



バイオマスを原料とするハイブリッド型

フューエルセルシステムの開発

(課題番号 12555230)

平成12年度～平成14年度科学研究費補助金 (基盤研究(B)(2))
研究成果報告書

平成15年3月

研究代表者 ^{ニシオノタカシ} 西尾尚道

学大学院先端物質科学研究科教授)



中央図書館

はしがき

本研究はバイオマスを原料とする水素-メタンハイブリッド型フューエルセルシステムに関する研究開発である。平成12年度～平成14年度において、純粋基質並びに実際の有機廃棄物から燃料電池に直接利用可能な水素を単一微生物および複合微生物群を利用して生産した後、その残渣から高速メタン発酵法によりメタンを回収する二段階プロセスを構築し、その有効性を検証しました。

ここに、これまでの研究成果をまとめて本報告書を作成し、専門諸家のご批判を仰ぎたいと考える次第です。

広島大学図書

0130484483



研究組織

- 研究代表者：西尾尚道（広島大学大学院先端物質科学研究科 教授）
研究分担者：柿菌俊英（広島大学大学院先端物質科学研究科 助教授）
研究分担者：中島田豊（広島大学大学院先端物質科学研究科 助手）
研究分担者：平賀哲男（島津製作所・官庁大学本部・技術開発部）

研究経費

(金額単位:千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成12年度	6,600	0	6,600
平成13年度	4,300	0	4,300
平成14年度	2,000	0	2,000
総計	12,900	0	12,900

研究発表

(1) 学会誌等

1. N. Nishio, Y. Nakashimada: Hydrogen-methane two-stage process for anaerobic wastewater treatment. In: Biotechnology for sustainable utilization of biological resources in the tropics (Y. Murooka, T. Yoshida, T. Seki, P. Matangkasombut, T. M. Espino, U. Soetisna, and M. I. A. Karim eds.). Vol 16, IC Biotech. In press
2. Y. Nakashimada, M. A. Rachman, T. Kakizono, N. Nishio: H₂ production of *Enterobacter aerogenes* altered by extracellular and intracellular redox states. Int. J. Hyd. Energy, **27** (11-12) 1399-1405 (2002)
3. H. Nagai, M. Kobayashi, Y. Tsuji, Y. Nakashimada, T. Kakizono, N. Nishio: Biological and chemical treatment of the solid waste from the process of soy sauce manufacture. Wat. Sci. Technol. **45** (12), 335-338 (2002)

(2) 口頭発表

学会発表

1. 中島田豊 他：ディスポージャーによる粉碎生ゴミの水素・メタン発酵
平成15年度日本農芸化学会, 2003年4月1日
2. 荒谷修一 他：通性嫌気性細菌 *Enterobacter aerogenes* の水素生成
ヒドロゲナーゼの基礎的検討
平成14年度日本生物工学会, 2002年10月29日
3. 伊藤武志 他：通性嫌気性細菌 *Enterobacter aerogenes* の2,3-ブタンジオール非生成株による高収率水素生産
平成14年度日本生物工学会, 2002年10月29日
4. 南久生 他：グルコースを基質とした水素—メタン二段発酵システムの開発
平成14年度日本生物工学会, 2002年10月29日
5. 高田和也 他 他：製パン工場から発生する固形有機性廃棄物の水素

—メタン発酵

平成14年度日本農芸化学会大会, 2002年3月25日

6. 伊藤武志 他: 通性嫌気性細菌 *Enterobacter aerogenes* の2,3-ブタンジオール非生成株の代謝解析

平成14年度日本農芸化学会大会, 2002年3月27日

7. 中島田豊 他: *Enterobacter aerogenes* の水素生産に及ぼす炭素源の効果

平成13年度日本生物工学会, 2001年9月27日

国際会議

1. Yutaka Nakashimada *et al.*: Methane fermentation of coastal mud sediment. H₂ production of *Enterobacter aerogenes* altered by extracellular and intracellular redox states. BioHydrogen 2002, April 21 -24, 2002, Ede, The Netherlands.
2. Takeshi Ito *et al.*: Enhanced hydrogen production by 2,3-butanediol deficient mutants of *Enterobacter aerogenes*. BioHydrogen 2002, April 21 -24, 2002, Ede, The Netherlands.

1. ハイブリッド型水素・メタン発酵システムの開発

1	緒言	2
2	実験方法	3
2.1	使用菌株	3
2.2	使用培地	3
2.3	培養条件及び培養方法	3
2.3.1	前培養（水素生産）	3
2.3.2	回分培養（水素生産）	3
2.3.3	連続培養（水素生産）	4
2.3.4	メタン発酵汚泥馴養	4
2.3.5	<i>E.aerogenes</i> 培養廃水メタン発酵	4
3	分析方法	4
3.1	最終代謝産物の測定	4
3.1.1	ガス組成の分析	4
3.1.2	液成分の定量	5
4	結果及び考察	6
4.1	<i>E.AEROGENES</i> 培養条件の検討（回分培養）	6
4.1.1	様々な基質を用いての培養	6
4.1.2	初発基質濃度の影響	6
4.1.3	Yest extract と Peptone 濃度の影響	7
4.1.4	Ni 濃度の影響	7
4.1.5	Fe 濃度の影響	7
4.1.6	Ti(III)濃度の影響	7
4.2	連続水素生産	8
4.3	メタン発酵	8
4.3.1	人工廃水を用いたメタン発酵汚泥の馴養	8
4.3.2	<i>E.aerogenes</i> 培養廃水メタン発酵	8
5	総括	23
6	謝辞	24
7	参考文献	25

1 緒言

水素は無味、無臭、無色の気体でアンモニア、メタノール、塩酸などの製造原料であり、還元剤としても利用されている。さらに現在、エネルギーは化石燃料の燃焼に依存しているがこれは NO_x , SO_x , CO_2 などの汚染物質を排出したり、数十年後には枯渇するというような問題点があり人類はこれらの問題を解決しなければならない。そこで次世代のエネルギー源の一つとして注目されているものとして水素を原料とした燃料電池による発電があげられる。このエネルギー獲得方法は上記の方法のような汚染物質を排出しないのでクリーンな方法である。したがって水素生産はエネルギー問題に直結した重要な事柄である。

生物的水素生産方法としては、光を必要とする光合成細菌を用いる方法や、*Clostridium*, *Rhodobacter* などの嫌気性細菌を用いて発酵生産を行なう方法などが挙げられる。それらのなかで *Enterobacter* 属の *Enterobacter aerogenes* はより多くの種類の基質から水素を生産できること、酸素に強いこと、制御が簡単であること、増殖速度が速いことなど多くの利点がある。そして *E. aerogenes* は水素を生産すると共に有機酸、アルコールなどの副産物を生産する。

本研究は様々な基質や培養条件を用いて *E. aerogenes* の水素生産についての検討をおこないグルコースを用いての *E. aerogenes* による連続水素生産の後 *E. aerogenes* 副産物をメタン発酵し、メタンとしてもエネルギー回収できる水素、メタン発酵ハイブリッド型のリアクターシステムの開発に向けた検討を行なった。

2 実験方法

2.1 使用菌株

水素生産での使用菌株は本研究室でメタン発酵汚泥より取得された *Enterobacter aerogenes* HU 101 野生株を用いた。

メタン発酵では東広島市の宝積飲料より採取したメタン発酵汚泥を用いた。

2.2 使用培地

水素生産においてバイアル瓶による回分培養では Table 1 に示した複合培地、リアクターにおける菌体充填床型培養でも Table 1 に示した完全複合培地を用いた。なお、121 °C、2 atm で 20 min 滅菌する際、培地中に炭素源、リン酸塩、マグネシウム塩が同時に存在すると培地が褐変するため、それぞれ別々に調製し滅菌後に混合した。

メタン発酵においてメタン発酵汚泥の馴養では Table 2 に示したメタン発酵培地をもちいた。

2.3 培養条件及び培養方法

2.3.1 前培養（水素生産）

前培養は 125 ml バイアル瓶中の複合培地 38 ml に 30 % グリセロール冷凍保存 (-80 °C) した保存菌体を 1 ml、10 倍に濃縮した炭素源、リン酸緩衝液を 5 ml それぞれ接種し 14 時間、37°C、120 rpm にて振盪培養した。

2.3.2 回分培養（水素生産）

回分培養は 125 ml バイアル瓶中の複合培地 38 ml に前培養液を 2 ml、10 倍に濃縮した炭素源、リン酸緩衝液を 5 ml それぞれ接種し 37°C、120 rpm にて振盪培養した。

2.3.3 連続培養（水素生産）

連続培養は Fig 1 に示す 60 ml のリアクターを用いて行なった。まずリアクターいっぱい培地を供給しておき前培養液を 2.4 ml 接種して 37 °C で 4 時間回分培養を行なった。その後リアクター底部からペリスターポンプによって徐々に希釈率 D を上げていき連続培養を行なった。残存グルコース濃度がない状態を確認してから希釈率を上げていった。

2.3.4 メタン発酵汚泥馴養

E.aerogenes 培養廃水をメタン発酵する前に Fig 2 に示す 800 ml の UASB リアクターを用いて Table 3 に示す人工廃水でメタン発酵汚泥を馴養した。人工廃水の炭素源としては Table 4 で示す *E.aerogenes* 回分培養での生産物をその濃度で用いた。希釈率は 0.5h^{-1} で行なった。

2.3.5 *E.aerogenes* 培養廃水メタン発酵

2.3.3 での *E.aerogenes* 培養廃水を 4000 rpm、30 min の遠心分離により菌体を除去し、10 g/l の濃度で NaHCO_3 を加え 2.3.4 での馴養の後のリアクターに投入しメタン発酵した。

3 分析方法

3.1 最終代謝産物の測定

3.1.1 ガス組成の分析

ガス組成の分析はガスタイトシリンジを用いてサンプルを抜き取りガスクロマトグラフィー(GC-8A, Shimadzu; TCD: Thermal Conductivity Detector)にて行なった。

<分析条件>

Colum :Stainless steel column

Column packing material	:Activated carbon
Carrier gas	:Argon gas
Current	:60 mA
Column temperature	:110 °C
Injection/Detection temperature	:140 °C

3.1.2 液成分の定量

液成分の定量は HPLC(日本分光：クロマトグラフィー用高性能データ処理システム BORWIN,UV-970,PU-980,CO-980)にて行なった。なおサンプルの注入はオートサンプラー(日本分光：851-AS)を用いた。

<分析条件>

Eluent	:5mM H ₂ SO ₄
Flow rate	:0.8 ml/min
Column	:Shodex Ionpak C-811
Column Temperature	:65 °C
Injection volume	:35 µl

4 結果及び考察

4.1 *E.aerogenes* 培養条件の検討 (回分培養)

4.1.1 様々な基質を用いての培養

バイアル瓶を用いて *E.aerogenes* HU-101 による様々な炭素源からの水素生産を行なった。その結果を Fig 4 に示した。炭素源はそれぞれ 10 g/l とした。

水素生産量は Glucose と K Gluconate を基質とした場合それぞれ約 40 mM でありそれ以外の基質の場合は約 80 mM であった。その他の代謝産物の結果として Glucose を基質としたとすると CO₂ が 80 mM と大きな値を示した。これは Fig 3 に示した代謝経路図からわかるように Pyruvate から 2,3-Butanediol に変換される課程で CO₂ が生じるのでこの CO₂ が Glucose の場合の大きな CO₂ 生産濃度の原因であると考えられる。2,3-Butanediol の生産濃度も他の基質と比べ多いのでこのことを裏付けている。この Glucose の場合の Pyruvate から 2,3-Butanediol への変換での NAD⁺の回復と対照的に Xylose の場合 Pyruvate から Acetate への変換で多くの NAD⁺回復を行なっているので Acetate 濃度が高いと考えられる。このような Xylose の代謝バランスのほうが水素生産に有利であるので、この検討をもっと行なうべきである。しかし Xylose は発酵速度が遅いという問題点がある。

Glycerol は高い水素生産性を示しなおかつ発酵速度も速いので水素生産に非常に期待できる物質であるといえる。

4.1.2 初発基質濃度の影響

バイアル瓶を用いて Glucose と Glycerol の初発濃度を変えた培養を行なった。その結果を Table 3 に示した。

Glucose の結果は濃度が 15 g/l 以上になると Lactate の濃度が高くなった。乳酸濃度が高くなることにより pH が低くなり菌の生育が止まるので消費しきれないグルコースが出てくると言える。Lactat 濃度は高くなったが水素や他の生産物濃度にはあまり変化が見られなかった。したがって水素生産を行なうには Glucose 濃度は 15 g/l 以下が適切であると考えられた。濃度が高くなると 2,3-BD

まで代謝されず Acetoin で止まってしまうものも表れてきているがこれは Lactat の生産が増えているのでそれに伴うバランスになっているのであろう。

Glycerol の結果も 15 g/l 以上で基質が消費しきれなくなっているので 15 g/l 以下の培養が適切であると考えられた。

4.1.3 Yest extract と Peptone 濃度の影響

バイアル瓶を用いて Yest extract と Peptone 濃度を変えた培養を行なった。その結果を Table 4 に示した。

Yest extract が 3 g/l 以上の場合水素を若干多く生産することがわかった。Peptone 3 g/l 以下では水素生産は若干少ないことがわかった。しかしこれらの結果はそれほど顕著ではなく、むしろ完全合成培地を用いれば乳酸の生成が低いので水素生産には完全合成培地が適していると考えられた。

4.1.4 Ni 濃度の影響

バイアル瓶を用いて Ni 濃度を変えた培養を行なった。その結果を Table 5 に示した。

ヒドロゲナーゼの活性を上げることを狙い実験を行なったのだが、Ni 濃度によって水素生産量、他の生産物量に変化はなかった。

4.1.5 Fe 濃度の影響

4.1.4 と同様にヒドロゲナーゼの活性を上げることを狙い実験を行なったのだが、変化はなかった。(Table 6)

4.1.6 Ti(III)濃度の影響

バイアル瓶を用いて Ti(III)濃度を変えた培養を行なった。その結果を Table 7 に示した。

Ti(III) citrate をもちいて酸化還元電位を大きく下げることによって水素生産にどのような影響が出るかを確認するために実験を行なったが効果はなかった。

4.2 連続水素生産

菌体充填床型リアクター (60 ml、Fig 1) を用いての連続水素生産を行なった。その結果を Fig 5 に示した。

希釈率を上げていくと共に水素生産速度も順調に増大していった。連続培養を行なうと回分培養では生産されなかった Formate が生産された。連続培養の条件は回分培養よりヒドロゲナーゼの活性が低下するのであろう。

常に生産物濃度はほぼ一定であったが希釈率が増大することによって若干 Lactate と Formate 濃度が増大し、Ethanol と 2,3-BD の濃度が減少することが観察された。希釈率を上げることによって代謝のバランスが Lactate 生成にシフトしたり、ヒドロゲナーゼの活性が低下することによってそのような現象が生じたのであろう。

希釈率 0.6 h^{-1} のとき 10 mmol/l/h の水素生産速度に達した。

4.3 メタン発酵

4.3.1 人工廃水を用いたメタン発酵汚泥の馴養

UASB リアクター (800 ml、Fig 2) で人工廃水を用いてメタン発酵汚泥の馴養を行なった。その結果を Fig 6 に示した。

馴養の初期で Lactate, 2,3-BD, Ethanol は速やかに分解されたが、Acetate と Propionate は蓄積する状況が起こった。しかし馴養を続けていくと馴養開始から約 90 日目で有機物がほぼメタン化された状態になった。有機物濃度の低下とともにメタン生成速度も増加した。馴養初期段階では *Methanosarcina*、*Methanosaeta* 等のメタン生成菌の活性が低かったが馴養を続けることによってこれらの活性が上がったと考えられる。

希釈率 0.5 D^{-1} で 2.5 mmol/l/h のメタン生成速度に達した。

4.3.2 *E.aerogenes* 培養廃水メタン発酵

4.3.1 で馴養したメタン発酵汚泥 UASB リアクター (800 ml、Fig 2) で 4.2 で水素生産した廃水を用いてメタン発酵を行なった。その結果を Fig 7 に示した。

希釈率を変化させて実験を行なったが希釈率 0.32 d^{-1} 以下ではほぼ完全に有機物をメタン化することが出来た。人工廃水から培養廃水に変えたことによって完全にメタン化できる速度が減少したのは培地組成が変わったことによると考えられる。Table 1 と Table 2 を比較すると培養廃水には人工廃水の 10 倍以上の SO_4^{2-} が含まれているためそのことにより人工廃水のときより硫酸還元菌が活発に活動してメタン生成を阻害したというようなことが考えられる。

希釈率 0.32 D^{-1} で 2 mmol/l/h のメタン生成速度に達した。

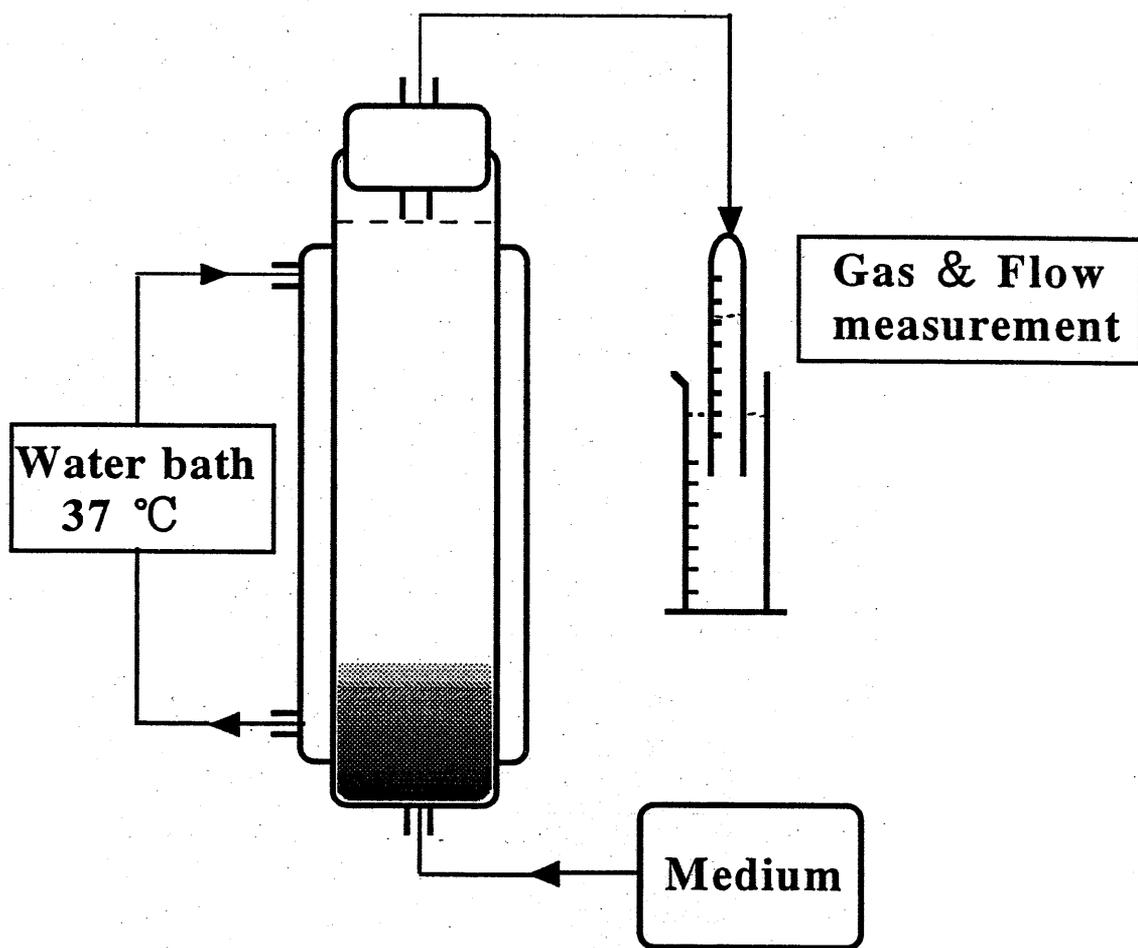


Fig 1 菌体充填床型リアクター (60 ml)

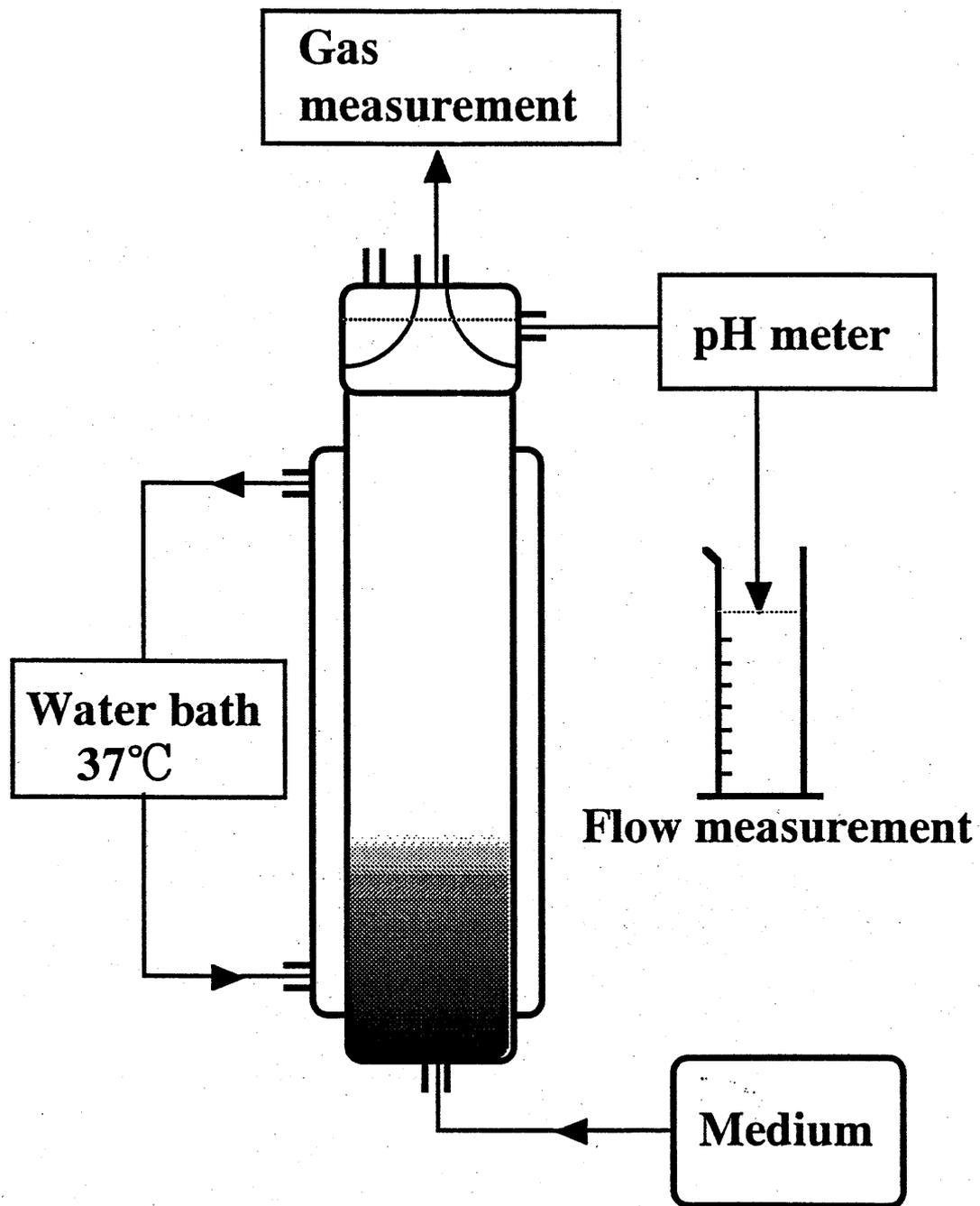


Fig 2 メタン発酵 UASB リアクター (800 ml)

Table 1 *Enterobacter* 液体培地 (g/l)

Yeast extract	5
Trypton	5
(NH ₄) ₂ SO ₄	1
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.12
Fe(NH ₄) ₂ SO ₄ · 6H ₂ O	0.039
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0.029
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.021
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.25
Vitamin sol.	10 ml
Trace element	10 ml
KH ₂ PO ₄	5.5
K ₂ HPO ₄	7
Glucose	10

● Vitamin sol. (g/l) 【×100】

Nicotinic acid	200
NiCl ₂	2
Na ₂ SeO ₃	17.2

● Trace element sol. (g/l) 【×100】

MnCl ₂ · 4H ₂ O	500
H ₃ BO ₃	100
AlK(SO ₄) · 12H ₂ O	10
CuCl ₂ · 2H ₂ O	1
Na ₂ EDTA	500

Table 2 メタン発酵汚泥馴養培地 (g/l)

KH ₂ PO ₄	0.696
K ₂ HPO ₄	0.454
NaCl	1.0
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.002
Vitamin sol.	10 ml
NaHCO ₃	10
Na ₂ SO ₄ · 9H ₂ O	0.3
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.82
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.25
Trace element sol.	6 ml
NH ₄ Cl	1.0
Ti(III)-citrate sol.	0.075 mM
Lactate	14 mM
Acetate	6 mM
Butanediol	30 mM
Ethanol	30 mM

● Vitamin sol. (mg/l) 【×100】

Biotin	2
Folic acid	2
Pyridoxine · HCl	10
Tiamine · HCl	5
Riboflavin	5
Nicotinic acid	5
DL-Calcium pantothenate	5
Lipoic acid	5
P-Aminobenzoic acid	5

● Trace element sol. (g/l) 【×167】

ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.10
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.03
H ₃ BO ₃	0.30
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.20
CuCl ₂ · 2H ₂ O	0.01
NiCl ₂ · 6H ₂ O	0.02
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.03

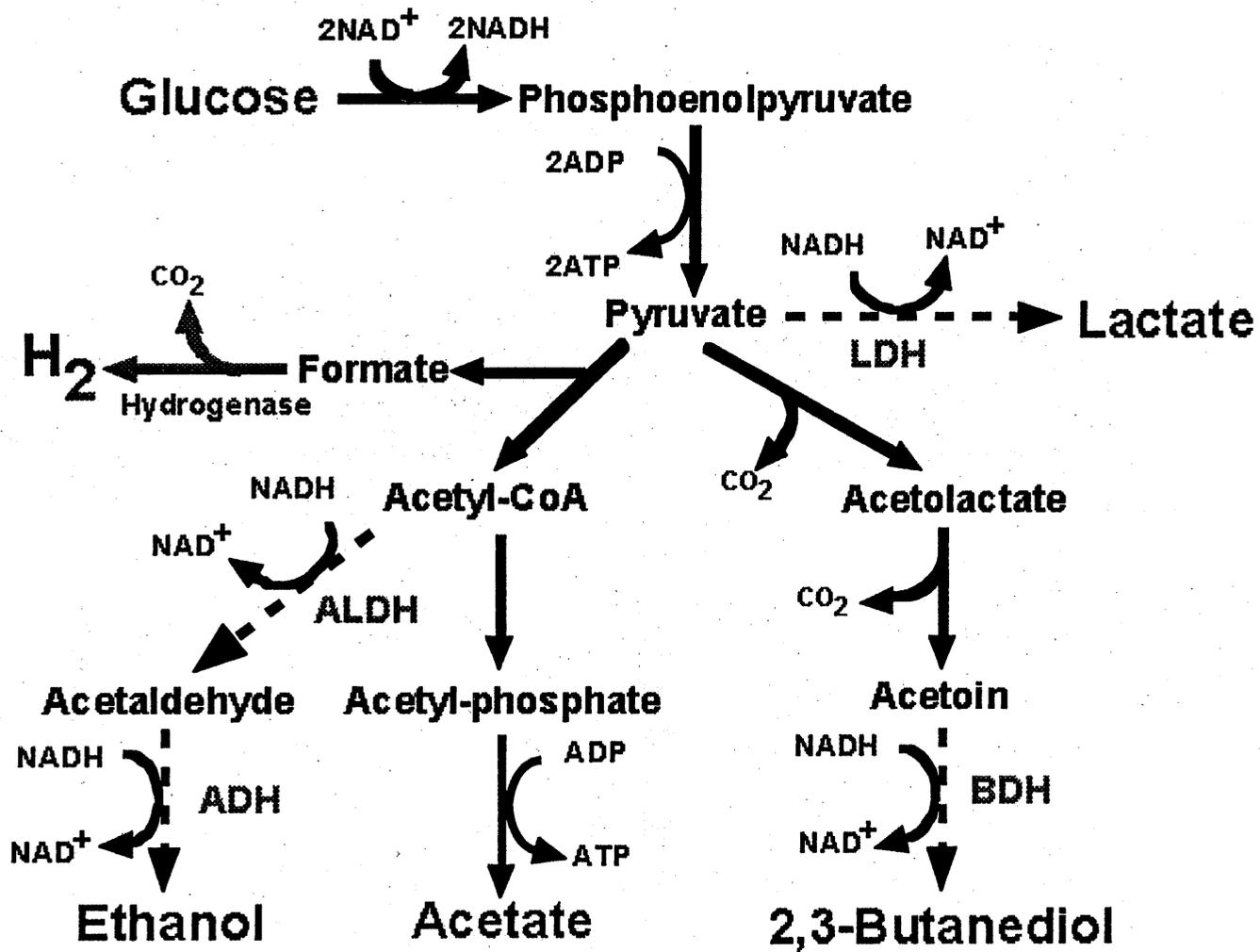
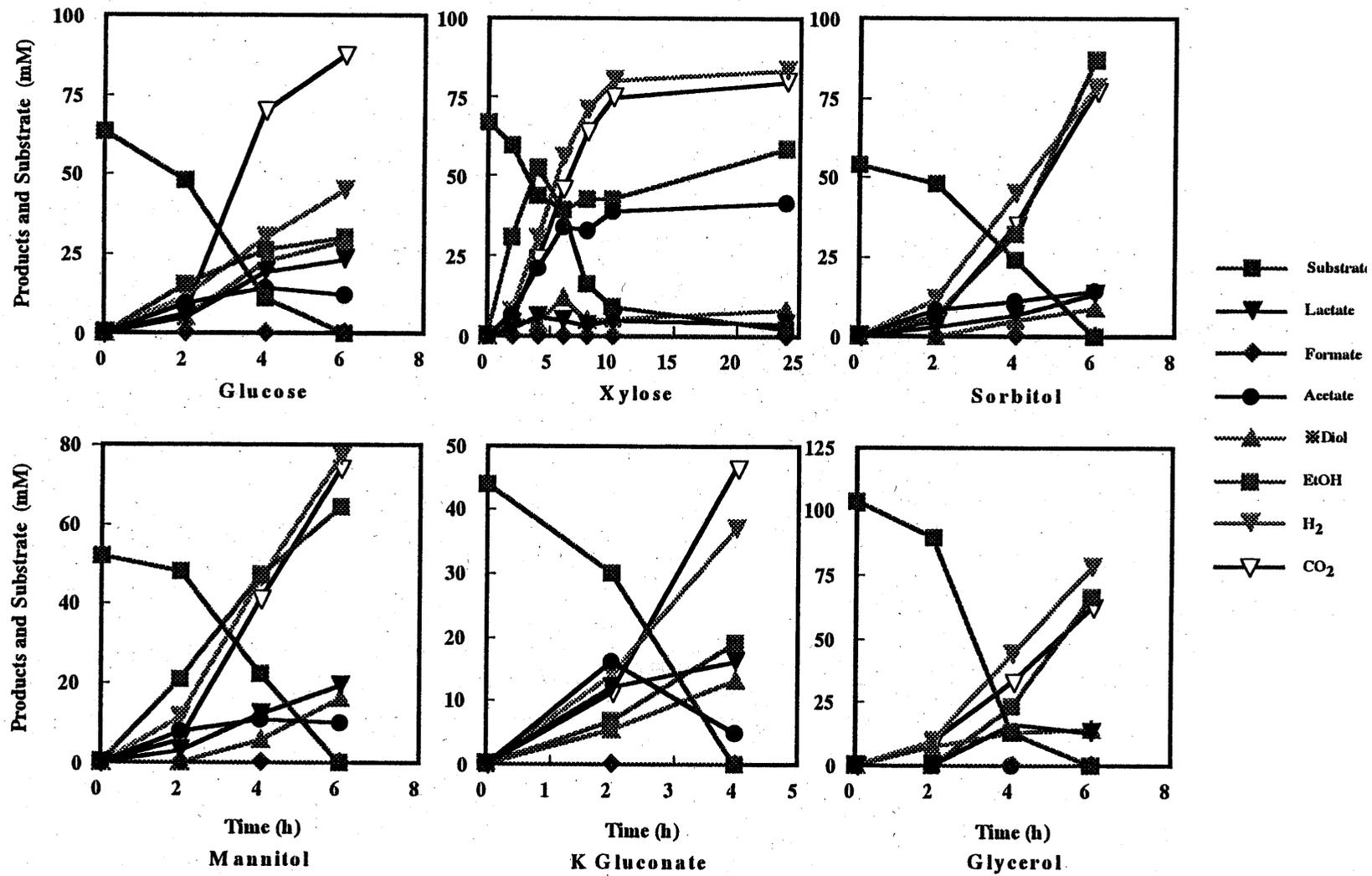


Fig 3 *Enterobacter aerogenes* の代謝経路



※ Glycerolを用いた時の培養の生産物のDiolは1,3-Propanediolでそれ以外の培養では2,3-Butanediolである。

Fig 4 様々な基質 (10 g/l) を用いた *E. aerogenes* 回分培養の生産物

Table 3 回分培養における初発基質濃度の影響 (12 h)

① Glucose

Substrate Concentration (g/l)	Products Concentration (mM)								
	H ₂	CO ₂	Lactate	Folmate	Acetate	Acetoin	2,3-Butanediol	Ethanol	Redundant Sustrate
5	26.4	27.2	14.9	0	13.3	0	7.8	16.1	0
10	33.7	62.2	27.8	0	9.2	0	31.2	29	0
15	47.1	42.6	56.5	0	9.2	1.27	29.3	34.7	0
20	44.7	118.2	84.9	0	8.55	1.7	41.8	37.7	12.5
25	45.0	120.7	77.4	0	8.33	2.09	37.1	36.4	41.1
30	44.7	114.2	79.5	0	8.36	1.93	37.5	38	76.8

① Glycerol

Substrate Concentration (g/l)	Products Concentration (mM)								
	H ₂	CO ₂	Lactate	Folmate	Acetate	Acetoin	1,3-Propanediol	Ethanol	Redundant Sustrate
5	38.2	29.0	7.14	4.63	6.75	0	11.37	43.8	0
10	64.7	62.2	17.7	7.85	3.05	0	14.5	73.5	0
15	84.7	92.3	22.8	0	1.83	0	18.9	101	9.7
20	81.3	89.2	37	0	1.36	0	36.6	89.8	104
25	74.2	81.0	38.6	0	0	0	41.1	76.9	158

Table 7 回分培養におけるTi(III)濃度の影響 (12 h)

① 通常の培地							
Products	H ₂	CO ₂	Lactate	Folmate	Acetate	2,3-Butanediol	Ethanol
Concentration (mM)	46.7	59.0	15.4	0.0	8.9	27.7	32.0
② Ti(III) 0.4 mM 添加した培地							
Products	H ₂	CO ₂	Lactate	Folmate	Acetate	2,3-Butanediol	Ethanol
Concentration (mM)	44.4	71.0	14.8	0.0	10.5	24.9	27.9
③ Ti(III) 2 mM 添加した培地							
Products	H ₂	CO ₂	Lactate	Folmate	Acetate	2,3-Butanediol	Ethanol
Concentration (mM)	42.5	69.6	13.3	0.0	10.4	26.3	32.7
④ Ti(III) 4 mM 添加した培地							
Products	H ₂	CO ₂	Lactate	Folmate	Acetate	2,3-Butanediol	Ethanol
Concentration (mM)	41.7	70.3	14.3	0.0	0.0	24.9	32.4

Table 5 回分培養におけるNi濃度の影響 (12 h)

① Yest extractとPeptoneを抜いた培地							
Products	H ₂	CO ₂	Lactate	Folmate	Acetate	2,3-Butanediol	Ethanol
Concentration (mM)	40.1	55.6	8.7	0.0	15.0	22.0	36.2

② Yest extractとPeptoneとNiを抜いた培地							
Products	H ₂	CO ₂	Lactate	Folmate	Acetate	2,3-Butanediol	Ethanol
Concentration (mM)	39.4	56.8	16.5	0.0	9.9	18.5	30.0

③ Yest extractとPeptoneを抜き通常の培地成分の10倍量のNiを加えた培地							
Products	H ₂	CO ₂	Lactate	Folmate	Acetate	2,3-Butanediol	Ethanol
Concentration (mM)	38.2	49.9	11.6	0.0	11.5	22.0	38.2

④ Yest extractとPeptoneを抜き通常の培地成分の100倍量のNiを加えた培地							
Products	H ₂	CO ₂	Lactate	Folmate	Acetate	2,3-Butanediol	Ethanol
Concentration (mM)	39.5	53.2	10.2	0.0	13.0	23.0	37.0

Table 6 回分培養におけるFe濃度の影響 (12 h)

① 通常の培地成分より $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を抜いた培地

Products	H ₂	CO ₂	Lactate	Folmate	Acetate	2,3-Butanediol	Ethanol
Concentration (mM)	38.2	63.4	14.1	0.0	7.0	21.6	26.8

② 通常の培地成分より $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を抜き FeCl_2 を10 mg/l加えた培地

Products	H ₂	CO ₂	Lactate	Folmate	Acetate	2,3-Butanediol	Ethanol
Concentration (mM)	41.6	69.0	16.4	0.0	8.7	24.4	29.9

③ 通常の培地成分より $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を抜き FeCl_2 を100 mg/l加えた培地

Products	H ₂	CO ₂	Lactate	Folmate	Acetate	2,3-Butanediol	Ethanol
Concentration (mM)	41.9	73.9	16.3	0.0	8.0	24.8	28.0

④ 通常の培地成分より $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を抜き FeCl_2 を500 mg/l加えた培地

Products	H ₂	CO ₂	Lactate	Folmate	Acetate	2,3-Butanediol	Ethanol
Concentration (mM)	42.3	78.7	13.5	0.0	7.3	24.9	28.4

④ 通常の培地成分より $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を抜き FeCl_2 を1000 mg/l加えた培地

Products	H ₂	CO ₂	Lactate	Folmate	Acetate	2,3-Butanediol	Ethanol
Concentration (mM)	38.0	81.8	13.0	0.0	5.4	34.8	33.4

Table 7 回分培養におけるTi(III)濃度の影響 (12 h)

① 通常の培地							
Products	H ₂	CO ₂	Lactate	Folmate	Acetate	2,3-Butanediol	Ethanol
Concentration (mM)	46.7	59.0	15.4	0.0	8.9	27.7	32.0
② Ti(III) 0.4 mM 添加した培地							
Products	H ₂	CO ₂	Lactate	Folmate	Acetate	2,3-Butanediol	Ethanol
Concentration (mM)	44.4	71.0	14.8	0.0	10.5	24.9	27.9
③ Ti(III) 2 mM 添加した培地							
Products	H ₂	CO ₂	Lactate	Folmate	Acetate	2,3-Butanediol	Ethanol
Concentration (mM)	42.5	69.6	13.3	0.0	10.4	26.3	32.7
④ Ti(III) 4 mM 添加した培地							
Products	H ₂	CO ₂	Lactate	Folmate	Acetate	2,3-Butanediol	Ethanol
Concentration (mM)	41.7	70.3	14.3	0.0	0.0	24.9	32.4

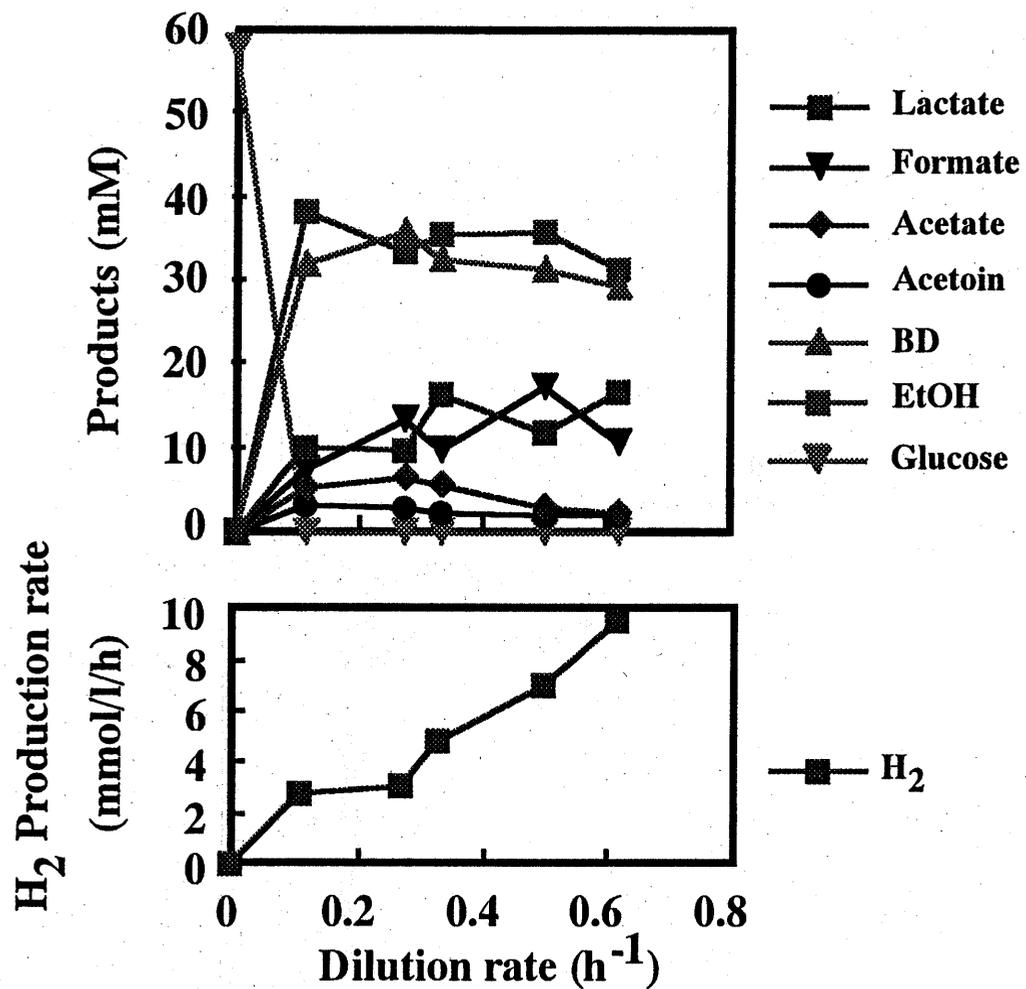


Fig 5 *Enterobacter aerogenes* 連続培養生産物

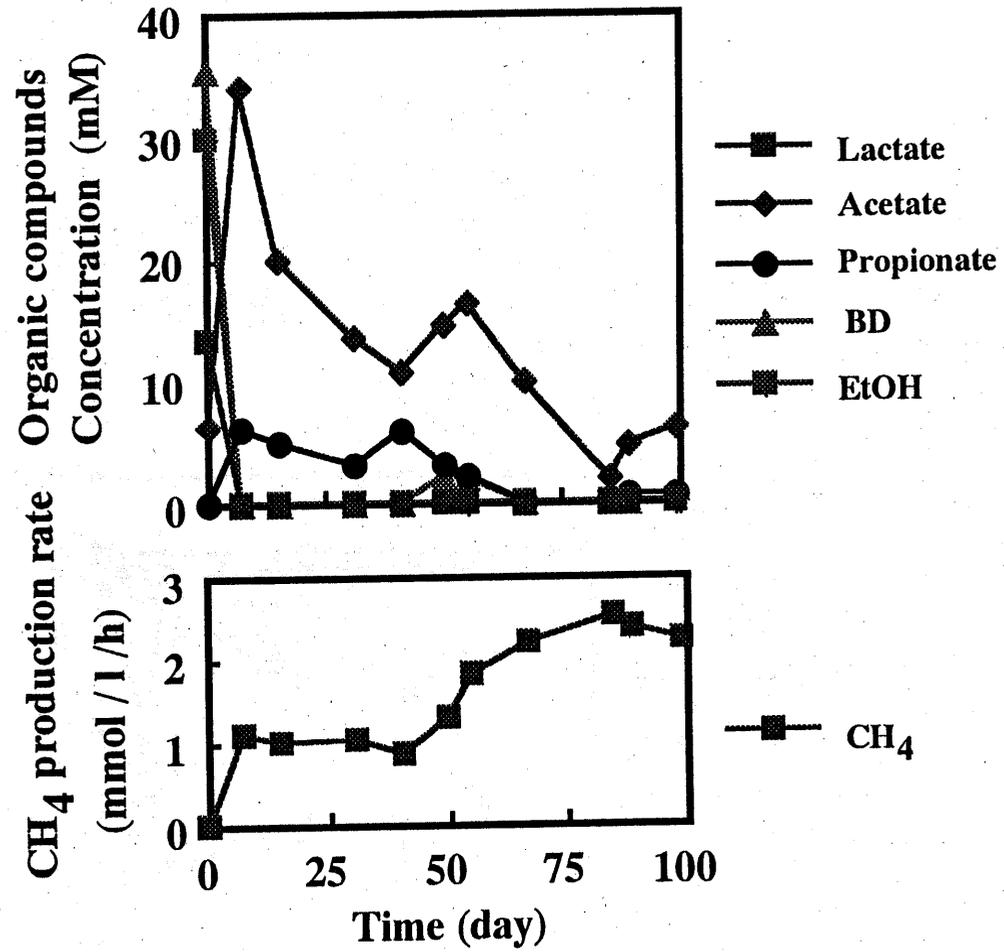


Fig 6 人工廃水を用いたメタン発酵汚泥の馴養

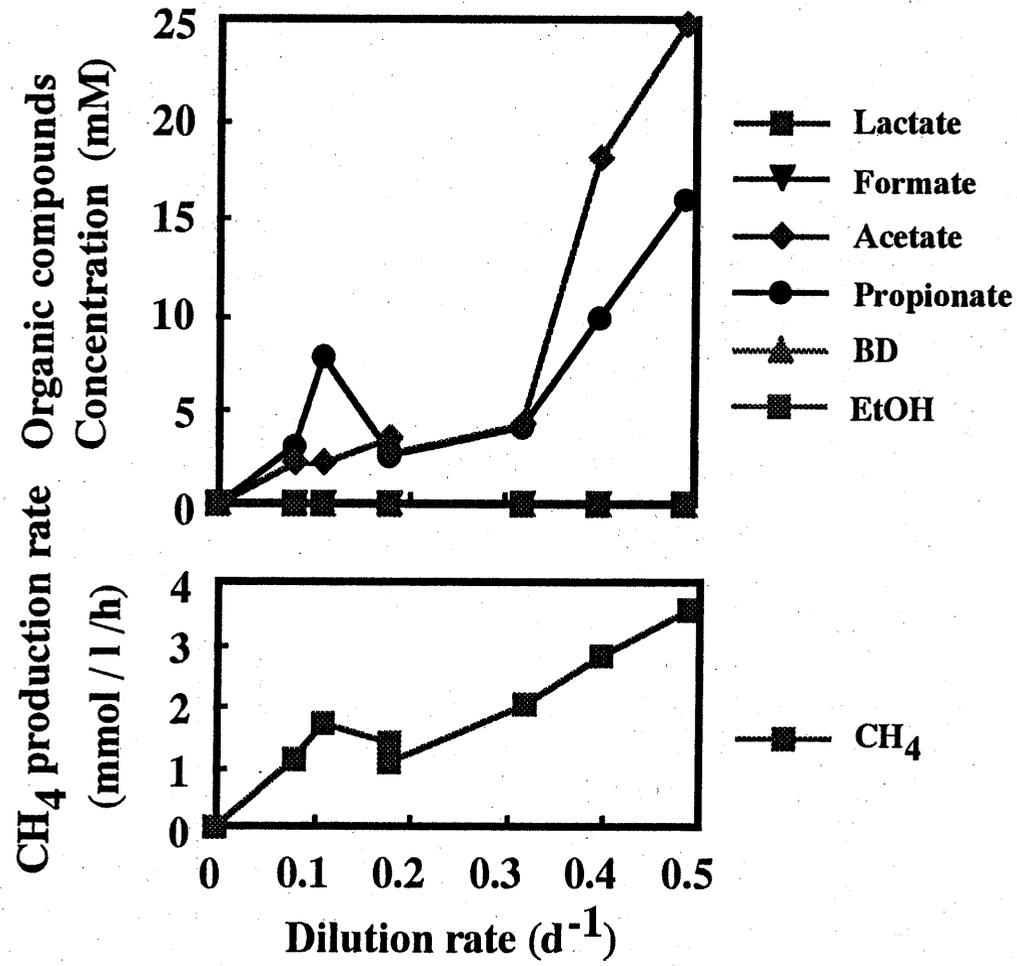


Fig 7 Enterobacter 培養廃液のメタン発酵

5 総括

本研究は水素高生産を目指した基質、培養条件等の検討を行ないさらに連続水素生産後の培養排水をメタン発酵を実際に行ないハイブリッド型リアクターシステムの開発に関する検討を行なった。

基質の検討ではバイオマスに多く含まれる Xylose、Glycerol で高濃度の水素生産が確認できたので高速連続水素生産の系でも検討を行なって行くべきである課題が出てきた。

今回もっとも単純なモデルといえるグルコースをもちいた高速水素生産を行ないその培養廃液後のメタン発酵では廃液をほぼ完全にメタンできたので水素発酵リアクターとの体積比を希釈率より検討すると水素発酵リアクターの 45 倍の体積の UASB リアクターが必要であるという値が算出することができた。文献値により本 UASB メタン発酵リアクターの負荷速度は高性能のリアクターのものであるということが確認できたので算出したリアクター比は妥当である。

今後、水素、メタン発酵とも発酵速度を上げるということ、バイオマスからの水素生産を行なうこと、実際に燃料電池に接続した総合的なリアクターシステムの開発を進めることを行なっていかなければならない。

6 謝辞

本研究を行なうにあたり、御指導いただきました西尾尚道先生、柿菌俊英先生、中島田豊先生ならびに数々の有益な御助言を賜りました代謝変換制御学研究室の先輩方、本研究室で共に助け合い、がんばった4年生の皆様に感謝の意を表します。

7 参考文献

- 1) Acetate as a carbon source for hydrogen production by photosynthetic bacteria
Maria J. Barbosa, Jorge M.S. Rocha, Johannes Tramper, Rene H. Wijffels
Journal of Biotechnology 85 (2001)
- 2) Hydrogen production with high yield and high evolution rate by self-flocculated cells of *Enterobacter aerogenes* in a packed-bed reactor
M. A. Rachman, Y. Nakashimada, T. Kakizono, N. Nishio
Appl Microbiol Biotechnol 49 (1998)
- 3) Hydrogen gas production from formate and glucose by different members of the *Enterobacteriaceae*
P. De Vos, P. Stevens, J. De Ley
Biotechnol letters Vol 5 No 2 (1983)
- 4) Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*
H. Biebl, A.-P. Zeng, K. Menzel, W.-D. Deckwer
Appl Microbiol Biotechnol 50 (1998)
- 5) A membrane-bound NAD(P)⁺-reducing hydrogenase provides reduced pyridine nucleotides during citrate fermentation by *Klebsiella pneumoniae*
J. Steuber, W. Krebs, M. Bott, P. Dimroth
Journal of Bacteriology, Jan (1999)
- 6) *Enterobacter aerogenes* の発酵水素発生と利用基質について
谷生重晴、若尾法昭
醗酵工学会誌 第 67 卷 第 1 号 (1989)
- 7) 廃棄物のバイオコンバージョン
矢田美恵子、川口博子、佐々木健
地人書館 (1996)
- 8) 細見亮郎 卒業論文 (1999)
- 9) 前田知香 卒業論文 (2000)
- 10) 難波真一郎 修士論文 (1998)
- 11) 古谷能紀 修士論文 (1996)

2. ディスポーザー処理した生ゴミの

水素・メタン発酵

目次

1.	緒言	4
2.	方法	7
2.1	使用汚泥	7
2.2	試料	7
2.3	回分培養	9
2.3.1	生ゴミ排水負荷の検討	9
2.3.2	使用汚泥の検討	9
2.3.3	pH の影響	9
2.4	単相式水素・メタン発酵	10
2.5	二相式水素・メタン発酵	10
2.5.1	攪拌型リアクターによる水素発酵	10
2.5.2	固定床リアクターによるメタン発酵	10
2.6	分析方法	13
2.6.1	ガス生産量測定	13
2.6.2	生成有機酸の定量	13
2.6.3	TOC (Total Organic Carbon)	14
2.6.4	MLSS (Mixed Liquor Suspended Solids)	14
2.7	消化汚泥中の微生物群集解析	14
2.7.1	DNA 抽出	14
2.7.2	16S ribosomal DNA 断片の PCR 増幅	14
2.7.3	変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)	16
3.	結果及び考察	17
3.1	生ゴミ排水の回分培養	17
3.1.1	生ゴミ排水負荷の検討	17
3.1.2	使用汚泥及び培養温度	17
3.1.3	pH の影響	18
3.2	単相式水素・メタン発酵	24
3.3	二相式水素・メタン発酵	26
3.3.1	攪拌型リアクターによる半連続水素発酵	26
3.3.2	固定床型リアクターによる連続メタン発酵	30
3.3.3	二相式生ゴミ処理の有用性	30

3.4	消化汚泥中の微生物群集解析	34
4.	総括	36
5.	謝辞	37
6.	参考文献	38

1. 緒言

我が国における廃棄物の排出状況をみると、一般家庭などから排出される一般廃棄物（ごみ及びし尿）の排出量は、平成 12 年度で 5236 万トンとなっており、一人当たりのごみ排出量は 1132 グラムとなっている。排出量の推移をみてみると、バブル期に向けて増大し、その後は横ばい傾向であるものの、高水準での推移を続けている。

このような廃棄物の現状をうけて、循環型社会形成に向けた動きがより活発になってきている。国・地方公共団体・事業者・国民が一体となって、廃棄物の発生抑制や再利用、適性処分などに取り組むもうということだ。すでに循環型社会形成推進基本法や食品リサイクル法が施行され、全国の自治体や処理業者もさまざまな処理システムを開発、導入している。

可燃ゴミの 16%を占める生ゴミについても、その有効利用についてさまざまな取り組みが行われている。以前から行われてきた農業用の堆肥としての生ゴミコンポスト化や、家庭でもできる EM 菌を用いた処理、加熱乾燥方式の生ゴミ減量化処理などが知られている。また最近ではみみずを使ってコンポスト化を行なおうという試みもなされている。

このような生ゴミ処理の一つとして流しに取り付けた生ゴミ粉碎機、ディスクローターにより粉碎した生ゴミをそのまま排水として流し、マンション単位などでまとめて処理を行う方法が注目されている。この方法だと生ゴミを直接触ったりにおいをきにしたりしなくてすみ、害虫の発生も防ぐことができる。さらに得られる生ゴミ排水は有機物が豊富であり、これを嫌気消化することにより生ゴミの処理及び水素、メタンなどのエネルギー回収が期待できる。そこで本研究ではディスクローター処理をした生ゴミ排水の嫌気消化について検討を行った。

今回我々が処理法として選択した嫌気消化処理は、活性汚泥法等の好気性の処理と比較して以下の特徴が挙げられる。

- 余剰汚泥の発生量が好気性処理に比べて 1/5~1/10 程度と少ない
- 酸素の供給が不要なため稼働消費動力が小さい
- 副産物としてエネルギー資源、化学原料物質などの有用物質を生産しうる

嫌気消化処理はこれらの特徴を持ちながら、一方でいくつかの欠点も持ち合わせている。まず一つ目に菌体増殖速度が遅いという点が挙げられる。糖やタンパク質などの高分子有機物の分解において、好気性微生物では一

種の微生物が水や二酸化炭素まで低分子化するのに対し、嫌気性微生物では酸生成細菌、酢酸生成細菌、そしてメタン生成細菌の、少なくとも3種類の嫌気性微生物群が共存して生態系を維持している。この微生物群のうち有機高分子の無機化を行う最終段階に位置するメタン生成細菌は増殖が遅く、全体の律速段階となっている。このため、嫌気消化処理を行う際メタン生成細菌の至適増殖条件を選択する必要がある。

また二つ目として、前項と関係のあることでもあるが、メタン生成細菌は pH、温度等の環境条件の変化に比較的敏感であることが挙げられ、嫌気性処理を行うにあたってこれらの条件が重要な管理項目となっている。嫌気上向流式汚泥床(upflow anaerobic sludge blanket :UASB)リアクターといった高負荷型の嫌気性処理のほとんどは 35~37°C付近に至適温度を有している中温性メタン生成細菌を利用しており、メタン生成細菌の活性を最大限に利用するために通常この至適温度付近での処理が行われている。しかし排水の処理温度に応じて、至適温度が 20°C付近の低温性メタン生成細菌や 55°C付近の高温性メタン生成細菌が用いられることがある。ただしメタン生成細菌の活性は温度の変化に比例するため、低温では低負荷の排水、高温では高負荷の排水の処理に用いられる。

またメタン生成細菌は pH に極めて敏感であるため、pH を常に 6.0~8.5 程度に維持する必要がある。メタン生成速度よりも負荷速度が速い過負荷状態においては、低級脂肪酸の蓄積により pH が低下するため、NaOH などのアルカリ剤を添加して pH の維持を行う必要がある。

我々は生ゴミの嫌気消化を検討する一方で、新たな側面に着目した。それは一連の嫌気消化過程においてどのような微生物相の変化が起きているのか、また各段階にどのような微生物種が関与しているのか、ということである。微生物の多様性を知ることによりさらなる嫌気消化の挙動を把握できると考えた。

しかし生ゴミに汚泥といった混合系から微生物を単離するのは非常に困難であり、さらに嫌気下で取り扱わなければならないという悪条件がつきまとう。ところが分子生物学的手法にてこれらは解決された。つまり培養による単離・同定ではなく DNA からアプローチする方法である。近年こういった分子生物学的手法による混合系の微生物多様性が明らかにされてきている。そのうち最も頻用されているのが変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE: Denaturant Gradient Gel Electrophoresis)である。

DGGE は元々野生型と変異型を分離するために開発された方法で、塩基配列のわずかな違いでこれらを分離することができる。変性剤の濃度勾配をかけたゲルで電気泳動を行うと変性剤による核酸サンプルの解離が起こるが、

塩基配列によって解離する変性剤の濃度が異なる。これは泳動時バンドの泳動距離に反映され、16S ribosomal DNA といった微生物種の分類の指標となりうる核酸サンプルを用いると、現れたバンドの数だけ微生物種が存在すると考えることができる。このような DGGE 法により、培養して単離していた従来の方法とは比べものにならないほど簡単に混合系の微生物の多様性を知ることができる。

本研究ではまず、生ゴミ排水の嫌気消化処理条件を検討した。その条件下で生ゴミ排水の嫌気消化を行い、処理の高速化を図った。あわせてこの過程における微生物相の変化を DGGE 法により検討した。

2. 方法

2.1 使用汚泥

本研究で用いた嫌気消化処理用の汚泥は、広島県内の下水処理場から採取した、余剰汚泥の高温メタン発酵汚泥(50°C)、及び東広島市内の食品製造工場から採取した消化汚泥(37°C)を使用した。また連続メタン発酵用の汚泥として、パン生地で馴養されたメタン発酵汚泥(38°C)を用いた。

2.2 試料

本研究で用いた生ゴミ排水は、市販ディスポーザーにより粉砕して調製した。Table 1 に示す標準生ゴミ 250 gを、流し台に取り付けたディスポーザー(Fig. 1)に投入後、8 l/min で水を流しながら粉砕し、排水を容器に回収した。

Table 1. 標準生ゴミ組成

成分材料		湿潤重比(%)	重量(g)
野菜類	ニンジン	18	45
	キャベツ	18	45
果実類	バナナの皮	10	25
	リンゴの皮	10	25
	グレープフルーツの皮	10	25
その他	鳥骨	8	20
	鯨の干物骨付き	10	25
	鶏卵の殻	2	5
	米飯	10	25
	茶殻	4	10
合計		100	250

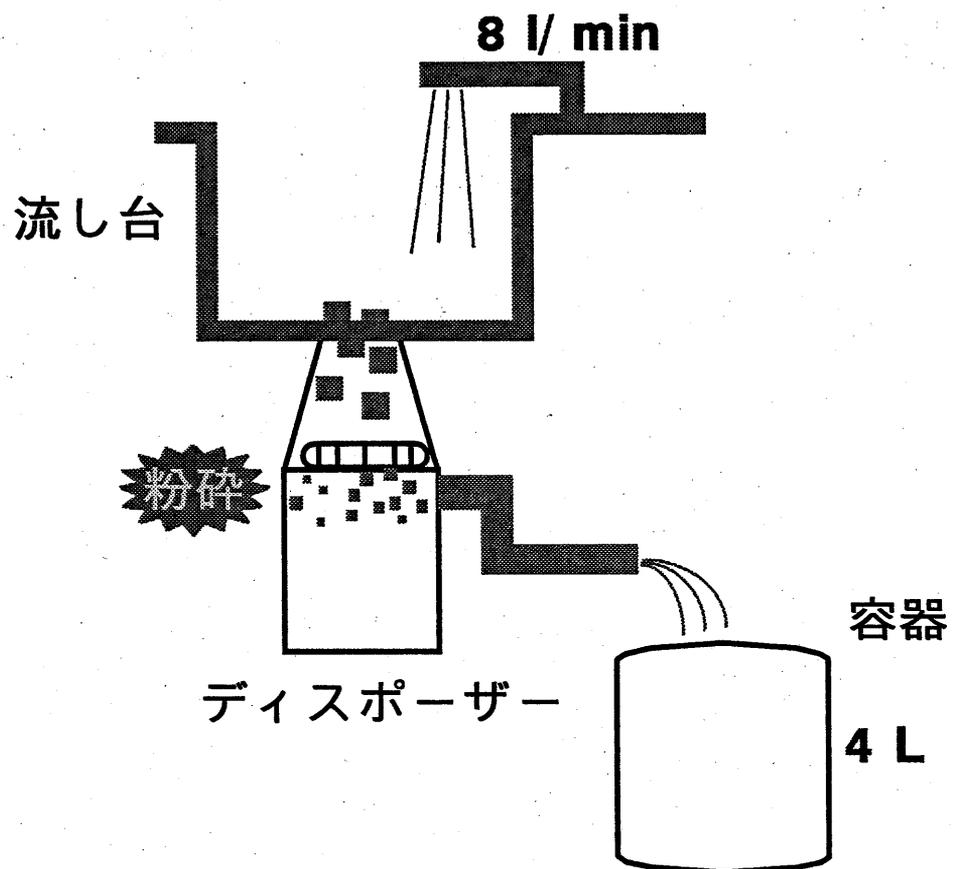


Fig.1 ディスポーザー模式図

2.3 回分培養

生ゴミ排水の嫌気消化処理条件を検討するため、回分培養を行なった。750 ml 容量のバイアル瓶にて生ゴミ排水及び汚泥を全量 350 ml になるよう混合し、pH を一定に調整したのち上部を N_2 ガスで置換した。培養は完全嫌気、暗条件下で静置にて行い、サンプリング毎に pH、ガス生成、有機酸生成、MLSS、全有機炭素濃度(TOC)などを測定し、pH を初期値に再調整した。

2.3.1 生ゴミ排水負荷の検討

調製した生ゴミ排水を嫌気消化処理するにあたり、処理に適した生ゴミ排水濃度を検討した。調製した生ゴミ排水を 2 倍、4 倍、8 倍に希釈したもの及び希釈していない排水原水と、余剰汚泥の高温メタン発酵汚泥(50°C)及び消化汚泥(37°C)を用いて上記の方法で培養を行なった。汚泥濃度は 30%(v/v) とし、pH 7.0 に調製した。

2.3.2 使用汚泥の検討

生ゴミ排水の嫌気消化処理において、より多くの H_2 生成、MLSS 減少を得るため、使用汚泥の種類及び混合濃度を検討した。汚泥は高温メタン発酵汚泥(50°C)、中温消化汚泥(37°C)の二種類を用い、それぞれ汚泥濃度を 0%、0.1%、1%、10%、30%として pH7.0 で上記同様培養を行なった。

2.3.3 pH の影響

高温メタン発酵汚泥(50°C)、中温消化汚泥(37°C)において、至適 pH の検討を行なった。高温メタン発酵汚泥 10%(v/v)、中温消化汚泥 1%(v/v)において pH 5.0、7.0、9.0 でそれぞれ上記同様培養を行なった。

2.4 単相水素-メタン発酵

Fig. 2 に示す攪拌型リアクターを用いて、生ゴミ排水の回分培養を行なった。高温メタン発酵汚泥(50°C)を10%(v/v)、生ゴミ原排水を2 lになるよう混合し、pH 7.0 に調整後、上部をN₂で置換した。PH 6.8~7.4 で制御しながら培養を続けた。

2.5 二相式水素・メタン発酵

生ゴミ排水処理をより高速化するため、加水分解段階とメタン生成段階をわけて別々に処理する、二相式水素・メタン発酵を試みた。

2.5.1 攪拌型リアクターによる水素発酵

一相目は攪拌型リアクターを用いた半連続培養を行い、生ゴミ固形分の可溶化及び水素回収を行なった。前項と同じ2.8 l容量の攪拌型リアクター(Fig. 2)に高温メタン発酵汚泥(50°C)を10%(v/v)、生ゴミ原排水を2 lになるよう調製し、pH 7.0 に調整して上部をN₂で置換した。pH 6.8~pH 7.3 で制御し、サンプリングの都度、上部をN₂で置換し、各種測定を行なった。4 日おきに培養液を半量引き抜き、新たな生ゴミ排水を添加して培養を続けた。引き抜き間隔を3 日おき、2 日おきと徐々に短くし、生ゴミ処理の高速化を図った。

2.5.2 固定床型リアクターによるメタン発酵

前項で行なった攪拌型リアクターによる水素発酵で得られた処理水をさらにメタンへ変換させるため、固定床型リアクターを用いてメタン発酵を行なった(Fig. 3)。1 l 容量の筒型リアクターに、担体としてポリプロピレン-セラミックス混成担体を詰め、パン生地馴養メタン発酵汚泥(38°C)を充填した。前項で行なった水素発酵の処理水を適宜希釈したものを、pH 7.0 に調整して基質とした。リアクター上部より処理水を回収し、各種測定を行なった。徐々に基質の負荷及び流入速度を上げて、処理の高速化を図った。

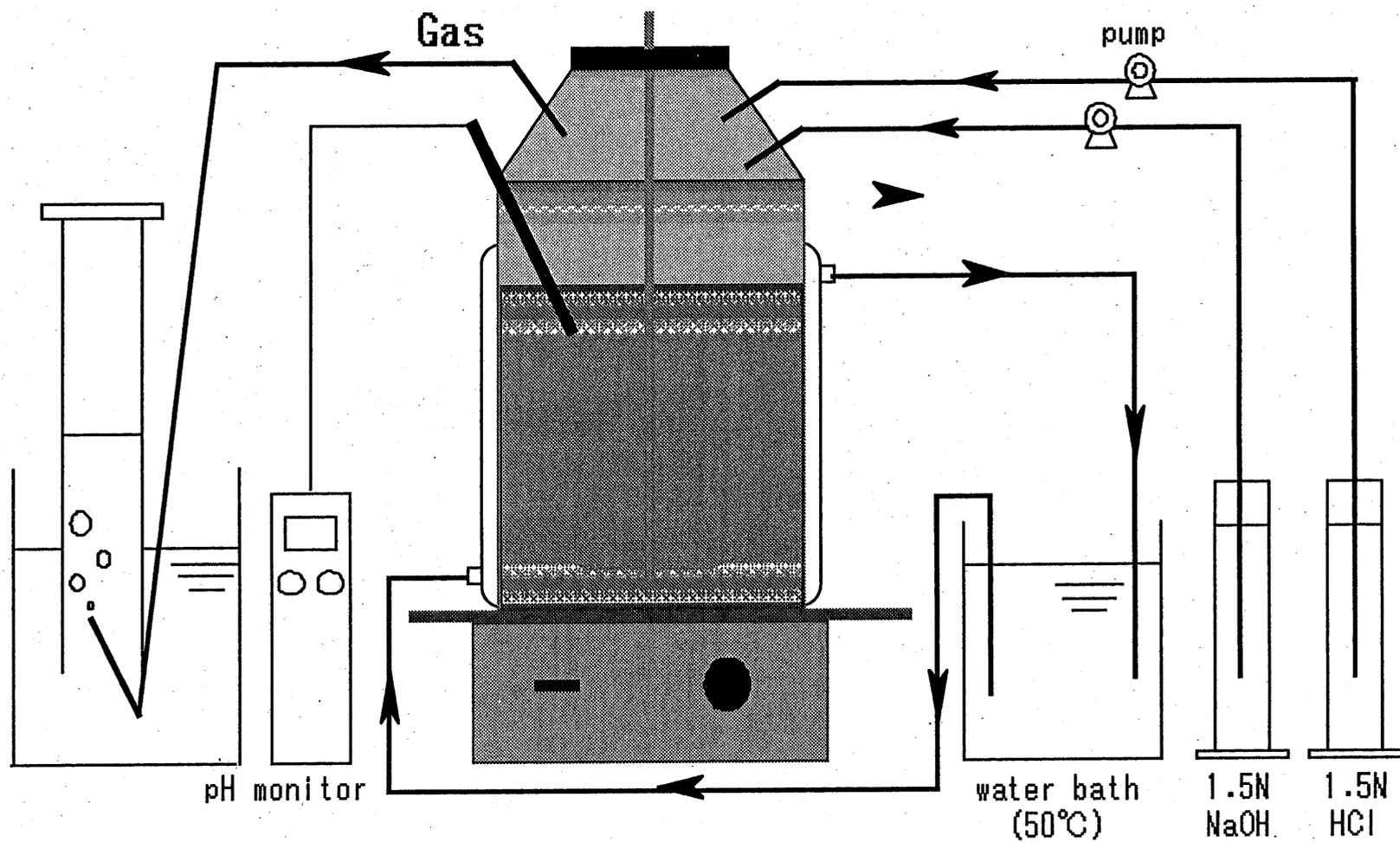


Fig.2 攪拌型リアクター模式図

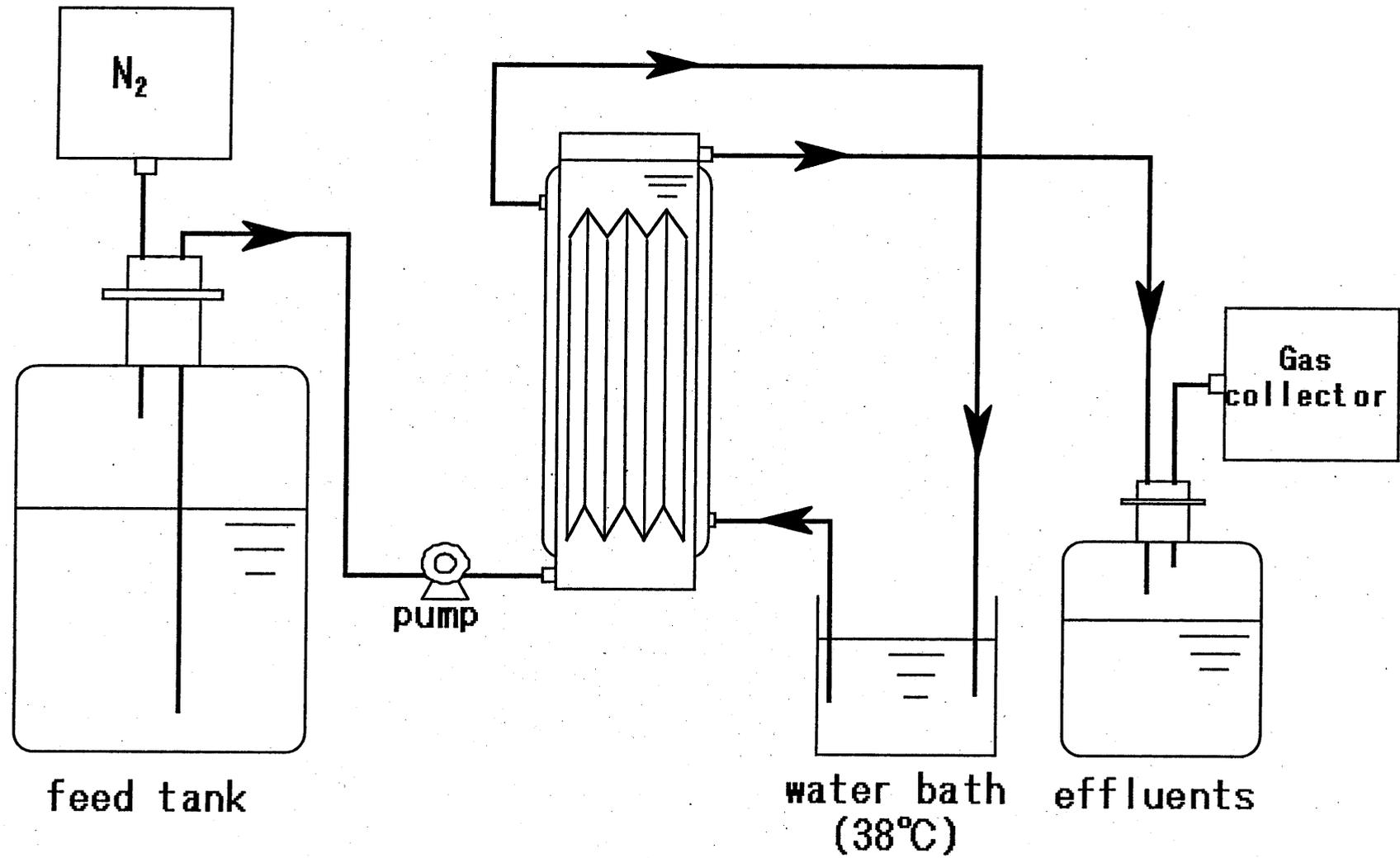


Fig.3 固定床型リアクター模式図

2.6 分析方法

2.6.1 ガス生産量測定

生成したガス組成はガスクロマトグラフィー(GC-8A, Shimadzu; TCD: Thermal Conductivity Detector)で分析した。ガスクロマトグラフィー分析条件は以下のとおりである。

Column: Stainless steel column
Column packing material: Activated carbon
Carrier gas: Argon gas
Current: 60mA
Column temperature: 110°C
Injection/ Detector temperature: 140°C

生成ガス量は水上置換法により求めた。

2.6.2 有機酸の定量

有機酸の定量には高速液体クロマトグラフィー(HPLC: High Performance Liquid Chromatography; JASCO Gulliver series UV-970 & PU-980, JASCO)を用いた。

2.6.3 TOC (Total Organic carbon)

TOC アナライザー(TOC-5000, Shimadzu)を用いて測定した。分析条件を以下に示す。

Carrier gas: O₂ gas
Flow rate: 150ml/ min
Combustion temperature: 680°C

2.6.4 MLSS (Mixed liquor Suspended Solids)

サンプリングした攪拌培養液 10 ml 遠心管に採取し、3000 rpm で 10 分間遠心後、上清を除去し、80 °Cの乾熱器で 2 日間乾燥後、秤量した。

2.7 消化汚泥中の微生物群集解析

2.7.1 DNA 抽出

サンプリングした培養液から Fast DNA SPIN kit [for soil](BIO 101)を用いて DNA を抽出した。0.8 %アガロースゲル(L03; TAKARA)にて電気泳動を行い(100V, 40min)、エチブロ(ethidium bromide)染色後(15min)、紫外線照射により、抽出 DNA を確認した。

2.7.2 16S ribosomal DNA 断片の PCR 増幅

抽出した DNA を鋳型として、真正細菌に特異的なプライマーペア、GM5F-GCclamp-(forward primer)、DS907R(reverse primer)(Table 2)を用いて PCR 増幅を行なった。PCR 条件を以下に示す。

Table 2. PCR 増幅に用いた各プライマーの塩基配列

Primer	Sequence	<i>E. coli</i> position
GM5F-GCclamp-	5'-GCclamp-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'	341-357
DS907R	5'-CCCCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3'	907-928
GC-clamp	5'-CGCCCGCCGCGCGGGCGGGGCGGGG CGGGGGCACGGGGGG-3'	

<PCR 条件>

Polymerase: KOD-plus- (TOYOBO)

PCR 機器: Perkin-Elmer GeneAmp PCR2400 system

反応液組成:

Components	Volume(μ l)	Final concn.
10 \times PCR buffer for KOD-plus-	5	1 \times
2mM dNTPs	5	0.2mM each
25mM MgSO ₄	2	1mM
Forward primer (10pmol/ μ l)	1	0.2 μ M
Reverse primer (10pmol/ μ l)	1	0.2 μ M
Template DNA (20-40ng)	1	
KOD-plus- DNA polymerase	1	1u
Distilled water	34	
Total	50	

PCR 反応条件:

94 $^{\circ}$ C	2min	
94 $^{\circ}$ C	30sec	35cycles
59 $^{\circ}$ C	20sec	
68 $^{\circ}$ C	30sec	
68 $^{\circ}$ C	5min	

PCR 産物は前項同様 0.8%アガロースゲルで電気泳動後、エチプロ染色して紫外線照射により増幅バンドを確認した。

2.7.3 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)

微生物相の変化を見るため、PCR 増幅した 16S rDNA 断片を用いて変性剤の濃度勾配をかけたアクリルアミドゲルでの電気泳動を行なった(DGGE; Denaturing gradient gel electrophoresis)。ゲル調整方法及び泳動条件は以下に示すとおりである。

機器： Dcode System (BIO RAD)

ゲル調整：0%及び 100%変性剤ゲルを調製後、これらを任意の割合で混合して 20%及び 70%濃度の変性剤アクリルアミドゲルを調製した。

0%変性剤アクリルアミドゲル*	
40% Acrylamide/ Bis	15ml
50×TAE buffer	2ml
Distilled water	+ α
	100ml
100%変性剤アクリルアミドゲル*	
40% Acrylamide/ Bis	15ml
Deionized formamide	40ml
Urea	42g
50×TAE buffer	2ml
Distilled water	+ α
	100ml

*フィルター濾過したのち、脱気して使用

泳動条件：1×TAE buffer、60°C、130V で 4 時間泳動した。Syber Green で染色後、紫外線照射により泳動バンドを確認した。

3. 結果及び考察

3.1 生ゴミ排水の回分培養

本研究で用いた生ゴミ排水の特性を以下に示す。

Table 3. 生ゴミ排水の特性

MLSS (g/l)		12.4
有機酸 (mM)	グルコース	9.3
	乳酸	2.0
TOC (mg/l)		1622

3.1.1 生ゴミ排水負荷の検討

生ゴミ排水の嫌気消化処理にあたり、生ゴミ排水の負荷濃度を検討した。調製した生ゴミ排水を2倍、4倍、8倍に希釈したもの、及び原排水をバイアル瓶にて回分培養を行なったところ、希釈倍率に応じて H_2 生成量及び有機酸生成量が小さくなっていた。よって生ゴミ原排水での処理が可能であることがわかった。Fig.4 に生ゴミ原排水を用いた培養結果を示す。培養初期に H_2 生成量及び有機酸生成がみられ、培養が進むにつれ CH_4 生成が盛んになった。生ゴミ排水は有機物豊富な基質であるので、このような典型的な嫌気消化の過程をとるものと考えられる。

3.1.2 使用汚泥及び培養温度

余剰汚泥の高温メタン発酵汚泥(50°C)及び中温消化汚泥(37°C)のうち、生ゴミ排水の嫌気消化処理にはどちらが適しているか、またその汚泥濃度について検討した。汚泥濃度を0.1~30%(v/v)、pH 7.0 で回分培養を行なったところ、汚泥濃度により若干違いがみられたが、どちらも平均30mMの H_2 、平均60%のMLSS減少率が得られた(Fig. 5)。生ゴミ排水を嫌気消化処理していく上で、より高い H_2 生成にあわせて、より高いMLSS減少率を期待できる条件が望ましい。よって30%(v/v)高温汚泥(50°C)および1%(v/v)中温汚泥(37°C)を今後の検討条件に用いることにした。

3.1.3 pH の影響

嫌気消化処理における pH の影響をみるため、30%(v/v)高温汚泥(50°C)および1%(v/v)中温汚泥(37°C)でそれぞれ pH 5.0、7.0、9.0 で培養した(Fig.6)。いずれも低 pH では乳酸の蓄積がみられ、H₂ 生成を阻害していることがわかった(Fig.7)。また培養温度 37°Cではアルカリ条件でも乳酸が生成しており、pH の違いによる H₂ 生成の差はみられなかった。一方、培養温度 50°Cでは pH 5.0 の場合培養が進むにつれ徐々に H₂ 生成がみられるのに対し、pH 7.0 及び pH 9.0 では培養 4 日目までに H₂ 生成が完了している。H₂ 生成がすばやく終了することは今後処理を高速化する上で大変好ましいので、高温汚泥を用いた pH 7.0 における処理が適切であると考えた。

以上のバイアルでの回分培養により、今後の生ゴミ排水の嫌気消化処理条件を、10%(v/v)高温メタン発酵汚泥、pH 7.0 制御、生ゴミ原排水で行なうこととした。

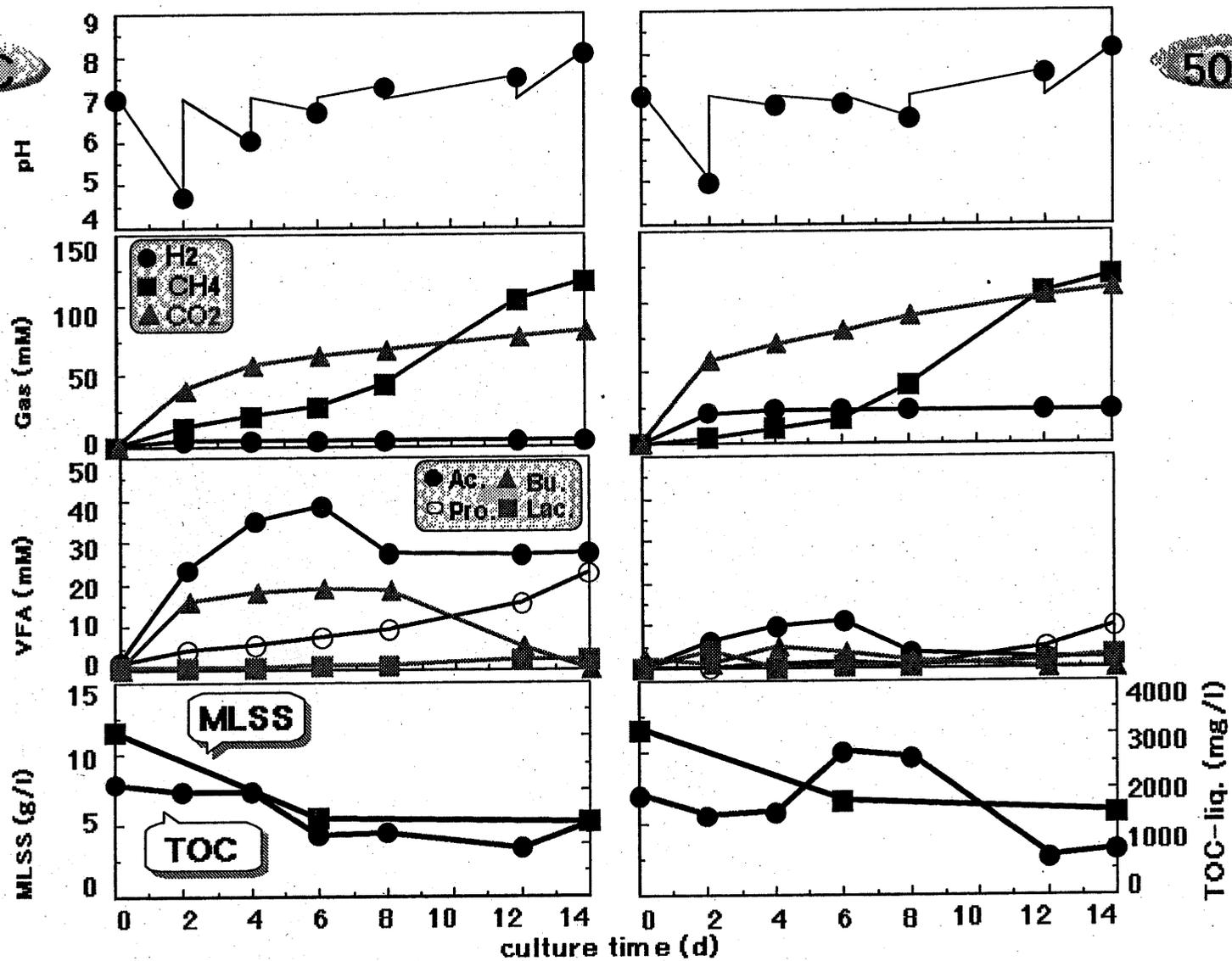


Fig. 4 生ゴミ原排水の嫌気消化 (37°C&50°C、30%(v/v)汚泥)

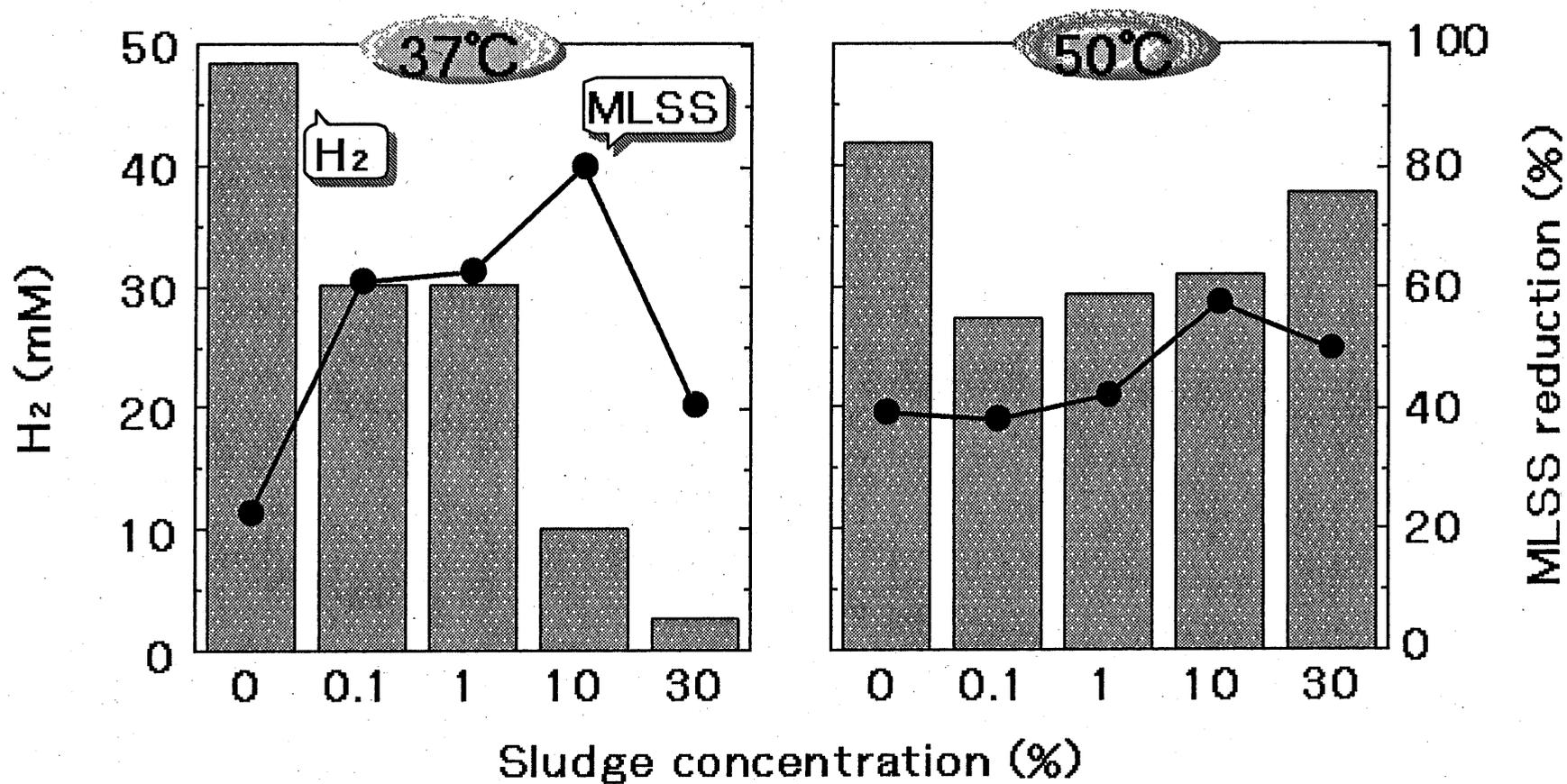


Fig.5 汚泥濃度とH₂生成及びMLSS減少率の関係

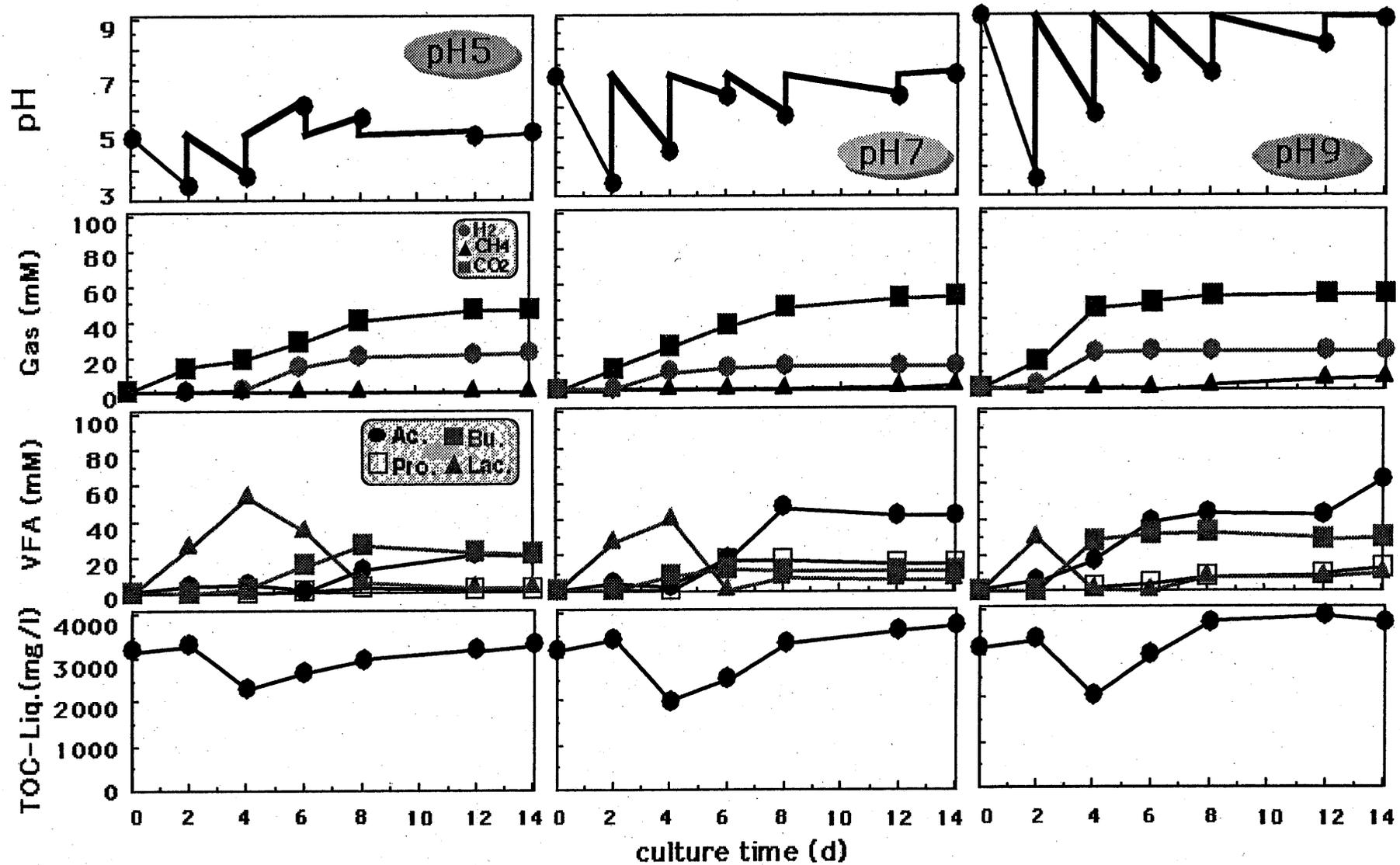


Fig.6a pHの影響(37°C, 1%(v/v)汚泥)

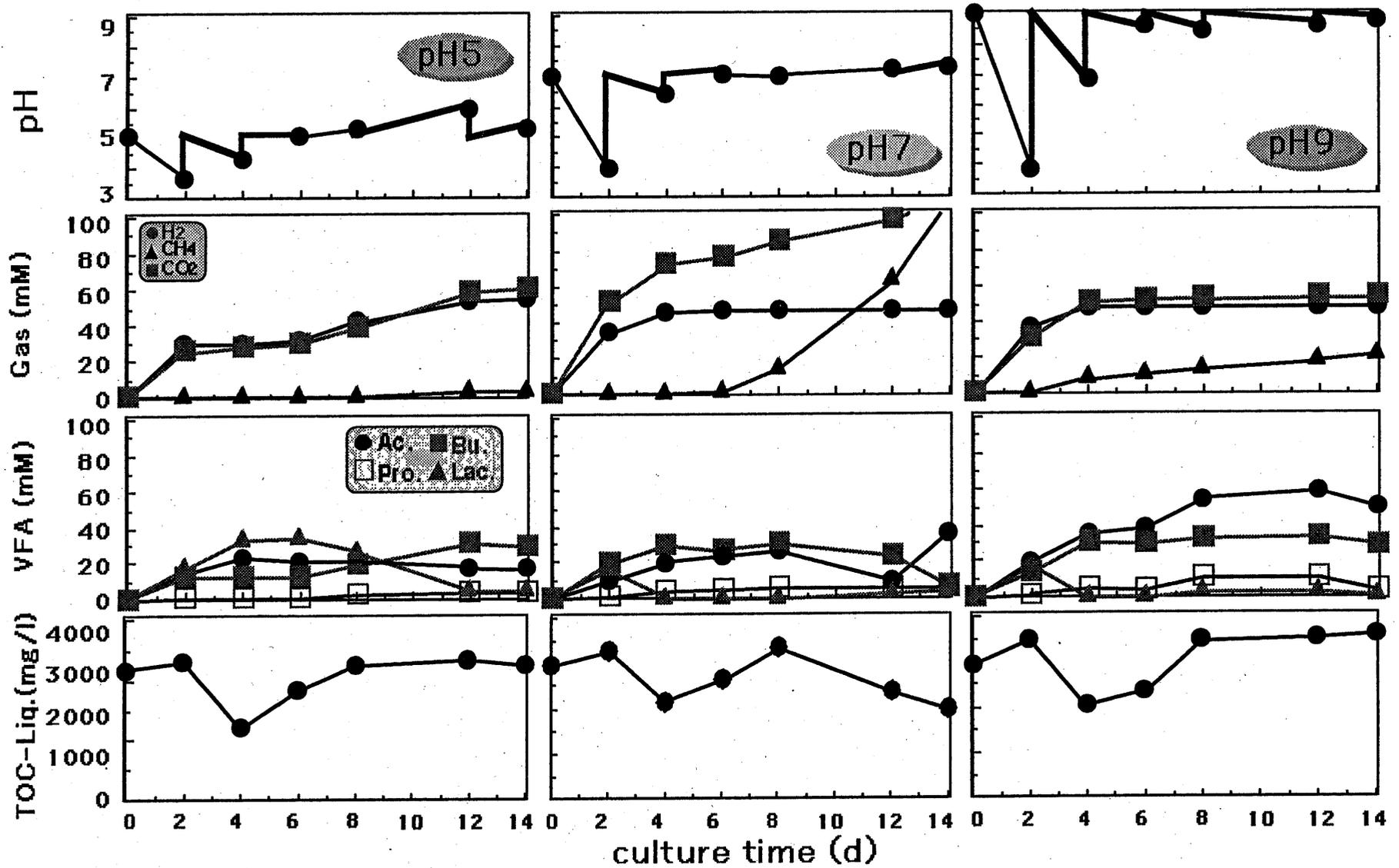


Fig.6b pHの影響(50°C, 10%(v/v)汚泥)

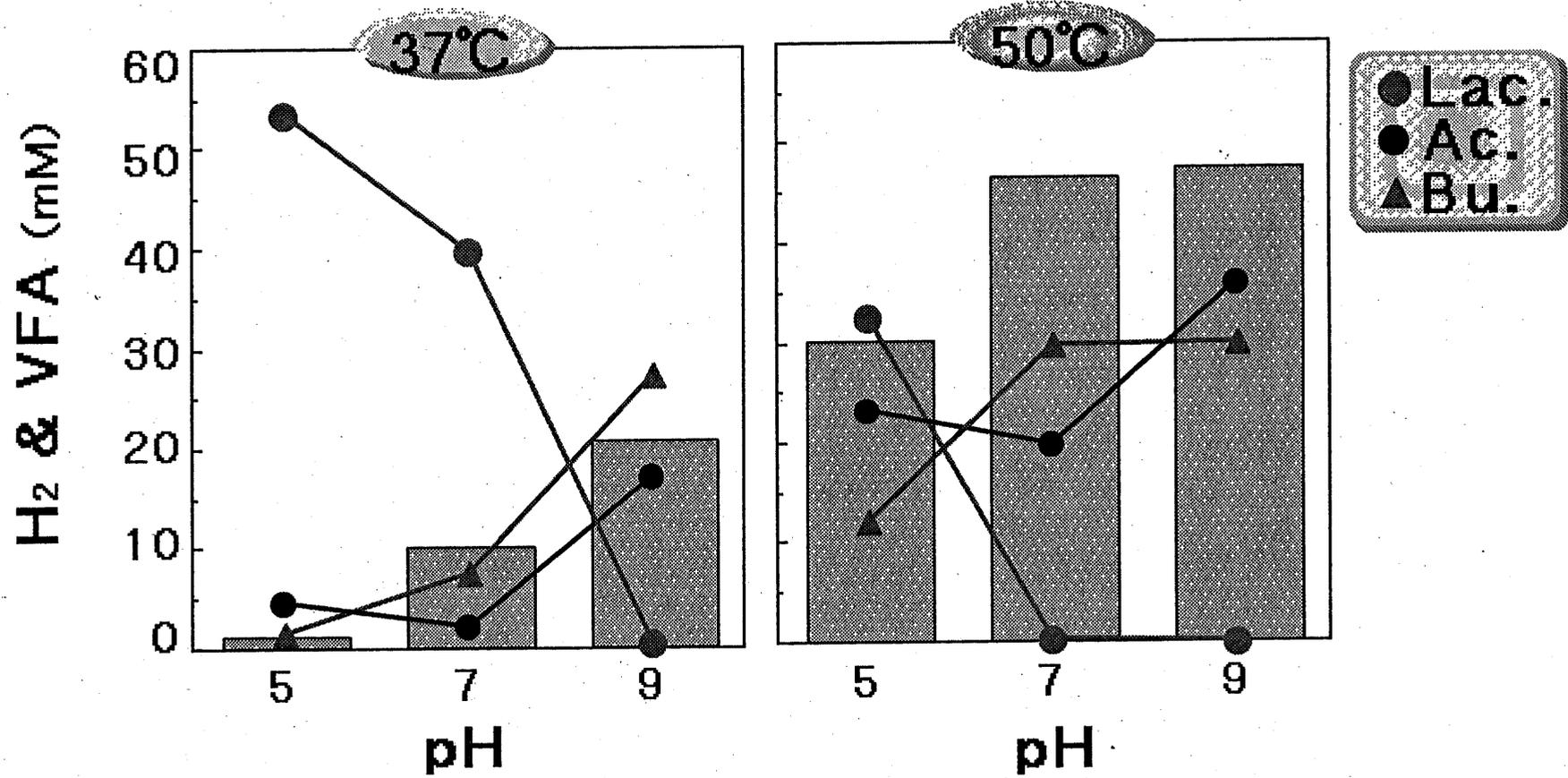


Fig.7 H₂生成におけるpHの影響

3.2 単相式水素・メタン発酵

検討した生ゴミ排水嫌気消化処理条件を用いて、攪拌型リアクターにて pH を制御しながら回分培養を行なった。バイアルでの回分培養と同様、培養初期に H_2 生成がみられ、有機酸の蓄積がみられた(Fig.8)。培養が進むにつれ CH_4 生成が盛んになってきた。30 日間の培養で約 20mM の H_2 、MLSS 減少率 59%を得た。

この攪拌型リアクターを用いた生ゴミ排水の嫌気消化処理過程をみると、培養 5 日目までに H_2 生成及び MLSS 減少が完了しており、後は蓄積した有機酸の CH_4 への変換で、培養 30 日目あたりで CH_4 生成が落ち着く。嫌気消化処理という点では、この単相式システムは良い系だが、時間がかかるのが難点である。

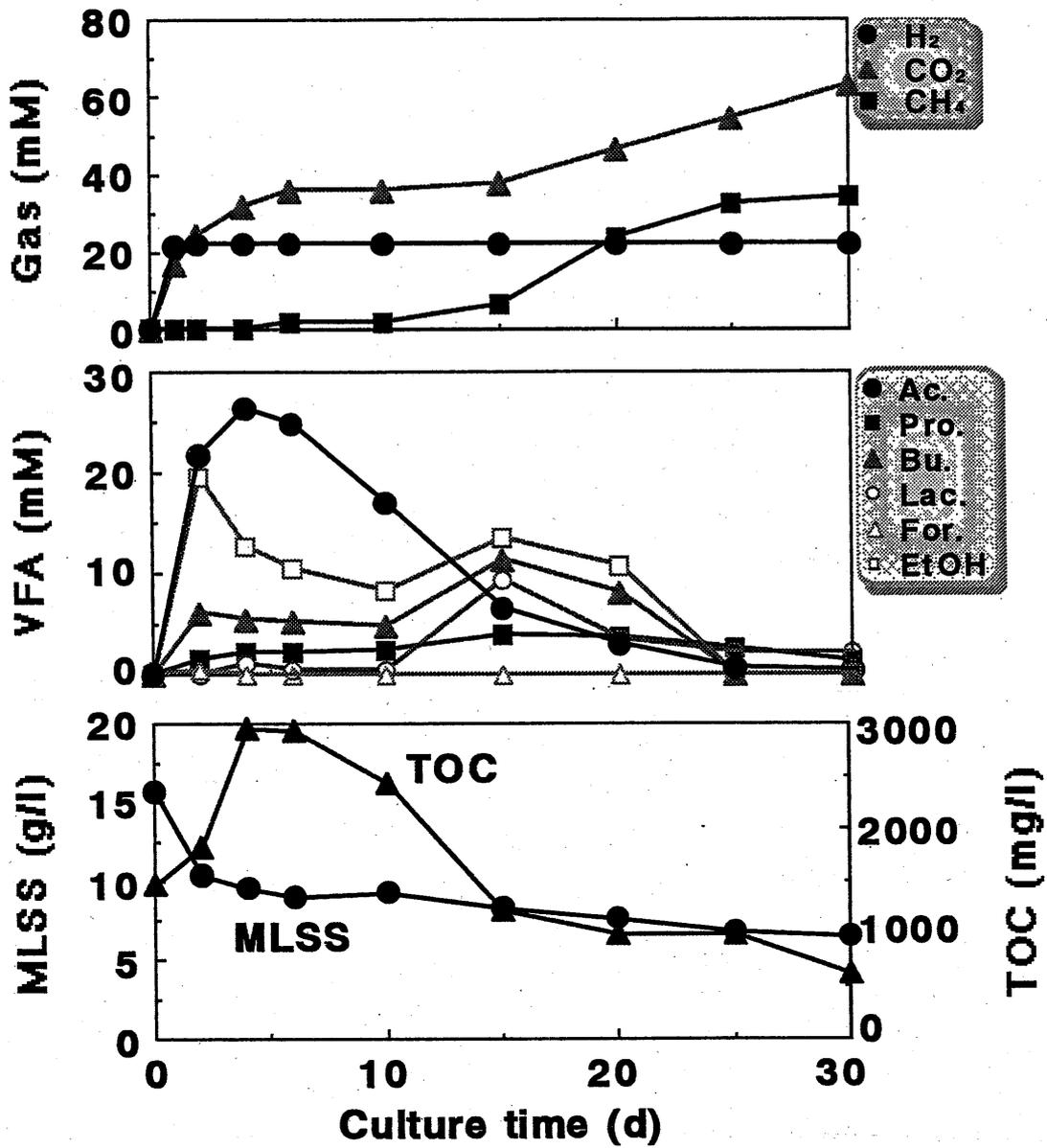


Fig.8 単相式攪拌型リアクターを用いた回分培養

3.3 二相式水素・メタン発酵

実際にこのシステムをマンションなどで実用化する上で、毎日生ゴミ排水が大量に流出されることを考えると、単相でメタン発酵まで処理するのはどうみても時間がかかりすぎる。そこで、酸及び水素生成段階と後発のメタン生成段階を別の相にわけて処理する、二相式処理システムを検討した。

3.3.1 攪拌型リアクターによる水素発酵

前項同様、攪拌型リアクターで生ゴミ排水の嫌気消化処理を行なった。H₂生成が頭打ちになる培養4日目に培養液を半量引き抜き、さらに新しい生ゴミ排水を投入し、培養を続けていった。この場合水理学的滞留時間(HRT: Hy Retention Time)は8日となり、8日で全量入れ替えることになる。この半連続培養ではH₂のみを回収したいのでCH₄生成を阻害するErBS(2-Bromoethane sulfonic acid)を所々添加した。処理を高速化するため、引き抜き間隔を3日おき及び2日おきにしたところ(HRT=6(d)、4(d))、有機酸の蓄積がみられた(Fig.9a)。さらに引き抜き間隔を1日おき(HRT=2(d))まで短くしたところ、MLSS量が大きくなり、処理の限界をみた(Fig.9b)。

このHRTの変化に伴う生ゴミ排水の嫌気消化過程の挙動をFig.10にまとめた。やはり処理時間が長い(HRT大)方がMLSS量は小さいが、しかしHRT=2dでも10mM前後のH₂生成があり、MLSSの減少率も約40%あった。よって攪拌型リアクターによる半連続水素発酵は2日で処理できることがわかった。

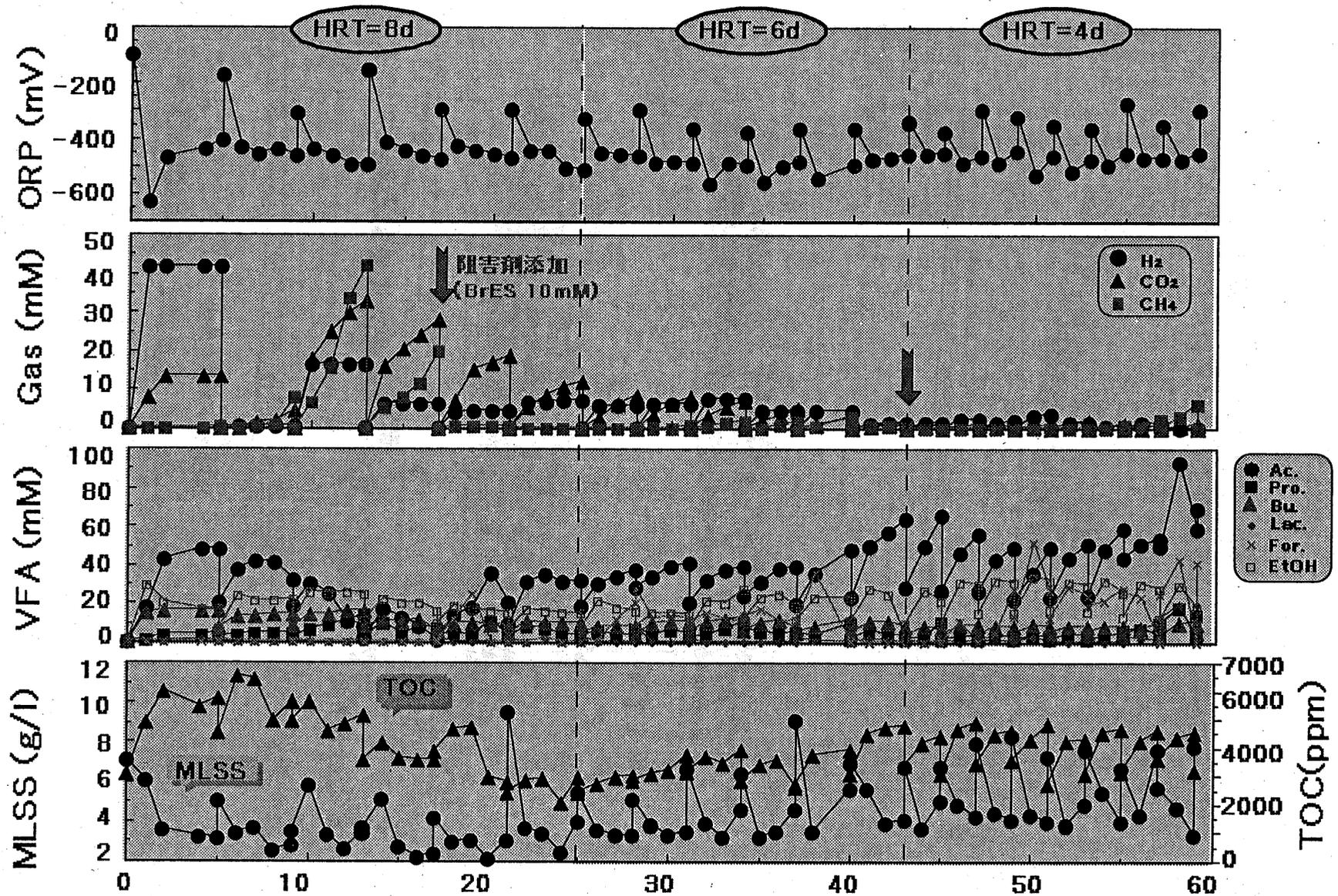


Fig. 9a 攪拌型リアクターを用いた生ゴミ排水の半連続水素発酵 (HRT=8d~6d)

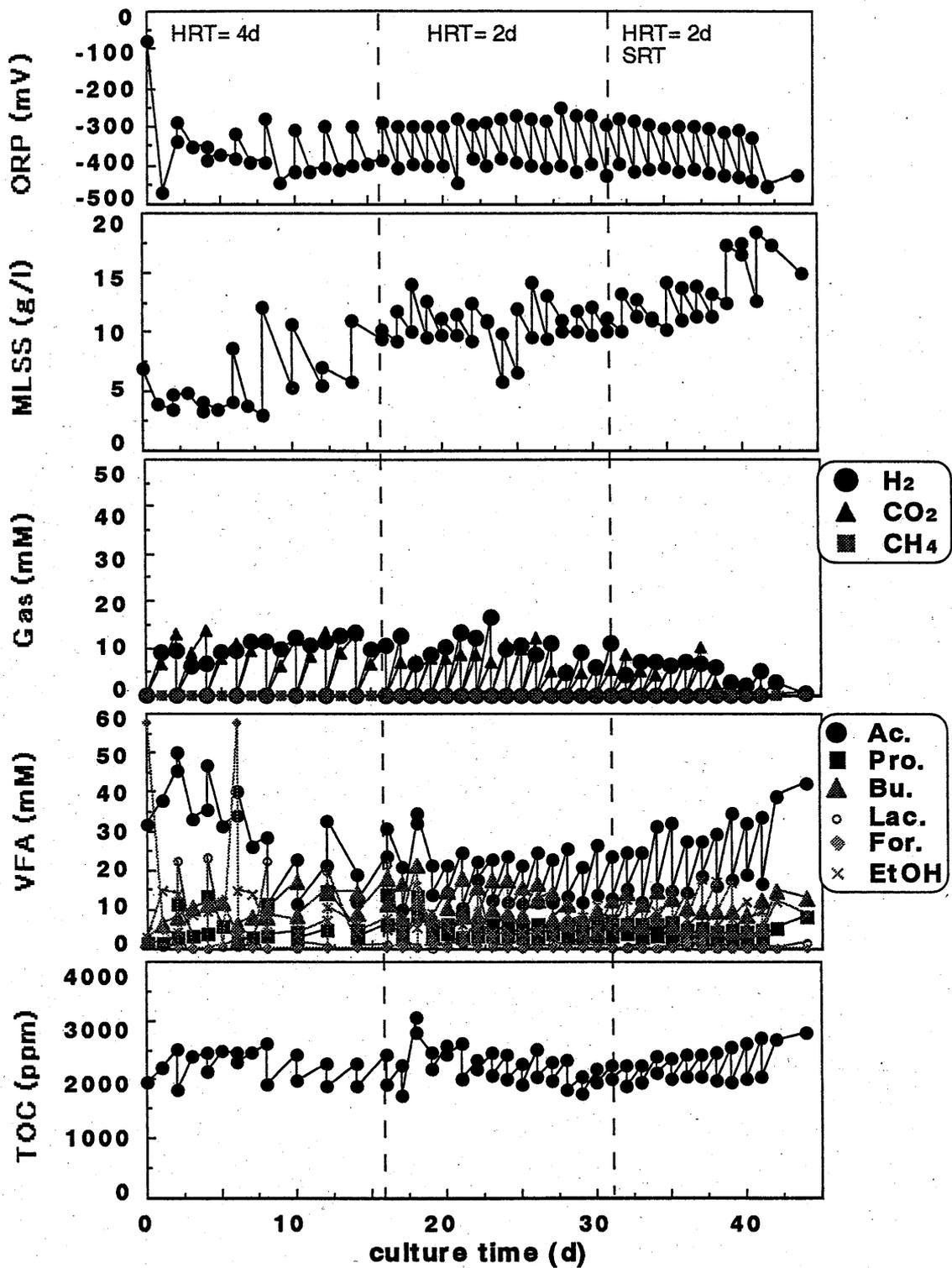


Fig. 9b 攪拌型リアクターを用いた生ゴミの半連続水素発酵 (HRT=4d & 2d)

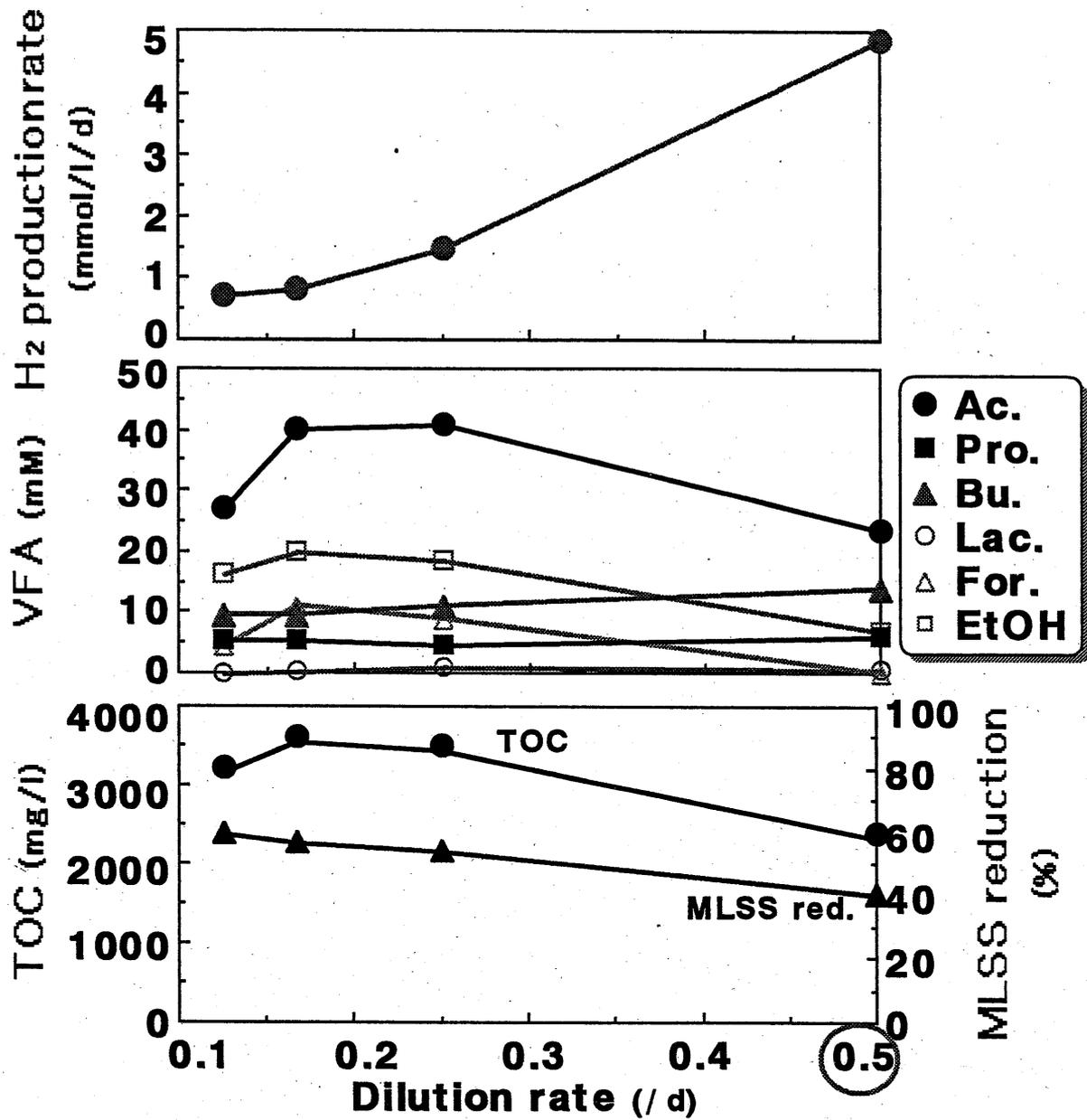


Fig.10 滞留時間短縮に伴う半連続水素発酵過程の挙動

3.3.2 固定床型リアクターによるメタン発酵

次に、前項の水素発酵における培養上清を基質として、筒型のリアクターにポリプロピレン-セラミックス混成担体を設置した固定床型リアクターによる連続メタン発酵を行なった。希釈率 0.5(/d)で徐々に有機物負加速度(OLR: Organic Loading Rate)を上げると、それにあわせて CH_4 生成速度も上昇した。OLR 2.17(g/l)で約 140(mmol/l/d)の CH_4 生成が得られ、TOC 除去率も約 90%を維持した。この時 CH_4 収率は 88.7 %($\text{g-C CH}_4/\text{g-consumption TOC}$)であった。

また OLR と CH_4 生成速度、TOC 除去率の関係を Fig.12 にまとめた。負荷を上げても高 CH_4 生成速度、高 TOC 除去率が得られたが、OLR 2.6 (gTOC/l/d)になると逆に速度は落ち、TOC 除去もあまりみられなくなった。このことから、連続メタン発酵は有機物負荷速度 2.2 (gTOC/l/d)付近で行なうと高速処理が可能であることがわかった。

3.3.3 二相式生ゴミ処理の有用性

生ゴミ処理システムとして、単相式と二相式を比較してみた(Table 4)。生ゴミ 1g あたりからの H_2 生成量は単相式が多いものの、生成速度としては二相式が速い。また、二相式では CH_4 生成量も生成速度も単相式を上回っている。MLSS 減少は単相式がやや上ではあるものの、二相式では 85%の高い TOC 除去が得られた。全体としての処理日数も、単相式にくらべはるかに短縮できる。実際のマンションなどに設置して、家庭からの生ゴミ排水を処理していくには、この二相式水素・メタン発酵システムが有効であると考えられる。

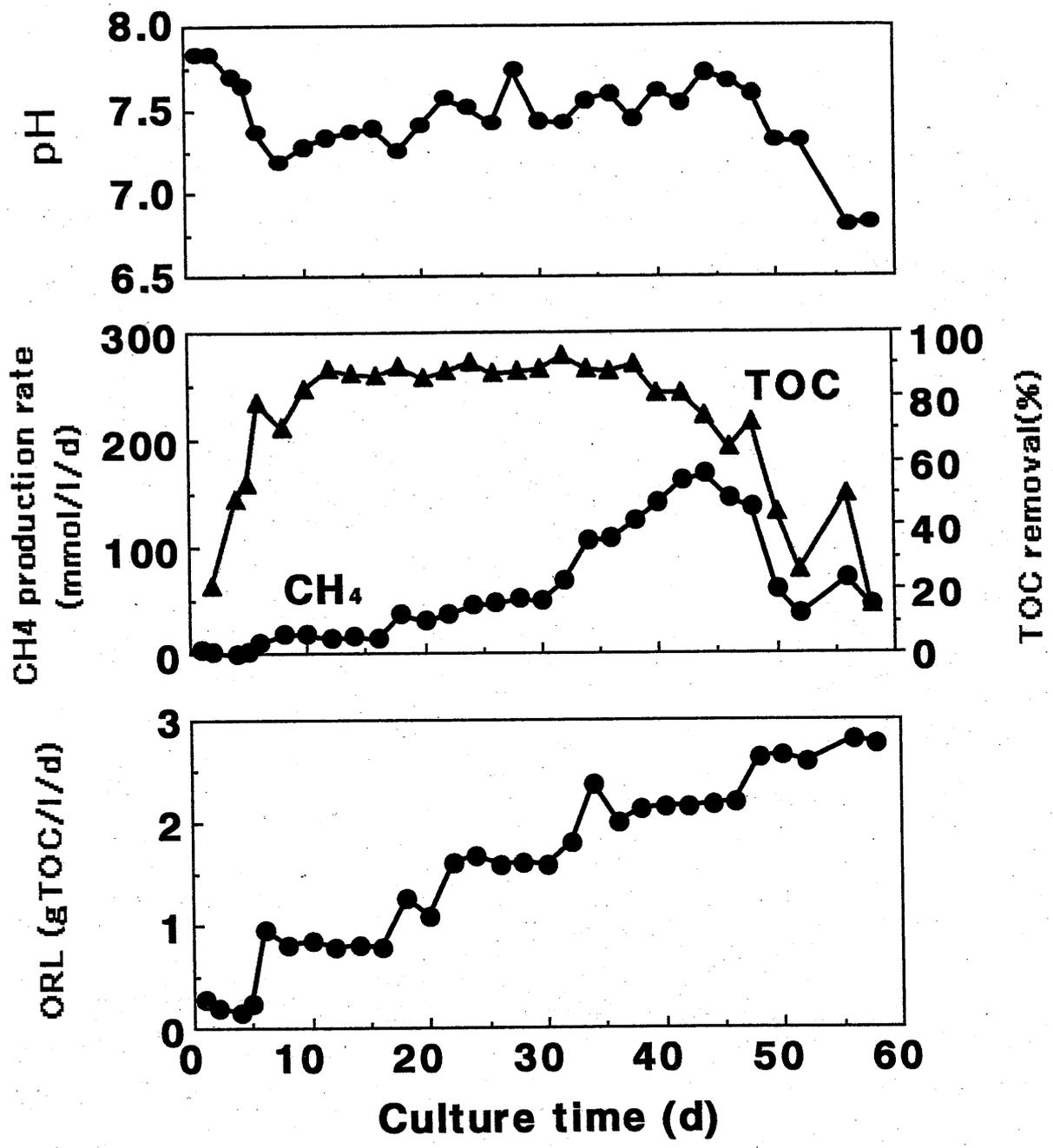


Fig.11 可溶化成分の連続メタン発酵

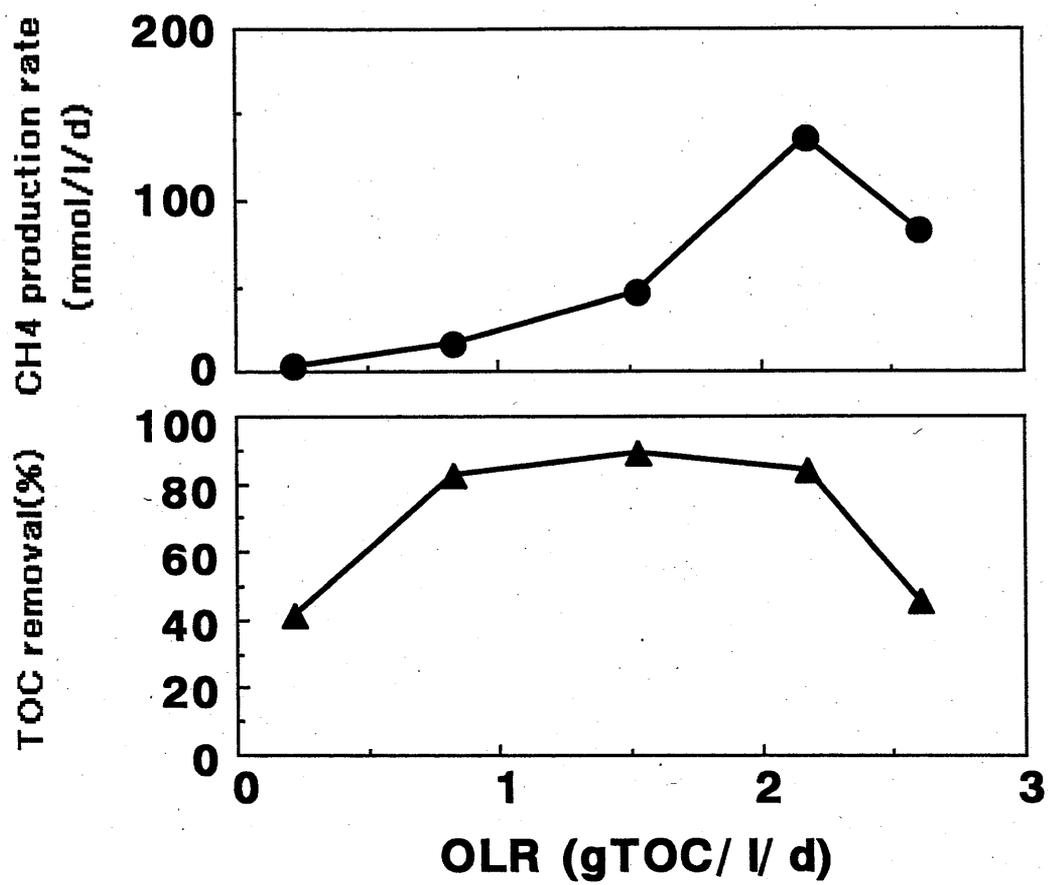


Fig.12 高負荷に伴うCH₄生成速度の変化

Table 4 生ゴミ処理における单相式と二相式の比較

	单相式	二相式
H ₂ 生成速度 (mmol/l/d)	0.73	4.9
CH ₄ 生成速度	1.1	136
生ゴミ1gあたりの H ₂ 生成量 (mmol/g-dry)	3.0	1.0
生ゴミ1gあたりの CH ₄ 生成量	4.7	8.2
MLSS減少率 (%)	59	42
TOC除去率		85
処理日数	30日	2日

3.5 消化汚泥中の微生物群集解析

嫌気消化過程における培養液の微生物組成を DGGE により解析した。本項では二相式システムの水素発酵リアクターにおける培養液サンプルを用いた解析を報告する。

DGGE 泳動写真(Fig.12)において、ひとつひとつのバンドが同一微生物種を表す。培養開始時、各 HRT での微生物相の変化をみると、まず培養開始時には単純だったバンドが培養開始後、複雑になっている。また各 HRT に常に同位置に存在するバンドもあれば、培養が進むにつれて消えていくもの、逆に現れてくるものもあった。HRT が小さくなるにつれ、 H_2 生成が抑制され、また MLSS 量の上昇もみられたことから、これらが生ゴミ固形分の加水分解に関与している微生物種であると予測できる。

今回は水素発酵段階での微生物相をみたが、今後二相目のメタン発酵リアクターでの微生物相の変化をみる必要がある。

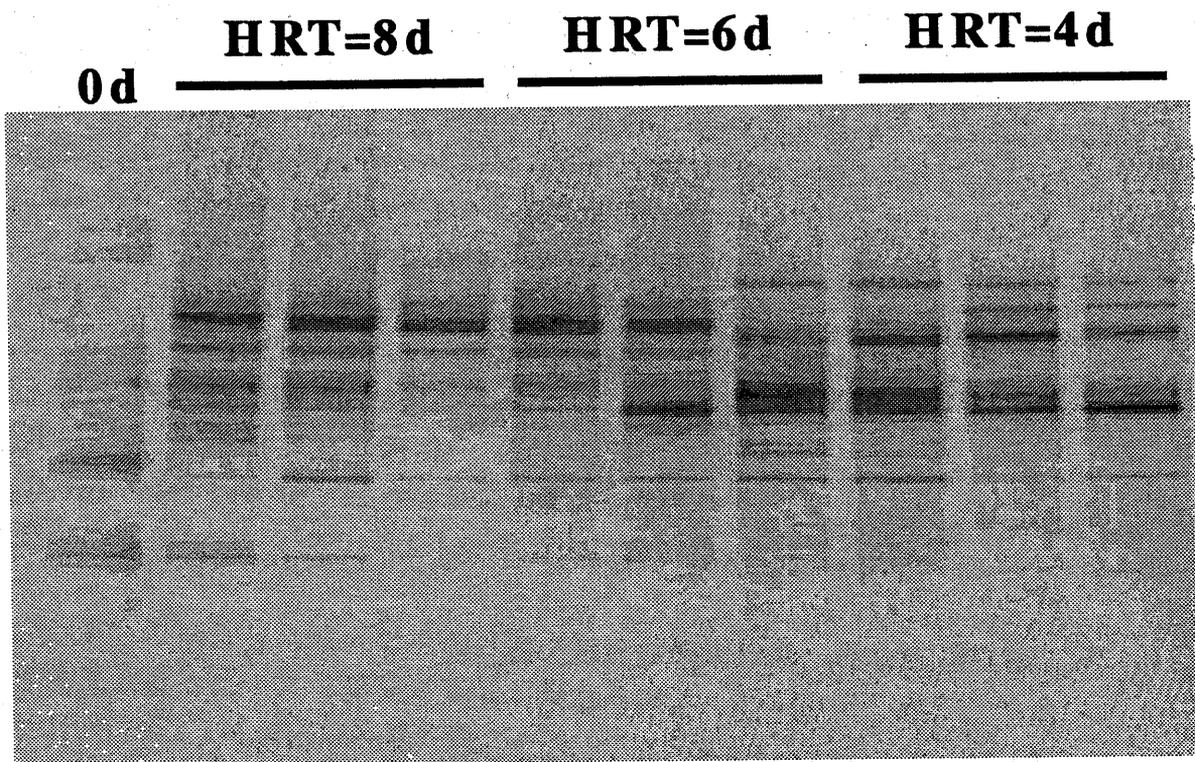


Fig.13 水素発酵過程における微生物相の変化

4. 総括

生ゴミ排水の嫌気消化処理過程において、まず水素生成及び酸生成が起こり、つづいて有機酸のメタンへの変換がおこった。これは一般に有機物を豊富に含む基質の嫌気消化によくみられる傾向で、特に生ゴミ排水は加水分解菌が資化しやすい固形分を多く含んでいるため、その傾向が著しく現れた。しかしメタン生成菌の生育は遅いため、メタンへの変換に至までに時間がかかる。そこで本研究では加水分解段階とメタンへの変換段階を別々の系にした、二相式の水素・メタン発酵システムを検討した。

一相目の攪拌型リアクターを用いた半連続水素発酵では、高 H_2 生成および MLSS 減少は保持しつつ、滞留時間を短くして処理の高速化を図った。滞留時間 2 日で約 10mM の H_2 、約 40% の MLSS 減少率を得ることができた。さらに二相目の連続メタン発酵では、一相目の培養上清を、有機物負荷速度 2.2(gTOC/l/d) でそのまま流入し、処理したところ、約 140(mmol/l/d) のメタン生成速度が得られた。TOC 除去率も約 90% と、高い処理効率を得ることができた。

以上のことから、毎日家庭から排出される生ゴミ排水を処理し、有用なエネルギーを取り出すには、二相式水素・メタン発酵システムが有効であることがわかった。今後さらに各リアクターの容積や高速処理がどこまで可能か、などを検討していく必要がある。将来マンションなどに設置された場合の配管のつまりや悪臭対策など、実用化に向けた検討もさらに必要である。

5. 謝辞

本研究を行なうにあたり、終始適切なご指導、ご鞭撻を賜りました西尾尚道教授、柿菌俊英助教授、中島田豊助手に深く感謝致します。また公私ともに様々なアドバイスを下さった歴代の先輩方、一から実験の指導をして下さった高田一也氏、大学院まで出してくれた母親に心から感謝致します。

平成 15 年 3 月

6. 参考文献

- 1) 循環型社会白書、環境省、平成 13 年度
- 2) 一般廃棄物の排出及び処理状況等報道発表資料、環境省、平成 14 年 1 月 25 日付
- 3) 月刊廃棄物 11 月号、2001
- 4) 農文協編集：家庭でつくる生ゴミ堆肥
- 5) 永井 史郎、上木 勝司：嫌気微生物学、養賢堂、1993
- 6) 根岸 幹雄、宮崎 忠雄、大池 永威、村松 信之、米山 正：食品工業における廃棄物からのエネルギー回収利用技術の開発に関する研究、長野県食品工業試験場、1982
- 7) Kenji Kida , Ikbal , yorikazu Sonoda : Journal of fermentation and bioengineering Vol.73 , No.5 , 390-395 , 1992
- 8) 平石 明：日本水処理生物学会誌 第33 卷 第3号、151-160、1997
- 9) W-T.Liu , T.L.March , H.Cheng and L.J.Forney : Applied and Environmental Microbiology , Vol.63 , No.11 , 4516-4522 , 1997
- 10) A.Taske , C.Water , G.Muyzer and N.B.Ramsing : Applied and Environmental Microbiology , Vol.62 , No.4 , 1405-1415 , 1994
- 11) 高田 一也：広島大学大学院 先端物質科学研究科 修士論文、2002