The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	緑藻の嫌気代謝を基礎とする水素生産システムに関する研究
Author(s)	太田, 壮一
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/35349
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

緑藻の嫌気代謝を基礎とする
水素生産システムに関する研究

目次

緒論 ---------- 1

本論 ---------- 3

第１章　高水素発生能を有する緑藻の選抜およびその選抜株の増殖能 -- 3

第１節　緒言 ---------- 3
第２節　実験方法 ---------- 4
第３節　結果および考察 ---------- 6
第４節　要約 ---------- 7

第２章　緑藻の暗水素発生の向上

第１節　緒言 ---------- 8
第２節　実験方法 ---------- 8
第３節　結果および考察 ---------- 9
(1)デンプン蓄積量と暗水素発生量の関係 ---------- 9
(2)ヒドロゲナーゼ活性と暗水素発生の関係 ---------- 12
(3)緑藻のデンプンから水素への変換率とデンプン分解量の比較-- 13
第４節　要約 ---------- 14

第３章　緑藻の嫌気代謝における水素発生 ---------- 15

第１節　緒言 ---------- 15
第２節　実験方法 ---------- 15
第３節　結果および考察 ---------- 15
(1)緑藻の発酵生産物の比較 ---------- 16

(2)緑藻の暗水素発生経路 ---------- 16
(3)環境条件変化による緑藻の還元力消費形式の変動 ---------- 18
第4節　要約 ---------- 24

第4章　緑藻-光合成細菌の混合培養による水素生産 ---------- 25
第1節　緒言 ---------- 25
第2節　実験方法 ---------- 26
第3節　結果および考察 ---------- 26
(1)緑藻Chlamydomonas reinhardtiiの発酵生産物と光合成細菌
Rhodospirillum rubrumの基質利用性 ---------- 26
(2)Rhodospirillum rubrumの暗水素発生 ---------- 27
(3)緑藻-光合成細菌の混合効果 ---------- 28
(4)混合系の水素発生における細胞濃度の効果 ---------- 30
(5)混合培養系による明暗サイクルを利用した水素生産システム-- 32
第4節　要約---------- 34

総括 ---------- 35

謝辞 ---------- 36

引用文献 ---------- 37

緒論

将来のエネルギー資源不足、石炭、石油等の化石燃料の大量消費に伴う環境破壊など、エネルギー供給に関連した問題が世界的に深刻化している。したがって、化石燃料などのエネルギー資源に代わる新しい無公害エネルギー資源の開発が切望されている。特に、水素は、クリーンなエネルギー源として、将来多くの分野で利用されると期待されており、これを安価かつ大量に生産するシステムの開発が試みられている。

生物は、生体内できわめて複雑かつ効率的な化学反応を安定に進行させながら、生命活動を行っている。近年、生物体の優れた機能を利用して、食品、医薬品、エネルギーなどを生産しようとする研究が注目されている。緑藻は、太陽エネルギーを効率よく利用して増殖し、明あるいは暗嫌気条件下において水素を発生することができる。

緑藻による水素発生は、1942年、GaffronとRubinによって緑藻 Scenedesmus sp.において初めて見いだされた。[1]それ以後、緑藻を用いた水素生産システムに関する研究成果が多数報告されてきたが、[2,3,4,25,27]そのほとんどの報告が光水素発生方式によるものであり、暗水素発生方式によるものは極めて少ない。
この原因としては、多くの研究者が、緑藻の明条件下における水素発生速度の大きさにあまりにも注目しすぎたためであった。すなわち、緑藻の光水素発生においては、光エネルギーを水素発生反応に対する駆動力として利用するため、初期の水素発生速度は非常に大きい。しかしながら、光照射することによって同時に発生する酸素が、水素発生酵素であるヒドロゲナーゼに阻害的に作用するため、水素発生はすぐに停止してしまい、安定した水素生産システムを構築することが困難であった。したがって、緑藻の光水素発生能を利用した水素生産システムに関する研究においては、この酸素からいかにヒドロゲナーゼを保護し、安定に機能させるかが最も重要な検討課題となっている。[25,31]

それに対して、緑藻の暗水素発生においては、光水素発生と比較して、発生速度は小さいものの、酸素発生によるヒドロゲナーゼの阻害もなく安定した水素生産システムの構築が可能である。それゆえに、ヒドロゲナーゼが安定に機能するという利点に着目して、三浦らは、緑藻の暗水素発生能を利用した淡水産

緑藻 Chlamydomonas reinhardtiiによる水素生産システムについて報告している。[5,6]

本研究では、緑藻の暗水素発生速度の改善を目的として、自然界より高水素発生能を有する海産性緑藻Chlamydomonas MGA 161を単離し、この株および他の代表的な緑藻の嫌気代謝の特徴について比較検討した。また、緑藻の嫌気代謝の検討結果から得られた知見を基礎として、優れた生産性および持続性を有する水素生産システムの開発の可能性についても検討を加えた。

すなわち、本論文の第１章では、近畿地区数カ所の沿岸より、高水素発生能を有する海産性緑藻Chlamydomonas MGA 161を単離し、この株の増殖条件について検討した。第２章では、MGA 161株の暗水素発生を向上させるために、デンプン蓄積量、ヒドロゲナーゼ活性発現、デンプンから水素への変換率、デンプン分解速度について検討を加えた。第３章では、MGA 161株と他の緑藻の発酵現象を比較し、それぞれの株の嫌気代謝の特徴について考察した。第４章では、緑藻の嫌気代謝から得られた知見を基礎として、緑藻-光合成細菌の混合培養による水素生産システムについて検討した。

本論

第１章　高水素発生能を有する緑藻の選抜およびその選抜株の増殖能

第１節　緒言

Biophotolysis（水の生物学的光分解）とは、緑色植物あるいは、藻類の光合成器官を用いて、水から水素を生産することと定義される。　図１は、　緑藻のBiophotolysis Systemを示している。緑藻は、昼間、細胞内にデンプンを蓄積し、夜間、嫌気条件下でデンプンを基質とする発酵を行い、水素をはじめ、酢酸、エタノール、ギ酸などの発酵生産物を生成できる。すでに、この様な緑藻の性質を利用した、安定な水素生産システムが実証されてきた。[6,14]　本章では、水素生産性の向上を目的として、自然界より高水素発生株の選抜を行い、その選抜株の増殖条件について検討した。

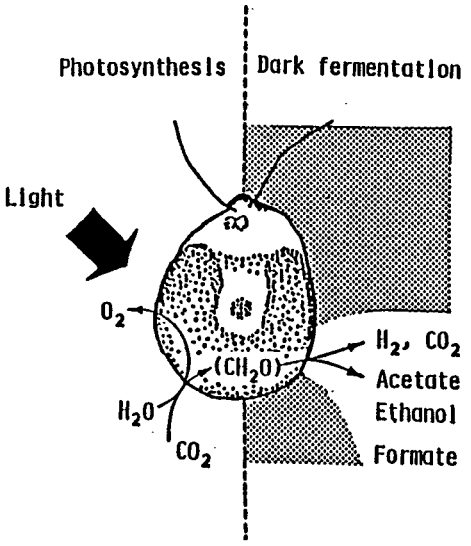

Fig. 1　Green Algal Biophotolysis System

第２節　実験方法

(1) 海産性緑藻の検索および分離

近畿地区数カ所の沿岸より、　海水、海草、泥等を採集し、　検鏡下、緑藻の存在が確認されたサンプルを表１に示した栄養添加海水培地(OK培地)を用いて、15 W/m²の光照射下、25°C、静置条件下で集積培養した。[7,8]それから、寒天平板法を用いて１６７の株を分離した。

(2)　培養方法

１６７の分離株は、それぞれOK培地に植菌され、5% 炭酸ガスを含んだ空気を300ml/minの速度で連続的に通気しながら、25W/m²の光照射下、30°Cで培養を行った。また、選抜された高水素発生能を有する緑藻Chlamydomonas MGA 161に対しては、新たに調製した合成培地である岡本改変培地（表２）を用いて培養を行った。その他の培養条件に関しては、上記方法に準じて行った。

(3) 水素発生活性の検出

対数期の藻を集菌し、OK培地で洗浄し同じ培地にて懸濁後、この藻懸濁液10mlを遮光した試験管に分注した。次に、この試験管をゴム栓で密閉し、気相部を窒素で20分間ガス置換した後、レシプロシェーカー(100 rpm)により、30°Cで振とうを加えた。この時、発生した水素は、ガスクロマトグラフ法により定量した。

Table 1 Composition of OK medium

$NaNO_3$	120 mg
K_2HPO_4	5 mg
Vitamin B_1	100 µg
Vitamin B_{12}	1 µg
Vitamin H	1 µg
Fe-EDTA	239 µg
Mn-EDTA	332 µg
Tris	1 g
Soil extract	50 ml
Sea water	1000 ml

Adjusted to pH 8.0 by 0.2N-HCl

Table 2-1

Composition of Modified Okamoto medium

NaCl	30 g
NH_4Cl	0.27 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.20 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.25 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.02 g
KH_2PO_4	0.04 g
K_2HPO_4	0.50 g
Vitamin B_1	100 µg
Vitamin B_{12}	1 µg
A'_5 solution	1 ml
Dist. water	1000 ml

Adujusted to pH 8.0 by 0.2N-HCl

Table 2-2

Composition of Trace-metal mix A'_5

H_3BO_3	2.86 g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1.81 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.22 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.08 g
Na_2MoO_4	0.02 g
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.01 g
EDTA·2Na	50 g
Dist. water	1000 ml

第３節　結果および考察

海水の有効利用および高水素発生株の検索をという観点に立ち、海産性微細藻を分離して、その増殖能および水素発生能に関して報告している例は極めて少ない。[26,28,36]図２は、分離された１６７株の海産性微細藻の暗水素発生能の分布を示している。高水素発生能を有する株が４株得られた。そして、ほとんどの株の暗水素発生能は、mg乾燥重量当り、９時間で、平均0.30±0.16 μmolの水素発生を示したのに対して、この４株は、1.91±0.45 μmolの水素発生を示していた。さらに、この４株に絞り、６回の繰り返し実験および水素取り込みの実験を行った結果、挿入図に示されているように、良好な成績を示した３株の中から、任意にMGA 161株を選び、本研究に供試した。この株は、鞭毛を有する単細胞の微細藻で、神戸大学の坪由宏教授により、クラミドモナス属の緑藻であると同定された。

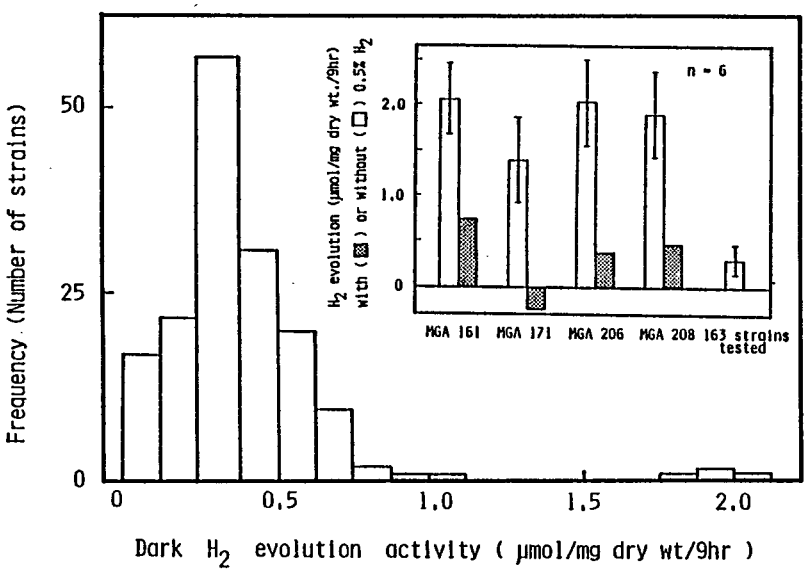

Fig. 2 Distribution of H_2 evolution activity of newly isolated marine microalgae

図３は、この選抜されたMGA 161株の増殖能を検討したものである。この株は、15-35°Cの範囲で増殖し、至適温度は30 °Cであった。また塩濃度を変化させた場合は、0.5-3.0 %で良好な増殖を示したものの、　それ以上の塩濃度では、この株の増殖は、阻害されていた。それゆえに、MGA 161株は、好塩性の緑藻というよりは耐塩性の緑藻であると考察された。さらに、岡本改変培地の調製の過程において、この株はVitamin B_1およびB_{12}を要求することもわかった。以上の検討より、MGA 161株の最大比増殖速度が、0.1hr^{-1} にまで向上した。

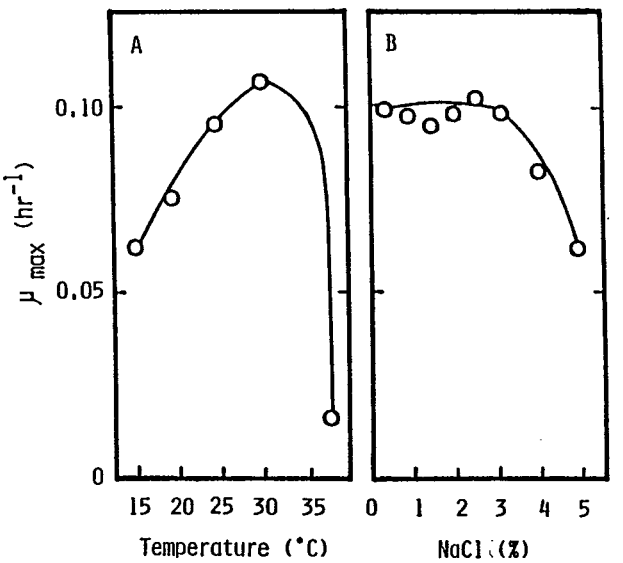

Fig. 3 Effects of temperature(A) and NaCl concentration(B) on the maximum specific growth rate of Chlamydomonas MGA 161

第４節　要約

近畿地区数カ所の沿岸より、分離された167株の微細藻の中から高水素発生能を有する海産性緑藻Chlamydomonas MGA 161が選抜された。　この株は新たに調製した合成培地にて良好な増殖を示し、また高い水素発生が観察された。したがって、選抜されたこの株を用いることによって、効率のよい、安定な水素生産系の開発の可能性が示唆された。

第２章　緑藻の暗水素発生の向上

第１節　緒言

緑藻の暗水素発生を向上させるためのアプローチとして４つの指針が考えられた。まず最初に、水素発生の基質となるデンプンをより多く蓄積させること。次に、水素発生酵素であるヒドロゲナーゼの活性を、高く、速やかに誘導すること。３番目には、デンプンから水素への変換率を高めること。最後に、デンプン分解過程の全体速度を高めることが、暗水素発生向上のために重要であると考えられる。そして、この指針に従い、MGA 161株に対して各項目ごとに検討を行なった。

第２節　実験方法

(1) 培養方法

分離したChlamydomonas MGA 161に対しては岡本改変培地を用いて、[7]また、東京大学応用微生物研究所より譲り受けた Chlamydomonas reinhardtii C-238, Chlorella pyrenoidosa C-212, Chlorococcum minutum C-138に対しては表３に示したブリストール改変培地を用いて、[7]5%炭酸ガスを含んだ空気を通気しながら、これら緑藻を25W/m^{2}の光照射下、30°Cで培養した。

(2) 暗水素発生

対数期の藻を集菌し、培養時に用いたおのおの培地で洗浄し懸濁した後、、この懸濁液10mlを遮光した試験管に分注した。次に、この試験管をゴム栓で密閉し、気相部を窒素で20分間ガス置換した後、レシプロシェーカー(100 rpm)により、30°Cで振とうを加えた。この時、発生した水素は、ガスクロマトグラフ法により定量した。

(3) ヒドロゲナーゼ活性測定法

発酵期間中に誘導されたヒドロゲナーゼ活性は、Triton-X100(終濃度0.1%)で処理した後、還元型メチルビオローゲン(2.5 mM)依存の１０分間の水素発生量より、1時間当り、乾燥重量1 mgの藻が発生する水素量に換算し表示した。[9]

(4) デンプンの定量

デンプンは、広川らの方法を改変した方法により、[10]藻体から抽出し、ヨーソデンプン反応法[10]および酵素法[15]により定量し、グルコース単位で表した。

Table 3-1

Composition of Modified Bristol medium

NaCl	25 mg
NH_4Cl	270 mg
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	10 mg
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	75 mg
KH_2PO_4	40 mg
K_2HPO_4	500 mg
A_5 solution	1 ml
Fe solution	1 ml
Dist. water	1000 ml

Adujusted to pH 7.0 by 0.2N-HCl

Table 3-2

Composition of Trace-metal mix A_5

H_3BO_3	2.86 g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1.81 g
$ZnSO_4 \cdot 5H_2O$	0.22 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.08 g
Na_2MoO_4	0.02 g
conc. H_2SO_4	1 drop
Dist. water	1000 ml

Table 3-3 Fe solution

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1.0 g
conc. H_2SO_4	2 drop
Dist. water	1000 ml

第３節　結果および考察

(1) デンプン蓄積量と暗水素発生量の関係

緑藻の暗水素発生はデンプンを主とする内部基質の発酵によるものである。[11,12]　したがって、デンプン蓄積量が暗水素発生の制限因子となる可能性が

あり、この点について検討した。表4は、デンプン蓄積量と暗水素発生量の関係を示している。 MGA161株は、通常の培養条件では、細胞内にmg乾燥重量当り、1.1μmolのデンプンを蓄積していたのに対して、高塩濃度、窒素制限、低温条件下で培養することによって、デンプン蓄積量の増加が観察された。そして、このデンプン蓄積量の増加効果は、これら条件下における緑藻の増殖の抑制によるものと考察した。しかしながら、デンプン蓄積量の増加に見合った暗水素発生量の増加は認められなかった。

Table 4 Relationship between starch accumulation and H_2 evolution

Growth conditions	Starch accumulation (A) (μmol glucose/mg dry wt)	Hydrogen evolution (B) (μmol/mg dry wt/6hr)	B/A
Standard	1.1	1.1	1.00
5% NaCl	1.6	0.83	0.52
7% NaCl	1.8	1.1	0.61
0.5 mM NH_4Cl	1.8	0.88	0.49
20°C	2.4	1.3	0.54

Algal cells were normally grown at 3% NaCl, 5 mM NH_4Cl and 30°C (Standard conditions). In this series of experiments, cells were also grown under the conditions modified as indicated, but dark anaerobic incubation was carried out under the standard conditions. Data are taken from the mean of three or more experiments.

次に、MGA 161株において、デンプン蓄積量の増加に見合った暗水素発生量の増加が認められない原因を調べることを目的として、さらに詳しい検討を行った。

図４は、この株のデンプン分解と暗水素発生の経時変化を調べたものである。十分に窒素源(5 mM NH_4Cl)を含んだ培地で培養した藻は、細胞内にmg乾燥重量当り、約0.9μmolのデンプンを蓄積していたのに対して、窒素制限(0.5 mM NH_4Cl)条件で培養した藻は、約2μmolのデンプンを蓄積していた。しかしながら、デンプン含量の大小にかかわりなく、両者のデンプン分解速度および水素発生速度に大きな差は認められなかった。特に、窒素制限条件で培養した藻においては、１２時間後でも、蓄積したデンプンの約５０％しか分解していなかった。

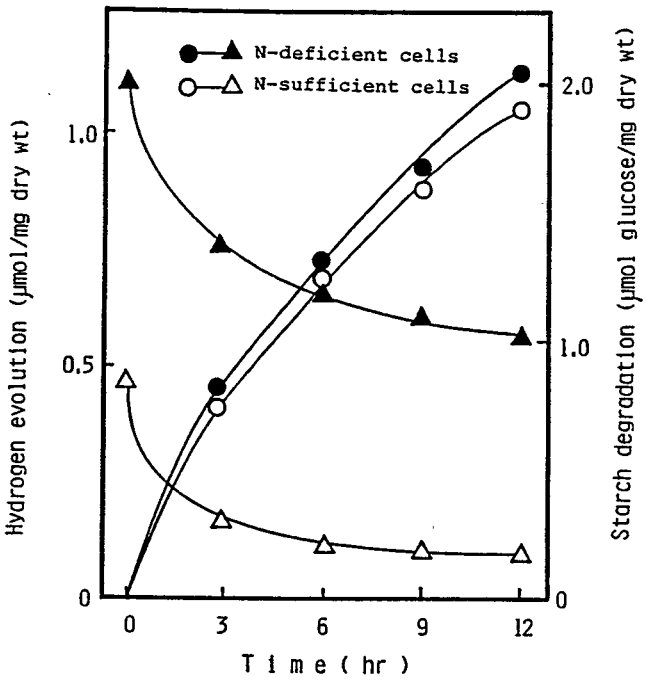

Fig. 4 Relationship between starch content and hydrogen evolution in Chlamydomonas MGA 161

Hydrogen evolution (●,○) and starch degradation (▲,△; determined in glucose units) were measured. Algal cells grown under N-deficient (●,▲; 0.5 mM NH_4Cl) conditions and N-sufficient (○,△; 5.0 mM NH_4Cl) conditions were incubated at sufficient (5 mM NH_4Cl) medium.

(2) ヒドロゲナーゼ活性と暗水素発生の関係

一般に、緑藻を暗嫌気条件下に適応させるとヒドロゲナーゼ活性が発現し明あるいは暗条件下での水素発生が可能となる。[13,41]図５は、MGA161株を暗嫌気条件下へ適応させる30分前、および適応後1時間目に、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドを添加した場合におけるヒドロゲナーゼ活性と暗水素発生を調べたものである。MGA161 株を、暗嫌気条件下に移行させると、ほとんど遅れもなく内部基質依存の水素発生が認められた。一方、ヒドロゲナーゼ活性は、暗条件へ移行後速やかに増加し、２時間後に一定となった。

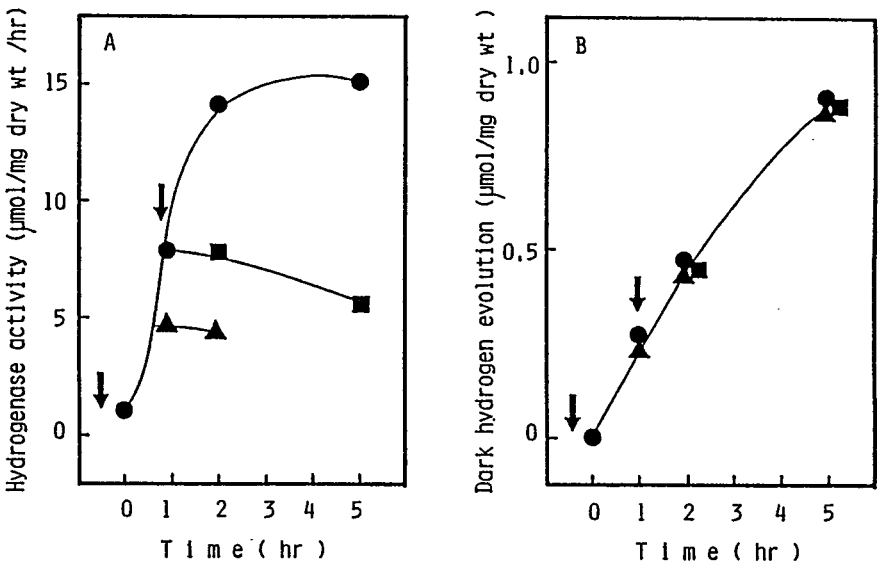

Fig. 5 Effects of cycloheximide addition on hydrogenase appearance and dark hydrogen evolution of Chlamydomonas MGA 161

Anaerobic incubations were performed under N_2 atmosphere in the dark : control was carried out without cycloheximide addition (●). Cycloheximide(50 μg/ml) was added 30 min before (▲) or 1 hr after (■) the initiation of dark anaerobiosis. Arrows indicate additions.

また、シクロヘキシミドの添加により、ヒドロゲナーゼ活性発現は抑制されたが、暗水素発生は全く影響されなかった。以上より、MGA161株の暗水素発生において、ヒドロゲナーゼ活性が律速因子とはなっていないことが明らかになった。

表５は、代表的な緑藻３株を、MGA 161株と同様に、暗嫌気条件下で処理し、ヒドロゲナーゼ活性と暗水素発生速度を比較したものである。他の緑藻と比較して、MGA 161株におけるヒドロゲナーゼ活性および暗水素発生速度の高さが特徴的であった。

Table 5 Comparison of hydrogenase activity and dark hydrogen evolution in various green algae

	Chlamydomonas sp. MGA 161	Chlamydomonas reinhardtii	Chlorella pyrenoidosa	Chlorococcum minutum
Hydrogenase activity (μmol/mg dry wt/hr)	12.0	7.51	1.10	0.78
Hydrogen evolution (μmol/mg dry wt/hr)	0.147	0.080	0.017	0.007

(3) 緑藻のデンプンから水素への変換率とデンプン分解量の比較

緑藻は、 EMP(Embden-Meyerhof-Parnas)経路を介してデンプンを分解し、 そのデンプン分解過程で生成した余剰の還元力を、水素を発生することで消費できる。[11,12,29] 図６は、 MGA161株と他の代表的な緑藻３株のデンプンから水素への変換率とデンプン分解量を比較したものである。MGA161株は、デンプン分解活性において、Chlamydomonas reinhardtiiに劣るものの、 水素への変換率は、Chlamydomonas reinhardtiiの４倍と非常に高く、１モルのグルコースから２モルの水素を生成していた。その結果、両者の積で与えられる水素発生速度は、４株

の中で最も高くなっていた。しかも、今までに報告されている緑藻の変換率の最高値が、0.43 (mol H_2/mol glucose)であるという事実からも、[20]このMGA 161株の変換率の高さが注目された。しかしながら、図４で示したように、MGA161株が高濃度にデンプンを蓄積した場合においては、１２時間後の水素発生の後でも、まだかなりの未分解のデンプンが残存しており、デンプン分解速度をさらに促進させることによって、この株の水素発生をより高めることが可能であろう。

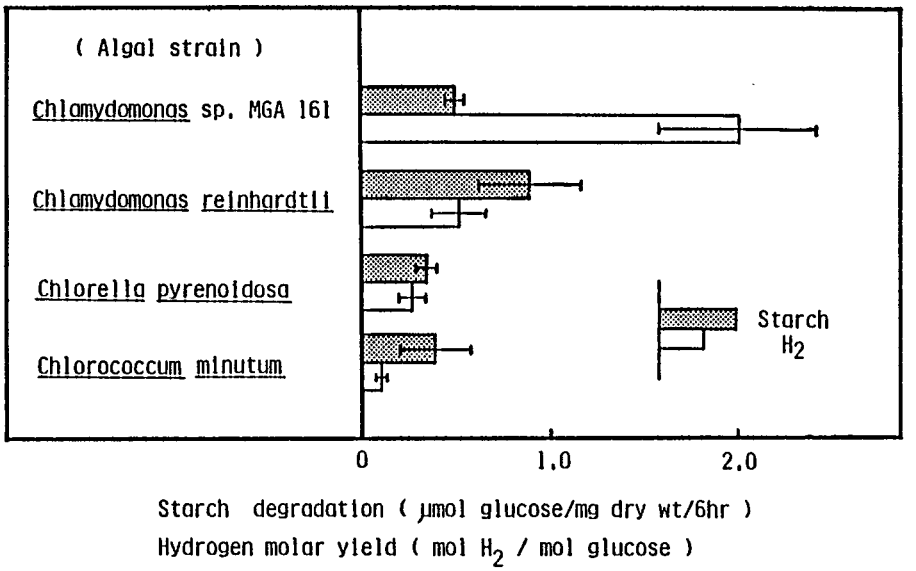

Fig. 6 Comparison of fermentative starch conversion to hydrogen by various green algae

第４節　要約

MGA 161株の暗水素発生を向上させるために、デンプン蓄積量、ヒドロゲナーゼ活性発現、デンプンから水素への変換率、デンプン分解速度について検討を加えた。その結果、デンプン蓄積量、ヒドロゲナーゼ活性発現、デンプンから水素への変換率に関して、この株は非常に優れた成績を示したが、デンプン分解速度にはまだ改善の余地があることが認められた。今後より高い水素生産性の向上を目的として、この株のデンプン分解をさらに高める方法を検討する必要がある。

第３章　緑藻の嫌気代謝における水素発生

第１節　緒言

緑藻は、昼間、細胞内にデンプンを蓄積し、夜間、嫌気条件下でデンプンを基質とする発酵を行い、水素以外にも炭酸ガス、酢酸、エタノール、ギ酸、グリセロールなどの発酵生産物を生成する。[12,20,24,29] MGA 161株が他の緑藻と比較して非常に高い水素発生能を有していることは、第１，２章で明らかになった。そこで本章では、なぜMGA161株が高水素発生能を有しているかを解明することを目的として、MGA 161株と他の緑藻の発酵現象を比較検討し、緑藻の嫌気代謝の特徴を把握することを試みた。

第２節　実験方法

(1) 培養方法

MGA 161株および他の緑藻の培養方法は、第２章第２節-(1)の実験方法に準じて行った。

(2) デンプンおよび発酵生産物の定量

デンプンおよび水素は、第２章第２節-(2),(4)の実験方法に準じて定量した。また、炭酸ガスは、ガスクロマトグラフ法により定量した。さらに、緑藻により培地中に放出された水素、炭酸ガス以外の発酵生産物は、藻懸濁液を遠沈操作により藻体と上清に分離した後、その上清をサンプルとした。発酵生産物の定量法に関しては、酢酸、エタノール、グリセロールは、ベーリンガーマンハイム社の分析酵素試薬（Ｆ-キット）を用いて、またギ酸、[16]乳酸[17]は、それぞれギ酸脱水素酵素、乳酸脱水素酵素を用時調製したものを用いて、酵素法により定量した。

第３節　結果および考察

(1) 緑藻の発酵生産物の比較

第２章、表５、図６において、試験した４株の緑藻の水素発生能が非常に異なっていることが認められた。　そこで、MGA 161株と他の３株の緑藻の水素以外の発酵生産物も定量することによって、これら緑藻の発酵現象の特徴を把握する事を試みた。　表６は、MGA161株と他の緑藻３株の発酵生産物の分布を比較したものである。なお、発酵生産物が正確に定量できているか否かを判断するために、Carbon recoveryとOxidation(O)/Reduction(R) indexの計算を行った。　特に、O/R indexは、酸化物質であるギ酸、炭酸ガスと還元物質である水素、エタノール、グリセロールに分けて、それぞれの化学式($C_xH_yO_z$)から、計算式Z-(1/2)Yを用いて算出し評価した。MGA161株の主な発酵生産物は、水素、炭酸ガス、酢酸、エタノールであり、　ギ酸、乳酸、グリセロールは、わずかしか検出されなかった。それに対して、Chlamydomonas reinhardtii は、　デンプン分解活性が最も高く、水素よりも、　ギ酸、酢酸、エタノールを、　それぞれ２：２：１の比率で大量に生成していた。　Chlorella pyrenoidosa では、　全体的に発酵速度が低いものの、 Chlamydomonas reinhardtiiと非常に良く似た分布を示した。
また、　Chlorococcum minutumは主に、炭酸ガス、酢酸、グリセロールを生成し、水素、ギ酸、エタノールは、ほとんど検出されなかった。

(2) 緑藻の暗水素発生経路

一般に、細菌型の水素発生経路は　E. Coli型とClostridium型に分類できることが知られているが、[18]緑藻の暗水素発生経路についてはまだ明らかになっていない。　ハイポフォスファイト(Na_2HPO_4)は、Pyruvate formate-lyase[21,22]およびformate dehydrogenase[23]阻害剤と言われており、　E. Coli型(formate hydrogen-lyase系)の水素発生に阻害的に作用する。

Table 6 Fermentation product formation and starch degradation in green algae

Product	Chlamydomonas MGA 161		Chlamydomonas reinhardtii		Chlorella pyrenoidosa		Chlorococcum minutum	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Starch	-0.52 ± 0.17		-0.89 ± 0.27		-0.30 ± 0.09		-0.34 ± 0.06	
H_2	0.97 ± 0.21	1.87	0.45 ± 0.15	0.51	0.12 ± 0.04	0.40	0.06 ± 0.02	0.18
CO_2	0.81 ± 0.24	1.56	0.57 ± 0.20	0.64	0.16 ± 0.08	0.53	0.21 ± 0.06	0.62
Acetate	0.62 ± 0.24	1.19	1.09 ± 0.39	1.22	0.39 ± 0.19	1.30	0.40 ± 0.15	1.18
Ethanol	0.34 ± 0.17	0.65	0.66 ± 0.29	0.74	0.22 ± 0.07	0.73	0.03 ± 0.04	0.09
Formate	0.01 ± 0.01	0.02	0.95 ± 0.30	1.07	0.27 ± 0.13	0.90	0.01 ± 0.01	0.03
Glycerol	0.06 ± 0.04	0.12	0.10 ± 0.02	0.11	0.04 ± 0.05	0.13	0.27 ± 0.06	0.79
Carbon recovery (%)	94 ± 10		98 ± 9		101 ± 7		94 ± 17	
O/R index	0.95 ± 0.23		1.11 ± 0.19		1.00 ± 0.18		1.09 ± 0.15	

Fermentation product formation and starch degradation were measured (A: µmol/mg dry wt/6 h) and the molar yield of products was caluculated (B: mol product/mol starch-glucose). Starch was assayed as glucose units. Values are means of five or more experiments.

Table 7 Effects of hypophosphite on hydrogen evolution and formate formation in Chlamydomonas MGA 161 and Chlamydomonas reinhardtii

Addition	Chlamydomonas MGA 161		Chlamydomonas reinhardtii	
	Hydrogen evolution $\frac{\mu mol}{(mg\ dry\ wt \cdot 6hr)}$	Formate formation $\frac{\mu mol}{(mg\ dry\ wt \cdot 6hr)}$	Hydrogen evolution $\frac{\mu mol}{(mg\ dry\ wt \cdot 6hr)}$	Formate formation $\frac{\mu mol}{(mg\ dry\ wt \cdot 6hr)}$
None	0.81	0.02	0.35	1.14
Hypophosphite	0.77	0.01	0.38	0.30

Hypophosphite(1 mM) was added immediately before dark anaerobic incubation.

表7は、ハイポフォスファイトを添加した場合の、Chlamydomonas MGA 161とChlamydomonas reinhardtiiにおける暗水素発生量とギ酸生成量を比較している。Chlamydomonas reinhardtiiのギ酸生成は、ハイポフォスファイトの添加により70%以上阻害されたにもかかわらず、この株の暗水素発生は全く阻害されなかった。同様に、MGA 161株の暗水素発生も阻害されなかった。したがって、この両株においては、E. Coli型の水素発生は行われず、Clostridium型すなわち、NAD(P)H - Fd - H_2aseという経路を介して水素発生が行われていることが示唆された。[19,20,30] また、MGA 161株においては、ハイポフォスファイトの添加の有無にかかわらず、ほとんどギ酸を生成しないで、専ら水素を発生するという性質を示し、この株の発酵反応における還元力消費形式に興味が持たれた。

(3) 液相および気相部の環境条件変化による緑藻の還元力消費形式の変動

デンプン分解過程で生成した還元力は、細胞内の酸化還元バランスを維持するために再酸化を受けなければならない。すなわち、生成した還元力は、水素、

エタノール、グリセールなどの発酵産物を生成する時に消費される。[19,20,24]
そこで、MGA 161株と他の緑藻が液相および気相部の環境条件の変化によって、
その還元力消費形式をどの様に変動させているかについて検討してみた。

図７は、培地中のNaCl濃度を変化させた時の、MGA 161株のデンプン分解量と発酵産物の生成量の変化を調べたものである。　MGA 161株のデンプン分解量は、0.1%から7%までの塩濃度の範囲においてほぼ一定であった。それに対して、発酵産物の生成量は、この濃度の範囲内において大きな変化を示した。特に生成時に還元力を消費する水素、エタノール、グリセロールの生成量の変化が注目された。すなわち、MGA 161株は細胞内の酸化還元バランスを一定に保ちつつ、高塩濃度側において細胞の浸透圧を調節するため、　水素、エタノールの生成から優先的にグリセロールを生成するという発酵変換を行っている事が示唆された。[32,40]

図８は、培地中のNH_4Cl濃度を変化させた時の、MGA 161株のデンプン分解量と発酵生産物の変化を調べたものである。MGA 161株のデンプン分解量は、5 mM以上のNH_4Clの添加によって増加した。この変化に伴い、発酵産物の生成量も大きな変化を示した。すなわち、MGA 161株は、細胞内の酸化還元バランスを一定に保つために、デンプン分解によって生成された余剰の還元力を消費する手段として、水素およびエタノールの生成量を増加させていた。

次に、水素発生酵素であるヒドロゲナーゼを阻害した時の、緑藻における還元力消費形式の変化について検討した。　図９は、ヒドロゲナーゼの阻害を目的として気相部に10%一酸化炭素を添加し発酵させた時の３株の緑藻におけるデンプン分解量および発酵産物の生成量を比較したものである。

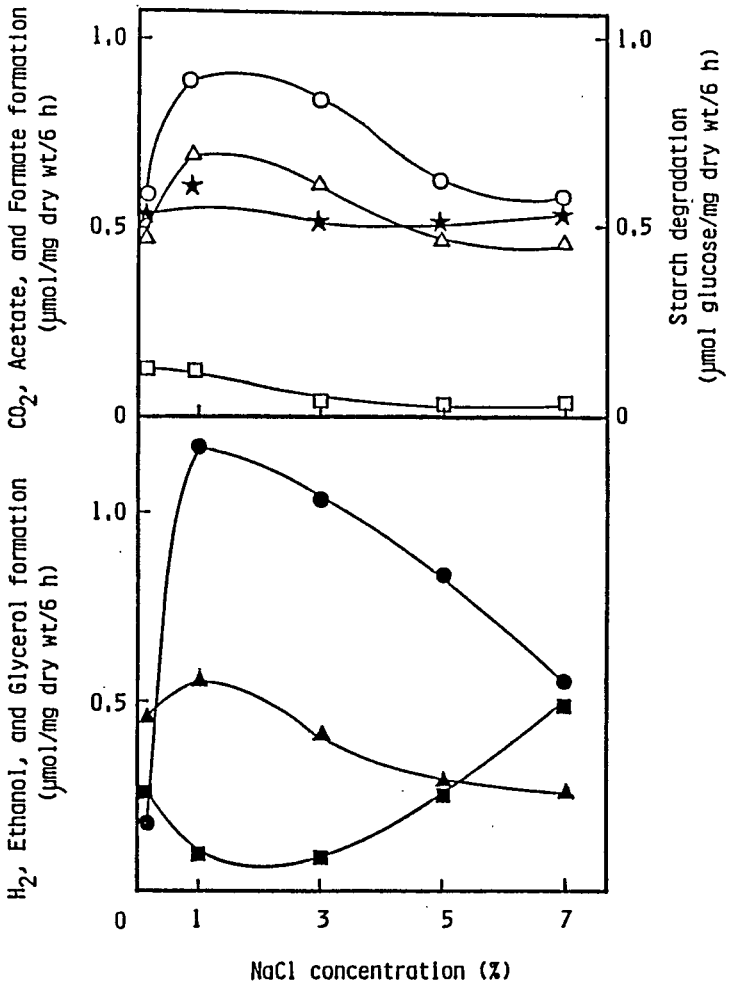

Fig. 7 Effect of NaCl concentration in the medium under dark anaerobic incubation on starch degradation and fermentation product formation in Chlamydomonas MGA 161

Starch degradation (★) and the formation of H_2 (●), CO_2 (○), acetate (△), ethanol (▲), formate (□), and glycerol (■) were measured. Algal cells grown at 3% NaCl were incubated at the concentration of NaCl indicated. Starch was assayed as glucose units. Points are the mean of three experiments.

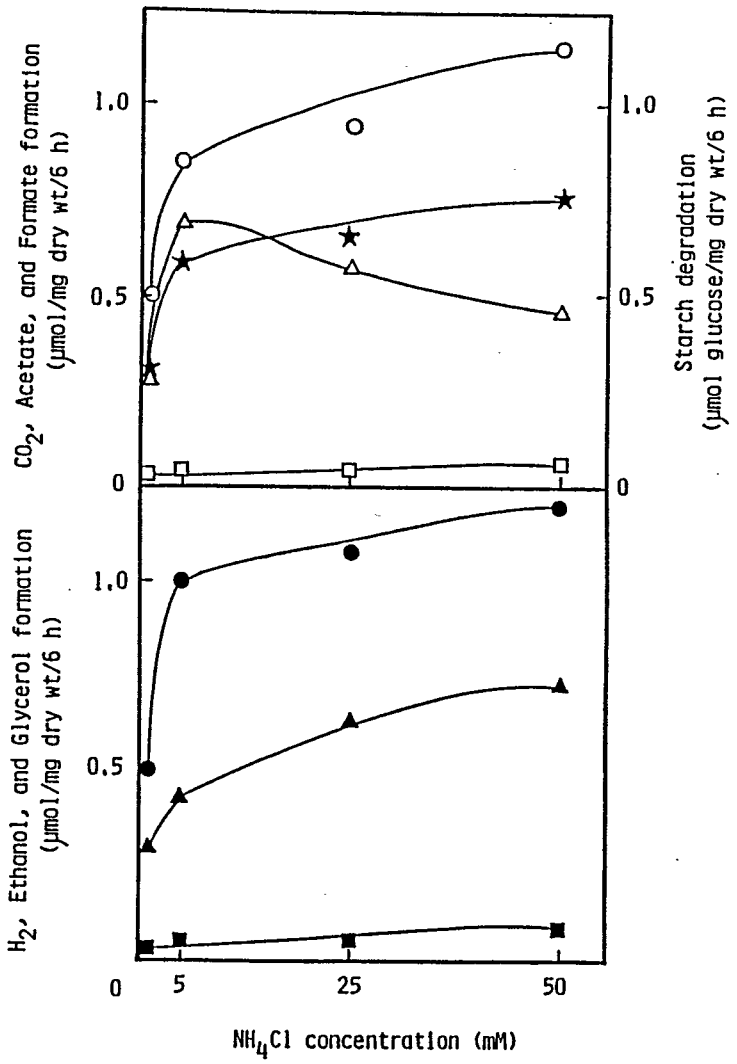

Fig. 8 Effect of NH_4Cl concentration in the medium under dark anaerobic incubation on starch degradation and fermentation product formation in Chlamydomonas MGA 161

Starch degradation (★) and the formation of H_2 (●), CO_2 (○), acetate (△), ethanol (▲), formate (□), and glycerol (■) were measured. Algal cells grown under N-deficient (0.5 mM) conditions were incubated at the indicated NH_4Cl concentrations. Starch was assayed as glucose units. Point are the mean of three experiments.

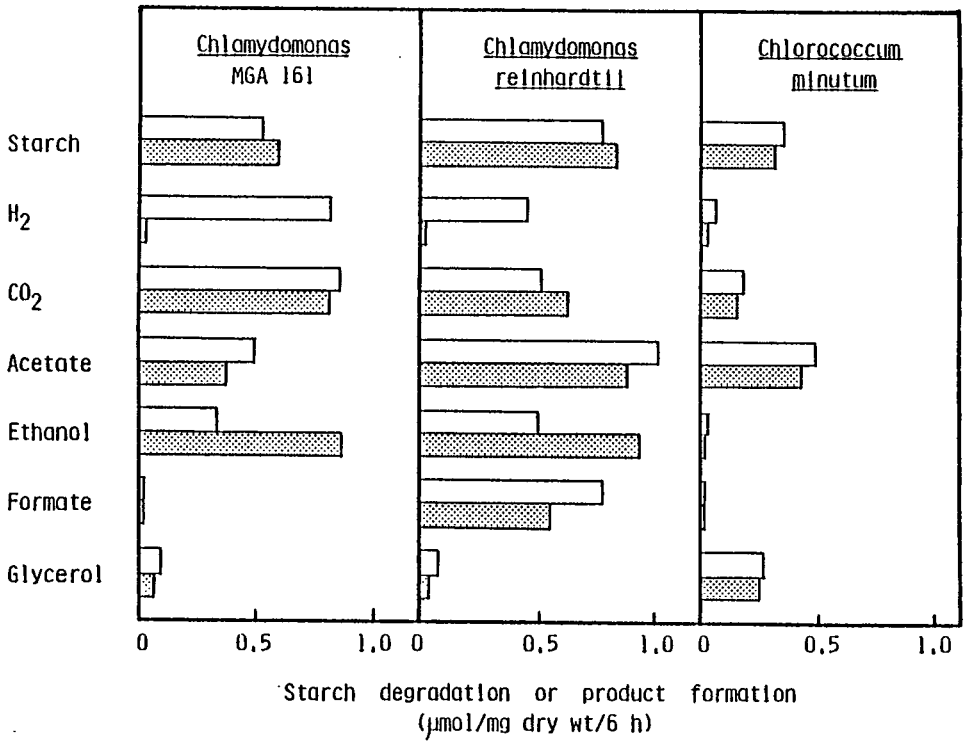

Fig. 9 Effect of CO on fermentation product formation and starch degradation in green algae

Dark anaerobic incubations were done with (▒) or without (□) added 10% CO in the gas phase. Starch was assayed as glucose units. Values are the mean of three experiments.

その結果、一酸化炭素の添加が、試験した３株のデンプン分解量に影響を及ぼしてはいなかった。しかしながら、MGA 161とChlamydomonas reinhardtiiの両株の発酵生産物に大きな変化が観察された。すなわち、無添加の場合と比較して、この両株においては約２倍量のエタノールの生成が認められた。この原因としては、生成した還元力の大部分が水素の代わりにエタノールによって消費されるようになったものと考察した。それに対して、Chlorococcum minutumは、通常グリセロールで主に還元力を消費しており、一酸化炭素の添加による水素発生活性の阻害がこの株の発酵現象に大きな変化を生じさせることはなかった。

図１０は、試験した緑藻の還元力消費形式について要約したものである。デンプン分解過程で生成した還元力は、グリセロール、水素、エタノールを生成することによって消費されていた。このうち、何を還元力消費産物とするかによって株の違いによる発酵形式の分類が可能であった。すなわち、MGA 161株では水素、Chlamydomonas reinhardtiiおよび Chlorella pyrenoidosaではエタノール、Chlorococcum minutumではグリセロールを生成することで消費し、 それぞれの細胞内の酸化還元バランスを保っていることが示唆された。

一般に、緑藻の嫌気代謝においては、生成した余剰の還元力は、主にエタノールの生成によって消費されるという報告がされているが、[12,20,24,29] 本章で示したMGA 161株は、水素で、Chlorococcum minutumはグリセロールで、還元力を主に消費しており、これら２株は、全くユニークな発酵形式を保持した株であることが認められた。特に、生成した還元力を主に水素発生で消費している、MGA 161株のデンプン分解速度がさらに改善されれば、この株を用いた理想的な水素生産システムの構築が可能になることが示唆された。

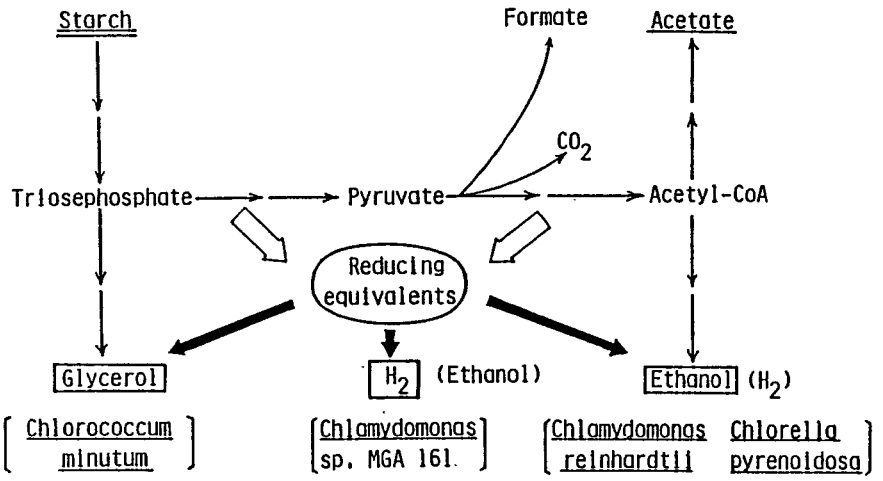

Fig. 10 Classification of green algal fermentation based on consumption mode of reducing equivalents

第４節　要約

MGA 161株および他の緑藻の発酵生産物を定量しその嫌気代謝の特徴を比較した。これら発酵生産物の定量結果から、　それぞれの株が独自の還元力消費形式を持っていることが認められた。すなわち、試験した緑藻において、　水素発生型、エタノール生成型、グリセロール生成型の３タイプに分類できることが示された。また、時には、環境条件変化に適応しながら、緑藻はその還元力消費形式を切り換えていることも注目された。

第４章　緑藻-光合成細菌の混合培養による水素生産

第１節　緒言

図１１は、昼夜サイクルを利用した藻-細菌による水素生産システムを示したものである。緑藻が、昼間細胞内に蓄積したデンプンを、夜間嫌気条件下で発酵し、水素以外にも酢酸、エタノール、ギ酸などの有機物を生成する事が、　第３章において明らかにされた。それに対して、一般に、光合成細菌は、有機物を外部基質として水素を発生できる事が知られている。[34,35,37]

そこで本章では、緑藻-光合成細菌の混合培養による水素生産システムにおけるモデルとして、水素発生量においてMGA 161株に劣るものの、デンプン分解活性は非常に高く、有機物を最も大量に生成していた緑藻Chlamydomonas reinhardtiiを用い、この株の単独の場合における水素発生量およびデンプンから水素への変換率が、光合成細菌との混合培養によって、どれだけ向上できるかを検討した。
なお、　光合成細菌は、紅色非硫黄細菌の一種である　Rhodospirillum rubrumを用いた。

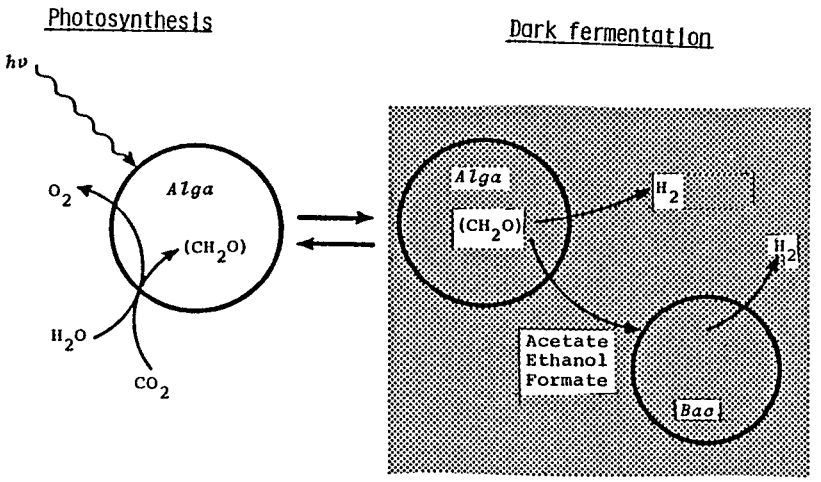

Fig. 11　Hydrogen production by alga-bacterial system in light/dark cycle

第２節　実験方法

(1) 培養方法

東大応微研より譲り受けた緑藻Chlamydomonas reinhardtii C-238に対しては、表３に示したブリストール改変培地を用いて、25W/m²の光照射下、30℃で通気培養した。また、NCIBより譲り受けた光合成細菌 Rhodospirillum rubrum 8255は、同じブリストール改変培地 1 リットル当り、ギ酸ナトリウム 680 mg、酢酸ナトリウム 820 mg、エタノール 460 mg、ビオチン 60 μgをさらに添加したものを用いて、200W/m²の光照射下、30 ℃で静置培養した。[33]

(2) デンプンおよび発酵生産物の定量

デンプンおよび発酵生産物の定量は、第２章第２節-(2),(4)および第３章第２節-(2)の実験方法に準じて行った。

第３節　結果および考察

(1) 緑藻Chlamydomonas reinhardtiiの発酵生産物と光合成細菌Rhodospirillum rubrumの基質利用性

表８は、緑藻 Chlamydomonas reinhardtiiの発酵生産物を示しており、また、これらの有機物が光合成細菌の暗水素発生における良好な基質となりうるか否かもここで検討した。Chlamydomonas reinhardtiiは、水素の他に酢酸、エタノール、ギ酸などの有機物を培地中に放出していた。　それに対して、Rhodospirillum rubrumは、緑藻が比較的多量に放出するギ酸を基質として高い水素発生を示すことが認められた。　したがって、この結果より、　Chlamydomonas reinhardtiiとRhodospirillum rubrumを混合培養することによって、　暗水素発生の増大効果が期待された。

Table 8 Fermentation products of C. reinhardtii and their availability as substrate for H_2 evolution by R. rubrum

Product or Substrate	Chlamydomonas reinhardtii Molar production (μmol / mg dry wt·6hr)	Chlamydomonas reinhardtii Molar yield of product (mol product / mol glucose)	Rhodospillium rubrum Hydrogen evolution * (μmol / mg dry wt·12hr)
No addition	----	----	0.07
H_2	0.45	0.51	----
CO_2	0.57	0.64	0
Acetate	1.09	1.22	0.05
Ethanol	0.60	0.74	0.05
Formate	0.95	1.07	2.04
Glycerol	0.10	0.11	0.05
Starch	-0.89	----	----
Carbon recovery (%)		98	

* Dark anaerobic assays were done with added substrate (10 mM)

(2) Rhodospirillum rubrumの暗水素発生

Rhodospirillum rubrumの暗水素発生に関して、もう少し詳しく検討してみた。図１２は、Rhodospirillum rubrumの水素発生におけるタンパク質合成阻害剤クロラムフェニコール（50 μg/ml)と Formate dehydrogenase阻害剤 ハイポフォスファイト(5 mM)の添加効果を示している。[21] 10 mMのギ酸を基質としたRhodospirillum rubrumの暗水素発生は、３時間の誘導期間の後に認められるようになり、これはクロラムフェニコールの添加により完全に阻害された。
また、ハイポフォスファイトの添加によっても、この株の水素発生が80%以上阻害されていた。以上より、Rhodospirillum rubrumは、暗嫌気条件下で誘導される Formate hydrogen-lyase系を介して水素発生をしている事が示唆された。[38,39]また、この時、アセチレン還元活性はほとんど認められず、ニトロゲナーゼ系による水素発生の可能性はないと考察した。

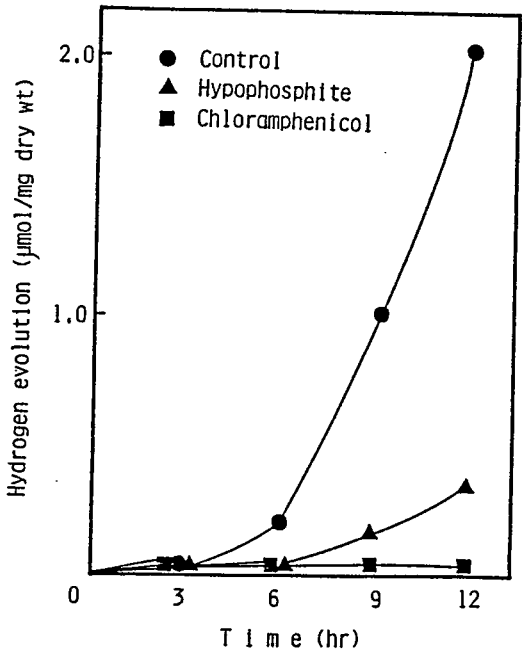

Fig. 12 Effect of chloramphenicol and Na-hypophosphite on hydrogen evolution by R. rubrum

(3) 緑藻-光合成細菌の混合効果

Rhodospirillum rubrumが外部基質としてのギ酸から水素を発生できることが認められたので、次に、Chlamydomonas reinhardtiiの発酵生産物中のギ酸を基質として、実際に、Rhodospirillum rubrumが水素を発生できるかどうか調べてみた。

表９は、Chlamydomonas reinhardtiiとRhodospirillum rubrumを、いろいろな比率で混合した場合における暗水素発生量を比較したものある。トータルの細胞濃度を一定にした時、混合系においては、緑藻濃度の増加につれて、水素発生量もまた増加していた。そして、緑藻の割合が最も高い、混合比８：２の場合に、最大の水素発生量が認められた。　すなわち、Total massに基づいて算出した混合系における水素発生に関しては、主に水素発生反応を司っている光合成細菌の細胞濃度が高い場合よりは、基質供給者である緑藻の細胞濃度が高い場合の方が、

より高い水素発生量が観察される。したがって、以下の実験はこの比率の水素発生について検討することにした。しかしながら、興味深いことには、Algal mass に基づいて算出した混合系における水素発生に関しては、逆に混合比２：８の場合に非常に高く、光合成細菌の存在が、緑藻の発酵反応に影響を与えていることが示唆された。　これら混合比変化に伴う水素発生増大効果についても、さらに詳細な検討が必要であろう。

Table 9　Dark H_2 evolution as a function of mixing ratio of alga and bacterium

C.reinhardtii : R.rubrum			Hydrogen evolution *	
			Total mass base (μmol/mg dry wt/12hr)	Algal mass base (μmol/mg dry wt/12hr)
10	:	0	0.60	0.60
8	:	2	2.39	2.99
5	:	5	1.50	3.00
2	:	8	1.09	5.45
0	:	10	0	0

* H_2 evolution was measured at 0.64 mg dry wt/ml of total cell concentration. Data are taken from the mean of five experiments.

図１３は、緑藻単独系と緑藻-光合成細菌の混合系における発酵の経時変化を調べたものである。　緑藻単独系ではデンプンを分解しながらギ酸、酢酸、水素、エタノールを蓄積していた。一方、混合系では、単独系とは異なる挙動が観察された。すなわち、６時間目以降、ギ酸は減少し、エタノールの増加は止まった。特に、６時間目以降、混合系における水素発生が、急激に増加していることが注目された。

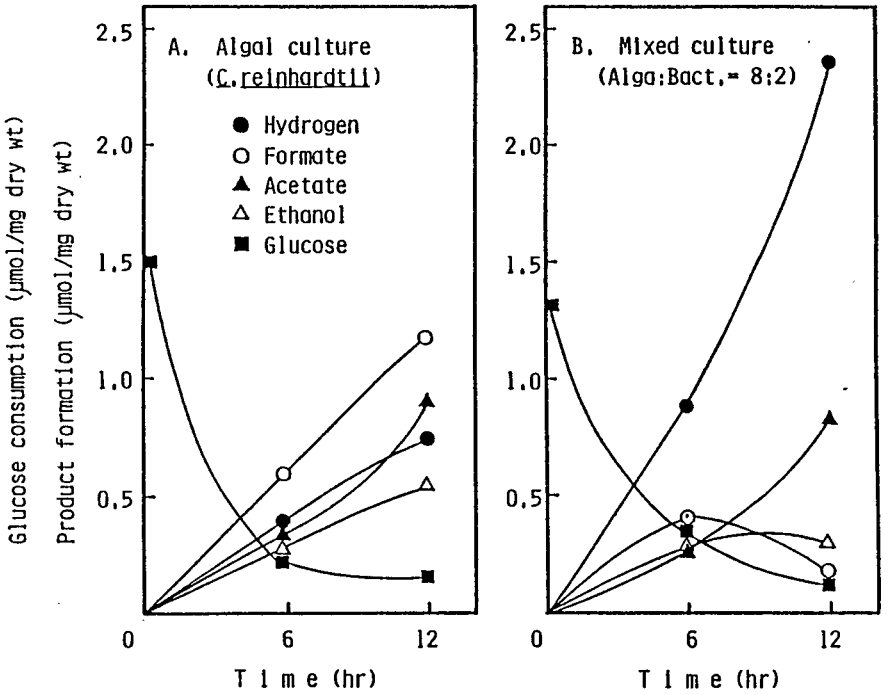

Fig. 13 Time course of fermentation in the algal culture(A) and the mixed culture of alga and bacterium(B)

(4) 混合系の水素発生における細胞濃度の効果

混合系での水素発生におけるトータルの細胞濃度の影響を調べてみた。図１４は、混合比を８：２に固定し細胞濃度を、0.1 および1.0 mg dry wt/mlに調製した時の水素発生量と培地中のギ酸の濃度を比較したものである。細胞濃度が高い場合の暗水素発生は、６時間目以降、蓄積したギ酸の急激な消費を伴いながら、著しく増加していた。それに対して、0.1 mg dry wt/mlと細胞濃度が低い場合では、６時間目以降の急激な水素発生の増加は認められなかった。　この様に、細胞当りの水素発生量が、　細胞濃度に依存している事から、　Rhodospirillum rubrumのFormate hydrogen-lyase系の活性の誘導は、培地中のギ酸の濃度に依存していることが示唆された。　そこで、誘導に必要な細胞濃度を知る目的で、図１５に示したような実験を行った。細胞濃度の増加に伴って、水素発生量の増加およびギ酸蓄積量の減少が認められた。その結果、混合系の水素発生量に対する至適濃度は、ml当り、0.6 mg dry wt以上であった。

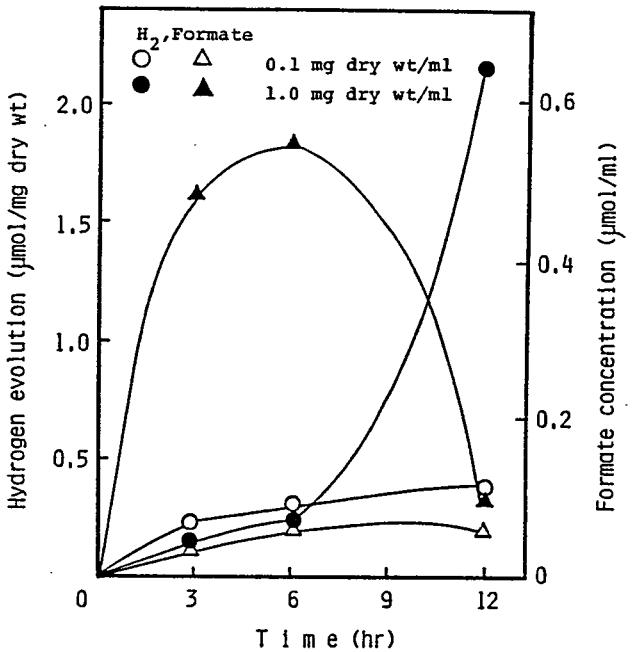

Fig. 14 Effect of total cell concentration on hydrogen evolution and formate accumulation

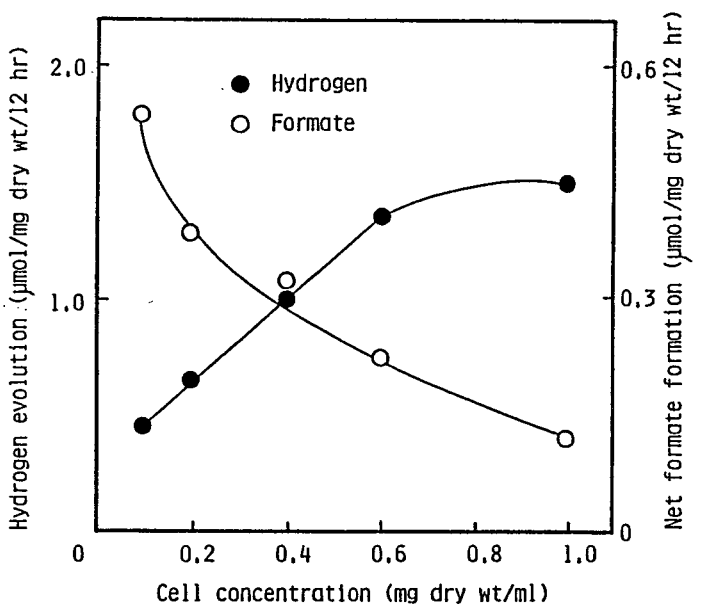

Fig. 15 Effect of total cell concentration on H_2 evolution in the mixed culture

(5) 混合培養系による明暗サイクルを利用した水素生産システム

実際に、この混合培養系を明暗のサイクルに同調させて実験を行ってみた。図１６は、Chlamydomonas reinhardtiiとRhodospirillum rubrumを実験開始時に８：２で混合し、１２時間明、１２時間暗に同調させながら、 混合系における藻の増殖と暗水素発生量を調べ、緑藻単独系の結果と比較したものである。

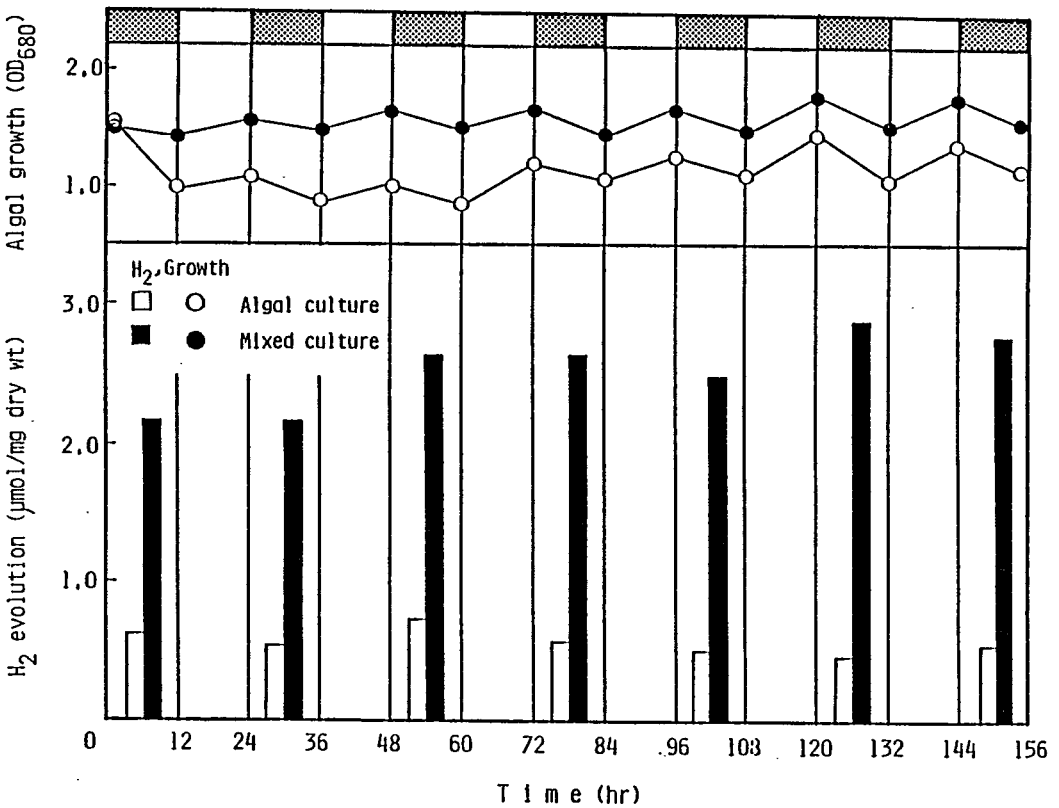

Fig. 16 Sustained hydrogen production by the mixed culture in a light/dark cycle

また、緑藻の増殖を正確に定量するために、透析チューブの中に光合成細菌を入れて、両者を分離した状態で実験を行った。それゆえに、緑藻の発酵生産物の光合成細菌による利用は、膜を介して行われる事となった。したがって、明暗サイクルの実験条件としては、両株をこの様な状態で混合した後、この混合培養系は、明期においては、200W/m^{2}の光照射下、30°Cで、12時間通気培養され、暗期においては、嫌気条件下、30°Cで、12時間振とうされた。そして、この操作が繰り返し行われた。

緑藻は、明暗サイクルに同調するかのように増加減少を繰り返しながら生育していた。　水素発生に関しては、緑藻単独系は、12時間で、mg乾燥重量当り、約0.5 μmolの水素を生成していたのに対して、　混合系では、　それの約4倍の2μmolの水素を生成していた。　そして、一週間にわたって、両者共に、安定な水素発生が観察された。

表１０は、緑藻単独系と混合系における暗水素発生量とデンプンから水素への変換率を比較したものである。　混合系の水素発生量および変換率は、単独系のそれと比較して、約４倍の水素発生量および約５倍の変換率が認められた。

Table 10 Comparisons of the H_2 evolution and the H_2 molar yield between the algal culture and the mixed culture

Culture	Hydrogen evolution (μmol/mg dry wt/12hr)	Hydrogen molar yield (mol H_2/mol glucose)
Algal *	0.62	0.51
Mixed **	2.81	2.70

* The culture of Chlamydomonas reinhardtii

** C. reinhardtii : R. rubrum = 8 : 2 (dry wt ratio)

第４節　要約

緑藻を用いた、効率のよい水素生産システムの構築を計るために、別の角度からのアプローチとして、緑藻-光合成細菌の混合培養システムについても検討を加えた。　緑藻Chlamydomonas reinhardtiiと光合成細菌Rhodospirillum rubrumを、８：２で混合した系において、Chlamydomonas reinhardtii単独系の水素発生量と比較して、約４倍の水素発生量が認められた。そして、明暗サイクルに同調しながら、一週間に渡って安定な水素発生が観察された。緑藻-光合成細菌の混合培養による水素生産システムの実証例は、本研究が初の試みであった。

総括

本研究においては、分離された海産性緑藻Chlamydomonas MGA 161の暗水素発生を中心に検討が行われた。　その結果、この株のデンプン分解速度がさらに改善されれば理想的な水素生産システムの構築が可能になることが示唆された。また、この株は生成した還元力を主に水素発生によって消費しているという非常にユニークな性質を持っていた。　さらに、還元力消費形式によって、試験した緑藻が、水素発生型、エタノール生成型、グリセロール生成型の３タイプに分類できることも示された。　次に、緑藻 Chlamydomonas reinhardtiiと 光合成細菌 Rhodospirillum rubrumとの混合培養モデルシステムの実験結果から、緑藻単独系の場合よりも混合系の場合の方が、水素発生量およびデンプンから水素への変換率共に、飛躍的に向上することが認められた。今後より高い水素生産性を目指して、高水素発生株であるChlamydomonas MGA 161を用いた混合培養システムについて検討する必要がある。

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始懇篤なる御指導を賜りました大阪大学薬学部三浦喜温教授、並びに宮本和久助教授に謹んで感謝の意を表します。

また、研究にあたって有益な御助言をいただきました八木清仁助手、蔵野憲秀助手、梅田房子技官に厚く感謝いたします。

そして共同実験者としてご協力いただきました真野光仁修士、林辰也修士、名和義仁修士、山本（旧姓今井）恵理子、辻本紫、森康子の諸氏、並びに薬品製造工学の諸兄に感謝いたします。

さらに、分離株の同定を行っていただきました神戸大学教養部坪由宏教授に感謝いたします。

引用文献

(1) H. Gaffron and J. Rubin, J. Gen. Physiol., 26, 219(1942).

(2) T. Pow and A. I. Krasna, Arch. Biochem. Biophys., 194, 413(1979).

(3) E. Greenbaum, Biotechnol. Bioeng. Symp., NO 10, 1(1980).

(4) E. Greenbaum, Biotechnol. Bioeng. Symp., NO 12, 469(1982).

(5) Y. Miura, K. Yagi, Y. Nakano, and K. Miyamoto, J. Ferment. Technol., 59, 441(1981).

(6) Y. Miura, K. Yagi, M. Shoga, and K. Miyamoto, Biotechnol. Bioeng., 24, 1555(1982).

(7) 田宮 博、渡辺 篤、編 《藻類実験法》 (南江堂)

(8) 西沢一俊、千原光雄、編 《藻類研究法》 (共立出版)

(9) T. Kakuno, N. O. Kaplan, and M.D. Kamen, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74, 861(1977).

(10) T. Hirokawa, M. Hata, and H. Takeda, Plant Cell Physiol., 23, 813(1982).

(11) H. Kaltwasser, T. S. Stuwart, and H. Gaffron, Planta, 89, 309(1969).

(12) U. Klein and A. Betz, Plant Physiol., 61, 953(1978).

(13) U. Klein and A. Betz, Physiol. Plant, 42, 1(1978).

(14) 八木清仁 ：学位論文 《水の生物学的光分解における水素酸素分離発生に関する研 究》 (1981)

(15) H. U. Bergmeyer, E. Bernt, F. Schmidt, and H. Stork, "Methods of Enzymatic Analysis", Vol. 3, ed. by H. U. Bergmeyer, Academic Press, New York and London, 1974, pp. 1196-1201.

(16) T. Hopner and J. Knappe, "Methods of Enzymatic Analysis",Vol. 3, ed. by H. U. Bergmeyer, Academic Press, New York and London, 1974, pp. 1176-1179.

(17) I. Gutmann and A. W. Wahlefeld, "Methods of Enzymatic Analysis", ed. by H.U. Bergmeyer, Academic Press, New York and London, 1974, pp. 1464-1468.

(18) J. E. Zajic and A. Margaritis, and J. D. Brosseau, Int. J. Hydrogen Energy, 4, 385(1979).

(19) F. P. Hearley, Plant Physiol., 45, 153(1970).

(20) R. P. Gfeller and M. Gibbs, Plant Physiol., 75, 212(1984).

(21) L. L. Campbell, J. Biol. Chem., 217, 669(1955).

(22) K. Kreuzberg, Planta, 163, 69(1985).

(23) R. K. Thauer, FEBS Lett., 27, 111(1972).

(24) K. Kreuzberg, Physiol. Plant, 61, 87(1984).

(25) B. Ward, M. E. Reeves, and E. Greenbaum, Biotechnol. Bioeng. Symp., NO 15, (1985).

(26) A. Ben-Amotz, D. L. Erbes, M. A. R. Henderson, D. G. Peavey and M. Gibbs, Plant Physiol., 56, 72(1975).

(27) A. M. Rosenkranz and A. I. Krasna, Biotechnol. Bioeng., 26, 1334(1984).

(28) E. Greenbaum, R. R. L. Guilard, and W. G. Sunda, Photochem Photobiol., 37, 649(1983).

(29) U. Klein, K. Kreuzberg, and A. Betz,"Advances in Biotechnolgy" Vol. 2, eds, Pergamonn Press, New York, 1981, pp. 97-193.

(30) K. Jungermann, R. K. Thauer, E. Rupprecht, C. Ohrloff, and K. Decker, FEBS Lett., 3, 144(1969).

(31) サン・ピエトロ他　編　《生物による太陽エネルギー変換》（学会出版センター）

(32) H. D. Hysic and N. E. Tolbert, Plant Physiol., 82, 594(1986).

(33) 北村博、森田茂広、山下仁平　編　《光合成細菌》　（学会出版センター）

(34) T. Matsunaga and A. Mitsui, Biotechnol. Bioeng. Symp., NO 12, 441(1982).

(35) J. Miyake, X. Y. Mao, and S. Kawamura, J. Ferment. Technol., 62, 531(1984).

(36) A. Mitsui and S. Kawamura, "Hydrogen Energy System", Vol. 3, ed. by T. N. Vezirogln and W. Seifritz, Pergamon Press, Oxford, 1978, pp. 1267-1291.

(37) J. S. Kim, K. Ito and H. Takahashi, Agric. Biol. Chem., 46, 937(1982).

(38) G. Schon and H. Voeleskow, Arch. Microbiol., 107, 87(1976).

(39) T. E. Correl and R. L. Uffen, J. Bacteriol., 131, 533(1977).

(40) A. Ben-Amotz and M. Avron, Plant Physiol., 53, 628(1974).

(41) P. G. Rosseler and S. Lien, Plant Physiol., 76, 1086(1984).