

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4084509号
(P4084509)

(45) 発行日 平成20年4月30日(2008.4.30)

(24) 登録日 平成20年2月22日(2008.2.22)

(51) Int. Cl.		F I			
C 1 2 N	1/20	(2006.01)	C 1 2 N	1/20	A
C 1 2 M	1/40	(2006.01)	C 1 2 M	1/40	Z
C 1 2 P	3/00	(2006.01)	C 1 2 P	3/00	Z

請求項の数 4 (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願平11-260608	(73) 特許権者	000004226
(22) 出願日	平成11年9月14日(1999.9.14)		日本電信電話株式会社
(65) 公開番号	特開2001-78754(P2001-78754A)		東京都千代田区大手町二丁目3番1号
(43) 公開日	平成13年3月27日(2001.3.27)	(74) 代理人	100070150
審査請求日	平成17年3月15日(2005.3.15)		弁理士 伊東 忠彦
特許法第30条第1項適用	平成11年3月15日 社団法人日本化学会発行の「日本化学会第76春季年会1999年講演予稿集▲11▼」に発表	(73) 特許権者	301021533
特許法第30条第1項適用	平成11年8月16日 社団法人日本生物工学会発行の「1999年 日本生物工学会大会 講演要旨集」に発表		独立行政法人産業技術総合研究所
微生物の受託番号	FERM P-17549	(74) 復代理人	100070150
微生物の受託番号	FERM P-7254		弁理士 伊東 忠彦
		(72) 発明者	近藤 利彦
			東京都千代田区大手町二丁目3番1号 日本電信電話株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 光合成細菌の菌株

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

高い水素発生能力を有するロドバクター スフェロイデス MTP4菌株(FERM P-17549)。

【請求項2】

350nm~1000nmの光に対する光透過率が光合成細菌ロドバクター スフェロイデス RV株よりも高いことを特徴とする請求項1に記載の菌株。

【請求項3】

光合成細菌の光合成色素であるバクテリオクロフィル及びカロチノイドによる吸収が光合成細菌ロドバクター スフェロイデス RV株と比較して、夫々35~40%及び25~30%減少していることを特徴とする請求項1又は2に記載の菌株。

【請求項4】

光源に近い前層に請求項1記載の菌株を、光源から離れた後層にロドバクター スフェロイデス RV株を夫々設置させて二重構造とし、光エネルギーを利用して有機酸等を含有する有機性水溶液から水素を発生させる二層型光合成リアクター。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、光エネルギーを利用して有機酸等を含有する有機性水溶液から水素を発生させる場合に用いられる光合成細菌の菌株に関する。

【 0 0 0 2 】

【 従来 の 技術 】

従来から光合成細菌の光合成能力を利用して有機性廃水を分解させ、次世代クリーンエネルギーとして有望視されている水素を発生させる試みがなされている。実際に水素発生を行う場合において、アクリル板若しくはガラス板等の光透過性の高い材料で平板型光合成リアクターを構成し、当該リアクター内に光合成細菌とともに光合成細菌育成のための栄養分（無機塩、窒素源）を含む培養液及び水素発生のための基質である有機性廃水、例えば有機酸を注入する。光合成細菌として、安定した高い水素発生能力を有するロドバクター スフェロイデス（*Rhodobacter sphaeroides*） R V 株（工業技術院生命工学技術研究所 寄託番号第 7 2 5 4 号）がよく利用されている。ここに光、例えば太陽光等を照射することにより、当該リアクター内に光エネルギーを供給して水素発生を行っている。平板型リアクターは非常に簡単な構造を有しているため、製造が容易でありかつ設置コストも低く抑えることができる。しかし、光合成細菌はその光合成色素により光を吸収するので、光強度はリアクターの受光面から離れるにつれて著しく減少し、リアクターの深部では水素発生に最小限必要な光エネルギーが十分に供給されず、結果として水素発生速度の低下が観測される（自己遮蔽効果）。

10

【 0 0 0 3 】

近年、光合成細菌を利用した光水素発生における水素発生速度向上を目指して、菌体の改変及びリアクターの改良に関する種々の研究がなされている。

前述のように、自己遮蔽効果のためにリアクター内では光合成細菌が有する本来の水素発生能力を十分引き出すことができず、特にリアクターをスケールアップした場合にはリアクター全体としての水素発生速度が大幅に低下してしまう。従来のロドバクター スフェロイデス R V 株を用いた場合には自己遮蔽効果の影響が大きく現れており、上記欠点を排除したさらに水素発生能力の高い光合成細菌が望まれている。

20

【 0 0 0 4 】

【 発明 が 解決 し よ う と す る 課 題 】

本発明は、上述の点に鑑みてなされたものであり、本発明は光合成リアクター内に生じる自己遮蔽効果により、リアクター内での光合成細菌の水素発生能力が低下するという点を解決させた光合成細菌の菌株を提供することを目的とする。

【 0 0 0 5 】

【 課 題 を 解 決 す る た め の 手 段 】

上記の目的は、高い水素発生能力を有するロドバクター スフェロイデス M T P 4 菌株（ F E R M P - 1 7 5 4 9 ）によって達成される。

30

【 0 0 0 6 】

前記菌株は、光合成細菌ロドバクター スフェロイデス R V 株に紫外線照射して突然変異を誘発させ、350nm～1000nmの光に対する光透過率が光合成細菌ロドバクター スフェロイデス R V 株よりも高く、光合成細菌の光合成色素であるバクテリオクロフィル及びカロチノイドによる吸収が光合成細菌ロドバクター スフェロイデス R V 株と比較して、夫々35～40%及び25～30%減少している菌株である。

【 0 0 0 7 】

光合成リアクター内で水素発生を行う場合には、自己遮蔽効果のため光合成細菌の菌体個々の水素発生能力に加えて、水素発生を行うために最小限必要な光エネルギーが供給されている菌体の数が、リアクター当たりの水素発生速度に大きく影響を与えられ

40

【 0 0 0 8 】

すなわち、菌体の光合成色素量を減らすほど菌体の光透過率が増加し、自己遮蔽効果が小さくなるので、リアクターのより深部にまで水素発生に最小限必要な光エネルギーが供給される。よって、水素発生を実際に行う菌体の数がより多くなり、リアクター当たりの水素発生速度は増大する。しかし、光合成色素量を必要以上に減らすと光エネルギー獲得能力が小さくなるため菌体個々の水素発生能力が著しく低下し、たとえ光透過率が優れてい

50

てもリアクター当たりの水素発生速度は減少してしまう。

【0009】

本発明の光合成細菌の色素欠損株は、その光合成細菌の光合成色素量が水素発生にそれほど悪影響を与えない程度に減少しているため、菌体個々の水素発生能力の低下は最小限に抑えられている。一方で、光透過率が優れているためリアクター内における自己遮蔽効果が低減され、水素発生を行うために最小限必要な光エネルギーが供給される菌体の数をロドバクター スフェロイデス R V株の場合より増加させることができる。

【0010】

以上のように光合成色素量の減少による水素発生能力の低下よりも、自己遮蔽効果の低減によるリアクター当たりの水素発生能力の増大の方がより強く作用しているために、本発明の色素欠損株は光合成細菌ロドバクター スフェロイデス R V株に比較して、リアクター当たりの水素発生能力は大きくなるものと考えられる。

10

【0011】

さらに本発明の色素欠損株による水素発生能力は、利用した光源の光強度に依存する傾向がある。本発明の色素欠損株である菌株は光強度が強いほど水素発生速度が大きくなる傾向を利用して、光源に近い前層に本発明の色素欠損株を、光源から離れた後層に親株であるロドバクター スフェロイデス R V株を積層させた二層型リアクターを作製したところ、その二層型リアクターの水素の発生能力は各単独株によるリアクターよりも高く、さらに高効率な水素発生系が得られる。

【0012】

20

【発明の実施の形態】

本発明者らは光合成細菌を利用した光水素発生システムにおける水素発生速度の向上を目指して、光合成細菌の菌体の改変に着目した。特に光合成細菌の光合成色素量を減らした色素欠損株である菌株を単離し、菌体の自己遮蔽効果を減少させることにより光合成リアクター内部への効率的な光照射を実現し、リアクター当たりの水素発生速度を増大させることを検討課題とした。

【0013】

光合成細菌であるロドバクター スフェロイデス R V株の突然変異を誘発させるために、254 nmの紫外線照射による方法を利用した。紫外線照射による突然変異により5種類の突然変異体が生成したが、その中で、特にバクテリオクロロフィル及びカロチノイドの量を適度に減少させた色素欠損株である新規菌株（本願では以下にMTP4という）が安定であり、良好な水素発生能力を有することから注目した。

30

【0014】

以下に本発明についての実施例を挙げて具体的に説明する。

1) MTP4株の単離

ロドバクター スフェロイデス R V株を対数増殖期後期まで a S y 培地で培養した後、その懸濁溶液(0.5 ml)を a S y 平板培地(シャーレ直径9 cm)に植菌し、紫外線(波長254 nm、強度710 μ W/cm²)を10秒間照射した後、暗好気条件下、30℃で24時間培養した。a S y 培地の組成を下記表1に示す。続いて、タングステンランプ照射(90 W/m²)の明嫌気条件下で3日間培養を行い、形成した約6000個のコロニーの中から色調がロドバクター スフェロイデス R V株と異なるものを視覚的に選択し、これを再び a S y 平板培地に植菌した。形成したコロニーを実体顕微鏡で観察し、雑菌等を含まないMTP4株の単一コロニーとなるまで選択、植菌を繰り返した。最後に、得られたMTP4株の単一コロニーを a S y 試験管培地(17 ml)に植菌し純粋培養した。

40

【0015】

【表1】

硫酸アンモニウム	1.25 g
コハク酸ナトリウム	9.8 g
酵母抽出物	1.0 g
基本培地	1 L

10

pH = 6.8に調整する

【0016】

2) 吸収スペクトルの測定

図1にaSy培地で培養したロドバクター スフェロイデス RV株及び上記調製されたMTP4株の菌体懸濁溶液の紫外-可視吸収スペクトルを示す。いずれの菌株の場合にも、バクテリオクロフィルによる吸収が800nm付近と850nm付近に、またカロチノイドによる吸収が450nm~500nmの領域に観測された。MTP4株のスペクトルの形はロドバクター スフェロイデス RV株と同様であるが、その吸光度が350nm~1000nmの全領域にわたって小さくなっていることが認められ、ある特定の色素タンパク質が欠損しているのではなく、色素タンパク質集合体のユニット全体が減少した変異株であると考えられる。

20

【0017】

さらにこのことは、MTP4株の光透過率がロドバクター スフェロイデス RV株よりも高いことを示している。

30

次にMTP4株の光合成色素欠損の度合いを、アセトン-メタノール混合溶媒を用いて、菌体から抽出した色素の紫外-可視吸収スペクトルより求めた。その結果、親株であるロドバクター スフェロイデス RV株と比較して、バクテリオクロフィルが35~40%、カロチノイドが25~30%減少していることが確認された。

【0018】

3) リアクター内部の光分布

親株と本発明の菌株を用いて、水素発生を行った場合のリアクター内部の光分布について説明する。リアクター内にMTP4株の菌体懸濁溶液を入れた場合のリアクター内部の光分布のシミュレーションを行った。受光面からの距離5~20mmにおける波長と相対エネルギーの関係を図2に示す。菌体濃度はいずれの菌株においても1.5mg/mlとした。ここで相対エネルギーは恒温槽の受光部分におけるタングステンランプの波長1000nmの成分の光エネルギーを1とした場合の相対値である。また実線はロドバクター スフェロイデス RV株を、破線はMTP4株の場合を示している。

40

【0019】

いずれの菌株を用いた場合にも、リアクターの受光面からの距離が増すにつれて到達する光エネルギーは減衰していくが、減衰の度合いはMTP4株で小さく、より深部にまで光が到達していることがわかった。すなわち、MTP4株を用いれば自己遮蔽効果が低減されるということが示唆された。

4) 水素発生挙動

リアクターの厚さ(光路長)が5、25、60mmの3種類の平板型リアクターを用いて

50

水素発生実験を以下に説明する。対数増殖期後期まで a S y 培地で培養した菌体懸濁溶液 (1 8 m l) をアルゴンバブルで脱気した g L 培地に植菌し、明嫌気条件下、3 0 で 2 4 時間本培養を行った。g L 培地の組成を下記表 2 に示す。リアクターの容量の 1 / 4 にあたる本培養菌体懸濁溶液を入れ、次いで容量の 3 / 4 にあたる g L 培地をアルゴンバブルで脱気した後注いだ。この際、菌体量が同株で同量になるように植菌量を調整した。光源としてタングステンランプを用い、リアクター受光面の光強度を 3 0 0 W / m² に設定し、明嫌気条件下、3 0 で水素発生を行った。発生したガスは 2 0 % 水酸化ナトリウム水溶液に通じ、二酸化炭素を取除いた後、水上置換によりメスシリンダー内に捕集した。

【 0 0 2 0 】

図 3 には、菌体濃度 c とリアクターの厚さ d の積 $c \times d$ と相対水素発生速度の関係を示す。ここでいう相対水素発生速度とは、ロドバクター スフェロイデス R V 株に対する M T P 4 株による相対水素発生速度のことである。 $c \times d$ の値が大きくなるにつれて、0 . 5 ~ 1 . 1 5 までは相対速度は急激に増加し、それ以降は徐々に減少するという傾向が観察された。

10

【 0 0 2 1 】

以上のように、菌体濃度とリアクターの厚さの積が 0 . 5 ~ 1 . 1 5 の場合に光合成色素を減少させたことに起因する水素発生速度増大効果が最大となり、M T P 4 株の水素発生速度はロドバクター スフェロイデス R V 株に比較して最大 1 . 6 倍に増大した。

【 0 0 2 2 】

【表 2】

20

L- グルタミン酸ナトリウム塩	1. 8 7 g
DL- 乳酸ナトリウム (6 0 % 水溶液)	9. 3 4 g
炭酸水素ナトリウム	1. 5 g
基本培地	1 L

30

pH = 6. 8 に調整する

【 0 0 2 3 】

表 1 及び表 2 に示す基本培地の組成を表 3 に示す。

40

【 0 0 2 4 】

【表 3】

$K_2 HPO_4$	0.75 g	$FeSO_4 \cdot 7 H_2 O$	10 mg
$KH_2 PO_4$	0.85 g	EDTA	2.0 mg
$H_3 BO_4$	2.8 mg	ビタミンB1	3.78 mg
$Na_2 MoO_4 \cdot 2H_2 O$	0.75 mg	ビオチン	3.57 mg
$ZnSO_4 \cdot 7 H_2 O$	0.24 mg	p-アミノ安息香酸	5.25 mg
$MnSO_4 \cdot 4 H_2 O$	2.1 mg	ニコチンアミド	6.48 mg
$Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2 O$	0.04 mg	ニコチン酸	3.56 mg
$CaCl_2 \cdot 2 H_2 O$	0.75 mg	蒸留水	1 L
$MgSO_4 \cdot 7 H_2 O$	0.2 g		

pH = 6.8に調整する

【0025】

5) 二層型リアクターにおける光合成細菌の水素発生

本発明の色素欠損株であるMTP4株は、親株であるロドバクター スフェロイデス RV株に比較して水素発生速度が優れていることは上記例にて確認された。さらにMTP4株による水素発生は照射される光強度に依存し、ロドバクター スフェロイデス RV株と比べて光強度が強い程、その水素発生速度は大きい。そこで、二層型リアクターによる光合成細菌の水素発生挙動を検討した。各株は4)と同じ手順にしたがって調製された。

10

20

30

40

50

図4に示すような形で、光源に近い前層と後層に各25mmの層厚で(A)、(B)及び(C)の二層型リアクターを調製した。リアクター受光面の光強度を500W/m²に設定し、4)にて説明したのと同じ方法で水素発生量を求め、その結果を図5に示す。図5から、後層における水素発生量は、前層に比較して供給される光エネルギーが少ないために水素発生量は少ない。前層にMTP4株を、後層にロドバクター スフェロイデス RV株を配置させた系において、全水素発生量は各株単独による系よりも水素発生量は増加した。

【0026】

【発明の効果】

上述の如く、本発明によれば、光エネルギーを利用して有機酸等を含有する有機性水溶液から水素を発生させる場合に用いられる光合成細菌ロドバクター スフェロイデス RV株において、光合成色素であるバクテリオクロロフィル及びカロチノイドを適度に減少させた本発明のMTP4株は、菌体個々の水素発生能力の低下を最小限に抑えつつ、リアクター内における自己遮蔽効果が低減され、水素発生を行うために最小限必要な光エネルギーが供給される菌体の数を増加させることができる。よって、リアクターをスケールアップした場合にも菌体の能力低下を抑えることが可能となり、リアクター当たりの水素発生速度が増大するという効果が得られる。

10

【図面の簡単な説明】

【図1】菌体懸濁溶液の紫外-可視吸収スペクトルを示す図である。

【図2】リアクター内部の光分布を示す図である。

20

【図3】菌体濃度cとリアクターの厚さdの積c×dとロドバクター スフェロイデスRV株に対するMTP4株の相対水素発生速度の関係を示す図である。

【図4】(A)は、光源に近い前層にロドバクター スフェロイデス RV株を、光源から離れた後層にもロドバクター スフェロイデス RV株を配置させたリアクターを示す図である。

(B)は、光源に近い前層にMTP4株を、光源から離れた後層にもMTP4株を配置させたリアクターを示す図である。

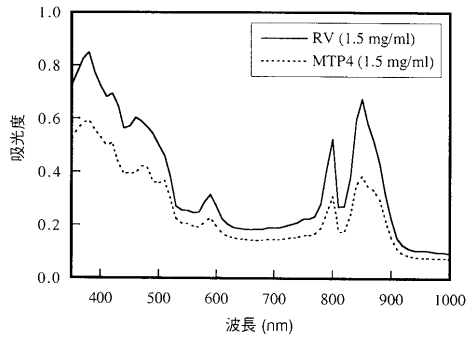
(C)は、光源に近い前層にMTP4株を、光源から離れた後層にロドバクター スフェロイデス RV株を配置させた二層型リアクターを示す図である。

【図5】二層型リアクターにおける各層及び全層からの水素発生量を示す図である。

30

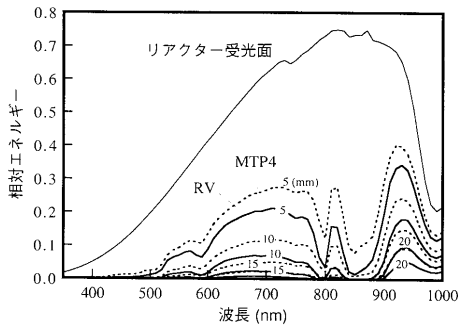
【 図 1 】

菌体懸濁溶液の紫外-可視吸収スペクトルを示す図



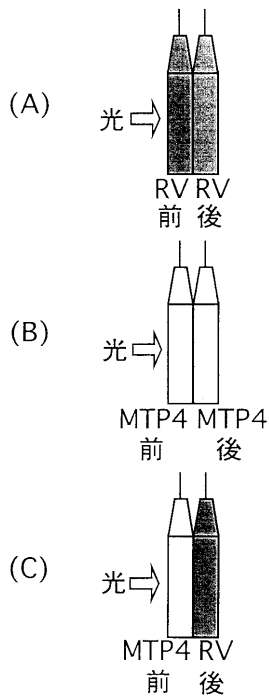
【 図 2 】

リアクター内部の光分布を示す図



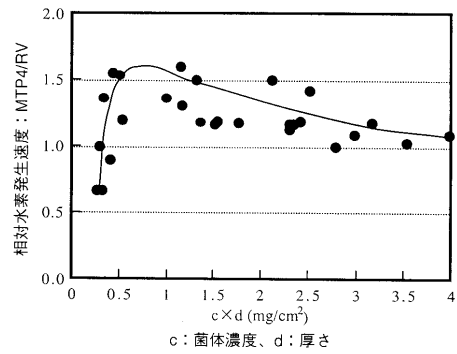
【 図 4 】

(A) は光源に近い前層にロドバクター スフェロイデス RV株を光源から離れた後層にもロドバクター スフェロイデス RV株を配置させたリアクターを示す図、(B) は光源に近い前層にMTP4株を、光源から離れた後層にもMTP4株を配置させたリアクターを示す図、(C) は光源に近い前層にMTP4株を、光源から離れた後層にロドバクター スフェロイデス RV株を配置させた二層型リアクターを示す図



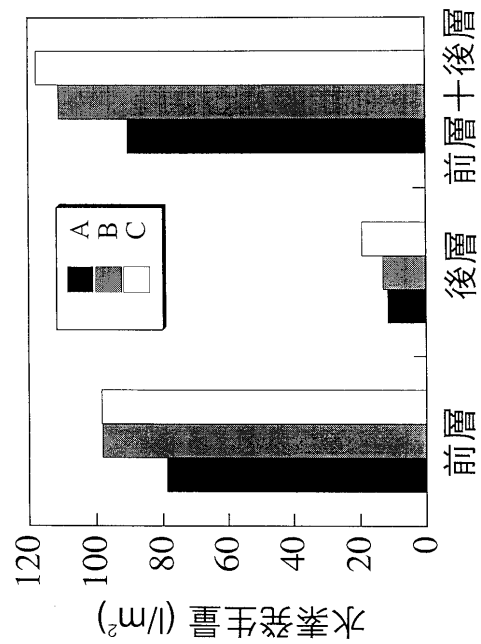
【 図 3 】

菌体濃度cとリアクターの厚さdの積c x dとロドバクター スフェロイデス RV株に対するMTP4株の相対水素発生速度の関係を示す図



【 図 5 】

二層型リアクターにおける各層及び全層からの水素発生量を示す図



フロントページの続き

- (72)発明者 荒川 正泰
東京都千代田区大手町二丁目3番1号 日本電信電話株式会社内
- (72)発明者 平井 敏郎
東京都千代田区大手町二丁目3番1号 日本電信電話株式会社内
- (72)発明者 三宅 淳
茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術院 生命工学工業技術研究所内
- (72)発明者 三宅 正人
茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術院 生命工学工業技術研究所内
- (72)発明者 浅田 泰男
茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術院 生命工学工業技術研究所内

審査官 中村 正展

- (56)参考文献 Chi. J. Oceanol. Limnol., 1998年, vol. 16, suppl., 91-104
J. Marine Biotechnol., 1996年, vol. 4, 34-37
J. Biosci. Bioeng., 1999年 5月, vol. 87, 619-624
J. Biosci. Bioeng., 1999年 7月, vol. 88, 1-6
BioHydrogen, 1998年, 121-131, DATABASE CA, AN 133:86827
BioHydrogen, 1998年, 81-86, DATABASE CA, AN 133:57643

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12N 1/20
C12M 1/40
C12P 3/00
JSTPlus(JDream2)
BIOSIS/MEDLINE/CA(STN)
BIOENG/CABA/SCISEARCH(STN)
CONFSCI(STN)
WPIDS(STN)
PubMed