

# 嫌気性細菌による糖類排水の水素発酵特性の比較

沈 建権<sup>1</sup>・李 玉友<sup>2</sup>・野池達也<sup>3</sup>

<sup>1</sup>学生会員 工修 東北大学博士後期課程学生 工学部土木工学科 (〒980-77仙台市青葉区荒巻字青葉)

<sup>2</sup>正会員 工博 東北大学助教授 工学部土木工学科 (〒980-77仙台市青葉区荒巻字青葉)

<sup>3</sup>正会員 工博 東北大学教授 工学部土木工学科 (〒980-77仙台市青葉区荒巻字青葉)

本論文は、嫌気性細菌による糖類排水の水素発酵特性に及ぼす基質の種類と水理学的滞留時間(HRT)の影響を解明することを目的として、グルコース、ラクトース、ショ糖及びデンプンをそれぞれ基質とし、HRTを変化させた連続実験を行い、動力学的解析を加えたものである。各種糖類排水に対して水素発酵のための最適HRTはそれぞれ6.0~8.0時間の範囲にあった。この条件においてグルコース、ラクトース、ショ糖及びデンプンからの水素収率はそれぞれ9.33 mmol-H<sub>2</sub>/g-glucose, 11.01 mmol-H<sub>2</sub>/g-lactose, 9.29 mmol-H<sub>2</sub>/g-sucroseおよび10.03 mmol-H<sub>2</sub>/g-starch であって、COD除去率はそれぞれ30~40%程度であった。バイオガス中の水素含有率は40%程度に達していた。水素発酵反応の化学量論式および動力学定数も決定された。

**Key Words:** anaerobic treatment, acidogenesis, hydrogen fermentation, hydraulic retention time (HRT), kinetics, glucose, lactose, sucrose, starch, stoichiometric equation

## 1. はじめに

近年、地球規模環境問題に対応するため、排水、廃棄物処理技術の開発において省資源、省エネルギー及び有価資源の回収利用といった新しい視点がより重要視されるようになってきている。そのため、嫌気性メタン発酵法による様々な有機性廃棄物の処理プロセスが広く用いられると同時に、バイオマスから水素を生産する研究も注目を浴びている。特に水素生成能の高い微生物を用いた有機廃棄物からの水素発酵は環境浄化だけでなく、クリーンエネルギーの生産にも貢献できるので、今後注目すべき魅力のある技術と考えられる<sup>1)</sup>。

従属栄養性微生物による水素発酵はそのエネルギー源に基づき、光に依存する光合成細菌と光に依存しない嫌気性発酵細菌に分けられるが、両方とも嫌気性細菌である<sup>2),3)</sup>。その中で光合成細菌は一般的に有機酸を基質としたものが多く、しかも光照射が必要

なので、複雑な有機性排水処理への直接適用はいろいろ困難がある。それに比較して、嫌気性発酵細菌による水素発酵は基質利用範囲が広いだけでなく、増殖速度が早く、しかも光照射を必要としないなどの利点があるので、排水処理への適用が期待できる。そのため、嫌気性発酵細菌を用いた有機物の水素発酵に関する基礎的な研究は活発に行われている<sup>4)-5)</sup>。しかし、これまでの研究は水素生成能の高い細菌の単離とその代謝特性の解明に関するものが多く、連続実験に基づく工学的検討が欠けている。また、普通の嫌気性消化の酸生成種汚泥を用いた場合、水素ガスの生成量が少なく<sup>6),7)</sup>、また滞留時間が少し長い条件では水素資化性メタン生成細菌及び硫酸塩還元細菌の増殖により生成した水素がほとんど消費されてしまう<sup>8)</sup>。従って、排水からの水素発酵法を確立するためには、水素生成能とCOD除去能の高い安定的混合培養系の構築が必要不可欠である。筆者ら<sup>9),10)</sup>は独自に集積培養した特殊嫌気性混合培養系を用いて実験的研

**Table 1** Composition of substrate.

Components	Concentration (mg/l)
Carbohydrate	11700
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	3770
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	125
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2000
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	5
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	100
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	15
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.125
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	25

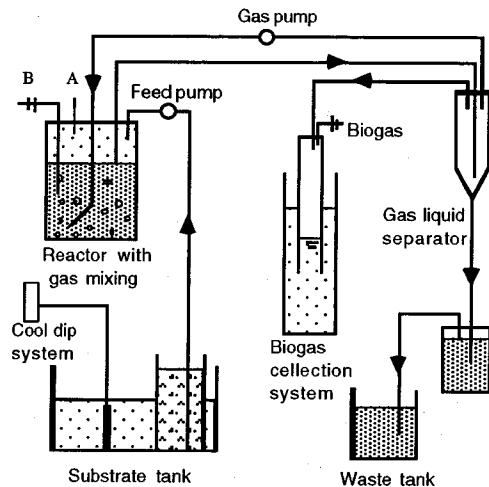
究を行い、有機性排水からの水素生産が可能であることを見出した。この混合培養系の有用性を多くの有機物質で検証すべく、様々な炭水化物に対するその水素発酵特性を把握することが必要である。

本研究では、異なる糖類基質の水素発酵特性を解明するために、多糖類の代表としてデンプン、二糖類の代表としてショ糖とラクトース、単糖類の代表としてグルコースをそれぞれ選択して実験用の基質とした。独自に集積培養した特殊混合細菌系を用いた各基質の水素発酵特性についてHRTを変化させた連続実験を行い、水素生成収率、COD除去率及び有機酸などの代謝産物の生成を把握し、比較検討を行った。また、各基質からの水素発酵の化学量論式と動力学定数も決定された。

## 2. 実験材料および方法

### (1) 種汚泥

水素発酵プロセスを構築するために、水素生成能の高い混合微生物系を発見することが重要である。普通の嫌気性消化汚泥を用いると、水素生成細菌と水素利用細菌間の水素伝達が起こりやすいので、水素の回収が難しい。本研究では、まず嫌気性消化汚泥以外の微生物種を求めた。そして、大豆粕の水素発生によって水素爆発事故を引き起こしたサンプルに水素生成能の高い細菌群が存在することが認められたので<sup>10</sup>、それを種微生物として集積培養を行った。本研究に用いた種汚泥は、集積培養で得られた混合微生物系を嫌気性ケモスタット型反応槽に移し



A: Gas sampling port, B: Mixed liquor sampling port

**Fig. 1** The continuous flow experimental apparatus with chemostat-type reactor.

て、Table 1に示した混合基質を連続的に投入して、HRT 1日、温度35 °Cの条件で、3ヶ月間馴養したものである。

### (2) 実験装置及び基質組成

Fig.1に実験装置の概略図を示す。反応槽は硬質塩化ビニル製円筒型反応器を用いて連続的に基質を流入させ、発酵反応で発生したバイオガスをポンプで循環させることによって反応槽内を攪拌し、消化混合液の連続的引き抜きが行なえる嫌気性ケモスタット方式である。反応槽の総容積は1.4 Lで、有効容積が1.0 Lである。発酵反応で生成したバイオガスは酸性飽和食塩水による水上置換で収集した。合成基質はマイクロチューブポンプを用いて、連続的に投入した。合成基質貯留槽は3°Cに保った。反応槽内の温度を一定に保つために、各反応槽を35°Cの恒温箱に設置した。

Table 1 に本研究に用いた基質の組成を示す。炭水化物の種類としてはグルコース、ラクトース、ショ糖、デンプンをそれぞれ用いた。各種の基質に含まれる炭水化物の濃度はいずれも11.7 g/lであった。またそれぞれの基質に対して、反応槽の滞留時間(HRT)は3.0, 4.0, 4.8, 6.0, 12.0, 24.0 hr の7段階に変化させて実験を行った。反応槽は35°Cの恒温箱に設置した。各実験条件の反応槽に対して定常状態に達したことを確認するために、ガス生成量、ガス組成、揮発性脂肪酸(volatile fatty acid, 以下VFAと

する)濃度及びCOD濃度などに関して、1週間に1回の定期的測定を行なった。測定値の変動範囲が平均値の5%以下になった時、定常状態が達成されたと見なした。定常状態における5回測定の実験データを平均して各HRT条件での代表値とした。各条件でそれぞれ約4ヶ月間連続運転を行なった。

### (3) 測定項目及び分析方法

基質であるグルコース、ラクトース、ショ糖、デンプン濃度はフェノール硫酸法<sup>11)</sup>により測定した。生成物である揮発性脂肪酸(VFA)は、FID・ガスクロマトグラフィー(Shimazu, GC-8A, ガラスカラム, 充填剤 Greensorb T KOCL-FM, ヘリウムキャリアガス1.6 kg/cm<sup>2</sup>)により測定した。ガス生成量は酸性飽和食塩水による水上置換法で測定した。ガス組成は、TCD・ガスクロマトグラフィー(Shimazu, GC-8A, ステンレスバックドカラム, 活性炭充填, ヘリウムキャリアガス0.75 kg/cm<sup>2</sup>)により測定した。COD(重クロム酸カリウム法)とVSSは下水試験法に準じて測定した。pH測定にはガラス電極pHメーターを用いた。

## 3. 実験結果

### (1) 炭水化物の分解, 細菌の増殖及びCOD除去に及ぼす基質種類の影響

Fig.2に炭水化物の分解率, pH, MLVSS濃度及びCOD除去率に及ぼす基質種類とHRTの影響を示す。各条件の反応槽における炭水化物の分解率の定義は次の通りである。

$$\text{分解率 (\%)} = \frac{\text{流入炭水化物濃度} - \text{流出炭水化物濃度}}{\text{流入炭水化物濃度}}$$

グルコース, ラクトース, ショ糖, デンプンをそれぞれ基質とした各々の実験において, 炭水化物の分解率は, いずれもHRTが長くなるにつれて高くなり, HRT 8 hr 以上の条件ではいずれも99%以上の分解率が得られた。また, 各HRT条件において4種類の基質の分解率は若干の変化があるものの, 全体としてはほぼ同じ傾向を示している。pHは6.0前後で若干変化しているが, 水素生成細菌のための最適pH範囲(6.0-6.5)<sup>12)</sup>にあったので, pHの変動による影響が小さいと考えられる。

Fig.2(c)にMLVSS濃度の変化に及ぼす基質種類とHRTの影響を示す。MLVSS濃度は全体としてデンプンの方が一番高かった。グルコース, ラクトース, ショ糖を基質とした場合, HRT 6.0 hr 以下の条件では, 基質の除去とともに増加し, HRTが6.0 hr以上長くなると, 基質がなくなったために, 内生呼吸の影響が大きくなり, その結果, MLVSS濃度はHRTが長くなるにつれて減少した。

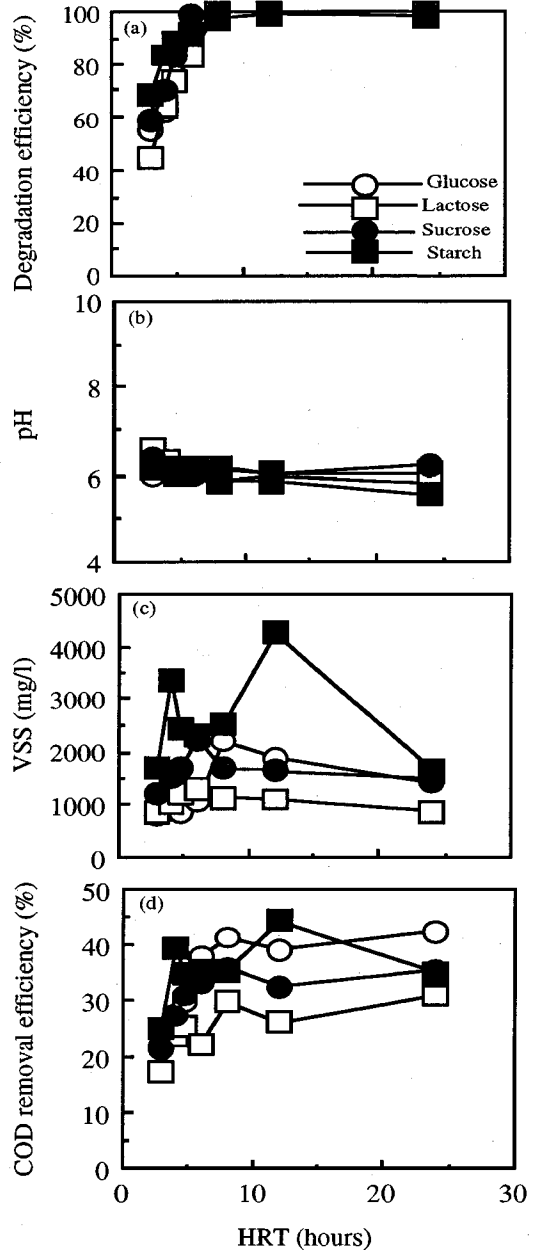


Fig. 2 Effects of HRT and substrate on carbohydrate degradation efficiency, pH, VSS concentration and COD removal efficiency.

ンの方が一番高かった。グルコース, ラクトース, ショ糖を基質とした場合, HRT 6.0 hr 以下の条件では, 基質の除去とともに増加し, HRTが6.0 hr以上長くなると, 基質がなくなったために, 内生呼吸の影響が大きくなり, その結果, MLVSS濃度はHRTが長くなるにつれて減少した。

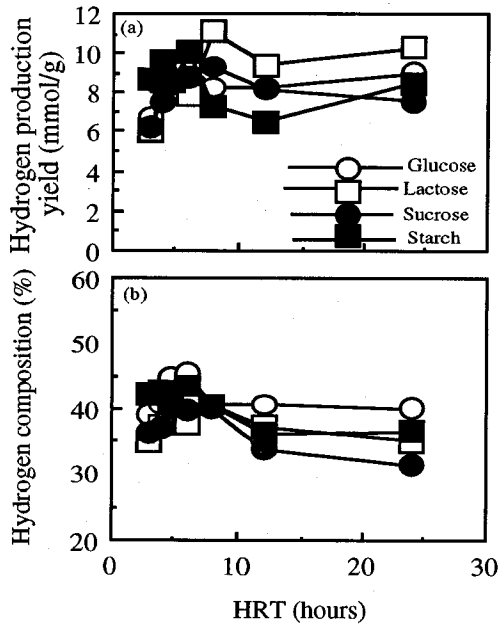


Fig. 3 Effects of HRT and substrate on hydrogen production yield and hydrogen percentage in biogas.

各基質に対するCOD除去率はFig.2(d)に示すように、HRTの増加とともに若干高くなり、HRT 6.0 hr以上の条件では、グルコースを基質とした場合は37.7-42.3%の範囲で、ラクトースを基質とした場合は26.2-30.8%の範囲で、ショ糖を基質とした場合は32.2-35.2%の範囲で、デンプンを基質とした場合は35.0-44.3%の範囲でそれぞれ安定していた。全体としてグルコースとデンプンを基質とした場合のCOD除去率は若干高く、40%を越えることもできた。これらの結果は従来の研究報告<sup>13)</sup>より10%ほど高かった。しかし、排水処理の観点から言うと、この程度のCOD除去率はとても低く、依然として不十分である。

## (2) 水素ガスと有機酸の生成に及ぼす基質種類の影響

Fig.3に各種基質からの水素ガスの生成収率と水素ガスの割合に及ぼすHRTの影響を示す。水素ガスの収率は基質種類とHRTによって変化している。グルコースを基質とした場合、水素ガスの収率はHRTが6.0 hrの条件で最大値の9.33 mmol-H<sub>2</sub>/g-glucoseとなった。ラクトースを基質とした場合、水素ガスの収率はHRTが8.0 hrの条件で最大値の11.01 mmol-H<sub>2</sub>/g-

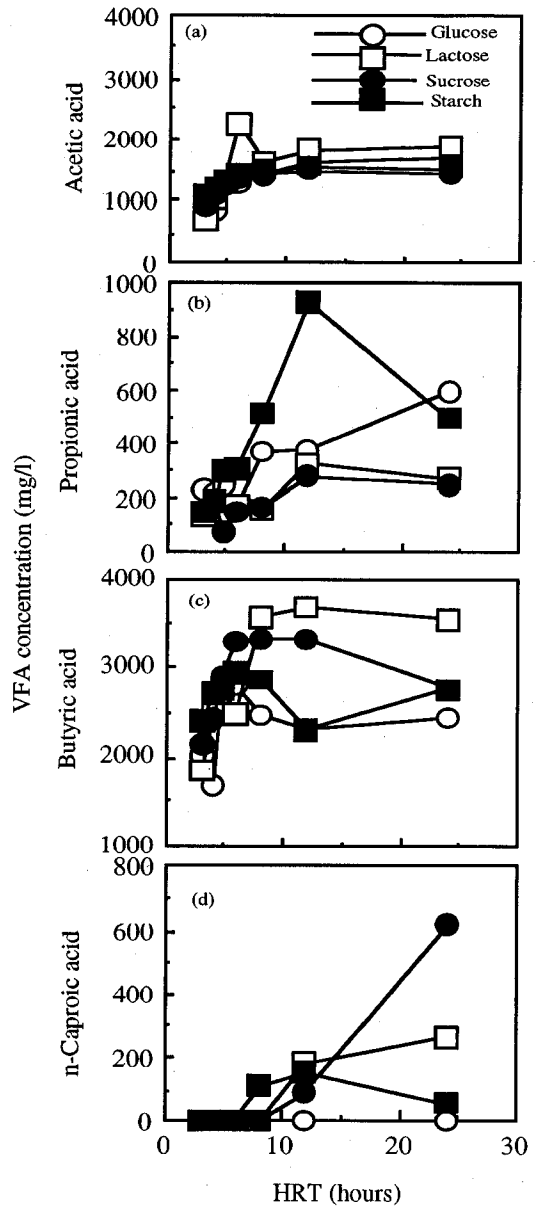


Fig. 4 Effects of HRT and substrate on acidogenesis.

lactoseとなった。ショ糖を基質とした場合、水素ガスの収率はHRTが8.0 hrの条件で最大値の9.29 mmol-H<sub>2</sub>/g-sucroseとなった。デンプンを基質とした場合、水素ガスの収率はHRTが6.0 hrの条件で最大値の10.03 mmol-H<sub>2</sub>/g-starchとなった。また、各実験において生成した水素ガスの割合は、Fig.3(b)に示したように、HRT 12.0 hr以下の条件では、生成したガスにおける水素ガスの含有率は基質によって若干の

**Table 2** COD mass balance of hydrogen fermentation from various substrate at the optimum HRT(%)

Substrate	Optimum HRT (hrs)	Influent COD (%)	Effluent COD (%)								Recovery (%)
			Substrate	VSS	Acetate	Butyrate	Propionate	N-HCA <sup>a)</sup>	CH <sub>4</sub>	H <sub>2</sub>	
Glucose	6.0	100	9.0	10.4	10.8	40.8	2.0	ND	ND	12.7	85.7
Lactose	8.0	100	0.35	11.0	14.0	52.0	1.9	ND	ND	15.6	94.9
Sucrose	8.0	100	0.2	16.3	12.0	48.5	2.0	ND	ND	13.2	92.2
Starch	6.0	100	8.2	22.5	12.3	43.1	3.6	ND	ND	14.0	103.7

a) : N-HCA = n-Caproic acid ND : Not Detectable

変化があったものの、40%前後であった。二酸化炭素の含有率は50-60%程度であった。一方、HRTが12.0 hr以上になると、メタンガスが若干検出されたために、水素ガスの含有率が5%ほど低下し、35%程度となっている。

Fig.4に流出水中の各種類の揮発性脂肪酸の濃度に及ぼす基質種類とHRTの影響を示す。水素発酵とともに生成された揮発性脂肪酸は酢酸、酪酸、プロピオン酸及びカプロン酸であり、その中で酢酸と酪酸が主成分で、プロピオン酸及びカプロン酸はわずかしか生成されなかった。

### (3) COD物質収支及び水素転換率

炭水化物からの水素発酵における物質の流れを検討するために、流入CODを100%として流出を残存基質と代謝産物で回収して、各基質を用いた水素発酵実験におけるCOD物質収支を計算した。VSSのCODへの換算は分子式C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>O<sub>3</sub>N<sup>14)</sup>で計算した。各基質からの代謝産物の生成はHRTによって影響されている。COD物質収支の結果に基づき、基質の分解率と水素収率が高く、しかもメタンが生成しないことを基準として決定した最適HRTは基質の種類によって若干異なったが、いずれも6-8時間の範囲にあった。最適HRT条件における各基質から水素発酵のCOD物質収支の結果をTable2にまとめた。基質から水素へのCOD転換率は、グルコースの場合11.6%、ラクトースの場合15.6%、ショ糖の場合13.2%、デンプンの場合14.0%であって、1割強程度であった。いずれの実験においても有機酸の生成量は多く、グルコースを基質とした場合は53.6%、ラクトース基質とした場合は67.9%、ショ糖を基質とした場合は62.5%、デンプンを基質とした場合は59.0%であって6割程度であった。有機酸の組成としては、酪酸が

**Table 3** Conversion factor of hydrogen in utilized substrates into various metabolites at the optimum HRT.

Substrate	Glucose	Lactose	Sucrose	Starch
Optimum HRT(hrs)	6.0	8.0	8.0	6.0
Acetate(%)	11.9	15.3	13.2	14.2
Propionate(%)	1.9	1.8	1.9	3.7
Butyrate(%)	35.9	45.6	42.4	40.0
VSS(%)	10.3	10.8	16.0	23.4
H <sub>2</sub> (%)	27.9	34.2	28.9	32.5
Recovery (%)	87.9	107.7	102.4	113.8

主成分で、その次は酪酸であった。プロピオン酸やその他の有機酸はわずかしか生成しなかった。

水素発酵における水素の流れを把握するために、分解した炭水化物中の水素を100%として、各代謝産物への水素の流れを計算した。水素発酵のための最適HRT条件における水素の物質収支をTable3にまとめた。微生物による有機物の加水分解反応では、H<sub>2</sub>O中の水素を取り込む場合もあるので、水素の全体の回収率が100%を超えている。水素ガスへの転換率はグルコースを基質とした場合、HRT 6.0 hrで最大値の32.5%に達した。ラクトースを基質とした場合、HRT 8.0 hrで最大値の34.2%に達した。ショ糖を基質とした場合、HRT 8.0 hrで最大値の28.9%に達した。デンプンを基質とした場合、HRT 6.0 hrで最大値の32.5%に達した。このように、グルコース、ラクトース、ショ糖及びデンプンの4種類の基質で水素発酵を行った結果、いずれの場合も基質中の水素含有量に対する水素生成収率は3割程度であったと言える。

## 4. 考察

### (1) 最適HRTと化学量論式

以上の実験結果に基づき、基質の分解率、CODの除去率、ガス中の水素ガスの割合、水素ガスの収率、流入CODから水素ガスへの転換率、基質に含まれる水素の水素ガスへの転換率などを総合すると、各基質の水素発酵のための最適HRTはいずれも6.0-8.0 hrと言えらる。それ以下の条件では基質の分解が不十分で、逆にHRTが余り長すぎると、水素資化性細菌が増殖しやすくなり、結果として水素の生成量が減少する。また、各基質の水素発酵の最適条件における代謝産物の生成量に基づき、本研究に用いた混合培養系による水素収率が最大のHRT条件における各基質の水素発酵反応の化学量論式で表すと、以下のようになる。

- a) グルコース  $\rightarrow 1.52 \text{ H}_2 + 1.78 \text{ CO}_2 + 0.36 \text{ 酢酸} + 0.54 \text{ 酪酸} + 0.14 \text{ 細菌 (C}_5\text{H}_9\text{O}_3\text{N)}$
- b) ラクトース  $\rightarrow 3.76 \text{ H}_2 + 5.38 \text{ CO}_2 + 0.84 \text{ 酢酸} + 1.25 \text{ 酪酸} + 0.26 \text{ 細菌 (C}_5\text{H}_9\text{O}_3\text{N)}$
- c) ショ糖  $\rightarrow 3.18 \text{ H}_2 + 4.68 \text{ CO}_2 + 0.72 \text{ 酢酸} + 1.17 \text{ 酪酸} + 0.39 \text{ 細菌 (C}_5\text{H}_9\text{O}_3\text{N)}$
- d) デンプン(C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>)<sub>n</sub>  $\rightarrow 1.63n \text{ H}_2 + 2.04n \text{ CO}_2 + 0.36n \text{ 酢酸} + 0.50n \text{ 酪酸} + 0.26n \text{ 細菌}$

このように本研究では、混合微生物培養系を用いてグルコース、ラクトース、ショ糖及びデンプンをそれぞれ基質とした連続水素発酵実験における水素ガスの収率はそれぞれ 9.33 mmol-H<sub>2</sub>/g-glucose, 11.0 mmol-H<sub>2</sub>/g-lactose, 9.29 mmol-H<sub>2</sub>/g-sucroseおよび10.03 mmol-H<sub>2</sub>/g-starchであった。一方、谷生ら<sup>2),15)</sup>は *Enterobacter aerogenes* strain E. 82005細菌を用いた回分実験の結果によれば、グルコース、ラクトース、ショ糖及びデンプンをそれぞれ基質とした水素発酵実験における水素ガスの収率はそれぞれ5.70 mmol-H<sub>2</sub>/g-glucose, 0.90 mmol-H<sub>2</sub>/g-lactose, 7.40 mmol-H<sub>2</sub>/g-sucroseおよび0.10 mmol-H<sub>2</sub>/g-starchであった。またTaguchiら<sup>4),5)</sup>は*Clostridium beijerinckii* strain AM21Bを用いた回分実験ではグルコース、ラクトース、ショ糖及びデンプンをそれぞれ基質とした水素発酵実験における水素ガスの収率はそれぞれ16.4 mmol-H<sub>2</sub>/g-glucose, 17.9mmol-H<sub>2</sub>/g-lactose, 19.0 mmol-H<sub>2</sub>/g-sucrose及び122mmol-H<sub>2</sub>/g-starchであった。本研究の混合培養系による糖類の水素ガス収率は

9.29-11.0 mmol-H<sub>2</sub>/g-substrate範囲にあった。この値は谷生らの報告より高いもの、Taguchiらの *Clostridium beijerinckii* strain AM21Bを用いた研究結果に比べると若干低かった。しかし、谷生らとTaguchiらのデータはいずれも回分実験の結果であり、しかも大量のペプトンも加えている。連続実験の混合培養で炭水化物の最小培地から高い水素収率を得たのは、本研究が初めてである。

### (2) 動力学的解析

本研究では、比基質利用速度と基質濃度との関係はMonod<sup>16)</sup>型式に従うとして、動力学的解析で誘導した基質利用、菌体増殖及び代謝産物の生成に関する解析式を用いて、データ解析を行った。それらの式を次のように示す。

#### (1) 基質利用に関するLineweaver-Burk式

$$\frac{1}{v} = \frac{K_{sv}}{v_{\max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (1)$$

ここで、

$K_{sv}$  : 飽和定数

$v$  : 比基質利用速度(mg-substrate/mg-VSS/h)

$v_{\max}$  : 最大比基質利用速度(mg-substrate/mg-MLVSS/d)

$S$  : 基質濃度(mg/l)

#### (2) 細菌増殖に関する解析式

$$\frac{1}{SRT} = (Y \cdot \mu) - Kd \quad (2)$$

$$\mu_{\max} = (Y \cdot v_{\max}) - Kd \quad (3)$$

ここで、

$\mu$  : 比増殖速度(1/h)

$\mu_{\max}$  : 最大比増殖速度(1/h)

$Y$  : 収率係数(mg-VSS/mg-substrate)

$Kd$  : 自己分解係数(1/h)

#### (3) 代謝産物の生成に関する解析式

$$\frac{1}{X} \cdot \frac{dP}{dt} = \frac{1}{X} \cdot Y_{p/s} \cdot \frac{dS}{dt} = Y_{p/s} \cdot v \quad (4)$$

式(1)を用いて、グルコース、ラクトース、ショ糖及びデンプンをそれぞれ基質とした水素発酵実験における比基質利用速度と基質濃度との関係を解析することによって、最大比基質利用速度 $v_{\max}$ と飽和定数

Table 4 Summary of kinetic parameters obtained from this study

Parameter	Substrate			
	Glucose	Lactose	Sucrose	Starch
$v_{max}$ (1/h)	2.3	1.5	1.5	1.3
$K_{Sv}$ (mg/l)	100	15	33	480
Correlation Coefficient	0.913	0.634	0.741	0.924
Kd (1/h)	0.05	0.08	0.02	0.01
$\mu_{max}$ (1/h)	0.55	0.22	0.28	0.28
Y (g-VSS/g-substrate)	0.26	0.20	0.20	0.22
$Y_{H_2}$ (l/g-substrate)	0.22	0.21	0.20	0.23
$Y_{CO_2}$ (l/g-substrate)	0.26	0.25	0.25	0.29
$Y_{HAc}$ (g/g-substrate)	0.13	0.13	0.14	0.13
$Y_{HBu}$ (g/g-substrate)	0.30	0.40	0.34	0.30

$K_{so}$ がそれぞれが求められた。また、式(2)を用いて、グルコース、ラクトース、ショ糖及びデンプンをそれぞれ基質とした水素発酵実験における比基質利用速度と比増殖速度との関係を解析することで、増殖収率Yと自己分解係数Kdがそれぞれが求められた。なお、式(4)を用いて、グルコース、ラクトース、ショ糖及びデンプンをそれぞれ基質とした水素発酵実験における比基質利用速度と各代謝産物の比生成速度との関係を解析すると、ガス生成、酢酸(HAc)及び酪酸(HBu)の比生成速度はいずれも比基質利用速度と直線的相関関係が見られた。これらの直線の傾きより各代謝産物の収率係数が得られた。

このように求めた動力学定数の値をTable 4にまとめた。本研究で用いた混合培養系の最大比基質利用速度 $v_{max}$ はグルコースの2.3 /hr で(55.2 /日)最大で、デンプンの1.3 /hr (31.2 /日) が最少であった。ショ糖に関する動力学データは前報<sup>10)</sup>と異なっているが、その原因は前報が一部分の実験データしか用いなかったが、本研究ではすべての実験条件におけるあらゆるデータを全部用いたのである。また、最大比増殖速度 $\mu_{max}$ と増殖収率Yはそれぞれ 0.22-0.55 /hr 及び 0.20-0.26 g-VSS/g-substrate の範囲で変化した。一方、普通の嫌気性消化酸生成相では、グルコースを基質とした場合、最大比基質利用速度 $v_{max}$ は706/日<sup>17)</sup>で、最大比増殖速度 $\mu_{max}$ は0.3-0.323 /hr<sup>18)</sup>であるが、デンプンを基質とした場合、最大比基質利用速度 $v_{max}$ は35.4-40 /日<sup>17),19)</sup>で、最大比増殖速度 $\mu_{max}$ は0.3 /hr<sup>19)</sup>であったことが報告されている。このように、基質利用および増殖特性から判断して本研究の混合培養系

は普通の酸生成細菌と十分競合しうるものであると言える。また、本研究の混合培養系は水素ガスの収率係数が0.20-0.23 (L/g-substrate) の範囲で、二酸化炭素ガスの収率係数が0.25-0.29 (L/g-substrate) の範囲で、酢酸の収率係数が0.13-0.14 (g/g-substrate) の範囲で、酪酸の収率係数が0.30-0.40 (g/g-substrate) の範囲で変化している。これを普通の嫌気性消化酸生成相と比較すると、水素ガスと酪酸の収率が高いだけでなく、生成した揮発性脂肪酸の組成にも特徴があり、いずれの基質からも主に酪酸と酢酸を多く生成している。

## 5. 結論

35°Cでの連続実験を通して、特別な嫌気性混合培養系による水素発酵に及ぼす炭水化物の種類の影響について検討した結果、次の結論が得られた、

- 1) グルコース、ラクトース、ショ糖及びデンプンの分解率は、いずれもHRTが長くなるにつれて、高くなり、HRT 8.0 hr 以上の条件ではそれぞれ99%以上の分解率に達している。また、各基質から生成したバイオガス中の水素の含有割合はHRT 12.0 hr 以下の条件で、大きな変化がなく40%程度であったが、HRTが12.0hr以上になると、メタンガスが若干検出されたために、水素ガスの含有率が5%ほど低下した。水素発酵ともに生成した揮発性脂肪酸は酢酸、酪酸、プロピオン酸及びカブロン酸であり、その中で酢酸と酪酸が主成分で、プロピオン酸及びカブロン

酸がわずかししか生成しなかった。

- 2) 各基質の水素発酵のための最適HRTはいずれも6.0 hr-8.0 hrの範囲にあった。この最適HRT条件における水素発酵の化学量論式は次のとおりである。

- a) グルコース  $\rightarrow 1.52 \text{ H}_2 + 1.78 \text{ CO}_2 + 0.36 \text{ 酢酸} + 0.54 \text{ 酪酸} + 0.14 \text{ 細菌 (C}_3\text{H}_5\text{O}_3\text{N)}$
- b) ラクトース  $\rightarrow 3.76 \text{ H}_2 + 5.38 \text{ CO}_2 + 0.84 \text{ 酢酸} + 1.25 \text{ 酪酸} + 0.26 \text{ 細菌 (C}_3\text{H}_5\text{O}_3\text{N)}$
- c) ショ糖  $\rightarrow 3.18 \text{ H}_2 + 4.68 \text{ CO}_2 + 0.72 \text{ 酢酸} + 1.17 \text{ 酪酸} + 0.39 \text{ 細菌 (C}_3\text{H}_5\text{O}_3\text{N)}$
- d) デンプン(C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>)<sub>n</sub>  $\rightarrow 1.63n \text{ H}_2 + 2.04n \text{ CO}_2 + 0.36n \text{ 酢酸} + 0.50n \text{ 酪酸} + 0.26n \text{ 細菌}$

混合微生物培養系を用いてグルコース、ラクトース、ショ糖及びデンプンをそれぞれ基質とした連続水素発酵実験における水素ガスの収率はそれぞれ9.33 mmol-H<sub>2</sub>/g-glucose, 11.01 mmol-H<sub>2</sub>/g-lactose, 9.29 mmol-H<sub>2</sub>/g-sucroseおよび10.03 mmol-H<sub>2</sub>/g-starchであった。

- 3) 各基質に対するCOD除去率はHRTの増加とともに若干高くなり、HRT 6.0 hr以上の条件では、グルコースは、37.7-42.3%の範囲で、ラクトースは、26.2-30.8%の範囲で、ショ糖は、32.2-35.2%の範囲で、デンプンは、35.0-44.3%の範囲でそれぞれ安定していた。全体としてグルコースとデンプンを基質とした場合のCOD除去率は若干高く、40%を越えることもできた。
- 4) 基質利用および増殖特性の動力学的解析の結果から判断して本研究の混合培養系は普通の酸生成細菌と十分競合しうるものである。

以上の結果を総合すると、本研究で集積培養できた嫌気性細菌の混合培養系を用いることにより、さまざまな糖類排水から高効率的水素発酵を行うことができると言える。

#### 参考文献

- 1) 田口文章：シロアリから分離した水素生成菌による廃棄物処理と水素産，用水と廃水，第136巻，pp.37-

44, 1994.

- 2) 谷生重晴：微生物の水素発生メカニズムとバイオ技術を利用した水素生産，化学装置，第33巻，pp.104-109, 1991.
- 3) 蓑田泰治：嫌気消化と水素発酵，バイオマス，生物資源の高度利用（日本農芸化学会編），pp.147-164, 朝倉書店，東京，1985.
- 4) Taguchi, F., Hang J.D., Mizukami N., Saito-Taki T Hasegawa, K., Morimoto, M.: Isolation of a hydrogen-producing bacterium, *Clostridium beijerinckii* strain AM21B, from termites, *Can. J. Microbiol.*, Vol.39, pp.726-730, 1993.
- 5) Taguchi F., Chang, J.D., Takiguchi, S. and Morimoto, M.: Efficient hydrogen production from starch by a bacterium isolated from termites, *J. Ferment. Bioeng.*, Vol.73, pp.244-245, 1992.
- 6) 松井三郎, 石黒敬史, Bulent Inanc, 井手慎司：嫌気性処理プロセスからの水素エネルギー回収を目的とした基礎的研究，環境工学研究論文集，第29巻，pp.247-253, 1992.
- 7) 小木曾直行, 中村玄正, 松本順一郎：嫌気性酸生成相における水素生成に及ぼす基質の影響，環境工学研究論文集，第31巻，pp.47-55, 1994.
- 8) 水野修, 李玉友, 野池達也：スクロースの酸発酵に及ぼす硫酸塩還元の影響，水環境学会誌，第11号，pp.894-911, 1995.
- 9) 沈建権, 李玉友, 野池達也：嫌気性発酵細菌によるサッカロースからの水素生産，土木学会第50回年次学術講演会講演概要集，第2巻(B), pp.1176-1184, 1995.
- 10) 沈建権, 李玉友, 野池達也：嫌気性水素発酵法による有機排水の処理特性，環境工学研究論文集，第32巻，pp.213-220, pp.213-220, 1995.
- 11) 福井作蔵：還元糖の定量法（第2版），pp.50-52, 学術出版センター，1990.
- 12) Tanisho, S., Suzuki, Y. and Wakao, N.: Fermentative hydrogen evolution by *Enterobacter aerogenes* strain E. 82005, *Int. J. Hydrogen Energy*, Vol.12, pp.623-627, 1987.
- 13) Vincenzini, M., Materassi, R., Tredici, M.R. and Florenzan G.: Hydrogen production by immobilized cells- II. H<sub>2</sub> photoevolution and waste-water treatment by agar-entrapped cells of *Rhodospseudomonas palustris* and *Rhodospirillum molicianum*, *Int. J. Hydrogen Energy*, Vol.9, pp.725-728, 1982.
- 14) Speece, R.E. and McCarty, P.L.: Nutrient requirements and biological solids accumulation in anaerobic digestion, *Advances in Wat. Pollut. Res.*, Vol.2, pp.305-322, 1964.
- 15) 谷生重晴ら：Enterobacter aerogenesの発酵水素発生と利用基質について，発酵工学会誌，第67巻，pp.29-34, 1989.
- 16) Monod, J.: The growth of bacterial cultures, *Ann. Rev. Microbiol.*, Vol.3, pp.371-394, 1949.
- 17) Noike, T., Endo, G., Chang, J.E., Yaguchi, J. and Matsumoto, J.: Characteristics of carbohydrate degradation and the rate limiting step in anaerobic digestion, *Biotech. Bioeng.*, Vol.27, pp.1482-1489, 1985.
- 18) Zoetemeyer, R.J. et al.: Influence of temperature on the anaerobic acidification of glucose in a mixed culture forming



part of a two-stage digestion process, *Wat. Res.*, Vol.16, pp.313-321, 1982.

19) 車基 詰, 李玉友, 野池達也: 低温域における嫌気性酸発酵の動力学的特性に及ぼす温度の影響, 土木学会論文集, 第461巻(II-22), pp.67-73, 1993.

(1996. 1. 29 受付)

## HYDROGEN FERMENTATION OF WASTEWATERS WITH VARIOUS CARBOHYDRATE BY AN ANAEROBIC MIXED CULTURE

Jian-Chuan SHEN, Yu-You LI and Tatsuya NOIKE

Hydrogen fermentation and COD removal from four kinds of wastewaters, respectively, with concentrated glucose, lactose, sucrose, starch were investigated using a special consortium of anaerobic bacteria in chemostat-type reactors at 35 °C. The experiment was conducted by varying the hydraulic retention time (HRT) of the reactor from 3.0 to 24.0 hours in 7 steps. The optimum HRT for hydrogen fermentation of various wastewaters ranged from 6 to 8 hours, at which the biogas produced from each substrate was mainly composed of hydrogen (40%) and carbon dioxide (60%), and hydrogen production yield ranged 9.23-11.0mmol/g-substrate. As a result, the COD removal reached to about 30-40%. The stoichiometric equation and all the kinetic parameters were determined for the hydrogen fermentation of each substrate.