

# 水素製造をともなう廃水処理システムのための *Enterobacter aerogenes* による好気的水素発生

谷生 重晴・佐々木 寧

横浜国立大学工学部

240 横浜市保土ヶ谷区常盤台 79-5

## Aerobic Evolution of Hydrogen by *Enterobacter aerogenes* for Hydrogen Production accompanied with Sewage Treatment

Shigeharu TANISHO and Yasushi SASAKI

Yokohama National University

79-5 Tokiwadai, Hodogaya-ku, Yokohama 240

To produce hydrogen from sewage, aerobic evolution of hydrogen by *Enterobacter aerogenes* st. E.82005 was examined at the condition of unsuitable nutrient and pH for growth. *E. aerogenes* evolved hydrogen for more than 40 minutes under aerobic condition, DO concentration ca. 5.8mg/l. It used dissolved oxygen immediately after inoculation, though it had been cultivated under anaerobic condition. From this result, the TCA cycle and electron-transport chain were found to be preserved even under anaerobic condition. The termination of hydrogen evolution at aerobic condition was explained as the oxidation of NADH turned from hydrogen evolution to the respiration.

**Key words :** hydrogen production, fermentation, *Enterobacter aerogenes*, sewage treatment, biomass

### 1. 結 言

地球温暖化防止条約によって、先に、90年レベルまでのCO<sub>2</sub>排出削減目標が課せられ削減に苦勞している中、96年7月に開かれた第二回締約国会議では、2000年以降にはさらに相当量削減する方向で提案がされている。地球の現状を考えれば、このような世界の流れは、今後、益々強くなることはあっても弱まることは無いであろう。CO<sub>2</sub>濃度増加の原因が化石燃料の燃焼にあり、90年レベルまでの削減さえ達成が困難になってきている現在、CO<sub>2</sub>の削減は、可能な限り自然の恵みを利用してエネルギーを生産し、化石燃料を燃やさないこと以外に方法は無いと言える。

家庭から排出される生ゴミは、現在、収集に多くのエネルギーを費やしながら埋立や焼却で処理する厄介ものである。しかし、生ゴミは元来バイオマスであり、バイオマスは太陽エネルギーをセルロースやデンプンとして

蓄えたいわばエネルギーの缶詰めであるから、適切な開缶方法を用いれば、生ゴミもエネルギー源として利用できるはずである。ちなみに、乾燥バイオマスの燃焼エネルギーは非常に高く、1 ton の乾燥木材はおおよそ 0.5 ton の石油に、乾燥生ゴミでも約 0.4 ton に等しいエネルギーを持っている [1]。にもかかわらず、バイオマスが未だエネルギー源として利用されていない理由の一つは、生では含水率が非常に高く、表1にも見られるように、水の蒸発に消費されるエネルギーのせいで、利用できるエネルギー量がかなり減ぜられるからである。これは、すなわち、含水率の高い生バイオマスのエネルギー変換方法に問題があるのであって、生バイオマスにふさわしい湿潤状態でエネルギーを変換するならば、都市ゴミの約 40%を占める生ゴミをエネルギーとして利用できるばかりか、収集方法についても、環境と美観に寄与し、かつ、省労力で集めることができるディスポーザを使用した方法に代えることができる。

表1. 木材の含水率と燃焼熱

含水率 [ % ]	燃焼熱		利用量 [ % ]
	kcal/g	GJ/ton	
0	4.78	20.0	100
10	4.24	17.7	89
20	3.70	15.5	77
30	3.16	13.2	66
40	2.62	11.0	55
50	2.08	8.7	44
60	1.54	6.5	32
70	1.00	4.2	21
80	0.46	1.9	10
90	-0.07	-0.312	-2

計算式：(乾燥木燃焼熱)\*(1-含水率)  
-0.539\*含水率-0.001\*(100-25°C)\*含水率

2. 発酵水素発生と光合成水素発生

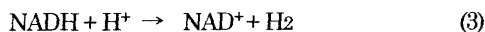
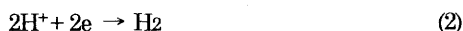
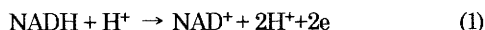
水分を含んだ炭水化物をエネルギーに変換するよく知られた方法に、エタノール発酵、メタン発酵があり、発酵法は有力なエネルギー変換方法の一つである。ただ、これらはそれぞれ蒸留エネルギーを必要としたり、発酵基質の滞留時間が長いなどの欠点があって、エネルギー生産としては魅力に欠けるが、近年、これらの欠点を持たない新しいエネルギー変換方法として、発酵による水素生産および太陽光を利用した生物反応による水素生産の研究が活発になっている [2-4]。

水素発酵は非常に短い滞留時間で基質を水素や有機酸などに変え、水素は気体で得られるから、蒸留のエネルギーを必要としない。さらに、メタンのように改質・分離する必要もなく、発生気体を直接燃料電池に導いて高効率で電気に変換できるので、装置的にも効率的にも非常に有利な変換法と考えられる。

発酵で水素を発生するバクテリアは、グルコースなど糖分をエネルギー源とし、代謝産物として水素と有機酸を生成する。その水素発生速度は表2に示すように非常に速く、*E. aerogenes* 菌はおおよそ 1m<sup>3</sup>·H<sub>2</sub>/m<sup>3</sup>·発酵槽

h の発生速度で連続的に廃糖蜜から発生したことが既に報告されている [5]。この時の糖蜜の平均滞留時間は約3.1時間と非常に短いことから、滞留時間が数日以上も必要なメタン発酵に比べて、極めて小さな発酵槽で、多量の水素を得ることが可能である。ただ、基質に対する水素収率がグルコースの場合で 1 ~ 3 mol-H<sub>2</sub>/mol-glucose と小さく、メタン発酵より基質からのエネルギー回収率が悪いのが欠点となっている。

代表的な発酵水素発生の経路には図1に示すような3経路が有り、*E. aerogenes* は NADH ( Nicotinamide Adenine Dinucleotide の還元型 ) を経た経路で次のように反応して水素を発生する。



この反応は、「余剰の NADH を再酸化するためであると同時に、細胞近傍の培地の H<sup>+</sup> 濃度を低くするために行われている」ことを Tanisho らは示しており [6]、余剰 NADH を増加させることで水素収率が増加する可能性のあることも示した [7]。

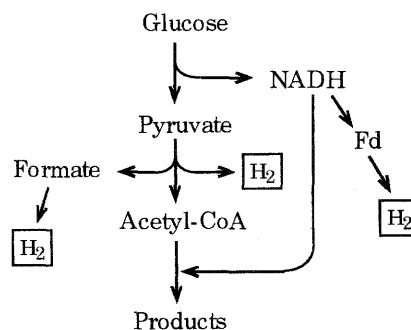
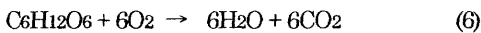
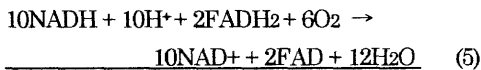
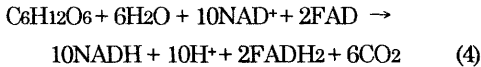


図1. 発酵水素発生の代表的な経路

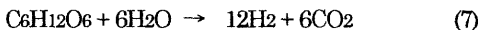
表2. 代表的なバクテリアの発酵による水素発生速度

Genus	substrate	mmol-H <sub>2</sub> /l h	mmol-H <sub>2</sub> /g h	°C	ref.
<i>Clostridium</i>					
<i>beijerinckii</i> AM21B	cellobiose	17	-	36	[3]
	glucose	17	25	41	[3]
<i>butyricum</i>	glucose	-	7.3	37	[11]
<i>Citrobacter</i>					
<i>intermedius</i>	glucose	11	9.5	34	[12]
<i>Enterobacter</i>					
<i>aerogenes</i> E.82005	glucose	21	17	38	[9]
	molasses	36	-	38	[5]

ところで、好気条件下でのバクテリアのグルコース代謝反応では、次式のように、12 mol の NADH と 2 mol の FADH<sub>2</sub> (Flavin Adenine Dinucleotide の還元型) が生成され、電子伝達鎖を介して、O<sub>2</sub> と H<sup>+</sup> から H<sub>2</sub>O を生成することで、NADH と FADH<sub>2</sub> を再酸化することが知られている。



このことから、(5)式の反応を阻害すれば多量の NADH が残ることになり、もしその再酸化を水素発生で行わせることができるならば、(7)式のように 12 mol の水素が得られ、水素収率の著しい向上が可能になると考えられる。



水素発生に関与する酵素ヒドロゲナーゼは一般的に酸素に対して非常に敏感で、酸素によって容易に失活すると言われている [8]。しかし、Tanisho らの言うように「H<sup>+</sup>の濃度を低くするため」であるなら、pH の低い範囲では、好気下でも水素を発生すると考えられる。本報では、収率の改善を目標に、好気下でも *E. aerogenes* が水素を発生するかどうかを調べた。

### 3. 実験方法

実験に使用したバクテリアは *Enterobacter aerogenes* st. E.82005 である。前培養液は 1 l の蒸留水に (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g、クエンサンナトリウム 1 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 14 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6 g、グルコース 15 g、ペプトン 5 g を加えて滅菌したもので、38°C の恒温槽で攪拌しながら 20 時間培養した後、この菌液 50 ml を本培養液に接種した。本培養液は、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>、クエンサンナトリウム、グルコースは前培養液と同量であるが、増殖を押しやるためにペプトンを除いた。

発酵槽体積は 2.5 l で、1 l の本培養液に 0.2 M 酢酸緩衝液 50 ml を加えて初期 pH を調整した。従って、本培

養液体積は前培養菌液 50 ml と合わせて 1.1 l であった。実験中の培地 pH は自動 pH コントローラで 0.2 M 酢酸緩衝液を用いて調整した。培養液中には窒素または空気を 1.8 ml/s の流量で吹き込み、溶存酸素濃度を培地に浸漬した DO センサー (DO 1A 東亜電波工業) で測定した。培養温度は 38°C に保った。

排気ガス中に含まれる発生した水素の濃度は、モレキュラーシーブ 5A を用いてガスクロマトグラフで測定した。

### 4. 実験結果

図 2 は、pH 5.1 の培地に空気または窒素を 1.8 ml/s で培地に吹き込みながら培養したときの、培地溶存酸素濃度を示したものである。気相の空気と平衡状態にあった溶存酸素濃度 (7.12 mg/l) が、時間 0 で 50 ml の前培養菌液を加えると、空気を吹き込んでいるにもかかわらず、直ちに減少し始めたが、増殖を抑制した培地では、やがて、ほぼ一定の溶存酸素濃度 (約 5.8 mg/l) に落ち着いた。また、窒素を吹き込んだ培養でも、接種後、まだわずかに溶けていた酸素 (約 0.4 mg/l) が直に取り込まれ、以後、誤差の範囲で 0 mg/l の濃度を示した。20 時間、前培養した菌液の溶存酸素濃度も同様に誤差の範囲で 0 mg/l を示したので、植え付けた菌は嫌気状態に置かれていたと考えられる。したがって、酸素の利用に必要な電子伝達鎖および TCA 回路などの酵素系は、植え付けられた菌には備えられていないと考えられた。しかし、このように、極めて短い時間で直ちに酸素を取り込む能力を示したことから、これら電子伝達鎖および TCA 回路は、酸素の存在を感知してからおもむ

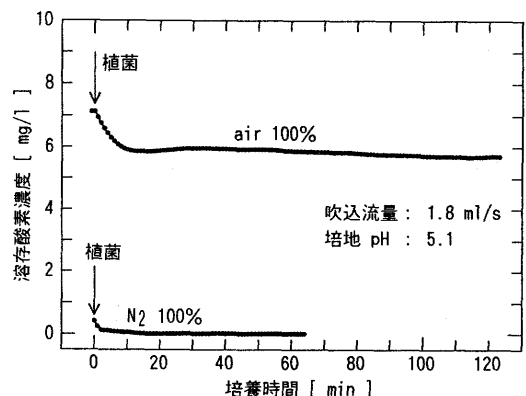


図2. 培養による溶存酸素濃度の変化

に形成されるのではなく、むしろ、常に細胞中に形成されていて、直ちに機能を働かせ得る状態にあると考えられる。

図3は培地pHを5.1または4.0に保ったときの、排出ガス中に含まれる水素濃度[%]の時間変化を示したものである。Tanishoらによると、pH 5.1は、この菌の棲息条件としては非常に厳しい条件であり、菌の増殖能力を表す菌体生産性はpH 7.0の25%程度であること [6]、そのため、水素発生活性も最大発生速度の70%程度であること [9]、が報告されている。pH 4.0 はさらに厳しく、生存さえ難しいと考えられる pH 条件である。時間0では、当然、水素濃度は0であるが、植え付け5分後には、嫌気、好気いずれの場合にも、0.02%前後の水素が検出され、植え付けた菌の水素発生活性が、数分間は同じ程度に高いことがわかった。その後、窒素を吹き込み続けた嫌気状態（白抜き印）では、培養時間の経過とともに、pH 5.1 のときは顕著に水素濃度が増加し、さらに低い pH 4.0 の下でも、わずかではあるが、増加する傾向を示した。しかし、空気を吹き込み続けた好気状態（黒塗り印）では、pH 5.1、4.0 いずれの場合にも、水素濃度が減少する傾向を示し、45分後には痕跡程度まで減少した。

このように、水素発生活性は、嫌気下では増加し、好気下では減少することから、酸素により失活することがわかったが、溶存酸素濃度が一定になった10分以後においてもかなり高い活性が見られ、とりわけ、45分後でもまだ水素の発生が認められたことから、ヒドロゲナーゼが酸素によって阻害されたためではなく、NADHの

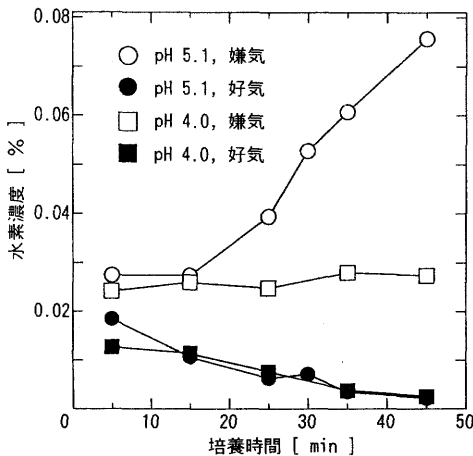
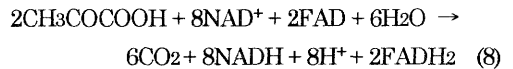


図3. 排出ガスに含まれる水素濃度の変化

再酸化が効率の良い電子伝達鎖の方を主に利用して行われるようになるために、水素発生の活性が失活すると考えられる。

5. 考 察

解糖系で作られた 2 mol のピルビン酸は、(8)式で示すように、TCA サイクルで 6 mol の炭酸ガスと 8 mol の NADH それに 2 mol の FADH<sub>2</sub> に分解される。



したがって、水素収率を上げるためには嫌気下でも TCA サイクルが機能していなければならない。TCA サイクルが酸素の存在を感知すると直ちに機能することが明らかになったことにより、このサイクルを利用できることがわかったが、このバクテリアが嫌気下で発酵を行うということは、TCA サイクルが嫌気下では機能しないからであり、この理由は、NADH の酸化は水素を発生することで行い得ても、FAD は標準酸化還元電位が 220 mV と NAD より 100 mV も高いので、嫌気下では酸化できないためであると考えられる。図4に示すように、電子伝達鎖はいくつかの箇所では阻害され、FADH<sub>2</sub>

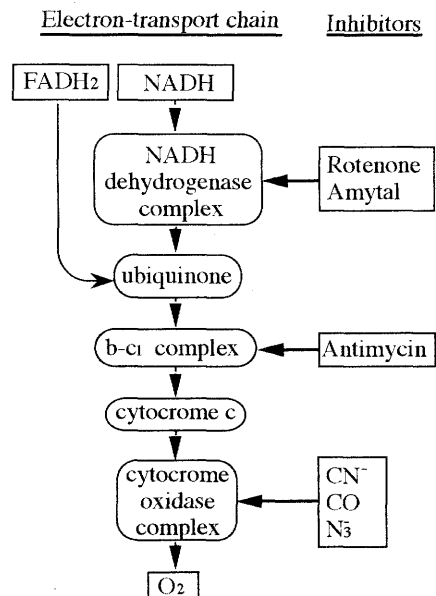


図4. 電子伝達鎖と阻害部位

表3. 湿重量あたりの含水率と含糖率

水 素 源	含 水 率 [ % ]	含 糖 率 [ % ]
リンゴ皮、芯	54	9.2
ミカンの皮	53	4.9
バナナの皮	75	1.6
ホウレン草	74	2.7

はユビキノンの部位で電子伝達鎖に電子を渡すことが知られているので、阻害をNADH酸化酵素複合体の部位で行うならば、電子伝達鎖はFADH<sub>2</sub>の酸化機能を残して機能すると思われる。もしそうであれば、酸素が取り込まれ水素収率が增加する現象として観察されると思われるが、この検証は今後の課題としたい。

ところで、都市における収集ゴミの内、厨芥は約40%を占めており、その含水率は50%前後である。厨芥は約85%が植物性食品で、約25%が肉、魚類であり、大部分を占める植物性食品のうち、グルコースなどの糖類は、表3に示すように、数%程度含まれているだけである[10]。他は、主にセルロースとデンプンであるから、水素発酵バクテリアがこれらを基質として利用するには

糖に分解する必要がある。セルロース、デンプンはセルラーゼ、アミラーゼなどを供給すれば効果的に糖に分解できるので、図5のような廃水処理システムを構築し、生物的に可溶化すれば、厨芥量の数十%を水素発生の基質に利用することも不可能ではないだろう。平成4年度における東京都区部の厨芥量は142万tonと推定されており、このうち20%が収率12 mol-H<sub>2</sub>/mol-glucoseで水素に変換されたとすると、表4に示すように、約17万kWの発電所に相当するエネルギーが回収できる。また、沖縄や宮古島で冬季2ヶ月間に発生する廃糖蜜を使用すれば、それぞれ2.1MW、1.5MWの電気エネルギーが年間を通して得られることになる。

発酵水素生産法では基質を水溶液の状態で使用することから、厨芥をディスポーザーで粉碎し、下水と一緒に集めれば、厨芥収集のエネルギーは不要になるばかりか、ゴミ収集車が収集で排出するCO<sub>2</sub>を大幅に削減することができる。したがって、これら水素生産法と粉碎収集とを併用すれば、生ゴミを資源ゴミに変える新しい廃水再生処理プロセスが構築できるのではなかろうか。また、沖縄や宮古島で冬季2ヶ月間に発生する廃糖蜜を使用

表4. 生ゴミ、廃糖蜜から水素生産で回収されるエネルギー量

場所	規模 人 or m <sup>2</sup>	単位など	水素発生量		電気エネルギー換算*3)	
			発酵*1) mol-H <sub>2</sub> /d	発酵+光生物*2) mol-H <sub>2</sub> /d	kW·hr/d	kW
団地	1000	250 g/人日	556	3333	264	11
	5000	250	2778	16667	1318	55
	10000	250	5556	33333	2636	110
ホテル	1000	223 g/m <sup>2</sup> 日	496	2973	235	10
	5000	54	600	3600	285	12
	10000	33	733	4400	348	14
	50000	16	1778	10667	843	35
	100000	14	3111	18667	1476	61
デパート	1000	88 g/m <sup>2</sup> 日	196	1173	93	4
	5000	36	400	2400	190	8
	10000	29	644	3867	306	13
	50000	25	2778	16667	1318	55
	100000	23	5111	30667	2425	101
日本全体	2000万t/年	10 %	60882801	365296804	28883933	1203497
		20	121765601	730593607	57767867	2406994
東京区部	142万t/年	10 %	4322679	25936073	2050759	85448
		20	8645358	51872146	4101519	170897
沖縄本島	廃糖蜜の 糖重量	3470 ton	107099	642593	50810	2117
宮古島	糖重量	2490	76852	461111	36460	1519

\*1)湿重量の20%がグルコースで、水素収率2と仮定した

\*2)湿重量の20%がグルコースで、水素収率1.2と仮定した

\*3)発酵+光生物で発生した水素を基に計算

糖重量：産糖量の21%相当の廃糖蜜が発生し、その33%が基質として利用できると仮定

「ディスポーザーによる生ゴミリサイクルシステムの開発に関する基礎調査」報告書、日本建築センター、平成7年3月、p.79, p.82

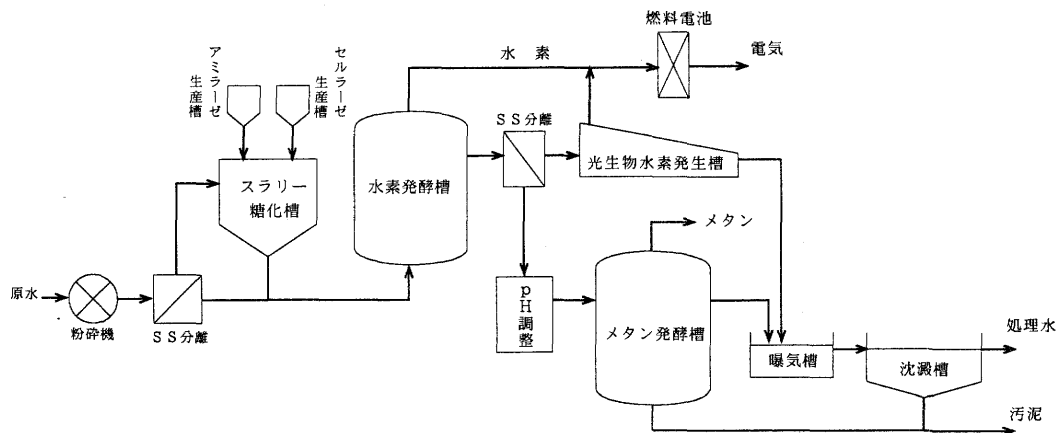


図5. 水素製造を伴う廃水再生処理フローチャート

すれば、それぞれ 2.1 MW、1.5 MW の電気エネルギーが年間を通して得られることになる。

発酵水素生産法では基質を水溶液の状態を使用するから、厨芥をディスポーザーで粉砕し、下水と一緒に集めれば、厨芥収集のエネルギーは不要になるばかりか、ゴミ収集車が収集で排出する CO<sub>2</sub> を大幅に削減することができる。したがって、これら水素生産法と粉砕収集とを併用すれば、生ゴミを資源ゴミに変える新しい廃水再生処理プロセスが構築できるのではなかろうか。

6. 結 論

増殖に適していない栄養条件、培地 pH 条件における *E. aerogenes* の好気的水素発生について、以下のことが明らかになった。

1. 酸素によって容易に失活するといわれていたヒドロゲナーゼが、酸素存在下でも 40 分以上にわたって活性を維持した。
2. 嫌気状態に数時間以上置かれていた菌が、好気下に置くと、直ちに酸素を消費することが示された。これによって、TCA サイクルと電子伝達鎖が嫌気下でも維持されている可能性があることが明らかになった。
3. 水素発生が酸素存在下で失活するのは、NADH の再酸化が効率の良い電子伝達鎖の方を主に利用して行われるためである。
4. 電子伝達を NADH 酸化酵素複合体の部位で阻害することで、好気下でも水素発生の可能性があり、収率を改善できると考察されたが、その検証は今後に残さ

れた。

参考文献

1. 宮崎 信; "バイオマスー生産と変換" 上、柴田一木崎編、学会出版センター、1981、p223-244、"林産廃棄物"
2. A.A.Tsygankov, Y.Hirata, M.Miyake, Y.Asada and J.Miyake; J.Ferment.Bioeng. 77, 575-578(1994)
3. 田口文章、長谷川勝重、用水と廃水、36, 37-44(1994)
4. H.Yokoi, T.Ohkawara, J.Hirose, S.Hayashi and Y. Takasaki; J. Ferment. Bioeng. 80, 571-574(1995)
5. S.Tanisho and Y.Ishiwata; Int.J. Hydrogen Energy 19, 807-812(1994)
6. S.Tanisho, N.Kamiya and N.Wakao; Biochim. Biophys. Acta 973, 1-6(1989)
7. M.Kuromoto, N.Kadokura and S.Tanisho; Proc.1st. Int. Conf. New Energy Systems and Conversions, Yokohama, 209-214(1993)
8. M.W.W.Adams, L.E.Mortenson and J-S. Chen; Biochim. Biophys. Acta 594, 105-176(1981)
9. S.Tanisho, Y.Suzuki and N.Wakao; Int.J. Hydrogen Energy 12, 623-627(1987)
10. 谷生重晴、藤井義浩; 水素エネルギーシステム, 20, 10-15 (1995)
11. I.Karube, S.Suzuki, T.Matsunaga and S.Kuriyama; Ann.N.Y.Acad.Sci. 369, 91(1981)
12. J.D.Brosseau and J.E.Zajic; Biotechnol. Bioengng 24, 1469(1982)