

発酵によるデンプン質生ゴミからの水素生産

安田 圭吾・谷生 重晴

横浜国立大学大学院環境情報学府

240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台79-5

Hydrogen Production by Fermentation from Food Wastes Containing Starch

Keigo YASUDA and Shigeharu TANISHO

Graduate School of Environment and Information Sciences,

Yokohama National University

79-5 Tokiwadai, Hodogaya-ku, Yokohama 240-8501

Fermentative hydrogen production from starch and artificial food waste was studied by using a newly isolated mesophilic bacterium HN001. This bacterium could produce H_2 from starch directly. Effect of incubation temperature, cultivation pH and starch concentration were investigated using YNU anaerobic culture. The maximum H_2 production rate decreased along with the increase of temperature from $1.2L-H_2 L-culture^{-1} h^{-1}$ at $37^\circ C$ to $0.3L-H_2 L-culture^{-1} h^{-1}$ at $50^\circ C$. The production rate was also increased from $0.6L-H_2 L-culture^{-1} h^{-1}$ to $1.8L-H_2 L-culture^{-1} h^{-1}$ along with the increase of culture pH from 5.5 to 6.5. The maximum H_2 production rate did not increase linearly along with the increase of starch concentration but approached nearly fixed rate at $1.5L-H_2 L-culture^{-1} h^{-1}$ at over 1.5%-starch. H_2 yield decreased linearly along with the increase of starch concentration because of the increased lactic acid production. There were significant differences between cultivation with entrails and without entrails on the maximum H_2 production rate, accumulated volume of H_2 and metabolites production. This bacterium produced hydrogen approximately 66L at $37^\circ C$, pH6.0 from 1kg of wet artificial food waste containing cooked rice and frozen vegetables with entrails of fishes. The hydrogen production was also carried out at repeated batch cultivation.

Key words: : hydrogen production, fermentation, mesophilic bacterium HN001, starch, entrails of fish

1. 緒言

今日、日本では年間約2000万トンもの食品廃棄物が排出されている。その大部分が焼却・埋め立て処理されている。また、最終処分場の残余年数も平成15年度現在で13.2年とひっ迫している[1]。

一方で、来たる水素社会に向けて、発酵や光合成による生物学的水素生産の研究が広く行われている。特に発酵水素生産は、光合成水素生産に比べて水素発生速度が速く、装置も小さくてすむなど利点が多く、また様々なバイオマス

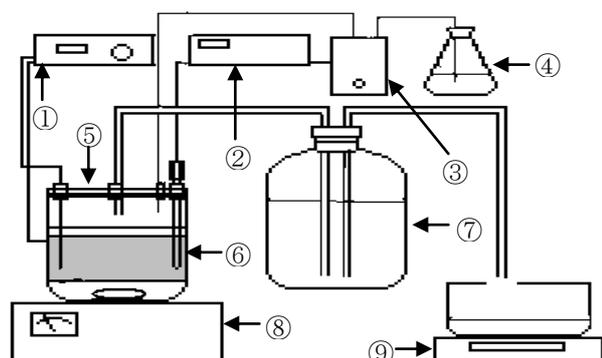
を発酵基質として扱うことができるので、実用化が期待されている。しかし、現在までに報告されている多くの水素生成バクテリアは実用化を念頭におくと、水素発生速度は速いとは言えない。そこで我々は、より水素発生速度が速いバクテリアを得るためスクリーニングを行い、 $41\sim 50^\circ C$ の中温で非常に水素発生速度が速い嫌気性細菌HN001株（未同定）を発見した。このHN001株は、回分培養において $47^\circ C$ でグルコース培地から約 $3.3L-H_2 L-culture^{-1} h^{-1}$ と非常に速く水素を生産することができた[2]。

本研究では、HN001株を使った資源循環型エネルギー

製造技術の実用化を目指して、発酵温度、pH、デンプン濃度などデンプンからの発酵水素発生特性を調べ、擬似生ゴミから効果的に水素を生産することを試みたので、その結果を報告する。

2. 実験方法

使用したHN001株は嫌気性菌増菌・継代・保存用ABC半流動培地（栄研器材株式会社）の高層培地に植え付け、十分に増殖したものを実験に用いた。実験装置の概略を図1に示した。実験で発生したガスは1Nの水酸化ナトリウム溶液を用いて水上置換し、押し出された水酸化ナトリウム溶液の重量を水素発生量として測定した。実験条件は発酵槽体積860ml、攪拌速度200rpm、発酵液のpHはコントローラーで一定に保ち、温度もPID制御法により設定温度に保った。擬似生ゴミからの水素発生実験ではpH6.0、温度37°Cに設定した。これらの発酵実験は24時間行った。また、代謝産物は高速液体クロマトグラフィ（HITACHI 655-A）で分析した。



- ①温度コントローラー ②pHコントローラー
③ペリスタリックポンプ ④2N NaOH水溶液
⑤発酵槽 ⑥pH電極 ⑦ガスホルダー
⑧マグネチックスターラー ⑨電子天秤

図1. 実験装置の概略

デンプンからの水素発生特性を調べるためYNU嫌気培地を用いた。その組成は、イオン交換水500mlあたり、ペプトン：12.5g、粉末酵母エキス-S：11.0g、L-システイン塩酸塩：0.15g、チオグリコール酸：0.15gに可溶性デンプンを設定濃度になるように加えたものである。また、分光光度計（APEL PD-303）を用いて波長550nmにおけるOptical Density (OD) を測定し、それを発酵液中の菌体濃度の指標とした。擬似生ゴミからの水素発生では、市水

500mlに解凍した冷凍鶏ごぼうピラフ：25g、ニンジンとコーンとグリーンピースを含む冷凍ミックスベジタブル：25gをミキサーで粉碎ものだけを擬似生ゴミ培地とし、栄養源や還元剤は添加しなかった。魚のはらわたを加える際にはスーパーマーケットの鮮魚コーナーで廃棄された不特定の魚のはらわたを設定量添加し、擬似生ゴミと一緒にミキサーにかけた。

繰り返し回分式での擬似生ゴミからの水素発生では、10時間毎に発酵液を約80%抜き取り、抜き取った量と等しい量の新しい培地を供給する方法で培養を5回繰り返し、計50時間行った。培地は市水500mlに擬似生ゴミとして冷凍のあさり筍ごはん：25g、冷凍ミックスベジタブル：25gに、回分式での実験と同様に魚のはらわたを25g加えたものである。

なお、擬似生ゴミからの水素発生実験では、培地の滅菌操作は行わなかった。

3. 結果と考察

3. 1 デンプンからの水素発生特性

3. 1. 1 発酵温度の影響

この実験はpH6.0、デンプン濃度1.0%の条件で行い、発酵温度は32、37、41、45及び50°Cの5段階に設定した。最大水素発生速度は、図2のように37°Cにおいて最も速く約 $1.2 \text{ L-H}_2 \text{ L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$ となり、温度が上昇するにつれ遅くなった。図3には積算水素発生量に対する発酵温度の影響を示した。積算水素発生量も同様に、37°Cにおいて最も多く約 $2.9 \text{ L-H}_2 \text{ L-culture}^{-1}$ となり、温度が上昇するにつれ少なくなった。また、32、37、41°Cではデンプンはほぼ消費されていたが、45、50°Cと高温になるにつれてデンプン消費量は少なくなった。ODも同様に、32、37、41°Cでは高かったが、45、50°Cでは低くなった。これらのことから、45、50°Cの高温で積算水素発生量が少なく、最大水

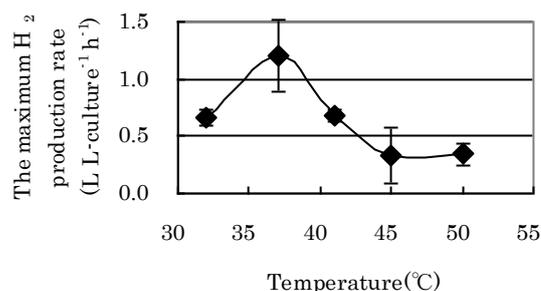


図2. 最大水素発生速度への発酵温度の影響
(条件：pH6.0、starch 1.0%)

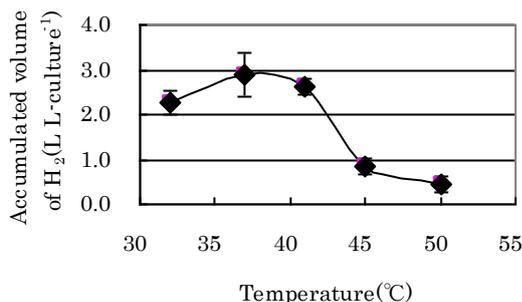


図3. 積算水素発生量への発酵温度の影響
(条件: pH 6.0, starch 1.0%)

素発生速度が遅くなったのは、HN001株は高温においてデンプンを利用することができず、増殖が抑制されたことが原因であると考えられる。

3. 1. 2 pHの影響

この実験は発酵温度37°C、デンプン濃度1.0%の条件で行い、pHは5.5、6.0及び6.5の3段階に設定した。最大水素発生速度は、図4のようにpH6.5において最も速く約1.8L-H₂ L-culture⁻¹ h⁻¹となり、pHが高いほど速くなる傾向があった。これはpHが高いほどODが高くHN001株の増殖が速かったためであると考えられる。また、積算水素発生量は図5に示すように、pHが低くなるほど多くなる傾向があった。谷生は、pHが低くなるとギ酸の酸化還元電位が水素の酸化還元電位より低くなるので、ギ酸が分解され

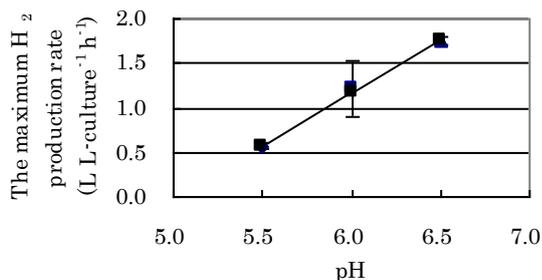


図4. 最大水素発生速度とpHの関係
(条件: 37°C, starch 1.0%)

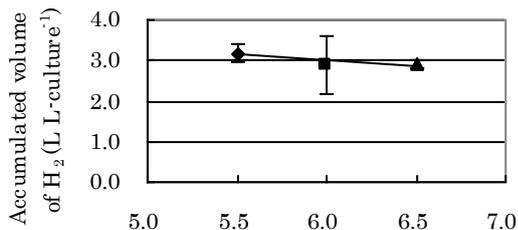


図5. 積算水素発生量とpHの関係
(条件: 37°C, starch 1.0%)

水素が生成され易くなると述べている[3]。したがって、pHが低くなると積算水素発生量が多くなったのは、生成されたギ酸が分解されたためであると考えられる。Taguchiらは、*Clostridium beijerinckii* AM21Bを用いたデンプンからの水素発生においてpHを5.0、5.5、6.0、6.5及び7.0の5段階に設定してpHの影響を調べたが、最大水素発生速度はpH6.5において最も速く、積算水素発生量はpH5.5において最も多かったことを報告している[4]。したがって、HN001株もAM21B株の水素発生特性と同様の傾向を示していると考えられる。

3. 1. 3 デンプン濃度の影響

この実験は発酵温度37°C、pH6.0の条件で行い、デンプン濃度0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0及び5.0%の8段階に設定した。最大水素発生速度は、図6のようにデンプン濃度1.5%まではデンプン濃度を高くすると速くなったが、1.5%以上では約1.5L-H₂ L-culture⁻¹ h⁻¹にとどまった。発酵液中のODを測定したところ、デンプン濃度が3.0%以上では一定となっており、菌体濃度が一定になったことがデンプンが高濃度において水素発生速度が速くならなかった一因と考えられる。また水素収率は図7に示すように、デンプン濃度が0.5%では0.32L-H₂ g-starch⁻¹と高かった。これ

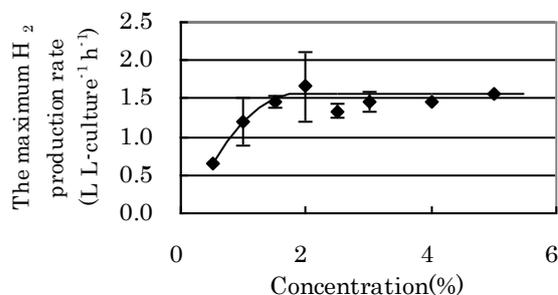


図6. 最大水素発生速度へのデンプン濃度の影響
(条件: 37°C, pH 6.0)

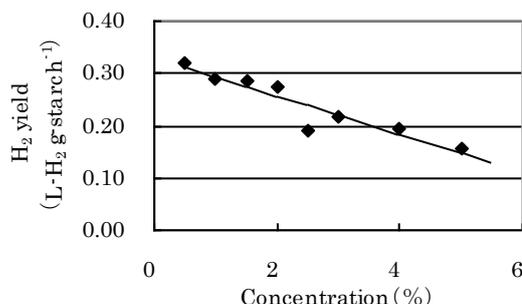


図7. 水素収率へのデンプン濃度の影響
(条件: 37°C, pH 6.0)

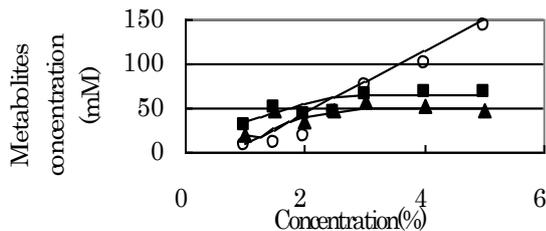


図8. 乳酸、酢酸、酪酸の生成量に対するデンプン濃度の影響

○Lactic acid ■Acetic acid ▲Butyric acid

はグルコース換算で2.3mol mol-glucose⁻¹の収率に相当する。しかし、デンプン濃度が高くなるにつれ、収率は直線的に低くなった。これは図8のように高濃度になるにつれ、酢酸や酪酸の生成が抑制され乳酸が生成され易くなったためである。このように乳酸の代謝が増える理由の究明は今後の課題である。

3. 2 擬似生ゴミからの水素発生

3. 2. 1 回分式での擬似生ゴミからの水素発生における魚のはらわた添加効果

谷生らは、*Enterobacter aerogenes*の水素発生において魚のはらわたが良質な窒素源であることを報告している[5]。そこで、HN001株において、鶏ごぼうピラフとミックスベジタブルで作った擬似生ゴミ培地に魚のはらわたを添加し、魚のはらわた添加効果を調べた。図9に水素発生量に対する魚のはらわた添加効果を示す。魚のはらわたを加えなかったときには質重量1kgの擬似生ゴミあたり22Lの水素発生しかなかったのに、はらわたを25g加えた方の積算水素発生量は66L-H₂ kg wet⁻¹と増加した。これより、魚のはらわたを加えると積算水素発生量が増加することがわかった。ちなみに鶏ごぼうピラフとミックスベジタブルを含まない魚のはらわただけの培地からは水素は生成されなかった。図10に、はらわたを添加した培地と添加しなかった培地の主な代謝産物の生成比率を示す。はらわたを加えなかったときには乳酸の生成比率が40%以上と高く、加えたときには乳酸は8%しかなく、酢酸と酪酸の生成比率が高くなっていることがわかった。したがって、はらわたの添加効果は窒素源として働くだけではないと考えられる。



①、②、③の総括反応式に見られるように、乳酸が生成されるときには水素は伴わず、酢酸と酪酸が生成されるときには水素を伴うので、はらわたを加えたときに水素発生量が多くなったのは、はらわたに乳酸の生成を抑制する何らかの物質が含まれているからであろう。ところで、鉄イオンは水素発生に影響を及ぼすことが報告されているが[6],[7]、HN001株は鉄イオンを添加すると乳酸、ギ酸の生成量を減らし、また酢酸、酪酸、エタノールの生成量を増やし、その結果水素収率が向上した[2]。魚のはらわたには魚の血液が含まれ、赤血球には鉄イオンが多量に含まれるので、はらわたを添加することによって水素発生量が多くなった理由のひとつは、血液中の鉄イオンが影響したと考えられる。

また、魚のはらわたの添加量を25、50、75、100g L-water⁻¹と変えたときの最大水素発生速度の変化を図11に示す。最大水素発生速度は、はらわたを加えなかったときには0.3L-H₂ L-culture⁻¹ h⁻¹、25g加えると1.0L-H₂ L-culture⁻¹ h⁻¹、75g加えたときに最も速く1.2L-H₂ L-culture⁻¹ h⁻¹であった。しかし、25gから100gと添加量を多くしても最大水素発生

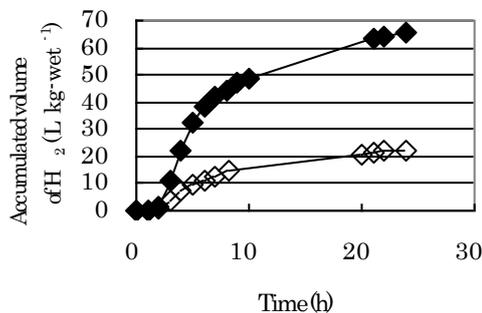


図9. 水素発生への魚のはらわた添加効果

◆With entrails ◇Without entrails

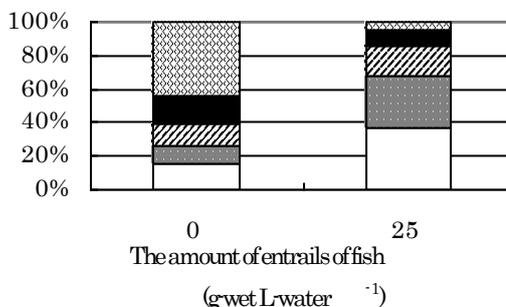


図10. 代謝産物への魚のはらわた添加効果

□ Acetic acid ■ Butyric acid ▨ Ethanol
 ■ Formic acid ▩ Lactic acid

速度はあまり速くならない傾向がみられた。

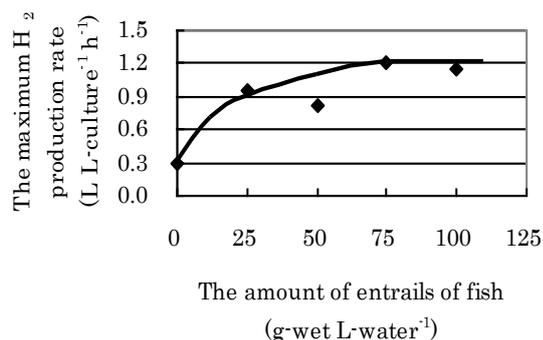


図11. 最大水素発生速度への魚のはらわた添加効果

3. 2. 2 繰り返し回分式での擬似生ゴミからの水素発生

Yokoiらは、*Enterobacter aerogenes* HO-39と*Clostridium butyricum* IFO13949の混合培養でサツマイモ残渣から繰り返し回分式で水素発生を行い、 $2.7\text{mol mol-glucose}^{-1}$ の水素収率を得たことを報告している[8]。我々もHN001株を用いて繰り返し回分式で擬似生ゴミからの水素発生を行った。その結果を図12に示す。各回の積算水素発生量にはばらつきがあるが、平均 $71\text{L-H}_2\text{ kg-wet}^{-1}$ であった。これは水素収率 $2.3\text{mol mol-glucose}^{-1}$ に相当する。ただ、20~30時間の3回目で $110\text{L-H}_2\text{ kg-wet}^{-1}$ の発生量が得られた理由については今後検討する必要がある。

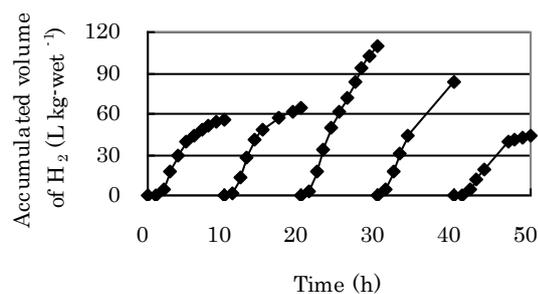


図12. 繰り返し回分式での水素発生

4. 結論

嫌気性細菌HN001株を用いた実験により、以下の結論を得た。

- HN001株はデンプンを基質として水素を生産することができる。至適温度は 37°C であり、 $\text{pH}6.0$ 、デンプン濃度 1.0% のとき最大水素発生速度は $1.2\text{L-H}_2\text{ L-culture}^{-1}\text{ h}^{-1}$ であ

った。発酵温度が 50°C ではデンプンを分解利用できず、水素はほとんど生成されなかった。また、デンプン濃度を高くすると乳酸を多く生成し、水素収率が低くなることがわかった。

- 擬似生ゴミからの水素発生実験において、魚のはらわたを栄養源として添加すると、酢酸と酪酸が多く、また乳酸が少なく生成され、水素発生量が3倍多くなった。水素発生速度も魚のはらわたを加えなかったときの速度に比べ4倍ほど速くなったが、魚のはらわたを多く添加しても速くはならない傾向があった。これらより、魚のはらわたが水素生産に非常に効果があることがわかった。

- 繰り返し回分式での水素発生実験から質量 1kg の擬似生ゴミから平均 71L の水素を生産できることがわかった。

参考文献

- 環境省ホームページ：一般廃棄物の排出及び処理状況等（平成15年度実績）について
<http://www.env.go.jp/press/press.php?serial=6512>
- 西山大紀、谷生重晴：“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 171-174 (2005)
- 谷生重晴：“バクテリアはなぜ水素を発酵で発生するのか、またエネルギー生産利用における問題点はなにか” 水素エネルギーシステム, Vol.29, 2-6 (2004)
- F.Taguchi, J. D. Chang, S. Takiguchi and M. Morimoto：“Efficient Hydrogen Production from Starch by a Bacterium Isolated from Termites” Journal of Fermentation and Bioengineering, Vol.73, 244-245 (1992)
- 谷生重晴、藤井義浩：“台所の生ゴミを利用したバクテリアによる水素生産” 水素エネルギーシステム, Vol.20, 10-15 (1995)
- Y. J. Lee, T. Miyahara and T. Noike：“Effect of Iron Concentration on Hydrogen Fermentation” Bioresource Technology, Vol.80, 227-231 (2001)
- Y. Jhang, G. Liu and J. Shen：“Hydrogen Production in Batch Culture of Mixed Bacteria with Sucrose Under Different Iron Concentrations” International Journal of Hydrogen Energy, Vol.30, 855-860 (2005)
- H. Yokoi, R. Maki, J. Hirose and S. Hayashi：“Microbial Production of Hydrogen from Starch-Manufacturing Wastes” Biomass and Bioenergy, Vol.22, 389-395 (2002)