

(46) 水素発酵における有機性廃棄物の分解特性

Characteristics of Organic Wastes Decomposition in Hydrogen Fermentation

水野修*・大原健史**・新谷真史*・野池達也*

Osamu MIZUNO*, Takeshi OHARA**, Masafumi SHINYA* and Tatsuya NOIKE*

ABSTRACT; Characteristics of organic wastes decomposition in hydrogen fermentation were investigated using batch reactor at 35°C. Bean curd manufacturing waste, rice bran and wheat bran were used as the organic wastes. The organic wastes were soaked in distilled water for dissolving carbohydrate and protein, and then the solution containing carbohydrate and protein was used as the substrate for batch experiment. Although carbohydrate was rapidly consumed during hydrogen fermentation, no decomposition of soluble protein was observed. It was suggested that the most of hydrogen was produced from carbohydrate decomposition. Hydrogen-producing microflora easily decomposed soluble carbohydrate of 46,000 molecular weight. Hydrogen yields of bean curd manufacturing waste, rice bran and wheat bran were 2.54, 1.29 and 1.73 mol H₂/mol hexose, respectively. Volatile fatty acids and alcohols were produced as the by-products from decomposition of substrate. Acetate, butyrate, ethanol, 2-propanol and 2-pentanol were the main substances.

KEY WORDS; alcohols, anaerobic microflora, bean curd manufacturing waste, hydrogen production, molecular weight, rice bran, soluble carbohydrate, wheat bran

1. 結 論

1970年代, 世界経済がエネルギー危機に直面した結果, 水素ガス(以後水素と略す)は化石燃料に替わるエネルギーとして注目され, その利用研究が盛んになった^{1) 3)}. 当時は, 水素を燃料とした場合には大気汚染物質が発生しないという点が評価された. 1990年代になると新たに地球温暖化の問題が浮上してきたため, 燃焼の際に二酸化炭素を発生しない水素は, 理想的なエネルギー源であるとして再び脚光を浴びるようになった⁴⁾. 水素は無尽蔵であり化石燃料のように枯渇する心配がないため, 経済面でも優れている. 以上のように, 水素は将来における化石燃料の代替エネルギーとしての選択のひとつであると言える. しかし, 現状では, 生産費用の低い水素を安定して供給するシステムは十分に確立されていない. 水素を使用する燃料電池自動車など利用側の技術のみが急速に発展しているが, 供給側の技術が遅れ気味になっていると思われる. このため, 水素の需要が高まる中で, より経済的な水素生成方法の開発が必要となってきた.

水素は水の電気分解によって生成されるが, 微生物の代謝過程から回収することも可能である. この方法では, 水素生産に大きなエネルギーを必要としないため, 経済的な方法のひとつとして研究が進められている. 代謝過程において水素を生成する微生物は, 藻類, 糸状菌, 嫌気性光合成細菌および嫌気性非光合成細菌である⁵⁾. 特に, 嫌気性非光合成細菌は増殖に光を必要としないため, 水素の連続生産が行えるという利点を持っている.

微生物を用いた水素生成に関する研究は, 純粋培養細菌およびグルコースなどの純物質を用いた研究が進められてきた. 主に微生物分野で行われてきた従来の研究は, *Clostridium* 属の細菌を用いたアセトン-ブタノール発酵⁶⁾ に

* 東北大学大学院工学研究科土木工学専攻 Department of Civil Engineering, Graduate School of Engineering, Tohoku University

** 三機工業(株) Sanki Industry Co., Ltd.

その端を発している。Clostridium 属の細菌を用いた場合、水素は従来のアセトン-ブタノール発酵の代謝産物のひとつとして回収することになる。アセトン-ブタノール発酵において、水素は不必要な代謝産物であったため、一酸化炭素などの阻害物質を用いて水素生成経路を停止させる研究が報告されてきた⁷⁾。水素回収を目的とする場合は、アセトン-ブタノール発酵とは逆に、溶媒生成経路を停止させ、水素生成経路を優先させる必要がある。このような視点から、pH、温度、滞留時間などの培養条件に関して研究が進められている^{8) - 11)}。また、水素回収に有望である細菌としては、Clostridium 属の外に Enterobacter 属の細菌の研究も進められている¹²⁾。

最近では、実廃水および有機性廃棄物からの水素回収が研究されるようになってきた。Roychowdhury ら¹³⁾は、混合培養細菌および純粋培養細菌を用いて、いくつかの有機性廃棄物からの水素回収を報告している。Kalia ら¹⁴⁾は、Bacillus licheniformis を用いて廃棄小麦からの水素回収を試みている。この研究では、水素の他に二酸化炭素および硫化水素の生成を確認している。Ueno ら¹⁵⁾は、砂糖工場廃水から連続的に水素回収を行ったところ、生成ガス中の水素が64%に達したと報告している。水野ら¹⁶⁾は、豆腐製造工程から大量に発生する「おから」の分解過程から水素を回収することが可能であると報告している。

以上のように有機性廃棄物からの水素回収が可能であることは、明らかになってきているが、水素の生成に伴い実際にどのような有機物質が利用されて、どのような分解特性があるのかはほとんど明らかにされていない。

本研究では、有機性廃棄物であるおから、米糠および小麦ふすまを用いて、それぞれの懸濁成分からの水素生成に伴う有機物質の分解特性を検討した。おからは豆腐製造工程から発生する大豆の摩砕物であり、年間約140万トン排出されるが、主に産業廃棄物として焼却処分されている^{17) 18)}。米糠および小麦ふすまは、それぞれ米および小麦の外殻であり、一部は利用されるのみで大半は廃棄処分されている。

2. 実験材料および方法

(1) 水素生成污泥

実験に用いた水素生成污泥は、水素爆発を起こした大豆サイロ¹⁹⁾から採取してスクロース (18g/L) と栄養塩で嫌気培養したものである。連続培養にはケモスタット型反応槽を用い、HRTは10時間、培養温度は35℃に設定した。pHは5.0 ± 0.2であった。回分実験時の水素生成污泥のバイオマス濃度は1630mg/L、生成ガス中の水素および二酸化炭素の割合は、それぞれ43%、57%であった。連続培養においてメタンは検出されなかった。

(2) 懸濁液の調整

実験に用いたおから、米糠および小麦ふすまの性状を Table 1 に示す。おから、米糠および小麦ふすまの含水率はそれぞれ77%、11%、12%であった。米糠および小麦ふすまは似たような性状であった。Table 2 に調整した懸濁液の性状を示す。懸濁液は、VS量で210gの有機性廃棄物に蒸留水を加えて4Lとして十分に攪拌し、濾布で濾して短時間で分解されない粗大成分を除去して調整した。各懸濁液は、高濃度の溶解性炭水化物および蛋白質を含有している。炭水化物/蛋白質比で比較すると、おからでは蛋白質の割合が高いが、米糠および小麦ふすまでは炭水化物

Table 1 Characteristics of organic waste

	Bean curd	Rice bran	Wheat bran
manufacturing waste			
Water content (wt%)	77	11	12
Total solid (wt%)	23	89	88
Volatile solid (wt%)	21	79	82
Ash (wt%)	2	10	6
Carbohydrate (wt%)	5.8	18	23

Table 2 Characteristics of substrate for batch experiment

	Bean curd manufacturing waste	Rice bran	Wheat bran
Total carbohydrate (mg/L)	3750	6300	7920
Soluble carbohydrate (mg/L)	2660	5110	5150
Total protein (mg/L)	5010	3740	1060
Soluble protein (mg/L)	3280	2680	943
Carbohydrate/Protein (total)	0.75	1.68	7.47
Carbohydrate/Protein (soluble)	0.81	1.91	5.46

の割合が高くなっている。おからは、豆腐製造工程で一度蛋白質を除去されているが、高濃度の蛋白質を含有している。

(3) 回分実験装置

Fig. 1 に回分実験に用いた反応槽の概略を示す。反応槽として容量 1200mL のバイアルを用いた。バイアルの口は、ブチルゴム栓およびアルミシールキャップで密封した。ブチルゴム栓部に液体サンプリングチューブ、ガスサンプリングチューブおよびガスコレクターを接続した。バイアルの中には攪拌子を入れ、マグネチックスターラーで液相を完全に攪拌した。発生したガスは、酸性飽和食塩水による水上置換で捕集した。以上のような反応槽に、Table 2 に示した懸濁液 750mL、水素生成汚泥 250mL および $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 142mg を酸素を除いた窒素の気流下において嫌氣的に封入した。液相の初期 pH は 6.5 に調整し、気相部は銅還元カラムを用いて微量酸素を除去した 100% 窒素ガスで置換した。回分反応槽は、35℃ の恒温槽内に設置して培養した。培養時間の経過に従って生成ガス量を測定し、ガス試料および液体試料を引き抜いて分析に用いた。

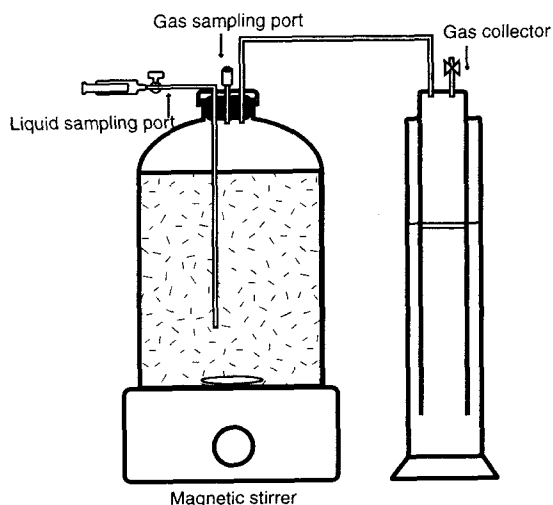


Fig. 1 Experimental apparatus

(4) 分析方法

おから、米糠および小麦ふすまの全固形物量 (Total solid 量) および含水率は、有機性廃棄物を 105℃ で 24 時間乾燥させた前後の重量差から算出した。揮発性固形物量 (Volatile solid 量) は、乾燥後の固形物を 600℃ で 1 時間燃焼する前後の重量差から求めた。ガス生成量は酸性飽和食塩水による水上置換で測定した。生成ガス中の水素の割合は TCD- ガスクロマトグラフ (Shimadzu GC-8A, 1.5m ステンレスカラム, 活性炭充填, 試料導入部温度 140℃, カラム温度 120℃, 窒素キャリアガス 1.4kgf/cm²) で定量した。液体試料はプラスチックシリンジで引き抜き、試料中の非溶解性物質は遠心分離 (14000rpm, 15min) により除去し、上澄を分析に用いた。揮発性脂肪酸 (C₂-C₄) 濃度は、FID- ガスクロマトグラフ (Shimadzu GC-8A, 1.5m ガラスカラム, Greensorb 担体, 試料導入部温度 170℃, カラム温度 145℃, ヘリウムキャリアガス 1.5kgf/cm²) により定量した。アルコール (C₂-C₄) 濃度は、FID- ガスクロマトグラフ (Shimadzu GC-8A, 2.5m ガラスカラム, Gaskuropack 54 60/80 担体, 試料導入部温度 210℃, カラム温度 180℃, ヘ

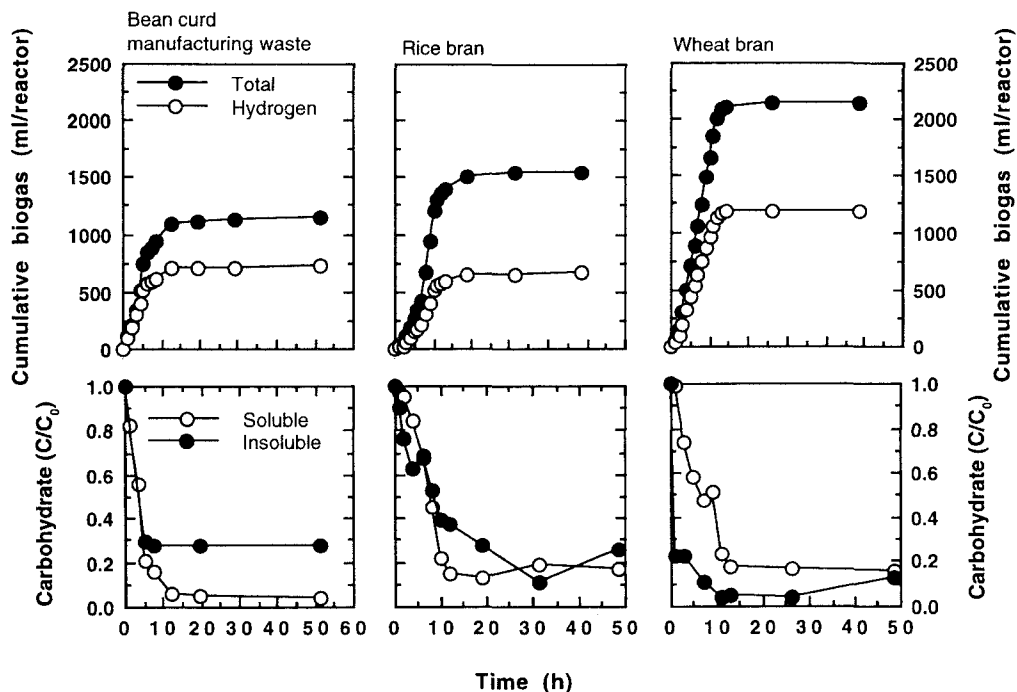


Fig. 2 Hydrogen production and decomposition of carbohydrate. C_0 , initial concentration of carbohydrate.

リウムキャリアガス (1.5kgf/cm²) により定量した。炭水化物濃度は、グルコースを標準物質としてフェノール-硫酸法²⁰⁾で定量した。溶解性蛋白質濃度は、アルブミンを標準物質として、Lowry 法²¹⁾により定量した。溶解性炭水化物および蛋白質の分離はゲルクロマトグラフ法(トヨパールKW-65F, 東ソー)で行った。また、溶解性炭水化物の分子量推定には、ゲルスタンダード(バイオラッド社)およびブルーデキストラン(ファルマシア社)を用いた。

3. 結果

(1) 水素生成および有機物質の分解特性

Fig. 2 に各懸濁液からの累積ガスおよび累積水素生成量、全炭水化物および溶解性炭水化物の濃度変化を示す。いずれの懸濁液においても、実験開始直後から水素の生成が観察された。生成ガス中の水素の割合は、培養終了の時点において、おから(63%)、米糠(44%)および小麦ふすま(54%)であった。生成したガスは水素と二酸化炭素であり、メタンは検出されなかった。非溶解性および溶解性炭水化物の分解は速やかに進み、いずれの懸濁液においても実験開始から10時間程度で分解が終了した。炭水化物の消費が停止すると、ほぼ

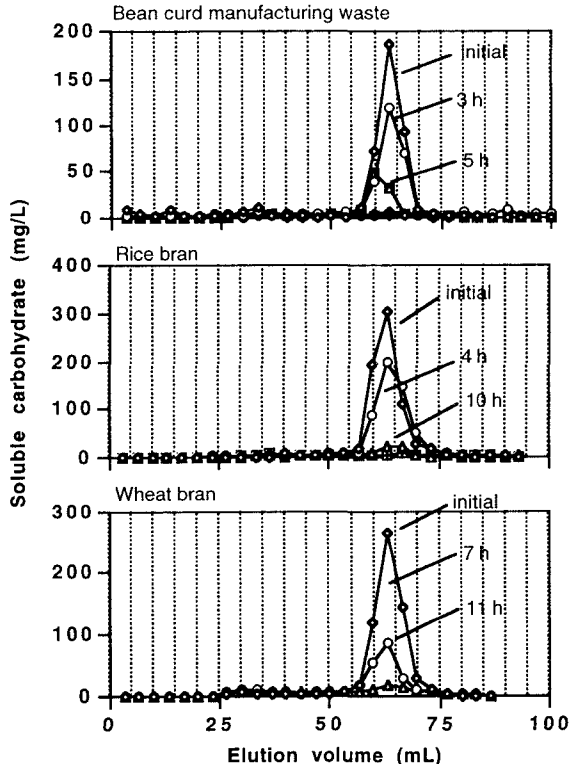


Fig. 3 Decomposition of soluble carbohydrate

同時にガスおよび水素生成も停止した。培養終了時のpHは、おから（4.4）、米糠（4.7）、小麦ふすま（4.5）であった。

Fig. 3 に溶解性炭水化物のゲルクロマトグラフを示す。溶解性炭水化物のピークは、いずれの懸濁液においても65 mL 前後の溶出量で見られ、分子量は約46,000であった。回分実験の時間経過に伴い、すべての懸濁液において溶解性炭水化物は10時間程度で速やかに分解した。

Fig. 4 に溶解性蛋白質濃度の変化を示す。溶解性炭水化物の分解に見られた現象とは異なり、いずれの懸濁液においても、溶解性蛋白質濃度の顕著な低下は見られなかった。

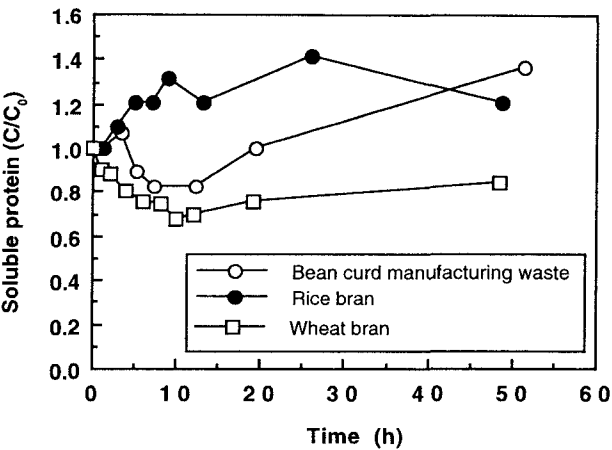


Fig. 4 Decomposition of soluble protein. C_0 , initial concentration of soluble protein.

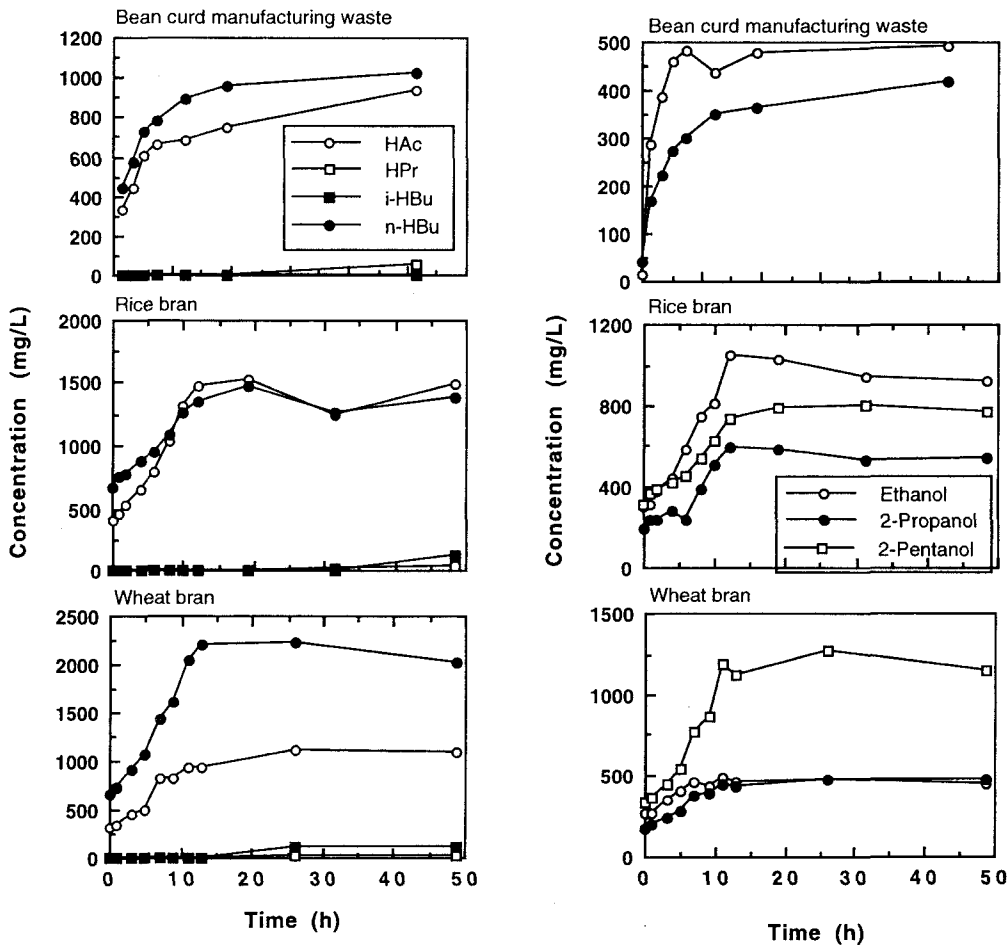


Fig. 5 Metabolites production from decomposition of organic substances

(2) 代謝産物の生成および水素収率

Fig. 5 に代謝産物濃度の経時変化を示す。懸濁液によって代謝産物の生成には大きな差異が見られた。揮発性脂肪酸では、酢酸および *n*-酪酸が主な代謝産物であり、プロピオン酸および *i*-酪酸はいずれの懸濁液においても低濃度であった。アルコールでは、エタノール、2-プロパノールおよび2-ペンタノールが検出された。ブタノールは検出されなかった。小麦ふすまにおいては、酪酸濃度が酢酸濃度を上回っていた。アルコールでは、エタノール、2-プロパノールおよび2-ペンタノールが検出された。おからおよび米糠ではエタノールが、小麦ふすまでは2-ペンタノールが大量に生成した。水素の収率は、水素が炭水化物からのみ生成していると仮定した場合、消費した炭水化物量をヘキソースに換算して算出すると、おから (2.54 mol H₂/mol hexose)、米糠 (1.29 mol H₂/mol hexose) および小麦ふすま (1.73 mol H₂/mol hexose) であった。

4. 考 察

おから、米糠および小麦ふすまを用いて水素生成に伴う有機物質の分解特性を検討したが、いずれの懸濁液においても、水素生成は主に炭水化物の分解に伴って起こることが明らかとなった。本研究で用いた水素生成汚泥は、非溶解性炭水化物および分子量の大きい溶解性炭水化物も速やかに分解できることがわかった。いずれの懸濁液においても、溶解性炭水化物の分子量は約 46,000 であるが、培養開始直後から速やかに分解が始まり、代謝産物として揮発性脂肪酸およびアルコールが生成された。一方、溶解性蛋白質の分解はほとんど起こらず、溶解性蛋白質は水素生成にはあまり貢献していないことが明らかとなった。本研究で用いた水素生成汚泥は、腐敗した大豆塊から分離したものであるため、大豆の摩砕物であるおからに含まれる懸濁成分は容易に分解できると考えられるが、おからの懸濁液に含まれる蛋白質はほとんど分解されなかった。本研究の水素生成汚泥はスクロースで培養しているが、分子量の大きな炭水化物を与えた場合でも、遅滞時間がほとんどない状態で分解が進み水素生成を行うことが可能であった。従って、炭水化物を含む廃水に対しては、高速で水素生成を行うことができると予想される。本研究の水素生成汚泥は炭水化物分解能力が高く、蛋白質分解能力が弱いという分解特性を持っている。このような分解特性を持つ細菌としては、炭水化物分解能力の高い *Clostridium* 属の細菌が知られている。この細菌は、グルコースを発酵して、酢酸、酪酸、ブタノール、アセトンを生成するが、蛋白質を分解する能力が低い。例えば、*Clostridium quini*^{2,2)} は単糖および二糖類は利用できるが、セルロース、澱粉およびアミノ酸を利用することができない。本研究では、水素生成汚泥中の優占種を同定しなかったが、汚泥中には、炭水化物を高速で分解して水素を生成するが蛋白質分解能力の低い特性を持つ細菌が多く存在すると推察される。

おからを用いた場合の水素収率は 2.54 mol H₂/mol hexose であり、グルコースなどの純物質を使用した場合と比較しても、十分に高い値である。Ueno ら^{1,5)} は、砂糖工場廃水からの水素生成において、水素収率は 1.91 - 2.59 mol H₂/mol hexose であったと報告している。本研究では、短時間ではほとんど分解しない粗成分を除いているため、今後は粗成分の分解も考慮する必要がある。

本研究で用いた水素生成汚泥を使用して、炭水化物および蛋白質を含んだ廃水から水素を回収する場合、炭水化物は分解されて水素、有機酸およびアルコールが生成するが、蛋白質はほとんど利用されずに流出水中に残留することが予想される。水素生成汚泥は混合培養であるが、得られた結果を考慮すると、炭水化物および蛋白質混合廃水から水素を回収する場合には、蛋白質を分解する細菌も共生させた方が処理をする上で有利であると考えられる。

5. 結 論

以上のようなことから、次のような結論が得られた。

1) いずれの懸濁液においても、水素生成の主な有機物質は炭水化物であった。溶解性蛋白質はほとんど分解されず、水素生成の基質として利用されなかったと考えられる。水素収率は、消費された炭水化物をヘキソースに換算して算出した場合、おから (2.54 mol H₂/mol hexose)、米糠 (1.29 mol H₂/mol hexose) および小麦ふすま (1.73 mol H₂/mol hexose) であり、おからの水素収率が高かった。

- 2) 溶解性炭水化物の分子量は、いずれの懸濁液においても約46,000であった。本研究で用いた水素生成汚泥は、分子量の大きな炭水化物であっても速やかに分解して水素を生成することが明らかになった。
- 3) 有機物質の分解から生成する代謝産物は、懸濁液によって異なっていた。揮発性脂肪酸では、酢酸および*n*-酪酸が主な代謝産物であり、プロピオン酸および*i*-酪酸はいずれの懸濁液においても低濃度であった。小麦ふすまにおいては、酪酸濃度が酢酸濃度を上回っていた。アルコールでは、エタノール、2-プロパノールおよび2-ペンタノールが検出された。おからおよび米糠ではエタノールが、小麦ふすまでは2-ペンタノールが大量に生成した。

謝 辞

本研究の一部は、(財)日産科学振興財団の日産学術研究助成「都市が産出する固形有機性廃棄物の総合管理と水素発酵を利用した資源回収」によって行われたことを記し、謝意を表す。

参考文献

- 1) Bockris, J.O'M.: Hydrogen economy, *Science*, **176**, 1323, 1972.
- 2) Maugh, T.H.: Hydrogen: synthetic fuel of the future, *Science*, **178**, pp.849, 1972.
- 3) Gregory, D.P.: The hydrogen economy, *Scientific American*, **223**, 13-21.
- 4) Benemann J.: Hydrogen biotechnology: Progress and prospects. *Nature Biotechnology*, **14**, 1101-1103, 1996.
- 5) Gray, C.T. and Gest, H.: Biological formation of molecular hydrogen, *Science*, **148**, 86-192, 1965.
- 6) Jones, D.T. and Woods D.R.: Acetone-butanol fermentation revisited, *Microbiological Reviews*, **50**, 484-524, 1986.
- 7) Datta, R. and Zeikus, J.G.: Modulation of acetone-butanol-ethanol fermentation by carbon monoxide and organic acids, *Applied and Environmental Microbiology*, **49**, 522-529, 1985.
- 8) 神戸宏, 中村玄正, 松本順一郎: 嫌気性処理におけるグルコースの酸生成分解過程と細菌群に関する基礎的研究-滞留時間の影響, 下水道協会誌論文集, **29**, 12-21, 1992.
- 9) 神戸宏, 中村玄正, 松本順一郎: 嫌気性処理におけるグルコースの酸生成分解過程と細菌群に関する基礎的研究-温度の影響, 下水道協会誌論文集, **29**, 22-30, 1992.
- 10) 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濃度の影響, 環境工学研究論文集, **31**, 47-55, 1994.
- 11) 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, **32**, 213-220, 1995.
- 12) Yokoi, H., Ohkawa, T., Hirose, J., Hayashi, S. and Takasaki, Y.: Characteristics of hydrogen production by aciduric *Enterobacter aerogenes* Strain HO-39, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **80**, 571-574, 1995.
- 13) Roychowdhury, S., Cox, D. and Levandowsky, M.: Production of hydrogen by microbial fermentation, *International Journal of Hydrogen Energy*, **13**, 407-410, 1988.
- 14) Kalia V C, Jain S R, Kumar A and Joshi A P.: Fermentation of biowaste to H₂ by *Bacillus licheniformis*. *World J. Microbiology and Biotechnology*, **10**, 224-227, 1994.
- 15) Ueno, Y., Otauka, S. and Morimoto, M.: Hydrogen production from industrial wastewater by anaerobic microflora in chemostat culture, *Journal of Fermentation and Microbiology*, **82**, 194-197, 1996.
- 16) 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.552/VII-1, 33-41, 1997.
- 17) 室山勝彦, 太田智久, 山出和弘: おから懸濁液のメタン発酵に関する研究, 環境技術, **23**, 621-629, 1994.
- 18) Yoshii, H., Furuta, T., Maeda, H. and Mori, H.: Hydrolysis kinetics of okara and characterization of its water-soluble polysaccharides, *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, **60**, 1406-1409, 1996.
- 19) ESPRIT Co., Ltd.: Research report of the explosion of soybean-meal in a silo, ESPRIT Co., Ltd., 1989.
- 20) Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F.: Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analytical Chemistry*, **28**, 350-356, 1956.
- 21) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.E. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265-275, 1965.
- 22) Svensson, Bo H., Dubourguier, H.-C., Prensier, G. and Zehnder, A.J.B.: *Clostridium quinii* sp. nov., a new saccharolytic anaerobic bacterium isolated from granular sludge, *Archives of Microbiology*, **157**, 97-103, 1992.