

発酵による水素生成技術の現状と将来

The Present State and The Future Technology of Hydrogen Production by Fermentation

谷生 重晴*
Shigeharu Tanisho

Abstract: This paper summarized on the fermentative hydrogen production in regard to the paper title. Since the hydrogen production from biomass is strongly expected from the point of global warming, this paper listed suitable biomasses for the fermentative production, yields and rates of production from the biomasses, and estimated the efficiency of energy conversion from biomass to hydrogen, production potentials from kelp, and referred to representative values on the production rate, yield and cultural temperature.

Key Words: fermentation, hydrogen production, biomass, kelp, Clostridium, Enterobacter, strain HN001

食品リサイクル法の制定により、年間 100 トン以上の食品廃棄物を発生している事業者は飼料肥料などへの再生利用方に興味を持っていると思われる。しかし、生ゴミや賞味期限切れの食品、菓子などが、発酵法による水素生産の非常に良い原料になることはあまり知られていない。バイオマスのエネルギー化にはエタノール発酵、メタン発酵がよく知られているが、これらはそれぞれ蒸留が必要、発酵時間が長いなどの短所がある。一方、水素発酵は蒸留は不要、発酵時間も短いなどの利点があるので、バイオマスに非常に適したエネルギー変換法である。このような理由で、燃料電池の実用化が間近になった今日、再生可能資源からの水素生産法として、バイオマス由来の発酵水素が期待されている。

水素生産に期待されるバクテリアには嫌気性の *Clostridium* や通性嫌気性の *Enterobacter* などがいるが、我々が汚泥中から選別した嫌気性の中温バクテリア HN001 株はとりわけ水素生産性が高く、最も実用的なバクテリアの一つである。ここでは発酵による水素生産とはどのようなものであるか、また発酵水素発生の研究の現状と将来について述べる。

1. 発酵水素発生の経路

グルコースの発酵では、乳酸以外にも酢酸、酪酸などの有機酸やエタノール、ブタノールなどのアルコールが代謝生産される。水素は、これらの代謝反応の経路で発生するが、Fig.1 に示したようにバクテリアによって異なった発生反応を行っている。たとえば *Escherichia coli* など大腸菌類は、ピルビン酸からアセチル-CoA に進む反応で (1) 式のようにギ酸を生成しているが、生育環境の pH が酸性に移ると、(2) 式のようにギ酸をさらに分解して水素を発生する。



また、*Clostridium butyricum* などクロストリディウム属の

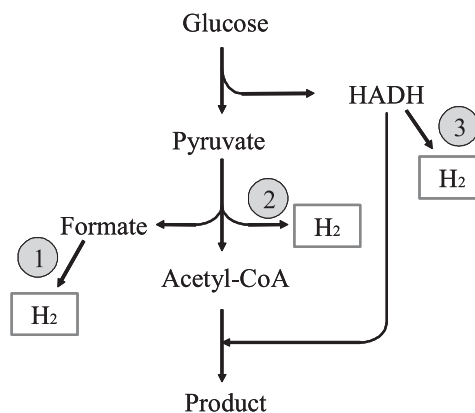
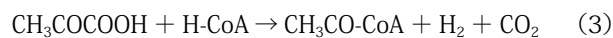


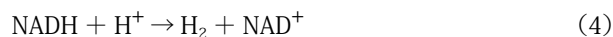
Fig.1 Main pathways of fermentative hydrogen production.

* 横浜国立大学 教育人間科学部
Yokohama National University

多くは、ギ酸を生成しないで、(3) 式のように直接水素と炭酸ガスを発生しているとされる。



さらに、生育環境の pH が酸性域では、(4) 式のように水素を発生して NADH の酸化を行ったと考えられる経路が知られている。



上式のように、水素発生経路は利用基質の違いに依るのではなく、どのような酵素を持っているかに依って決まる。

2. 水素発酵に利用できるバイオマス

バクテリアが発酵に利用するバイオマス（炭水化物）は、大きく分けて、グルコース（ブドウ糖とも言う）などの単糖類、スクロース（蔗糖とも言う）などの二糖類、デンプンやセルロースなどの多糖類、マンニトールなどの糖類似

化合物である。バクテリアごとに利用できるバイオマスの種類が異なるので、バクテリアの種を生化学的に判別する指標に利用されているが、ここでは、主に筆者の研究室で利用しているバクテリアの、*Enterobacter aerogenes* と *C. butyricum* それに中温菌の HN001 株が利用するバイオマスについて述べる。

2.1 単糖類および類似化合物

Table 1 に示したように、単糖類は三炭糖、五炭糖、六炭糖などからの発生が調べられており、六炭糖のグルコースが自然界には最も多く存在するので、水素発生の代謝反応を代表している。この他、果物に含まれるフルクトース、針葉樹の木質部などに含まれるマンノース、乳糖を構成するガラクトースなどから水素を発生できる。また、海藻などに含まれるマンニトール、ナナカマドの種子などに含まれるソルビトールやグルコン酸など六炭糖類似化合物からも発生できる。マンニトール、ソルビトールの水素発生速度はグルコースと同程度であるが、構成水素原子が 2mol

Table 1 Utility of carbohydrates for hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*.²⁵⁾

Material	Formula	mol-weight	Cell mass Production [mg]	Hydrogen evolved [mmol]	Specific rate ^{a)} [-]	Yield			
						Y _{H₂/S} [mol/mol]	Y _{H₂/S} [mmol/g]		
Trioses									
Glyceraldehyde	C ₃ H ₆ O ₃	90.1	*	0.5	*	0.1	1.2		
Dihydroxyacetone			*	0.72	*	0.2	1.9		
Pentoses									
D-Arabinose	C ₅ H ₁₀ O ₅	150.1	8.7	0.31	0.2	0.1	0.5		
L-Arabinose			16.1	1.54	0.6	0.7	4.7		
D-Xylose			15.9	0.95	0.4	0.4	2.7		
D-Ribose			*	0.55	*	0.2	1.3		
Hexoses and related compounds									
Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.2	24.5 (7.0)	1.88	1	1.0	5.7		
Galactose			12.3 (9.3)	1.80	0.8	1.0	5.6		
D-Fructose			26.7 (8.0)	2.15	0.9	1.2	6.8		
D-Mannose			25.3 (7.8)	2.19	1.0	1.2	6.9		
L-Sorbose			7.9	0.06	—	—	—		
Mannitol			C ₆ H ₁₄ O ₆	182.2	43.8 (7.0)	2.79	1.2	1.6	8.9
D-Sorbitol					22.5 (7.0)	2.78	1.2	1.6	8.9
Gluconic acid					33.2 (8.5)	1.38	1.4	0.9	4.6
Saccharides									
Sucrose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.3	22.7 (9.9)	2.33	1.0	2.5	7.4		
Maltose			23.3 (8.5)	2.56	0.9	2.9	8.6		
Lactose			9.2	0.4	0.1	0.3	0.9		
Polysaccharides and structural polysaccharide									
Amylose	(C ₆ H ₁₀ O ₅) _n	—	*	0.19	—	—	0.1		
Glycogen			*	0.22	—	—	0.4		
Starch			12.1	0.19	—	—	0.1		

a) Estimated as the specific rate to the rate of glucose fermentation (11 mmol-H₂/L h)

多いので、水素収率は 1.6 倍多い。

Fig.2 はグルコースの構造式で、(a) のように直鎖で表すことも (b) のようにピラノースと呼ばれる六員環構造で表すこともできる。Fig.3 はガラクトースで、ガラクトース、マンノースはグルコースと立体構造における OH の向きが異なるだけであり、分子構造はよく似ている。Fig.4 はフルクトースの構造式であるが、グルコースがアルデヒド基を持つのに対し、カルボニル基を持っており、フラノースと呼ばれる五員環を形成する。

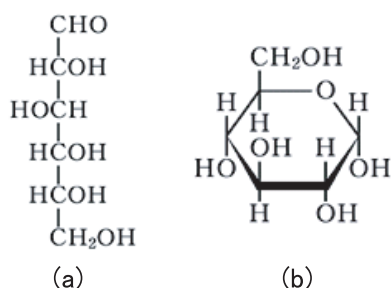


Fig. 2 Structure of D-glucose.¹⁾

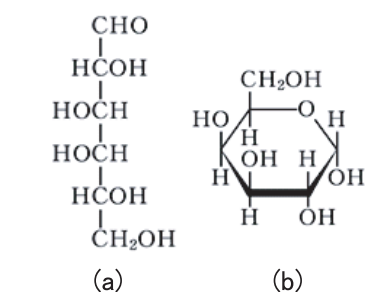


Fig. 3 Structure of D-Galactose.¹⁾

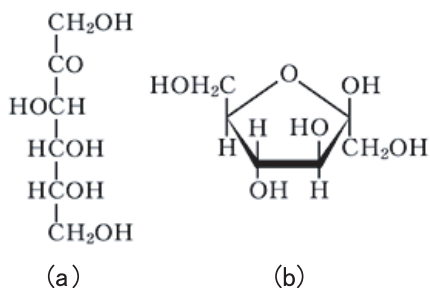


Fig. 4 Structure of D-fructose.¹⁾

2.2 二糖類

スクロースはサッカロース、蔗糖とも呼ばれ、貯蔵糖として植物に広く存在する。サトウキビ、テンサイ、サトウカエデなどから工業的に製造される二糖で、単糖のグルコースとフルクトースの化合物である。多くの細菌はスクロースを基質に利用して水素を発生し、発生速度もグルコースと同じ程度である。

麦芽糖とも呼ばれるモルトースはグルコース二分子で構

成され、スクロースと同様、良い水素発生基質になる。

哺乳類の乳汁の特有成分であるラクトース（乳糖）は、グルコースとガラクトースで構成され多くの細菌が利用するが、*E. aerogenes* では菌株によっては分解できないものもある。

2.3 多糖類

デンプンはグルコースの多糖体で、植物のもっとも重要な貯蔵栄養体である。トウモロコシ、ジャガイモ、米などバイオエタノール、バイオ水素を生産するいわゆるエネルギー作物は、主にデンプンを利用している。Fig.5 に示すように、グルコースが直鎖につながるアミロースと、アミロースが枝分かれしてつながるアミロペクチンとがある。アミロペクチンの含有率は一般的には 70 ~ 80% であるが、もち米など穀類によっては 98% 以上にもなるものもある¹⁾。*E. aerogenes* はデンプンを直接利用することはできないが、*C. butyricum* や筆者らが発見した中温菌 HNO01 は直接資化して水素を発生できる。しかし、その水素発生速度は Fig.6 に見られるように、グルコースからの発生 (47°C で 3.2 L-H₂/(L-cult. h)) よりかなり遅い (37°C で 1.2 L-H₂/(L-cult. h))。

セルロースもまたグルコースの多糖体であるが、デンプ

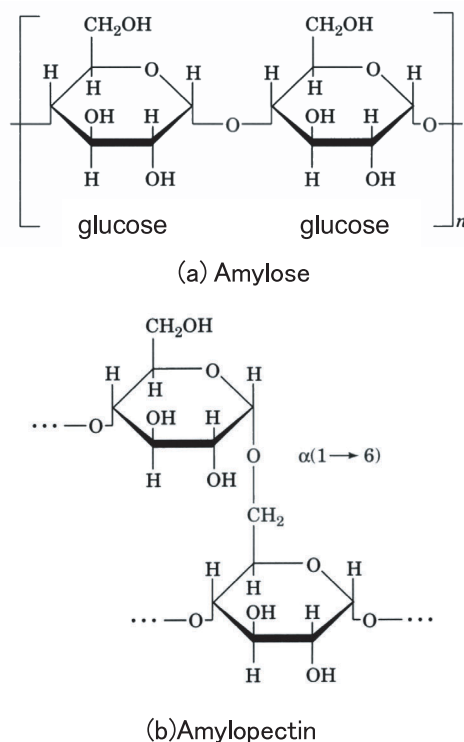


Fig. 5 Structure of starch. (a) Amylose, a linear polymer of D-glucose in $\alpha[1 \rightarrow 4]$ linkage. (b) Amylopectin, structure of a branch point from $\alpha[1 \rightarrow 4]$ linkage to another $\alpha[1 \rightarrow 4]$ linkage by $\alpha[1 \rightarrow 6]$ linkage of D-glucose.

ンとは異なり、Fig.7 に示したような $\beta(1 \rightarrow 4)$ 結合でポリマーを形成している。また、多数のポリマーが寄り集まって強固な繊維を構成するので、セルロースを分解するのは非常に難しく、直接水素発生するバクテリアはあまり知られていない。現在、*C. thermocellum* が有望なバクテリアと考えられているが、水素発生速度はあまり速くない。したがって、イナワラや木材から発酵で水素生産するためには、糖化処理をする必要がある。

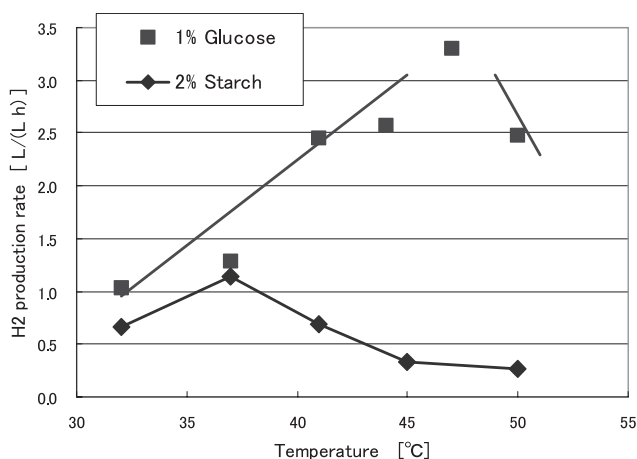


Fig. 6 Hydrogen production rate of Mesophilic bacterium HN001 from glucose and starch.

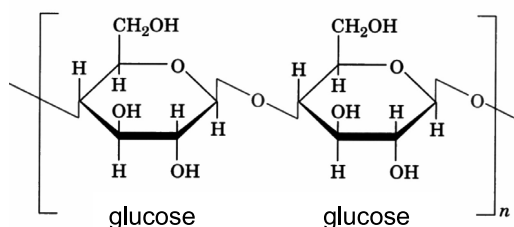


Fig. 7 Structure of cellulose. A linear polymer of D-glucose in $\beta(1 \rightarrow 4)$ linkage.

3. 海藻バイオマスを利用した水素発酵

オニコンブ、マコンブなど褐藻類は、収穫時期には Fig.8 に示したような糖類似化合物のマンニトールを約 8%、アルギン酸を約 7%細胞に蓄えている。ロープを張った人口栽培での収穫量は 1m^2 あたり 14.5kg あり²⁾、マンニトール収量は 12ton/ha にもなるから、スクロース収量 9~15ton/ha のサトウキビに匹敵する反当収量を上げることが出来る。マンニトールは、Table 1 にあるように、*E. aerogenes* は 8.9mmol/g と 1g の基質重量当たりでは最大の収率で水素発生し、グルコースの収率 5.7mmol/g より優れた水素基質になっている。HN001 株はこれを利用できなかったが *C. butyricum* は利用できるので、褐藻類は非常に有力なエネルギーバイオマスになる。Table 2 はコンブを栽培することによってどれくらいの水素が得られるか、サトウキビ栽培と比較したものである。ちなみに、昨今のブラジル、沖縄のサトウキビ収穫量は、60~100ton/ha である。

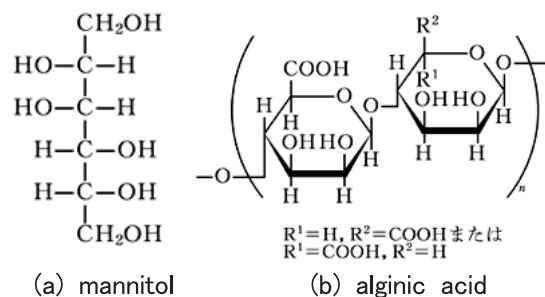


Fig. 8 Structure of elemental carbohydrates making kelp.

4. 発酵水素発生研究の現状

研究の現状については、Table 3 に一覧で示した。この表は、Vrije と Claassen が作成した表³⁾ に、谷生が最近の情報を書き加えたものである。

Table 2 Comparison of productivity between kelp and sugarcane.

	Kelp		Sucrose		Unit
	1.5	11	2.3	10	
H2 yield					
Yield of product	291		100		[ton/ha]
Yield of product	29,000		10,000		[ton/km ²]
Hexose	2,320		1,500		[ton/km ²]
H2 produced	392,376	2,877,423	429,333	1,866,667	[Nm ³ /km ²]
Gasolin	392	2,877	429	1,867	[kL/km ²]

- 1) The crop of kelp was estimated at 14.5kg/m².
- 2) Harvesting of kelp is assumed to be twice a year.
- 3) The amount of mannitol was estimated at 8% of the wet weight of kelp.
- 4) Running efficiency assumed to be 1m³-H₂ equals to 1 L-gasolin.

Table 3 Representative bacteria that can produce hydrogen by fermentation.

Strict anaerobic bacteria	Cult. ^{a)}	pH [—]	Temp. [°C]	Sub.	Yield ^{b)} [mol/mol]	Production rate	
						[mmol/L·h]	[mmol/g·h]
<i>Clostridium</i> sp. No 2 ⁴⁾	B	6.0	36	glucose	2.0	24	—
<i>C. paraputrificum</i> M-21 ⁵⁾	B	—	37	GlcNAc	2.5	31	—
Mesophilic bacterium HN001 ⁶⁾	B	6.0	47	glucose	2.4	160	44
<i>C. butyricum</i> LMG1213t ⁷⁾	C	5.8	36	glucose	1.5	22	—
<i>Clostridium</i> sp. No 2 ⁸⁾	C	6.0	36	glucose	2.4	21	—
<i>C. pasteurianum</i> ⁹⁾	C	6.6	40	sucrose	1.6	612	17
Facultative anaerobic bacteria							
<i>Enterobacter aerogenes</i> E.82005 ¹⁰⁾	B	6.0	38	glucose	1.0	21	17
<i>E. cloacae</i> IIT-BT 08 ¹¹⁾	B	—	36	sucrose	3.0	35	29
<i>E. aerogenes</i> E.2005 ¹²⁾	C	6.0	38	molasses	0.7	36	17
<i>E. aerogenes</i> HU-101 m AY-2 ¹³⁾	C	—	37	glucose	1.1	58	—
Thermophilic bacteria							
<i>Thermotoga maritima</i> ¹⁴⁾	B	—	80	glucose	4.0	10	—
<i>Thermotoga elfii</i> ¹⁵⁾	B	7.4	65	glucose	3.3	3	5
<i>Caldicellulosiruptor</i> <i>Saccharolyticus</i> ¹⁵⁾	B	7.0	70	sucrose	3.3	8	12
<i>Clostridium thermocellum</i> ¹⁶⁾	B	—	60	cellobiose	1.0	7	14
<i>Thermococcus kodakaraensis</i> KOD1 ¹⁷⁾	C	6.8	85	pyruvate	2.2	9	59
Co-culture							
sludge compost ¹⁸⁾	C	6.8	60	waste water	2.5	8	—
<i>C. butyricum</i> IFO13949 + <i>E. aerogenes</i> HO-39 ¹⁹⁾	C	5.2	36	starch	2.6	53	—
sewage sludge ²⁰⁾	C	5.7	35	glucose	1.7	30	—
fermented soybean meal ²¹⁾	C	6.0	35	glucose	1.4	8	—
sewage sludge ²²⁾	C	—	35	sucrose	1.5	298	—

a) B: batch cultivation, C: continuous cultivation b) [mol/mol-monosaccharide]

4.1 発生速度の状況

培地 1L あたりの発生速度は、回分培養と連続培養のいずれも、めざましい進展が見られる。連続培養では、菌体の高密度化に成功した台湾の Jo-Shu Chang グループ ^{9,22)} が、フィードの平均滞留時間がわずか 0.5 時間と非常に速い流速の下で、*Clostridium pasteurianum* による 612mmol/(L·h) という水素発生速度を報告している ⁹⁾。これは、乾燥菌体重量当たりの水素発生速度 17mmol/(g·h) から推算すると、35g/L 以上の高菌体密度になる。一方、回分培養では菌体の高濃度化ができないのでかなり遅くなるが、Nishiyama らは 160mmol/(L·h)、44mmol/(g·h) で発生する中温菌 HN001 を選抜している ⁶⁾。また、バクテリアの単位重量あたりでの水素発生速度では、Kanai らは *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 がピルビン酸から 59mmol/(g·h) で発生することを報告しており ¹⁷⁾、速さの観点からは、この数年、極めて進展したと言える。

4.2 発酵温度の状況

Table 3 に見られるように、多くのバクテリアの生息至適温度が人間の体温付近にあったので、これまでは 37°C 前後での発生研究が多かったが、化学反応の活性化エネルギーの観点から考察すると、反応温度が高いほど反応速度は速くなる。そのため、工業的観点から高温菌の選抜が進められている。Kanai らの *T. kodakaraensis* KOD1 株は培養温度が 85°C という高温での発生速度であり ¹⁷⁾、Nishiyama らの HN001 株は従来菌より 10°C ほど高い 47°C で最高発生速度になるバクテリアである ⁶⁾。ただ、60°C 以上の高温菌は、傾向として、非常に低密度での培養しかできないようで、単位培養液あたりの発生速度では 10mmol/(L·h) 以下の速度しか得られていない。また、高温にすることで、他の菌による汚染が防ぎやすいという利点はあるが、加熱エネルギー源をいかに得るかという問題をかかえている。

4.3 水素収率の状況

発酵水素生産の水素収率は、前述のように、グルコースから酢酸のみを代謝するとき、最大の 4 mol-H₂/mol-glucose が得られる。中温域のバクテリアは、嫌気性菌で 2.4mol/mol 前後、通性嫌気性菌で 1.0mol/mol 前後の収率で水素生産する。一方、一般的に高温菌は中温菌より収率が高く、なかでも *Thermotoga maritima* は理論最大収率の 4 mol/mol で水素生産している¹⁰⁾。この収率はエンタルピー回収率では 41% に相当し、生産した水素を燃料電池で利用するなら、最終エネルギー変換効率はエタノール発酵でエタノールを生産して発電するより高くなる。このように発酵そのものではまだ十分なバイオマスのエネルギー利用ではないので、遺伝子操作などの手法でさらに高い収率への菌の改良が試みられている²³⁾。

5. 水素発酵のエネルギー変換効率

水素発酵では、水素の生産性を一般的に収率で表している。これは発酵基質 1mol から水素が何 mol 発生するかを表しており、単糖、二糖などからのエネルギー回収率を知る上で便利である。とりわけ、グルコースの燃焼熱は HHV (Higher Heating Value) で 2,817kJ/mol であり、水素のそれは 285.9kJ/mol であるから、収率 1 はエンタルピー回収率で 10.1% になる。水素発酵は、酢酸のみを代謝生産して水素を発生する時、(5)式のように、最大収率 4 になるから、40% が理論最大変換効率であることを簡単に知ることが出来る。



さらに、Table 3 で水素発生速度の速い HN001 株や *C. pasteurianum* などが、それぞれ 24%、16% のエネルギー回収率で利用できることも容易に分かる。

バイオマスの自動車燃料としての利用が温暖化防止の効果的な手段と考えられ、バイオエタノール生産が近年の話題になっている。燃料電池自動車普及し始めると、バイオ水素も当然期待されるが、バイオエタノールとバイオ水素はどちらがバイオマスをより有効に利用していることになるか、興味ある問題である。そこで、エネルギー利用総合効率の試算を次のような式で計算した。

- ・生産効率：発酵における目的物質の収率から計算したグルコースのエネルギー回収率。
- ・加工損失：使用状態に加工するために必要なエネルギー量の生産物が持つエネルギー量に対する割合；バイオ水素では 350 気圧への圧縮に使われるエネルギー。

- ・使用効率：自動車で使用した時のエネルギー変換効率。
- ・総合効率 = (生産効率 x (1 - 加工効率) x 使用効率)

x100

	生産効率	加工損失	使用効率	総合効率
バイオ水素	0.25	0.1 (圧縮)	0.6 (燃料電池)	13.5
バイオエタノール	0.9	0.5 (蒸留)	0.2 (内燃機関)	9.0

この試算では、エタノール発酵のエタノール収率から計算したエネルギー回収率は 90% と高いけれども、発酵液は高々 10% 濃度でしか得られないので、蒸留で 99.6% まで濃縮するために製品の 50% のエネルギーを使用すると仮定している。一方、水素発酵はわずか 2.5 の収率で 25% のエネルギー回収率しかないけれども、圧縮に必要なエネルギーは DOE の資料から 10% と仮定し、電池での使用効率はガソリンエンジンの 3 倍と見積もった。その結果、総合効率はエタノール生産より高いことが明らかになった。Table 3 の高温菌のように、バイオ水素の収率が 4 に改良されるならば、総合効率は 21% まで高められる。現今、木材廃棄物やバガスなどセルロース類の糖化処理研究が盛んに行われているが、この技術は、将来バイオ水素生産に使用されるようになることは明らかである。

6. 今後の方向

Jo-Shu Chang グループ^{9,22)} の高密度培養の成功により、極めて速い発生速度が達成されていることから、高速生産を求めて高収率の高温菌による高密度培養法の開発、あるいは新しい高温菌の選抜などが今後の研究方向になると思われる。同時に、遺伝子操作による菌の改良も盛んになるであろう²³⁾。また、実用化を考えた時、発酵廃液の処理が重要な問題になるので、代謝産物が 1 ~ 2 種になるよう単純化が最重要課題になるであろう²⁴⁾。

文献

- 1) 長倉ら, 「理化学辞典」, 第 5 版 CD-ROM 版, 岩波書店 (1999)
- 2) 三本菅ら, 「バイオマス変換計画」, pp.320-32, 農林水産省農水技術会議編, (株)光琳 (1991)
- 3) T. de Vrije, P. Claassen: in Bio-methane & Biohydrogen, ed. J. Reith et al., ISBN:90-9017165-7, pp.103-123 (2003)
- 4) F. Taguchi, et al.: Can. J. Microbiol., 40, pp.228-33 (1994)
- 5) D. Evvyernie, et al.: J. Bioscience Bioeng., 89, 596-601 (2000)

- 6) Hiroki Nishiyama, Shigeharu Tanisho: Proc.16th World Hydrogen Energy Conf., Lyon, 265.pdf in CD-ROM (2006)
- 7) M. Heyndrickx, et al.: Syst. Appl. Microbiol., 8, pp.239-44 (1986)
- 8) F. Taguchi, et al.: Can. J. Microbiol., 41, pp.536-40 (1995)
- 9) Shu-Yii Wu, et al.: Biotechnol. Bioeng., 93, pp.934-946 (2006)
- 10) S. Tanisho, et al.: Int. J. Hydrogen Energy, 12, pp.623-27 (1987)
- 11) N. Kumar, D. Das: Process Biochem., 35, pp.589-93 (2000)
- 12) S. Tanisho, Y. Ishiwata: Int. J. Hydrogen Energy, 19, pp.807-12 (1994)
- 13) M. Rachman, et al.: Appl. Microbiol Biotechnol., 49, 450-54 (1998)
- 14) C. Schroder, et al.: Arch Microbiol, 161, pp.460-470 (1994)
- 15) E. van Niel, et al.: Int. J. Hydrogen Energy, 27, pp.1391-98 (2002)
- 16) R. Islam, et al.: Appl. Microbiol. Biotechnol., 72, pp.576-83 (2006)
- 17) T. Kanai, et al.: J. Biotechnol., 116, pp.271-82 (2005)
- 18) Y. Ueno, et al.: J. Ferment. Bioeng., 82, pp.194-97 (1996)
- 19) H. Yokoi, et al.: Biotechnol. Letters, 20, pp.143-47 (1998)
- 20) C-Y Lin, R-C Chang: J. Chem. Technol. Biotechnol., 74, pp.498-500 (1999)
- 21) O. Mizuno, et al., Bioresource Technol., 73, pp.59-65 (2000)
- 22) K-S. Lee, et al.: Biotechnol. Bioeng., 87, pp.648-57 (2004)
- 23) 原田禎子、谷生重晴：第25回水素エネルギー協会大会予稿集、pp.179-182 (2005)
- 24) 西山, 谷生：「中温水素発生菌による発酵水素生産の研究」, 第25回水素エネルギー協会大会予稿集, p.171 - 174 (2005)
- 25) 谷生ら：「*Enterobacter aerogenes* の発酵水素発生と利用基質について」、発酵工学会誌、67, pp.29-34 (1989)