

## 海士町における自生海藻の調査と新規水素発生菌叢の探索結果報告

バイオ水素株式会社 谷生重晴

### 1. 海藻の採取とマンニトール含有率測定

今後、海士町で自生、栽培する海藻から発酵法で水素を生産するために、発酵の基質（原料）になるマンニトールが各海藻にどれくらい蓄積されているか、採取時期によって濃度がどのように変化するか、データを蓄積する必要がある。また、試料の数が多くなるので、この濃度分析はできるだけ簡便な方法で測定できることが好ましい。現状では液体クロマトグラフィーで分析しており、一回の分析にかかる時間は、試料の粉碎、遠心分離、フィルター濾過などで約 1 時間、分析機に掛けてから結果が出力されるまでに 47 分、計約 2 時間かかっている。しかし、サトウキビの糖濃度を調べるために使用する糖度計は、糖溶液の屈折率を利用して測定するため、搾り汁が準備できれば約 1 分で結果が分かるだけでなく、掌に載るほど小型であるから、もし海藻のマンニトールの濃度測定に利用できれば、実験室に試料を持ち込まなくても現場で濃度測定が可能になる。

そこで、糖度計で測定した糖濃度と液体クロマトグラフィーで測定した正確な糖濃度との相関関係を調べて糖度計が使用できないか検討することにした。

#### 1.1 3月採取海藻のマンニトール含有率

海士町崎の磯浜でアカモク、アラメを、保々見の磯浜でノコギリモク、アカモクの雌株、ワカメ、オオバモクを、日須賀の海中からホンダワラを採取した。これらの海藻を、ミンサーで疎細分し、重量を測定してその数倍の海水と一緒にミキサーに掛けて微粉碎した。この液を白元社の水切りゴミ袋で濾過した後、透過液の Brix 値をアズワンのフードテスター（糖度・塩分濃度計）で測定した。また、あるものは透過液を 12,000rpm で遠心分離して更に 0.25µm のフィルターを通し、糖化液を液体クロマトグラフィーに掛けてマンニトール含有濃度を測定した。ただ残念なことに、液体クロマトグラフィーのデータ保存機能が働かず、また記録計が無いので測定データが残らなかったため、糖度計の指示した Brix 値と液クロ指示値の相関関係を調べることはできなかった。

表 1. 測定海藻の重量と粉碎に加えた海水量、その海水の塩分濃度と粉碎濾過液の Brix 測定値

採取月日	名前	粉碎重量	海水加水量	塩分濃度	海水Brix値	実測 B r i x 値	Brix値	備 考
		[g]	[g]	[ % ]	[ % ]	[ % ]	[ % ]	
4/8	アカモク	85	89		0.3	0.7	0.82	
4/9	アカモク	85	89		0.1	1.1	2.05	1日置くと糖度が増す？
4/9	ワカメ	90	181		0.1	0.1	0.00	
4/11	ノコギリモク	91	195	2.76		0.4	1.26	Brix:0.4, 0.4, 0.4 塩分:2.75, 2.76, 2.77 非常に水っぽい。ワカメと同じくらいか。 草の香りがする。
4/11	アカモク	131	264	2.93		0.4	1.22	Brix:0.4, 0.3, 0.3 塩分:2.93, 2.93 ワカメより粘性が高い。 塩の香りがする。
4/14	ノコギリモク	91	195	2.76	0.6	1.4	2.51	1日置くと糖度が増す？
4/14	アカモク	131	264	2.93	0.6	0.8	0.60	1日置くと糖度が増す？
4/28	ワカメ茎と葉	57	115		0.4	1.2	2.44	液クロで分析するも、データの記録が出来なかつ
4/29	ワカメのメカブ	28	250		0.6	0.7	0.99	液クロで分析するも、データの記録が出来なかつ
4/29	ワカメのメカブ	35	125			0.1	0.46	液クロで分析するも、データの記録が出来なかつ
4/30	ワカメ葉のみ	130	391			0	0.00	液クロで分析するも、データの記録が出来なかつ
4/30	ワカメ茎のみ	52	157			0.3	1.21	液クロで分析するも、データの記録が出来なかつ
4/30	オオバモク	58	177			-		非常に粘りがあって、ろ過できなかった。
5/1	ホンダワラ？	52	156			0.9	3.60	液クロで分析するも、データの記録が出来なかつ
5/1	アラメ	49	150			1.6	6.50	液クロで分析するも、データの記録が出来なかつ

なお、Brix 値の校正は、イワガキ生産組合の滅菌海水を Brix 値 0%とし、マンニトールを滅菌海水で溶かして 30%濃度にしたものを基準校正液とした。海藻の Brix 値測定の前に、新しい滅菌海水の Brix 値をできるだけ毎回測定したが、0%にならない時が多かった。

また、粉碎・濾過処理してBrix 値を測定した試料を、一晩置いて翌日再度測定すると、Brix 値が大きくなっていった。細胞を破碎して濾過した液だから、細胞内の糖類が浸出したとするのは考えにくい。そのためこの理由についてはまだ明確な説明ができないので、今後、表1の測定項目に漏れの無い事例を増やし、理由を明らかにしたい。

### 1.2 液体クロマトグラフによるマンニトール含有率測定

前項で書いたように、液体クロマトグラフィーのデータ保存機能がまだ正常に作動していないので、マンニトール濃度と Brix 値との相関関係を調べることはできなかった。今後、正常にデータ保存ができるようになったら、相関関係を改めて調べる予定である。

### 1.3 9月採取海藻と3月採取海藻のマンニトール含有率比較

海藻のマンニトール含有率は成長に伴って変化する。水素生産には含有率の高い原料を使用した方が生産性が高くなりコストを下げるできるので、成長段階のいつごろから収穫して使用するのが良いか調べる必要がある。。そこで、海士町で、異なった時期に海藻を採取し、含有率の測定を行っている。図1はアルジェンチンの乾燥海藻を分析し、ピークの同定を行った時の例を示している。オレンジ色のピークは食塩のピークで、青色のピークは4種類の糖を溶かした液のピークであり、この海藻では3つのピークが現われた。2つのピークは海水由来する Na とCl のピークであり、三つ目のピークはマンニトールであることが明らかに示されている。

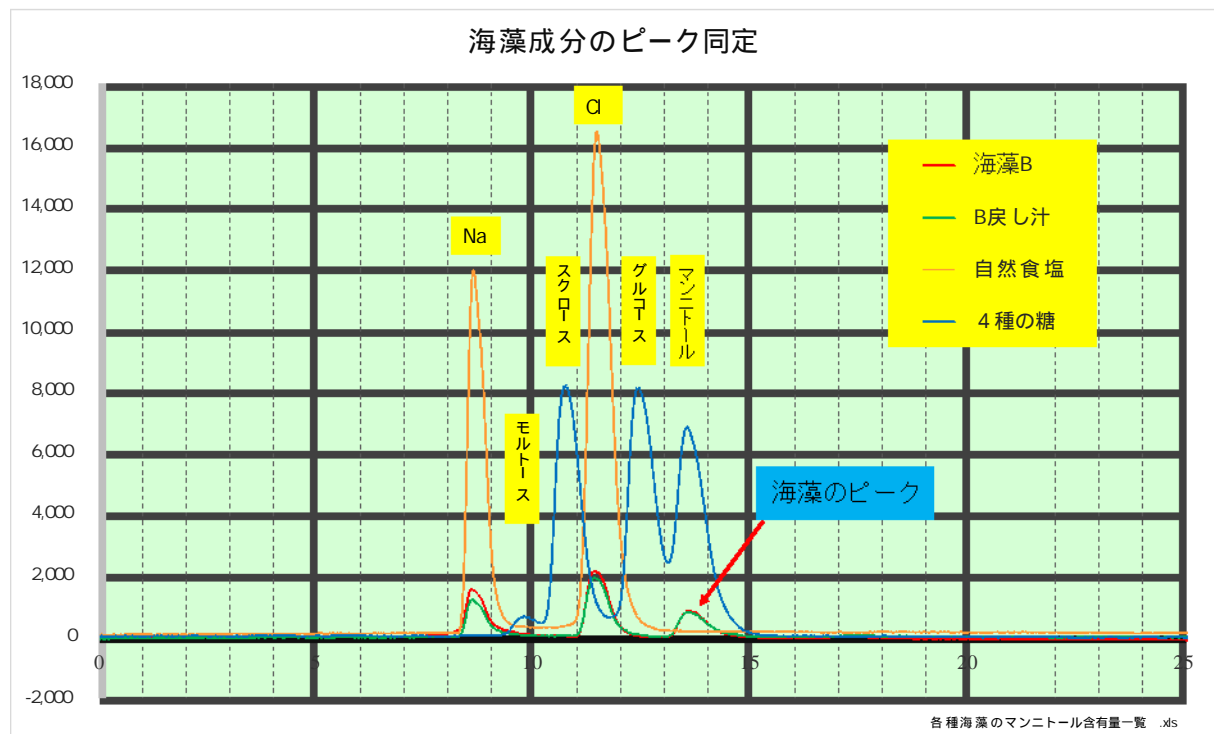


図1. 液体クロマトグラフィーによるアルジェンチンの海藻の成分分析例

図 2 は、海士町で採集した海藻の乾物に含まれるマンニトール量と、市販の北海道産「出し昆布」と「早煮昆布」の含有量を示している。北海道のマコンプ、オニコンプには湿重量で約3%のマンニトールが含まれることが報告されており、図中の「出し昆布」は湿重量換算では約 7%の含有率になる。図 3 は湿海藻を使用して測定した海士マコンプと鳴門ワカメの比較で、海士マコンプは約 4%の含有率、鳴門ワカメには約 0.5%しか含まれていないことが分かった。

乾海藻のマンニトール含有率測定

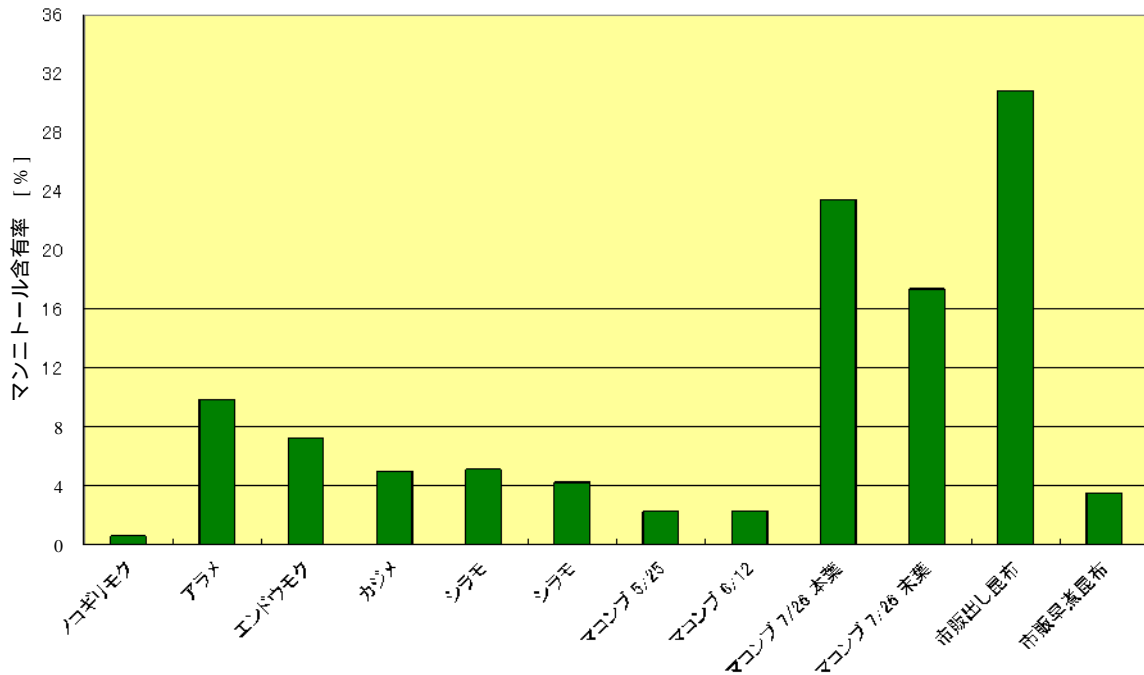


図 2 . 海士町で採集した海藻（乾燥試料）と市販コンブのマンニトール含有率比較

湿鳴門ワカメと湿海士マコンプのマンニトール含有率

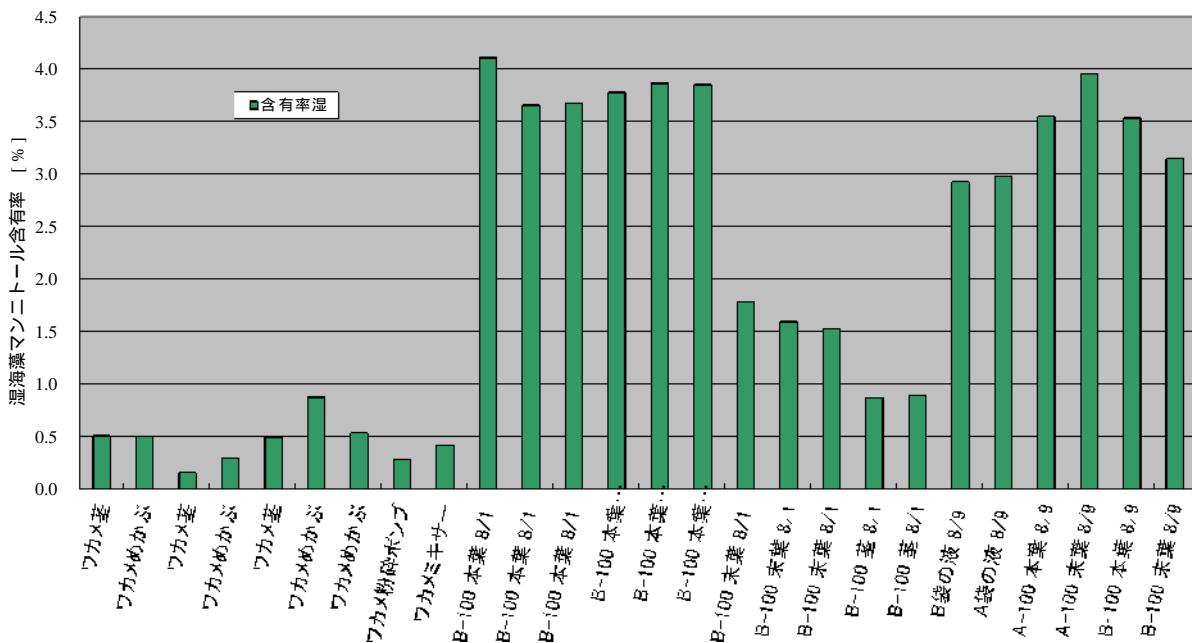


図 3 . 海士町で採集したマコンプと鳴門のワカメのマンニトール含有率比較（湿海藻）

表 2 . 海士マコンブと鳴門ワカメの実測データと計算結果

各種海藻のマニトール含有量一覧	NaClMan.	備考湿	湿(g)	乾(g)	水(g)Na/ClMan./NaMan./ClMan	濃度	Xg湿	X乾含有率湿
						[ mM ] [ g/l ] [ % ]		
R.T.8.62011.44713.593								
マニトール		31417Man. 3.977%= 218.5mM						
マニトール		45798Man. 325.0mM					y = 7.0513E-03x	
<b>NaCl56179080NaCl 1.859%</b>					<b>0.620.000.00</b>			
ワカメ茎	39126636994	鳴門CaCl2 0.1M 4倍希釈	501500.590.250.157.00.260.51					
ワカメめかぶ	36806360973	鳴門CaCl2 0.1M 4倍希釈	501500.580.260.156.90.250.50					
ワカメ茎	17212767250	紀伊水道	622450.620.150.091.80.100.16					
ワカメめかぶ	20302915456	鳴門	572280.700.220.163.20.170.29					
ワカメ茎	24312971770	鳴門	562240.820.320.265.40.280.49					
ワカメめかぶ	131720461362	鳴門	18720.641.030.679.60.160.87					
ワカメめかぶ	16652575840	紀伊水道	652600.650.500.335.90.350.54					
ワカメ粉砕ポンブ	31194932923	鳴門	637090000.630.300.196.518.210.29					
ワカメミキサー	18122854654	鳴門	753000.630.360.234.60.310.42					
B-100 本葉 8/1	7159222914	海士B-100 8/1 本葉部分	20.42030.784.083.1620.50.844.11					
B-100 本葉 8/1	6928002593	海士B-100 8/1 本葉部分	20.42030.873.753.2418.30.743.66					
B-100 本葉 8/1	7438202609	海士B-100 8/1 本葉部分	20.42030.913.513.1818.40.753.68					
B-100 本葉 NaOH 8/1 342458962679		海士B-100 8/1 本葉部分	20.42030.580.780.4518.90.773.78					
B-100 本葉 NaOH 8/1345359332741		海士B-100 8/1 本葉部分	20.42030.580.790.4619.30.793.87					
B-100 本葉 NaOH 8/1345059522731		海士B-100 8/1 本葉部分	20.42030.580.790.4619.30.783.85					
B-100 末葉 8/1	93812061269	海士B-100 8/1 葉先部分	11.11100.781.351.058.90.201.79					
B-100 末葉 8/187410881134		海士B-100 8/1 葉先部分	11.11100.801.301.048.00.181.60					
B-100 末葉 8/188310571085		海士B-100 8/1 葉先部分	11.11100.841.231.037.70.171.53					
B-100 茎 8/1310-292		海士B-100 8/1 茎部分	4.0790.60.942.10.040.87					
B-100 茎 8/1338-300		海士B-100 8/1 茎部分	4.0790.60.892.10.040.90					
B袋の液8/9 109841428422815B-100 8/9		袋に溶け出した液			0.772.081.60160.90.002.93			
A袋の液8/9 113081445923199A-100 8/9		袋に溶け出した液			0.782.051.60163.60.002.98			
A-100 本葉 8/9743773251420.8			20.82080.963.383.2517.70.743.55					
A-100 末葉 8/9850860278520			202020.993.283.2419.60.793.96					
B-100 本葉 8/9805813249240			404020.993.103.0717.61.413.54					
B-100 末葉 8/91047882215838.4			38.43981.192.062.4515.21.213.15					

## 2. 海藻粉砕の濾過残固形分の利用研究

水素生産に使用する海藻はチョッパーと微粉砕機を通して細胞を破碎し、海水に溶出した細胞成分を濾過して濾液を原料に使用する。そのため、多量に固形の濾過残が残るので、その有効利用を考えている。

価値の高い成分の一つとして、海藻の主成分であるアルギン酸を商品化することが考えられ、図4のような工程を考えた。工業的にはエタノールではなく酸を使用して結晶化しているが、エタノールは高純度である必要はなく蒸留で回収でき再使用できるので、この工程を検討することにした。

表1に示すように、粉砕の分散液量について固形分量と等量から3倍までを試みたが、海藻毎に粘度が異なり、オオバモクでは3倍でも濾過できないほど高粘性であった。また、ワカメの濾過残にNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>水溶液を加えたところ、これも非常に高粘度になったので、今後、分散液倍率、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>希釈倍率を決定するための試行錯誤実験が必要である。

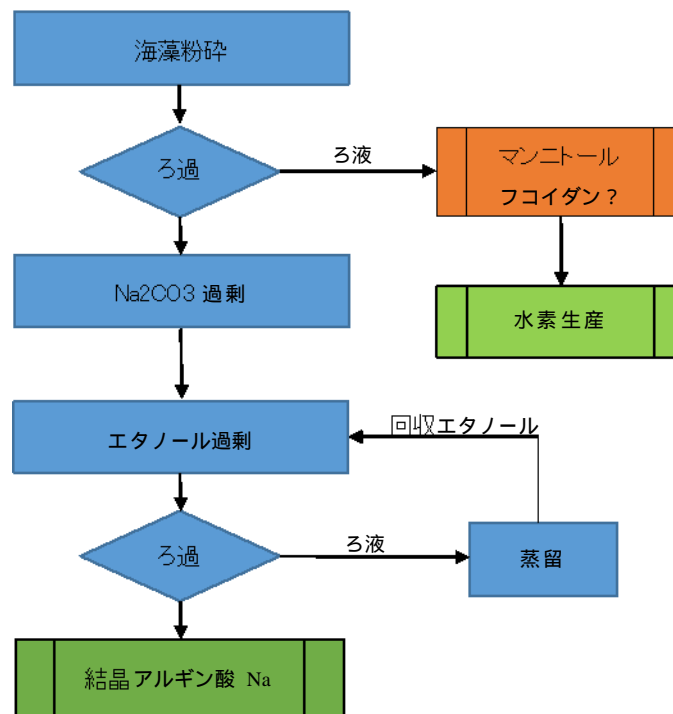


図4. マンニトール溶出固形残渣の有効利用処理工程

### 3. 新規菌叢の探索

発酵水素発生はこれまで真水を基質の溶媒として使用して行ってきたが、海藻成分を原料として発酵を行うことから、塩分濃度がこれまでと違って非常に濃くなることが考えられる。また、水素生産量が海士町の全エネルギーをまかなえるほどに多量になると、使用する水量がきわめて多量になるので、海藻の洗浄、基質の溶出に海水が使えると水供給の心配をしなくて済む。しかし、これまで使用して来た細菌では、塩の影響を強く受ける。図5は、マンニトールから水素を発生するEnterobacter aerogenes の水素発生に及ぼす食塩濃度の影響を調べた実験結果である。1%程度であればほとんど影響は無いが、3%になると発生量も発生速度も非常に影響を受けることがこれにより良く分かる。

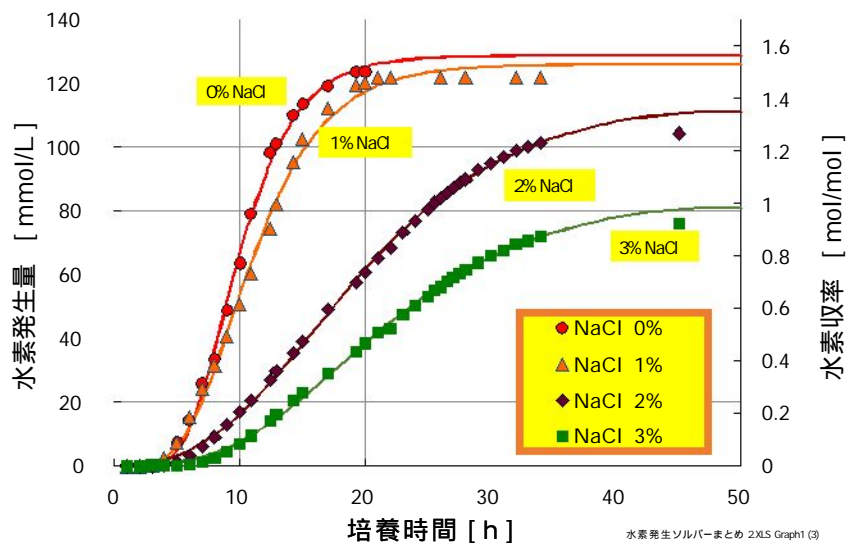


図5. 食塩濃度がEnterobacter aerogenesの水素発生に及ぼす影響

そこで、海に棲む水素発生細菌を探索した。これまで長年、磯で海中バクテリアの採取を試みていたが、磯では波に洗われて泥の堆積場所が無く、試料の採取ができなかったが、幸い、知々井の実験室はイワガキ生産組合の作業場に隣接しているので、イワガキの殻に泥や海藻が積もっていることを発見し、殻から試料を採取して選別実験を行った。写真1は出荷洗浄前のイワガキの殻の表面である。



写真1. 岩牡蠣の殻表面に付着している海藻や泥の状況

### 3.1 海中に棲む新規水素発生菌の探索実験

新規細菌の探索は試験管で行う。細菌の栄養源として ABCM 糖分解用培地（栄研化学㈱）と水素発生基質としてマンニトール0.5%を加えた培養液を試験管に 20mL を注入し、いろいろな所から採取した試料をそれぞれ別々の試験管培地に穿刺植菌する。その試験管に栓をし、写真2の左のように恒温槽に静置し、発生したガスを水を満たしたガス収集試験管に導いてガス発生量を経時的に測定する。そうすることで、簡単に有望な菌がいる試料を選び出すことができる。

写真2は、2015年3月24日火曜に採取した試料の培養試験を時系列写真で示したもので、14:17に培養を開始した時の水温は、加熱エネルギーを少なくすることを考えて 30℃に設定した。しかし、翌朝の8:52にガス発生を観察すると、発生量が非常に少ないので、33に設定変更して培養を続けたところ、約4時間後の12:38（写真3・左）にはNo.3とNo.4の試料が速い速度でガス発生していることが判明した。そこで、この試料には2本目のガス置換試験管を接続したところ、約1時間後にNo.3の、2時間後にNo.4の一本目の試験管の水が置換され、低培養温度でも非常に活発にガス発生する試料を獲得することができた。

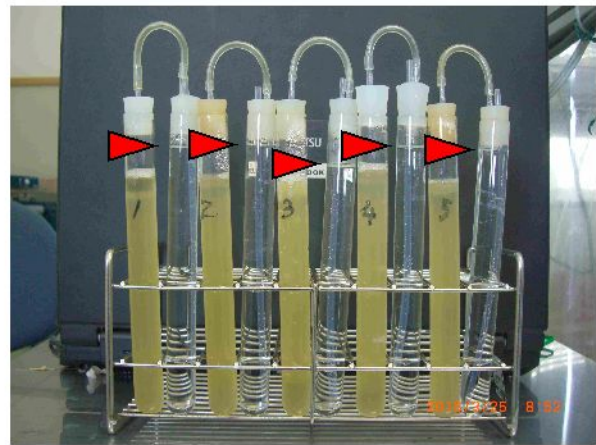
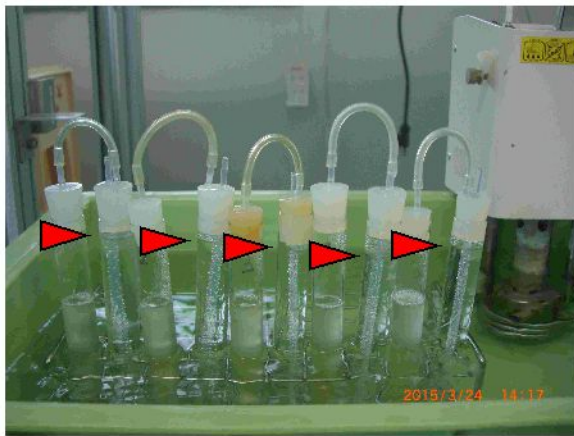


写真2 . 岩牡蛎から採取したサンプルの海水による培養試験。

培地 : ABCM 糖分解用培地、基質 : マンニトール、基質濃度0.5%、溶媒 : 滅菌海水、培養温度 : 33 。  
写真左 : 2015/3/24 14:17 。 写真右 : 2015/3/25 8:52 。

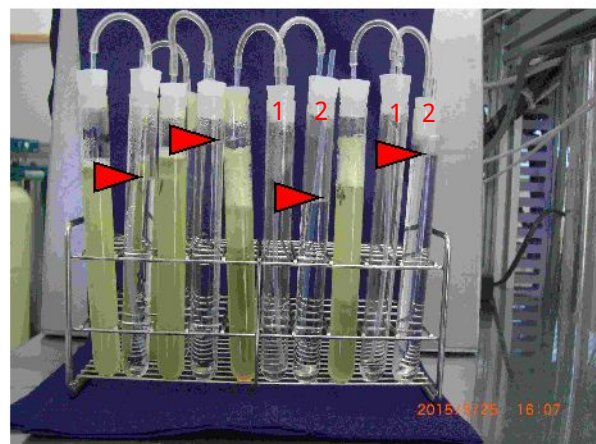
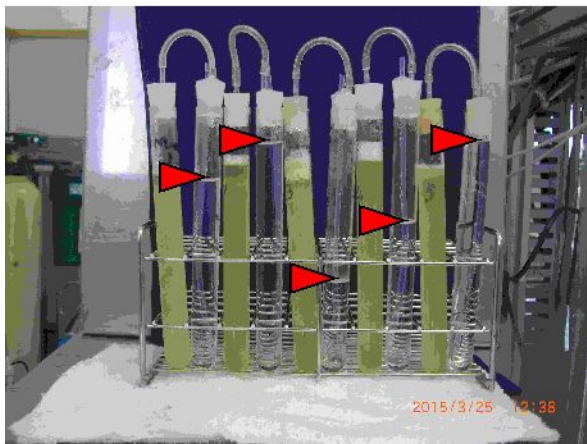


写真3 . 左3/25 12:38。右 3/25 16:07。試験管番号3と4は1本目の試験管の水はすべて発生ガスで置換され、2本目の試験管の水が置換が始まっている。

さらに、培地の pH を試験紙で調べたところ、写真4に示すように7 前後の値を示し、この菌叢は pH 制御のための薬品を使用する必要が無い理想的な菌叢であることが判明した。

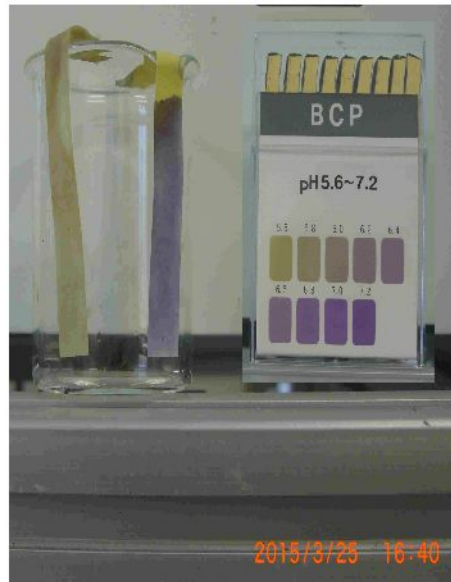


写真 4 . pH 試験紙による培養後培地の pH 測定結果

### 3 . 2 海中に棲む新規水素発生菌のガス発生性能

写真で示した新規細菌探索実験の有望菌叢、 No.3 と No.4、それに真水培地で発見した水素収率の高い優良菌叢の Man1 をデータ化したのが表3である。試験管の内径は 14 mm なので、置換されたガスの深さを測定すると発生したガス量を知ることができる。培地の堆積は 20mL であるから、1 の培地あたりでの発生量で表示すると、他のデータと比較することができる。

表 3 . 優良試料の実測データと計算データ

撮影時刻	置換ガス深さ [ mm ]			置換ガス量 [ mL ]		
	No.3	No.4	Man1	No.3	No.4	Man1
8:52	16	10	20	2.46	1.54	3.08
10:33	40	25	30	6.15	3.85	4.62
11:32	65	40	38	10.00	6.15	5.85
12:38	93	63	38	14.31	9.69	5.85
13:30	123	88	38	18.92	13.54	5.85
14:32	152	120	39	23.39	18.46	6.00
16:07	194	164	40	29.85	25.23	6.15

撮影時刻	[ mmol/L ]			[ mmol/Lh ]	
	No.3	No.4	Man1	No.3	No.4
8:52	5.5	3.4	6.9		
10:33	13.7	8.6	10.3	4.9	3.1
11:32	22.3	13.7	13.1	6.3	3.8
12:38	31.9	21.6	13.1	8.6	7.1
13:30	42.2	30.2	13.1	11.9	9.9
14:32	52.2	41.2	13.4	9.8	10.8
16:07	66.6	56.3	13.7	9.1	9.5



図 6 は採取した試料のガス発生をグラフ化したもので、図 5 に示した *E. aerogenes* の 3%食塩濃度における水素発生データも一緒に示している。真水培地での優良菌叢 Man1 の海水中でのガス発生に比べ、海水中から発見した No.3 と No.4 のガス発生は非常に活発であるだけでなく、38 で培養した *E. aerogenes* より遥かに良いことも良く分かる。また、図 7 はガス発生速度を比較したものであるが、新規菌叢は *E.aerogenes* に比べて断然ガス発生速度が速いことも良く分かる。

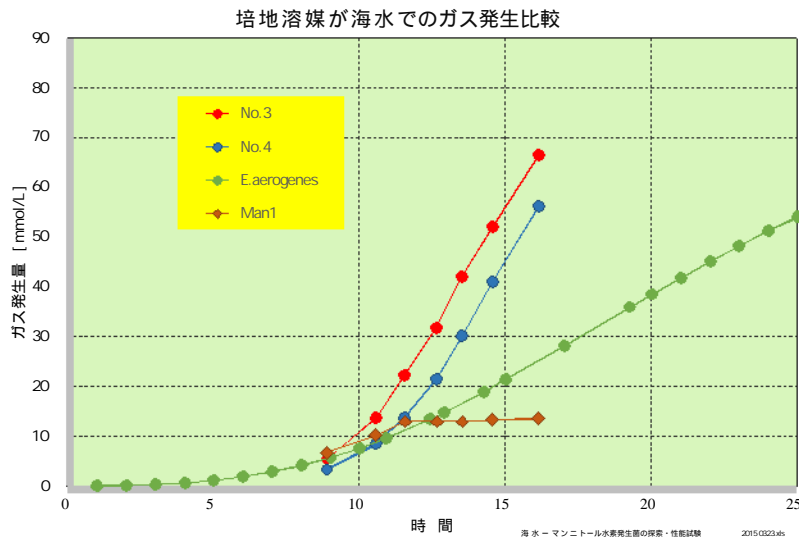


図 6 . 新規探索菌叢と *E.aerogenes*、Man1 とのガス発生比較

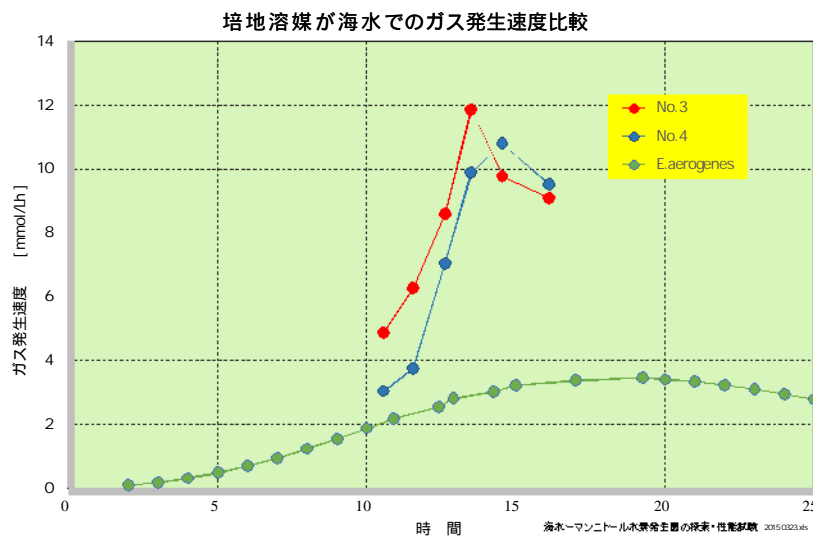


図 7 . 新規探索菌叢と *E.aerogenes* とのガス発生速度比較

#### 4 . まとめ

今回の調査で、海藻のマニトール含有率は少なく、これからも定期的に測定して収穫に適した時期を知る必要のあることが分かった。固形廃棄物についても、実験を続けて技術を確認する必要がある。新規水素細菌探索は非常に良い結果を得たので、今後この菌叢を使用して操作条件など基礎データを収集し、特許取得など実用に結び付けたい。

表 4 . 新規水素細菌探索の処理記録

培地： 海水 + Mannitol 0.5%+ABC糖分解用、pH  
 培養温度：3.3

日時親株 2015/3/25 2015/3/25 2015/4/11 2015/4/12	株培養後 p AMA No.3 AMA No.4 AMA No.3 AMA No.4 AMA No.3 AMA No.4 AMA No.3 AMA No.4 AMA No.3 AMA No.4	海水 ABCM	mannitol [g][g][g]	H	備考
	AMA003				AMA003浅として分析依頼
	AMA003中				AMA003中として分析依頼
	AMA003深				AMA003深として分析依頼
	AMA004浅				
	AMA004中				
	AMA004深				
	AMA004浅			5.4	AMA No.4 として分析依頼 寒天中に泡が多数見えるものの、ガス発生は少なかった。
	AMA004中			4.5	AMA004 浅として分析依頼 ガスを活発に出した
	AMA004深			6.2	AMA No.3 として分析依頼 ガス発生非常に少量
	AMA004浅上部		1.02048.3		寒天中に短時間で泡が多数発生するも、ガス発生は少ない写真。
	AMA004中上部				寒天中に泡が多数見えるものの、ガス発生は少ない写真。
	AMA004浅上部				ガスを活発に出した。写真。4/13 魚粉の実験で使用
	AMA004中上部				ガスを活発に出した。写真。4/13 魚粉の実験で使用
	AMA004深			4.5	ガスを活発に出した。写真。4/13 魚粉の実験で使用

\* 水+タの校正液準備が間に合わず、このデータの値と pH 試験紙との指示値がかなり異なっている。今後のデータ収集では正確な値になるよう準備を進めている。