

光バイオ水素生産プロジェクトの成果概要

三宅 淳・浅田泰男

工業技術院・生命工学工業技術研究所

産業技術融合領域研究所

〒305-8562 つくば市東 1-1

Biohydrogen Project of RITE

Jun MIYAKE, Yasuo ASADA

National Institute of Bioscience and Human-Technology,

National Institute for Advanced Interdisciplinary Research, AIST/MITI

Higashi 1-1, tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan 305-8562

Solar energy is the most abundant one among various renewable energy sources. However its defect is the low density, which prohibits commercial applications. Biological methods provide the way to accumulate the low density energy because the organisms grow by themselves to cover the area and to create automatically the devices of energy conversion as photosynthesis system. Ministry of International Trade and Industry Japan (MITI) has launched various projects for the development of new energy sources. This report summarizes a national R&D project of a biological hydrogen production. Scientific basis of the technology, the project organization and the research contents as approaches of genetic engineering and use of waste waters with a bench-scale reactors are described.

Key words: hydrogen production, biohydrogen, solar energy, national project

1. 緒言

化石エネルギー資源を代替する新たなエネルギー資源の開発のため、光合成微生物などの微生物を用いた水素生産技術の研究開発が通商産業省・工業技術院のプロジェクトとして、新エネルギー産業技術総合開発機構（NEDO）を通じて、地球環境産業技術研究機構（RITE）に委託され、1991年から行われてきた。1998年度をもってこの研究開発プロジェクトも終了しようとしている。本稿では、このプロジェクトの概要とこれまでの成果を解説したい。

2. RITEプロジェクトの概要

(1) 研究開発の必要性

化石燃料は埋蔵量に限界があり、また、燃焼によ

り温室効果を有する二酸化炭素を発生することから、その使用を低減することが求められている。エネルギー環境問題を解決するためには、再生可能なクリーンなエネルギーが必要とされる。そこで、太陽光、バイオマスから環境を汚染しないクリーンなエネルギーである水素を生産する技術の開発が期待されている。光合成微生物は、太陽光をエネルギー源として水・有機物を分解し水素を発生することができたため、簡易安価な生産技術の可能性を有する。またこれら資源は地域的遍在が少なく、エネルギー政策の観点からも極めて重要な意義を有している。微生物を利用した水素生産技術は、基礎研究が世界的に行われているが、これまでのところ実用に至っていない。

光合成微生物による水素生産は、石油に代替することのできる燃料を生産するのみならず、温室効果を有する二酸化炭素を低減することもでき、地球環

境問題対策上大きな意義を有している。化石燃料を大量に使用しているわが国にとって、再生可能なクリーンなエネルギーを確保することは急務であり、

この分野の研究を加速すべく本技術開発を推進する必要がある。

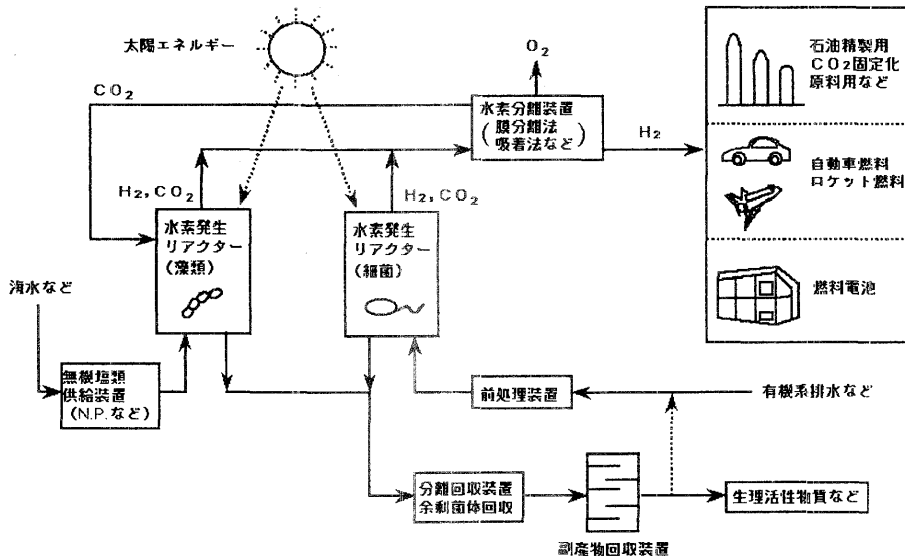


図1. 水素プロジェクト概念図

(2) 研究開発の目標と方式

(1) 現在の環境問題を引き起こした主たる原因は石油系燃料であるが、それに代わる無公害の燃料である水素の生産技術を開発することを目標とする。再生可能な資源を用い、環境に負荷を掛けない水素生産方法として微生物を用いた技術を確認することを目標とする。

(2) この目標を達成するため、下記の研究開発を行う。

- ① 水素生産能力の優れた光合成微生物等の探索及び育種改良等の研究開発
- ② 微生物による水素生産能を最も効率化する培養技術の研究開発
- ③ 生成した水素を効率よく分離・精製する技術の開発
- ④ 微生物から生理活性物質等の有用物質を生産する技術の開発
- ⑤ 効率のよい大規模な水素生産システムを開発するための技術の検討と総合的な運転技術の研究開発

(3) 研究開発の方式については、上記の研究開発に係わる機能要素の開発、方式の選定、装置化技術の

開発を行い、中間評価を経た後、最適技術によるパイロットプラントを開発して実証化試験を行う。

3. 研究組織

通産省工業技術院サンシャイン室のプロジェクトとして新エネルギー産業技術総合開発機構(NEDO)に委託され、さらにNEDOから地球環境産業技術研究機構(RITE)に研究委託されたものである。参加企業は、石川島播磨重工業(株)、鹿島建設(株)、クボタ(株)、東京ガス(株)、(株)富士電気総合研究所、さらにイタリアからエニテクノロジー。参加企業の持ち帰りだけでなく、3社と国研の共同研究を生命工学工業技術研究所において、さらに東京農工大学、茨城大学、ハワイ大学、ロンドン大学に研究委託して行った。

4. 結果

(1) 光合成微生物等の探索・育種改良

光合成細菌：水素発生の反応の主たる要素は光合成系、電子伝達系、水素発生酵素系である。強光

を受けて光合成系で過剰のエネルギーが生産されると、後続の過程でオーバーフローを引き起こす。光合成系、電子伝達系、水素発生酵素のバランスを保ち、オーバーフローを避ければ、水素発生効率の向上が可能となる。即ち、光合成系の機能（発現量）を他の要素とバランスさせることが有効と考えられ、光合成系を制御し、目的に応じてその量を増減する

ことが必要である。本研究では突然変異・遺伝子操作技術等を用いて光捕獲色素系が異なったP3ミュータント株を取得・確立した。この株は野生株と比べると光補角系Iが減少している。単色光下での水素発生速度が30%程度向上していることが明らかとなった。

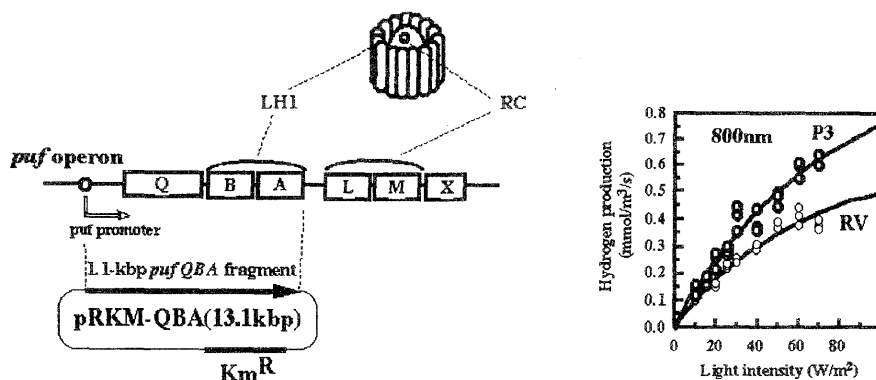


図2. 光合成細菌の遺伝子の改変方法と性能向上

水素発生は光合成によって生成された還元力を用いるが、競合反応もある。例えばバイオプラスチックとして注目されるPHB（ポリヒドロキシ酪酸）も還元力を必要とする。そこで、水素発生を行うときは、PHB生産能が低いことが望ましく、この酵素をコードしている遺伝子を発現しないように改変することにも成功した（PHB-）。さらに、水素発生の酵素でもあるヒドロゲナーゼの中には逆に水素を吸収してしまうものもあり、この種のヒドロゲナーゼが発現・機能しないように遺伝子レベルで改変を加えた株（hup-）も取得した。この種の遺伝子操作技術のポイントは、特定の酵素機能を強化するより、細胞内のエネルギーの流れをスムーズにすることにある。

また、太陽光照射を受けるとリアクターの温度が上昇する。冷却には大変なエネルギーを要するので、耐熱性に菌株があれば望ましい。国内で温泉などからのスクリーニングを行って、40度以上でも増殖・水素発生能力を有する菌株を取得している。この種の探索育種・改良株の機能については現在検討中である。

藍藻： 藍藻は水分解を行う能力を有し、究極のバイオ水素生産方法として期待されるが今のところ水素発生速度が低い。これは、水素発生に関わる酵素が十分な性能を有しないためである。そこで、極めて強力な水素発生能力を有する嫌気性菌であるClostridiumのヒドロゲナーゼをラン藻に組み込み、その機能を応用するため、細胞に電気パルスを与えて一時的に孔を開け、Clostridiumのヒドロゲナーゼ蛋白質を藍藻の細胞内に取り込ませる疑似形質転換系を開発した。この方報では遺伝子的に蛋白質を導入するのではないが、細胞内で特定の蛋白質が働くかどうか簡易に評価することが出来る。Clostridiumのヒドロゲナーゼ蛋白質が直接導入されたPCC7942株において、Clostridiumのヒドロゲナーゼがラン藻菌体内で電子伝達系とカップリングし、水素発生を行うことが確かめられた。ヒドロゲナーゼの遺伝子をラン藻内で発現させれば水素発生の向上に寄与できると考えられた。

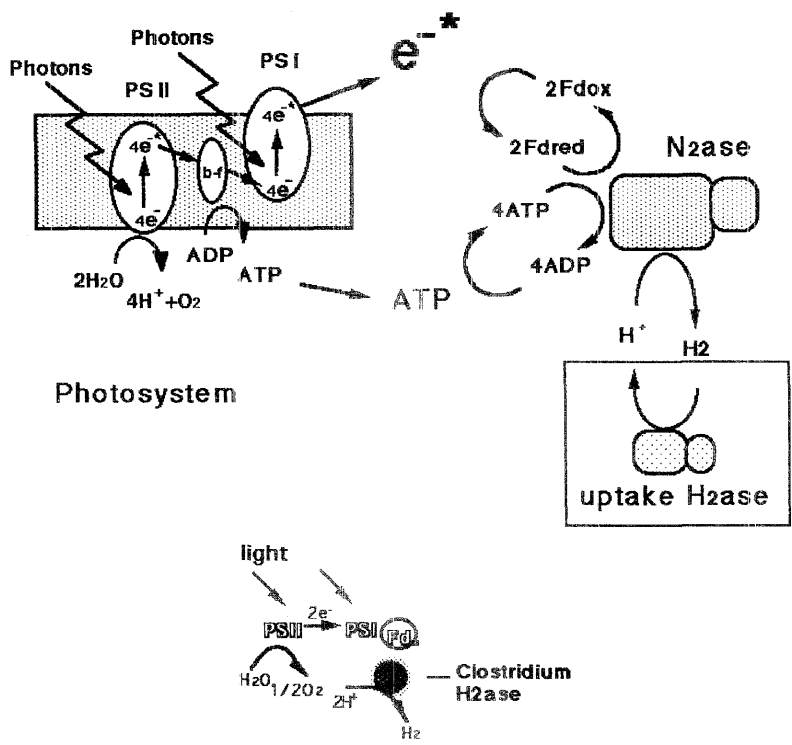


図3. 藍藻の水素生産反応と疑似形質転換による効果

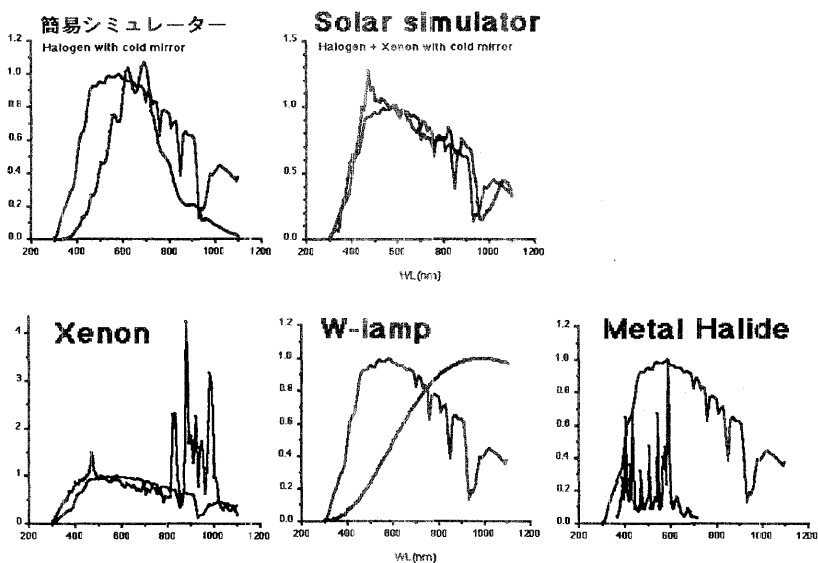


図4. ソーラーシミュレーターと各種光源の比較

そこで、PCC7942 を宿主とする発現ベクター pKE4-9 を用いて、Clostridium 由来ヒドロゲナーゼ遺伝子をレポーター遺伝子 (cat) と共に導入し、得られた形質転換ラン藻(7)について、各遺伝子の発現を調べた。その結果、cat 及びヒドロゲナーゼ遺伝子保有株で、cat、ヒドロゲナーゼがともに転写されていることがわかった。それらのサイズは 2.2kb と等しく cat 転写産物(0.7kb)、Clostridium のヒドロゲナーゼ転写産物(1.7kb) よりも大きかった。これは、cat とヒドロゲナーゼの融合 mRNA として得られているためと考えられた。海外の菌株コレクションを用いて海洋性の藍藻などから水素発生能力の高い菌株の探索も進めている。

光強度の影響： 効率的な水素生産を実現するための照射方法について検討した。特に、照射条件やエネルギー量・明・暗条件などを時間的に変化した光水素発生実験、光源の規格統一、簡易ソーラーシミュレーターの開発、多室型リアクターを用いたリアクター内の光環境の解析を行った。

(2) 大量培養技術

微生物の固定化、嫌気性細菌等との混合培養等、培養・制御技術の開発、大量培養技術、基質となる有機物等の前処理技術などを検討した。基質として

は、糖廃液、セルロース等を含有した廃水、下水汚泥、生ゴミが想定され、実際にそれら廃水を用い、屋外培養などを通じて水素発生実験が行われた。また、基質処理の過程で、嫌気細菌等による前処理、脱窒素、光合成細菌との混合培養、水素吸収などの副反応の制御、PHBの蓄積に影響を与えるパラメーターの検討を行った。

屋外リアクターを用いた実際の水素発生実験が4つの研究室で行われている。平板屋根型の容量20L規模の浮体式リアクターのバッチ運転、光誘導・拡散型フォトバイオリアクターの開発、太陽光集光システム(ひまわり)とガラスファイバーを用いた内部照射型リアクター、チューブ型リアクターを用いた水素発生システムがいずれも屋外に於いて、1ヶ月以上の連続運転を行っている。別表に示すとおり、安定に1%程度の効率で水素生産が行われることが証明された。

(3) 総合システム

下水汚泥、生ゴミ、食品工場廃水などを用いて太陽光下での1ヶ月程度の長期実験を行った。その結果光エネルギーの変換効率として0.5-1%超の効率を得られた。廃水を用いた水素生産を大規模なリアクターを行った結果としては高い効率を得られた。

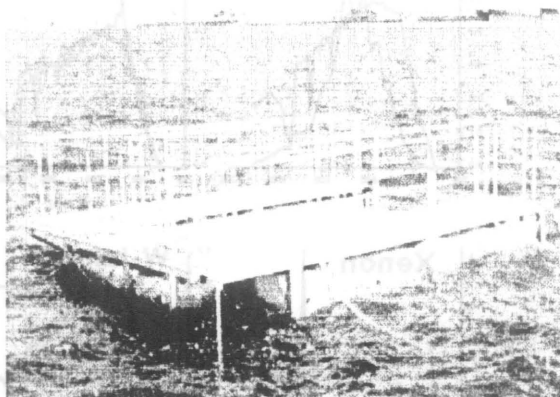
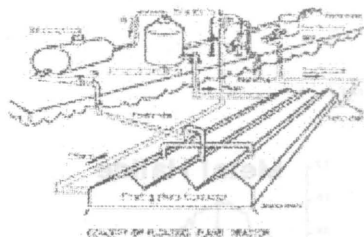


図5. 光合成細菌による水素発生リアクター
コンセプトと洋上リアクター (RITE IHI 分室提供)

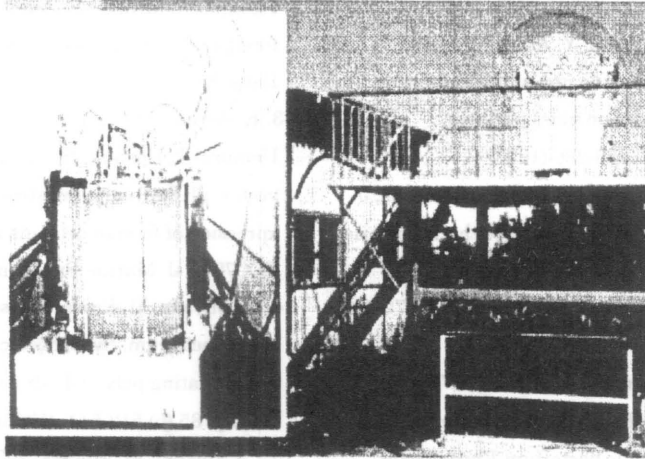


図6. 太陽光集光装置と内部照射型リアクター
(RITE クボタ分室提供)

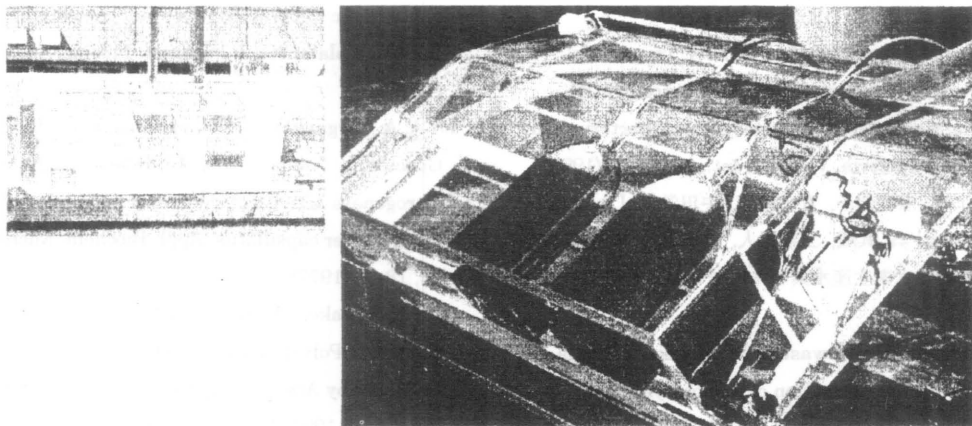


図7. 屋外水素発生の小規模実験 (生命工学工業技術研究所)

成果の普及活動

国際的研究交流を促進し、Biohydrogen 95, 東京と Biohydrogen 97, ハワイ (米国エネルギー省との共同開催) を開催した。後者のプロシーディングは今年注に出版の予定である。また、国内外の多くの学会で発、論文誌などで発表を行ってきた。

謝辞

本研究は、新エネルギー・産業技術総合開発機構の委託研究「環境調和型水素製造技術研究開発」と

して((財)地球環境産業技術研究機構において実施されたものである。図版提供頂いた石川島播磨重工業、(株)クボタおよび生命工学工業技術研究所の三宅正人主任研究官に感謝申し上げる。

5. 本プロジェクト関連で出版された文献の一部

1. M.Miyake, H.Kotani, Y.Asada, Isolation and identification of restriction endonuclease, Sel 1 from a cyanobacterium, *Synechococcus elongatus*, Nucleic

- Acids Research. 1992; 20 (2605): 2605.
2. A. A. Tsygankov, Y. Hirata, Y. Asada, J. Miyake
Immobilization of the purple non-sulfur bacterium
Rhodobacter sphaeroides on glass surfaces,
Biotechnol. Techniq., 7, 283-286 (1993).
 3. A. A. Tsygankov, Y. Hirata, M. Miyake, Y. Asada, J.
Miyake, Photobioreactor with photosynthetic bacteria
immobilized on porous glass for hydrogen
photoproduction, J. Ferment. Biotechnol., 77, 575-578
(1994).
 5. T. Suzuki, A. A. Tsygankov, J. Miyake, Y. Tokiwa, Y.
Asada, Accumulation of poly-(hydroxybutyrate) by a
non-sulfur photosynthetic bacterium *Rhodobacter*
sphaeroides RV at different pH, Biotechnol. Lett., 17,
395-400 (1995).
 6. E. Nakada, Y. Asada, T. Arai, J. Miyake, Light
penetration into cell suspensions of photosynthetic
bacteria, relation to hydrogen production, J. Ferment.
Bioeng., 80, 53-57 (1995).
 7. H. Zhu, J. Miyake, Y. Asada, A. A. Tsygankov,
Hydrogen production from highly concentrated
organic wastewater by photosynthetic bacteria and
anaerobic bacteria, Water Treat., 10, 61-68 (1995).
 8. 三宅 淳, 永峰恭子, 青山勝博, 中田栄寿, Lyudomila
Vasilyeva, 呉 其威, 三宅正人, 浅田泰男, 光合成微生物
による光水素生産水素エネルギーシステム, 21, 29-33
(1996).
 9. Y. Nagamine, T. Kawasugi, M. Miyake, Y. Asada, J.
Miyake, Characterization of a photosynthetic
bacterium *Rhodobacter sphaeroides* RV for hydrogen
production, J. Marine Biotechnol., 4, 34-37 (1996).
 10. E. Nakada, S. Nishikata, Y. Asada, J. Miyake,
Hydrogen production by gel-immobilized cells of
Rhodobacter sphaeroides: Distribution of cells,
pigments and hydrogen evolution, J. Marine
Biotechnol., 4, 38-42 (1996).
 11. A. A. Tsygankov, T. Laurinavichene, I. Gogotov, Y.
Asada, J. Miyake, Switching over from light
illumination to ammonium limitation of chemostat
cultures of *Rhodobacter capsulatus* grown in different
types of photobioreactors, J. Marine Biotechnol., 4,
43-46 (1996).
 12. M. Miyake, J. Yamada, K. Aoyama, I. Uemura, T.
Hoshino, J. Miyake, Y. Asada, Strong expression of
foreign protein in *Synechococcus* PCC7942, J. Marine
Biotechnol., 4, 61-63 (1996).
 13. K. Aoyama, M. Miyake, J. Yamada, J. Miyake, I.
Uemura, T. Hoshino, Y. Asada, Application of the
vector, pKE4-9 carrying strong promoter to the
expression of foreign proteins in *Synechococcus*
PCC7942, J. Marine Biotechnol., 4, 64-67 (1996).
 14. M. Miyake, M. Erata, Y. Asada, A thermophilic
cyanobacterium, *Synechococcus* sp. MA19 capable of
accumulating poly- β -hydroxybutyrate, J. Ferment.
Bioeng. 85 (5) 512-514, (1996).
 15. T. Suzuki, M. Miyake, T. Tokiaw, H. Saekusa, M.
Saitou, Y. Asada, A recombinant cyanobacterium that
accumulates poly-(hydroxybutyrate), Biotech.
Letters. 18 (9): 1047-1050, (1996).
 16. K. Aoyama, I. Uemura, J. Miyake, Y. Asada,
Fermentative metabolism to produce hydrogen gas
and organic compounds in a cyanobacterium,
Spirulina platensis, J. Ferment. Bioeng., 83, 17-20
(1997).
 17. A. A. Tsygankov, T. V. Laurinavichene, I. N.
Gogotov, Y. Asada, J. Miyake, Effect of light on the
nitrogenase activity of chemostat cultures of
Rhodobacter capsulatus, Appl. Biochem. Microbiol.,
33, 18-21 (1977).
 18. M. Miyake, K. Kataoka, M. Shirai, Y. Asada,
Control of Poly- β -Hydroxybutyrate Synthase
Mebiatod by Acetyl Phosphate in Cyanobacteria. J.
Bacteriol. 1997; 179 (16): 5009-5013.
 20. M. Miyake, Asada, Y., Direct Electroporation of
clostridial hydrogenase into cyanobacterial cell,
Biotech. Techniques 11 (11), 787-790, 1997;
 22. T. Martynski, D. Frackowiak, J. Miyake, A.
Dudkowiak, A. Piechowiak, The orientation of
bacterio-chlorophyll c in green bacteria cells and cell
fragments, J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 42, 57-66
(1998).
 23. E-A.A. Khatipov, M. Miyake, J. Miyake, Y. Asada,
Accumulation of poly-(greek beta)-hydroxybutyrate
by *Rhodobacter sphaeroides* on various carbon and
nitrogen substrates, FEMS Microbiol. Lett. 162/1,
39-45 (1998).

25. K. Noda, N. A. Zorin, C. Nakamura, M. Miyake I. N. Gogotov, Y. Asada, H. Akutsu, J. Miyake, Langmuir-Blodgett film of hydrogenase for electrochemical hydrogen production, *Thin Solid Films*, in press.
26. K. Noda, N. A. Zorin, C. Nakamura, M. Miyake, I. N. Gogotov, Y. Asada, H. Akutsu and J. Miyake, Langmuir-Blodgett film of hydrogenase for electrochemical hydrogen production, *Supramolecular Science*, in press.
27. H. Zhu, T. Suzuki, E. Nakda, Y. Asada, J. Miyake, Hydrogen Production From Tofu Wastewater by *Rhodobacter sphaeroides* Immobilized in Agar Gel, *IJHE*, in press.
28. A. S. Fedorov, I. P. Talipova, T. V. Laurinavichene, A. A. Tsygankov, Y. Asada, J. Miyake, Immobilized purple bacteria for H₂ production and waste water treatment, *Appl. Biochem. Microbiol.*, in press.
29. Y. Asada, M. Miyake and J. Miyake, Production of bioplastics and hydrogen gas by photosynthetic microorganisms, *Chinese J. Oceanology and Limology*, 16, 91-104 (1998).
30. M. Miyake, H. Nagai, M. Shirai, R. Kurane, and Y. Asada, A high-copy number plasmid capable of replication in thermophilic cyanobacteria, *App. Biochem. Biotechnol.* (in press), (1998).
31. 三宅 淳, 光合成独立栄養微生物: 光合成細菌のエネルギー変換機能の応用を中心に, *化学と生物*, 30, 597-603 (1992).
32. 三宅 淳, 浅田泰男, 光合成細菌による環境調和型水素生産, *生物工学会誌*, 71, 431-433 (1993).
33. 三宅 淳, 光合成細菌を用いた光水素生産と光電変換素子, *レーザー協会誌*, 19, 27-32 (1994).
34. 三宅 淳, 浅田泰男, 光合成微生物による光水素生産の改良: 遺伝育種技術の戦略, *水素エネルギーシステム*, 21, 23-28 (1996).
35. 三宅 淳, 人類生存とエントロピー的展望, *化学工学*, 61, 614-617 (1977).
36. 三宅 淳, 浅田泰男, 生物的水素生産, 地球温暖化への挑戦 (大内日出夫編), 日刊工業新聞社, (1992).
37. J. Miyake, Biological Solar Energy Conversion Renewable biological systems for alternative sustainable energy production, (FAO Agricultural Services Bulletin 128), (ed., K. Miyamoto), FAO, UN., pp.7-17.