

食品廃棄物の水素発酵におけるC/N比及び基質濃度の影響

安田圭吾・谷生 重晴

横浜国立大学教育人間科学部

240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台79-5

Effect of C/N and Substrate Concentration on Fermentative Hydrogen Production from Food Waste

Keigo YASUDA and Shigeharu TANISHO

Faculty of Education and Human Sciences,

Yokohama National University

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

Fermentative hydrogen production from artificial food waste by batch cultivation under a pH of 6.0 and a temperature of 37°C was studied by using mesophilic bacterium HN001. The aim of this study is to investigate the effect of the ratio between carbon and nitrogen concentration (C/N) and substrate concentration on hydrogen fermentation. C/N was changed from 9 to 23 by adding entrails of fish to the artificial food waste because entrails contain lots of Nitrogen. Hydrogen production rate and hydrogen yield increased from 0.3 L L-culture⁻¹ h⁻¹ to 1.2 L L-culture⁻¹ h⁻¹ and from 22 L kg-wet⁻¹ to 67 L kg-wet⁻¹ respectively when C/N decreased from 23 to 20. Volatile fatty acid also changed, acetate and butyrate increased and lactate decreased, by decreasing C/N. Hydrogen yield was relatively low though hydrogen production rate did not decrease when yeast extract and casamino acids were used as nutrients instead of entrails. However, it was improved by adding yeast extract, casamino acids and iron. This result indicates that entrails could be utilized as not only nitrogen source but also mineral source for hydrogen fermentation. Hydrogen productivity was also affected by substrate concentration. Hydrogen production rate increased along with the increase of substrate concentration from 100 g-wet L⁻¹ to 300 g-wet L⁻¹. On the other hand, hydrogen yield on 500 g-wet L⁻¹ decreased compared with them between 100 g-wet L⁻¹ and 300 g-wet L⁻¹.

Key words: hydrogen production, fermentation, food waste, C/N, substrate concentration

1. 緒言

水素の製造方法には化石燃料の改質、水の電気分解、副生水素の利用によるものなどがあるが、原油高騰や地球温暖化問題に直面している現在、水素をカーボンニュートラルの特性を持つバイオマスから製造することが注目されている。特に含水率の高いバイオマスについては温和な温度条件で生産できる生物学的生産方法が好

ましいと考えられる。水素の生物学的生産方法には水素発酵と光合成による水素生産がある。水素発酵は、嫌気性細菌によってグルコース、スクロース、デンプンなどの糖質が代謝されることにより水素を生産する技術であり、光合成による水素生産と比較して水素発生速度が速い、装置も小さくて済む、昼夜を問わずに水素を生産できるなどの利点がある。しかし、実用化にあたっては賦存量が多く食糧と競合しない食品廃棄物や農産物非

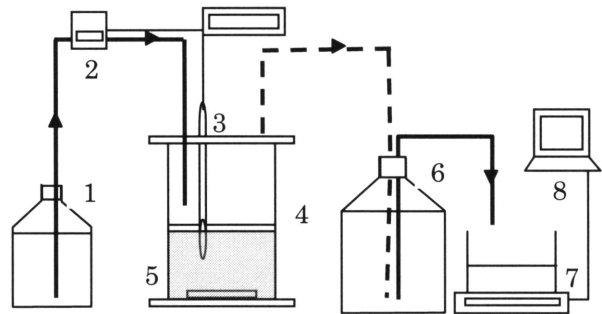
食用部などの未利用バイオマスを利用することが望まれる。食品廃棄物の水素発酵では果物類や野菜類が水素発酵の基質として利用できることが報告されている[1]。また連続発酵において、食品廃棄物の組成は変えず供給量や供給速度を変えてその影響について調べられている[2-4]。しかし、実際に排出される食品廃棄物は排出源や時間帯によって性状が異なることが予想される。中村は厨芥の元素組成を分析した結果、炭素と窒素の割合(C/N比)は、種類別で見ると植物性厨芥ではC/N=22.6、動物性厨芥ではC/N=10.5、排出源別で見ると家庭系厨芥ではC/N=18.8、事業系厨芥ではC/N=13.9であり、排出源によって性状が異なることを報告している[5]。したがって食品廃棄物を水素発酵の原料として利用することを念頭に置くと、水素発生に対する食品廃棄物の性状の影響を知る必要がある。また、水素発酵において有機酸を含む廃液の処理が問題である。そこで廃液量を削減するためには基質濃度を高くすることで発酵槽の単位体積あたりの発生量を向上させることが挙げられる。

そこで我々は、擬似生ごみに魚のはらわたを添加することによりC/N比を変化させ、回分発酵においてC/N比が水素発生に及ぼす影響を検討した。また、魚のはらわたと合成培地で用いられている窒素源及び栄養源の効果の比較をした。そして擬似生ごみ添加量を変化させ、水素発生に対する基質濃度の影響を調べた。本論文はそれらの結果について報告する。

2. 実験方法

2.1. 実験条件

本研究ではスクリーニングにより単離された水素発生細菌HN001株をABCM半流動培地(栄研器材)約15 mlに植菌し前培養したものをを用いた。Fig.1に使用した実験装置の概略図を示す。発酵槽体積は860 ml、発酵液体積は500 mlであった。温度は37 °Cに保ち、pHはガラス電極(東京硝子器械 FD-02)により測定して1 M NaOH水溶液をペリスタリックポンプで自動的に供給し発酵液をpH 6.0に保った。また発酵液の攪拌はマグネチックスターラーで行い、200 rpmに保った。発生したガスは1 M NaOH水溶液で満たされたタンクに捕集され、押し出されたNaOH水溶液を水素発生量として電子天秤により計量した。



1. 1M NaOH水溶液 2. ペリスタリックポンプ
3. pH電極 4. 発酵槽 5. ヒーター
6. 1M NaOH水溶液 7. 電子天秤 8. PC

Fig.1 実験装置の概略図

実験に用いた基質は冷凍食品の調理済み五目飯とコーン、ニンジン、グリーンピースを含むミックスベジタブルを解凍したものが用いられ、添加濃度はそれぞれ50 g-wet L⁻¹であり、計100 g-wet L⁻¹加えられた。またそれらにスーパーマーケットから頂戴した魚のはらわたを25、50、75、100 g-wet L⁻¹加えた。また栄養源の比較にはカザミノ酸 10 g L⁻¹、粉末酵母エキス 10 g L⁻¹、FeCl₃ 10 g L⁻¹が魚のはらわたの代わりに加えられた。基質濃度の影響を調べる際は、魚のはらわたを50 g-wet L⁻¹にして調理済み五目飯及びミックスベジタブルを等量ずつ計100、200、300、500 g-wet L⁻¹加えた。それらを水道水で希釈し、ミキサーで粉砕したものを使用した。

2.2. 分析方法

C、H、Nの比率及びC/N比は元素分析装置(Elementar, vario EL III)により分析した。発酵液中の有機酸及びアルコールは高速液体クロマトグラフ分析装置(カラム:日立化成工業, Gelpack GL-C610H-S)により分析した。また発酵液中の鉄分は原子吸光分光光度計(HITACHI AA-660)により分析した。

3. 結果と考察

3.1. 食品サンプルの元素分析

Table.1に食品サンプルの元素分析結果を示す。五目飯とミックスベジタブルにおける炭素の比率はニンジンが最小で38.6%、トウモロコシが最大で44.2%、窒素の比率はニンジンが最小で1.0%、グリーンピースが最大で3.8%、水素の比率はニンジンが最小で

6.5%からトウモロコシが最大で7.1%であった。またC/Nには大きな違いがみられ、五目飯はC/N=31.9、ニンジン38.1とC/Nは高かったが、トウモロコシはC/N=19.4、グリーンピースはC/N=11.1であり五目飯、ニンジンに比べ低かった。また魚のはらわたは窒素含有率が6.8%と高く、C/N比も他の食品サンプルと比較して非常に低いことがわかる。これにより魚のはらわたが窒素源として有効である可能性が高いことが示唆された。

Table.1 食品サンプルの元素組成

		C	N	H	C/N
		%			
fried rice		42.23	1.324	6.912	31.90
	corn	44.21	2.278	7.108	19.41
vegetables	carrot	38.55	1.013	6.500	38.06
	green pea	42.26	3.818	6.871	11.07
entrails		49.91	6.760	8.106	7.382

3.2. 水素発生に対するC/N比の影響

Fig.2 に最大水素生産速度に対するC/N比の影響を示す。最大水素発生速度とは回分発酵において水素発生速度が最も速くなった時点の1時間当たりの発生量である。最大水素生産速度はC/N=23のとき0.3 L L⁻¹ culture⁻¹ h⁻¹であった。しかし、魚のはらわたを擬似生ごみに添加することによりC/Nを低くすると、最大水素生産速度はC/N=20のとき1.0 L L⁻¹ culture⁻¹ h⁻¹、C/N=14のとき0.9 L L⁻¹ culture⁻¹ h⁻¹、C/N=11及び9のとき1.2 L L⁻¹ culture⁻¹ h⁻¹であり改善された。しかし、C/N比が減少しても最大水素発生速度に大きな違いはみられなかった。Fig.3に水素収量に対するC/N比の影響を示す。水素収量はC/N=23のとき22.4 L kg⁻¹ wet⁻¹、C/N=20のとき67.0 L kg⁻¹ wet⁻¹、C/N=14のとき61.7 L kg⁻¹ wet⁻¹、C/N=11のとき65.3 L kg⁻¹ wet⁻¹、C/N=9のとき75.5 L kg⁻¹ wet⁻¹であった。ただし、水素収量は白米とミックスベジタブル1 kgあたりであり、魚のはらわたの添加量は加味されていない。これより擬似生ごみに魚のはらわたを添加しC/N比が低くなることで水素収量が向上したことがわかる。Fig.4に酢酸、酪酸、乳酸の生成量に対するC/Nの影響を示す。酢酸及び酪酸はC/N=23のときそれぞれ37 mM、26 mMであり、C/N比が低くなるとそれぞれ60 mM程度まで向上した。一方、乳酸はC/N=23のとき103 mMであり生成量は多かったがC/N=20になると6 mMまで急激に低下した。そしてC/N

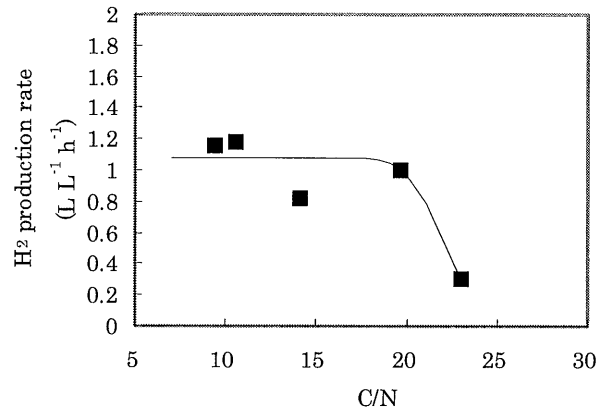


Fig.2 水素発生速度に対するC/N比の影響

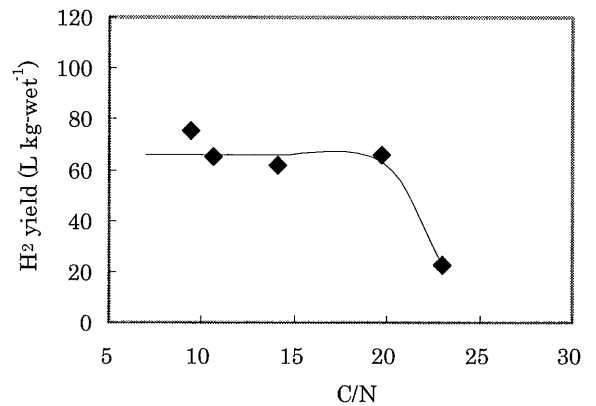


Fig.3 水素収量に対するC/N比の影響

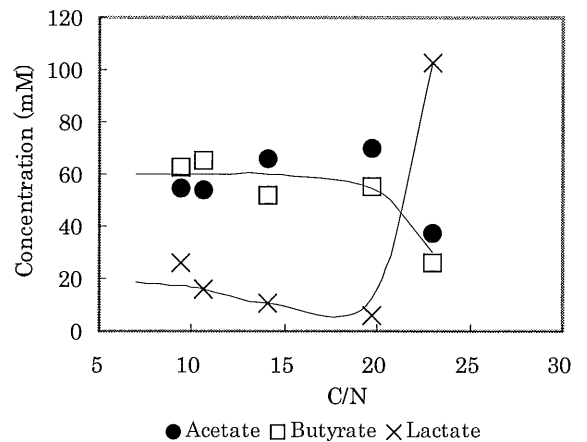
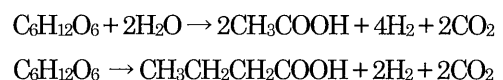


Fig.4 酢酸、酪酸、乳酸の生成量に対するC/N比の影響

比が減少しても乳酸生成量は低く保たれていた。以下に一般的な水素生産菌のグルコースからの酢酸、酪酸及び乳酸の総括反応式を示す。





グルコース1 molから酢酸2 molが生成される場合、理論的に最大の水素収率である4 mol-H₂ mol-glucose⁻¹になる。またグルコースから酪酸が生成される場合は2 mol-H₂ mol-glucose⁻¹になる。しかし、乳酸が生成されるとき水素は生成されない。Linらは*Clostridium pasteurianum*が優先的な細菌群を用いてスクロースを基質としてC/Nを40から130までの4段階にしてその影響を調べ、C/N比は水素発酵に影響を及ぼし、C/N=47において水素収率が4.8 mol-H₂ mol-sucrose⁻¹に向上したことを報告している[5]。これより、C/N比が水素発酵に影響を及ぼすことがわかる。本実験においてもC/N比が低下したことで水素発生を伴う酢酸及び酪酸に代謝がシフトしたため水素発生能が改善されたと考えられる。また中村は厨芥の元素組成を分析した結果、家庭系厨芥ではC/N=18.8、事業系厨芥ではC/N=13.9であることを報告しており[6]、本実験ではC/N=20以下では水素発生能が向上したので、実際に排出される食品廃棄物も水素発酵に適した基質になることが示唆された。

3.3. 栄養源の比較

Fig.5 に栄養源を変えた場合における水素発生速度の比較を示す。擬似生ごみ（白米とミックスベジタブルのみ）と擬似生ごみにFeCl₃を添加した場合、水素発生速度はそれぞれ0.3 L L⁻¹ culture⁻¹ h⁻¹、0.2 L L⁻¹ culture⁻¹ h⁻¹であった。擬似生ごみに窒素源及び栄養源としてカザミノ酸と酵母エキスを加えた場合、またそれらにFeCl₃を加えた場合はそれぞれ1.2 L L⁻¹ culture⁻¹ h⁻¹、1.4 L L⁻¹ culture⁻¹ h⁻¹であった。魚のはらわたを添加した場合は1.2 L L⁻¹ culture⁻¹ h⁻¹であり、カザミノ酸と酵母エキスを加えた場合と同程度であった。水素発生速度は菌体量に比例するので、魚のはらわたが菌体増殖のための栄養源として有効であることが明らかになった。Fig.6 に栄養源を変えた場合における水素収量の比較を示す。擬似生ごみ（白米とミックスベジタブルのみ）と擬似生ごみにFeCl₃を添加した場合、水素発生速度はそれぞれ22.4 L L⁻¹ culture⁻¹ h⁻¹、30.9 L L⁻¹ culture⁻¹ h⁻¹であった。擬似生ごみに窒素源及び栄養源としてカザミノ酸と酵母エキスを加えた場合、またそれらにFeCl₃を加えた場合はそれぞれ55.1 L L⁻¹ culture⁻¹ h⁻¹、70.8 L L⁻¹ culture⁻¹ h⁻¹であった。魚のはらわたを添加した場合は67.0 L L⁻¹ culture⁻¹ h⁻¹であり、カザミノ酸、酵母エキス、FeCl₃を加えた場合と同程度であった。ところで、水素発

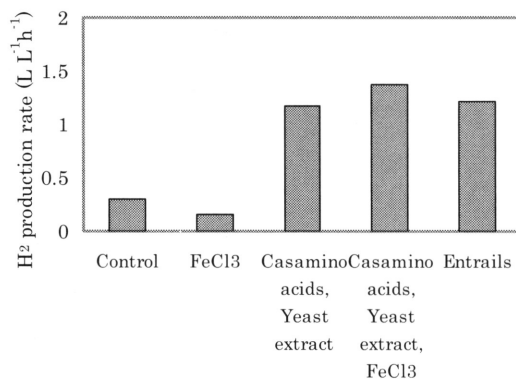


Fig.5 水素発生速度の比較

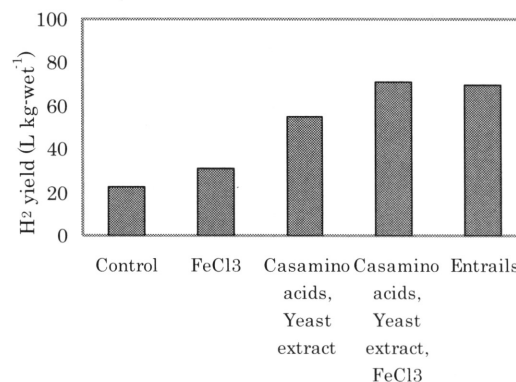


Fig.6 水素収量の比較

生細菌は種々の経路で水素を発生しているが、ある経路では電子伝達にはフェレドキシンが関与しており、最終的にはヒドロゲナーゼが触媒し水素が生成される[7]。Schonheitらは*Clostridium pasteurianum*を用いて培地中の鉄濃度が10 μM以下であるとフェレドキシン合成が抑制されることを報告している[8]。Junellsらは*Clostridium acetobutylicum*のヒドロゲナーゼの比活性が培地中の鉄濃度が0.2 mg L⁻¹の制限下では40%低下したことを報告している[9]。Leeらの実験ではスクロースを基質にして塩化鉄(II)を添加することで水素収率が向上した[10]。Yangらの実験でもデンプンを基質にして硫酸鉄(II)を添加することにより水素収率が向上した[11]。また、原子吸光法により魚のはらわたを添加した発酵液中の鉄分を分析した結果、2.6 mg L⁻¹含まれていた。したがって、魚のはらわたを添加したことによって水素収量が増加したのは、はらわたに含まれている鉄分が水素発生に関与するフェレドキシンやヒドロゲナーゼに影響したことが考えられる。以上より、魚のはらわたは水素発酵において窒素源として有用であるとともに鉄分を供給できるミネラル源であることも示唆された。

3.4. 水素発生に対する基質濃度の影響

Fig.7に水素発生速度に対する基質濃度の影響を示す。水素発生速度は基質濃度が100 g-wet L⁻¹のとき0.8 L L-culture⁻¹ h⁻¹、200 g-wet L⁻¹のとき1.1 L L-culture⁻¹ h⁻¹、300 g-wet L⁻¹のとき1.3 L L-culture⁻¹ h⁻¹であり、基質濃度が高くなるにつれて上昇した。しかし基質濃度が500 g-wet L⁻¹になると水素発生速度は1.2 L L-culture⁻¹ h⁻¹であった。

Fig.8に水素収量に対する基質濃度の影響を示す。水素収量は基質濃度が100 g-wet L⁻¹のとき59.1 L kg-wet⁻¹、200 g-wet L⁻¹のとき59.6 L kg-wet⁻¹、300 g-wet L⁻¹のとき57.6 L kg-wet⁻¹であり、基質濃度に関係なくほぼ一定であった。しかし基質濃度が500 g-wet L⁻¹になると水素収量は42.9 L kg-wet⁻¹になり低下した。Fig.9に有機酸生成に対する基質濃度の影響を示す。酢酸は基質濃度が100 g-wet L⁻¹から300 g-wet L⁻¹までは基質濃度が高くなるにつれて生成量が増加し、300 g-wet L⁻¹のとき143 mMであった。しかし、500 g-wet L⁻¹になると136 mMになり300 g-wet L⁻¹のときのそれと同程度であった。酪酸は基質濃度の上昇とともに生成量も増加した。乳酸生成量はどの基質濃度

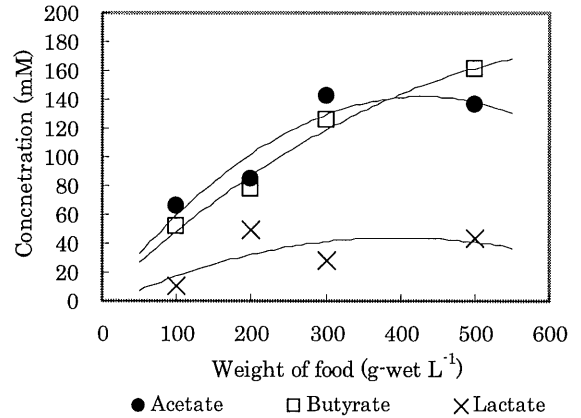


Fig.9 酢酸、酪酸、乳酸の生成量に対する疑似生ごみ添加量の影響

においても酢酸及び酪酸と比較して少なかった。高木らは水素発生細菌群による水素発酵における固形物濃度の影響を調べ、非水溶性デンプンを基質にした場合において固形物濃度が32%以上では水素生成活性が低くなること、またセルロースの割合が高くなることによっても水素生成活性が低くなることを報告している[12]。水野らはおからを基質にして水素発生に対する固形物濃度の影響を調べ、積算水素発生量に対しては固形物の影響はみられなかったが、水素生成活性は固形物濃度が9.2%になると低下したことを報告した[13]。Shinらは生ごみからの水素発酵におけるVS濃度の影響を調べ、VS濃度が6 g L⁻¹において水素収率は1.8 mol mol-hexose⁻¹で最大になり、VS濃度が8 g L⁻¹以上では水素収率が低下したことを報告した[14]。本実験においても、300 g-wet L⁻¹程度までであれば水素収量は低下しなかった。しかし500 g-wet L⁻¹になると水素生成活性は低下したのは、疑似生ごみにはセルロースが含まれているので発酵液中の固形物濃度が増加したことが一因であると考えられる。

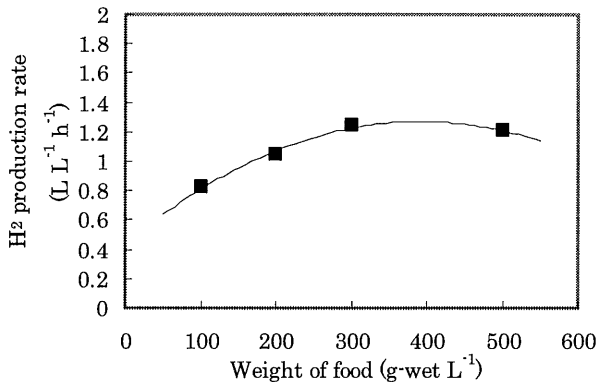


Fig.7 水素発生速度に対する疑似生ごみ添加量の影響

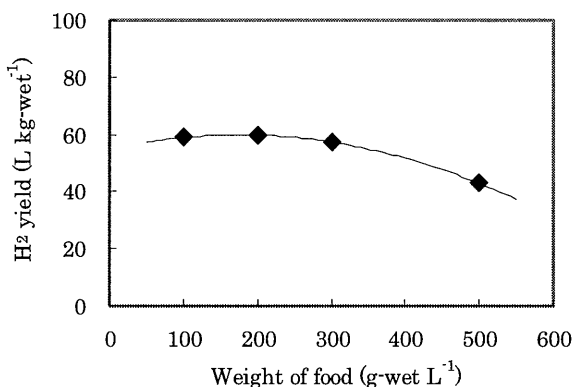


Fig.8 水素収量に対する疑似生ごみ添加量の影響

4. 結論

疑似生ごみを用いた水素発酵におけるC/N比の影響、栄養源の比較、基質濃度の影響を調べた結果、以下の結論を得た。

C/N=20以下では酢酸及び酪酸の生成量が増加し、乳酸の生成量が減少したことにより、水素発生速度及び水素収量が向上した。これより食品廃棄物の水素発酵においてC/N比は水素発生に影響を及ぼす一因であることがわかった。

窒素源及び栄養源として魚のはらわたとカザミノ酸、酵母エキス、鉄イオンを比較した結果、魚のはらわたには鉄分も含まれており水素発酵において窒素源としてだけでなくミネラル源としても有効であることが示唆された。

基質濃度を高くすることにより水素発生速度は速くなったが水素収量は低下したことから、基質濃度は300 g-wet L⁻¹程度が至適であることがわかった。

参考文献

1. 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)
2. S-K. Han, H-S. Shin：“Biohydrogen production by anaerobic fermentation of food waste” *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol.29, 569-577 (2004)
3. 水野修、大原健史、野池達也：“嫌気性細菌による食品加工廃棄物からの水素生成”土木学会論文集 No.573/VII-4, 111-118 (1997)
4. 河野孝志、和田克士、李玉友、野池達也：“複合基質からの嫌気性水素発酵に及ぼす基質濃度とpHの影響”水環境学会誌 Vol.27, 473-479 (2004)
5. C. Y. Lin and C. H. Lay：“Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora” *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol.29, 41-45 (2004)
6. 中村一夫：“厨芥類を中心とする今後のごみ処理システムの方向性について”エネルギー・資源, Vol.22, 224-228 (2001)
7. 谷生重晴：“バクテリアの発酵水素発生機構”植田充美、近藤昭彦監修 エコバイオエネルギーの最前線—ゼロエミッション型社会を目指して—シーエムシー出版 154-162 (2005)
8. P. Schönheit, A. Brandis, R.K. Thauer：“Ferrdoxin degradation in growing *Clostridium pasteurianum* during period of iron deprivation” *Arch Microbiol*, Vol.120, 73-76 (1979)
9. AM. Junells, R. Janati-Idrissi, H. Petitdemange, R. Gay：“Iron effect of acetone-butanol fermentation” *Current Microbiology*, Vol.17, 299-303 (1988)
10. YJ. Lee, T. Miyahara, T. Noike：“Effect of iron concentration on hydrogen fermentation” *Bioresource Technol*, Vol.80, 227-231 (2001)
11. H. Yang, J. Shen：“Effect of ferrous iron concentration on anaerobic bio-hydrogen production from soluble starch” *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol.31, 2137-2146 (2006)
12. 高木啓行、宮原高志、我妻貞男、野池達也：“嫌気性細菌を用いた水素生成に及ぼす固形物濃度の影響”工業用水, No.484, 26-32 (1999)
13. 水野修、大原健史、野池達也：“嫌気性細菌による食品加工廃棄物からの水素生成”土木学会論文集, No.573/VII-4, 111-118 (1997)
14. H-S. Shin, J-H. Youn, S-H. Kim：“Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis” *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol.29, 1355-1363 (2004)