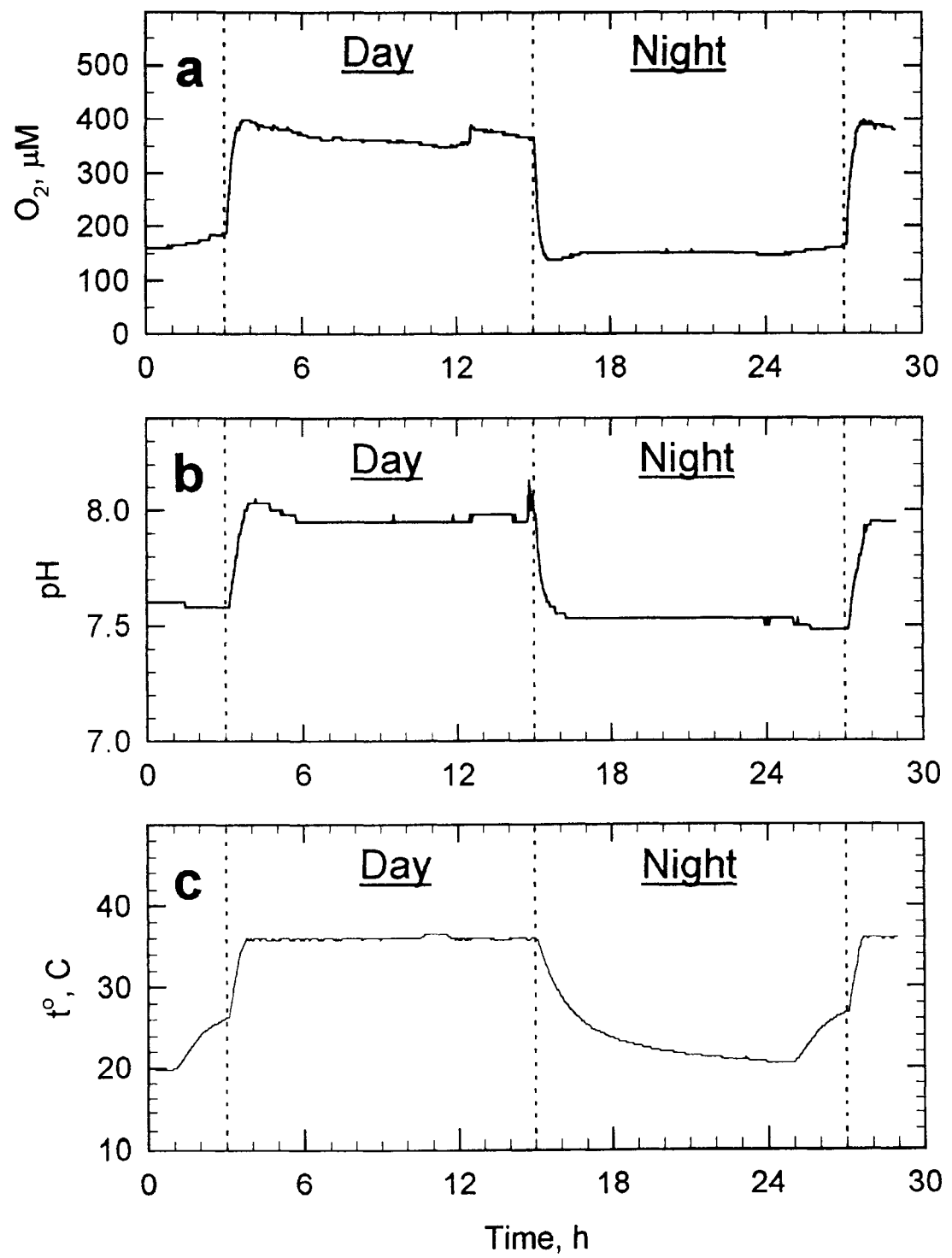
Curves 1, 2 and 3 are the potential  $\text{H}_2$  production under argon, the potential  $\text{H}_2$  production under air+2%  $\text{CO}_2$  and the actual  $\text{H}_2$  production under air+2%  $\text{CO}_2$ , respectively. (a), specific rates of  $\text{H}_2$  evolution determined after a relative stabilisation of  $\text{H}_2$  evolution (9 h after the onset of the light period); (b), volumetric rates of  $\text{H}_2$  production were calculated on the basis of  $\text{H}_2$  production only during light periods.

During the experiment the growth density was changed gradually from the lower to the higher values. At each indicated density cultivation lasted for 3-5 days. The PhBR was irradiated at a PPFD of  $332 \mu\text{E} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ . SD for potential and actual rates was less than 5% and 20%, respectively.

Fig. 4. The effect of light intensity on the actual  $\text{H}_2$  production by the continuously aerated culture of *A. variabilis* PK 84.

Bars represent average values of  $\text{H}_2$  production during successive cultivation of the cyanobacteria at the PPFD of  $223 \mu\text{E} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$  (11 days) and then at  $332 \mu\text{E} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$

**Fig. 1**



**Fig. 2**

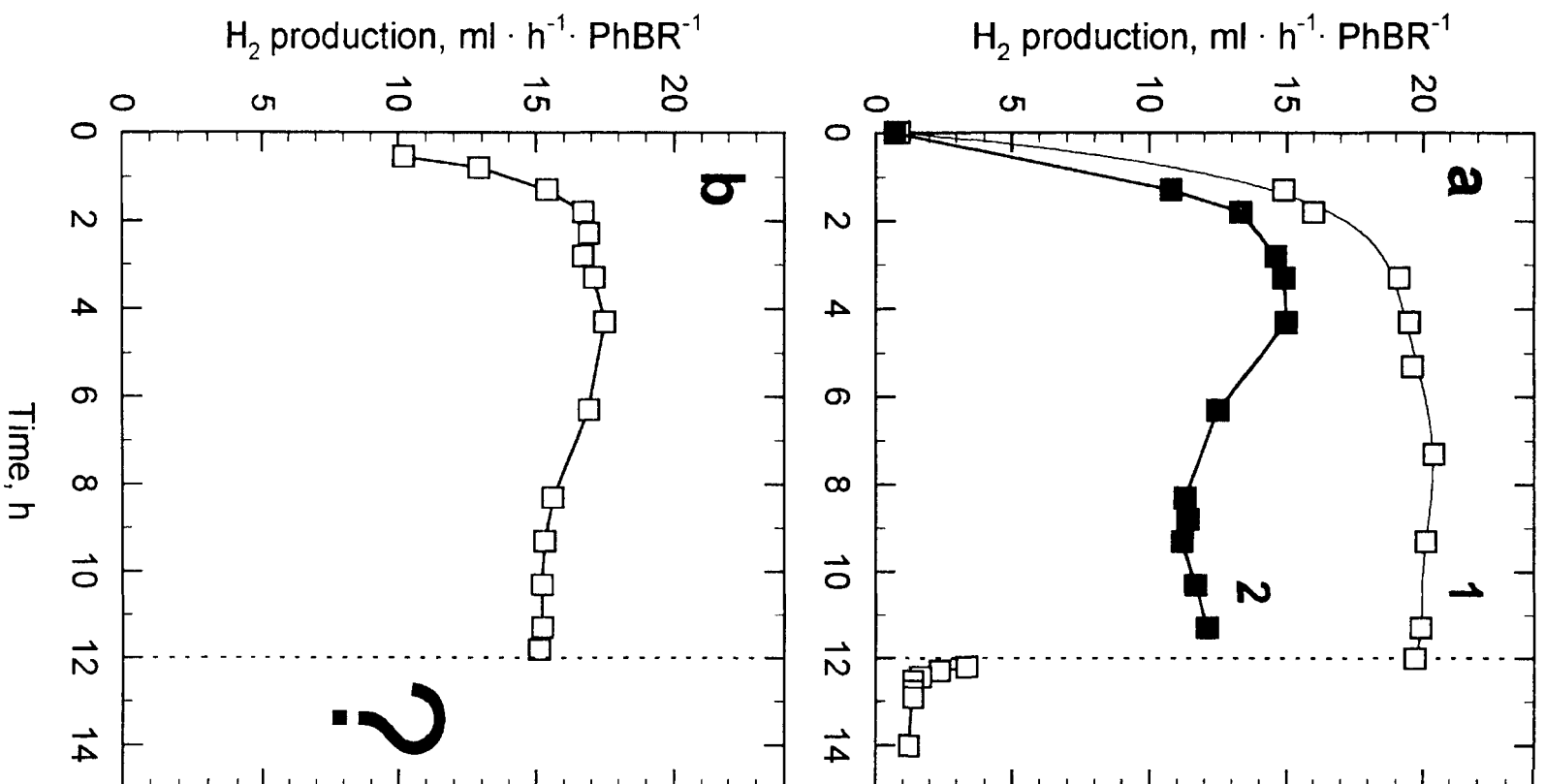
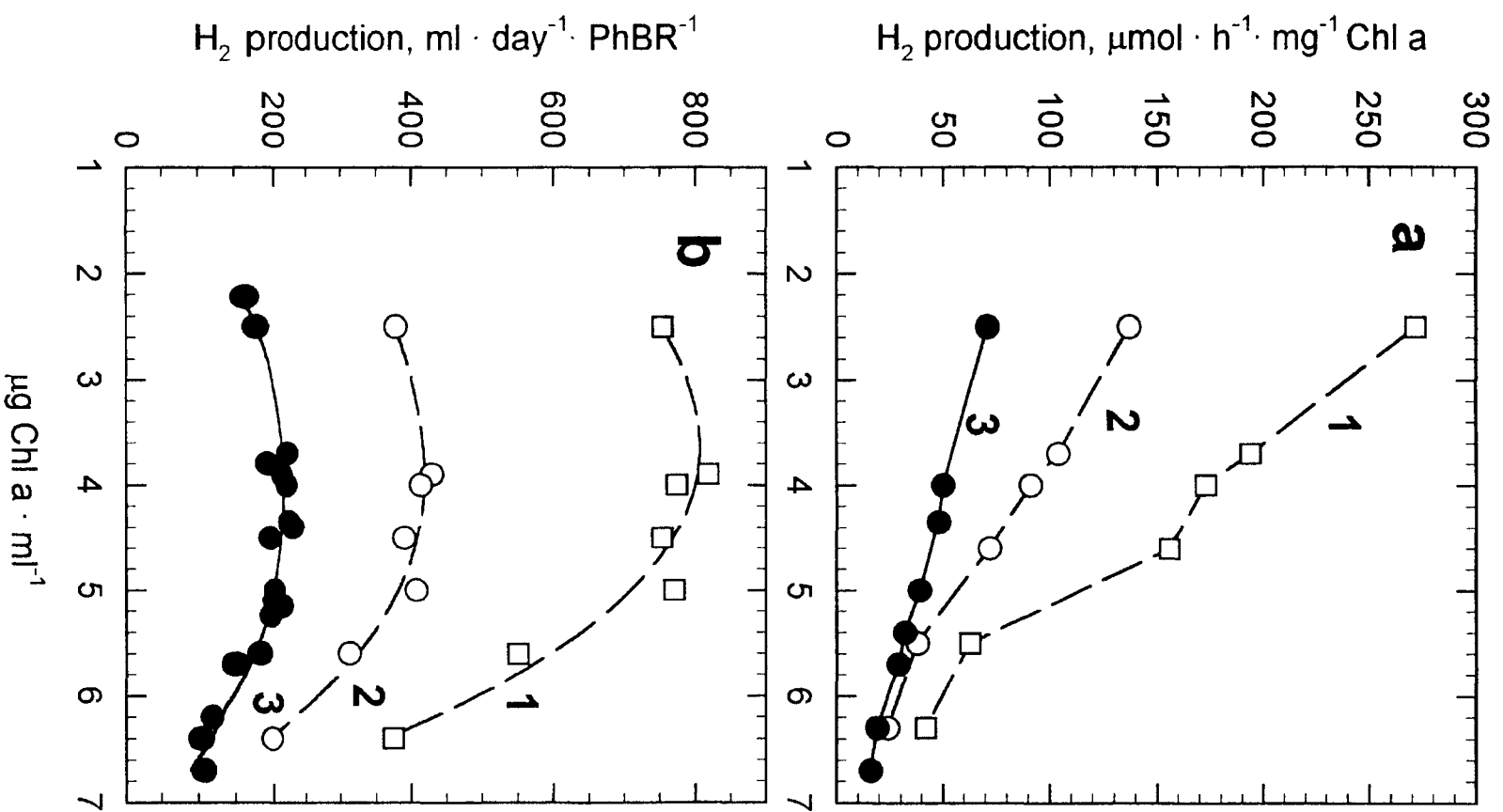
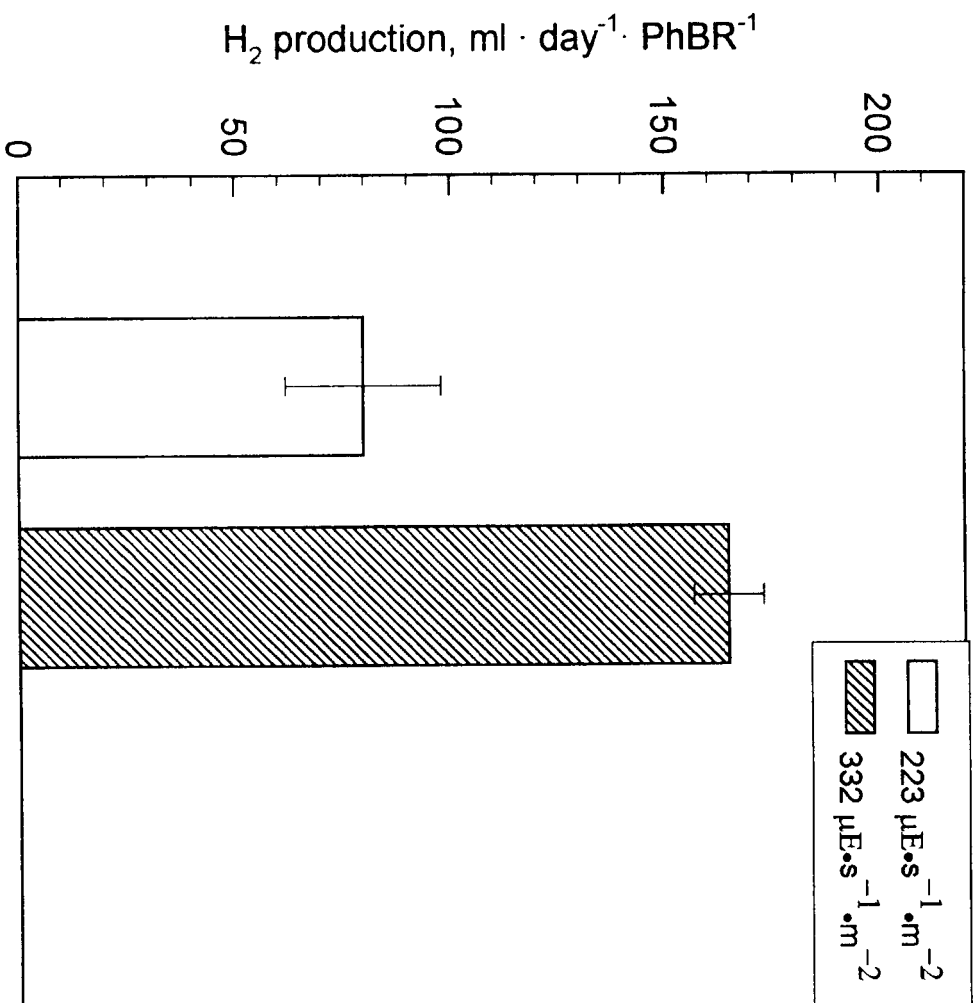


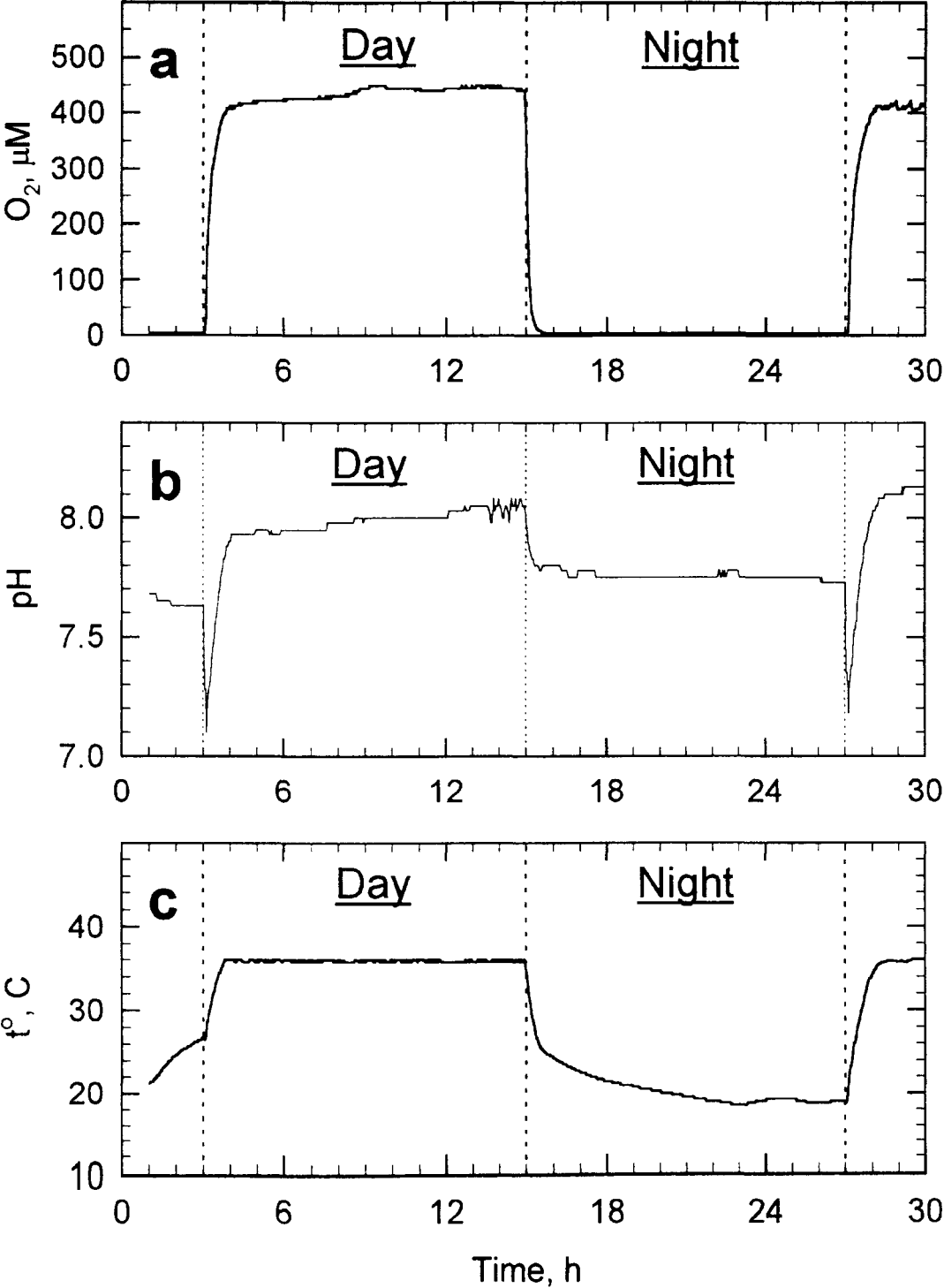
Fig. 3



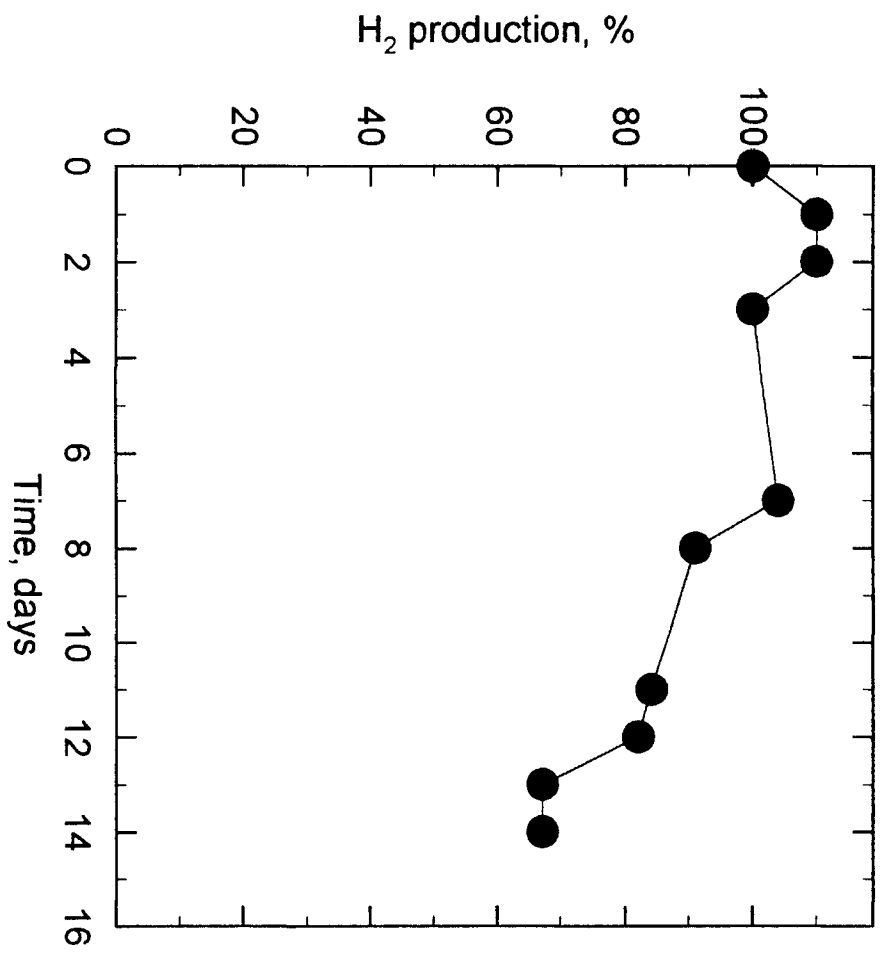
**Fig. 4**



**Fig. 5**



**Fig. 6.**



(3 days). The culture ( $2.0\text{--}2.2 \mu\text{g Chl a} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) was aerated with air+2%  $\text{CO}_2$ . Error bars are  $\pm$  SD.

Fig. 5. Changes in  $\text{O}_2$  concentration, pH and temperature in the periodically aerated culture of *A. variabilis* PK 84 after transition of the PhBR from the light (aerated) to dark (nonaerated) conditions and vice versa.

Traces were recorded at the growth density of about  $4 \mu\text{g Chl a} \cdot \text{ml}^{-1}$  and PPFD of 332 or  $0 \mu\text{E} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$  (light/dark periods).

Fig. 6. The effect of the absence of aeration during dark periods on the actual rate of  $\text{H}_2$  production by *A. variabilis* PK 84.

Non-aerating conditions in darkness were applied to the culture at zero time. 100% is the rate of  $\text{H}_2$  production by the continuously aerated culture ( $230 \text{ ml} \cdot \text{day}^{-1} \cdot \text{PhBR}^{-1}$ ) at the same growth density. The growth density and PPFD were  $4 \mu\text{g Chl a} \cdot \text{ml}^{-1}$  and  $332 \mu\text{E} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ , respectively.

Table 1. H<sub>2</sub> evolution by *A. variabilis* PK 84 under the gas phase of various composition.

| Time after the onset of the light period | H <sub>2</sub> evolution, (μmol • h <sup>-1</sup> • mg <sup>-1</sup> Chl a) * |                         |                        |            |
|------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|------------------------|------------|
|                                          | Air                                                                           | Air +2% CO <sub>2</sub> | 80% Argon + 20% Oxygen | 100% Argon |
| 2 hours                                  | 68.0±12.0                                                                     | 81.0±10.0               | 148.0±4.0              | 149.0±11.0 |
| 9 hours                                  | 106.0±7.0                                                                     | —                       | 190.0±8.0              | 191.0±11.0 |

\* - H<sub>2</sub> evolution was measured in vials.

Prior measurements the cyanobacterium was cultivated under the conditions of continuous aeration at the constant density (2.0- 2.4 μg Chl a • ml<sup>-1</sup>) for 9 days. The PPFD during light periods was 223.0 μE • s<sup>-1</sup> • m<sup>2</sup>.

## SECTION 8      APPENDIX

### HYDROGENASES AND HYDROGEN PRODUCTION BY *Synechococcus* Sp. Miami BG-043511

Hydrogen production under argon or under air enriched with CO<sub>2</sub> by the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* Miami BG-043511 (a gift from the Hawaii Culture Collection) grown under batch or continuous culture conditions was studied using the computer regulated helical photobioreactor. *Synechococcus*, like *Anabaena variabilis* ATCC 29413, did not evolve H<sub>2</sub> when grown in 98% air and 2% CO<sub>2</sub>. A comparison of the H<sub>2</sub> production capabilities of *Synechococcus* BG-043511 and the *A. variabilis* mutant PK84 is made in Table 1. Even under argon the rates of H<sub>2</sub> production by *Synechococcus* cultured under continuous illumination in argon was significantly lower than that by PK84 grown under the same conditions.

#### *Hydrogenases in Synechococcus 043511*

To determine H<sub>2</sub> uptake activity of the cells, *Synechococcus* cells growing in the batch culture mode in the photobioreactor was incubated in closed vials filled with H<sub>2</sub> in a shaking thermostated bath. The H<sub>2</sub> content of the vials was measured, at intervals, by gas chromatography. The incubations were carried out both in light and in dark conditions. A typical activity determination is shown in Fig 1a and 1b and the data from a series of experiments is presented in Table II. H<sub>2</sub> uptake activity is maintained by the cells both under light and dark incubation, the rates being slightly higher in the former case. To confirm the presence of uptake hydrogenase activity the cells were incubated in the reaction chamber of an oxygen/hydrogen electrode and the change in H<sub>2</sub> concentration was followed polarographically. In a typical experiment (performed in Peter Lindblad's laboratory in Uppsala) two levels of H<sub>2</sub> uptake was observed the initial 1.13  $\mu$  mol H<sub>2</sub> mgchl<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> lasting 5-10 minutes followed by a more stable uptake of 0.38  $\mu$  mol H<sub>2</sub> mgchl<sup>-1</sup>.

Thus we have established the presence of uptake hydrogenase activity in *synechococcus* cells which may explain the lack of H<sub>2</sub> evolution from cells grown in air; any H<sub>2</sub> evolved will be oxidised (by O<sub>2</sub>) in the presence of uptake hydrogenase.

**Table 1.**

The maximum rates of H<sub>2</sub> production by *A. variabilis* PK 84 and *Synechococcus* sp. 043511 in our experiments.

| Culture                                           | Light conditions        |                                                                   | Growth density at the maximum volumetric H <sub>2</sub> production<br>( $\mu\text{g Chl}_a \cdot \text{ml}^{-1}$ ) | Maximum H <sub>2</sub> production rate<br>( $\text{ml} \cdot \text{PhBR}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ ) |             |                              |             |
|---------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|------------------------------|-------------|
|                                                   |                         |                                                                   |                                                                                                                    | Actual                                                                                                 |             | Potential                    |             |
|                                                   | Regime of illumination  | PPFD<br>( $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) |                                                                                                                    | Under air+2% CO <sub>2</sub>                                                                           | Under argon | Under air+2% CO <sub>2</sub> | Under argon |
| <b>Batch</b><br><i>A. variabilis</i><br>PK84      | Continuous illumination | 332.0                                                             | 15.0 - 19.0                                                                                                        | 1056.0                                                                                                 | 2851.0      | —                            | 3360.0      |
| <b>Continuous</b><br><i>A. variabilis</i><br>PK84 | Continuous illumination |                                                                   | ?                                                                                                                  | ?                                                                                                      | ?           | ?                            | ?           |
| <b>Continuous</b><br><i>A. variabilis</i><br>PK84 | Day/night<br>(12/12 h)  | 332.0                                                             | 3.6 - 4.4                                                                                                          | 230.0                                                                                                  | —           | 430.0                        | 810.0       |
| <b>Continuous</b><br><i>Synechococcus</i><br>sp.  | Continuous illumination | 150.0                                                             | 3.6*                                                                                                               | trace                                                                                                  | 650.0       | —                            | —           |

**Table 2.**

**Maximum H<sub>2</sub> uptake activities in *Synechococcus* sp. 043511 cells grown in the batch culture under continuous light.**

**I. Incubation of the cells under the dark conditions.**

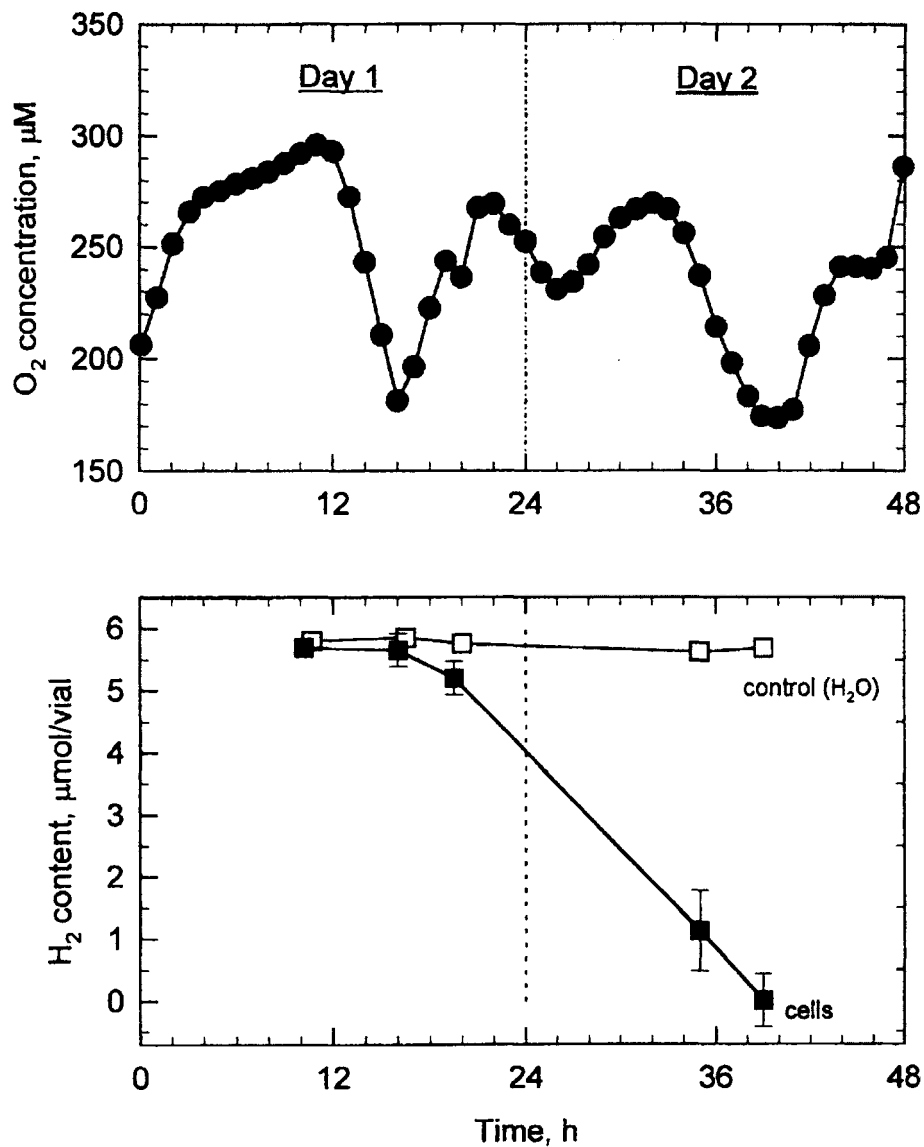
| Experiment | Growth density<br>( $\mu\text{g Chl(a)}/\text{ml}$ ) | H <sub>2</sub> uptake<br>( $\mu\text{mol}/\text{mg Chl(a) h}$ ) |
|------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| 1          | 4.3                                                  | 32.0                                                            |
| 2          | 3.9                                                  | 36.0                                                            |
| 3          | 4.6                                                  | 21.0                                                            |
| 4          | 4.2                                                  | 27.0                                                            |

**II. Incubation of cells under the light conditions.**

| Experiment | Growth density<br>( $\mu\text{g Chl(a)}/\text{ml}$ ) | H <sub>2</sub> uptake<br>( $\mu\text{mol}/\text{mg Chl(a) h}$ ) |
|------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| 1          | 3.5                                                  | 39.0                                                            |
| 2          | 1.7                                                  | 78.0                                                            |

22-23.05.98

Fig 1a.  $H_2$  uptake by the *Synechococcus* sp. 043511 cells under the light conditions.

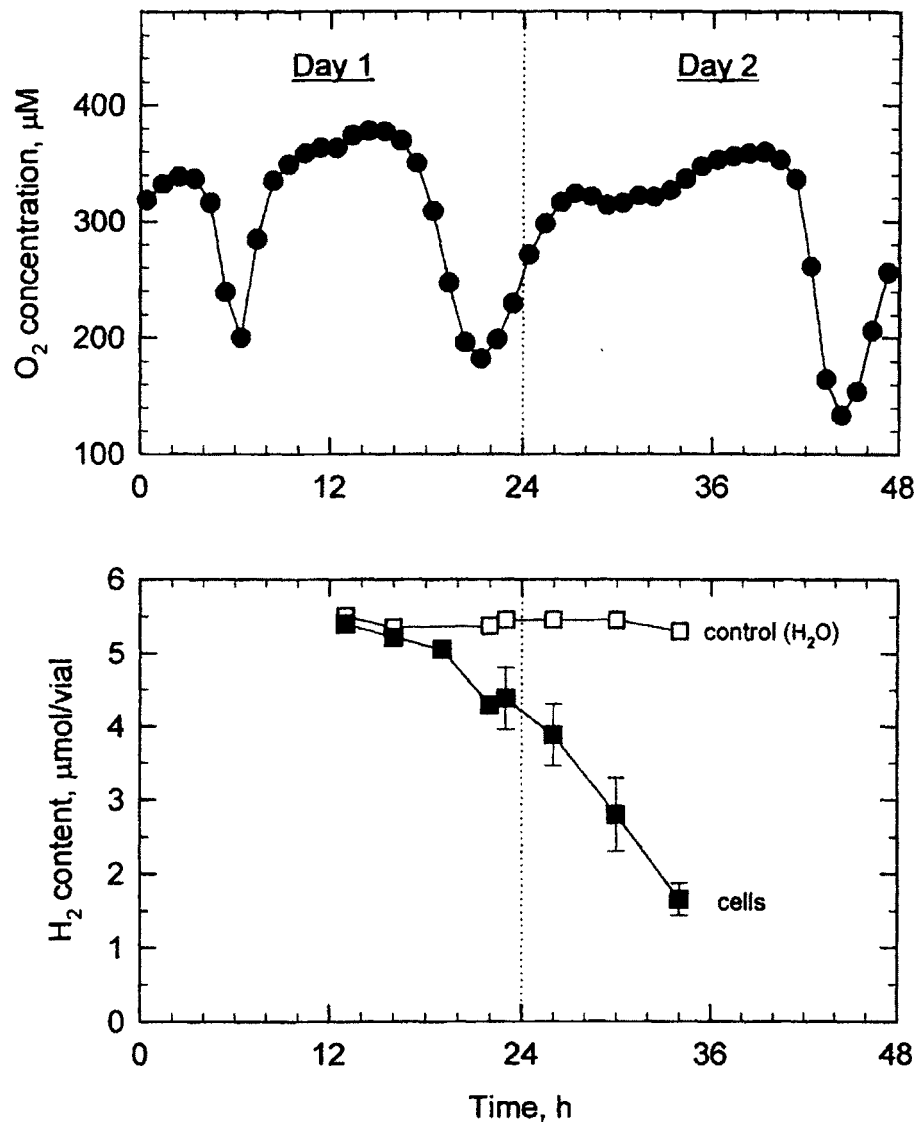


Top, photosynthetic activity of the cells under growth conditions. Bottom,  $H_2$  consumption by the cells in testing vials under light conditions ( $40 \mu E/m^2 s$ ) at the same period of time.

**Growth cond.:** air+2%  $CO_2$  (~150 ml/min),  $1.7 \mu g$  Chl(a)/ml,  $30^\circ C$ , PPFD  $120 \mu E/m^2 s$ .

14-15.05.98

Fig 1b.  $H_2$  uptake by the *Synechococcus* sp. 043511 cells under the dark conditions.



Top, photosynthetic activity of the cells under growth conditions; points represent mean values of  $O_2$  concentration for each hour of cultivation.

Bottom,  $H_2$  consumption by the cells in testing vials under dark conditions at the same period of time; error is Sd ( $n=3$ ).

**Growth conditions:** air+2%  $CO_2$  (~150 ml/min), 3.9  $\mu g$  Chl(a)/ml, 30°C, PPFD is 120  $\mu E/m^2$  s.

## 平成10年度水素製造プロジェクト成果報告書

### 遺伝子組み換え微生物による 水素発生リアクターの基礎的検討

# 「遺伝子組み換え微生物による水素発生リアクターの基礎的検討」

## 目次

|       |                                                                 |    |
|-------|-----------------------------------------------------------------|----|
| 第1章   | 概要                                                              | 1  |
| 第2章   | 1相式、及び2相式リアクターを用いた <i>Rhodovulum</i> sp.<br>NKPB1600471Rによる水素生成 | 3  |
| 2-1   | 緒言                                                              | 3  |
| 2-2   | 材料及び実験方法                                                        | 9  |
| 2-2-1 | 試薬及び器具                                                          | 9  |
| 2-2-2 | 1相式、2相式リアクターの構築                                                 | 9  |
| 2-2-3 | 全水素生成量と理論的水素生成量との比較及び評価                                         | 12 |
| 2-2-4 | 嫌気条件下及び微好気条件下における水素生成速度の比較                                      | 12 |
| 2-3   | 結果及び考察                                                          | 13 |
| 2-3-1 | 1相式、2相式リアクターを用いた <i>Rhodovulum</i> sp.<br>NKPB160471Rによる水素生成    | 14 |
| 2-3-2 | 連続基質供給条件における水素生成への影響                                            | 17 |
| 2-4   | 結言                                                              | 20 |
| 第3章   | 結論                                                              | 21 |
|       | 参考文献                                                            | 23 |

## 第1章 概要

これまで、当プロジェクトでは海洋光合成細菌における高水素生成株のスクリーニング及びスクリーニングされた株についての水素生成能の評価を行ってきた。また、スクリーニングされた株の水素生成能の向上、及びこの株を用いた水素生成リアクターの構築を目指し、基礎的な検討を行ってきた。

平成4年度は、海洋光合成細菌の遺伝子導入系の開発、高速水素生成リアクターの開発を目的とした光分散型ファイバー上に固定化した菌体による水素生成を行った。平成5年度は、太陽光を利用した海洋光合成細菌による水素生成、有用物質生産、及び廃水処理を同時に行うことが可能なシステムの開発を行った。平成6年度、7年度は、新たに海洋からスクリーニングされた高水素生成株*Rhodovulum* sp. NKPB160471Rの吸収型ヒドロゲナーゼ変異株を作製した。さらに、この変異株の水素生成能が野生株に比べて高いことを示した。また、平成8年度は、*nifH*遺伝子の増幅を指標とした直接PCR法による自然界からの好熱性光合成細菌の検出を試みた。平成9年度は、*Rhodovulum* sp. NKPB160471Rの水素生成条件下において、酸素呼吸を行わせATPレベルを増加させることにより水素生成速度の向上を試みた。その結果、微量の酸素の添加を行うことで、水素生成速度は

嫌気条件下の水素生成に比べて向上することが見出された。さらに、長期的にもこの効果が維持できることも確認された。

最終年度は、明/暗条件の存在する2相式リアクターの構築を行い、*Rhodovulum* sp. NKPB160471Rによる水素生成におけるこのリアクターの評価を行った。

## 第2章 1相式、及び2相式リアクターを用いた*Rhodovulum* sp.

### NKPB1600471Rによる水素生成

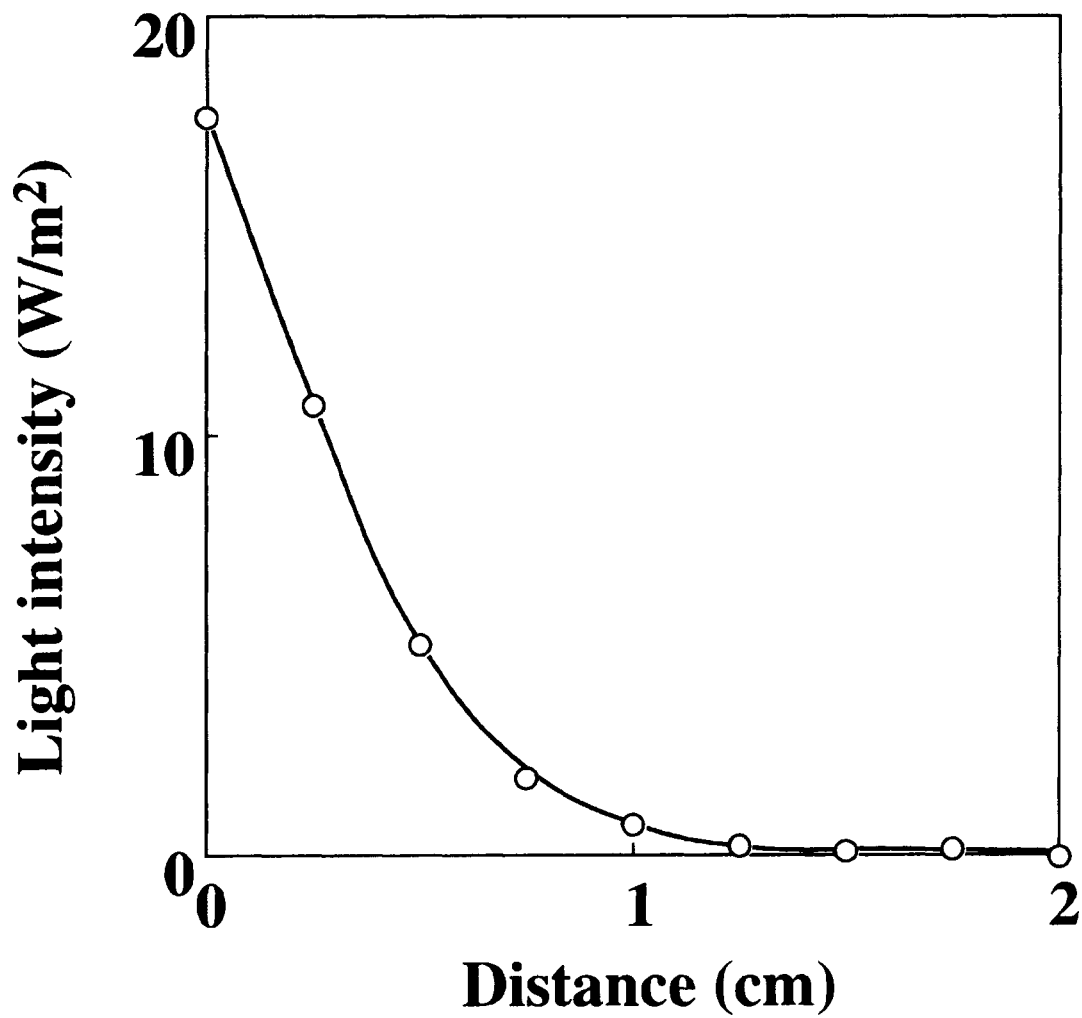
#### 2-1 緒言

光合成細菌の水素生成は、有機酸等の分解により得られた電子を必要とする。得られた電子は光合成反応中心で光エネルギーにより励起され、バクテリオフェオフィチン、フェレドキシン、フラボドキシン等の電子伝達体を通して最終的にニトロゲナーゼに伝達され、プロトンの還元による水素生成反応が起こる。この水素生成反応は、嫌気条件下で起こるが、酸素が存在する条件下では、主にニトロゲナーゼのFeタンパク質の失活により阻害される<sup>1)</sup>。このような酸素に対する防御機構にニトロゲナーゼのADPリボシル化がある。ニトロゲナーゼのFeタンパク質のアルギニン残基に特異的にADP-Riboseが結合し、酸素に対して安定な複合体を形成することが報告されている<sup>2,3)</sup>。このとき、一時的にニトロゲナーゼは不活性化するが、この結合反応は可逆的であり、酸素分圧の低下に伴いADP-Riboseが解離し、ニトロゲナーゼ活性は回復する。また、酸素に対する防御機構の特殊な例として、*Azotobacter vinelandii*では、FeS-II (Shethna protein)と呼ばれるタンパク質がニトロゲナーゼのMoFeタンパク質に結合し、酸素耐性を持つ複合体を形成することが

報告されている<sup>4)</sup>。ADPリボシル化は、アンモニウムイオンや酸素の存在下、暗条件において誘導される<sup>5-7)</sup>。しかし、光照射またはPHB (poly-  $\beta$  -hydroxybutylate)の存在下でADPリボシル化が解除されることが報告されている<sup>8)</sup>。呼吸能を有する光合成細菌は、その他の好気性窒素固定菌と同様に細胞周辺の酸素を消費することで酸素分圧を低く保ち、ニトロゲナーゼ活性を維持することが可能であると考えられる。Fig. 2-1に紅色非硫黄光合成細菌の酸素存在下での明/暗条件における呼吸代謝を示す。紅色非硫黄光合成細菌は、酸素呼吸能を有し、その呼吸に重要な役割を担っているのは、呼吸鎖の末端に位置するcytochrome  $c_2$ である。この、cytochrome  $c_2$ は、光合成反応中心、及び呼吸における酸素への最終電子供与体であり<sup>9,10)</sup>、cytochrome  $c_2$ 由来の呼吸は、主に暗条件で起こるが、明条件においては、光により誘導されるQuinol oxidase由来の呼吸系が働くことが報告されている<sup>11)12)</sup>。照射光強度が弱い条件下では、これらの呼吸系と光合成系の反応が同時に起こる<sup>13)</sup>。*Rhodospirillum rubrum*を例として、呼吸系と光合成系が同時に働いている条件下での菌体は、嫌気・明条件の菌体に比べ、10倍以上のATP濃度に達することが報告されている<sup>14)</sup>。また、微好気・暗条件で生育させた菌体においても嫌気・暗条件で生育させた菌体に比べ、約4倍のATP濃度に達することが報告されている<sup>15)</sup>。

光合成細菌の水素生成反応には、ニトロゲナーゼへのATPの供給が

不可欠であり、呼吸により細胞内のATP濃度を高めた菌体を用いることで嫌気条件下よりも水素生成が向上すると考えられる。既に平成9年度の研究成果より微量の酸素の添加が水素生産の向上につながることを示した。しかし、実際に太陽光を用いて水素生産を行わせる場合、菌体は強光条件にさらされることが予想される。照射光強度の増加に従い、光合成反応中心への電子の流れが強まり、呼吸阻害が現れるという報告もある<sup>16)</sup>。さらに強光条件下での酸素の存在は、活性酸素の生成によるフォトブリーチング等が引き起こされる。これらの問題点を考慮すると、明条件における多量の酸素の添加は、ニトロゲナーゼの失活のみならず酸素呼吸の阻害を引き起こすことが考えられるので十分に検討することが必要である。平成9年度の報告で最も高い光/水素エネルギー変換効率を得られた光強度は菌体濃度 3.1mg drycells/mlのとき18.6W/m<sup>2</sup>であった。このとき照射した光は、細胞により吸収され、深さの1/2の地点で利用できる光は、入射光の10%以下であった(Fig. 2-2)。この条件で高い光/水素エネルギー変換効率を得られた理由として、光の届かない領域（暗条件）で行われる酸素呼吸に伴うATPの生成が関与しているものと考えられた。そこで、本研究では、明条件、暗条件のサイクルからなる2相式のリアクターを作成し、水素生成の向上を試みた。また、明条件のみからなる1相式のリアクターとの比較を行った。更に暗条件において酸素を添加することにより細胞内のATPレベルの向上を図り、水素生成の向



**Fig. 2-2 The distribution of light intensity as a function of distance from the surface.**

**Cell concentration : 3.1mg dry cells/ml**

上を試みた。

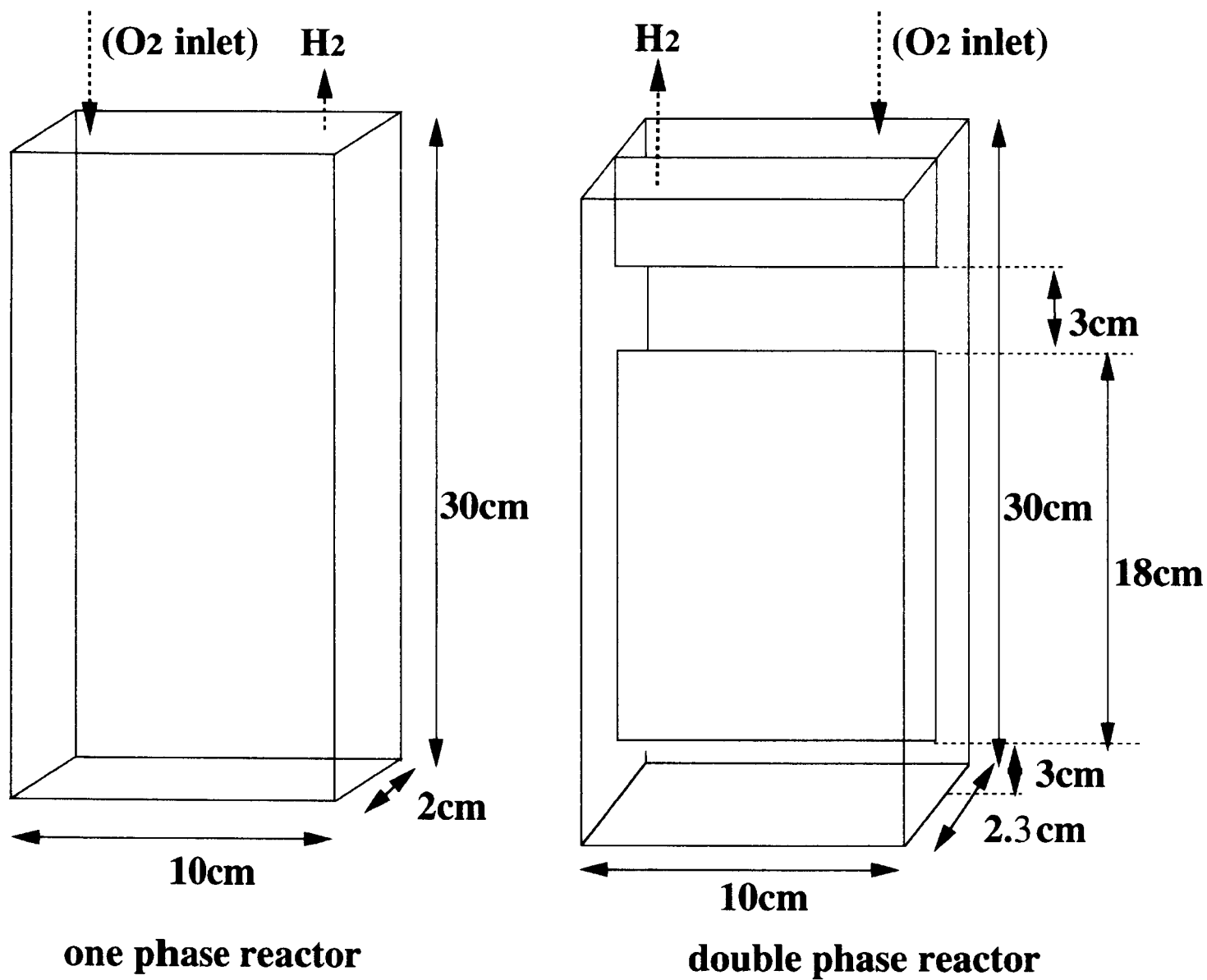
## 2-2 材料及び実験方法

### 2-2-1 試薬及び器具

試薬は全て研究用の市販特級を用いた。光源には白色蛍光灯を用いた。菌体濃度の測定は島津製作所の分光光度計UV-1600を用いた。リアクターへの照射光強度の定量にはライカー社製の測光メーターLI-189及びSAタイプセンサーを使用し発生したガス成分の分析には日立製作所製のガスクロマトグラフィー164型を用いた。

### 2-2-2 1相式及び2相式リアクターの構築

作製した水素生成リアクターの模式図及び写真をFig. 2-3、2-4示した。1相式リアクターはサイズ縦30cm、横10cm、深さ2cmとなるよう厚さ3mmの亚克力板を用い作製した。リアクターの体積は600ml、菌体量は500ml、照射光面積は250cm<sup>2</sup>とした。また、リアクター内部に反射鏡を装着し、明条件、暗条件が存在する2相式リアクターを作製した。水素生成条件をTable 2-1に示した。光源として白色蛍光灯を用い、発生した水素の回収には水上置換法、水素の測定にはガスクロマトグラフィーを用いた。



**Fig. 2-3 Schematic diagram of the one and double phase reactors.**

**Table 2-1    Experimental conditions**

---

|                           |                              |
|---------------------------|------------------------------|
| <b>Reactor volume</b>     | <b>: 600ml</b>               |
| <b>Culture volume</b>     | <b>: 500ml</b>               |
| <b>Cell concentration</b> | <b>: 3.1mg dry cells/ml</b>  |
| <b>Temperature</b>        | <b>: 34°C</b>                |
| <b>Light source</b>       | <b>: Fluorescent lamp</b>    |
| <b>Irradiation area</b>   | <b>: 250cm<sup>2</sup></b>   |
| <b>Light intensity</b>    | <b>: 34.5W/m<sup>2</sup></b> |

---

### 2-2-3 全水素生成量と理論的水素生成量との比較及び評価

対数増殖期後期まで培養した菌体を遠心集菌（5590×g, 4min, 34℃）し、脱気済みの水素生成用のRCVBN培地（L-malate:4.03g/l, NH<sub>4</sub>Cl:0g/l, NaCl:15g/l, L-glutamate :0.29g/l）500mlに再懸濁し、菌体濃度を3.1mg dry cells/mlに調整した。その後、1相式、2相式リアクターへ移し、気相を15分間アルゴンガスで置換した後、光照射を開始した。

6時間ごとに20 μmol/reactorの酸素を添加した条件と添加しない条件において水素生成が停止するまで測定を行った。このときの水素生成量と理論値との比較を行った。

### 2-2-2 基質供給条件における水素生成の比較

菌体の培養条件はTable 2-1に示した。6時間ごとに酸素を添加し、1相式、2相式リアクターによる水素生成を行った。水素生成速度の減少が見られた後に7.5mmolのL-malateを添加し、水素生成速度の維持を試みた。また、得られた水素生成量から水素生成速度及び光/水素エネルギー変換効率を算出した。光水素エネルギー変換効率はMiyakeの評価法(Efficiency(%)=(combustion energy of hydrogen/Energy of light)×100)を用いた。

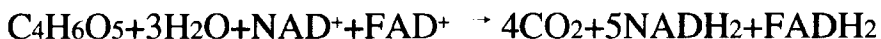
## 2-3 結果及び考察

### 2-3-1 1相式、2相式リアクターを用いた*Rhodovulum* sp.

#### NKPB160471Rによる水素生成

嫌気条件下及び6時間ごとに20  $\mu$  mol/reactorの酸素を添加した条件における全水素生成量の比較を行った結果、18日後、嫌気条件下における1相式リアクター及び2相式リアクターからの全水素生成量は53、50mmolとなり水素生成量の理論値に対し58.6、55%となった。また、6時間ごとの20  $\mu$  mol/reactorの酸素を添加した条件下においては、1相式リアクター及び2相式リアクターからの全水素生成量は46.1、36mmolとなり、水素生成量の理論値に対し、51.9、40.0%となった(Table 2-2)。

嫌気条件下の水素生成量の理論値は、以下に示す式から1molのL-malateの分解で6molの水素を生成すると仮定できる。



また、酸素添加条件では、Fig. 2-5に示したように1molのL-malateの分解には3molの酸素を必要とする。これは、光に依存しない過程、すなわち酸素呼吸によるL-malateの消費である。よって、全水素生成量の理論値は添加した酸素量から消費されるL-malateを算出し、嫌気条件における全水素生成量の理論値から差し引いた値となる。

1相式リアクター、及び2相式リアクターにおいて水素生成が停止す

**Table 2-2 Total hydrogen production and H<sub>2</sub> yield by *Rhodovulum* sp. NKPB160471R under various conditions**

| <b>Conditions</b>                 | <b>H<sub>2</sub> production<br/>(mmol/reactor)</b> | <b>Theoretical value of H<sub>2</sub><br/>(mmol/reactor)</b> | <b>H<sub>2</sub> yield<br/>(% of theoretical value)</b> |
|-----------------------------------|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| <b>anaerobic condition</b>        |                                                    |                                                              |                                                         |
| one phase reactor                 | <b>52.7</b>                                        | <b>90.0</b>                                                  | <b>58.6</b>                                             |
| double phase reactor              | <b>49.1</b>                                        | <b>90.0</b>                                                  | <b>55.0</b>                                             |
| <b>micro-anaerobic condition*</b> |                                                    |                                                              |                                                         |
| one phase reactor                 | <b>46.1</b>                                        | <b>88.7</b>                                                  | <b>51.9</b>                                             |
| double phase reactor              | <b>35.5</b>                                        | <b>89.2</b>                                                  | <b>40.0</b>                                             |

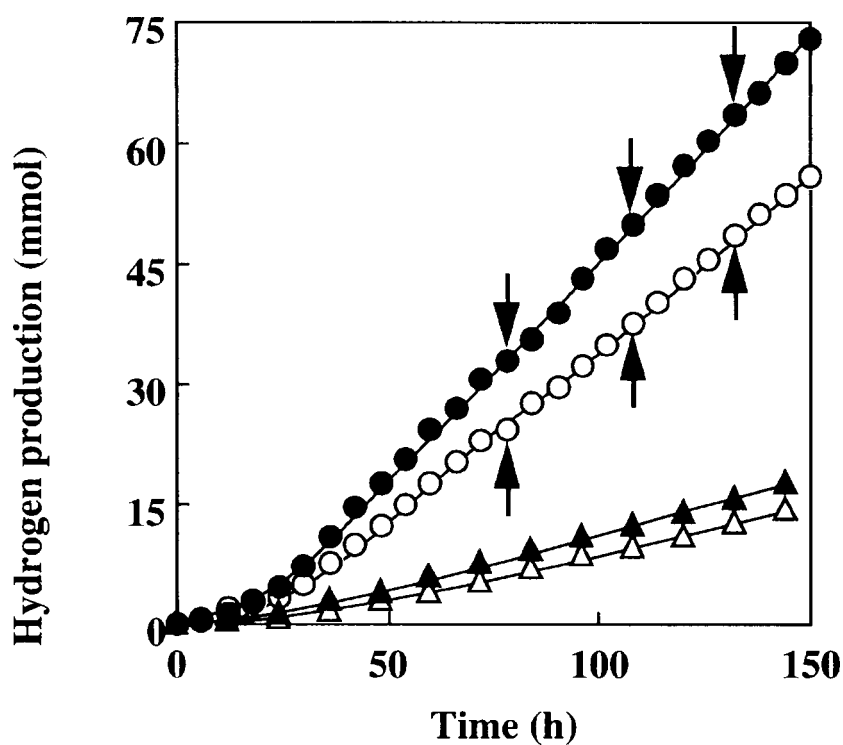
**\*: 20mmolO<sub>2</sub> was added to reactor at each 6h**

るまでに添加した酸素量は、0.66、0.39mmolで全水素生成の理論値は、88.7、89.2mmolとなった。

嫌気条件下に比べ酸素を添加した条件の全水素生成量の低下は、Fig. 2-5に示す好氣的なL-malateの分解では、嫌気条件下の分解で生成するAcetate等の中間代謝物の生成を伴わず、CO<sub>2</sub>、H<sub>2</sub>Oにまで分解される。また、L-malateの分解によって得られた電子の酸素への供与等が全水素生成量の低下を招いた原因の1つとして考えられる。しかし、この基質消費の問題は、廃水処理と組み合わせた水素生産を行うことで解決できるものと考えられる。

### 2-3-2 基質供給条件における水素生成への影響

連続的に基質を供給して水素生成を行わせた結果、2相式リアクターからの水素生成速度は、嫌気条件下における1相式リアクターに比べて約4倍に向上した(Fig.2-6)。嫌気条件下における水素生成速度は一定であり、基質律速の状態にはなっていないと推定され、基質の供給は行わなかった。基質の供給を行った1相式リアクター及び2相式リアクターの水素生成速度は、0.4及び0.6mmol/reactor/hとなった。また、光/水素エネルギー変換効率は、それぞれ4.6、3.1%となった(Table2-3)。1相式リアクターに比べて2相式リアクターで高い水素生成速度が得られた理由の1つとして、暗条件で好氣的にATPを生成した細胞が明条件でより多くの水素を生成したためだと考えられる。2



**Fig. 2-6**

**Hydrogen production by *Rhodovulum* sp. NKPB160471R using one phase and double phase reactors.**

Arrows indicate injection of 7.5mmol L-malate

Aerobic conditions (addition of 20 $\mu$ mol O<sub>2</sub>/reactor at 6 h intervals)

—○— one phase reactor

—●— double phase reactor

Anaerobic condition

—△— one phase reactor

—▲— double phase reactor

**Table 2-3 Hydrogen production rates and conversion efficiencies of light energy to hydrogen by *Rhodovulum* sp. NKPB1 60471R using one phase and double phase reactor**

| Conditions                     | H <sub>2</sub> production rate<br>(mmol/reactor/h) | Efficiency( %) |
|--------------------------------|----------------------------------------------------|----------------|
| <b>anaerobic condition</b>     |                                                    |                |
| one phase reactor              | 0.15                                               | 1.1            |
| double phase reactor           | 0.20                                               | 1.4            |
| <b>micro-aerobic condition</b> |                                                    |                |
| one phase reactor              | 0.41                                               | 3.1            |
| double phase reactor           | 0.60                                               | 4.6            |

**\*: 20μmolO<sub>2</sub> /reactor was added to reactor at each 6h**

相式リアクターの水素生成速度は、嫌気条件下における1相式リアクターの水素生成速度( $0.15\text{mmol/reactor/h}$ )の4倍に達し、嫌気・連続光照射における水素生成に比べて向上することが示された。

## 2-4 結言

本章では、光/水素エネルギー変換効率の向上を目指した水素生成を行うことを目的として2相式リアクター構築を試み、その評価を行った。以下に本章の結果をまとめる。

2相式リアクターに6時間ごとに $20\ \mu\text{mol/reactor}$ の酸素を添加した場合の水素生成速度は、比較として用いた1相式リアクターに比べて向上した。このときの1相式、2相式リアクターの水素生成速度は、 $0.4$ 、 $0.6\text{mmol/reactor}$ となった。光/水素エネルギー変換効率は、 $4.6$ 、 $3.1\%$ に達した。ここで得られた2相式リアクターの水素生成速度は、嫌気・連続光照射条件にある1相式リアクターの水素生成速度に比べて4倍に達した。

本章では、明/暗条件からなる2相式リアクターに酸素の添加を行うことにより嫌気・明条件よりも水素生成を向上させることが可能であることを示した。

### 第3章 結論

今年度は、高い光/水素エネルギー変換効率を維持するために、光に依存しないATP生成が必要であると考え、酸素を添加した条件下での水素生成を行うと同時に、明条件、暗条件が存在する2相式のリアクターを構築し、その評価を行った。その結果、酸素を添加した条件における2相式リアクターの水素生成速度は嫌気条件下の1相式リアクターの水素生成速度の4倍に達した。暗条件において好氣的に細胞内ATPレベルを高め、このような菌体を用い、明条件において水素生成を行うという2つのサイクルが、高い水素生成速度の理由と考えられた。しかし、2相式リアクターを用い酸素の添加した場合、水素の高生成には基質の供給が不可欠である。また、嫌気条件下に比べて基質の消費が大きくなることが示されたが、有機廃水を利用することで安価な有機基質の供給は可能である。今後、実用化に向け、更なる研究が必要である。

平成4年度から開始した、当プロジェクトにおける研究は、自然界からの高水素生成株や好熱性光合成細菌のスクリーニング、遺伝子組換え海洋光合成細菌による水素生成能の向上、効率的な水素生産を目指したフォトバイオリアクターの構築と評価、さらにバイオレメディエーション、有用物質生産を組み合わせた多機能型リアクター

の考案等、様々な角度から行われた。これらの研究結果は将来、実用化に向けたバイオリアクターを構築する上で重要な知見を与えるものである。

## 参考文献

1. R. L. Robson, J. R. Postgate, *Annu. Rev. Microbiol* **34**, 183-207 (1980).
2. I. Goldberg, V. Nadler, A. Hochman, *J. Bacteriol.* **169**, 874-879 (1987).
3. P. W. Ludden, *Mol. Cell. biochem.* **138**, 123-129 (1994).
4. Z.-C. Wang, A. Burns, D. Watt, *Biochemistry* **24**, 214-221 (1985).
5. Y. Zhang, A. D. Cummings, R. H. Burris, P. W. Ludden, G. P. Roberts, *J. Bacteriol.* **177**, 5322-5326 (1995).
6. J. Li, C. Z. Hu, D. C. Y, *J. Bacteriol.* **169**, 231-237 (1987).
7. R. G. Lowery, L. L. Saari, P. W. Ludden, *J. Bacteriol.* **166**, 513-518 (1986).
8. A. Norén, A. Soliman, S. Nordlund, *Biochem. J.* **322**, 829- 832 (1997).
9. G. M. Alastair, *Antonie van Leeuwenhoek* **66**, 151-164 (1994).
10. J. C. Willison, Y. Jouanneau, A. Colbeau, P. M. Vignais, *Ann. Microbiol.* **134**, 115-135 (1983).
11. S. Romagnoli, A. Hochkoeppler, L. Damgaard, D. Zannoni, *Arch. Microbiol.* **167**, 99-105 (1997).
12. A. Hochkoeppler, F. E. Jenney, S. E. Lang, D. Zannoni, F. Daldal, *J. Bacteriol.* **177**, 608-613 (1995).

13. J. Oelze, *Arch. Microbiol.* **165**, 219-225 (1996).
14. R. F. L. Monica, B. L. Marrs, *Biochim. Biophys. Acta.* **423**, 431-439 (1976).
15. J. Ramirez, L. Smith, *Biochim. Biophys. Acta* **153**, 466-475 (1968).
16. J. Oelze, P. Weaver, *Arch Mikrobiol.* **79**, 108-121 (1971).

# **Search and Screening of Marine Photosynthetic Microorganisms Capable of Hydrogen Production**

Year-End and Final Report  
January 15, 1999

University of Hawaii at Manoa

## **Project Team**

Youji Wachi, Ph.D., Project Team Leader  
JoAnn C. Radway, Ph.D., Project Scientist  
Brandon Yoza, M.S., Project Laboratory Manager  
Atsushi Arakaki, Visiting Student

Principal Investigator  
Oskar R. Zaborsky, Ph.D.  
FAX Number: (808) 956-5308  
Telephone Number: (808) 956-8146  
e-mail: ozabo@hawaii.edu

# **Search and Screening of Marine Photosynthetic Microorganisms Capable of Hydrogen Production**

## **Abstract**

The goal of this study was to identify strains with superior hydrogen-producing capability under RITE-proposed conditions and standards. Strain HCC 2205 and HCC 2037 demonstrated superior hydrogen production capability during previous tests of 205 photosynthetic bacteria from the Mitsui-Miami Collection. In addition, we tested HCC 2206, a hydrogen producing Hawaiian isolate, and *Rhodobacter sphaeroides* RV, which had been proposed by RITE as a standard strain. Hydrogen production capabilities of these strains were compared using lactate, acetate, butyrate, succinate and propionate as substrates. HCC 2037 produced hydrogen from all the acids, but production rates were highest rates with lactate and acetate. Four RITE-specified simulated industrial wastewaters, containing mixtures of organic acids, were used to explore the potential for practical applications of hydrogen production by photosynthetic bacteria. HCC 2037 and *R. sphaeroides* RV both produced hydrogen from all four simulated wastewaters, but maximum hydrogen production rates varied according to the strain and wastewater tested. Overall performance of HCC 2037 compared favorably with that of *R. sphaeroides* RV in these experiments. HCC 2037 was used to examine the effects of reduced glutamate concentrations and periodic lactate addition on hydrogen production. When initial concentrations of glutamate and lactate were decreased, hydrogen production was increased 2.5-fold by daily lactate addition. Hydrogen production by HCC 2037 was also enhanced by immobilization in agar.

## **1. Introduction**

Dr. Zaborsky's laboratory at the University of Hawaii (UH) has been engaged by the Research Institute of Innovative Technology for the Earth (RITE) to conduct research on the biological production of hydrogen. Specifically, we have been charged with investigating the potential of photosynthetic bacteria for producing hydrogen. The fourth phase of the re-entrustment project ran from April 1, 1998 to December 31, 1998.

## **2. Goals and Objectives of the Study**

As given in the original re-entrustment contract between RITE and UH, the overall goal of this study is to isolate strains with superior hydrogen-producing capability under RITE-proposed conditions and standards. The overall scope of the study is several fold:

- Transfer photosynthetic bacteria in Mitsui's collection to Hawaii and initiate screening for hydrogen production (Fiscal Year 1996);
- Optimize culture and hydrogen-producing conditions for isolated strains (Fiscal Year 1997); and
- Complete the evaluation of the most promising strains for RITE-proposed conditions and search for new photosynthetic bacteria in Hawaii (if screening makes good progress) (Fiscal Year 1998). Tasks in previous years have been pursued and reported.

For FY 1998, the following tasks constituted the scope of work:

- (a) complete evaluation of most promising strains in the Mitsui collection for hydrogen production under RITE-proposed conditions employing RITE-prescribed substrates;
- (b) complete comparison of Mitsui strains to the *Rhodobacter sphaeroides* RV strain; and
- (c) investigate key aspects of biohydrogen process factors of photosynthetic bacteria including the growth-enhancing agent (Ala Moana extract or AMex), the effect of glutamic acid, and the immobilization of the most promising strain(s).

### 3. Experimental Methodology

General protocols for maintenance of cultures, media, and conditions for the production of hydrogen are after those of Miyake (Miyake et al. 1982 and personal communication), and have been described in the 1996 and 1997 Year-End Reports. The strain *Rhodobacter sphaeroides* RV (Miyake 1994) is used as a reference strain.

#### Bacterial strains

The Mitsui collection, now housed at the University of Hawaii's Hawaii Culture Collection (HCC) served as the major source of photosynthetic bacteria for screening. Two strong hydrogen producing bacteria were selected from this collection by means of screening for hydrogen production using GL medium. Also, photosynthetic bacteria isolated in Hawaii were evaluated for hydrogen evolution. Of these new isolates, HCC 2206 (M006), isolated from a canal at Ala Moana Beach Park in Honolulu, showed the highest hydrogen production rates.

#### Growth conditions

Basal medium contained 866 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 733 mg  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 200 mg  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 75 mg  $\text{CaCl}_2$ , 20 mg EDTA(disodium salt), 11.8 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2.8 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 2.1 mg  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 750  $\mu\text{g}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 240  $\mu\text{g}$   $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 40 $\mu\text{g}$   $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , and 0.15  $\mu\text{g}$  each of biotin, thiamin, p-aminobenzoate, nicotinate and nicotinamide per liter. Culture maintenance medium (aSy medium) contained the basal medium, 0.125 % ammonium sulfate, 0.98 % sodium succinate and 0.1 % yeast extract (pH 7). Stock cultures were maintained

anaerobically in an illuminated, controlled temperature incubator (30 °C, 81  $\mu\text{Es}^{-1}\text{m}^{-2}$ , 12 h light / 12 h dark). Anaerobic preculturing of selected strains for hydrogen production measurements was carried out using 300 ml BOD (biological oxygen demand) bottles filled with aSy medium under 5.4~10.8  $\mu\text{Es}^{-1}\text{m}^{-2}$  halogen illumination at 32°C.

#### Hydrogen production

Early hydrogen production experiments utilized GL medium. This medium contained the basal medium plus 50 mM sodium lactate, 10 mM sodium glutamate, 0.15 % sodium bicarbonate (pH 7). Cells were cultured 1-2 days in aSy medium, then harvested by centrifugation and washed in GL media. The cell pellets were resuspended in GL media and 35 ml of this cell suspension was put into 70 ml flat tissue culture flasks. Experiments were performed aseptically. The initial cell concentration was adjusted to approximately 1 mg/ml dry weight. Dry weight was measured by washing 1 ml aliquots of cell suspension once with distilled water and drying at 102-104 °C. Turbidity was determined by optical density measurements at 660 nm.

Each tissue culture flask was sealed with a silicone stopper fitted with a needle for gas evolution. Flask headspace was evacuated and then filled with argon. This procedure was repeated more than five times. Hydrogen production was carried out at 32°C under continuous unilateral halogen illumination ( $180 \mu \text{Es}^{-1} \text{m}^{-2}$ ). To measure the amount of gas produced, one end of a 15 cm tube (volume 11 ml) was connected to the needle, and the other end placed into an inverted, water filled 100 ml glass cylinder. The volume of water displaced during the experiment was equal to the volume of gas produced. This volume was expressed in terms of production per unit time. The hydrogen content of the gas was determined by gas chromatography using a Shimadzu GC-14A gas chromatograph.

Hydrogen production from various single organic acids was measured by the same protocol, modified by the substitution of the appropriate acid for lactate in GL medium.

#### Hydrogen production from simulated wastewaters

With a view toward practical applications for hydrogen production using photosynthetic bacteria, hydrogen production from four simulated wastewaters was examined using HCC 2037 and *Rhodobacter sphaeroides* RV. Composition of simulated wastewaters was specified by RITE and was designed to simulate various industrial and food processing wastes. SW-1 contained 0.8 g sodium acetate, 0.8 g sodium butyrate, 0.8 g sodium propionate, 0.4 g ethanol, 1.5 g sodium bicarbonate and 1000 ml basal medium; SW-2 contained 2.46 g sodium acetate, 3.3 g sodium butyrate, 1.5 g sodium carbonate and 1000 ml basal medium; SW-3 contained 1.37 g sodium acetate, 1.25 g sodium propionate, 1.5 g sodium bicarbonate and 1000 ml basal medium; SW-4 contained 4 g sodium lactate, 0.4 g sodium acetate, 1.5 g sodium bicarbonate and 1000 ml basal medium. Hydrogen production of strains was estimated using the experimental apparatus described above.

## **4. Results and Discussion**

### Primary selection of hydrogen producing strains from the Mitsui Collection

205 strains of photosynthetic bacteria in the Mitsui Collection were evaluated for hydrogen production using GL media. Hydrogen producing photosynthetic bacteria are shown in Table 1. HCC 2205, HCC 2037 and HCC 2090 produced hydrogen strongly from lactate, as did the standard strain *Rhodobacter sphaeroides* RV and Strain HCC 2206, isolated in our laboratory by Mitsufumi Matsumoto. However, growth and hydrogen production capabilities of HCC 2090 are variable. Four strains were therefore selected for further screening and comparison with *R. sphaeroides* RV.

### Further evaluation of photosynthetic bacteria with lactate as a carbon source

Hydrogen production capabilities of the photosynthetic bacteria tended to vary in early experiments. We surmised that this related to nutritional status of the cultures. Two methods were used to improve growth and to recover and stabilize hydrogen production capability.

Table 1 Primary Selection of Hydrogen Producing Photosynthetic Bacteria

| HCC Number | Original Number                   | Max. H <sub>2</sub> Production Rate*<br>( $\mu$ l / ml / h ) |
|------------|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| HCC 2037   | Miami 22711                       | 64                                                           |
| HCC 2090   | Miami 26611                       | 44                                                           |
| HCC 2111   | Miami 28011                       | 11                                                           |
| HCC 2205   | Miami 25320                       | 71                                                           |
| HCC 2101   | Miami 27520                       | 7                                                            |
| HCC 2099   | Miami 27420                       | 3                                                            |
| HCC 2105   | Miami 27640                       | 1                                                            |
| HCC 2045   | Miami 23110                       | 1                                                            |
| HCC 2121   | Miami 28910                       | 1                                                            |
| HCC 2206   | M0006                             | 36                                                           |
|            | <i>Rhodobacter sphaeroides</i> RV | 75                                                           |

\*Maximum hydrogen production rates were calculated on the basis of initial dry weight of the cell suspension.

1. Addition of 1% AMEX (a sterilized water extract of sediment collected from the Ala Moana Canal in Honolulu, Hawaii) to aSy stock cultures. Unamended growth medium was used for subsequent transfers. This caused enhancement of growth and hydrogen production in several cases (data not shown).
2. Unstable strains were spread on aSy agar and incubated anaerobically in the dark. Large reddish colonies were then picked into liquid aSy with 0.5 % yeast extract. This method has been successfully used in the Miyake laboratory (J. Miyake, personal communication).

After these procedures, growth was stimulated and hydrogen production results were more reproducible. Ten replicate experiments were used to evaluate hydrogen production from lactate by the four selected strains (Table 2). The Mitsui strain HCC 2037 produced the most hydrogen. *Rhodobacter sphaeroides* RV and HCC 2205 also performed well, while 2206 performed more poorly. It should be specified that rates were calculated on the basis of initial dry weight of the cell suspensions. Fig. 1 shows the time course of hydrogen production by the four strains from lactate in a typical experiment. It can be seen that Strains 2037 and 2055 produced hydrogen rapidly compared to other strains and started to produce hydrogen before 16 hours.

#### Hydrogen production of four strains from other organic acids

Hydrogen production by the four strains from lactate, acetate, butyrate, succinate and propionate was compared (Table 3). Clearly, although lactate was the best substrate in all cases, the strains differed with regard to their ability to use the other acids. HCC 2037 produced hydrogen from all carbon sources tested. Acetate was most effective, followed by lactate, succinate, butyrate and propionate. On the other hand, strain RV produced hydrogen from lactate, butyrate and acetate, and to some extent propionate, but succinate was not effective. HCC 2205 and 2206 produced hydrogen from lactate, butyrate, and succinate, but not from acetate or propionate. We concluded that HCC 2037 surpassed the other strains because of its versatility in producing hydrogen from all the tested substrates and because of its high maximum hydrogen production rate from lactate and acetate.

Figures 2 and 3 show the time course of hydrogen production by HCC 2037 and *Rhodobacter sphaeroides* RV from the five acids. HCC 2037 produced hydrogen rapidly from lactate and acetate, but only after 64 h in the case of propionate. On the other hand, *Rhodobacter sphaeroides* RV produced hydrogen rapidly from lactate and acetate but showed a long lag time with propionate and no production from succinate.

#### Hydrogen production from simulated wastewaters

HCC 2037 and *Rhodobacter sphaeroides* RV were tested for hydrogen production from four simulated industrial and food processing wastewaters (Table 4). Both strains produced hydrogen from each of the wastewaters, but their relative capabilities varied (Table 5, Figs. 4–5). HCC 2037 produced the most hydrogen from SW-4, containing mainly lactate, and SW-2, with acetate and butyrate. On the other hand *Rhodobacter sphaeroides* RV produced the most hydrogen from SW-4 and SW-1, containing acetate, butyrate and propionate. SW-3 supported the least hydrogen production by HCC 2037; we speculate that propionate may have been inhibitory

Table 2 Maximum hydrogen production rate of 4 strains from Lactate ( $\mu$  l/mg/h)

| Strain                        | Mean | Largest | Smallest | Standard deviation |
|-------------------------------|------|---------|----------|--------------------|
| HCC 2037                      | 102  | 136     | 76       | 16.9               |
| HCC 2205                      | 83   | 134     | 71       | 18.8               |
| HCC 2206                      | 53   | 90      | 35       | 21                 |
| Rhodobacter<br>sphaeroides RV | 89   | 122     | 61       | 18.3               |

Table 3 Max. hydrogen production rate of 4 strains from 5 carbon sources ( $\mu$  l/mg/h)

| Strain                        | Lactate | Acetate | Butyrate | Succinate | Propionate |
|-------------------------------|---------|---------|----------|-----------|------------|
| HCC 2037                      | 136     | 171     | 67       | 116       | 22         |
| HCC 2205                      | 134     | 0       | 59       | 25        | 0          |
| HCC 2206                      | 90      | 0       | 48       | 66        | 0          |
| Rhodobacter<br>sphaeroides RV | 122     | 69      | 73       | 0         | 5          |

**Fig. 1 Time course of Hydrogen production from lactate by 4 strains**

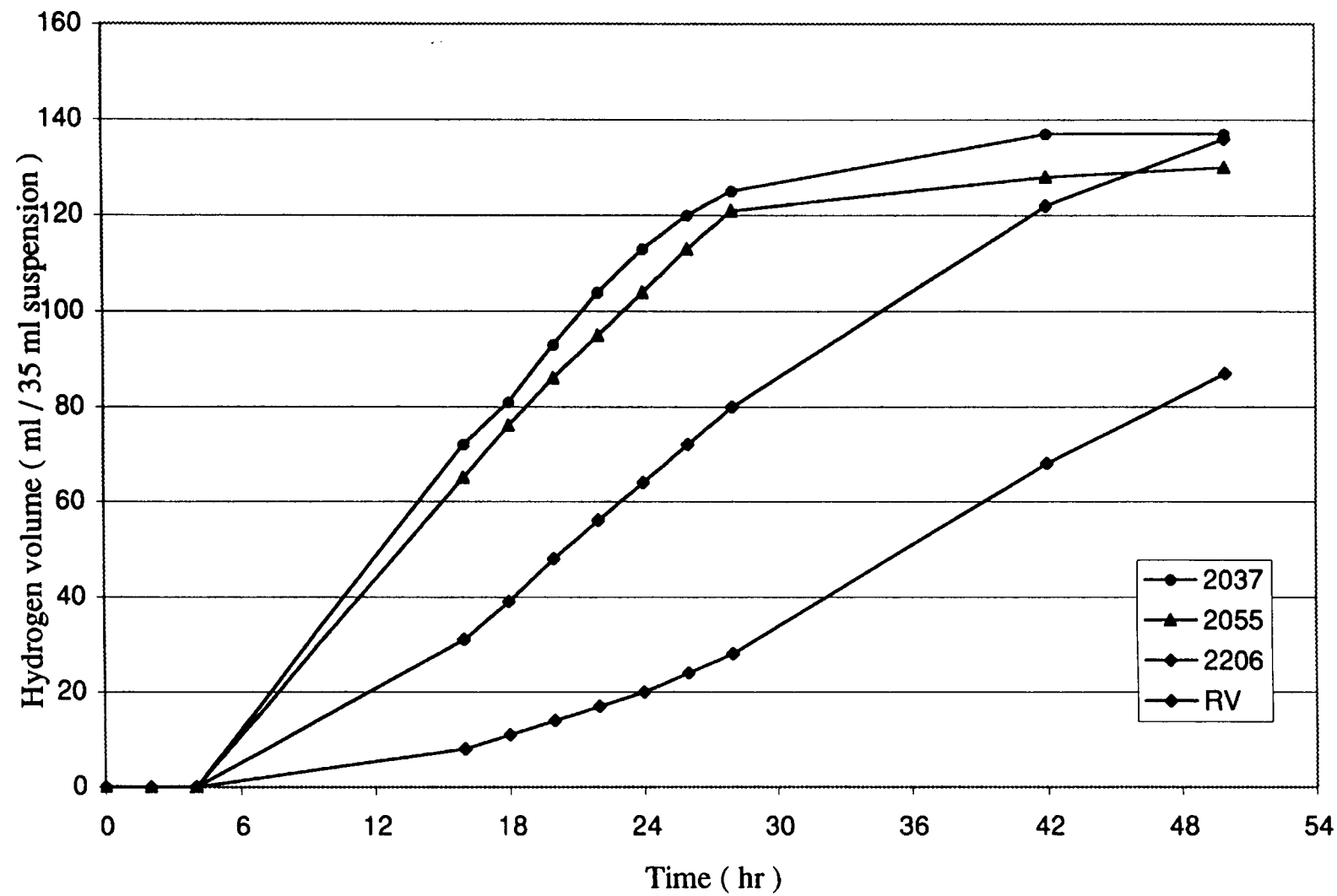
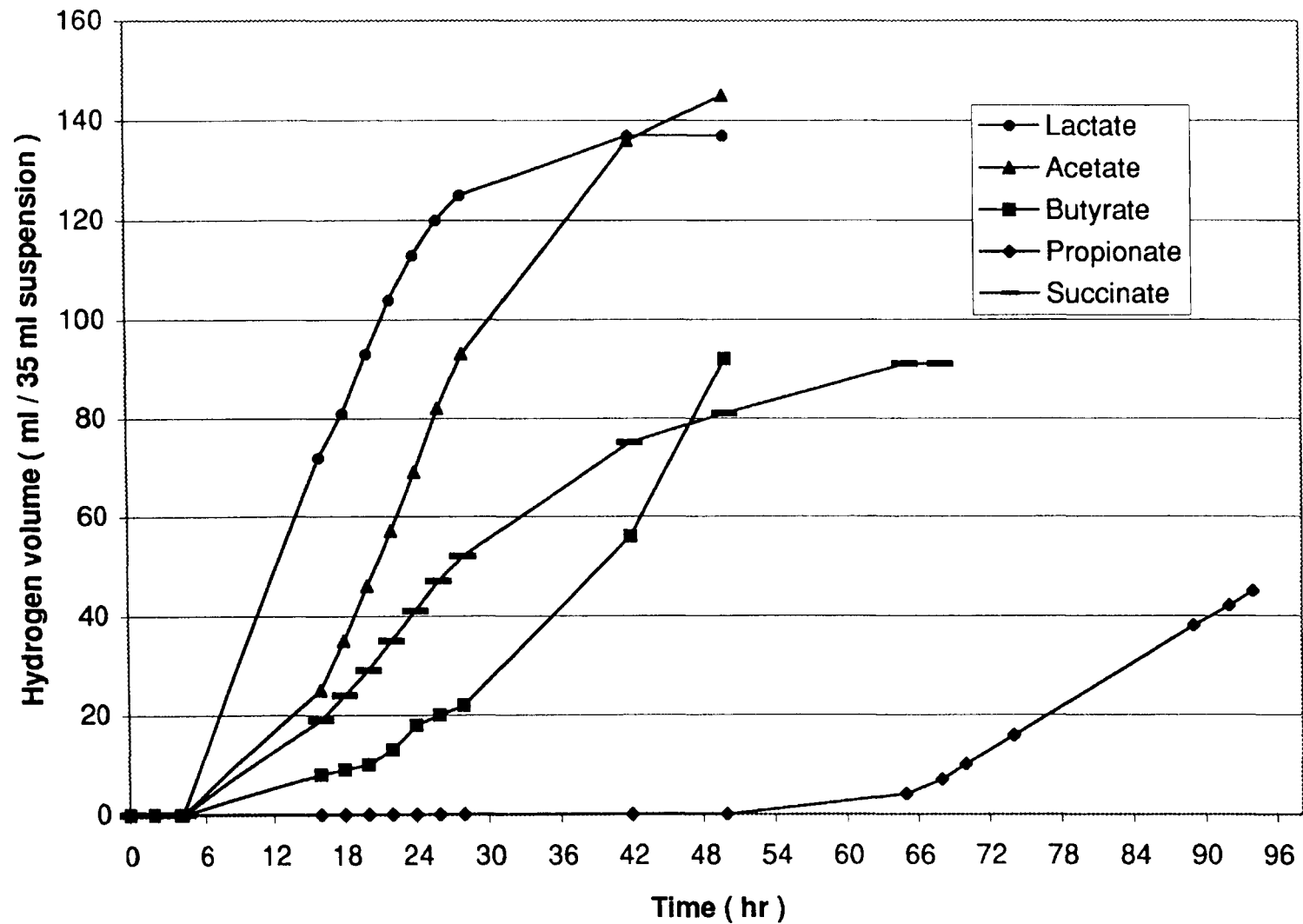


Fig.2 Hydrogen production of 2037 from organic acids



**Fig.3 Hydrogen production of RV from organic acids**

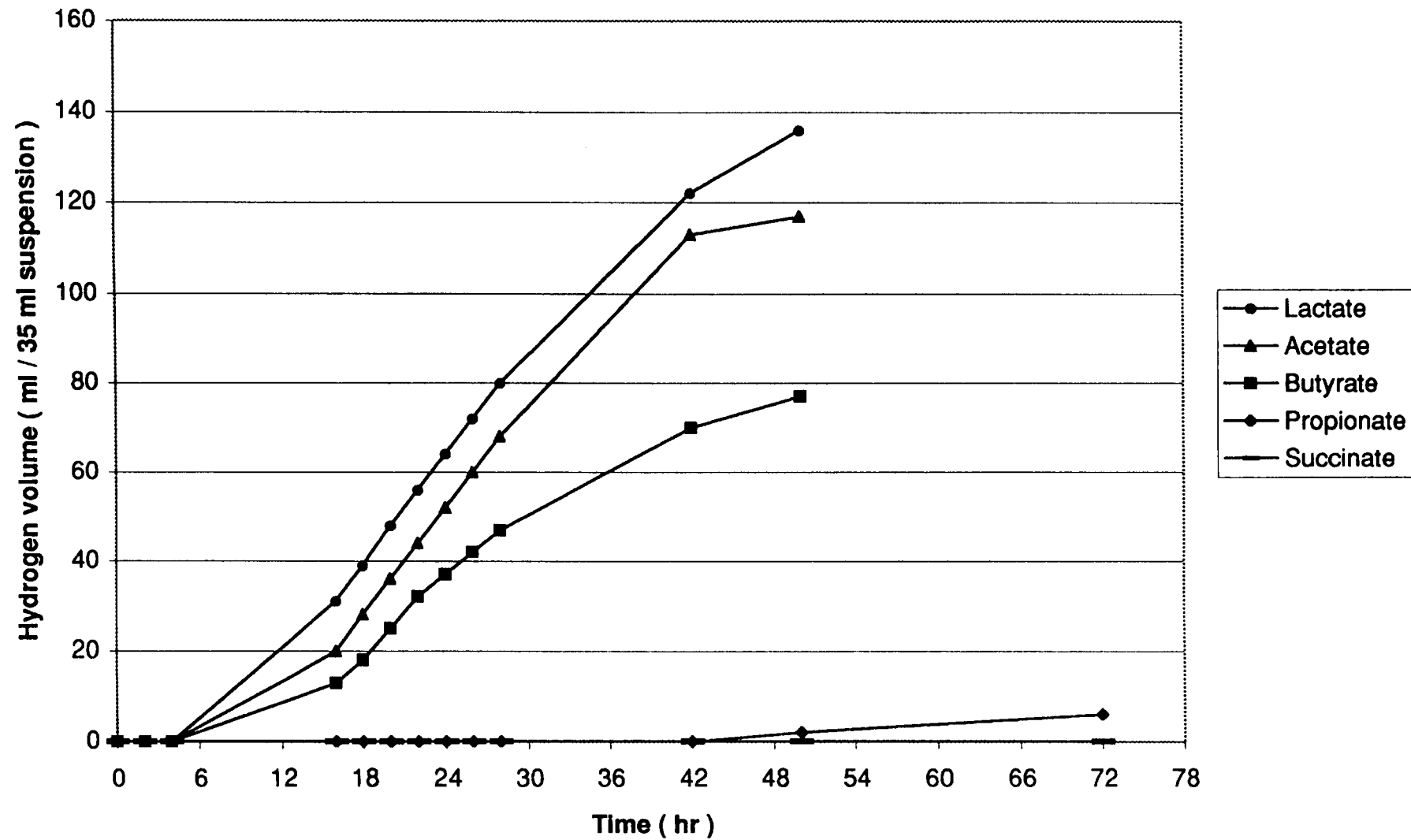


Table 4 Formulas of simulated wastewaters

| Simulated wastewater*       | SW-1 | SW-2 | SW-3 | SW-4 |
|-----------------------------|------|------|------|------|
| Sodium acetate ( g / l)     | 0.8  | 2.46 | 1.37 | 0.4  |
| Sodium butyrate ( g / l)    | 0.8  | 3.3  |      |      |
| Sodium propionate ( g / l)  | 0.8  |      | 1.25 |      |
| Sodium lactate ( g / l)     |      |      |      | 4    |
| Ethanol ( g / l)            | 0.4  |      |      |      |
| Sodium bicarbonate ( g / l) | 1.5  | 1.5  | 1.5  | 1.5  |

\*Organic compounds and sodium bicarbonate were added to basal medium in quantities shown.

Table 5 Maximum H<sub>2</sub> production (μ l/mg/h) by HCC 2037 and *R. sphaeroides* RV from simulated wastewaters

| Simulated wastewater     | SW-1 | SW-2 | SW-3 | SW-4 |
|--------------------------|------|------|------|------|
| HCC 2037                 | 35   | 63   | 14   | 131  |
| <i>R. sphaeroides</i> RV | 63   | 13   | 30   | 79   |

**Fig.4 Hydrogen production of 2037 from Waste water**

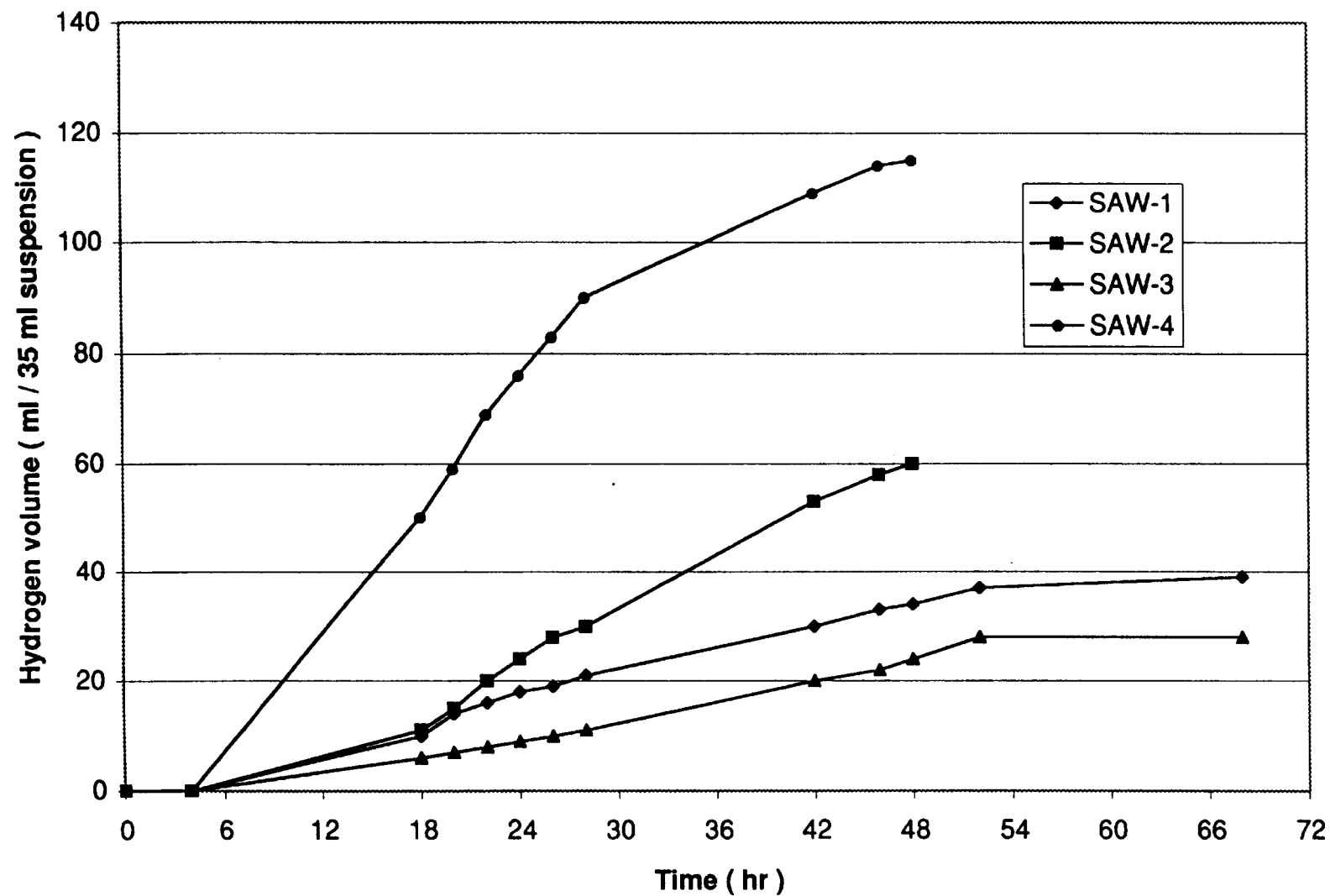
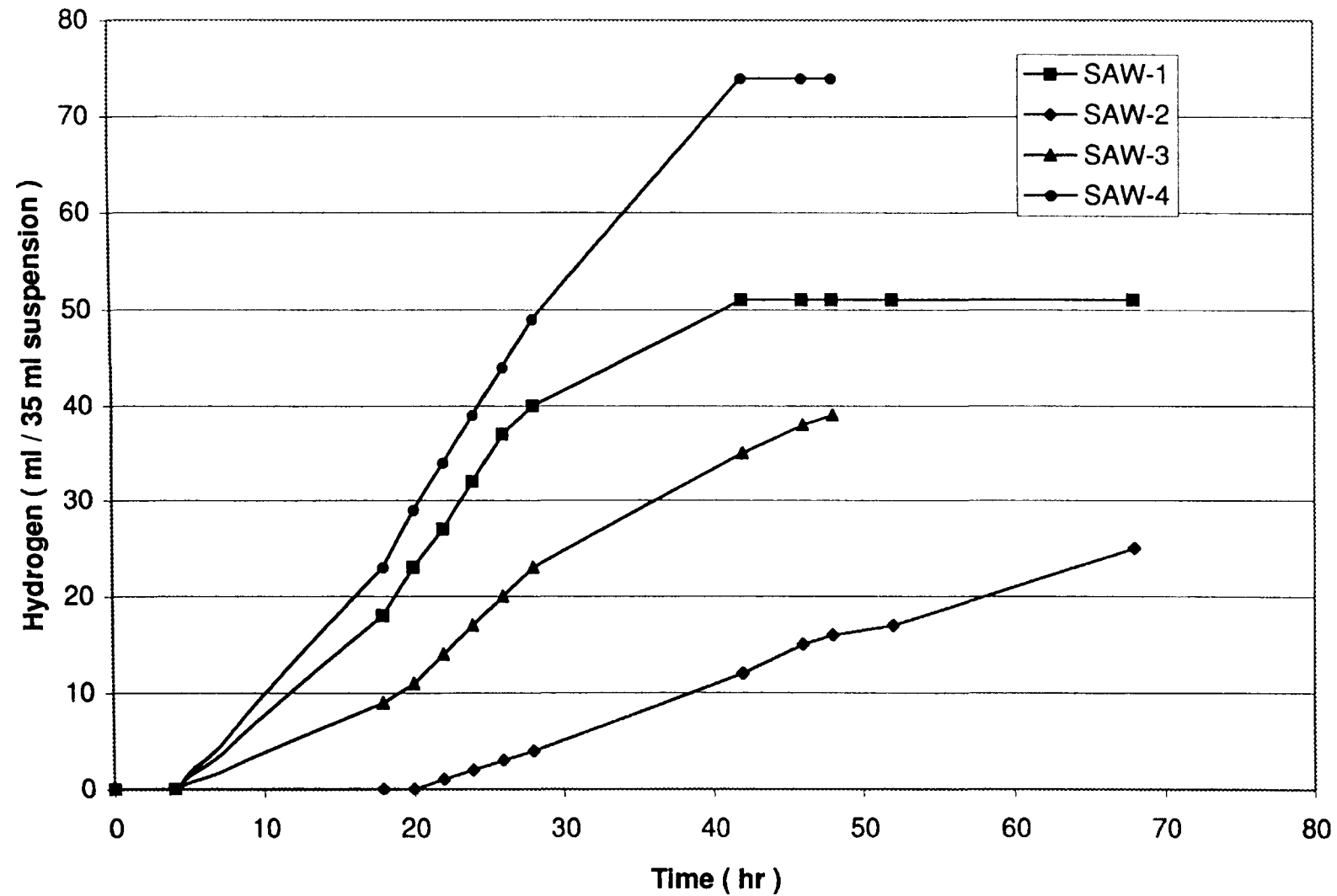


Fig.5 Hydrogen production of RV from Waste water



in the absence of glutamate. Nevertheless, HCC 2037 compares favorably with Strain RV in terms of overall hydrogen production capabilities using the four wastewaters. Although the lactate-containing SW-4 supported the most hydrogen production by both strains, rates were lower than in previous single-acid experiments. We attribute this to the absence of glutamate from the simulated wastewaters.

#### The effects of AMEX on hydrogen production of strain 2037

As previously stated, reisolation was used in some cases to stabilize strain performance, which had been variable in early experiments. During one such early effort, we isolated two colony types from Strain 2037. The dominant type (2037 A) was red, while a minor component (2037B) was greenish brown. Figure 6 shows the effects of AMEX on both types. Hydrogen production commenced before 18 hours and continued as a linear function of time. AMEX had the effect of increasing hydrogen evolution by the less productive strain 2037A, but had a slightly inhibitory effect on the more productive strain 2037 B. The maximum hydrogen production rate by 2037 B was 128  $\mu\text{l}/\text{mg}/\text{h}$ , while that by 2037 B with 1 % AMEX was 89  $\mu\text{l}/\text{mg}/\text{h}$ .

#### Effects of glutamate concentration and daily lactate addition on hydrogen production

Experiments were performed to optimize hydrogen production by strain HCC 2037. Clearly, the addition of glutamate to the reaction mixture is not an absolute requirement, since the simulated wastewaters did not contain this compound. We speculated that limiting growth by reducing glutamate concentrations might cause lactate to be used primarily for hydrogen production rather than growth. Adding lactate on a daily basis might have a similar effect. We therefore examined the effect of low glutamate concentration and daily lactate addition on hydrogen evolution by strain 2037. Initial glutamate and lactate concentrations are shown in Table 6. After 24 hours of incubation, 0.2 mM glutamate and 10 mM lactate were added daily; controls received no additions. To prevent settling and allow more prolonged hydrogen production, experimental suspensions were magnetically stirred after hydrogen evolution commenced.

Results are shown in Table 6 and Figure 7. Daily lactate addition enhanced maximum hydrogen production rates when initial lactate concentration was 10 mM, but had little effect when initial concentration was 0.5 mM (Table 6). Total hydrogen production was enhanced by the daily additions in both cases, but especially when initial concentrations were lower. Lactate was nearly exhausted in controls, but remained at 19 – 33% of initial levels when added daily. In controls (0.2G10L-C and 0.5G50L-C), hydrogen production stopped after 50 – 66 h, but daily addition of 10 mM lactate and 0.2 mM glutamate extended this period to 9 days (Fig. 7). Hydrogen production rates then decreased gradually, but to a lesser extent in samples with lower initial substrate levels. Over a five-day period, 0.2G10L-A produced 2.5 times as much hydrogen as 0.5G50L-C1, at the expense of a similar total amount of lactate. We conclude that hydrogen production efficiency is enhanced by a reduction in initial substrate concentration and daily additions of a small amount of substrate.

#### Hydrogen production by immobilized HCC 2037

In an experiment designed to compare hydrogen production by immobilized and free cells, we mixed 10 ml of warm GL medium containing 4 % melted agar with 10 ml of GL medium

**FIG. 6 The effect of AMEX on hydrogen production of strain 2037**

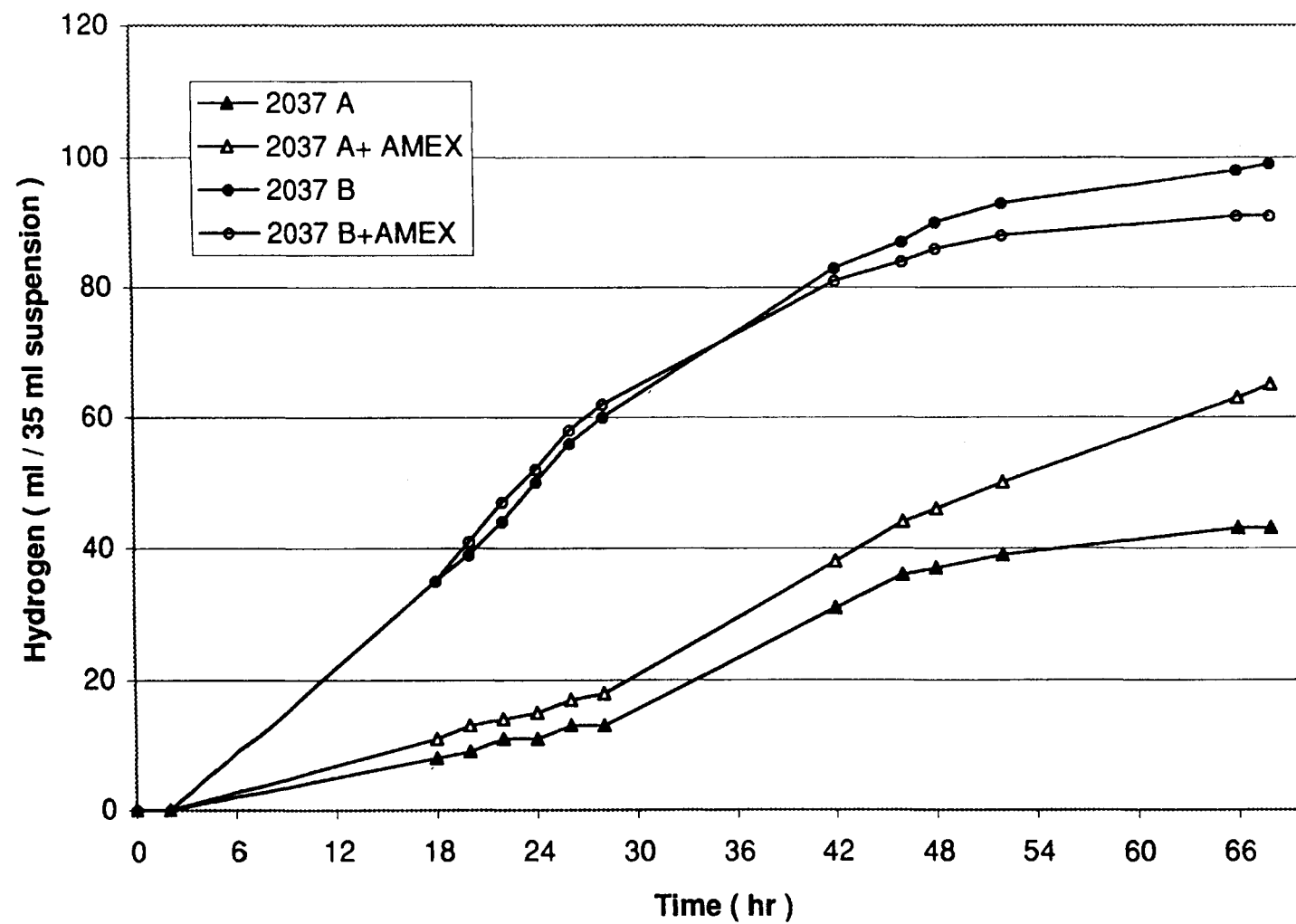
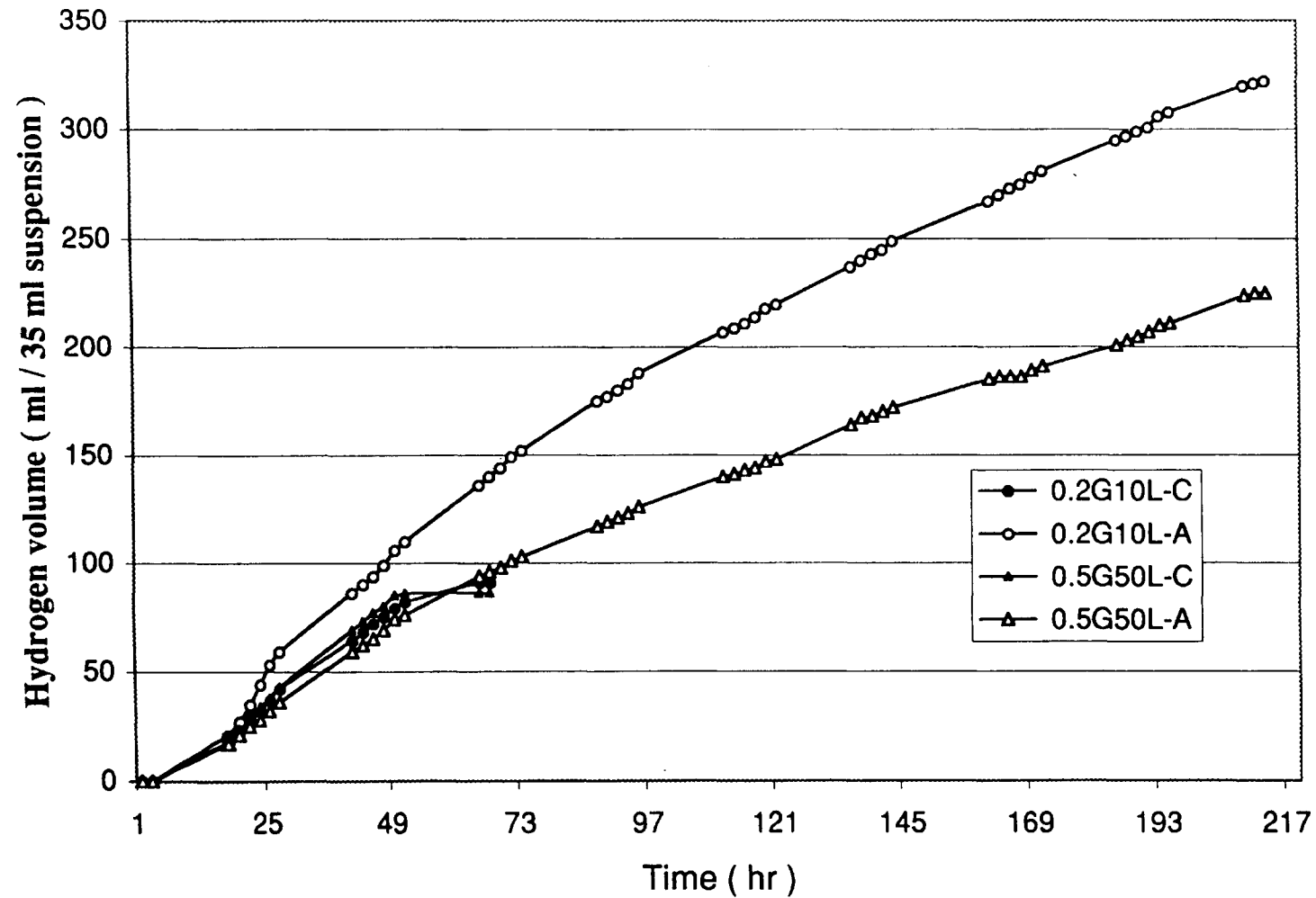


Table 6 Effect of daily lactate addition on hydrogen production by HCC 2037

| Sample     | Glutamate<br>(mM) | Lactate<br>(mM) | Max. H <sub>2</sub><br>Prod. Rate<br>(ml/mg/h) | Total H <sub>2</sub> Production      |              | Lactate           |                 |
|------------|-------------------|-----------------|------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------|-------------------|-----------------|
|            |                   |                 |                                                | H <sub>2</sub> volume<br>ml / vessel | Time<br>(hr) | Remaining<br>(mM) | Consumed<br>(%) |
| 0.2G10L-C  | 0.2               | 10              | 34                                             | 91                                   | 66           | 0.1               | 99              |
| 0.2G10L-A* | 0.2               | 10              | 63                                             | 322                                  | 214          | 29.62             | 67              |
| 0.5G50L-C  | 0.5               | 50              | 31                                             | 86                                   | 52           | 0.5               | 99              |
| 0.5G50L-A* | 0.5               | 50              | 29                                             | 225                                  | 212          | 24.91             | 81              |

\*Commencing at 24 h, 0.2G10L-A and 0.5G50L-A received 0.2 mM sodium glutamate and 10 mM sodium lactate daily.

**Fig.7 Effect of daily lactate addition on hydrogen production by 2037**



containing the Strain 2037 suspension. The mixture was poured into a sterilized glass vessel and allowed to solidify in sheet form. The immobilized preparation was washed with GL media and 35 ml of fresh GL media was added to the vessel. The vessel headspace was then repeatedly evacuated and refilled with argon. These experiments were performed aseptically. Other experimental methods were as described for cell suspensions.

Fig. 8 shows hydrogen production by immobilized 2037. The effect of immobilization was dramatic. Although biomass density was 1/3 lower in the immobilized preparations, hydrogen production at 46 h was twice as high as in free cell suspensions. Furthermore, immobilized preparations are readily maintained under anaerobic conditions and this aids in stabilizing the reaction. Also, Fig 8 shows that when hydrogen production by immobilized cells stopped after 54 hours, replacement of the medium with fresh GL allowed the reaction to restart after only 2 h.

## 5. Summary

As described above, the tasks for Fiscal Year 1998 have now been completed. Qualitative and quantitative comparisons of hydrogen production capabilities have been made using the best four strains. These included strains from the Mitsui collection, a Hawaiian isolate, and the standard, Strain RV. Advances were made in experimental methods, allowing improved strain performance and a decrease in variability. Selected strains were compared using both individual organic acids and the four RITE-specified acid mixtures, and work was carried out to optimize performance of the best strain.

## 6. Bibliography

Kumazawa, S., and Mitsui, A. 1989. Algae for hydrogen generation. [Eds.] O. Kitani and C.W. Hall. In: Biomass Handbook. Gordon and Research Science Publications, New York.

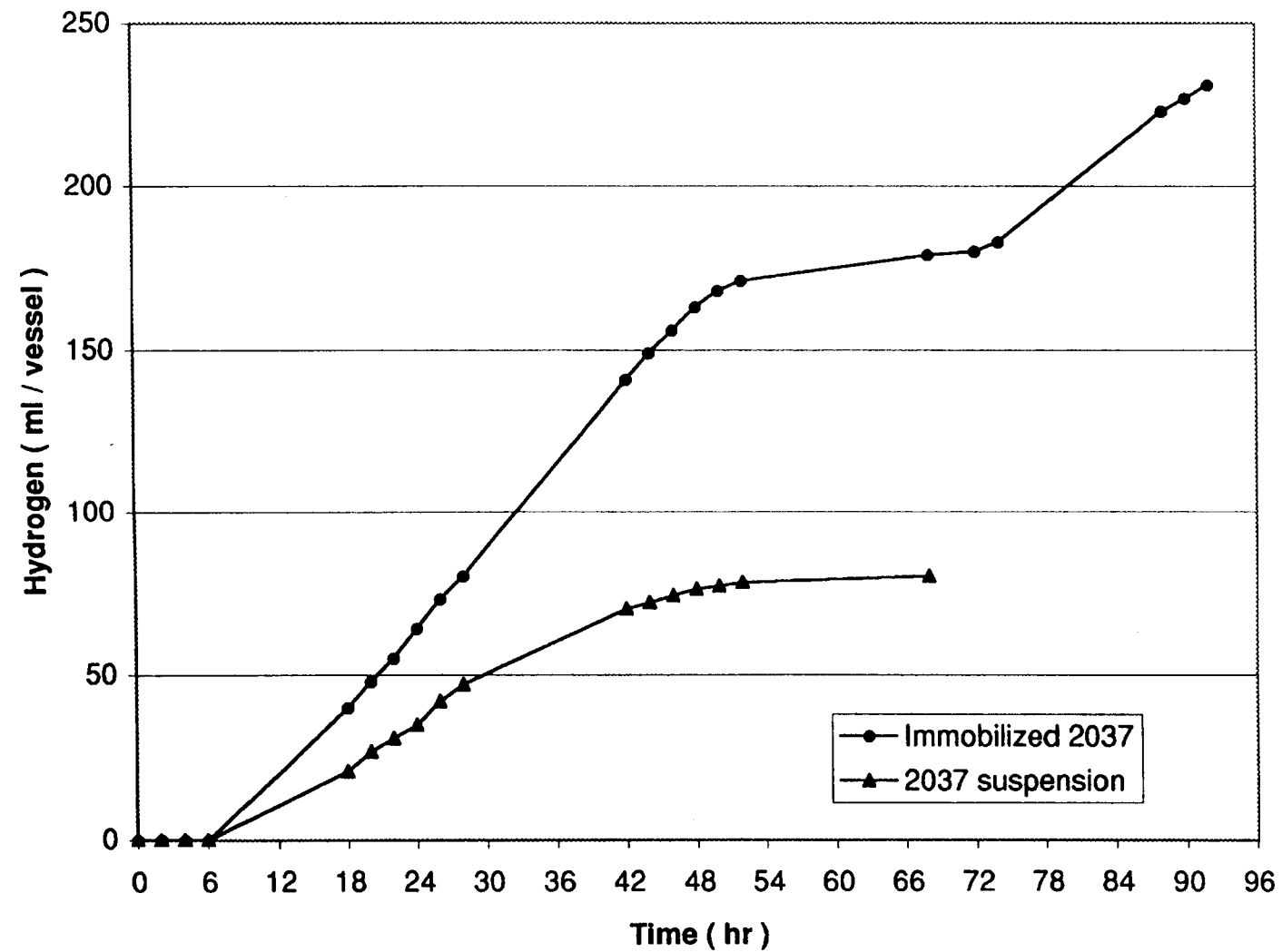
Mitsui, A., Matsunaga, T., Ikemoto, H., and Renuka, B.R. 1985. Organic and inorganic waste treatment and simultaneous photoproduction of hydrogen by immobilized photosynthetic bacteria. *Develop. in Industrial Microbiol.* 26:209-222.

Miyake, J. (personal communication) 1995-1996. Chief Researcher, Molecular Construction Team, Bionic Design Group, National Institute for Advanced Interdisciplinary Research, Tsukuba, Japan.

Miyake, J. 1994. Photosynthetic bacteria for solar energy conversion. *Proceedings of the 6th European Congress on Biotechnology*. L. Alberghina [Ed.], Elsevier Science B.V. 1019-1025.

Miyake, J., Tomizuka, N., and Kamibayashi, A. 1982. Prolonged photo-hydrogen production by *Rhodospirillum rubrum*. *J. Ferment. Technol.* 60(3):199-203.

**Fig.8 Hydrogen production of immobilized strain 2037**



## **Acknowledgments**

The University of Hawaii project team acknowledges the support of the Research Institute of Innovative Technology for the Earth (RITE) for financial support. We also acknowledge the generous assistance of many individuals from Japan who have contributed greatly to this undertaking, especially former students, postdoctoral fellows and friends of Professor Akira Mitsui. We especially thank Professor T. Matsunaga of the Tokyo University of Agriculture and Technology and Dr. J. Miyake of the National Institute for Advanced Interdisciplinary Research

平成 10 年度 研究報告書

好熱性光合成細菌の探索とその水素生産への利用

茨城大学農学部資源生物科学科

教 授 高村義親

助教授 西原宏史

## 1. 背景と目的

光合成細菌の能力を利用した光水素生産は地球環境にとって望ましいシステムであるが、その光エネルギー変換効率は実用化のレベルに至っていない。エネルギー変換効率を改善する一つの方法として、好熱性光合成細菌を探索し、それらを利用して冷却システムのいらぬ水素生産系を開発することが考えられる。

平成9年度は日本の温泉より取得した42分離株の増殖特性について解析を行った。ほとんどの株が40-43℃に生育至適温度を有し、46℃でも良好に生育することができる株も存在した。このうち、16株について水素生産能の第1次評価を行ったが、*Rhodobacter sphaeroides* RV株の30℃における水素生産量と同等、あるいはそれ以上の生産量を示した株も存在した。40℃における生産量で比較した場合には、分離株はRV株とは比較にならないほど高い水素発生能を示した。従ってこれら分離株の利用により、冷却コストが大きく削減されることが期待された。本年度は分離株の水素生産能の第1次評価を継続すると共に、高い水素発生能を示した株についてはさらに条件を変えて検討を行った。またタイの温泉から得られた55℃で増殖するCM55 strainsは極めて純化が困難で、純粋分離に成功していないが、集積培養の条件により混在する非光合成細菌の数をかなり排除することができたため、本菌による水素生産を行ってみた。

## 2. 実験方法

### 2-1. 水素生産能の第1次評価

水素生産用培地および水素生産能の評価手順は平成9年度と同様にして行った。OD=1.0 - 1.5 程度となるように40℃, 2,000 lux で前培養を行った後、水素生産用培地と1:6の割合で混合した。50 ml 容のガラス製flat bottleに移し、40℃, 5,000 lux にて水素生産を行った。発生したガスは24h毎に5日間測定し、ガス中の水素含量はGC(Shimadzu GC-5A)にて以下の条件で測定した。

カラム：Molecular Sieve 5A

キャリアガス：Ar(40 ml/min)

カラム温度：60℃ インジェクション温度：80℃

セル電流：60mA

### 2-2. 有機酸消費量の測定

5日間の水素生産反応の後、培養液を12,000rpmにて遠心分離して菌体を除去し、培地中に残存する有機酸の量をHPLC(HITACHI-L4000)により以下の条件で測定した。

カラム：Gelpack GL-C610-S（日立化成工業株式会社）

カラム温度：55℃

溶離液：5%リン酸 流速：0.8ml/min

リンゴ酸・コハク酸・酢酸の3種の有機酸を含む水素生産培地Ⅰ、乳酸のみを含む培地Ⅱ（平成9年度 研究報告参照）のうち、著量の水素生産が認められたものに関してのみ HPLC に供した。ただし酢酸の消費量に関しては、巨大な未同定ピークが観察されるものがあり、これが酢酸のピークと重なるため分析できない株もあった。

### 2-3. 温度、pH を変えたときの水素生産能の評価

一次評価で高い水素生産能を示した株のうち、平成9年度に行われた増殖特性の解析から 43℃以上で良好に生育するもの、および低い pH でも良好に増殖可能なものについて、さらに高い温度、低い pH 条件にて水素生産能の評価を行った。pH が低いほど水素生産反応の基質であるプロトンが豊富になるため、水素生産反応は有利に進行することが期待された。なお、43℃以上で測定された水素生産量はボイル・シャルルの法則により 40℃あたりの量に変換した。使用菌株は、以下の通りである。

#### (1)高い温度での水素生産

SGL2, SGD2, D3, D4, USL2, MSL5, OML3

#### (2)低い pH での水素生産

SGL4, SGL12, MSL5, OML3

### 2-4. CM55 strains の純化の検討

#### (1) Single Colony Isolation

使用した培地は CM55 medium（平成9年度 報告書参照）を使用した。なお菌体培養液から硫黄臭が確認されたため、硫酸還元菌が混在すると考え、窒素源は塩化アンモニウムに切り替えた。ゲル化剤は Gellan Gum (Wako) 1.5% を使用した。コロニーの形成は GasPack 150™ (BBL) および GasPack Pouch™ (BBL) を用いた嫌気・明条件で、50℃, 2,000lux にて行った。

#### (2) MPN 法による純粋分離

CM55 medium 9ml 含む 15ml 容バイアル瓶を滅菌後、培養液を CM55 medium にて段階的に希釈して植菌した。気相を Ar 置換した後、55℃, 2,000lux で培養を行った。

#### (3)集積培養における非光合成細菌の排除の検討

CM55 strains は昨年度報告したように、水素を電子供与体として光独立栄養的に非常に良好に増殖することが明確となった。さらに窒素固定条件を組み合わせることで培養を行うことができれば、混在する非光合成細菌よりも極めて選択的

に培養することができると考え、この条件による集積培養を試みた。平成9年度報告書に記載されている Auto H-medium から窒素源と Yeast extract を除いた培地を 50ml バイアル瓶に 10ml 入れ、気相を  $H_2:N_2:CO_2=85:10:5$  として静置培養を行った(2,000lux, 55℃)。

### 3. 実験結果および考察

#### 3-1. 水素生産能の一次評価 (40℃, pH 7.0)

日本の温泉より分離した 42 株の 24h あたりの最大水素生産量および 5 日間の積算水素生産量を Table 1-3 にまとめた。比較のため、平成9年度に行った *Rhodobacter sphaeroides* RV 株の 30℃と 40℃における水素生産量も同時に示した。特に水素生産能の高かった SGD4, MSL2, MSL5 株についてはそれぞれ Fig. 1, 2, 3 に 24h 毎の水素生産量を示した。

#### (1)下賀茂温泉より取得された SG strains

SGL5, SGL7 を除く全ての株は培地Ⅱより培地Ⅰでの水素生産量が高かった。

SGL2 は培地Ⅰで 5 日間の積算水素生産量 170.8ml/1 OD/bottle と比較的高い水素生産量を示した。培地Ⅰの 3 種類の有機酸の中では特に酢酸(17.5mM)とリンゴ酸(5.8mM)を利用していた。本菌の生育至適温度は 43℃であることから、さらに高温での水素生産を検討することにした。

SGD2, SGD3 は共に培地Ⅰで 5 日間の積算水素生産量約 200ml/1 O.D./bottle と良好な結果であった。SGD2 株は 2-2 で述べた理由により酢酸のピークが読みとれなかったが、他の基質をほとんど消費していないことから酢酸を主に消費していたと考えられた。SGD3 株は主にリンゴ酸(8.0mM)を消費し、酢酸・コハク酸は利用していなかった。これらの分離株は 43℃、46℃でも増殖可能であり、より高い温度での水素生産能を検討することにした。

SGD4 は 5 日間の積算水素生産量 285.5ml/1 O.D./bottle を記録し、30℃における RV 株の水素生産量に匹敵する値(290.2ml)を示した。基質としては酢酸を 16.0mM、リンゴ酸を 9.9mM 消費していた。本菌の生育至適温度は 40℃であるが、46℃でも良好に生育するため、さらに温度を高くした二次評価を行うことにした。

SGL4 の 5 日間の積算水素生産量は 110.9ml/1 OD/bottle とそれ程高いとは言えないが、本菌は pH 6.0 における生育速度と至適 pH(7.5) における生育速度にそれほど大きな相違は見られなかったため、より低い pH での水素生産に興味を持たれた。本菌も酢酸の消費量が読みとれなかったが、他の基質をほとんど消費していない(リンゴ酸を 2mM 消費)ことから酢酸を主に消費していると考えられた。

SGL12 の水素生産もそれほど高くはないが、至適 pH(6.5)と同様に pH 6 でも良好に生育することから、より酸性条件での水素生産について検討を行うこ

とにした。

その他 40℃, pH 7.0 の条件では SGL1, SGL11 が 5 日間の積算水素生産量 200ml/1 O.D./bottle 以上と良好な結果を示した。しかしながら本菌の生育至適温度は 40℃であり、43℃では生育速度が大きく低下するため、条件を変えた二次評価には使用しなかった。

## (2)大丸温泉より取得した OM strains

OM strains は、特に高い水素生産量を示すものはなかった。しかしながら OML3 は 40℃と 46℃で生育速度はほとんど変わらず、また生育至適 pH は 6.5 であったため、さらに条件を変えて二次評価を行うことにした。

## (3)海潮温泉、玉造温泉、三朝温泉より取得した US, TM, MS strains

USL2 は培地 I で 5 日間の積算水素生産量 148.0ml/1 OD/bottle であったが、本菌は 43℃で良好な生育を示したため、二次評価を行うことにした。その他 US, TM strains で特に高い水素生産量を示すものはなかった。

MSL5 は培地 I で 24h あたりの最大水素生産量 145.3ml/1 OD/bottle、5 日間の積算 311.3ml/1 O.D./bottle を記録し、40℃, pH 7.0 の条件で分離株の中で最高の水素生産を示した。酢酸の消費量を読みとることができなかったが、他の基質をあまり消費していない(リンゴ酸 3.8mM、コハク酸 1.8mM 消費)ことから酢酸が主な基質であると考えられた。本菌の生育至適温度は 43℃、生育至適 pH は 6.5 であるため、各条件を変えた二次評価を行うこととした。

MSL4 は培地 II で 24h 当たりの最大水素生産量 134.4 ml/1 OD/bottle、5 日間の積算 288.3ml/1 O.D./bottle と MSL5 と同様に RV 株の 30℃における水素生産量に匹敵する高い値を示した。しかしながら本菌の生育至適温度は 40℃で、それより高い温度では生育速度が急激に落ちるため、条件を変えた二次評価は行わなかった。

## 3-2. 温度、pH を変化させたときの水素生産能の評価（二次評価）

### 3-2-1. より高温での水素生産(Table 1-3)

SGD3 は 43℃で 5 日間の積算水素生産量 170.9ml/1 OD/bottle を記録したが 45℃では大きく減少した。SGL2, SGD3 は 5 日間で 85-90ml/1 OD/bottle 程度の水素を生産したが 40℃の生産量と比較すると大きく減少した。SGD2 株では 45℃でも 5 日間で 58.7 ml/1 O.D./bottle の水素生産が観察された。すべての分離株の中で 45℃での水素生産が確認されたのは本菌だけであり、条件の最適化や菌体の固定化等による水素生産量の向上も期待される。

### 3-2-2. より低い pH での水素生産(Table 1-3)

SGL4 株の pH 6.5 での水素生産量は pH 7 における結果より大きく増大し、

培地Ⅰで5日間の積算量 318ml/1 O.D./bottle を記録した。この水素生産量は 30℃における RV 株の生産量を超えるものであり、分離株の中で最も高い値であった。また培地Ⅱでも pH 7 における水素生産は少量であったが、pH 6.5 では5日間の積算で 240.6ml/1 O.D./bottle と、高い量を記録した。本菌は pH 6.5 において培地Ⅰではリンゴ酸を 6.2mM、酢酸を 2.6mM、培地Ⅱでは乳酸を 12.1mM 消費していた。本菌の pH 7 および pH 6.5 における 24h 毎の水素生産量を Fig. 4, 5 に示した。なお、pH 6 以下では水素生産量は大きく減少した。

また、SGL12 株も pH 6.5 における水素生産は pH 7.0 と比較して増大し、5日間の積算量は 124.8ml/1 O.D./bottle となった。その他の2株については pH 7.0 と比較して減少した。

### 3-3. CM55 strains の純化の検討

#### (1) 水素を電子供与体とした光独立栄養・窒素固定条件による集積培養および Single Colony Isolation

初期の CM55 strains はプレート一面に形成されている非光合成細菌の白色コロニー上に非常に小さな赤いコロニーを形成しており、赤いコロニーのみをかき取ることができず、液体培養に戻してもコンタミを取り除くことは出来なかった。本菌は光独立・窒素固定条件で増殖することが明らかになったため、この条件で十数回継代培養を繰り返し、非光合成細菌を排除することを試みた。この集積培養により光合成細菌を優占種とすることに成功し、白色のコロニーは大きく減少し、光合成細菌の独立した赤いコロニーを形成させることができた。しかしながら、このコロニーをピックアップし液体培養、あるいはその菌体をそのまま塗布したプレート培養（嫌気・明条件）を行っても増殖を確認することはできなかった。CM55 strains は液体培養において、気相をアルゴンに置換しなければ生育できないということもあり、取り扱いにはかなり厳密な嫌気度が必要とされることが考えられた。そこでコロニーをピックアップするときに空気にさらされないよう、嫌気グローブボックスを使用したがいまだに増殖は認められず、Single Colony Isolation は成功しなかった。

#### (2) MPN 法による純化

初期の CM55 strains で MPN 法を行ったところ、培養液の OD<sub>660</sub> が 2 以上あるにもかかわらず、10<sup>-4</sup>の希釈までしか増殖が確認されなかった。しかしながら光独立・窒素固定条件で十数回継代培養を行ったサンプルでは、10<sup>-20</sup>の希釈まで増殖が確認された。従って culture における優先種のみが残り、コンタミは排除されている可能性があったが、この MPN 法後の培養液をプレートに植菌し培養を行ったところ、やはり非光合成細菌の白いコロニーが存在した。また、この赤いコロニーをピックアップして液体培養に戻しても増殖は確認されなかった。

#### 3-4. CM55 strains による水素生産

3-3 で述べたように CM55 strains は極めて純化が困難で、純粋分離に成功していない。しかしながら集積培養の条件により混在する非光合成細菌の数をかなり排除することができたため、本菌による水素生産を行ってみた。2-1 に示した方法と同様にして 53℃ にて行ったところ、水素は全く発生せず、増殖も観察されなかった。そこでより嫌氣的にするために 25% アスコルビン酸ナトリウムを  $1 \mu\text{l/ml}$ 、及び 2%  $\text{Na}_2\text{S}$  を  $10 \mu\text{l/ml}$  それぞれ添加して行ったところ、増殖は確認されたものの水素発生は観察されなかった。そこで気相をアルゴン置換したところ、6, 7, 8 日目に約 10ml/1 O.D./bottle の水素発生が観察された(Fig. 6)。

#### 3-5. 総括

以上述べたように日本の温泉から分離された 42 株を使用して、40℃ 以上における水素生産能の評価を行った。また低い pH でも良好に生育するものについては、より低い pH での検討を行った。40℃ では *Rhodobacter sphaeroides* RV 株の 30℃ における水素生産量に匹敵する分離株が 4 株存在した。また 45℃ という高い温度でも、SGD2 株は 5 日間の積算で 58.7 ml/1 O.D./bottle の水素を生産することができた。これらの分離株のように、40℃ 以上の温度でこれほど高い水素生産を示す光合成細菌に関する報告はない。従って本プロジェクトの目的であった、より高温下における光従属栄養細菌を利用した光水素生産については、その限界は確実に高められたといえる。水素発生に最適な有機酸の検討や最適光照度などの条件検討、菌体の固定化などによってさらに改善されることも期待できる。

CM55 strains は 50℃ 以上で生育することが可能であるが、53℃ における水素生産量は 10ml/1 O.D./bottle とそれほど高くなく、またかなり高い嫌気度が要求されるなど、その取り扱いも容易ではなかった。水素生産についてはさらに基質を変えて検討を行うこと等により改善される可能性はある。しかし何よりも重要なことは、50℃ 以上で良好に生育することができる光従属栄養細菌の存在を示すことができたことである。今後、50℃ 以上で高い水素生産能を有す光従属栄養細菌のスクリーニングも可能であろう。

以 上

Table 1 H<sub>2</sub> evolution by SG strains

| Strains   | Maximum evolution /day<br>(ml/1 O.D./bottle) |       | Total evolution /5days<br>(ml/1 O.D./bottle) |       |
|-----------|----------------------------------------------|-------|----------------------------------------------|-------|
|           | Medium I                                     | II    | I                                            | II    |
| RV (30°C) | 85.1                                         | 130.6 | 290.2                                        | 261.2 |
| (40°C)    | 3.7                                          | 9.7   | 8.4                                          | 19.4  |
| SGL1      | 54.1                                         | 14.6  | 219.2                                        | 53.7  |
| SGL2      | 66.2                                         | 26.1  | 170.8                                        | 59.6  |
| SGL3      | 29.2                                         | 24.8  | 106.4                                        | 80.1  |
| SGL4      | 44.6                                         | 10.7  | 110.9                                        | 20.1  |
| SGL5      | 25.1                                         | 76.2  | 76.2                                         | 186.4 |
| SGL6      | 34.4                                         | 35.3  | 98.6                                         | 93.7  |
| SGL7      | 0                                            | 16.6  | 0                                            | 50.2  |
| SGL8      | 50.6                                         | 36.5  | 76.6                                         | 67.6  |
| SGL9      | 67.6                                         | 33.7  | 183.1                                        | 78.8  |
| SGL10     | 48.4                                         | 14.2  | 135.6                                        | 28.3  |
| SGL11     | 94.4                                         | 28.5  | 225.8                                        | 101.6 |
| SGL12     | 42.4                                         | 24.2  | 98.9                                         | 48.4  |
| SGL13     | 40.8                                         | 23.4  | 107.5                                        | 66.9  |
| SGD1      | 51.2                                         | 33.7  | 153.6                                        | 101.2 |
| SGD2      | 60.8                                         | 3.2   | 198.6                                        | 3.2   |
| SGD3      | 63.9                                         | 28.8  | 200.8                                        | 92.5  |
| SGD4      | 82.5                                         | 52.0  | 285.5                                        | 144.0 |
| 43°C      |                                              |       |                                              |       |
| SGL2      | 25.9                                         | 25.2  | 85.4                                         | 57.2  |
| SGD2      | 32.5                                         | 36.5  | 87.4                                         | 83.6  |
| SGD3      | 153.1                                        | 5.6   | 170.9                                        | 13.2  |
| SGD4      | 5.0                                          | 19.9  | 5.0                                          | 33.2  |
| 45°C      |                                              |       |                                              |       |
| SGD2      | 27.5                                         | 0.7   | 58.7                                         | 0.7   |
| SGD3      | 0                                            | 0     | 0                                            | 0     |
| pH6.5     |                                              |       |                                              |       |
| SGL4      | 87.0                                         | 120.3 | 318.3                                        | 240.6 |
| SGL12     | 34.0                                         | 36.8  | 124.8                                        | 84.8  |
| pH6.0     |                                              |       |                                              |       |
| SGL12     | 47.6                                         | 0     | 50.0                                         | 0     |
| SGL4      | 5.8                                          | 0     | 7.0                                          | 0     |
| pH5.5     |                                              |       |                                              |       |
| SGL4      | 0                                            | 0     | 0                                            | 0     |

Table 2 H<sub>2</sub> evolution by OM strains

| Strains   | Maximum evolution /day<br>(ml/1 O.D./bottle) |       | Total evolution /5days<br>(ml/1 O.D./bottle) |       |
|-----------|----------------------------------------------|-------|----------------------------------------------|-------|
|           | Medium I                                     | II    | I                                            | II    |
| RV (30°C) | 85.1                                         | 130.6 | 290.2                                        | 261.2 |
| (40°C)    | 3.7                                          | 9.7   | 8.4                                          | 19.4  |
| OML1      | 11.1                                         | 6.9   | 25.5                                         | 12.5  |
| OML2      | 50.0                                         | 18.4  | 86.0                                         | 31.6  |
| OML3      | 35.1                                         | 21.6  | 93.6                                         | 37.8  |
| OML4      | 0                                            | 3.6   | 0                                            | 14.4  |
| OML5      | 22.9                                         | 6.1   | 77.8                                         | 15.1  |
| OML6      | 0                                            | 0     | 0                                            | 0     |
| OML7      | 39.8                                         | 9.1   | 70.4                                         | 13.6  |
| OMD1      | 38.5                                         | 16.5  | 126.0                                        | 64.3  |
| OMD2      | 9.8                                          | 8.5   | 24.5                                         | 12.7  |
| OMD3      | 32.6                                         | 30.4  | 75.4                                         | 58.4  |
| OMD4      | 0                                            | 24.5  | 0                                            | 89.1  |
| OMD5      | 7.5                                          | 14.0  | 12.7                                         | 18.6  |
| 43°C      |                                              |       |                                              |       |
| OML3      | 9.8                                          | 18.3  | 34.2                                         | 60.2  |
| pH6.5     |                                              |       |                                              |       |
| OML3      | 4.1                                          | 0     | 5.5                                          | 0     |

Table 3 H<sub>2</sub> evolution by US,TM,MS strains

| Strains   | Maximum evolution /day<br>(ml/1 O.D./bottle) |       | Total evolution /5days<br>(ml/1 O.D./bottle) |       |
|-----------|----------------------------------------------|-------|----------------------------------------------|-------|
|           | Medium I                                     | II    | I                                            | II    |
| RV (30°C) | 85.1                                         | 130.6 | 290.2                                        | 261.2 |
| (40°C)    | 3.7                                          | 9.7   | 8.3                                          | 19.4  |
| USL1      | 35.0                                         | 0     | 102.7                                        | 0     |
| USL2      | 54.7                                         | 0     | 148.0                                        | 0     |
| TML1      | 26.5                                         | 0     | 75.2                                         | 0     |
| TML2      | 35.1                                         | 0     | 101.0                                        | 0     |
| TML3      | 29.2                                         | 0     | 72.8                                         | 0     |
| TML4      | 8.5                                          | 0     | 49.0                                         | 0     |
| TML5      | 47.9                                         | 0     | 160.6                                        | 0     |
| MSD1      | 15.6                                         | 1.7   | 36.3                                         | 4.6   |
| MSL1      | 0                                            | 0     | 0                                            | 0     |
| MSL2      | 0.5                                          | 0     | 0.5                                          | 0     |
| MSL3      | 40.1                                         | 53.0  | 70.9                                         | 125.6 |
| MSL4      | 52.9                                         | 134.4 | 88.3                                         | 288.3 |
| MSL5      | 145.3                                        | 92.3  | 311.3                                        | 174.3 |
| 43°C      |                                              |       |                                              |       |
| USL2      | 0                                            | 0     | 0                                            | 0     |
| MSL5      | 14.6                                         | 59.6  | 24.9                                         | 138.2 |
| pH6.5     |                                              |       |                                              |       |
| MSL5      | 81.9                                         | 7.7   | 154.0                                        | 7.7   |

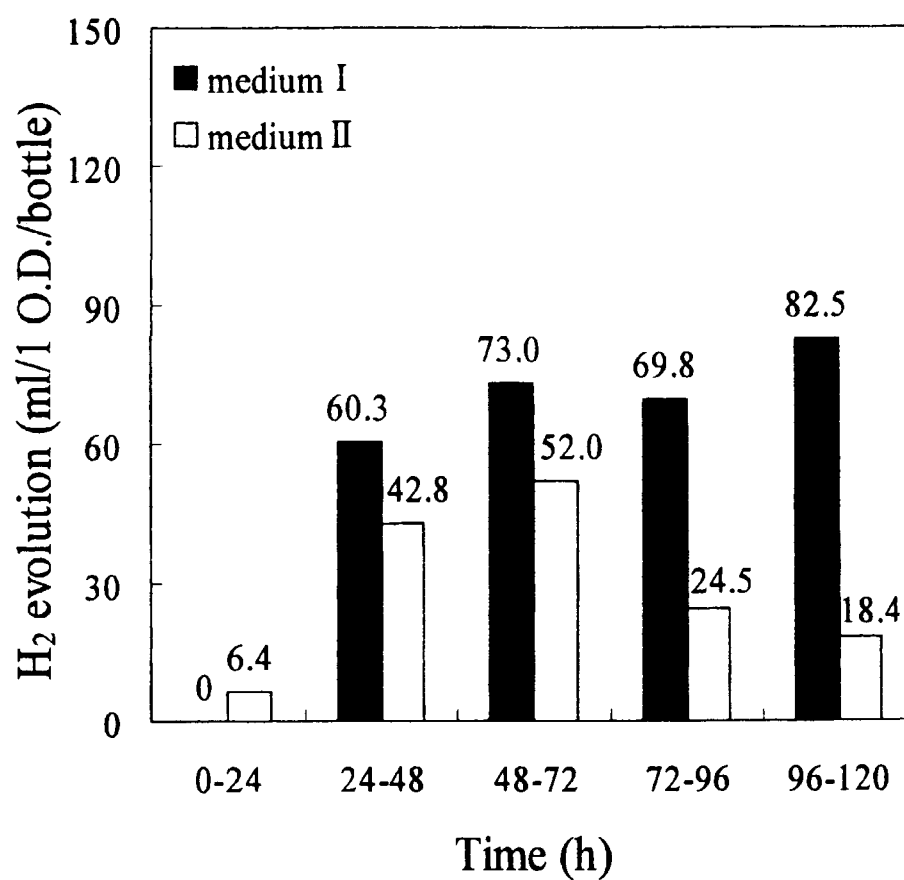


Fig. 1 H<sub>2</sub> evolution by SGD4  
at 40°C, pH 7.0

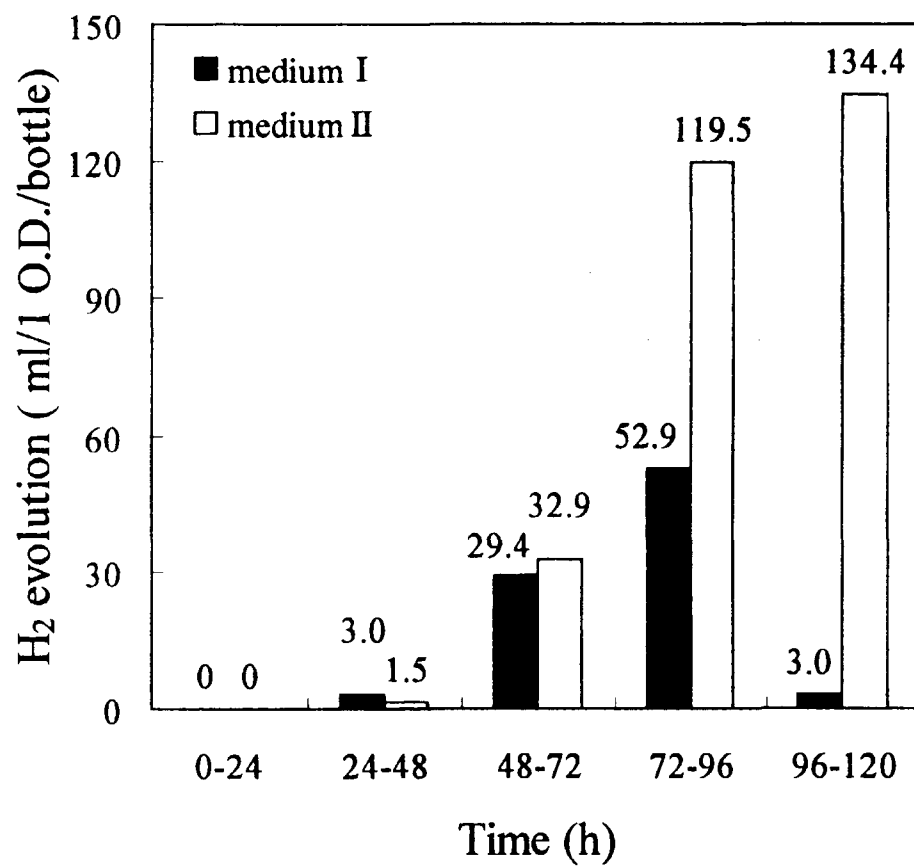


Fig. 2 H<sub>2</sub> evolution by MSL4  
at 40°C, pH 7.0

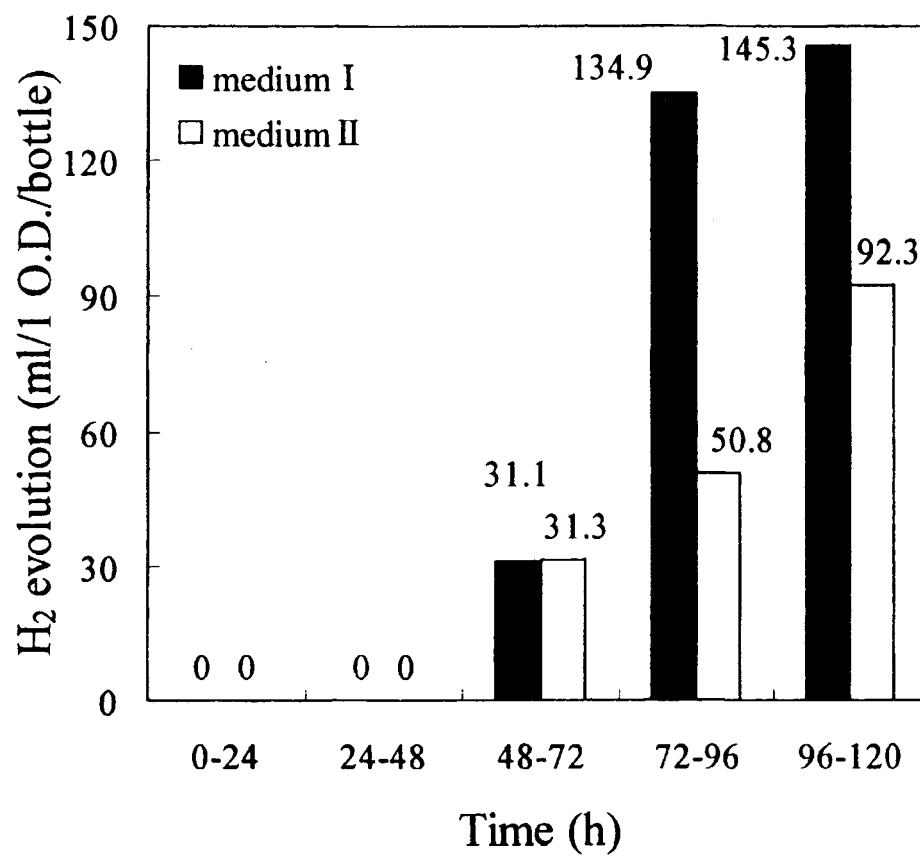


Fig. 3 H<sub>2</sub> evolution by MSL5  
at 40°C, pH 7.0

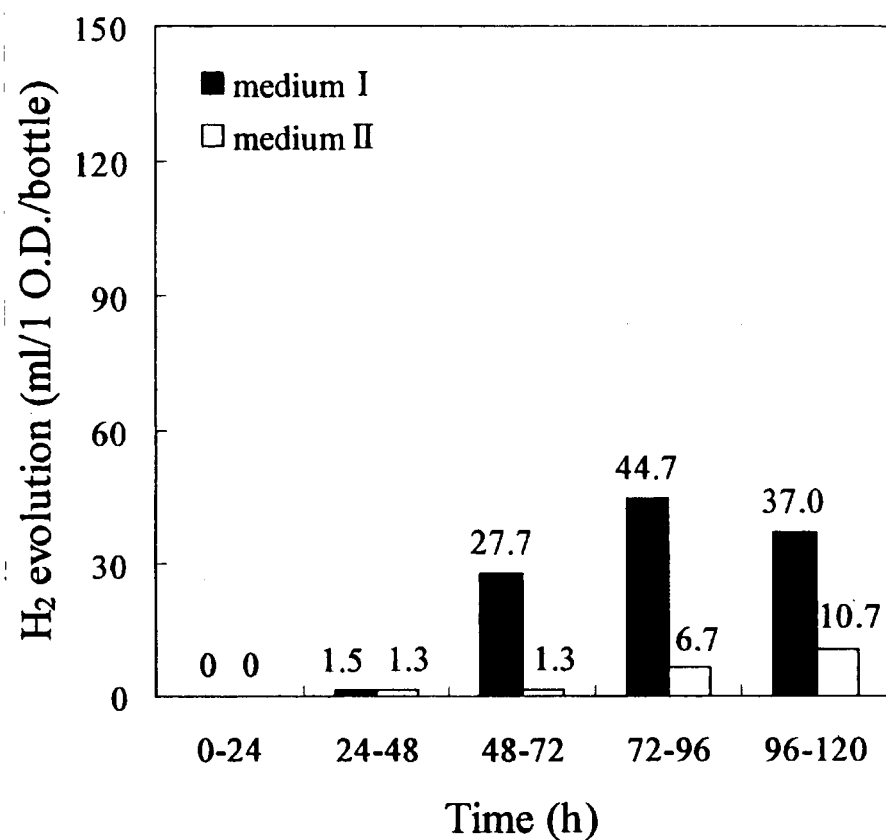


Fig. 4 H<sub>2</sub> evolution by SGL4  
at 40°C, pH 7.0

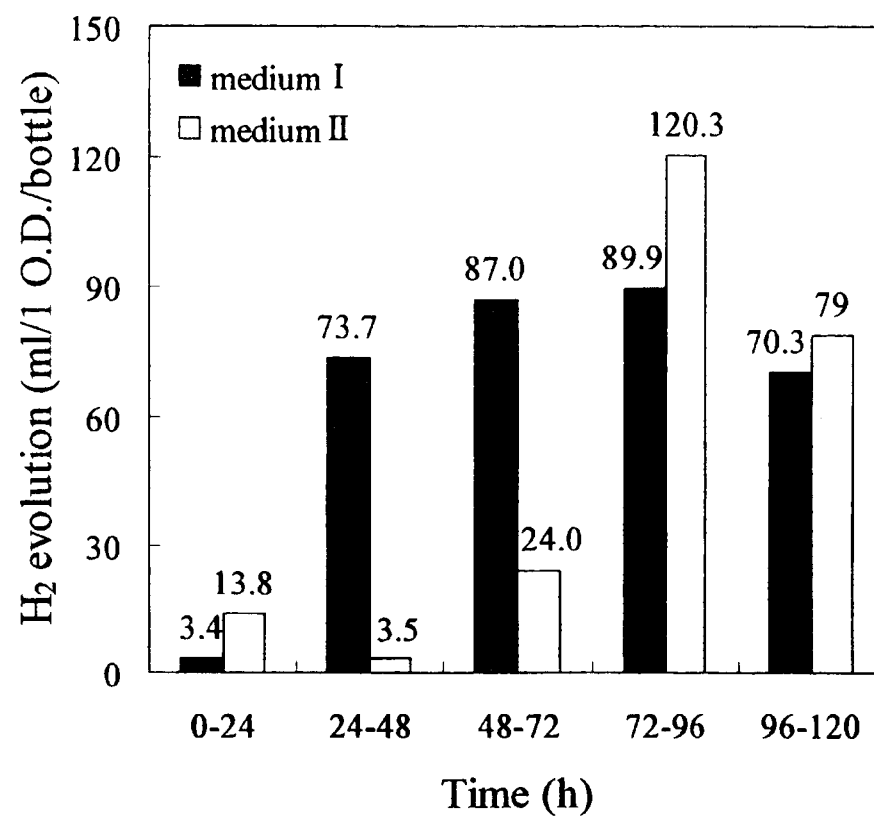


Fig. 5 H<sub>2</sub> evolution by SGL4  
at 40°C, pH 6.5

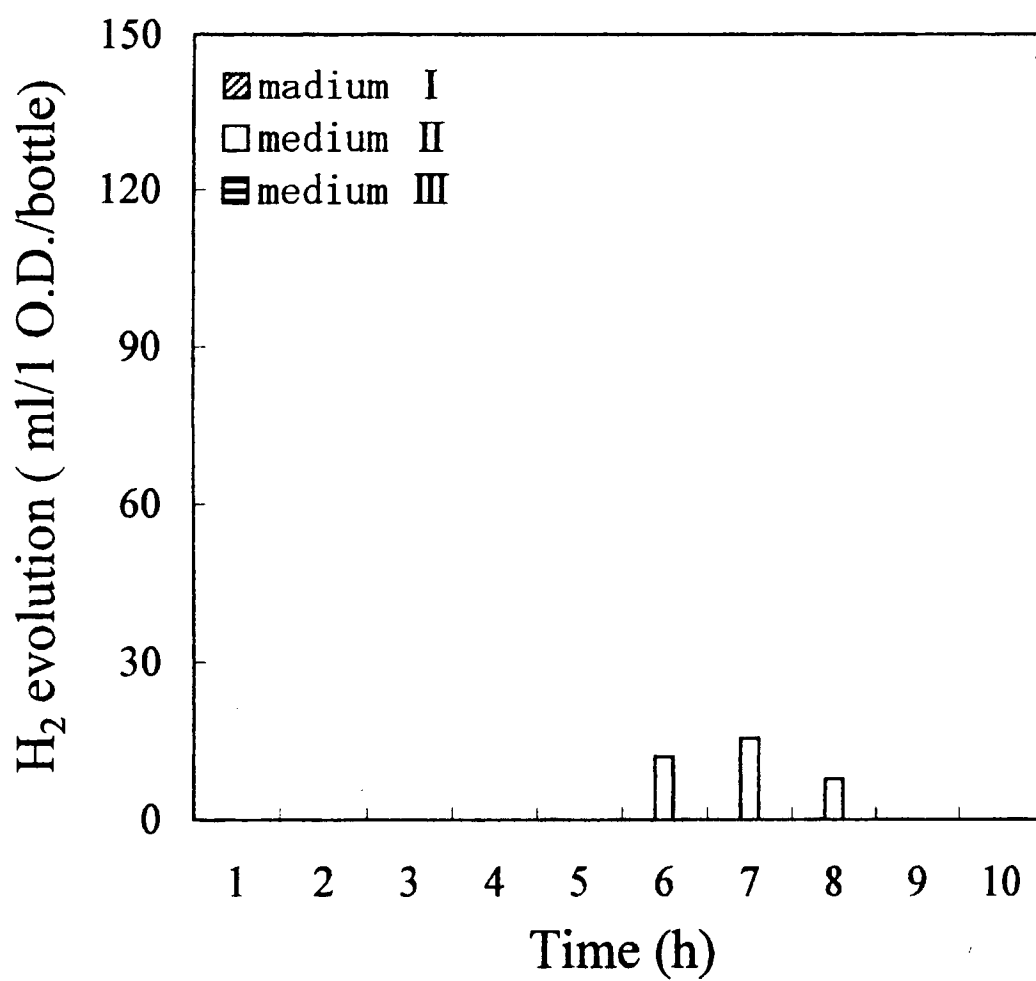


Fig. 6 H<sub>2</sub> evolution by CM55L1  
at 53°C, pH 7.5

# 海外調査報告書

米国技術調査（バイオテクノロジーシンポジウム）

地球環境産業技術研究機構  
CO<sub>2</sub>固定化等プロジェクト室  
環境調和型水素製造プロジェクト

RITE report on 20-th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals,  
Gatlinburg, USA '98

Content

I. OBJECT

1. Purpose
2. Period
3. Researching items
4. Participant
5. Schedule

II. RESULTS

1. Connecticut University, visit
2. 20-th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, Gatlinburg
3. Discussion with Dr. Greenbaum

## 1. OBJECT

### 1. Purpose

Scientific exchange of current information about different aspects of optimization of light energy conversion to biohydrogen.

### 2. Period

4 30 (Thu.) - 5 8 (Fri.) 9 days

### 3. Researching Items

- (1) Presentation and discussion of our results in Connecticut University
- (2) Poster presentation and discussion on the Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, Gatlinburg
- (3) Discussion with Dr. Greenbaum and visit Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge

### 4. Participant

Lyudmila Vasilyeva, Ph.D

(National Institute of Bioscience and Human Technology, Research Institute of Innovative Technology for the Earth, Fuji Electric Corporate R&D, Ltd.)

### 5. Schedule

- 4 30 (Thu.) departure from Narita, arrive to Detroit,  
departure from Detroit, arrive to Hartford
- 5 1 (Fri.) Connecticut University, visit. Presentation on interdepartment seminar, "Photosynthetic bacteria: applications for biotechnology". Discussion.
- 5 2 (Sat.) departure from Hartford, arrive to Pittsburgh,  
departure from Pittsburgh, arrive to Knoxville,  
transportation from Knoxville to Gatlinburg

5 3 (Sun.) 20th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals  
 5 4 (Mon.) 20th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals  
 5 5 (Tue.) 20th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals  
 Tour of Oak Ridge National Laboratory  
 5 6 (Wed.) 20th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals,  
 presentation of the poster, discussions  
 5 7 (Thu.) transportation from Gatlinburg to Knoxville,  
 departure from Knoxville, arrive to Detroit,  
 departure from Detroit  
 5 8 (Fri.) arrive to Narita

## II. RESULTS

### 1. Connecticut University

#### (1) Presentation on the interdepartment seminar:

"Photosynthetic bacteria: applications for biotechnology".

The talk was about the potential of photosynthetic bacteria for biotechnology and our current work on the BioHydrogen project. Common approaches to light energy utilization for production of biotechnologically useful compounds were discussed.

#### a. Summary of the presentation:

*Rhodobacter sphaeroides* can produce molecular hydrogen as a major photosynthetic product during light dependent utilization of organic compounds. However the efficiency is still not sufficient for practical application and further increasing is necessary. Since the light is a driving force for photohydrogen production, the size and organization of the photosynthetic unit seems to be important in determining the efficiency of light energy transfer. However, so far the relation between the early processes of the photosynthesis and the hydrogen production has not been clarified. In this respect mutants somewhat defected in the synthesis of

light-harvesting complexes would be useful for understanding of the regulatory mechanisms which control the efficiency of light energy conversion to molecular hydrogen. For enhancement of the hydrogen production by *Rb. sphaeroides* we proposed the method of optimization of LH1: LH2 complexes ratio in the intracytoplasmic membrane. A mutant with alterations in light-harvesting system was used as a model to demonstrate this method. In addition, an expression vector based on *puf* promoter from *Rb. sphaeroides* has been constructed. Using *puf:luc* fusion we have demonstrated that transcription of *puf* genes was strongly repressed under aerobic conditions and approximately 700-fold induced under anaerobic light conditions. This vector can be used for regulation of bacteriochlorophyll content for optimization of hydrogen production as well as for expression of any useful genes in *Rb. sphaeroides*.

#### Question 1

Why it is necessary to reduce the amounts of light-harvesting pigments?  
How can it increase the efficiency of light energy conversion?

#### Answer

The necessity of the reduction of light-harvesting antenna is connected with the problem of light penetration into photobioreactors. It would possess more equal distribution of light energy in cell suspension and thus the efficiency of light utilization will be enhanced.

#### Question 2

Do you know any other genetic approaches to enhance hydrogen production or light energy conversion in general?

#### Answer

Only one successful genetic approach was reported. It was shown that the hydrogen production of *Hup<sup>-</sup>* (minus) mutants of *Rb. sphaeroides* and *Rb. capsulatus* was increased, because the hydrogen uptake activity of hydrogenase was cut off. However, the hydrogen production rate in that case was not changed.

### Question 3

Why it was necessary to construct the vector based on the puf promoter?  
Why did not you use the variety of efficient vectors already existing and commercially available?

### Answer

The point is that the strong promoters from *E. coli*, *Pseudomonas* and from other bacteria (viruses) are not active in photosynthetic bacteria. That is why the search for strong and well regulated native promoters was undertaken.

### (2) Visit of two research groups in Department of Plant and Cell Physiology.

- a. The first group: Villar R., Laguna M.R., Dr. Cadavid I. Prof. Sha'afi R.

They study the effects of aqueous extracts of some marine microalgae on responses to various contractile agents in isolated rat *duodenum* (acetylcholine, calcium chloride, barium chloride) and *vas deferens* (noradrenaline). It was shown that extracts of *Chlorella stigmatophora* may have pharmacological potential. The extracts had spasmolytic effects on responses to the three contractile agents in *duodenum*. In *vas deferens*, the extracts inhibited the contractions induced by noradrenaline. With the aim of elucidating their mechanisms of action, they are attempting to isolate the active principles present in these extracts.

- b. The second group: D.F. Buchi, Dr. M.P. Canta, Prof. Sha'afi R.

They study *Mandevilla velutina* (*Apocynaceae*) cell culture as production system for biomass and secondary metabolites such as velutinol A, which is able to inhibit the hypotensive activity of bradykinin. The cell heterogeneity concerning morphology, differentiation, and growth features of *M. velutina* cell cultures are documented by optical and electron microscopy. The optimization of velutinol A production are planning through cell line selection within a two-stage production system: massive biomass production followed by a shift to secondary metabolism accumulation.

## 2. 20-th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals

### (1) Session 1: Feedstocks: New Supplies And Processing.

#### a. Presentation

"New Opportunities For Engineering Lignin" by J. Ralph, R. D. Hatfield, R. R. Sederoff, J. J. MacKay, and A. M. Boudet, U.S. Dairy Forage Research Center, Madison, Wisconsin

#### Content:

Recent findings suggest that there is greater potential for lignin modification in plants than previously considered. Viable mutant plants that are unable to produce sufficient quantities of normal lignin monomers due to natural or biogenetic mutations appear to utilize other plant phenols to create a functional, yet modified, lignin polymer. These phenols do not necessarily come from the normal monolignol biosynthetic pathway and were therefore unanticipated. This unexpected metabolic plasticity means that attempts to "down regulate" lignification by targeting pathway enzymes may not always be successful, because plants may still make as much lignin from other phenolics. However, it provides significant opportunities for engineering lignin to create new lignins with different properties. There is a potential to induce plants to create their lignins from other components.

#### b. Presentation

"Natural And Somatic Embryo Development In *Loblolly Pine*: Gene Expression Studies Using Differential Display" by J. Cairney, N. Xu, G. S. Pullman, V. T. Ciavatta, and B. Johns, Institute of Paper Science and Technology, Forest Biology Group, Atlanta, Georgia

#### Content:

Capturing the genetic gain from breeding and genetic engineering programs requires a means of multiplying superior genotypes in quantities suitable for operational use. A tissue culture method for multiplying embryos asexually, has great potential as a cost-effective method for clonal multiplication of elite genotypes. *Loblolly pine*, the most important

commercial softwood in the southern United States, has proven recalcitrant; yields are low, and embryo quality can be poor. A comparison of natural and laboratory embryos could illuminate key areas in the process. A recent technique called "Differential Display" has been modified to examine gene expression throughout the course of somatic and zygotic embryo development. Over 400 cDNA "bands" have been cloned and their sequences determined. These bands can serve as "expression markers" for embryo development under natural and laboratory conditions. This technique is rapid, simple, and sensitive and can provide important insights into the physiology of conifer embryogenesis.

(2) Session 2: "Applied Biological Research"

a. Presentation

"Factors Crucial For Recombinant *Saccharomyces* Effective In Fermenting Xylose" by N. W. Y. Ho, Z. D. Chen, M. Sedlak, S. Mohammad, and A. Brainard, Laboratory of Renewable Resources Engineering, Purdue University, Indiana

Content:

The naturally occurring *Saccharomyces* yeasts, particularly those capable of effectively fermenting glucose, are known to be unable to metabolize xylose aerobically or anaerobically. Previously, it was reported the successful development of recombinant *Saccharomyces* yeasts that can not only effectively ferment xylose but also effectively co-ferment both glucose and xylose. This was accomplished by cloning multiple copies of genes encoding three key enzymes required for metabolizing xylose in yeasts: xylose reductase, xylitol dehydrogenase, and xylulokinase. These genes were modified so that they could be expressed in the presence of glucose and or xylose. These modified genes were either carried on a high-copy-number plasmid or directly integrated into the yeast chromosome. The best xylose-fermenting *Saccharomyces* contains multiple copies of integrated xylose

reductase gene, xylitol dehydrogenase gene, and xylulokinase gene, and can ferment a mixture of 8% glucose and 4% xylose to ethanol in 30 h.

b. Presentation

"Metabolic Engineering Of *Escherichia coli* Based Bacterial Hydrogen Production" by K. Sode, M. Watanabe, H. Makimoto, M. Tsutsumi, T. Kobayashi, and M. Tomiyama, Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, National Institute of Agrobiological Resources, Japan

Content:

Bacterial hydrogen production based on anaerobic metabolism is a possible option to reduce organic waste. Research on hydrogen production from waste has been carried out using molasses from sugar-producing manufacturers. *E. coli* produces hydrogen by mixed-acid fermentation, mainly from glucose. In *E. coli*, hydrogen is evolved via the formate hydrogen lyase (FHL) system containing the formate dehydrogenase-H (hydrogenase linked), electron-carrier intermediate(s), and hydrogenase 3. In the report a few metabolic engineering approaches were undertaken to enhance the efficiency of *E. coli* hydrogen production from glucose by introducing rational mutations into the genes responsible for the branching metabolic pathways, such as fermentative lactate dehydrogenase and uptake hydrogenases.

(3) Session 3: "Bioprocessing Research"

a. Presentation

"Novel Reactor With Electromagnetic-Field Stirring That Boosts Cellulosic Waste Bioconversion" by A. Sinitsyn, V. Baraznenok, N. Popova, N. Ankudinova, A. Berlin, and A. Gusakov, Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Content:

The efficiency of bioconversion of agricultural cellulosic waste (e.g., rice straw) and wood, pulp, and paper by products by cellulases into soluble

sugars and then into alcohol and chemicals is hindered by the low reactivity of the crystalline substrates and the requirement for mechanical stress synergistic to enzymatic action. Using commercial cellulases from *Trichoderma reesei* and other micromycetes, the sugar level rose to 50 g L in 1 h, manifesting an acceleration of severalfold. Reactor design and hydrolysis conditions were optimized, making the approach a valuable tool for commercially feasible cellulose bioconversion.

#### (4) Session 5: "Bioprocess Evaluation and Confirmation"

##### a. Presentation

"Analysis Of Advanced Technology For Coproducing Ethanol And Power From Biomass" by S. Casten and L. R. Lynd, Thayer School of Engineering, Hanover, New Hampshire.

##### Content:

Analyzed of mature biomass ethanol technology. For an advanced scenario representing an estimate of the most likely features of mature technology, a selling price of 50.3 cents per gallon was projected for production from poplar costing \$38.6 per delivered dry ton. Electricity coproduction is a significant source of revenue (12 cents per gallon of ethanol produced), even though power generation using a conventional Rankine cycle with rather modest (26.8%) efficiency was assumed. For both biomass and oil, factors must be considered such as raw-material cost, ease of handling, reactivity, amenability to biotechnology, scale, and product distribution.

#### (5) Special Topic Discussion Groups

"Technical and process advances in biomass to ethanol from an international perspective".

Sponsored by the International Energy Association,

Discussion Leader: Jack Saddler, University of British Columbia, Vancouver,  
British Columbia, Canada

Presentations of researchers from USA, Canada, Sweden, Brazil and Italy and  
discussion of their current results and the prospects of international  
collaboration in this field.

(6)Poster session

Poster 89: "A novel multicopy plasmid capable of replication in thermophilic  
cyanobacteria". Masato Miyake, Hiroshi Nagai, Makoto Shirai, and Yasuo Asada,  
National Institute of Bioscience and Human-Technology, Japan

Content: A 2.5 kb-multicopy plasmid, pMA4, in a thermophilic cyanobacterium,  
*Synechococcus sp.* MA4, was isolated and analyzed for use in development  
studies involving the genetic engineering of thermophilic cyanobacteria. The  
copy number estimated from densitometric analysis was at least 300. Five open  
reading frames (ORFs) were found in the primary structure. In the 300 bp-  
region between ORF2 and ORF3, a pair of 23 bp-directed repeat and 13 bp-stem-  
14 bp-loop structures were found. A consensus sequence of the nick site in the  
Inc-Q-group plasmid of gram-positive bacteria, 5'-TAAATGCGCCCT-3', was found  
in the 5' terminal of ORF1. To demonstrate the potential application of pMA4,  
the pMA4 plasmid was electroporated into a thermophilic cyanobacterium,  
*Synechococcus sp.* MA19, which is the strongest poly-beta-hydroxybutyrate  
producer in photoautotrophic organisms. The plasmid pMA4 was replicated in the  
thermophilic cyanobacterium.

Poster 92: "Immobilization of oriented photosynthetic reaction centers", Ida  
Lee, James W. Lee, and Elias Greenbaum, Oak Ridge National Laboratory,  
Tennessee, USA

Content: The Photosystem I (PSI) reaction center is one of the pigment-protein complexes that are responsible for the photosynthetic conversion of light energy to chemical energy. Each is  $\sim 6$  nm in size and can generate approximately 1 V in a few picoseconds with high quantum efficiency ( $\sim 100\%$ ). PSI reaction centers were deposited and characterized on gold surfaces. The epitaxially grown gold films were treated separately with 2-mercaptoethanol, mercaptoacetic acid, 2-dimethylamino-ethanethiol, thioacetic acid, and mercaptoethane. Tapping-mode atomic force microscopy and scanning tunneling microscopy were used to study the percentage coverage on various derivatized gold surfaces, their electronic properties, and their anchored orientation.

Poster 94: "Screening for oxygen-tolerant mutants of hydrogen-producing *Chlamydomonas reinhardtii*", T. Flynn, M. L. Ghirardi, D. Benson, E. Tracy, and M. Seibert, National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado, USA

Content: The potential of green algae for use in a commercial hydrogen production system will depend on their ability to evolve hydrogen from water under aerobic conditions. However, the hydrogen-evolving metabolic pathway in wild-type algae is sensitive to very low concentrations of oxygen. Two approaches were developed to genetically select for oxygen-tolerant mutants of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* that produce hydrogen under increasing oxygen partial pressures. The two selective pressures have been further refined to eliminate coselection of other kinds of mutants. A rapid chemochromic assay was also developed to screen for the desired mutants because the selective pressures was not very strong. The assay is based on the ability of a solid-state film to change absorbance properties when in contact with hydrogen gas. The chemochromic response of the film in the presence of oxygen was correlated to the  $O_2$  level for hydrogen-evolution capacity and to the estimated rate of  $H_2$  evolution in the absence of added  $O_2$ .

Poster 95: "A new class of hill reagents and their potential for production of fuels by nanofabrication and biometallocalysis", James W. Lee, Robert T. Collins, and Elias Greenbaum, Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA

Content: The report of the results of an extensive experimental survey and characterization of over 20 species of transition-metal compounds for their activity in the Hill reaction and photoprecipitation of metal at the lipid-water interface of photosynthetic thylakoid membranes. Four new Hill reagents were identified:  $\text{PtCl}_4$ ,  $\text{OsCl}_3$ ,  $[\text{RuCl}_2]^{2-}$ , and  $[\text{RuCl}_2]^{3-}$ . Each can be photosynthetically reduced to form a metallic catalyst at the reducing site of Photosystem I (PSI) in the thylakoid membranes. A negative charge of the metal compound species is apparently essential for interaction with the reducing site of PSI. When  $\text{PtCl}_4$  and  $\text{OsCl}_3$  are dissolved in water, they combine with water molecules to form  $\text{H}_2[\text{PtCl}_4(\text{OH})_2]$  and  $\text{H}_3[\text{OsCl}_3(\text{OH})_3]$ , which can dissociate to negatively charged species  $[\text{PtCl}_4(\text{OH})_2]^{2-}$  and  $[\text{OsCl}_3(\text{OH})_3]^{3-}$  at neutral pH. Metallic ruthenium can also catalyze reduction of protons for  $\text{H}_2$  production, in addition to its known catalytic ability to fix  $\text{CO}_2$ . These findings considered to be important implications for nanofabrication and biometallocalysis to harness the power of photosynthetic systems.

Poster97: "Effects of reducing agents and pH on hydrogen production by anaerobic *Clostridium* species", B. K. Soni and V. J. Srivastava, Institute of Gas Technology, Des Plaines, Illinois, USA

Content: The biological production of hydrogen has been examined primarily by the use of unicellular cyanobacteria. This consists of molecular nitrogen as the sole nitrogen source in the presence of light and nitrogenase enzymes. The other approach to hydrogen production involves the use of *Clostridium* species under reductive conditions. A preliminary process concept has been developed for the production of hydrogen from biomass. Two different biocatalysts,

namely, *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium butyricum*, have been utilized for the production of hydrogen in anaerobic reactors. The incorporation of reducing agents such as cysteine hydrogen chloride and sodium sulfide has been examined. The effect of reducing agents was examined with and without pH regulation using calcium carbonate. Under optimal conditions, the hydrogen production was enhanced by more than 56% as compared with that in control experiments. A material and energy balance revealed that more than 96% of the feed substrate energy was accounted for in various products.

Poster93: "Light-harvesting system of Rhodobacter sphaeroides: application aspects of genetic studies", L. Vasilyeva, M. Miyake, E. Nakada, Y. Asada, and J. Miyake, RITE, NIBH, AIST, Tsukuba, Ibaraki, Japan

(7) Discussion near the poster

Question 1

How the P3 mutant was obtained?

Answer

This mutant was selected after UV irradiation of petri dishes with wild type strain. We selected mutant clones with altered pigmentation. Only this strain was found to be stable.

Question 2

You obtained the recombinant strain with restored spectrum. Why the hydrogen production of this strain is lower than that of the wild type strain?

Answer

The recombinant strain with restored spectrum contains the plasmid. We have to add kanamycin to the growth medium to maintain the plasmid. It is known that the presence of the antibiotic inhibits both the growth rate and hydrogen production.

### Question 3

Why do you think the *puf* promoter activity was observed only during 5 hours of photosynthetic growth?

### Answer

This is true for batch culture. Probably, the reason is general. During batch cultivation pH of the medium is increasing, the light penetration is decreasing. These conditions are not optimal for both the growth and photosynthetic activity. In continuous culture with pH regulation we could observe *puf* promoter activity continuously.

### 3. Discussion with Dr. Greenbaum and Tour of Oak Ridge National Laboratory

#### (1) Discussion with Dr. Greenbaum

Monday, May, 4 - business-lunch and discussion

Participant: Dr. E. Greenbaum, Dr. L. Vasilyeva, Dr. M. Miyake,

Dr. Tomiyama, Dr. C. Nakamura

Discussion about the potential of photosynthetic bacteria for biotechnology, biohydrogen as prospective clean and renewable fuel for future, international collaboration and our current work on the BioHydrogen project.

#### (2) Tour of Oak Ridge National Laboratory

##### a. Laboratory A13

Dr. Elias Greenbaum, Biotechnology of Photosynthesis for Fuels, Chemicals and Sensor Development

##### b. Laboratory B1

Dr. Tanya Kuritz, Molecular Microbiology of Aquatic microorganisms:

Application in Environmental and Industrial Biotechnology.

##### c. Laboratory 38

Cathy McKeown, Succinic Acid Production by *E. coli*: Scale-up and User Facility.

##### d. Laboratory 36

Thomas Klasson, Biofiltration of Organics in Trickle-bed Reactors.

e. Comments

We spent much time in the Security Office to get a permission to enter the territory of ORNL. And then each group had only 5-10 min to visit each laboratory. Unfortunately, we did not have a time to stay longer and ask questions. Taking pictures was prohibited.

# 海外調査報告書

南米技術調査（世界水素エネルギー会議）

地球環境産業技術研究機構  
CO<sub>2</sub>固定化等プロジェクト室  
環境調和型水素製造プロジェクト

## アルゼンチン技術調査報告書

### 1. 調査目的

この度アルゼンチン、ブエノスアイレスにて開催される第12回世界水素エネルギー会議（Hydrogen'98）に参加し、オーラル及びポスター発表を行い、生物的水素製造技術に関する研究開発動向について調査するとともに、意見交換・討論を通じて、関連情報の収集を行う。

### 2. 調査概要

#### （1）調査期間

平成10年6月19日（金）～6月29日（月）（11日間）

#### （2）調査項目

第12回世界水素エネルギー会議（Hydrogen'98）参加

場所：Escuela Superior Tecnica del Ejercito

Gral. Div. Manuel N. Savio

Buenos Aires, Argentina

#### （3）調査参加者

大月利 主任研究員 （IHI分室）

高崎幸一 主任研究員 （東ガス分室）

北島洋二 研究員 （鹿島分室）

#### （4）調査日程

6/19（金）成田発 →

20（土）Buenos Aires 着

21（日）第12回世界水素エネルギー会議

22（月）第12回世界水素エネルギー会議

23（火）第12回世界水素エネルギー会議

24（水）第12回世界水素エネルギー会議

25（木）第12回世界水素エネルギー会議

26（金）第12回世界水素エネルギー会議

27 (土) Buenos Aires 発 →

28 (日) 機中泊 →

29 (月) 成田着

### 3. 調査結果のまとめ

・世界水素エネルギー会議は2年ごとに開催されており、前回のドイツのシュツットガルトでの会議に続いて開催されたものである。前回の会議に比べると欧米からの参加者が少ないように感じられたが、一方で地元アルゼンチンを含むラテンアメリカから多数の参加者があった。

・今回世界水素エネルギー会議がブエノスアイレスで開催されたことは、以下の2点から重要である。まず12回目を数えるこの会議が、初めて発展途上国でしかも初めて南半球で開催されたことである。21世紀の地球環境問題、それに資するであろう水素エネルギー社会を考えると、発展途上国の関与は不可欠であり、この時期に発展途上国で開催されたことは意義深い。第2に、第4回気候変動枠組み条約締約国会議(COP4)が本年11月にブエノスアイレスで開催されることである。昨年12月に京都で開催されたCOP3での合意事項を受けて、各国が取り組みを始めているところであるが、COP3からCOP4への橋渡しの時期に、COP4に先立って水素エネルギー会議が同じ都市で開催されることは意義深い。

・本会議は水素エネルギー全般に関する総合会議であり、水素の製造、貯蔵、輸送、利用に関する要素技術の研究から、材料、安全性、標準化、法規制などの水素に関係した諸分野の研究、さらには水素社会への戦略の研究までを網羅した幅広い分野の発表が行われた。

・全体を通して、13件のPlenary Lecture、170件を超えるOral Presentation、120件余りのPoster Presentationが行われた。発表論文の内訳は以下の通りである。

Topic 1 Transition to hydrogen-based energy systems 7件

1.1 Socio-political aspects

1.2 Environmental implications

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| 1.3 Economic aspects                                   | 5  |
| 1.4 Visions and strategies                             | 12 |
| 1.5 International and national programs and projects   | 15 |
| Poster                                                 | 16 |
| Topic 2 Technologies of hydrogen production            | 6  |
| 2.1 Hydrogen from fossil fuels                         | 5  |
| 2.2 Electrolysis                                       | 6  |
| 2.3 Thermochemical cycles                              | 5  |
| 2.4 Hydrogen separation and purification               |    |
| 2.5 Other technologies                                 | 5  |
| Poster                                                 | 21 |
| Topic 3 Technologies of hydrogen storage and transport |    |
| 3.1 Stationary storage systems                         | 6  |
| 3.2 Mobile storage systems                             | 6  |
| 3.3 Physico-chemical storage                           | 17 |
| 3.4 Hydrogen liquefaction                              |    |
| 3.5 Hydrogen transport and distribution                |    |
| Poster                                                 | 27 |
| Topic 4 Technologies of hydrogen utilization           | 12 |
| 4.1 Industrial use                                     |    |
| 4.2 Combustion systems                                 | 16 |
| 4.3 Fuel cells                                         | 7  |
| 4.4 Air and space projects                             |    |
| 4.5 Other applications                                 |    |
| 4.6 Systems modelling and simulation                   | 5  |
| Poster                                                 | 25 |
| Topic 5 Materials and safety                           | 6  |
| 5.1 Materials for hydrogen technologies                | 12 |
| 5.2 Safety aspects of hydrogen and its application     | 6  |
| Poster                                                 | 12 |
| Topic 6 Fundamentals                                   |    |
| 6.1 Photoelectrochemistry                              | 4  |

|                                                |    |
|------------------------------------------------|----|
| 6.2 Biological hydrogen production             | 4  |
| 6.3 Innovative materials and processes         | 5  |
| 6.4 Mathematical modelling                     | 1  |
| Poster                                         | 24 |
| Topic 7 Standards and regulations              | 4  |
| 7.1 ISO TC 197                                 |    |
| 7.2 Related energy and environmental standards |    |
| 7.3 Vehicle emissions regulations              |    |
| Poster                                         |    |

・ポスターセッションは会議期間中の掲示に加えて、講演会場にてそれぞれ5分間のショートプレゼンテーションが行われた。参加者に十分周知されていたとは言えず、また発表者によってはOHPなどを用意しておらず、ポスターを面前にしてのディスカッションに比して今一つ盛り上がらなかったようである。

・RITE水素製造プロジェクトからは、以下に示す題目で1件のポスター発表と2件のオーラル発表を行った。

- Hydrogen Production by Floating-type Photobioreactor.  
(大月、ポスター)
- Biological Hydrogen Production as an Environmentally Friendly Technology. (高崎、オーラル)
- Outdoor Operation of Bioreactor using Photosynthetic Bacteria and Effect of Dark Reaction. (北島、オーラル)

・我々からの発表を含めて、バイオ水素に関する発表としてオーラル発表4件、ポスター発表2件があった。論文数そのものは、2年前のそれぞれ5件、10件に比べて減少した。これは必ずしもバイオ水素の研究が下火になったということではなく、開催地の地理的な条件、経済情勢などから、バイオ水素の研究開発に携わる研究者自体の参加が少なかったことが原因として考えられる。

・展示は会議場エントランスの狭いスペースに限定され、2年前に比較すると数も少なかった。Norsk Hydro Electrolysers AS (水の電気分解)、ZEVCO (ゼロ

エミッション自動車)などの企業の展示があった。会議の最終日には、会場の中庭でアルゼンチンで開発途上の水素自動車の実物の展示があった。

- ・会議全体を通して印象深かったのは、アルゼンチン・パタゴニア地方、南極大陸、アラスカ州などの風力が豊富な地域で風力発電を行い、水を電気分解して水素を作り、得られた水素を近隣の村のエネルギー源としてオンサイトで使用するか、あるいは水素を液化して他の場所へ輸送するという構想が複数の研究者から語られたことである。

- ・COP3を受けて各国ともCO<sub>2</sub>排出量の削減のために再生可能エネルギーの利用を考えている。2000年をひとつのターゲット時期として開発を加速化しており、そのために国際協調の必要性が何度となく指摘されていた。また、水素エネルギー社会への転換のためには、水素ガスステーションに代表される社会インフラの整備が重要な問題であることが指摘された。

- ・次回第13回の会議は、2000年の6月に中国、北京にて開催される。

#### 4. まとめと感想 (大月)

- ・平成8年第11回の国際会議がドイツのシュツットガルトで開催されたのを受けて、本国際会議は、各種エネルギー利用の研究開発をめざしている南米の大都市アルゼンチンのブエノスアイレスで行われた。

- ・今回の会議は水素エネルギーに関する最近の技術の集大成といった感じで、受領したブローシヤリングは3冊、合計2300ページという分厚いものであった。ドイツ、アメリカの発表に代表されるように、水素を直接燃焼させるバス、自動車などがもう実用化寸前にまできていること、太陽電池で作った電気で水を電気分解して水素を生産するといった、生物方式以外の水素生産研究が盛んである。アルゼンチンでは、パタゴニア地方に風力発電設備をおいて、水を電気分解して作った水素を液化して外国へ輸出しようという大それた構想の紹介もあり、印象に残った。

- ・日本からの発表では、我々RITE (K. Takasaki, Y. Kitajima and T. Otsuki) のほかにWE-NET関係の発表が数件あった (K. Fukudaなど)。また、20年以上も前から水素自動車を開発してきた武蔵工大 (S. Furuhashi and K. Yamane) の

発表もあった。

・総じて、生物関係の発表は少なかったが、水素に関する多数の技術の一端を知ることができ、例えば、アメリカ、カナダは水素の取り扱い方法の教科書的な Sourcebook、“Hydrogen for Application”を作成し、CD-ROMも発行する予定である、といった動向をも知ることができ有益な会議であった。

## Plenary Lecture

・John O. M. Bockris (USA)

### The Hydrogen Economy and the Future

いろいろと自然エネルギーの利用方法があるという感想をもった。

(1). エネルギー消費が増えるとG N Pが上がり、Sカーブを示す。非共産国ではG N P増加はエネルギー消費6 KW/personで頭打ちであるが、共産国では直線的に上昇途中である。

(2). 原子力のコストと太陽電池のコスト比較

2010年以降原子力コストは上昇する。太陽電池コストは原子力コストより低く、今後も減少を続ける。アモルファス太陽電池は生産規模が10 MW/year (2000年)になればコストはUS\$ 1位になる。今は1 MW/yearでUS\$ 3~4、効率6%である。

(3). 太陽エネルギーを地球に移送する方法 (アイデア)

a) 衛星利用

b) いったん月に集めて地球に送る (NASA)

(4). Brine electrolysis no Cl<sub>2</sub> evolution

塩素を出さないで海水を電解する。代わりに臭素が出るが、臭素は市場で売れる。

(5). 風力利用

E=10<sup>27</sup>・1.2・PV3、Homopolar Generator

(6). 重力による発電

水面と海底との間にループを作り、水面でLoadに積んだCO<sub>2</sub>を海底でLoadから放出する。

(7). 燃料電池

水素を使えばSO<sub>x</sub>、NO<sub>x</sub>、CO<sub>2</sub>を出さない。メタノール自動車、バッテリー自動車はこれらのガスを出す。

・Hans W. Pohl (Daimler-Benz, Germany)

## Cryoplane, Hydrogen in Aviation, Reasons and Prospects

今後、飛行機製造数は増加する。しかし、CO<sub>2</sub>対策はなされていないので問題である。Daimler-Benzは1995年5月から30席のDornier328機（2-プロペラ）の開発をスタートし、2010年の実用化をめざしている。燃料は液体水素である。キーワードはsafe、reliable、environmentally compatible operation of liquid H<sub>2</sub> propulsionとのことであった。

・C. Marchetti (International Institute for Applied Systems Analysis, Austria)

## The Energy Islands as a Final Configuration in the Hydrogen Economy

エネルギー、特に原子力の将来の話があった。石炭、バイオマス木材、油、ガス、原子力の構成比率の動向予測をした。Atoll in the Pacific、Canton Islandでエネルギーを作るアイデアの紹介があった。2 km×2 km×20 mのBreeding Lagoonを使用し、深層水を汲み上げて海水からウランを吸着法で取る。5-10 HTGRとBreederからなるリアクタを設置する。Canton Islandは長さ15 kmの島。ラグーンのバージ上で原子力発電を行う。液体水素を作ってタンカーで運ぶ。

[入手文献]

C. Marchetti, Hydrogen and Energy, Chemical Economy and Engineering Review, Published by Chemical Economy Research Institute (Japan), Jan., 1973

C. Marchetti, Energy Islands in the Final Configuration of the H<sub>2</sub> Economy, Plenary lecture at the World Hydrogen Conference BsAs, 21-26 June, 1998

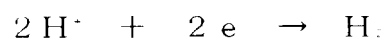
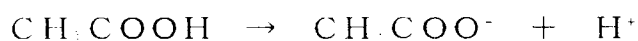
## Technologies of Hydrogen Production

・S. Roychowdhury (PACE University, USA)

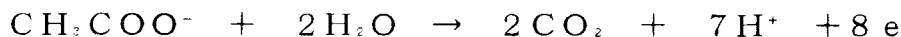
### Continuous Generation of Hydrogen from Sewage Sludge

嫌気性消化汚泥に低電圧（4～4.5 V）の電流（0.1～0.17 Amp）を通電すると、メタン生成が抑制され水素が生成するという興味深い発表であった。これは次の電気化学的反応による。

(cathode)



(anode)



汚泥中の主成分である酢酸は電解されて陰極で水素を、陽極で炭酸ガスを生成する。消化汚泥の実験例では、ガス中の水素は70%、炭酸ガスは26%、窒素は1%（8日後）であった。メタンは2日後から検出されなくなった。

#### Biological Hydrogen Production

・B. Gaudernack (Institute for Energy Technology, Norway)

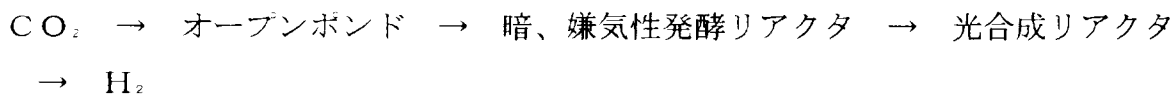
Photoproduction of Hydrogen. Annex 10 of the IEA Hydrogen Programme

IEAの水素プログラムを紹介した。Annex 10がPhotoproduction of Hydrogenで

1995年3月～1998年10月が活動期間である。この中でSubtask Bが

Photobiological Hydrogen Productionである。Annex 10にはJ. Benemann、O.

Zaborsky、E. Greenbaum、Y. Asada、K. Rao、M. Trediciらの有名な人々が参加している。発表の中で、ハワイ大のチューブラーリアクタが紹介され、IEAの報告書にJ. BenemannがハワイのBiohydrogen processを示している。これは我々がよく知っている関電のプロセスに類似していた。



#### Poster Presentation

・大月が、Hydrogen Production by Floating-type Photobioreactorという表題でポスター発表を行った。室内連続光照射で30日以上、太陽光下で20日以上水素を連続生産した実験結果、及び400L規模のモジュールでも水素生産を開始したことを発表した。ポスターでは別に5分間のショートプレゼンテーションを別の部屋で行った。本RITEプロジェクトは廃水処理と水素生産を同時に為し遂げることがめざす国家プロジェクトであること、浮体式リアクタは冷却のコストが不要で波による攪拌が可能なことなどが特長であること、リアクタの性能評価を光エネルギー変換効率で行っていること、などを強調した。これに対して、リアクタの材質は何か、浮体式の問題点は何か、などの質問を受けた(N. Holle, Institut fuer Verfahrenstechnik, Germany)。リアクタ本体はステンレス製、天板はアクリル製であること、問題点としては気象条件が悪化したときのリアクタの避難方法が未検討、海生生物の付着があること、などを挙げたがいずれも解

決できる見込みであると回答した。また、Agency for Science and Technology (Cuba) のAntonio Valdes Delgadoから、キューバではサトウキビ搾りかすを嫌気性処理しているが、水素生産まではやっていないので、是非RITEとコンタクトして技術を学びたいとの申込みがあった。I H I の工場の岸壁付近の海上に設置した400L規模のリアクタの写真は、参加者の関心を呼んだ。アルゼンチンは化学者、物理学者は多数いるようであるが、微生物で水素を生産することを試みている人はいないように見受けられた (D. Frankovic, Univ. of Rijeka, Argentinaの話)。

## 5. まとめと感想 (高崎)

### Plenary Lecture

- ・ John O M. Bockrisは水素エネルギーの経済性の観点から問題点の抽出を行った。太陽エネルギーをとらえる新しい試みとして、集光装置を太陽系の軌道の上に置き、そこから地球に伝達する構想が示された。

- ・ Hans-Wilhelm Pohl (Daimler-Benz, Germany) はDaimler-Benz社が進めているCryoplane Projectの紹介を行った。液体水素を燃料とする水素ジェットエンジン搭載の飛行機の初飛行を、2001年の9月に予定していることが明らかにされた。

- ・ N. Rossmeissl (DOE, USA) は1993年からDOEのHydrogen ProgramのManagerを務めているが、米国の近年の水素研究開発の情勢について、政策方針、予算割り当て状況を含め概説した。50年前から水素エネルギーの重要性が指摘されてきたにもかかわらず、まだ目に見える形で実用化されていない。今後50年間も水素に携わる研究者がよい条件で研究が続けられるよう、環境整備を進めていく必要があるとの言葉で締めくくった。

- ・ N. R. Beckがカナダの水素研究開発を紹介した。カナダは世界で2番目のCO<sub>2</sub>排出国であり、国の重要な政策として水素エネルギーの開発と利用に取り組んでいる。たとえば、石油会社の廃棄物である硫化水素からの水素生産への取り組み、バンクーバーでは燃料電池を搭載した3台の水素バスが走っていることなどが紹介された。なお、米国シカゴでも3台の水素燃料電池バスが走っている。

- ・ R. Wurster (Ludwig Bolkow Systemtechnik, Germany) がドイツの水素関連プロジェクトについて紹介した。質疑の中で、2000年に開催されるハノーバー

EXPOでの水素飛行機の試験飛行は困難であるとの見通しが示された。これは前出のDr. Pohlの見解とも一致する。また、Daimler-Benz社が2004年に水素自動車を市場に出すであろうとの見通しが示された。

・K. Fukuda (WE-NET Center, Japan) は日本のWE-NET Projectの紹介を行った。当初通産省ニューサンシャイン計画推進本部の林開発官に講演依頼があったが、都合によりWE-NET CenterのProject ManagerであるFukuda氏が講演することとなった。WE-NET ProjectのPhase I が今年度で終わり、Phase II が1999年～2003年までの5年間実施され、また然るべき評価の後Phase III が2004年から5年間の予定で計画されていることが紹介された。

・C. Flavin (USA) はCOP3 京都会議を受けての各国の責務について講演した。京都プロトコルの実現のためには先進国から発展途上国への技術の移転が重要であることを力説した。

・Estrada Oyuela (Argentina) はCOP4のホスト国としてここ数年のCO<sub>2</sub>削減に対する世界の流れについて概説した。COP4 ブエノスアイレスで何が達成されそうかという質問に対しては、京都プロトコルの前には18ヶ月の準備期間があったが、COP3からCOP4までは11ヶ月しかなく、残すところ5ヶ月となってしまった。従って本当に実現可能なことを選択して合意にこぎ着ける必要があると述べた。

・C. Huss (BMW, Germany) はBMWの水素ガス自動車開発のコンセプトを紹介した。天然ガス自動車から水素ガス自動車への移行は、CNG→LNG→LH<sub>2</sub>の順に行われる。水素自動車の普及のために必要なものは、安全性に関する法整備と水素ガスステーションに代表されるインフラの整備であると述べた。

・S. Weiner (Ballard Generation Systems, USA) はBallard社の研究開発について概説した。燃料電池搭載の水素自動車を可能としたのはBallard社のPEM

(Proton Exchange Membrane) 燃料電池の開発に負うところが大きい。Ballard社は、Daimler-Benz、Fordと協定を結び水素自動車の開発を進めており、2002年に商用バス、2004年に商用自動車の販売を計画している。演者はトヨタとGMが競争相手であることを明言した。また、携帯型電源として使用する燃料電池を開発中であることも明らかにした。

#### Award Ceremony

・国際水素エネルギー協会 (IAHE) から、水素エネルギーに関連した5分野の研

究業績に対する授賞式が行われた。5分野とは、General、Chemical、Electrochemical、Biological、Spaceである。このうち我々にもっとも関係の深いBiological分野については、ノミネートがなかったことから唯一授賞が見送られた。Chemical分野では日本のWE-NET Projectの業績が高く評価され受賞した。他の3分野の受賞者は以下の通りである。

General : Dr. John O M. Bockris, Dr. Cesare Marchetti

Electrochemical : Ballard Power Systems Inc.

Space : NASA

#### Economic Aspects

・高崎がRITE水素製造プロジェクトの概要と成果についてオーラル発表を行った。基礎研究については、遺伝子組み換えにより水素発生能力を向上させる各種変異株の取得に成功したことを報告した。エンジニアリング開発については、各種光合成リアクタの開発と現状の光エネルギー変換効率について発表した。特に本年度がプロジェクトの最終年度にあたることから、最終評価にて予想される評価のポイントについても言及した。発表に関し、James J. Provenzano (Clean Air Now, USA) から以下のような質問があった。

(Q) Hydrogenaseを光合成微生物に導入することによって、水素発生に関してNegativeな影響はないか？

(A) 培養条件を最適化することにより、系全体としてHydrogenase導入変異株からのPositiveな水素発生が可能になると考えている。

(Q) 培養の基質は何か？

(A) 光合成細菌の場合用いる廃水により異なるが、主な成分は乳酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸などである。

(Q) 発生した水素を細胞外に出す工夫があるか？

(A) 水素は自然に細胞外に出る。

(Q) 培地中の水素をどのように系外に出すか？

(A) 水素発生反応にマイナスとならないよう水素は除かれる。たとえば系外のチャンバーに捕集される。

セッションの終了後に、アルゼンチンの研究者 (Roque Pedace, Center for Advanced Studies, Buenos Aires University) から、発表OHPのコピーを入手したいとの申し出があった。また別の女性研究者 (名前および所属は不明) か

らは名刺をほしいとの申し入れがあった。このセッションの座長を務めた Dr. Robert Zweig (Clean Air Now, USA) とは、平成 7 年の 9 月にハワイに出張し、Hydrogen Weekの行事に参加したとき以来の再会であったが、印象深い発表であったとのコメントをいただいた。これらの研究者との意見交換からは、RITE 水素製造プロジェクトの研究開発内容に対する世界からの関心の高さをうかがい知るとともに、プロジェクトのアピールを行うことができた。また基礎から応用まで一貫して研究開発を進めているのはRITE水素製造プロジェクトのみであり、引き続き世界をリードしていく責務を再認識した。

### Visions and Strategies

・G. D. Rambach (Desert Research Institute, USA) は、質の高い風力があり隔離された地域では、風力発電→水分解→水素→燃料電池を組み合わせたシステムが有望であることを提唱した。たとえばアラスカ州のような人口が数百人、数千人のコミュニティでは、エネルギー源として水素が効率的であることを提案した。

### International and National Programs and Projects

・E. Spinadel (Buenos Aires University, Argentina) はコスト試算の結果から、 $10\text{ m/s}$  の風速があれば、パタゴニア地方の風力発電で水を電気分解し、南アフリカや極東地域に液体水素をエネルギーとして輸送できると発言した。パタゴニアの風力利用に関しては、実際に 2 つの企業が興味を示しているそうである。他の講演で南極の風力を利用するという構想があったが、南極のような極寒地で働く風力タービンがあるかとの質問に対しては、ドイツ製のタービンが使用できるのではとの回答があった。

・B. De You (China Association for Hydrogen Energy, P. R. China) は中国における燃料電池バスProjectについて紹介した。演者は 2000 年に北京で開催される第 13 回世界水素エネルギー会議の事務局を務めることになっている。

・H. Gretz (Germany) はアイスランドとドイツとの共同Projectについて紹介した。その内容は、アイスランドの水力発電から製造した水素をハンブルグに輸送し、バン型の乗用車の燃料として使用するというものである。

・C. Bailey (Enron International, USA) が、Hydrogen Technical Advisory Panel (HTAP) の活動について紹介した。HTAPは、米国政府の水素エネルギー政

策について、DOE長官に対し提言する委員会である。平成7年の9月にハワイにて開催されたHTAP MeetingにRITE水素製造プロジェクトもオブザーバーとして参加しており、その活動についてはよく知られている。

・K. Matthes (Germany) はMunich、Erlangen、Nurnbergにある3つのバス会社の協力を得て、公共交通機関に導入された液体水素バスの運転状況につき報告した。液体水素バスを通常のバスと色分けしたところ、乗客の拒絶反応は全く見られず、むしろ騒音の低さ、乗り心地の良さなどから好まれる傾向が見いだされた。

#### Technologies of Hydrogen Production

・M. Steinberg (Brookhaven National Laboratory, USA) はCO<sub>2</sub>を削減するための天然ガスの脱炭素と水素生産技術について概説した。Steam reforming of methane (SRM) とThermal decomposition of methane (TDM) の比較を行い、それぞれの技術の長所、短所を明らかにした。

・S. Roychowdhury (PACE University, USA) は下水汚泥からの水素生産について発表した。下水汚泥の通常の嫌気発酵では、メタン生成菌の働きでメタンとCO<sub>2</sub>が生成されるが、演者らは系に電極からの低電圧を作用させることにより、メタン発酵を抑制し水素とCO<sub>2</sub>を主成分とするガスが発生することを見いだした。水素の生成メカニズムに関しては、嫌気発酵で生成した有機酸が電気分解することにより、水素とCO<sub>2</sub>に分解されるものと推測している。演者は発表の最後に「都市下水を与えてくれればいくらでも水素を生産してみせる」と豪語していた。演者は2年前のシュツットガルトの学会でも同じテーマで発表していたが、スケールアップやメカニズムの解明など更なる研究開発が必要であると感じた。以下のような質疑があった。

(Q) いつも加電しているのか？

(A) サイクルで定期的に電荷を与えており、いつも加電しているわけではない。

(Q) 炭水化物の生成はあったか？

(A) なかった。

(Q) CO<sub>2</sub>の発生が完全に抑制されている表が示されたが本当か？

(A) 系全体では必ずCO<sub>2</sub>は発生する。

#### Hydrogen from Fossil Fuels

・S. Lynum (Kvaerner Oil & Gas, Norway) は風力発電からの水素生産、化石燃

料からの水素生産 (CB&H Process)、バイオマスからの水素生産 (PyroArc Process) の3種をミックスした水素エネルギーサイクルを提唱し、このサイクルが環境調和性を持つことを強調した。

#### Biological Hydrogen Production

- ・プログラムによると、J. R. Benemann (USA) が “Feasibility Analysis of Photobiological Hydrogen Production” というタイトルで講演するはずであったが、本人が会議に参加しておらずキャンセルされた。

- ・B. Gaudernack (Institute for Energy Technology, Norway) は、IEA水素プログラム Annex 10 (Photoproduction of Hydrogen) の活動内容を紹介した。

Photobiological Hydrogen ProductionはSubtask Bに相当するが、現在の活動は本年10月に終わり、新たなAnnexとして活動を開始する見込みであることが紹介された。

- ・P. Lindblad (Uppsala University, Sweden) は、シアノバクテリアNostoc PCC 73102株のuptakeヒドロゲナーゼの遺伝的ならびに生理学的解析の結果について報告した。

- ・N. Holle (Institut fuer Verfahrenstechnik, Germany) は基質として乳酸、光合成細菌としてRhodospirillum rubrumを用い、縦型の平板型リアクタで屋外での連続水素生産を試みた結果について報告した。リアクタ設置面積 $1\text{ m}^2$ 、リアクタの総表面積 $8\text{ m}^2$ の条件で、 $40\text{ L/m}^2\cdot\text{day}$ の水素生産、光エネルギー変換効率として2%を達成したと報告した。さらにこの結果に基づき、100倍の容量のリアクタ (設置面積 $100\text{ m}^2$ 、総表面積 $800\text{ m}^2$ ) を想定し、水素生産コストに関するFSを実施した結果について発表した。セッション終了後の意見交換では、演者は化学工学を専門としており、あくまでも化学工学の立場からバイオ水素生産の向上を目指したいとの話であった。また、RITE水素製造プロジェクトの今後に非常に興味を持っており、共同研究ができないかとの打診があった。

#### Round Table Discussion

- ・ “Hydrogen Oil & Gas” というタイトルで、Round Table Discussionが行われた。C. J. Winterが総合司会、G. Mosconi (Instituto Argentino de la Energia, Argentina) がRound Tableの司会、他にT. N. Veziroglu (President, IAHE)、N. Rossmeissl、S. Weinerを初め6人のパネリストが参加した。パネリストから

は以下のような提言がなされた。宇宙でのエネルギーの利用を考えると、化石燃料由来の水素エネルギーと原子力エネルギーとの融合が必要になるであろう。よりクリーンな燃料としてのHythane (20% Hydrogen + 80% Methane) の更なる導入を考えなければならない。これからは石油と天然ガスと水素の競合が考えられ、水素の供給が増えれば水素はもっと使われるようになるのではないか。石油会社は石油が枯渇したときの次のビジネスを考えているはずであり、その戦略を知りたい。

## 6. まとめと感想 (北島)

- ・今回、アルゼンチンのブエノスアイレスにて水素エネルギーに関する国際会議が開催され、RITEからの海外派遣依頼を受けて6月19日～29日に出張調査が行われた。

- ・水素エネルギーの研究は地球温暖化防止にも関わる代替エネルギー研究として、各国様々な研究機関の報告があった。全体としては3つの流れに大別されるものと思われる。

- (1). 何かのエネルギーから水素を造る研究：代替エネルギーの研究として自然エネルギーの活用が主目的である。風力・太陽光・廃水等からエネルギーの貯蔵物質として水素を造っている。将来技術としての政策宣伝的な性格が強い。

- (2). 水素－電気変換関連の化学触媒研究：電解により水素を造る研究と、水素から電気を起こす燃料電池の心臓部としての研究がある。最も学術的な基礎研究としての面が強く、触媒化学者が多数参加していた。

- (3). 水素の効率的な利用研究：水素自動車のように、水素を実社会にどう役立てていくかの開発主体の発表。

この三分野はそれぞれが全く異なる独立した学会規模の研究テーマを有している。この国際会議ではそれぞれの分野の専門家が垣根を越えて一堂に会することで、今後も持続可能な高度技術社会を維持するための方向を考えており、水素を軸とした異分野交流としての意義は大きいものと思われる。

- ・RITE水素製造プロジェクトからの発表者は、(1). の自然エネルギー活用のために微生物を触媒とした水素生産の研究を発表した。

・Biological Hydrogen Productionに関する北島の発表では、屋外実験による水素生産予測解析について報告した。キューバの製糖産業研究者（Antonio Valdes Delgadoの関係者）より廃水処理の実用化に関する質問を受けた。地表面積当たりの廃水処理量を上げるため水深のあるリアクタを用いると、逆に水素生産が急落することを水素収支を用いて説明を行った。さらに海外の研究例にしても、培養条件の設定が不十分なために、屋内での小規模培養で得られた高効率実験データが、屋外での大量培養時には再現されないことを予想した。したがって、他の海外研究グループにおいても培養条件を再検討すれば今後に効率向上の可能性を期待できるものと思われた。ただし、今回の国際会議では微生物関連の報告者は少なく、そうした中でM. Modigell & N.

Holleの発表では、屋外型の水素生産バイオリアクタで我々と同じく縦置き薄層平板型の報告がなされていたのは内容的にも興味深かった。

以上

# 海外調査報告書

欧州技術調査（国際光合成会議）

地球環境産業技術研究機構  
CO<sub>2</sub>固定化等プロジェクト室  
環境調和型水素製造プロジェクト

## ブタペスト技術調査報告書

### 1. 調査目的

8月にハンガリー、ブタペストにて開催される第11回光合成国際会議に参加し、ポスター発表を行い、生物的水素製造技術に関する研究開発動向について調査するとともに、意見交換・討論を通じて関連情報の収集を行う。

### 2. 調査概要

#### (1) 調査期間

平成10年8月16日(日)～8月24日(月) (9日間)

#### (2) 調査項目

第11回光合成国際会議への参加

場所：ブタペスト経済大学

#### (3) 調査参加者

若山 樹 研究員(エネ研分室)

Khatipov Emir 研究員(エネ研分室)

中田 栄寿 研究員(富士電分室)

#### (4) 調査日程

8 / 16 (日) 成田発→ブタペスト着  
17 (月) 第11回光合成国際会議  
18 (火) 第11回光合成国際会議  
19 (水) 第11回光合成国際会議  
20 (木) 第11回光合成国際会議  
21 (金) 第11回光合成国際会議  
22 (土) 第11回光合成国際会議  
23 (日) ブタペスト発→  
24 (月) 成田着

### 3. 調査結果のまとめ

#### 1) 第11回光合成会議

##### (1) 緒言

光合成国際会議 (International Congress on Photosynthesis) は International Society of Photosynthesis Research が主催し、3 年毎に世界各地で開催される国際会議である。その名が示すように光合成微生物を対象としており、光合成や代謝の機構解明や遺伝育種などの基礎的な研究から、酵素反応による物質生産や培養技術などの応用研究に至るまで発表内容は多岐にわたる。

第 11 回目となる今回は、ハンガリーの首都ブタペストで開催された。会場となったブタペスト経済大学は、ドナウ河のほとりに位置し、かつては税関として使用されていた歴史的な建造物であった。発表件数は約 1,300 (43 カ国) であり、PLENARY LECTURES、SYMPOSIA and DISCUSSION SESSIONS、POSTER SESSIONS のいずれかの形式で発表が行われた。開催時期が夏季休暇と重なるため学生の参加も多く、年齢を問わず盛んに討議を行なう光景が会場のあちこちで見うけられた。

今回 RITE の調査メンバーとして参加した 3 名は、情報収集を行なう一方で、POSTER SESSIONS において各人の研究成果を発表した。なお複数の会場で発表が行われるため、それぞれ分担して情報収集を行った。

##### (2) 日時

平成 10 年 8 月 16 日～8 月 24 日 (9 日間)

##### (3) 参加者

若山 樹 研究員 (エネ研分室)

Khatipov Emir 研究員 (エネ研分室)

中田 栄寿 研究員 (富士電分室)

##### (4) 会議報告

今回の学会で報告された注目すべき発表について以下に列記する。

## ①PLENARY LECTURES

### PL3

#### **The oceanic photosynthetic engine: origins, evolution, and role in global biogeochemical cycles**

(Falkowski P. G.)

Falkowski博士は、水系内における光合成の最新の研究成果について報告した。海洋における酸素発生は、微量成分である金属に影響される。海洋中の鉄（光合成の電子伝達に必須な金属）の濃度は低い、銅やモリブデンは比較的豊富に存在する。こういった状況が、今日の海洋を特徴づけているといえる。現在の海洋は、分類学上12分類される植物性プランクトンが、年間約 $45 \times 10^{15}$  gの炭素フラックスを支えている。このフラックスは地球の光合成生産物のおよそ半分である。窒素固定が鉄によって制限されていることから、海洋における炭素固定は、大局的には無機窒素の固定によって制限されていると見ることができる。本発表では、海洋における鉄源は地面からの流入だけであり、おもに砂漠が中心であることが報告された。

(Khatipov)

### PL4

#### **Light induced structural changes in bacterial RCs and their relevance to protonation and electron transfer kinetics**

(Feher G.)

Feher（主要光合成反応における分子のメカニズムに関する研究開拓者の一人）は、彼の研究室の最近の研究成果を纏めて発表した。反応中心（リアクションセンター、RC）が荷電分離の間、一定の変化を受けることが、長い間仮定されてきている。そこで、Feherらはブレ照射したRCと照射しないRCの電子伝達速度を測ることで、電荷分離の変化の解明を試みた。現在までに確立した測定技術が無かったため、この反応の測定に成功したものはいなかった。しかし、Feher博士と共同研究者達は、最近その測定に成功した。成功の鍵は、凍結したRCに光を照射したり暗条件にすることであった。RCsを凍結下照射したとき、QAからQBへの電子伝達速度が数桁の単位で増加した。RCの結晶化という大研究は二つの研究所で行われ、構造決定とその変化が検討された。我々が用いている、*Rhodobacter sphaeroides*のRCs中の光依存する構造上の再配置に関する最初の報告であることに興味を抱いた。

(若山)

## PL11

### **Genome analysis of a cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803**

(Tabata S.)

*Synechocystis* sp. PCC 6803のゲノムの全シーケンスが解析された。3,168のタンパクをコードする遺伝子が明らかになり、これらの情報はインターネットを通じて閲覧、利用することができる。これらの情報を用いることで、ワイルドレベルにおける遺伝子機能や制御系を研究するための新たなアプローチが可能となった。系統的な遺伝子変異プロジェクト (CyanoMutants、[<http://www.kazusa.or.jp/cyano/mutants/>]) が、日本の研究団体で進行している。異なる培養条件、あるいはいくつかの育種改良株の、菌体内の全mRNAをプローブとしたハイブリダイゼーション実験は、遺伝子の発現や制御をモニターするのによく用いられる手法である。インターネットで公表された完全なシーケンスデータを利用することで、ラン藻の光合成機構の理解が加速されることが考えられる。(Khatipov)

## ② [SYMPOSIA 1-2] Structure and functions of antenna complexes

### SY1-2-P13

**The role of bacteriochlorophyll *e* and carotenoids in light-harvesting complexes in brown-colored green sulfur bacteria** (Cox R. P., Miller M., Aschenbrucker J., Macpherson A., Gillbro T.)

褐色の緑色イオウ細菌である *Chlorobium phaeobacteroides* はバクテリオクロロフィル *e* とカロチノイドを有し、500nm 近辺の光を利用する点で、通常の緑色細菌と一線を画している。バクテリオクロロフィル *e* を単離し、吸収スペクトルを測定したところ 520nm にショルダーが見られた。またこの株の集光色素タンパク複合体にはカロチノイドが含まれなかった。したがって、このバクテリオクロロフィル *e* が 520nm 付近の光の利用に関与していることが分かった。

我々が水素生産に用いている紅色非イオウ細菌は、バクテリオクロロフィル *e* を持たず、カロチノイドで 500nm 付近の光を吸収するとされている。太陽光には 500nm 付近の光が多く含まれる。そこで紅色非イオウ細菌にバクテリオクロロフィル *e* を遺伝子操作技術で導入し、発現させることができれば、これらの波長の光を効率よくエネルギーに変換することができるのではないかと考えた。これについて発表者に質問したところ、次のような回答を頂いた。① 紅色非イオウ細菌内でもバ

クテリオクロロフィル e が集光色素として機能すると予想できる。②しかしカロチノイドとバクテリオクロロフィル e のどちらが光エネルギー伝達効率が高いか不明なため、効果については明言できない。③バクテリオクロロフィル e の遺伝情報が、まだ充分に分かっていない点も問題である。（中田）

#### **SY1-2-P106**

##### **Are the light-harvesting I complexes from *Rhodospirillum rubrum* arranged around the reaction center in a square geometry?**

(Stahlberg H., Dubochet J., Vogel H., Ghosh R.)

*Rhodospirillum rubrum* の集光色素タンパク複合体 (RC-LH 1) が単離され、2 次元の膜結晶として再構成された。これを透過型電子顕微鏡などで解析した結果、LH1 の環状構造が正方形の対称形で、正方形の結晶格子を内包していると推測された。このような集光色素タンパクの構造解析は、近年特に進展している分野である。たとえば本プロジェクトで育種された集光色素タンパク量が野生株と異なる P 3 株について、このような手法を適用することで、集光色素タンパクの構造と水素発生の関係について新たな知見が得られる可能性もあり、非常に興味深い発表であった。

（中田）

#### **③ [SYMPOSIA 4] Reaction centers II. Purple bacteria and photosystem II**

##### **SY4-P13**

##### **Site-directed mutagenesis on the c subunit of photosynthetic reaction centers of *Rps. viridis***

(Chen I., Michel H.)

*Rps. viridis* の C サブユニットは、反応中心の機能に不可欠な 4 つのヘム C タイプのチトクロム (Cyt C) で構成されており、Cyt C を欠損した *Rps. viridis* は光合成に適応できなくなることが分かっている。この Cyt C 欠損株の相補実験を行ない、*puf C* 遺伝子を導入することで光合成に適応できるようになることを確認した。そこで C サブユニットの c 末端にオリゴペプチドのタグを付加したところ、このタグのついた反応中心が *Rps. viridis* 内で安定に存在できることが分かった。また C サブユニット C264 残基を各種のアミノ酸に置換する育種を行なったところ、アルギニンからリジンに置換した株だけが光合成で増殖できることが分かった。（中田）

##### **SY4-P65**

##### **Excitation wavelength dependent spectral evolution in *Rhodobacter sphaeroides* R-26 reaction**

#### **centers at low temperatures : The Q<sub>x</sub> transition region**

(Lin S. , Jackson I. , Taguchi A. K. W. , Woodbury N. W. )

Q<sub>x</sub>遷移領域におけるR-26株の反応中心のスペクトル変化が、フェムトセカンドオーダー、15Kで測定された。これは反応中心のAまたはB端上の電荷分離サイト形成が、励起波長や励起強度に依存するかどうかを調べるために行われた。この結果、励起がバクテリオクロロフィルバンドで直接行われるときは、532および545nmの両波長が速やかに消光することが分かった。また励起強度が増加したときは、534nmに結合ピークが現れた。以上のことから、B端上の電荷分離サイトの形成の機構は、二重光子励起で進行すると考えられた。(中田)

#### **SY4-P105**

##### **Control of the redox potential of Q<sub>A</sub> in *Rb. sphaeroides* reaction centers : Site-directed mutagenesis of ILE-M265**

(Takahashi E. , Wells T. A. , Wraight C. A. )

光合成細菌の反応中心の第一キノンであるQ<sub>A</sub>のレドックス特性に、周囲のタンパクが及ぼす影響を検討するため、Q<sub>A</sub>結合サイト中のM265残基(野生株では isoleucine)をそれぞれthreonine、serine、valineに置換した育種株を取得した。threonine、またはserineに置換した育種株は、Q<sub>A</sub>のレドックス電位が100mVネガティブ方向にシフトした。この理由はthreonineやserineの水酸基の酸素と、キノン環が持つカルボニル基の酸素とが静電的に相互作用するためと考えられた。一方、valineで置換した育種株でこのようなレドックス電位のシフトが見られなかった理由は、前述の育種株に比べてユビキノンのメトキシグループが動き易くなっているためと考えられる。(中田)

#### **④ [SYMPOSIA 6] Cytochrome complexes; soluble electron transfer proteins**

##### **SY6-L1**

##### **Partition of ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase between photosynthesis and antioxidant metabolism (Carrillo N. )**

フェレドキシンNADPリダクターゼ(FNR)と名付けられた新規酵素に関する発表であった。FNRは光合成電子伝達鎖の最終ステップにおいて、還元型フェレドキシンと、NADPや二酸化炭素同化のためのNADPH生産などの間のリバーシブルな電子伝達を触媒する。FNRは光合成系の電子伝達系において重要な役割をになっている

る。また光合成細菌、すなわち*Rhodobacter*種で機能する酵素である。したがって、おそらくこれらの種における水素発生反応にも、大きく寄与しているものと考えられる。そこでCarrillo博士とこの件について討議し、水素発生という側面から共同研究することも有効ではないかとの印象を受けた。(Khatipov)

⑤ [SYMPOSIA 7] Energy transduction; ATP synthase

SY7-L2

**Proton-translocating transhydrogenase from photosynthetic bacteria**

(Jackson J. B., Quirk P. G., Cotton N. P. J., Venning J. D., Gupta S., Peake S. J., Jeeves M., Smith K. J.)

光合成細菌(*Rhodobacter*種)のプロトン移動トランスヒドロゲナーゼの構造と機能に注目した発表であった。これは膜透過性の酵素複合体であり、NADHによるNADP<sup>+</sup>の還元を進行するため、 $\Delta p$ のエネルギーを利用する。NAD(H)結合サイトのあるドメインI、およびNADP(H)との結合サイトがあるドメインIIIは、膜から突出していた。しかしドメインIIは膜上に伸びていた。組換え体から単離したドメインIおよびIIIのスペクトルデータから、レドックス媒体の介在なしに、2つの塩基間で水素化物の直接移動が起きていることが分かった。NMRスペクトルによって、ドメインIとIIIの間の相互作用に寄与するアミノ酸残基が同定された。

これまでプロトン移動トランスヒドロゲナーゼと水素発生との関係が検討されたことはない。これは、水素発生反応では還元型フェレドキシンがニトロゲナーゼのドナーとなるためであり、この酵素による寄与はほとんどないと考えられるためである。(Khatipov)

⑥ [SYMPOSIA 13] Photosynthetic genes I. Prokaryotes

SY13-L2

**Structural characterization of a major photosynthesis gene cluster from *Heliobacillus mobilis***

(Xiong J., Inoue K., Bauer C. E.)

*Heliobacterium*である*Heliobacillus mobilis*から35.7kbの光合成遺伝子クラスターが単離され、構造遺伝子(28のORFと19の光合成関連遺伝子)の同定、解析が行われた。19すべての光合成遺伝子は、密接につながっており、一方方向に転写された。RieskeFe-Sタンパク、チトクロム *b<sub>L</sub>*、サブユニットIV、*diheme*チトクロム *c*で構成

されるチトクロム *bc*複合体をコードするユニークな4サブユニット遺伝子が同定された。

*Heliobacteria*は、比較的最近発見された菌種である。これらはグラム陽性菌に分類され、進化的にたいへんユニークな特徴がある。バクテリオクロフィル *g* を保有し、明条件だけでなく暗条件においても窒素固定が可能である。さらにいくつかの株が好熱性であることが分かっている。これまでに*Heliobacterium*の水素発生能力に関する報告例はほとんどなく、Bauer博士らの今後の検討に期待したい。

(Khatipov)

### **SY13-L3**

#### **Directed mutations of orfs in purple photosynthetic bacteria reveal new photosynthesis genes**

(Beatty J. T.)

光合成遺伝子クラスター内に存在するオープンリーディングフレーム(*orf*)は、光合成系の発現において重要な遺伝子である。現在、*puf X*、*puf C*、*lha A*などの*orf*が知られている。これらの機能は、通常、最適な光合成増殖条件下において比較されるが、不明な点が多い。そこで*orf*の機能を調べるために、*orf*領域を削除した変異株が取得された。今後、これを解析することで、さまざまな情報が得られるものと考えられる。

本プロジェクトでは、育種改良の一方針として、集光色素タンパクの発現量の調節を行なっている。集光色素タンパクの発現にも、*orf*が関与している。

特に、*puf X*、*puf C*などは、我々がターゲットとしている*puf*オペロン上に存在する。演者らの研究は、集光色素タンパクの発現量を制御する新たなアイデア発見につながる可能性もあることから、非常に興味深い発表であった。(Khatipov)

### **SY13-P5**

#### **Identifying components involved in light responsive *psbA II* gene expression in**

***Synechococcus sp.* PCC 7942**

(Schmitz O., Nair U., Guillory L. J. Jr., Golden S. S.)

本発表は、ラン藻*Synechococcus sp.* PCC 7942が持つ3つの*psb A*遺伝子に関する報告であった。*psb A*は、PS IIのD1タンパクをコードする遺伝子で、光によって発現が制御されている。菌体を弱光から強光照射下に移行した場合、*psb A II*の転写活性が向上することが分かった。なお転写活性の定量には、ルシフェラーゼ遺伝子をマーカー遺伝子とした系が用いられた。(Khatipov)

⑦ [SYMPOSIA 16] Biosynthesis and assembly II. Pigments

**SY16-P9**

**The synthesis of lycopene in *Rhodobacter sphaeroides* and its functional incorporation into the photosynthetic apparatus**

(Garcia A. G., Hunter C. N.)

*Rhodobacter sphaeroides*が保有するカロチノイドは、通常スペロイデンである。演者らは、異種のカロチノイドであるリコペンを、遺伝子操作技術を用いて導入することを試みた。導入されたリコペンは、バクテリオクロロフィルに高効率でエネルギー伝達できることが分かった。

本発表は、①光合成細菌に異種色素遺伝子を導入し、発現が確認された、②異種色素の導入でエネルギー伝達の効率が向上した、という2点で興味深い。そこでそれぞれについて解説とコメントを列記する。

①については、演者らが光合成細菌の色素に関する第一線の研究者であり、スペロイデンやリコペンといった色素の遺伝学的情報を豊富に保有していたため実現できたといえる。リコペンを用いたのは、遺伝子のサイズがスペロイデンと大差ないことや、制御系が単純であったためとの説明であった。異種色素の導入や発現に成功したという報告は、集光色素タンパクの量だけでなく種類を変える育種も可能であることを示唆するものであり、貴重な情報を収集することができたと考える。

②でエネルギー伝達効率が向上した理由については、バクテリオクロロフィルが直接エネルギーを獲得している、または他の色素（スペロイデン以外のカロチノイド）がエネルギー伝達に関与しているのではないかと、といった疑問があり、発表会場周辺では活発な議論が行われた。今後、リコペンとバクテリオクロロフィルの相関関係などについて、さらに研究を行なう予定との説明であった。

(Khatipov、中田)

⑧ [SYMPOSIA 18] Metabolic pathways

**SY18-L3**

**Regulation of ammonium assimilation in cyanobacteria**

(Florencio F. J., Garcia D. M., Martin F. E., Crespo G. J. L., Navarro F., Muro-Pastor M. I., Reyes J. C.)

バクテリアのアンモニウム同化の主な代謝経路は、グルタミン酸塩 dehydrogenase (GDH) もしくはグルタミン synthetase (GS) /グルタミン酸塩 synthase (GOGAT) 経路である。NADとNADPに依存するグルタミン酸塩デヒドロゲナーゼの存在が藍色細菌の中で報告された。しかし、アンモニウムは主にGS/GOGAT経路 (GSは、アンモニウムとグルタミン酸塩からグルタミンをATP依存で合成する反応を触媒する) を通して炭素骨格に組み込まれる。窒素代謝の中のグルタミンの重要性のため、GSの酵素発現は多くの生物において確実に制御されている。一方、ここ数年間、藍色細菌の窒素同化の制御に関する報告はなかった。しかし、本発表のように、*Synechocystis* 6803株と*Anabaena* 7120株のGS-GOGAT経路の新規キャラクター化が7年間の研究の末明らかになった。6803株が、2つの異なるGS、GS<sub>I</sub>とGS<sub>III</sub>と2つのGOGATsを有していることが分かった。これらの酵素は、電子供与体としてのフェレドキシンやNADHなどに依存していた。一方、*Anabaena* 7120株は一つのGSと一つのFd-GOGATしか持っていなかった。遺伝・進化上、従属栄養細菌や光合成細菌に近縁 (上流) の藍色細菌においても厳密に制御された窒素代謝経路を持つことが分かった。(若山)

#### **SY18-P25**

##### **Fd-gogat is necessary for the integration of photosynthetic c- and n-assimilation in cyanobacterium**

(Okuhara H., Matsumura T., Fujita Y., Hase T.)

本発表は、C/N代謝のバランスにおける二つの異なるグルタミン酸塩 synthase (GOGAT) 分子構造の機能に関する検討を行っていた。GOGATの機能は、化学栄養細菌 (大腸菌など) や光合成細菌 (*Rhodobacter sphaeroides*, *Rba. capsulatus*, など) において既に明らかにされている。GOGATの生体機能上の重要性のために、GOGATは制御されたパターンの複合体を持つと思われ、窒素同化や照射条件などに依存した酵素活性の制御がなされていると思われる。ヘテロシストを持たない藍色細菌 *Plectonema boryanum* 由来の ferredoxin と NADH 依存性の GOGAT をコードする2つの遺伝子がクローニングされた。また、各々の遺伝子群を欠損した Knockout ミュータントも同じくクローニングされた。興味あることに、演者らは、Fd依存GOGATのノックアウトミュータントが、C/N代謝の不均衡に関係するフェノタイプを持つことを明らかにした。またこのノックアウトミュータントがかなり imbalanced された C/N 同化で、共通の表現型を持つ個体群を持つとわかった。それらは、十分な光

条件下、クロロフィルとフィコビリプロテイン量の減少と関係づけられるだろう。もう一方のNADH依存GOGATのノックアウトミュータントは、光強度を増加してもアンモニア同化速度の向上は観察されなかった。（若山）

⑨ [SYMPOSIA 21-22] **Whole plant and community photosynthesis; Photosynthesis and planet Earth**

**SY21-22-P3**

**Fluorescence diagnostic of iron limitation in phytoplankton**

(Behrenfeld M. J., Kolber Z. S., Falkowski P. G.)

赤道上の太平洋を除く大部分の地域で、植物プランクトンの増殖制御因子は、 $\text{NO}_3$ 、 $\text{NH}_4$ 、尿素などの生物が利用出来る形態の窒素の流束である。これは、演者によって開発された新規で非常に良い実験方法に依った。これは、海が示す蛍光強度の毎日の変化に基づく鉄制限下の評価方法である。

本発表は、Falkowski博士によってされた講義とリンクしている。Falkowski博士の調査中の地球的な研究アプローチの重要性は極めて大きい。これらの仕事は、大洋における生態系の非常に詳細かつ地球規模のエコシステムの情報を与える。また、地球規模の環境変化の情報を、視覚化して得られることで、環境の変化の予測や、原因の究明、変化への対策に貢献するものと思われる。（若山）

⑩ [SYMPOSIA 23] **Biomedical & biotechnological applications : artificial systems**

**SY23-P4**

**Regulation of polyhydroxybutyrate accumulation in *Rhodobacter sphaeroides***

(Khatipov E., Tsygankov A., Miyake M., Miyake J., Asada Y.)

光合成細菌はある条件下、アセチルCo-Aから多量のPHBを合成することが知られている。一方、光水素発生時においても、乳酸からアセチルCo-Aを経由するフラックスが存在している。また、PHBの合成が確認されている。そこで、光水素発生時におけるPHB合成を抑制することで水素の効率的生産を試みた。PHB合成酵素を欠損した株を取得する方法もあるが、我々は比較的簡易な培養条件による制御を試みた。pHを変化させて連続培養を行うことで、光水素発生とPHB合成をある程度制御できることが明らかとなった。基質を酢酸、乳酸に変化させても同様であった。また、実験期間中における細胞内のエネルギー物質の測定を行ったところ、酸化還

元バランスによって制御されている可能性が示唆されると思われるデータが得られた。

なお、ロンドン大のDr. Hall、USA（教授）のDr. AntonkineとDr. Vasilyev、ロシア（教授）のDr. Pyankov、早稲田大学のDr. 桜井、ドイツのDr. Mulendorff、ルーマニアのDr. Tugulea、などの各国の研究者からコンタクトがあり、意見や情報の交換を活発に行った。（Khatipov）

#### **SY23-P6**

##### **Localized poly-b-hydroxybutyrate accumulation in cyanobacteria**

(Miyake M., Kataoka K., Khatipov E. A., Shirai M., Kurane R., Asada Y.)

三宅正人らの発表は、PHB顆粒形成の場についてのアプローチをサマライズしたものである。藍色細菌細胞内にPHB顆粒が形成されると、チラコイド膜が破壊される現象が古くから知られている。この時、光合成活性も同様に失活する。藍色細菌のPHB合成酵素は膜結合性であり、おそらくチラコイド膜にも存在するために顆粒形成の際に物理的にチラコイド膜を破壊している可能性が生じた。光独立栄養的PHB蓄積では、光合成活性の持続は重要である。そこで、三宅らは、水素酸化細菌から分離された可溶性のPHB合成酵素を導入した藍色細菌形質転換株のPHB顆粒を分離し、野生型のPHB顆粒と比較した。形質転換株ではPHB顆粒はチラコイド膜と結合していないことが明らかになり、遺伝子工学的なPHB形成場のコントロールの可能性が示された。（若山）

#### **SY23-P7**

##### **Hydrogen production by photosynthetic bacteria: The relationship between light wavelength and hydrogen production**

(Nakada E., Nishikata S., Asada Y., Miyake J.)

光合成細菌の光水素発生速度の波長依存性を調べるため、バンドパスフィルターで分光した波長幅100nmの光を菌体に照射し、発生した水素の量子収率を算出した。この結果、500～900nmの光照射下では、水素発生速度がほとんど波長に依存しないことが分かった。なお、以下のような質疑応答があった。

Q1:水素発生速度の測定方法は、

A1:発生したガスをガラスシリンジに補集し、体積を測定する。またガスクロマトグラフで水素含有量を定量する。

Q2:集光色素タンパクの吸収波長以外の光照射下でも、水素が発生するのはなぜか。

A2:たとえば600nm付近だが、確かに800や850nmに比べて吸収は小さいが、まったく吸収がないわけではない。したがって600nm付近の光も集光色素タンパクにトラップされ、反応中心への電子移動が起きるため、水素を発生することができると思われる。

Q3:光合成活性の波長依存性は検討したことはあるか。

A3:藻類や植物であれば、光合成時における酸素の発生をモニターすることで光合成活性を調べることができる。しかし光合成細菌は水分解を行わず、また光合成従属栄養的生育をするので、光合成活性という指標で評価することはできない。嫌気明条件における増殖速度の波長依存性は調べられるが行っていない。

(中田)

#### **SY23-P10**

##### **Photopotential generation in green bacteria cells and cell fragments located in an electrochemical cell**

(Ptak A., Dudkowiak A., Frackowiak D.)

2枚の透明電極、半導体電極、または半導体電極と金属電極の間に緑藻 *Prosthecochloris aestuarii* の菌体組織を挟んだサンプルが調製され、明暗いずれかの条件でアクションスペクトルが測定された。その結果、バクテリオクロロフィルcオリゴマーが光発電に寄与していないことが明らかになった。またサンプルの分解にともない、バクテリオクロロフィルcモノマーの吸収波長に相当する675nmのアクションスペクトルが増加することが分かった。(中田)

#### **SY23-P15**

##### **Effects of light-dark cycle on photo-hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* RV**

(Wakayama T., Toriyama A., Kwasugi T., Asada Y., Miyake J.)

太陽光の照射エネルギーは強力なので、光合成細菌の光水素変換効率を低下させることを我々は既に明らかにしている。よって、過剰な太陽光を空間的もしくは時間的に分散する方法について、これまで検討を行ってきた。本発表では、光をミラーなどを用いて分散する方法の基礎として、様々な単位時間の明暗周期光を照射した場合における光合成細菌の光水素発生への効果を調べた結果をサマライズして発表した。各国の研究者からコンタクトがあった。

Q1:Prof. Seibert (NREL):光合成細菌による水素発生におけるオオソリティ

長い時間の明暗周期光を用いた実験は興味深い。なぜ、20分近傍にサブオブティ

マルがあるのか？

A1:光合成細菌の光水素発生が時間依存であることは確かと思われるが現在の処何故だかはわかっていない。細胞内ATP量を測定する事などを検討中である。

Q2:Ass. Prof. ABDEL (エジプトの大学の助教授)

水素の検出はどうして行うのか？捕集法はどうするのか？

A2:TCDのGCを用いている。細かな条件は持ち合わせていないが、カラムにはMolecular sieve 5Aを充填している。水素の捕集は水を満たして転倒したメスシリンダを用いている。

Q3:Prof. Wunschiers (マールブルグ大学)

水素発生量の評価に1/m<sup>2</sup>やE%を用いているがバイオマス当たりや菌体重量当たりの発生量は何処くらいになるのか？

A3:我々は、実際の屋外での評価を考え、設置面積や体積、照射面積当たりの評価をしている。詳細な計算結果をメールで送信する。(若山)

#### **SY23-P16**

##### **Hydrogen evolution in *Oscillatoria chalybea* : Stress effects**

(Klaus P. B. and Refat A. B.)

ヘテロシストを持たないラン藻*Oscillatoria chalybea*の光水素発生に、塩濃度が及ぼす影響が検討された。イオン系 (NaCl) と非イオン系 (マンニトール) ではどちらも水素発生を阻害したが、非イオン系の方がわずかに阻害効果の大きいことが分かった。この理由として、イオンの毒性よりむしろ水欠乏の方が影響が大きいと考えられる。(中田)

#### **⑪ [SYMPOSIA 26] Educational aspects. Undergraduate and graduate training; public awareness**

##### **SY26-L2**

##### **Photosynthesis and the world wide web**

(Govindjee)

現在、ワールド・ワイド・ウェブは、データや意見の交換の場所として非常に強力かつ便利なツールになっている。そして、この分野においても光合成にまつわる知見をサマライズする努力が続けられている。本発表は、WWWを閲覧できる多くの光合成研究者にとって、非常に面白くてとても役に立つプレゼンテーションと思

われた。

Govindjeeは、光合成関連の研究に関係している科学者のために、WWWリソースを集めて開発してきた。筆者らの研究室でオーガナイズされているWWWアドレス (<http://photoscience.la.asu.edu/photosyn>) が提示された。

また、Govindjeeのサイト (<http://www.life.uiuc.edu/govindjee/>) は役に立つリンクと絵が入っている。A. R. Croftsは、Biological Energy Transductionのコースの優秀なサイト (<http://arc-gen1.life.uiuc.edu/Bioph354>) をもっている。

すでに私も、*Rba. sphaeroides*のゲノムや性状に関する有用なサイトやリンクをインターネット上で見つけ利用している。NEDOの情報サービスのいっそうの充実が望まれる。(Khatipov)

#### (5) その他・所感

- ・ 前回の第10回会議で発表の中心だった集光色素タンパクや反応中心をコードする遺伝子の機能や制御系に関する報告（例えば*pufX*遺伝子など）は発表数が減少し、今回は菌体内のエネルギー伝達に関与するタンパクの構造や遺伝学的情報に関する報告が目立った。
- ・ 光合成微生物を用いたアプリケーションでは、これまで主要テーマであったリアクターの開発に関する発表が激減。代わりに光合成系を用いた光電変換デバイスの開発、光合成微生物による環境浄化（重金属回収など）が中心となり、この分野の発表数も増加した。
- ・ バイオ水素関連の発表では、藻類を用いたもの、またはヒドロゲナーゼによる水分解がほとんどで、光合成細菌を用いた発表はR I T Eの2件だけであった。
- ・ 会場の一部にパーソナルコンピューターが8台設置され、参加者はインターネットを通じて留守中の研究室との情報交換を自由に行なうことができた。持参し忘れたPoster用図表を電子メールで送信してもらう参加者がいるなど、コンピューターネットワークの目覚しい進展を実感した。国際学会そのものが、コンピューターネットワークを利用したオンライン会議といった形式に変わっていく日もそう遠くないと感じた。

#### (6) 添付資料

なし

# 海外調査報告書

欧州技術調査（温暖化ガス抑制技術国際会議ほか）

地球環境産業技術研究機構  
CO<sub>2</sub>固定化等プロジェクト室  
環境調和型水素製造プロジェクト

### 3 調査結果のまとめ

#### 3.1 GHGT-4 (第4回 Greenhouse Gas Control Technologies 国際会議)

##### (1) 緒言

本国際会議は、第1回1992年オランダ・アムステルダム、第2回1994年京都、第3回1996年アメリカ・ボストンに続き、今回第4回目がスイス・インターラーケンで開催された。

約49カ国、530人が参加し、地球温暖化問題への関心の高さ、研究の活発さが世界各国に共通していることが現れていた。全体で236件（オーラル：178件、ポスター：58件）の論文発表が、下記の12分野、20セッションに分かれて発表された。

- a. Plenary Session
- b. Capture (I, II)
- c. Storage (Storage-General, Storage-Ocean, Storage-Geology)
- d. Chemistry
- e. Policy (I, II)
- f. Energy Technologies (I, II)
- g. Energy Efficiency
- h. Other GHG (I, II)
- i. Economy and LCA
- j. Transport and Industry
- k. Bioenergy and Forestry
- l. Renewable and Nuclear

日本からは、オーラル30件、ポスター20件の発表があり、我々RITE水素プロジェクトからは次の2件の発表を行った。

- a. K. Aoyama et. al.; Carbon Dioxide Utilization and Hydrogen Production by Photosynthetic Microorganisms
- b. S. Otsuka et. al.; Biological Hydrogen Production as an Environmentally Friendly Technology

##### (2) 日時

平成10年8月30日～9月2日

##### (3) 参加者

大塚 誠治 技術部長  
服部 達雄 主任研究員  
青山 勝博 主任研究員

#### (4)会議報告

##### a. オープニングセッション

組織委員長 Dr. Baldur Eliasson から、今回は二酸化炭素に限定せず、すべての温室効果ガスを対象とし、技術からだけでなく政治、経済からも議論し、地球温暖化抑制のための実効ある対策を見つけ出そうとする姿勢が明らかにされた。

Dr. Philippe, Roch (スイス) は、スイスが2000年までに二酸化炭素の排出量を1990年のレベルに、また2012年までにはさらに8%の削減をしなければならないことを言及した。そのためスイスでは既に、大気、エネルギー、輸送、農業などの各分野で、各種の政策（例えば、エネルギー分野では‘Energy 2000’、農業では‘Agriculture 2002’など）を実施し温室効果ガスの削減に取り組んでいることを報告した。

Dr. Meinrad Eberle (スイス) は、シェルと WEC の気候変動シナリオを比較すると、京都会議の結果と UNFCCC の結果で500ppm まで二酸化炭素濃度が上昇することを予測し、今後クリーンエネルギーの使用が必要となってくることを説いた。その際クリーンエネルギーとして考えられるものは、核エネルギーと再生可能なエネルギーが挙げられること、また京都会議での途上国の参加意義について見直しが今後の会議では必要となってくると述べた。さらには、2050年までには一般家庭において2kW の社会が実現するであろうとコメントしていた。最後に地球環境問題に対する取り組みでは、各国間のコラボレーションが必要であり、例えば、スイスではコロンビアと、またベルギーとオランダとの間でも国際協力が実施されている旨が紹介された。さらに今後注目される技術として、太陽光からの水素の生成と燃料電池自動車を取り上げていた。

茅陽一 RITE 研究所長 (日本) の講演では、工業、家庭、運搬の3面から二酸化炭素放出量の増加について削減の方法について解析した。工業面では企業の場合、政府の要請があれば二酸化炭素の放出量を抑制すると考えられること（この分野は1976～1996年まで大きく変化していないことも併せて言及した）、家庭面は、人々がより快適な生活 (Home Appliance) を求めてきたため、二酸化炭素の放出量は増加したこと、運搬面では、人々がより大きな車・重い車を求めてきたため、他の2面に比べて最も二酸化炭素の放出量が増加したことを説明し、結論として二酸化炭素放出の削減には、次の4項目（・現状維持に努める。・原子力の使用量を増加させる。・二酸化炭素放出を抑制した自動車を生産する。・Greenhouse Gas を放出しない新エネルギーを導入する。）について検討する必要がある、それによって1990年レベルの二酸化炭素放出量に抑制できるであろうとまとめた。

##### b. STORAGE - OCEAN

###### ① Ocean Sequestration of CO<sub>2</sub> - An Overview

Howard J. Herzog (アメリカ)

演者は、このセッションのオープニングとして二酸化炭素の海洋隔離について、基礎研究の分野での環境面に与えるインパクトや、二酸化炭素の様々な注入方法や運搬方法の海洋隔離効果について総括を行った。

② Enhanced Ocean Biological Pump in High-Nutrient Low Chlorophyll Water to Increase Ocean Storage - Potential and Effects in Subarctic Waters

C. S. Wong (カナダ) and R. J. Matear (オーストラリア)

海洋に存在する肥沃な鉄が、生物で分解しきれなかった余剰の無機栄養源（窒素・ケイ素・リン）と相まって、さらに生物により様々なプロセスを経て、海面付近の二酸化炭素を深層水に貯めることができ得ることを発表した。鉄堆積物により、北極・南極両圏での深層水への二酸化炭素貯蔵効果についてシミュレーションを行った。

③ An International Experiment on Ocean Sequestration

Eric Adams, et al.

日本とノルウェーとアメリカは二酸化炭素の海洋隔離についての国際協力について調印をしている。このプロジェクトは2002年まで続き、日本は RITE、ノルウェーは Norwegian Institute for Water Research、アメリカは MIT が中心となって構成されている。研究実施場所はハワイの Pacific International Center for High Technology Research が選ばれた。当面の課題としては、ハワイというロケーションの適正について、500m 以下の深海への二酸化炭素の投棄について、二酸化炭素を放出する深度、放出量、放出に要する時間について、どのような機器を使って測定（モニター）するかについてを調査・検討することになった。

④ Ocean Injection of CO<sub>2</sub> off the Coast of Norway - A Case Study

Helge Drange, et al. (ノルウェー)

二酸化炭素の海洋貯蔵は大気中の二酸化炭素を急速に削減するための一つの有効な方法と考えられる。ここでは、ノルウェーにおける地球物理学と経済学の観点からの実行可能性調査を報告する。二酸化炭素放出深度を350~950m、二酸化炭素放出量（1年当たり）200,000 t ~ 800,000 t の間で検討を行っている。深海での二酸化炭素の急速な放流を防ぐためには、二酸化炭素放出深度で800m 以上必要なことがわかった。放出された二酸化炭素の滞留時間は長く、数百年以上滞留しているであろうと考えられる。二酸化炭素の放出に要する総コストは決して高いものではない。

c. STORAGE - GEOLOGY

① Geological Sequestration and Biogeochemical Recycling of Carbon Dioxide in Aquifers

Hitoshi Koide (日本)

世界の帯水層は、 $3 \times 10^{12}$ 以上の二酸化炭素を貯蔵できる容量があるといわれている。石油探索の掘削は一年間に7,000 t の二酸化炭素を22年間以上に渡って日本の周りの帯水層ですら貯蔵することができるといわれている。発電所の排気ガスから分離

して得られる、推定年間7,000 tの二酸化炭素は、単位炭素量当たり1,200円の炭素税に匹敵し、年間 $4.2 \times 10^{11}$ 円のコストとなり、日本で発生される総二酸化炭素放出量の6%に当たる。二酸化炭素を注入することによって得られる、化石燃料の地下水に溶解しているメタンは、純度の低い天然ガス源として利用可能であることがわかった。

ここで、CO<sub>2</sub>海洋隔離プロジェクトについてまとめると、以下のようになる。

(CO<sub>2</sub>放流点周辺域の環境影響予測技術の開発)

#### イ.目的

CO<sub>2</sub>の放流点周辺域における海洋及び海洋生物への環境影響を予測する手法の開発を行う。

#### ロ.研究期間

1997年より5年間の予定で研究開発を実施する。

#### ハ.研究開発内容

- .液体CO<sub>2</sub>の放流時挙動の解明
- .海洋中層へのCO<sub>2</sub>の送り込み希釈技術の研究
- .海洋生物へのCO<sub>2</sub>影響室内実験
- .CO<sub>2</sub>放流点周辺域環境影響モデル開発
- .CTIの枠組みの中で、実海域でCO<sub>2</sub>放流実験を国際共同にて実施
- .研究支援調査（国内外研究動向調査等と海洋隔離に関する全体システムの検討）

#### d. CHEMISTRY

##### ① Analysis of Practical Application of Photosynthetic CO<sub>2</sub> Fixation / Conversion Technologies by Microalgae

Yoshitomo Watanabe（日本）

電中研の渡辺博士は、ロンドン大でも実施していたチューブを利用した逆円錐タイプのリアクター（Helical Tubular Photobioreactor）を用いて微細藻類の培養を行い、光合成反応を利用した二酸化炭素の固定効果について発表した。光合成反応を利用した二酸化炭素の固定の場合、穀物と微細藻類が考えられるが、両者について二酸化炭素のみならず、一酸化窒素、メタンも含めた温室効果ガス削減効果（GHG emission）について言及した。その結果、二酸化炭素だけを考えた場合は微細藻類の方が固定効果が高かったが、その他の温室効果ガスも含めると穀物の方が削減効果が高いことがわかった。また、併せて微細藻類を用いて二酸化炭素を固定した際に必要となる集菌時のエネルギーを算出していた。その結果必要となるエネルギーの多い順に、スプレードライ、遠心、フィルター濾過であった。また微細藻類等を用いて二酸化炭素を固定した場合は、如何にこの微細藻類に付加価値を付けるかが重要な課題であった。

##### ② Carbon Dioxide Utilization and Hydrogen Production by Photosynthetic Microorganisms

Katsuhiro Aoyama et al.（日本）

生物の光合成反応を用いて二酸化炭素を固定し、水素ガスを生産する研究に関して発表を行った。さらに得られた水素は燃料電池に供給し発電を行った。詳細は光合成微生物の藻類に、明条件下で二酸化炭素を固定してグリコーゲンに変換し、これを嫌気暗条件下で水素と有機酸に分解し、有機酸はさらに光合成細菌により水素まで変換する。得られた水素は回収し直接燃料電池に供給して発電するシステムであった。光合成細菌による水素生産では、発生する気体の約80%が水素で、残り20%が二酸化炭素である。従って得られるガスは直接燃料電池に供給できる。また演者らは、藻類で二酸化炭素を固定してグリコーゲンを効率的に蓄積させる方法について検討したり、嫌気暗下での発酵条件を検討することにより、得られる有機酸の量・成分を光合成細菌による水素生産に適したものに交換させていた。

## c. BIOENERGY AND FORESTRY

### ① Biological Processes for Mitigation of Greenhouse Gases

John Benemann (アメリカ)

生物による二酸化炭素固定の最良の方法に光合成の利用が考えられる。二酸化炭素放出量の削減の最も最良の方法は化石燃料をバイオマス燃料に転換することである。バイオマス燃料は、農業や林業の副産物として得られる。今日、太陽エネルギーの光合成変換の最大値は2~3%で、この値はサトウキビや微細藻類で得られたものである。最近のカリフォルニア大学、バークリー校での研究で、アンテナクロロフィルの発現量を低下させた微細藻類では強光化でも高い光エネルギー変換効率を示すものが得られた。また、強大なバイオマスのプランテーションについても、海洋でのジャイアントケルプ農場などは、もはや現実的なものではないと言及していた。バイオ燃料の生産は、それ単独ではなく農業・林業・酪農などの周辺領域の産業とその利用・変換が必要不可欠である。さらに木質系バイオマスや穀物などを熱的もしくは化学的変換してオイル成分やアルコールに変え、バイオマスの燃料として用いる技術も同時並行で検討する必要があると述べていた。

### ② Carbon Sequestration in an Arid Environment of Western Australia by Afforestation

K. Yamada, et al. (日本)

乾燥地帯の植物が関係しているバイオマスや二酸化炭素の固定に関するデータは、現在ほとんど得られていない。通常の灌木の乾燥重量は161~860g であるが、アカシア、ユーカリ、コバノブラッシノキの3種類の灌木の根は、高さ1m 位のもので1.45 kg から高さ5.7m のもので379.5kg にもなる。灌木では根の重量は、通常全体の17~25%を占めるが、上記3種類の木では21~30%を占める。植生を観察して作成した帯状の標本から、四季を通じてその種類、大きさ、分布について調べられた。この結果、3種類の木は一種のコミュニティーをつくっていることがわかった。また各々のサンプルは、その炭素含有量と生育年数が調べられ、立っている木で乾燥重量で 1 ha あ

たり600kg～82tを占め、炭素量にして4.3tにのぼることがわかった。

### ③ Efficient Electricity Production from Biomass Using the Integrated Pyrolysis Combined Cycle Concept

Christian Roy, et al. (カナダ)

バイオマスの直接燃焼と IPCC の比較について述べられた。IPCC の方が、1 t 当たりのバイオマスで比較すると電力にして18～30%多く得られる。この増加分は、バイオマスをオイル、ガス、石炭に変換する部分で Pyrocycling Vacuum Pyrolysis を使用した点とバイオオイルのコンバインドサイクルを実現できた点にある。ここでは、木炭の燃焼はスチームボイラーを用いて行った。IPCC システムではバイオマスは50%の水分を含む。本プロセスからは熱エネルギーがあり余るほど得られるので、バイオマス原料を乾燥するために、さらなる熱エネルギーを投入してやる必要はない利点があった。このとき空気乾燥のバイオマス（15%水分を含む）は、リアクターに3,500kg/hで投入され、温度450℃、圧力15kPaで熱分解され、得られたオイルはガスタービンで燃焼され HRSG に供給される。これらの全てのエネルギーは40%の効率で燃焼サイクルに供給され、3.7MWe の電力が得られた。一方余剰のエネルギーは熱源として使用されるとともに、濃縮されていないガスは熱分解プロセスに必要なエネルギーの60%を賄えた。さらにウッドオイルの一部で残り40%のエネルギーを賄えた結果、本システムの全電力生産量は6.3MWe 得られた。本システムはカナダで1998年～1999年にかけて3.5t/hの規模で実施されている。

## f. ポスターセッション

### ① Biological Hydrogen Production as an Environmentally Friendly Technology

Seiji Otsuka, et al. (日本)

水素プロジェクトの概要と現在までの成果について発表した。微生物による水素生産は、原料として水（生物的分解）と有機物（暗発酵と明発酵）を用い、化石燃料の消費を伴わないで大気中の二酸化炭素を循環するだけなので二酸化炭素排出抑制に貢献できる技術である。RITE の水素プロジェクトは1991年から始まり、基礎研究とエンジニアリング技術の開発の大きな二つの柱からなる。基礎研究の分野では、遺伝子操作技術を駆使して光合成微生物の水素生産能力を劇的に増強させることに取り組んでおり、エンジニアリング分野では、水素生産のプロセスや原料有機物・排水の調製を改良・発展させる取り組みを行っている。現在までの特筆すべき成果としては、嫌気性微生物による暗発酵では1モル当たりのグルコースから2.4モルの水素が得られたことと、光合成細菌での光エネルギー変換効率が2%の値を示したことであった。

### ② Can Microalgal Biotechnology be Used to Reduce the CO<sub>2</sub> Atmospheric Burden?

F. H. Mohn, et al. (ドイツ)

ここ100年での二酸化炭素の増加が地球温暖化効果に大きく影響を与えてきた。微細藻類の生産性は、0.2～0.4t/day/ha（1年に70～130t/ha）で、これを二酸化炭素の固

定能力に置き換えると0.4~0.7t/day/ha（1年に140~260t/ha）となり、高等植物の二酸化炭素固定能より高いことがわかる。これらの研究は、国際的には日本とドイツで盛んであった。演者らは、中央ヨーロッパでの300MW クラスの石炭火力発電所からの排ガス中の二酸化炭素を固定することに関して、フィジビリティースタディーを行った。総合システムとしては、排ガス中の二酸化炭素で微細藻類の培養を行い、培養藻類は発電所の燃料として再利用するもので、全体として二酸化炭素の閉鎖系を構築している。今後本システムの課題としては、

- イ. 中央ヨーロッパが微細藻類の生育に適さない気候であることから、広大な敷地面積が必要になること。オープンポンドでの最適な光条件下での培養では、生産量は0.2 t/day/ha（1年では73t/ha である。300MW クラスの石炭火力発電所からの二酸化炭素を固定するには、100km<sup>2</sup>の敷地が必要になる。この値は夜間での二酸化炭素を固定していることになっているので、この点を補正すると敷地は200km<sup>2</sup>必要になることになる。
- ロ. 二酸化炭素を集めて、微細藻類に供給するためや、培養後の微細藻類を利用する際に資金とエネルギーが必要になる。
- ハ. 広大な培養池のメンテナンスとコンタミを防ぐための労力が必要となる。

現況においては、以上のような課題から、中央ヨーロッパでの微細藻類を用いた二酸化炭素の固定は初期投資やランニングコストが高いため成立しないとの結論に至った。

しかしながら、今後バイオリアクターの進展や微細藻類の培養に適した環境条件（立地条件など）を整えること、また微細藻類で付加価値の高い物を生産できるようになれば、コスト面での問題が解決し、微細藻類を用いた二酸化炭素の固定方法が実現可能と推測していた。

### ③ Impacts of High Concentration of CO<sub>2</sub> on Deep-Sea Marine Organisms; A Modification of CO<sub>2</sub> Ocean Sequestration

Kazuhisa Takeuchi, et al.（日本）

高濃度の二酸化炭素が深海に投棄された場合、その近辺の生物層に与える影響について、線虫や微生物の増殖を調べることによって評価していた。線虫は深海の生態系において最も豊富に存在する後生動物であり、微生物は様々な物を分解し、食物連鎖の最底辺に位置するため研究材料として取り扱った。線虫は深海の沈殿物を耐圧容器に海水と共に入れ、二酸化炭素を添加して圧力を掛けて培養した。生育は CCD カメラで観察した。高圧にして行くに従って線虫は徐々に死に、培養液の pH が5.5~6の間では、ほとんどの線虫が1時間以内に死滅した。高圧の条件下で線虫を長い間生存させるには、培地組成を改良することが必要であるとわかった。また、深海水から分離した微生物について二酸化炭素の影響を次のようにして調べた。微生物は貧栄養の合成海水培地で培養し、高圧かつ低温条件で二酸化炭素を添加した。培養液を寒天培

地に移して72時間培養し、生育してきたコロニーを数えた。pH が5～6の間で、深海微生物の生育は影響を受けた。深海への二酸化炭素投棄が、そこに生育する生物に与える影響は pH の変化を十分に考慮する必要があることがわかった。

#### (5) その他・所感

オーラルセッションでは、"Chemistry"のセッションで発表したため、同セッションには二酸化炭素を水素と共に反応させ、メタノール等に変換させる報告が多かった。これらの発表は、何れも水素を何処から持ってくるかについて議論されている報告は少なかった。このような状況下、我々の水素プロジェクトの発表は、二酸化炭素の排出は抑制しつつ水素を生産するという観点から、多くの人に非常に興味を持ってもらえた。やはり水素はエネルギーの利用としてのみならず、二酸化炭素の固定に際して必要な化合物であることは再認識できた。従って、今後は環境に優しく如何に安価に水素を製造できるかが問題であると痛感した。水素以外の観点からは、生物、特に藻類による二酸化炭素の固定では、基本的には菌体増加分の炭素源は二酸化炭素由来である。従って単位面積当たりまたは一菌体がどれだけ二酸化炭素を固定できるかが興味の点で、生物の持つ最大の利点である、トータルの系として二酸化炭素は循環しているだけで、化石燃料の由来の二酸化炭素を放出していない点を十分理解できたとは感じられなかった。

ポスターセッションでは、本会議の多くの参加者のバックグラウンドが化学であるため、生物を用いた二酸化炭素の固定は多くの人の興味を引いた。スロバキア共和国の Associated Professor、Dr. Marcela Morvova (Comenius University Bratislava) からは、使用している微生物の種類や培養方法について質問を受け、生物により NO<sub>x</sub> や SO<sub>x</sub> を固定できないかについて議論した。ドイツの Dr. F.H.Mohn (Institute for Chemie und Dynamik der Geosphere) は、藻類による二酸化炭素の固定について検討していたが、残念ながら机上のデータでの計算内容であった。しかしながら、生物による二酸化炭素固定（リサイクル）の重要性については共感が得られた。

これまでの RITE による研究開発によって、生物による水素製造の実現が見通せるようになってきたことや、LCCO<sub>2</sub>による評価からバイオ水素が地球温暖化対策技術の有力なオプションの一つであることが実証されたことを示すことができ、バイオ水素に対する理解を得る上での貴重な機会を持つことができた会議であった。

#### (6) 添付資料

無し

### 3. 2 チェコ科学アカデミー微生物学研究所訪問技術打合せ

#### (1) 緒言

Dr. Frantisek Straka の案内により、オーストリア国境に近い Trebon 市にある、豚糞と市の下水汚泥を利用したバイオガス製造プラントならびに、「チェコ科学アカデミー微生物学研究所」を訪問し、藻類の屋外リアクターを見学し、情報収集を行った。

(2)日時

平成 10 年 9 月 4 日

(3)参加者

大塚 誠治 技術部長  
服部 達雄 主任研究員  
青山 勝博 主任研究員

面会者：Dr. Frantisek Straka (Fuel Research Institute)

Dr. Jiri Doucha (Head of the Autotrophic Microorganisms Labo. Division)

Dr. Vilem Zachleder (Senior scientist)

(4)会議報告 および (5)その他・所感

a. バイオガス製造プラント (チェコ共和国、Trebon 市)

オーストリア国境に近い Trebon 市で、25,000頭の養豚場からの豚糞と約9,000人分の下水汚泥をパイプラインで収集し (養豚場からは約300m、下水処理場からは約1 km)、嫌気発酵させてメタンガスを回収しエネルギー源としているプラントを見学した。嫌気発酵プラントは、容積3,200m<sup>3</sup>と2,800m<sup>3</sup>の2つの発酵タンク (写真A) からなり、一日に豚糞200m<sup>3</sup>と下水汚泥40m<sup>3</sup>を処理 (写真B) する規模のものであった。さらに近郊の下水処理場、養豚場からも、汚泥・豚糞をトラック (写真C) で集め (料金は1トンあたり約1,000円)、最終的な処理残渣は堆肥 (写真D) として再利用し、処理水 (BOD 25mg/l) はチェコ特有の広大な鯉やマスの養殖池 (写真E) に放流していた。この発酵槽は1973年から稼働しており、以降ノーメンテナンスで運転されており、温度は約40℃で、一日に4,200m<sup>3</sup>のバイオガスが生成する。そのガス組成は、62%がメタンガスで38%が二酸化炭素であった。得られたバイオガスは、ボイラー (写真F) や130kW のガスエンジン (写真G) のエネルギー源として使用して、熱は発酵槽の保温や養豚場の温水として使い、電気は発酵プラント全体の電力を賄っていた。バイオガスには1m<sup>3</sup>当たり4g の硫化水素が含まれるため、ガスエンジンのメンテナンスが大変であったこと以外は、非常に良くできた地域分散型の環境調和型のエネルギーシステムであると感心させられた。

b. チェコ科学アカデミー微生物学研究所 (チェコ共和国、Trebon 市)

1ユニットが表面積24m<sup>2</sup>の平板型リアクタ (写真H：中央) によるクロレラ培養の

屋外実験を見学した。傾斜させた平板の上を厚さ（深さ）5mm 程度で培養液を急速に流下させ、二酸化炭素を吹き込み菌体に固定させていた。この際吹き込んだ二酸化炭素の20～30%は大気中に放出してしまうが、菌体は非常に高濃度に培養（写真 I）できる（菌体濃度：30～40g-dry cell/L-culture、リアクター全量は約100L）。菌体濃度が高いので、この深さでも背面へはほとんど光は透過しない。特筆すべきは、リアクタの素材にガラスを用いていた点であった。土地柄もあるが、長期的にはアクリル製よりもガラス製の方がコスト安になるそうである。現在はボイラ排ガスの吹き込み設備（写真 J：垂直部分）を建設中で、二酸化炭素の代替として利用可能性を研究する予定とのことであった。またスケールアップの面では、現在ギリシャで100m<sup>2</sup>規模のリアクタを建設中であった。ギリシャでのデータでは1日当たり35g-dry cell/m<sup>2</sup>の菌体を得られたそうである。また Dr. Jiri Doucha らは、培養温度や二酸化炭素の供給速度が培地の pH や菌体生産量に与える影響についても検討していた。現在得られたクロレラは、健康食品や化粧品の材料として用いられているが、今後は如何にさらに付加価値を付けることが問題であった。

この地方には大規模な養豚場（25,000頭）が存在し、その糞尿の処理が必要である。またチェコの土壤は不毛の地である。さらに太古からチェコでは魚（鯉やマス）の養殖が盛んで、広大な養殖池（100ha）がある。現在は電力確保のため火力発電所が稼働し、大気中に二酸化炭素が放出されている。これらの環境を鑑み、二酸化炭素固定・クロレラ培養、嫌気発酵・エネルギー回収、養殖用餌の確保、廃水処理を都市の中で総合システムでまとめる構想は、非常に興味深い研究であり今後の進展に注目したいと思われた。

#### (6)添付資料：論文

- 1)Influence of solar irradiance, culture temperature and CO<sub>2</sub> supply on daily course of O<sub>2</sub> evolution by Chlorella mass cultures in outdoor open thin-layer culture units.

Algological Studies 89 137-149 Karel Livansky and JiriDoucha

- 2)CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> gas exchange in outdoor thin-layer high density microalgal cultures.

Journal of Applied Phycology 8: 353-358, 1996 Karel Livansky and JiriDoucha

- 3)Novel outdoor thin-layer high density microalgal culture system: Productivity and operational parameters.

Algological Studies 89 137-149 JiriDoucha and Karel Livansky

### 3. 3 V T T E n e r g y（フィンランド）訪問技術打合せ

#### (1)緒言

Helsinki 郊外の Espoo 市にある VTT Energy を訪問し、RITE 水素プロジェクトの概要説明・基礎研究部分の紹介を行った後、バイオマスのガス化に関する試験設備の見学と情

報交換を行った。

(2)日時

平成10年9月7日

(3)参加者

大塚 誠治 技術部長

服部 達雄 主任研究員

青山 勝博 主任研究員

面会者：・ New Energy Technologies

Research Manager Professor Kai Sipila

Manager, Gasification and Gas Cleaning MSc(Eng) Esa Kurkela

Research Scientist MSc(ChemEng) Tuula Makinen

・ Energy Systems

Senior Research Scientist MSc(Tech) Riitta Pipatti

(4)会議報告 および (5)その他・所感

VTT Energy は、Technical Research Center of Finland 傘下の研究機関の一つで、約300人の陣容を擁し、原子力、新エネルギー、エネルギーシステムなどの研究開発を進めている。特に、国産エネルギー資源であるビート、森林系バイオマスの利用に関する技術開発に積極的に取り組んでいるところに特色がある。予算の30%は政府からで、残りの70%をコントラクトで運営している。以下の5つの大きな組織に分かれフィンランドに特徴的な研究を実施している。

- ・ Fuels and Combustion (木質・ビートの生産、燃焼技術、分析)
- ・ New Energy Technologies (ガス化技術、パルプ業とエネルギー、廃棄物利用)
- ・ Nuclear Energy (核エネルギー全般)
- ・ Energy Use (エンジン技術、プロセスのシミュレーション、森林工業)
- ・ Energy Systems (電力分配、環境問題、風力発電、経済性)

フィンランドの1次エネルギー消費32Mtoe (1995)のうち、6%をビート、15%を木材燃料によって供給している。2005年までにバイオエネルギーの供給シェアを25% (10 Mtoe)まで高めるのがフィンランド政府のエネルギー政策の目標であり、バイオエネルギーの研究開発への資源投入を増加させている。これを受け、V T Tは次の4つの研究開発に取り組んでいる。

1. I G C Cプロセスのための加圧流動床ガス化
2. 小規模エネルギー生産のための大気圧ガス化
3. ガス化ディーゼルのデモンストレーションとそこで採用するガス浄化技術

#### 4. 化学工業原料のための合成ガス製造とメタノールと電力を併産する複合システム

これらは、EUの研究開発の一部としても資金を確保し、Foster Wheeler や Siemens といった世界トップクラスのプラントメーカー、電機メーカーをパートナーとして試験設備を建設し、実証プラントの建設、国外への技術輸出までを視野に入れた取組みとなっている。地球温暖化対策（二酸化炭素の排出抑制）のためだけでなく、森林の保全、休耕田の有効活用のためにも、バイオマスのエネルギー資源としての利用が今後日本においても積極的に取り上げられるべきである。その場合に、物理的処理（加熱してのガス化）に適したバイオマス（森林系バイオマス）と生物的処理（微生物による発酵）に適したバイオマス（農畜産系廃棄物、廃水・汚泥）があり、それぞれのバイオマスの特性に適合した処理方法が選択されることになる。したがって、バイオ水素についても、その適否を十分に把握した上で、実用・普及の道筋を策定してゆくことが肝要である。

#### (6) 添付資料：論文

1) Cost-effectiveness of alternative strategies in mitigating the greenhouse impact of waste management in three communities of different size.

Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change 2: 337-358, 1997-1998 Riitta Pipatti and Margareta Wihersaari

2) Role of energy production in the control of greenhouse gas emissions from waste management.

Energy Convers. Mgmt 37, Nos 6-8, 1105-1110, 1996 R. Pipatti and I. Savolainen

# 海外調査報告書

欧州技術調査（エニ分室研究会ほか）

地球環境産業技術研究機構  
C O 2 固定化等プロジェクト室  
環境調和型水素製造プロジェクト

# 海外出張報告書

## －エニ分室研究会ほか－

1. 調査目的：イタリアのエニ分室を訪問して、エニシステムを評価・検討し、並びに育種研究の進捗状況等を打ち合わせる。その後、イギリスのロンドン大学を訪問して研究の進捗等を打ち合わせる。

### 2. 調査概要

#### (1) 出張先（名称・所在地）

①Eni Technologie

00016 MONTEROTONDO(ROMA)

via E. Ramarini 32

②Eni Technologie

20097 S. Donato Milanese(Milano)

via F. Maritano 26

③King' s College London

Campden Hill Road

London W8 7AH, U. K.

#### (2) 期間

平成10年7月5日～平成10年7月12日（8日間）

#### (3) 用件

平成10年度エニ分室研究会・ロンドン大学技術打ち合わせ

#### (4) 調査参加者

後藤雅史（鹿島分室）、西代孝志（クボタ分室）、服部達雄（東ガス分室）、  
小池洋潤（エネ研分室）、中山克彦（エニ分室）、鬼山和彦（技術部）

#### (5) 調査日程

7 5 出国・ローマ着

7 6 エニテクノロジー ローマ分室研究会

7 7 エニテクノロジー ローマ分室研究会

7 8 エニテクノロジー ミラノ分室研究会

7 9 ロンドン移動

7 10 ロンドン大学技術打ち合わせ

7 11 出国

7 12 帰国

### 3. 調査結果のまとめ

#### 1) エニ分室 リアクタグループ（ローマ）研究会

##### (1) 緒言

エニ分室ローマ研究所を訪問し、研究会を開いた。エニ分室ローマ研究所は総勢約130名の体制で、主に環境関連の研究・分析等を担当しているエニ・テクノロジー社の研究所である。

今回のエニ分室（ローマ研究所）研究会の主な目的は、水素製造プロジェクトの最終年度に当たり、最終成果報告書作成に向け情報の交換 コスト等計算（FS）条件のすり合わせ等である。なお、廃棄物前処理・水素生成の一連のプロセスに関する実験は、ローマ研究室で実施されている。

##### (2) 日時

7月6日（月）エニ分室・ローマ研究室

7日（火）エニ分室・ローマ研究室

##### (3) 参加者

（エニ分室ローマ研究所）

Mr. D'Addario, Mr. Valdiserri他、エニ分室ローマ研究所研究員約10名

（訪問団）

服部（RITE技術部）、鬼山（RITE技術部）、中山（エニ分室東京）、  
小池（エネ研分室）、西代（クボタ分室）、後藤（鹿島分室）

##### (4) 研究会報告

① エニ分室ローマ研究所における研究会は、まず、RITE技術部から今回の研究会の目的ならびにプロジェクト全体の進捗状況の説明を行うことから始められた。特に、本年度はプロジェクトの最終年度にあたり、八月末からは最終評価も始まるため、全体のとりまとめ作業が非常に大切である旨が強調された。また、最終的な報告書を取りまとめるための必要な資料の項目 書式等についても説明があった。

Q（エニ分室）：プロジェクト全体の進捗状況に関する説明の中に、耐熱性水素生産菌に関するテーマがあった。このテーマに関しては、以前、エニ分室からの提案が採用されなかった経緯があるが、今回、テーマとして上がっているのは何故か？

A（RITE）：当初の計画では予定していなかったが、中間評価において指摘を受け、再委託の形でテーマとして取り込んでいる。

Q（RITE）：エニ分室での実験に用いている菌株は野生株か変異株か？

A（エニ分室）：エニ分室での水素生産実験に用いている株は全て野生株である。変異株を用いた実験はまだ実施していない。理由は、おそらく水素製造コストを改善することはできないと思われるからである。

②続いて、D Addario氏からエニ分室における実験進捗状況の説明があった。主な内容は、以下の通り。

エニ分室では、98年2月以来ガラス製チューブリアクタによる実験を行ってきた。リアクタ径は、平板リアクタによる実験データ（5cm平板リアクタで水素発生量がほぼ0であった）に基づき、モジュールリアクタは20mm、45mm、ならびに60mm（いずれも内径）とした。

内径45mmのモジュールリアクタの場合、リアクタ容積あたり0.5～0.6 L-H<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> reacr dayの水素生産を得ているが、その時の微生物増殖はベンチ実験に比して非常に少なかった。これは、設備の暗領域が大きいこと、また設備の配置が適切でないこと等に起因していると考えている（現在の配管、配置では、設備の全容量20～25Lに対し、光リアクタ部の容量は14～15L程度とのこと）。現在、モジュールリアクタについて検討している改善案としては、設備の配置、配管経路ならびに材質の変更、供給基質濃度の増大、基質当たりの水素収率を最大化するためのリアクタ径の増大（10cm）、コンタミ防止等がある。

酸発酵液希釈液（1:10）を用いた内径45mmのモジュールリアクタによる実験では、乳酸および酢酸初期濃度4.65および0.47g L<sup>-1</sup>、植菌濃度10%、温度30℃（昼間のみ温度制御）、人工光源300 W m<sup>-2</sup>（昼間のみ光照射）、滞留時間30時間の条件において9日目に0.9 L-H<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> reacr dayを観察したが、その後、時間の経過と共に水素生成速度が低下しプロピオン酸が蓄積する傾向が見られた。このことは、他の菌（雑菌）が優勢になったことを示していると考えている。同じモジュールリアクタによる屋外実験では、乳酸および酢酸初期濃度7.65および0.8g L<sup>-1</sup>、滞留時間30時間の条件において、やはり9日目に最大水素発生速度0.39 L-H<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> reactor dayを観察した（屋外設置モジュール見学：二基のリアクタによる水素生成実験が行われていた。設置方位、角度等の検討はこれからとのこと）。

これらの実験は、コンタミ防止対策を特に施していない系であるが、既に述べた通り目的菌株以外の雑菌が増殖している可能性があるため、基質供給設備の改良（濾過滅菌等）や雑菌増殖の抑制剤添加の効果等について実験を実施している。後者に関しては、ラン藻、硫酸還元菌、酢酸生産菌、メタン生産菌等の増殖抑制を目的として種々の物質を検討しているが、現在は食品保存添加物として数種類市販されているホップの抽出物を用いて実験を行っている（実験設備見学：バイオアッセイ的な手法による水素生成菌に対する阻害活性のホップ抽出物濃度依存性をテスト中であった）。

Q（RITE）：エニ・システムにおける窒素源についてコメントされたい。

A（エニ分室）：エニ分室のシステムでは水素生成リアクタにおいてアンモニア律速になる場合があり、アンモニアが消費されると水素発生速度が低下する。このため、

投入基質とは別個に塩化アンモニウム溶液の連続供給が必要である。

Q (RITE) : 酸生成相についてコメントされたい。

A (エニ分室) : エニ分室のシステムでは、野菜やフルーツ廃棄物を原料としている。酸生成リアクタは20~30℃で運転するが、特に植種は行わない。生産有機酸の90%程度が乳酸である。なお、運転温度を上昇させると、乳酸濃度が低下すると思われる。

Q (RITE) : 水素生成リアクタの運転条件についてコメントされたい。

A (エニ分室) : モジュールはガラス製のチューブリアクタである。系内の標準的な水理的滞留時間は30時間であるが、反応液は数分程度の周期で高速にリサイクルしている(温度制御に必要とのこと)。

③RITE技術部から、現在国内の分室で検討している3システムについて概要の説明があり、次いで、エニ分室のD Addario, Valdiserri両氏から、F.S. に必要な装置諸元、物質フローに関して説明があった(システム、数値の詳細は添付資料参照)。概要は、以下の通り。

エニ分室では、水素生産日量3,500 Nm<sup>3</sup>-H<sub>2</sub>/day のシステムとして諸元を決めている。エニ・システム (Acidogenetic-Photobiological Continuous System ; 以下、APCS) の投入基質は野菜・フルーツを中心とする市場廃棄物であり、前処理による乳酸が約90%をしめる酸生成前処理を施す。投入廃棄物の固形分の約90%は有機物(揮発物)であるが、固形分中の全窒素含量は約1.4%である。

予備試験スケールでのAPCSの操作手順は以下の通りである。すなわち、まず、廃棄物の投入濃度125g/500mLで4日間酸発酵させる。前培養(2日間)した植種、ならびに先の酸発酵液を1+10希釈し光合成リアクタに投入し、循環を開始する。この時、Mo、Fe、Mnなどの微量栄養素を含む塩溶液も投入する。5日目から連続運転に切り替え、毎日、約50gの廃棄物に相当する酸発酵液を希釈水と共に供給する。なお、光合成リアクタから排出される排液は酸発酵リアクタに返送、希釈水として再利用するが、これによりpH調整が不要となる。また、光合成リアクタには塩化アンモニウムを添加する必要がある。

実際のAPCSでは、予備的な意味を込めて、酸発酵プロセスへのアルカリ投入ポンプを設けることとする。また、酸発酵液には光合成リアクタに供給する直前に、濾過滅菌ならびに塩化アンモニウム添加を行う。光合成リアクタ排液はそのまま酸発酵リアクタに返送するが、返送率はほぼ100%である。酸発酵リアクタ、最終排液処理工程から排出される余剰汚泥は、脱水後コンポスト処理することを想定している。

物質フロー酸発酵処理プロセスは24時間 日運転、水素発生プロセスは12時間 日運転として計算した。詳細は添付資料に譲るが、プロセスの中心はチューブを333本を装備した50m x 100mのチューブラリアクタモジュールであり、全体で23モジュールが必要である。

現在、光水素反応効率向上のため、変異株の利用、反応液からの水素除去などを検討しているが、変異株（PHB合成酵素欠損株）については、自然光条件においては余り多くは望めないと思われる由である。また、光変換効率向上のため水素発生リアクタ反応液をサブリアクタに導入し、不活性ガスでバブリングすることにより阻害ガスを系外に除去する実験を実施中である（実験室見学：最近、ロンドン大学のグループがこの件に関連する論文を発表したが、元々のアイディアはエニ分室が提案したとのことである）。

最後に、既報の「投資及び廃棄物処理に関する感度、有機廃棄物からの水素生産」図の説明があったが、エニ分室における試算では、必要面積が30haとしてプラント製造コストが約7000円 m<sup>2</sup>程度にできればシステムとしてなんとか成り立つ可能性があるが、この値は最近発表されたBenemann等の推算値とほぼ同等であるとのことである（この時の水素製造コストは100円 Nm<sup>3</sup>-H<sub>2</sub>程度か？）。

Q（エニ分室）：IHIのシステムでは、酸生成（前処理）システムで水素が生産されるのは何故か？ 特別な菌体を植菌しているのか、それともpHコントロールによるものか？

A（RITE）：現在、把握していないのであとで確認する。

Q（エニ分室）：クボタ・システムで示されている副産物とは、具体的にはどのようなものか？このような副産物の価値をコスト計算に含めるのか？

A（RITE）：菌体自体、ビタミンB 1 2、補酵素などを想定している。副産物の価値をコスト計算には含めていない。

Q（エニ分室）：鹿島システムでは、光合成リアクタから（前処理システムへの）返送はあるのか？

A（RITE）：鹿島のシステムでは、前処理した廃液はさらに希釈する必要があるが、希釈水は最終処理水の返送・再利用を想定している。

Q（RITE）：APCSにおける動力用電力使用量はどれくらいか？

A（エニ分室）：循環に必要な電力として0.66 kWh Nm<sup>3</sup>-H<sub>2</sub>と計算している。

Q（RITE）：加熱用スチームの必要量はどれくらいか？

A（エニ分室）：0.61kg Nm<sup>3</sup>-H<sub>2</sub>と計算している。

Q (RITE) : イタリアにおける水素ガスの標準的な価格はどれほどか？

A (エニ分室) : 約100リラ Nm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>である(日本円換算で9~10円程度)。ただし、特殊用途向けの水素はその10倍程度の価格で取引されている例もあり、バイオ水素はこのような用途に焦点を合わせたい。

Q (RITE) : 他の分室のシステムとの整合性を保つため、エニ・システムも日本の基準、数値に基づいてコスト試算等を行いたい。

A (エニ分室) : 了承する。エニ・テクノロジー内でも独自にコスト試算は実施しているが、プロジェクトの整合性を保つためにも、日本の基準で試算するのが良いと思う。

#### (5) その他

エニ社のシステムは光変換効率等の数値が高く、システムも比較的シンプルで非常に整ったものであると感じられた。乳酸を基質とした高い水素生産培養結果が高いシステム効率につながっており、水素生産の効率がシステムの効率に大きく影響していることを再認識した。

#### (6) 添付資料

写真 1 1 枚 (エニ分室ローマ研究所、ベンチスケール実験装置(I)、  
ベンチスケール実験装置(II)、ベンチスケール実験装置(水没型平板リアクタ)、  
ベンチスケール実験装置(ホップ抽出物添加による雑菌増殖抑制効果)、  
屋外実験装置-全体(裏側)、屋外実験装置-小型チューブリアクター、  
屋外実験装置-チューブリアクタモジュール-、  
屋外実験装置-チューブリアクタモジュール単体-、  
屋外実験設備付属コントロール/モニタリングルーム、  
モニターコンソール画面)

Photobiological Hydrogen Production -Large Scale Cultivation- (2 2 枚)

## 2) エニ分室 育種グループ（ミラノ）研究会

### (1) 緒言

ローマよりミラノへ移動し、午後1時よりミラノ San Donatoのエニリチェルケにて育種改良に関するディスカッションを中心とした研究会が行われた。

エニ（ミラノ）分室で得られた育種株に関し、先に日本で行われた評価委員会で、変異株の評価方法、実験手法、データの取りまとめ方等に関し厳しい意見が出されており、その点も含めて議論することが目的であった。特に育種変異株の評価はローマにて行われており、このミラノでの研究会に先立ってローマで行われた研究会の内容も一部関与しているため、その内容も含めて記すこととした。以下その報告である。

### (2) 日時 現地時間 7月8日 13:00開始

### (3) 参加者 R I T E技術部より、服部、鬼山。各分室より、後藤、中山、西代、小池 エニ（ミラノ）分室から Mr. Casati、Ms. Serenellini、Ms. Pedroni の計9名

### (4) 研究会報告

#### ① エニテクノロジーの紹介

まずエニテクノロジーの戦略企画マネージャーである Mr. D. Casati及び Ms. S. Serenelliniよりエニテクノロジーの概要が紹介された。彼らによれば、エニテクノロジーはその出資の50%以上がエニリチェルケでありエニリチェルケ内部におけるR&Dを中心に受け持つことを目的としており、一つは石油生産及びエネルギーに関する問題、もう一方で環境低付加技術の開発に重点を置いているとのことであった。実際には、触媒、コロイド、環境等6つのセクションに分かれており、水素製造技術開発はエネルギーリサーチの一環に組み込まれているようである。スタッフはミラノに306人、ローマに126人が配置されており、年間約600億リラ（日本円で約55億）程度の予算で活動しているとのことであった。

#### ② R I T E研究成果及び最終年度研究計画

Ms. P. Pedroniからエニ・ミラノ研究室での研究成果の概要と最終年度の研究計画に関して紹介が行われた。

現在下記の3点に関し研究が進められており、それらに関しディスカッションが行われた。

##### i. R V株における異種ヒドロゲナーゼの発現

クロストリジウムヒドロゲナーゼをクローニングしたバクターを有する形質転換R V株はすでに得られており、タンパク質の発現は抗原抗体反応で確認できている。また活性染色法によりその活性の確認を試みている段階であるが、現在、ポジティブコントロールであるクロストリジウムを用いた活性染色の条件決定に成功した段階であり、形質転換株での確認は現在進行中とのことであった。

この系に関しては、8月（或いは7月）まで検討を進めるが、もし確認できない場

合は日本に研究員を派遣し水素電極による測定を試みたいとの申し出があった（エニ分室には水素電極が無いため）。更に、今後の計画として、もし、上記の系でクロストリジウムヒドロゲナーゼの活性発現が確認された場合は、現在平行して進められているP.H.A合成マイナス或いは取り込み型ヒドロゲナーゼマイナスミュータントへの導入も考えているとのことであった。

#### ii. 各種ミュータントの評価

これまでの報告会や評価委員会においてバッチ培養によるミュータントの評価が必要であるとの指摘が多く出されており、前々日、前日とローマのエニ分室において行われた会議においてもMr. D'Addarioとその点に関するディスカッションが行われていた。ミュータントの評価はミラノではなくローマにおいて連続培養を行っているグループが実施しており、ローマにおいてこの点を十分に議論する必要があったためである。

当初Mr. D'Addarioは既に行われた幾つかの実験（評価委員会にて示されたデータ）が利用した実排水も含めミュータントの評価を行うのに十分な系である事を主張していたが、最終的には標準的なA S Y培地（我々が用いているものと多少組成が異なるがそれを記載した論文を入手した）によるバッチ培養での評価の実施に同意した。この結果を反映してMs. P. Pedroniの示した計画にもバッチ培養での評価実施が組み込まれていた。実施時期としてはローマで現在動いている連続系が終了した後9月末までに完了する計画であるとの事であった。8月末に開催が予定されているNEDOの評価委員会に向けて、具体的なデータが必要ではないかとの意見も出されたが完全な形でデータは必ずしも必要では無いとの判断により9月中に実施する予定となった。

#### iii. ニトロゲナーゼの調節に関する研究

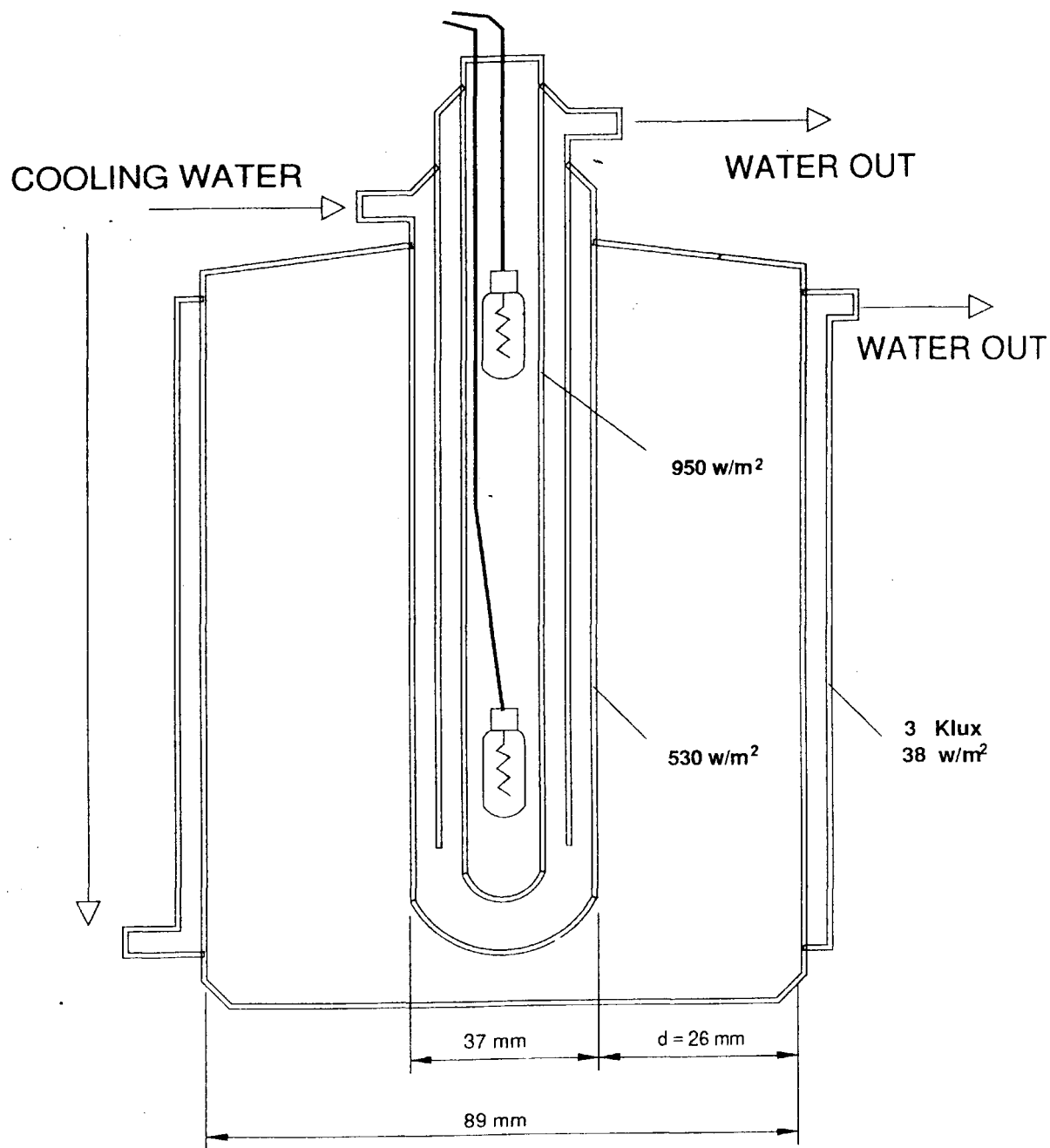
ニトロゲナーゼの調節系に関する研究はまだほとんど進んでおらず具体的な成果は得られていない様である。

#### (5) その他所感

R V株へのクロストリジウムヒドロゲナーゼの遺伝子導入に関しては、先の評価委員会用に準備された資料では活性が得られたという認識がなされていたが、当初、図の説明が抜け落ちており、その事実確認が正確に行われていなかった。今回、実際にMs. P. Pedroniとディスカッションした結果、活性染色はポジティブコントロールのみで行われた結果であることが明らかとなった。またミュータントの評価方法に関しても認識の違いが認められた。リアクター関連の研究においては、フィージビリティスタディも含めローマ研究室で一貫して作業が進められており特に問題無いようであるが、育種に関しては日本とイタリアのみならず、ローマ研究室とミラノ研究室の間でもデータの取り扱いに食い違いが生じていることが感じられ、分室内での何らかの対応が必要ではないかと思われた。特に本プロジェクトが最終年度である点からしても、これまでの研究成果を取りまとめる必要があり、育種に関してもエニ分室の成果を、エニ分室として取りまとめてゆく必要があるのではないかと感じた。



## LABORATORY REACTOR SCHEME



$$I = I_0 e^{-1.01d}$$

Broth OD 660 nm = 2.2

ミュータント評価用小型リアクタ図面

### 3) ロンドン大学技術打ち合わせ

#### (1) 緒言

キングスカレッジロンドンのD. Hall教授及びDr. K. Raoを現在の研究成果確認の目的で訪問した。

#### (2) 日時

平成10年7月10日

#### (3) 参加者

西代孝志研究員(ボタ分室)  
中山克彦主任研究員(エニ分室)  
小池洋潤研究員(エネ研分室)  
服部達雄主任研究員(東ガス分室)  
鬼山和彦技術部次長(技術部)

#### (4) 打ち合わせ内容

##### ①室内および屋外スパイラルリアクターの見学

パイプ内径1cmスパイラル外径約50cmの樹脂製リアクター(総容積4.35L、長さ約20m)の運転状況を見学した。室内の装置はこれまで報告のあったものと同じであるが、新たに制作した屋外の装置は、数日前よりテスト開始したものでP K81株(変異株)を用い、連続培養運転をおこなっていた。太陽光下では、水素は発生していなかった。これまでと変更のあった点は各種センサー類、デバイスの改良が行われた。またパソコンによる制御およびデータの記録も改良が行われた。

##### ②Dr. K. Raoよりこれまでの成果についてその概略の説明

シアノバクテリアの水素代謝に関する基礎的な研究およびバイオリアクターのエンジニアリング的な側面よりの研究の成果で別紙1(内容別)及び別紙2(時系列順)を用いて説明が行われた。また別紙3に各種菌体での水素発生能の比較データが示された。またこれまでの対外発表は別紙4の様に纏められる。

##### ③RITE技術部より今後のNEDOおよびMITIに対する最終報告のスケジュール及び年次報告書等に関する説明、CTIに関する状況説明がなされた。

#### (5) その他、所感

研究施設は、やや古く歴史が感じられる。D. Hall教授を含めメンバーは、非常に友好的で活発な討議が行われた。スパイラルリアクターは非常に簡単な構造、材質で構成されており、実験室レベルの域をまだ越えていないが、研究者の熱意は大きく感じられ、今後の成果に期待したい。

RITE Photobiological H<sub>2</sub> Production (1992-98)  
 Re-entrustment Contractor: King's College London  
Fundamental research results on cyanobacterial H<sub>2</sub> metabolism

1. Immobilisation of cells on polymers and hollow fibres. Physiological and morphological characteristics of free and immobilised cells of *Anabaena* and *Nostoc* spp.
2. H<sub>2</sub> metabolism and nitrogenase activities of cells cultured in Mo M<sub>0</sub>, V<sup>+</sup> and no Mo or V media. H<sub>2</sub> metabolism of *A. variabilis* mutant PK84 - possible explanations for increased H<sub>2</sub> evolution by the mutant.
3. Engineering aspects of photobioreactor design. (a) Horizontal vertical/tubular reactors enclosing hollow fibres, (b) 'Air lift' mechanism for nutrient flow, (c) operation of 'chemostat'-type bioreactors, (d) assembly of helical tubular bioreactors made of PVC or Teflon, (e) Biofilm formation in the inner walls and technique to prevent the cell adhesion to the reactor, (f) withdrawal and measurement of products from the reactor, (g) correlation of optical density of the cells and chlorophyll *a* concentration, (h) development of 'twin' bioreactors for comparing activities of cells grown in 'specified' nutrient or 'ambience' differences etc.
4. Factors affecting H<sub>2</sub> production in 'batch' and 'bioreactor'-cultured cyanobacteria. Cell density and age, dilution rate, light intensity and duration, temperature, pH, ambient environment e.g. partial vacuum, argon, enriched CO<sub>2</sub>, N<sup>+</sup>C<sup>-</sup> starvation etc.
5. Development of computer-automation of the bioreactor operation. Hardware and software, data logging etc.
6. Method for determination of light conversion efficiencies in bioreactors.

***Collaborations and Funding other than RITE:***

- The Royal Society, UK
- INTAS, Brussels
- King's College London Research Fund
- IEA, Annex 10, Biological H<sub>2</sub> production
- EU COST Action 812: Hydrogenases in Biotechnology & Agriculture

## RITE Photobiological Hydrogen Production (1992-98)

Re-entrustment Contractor: King's College London

Milestones in R & D on cyanobacterial H<sub>2</sub> production

- 1992:** Introduced the concept of using cyanobacterial cell immobilisation on hydrophilic and hydrophobic hollow fibres for the development of photobioreactors to produce H<sub>2</sub>.
- 1993-94:** Demonstrated the potential of *Anabaena variabilis* immobilised in hollow fibres in the construction of photobioreactors and in the continuous production of H<sub>2</sub> coupled to CO<sub>2</sub> consumption. Continuous operation of two-phase system of H<sub>2</sub> production/biomass synthesis achieved for more than one year.  
Determination of the efficiency of conversion of light energy to combustion energy of H<sub>2</sub> by *A. variabilis* immobilised on polysulfone hollow fibres in a minireactor enclosed in a light-integrating Ulbright Sphere; calculated efficiency = 3.2%.
- 1994-95:** Culturing and isolation of free-living cell filaments of the terrestrial cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* from the polysaccharide sheath of the dry cells. Demonstration of the high H<sub>2</sub> production capacity of this 'novel' strain of cyanobacterium.
- 1995-96:** Development of chemostat-bioreactors for H<sub>2</sub> production by filaments of *N. flagelliforme*.  
Culturing of *A. variabilis* ATCC 29413 in V-enriched medium. Demonstration of enhanced H<sub>2</sub> production performance of V-grown cells (with V-nitrogenase) compared to the normal Mo-grown cells under identical growth and assays.  
Assembly of 'air-lift' bioreactors for H<sub>2</sub> production using free and hollow fibre-immobilised *A. variabilis* cells.  
Preliminary studies of H<sub>2</sub> production activities of mutant strains PK84 and PK17R of *A. variabilis* 29413. Mutants deficient in uptake hydrogenase.
- 1996-97:** Construction of a bench-top automated helical tubular bioreactor with computer control of growth parameters and data collection. Sustained H<sub>2</sub> production in the bioreactor by *A. variabilis* PK84 under anaerobic and aerobic conditions. First report of H<sub>2</sub> photoproduction in air environment by a cyanobacterium viz *A. variabilis* PK84 (presented at Biohydrogen 1997, Hawaii). Suggestions for scale up of the reactor.
- 1997-98:** Optimisation of H<sub>2</sub> production by PK84 in the continuous flow helical reactor. Comparison of H<sub>2</sub> production rates in argon and in air + CO<sub>2</sub>. Comparison of H<sub>2</sub> production activities of *Synechococcus* strain Miami BG043511 (Hawaii culture collection) with *A. variabilis* PK84.
- 1998:** Determination of hydrogenase activities (H<sub>2</sub> consumption and H<sub>2</sub> evolution) of *Synechococcus* 043511. Possible construction of chemical mutants with impaired H<sub>2</sub> uptake activity.  
**(In progress)** Assembly and operation of the photobioreactor outdoors.

RITE Photobiological H<sub>2</sub> Production (1992-98)  
H<sub>2</sub> production by cyanobacteria. Data obtained at Kings' College London 1992-98.

| Organism used                                                    | H <sub>2</sub> production rate                                            | Comments                                                                                                                                                                           | Reference                    |
|------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| <i>Anbaena variabilis</i><br>(Kurzing)<br><i>Nostoc muscorum</i> | 1 ml/mg chl a/h                                                           | H <sub>2</sub> production under partial vacuum, glass reactor, containing cyanobacteria immobilised in hollow fibre. Production phase lasted 6h.                                   | Markov <i>et al</i> 1992     |
| <i>A. variabilis</i>                                             | 0.2 ml/mg dw/h                                                            | Maximum rate, hollow fibre reactor, partial vacuum, lasted for 5 months.                                                                                                           | Markov <i>et al</i> 1993     |
| <i>A. variabilis</i>                                             | 20 ml/g dw/h                                                              | H <sub>2</sub> production coupled to CO <sub>2</sub> (5%) consumption. Photobioreactor ran continuously for 1 year.                                                                | Markov <i>et al</i> 1995     |
| <i>N. flagelliforme</i>                                          | 84 mmol/mg chl a/h<br>43 ml/g dw/h<br>510 ml/day/litre                    | Maximum rates obtained in chemostat cultures under optimised dilution, temperature, N <sub>2</sub> and CO <sub>2</sub> concentrations                                              | Lichtl <i>et al</i> 1997     |
| <i>A. azollae</i>                                                | 13 ml H <sub>2</sub> /h/litre                                             | Suspension of culture in a photobioreactor                                                                                                                                         | Tsygankov <i>et al</i> 1997  |
| <i>A. variabilis</i><br>wild type and mutant PK84                | 1.6 μmol/mg protein/h<br>7.0 - ditto -<br>3.1 - ditto -<br>12.6 - ditto - | <i>A. variabilis</i> ATCC 29413 wild type (WT).<br><i>A. variabilis</i> mutant PK84.<br><i>A. variabilis</i> WT under N <sub>2</sub> starvation.<br><i>A. variabilis</i> PK84. " " | Sveshnikov <i>et al</i> 1997 |
| <i>A. variabilis</i><br>29413                                    | 45 μmol/mg chl a/h<br>64 - ditto -                                        | Cells grown in the normal Mo medium in a cylindrical PhBR.<br>Cells grown in Mo deficient, V-enriched medium in a PhBR.                                                            | Tsygankov <i>et al</i> 1997  |
| <i>A. variabilis</i><br>PK84                                     | 81 μmol/mg chl a/h<br>190 - ditto -                                       | Helical tubular bioreactor, continuous light in air + 2% CO <sub>2</sub><br>tubular bioreactor in argon.                                                                           | Borodin <i>et al</i> 1998    |
| <i>Synochococcus</i><br>Miami 043511                             | 320 μmol/mg chl a/h                                                       | Non-synchronised cells, continuous day/night cycles in argon. Rates compare with 540 μmol/mg chl a/h obtained by Mitsui <i>et al</i> .                                             | Borodin <i>et al</i> 1998    |

## SELECTED PUBLICATIONS

PROFESSOR DAVID O HALL

Markov S A, Rao K K and Hall D O, 'A hollow fibre photobioreactor for continuous production of hydrogen by immobilized cyano-bacteria under partial vacuum' in *Hydrogen Energy Progress IX*, T.N. Veziroglu et al (ed), 641-650, 1992. <<CCPR>>

Rao K K and Hall D O, 'Immobilized photosynthetic systems - applications in biotechnology' in *Trends in photosynthesis research*, Barber, J., Guererro, M.G., Medrano, H. (eds), 135-147, Intercept, London, 1992. <<CEW>>

Hall D O and Rao K K (1993) Algal and cyanobacterial cell immobilization: Applications in clean energy and environmental biotechnology, in *Microalgae: From the Laboratory to the Field, Workshop, October 17-18*, 3-12, Dept.de Sciences et technologie de alliments,U.of Laval,P.Q. <<IL>>

Hall D O and Rao K K (1994) *Photosynthesis*, 5th edition, Cambridge University Press. <<BKA>>

Markov S A and Hall D O (1994) Photoproduction of hydrogen by cyanobacteria under partial vacuum in batch culture or in a photobioreactor, in *Hydrogen Energy Progress X, Proceedings of the 10th World Hydrogen Energy Conference*, D L Block, T N Veziroglu (eds), 941-949, Cocoa Beach, Florida, USA. <<CCPR>>

Markov S A, Bazin M J and Hall D O (1995) Hydrogen photoproduction and carbon dioxide uptake by immobilized *Anabaena variabilis* in a hollow-fiber photobioreactor, *Enzyme and Microbial Technology*, 17, 306-310. <<PAJ>>

Markov S A, Bazin M J and Hall D O (1995) The potential of using Cyanobacteria for hydrogen production. In *Advances in Biochemical Engineering* 52,62-86.

Gogotov N, Rao K K & Hall D O (1995) Hydrogen production in systems containing metal iron and hydrogenase preparation. *Appl. Biochem. Microbiol.* 3,384-392.

Hall D O, Markov S A, Watanabe Y and Rao K K (1995) The potential applications of cyanobacterial photosynthesis for clean technologies. *Photosyn. Res.* 46, 159-167.

Rao K K and Hall D O (1996) Hydrogen production by cyanobacteria: potential, problems and prospects. *J. Mar. Biotechnol.* 4, 10-15.

Lichtl R R, Bazin M J & Hall D O (1997) The biotechnology of hydrogen production by *Nostoc flagelliforme* grown under chemostat conditions. *Applied Microbiology & Biotechnology* 47, 701-707.

Sveshnikov D A, Sveshnikova N V, Rao K K, Hall D O (1997) Hydrogen metabolism of mutant forms of *Anabaena variabilis* in continuous culture and under nutritional stress. *FEMS Microbiology Letters* 147, 297-300 PAJ

Tsygankov A S, Laurinavichene T V, Butakin V E, Gogotov I N, Hall D O (1997) Biomass production by continuous cultures of *Rhodobacter capsulatus* grown in various bioreactors. *Appl. Biochem. & Microbiol.* 33, 485-490

Tsygankov A S, Serebryakova L T, Sveshnikov D A, Rao K K, Gogotov I N, Hall D O (1997) Hydrogen photoproduction by three different nitrogenases in whole cells of *Anabaena variabilis* and the dependence on pH. *Int. J. Hydrogen Energy* 22, 859-867 PAJ



写真 1 室内で実験中のスパイラルリアクタ