

(44) UASB法によるデンプンの高温水素発酵特性と水素生成グラニューールの微生物群集構造解析

木村 久美¹・小林 拓朗²・李 玉友^{3*}・中井 裕¹

¹東北大学大学院農学研究科 (〒989-6711宮城県大崎市鳴子温泉字蓬田232-3)

²国立環境研究所 循環型社会・廃棄物研究センター (〒305-8506 茨城県つくば市小野川116-2)

³東北大学大学院環境科学研究科 (〒980-8579宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06)

* E-mail: jyli@ep11.civil.tohoku.ac.jp

本研究ではHRTを変化させた連続運転によって、UASBリアクターを用いた合成でんぷん廃水の高温水素発酵における物質変換特性および水素生成グラニューールの微生物群集構造の解析を行った。容積負荷 16-32 kg-COD_C/m³/dの範囲で基質分解率85%以上の良好な処理および安定した水素生成が達成でき、最大水素収率はHRT24 hのとき1.2mol H₂/mol glucoseを記録した。代謝産物の構成はHRTに伴って変化し、HRT24 hとHRT 12 hでは酢酸と酪酸が優勢であったのに対し、HRT 16 hでは乳酸が優勢であった。水素生成グラニューールの16S rRNA遺伝子を標的としたクローニング解析とFISH解析の結果、槽内では各HRT条件において水素生成細菌の*Thermoanaerobacterium*属が優勢であった。このことから、運転期間を通して高温UASBリアクター内には*Thermoanaerobacterium*属が保持され、これらが水素生成を担っていることが示唆された。

Key Words : Bio-hydrogen, Thermophilic, UASB reactor, Microbial community structure

1. はじめに

水素発酵法は、バイオマスから水素ガスを生成するバイオ燃料生成技術の一つとして注目されている。従来、水素発酵には主として完全混合型反応槽 (CSTR) が利用されてきた¹⁾。高効率な処理を行うためには、高負荷での高速処理を行うことが望ましいが、CSTRで容積負荷 16 kg-COD_C/m³/d 以上の高負荷運転を行った場合、菌体のウォッシュアウトが生じることが報告されている²⁾。近年、水素発酵に担体充填法や Up-flow Anaerobic Sludge Bed (UASB) 法を導入することによって、槽内の菌体濃度を向上させ、高負荷で水素発酵を行う試みがなされている³⁾。UASB法を用いた水素発酵は、これまで中温条件での検討が行われてきた⁴⁾。一方、CSTRによる研究からは、水素発酵は中温条件 (30-40℃) よりも高温条件 (50-60℃) の方が高い水素生成効率を示すことが報告されている^{5,11)}ため、高温UASB法による水素発酵は高効率な処理が期待できる。しかし、高温条件でのUASB法による水素発酵に関してはごく限られた報告しかなく^{24,29)}、さまざまな操作因子の影響の検討はこれからの課

題となっている。また、高温水素生成グラニューールの微生物群集構造を解析した研究もない。UASB法は、浮遊性の微生物がウォッシュアウトされてしまう短HRTのもとで、付着性の微生物をグラニューールとして選択的に槽内に保持する原理となっているが、高温UASBリアクター内においてどのような種類の水素生成細菌がどのように保持され得るかも未知である。

そこで、本研究では高温UASB反応槽の水素発酵性能評価と水素生成微生物の特定および保持能を明らかにすることを目的とし、高温UASB水素発酵の物質変換特性と微生物群集構造の解析を行った。

2. 実験方法

2.1 連続実験の方法

2.1.1 種汚泥および水素生成グラニューール形成

種汚泥はCSTR (55℃) を用いてでんぷん (15g/L-starch) で馴致された高温水素生成微生物群集である。水素生成グラニューールの核源として、熱処理 (100℃, 2時間) に

よって殺菌を行ったメタン生成グラニュールを使用した。デンプン排水を基質として高温条件において約2年間連続運転を行ってきた。その間に、既報²⁸⁾のように連続運転を行い、その後は低負荷運転で微生物を保持した。

2.1.2 実験に用いた合成デンプン廃水

本研究では基質の唯一の炭素源としてデンプンを用いた。反応槽に投入した基質1L当たりの組成はデンプン 15000 mg; NaHCO_3 6000 mg; NH_4Cl 2000 mg; K_2HPO_4 4200 mg; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 4000 mg; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2500 mg; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mg; KI 5 mg; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 5 mg; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 4 mg; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2.5 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mg; H_3BO_3 1 mg; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.5 mg とした。基質の COD_G は $16.0 \text{ g-COD}_G/\text{L}$ である。

2.1.3 実験条件

本研究で使用する実験装置の概要を図1に示す。UASB型反応槽は、内径9.6 cm、高さ82 cmで有効容量6 Lである。リアクター内部の水温はウォータージャケット方式の温度調節装置により 55°C に保たれている。運転条件は、HRTを24, 16, 12時間(h)と段階的に短縮しながら変更した。これに伴い有機物負荷率(OLR)は16, 24, $32 \text{ kg-COD}_G/\text{m}^3/\text{d}$ へとそれぞれ変化する。

水素発酵における最適 pH は 5.0-6.5 と報告されている⁹⁾。HRT16 h では平均 pH4.6 と適正域よりも低くなったため、運転 41-75 日では Na_2CO_3 (1400mg/L) を基質に加え、pH を 5.5 付近になるように調節し、HRT16 h で運転し、pH による影響を調べた。この区間を pH 調整区間とする。HRT24h, 16h(16-40 日)、12 h では Na_2CO_3 添加による pH 調整は行わなかった。

2.1.4 分析方法

リアクターで生成されたガス生成量は湿式ガスメータ(W-NK-0.5, Shinagawa, Japan)によって測定し、標準状態でのそれに換算した。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 3mm)を用い、 N_2 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。二酸化炭素濃度とメタン濃度は TCD ガスクロマトグラフ(Shimadzu GC-8A)により測定した。2 m ステンレスカラム(Porapak Q 充填)を使用し、 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。

水質分析のためのサンプリングは反応槽流出水を対象に行った。pH は、ガラス電極式 pH 計(HORIBA)を使用した。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で測定した。ギ酸、乳酸濃度はキャピラリー電気泳動分析器(Photal CAPI-3200, Ohtsuka, Japan)を使用して測定した。内径 $75\text{m} \times 805\text{mm}$ のキャピラリーカラム

を用い、 25°C 、電圧 -20kV 、220 nm UV 検出器で分析した。その他の有機酸濃度は FID ガスクロマトグラフ(Shimadzu GC-1700)により測定した。30 m カラム(J&W DB-WAX)を使用した。VSS 濃度は下水試験方法、 COD_G 濃度は Standard Method (APHA, 1995) に従って測定した¹³⁾。各 HRT でガス生成速度、pH、水素濃度が安定した時期を定常状態と判断し、その時期のデータを平均的性能の評価に使用した。

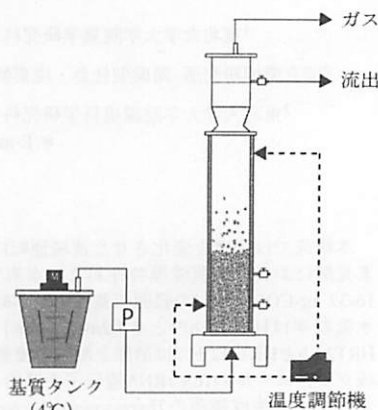


図-1 実験装置の概略図

2.2 微生物群集構造解析

2.2.1 クローン解析

サンプルは HRT24 時間運転終了時に採取したグラニュールを使用し、DNA 抽出には Ultra Clean Soil DNA kit (Mo Bio Laboratory Inc., USA)を使用した。抽出した DNA をテンプレートとして、真正細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR を行った。プライマーとして、EUB338-I-III mix と Univ1500 とを使用した(表1)。PCR 反応は 94°C で 5 分の変性、 94°C で 30 秒の変性、 50°C で 40 秒のアニーリング、 72°C で 2 分の伸長ステップを 30 サイクル行った。PCR 産物は PCR Purification Kit (QIAGEN, Tokyo, Japan) で精製した。その後 TOPO TA cloning kit (Invitrogen) を使用し、プロトコルに従ってクローニングした。形成された組み換え体コロニー群からランダムでピックアップを行い、回収したプラスミドから PCR によってクローンの DNA 断片をそれぞれ回収した。続いて、それらを制限酵素 *Taq* I と *Hind* III を用いた RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) によってグループ分けした。89 サンプルを 19 グループに分類し、グループを代表するクローンの塩基配列をタカラバイオドラゴンジェノミクスセンターの受託解析により決定した。

表-1 実験で使ったプライマーおよびプローブ

Method	Name	Sequence(5'-3')	Target	FA(%)
Cloning	EUB338-I-III mix-F ⁽¹⁴⁾	AC(AT)CTAG(T/A)GGC(T/A)GC	Most Bacteria	-
	UNIV1500-R ⁽¹⁶⁾	GGYTACCTTGITACGACTT	All Organisms	-
FISH	EUB338 I ⁽¹⁴⁾	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Most Bacteria	30%
	EUB338 II ⁽¹⁵⁾	GCAGCCACCGTAGGTGT	Planctomycetales	30%
	EUB338 III ⁽¹⁵⁾	GCTGCCACCGTAGGTGT	Verrucomicrobiales	30%
	ARC915 ⁽¹⁷⁾	GTGCTCCCCGCCAATTCT	Archaea	30%
	Thm	GCGATGCCGCTTCTCGAC	<i>Thermoanaerobacterium</i> spp	30%

表-2 各 HRT での定常状態におけるガス分析と pH の平均値

HRT (h)	pH	水素生成速度 (L H ₂ /L/d)	水素収率 (mol H ₂ /mol inf glucose)	ガス組成 (%)		基質分解率 (%)
				H ₂	CO ₂	
24	5.2±0.04	2.2±0.21	1.2±1.3	33±1.4	67±1.4	99±0.25
16	4.6±0.11	2.6±0.30	0.94±1.8	32±2.4	68±2.4	93±2.5
16(pH 調整)	5.3±0.04	2.3±0.73	0.83±1.2	29±1.0	71±1.0	96±0.83
12	5.0±0.12	4.2±0.47	1.1±2.8	38±1.0	62±1.0	85±3.5

2.2.2 Fluorescence in situ hybridization (FISH)

サンプルは、各運転期間で定常状態期間に反応槽側面に設置されたサンプリングポートから採取した培養液を、それぞれ上清とグラニュールに分けて使用した。採取したサンプルは、PBS で数回の洗浄を行ったあと 4%パラホルムアルデヒドで 3 時間、4℃で固定した。固定後 PBS で数度洗浄した後、PBS とエタノールの 1:1 混合液中で保存した。セルカウントに用いたサンプルは、混合液に終濃度 0.5%のトリポリリン酸ナトリウムを添加して、超音波ホモジナイズを行ってから FISH 実験を行った。グラニュール断面観察のための実験では、関口らの方法¹⁸⁾でグラニュールのパラフィン包埋およびマイクロームによる薄切切片を作成してから、FISH 法を施した。FISH の手順は Sekiguchi ら¹⁹⁾の方法に従った。使用したプローブとハイブリダイゼーションバッファー中のホルムアミド濃度を表 1 に示す。Thm プローブは ARB プログラムを用いて特異的に設計した。CSTR の水素発酵連続運転で集積された *Thermoanaerobacterium* 属をポジコンとし、*Lactobacillus casei*(JCM1134) と *Tenacibaculum aestuarii*(JCM1349)をネガコンとして用いて実験条件を最適化し、ハイブリダイゼーションにおけるホルムアルデヒド濃度は 30%とした。ハイブリダイゼーションは 46℃で 3 時間、洗浄は 48℃で 15 分間行った。

セルカウントは、無作為に選んだ複数の視野において DAPI 染色セルと FISH 染色セルをそれぞれカウントして、視野ごとのカウント数を足し合わせた。カウントした DAPI 染色セルが合計 600 セル以上となるように測定した。グラニュール、浮遊微生物についてそれぞれ行い、DAPI 染色セルのカウント数に対する FISH 染色セルのカウント数の割合を検出率として求めた。

3. 実験結果

3.1 連続実験

3.1.1 各 HRT での水素生成

生成されたバイオガスは水素と二酸化炭素から構成されていた。実験期間中のガス生成量とガス中の水素濃度の経日変化を図 2 に示す。各運転期間で安定した水素生成が行われた。実験期間中メタンの生成は確認されなかった。表 2 に運転期間のガス組成、pH、水素生成速度、水素収率、フェノール硫酸法による糖分析により評価した基質分解率(炭水化物ベース)の平均値を示す。pH は HRT 16 h の期間に一時低下し、調整を要したが、それ以外の期間は水素発酵に適切な pH を維持できた。水素生成速度は 2.2-4.2 L/L/d の範囲であり、HRT 12 h で最大値を記録した。水素生成速度は OLR の上昇に伴って有意に上昇傾向にあるといえる。水素濃度は平均 29-38%の間で推移し、HRT 16 h が最も低く、HRT 12 h が最も高かった。HRT 16 h の pH 調整ありとなしの区間では水素生成速度、水素収率ともに有意な差が見られなかった(Tukey の多重比較による有意水準 5%の条件で)。水素収率は 0.8 から 1.2 の範囲で分布し、最大水素収率は HRT 24 h のときで 1.2 mol H₂/mol inf glucose であった。OLR

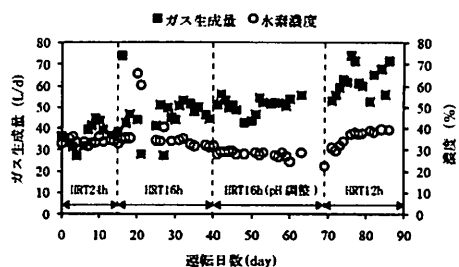


図-2 ガス生成量およびガス中の水素濃度の経日変化

表3 各 HRT の定常状態の下での基質由来 COD_C の物質変換割合の平均値 (%)

HRT(h)	AA	PA	isoBA	BA	CA	FA	LA	CH ₃ O	H ₂	VSS	unknown
24	69±0.13	22±0.16	1.3±0.17	62±0.98	1.6±0.39	nd	nd	1.3±0.25	10±0.93	7.7±6.3	73±0.04
16	49±0.91	1.4±0.48	0.2±0.22	40±0.34	0.33±0.25	0.88±0.15	30±2.01	6.1±2.5	7.8±0.91	6.7±4.6	1.8±0.11
16(pH調整)	27±0.16	1.5±0.16	0.14±0.22	43±1.52	0.53±0.33	0.67±0.20	33±6.47	3.7±0.84	6.9±0.59	5.5±6.3	2.4±0.04
12	11±1.9	2.0±0.81	1.1±0.79	1.9±4.9	4.1±1.1	0.53±0.11	11±4.9	1.5±4.1	9.4±1.1	9.6±5.4	1.8±0.12

AA: acetic acid, PA: propionic acid, isoBA: isobutyric acid, BA: n-butyric acid, CA: caproic acid, FA: formic acid, LA: lactic acid, Carbo: carbohydrate

の増大による水素収率の有意な変化は確認されなかった。基質分解率は負荷上昇にともなって低下したが、HRT12 h でも分解率は 80%以上を維持し、良好に基質が分解されたといえる。以上の結果から高温 UASB による水素発酵は、OLR 32 kg/m³/d まで安定した良好な運転が実現できることが示された。

3.1.2 各 HRT での基質由来 COD 成分の物質変換特性

表 3 に基質と流出液の分析結果をもとに計算した、各 HRT 条件での COD_C 物質収支を示す。HRT24h では投入したデンプンの COD_C の 6.9%が酢酸、62%が酪酸に変換された。乳酸生成は見られなかった。HRT16h では 4.9%が酢酸、40%が酪酸、30%が乳酸に変換された。HRT12h では 11%が酢酸、20%が酪酸、11%が乳酸に変換された。水素変換率は 6.9-10%の範囲であり、HRT16 h の時期に最も低下した。HRT を 24 時間よりも短くすると、代謝産物組成は大きく変化した。HRT24 h の条件では酪酸、酢酸が主な代謝産物であった。HRT16 h の条件時では HRT 24 h の条件時と比較して酪酸の割合は減少し、代わりに乳酸の割合が増加した。一方 HRT12 h では、HRT 16 h と比較して乳酸の割合が減少し、酢酸の割合が増加した。

グルコースからの水素生成反応は、(1) 式の酢酸発酵経路または(2) 式の酪酸発酵経路の二つの化学量論式により説明されており、それぞれ 4 mol H₂/mol glucose および 2 mol H₂/mol glucose の水素が生成する。一方で乳酸発酵は(3)式のように表わされ、水素生成がない。したがって、水素発酵において酢酸および酪酸を生成する経路をとることが望ましい。本研究では、乳酸への変換割合が最大であった HRT 16 h において水素収率が最小となった。このことは水素生成を伴わない乳酸発酵経路をとる割合が最も増大したことが原因であると考えられる。このように代謝経路と水素生成との間には相関関係がある。

こうした代謝経路を支配する要因の一つは pH であることが報告されている⁹⁾。5.0 を下回る低 pH の下では乳酸発酵経路が優勢となりやすく、水素収率が低下することが報告されている^{5,30,31)}。本研究では、HRT 16 h の運転期間において、一時的に pH が 5.0 を下回る水準まで低下した。そのために乳酸生成経路が優勢となった可能性がある。表 3 に示す物質変換において、基質の有機酸への変換割合は HRT 16 h のときが最も大きい。そのため pH 低下の影響が他の条件と比較して強かったと考えられる。HRT12h では、基質分解率が低下したため、

表-4 クローンライブラリにおける最近縁種

Closest relative	Identity(%)	No of clone	Abundance(%)
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	99	19	21.3
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp. PO-2009	96	14	15.7
<i>Acetobacter lovaniensis</i>	100	10	11.2
<i>Caldanaerobium fijiensis</i>	92	9	10.1
<i>Yersinia enterocolitica</i>	99	7	7.9
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	100	5	5.6
<i>Lactobacillus casei</i>	100	3	3.4
<i>Aeromonas hydrophila</i>	100	3	3.4
<i>Pseudomonas</i> sp. HY-24	99	3	3.4
<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>	100	3	3.4
<i>Pseudomonas</i> sp. 91S1	99	2	2.2
<i>Sporolactobacillus</i> sp. QC81-06	96	2	2.2
<i>Lactococcus</i> sp. YM05004	99	2	2.2
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	100	2	2.2
<i>Clostridium propionicum</i>	97	1	1.1
<i>Lactobacillus nagelii</i>	100	1	1.1
<i>Flavobacteriales bacterium</i> CF-1	98	1	1.1
<i>Dysgonomonas capnocytophagoides</i>	97	1	1.1
<i>Aeromonas</i> sp. AKB-2008-HE79	100	1	1.1
Total		89	100

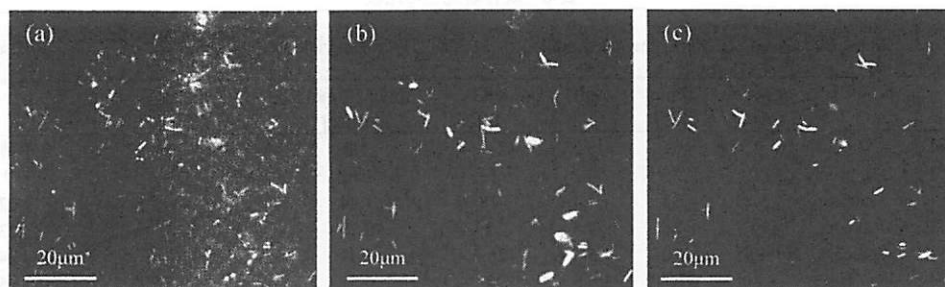
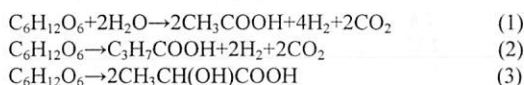


図-3 FISH 法による蛍光観察像 (a)DAPI, (b)EUB338(Cy3), (c)Thm(FITC)による染色

HRT16h の時と比較して pH 低下因子となる酸への変換割合が低下し、HRT16h よりの良好な水素生成が可能であった。



3.2 微生物群集構造

3.2.1 クローンライブラリ解析

クローンライブラリ解析の結果を表 4 に示す。全クローンの 21%は、高温水素生成グラニュールには水素生成菌として知られる *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*²⁰⁾ に近縁であった。水素生成菌である *Thermoanaerobacterium* 属に近縁なクローンは合計して全体の 37%を占め優勢であった。それ以外には水素生成細菌として報告されている細菌に近縁なクローンは検出されなかった。以上から、本 UASB リアクターでは *Thermoanaerobacterium* 属が水素生成を担っていることが示唆された。

3.2.2 FISH 法によるセルカウント

図 3 はグラニュールの分散サンプルを対象とした FISH での同一視野の蛍光観察像である。(a) は DAPI, (b) は EUB338 (Cy3), (c) は Thm (FITC) による染色である。ARC915 プローブを用いた FISH の結果、アクティブな古細菌のセルは全く検出できなかった。このことは連続運転においてメタン生成が確認できなかった事実と整合している。図から明らかなように、クローンライブラリと同様に *Thermoanaerobacterium* 属標的のセルが優勢であった。表 5 に各 HRT 条件における検出率を示す。(A) はグラニュール、(B) は浮遊微生物である。真正細菌に対する水素生成菌の割合はグラニュール・浮遊微生物ともに 20-60%を占め、優勢であった。このことから本 UASB では水素生成菌をうまく保持できたと考えられる。グラニュール内の *Thermoanaerobacterium* 属の検出率は HRT24 h から HRT16 h にかけて低下し、HRT12 h で再び増加した。この傾向は水素収率と同じであり、*Thermoanaerobacterium* 属標的セルの検出率と水素収率との間には相関があると考えられる。

グラニュール内微生物は浮遊微生物と比較して、

FISH による検出率が低いことがわかった。本研究のグラニュールは殺菌処理したメタングラニュールを核源とするため、グラニュール内には FISH では検出できない死滅菌やその残骸が多く含まれると考えられる。

表-5 各 HRT における検出率平均値

(A) グラニュール

HRT(h)	EUB338/DAPI	Thm/DAPI
24	19±2.9	6.3±2.7
16	27±8.3	5.4±3.7
16(pH 調整)	20±4.7	9.0±2.4
12	25±4.7	12±2.4

(B) 浮遊微生物

HRT(h)	EUB338/DAPI	Thm/DAPI
24	44±5.7	27±5.0
16	72±7.1	25±8.3
16(pH 調整)	62±4.2	12±6.6
12	73±16	15±6.6

3.2.3 FISH 法によるグラニュール断面観察

図 4 はグラニュール断面を EUB338 を使用した FISH により観察したものである。FISH の蛍光強度はセルの保持 rRNA コピー数に比例する。グラニュール表層に強い蛍光が観察されることから、活性をもった菌が表層にだけ分布していると考えられる。セルカウントにおけるグラニュール内微生物の FISH 検出率が低かったことはこの現象に由来すると考えられる。デンプンは高分子であるので、グラニュール深部には浸透できず、デンプン分解の反応はグラニュール表層で起きていることが推測される。これまでの研究において、グラニュール内の光らない部分は死菌や無機物、休止中の細胞であると考えられている^{32,33)}。上に述べたように、グラニュールは死滅菌を核としているので、内部には死滅菌やそれらの残骸が蓄積しているのかもしれない。以前の研究において水素発酵条件で運転開始後、全ての黒いメタングラニュールが次第に変色し、現在の水素グラニュールに変化したことが確認されている²⁹⁾。グラニュールの形成には EPS が重要であると考えられている^{34,35)}。EPS は細胞外分泌物や死菌の残骸で構成される。はじめに滅菌したグラニュールに存在する EPS を利用し、それを核として水素生成細菌

表-6 既存研究との比較

Reactor	Substance	Experimental condition				Hydrogen yield [mol H ₂ /mol glucose]	Substrate degradation efficiency (%)	Reference
		conc. [g/l]	Temp. [°C]	pH	HRT [h]			
UASB	starch	15	55	5.2	12-24	1.2	99	本研究
UASB	sucrose	10	39	4.2	13	1.61	-	7
UASB	sucrose	5.33	38	4.4	18	1.44	over 95	22
UASB	glucose	10.7	35	4.4	2	0.79	87	23
UASB	glucose	4.85	70	4.5-6.5	26.7	2.47	-	24
UASB	sucrose	20	35±1	6.5	8	0.75	93.7	25
UASB	citric wastewater	15-21	35-38	4.5-5.5	12	0.84[mol H ₂ /mol hexose]	96.6	26
UASB	sucrose	20	40	5.8-6.8	2	1.34	-	27
UASB	winery wastewater	34	55	5.5	2	1.37-2.14[mol H ₂ /mol hexose]	-	28
UASB	starch	15.9	55	4.8	48	1.68	over 93	29
CSTR	starch	20	55	5.1	24	2.8	72	5
CSTR	starch	10	55	4.9	24	2.32	96.3	21

が表面に張り付き、グラニューール形成をしたと考えられる。

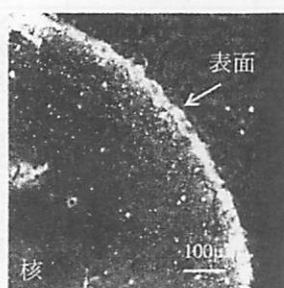


図-4 FISH法によるグラニューール断面観察像

4. 考察

4.1 水素収率および容積負荷の評価

Akutsu ら²⁹⁾の報告では基質濃度 15g-starch/L, HRT12h のとき水素収率は約 0.6mol H₂/mol glucose であるのに対し本研究では Akutsu らと同じ条件で水素収率は 1.1mol H₂/mol glucose と高い値が得られた。Akutsu らのリアクター内 pH は平均約 4.8, 代謝産物として酪酸 24.2mM, 酢酸 21.3mM, 乳酸 40.2mM が生成されたと報告されている。本研究ではリアクター内平均 pH が 5.0, 代謝産物は酪酸 22mM, 酢酸 27mM, 乳酸 19mM であった。本研究で Akutsu らの報告より高い水素収率が得られた原因は、本研究では Akutsu らの報告と比較して乳酸生成が少なく、酢酸生成が多かったためと考えられる。Noike ら³⁶⁾は乳酸菌共存下で水素生成が阻害されると報告している。また高島ら³⁷⁾は乳酸菌による水素発酵阻害は pH5 を境界とし、5 より低い pH で顕著に現れると報告している。これらのことから、本研究では pH5 以上を保持できたため、Akutsu らの報告と比較して乳酸菌による水素発酵の阻害が少なかったと考えられる。表 6 に、本研究と既報の水素発酵プロセスと

の水素発酵特性との比較をまとめた。本研究で得られた最大水素収率は 1.2mol H₂/mol inf. glucose であり、既往研究において報告されている水素収率と比較して中程度の水準であった。各プロセスで処理している基準に着目すると CSTR を除いて高い水素収率を記録しているプロセスでは分解しやすい低分子のグルコースやスクロースなどを使用しているが、本研究ではそれらより分解しにくい高分子のデンプンを使用している。このことは、本研究が他の高水素収率のプロセスと比較してそれが低い一因であると考えられる。温度について着目すると、中温条件の UASB プロセスと高温条件の UASB プロセスとの間には顕著な水素収率の違いはみられなかった。同様の植種源と基質を用いている Akutsu ら³⁾が行った CSTR の実験から得られた結果と比較すると、本研究の水素収率は約 1/2 と低い。Akutsu ら³⁾の報告では CSTR では主な代謝産物は酢酸で、乳酸はほとんど生成されなかった。上記のように、酢酸発酵は最も水素収率の高い代謝経路である。この CSTR の結果と比較して、本研究の水素発酵経路は水素発酵に不向きな経路をとる傾向をとったことが水素収率が低い原因である。一方で、CSTR は負荷上昇に伴い基質分解率は著しく低下した。OLR 32 kg-COD_C/m³/d では基質分解率 56 %であった。これに対し本研究は、OLR 32 kg-COD_C/m³/d においても 85%の基質分解率を維持できた。この結果は、水素発酵の許容負荷の点では、UASB の方が CSTR よりも優れていることを示している。

4.2 微生物群集の既報との比較

上記のように、本研究の UASB リアクター内では *Thermoanaerobacterium* 属が優勢であった。Akutsu らの CSTR を用いた研究においても、優勢な水素生成細菌は *Thermoanaerobacterium* 属であり、クローンライブラリにおけるその割合は 88.8%であった¹⁸⁾。この数値は本研究の 37%と比較して倍以上高い水準

であり、CSTRの方が、より水素生成細菌を選択的に槽内に保持できていることを意味している。このような水素生成菌が優占しやすい環境が、CSTRの方がUASBよりも水素収率が高い原因のひとつであると考えられる。

5. まとめ

UASBリアクターを用いたデンプン廃水の高温水素発酵において、容積負荷 16-32 kg-COD_C/m³/d の範囲で基質分解率 85%以上の良好な処理が達成でき、最大水素収率は HRT24 h のとき 1.2mol H₂/mol glucose を記録した。水素生成グラニュールの 16S rRNA 遺伝子を標的としたクローン解析と FISH 解析の結果、槽内では各 HRT 条件において水素生成細菌の *Thermoanaerobacterium* 属が優勢であった。このことから、運転期間を通して高温 UASB リアクター内には *Thermoanaerobacterium* 属が保持され、これらが水素生成を担っていることが示唆された。

参考文献

- 1) S.W.V. Ginkel and B.E. Logan, Increased biological hydrogen production with reduced organic loading, *Water Res.*, 39(16), pp. 3819-3826, 2005.
- 2) S.V. Ginkel and B.E. Logan, Inhibition of biohydrogen production by undissociated acetic and butyric acids, *Environ Sci Technol* 39(23), pp. 9351-9356, 2005.
- 3) H.H.P. Fang and H. Liu, Effect of pH on hydrogen production from glucose by mixed culture, *Bioresour Technol.*, 82(1), pp. 87-93, 2002.
- 4) O. Mizuno, R. Dinsdale, F.R. Hawkes, D.L. Hawkes and T. Noike, Enhanced hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging, *Bioresour Technol.*, 73(1), pp. 59-65, 2000.
- 5) Y. Akutsu, Y.Y. Li, H. Harada and H.Q. Yu, Effects of temperature and substrate concentration on biological hydrogen production from starch, *Int J Hydrogen Energy*, 34 (6), pp. 2558-2566, 2009.
- 6) 堆 洋平, 李 玉友, 原田 秀樹, 嫌気性水素発酵による有機性排水からの水素生産に関する研究の動向, *日本水処理生物学会誌*, 44(2), pp. 57-75, 2008.
- 7) Mu, Y., Yu, H.Q. and Wang, Y., The role of pH in the fermentative H₂ production from an acidogenic granule-based reactor, *Chemosphere*, 64(3), pp. 350-358, 2006.
- 8) Gavala, H.N., Skiadas, I.V., and Ahring, B.K., Biological hydrogen production using an up-flow anaerobic sludge blanket reactor, *Int J Hydrogen Energy*, 29(1), pp. 33-39, 2004.
- 9) Yang, H. and Shen, J., Effect of ferrous iron concentration on anaerobic bio-hydrogen production from soluble starch, *Int J Hydrogen Energy*, 31(15), pp. 2137-2146, 2006.
- 10) J.H. Youn and H.S. Shin, Comparative performance between temperature-phased and conventional mesophilic two-phased processes in terms of anaerobically produced bioenergy from food waste, *Waste Manag Res*, 23 (1), pp. 32-38, 2005.
- 11) I. Valdez-Vazquez, E. Rios-Leal, F. Esparza-García, F. Cecchi and H.M. Poggi-Varaldo, Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H₂ production from organic waste: mesophilic versus thermophilic regime, *Int J Hydrogen Energy*, 30 (13-14), pp. 1383-1391, 2005.
- 12) H. Yu, Z. Zhu, W. Hu and H. Zhang, Hydrogen production from rice winery wastewater in an upflow anaerobic reactor by using mixed anaerobic culture, *Int J Hydrogen Energy*, 27 (11-12), pp. 1359-1365, 2002.
- 13) APHA, Standard methods for the examination of water and wastewater (21st ed.), American Public Health Association, Washington, D.C. (2005).
- 14) Amann, R.L., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., and Stahl, D.A. : Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations, *Appl Environ Microbiol*, 56(6), pp. 1919-1925, 1990.
- 15) Daims H., Brühl A., Amann R., Schleifer K.-H. and Wagner M, Thedomain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection on all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set, *Syst Appl Microbiol*, 22(3), pp.434-444, 1999.
- 16) Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., and Lane, D.J., 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study, *J Bacteriol*, 173(2), pp. 697-703, 1991.
- 17) D.A. Stahl and R. Amann, Development and application of nucleic acid probes. In: E. Stackebrandt and M. Goodfellow, Editors, *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK (1991), pp. 205-248.
- 18) 関口 勇地, 大橋 晶良, 珠坪 一晃, 荒木 信夫, 原田 秀樹, 嫌気性グラニュール汚泥からの rRNA 遺伝子のクローニングによって推定された未知な細菌の検出とその空間的分布 -16SrRNA から見た中温・高温グラニュール汚泥の微生物生態, *環境工学研究論文*, 35, pp. 427-443, 1998.
- 19) Sekiguchi, Y., H. Takahashi, Y. Kamagata, A. Ohashi, and H. Harada. In situ detection, isolation, and physiological properties of a thin filamentous microorganism abundant in methanogenic granular sludges: a novel isolate affiliated with a clone cluster, the green non-sulfur bacteria, subdivision I, *Appl Environ Microbiol*, 67(12), pp. 5740-5749, 2001.
- 20) Ueno, Y., Haruta, S., Ishii, M., and Igarashi, Y., Characterization of microorganism isolated from the effluent of hydrogen fermentation by microflora, *J Biosci Bioeng* 92(4), pp. 397-400, 2001.
- 21) Y. Akutsu, Y.Y. Li, M. Tandukar, K. Kubota, H. Harada, Effect of seed sludge on fermentative characteristics and microbial community structures in thermophilic hydrogen fermentation of starch, *Int J Hydrogen Energy* 33 (22), pp.6541-6548, 2008.
- 22) H.Q. Yu and Y. Mu, Biological hydrogen production in a UASB reactor with granules. II: reactor performance in 3-year operation, *Biotechnol Bioeng* 94 (5), pp. 988-995, 2006.
- 23) H.N. Gavala, I.V. Skiadas and B.K. Ahring, Biological hydrogen production in suspended and attached growth an anaerobic reactor systems, *Int J Hydrogen Energy*, 31(9), pp.1164-1175, 2005.
- 24) T.A. Kotsopoulos, R.J. Zeng and I. Angelidaki, Biohydrogen production in granular up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors with mixed cultures under hyper-thermophilic temperature (70 °C), *Biotechnol Bioeng*, 94 (2), pp. 296-302, 2006.
- 25) F.Y. Chang and C.Y. Lin, Biohydrogen production using an up-flow anaerobic sludge blanket reactor, *Int J Hydrogen Energy*, 29 (1), pp. 33-39, 2004.
- 26) H. Yang, P. Shao, T. Lu, J. Shen, D. Wang and Z. Xu, Continuous bio-hydrogen production from citric acid wastewater via facultative anaerobic bacteria, *Int J Hydrogen Energy*, 31 (10), pp. 1306-1313, 2006.
- 27) S.Y. Wu, C.N. Lin and J.S. Chang, Hydrogen production with immobilized sewage sludge in three-phase fluidized-bed bioreactors, *Biotechnol Prog*, 19 (3), pp. 828-832, 2003.
- 28) H. Yu, Z. Zhu, W. Hu and H. Zhang, Hydrogen production

- from rice winery wastewater in an upflow anaerobic reactor by using mixed anaerobic culture, *Int J Hydrogen Energy* 27 (11-12), pp. 1359-1365, 2002.
- 29) Y. Akutsu, D. Lee, Y. Chi, Y. Li, H. Harada, Thermophilic fermentative hydrogen production from starch-wastewater with bio-granules, *Int J Hydrogen Energy*, 34(12), pp.5061-5071, 2009.
- 30) 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*, 27(7), pp. 473-479, 2004.
- 31) 河野 孝志, 李 玉友, 野池 達也, 嫌気性水素発酵の基礎既往研究と発展, *用水と廃水*, 47(11), pp.39-47, 2005.
- 32) H. Satoh, Y. Miura, I. Tsushima, S. Okabe, Layered structure of bacterial and archaeal communities and their in situ activities in anaerobic granules *Appl Environ Microbiol*, 73(22), pp. 7300-7307, 2007.
- 33) Y. Sekiguchi, Y. Kamagata, K. Nakamura, A. Ohashi, H. Harada, Fluorescence in situ hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules, *Appl Environ Microbiol*, 65(3), pp. 1280-1288, 1999.
- 34) H. S. Jeong, Y. H. Kim, S. H. Yeom, B. K. Song and S. Il Lee Facilitated UASB granule formation using organic-inorganic hybrid polymers, *Process Biochemistry*, 40(1), pp 89-94, 2005.
- 35) Y.Q. Liu, Y. Liu, J..H. Tay, The effects of extracellular polymeric substances on the formation and stability of biogranules, *Appl Microbiol Biotechnol*, 65(2), pp.143-148, 2004.
- 36) T. Noike, H. Takabatake, O. Mizuno, M. Ohba, Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria, *Int J Hydrogen Energy* 27(11-12), pp.1367-1371, 2002.
- 37) 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, *環境工学論文*, 39, pp55-65, 2002.

(2010.5.21 受付)

Analysis of Bio-conversion and Microbial Community of Thermophilic Hydrogen-producing UASB Process Treating Starch Wastewater

Kumi KIMURA¹, Takuro KOBAYASHI², Yu-You Li³, Yutaka NAKAI¹

¹Graduate School of Agricultural studies, Tohoku University

²National Institute for Environmental Studies

³Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University

In this study, characteristics of biological conversion of substrate and microbial community structure of thermophilic hydrogen-producing UASB process treating artificial starch wastewater was investigated in the continuous operation gradually shortening HRT. The process was successfully operated during the operation of OLR 16-32 kg-COD_C/m³/d, where substrate removal efficiency had been higher than 85% and the maximum hydrogen production yield was 1.2 mol/mol- glucose at HRT 24 h. Composition of metabolic products changed among three operating periods of different HRT condition., and the predominant product at HRT 24 h and HRT 12h was acetate and butyrate while that at HRT16h was lactic acid. The results of clone analysis and FISH targeting at hydrogen-producing granule revealed the genus *Thermoanaerobacterium* as. hydrogen-producing bacteria was predominant in the reactor during the continuous operation, suggesting that bacteria the genus *Thermoanaerobacterium* was successfully retained in the UASB reactor and played an important role in the hydrogen production.