

(46) でんぶんの連続式水素発酵に及ぼす pH と窒素濃度の影響

The Effects of pH and Nitrogen Concentration on Hydrogen Fermentation from Starch

○堆 洋平*, 李 玉友*, 野池達也**

Yohei AKUTSU*, Yu-you LI*, Tatsuya NOIKE**

ABSTRACT ; The effects of pH and nitrogen concentration on anaerobic hydrogen fermentation by a mixed microflora were investigated using starch as a sole substrate. Two series of experiments were conducted by using a chemostat-type reactor with a pH controller. The experiment1 was conducted to investigate the effects of pH on the hydrogen fermentation at a nitrogen limited condition by controlling pH to be 4.5, 5.5 and 6.0 respectively. It was revealed that nitrogen limitation at all pHs caused deterioration of bacterial growth and substrate decomposition efficiency. Lactate was significantly produced at pH6.0 under nitrogen limitation. The experiment2 was conducted to clarify the influence of nitrogen concentration on the continuous hydrogen production by changing the nitrogen concentration of the substrate from TAN(Total Ammonia Nitrogen) 30 to 2000mg/L. The hydrogen production was stable with a hydrogen yields of about 1.40~1.53mol H₂/mol hexose-converted during a long time continuous operation of over two months at the nitrogen concentration ranging from TAN300 to 2000mg/L. The results of this research indicated that nitrogen has a significant effect on the continuous hydrogen fermentation and that the suitable C/N ratio ranges 3 to 20

KEYWORDS; continuous hydrogen fermentation; nitrogen concentration; hydrogen yield; metabolic pathway; substrate decomposition efficiency

1 緒言

今日、二酸化炭素濃度の増大によって引き起こされている地球温暖化などの環境問題が深刻になっており、二酸化炭素の排出量を削減する努力が求められている。二酸化炭素の排出量が増大する一番の原因は化石燃料の大量消費であり、化石燃料の代替エネルギーが切望されている。

水素は、燃料電池の原料であり、副生成物として二酸化炭素を排出しないクリーンエネルギーであるため、有望な化石燃料の代替エネルギーのひとつとして考えられている。水素を原料とした燃料電池は燃料電池自動車などが将来普及することにより需要が高まると考えられる。現在水素は、化石燃料からの改質、水の電気分解などによって生産されているが、これらの生産方法には膨大な化石燃料の消費が伴う¹⁾。そのため、化石燃料の消費をできるだけ抑えて持続的に水素を生産できる新たな方法が必要である。嫌気性水素発酵法は、カーボンニュートラルで再生可能なバイオマスから微生物を用いて水素を生産する方法である。水素を生成する微生物には、嫌気性光合成細菌および嫌気性非光合成細菌が存在し、嫌気性非光合成細菌を用いた場合には、光エネルギーを必要とせずに連続的に水素を生産することが可能である。したがって、嫌気性非光合成細菌を用いたバイオマスからの水素生産は、化石燃料の消費を抑制し環境問題の改善に寄与できる持続的な水素の生産方法として期待できる。

嫌気性水素発酵法の中で主な基質となるのは炭水化物であり、多くの研究ではグルコースやスクロースなどを用いている。Okamoto ら²⁾は、熱処理した消化汚泥を種汚泥として用いて、米、キャベツ、にんじん、

*東北大学大学院工学研究科(Graduate School of Engineering, Tohoku University)

**日本大学大学院総合科学研究科(Advanced Research Institute for the Science and Humanity, Nihon University)

卵、赤身肉、脂肪、鳥皮からの水素生成ポテンシャルを検討したところ、タンパク質および脂肪からの水素生成は難しく、水素生成のほとんどは炭水化物から行われたと報告した。しかし、炭水化物リッチなバイオマスを経質とした水素発酵では、菌体の増殖に必要な窒素が不足すると考えられる。Yokoi ら³⁾はサツマイモでんぷんの製造過程で排出される残渣から、水素生成細菌として *Clostridium butyricum* および *Enterobacter aerogens* を用いて水素生成の研究を行い、窒素の添加が水素生成には必要であることを報告した。Tanisho ら⁴⁾は糖蜜排水からの水素発酵を行い、糖蜜排水をそのまま用いた場合には $0.52 \text{ mol H}_2/\text{mol glucose}$ であったが、窒素源としてペプトンを添加した場合には $1.58 \text{ mol H}_2/\text{mol glucose}$ へと増大し、糖蜜排水への窒素源添加の有効性を報告している。しかし、それらはいずれも回分実験であり窒素制限が連続式水素発酵に及ぼす影響に関する確かな知見はなく、窒素制限下での連続式水素発酵への窒素添加の影響および窒素の定量性に関する報告はない。

でんぷんは、穀類やイモ類に代表されるように入手しやすい炭水化物系バイオマスであり、水素発酵を実用化する場合にはでんぷんを用いた研究報告は重要である。そこで本研究では、でんぷんの連続式水素発酵に及ぼす窒素の影響を検討した。まず窒素制限が水素発酵に及ぼす影響を検討するために、窒素が制限となるように基質の窒素濃度を調整し pH を 4.5、5.5 および 6.0 に制御して連続式水素発酵を行った。それから各培養槽内の窒素濃度を増大させ窒素の添加が及ぼす影響について検討を行った。さらに、窒素濃度の異なる培地を用いて水素発酵における窒素の最適濃度およびアンモニア性窒素濃度の水素発酵への阻害の有無について水素生成、代謝産物、基質の分解率などから検討した。

2 実験方法

2.1 植種細菌群

植種細菌群として本研究で保有している大豆粕から採取した混合細菌群集を用いた⁵⁾⁶⁾。登坂ら⁵⁾は、同植種細菌群を用いてグルコースからの連続式水素発酵を行い、PCR-DGGE 法により微生物を解析した結果、*Clostridium acetobutylicum* が優占していたと報告した。本研究では、菌叢解析は行わなかったが、同じ植種細菌群を使用したため *C. acetobutylicum* は本研究においても存在していたと考えられる。*C. acetobutylicum* は、種々の代謝経路を有し、酪酸、酢酸、乳酸などの酸の他にエタノール、アセトン、ブタノールなどの溶媒も生成する。また、典型的な水素生成細菌としても知られており、Chin ら⁷⁾は、*C. acetobutylicum* を用いてグルコース 1 モルから約 2 モルの水素を得たと報告している。本実験では、植種細菌群はメタン生成細菌を死滅させるために 80℃で 20 分間熱処理してから使用した⁸⁾。

2.2 実験条件

基質には唯一の炭素源としてでんぷんを用いて、実験 1 では 9g/L、実験 2 では 15g/L とした。培地 1L あたりの無機塩類の組成は K_2HPO_4 , 250mg; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 120mg; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 25mg; KI , 2.5mg; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2.5mg; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2.5mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5mg; $\text{NiCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5mg; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.5mg; H_3BO_3 , 0.5mg とした。窒素濃度は、塩化アンモニウムを用いて調整した。アンモニウムイオンは溶液中で NH_4^+ と NH_3 との平衡状態を生じる。本研究では NH_4^+ と NH_3 の合計である

表1 実験条件

	系	pH	窒素濃度 [TAN mg/L]	でんぷん濃度 [g/L]	滞留時間 [時間]	温度 [℃]
実験 1	1	4.5	62 → 125	9.0	14-15	35
	2	5.5				
	3	6.0				
実験 2	1	5.5	30	15.0		
	2		100			
	3		300			
	4		520			
	5		1250			
	6		2000			

TAN(Total Ammonia Nitrogen)で窒素濃度を定義した。実験 1 では pH をそれぞれ 4.5, 5.5, 6.0 に制御して 3 系列の連続実験を行った。まず窒素が制限となるように TAN62mg/L とし、安定した後に TAN125mg/L まで増大させた。実験 2 では pH を 5.5 に制御して、6 系列の窒素濃度をそれぞれ TAN30, 100, 300, 520, 1250, 2000mg/L

に固定して連続実験を行った。表1に実験条件をまとめた。

2. 3 実験装置および実験方法

実験に用いた反応装置の概略図を図-1に示す。反応槽はアクリル製で有効容積 500mL のケモスタット型の反応槽である。反応槽は恒温槽内に設置して温度 35°C、HRT14~15 時間に制御した。反応槽内はスターラーで実験全系とも同じ速度で一様に攪拌した。pH は pH 電極、pH コントローラーにより NaOH 溶液(5N)を反応槽内に添加して一定に制御した。ガスの生成量は生成したガスをアルミニウム製ガスバッグにより捕集し測定した。基質の供給および培養液の排出を連続的に行う前に菌体を増殖させるため回分式培養を行った。ガス生成速度を観察しながら対数増殖期を過ぎたのを確認してから連続式培養を開始した。ポンプを用いて供給する基質と同じ量の培養液を流出させることで反応槽内の水位を一定に制御した。

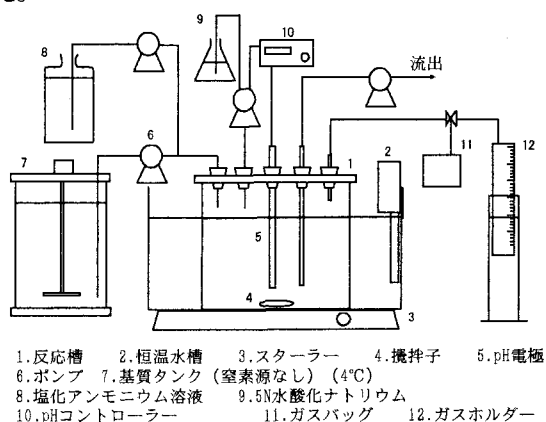


図-1 実験装置の概略図

2. 4 分析方法

生成ガス中の水素濃度は TCD ガスクロマトグラフ(SHIMADZU GC-8A)により測定した。2m ステンレスカラム (モレキュラーシーブ 5A 60/80 3mmφ) を用い、N₂ をキャリアガス (40ml/min) とし、検出温度 100°C、カラム温度 60°C の条件で分析した。二酸化炭素、メタンおよび窒素濃度は TCD ガスクロマトグラフ (SHIMADZU GC-8A) により測定した。2m ステンレスカラム (Porapak Q 充填) を用い、He をキャリアガス (30ml/min) とし、検出温度 100°C、カラム温度 70°C で分析した。炭水化物はグルコースを標準物質としてフェノール硫酸法で測定した⁹⁾。有機酸濃度はキャピラリー電気泳動分析器 (Photol CAPI-3200, OHTSUKA) を用いて測定した。内径 75μm×805mm のキャピラリーカラムを用い、25°C、電圧-20kV、220nmUV 検出器で分析した。アルコールは FID ガスクロマトグラフ GC-1700 (SHIMADZU) を用いて測定した。カラムは J&W DB-WAX (長さ 30m, I.D. 0.53mm)、キャリアガスは He (60ml/min) を用いて分析した。VSS 濃度は下水試験法¹⁰⁾に従って測定した。アンモニア性窒素濃度は、アンモニア測定キット 0.4~50mg-NH₃-N/L (セントラル科学社) を用いて測定した。VSS の元素分析は VARIO EL III CHNSO 元素分析装置 (日本シイベルヘグナー株式会社) を用いて行った。細菌の計数は MPN (Most Probable Number) 法 (5 本法) により行った。培地の作成、サンプルの希釈、接種操作はガス噴射嫌気性操作法により行った¹¹⁾。水素生成細菌および水素酸化性細菌の計数は、それぞれ沈¹²⁾ および李¹³⁾ の方法に従った。

3 実験結果および考察

3. 1 実験 1 : pH と窒素制限および窒素添加の水素発酵への影響

(1) 水素収率、基質の分解率および菌体濃度

3 系列全て約 2 ヶ月にわたり連続的に水素が生成した。培養期間中にどの系においてもメタンガスの生成は認められなかった。行った連続実験を例示するために pH を 4.5 に制

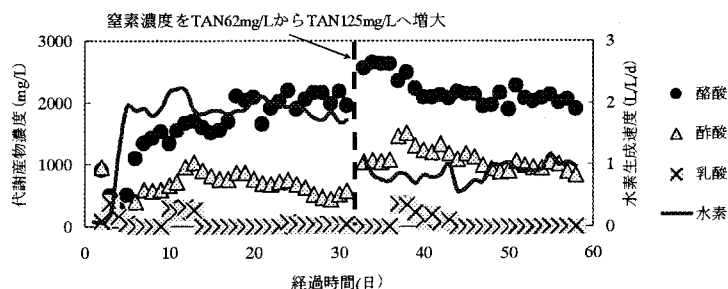
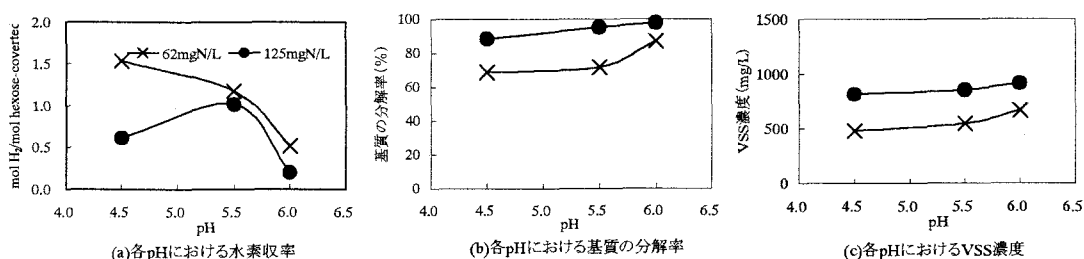


図-2 pH4.5における水素発酵の経時変化

御した時の水素生成速度および代謝産物濃度の経時変化を図・2 に示した。また、図・3 には(a)水素収率、(b)基質の分解率、(c)VSS 濃度をそれぞれ示した。基質の分解率は、流入する基質の COD_{Cr} を 100%とし、下式により定義した。

$$\text{基質の分解率(\%)} = \frac{(\text{流入する基質のCOD}_{Cr}) - (\text{残留している炭水化物のCOD}_{Cr})}{\text{流入する基質のCOD}_{Cr}}$$

データの解析には、10 日間の測定値の変動範囲が平均値の 10%以内になった時を安定時とみなし、この期間で得られたデータの平均値を代表値として用いた。各系において窒素の添加前と後での水素収率を比較すると、pH4.5 では添加前には 1.53mol H₂/mol hexose-converted であったが、添加後には 0.61mol H₂/mol hexose-converted へ、pH5.5 では、1.17 mol H₂/mol hexose-converted から 1.01 mol H₂/mol hexose-converted へ、pH6.0 では 0.51mol H₂/mol hexose-converted から 0.20mol H₂/mol hexose-converted へと低下し、連続培養の途中から窒素を添加しても水素生成が向上するような傾向が見られなかった。投入された基質の分解率を見ると、窒素の添加前には pH4.5 においては 70%程度であったのに対して、pH6.0 では 90%近くとなり、pH が高くなると基質の分解率が高くなる傾向が見られた。窒素の添加後には各 pH において基質の分解率は上昇し、pH が 5.5 および 6.0 では投入された炭水化物の 95%以上が分解された。菌体濃度は pH が高くなる時に若干大きくなる傾向が見られたが、各系において、残留していたアンモニア性窒素は検出されず菌体の増殖に必要な窒素が制限となっているために大きな差異が見られなかった。



図・3 各pHにおける窒素制限および窒素源添加の影響

(2) 代謝産物

流入する基質の COD_{Cr} を 100%として各系における代謝産物、菌体濃度 (VSS)、残留している炭水化物濃度から COD_{Cr} 収支を計算し、その結果を表 2 に示した。ただし VSS は分子式 C₅H₇O₃N を⁹⁾、炭水化物は標準物質のグルコースの換算係数 1.067 をそれぞれ用いて COD へ換算した。各系において主な代謝産物として酪酸および酢酸が生成した。しかし、pH6.0 では、他の系とは著しく異なる傾向を示し、窒素の添加前には COD 収率で

30%程度の乳酸が生成した。実験を通して水素収率が大きい時には、酪酸が優先して生成されている傾向が見られた。窒素を添加した後は、代謝産物の生成パターンに変化が見られ、窒素の添加後にはいずれの系においても酢酸が増大した。pH6.0 においては窒素の添加前に多量に生成した乳酸はほとんど検出されなく

表 2 実験 1 における COD_{Cr} 物質収支(%)

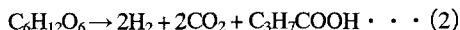
pH	窒素制限 TAN 62mg/L			窒素の添加後 TAN 125mg/L		
	4.5	5.5	6.0	4.5	5.5	6.0
水素	9.1	7.3	3.9	4.7	8.3	1.7
酢酸	7.4	8.7	19.1	11.3	22.8	32.6
乳酸	0.4	-	29.5	-	-	-
プロピオン酸	3.0	4.7	8.1	3.4	5.3	13.4
酪酸	39.1	34.4	28.2	40.7	35.0	23.3
その他	1.5	3.8	3.0	3.3	3.0	3.5
エタノール	-	-	3.2	-	2.7	3.4
VSS	7.2	9.5	10.2	12.6	12.9	13.8
炭水化物	31.4	28.3	12.9	11.6	5.0	2.4
回収率	99.1	96.7	118.2	87.7	95.0	94.1

その他 : キ酸 + コハク酸 + カプロン酸

なった。安定時における酪酸の収率は、各系において窒素の添加前後で大きな変化が見られなかった。また、プロピオン酸は pH4.5 および 5.5 の時には生成量がわずかであったが、pH6.0 になると生成量が増大し、窒素の添加後の COD 収率は 13% 程度に達した。制御する pH により、発酵パターンが変化することは従来の研究^{14) 15)}と一致した結果であるが、本実験から、窒素が制限になることで制御する pH によって乳酸生成パターンと非乳酸生成パターンに分かれることが示された。また、連続培養途中で窒素を添加することで投入する基質の分解率は向上したが、それによって各代謝産物の収率が一様になるのではなく、酢酸濃度が増大し、乳酸は生成しにくくなった。

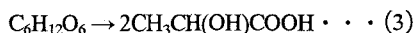
(3) 代謝産物と水素生成との関係

嫌気性水素生成細菌による水素生成パターンは式 (1) の酢酸発酵パターンまたは式 (2) の酪酸発酵パターンの二つの経路があると考えられており、それぞれ $4\text{mol H}_2/\text{mol glucose}$ および $2\text{mol H}_2/\text{mol glucose}$ の水素が生成する。したがって、水素発酵において酢酸および酪酸が特に重要な代謝産物である。



本研究では、水素生成量が多い時には酢酸よりも酪酸が優先している傾向があるために、用いた混合細菌群集内の水素生成は式 (2) の酪酸発酵パターンによる寄与が大きいと考えられる。

また、本実験の中で乳酸も主要な代謝産物であった。グルコースから乳酸のみが生成する場合には式 (3) に示されるように水素生成が伴わない。乳酸が多量に生成した pH6.0 の時には基質の分解率が高いにも関わらず水素収率が低くなっており、乳酸の生成は水素発酵に不利という既往の研究報告と一致している^{16), 17)}。



乳酸の生成する条件は培養条件によって大きく異なる。回分実験の場合、制御する pH が低い時に乳酸が生成しやすい。河野ら¹⁷⁾はドッグフードを用いた回分実験で、pH が低い時に乳酸発酵が優勢で水素生成量が少なかったと報告している。また、水野ら¹⁸⁾は製麺工場排水からの水素生成に及ぼす pH の影響を検討し、pH4.0 において水素生成は生じず、主な代謝産物として乳酸が生成したと報告した。一方、Zoetemeijer ら¹⁹⁾は活性汚泥を用いて酸生成相におけるグルコースの異化代謝に及ぼす pH の影響を検討するため連続実験を行い、pH6.0 以上において主な代謝産物が酪酸から乳酸へ変化したと報告した。さらに、Dabrock ら²⁰⁾は、pH が 5.1 以上では鉄制限が乳酸生成を増大させると報告している。他にも CO による増殖阻害なども乳酸の生成量を増大させると報告されている²¹⁾。

3. 2 実験 2：窒素濃度の影響

(1) 実験の目的

実験 1 において、窒素制限下での水素発酵への窒素の添加は、水素発酵槽内の水素分圧などの影響により水素収率の増大に寄与しないことが示された。そこで実験 2 においては、窒素濃度を低濃度から高濃度へ段階的に増大させるのではなく、実験開始時から窒素濃度を TAN30、100、300、520、1250、2000mg/L の 6 系列に分けて 2 ヶ月間の連続実験を行い、最適窒素濃度を検討した。実験 1 によれば、水素収率は pH4.5～5.5 の時に高くなり、基質の分解率は pH が 4.5～6.0 の範囲で pH の上昇と共に増大する。したがって、実験 1 よりも高濃度のでんぷんから高い水素収率を得るために全系において pH を 5.5 に制御した。

(2) 水素生成、菌体増殖および基質の分解率

行った連続実験を例示するために TAN300mg/L の時の水素生成速度および代謝産物濃度の経時変化を図-4 に示した。各窒素濃度において実験 1 と同様な基準で代表値を得て(a)水素収率、(b)基質の分解率および VSS 濃度をそれぞれ図-5 に示した。図-5 に示すように TAN300～2000mg/L では、水素収率は $1.40 \sim 1.53\text{mol H}_2/\text{mol}$

hexose-converted が得られたが、TAN30mg/L および 100mg/L においては、著しく水素収率が低下し、それぞれ、 $0.82 \text{ mol H}_2/\text{mol hexose-converted}$ および $0.72 \text{ mol H}_2/\text{mol hexose-converted}$ であった。また、この二系において残存しているアンモニア性窒素は検出されず、菌体の増殖および基質の分解率は、

TAN300mg/L 以上と比較して低下した。したがって、菌体が十分に増殖するための窒素が不足し、基質の分解率が低下すると水素収率は低下することが分かる。本実験において高い水素収率を得るためには、菌体が十分に増殖するための窒素が必要であることが示された。実験からは TAN300mg/L 以上で菌体が十分に増殖できたが、理論的にどれだけの窒素量が連続式水素発酵に必要であるか検討するために窒素収支を検討する必要がある。窒素収支は流入する窒素量を 100% とし、各系における VSS 中の窒素量、排出される培養液中の $\text{NH}_4^+\text{-N}$ から計算し、表 3 に示した。VSS の元素分析の結果は表 4 に示した。表 4 より得られた VSS の分子式は $\text{C}_5\text{H}_{8.42}\text{O}_{2.98}\text{N}_{0.99}\text{S}_{0.02}$ であった。TAN30mg/L の時は基質の分解率が低く、残留した炭水化物の影響で誤差が大きくなり回収率が大きくなったが、全体の傾向として流入した窒素は VSS 中の窒素と排出された窒素によりほぼ回収されていることが分かる。TAN300~2000mg/L における VSS は 1200~1400mg/L であるため、菌体を十分に増殖させるためには、添加する窒素量は TAN150mg/L 程度で十分であると考えられる。

(3) C/N の影響

メタン発酵においては基質の C/N が非常に重要であり、C/N は 10~20 が最も良いとされている²²⁾。アンモニア性窒素は菌体の増殖に必要な栄養源として利用される反面、菌体に対して毒性も有する。特に、遊離アンモニアが細胞膜を通り代謝へ影響を与える。例えば、Gallert ら²³⁾ は、メタン生成へのアンモニア阻害について検討し、遊離アンモニア濃度が中温 37°C で $0.22 \text{ g/L free NH}_3$ 、高温 55°C では $0.69 \text{ g/L free NH}_3$ になるとメタンガス生成速度は 50% 低下したと報告した。本研究では、水素発酵に適した窒素濃度は TAN300~2000mg/L であったが、分解されたでんぷん中の炭素量と供給した窒素量から算出される C/N で概ね 3~20 である。3. 2 (2) において菌体の十分な増殖のために必要とされる窒素量は TAN150mg/L 程度だと述べたが、この場合に基質の分解率を TAN300~2000mg/L とほぼ同じ 90% 得られると仮定すると、分解されるでんぷん中の炭素量から与えられる C/N は 40 となる。したがって、水素発酵においては C/N が 3~40 で、安定的な水素生産が可能であると考えられる。実験 1 で pH5.5 における窒素の添加前(C/N 65)に得られた水素収率は、 $1.17 \text{ mol H}_2/\text{mol hexose-converted}$ であり、実験 2 における TAN300~2000mg/L (C/N 3~20) の範囲で得られた $1.40\sim1.53 \text{ mol H}_2/\text{mol hexose-converted}$ と比較して小さかった。これは、実験 1 では窒素添加前に窒素が不足し、この時の C/N 65 が実験 2 により得られた水素発酵に最適な C/N の範囲 3~20 よりも大きかったためだと考えられる。また、メタン発酵に最適な C/N と比較して C/N が小さい時にも安定した水素発酵が可能であったのは、pH5.5、温

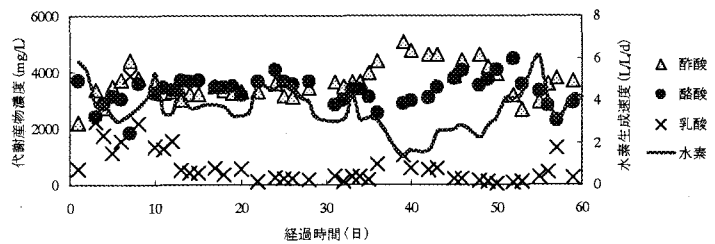
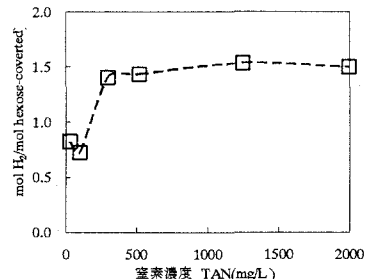
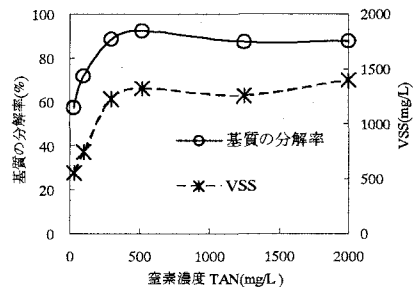


図-4 TAN300mg/Lにおける水素発酵の経時変化



(a)各窒素濃度における水素収率



(b)各窒素濃度における基質の分解率およびVSS濃度

図-5 水素発酵における窒素濃度の影響

度 35℃に制御した本実験では TAN2000mg/L においても遊離アンモニア濃度はほとんど存在せず NH_4^+ として存在し²⁴⁾、菌体の増殖へ阻害が生じなかったためだと考えられる。

表3 窒素収支

	単位(mg/L)					
TAN (mg/L)	30	100	300	520	1250	2000
VSS中の窒素濃度	59	81	146	140	127	142
排出液内の窒素濃度	0	0	137	400	1040	1750
回収率(%)	195	81	94	104	94	95

表4 VSSの元素分析結果

元素	割合(%, w/w)
N	10.6
C	45.9
S	0.6
H	6.5
O	36.4

酸素(O)の割合は100%から他の元素の割合を引いて求めた。

(4) 代謝産物

流入する基質の COD_{Cr} を 100% とし、各系における代謝産物、菌体濃度、残留している炭水化物濃度から COD_{Cr} 収支を計算し、その結果を表5に示した。VSS は実験 1 と同様に分子式を $\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_3\text{N}$ として COD へ換算した。代謝産物の傾向は TAN30mg/L、TAN100mg/L、TAN300mg/L 以上の 3 パターンに大きく分かれた。TAN30mg/L においては、乳酸の生成量

表5 実験2における COD_{Cr} 物質収支(%)

TAN (mg/L)	30	100	300	520	1250	2000
水素	4.0	4.4	10.5	11.4	11.3	11.1
酢酸	8.4	21.5	22.4	17.7	15.1	24.7
乳酸	27.3	2.9	3.8	0.8	0.4	2.8
プロピオン酸	1.2	1.2	1.7	2.3	1.6	1.8
酪酸	14.7	23.9	41.0	46.7	53.2	44.3
カブロン酸	4.0	9.9	1.2	2.8	-	2.4
エタノール	0.8	1.9	1.2	0.5	-	5.2
VSS	5.0	6.7	11.1	13.1	11.3	12.6
炭水化物	42.7	28.3	12.2	7.7	12.9	12.5
回収率	108.1	100.7	105.2	102.9	105.8	117.3

が非常に多くなり、収率は 30% 程度になった。水素の収率は 4% 程度しかなかった。TAN100mg/L においては、主な代謝産物としては、酪酸および酢酸がそれぞれ 20% 程度生成し、他にカブロン酸の生成也多くなり 10% 程度にまで達した。水素の収率は 4% 程度と低かった。水素の収率が低くなった理由としては、基質の分解率が低かったことと、基質の分解により生成した還元力がカブロン酸の生成により消費されたためと考えられる。TAN300mg/L 以上では、酪酸および酢酸が主な代謝産物であり、それぞれ 40~55%、15~25% 生成した。水素の収率は 10% 程度にまで増大した。実験2においても水素生成量は酪酸の生成が多い時に多くなり、乳酸の生成量が多い時に少なくなることが確認された。

登坂ら⁵⁾ および沈ら⁶⁾ は、本実験と同じ植種細菌群を用いて連続式水素発酵を行った。それらの実験で得られた化学量論式および実験条件と本実験の TAN1250mg/L の時に得られたデータを比較し、表6に示した。本実験で得られた水素収率は $1.40\sim 1.53\text{mol H}_2/\text{mol hexose-converted}$ であり、登坂らとほぼ等しい値であるが、沈らの報告と比較してわずかに低下した。表6から、沈らの報告する最適滞留時間である 8 時間に対して、本実験では 14~15 時間に制御したために、内生呼吸の影響が大きくなり菌体の収率が低下していることがわかる。また、本研究と同様にでんぶんを基質とした沈らの報告と発酵パターンは類似していたのに水素収率が低下したのは、滞留時間を長く設定したために細菌群の構造が変化したためだと考えられる。

表6 本実験と同じ植種細菌群を用いた連続式水素発酵の報告との比較

基質	温度 (℃)	滞留時間 [時間]	水素発酵の化学量論式	研究者
グルコース	35	12	グルコース $\rightarrow 1.44\text{H}_2 + 0.98\text{CO}_2 + 0.41\text{酢酸} + 0.48\text{酪酸} + 0.21\text{菌体}$	登坂ら, 2004
でんぶん	35	8	でんぶん $\rightarrow 1.63\text{nH}_2 + 2.04\text{nCO}_2 + 0.36\text{n酢酸} + 0.50\text{n酪酸} + 0.26\text{n菌体}$	沈ら, 1996
でんぶん	35	14-15	でんぶん $\rightarrow 1.53\text{nH}_2 + 1.21\text{nCO}_2 + 0.51\text{n酢酸} + 0.72\text{n酪酸} + 0.13\text{n菌体}$	本研究 TAN1250mg/L

本研究で得られた菌体の分子式: $\text{C}_5\text{H}_{8.42}\text{O}_{2.98}\text{N}_{0.99}\text{S}_{0.02}$

(5) 乳酸の生成について

2.1 で記したように *C.acetobutylicum* は本実験においても存在していると思われる。Meyer ら²⁵⁾は、*C.acetobutylicum* による溶媒発酵での研究の中で CO により菌体増殖が阻害された時に、 $Y_{ATP}(g\text{-biomass/mol-ATP})$ が著しく低下し、乳酸の生成が増大したと報告している。また彼らは、*C.acetobutylicum* は CO により菌体増殖が阻害された時に、菌体内の ATP 濃度および NADH 濃度が著しく増大し、酢酸および酪酸生成速度が低下し、エタノールおよびブタノール濃度が増大したと報告している²⁵⁾。エタノールやブタノールなどの溶媒生成過程での ATP 収率は酸生成過程と比較して低い^{25),26)}。つまり、菌体内の ATP 濃度および NADH 濃度が著しく増大した場合、溶媒生成のような ATP 生産性の低い代謝経路に移行し NADH を消費する²⁵⁾。一般に、菌体の合成が ATP 生産の律速となるエネルギー非共役型の場合には、エネルギー共役型よりも Y_{ATP} が低下するために菌体の増殖により多くの ATP を必要とする²⁷⁾。TAN30mg/L の時には、TAN300mgN/L 以上の時と比較して単位菌体当りに分解された基質の量が大きくなったために、解糖系で生産された ATP および NADH が TAN300mg/L 以上の時と比較して多くなったと考えられる。その結果、ピルビン酸以降の分解過程の中で、ATP 生産性の低い代謝経路で蓄積した NADH を速やかに消費するように働くと考えられる。Girbal ら²⁸⁾や Vasconcelos ら²⁹⁾による報告の中で示されている *C.acetobutylicum* の代謝経路の中で、ピルビン酸から乳酸が生成する過程では ATP の生成が記されていない。本実験のような酸の生成を優先させる水素発酵においては、酢酸や酪酸のような ATP の生産を生じる代謝経路よりも、ATP 生産のない乳酸生成経路により多くの NADH が消費されたと考えられる。また、カブロン酸の生成経路に関しての知見は十分ではないが、*C.acetobutylicum* から生成するという報告はないので、他の優占種が ATP 生産性の低い代謝経路で生産する代謝産物であると考えられる。

(6) 水素生成パターンと水素資化性ホモ酢酸生成細菌の影響

水素生成を担うと考えられている (1) 酢酸発酵パターンまたは (2) 酪酸発酵パターンの水素生成への寄与を MPN 法により検討した。MPN 法による細菌数の計数は各系で 1 回または 2 回行った。計数を行った時の酢酸濃度および酪酸濃度と水素生成細菌数との関係および酢酸濃度と水素資化性ホモ酢酸生成細菌数との関係をそれぞれ図-6 の(a)および(b)に示した。

水素資化性ホモ酢酸細菌は以下の式 (4) に示されるように生成した水素を消費して酢酸を生成する。



連続式水素発酵に最適 pH は概ね 5.5 である^{30),31)}のに対して、ホモ酢酸生成細菌の最適 pH は 5.3~8.3 であり³²⁾、基質として水素および二酸化炭素、乳酸やコハク酸などの有機酸、炭水化物など多種多様な有機物を用いて増殖できるものが存在し、増殖速度も大きい³³⁾。したがって、本実験条件においても生育可能な水素資化性ホモ酢酸生成細菌が存在すると思われる。Hussy ら³⁴⁾は、小麦でんぷんを用いて水素発酵を行い、酢酸の生成量が増大する時に水素生成量が増大しない理由を水素資化性ホモ酢酸細菌による水素の消費に起因するものと考察した。しかし、これまで実際に水素資化性ホモ酢酸生成細菌の定量は行っていない。本研究においては、水素生成量と酢酸生成量との間に明白な相関が見られなかつ

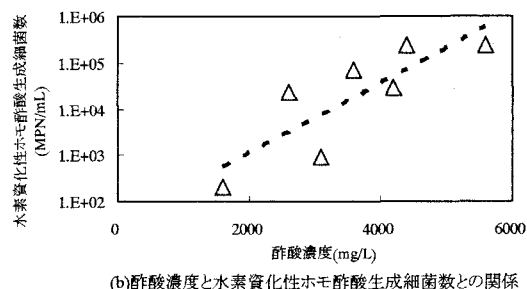
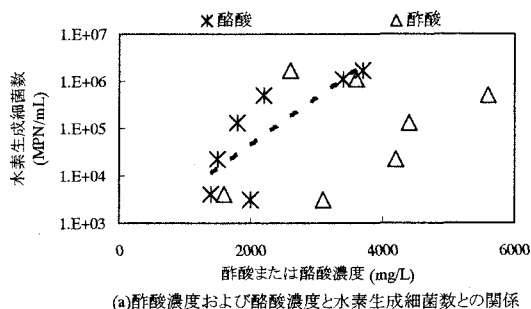


図-6 水素生成パターンと
水素資化性ホモ酢酸生成細菌の影響

ために、MPN 法により水素資化性ホモ酢酸生成細菌を定量し、その影響について検討した。図-6(a)から酪酸濃度が大きい時に水素生成細菌数が多くなる傾向が得られたのに対して、酢酸濃度との間には相関が見られないことが分かる。また図-6(b)からは、酢酸濃度の増大に従い水素資化性ホモ酢酸生成細菌数が増大する傾向があることが分かる。以上から本実験で用いた混合細菌群集内の水素生成細菌は、水素生成と共に酪酸を生成したために、酪酸が多く生成した時に水素生成量が増大したことが分かる。また、酢酸と水素生成との間に明瞭な関係が観察されなかったことは、酢酸の生成には水素資化性ホモ酢酸生成細菌による水素の消費が寄与していたためだと考えられる。

表6に示したように、水素発酵の反応は化学量論式で単純に表すことができるが、これはあくまで結果論である。実際の反応槽においては、図-7に示す共生関係があると考えられる。ここで、酪酸は式(1)、酢酸は式(2)または(4)により生成すると仮定し、表6から水素資化性ホモ酢酸生成細菌により消費された水素の割合を計算すると、水素生成細菌が生産した水素の約30~60%が、水素資化性ホモ酢酸生成細菌により消費されたことになる。したがって水素発酵においては、水素収率の向上を図るために水素資化性ホモ酢酸生成細菌の増殖特性を把握し、水素の消費を抑えるような工夫が必要である。

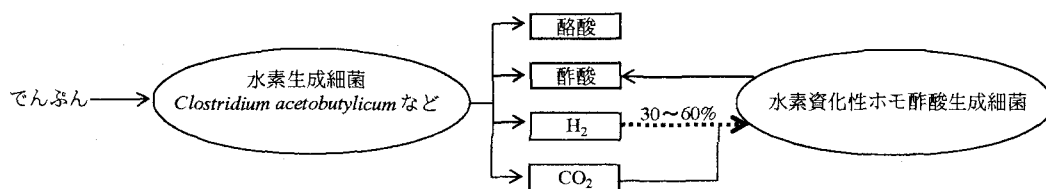


図-7 水素発酵における細菌の共生関係の概略図

(7) 連続式水素発酵の展望

水素は、3.1(3)中の(1)および(2)式にそれぞれ示される酢酸発酵パターンおよび酪酸発酵パターンにより生成する。しかし、多くの報告によれば、水素の生成には酪酸発酵パターンがより重要である。混合細菌群を用いた既往の研究で報告されている水素収率は、回分実験の場合には $1.8\sim 2.1\text{mol H}_2/\text{mol glucose}$ ^{17), 35)}、連続実験の場合には $0.86\sim 2.1\text{mol H}_2/\text{mol glucose}$ であり^{5), 6), 36)}、本研究で得られた $1.40\sim 1.53\text{mol H}_2/\text{mol hexose}$ は長期連続実験としては比較的高い値である。連続実験では、回分実験よりも水素収率が低下する場合があるが、この理由の一つに、水素資化性ホモ酢酸生成細菌などによる水素の消費が考えられる。

また、水素発酵法は、バイオマスからの水素エネルギーの回収という目的の他に、二相式メタン発酵法の前段である可溶性・酸発酵槽としての役割も期待できる。水素発酵槽から主に生成する酪酸は、酢酸やプロピオン酸など他の有機酸と比較して、メタン生成細菌により速やかに分解されることが知られている³⁷⁾。したがって、水素発酵槽の設置によりメタン発酵の効率化も期待できる。

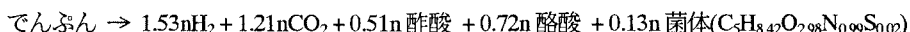
以上の理由から、連続式水素発酵法においては、酪酸発酵パターンにより理論的に得られる $2\text{mol H}_2/\text{mol glucose}$ 以上の水素収率を長期間、安定的に得るための工夫が必要だと考えられる。

4 結論

植種菌として大豆粕から採取した混合細菌群を用いて、でんぷんからの連続式水素発酵を行い、窒素制限、窒素の添加および窒素濃度の影響について検討した。本研究より以下の知見が得られた。

- 1) 窒素が不足すると菌体の増殖が制限され基質の分解率が低くなった。窒素制限下における連続実験において、窒素の添加により基質の分解率は上昇したが、水素収率が低下する傾向がみられた。この時の代謝産物の変化として乳酸の生成量が減少し、酢酸の生成量が増大する傾向が見られた。
- 2) pH5.5 に制御した場合には、安定した連続式水素発酵には TAN300mg/L 以上の窒素が必要であった。窒素

が不足した時には、水素生成に不利な発酵パターンが生じた。TAN300~2000mg/L においては水素生成、代謝産物、菌体の増殖および基質の分解率に差異が見られなかった。TAN1250mg/L における水素発酵の化学量論式は以下のように与えられた。



また本実験では、水素生成は酪酸発酵パターンによる寄与が大きく、水素資化性ホモ酢酸生成細菌による水素の消費が影響していた。

- 3) C/N が3~20 の範囲で安定的に比較的高い水素収率が得られた。ただし、窒素収支の結果から、理論的には C/N が3~40 の範囲で水素収率の高い水素発酵が可能になることが示唆された。

参考文献

- 1) 文部科学省 科学技術政策研究所 科学技術動向研究センター:水素エネルギー最前線, pp.143-170, 工業調査会, 2003
- 2) M.Okamoto, T.Miyahara, O.Mizuno and T.Noike:Biological Hydrogen Potential of Materials Characteristics of the Organic Fraction of Municipal Solid Wastes, Water Science and Technology, Vol.41, No.3, pp.25-32, 2000
- 3) H. Yokoi, A. Saitsu, H. Uchida, J. Hirose, S. Hayashi and Y. Takasaki:Microbial hydrogen production from sweet potato starch residue, Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol.91, No.1, pp.58-63, 2001
- 4) S.Tanisho, M.Kuromoto and N.Kadokura:Effect of CO₂ Removal on Hydrogen Production by Fermentation, International Journal of Hydrogen Energy, Vol.23, No.7, pp.559-563, 1998
- 5) 登坂充博, 李玉友, 野池達也: PCR-DGGE 法を用いた水素発酵微生物群集の構造解析, 土木学会論文集, No.790/VII-35, pp.1-10, 2005
- 6) 沈建権, 李玉友, 野池達也: 嫌気性細菌による糖類排水の水素発酵特性の比較, 土木学会論文集, No.552/VII-1, pp.23-31, 1996
- 7) H.-L. Chin, Z.-S. Chen, and C.P. Chou: Fedbatch Operation Using *Clostridium acetobutylicum* Suspension Culture as Biocatalyst for Enhancing Hydrogen Production, Biotechnology Progress, Vol.19, pp.383-388, 2003
- 8) 李東烈, 野池達也: 膜分離型反応槽を用いた連続的水素発酵, 環境工学研究論文集, 第 40 巻, pp.353-362, 2003
- 9) 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
- 10) 社団法人日本下水道協会:下水試験方法, 1984
- 11) 土木学会 衛生工学委員会:環境微生物工学研究法, pp.149-152, 技報堂出版, 1993
- 12) 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, 1995
- 13) 李玉友, 野池達也:汚泥の嫌気性消化における細菌群分布と物質分解特性—メタン生成菌とホモ酢酸生成細菌を中心として—, 水質汚濁研究, 第 12 巻, 第 12 号, pp.771-780, 1989
- 14) J.-J. Lay: Modeling and Optimization of Anaerobic Digested Sludge Converting Starch to Hydrogen, Biotechnology and Bioengineering, Vol.68, No.3, pp.269-278, 2000
- 15) J.-I. Horiuchi, T.Shimizu, K.Tada, T.Kanno, M.Kobayashi:Selective Production of Organic Acids in Anaerobic Acid Reactor by pH Control, Bioresource Technology, Vol.82, pp.209-213, 2002
- 16) 高島寛生, 河野有吾, 丹野幸, 野池達也: 乳酸菌 *Lactobacillus paracasei* の嫌気的水素発酵阻害における pH 依存性及び代謝産物の影響, 環境工学研究論文集, 第 39 巻, pp.55-65, 2002
- 17) 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, No.7, pp.473-479, 2004
- 18) 水野修, 新谷真史, 鈴木清彦, 矢口淳一, 野池達也:製麺工場排水からの水素生成に及ぼす pH の影響, 環境工学研究論文集, 第 37 巻, pp.97-106, 2000

- 19) R.J. Zoetemeijer, J.C. Van D. Heuvel and A. Cohen: pH Influence on Acidogenic Dissimilation of Glucose in an Anaerobic Digester, *Water Research*. Vol. 16, pp.303-311, 1982
- 20) B. Dabrock, H. Bahl, and G. Gottschalk: Parameters Affecting Solvent Production by *Clostridium pasteurianum*, *Applied and Environmental Microbiology*, pp.1233-1239, 1992
- 21) C. L. Meyer, J. W. Roos, and E. T. Papoutsakis: Carbon Monoxide Gassing Leads to Alcohol Production and Butyrate Uptake without Cultures of *Clostridium acetobutylicum*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol.24, pp.159-167, 1986
- 22) 矢田美恵子, 川口博子, 佐々木健: 廃棄物のバイオコンバージョンー有機性廃棄物のリサイクル, 他人書館, pp.70-71, 1996
- 23) C. Gallert, J. Winter: Methophilic and thermophilic Anaerobic Digestion of Source-sorted Organic Wastes: Effect of Ammonia on Glucose Degradation and Methane Production, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol.48, pp.405-410, 1997
- 24) Speece, R.E.: 産業廃水処理のための嫌気性バイオテクノロジー, pp.92-95, 技報堂出版, 東京, 1999
- 25) C. L. Meyer, E. T. Papoutsakis: Increased Levels of ATP and NADH Are Associated with Increased Solvent Production in Continuous Cultures of *Clostridium acetobutylicum*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol.30, pp.450-459, 1989
- 26) J. W. Roos, J. K. McLaughlin, E. T. Papoutsakis: The Effect of pH on Nitrogen Supply, Cell Lysis, and Solvent Production in Fermentations of *Clostridium acetobutylicum*, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol.12, pp.681-694, 1984
- 27) 合葉修一, 永井史郎: 生物化学工学 反応速度論 化学工学シリーズVI, 科学技術社, pp.81-92, 1975
- 28) L. Girbal, C. Croux, I. Vasconcelos, P. Soucaille: Regulation of Metabolic Shifts in *Clostridium acetobutylicum* ATCC824, *FEMS Microbiology Reviews*, Vol.17, pp.287-297, 1995
- 29) I. Vasconcelos, L. Girbal and P. Soucaille: Regulation of Carbon and Electron Flow in *Clostridium acetobutylicum* Grown in Chemostat Culture at Neutral pH on Mixtures of Glucose and Glycerol, *Journal of Bacteriology*, Vol.176, No.3, pp.1443-1450, 1994
- 30) H. Yu, Z. Zhu, W. Hu, H. Zhang: Hydrogen Production from Rice Winery Wastewater in an Upflow Anaerobic Reactor by Using Mixed Anaerobic Culture, *International Journal of Hydrogen Production Energy*, Vol.27, pp.1359-1365, 2002
- 31) F.R. Hawkes, R. Dinsdale, D.L. Hawkes, I. Hussy: Sustainable Fermentative Hydrogen Production: Challenges for Process Optimisation, *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol.27, pp.1939-1947, 2002
- 32) 李玉友: 嫌気性消化における下水汚泥の分解機構に関する研究, 東北大学博士学位論文, 1989
- 33) Harld L. Drake: Acetogenesis, pp.317-320, 1993
- 34) I. Hussy, F.R. Hawkes, R. Dinsdale, D.L. Hawkes: Continuous Fermentative Hydrogen Production from a Wheat Starch Co-Product by Mixed Microflora, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol.84, No.6, pp.619-626, 2003
- 35) M. Morimoto, M. Atsuko, A.A.Y. Atif, M.A. Ngan, A. Fakhru'l-Razi, S.E. Iyuke, A.M. Bakir: Biological Production of Hydrogen from Glucose by Natural Anaerobic Microflora, *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol.29, pp.709-713, 2004
- 36) Herbert H.P. Fang, Hong Liu: Effect of pH on Hydrogen Production from Glucose by Mixed Culture, *Bioresource Technology*, Vol.82, pp.87-93, 2002
- 37) R.J. Zoetemeijer, J.C. Van Den Heuvel and A. Cohen: pH Influence on Acidogenic Dissimilation of Glucose in an Anaerobic Digester, *Water Research*. Vol. 16, pp.303-311, 1982