

# 水素エネルギーとバイオ

松永 是・松本光史

東京農工大学工学部

小金井市中町 2-24-16

## Hydrogen Energy and Biotechnology

Tadashi Matsunaga and Mitsufumi Matsumoto

Tokyo University of Agriculture and Technology

2-24-16 Naka-cho, Koganei, 184-8588

Biological hydrogen production has been carried out to develop a renewable and environmentally acceptable energy source. Hydrogen production by photosynthetic bacteria and cyanobacteria is one approach that has been investigated extensively. Double phase photobioreactor was used to increase hydrogen production from marine photosynthetic bacteria. The hydrogen production was enhanced 5 times higher than the conventional reactors. Marine cyanobacterial strains in the genus *Cyanothece* at our culture collection were divided into two groups by resulting from hydrogen production rates and phylogenetic analysis using 16S rDNA. Floating culture using floating materials (coal fly ash block: CFAB) and adhesive marine cyanobacterial of *Synechococcus* sp. was successfully performed in an artificial medium. Cell growth on surface of CFAB was enhanced in the seawater as compared with the artificial medium.

**Keywords:** Hydrogen production, Photosynthetic bacteria, Double phase reactor, Floating culture

### 1. はじめに

海は、私たちに食料や環境の維持など多大な恩恵を与えてくれる。海洋の有効性、又は優位性の一つに、地表の約7割という広大な面積を有していることである。さらに、エネルギーや物質生産など、多くの可能性を秘めている。バイオ技術の中で、マリンバイオテクノロジーは海洋生物を利用した総合技術であり様々な分野をあげることが出来る。表1にマリンバイオテクノロジーの主要技術をまとめた。様々な分野が挙げられるが近年、新規海洋生物の探索や環境問題への応用の重要性が特に強く認識されている。

水素エネルギーは、クリーンなエネルギー源として期待されている。バイオ技術を利用した水素生産は、穏和な条件下で行えることから注目されている。その中で光合成微生物による生物学的な水素生産は、太陽エネルギー

を水素エネルギーに転換できる利点をもっている。しかし、生物学的な水素生産では、有望株の探索、維持管理、生産方法など多くの支援技術が必要である。海洋光合成微生物は、広く海洋に分布し、光エネルギーを利用して水素をはじめ様々な有用物質を生産する。そこで本稿では、マリンバイオテクノロジーの中心である海洋光合成微生物の保存、管理、さらに海洋光合成微生物を利用した水素エネルギーを含めた物質生産の可能性について述べたい。

### 2. 有用物質を生産する海洋光合成微生物の保存及び探索

水素を含めた有用物質を生産する海洋光合成微生物の探索、又は保存や管理は、バイオ技術の中で重要な位置を占めると考えられる。図1に世界中の主な光合成微生物のカルチャーコレクションの存在する場所を示した。

日本においても、カルチャーコレクションを揃える施設、研究機関が存在するが、海洋光合成微生物のカルチャーコレクションといえるのは、海洋バイオテクノロジー研究所と本研究室にあるNK株であろう。海洋光合成微生物による生物学的手法によって、現在問題になっている再生可能エネルギー開発などの諸問題の解決、また、海洋の利用性を高めるためにも、海洋光合成微生物のカルチャーコレクションの充実をはかる必要がある。有望株の検索には多くの労力と時間を必要とする。しかし、諸問題の生物学の解決を進めるには、あらゆる環境から有望株の検索を行い、多様性に富んだ株を獲得する必要がある。現在でも新種の生物が発見されていることから明らかであるが、海洋には未だに、我々の目の前に現れていないすばらしい機能を持つ光合成微生物の存在の可能性がある。これらのことから、海洋光合成微生物の検索、保存、管理はこれからのマリンバイオテクノロジーにとって重要な技術であると考えられる。

### 3. 二層式フォトバイオリアクターを利用した海洋光合成細菌の水素生産の効率化

光合成細菌の水素生産量は、他の微生物に比べ高い速度で水素生産を行うことが可能であることから、生物学的水素生産において期待される菌種である。1949年に光合成細菌で水素生産が起こることが明らかにされてから[1]、光合成細菌から水素を効率よく取り出す研究が進められている。これまでに、高水素生成を行う光合成細菌の検索[2-3]や変異株[4-7]を作製し、水素生成量の向上を目指して多くの研究がなされてきた。このなかで、我々は高水素生成能を有する海洋光合成細菌 *Rhodovulum* sp. NKPB 160471 株[2]に着目し、明暗所の2つの層を持つ二層式リアクターを作製し(図2)、微好気条件下(20  $\mu\text{mol O}_2/\text{reactor}$ )で水素生産を行った。その結果、二層式のリアクターを用いた場合、従来のリアクターと比較して5倍量も、水素生産が高まることを明らかにした[8](図3)。これは光合成細菌の微好気、暗所での呼吸によるATP生成の増加によるものであった(表2)。細胞のATP含有量は他の条件に比べ、5~10倍量に達することが確認された。光合成細菌の水素生産は細胞内のニトロゲナーゼによって触媒されており、この反応ではATPの供給が律速となっている。この律速となっているATPを微好気、暗所で呼吸によって生成、細胞内に蓄積させ、明所で水素

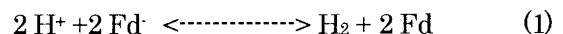
生産を行うことで、より多くの水素を取り出すことを可能とした。二層式のリアクターと光合成細菌の呼吸によるATP生成を組み入れることで、より多くの水素を同じ細胞、リアクターから生産することが可能であり、光合成細菌を用いた水素生産において有効な技術と考えられる。

### 4. 海洋シアノバクテリアの水素生産と系統

海洋シアノバクテリアの水素生産は、生産量の大きさから期待されてきた。そこで、当研究室に保存されている *Cyanothece* 属の海洋シアノバクテリアの水素生産性を検討した。その結果、同じ *Cyanothece* 属に帰属される株において、水素生産量が比較的高いグループと(Group A)、低いあるいは全く生産しないグループ(Group B)が存在することが確認された(表3)。16S rDNA配列を用いて、これらの株の分子系統関係を解析したところ、Group AとGroup Bでは、分子系統上も2つのグループに分けられることが確認され(図4)、水素生産能力と系統関係に何らかの相関関係があることがわかった。このことは、高水素生産能力をもつ海洋シアノバクテリア系統群に対して特異的な primer を設計することにより、環境から高水素生産能力をもつ海洋シアノバクテリアを探索・分離することが可能であることを示唆している。

シアノバクテリアを利用した水素生産は、光合成細菌と同様に主にニトロゲナーゼを利用する。しかし近年、真核緑藻 *Chlamydomonas* を用いた水素生産で、双方向ヒドロゲナーゼを利用する試みが行われている(9,10)。この酵素は、微生物の  $\text{H}_2$  代謝に関わっており、原核・真核を問わず広く微生物に分布している(11,12)。また、水素生産においてこの酵素は、ニトロゲナーゼと異なり、ATPのエネルギーを必要としない利点を持つ(式1)。

#### Hydrogenase



これは、ニトロゲナーゼと比べ、エネルギー的に有利であることを示している。さらに、この酵素を持つ微生物が広く分布していることから、より多くの光合成微生物を対象にした水素生産へ応用することが出来ると考えられる。

### 5. 浮遊培養を用いた海洋バイオマス生産

農業バイオマスを利用したアルコールへのエネルギー

生産は、すでに米国、ブラジルなどの国で行われている。日本における農業バイオマス利用は、農業形態、生産規模の違いから、これらの国々と同じ利用形態を取れない。そこで、独自のバイオマス利用を考える必要がある。日本は、周りを海に囲まれている。海洋表層には、光合成微生物の生育に利用可能な十分な光、栄養塩が存在する。このことから、海洋表層で海洋光合成微生物を培養し、そこから生産される海洋バイオマスの利用が考えられる。

当研究室ではこれまでに海洋光合成微生物の有効性に着目して研究しており、海洋の様々なところよりサンプリングを行い、多くの有用物質を生産する海洋光合成微生物を見出してきた(表4)。さらに、これらを用いた、効率的な物質生産に関する研究を行ってきた。

浮遊培養は、浮遊性の担体に海洋微細藻類を固定し、その表面で増殖させる培養方法である。この方法を用いることで、海洋表層で培養が行え、藻体の回収が容易であるといった利点がある。さらに、効率的で集約的な海洋大規模培養に用いることが可能と考えられる。そこで、我々は浮遊性を持つように改良した石炭灰ブロック(Coal fly ash block: CFAB)を用いて、付着性を有する海洋微細藻類を用いて浮遊培養について検討を行った結果、海洋シアノバクテリア *Synechococcus* sp. NKBG 040607 株が CFAB に付着し、良好な生育を示すことを見出した[13]。図5に付着、生育する *Synechococcus* sp. NKBG 040607 株を示した。このことから、CFAB のような浮遊性担体を用いることで浮遊培養が可能であると考えられた。また、浮遊培養を海水中で行うことにより最も付着量が増大し、培養19日目に  $2.0 \times 10^9$  cells/cm<sup>2</sup> に達した(図6)。さらに、CFAB は成型過程において、微細藻類に必要な栄養塩を内包させることが可能で、栄養塩の少ない海域での培養も十分可能であると考えられる。

このような浮遊培養を利用することで、海洋表層の生産プロセスを利用した海洋バイオマスの生産を行うことが出来ると考えられる。さらにそれらを、バイオマスエネルギー変換プロセスを利用した水素、メタン、アルコール変換に利用することが可能となると考えられる(図7)。

## 6. おわりに

光合成微生物を利用した水素生産は、触媒や物理化学的手法と異なり、無限ともいえる光エネルギーから水素エネルギーへの変換を可能とする。このため、光合成微生物は、今後も水素エネルギー問題解決の重要な役割を果たし、生物学的水素生産に貢献するものと考えられる。

## 参考文献

1. H. Gest, M.D. Kamen; Science 109, 558-559 (1949)
2. A. Yamada, T. Hatano, T. Matsunaga; Biohydrogen, Plenum Press, New York, 167-171(1998)
3. J.Miyake, S. Kawamura; Int. J. Hydrogen Energy 12, 147-149 (1986)
4. E. Hustede, A. Steinbuchel, H.G. Schegel; Appl. Microbiol. Biotechnol. 39, 87-93 (1993)
5. M. Kern, H.G. Koch, J.H. Klemme; Appl. Microbiol. Biotechnol. 37, 496-500(1992)
6. M. Kern, W. Klipp, J.H. Klemme; Appl. Environ. Microbiol. 60, 1768-1774 (1994)
7. N.A. Zorn, T. Lissolo, A. Colbeau, P.M. Vignatus; J. Mar. Biotechnol. 4, 28-33
8. T. Matsunaga, T. Hatano, A. Yamada, M. Matsumoto; Biotechnol. Bioeng. 68, 647-651 (2000)
9. A. Melis, L. Zhang, M. Forestier, M.L. Ghirardi, M. Seibert; Plant. Physiol. 122, 127-136 (2000)
10. M.L. Ghirardi, L. Zhang, J.W.Lee, T. Flynn, E. Greenbaum, A. Melis; Trends Biotechnol. 18, 506-511 (2000)
11. J. Appel, R. Schulz; J. Photochem Photobiol. 47, 1-11 (1998)
12. P.F. Weaver, S. Lien, M. Seibert; Sol. Energy 24, 2-45 (1980)
13. M. Matsumoto, E. Yoshida, H. Takeyama, T. Matsunaga; Appl. Biochem. Biotechnol. 84/86, 51-57 (2000)

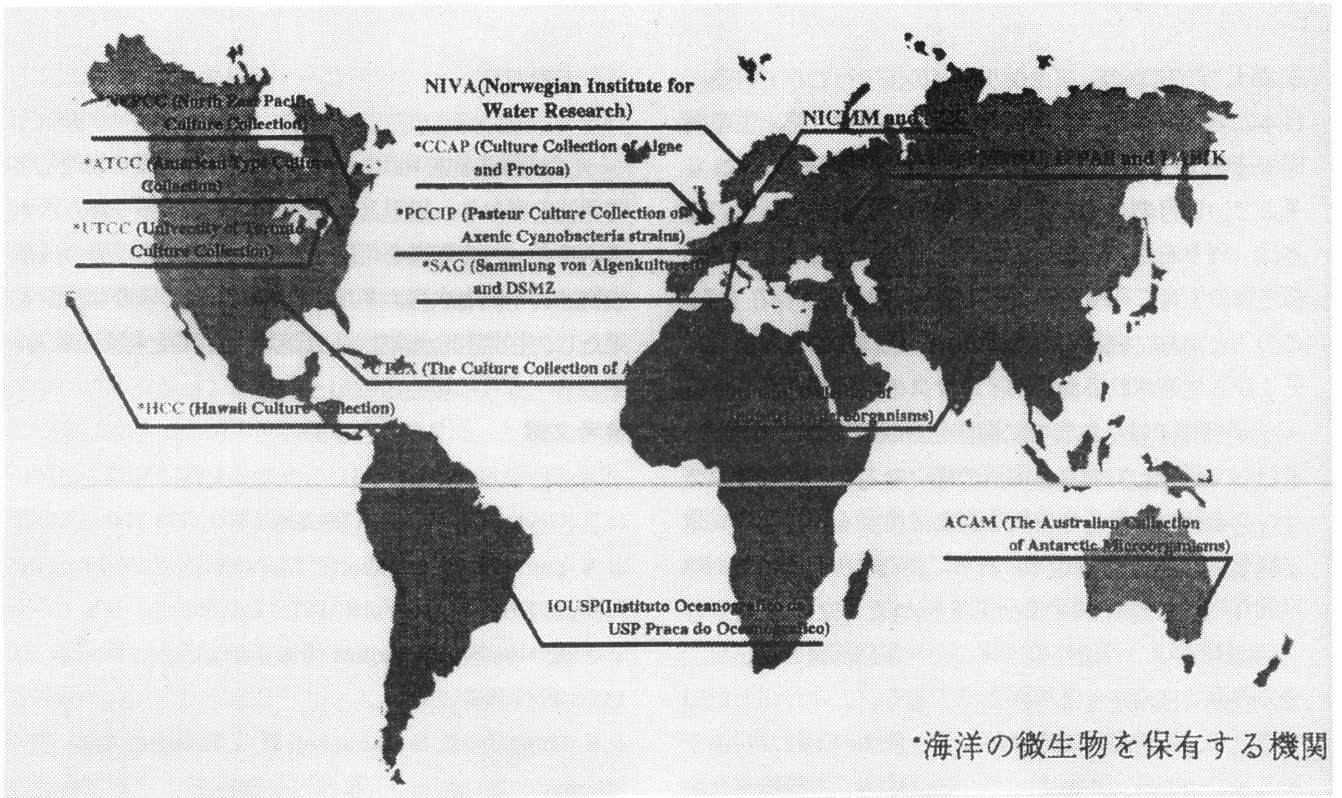
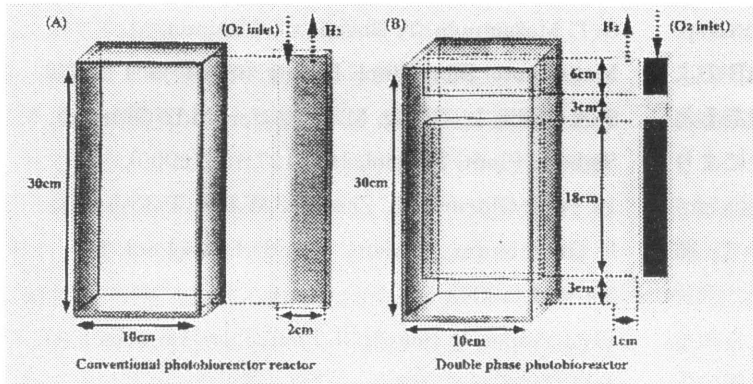
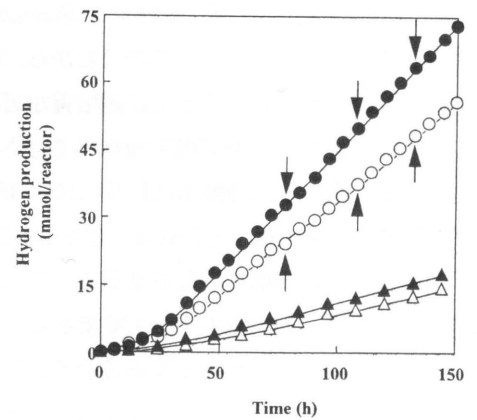


図1 世界の代表的なカルチャーコレクションを保有する機関



(A)従来型のリアクター (B)二層式のリアクター

図2 海洋光合成細菌の微好気条件下での水素生産に用いる二層式リアクターの構成図



(○) 従来式リアクター (6h 毎に20 $\mu$ molのO<sub>2</sub>を添加)  
 (●) 二層式リアクター (6h 毎に20 $\mu$ molのO<sub>2</sub>を添加)  
 (△) 従来式リアクター(嫌気)  
 (▲) 二層式リアクター(嫌気)

Arrows indicate injection time point of 7.5 mmol of L-malate.  
 Cell concentration was adjusted to 3.1 mg dry weight/ml.  
 Light intensity was adjusted to 34.5W/m.

図3 二層式リアクターを用いた微好気下での水素生産

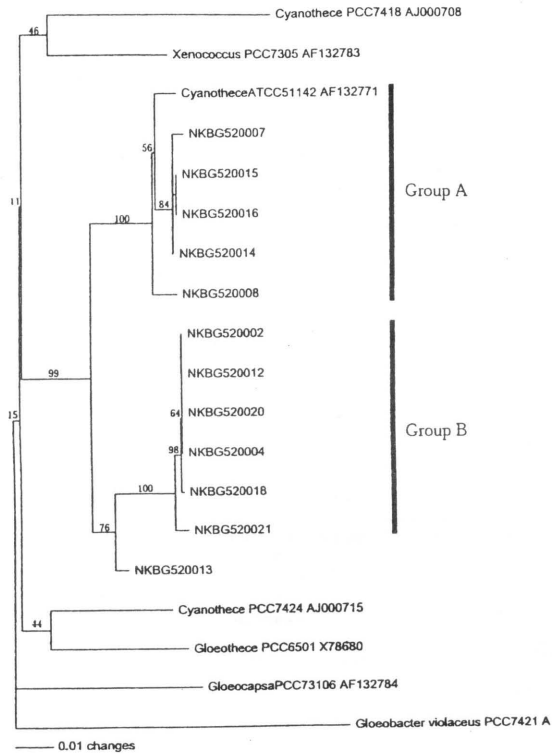


図4 海洋 Cyanobacter sp. NKBG 株の系統樹

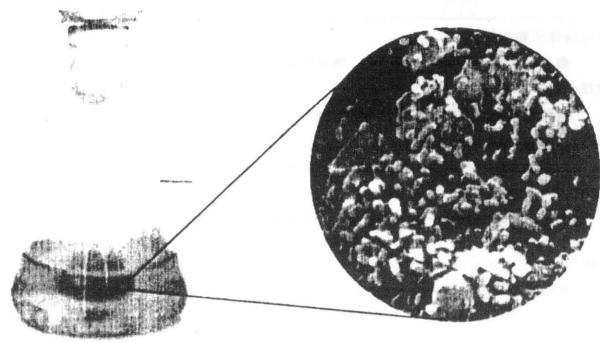


図5 浮遊性石炭灰ブロックに付着、生育する Synechococcus sp. NKBG 040607

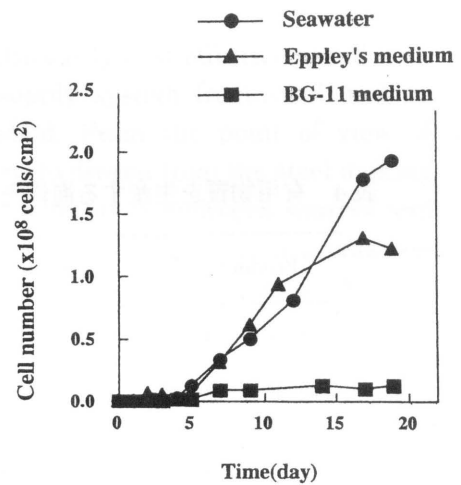


図6 各培地を用いて浮遊培養を行った時の Synechococcus sp. NKBG 040607 の担体表面上での増殖曲線

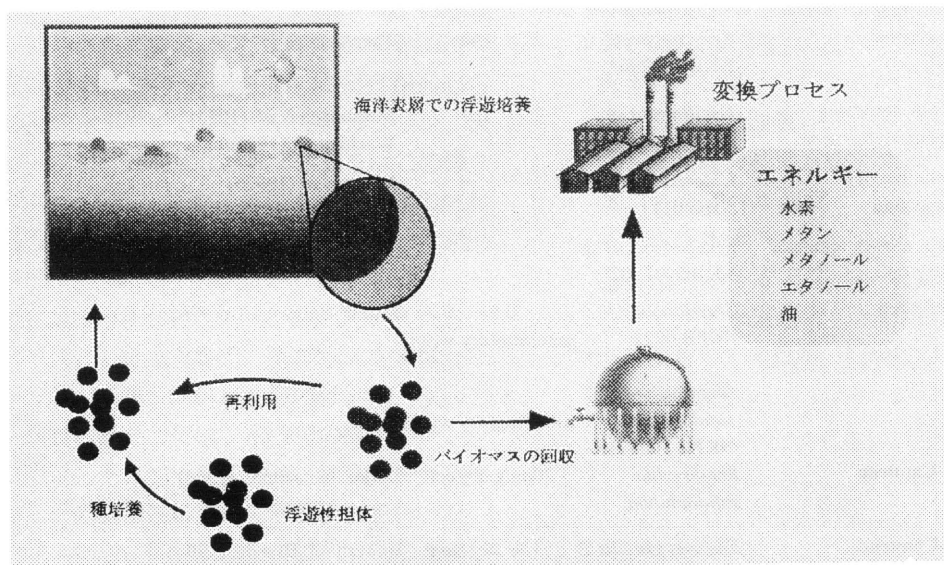


図7 海洋表層における浮遊培養を用いた海洋バイオマス生産とエネルギー生産

表1 マリンバイオテクノロジーの主要技術

(1) 有用海洋生物の探索	微生物、微細藻類、大型藻類、無脊椎動物、脊椎動物
(2) 海洋生物の育種	海洋微生物、微細藻類の遺伝子組換え、大型藻類の細胞融合、魚類の染色体操作
(3) 海洋生物による有用物質生産	医薬品、食料、飼料、化成品、電子材料、化粧品
(4) 海洋生物の機能解明とその利用	耐塩、耐寒、耐熱、耐圧、光合成、窒素固定、硝酸還元、浮遊、発光、走磁性、生物付着などのメカニズム
(5) 海洋バイオテクノロジー支援システム	建築構造物、センサ、リモートセンシング、ダウンストリーム技術
(6) 海洋生態系の解明および地球環境問題への応用	赤潮、サンゴ礁、石灰藻などの解明とその応用、深海生態系の解明、流出原油の分解、海洋におけるCO2固定と地球温暖化防止
(7) 海洋生物利用システム	大量培養や養殖技術、CO2海洋投棄、CO2固定システム、海洋総合利用システム

表2 暗条件下での細胞内ATP量の変化

Condition	ATP content (nmol/mg dry weight)
<b>Light illumination</b>	
Anaerobic	0.2 ± 0.1
Micro-aerobic	0.5 ± 0.1
<b>Dark condition</b>	
Anaerobic	0.6 ± 0.2
Micro-aerobic	2.6 ± 0.6

20 μmolの酸素を添加した2時間後に測定。

表3 海洋Cyanothecae属における水素生産量の比較

Cyanothecae	水素生産速度 (μl/mg dry weight/day)
Group A NKBG520007	198.0±18.6
NKBG520008	187.0±90.9
NKBG520014	102.0± 3.9
NKBG520015	3.0± 0.1
NKBG520016	5.6
Group B NKBG520002	11.3± 1.0
NKBG520020	N.D.
NKBG520004	N.D.
NKBG520012	N.D.

N.D.: not detected

表4 有用物質を生産する海洋光合成微生物

Product	Strain	Amount (mg/g dry wt.)	Ref.
γ-Linolenic acid	<i>Chlorella</i> sp. NKG042401	9.5	Hirano <i>et al.</i> (1990) Miura <i>et al.</i> (1993b)
Palmitoleic acid	<i>Phormidium</i> sp. NKBG 041105	47	Matsunaga <i>et al.</i> (1995)
Docosahexaenoic acid (DHA)	<i>Isochrysis galbana</i> UTEX LB 2307	15.7	Burgess <i>et al.</i> (1993)
Eicosapentaenoic acid (EPA)	<i>Synechococcus</i> sp. NKBG042902	0.64	Takeyama <i>et al.</i> (1997)
Polysaccharide	<i>Aphanocapsa halophytia</i>	45	Sudo <i>et al.</i> (1994)
Glutamate	<i>Synechococcus</i> sp. NKBG040607	15.4	Matsunaga <i>et al.</i> (1988,1991)
Phycocyanin	<i>Synechococcus</i> sp. NKBG042902	150	Takano <i>et al.</i> (1995b)
UV-A absorbing biopterin glucoside	<i>Oscillatoria</i> sp. NKBG 091600	0.2	Matsunaga <i>et al.</i> (1993) Wachi <i>et al.</i> (1995a)
Antimicrobial compound	<i>Chlorella</i> sp. NKG 0111	-	Miura <i>et al.</i> (1993b)
Plant growth regulator	<i>Synechococcus</i> sp. NKBG042902	-	Wake <i>et al.</i> (1991, 1992a, 1992b)
Hydrogen	<i>Chromatium</i> sp. NKPB 0021	0.96 μmol/mg(dry wt.)/h	J. Mar. Biotechnol. (1996)
	<i>Rhodovulum sulfidophilum</i> NKPB 160471R	9.4 μmol/mg(dry wt.)/h	Biotechnol. Bioeng. (2000)
β-Carotene	<i>Rhodovulum sulfidophilum</i>	20μg/g dry cell	J. Mar. biotechnol. (1996)
β-Carotene, VitaminC,E	<i>Euglena gracilis</i> Z	71.0, 30.1 and 86.5 mg/l	Biotechnol. Bioeng. (1997)