

# 微生物による有機資源からの発酵水素生産

中島田 豊<sup>1</sup>・西尾 尚道<sup>2</sup>

<sup>1</sup>東京農工大学大学院工学府応用化学専攻

184-8588 小金井市中町2-24-16

<sup>2</sup>広島大学大学院先端物質科学研究科

739-8530 東広島市鏡山1-3-1

## Microbial Hydrogen Production from Organic Resources

Yutaka NAKASHIMADA<sup>1</sup> and Naomichi NISHIO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Tokyo University of Agriculture and Technology

2-24-16 Naka, Koganei, Tokyo 184-8588, Japan

<sup>2</sup>Hiroshima University

1-3-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima 739-8530, Japan

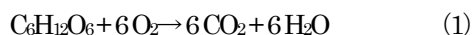
In this review, it is mainly described that the recent progress on fermentative hydrogen production from various kinds of sugar and renewable organic resources using a facultative anaerobe, *Enterobacter aerogenes* HU-101. Firstly, the reason anaerobic bacteria must produce hydrogen is briefly reviewed. Then, methodology and experimental results for improvement of hydrogen productivity considering with energy metabolism of *E. aerogenes* and redox state of substrates are demonstrated. Finally, as one example of hydrogen production from actual organic wastes, it is introduced that simultaneous production of hydrogen and ethanol by *E. aerogenes* from glycerol-containing wastes discharged from bio-diesel manufacturing process.

**Key words:** hydrogen production, fermentation, *Enterobacter aerogenes*, organic wastes

### 1. 微生物はなぜ水素を作るのか？

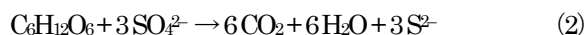
水素を生成する微生物は非常に多い。現在では生物について専門外の方でも微生物による水素生産は良く知られているが、なぜ微生物が水素を作るのかはあまり知られていないようである。そこで、ここではまず微生物が水素をつくる理由について概説したのち、著者らが行った発酵水素生産の高速化・効率化、および実廃棄物を用いた検討結果を紹介する。

人も含めて分子状酸素を利用して生きる生物は、有機物を摂取、代謝し、その一部を生体成分とするが、大部分は最終的に水と二酸化炭素にまで分解し、その過程でエネルギーを獲得する（呼吸）。有機物としてグルコースを考えると、その分解反応は以下のように表せる。



この反応は燃焼と全く同じであるが、生物の場合、上記反応で放出されるエネルギーを生物のエネルギー通貨であるアデノシン三リン酸（ATP）の形で蓄え、生体合成や維持のために用いる。この反応について酸素の側から見ると、酸素原子はグルコースが持っていた電子を受け取り、酸素イオン（ $\text{O}^{2-}$ ）に還元されたとも言える。そういう意味ではグルコースは電子供与体、酸素分子は最終電子受容体であると言える。酸素を使いエネルギーを獲得できる微生物を好気性微生物と呼ぶが、一方、酸素の無い環境下（anaerobic condition）でも多くの微生物が生きている。これらをまとめて嫌気性微生物と呼ぶ。嫌気性微生物はエネルギーの獲得の仕方によりさらに細かく分類される。

生物の使うことができる電子受容体は分子状酸素の他にいくつか有る。例えば硫酸の場合、



となり、+6価の硫黄イオンが-2価にまで還元され、硫化水素として放出される。このようにして硫酸を最終電子受容体としてエネルギーを獲得する微生物を硫酸還元菌という。同様に、硝酸(NO<sub>3</sub>)や鉄イオン(Fe<sup>3+</sup>)なども電子受容体として用いられる。上記反応は、有機物中の電子が最終電子受容体に受け渡される過程でエネルギーを獲得するという意味で分子状酸素を利用した呼吸と同じである(嫌気呼吸)。特に、硫酸や硝酸イオンなど酸素含む電子受容体が存在する場合、嫌気状態と区別して無酸素状態(anoxic condition)とも呼ぶことがある。

しかし、上記のような電子受容体が環境中に常に存在するとは限らない。電子受容体が存在しない場合、微生物は別の方法で有機物を代謝しエネルギーを獲得する。例えば、乳酸菌の場合グルコースを乳酸に代謝する。



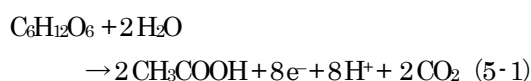
この代謝過程で微生物はグルコース1モルから2モルのATPを得る。同様に酵母などのエタノール生産菌は、以下の反応によりやはり1モルのグルコースから2モルのATPを獲得する。



これを基質レベルのリン酸化と呼び、先ほどの呼吸とは異なるエネルギー獲得方法である。このように外部に電子受容体が存在しない場合、ここで重要なことは、微生物が基質レベルのリン酸化により増殖のためのエネルギーを得る場合、有機物は完全には分解されず、水と二酸化炭素以外のなんらかの最終産物に変換されるということである。

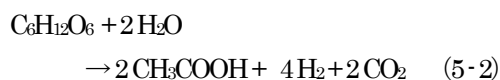
式3と4を再び見ていただきたい。反応の酸化還元バランスは完全にとれており水素生成の余地は無い。しかし、微生物全てが乳酸のみ、エタノールのみを生産するわけではない。有機物が微生物により腐敗したとき非常に臭いのは、硫酸還元による硫化物イオンの生成とともに、多くの場合、乳酸の他、酢酸、プロピオン酸、酪酸などの有機酸が同時に生産されるためである。特に酪酸の臭いは強烈である。有機酸の他にもエタノール、ブタノールなどのアルコール類も同時に生産される。

微生物がグルコースから嫌氣的に酢酸を生成する時の反応は以下ようになる。

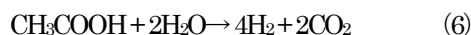


ここでe<sup>-</sup>は電子をあらわす。電子を別にしたのは微生物がグルコースから酢酸を生産する場合、余剰の電子が生じることを理解していただくためである。余剰電子は生体内で

は、ニコチンニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD<sup>+</sup>)、フェレドキシンなどの中間電子受容体に一旦貯められる。大腸菌などの通性嫌気性(酸素があってもなくても代謝を変えて生存できる)微生物は、上記中間電子受容体を還元する代わりにギ酸を生成する。これら、中間電子受容体は生体内には一定量しか存在しないので、余剰の電子を処理しなければ反応は停止し、細胞は死滅する。酸素などの電子受容体が存在する場合、電子を酸素原子に受け渡すが、適当な電子受容体が存在しない場合、微生物はヒドロゲナーゼを介して水素イオンを電子受容体として電子を処理する。これが、発酵における水素ガス生成の理由である。言い換えれば、水素生成は生体内での酸化還元バランスを維持するために行われる。



ただし、下式のように酢酸をさらに代謝して水素を作ることとはできない。



これは、6式が常温、常圧で自由エネルギーが正の吸エルゴン反応であるからである。発酵生産の場合、外部から光などのエネルギーが与えられないので反応は進行しないが、発酵水素生産以外のもう一つの生物的水素生産法である光水素生産では、光をエネルギー源として与えるので、酢酸からの水素生産は可能である。従って、発酵水素生産におけるグルコース1モルからの最大水素収率は4モルとなる。*Clostridium*など偏性嫌気性微生物における水素は、フェレドキシン経由で生産される。解糖系で生じるNADHもNADH-フェレドキシン還元酵素によりフェレドキシンを還元するために使われるので [1]、最大水素収率は上記の通り4mol/molグルコースとなる。実際には、酢酸以外に、プロピオン酸、酪酸、乳酸などの有機酸や、エタノールなどのアルコール類を同時に副生するとともに、電子の一部は菌体構成成分に利用されるため水素収率は4モルより低い。

## 2. 単一菌による発酵水素生産速度の向上戦略

以上、嫌気性微生物がなぜ水素を生成するかを説明したのは、微生物による水素生産を効率化するためには、エネルギー代謝、つまりエネルギー(ATP)獲得のための基質代謝と中間電子受容体の酸化還元バランスの制御方法を知ることが非常に重要であることを理解していただき

かったためである。筆者らはこれまでに、中温高速メタン発酵汚泥から高速水素生産菌として単離した *Enterobacter aerogenes* HU101株をモデルとして水素生産効率化に関する検討を行ってきた。水素生産菌としては先に述べた *Clostridium*属などの偏性嫌気性菌について検討が多く行われてきたが [2-7]、大腸菌や *Enterobacter*などの通性嫌気性菌は、最大水素収率が2mol/mol-グルコースと低いものの(理由は後述)、一般的に毒性が少なく取り扱いが容易であり、また水素による阻害が少なく培養が非常に簡単であるという特徴を持っていることから、本菌による水素生産の効率化を目指すこととした。また、それまでに、水素高収率生産菌の単離や培養方法の工夫などの検討は広く行われてきたが、高収率生産菌の育種に関する検討が見えなかったことも本研究を行う原動力となった。

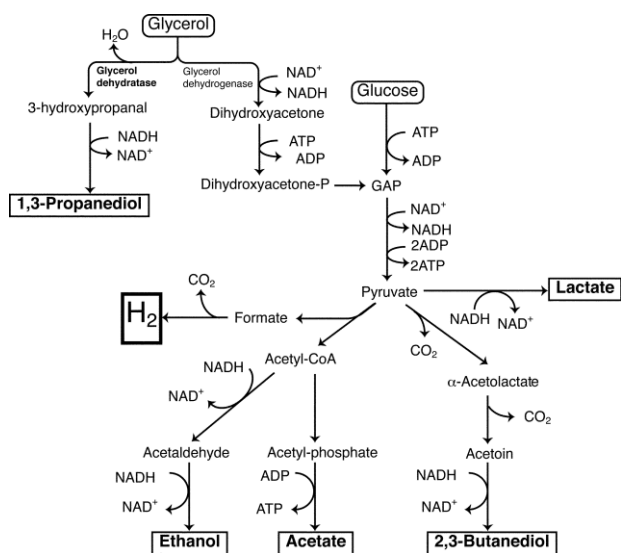
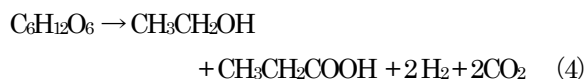


図1. *E. aerogenes*によるグルコースおよびグリセロールの嫌気代謝経路

*E. aerogenes* HU101株によるグルコースの予想嫌気代謝経路を図1に示す。まず、グルコースは解糖系でピルビン酸に分解される。ピルビン酸からはピルビン酸ギ酸リアーゼの作用によりギ酸とアセチルCoAが生成する。水素はここで生成されたギ酸からつくられる。アセチルCoAからはエタノールまたは酢酸が生成する。グルコース1モルからエタノールと酢酸それぞれ1モル生成する時、2モルの最大水素収率が得られる。



しかし、ピルビン酸からは他に水素生成には関与しない2,3-ブタンジオールおよび乳酸が多く生成する。このため、野生株における水素収率は通常0.5~1mol/mol-グルコースと理論値よりもかなり低い。

そこで筆者らは、まず、水素生産を低下させる要因である乳酸及び2,3-ブタンジオール生産能を抑制または欠損させた変異株を取得することとした [8]。野生株を変異処理した後、有機酸生成に起因するpH低下により増殖を阻害するプロトン自殺法を用いて有機酸生成抑制変異株を取得し、水素収率の向上を確認した。さらに、アリルアルコール法を用い、アルコール類の合成に必要なアルコール脱水素酵素系を欠損、または抑制した変異株を選抜したところ、やはり水素収率は向上した。さらに、上記の選抜法を組み合わせた二重変異株AY-2株を作成したところ、グルコース1モルあたりの水素生産収率は野生株の約2倍である1.5モルに向上した。ただ、これらの選抜法では、水素生成に同期するエタノール、酢酸生成も抑制してしまうことから、ダイアセチル、アセトイン検出法であるVoges-Proskauer (VP) 法を用いて2,3-ブタンジオールのみをターゲットとして2,3-ブタンジオール非生成株を作製したところ、その中で2,3-ブタンジオールのみならず同時に乳酸を生成しないVP-1株を取得できた。本変異株は、ギ酸の蓄積が見られたものの、理論的最大収率とされる2 mol/molグルコースの水素+ギ酸収率を達成した [9]。

表1. 微生物固定化による水素生産の例 (文献 [10]より一部改変)

微生物	担体	<sup>a</sup> 基質	<sup>b</sup> 濃度	<sup>c</sup> 生産速度	<sup>d</sup> 収率	文献
<i>E. aerogenes</i> HO-39	多孔性ガラスビーズ	Glu	10	38	0.73	[11]
<i>C. butyricum</i> IFO13949	多孔性ガラスビーズ	Glu	5	51	1.9	[12]
<i>E. aerogenes</i> E.82005	ウレタンフォーム	Mol	20	10	1.8	[13]
<i>E. aerogenes</i> AY-2	自己凝集菌体	Glu	15	58	1.1	[14]
<i>E. aerogenes</i> HU-101	自己凝集菌体	Gly	10	80	0.95	[15]
<i>E. cloacae</i> IIT-BT 08	リグノセルロース担体	Glu	10	76	1.8	[16]
嫌気馴養汚泥	活性炭	Suc	18	59	1.3	[17]

<sup>a</sup> Glu, グルコース; Suc, スクロース; Gly, グリセロール, Mol, 蔗糖蜜, <sup>b</sup> g/l, <sup>c</sup> mmol/h, <sup>d</sup> mol/mol-基質

培養システムを簡単かつ小型化することはシステムの初期製造コストを低減するために非常に重要な課題である。小型化のためにはリアクター体積あたりの基質負荷速度ができる限り高いほうが良い。その方策としては、先に述べた水素収率の向上の他に、菌体を適当な担体に固定化することにより高密度化した固定床プロセスが有効である。表1に示す通り、これまでに、いくつかの担体を用いた水素生産法が報告されている。著者らは、*E. aerogenes*の固定床リアクターを運転中、菌体がリアクター底部に顆粒状に自己凝集することを発見した。そこで本菌の自己凝集性を利用した固定床リアクターによる水素生産を検討したところ、期待通り自己凝集菌体がリアクター内部に貯留され、グルコース15g/l、滞留時間1.5時間で野生株の場合、30mmol/h、変異株を用いた場合では58mmol/hの連続水素生産が可能であった [18]。

### 3. *E. aerogenes*による様々な炭素源からの発酵水素生産

*E. aerogenes*はグルコースを始め、キシロース、マンニトールなど、様々な炭水化物を利用し水素を生産することが知られている。本菌の利用基質に関しては谷生らが糖類、有機酸、アルコール、アミノ酸、ビタミン及び補酵素からの水素生産を検討し、マンニトール、ソルビトールを用いた場合の水素収率はグルコースの1.6倍と高くなることを報告している [19]。我々はこれに着目し、様々な糖および糖アルコールを基質として用いたとき、その基質の性質と水素生産に何らかの因果関係があるのではと考え検討した [20]。基質濃度10g/lとして24時間培養後の発酵代謝産物の基質重量当たりの水素収率を調べたところ、それまでの報告通り、糖アルコールであるマンニトール、ソルビトールの水素収率がグルコースと比較して2.5倍以上高かった。グリセロールに至ってはグルコースと比較して3.3倍もの水素収率で水素を生産することがわかった。ここで、用いる炭素源により水素収率が違うのは、炭素源の還元度の違いが大きく関与していることが推測された。例えば、お互いが異性体関係にある糖（例えばグルコース、フルクトース、ガラクトース）の場合、同じような水素収率を示す。一方、マンニトールなどの糖アルコールでは水酸基が一つ多く、グリセロールは炭素1原子に一つの水酸基が結合している非常に還元度の高い基質である。そこで、この関係をよりはっきりさせるために、炭素1原子当たりの有

効電子数 ( $C_{AVE}$ ) を定義し、有効電子数に対する水素収率を求めた。ここで、有効電子数は以下のように定義される。

$$C_{AVE} = (\text{基質の有効電子数}) / (\text{基質の炭素数})$$

基質の有効電子数は、 $C=4$ 、 $O=-2$ 、 $H=1$ として計算し、例えばグルコースの場合、 $C_6H_{12}O_6$ なので有効電子数は $6 \times 4 + (-2) \times 6 + 1 \times 12 = 24$ となる。従ってグルコースの炭素1原子当たりの有効電子数 $C_{AVE} = 24/6 = 4$ と計算できる。このようにして計算した場合、グルコン酸の有効電子数は3.67、グルコース、フルクトース、スクロース、ガラクトース及びキシロースは4、ソルビトール、マンニトールは4.33、グリセロールは4.66となり、異なった炭素源の水素収率に関する直接の比較が可能となる。実際に、炭素1原子当たりの有効電子数に対し、炭素1原子当たりの発酵代謝産物収率を図2のようにプロットした。すると、水素収率はキシロースを除いて有効電子数に比例して向上することがわかった。水素収率とエタノール収率が連動して増加していることから、還元度の高い基質を用いた場合、ピルビン酸-ギ酸リアーゼを経由することにより生産されるエタノール生成活性が増加し、その結果として水素収率が向上するものと考えられる。

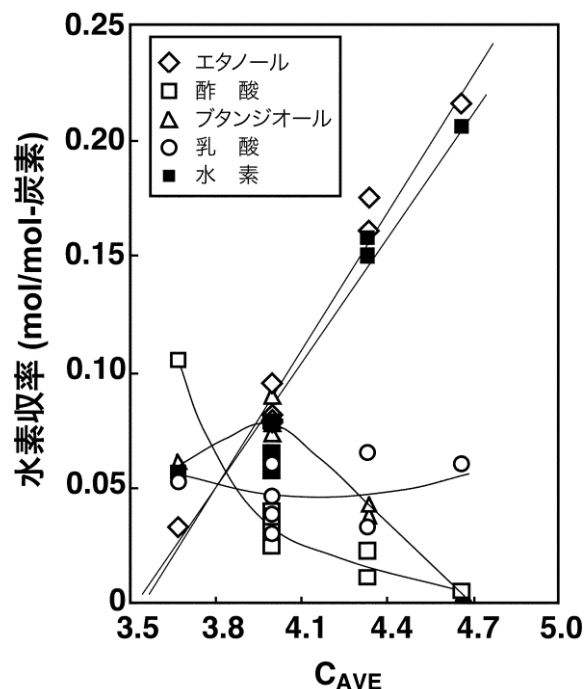


図2. 炭素源の還元度と代謝物生産の関係 (文献 [20] より)

キシロースを用いた場合、グルコース、フルクトースなどの同じ還元度を持った炭水化物と比較して3倍以上の高

い水素収率となった。これは、エタノールおよび酢酸生成量がグルコース、フルクトースなどと比較して劇的に増加したことが要因であったが、なぜ代謝が変化したのかは現在不明である。キシロースは他の炭素源とは違い、ペントースリン酸サイクルを経て解糖系に流入することから、違う代謝制御を受ける可能性が考えられる。その代謝制御機構を明らかにすることが出来れば、他の基質においても更なる水素収率を向上させる方策を見出すことが可能と示唆される。また、実用面から考えた場合、キシロースはバイオマスの主要構成糖の一つであることから、キシロースの水素収率が高いことは本菌を水素生産菌として利用するうえで一つの利点となる。

#### 4. 微生物フローラによる種々の炭素源からの発酵水素生産

筆者らは単一菌 *E. aerogenes* を用いた水素生産について主に検討してきた。しかし、食品系有機廃棄物から水素を生産する場合、非滅菌系での運転が現実的であり、この場合、雑菌汚染は避けられず、単一菌での水素生産は難しい。このため、メタン発酵汚泥などを微生物源として、水素生産能が高くなるように馴養・安定化した微生物集団（フローラ）を用いることが考えられている。実際、微生物フローラを用いた有機廃棄物からの水素生産についてこれまでに多く報告されている [21-25]。しかし、用いられた実廃水は主に糖系廃棄物が主であり、食品廃棄物に多く含まれるタンパク質や油脂などが水素生産に及ぼす影響に関する報告は無かった。そこで、筆者らは、糖などの炭水化物、タンパク質またはその加水分解物、さらに油脂を単一炭素源とした場合の水素生産性を評価した [26]。中温メタン発酵汚泥を微生物源として、糖、糖アルコール、タンパク質（アミノ酸）、油脂を炭素源として水素生産を試みたところ、従来の報告通り、糖および糖アルコールからは著量の水素が生成した。一方、タンパク質および油脂からの水素生産はほとんど見られなかった。タンパク質を炭素源とした場合、糖の場合と同等またはそれ以上の有機酸が生成したことから、水素生成に必要な還元力は、アミノ酸分解時のスティックランド反応 [27]により消費されたと推定された。一方、油脂を用いた場合、有機酸生成もほとんど見られなかった。このように、有機物の種類により水素生成量は大きく異なる。さらに、糖質に加え脂質、タンパク質含量の高い赤ヌカおよび脂質・タンパク質含量の低い白ヌカをモデル基質として水素生産性を検討したところ、

赤ヌカおよび白ヌカの水素生産速度は、負荷速度10g/日において、それぞれ33、66mmol/日であった。一方、糖質、タンパク質、そして脂質単品を含量が同一になるように調整した人工赤ヌカおよび白ヌカについて同様に調べたところ、それぞれ30、75mmol/日となり、天然物とほぼ同じ水素生産速度となった。このことから、タンパク質および脂質は生物的水素生産に寄与しないが、顕著な悪影響を及ぼすものでもないことが示唆された。

#### 5. バイオディーゼル製造廃液からの水素-エタノール生産

先に述べた通り、*E. aerogenes* HU101株を用いた水素生産にはグリセロールが非常に良い基質であることがわかった。また、その副生成物としてはエタノールが主に生産された。その理由は、グリセロール代謝における酸化還元バランスを考えると理解できる。図1に示した通り、グリセロールはグリセルアルデヒド三リン酸を經由して解糖系に入り代謝される。この時、1モルのグリセロールから2モルのNADHと1モルのアセチルCoAが生成する。そして2モルのNADHがアセチルCoAからのエタノール生成に用いられることにより、炭素バランス及び還元力バランスが満たされるからである。そこで、グリセロールを基質として（濃度10g/l）、HU-101株凝集菌体を用いた連続水素発酵を行ったところ、滞留時間50分で水素生産速度80mmol/h、0.8 mol/molのエタノール収率が得られた [15]。理論上のエタノール収率は1mol/molグリセロールであるが、1,3-プロパンジオールが副生したためエタノール収率は低下した。

グリセロールは現在、再生可能エネルギーとして、また自動車燃料として大いに期待されている水素とエタノールを同時に高速生産しうる優れた基質であった。そこで筆者らは、廃食油などからつくられるバイオディーゼル製造において脂肪酸のメチルエステル化後に発生する高濃度グリセロールを含む廃液に着目し、水素-エタノール同時発酵法による廃食油の完全エネルギー化を検討した。その結果、セラミック固定化担体を導入することで、廃液を用いた場合でも60mmol/hの水素生産速度、エタノール収率0.85mol/molグリセロールでの連続生産が可能であることがわかった。廃食油1000lを処理すると仮定して、この結果を用いて計算すると、930lのバイオディーゼル燃料、145m<sup>3</sup>の水素、そして約50lのエタノールが生産できることになる。ただし、現状では廃液を希釈する必要があるため

最終エタノール濃度が低く、エタノール精製工程でのコスト高が懸念される。今後は、高濃度グリセロール耐性菌のスクリーニングなどによる更なる生産性の向上を図りたい。

## 6. おわりに

本総説では、著者らが主に検討を行ってきた通性嫌気性微生物 *E. aerogenes* HU-101株を用いた、発酵水素生産の効率化手法および実有機廃棄物を用いた水素生産について概説した。発酵水素生産では微生物のエネルギー代謝による制限から、水素収率の上限が存在し、水素の他に酢酸をはじめとして必ず何らかの副生物が生ずる。その副産物もまだエネルギーを含んでおりその有効活用法が非常に重要な課題である。今回紹介したバイオディーゼル製造廃液を用いた水素・エタノール法の他にも、水素発酵のあとにメタン発酵を行う二段法、光合成細菌を用いた有機酸から光水素生産法、そして微生物燃料電池を連結した電気生産などいくつかのプロセスが提案されている。これらのどれかが本命ということではなく、廃棄物の種類と微生物代謝に関する様々な情報を総合的に理解、活用し、どのようなプロセスが最適化を常に考えながら検討を進めることが発酵水素生産を今後活用してゆくためには必要であろう。

## 参考文献

1. L. Girbal, C. Croux, I. Vasconcelos and P. Soucaille: *FEMS Microbiol. Rev.* 17, 287-297 (1995).
2. R. Islam, N. Cicek, R. Sparling and D. Levin: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 576-583 (2006).
3. F. Taguchi, K. Yamada, K. Hasegawa, T. Taki Saito and K. Hara: *J. Ferment. Bioeng.* 82, 80-83 (1996).
4. F. Taguchi, N. Mizukami, T.S. Taki and K. Hasegawa: *Can. J. Microbiol.* 41, 536-540 (1995).
5. O.A. Nikitina, S.S. Zatspein, S.V. Kalyuzhnyi, E.I. Rainina, S.D. Varfolomeev, A.L. Zubov and V.I. Lozinski: *Microbiology.* 62, 296-301 (1993).
6. M. Heyndrickx, A. Vansteenberghe, P. Devos and J. Deley: *Sys. Appl. Microbiol.* 8, 239-244 (1986).
7. J.D. Brosseau and J.F. Zajic: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 32, 496 (1982).
8. M.A. Rachman, Y. Furutani, Y. Nakashimada, T. Kakizono and N. Nishio: *J. Ferment. Bioeng.* 83, 358-363 (1997).
9. T. Ito, Y. Nakashimada, T. Kakizono and N. Nishio: *J. Biosci. Bioeng.* 97, 227-232 (2004).
10. 西尾 尚道, 中島田 豊, 沖 泰弘, 三谷 優: *クリーンエネルギー*. 14, 55- 59 (2005).
11. H. Yokoi, T. Tokushige, J. Hirose, S. Hayashi and Y. Takasaki: *J. Ferment. Bioeng.* 83, 481-484 (1997).
12. H. Yokoi, Y. Maeda, J. Hirose, S. Hayashi and Y. Takasaki: *Biotechnol. Tech.* 11, 431-433 (1997).
13. S. Tanisho and Y. Ishiwata: *Int. J. Hyd. Ener.* 20, 541-545 (1995).
14. M.A. Rachman, Y. Furutani, Y. Nakashimada, T. Kakizono and N. Nishio: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49, 450-454 (1998).
15. T. Ito, Y. Nakashimada, K. Senba, T. Matsui and N. Nishio: *J. Biosci. Bioeng.* 100, 260-265 (2005).
16. N. Kumar and D. Das: *Enz. Microbiol. Technol.* 29, 280-287 (2001).
17. J.-S. Chang, K.-S. Lee and P.-J. Lin: *Int. J. Hyd. Energy.* 27, 1167-1174 (2002).
18. M.A. Rachman, Y. Furutani, Y. Nakashimada, T. Kakizono and N. Nishio: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49, 450-454 (1998).
19. 谷生 重晴: *醗酵工学会誌*. 67, 29-34 (1989).
20. Y. Nakashimada, M.A. Rachman, T. Kakizono and N. Nishio: *Int. J. Hyd. Ener.* 27, 1399-1405 (2002).
21. H. Yokoi, R. Maki, J. Hirose and S. Hayashi: *Biomass Bioener.* 22, 389-395 (2002).
22. Y. Ueno, S. Otsuka and M. Morimoto: *J. Ferment. Bioeng.* 82, 194-197 (1996).
23. H. Yu, Z. Zhu, W. Hu and H. Zhang: *Int. J. Hyd. Ener.* 27, 1359-1365 (2002).
24. 中島田 豊, 西尾 尚道: *水素利用技術集成Vol. 2- 効率的大量生産・CO<sub>2</sub>フリー・安全管理*, pp 46-52, エヌ・ティー・エス (2005).
25. J.J. Lay, Y.J. Lee and T. Noike: *Water Res.* 33, 2579-2586 (1999).
26. 中島田 豊, 西尾尚道: *水*. 49, 70-74 (2007).
27. M. Madigan, J. Martinko and J. Parker: *Brock Biology of Microorganisms*. Prentice Hall, NJ (2000).