

Laminaria japonica (真昆布)を用いた *Rhodobacter sphaeroides* RV
による水素生産に関する研究

神野 英毅 (応用分子化学科)

本研究は、平成 19 年度までに得られた *Rhodobacter sphaeroides* RV による水素生産向上に関する研究を踏まえ、昆布からの水素生産を行った。その報告を行う。

1. 緒言

近年、二酸化炭素排出による地球温暖化と途上国のエネルギー需要による化石燃料の枯渇が大きな問題となっている。現在、化石燃料の代替となる新しい持続可能エネルギーの研究が盛んに行われており、その一つとして水素をエネルギーに利用する方法が注目されている。水素は燃焼によって温暖化ガスの原因とされる二酸化炭素を生じないためクリーンであり、1 次エネルギーである熱、電気、光によって再生可能なエネルギーキャリアーである¹⁾。すでに水素を燃料に用いる事業用の燃料電池システムが市場に投入されつつあり、今後水素の需要が高まると考えられる。しかし現在化石燃料やメタノール、メタンからの変換により製造されているが、化石燃料からの製造は地球温暖化と環境問題の観点から、実際的でなくこれらの解決には至らない。そこで、再生可能なエネルギーを利用して水素を製造する技術、微生物の機能を用いた生物学的水素製造技術が注目されている。特に、光合成微生物を利用した光水素製造技術は、太陽光という究極の再生可能なエネルギーを有効に利用できることが最大の利点である。しかし、バイオマスを用いた水素生産は、実用化の進むバイオエタノールと同様に、食料との競合が問題となる。例えば、アメリカを中心として研究が盛んに

行われていたトウモロコシからのバイオエタノール生産がある。これにより、食品としての価値が高騰し大きな問題となった。またバイオマス生育のための農地転用などの土地問題が大きな障害となると考えられる。

そこで、我々は海洋での成育可能な昆布に着目し、これを原料としたバイオ水素生産の研究を行っている。昆布は穀物類などに比べ短期間で収穫でき、養殖場所の確保が容易である。さらに、森林が年間に吸収する CO₂ 量の約三倍の量を昆布は生育期に吸収することが報告されている。また、食料として昆布を消費するのは、世界的にみて日本及び中国などごく一部であり、食料との競合が少ないため、バイオエネルギー源に適していると考えられる。これらのことから、昆布をバイオエネルギーの原料として用い、さらに、生産されたバイオエネルギーを社会で用いることで多量の CO₂ を削減が期待できる。

2. 目的

海洋で養殖した昆布からの水素生産を目的とし、昆布の前処理の検討、前処理昆布からの高収率水素生産の検討を行った。さらに、得られた水素を燃料電池と組み合わせることにより社会で新エネルギーとして使用できるような環境調和型水素生産プロセスの構築を目的とする。

3. 実験方法

3-1. 昆布破碎液作製

バイオマスとして生産された東京湾産

昆布 (*Laminaria japonica*) を乾燥させ用いた。切断した乾燥昆布を回転刃式ホモジナイザ (ヒスコトロン NS-56 マイクロテック・ニチオン) を使用し 1% 昆布破砕液を調整した。

3-2. 昆布破砕液の前処理

3-2-1. 酵素分解

和光純薬工業(株)製の *Tricoderma vivide* 由来セルラーゼ、ナガセケムテック(株)製のアルギン酸リアーゼを使用して昆布の低分子化を行った。1% 昆布破砕液にセルラーゼ、アルギン酸リアーゼ濃度を変化させて添加し、30 °C 条件化で攪拌酵素分解反応を行った。また、経時的にサンプリングを行い、サンプル中の糖濃度を Somogyi-Nelson 法を用いて測定した。

3-2-2. 亜臨界分解

1% 昆布破砕液を亜臨界装置 Taiatu Techno Corp の TAS-05 型 に 200 ml 仕込み、温度条件として 250、270、300 °C にて亜臨界分解を行った。分解時間は、設定温度に達してから 10 分とした。

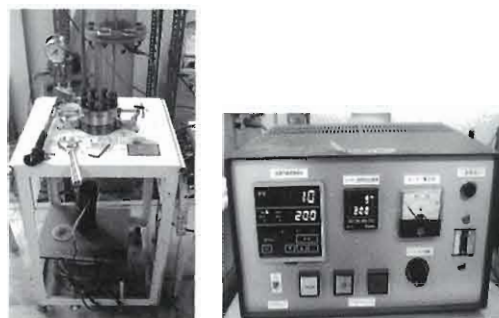
3-3 水素生産

3-3. 使用菌体

本研究では、独立行政法人製品評価技術基盤機構、生物遺伝資源部門 (NBRC) より分譲された NBRC 番号 5384、*Rhizopus oryzae* (以下 *R. oryzae*)²⁾ (Fig. 2) を乳酸発酵菌として、Miyake らによって分離された光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* RV (以下 RV) (Fig. 3) を水素生産菌として使用した。

3-4. 前培養、集菌、懸濁

RV は aSy 培地 (Ammonium sulfate, Sodium succinate, Yeast extract) でハロゲンランプ (10,000 lux) 照射下嫌気培養、*R. oryzae* は PDB (Potato Dextrose Broth) で好気培養した。前培養した菌体は遠心分離 (4 °C, 15 min, 9,000 rpm) し、リン酸濃度を 10 倍に強化した Basal 培地 (RV 用無機塩培地) で



Specification :
Material SUS 316, Dosage 500 ml,
Pressure 20 MPa, Temperature 350 °C

Fig. 1 Sub-critical device

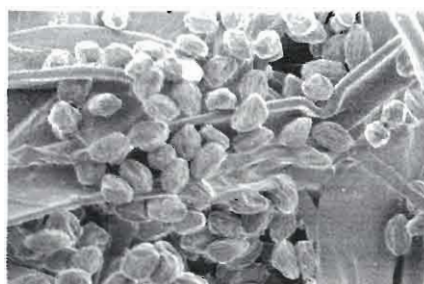


Fig. 2 Scanning electron microscope of *Rhizopus oryzae*

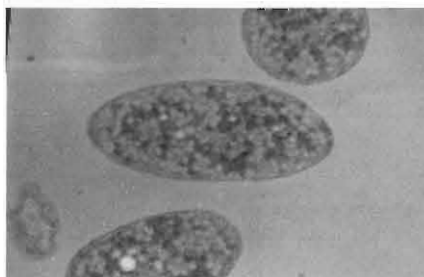


Fig. 3 Electron micrograph of *Rhodobacter sphaeroides* RV

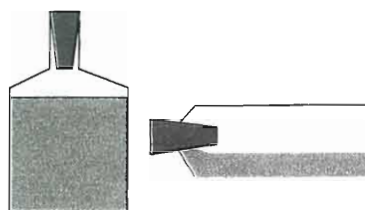


Fig. 4 Co-immobilization of the microorganisms in Roux bottle.

懸濁した。

3-5. 菌体の固定化

懸濁した 2 種類の菌体をルー瓶に寒天で

Fig. 4のように固定化した。(4% 寒天 30 ml, 空隙 200 ml)

3-6. 前培養

R. oryzae の活性化をするためにルー瓶の空隙に PDB 培地を加えて 2 日間培養を行った。また光合成細菌のニトロゲナーゼ系を誘導するために gL (1.75 mM glutamate, 75 mM Lactate) 培地で 24 時間培養した。

3-7. 水素発生実験

セルラーゼ、アルギン酸リアーゼ及び亜臨界を用いて前処理を行った昆布破砕液を空隙に 200 ml 入れて水素発生実験を行った。H₂ は水上置換法により回収した。

3-8. 分析

培養液中の有機酸などは高速液体クロマトグラフィー (Shimadzu) によりそれぞれ分析を行った。

4. 結果および考察

4-1. 昆布破砕

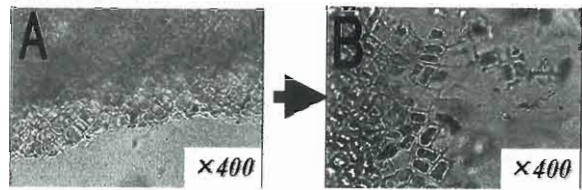
昆布の表面は Fig. 5 A に示した様に、断面の一部以外は細胞がアルギン酸によって充填された状態となっている。これを、ホモジナイザを用いて破砕することで Fig. 5 B の様に細胞の集まりを細かくすることができ露出細胞壁の表面積拡大が確認された。

4-2. 昆布破砕液の前処理

4-2-1. セルラーゼ、アルギン酸リアーゼ分解

セルラーゼを用いた昆布破砕液の分解反応では、開始 150 分後から分解が始まり 270 分前後で分解の終了を確認することができた。また、セルラーゼ量の増加に応じて分解能が向上することが確認された (Fig. 6)。

アルギン酸リアーゼを用いた昆布破砕液の分解反応では加えた時点から反応が開始され 25 分程度での分解終了が確認された。また、アルギン酸リアーゼとセルラーゼを混



A: Before crushes B: After crushes

Fig. 5 Micrograph of *Laminaria japonica*

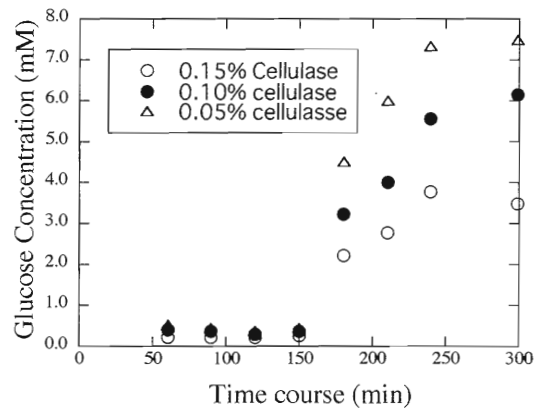


Fig. 6 Sugar production by cellulase

合し分解反応³⁾を行った。酵素を加えた直後から反応が開始されアルギン酸リアーゼのみの場合と比較すると糖濃度増加が見られた。これは、アルギン酸リアーゼによりアルギン酸が分解されアルギン酸によって包まれていた細胞壁が露出したためにセルラーゼによる分解反応が促進したためであると考えられる。

4-3. 水素生産実験

4-3-1. 乳酸発酵

セルラーゼを用いて昆布の糖化处理を行った溶液を *R. oryzae* を用いて乳酸発酵を行った。その結果、0.1% セルラーゼによる酵素処理昆布溶液においては 60 時間、1% セルラーゼ酵素処理昆布溶液は 84 時間で最大乳酸産生量が確認でき、それぞれ 6.5, 15 mM であった。また、その時の *R. oryzae* の濃度は OD₆₀₀ = 0.3 の時において最も良いことがわかった。

また、亜臨界分解した昆布の *R. oryzae* を用いた乳酸発酵は、培養 24 時間後から乳酸の産生が見られ 96 時間で産生が終了することが確認された。また、亜臨界分解の温度条件に応じてかなりの違いが見られ 250 °C において最大乳酸産生を示した。

4-3-2. 混合水素生産

R. oryzae と RV を寒天中に固定化した混合菌体による水素生産方法を用いて水素生産を行った。0.1%セルラーゼ酵素分解昆布液では乳酸の生成と資化は行われていることが確認されたが、水素生産には至らなかった。また、1%セルラーゼ酵素分解昆布溶液においては、乳酸の生成、資化は確認され、50 ml の水素が得られた。乳酸の生成量が少なかったため、わずかな水素しか得られなかったと考えられる。

4-3-3. 二段階水素生産

4-3-2 において水素生産量が少なくまた乳酸産生濃度も低いことから乳酸発酵と水素生産を別々に行う二階法を用いた水素生産実験を行った。0.1% セルラーゼ酵素分解昆布液においては 100 ml、1% セルラーゼ分解昆布液においては 150 ml の水素が得られ、混合菌体による水素生産よりも回収率が増加した。また、セルラーゼとアルギン酸リアーゼの 2 種酵素分解昆布溶液からの 2 段階水素生産実験では、セルラーゼのみと比較し、1.18 倍の水素が生産された。

また、亜臨界処理昆布溶液からの水素生産実験では、本実験方法において水素を発生することが出来なかった。亜臨界処理において乳酸を得られたが、メイラード反応が生じ、阻害しているためと考えられる。

5. 結論

昆布からのセルロース回収率を 100% と仮定した場合の各段階における回収率を

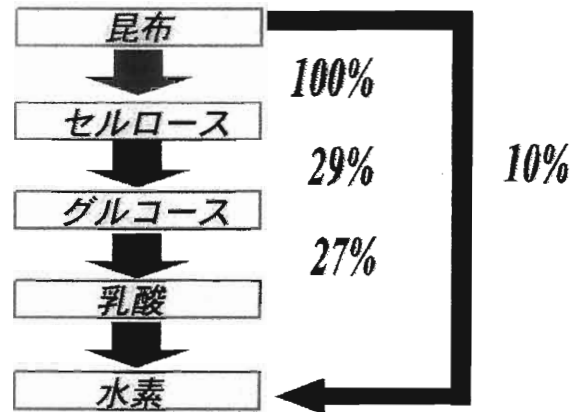


Fig. 7 Recovery rate

Fig. 7 に示した。以上より昆布をバイオマス資源とした燃料生産系の可能性が示唆された。しかしながら、回収率が低いために実用化が難しい段階である。そのため、各段階における回収率の改善が必要である。

しかし、同様の手法によりグルコースや有機酸が得られることが明らかとなり、バイオエタノールや生分解性プラスチックの原料であるポリ乳酸の原料とすることが可能であり、様々な分野で利用が可能であると考えられる。

6. 参考文献

- 1) Asada, Y et al.:Journal of Bioscience and Bioengineering 88 1 1-6(1999)
- 2) Y.Oda et al Food Microbiology 20(2003) 371-375
- 3) S. Kohata., et al.: Characterization and Enzymatic Digestion of Seaweed Cultured the Yatsushiro Sea.J Technology and Education, Vol.15,No.1,pp1-10(2008)