

# 海藻を基質に利用した発酵法による 水素生産の可能性について

谷生重晴、菅沼 剛

横浜国立大学

240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台 79-2

## Feasibility of Hydrogen Production from Seaweeds by Fermentation

Shigeharu TANISHO and Takeshi SUGANUMA

Yokohama National University

79-2 Tokiwadai, Hodogaya-ku, Yokohama 240-8501

To use kelps as a substrate for fermentative hydrogen production by *Enterobacter aerogenes* strain E.82005, hydrogen evolution rates and yields from mannitol were measured under various salt-concentration cultures. Under non-salt condition, they were 13 mmol per liter culture per hour and 1.6 mol H<sub>2</sub> per mol mannitol, as compared with these, under salt condition 1%, 2%, and 3%, they were 9.9 and 1.5, 4.3 and 1.2, and 3.0 and 0.9, respectively. From these results, we concluded that the production of hydrogen is suitable under non-salt condition, but lower salt condition than seawater especially around 1% is allowable for practical production of hydrogen. The higher yield of H<sub>2</sub> from mannitol than from glucose was clearly shown from the mass balance between evolved H<sub>2</sub> and calculated H<sub>2</sub> from metabolite.

**Key words:** hydrogen production, fermentation, mannitol, kelp, biomass, sea water, *Enterobacter aerogenes*

### 1. 緒言

現在地球上には約2兆トンのバイオマスがあり、さらに毎年約2000億トンずつ生産されている。毎年生産されるバイオマスは全世界の年間エネルギー消費量の約10倍に相当し、バイオマスは、太陽光をエネルギー源として空気、水、土壌の作用で生成されることから、無限に利用可能なクリーンなエネルギーと言われている。

現在のところ、バイオマスのエネルギー利用法としては、

- ・バイオマスに含まれる石油成分を抽出する方法
- ・海藻や農林廃棄物などをメタン発酵やアルコール発酵の基質に利用して燃料とする方法
- ・人間や動物の糞やし尿をメタン発酵する方法
- ・光合成で水素発生を発生する藻類や菌類から水素を採る方法
- ・発酵法で炭水化物を水素に変換する方法
- ・葉緑体で太陽電池をつくる方法
- ・高温高压でバイオマスをガス化する方法

などが考えられている。メタン発酵によるメタンの発生やゴミの焼却熱を利用した温水の供給などを除いて、これらの利用法はまだ実用化されていないが、発酵法による水素化は非常に実用に近ところにある変換方法の一つである。

バイオマスは約2/3が陸上で、約1/3が水中とくに海水中で毎年生産されている[1]。日本は四面を海に囲まれ、水中バイオマスの生産に非常に適した環境にある。また、古くから海藻の利用が盛んで、紅藻類から作る干しノリは海苔として、褐藻類のコンブ、ワカメは調味料、食用として養殖、採取されており、よく研究されている海藻作物類の一つでもある。これら海藻のうち、マコンブ、オニコンブなどは非常に生産性が高く、さらに、水深50mから低潮線の間で生育するので、沿岸域でエネルギーバイオマス資源として栽培生産する可能性は非常に高いと言える。

コンブ類は図1に示すようにマンニトールを主成分とし、アルギン酸をほぼ同量含んでいることが知られている[2]。筆者らが発酵水素発生に利用している

*Enterobacter aerogenes* は、マンニトールを基質に使用して水素発生を行うだけでなく、グルコースを基質にしたときの水素収率が1.0 [mol-H<sub>2</sub>/mol-substrate]であるのに対し、マンニトールでは1.6と効率よく水素を発生する[3]。また、水素発生速度も36 mmol l-culture<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>と非常に速く[4]、コンブ類のエネルギー利用には発酵水素発生法は最も適した変換法の一つと考えられる。

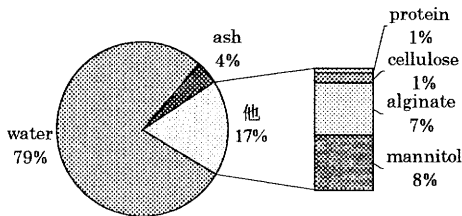
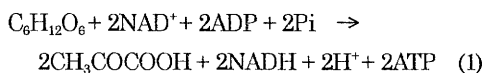


図1 コンブの構成成分組成

これまで、*E. aerogenes* の水素発生では、塩化ナトリウムを含まない培地で実験が行われてきたが、海藻を大量に使用するなら、塩水培地で水素発生を行うことがコストを抑えた工業的水素生産のために必要になると考えられる。本報では、種々の塩濃度下での発酵水素発生をしらべ、海水環境下での水素生産の可能性を検討したので報告する。

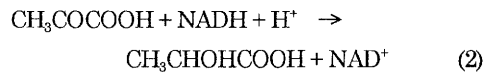
## 2. 発酵水素発生

発酵により水素を発生する微生物は、グルコースなどの糖類を代謝分解することにより、水素と有機酸を生成する。代表的な糖の代謝経路としては、EM (Embden-Meyerhof) 経路、ED (Entner-Doudoroff) 経路、PP (Pentose Phosphate) 経路の3つの経路があり、生物にとってのエネルギー源であるATP (Adenosine Triphosphate)を生産している。*Enterobacter* 科の微生物は、酸素が無い嫌気状態下では主にEM経路でグルコースを分解し[5]、水素発生に関与するNADH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide, reduced form)とピルビン酸、ATPを次のように2モルづつ生成する。

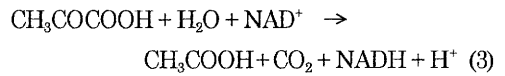


ピルビン酸はさらに反応して、次の例のように最終の代謝産物に変化する。

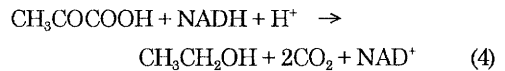
・乳酸



・酢酸

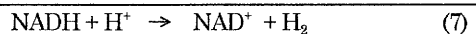
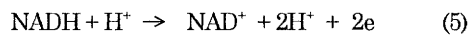


・エタノール



このように、生物は嫌気状態下でNADHを再酸化するために代謝産物を生成しているが、培地 pH が低くなると、バクテリアは細胞の近傍の pH を生育に適切な状態に保つために、一部のNADHを次のように反応させて水素を発生すると言われている[6]。

・水素



## 3. 実験方法

実験に使用したバクテリアは、*Enterobacter aerogenes* st.E.82005 である[4]。表1に示した前培養液組成で準備した滅菌液に菌を植え付けた後、38°Cの恒温槽で攪拌しながら17時間菌体を培養した。この前培養菌液 1 mlを表1に示した本培養食塩液 35 mlに加え、マグネティックスターラーで攪拌しながら一定時間毎に水素の発生量を測定した。培養前と培養後の培地は、液体クロマトグラフ(信和化工㈱、Ultron PS-80H)で分析し、代謝産物濃度を測定した。菌体重量は吸光度計

表1 培養液組成

成分	前培養 [g/l]	本培養 [g/l]
Glucose	15.0	—
Mannitol	—	15.0 (7.5)*
Peptone	2.0	5.0
Citrate·H <sub>2</sub> O	1.0	1.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.0	2.0
MgSO <sub>4</sub>	0.2	0.2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14.0	1.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6.0	1.5

\* 一部の試験では7.5g/lの濃度で行った。

を用いて測定した。また、培養途中の菌体濃度、代謝産物濃度の測定は、2 l の培養槽で 1.8 l の培養液を用いて行った。

4. 実験結果

図2は各食塩濃度における水素発生量の経時変化の図を示したものである。この図から、食塩濃度が高くなるにつれ、水素発生量及びグラフの傾きとして表れる水素発生速度が悪くなっていくことがわかる。食塩を加えていないグルコース培地からは培養開始後約2時間で水素を発生したが、食塩を加えて培養を行うとNaCl濃度1%では約3時間後、2%では約4時間後、3%では約6時間後に水素発生が始まり、水素発生までに時間を要した。また、食塩濃度1%では水素発生が20時間で終了したが、2%、3%では30時間経過してもまだ水素発生を持

続していた。培養終了後のマンニトールの消費量を比較すると、初めに82.3 mmol/lあったマンニトールが、塩濃度1%では20時間ですべて消費されたが、3%では45時間後でも67.2 mmol/lが消費されただけであった。図中の実線は次式で表わされる修正ロジスティック曲線で[7]、実測値と近似曲線値とは非常によく一致しており、水素発生の始発時間、水素発生速度、水素発生量の推定には利用できる。

$$V = P_{max} \times \exp\{-\exp[R_{max} \times e / P_{max} \times (L - t) + 1]\} \quad (8)$$

- V:水素発生量 [mmol]
- $P_{max}$ :最大水素発生量 [mmol]
- e :2.71828
- $R_{max}$ :最大水素発生速度 [mmol/h]
- L:水素発生までに要する時間 [h]
- t:培養時間 [h]

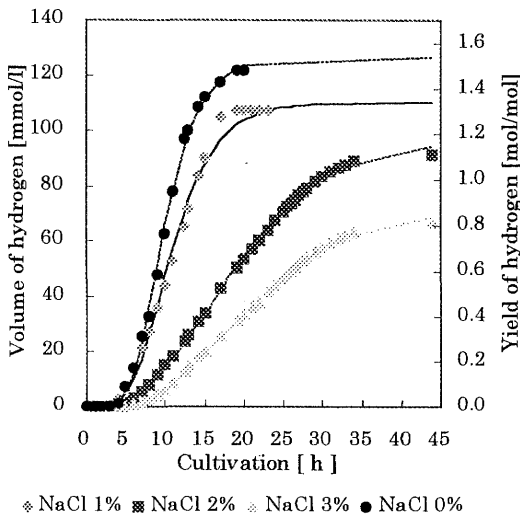


図2 各食塩濃度下での水素発生状況

表2に示すように、食塩濃度が濃くなると、水素発生量、発生速度、発生までの時間、発生終了時間、収率、マンニトール消費量のどの比較要素も悪くなったが、食塩濃度1%と3%について、水素発生終了時の菌体濃度を消費マンニトール量当たりで比較すると、それぞれ 14.6、15.9 [mg-dry cell/mmol-mannitol]でほとんど変わらなかった。このことから、NaCl はマンニトールの取り込みに影響を与え、その結果、菌の増殖速度が遅くなり、水素発生速度なども遅くなったと考えられる。

これらの結果から、海水を直接培養液に利用することは生産性の観点から適当ではないが、収穫した昆布に付着している海水が混ざる程度であれば、水素発生に大きな影響を与えないと言えるであろう。

表2 水素発生特性に及ぼすNaCl濃度の影響

NaCl 濃度	実測値					近似曲線による予測値			
	水素発生量	水素発生速度	収率	基質消費量	菌体濃度	水素発生量	水素発生速度	始発時間	収率
[%]	[mmol/l]	[mmol/(l·h)]	[mol/mol]	[mmol/l]	[g/l]	[mmol/l]	[mmol/(l·h)]	[h]	[mol/mol]
0	122	14.9	1.5	82	—	127	15.0	5.6	1.55
1	107	9.2	1.3	82	1.20	110	10.0	5.6	1.33
2	91	4.8	—	—	—	98	4.4	7.3	—
3	67	3.5	1.0	67	1.07	72	3.1	9.0	1.27

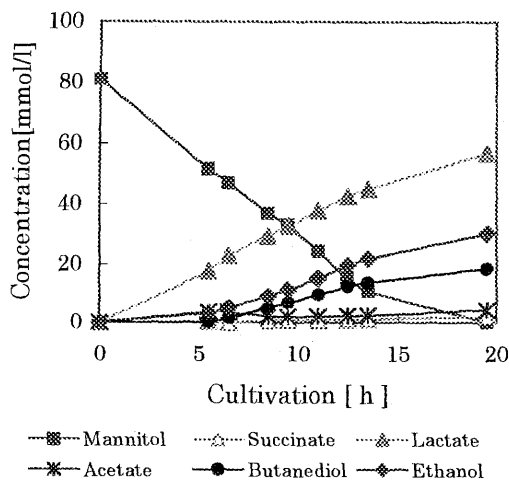


図3 NaCl存在下でのマンニトールの代謝

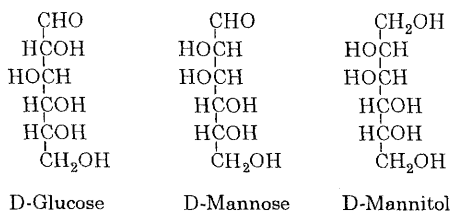


図4 D-グルコース、D-マンノース、D-マンニトールの構造式

図3は、1%塩濃度下での培養における液体クロマトグラフで分析した培地中のマンニトールと代謝産物の濃度を示したものである。この図から分かるように、主な代謝産物は乳酸、酢酸、コハク酸、エタノール、ブタンジオールであった。図4はマンニトール、D-グルコース、D-マンノースの構造式を示している。グルコースの解糖系における代謝反応では、2モルのピルビン酸と2モルのNADHが生成される。ピルビン酸とNADHは、代謝産物生成過程で更に反応し、乳酸など種々の代謝産物が生成するが、余ったNADHは水素を発生することでNAD<sup>+</sup>に再酸化される。

マンニトールはC<sub>6</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>とグルコースやマンノースよりも水素原子が2つ多い分子式で表わされるため、解糖系における分解の式は次式のようなのではないかと考えられる。

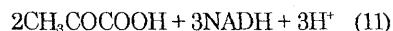
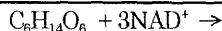
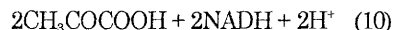
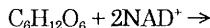
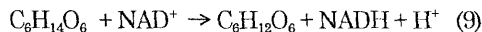


図3に示す代謝産物濃度から、式(1)~(7)などに示す代謝反応式を使用すれば、マンニトールの分解により生成したピルビン酸量とNADH量、代謝産物生成に使用されたNADH量が分かるので、余ったNADHは全て水素発生に使われたとして、計算で求めた水素量と実測で得た水素量とを比較することで、この式が正しいかどうか判定できる。図5はその結果を示している。計算による水素量と実測の水素量の経時変化が非常によく合っていることから、マンニトールの分解反応には、3 molのNADHが関与していることが明らかになった。

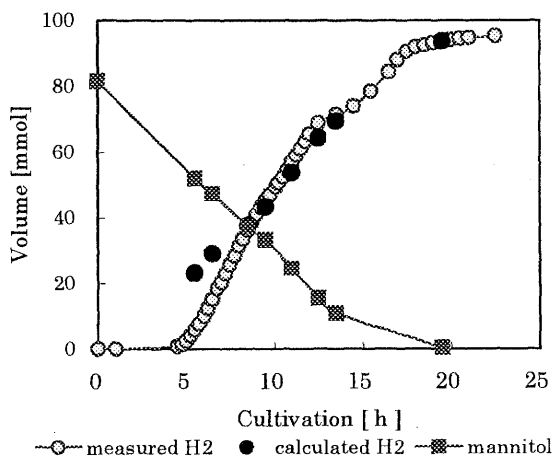


図5 マンニトール代謝の計算による水素発生量と実測値との比較

表1に示したように、本培養液には窒素源としてペプトンを5 g/l 加えていた。コンブには約1%のタンパク質が含まれているが、コンブのタンパク質は*E. aerogenes*の増殖には適さず、ペプトンを加えない培地では水素発生が見られなかったためである。しかし、*E. aerogenes*の塩水下での水素生産では窒素源がどれくらい必要であるか、あるいは窒素源の多少が水素発生に影響するのかがどうかについてはまだ明らかではない。

表3 NaCl1%下での水素発生特性におよぼすペプトン濃度の効果

ペプトン濃度 [g/l]	最大水素発生速度 [mmol/(l h)]	水素収率 [mol/mol]
0.7	0.7	0.2
2.0	2.8	0.5
5.0	9.2	1.3
6.7	8.5	1.2
13.3	7.5	1.2
20.0	7.6	1.3
26.7	7.5	1.4

そこで、食塩濃度1%におけるペプトン濃度と水素発生活性の関係を調べた結果を一覧に示したのが表3である。水素収率は、培地のマンニトールがすべて使用されたと仮定して計算した値であるから必ずしも正確ではないが、ペプトンが少なすぎると水素発生量が少ないことを明瞭に表している。一方、最大水素発生速度はペプトン濃度が 5.0 g/l で最大値を示し、水素収率が5.0g/l以上ではほぼ一定の傾向を示すとは非常に異なった結果を得た。この原因についてはまだ不明なところが多く、今後の成果を待つ必要がある。

図6はペプトン量が菌体の増殖量にどのように影響するか調べた結果を表したものである。窒素源が多くなるにしたがって増殖量も多くなるが、10 g/l 以上ではほぼ同じ増殖量であると言える。表3とこの図から、窒素源は 5 g/l 以上あれば充分であることがわかった。

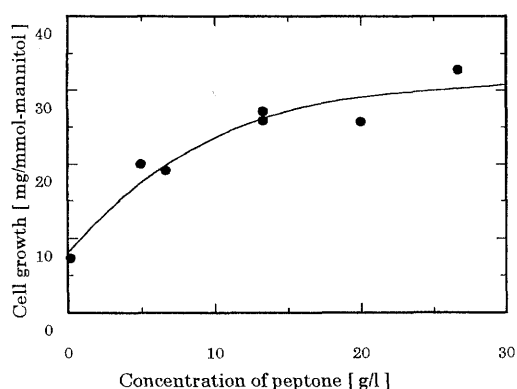


図6 NaCl1%下でのペプトン濃度と菌体濃度との関係

コンブを基質に使用する場合には窒素源を加えなければならないことがわかったので、市販の乾燥昆布29 gをミキサーで粉碎し、水切りゴミ袋で未粉碎コンブを濾

し取った試料を本培養液組成のマンニトールの代わりに加えて、NaCl 濃度1%で実験を行った。その水素発生状況を図7に示した。この時、液体クロマトグラフで測定した初期マンニトール濃度は12.2 mmol/l (2.22g/l)で、マンニトール量はかなり少なかった。しかし、水素発生速度は 7.9 mmol l-culture<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>と、マンニトールを用いたときの最大値 9.2 mmol l-culture<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>より遅いけれども、高濃度ペプトンの時と比べるならばほぼ同じ速さであった。また、水素収率は1.4を示し、マンニトールを用いた時と同じであった。したがって、コンブには、マンニトール以外にアルギン酸、灰分、蛋白質などが含まれているが、マンニトール以外の成分が水素発生の収率、発生速度に与える影響は少ないと思われる。ただ、実験後、培養槽底部にアルギン酸と思われる粘性のある物質が沈澱しており、攪拌動力などへの影響が今後問題になるとと思われる。

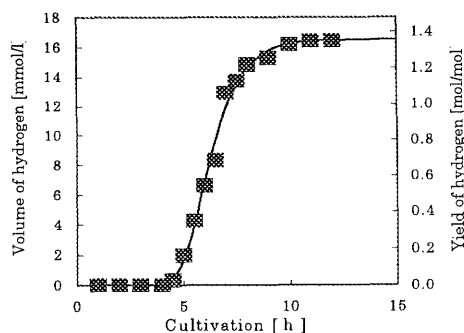


図7 NaCl1%濃度下でコンブを基質に使用した時の水素発生状況

## 5. 考察

この実験からコンブが非常によい水素発生を示すことが分かった。そこで、栽培バイオマスからどれほどの電気エネルギーが得られるか、現在の栽培昆布の収穫状況を基に試算を試みた。生昆布の栽培収穫量は14.5 kg/m<sup>2</sup>、マンニトールの含有量は湿重量の 8%と報告されている[2]。水素の高位発熱量を68.3 kcal/mol、水素エネルギーを電気エネルギーに変換する燃料電池の総合効率を60%とすると、コンブ栽培面積 1 km<sup>2</sup>あたりから獲れるコンブ量、マンニトール量、発生水素量、総合発電量は表4のように計算される。同様の計算をサトウキビに含まれるスクロースを基質とする場合についても行い表4に示した。

表4 コンブとサトウキビを基質の供給源としたときの  
水素生産量とエネルギー生産量の比較

	Kelp	Sugarcane	Unit
Yield of product	145	169*	[ton/ha]
Yield of product	14,540	16,900	[ton/km <sup>2</sup> ]
Hexose	1,163	2,535	[ton/km <sup>2</sup> ]
H <sub>2</sub> yield	229,061	415,088	[Nm <sup>3</sup> /km <sup>2</sup> ]
Power	304,603	671,208	[kW.h/km <sup>2</sup> ]

\* "Renewable Energy", ed. Johansson et al.,  
Earthscan Pub. Ltd., 1993, p.847.

1 km<sup>2</sup>の栽培面積から得られる電気エネルギー量はあまり多くなく、平均的家庭100軒程度を賄える量にしかならないことがわかった。これは基質からの水素エネルギーへの変換効率が悪いため、今後、*Clostridium butyricum* のような水素収率の高いバクテリアを使用するか、このバクテリアよりさらに収率の高いバクテリアを発見または改良する必要があるだろう[8]。さらに、有機酸を多く含む代謝廃液をメタン発酵に利用して今一段のエネルギー回収を図る必要がある。

同時に、バイオマスには太陽エネルギーが高々5%変換固定されただけであり、サトウキビで約2%と見積もられることから、コンブのアルギン酸、サトウキビのバガスを有効に利用して総合的な効率の向上を図る必要があるだろう。アルギン酸は非水溶性で、粘度を増加させたり乳化組織を安定させる作用を持つため、フィルム、ゴム、リノリウム、化粧品、カーワックス、塗料などの製造に使われており、また、アルギン酸レーヨンは、手術糸その他の医療用として用いられるなど付加価値は高い。

## 6. 結論

以上の結果から、コンブを基質に用いた水素生産に関して次のようなことが明らかになった。

1. NaCl濃度が濃くなると、水素発生量、水素発生速度、水素発生までの時間、水素発生終了時間、水素収率、マンニトール消費量のどの要素もNaClが無い培地での水素発生より悪くなる。
2. 海水を直接培養液に利用することは適当ではないが、収穫した昆布に付着している海水が混ざる程

度であれば、水素発生に大きな影響を与えない。

3. グルコースの解糖系では 2 mol のNADHが関与しているのに比べ、マンニトールの分解反応では3 molのNADHが関与し、そのために水素収率が高くなる。
4. コンブを基質に使用するときには窒素源を加えなければならないが、窒素源は 5 g/l 以上あれば充分である。
5. コンブに含まれるマンニトール以外の成分が水素発生の収率、発生速度に与える影響は少ないが、粉碎後アルギン酸を除去しなければ、アルギン酸による粘性の増加が攪拌動力などに影響を与えることが示唆された。
6. *E. aerogenes* よりさらに収率の高いバクテリアを発見または改良する必要が示唆された。
7. 代謝廃液をメタン発酵でさらに利用し、今一段のエネルギー回収を図る必要性が示された。

## 7. 参考文献

- 1) 清水幸丸, "自然エネルギー利用学", パワー社, pp.12, 25, 123 (1993).
- 2) Sanbonsuga, Y.: "Studies of the growth of forced Laminaria", Bull. Hokkaido. Reg. Fish. Res. Lab., 49, 10-13 (1984).
- 3) 谷生重晴ら: 発酵工学会誌, "Enterobacter aerogenesの発酵水素発生と利用基質について" 67, 29-34, (1989).
- 4) Tanisho, S., and Y. Ishiwata: Int. J. Hydrogen Energy, "Continuous hydrogen production from molasses by the bacterium Enterobacter aerogenes", 19, 807-812 (1994).
- 5) 日本生化学会編: 生化学データブック II, 東京化学同人, p.878 (1981).
- 6) Tanisho, S., et al.: Biochim. Biophys. Acta, "Hydrogen evolution of Enterobacter aerogenes depending on culture pH", 973, 1-6 (1989).
- 7) Lay, J.J., et al.: Wat. Res., "The influences of pH and moisture content on the methane production in high-solids sludge digestion", 31, 1518-1524 (1997).
- 8) Tanisho, S.: "Hydrogen production by facultative anaerobe Enterobacter aerogenes", in BioHydrogen, pp.273-279, ed. Zaborsky et al., Plenum Press (1998).