

熱耐性を持つ水素生成菌を利用した水素発酵に適した条件の検討

山口大学大学院 理工学研究科 ○森本真太郎

RAFIANI、今井剛、関根雅彦、樋口隆哉、山本浩一、KARIM Md.Rezaul

1. 研究背景および目的

現在、石油や石炭のようなエネルギー資源である化石燃料の枯渇が問題視されている。また、石油や石炭は構造内に炭素を有しているので燃焼させると二酸化炭素が生成・排出される。二酸化炭素を排出することは温暖化が進行する現在において望ましくない。そこで農業系廃棄物や生ごみ、廃材や下水汚泥などのバイオマスエネルギーへと変換することで、電気や熱、水素やメタンガスなどのバイオマスエネルギーとして利用するという、代替エネルギーの研究が行われている。特に水素はエネルギーとして直接回収・利用できることや、燃焼しても二酸化炭素を排出しないことから、代替エネルギーとして有望視されている。

本研究では、有機性廃棄物などのバイオマスから直接水素を生成する水素発酵技術に着目し、エネルギー回収プロセスとして代表的な嫌気性処理法を用いて、水素生成に適した条件の検討を行う。

2. 実験方法

2.1 水素生成方法

嫌気性処理における有機物の分解は加水分解・酸発酵・メタン発酵の三段階を経て、最終的にメタンと二酸化炭素が生成される（図1）。分解過程で生成される水素は、メタン発酵段階におけるメタン生成菌の働きによりメタンに変換されてしまうため、通常の嫌気性処理では水素を分離・回収することは難しいとされている。効率よく水素を生成させるためにはメタン発酵を抑制する必要がある。嫌気性処理は通常、約 35 で行われ、この温度域では中温菌が活性化している。そのため、高温（70）に設定することで中温菌（主にメタン生成菌）の働きを抑制し、好熱性菌（主に水素生成菌）を活性化させる。好熱性菌とは最適生育温度が 55 以上、増殖可能温度が 50 以上の微生物のことをいう。さらに、メタン生成菌は中性付近でのみ活性化するという特徴を持つため、pH を酸性に保つことによりメタン発酵を抑制させ、優先的に水素を生成させることができると考えられる。したがって pH を酸性に保持して、35 と 70 の 2 つの温度条件を比較し、水素の生成効率や菌相にどのような違いが生じるかを検討する。

2.2 水素生成実験

本実験は嫌気性処理における水素生成量、メタン生成量を把握するために行った。嫌気性消化汚泥とその上澄み液を入れた 2 本の大バイアルビンと 4 本の小バイアルビンを用意し、それらのビン内の気相部は窒素で置換した。ここで、小バイアルビンの消化汚泥には事前に 105 で 20 分間温度ショックを与えた。水素生成菌の胞子は熱耐性を持つので、メタン生成菌の活性を抑制するためにこの処置を行った。これにより温度ショックを与えていないものとの水素・メタン生成量、さらに菌相の違いを確認する。以後、上記の 4 条件を 35、35 ショック、70、70 ショックとする（表2）。また、嫌気性菌を活性化させるための基質としてグルコースを用い、基質濃度が 2000mg-COD_{Cr}/L になるように各バイアルビンに注入した。全培養期間は約 5 ヶ月間で、実験は計 5 サイクル行った。液相はグルコースの分解により、揮発性脂肪酸（酪酸、酢酸、プロピオン酸）が蓄積される。蓄積されると、微生物によるグルコースの分解を阻害することが知られているため、2cycle 目以降はサイクル毎に液相を入れ替え、液相に対して基質濃度が 2000mg-COD_{Cr}/L となるようにグルコースを注入した。サンプリングを行う際はガス発生量、ガス組成、pH を測定した。その他の分析項目として浮遊物質(SS)、強熱減量(VSS)、全有機炭素(TOC)、揮発性脂肪酸(VFA)を測定した。

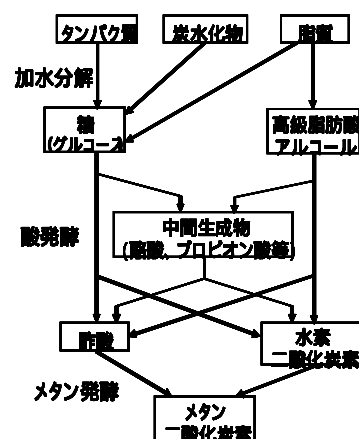


図 1. 嫌気性微生物による有機物の分解過程

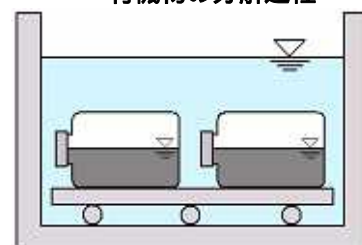


図 2. 実験装置の概略

表 1. 実験条件

基質濃度	2000mg-COD _{Cr} /L
槽内温度	35 or 70
振とう速度	70 ~ 100回/分

表 2. サンプルの培養条件

500mlバイアルビン (各1本)	35
	70
70mlバイアルビン (各2本)	35 + 温度ショック
	70 + 温度ショック

3. 実験結果および考察

菌体あたりの水素およびメタン生成量の結果を図3に示す。35 ショック、70 ショックに関しては、各2本の平均値を用いた。水素生成量は全期間を通して、減少していなかったため、この水素生成方法は長期的に運転できると考えられる。1cycle 目に関してはどの条件も pH を酸性に保つことができなかったためメタンが生成され、水素生成量が少なかった。このことからメタン発酵を抑制するためには pH を酸性に保つことが必要であることが確認された。2cycle 目以降は pH を酸性に保つことができたが、35 に関しては4cycle 目以降、少量ではあるもののメタンが生成された。これは長期間培養することで低 pH の環境に馴致された、または酸耐性をもつ菌が増殖してきたことによると考えられる。一方、35 ショックはほとんどメタン生成がみられないので、温度ショックはメタン発酵を抑制する手段として有効であると考えられる。しかし中温状態では pH を酸性に保つことと温度ショックを与えることでメタン発酵を抑制できたが、水素生成量は多くなかった。このことから、効率よく水素を生成させるには中温での培養は適していないと考えられる。70 と70 ショックについては、どちらもメタン生成がほぼみられなかったことから、高温状態に保持することでメタン生成菌にとって過酷な環境となり、メタン発酵を抑制できたと考えられる。しかし水素生成量に着目すると70 は安定して水素を生成できているのに対し、70 ショックは5cycle 目に若干その回復傾向がみられるものの全体的に減少傾向にあり、生成量にばらつきがみられ、温度ショックを与えていないもの(70)に劣る結果となった。したがって長期培養において、水素生成効率の上昇に温度ショックの効果はないものと考えられる。以上のことから、70 は pH を酸性に保つだけでメタン発酵を抑制し、さらに他条件に比べ安定して水素を生成できていたことから、水素生成に適した条件であると考えられる。

4. 微生物群集構造解析

本研究では長期培養により、各条件での菌相構造がどのように変化していくのか経時的に把握するため、また水素生成に関わっていると考えられる菌種を特定するために生物学的手法(PCR-DGGE 法)を用いた微生物群集構造解析を行った。培養前の污泥から DNA を抽出し、さらに2週間おきに DNA を抽出した。DGGE 解析の結果を図4に示す。なお、培養前の污泥をコントロールとする。結果より、中温と高温の条件間で菌相に大きな違いが確認できた。特に高温条件でははっきりとした、特異なバンドが検出されていることから、長期培養により高温に特化した菌が優占してきたものと考えられる。また、どの条件においても培養前と培養後では菌相が異なることが確認された。そしてこの結果を用い、シークエンス解析(塩基配列の決定)を行った。35 では *Syntrophobacter fumaroxidans* という菌種の同定に成功した。この菌は、水素資化性のメタン生成菌と共生関係をもつプロピオン酸酸化細菌であり、メタン生成菌の生育、メタン生成を支持する働きをすることがわかった。70、70 ショックについては *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* という菌種の同定に成功した。この菌種は糖をエタノールに発酵する働きをし、その過程で水素が生成されることがわかった。

5. まとめ

- ・高温(70)の条件において、pH を酸性に保つことで長期的に安定して水素を生成できることがわかった。
- ・DGGE 解析の結果、中温と高温では菌相に大きな違いがあることが確認できた。

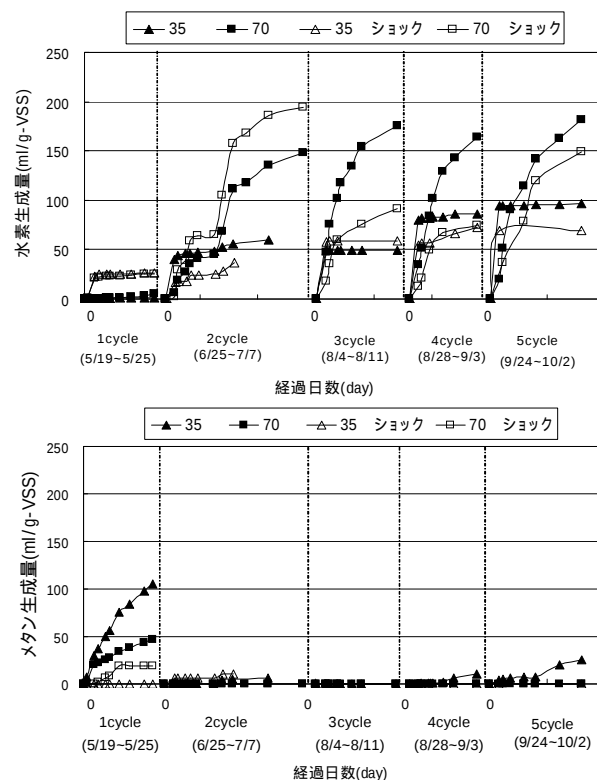
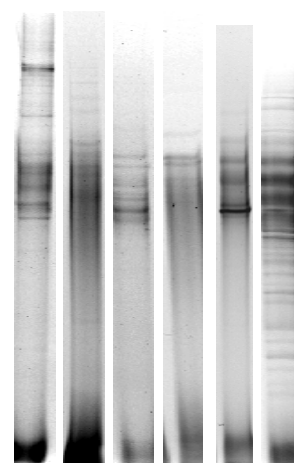


図3 単位菌体重量あたりの水素およびメタン生成量



コントロール
コントロール(ショック)
35 (20週後)
35 ショック(20週後)
70 (20週後)
70 ショック(20週後)

図4. DGGE 解析結果