

発酵水素生産に適した隠岐に生育する海藻の選択の研究

Research of Selection of Seaweed that Grows to Oki that is Appropriate for Fermentative Hydrogen Production

本郷 敦^{1*}, 谷生 重晴²
ATSUSHI HONGO and SHIGEHARU TANISHO

¹ 十文字中学・高等学校 〒170-0004 東京都豊島区北大塚 1-10-33

² バイオ水素株式会社 〒253-0006 神奈川県茅ヶ崎市堤 1-1-7-207

* TEL: 03-3918-0511 FAX: 03-3576-0511

* E-mail: h-atushi@xk9.so-net.ne.jp

¹ Jyumonji Junior High School and High School, 1-10-33 Kita-Ohtsuka, Toshimaku, Tokyo 170-0004, Japan

² BioHydrogen Technologies, Inc. 1-1-7-207 Tsutsumi, Tigasakishi, Kanagawa 253-0004, Japan

キーワード: 水素生産, 発酵, 海藻, 培養, マンニトール量

Key words: hydrogen production, fermentation, sea alga, cultivate, amount of the mannitol

(原稿受付 2011年5月5日/原稿受理 2011年12月1日)

1. 緒 言

現在, 全世界のエネルギーのうち 79.8%が石油, 石炭や天然ガスを中心とする化石燃料から生産されており¹⁾, 大気中に大量の二酸化炭素を放出する結果を招いている。日本は, 世界の化石燃料の約 5.1%を輸入し使用している^{2,3)}。しかし化石燃料以外に, エネルギー源となりえるバイオマスが現在地球上には約 2 兆トン存在し, 年間約 2000 億トンずつ生産されている。毎年生産されてい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, 太陽光をエネルギー源として生成されることから, クリーンなエネルギー源とも言われている。また, バイオマスは約 2/3 が陸上で, 約 1/3 が海水中で生産されている⁴⁾。そこで, 従来の化石燃料に代わり次世代のエネルギーとして注目され始めている水素を, 周囲を海に囲まれた日本で, 日本の海に多く生育する海藻から生産しようという試みがこの研究の始まりである。海藻は, 日本に存在する数少ない有機資源の一つであるが未利用のものも多い。バイオマスから水素を生産する方法としては, 物理的手法である高温ガス化, 超臨界水ガス化や, 生物学的手法である水素発酵を用いた方法, 間接的ではあるがバイオマスから得られた有機酸を栄養源とし光合成により水素を生産する方法などがある⁵⁾。本研究では微生物の水素発酵による水素生産を選択した。海藻から水素発酵により水素が生産できれば, 海藻 1 t 当り 51.2 kWh (処理時のエネルギー消費量 20%を差し引いた値) の電気エネルギーが生産可能であり, 海藻の養殖を行うことにより, 日本が消費するエネルギーの一部を生産することが可能になる。また, 水素

をバイオマスから生産することで, 化石燃料を利用する中で発生する二酸化炭素量を削減できる。海藻の固体成分は, 主にアルギン酸とマンニトールで構成され, 微量成分としてセルロースが含まれている。例として褐藻類であるコンブの成分はアルギン酸 (7%), マンニトール (8%), 水分 (79%), セルロース (1%), 蛋白質 (1%), その他灰などが (4%) である⁶⁾。

これまでの知見と研究結果から, マンニトールは分子量 182.17 の単糖類であり, マンニトールからの水素生産は確認されているが, アルギン酸からの水素生産は実現していないのが現状である。発酵によって水素を生産する微生物は, 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⁷⁾。本実験で微生物の発酵基質となるのは, 海藻の中に含まれるマンニトールである。マンニトールはグルコースと同じ単糖であり, 化学構造も似ている。また, グルコースよりも H を 2 個多く持ち, *Enterobacter aerogenes* の水素発酵の代謝における水素生産量は, 代謝産物として酪酸が生産された場合, グルコースよりも 1.5 倍多くの水素発生が可能となる⁸⁾。また, 水素生産菌である *Enterobacter aerogenes* st. E. 82005 (以降 *E. aerogenes* st. E. 82005 と呼ぶ) を用い水素生産を行った場合, 基質にグルコースを用いた場合の水素収率は 1.0 (mol-H₂/mol-glucose) であるが, 基質がマンニトールの場合の水素収率は 1.6 (mol-H₂/mol-glucose) となり, 1.6 倍多くの水素を生産できることが分かっている⁹⁻¹¹⁾。グルコースとマンニトールの構造式を (図 1) に, また, *Enterobacter aerogenes* によるマンニトールの水素生産代謝経路を (図 2) に示す^{12,13)}。

よって、本研究では試験的に島根県隠岐郡海士町で行われている海洋バイオマスからのエネルギー資源化のプロジェクトにおいて、隠岐の島近海で収穫される海藻の中から、水素生産に適している海藻を、固形分の割合と含有マンニトール量と発酵による水素生産量を比較し評価を行い、選別することを目的とした。

2. 実験方法

2.1. 海藻の固形分割とマンニトール含有量の測定

2.1.1. 海藻の種類別の比較

海藻を発酵水素生産の基質に利用するに当たって、海藻の固形分の割合とマンニトール量を測定した。海藻の

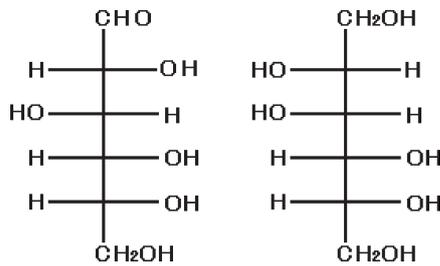


図1. グルコースとマンニトールの構造式。
左・グルコース 右・マンニトール

固形分の割合が8月において約2割ほどであることは知られていたが、本実験で用いる各海藻について測定を行った¹⁴⁾。評価する海藻は、ホンダワラ (*Sargassum fulvellum* C. Agardh), ナラサモ (*Sargassum nigrifolium* Yendo), ヒジキ (*Sargassum fusiforme* Okamura), アオワカメ (*Undaria peterseniana* Okamura), スギモク (*Coccophora langsdorfii* Greville), アカモク (*Sargassum horneri* C. Agardh), クロメ (*Ecklonia kurome* Okamura), ジョロモク (*Myagropsis myagroides* Fensholt), ヨレモク (*Sargassum siliquastrum* (Turner) C. Agardh), ワカメ (*Undaria pinnatifida* Suringar), ツルアラメ (*Ecklonia stolonifera* Okamura), アラメ (*Eisenia bicyclis* Setchell 1905), ヤナギモク (*Sargassum ringgoldianum* Harvey ssp. coreanum (J. Agardh) Yoshida), ノコギリモク (*Sargassum macrocarpum* C. Agardh) である。いずれの海藻もエネルギー生産を目的とした海藻を養殖する予定地である島根県隠岐郡海士町で8月に収穫された海藻を用いた。海藻中のマンニトール含有量が最も多くなるのが8月であることが三本菅らの論文で確認されている¹⁵⁾。8月の海藻を用いることにより、各海藻の固形分の割合やマンニトール量、最大水素発生値の比較を行い、水素発酵に最適な海藻の選別を行った。

乾燥は、検体をペトリ皿に5gとり、精密天秤 (ELECTRONIC BARANCE LIBROR AEX-200G 島津製

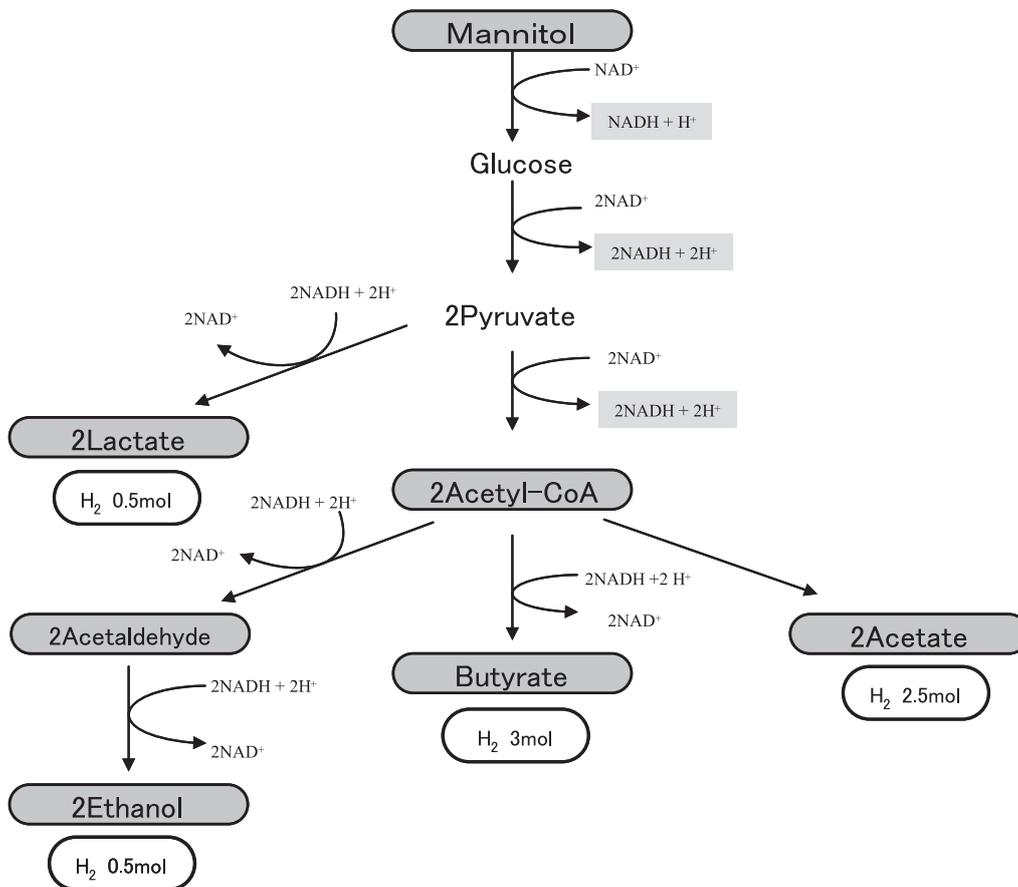


図2. 1 mol のマンニトールからの代謝経路と水素発生可能量。
マンニトールからグルコースに変わるとき水素イオンが放出され、グルコースに比べて水素生産量が多くなる。各物質が1 mol 生成時に発生する水素量を各物質名の下に mol 表記した。

作所)により湿重量を測定後、オーブンをを用い 105°C で 24 時間乾燥させた後、デシケーターに 30 分間入れ、常温になるまで冷却し、乾燥重量を測定した。

発生気体の成分の測定には、ガスクロマトグラフィー (Shimadzu GC-3BT) を用いた。

マンニトール量の測定には、高速液体クロマトグラフィーを用いた。分析条件は、カラム: GL-C610H-S (日立化成工業株式会社), キャリア: 0.1%リン酸水溶液, 流速: 0.5 mL/min, 検出器: RI Monitor (655A-30 HITACHI), カラムオープン温度: 40°C とした。

海藻には高粘性高分子であるアルギン酸が含まれている。このため、粘性によりカラムが目詰まりを起こしたり、キャリアに使用しているリン酸水溶液の影響で、アルギン酸が析出しカラムに詰まってしまう事が考えられた。そのため、酸によって塩析させアルギン酸を除去し、除去した溶液をアルカリを用いて中和する方法と、ナトリウムより水中での電離度が低く、価数が高いカルシウムにより、アルギン酸を抽出し、除去する方法が考えられた。前者の場合、後者に比べ、工程が増えてしまうためサンプルに対して使用する物質が多くなるため、アルギン酸除去には後者の方法が適していると考えた。高速液体クロマトグラフィー分析時には、2%の塩化カルシウムによりアルギン酸をあらかじめ析出させて、析出したアルギン酸を遠心分離機 (HITACHI SCT4BB) により (1940 G 5 min) で沈殿させ、さらにフィルターで上澄み液をろ過し、アルギン酸の除去を行ってから高速液体クロマトグラフィーで分析を行った。

2.1.2. 海藻の部位別の比較

海藻の部位ごとの固形分の割合とマンニトールの含有量を調べるためアラメ (*Eisenia bicyclis* Setchell 1905), ツルアラメ (*Ecklonia stolonifera* Okamura) に対して、葉部と茎部に分けて測定を行った。また、同じ褐藻類であるコンブの 1 年目と 2 年目の固体において、アルギン酸やセルロースの含有量変化の少ないことは知られているが、マンニトール量の部位別の変化を確認するため、無性世代のツルアラメを『*Ecklonia stolonifera* Okamura A』、有性世代のツルアラメを『*Ecklonia stolonifera* Okamura B』とし、それぞれ 11 月に島根県隠岐郡海士町で収穫された検体を用い分析を行った¹⁶⁾。固形分の割合、マンニトール量の測定は海藻の種類別の比較と同様の方法で行った。

2.2. 海藻を基質に用いた水素発生量の比較

前培養液は $C_6H_{14}O_6$ 15 g, Casamino Acid 5 g, $(NH_4)_2SO_4$ 2 g, $MaSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ 1 g, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 14 g, KH_2PO_4 6 g, Ion-Exchange Water 1000 ml, pH 6.8 の組成の YNUB 培地を用いた。滅菌した前培養液に白金耳で菌を植え付けた後、30°C の恒温槽で攪拌しながら 17 時間菌体を培養した。なお、実験に使用したバクテリアは、*E. aerogenes* st. E. 82005 である。

500 mL のイオン交換水に乾燥後破砕機で粉末状にした乾燥粉末海藻 10 g を入れ、5 分間攪拌したのち、121°C のオートクレーブで 20 分間滅菌し培地を作成した。滅菌後、培地を常温にまで冷却し、500 mL の培養槽に移した。前培養を行った *E. aerogenes* st. E. 82005

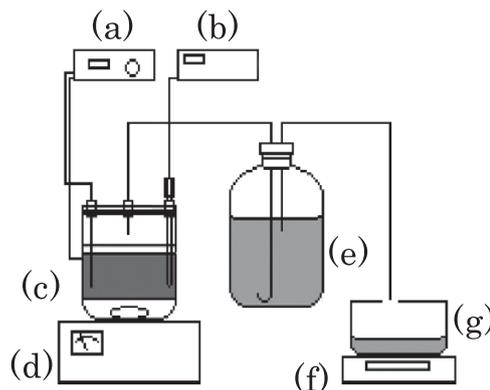


図 3. 回分培養実験装置図。

(a) pH 測定装置: Fine pH controller SERIES-B FD-02, NISSIN TYPE CE108C-1.8BG, (b) 温度調節装置: SHINO.LT100, (c) 培養槽, (d) 攪拌装置: ASONE MAGNETIC STIRRER HS-4SP, (e) NaOH 槽, (f) 電子天秤: sartorius BJ6100, (g) 測定容器

を培地の入った培養槽に 10 mL 投入し 37°C でバッチ培養を行った。攪拌はスターラーを用い 250[rpm] で行った。培養実験は、培養液中のマンニトールが消失するまで行い、培養終了後、発生水素量および、液体クロマトグラフィー分析によるマンニトールの残存量を測定した。発生気体の成分の測定には、ガスクロマトグラフィー分析を用いた。培養実験装置図を (図 3) に示す。

(図 3) の各名称は (a) pH 測定装置: Fine pH controller SERIES-B FD-02, NISSIN TYPE CE108C-1.8BG, (b) 温度調節装置: SHINO.LT100, (c) 培養槽, (d) 攪拌装置: ASONE MAGNETIC STIRRER HS-4SP, (e) NaOH 槽, (f) 電子天秤: sartorius BJ6100, (g) 測定容器である。NaOH 槽は水酸化ナトリウムで水上置換することにより、二酸化炭素を除去する目的で設置した。評価した海藻は、3.1 で用いたサンプルと同じもので、海藻の種類別比較に用いた検体は島根県隠岐郡海士町で 8 月に収穫されたものを用いた。

3. 結 果

3.1. 海藻の固形分の割合とマンニトール含有量の測定結果

海藻の種類別による固形分の割合およびマンニトール量を比較した結果を (図 4) に示す。

各種海藻の固形分の割合の比較から、『ジョロモク』『ナラサモ』『ヨレモク』『ノコギリモク』『ヤナギモク』の順番で固形分の割合が高く、『アオワカメ』は極端に低いことが分かった。湿海藻中のマンニトール含有量は『ノコギリモク』『ヤナギモク』『アラメ』『ツルアラメ』の順で多いことが分かった。各海藻の値までの原点からの傾きが大きければ大きいほど固形分辺りのマンニトール含有量が多いことを表している。茎部と葉部が明確に分かれているツルアラメとクロメについて、茎部と葉部の固形分の割合をおよびマンニトール含有量を (図 5) に示す。

その結果、茎部と葉部における固形分の割合には大き

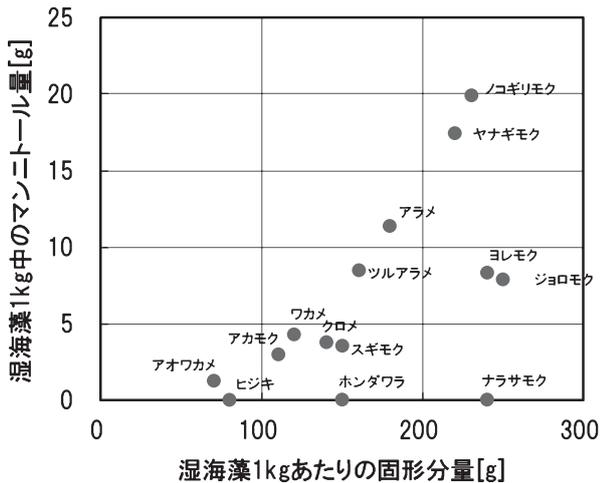


図4. 海藻の固形分の割合とマンニトール含有量の関係。

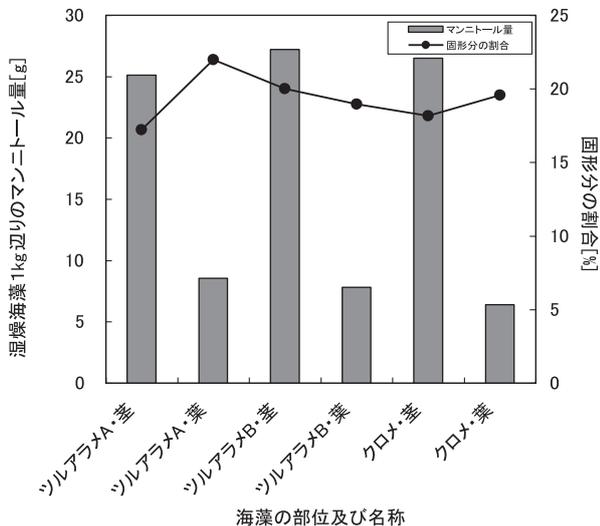


図5. 湿海藻の茎部と葉部の固形分の割合とマンニトール含有量の比較。

な違いは見られなかった。一方、茎部は葉部に比べマンニトールの含有量のはるかに多いことがわかった。

3.2. 水素発生量の測定結果

水素発生実験における結果と、含有マンニトール量に対し *E. aerogenes* st. E. 82005 が水素収率 1.6 (mol-H₂/mol-glucose) で水素生産を行った場合発生すると考えられる水素発生量を予想水素発生量として重ね合わせて(図6)に示した。比較した理由は、基質をマンニトールから海藻に置き換えることによる、基質の影響を調べるためである。

各海藻において、予想水素発生量より多くの水素発生が確認された。また、発生量は『ノコギリモク』『ヤナギモク』『アラメ』の順番で多く水素生産が行われたことが確認された。『ホンダワラ』『ナラサモ』『ヒジキ』においては水素発生が確認出来なかった。

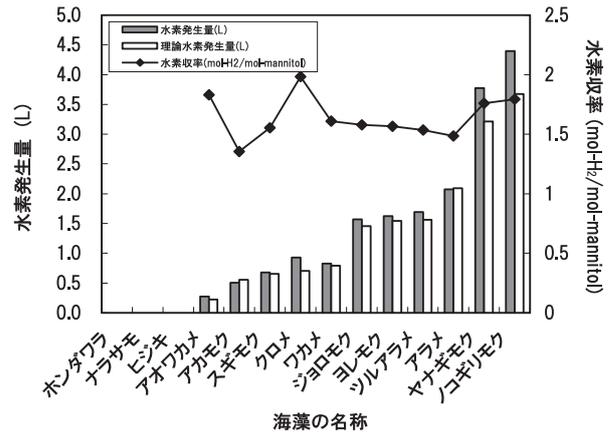


図6. 1 kg の湿海藻からの水素発生値と 1 kg の湿海藻に含まれるマンニトール量からの予想水素発生値との比較。

4. 考 察

4.1. 海藻別の比較

(図6)において、各海藻に実際含まれていたマンニトール量と発生した水素量から、水素収率 [H₂-mmol/mannitol-mmol] を求め、図中に示した。

『クロメ』において水素収率が 1.9 [H₂-mmol/mannitol-mmol] と最も高く、『アカモク』は水素収率が 1.45 [H₂-mmol/mannitol-mmol] と最も低かった。『アカモク』、『アラメ』以外のすべての海藻の水素収率は 1.6 [H₂-mmol/mannitol-mmol] 以上であることが分かった。このことにより、*E. aerogenes* st. E. 82005 が、マンニトールから水素生産を行う場合に予想されていた予想水素収率である 1.6 [H₂-mmol/mannitol-mmol] を 9 サンプルで上回り、各海藻の含有マンニトール量が水素生産量に関係していることが確認された。予想水素発生量を上回った理由として、細菌がマンニトール以外の物質からも水素を生産している、または、海藻に含まれる他の物質が代謝に影響を及ぼしていることが考えられる。

(図4)より、各海藻の値の傾きより『ノコギリモク』が 0.087 と最も大きく固形分に含まれるマンニトール量は 11.5% で各海藻の中で最大であった。一度海藻を乾燥させてから発酵水素生産を行う場合、固形分中のマンニトール量の割合が高い『ノコギリモク』『ヤナギモク』『アラメ』『ツルアラメ』の順で適しているということが分かった。

海藻からの水素生産を実用化する場合、エネルギー効率の点から海藻を乾燥させることは行わないと考えられる。そのため、湿海藻に含まれるマンニトール量を比較した場合『ノコギリモク』『ヤナギモク』『アラメ』の順で多く『ツルアラメ』『ヨレモク』『ジョロモク』は共にほぼ同じ量であった。これは(図6)の 1 kg 辺りの湿海藻からの水素発生量の結果からも確認できる。

よって、海藻からの水素発生に適している海藻は、固形分の割合、マンニトールの含有量、水素発生量から、湿海藻、乾海藻に関係なく『ノコギリモク』が適していることが分かった。

マンニトール含有量、水素生産量が高かった海藻である『ノコギリモク』『ヤナギモク』『アラメ』『ツルアラメ』

『ヨレモク』『ジョロモク』は、どれも褐藻類であった。

4.2. 葉部と茎部の比較

葉部と茎部において、固形分の割合について、大きな違いは見られなかった。マンニトールの含有量は『*Ecklonia stolonifera* Okamura A』、『*Ecklonia stolonifera* Okamura B』、『*Eisenia bicyclis* Setchell 1905』3種類のサンプルすべてにおいて、葉部よりも茎部に多く含まれていることが分かった。これにより、茎部のほうが葉部よりも発酵水素生産の基質に適していることが分かった。また、世代によるマンニトールの含有量の変動が小さく、世代に関わらず1年周期で利用できることも分かった。茎部と葉部の比較については、茎部と葉部の固形分の割合はほぼ同じであるが、マンニトールの割合は茎部の方が多く、マンニトールは有性世代、無性世代にかかわらず、葉部よりも茎部に多く蓄積される事が分かった。

4.3. 全体の考察

固形分が多くマンニトールの含有量が少ないという結果になった海藻については、固形分中のマンニトール以外の物質が、他の海藻構成物質であるアルギン酸やセルロースを多く含んでいる可能性がある。今後アルギン酸やセルロースからの水素生産が可能になった場合、水素生産の効率化に寄与する可能性が考えられる。また、8月に海藻のマンニトールの割合が高いことが分かっているが、各海藻の通年のマンニトール含有量を調べることにより、季節に合った海藻を基質に用いた水素生産が可能になると考えられる。

5. 謝 辞

今回の研究で試料を提供していただいた東京海洋大学海洋科学部海洋生物資源学科教授能登谷正浩先生に深謝する。

文 献

- 1) 経済産業省. 2008. エネルギー白書.
- 2) IEA (国際エネルギー機関). 2009. Energy indicators and energy balance sheets. pp. II 88–91, Energy Balance of OECD Countries.
- 3) 矢野恒太記念会. 2006. 世界国政図解. pp. 183–186.
- 4) 清水幸丸. 1993. pp. 12, 25, 123. 自然エネルギー利用学. パワー社.
- 5) 松村幸彦. 2004. バイオマスからの水素製造技術の現状と展望. 水素エネルギーシステム. vol. 29. No. 1: 8–12.
- 6) Yoshiaki Sanbonsuga. 1984. Studies of the growth of forced *Laminaria*. Bull. Hokkaido Reg. Fish Res. Lab, p. 24.
- 7) 谷生重晴. 2004. バクテリアはなぜ水素を発酵で発生するのか, またエネルギー生産利用における問題点はなにか. 水素エネルギーシステム. vol. 29. No. 1: 2–6.
- 8) 谷生重晴. 1989. *Enterobacter aerogenes* の発酵水素発生と利用基質について. 67: 29–34.
- 9) Shigeharu Tanisho. 1994. Continuous hydrogen production from molasses by the bacterium *Enterobacter aerogenes*. 19: 807–812.
- 10) 谷生重晴, 菅沼 剛. 1999. 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. 水素エネルギーシステム. vol. 24. No. 1: 20.
- 11) 菅沼 剛, 谷生重晴. 1999. 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. 卒業論文. p. 8.
- 12) 化学大辞典出版委員会. 1993. p. 141. 化学大辞典 3. 共立出版.
- 13) 化学大辞典出版委員会. 1993. p. 924. 化学大辞典 8. 共立出版.
- 14) Yoshiaki Sanbonsuga. 1984. Studies of the growth of forced *Laminaria*. Bull. Hokkaido Reg. Fish Res. Lab., p. 10.
- 15) Yoshiaki Sanbonsuga. 1984. Studies of the growth of forced *Laminaria*. Bull. Hokkaido Reg. Fish Res. Lab, p. 12.
- 16) 三本菅善昭. 1985. 促成養殖コンブの生長過程に関する研究. 北水研究報告 50. 77–78.