

# 食品廃棄物を用いた水素発酵条件の基礎的検討（Ⅱ）

村瀬佳史・久保倉宏一・川越保徳\*

福岡市保健環境研究所廃棄物試験研究センター

\* 熊本大学大学院自然科学研究科社会環境工学専攻 准教授

## Fundamental Study for Hydrogen Fermentation Condition using the Food Waste(Ⅱ)

Yoshifumi MURASE, Koichi KUBOKURA, Yasunori KAWAGOSHI

Waste Research Center, Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment

\* Graduate School of Science & Technology Kumamoto University

### 要約

昨年度行った実験データをもとに、乾燥食品廃棄物として学校給食残渣の生ごみ処理機生成物を、また菌種として下水消化汚泥を用いて嫌気発酵による繰り返しバッチ試験を行い、培養温度、基質濃度などの基礎的条件を検討した。

その結果、37℃ではバッチ数増加に従ってガスの発生量は低下したが、ガス発生は継続した。50℃では1バッチ目はガスが発生したが、2バッチ目からガス発生量が極端に低下したので、連続発酵には37℃の方が適していると考えられた。また基質が高濃度よりも低濃度で安定したガス発生量、水素発生率が得られた。さらに、発酵液に含まれる有機酸の組成を調べたところ、ガス発生量が少ないときには乳酸が多く生成しており乳酸が阻害物質となる可能性が考えられた。

**Key Words** : 食品廃棄物 food waste, 水素発酵 hydrogen fermentation, 乳酸 lactic acid,  
消化汚泥 digested sewage sludge, 嫌気発酵 anaerobic fermentation

## 1 はじめに

近年、循環型社会の構築に向けて廃棄物の発生抑制やリサイクルに関する技術開発が急がれており、特にエネルギーの大部分を輸入に頼る日本では廃棄物からのエネルギー回収技術は重要な課題となっている。

そこで、化石燃料に代わるクリーンなエネルギーとして水素が注目を浴びており、微生物発酵を用いた有機性廃棄物からの水素やメタン回収技術の研究が行われるようになった。水素はメタンと異なり改質器で変換せずに直接燃料電池で電気エネルギーとして利用できるため、有機性廃棄物処理により水素回収を行うことができれば循環型社会の構築に大きく寄与できる<sup>1)</sup>。

従来の研究ではグルコースやでん粉などの単一炭水化物を対象とした基礎研究が多かったため実用化に向けて食品廃棄物からの雑菌混入などを考慮し、基質として乾燥食品残渣を、種菌として複合微生物系である下水消化汚泥を用いて水素発酵試験を行い、前報で報告した。

そこで、本報では同様に、乾燥食品残渣及び下水消化汚泥を用いて、連続発酵試験を想定した繰り返しバッチ試験を行い、連続発酵実用化に向けて、基質濃度、培養温度などの条件を検討した。

## 2 実験方法

## 2.1 基質および種菌

基質には前報<sup>2)</sup>と同様、学校給食残渣を乾燥粉末化させたもの(生ごみ処理機生成物)を1.0mmメッシュで篩い、異物を除去したものをを用いた。基質中のフェノール硫酸法<sup>3)</sup>による全糖度は40%であった。

## 2.2 発酵条件及び回分試験装置

回分試験は、次に示す条件で行った。

- ・種菌…煮沸処理下水消化汚泥。下水消化汚泥は1.0mmメッシュでろ過して雑物を除いて用いた。
- ・基質…7.5g, 10.0g, 15.0g  
(基質濃度は汚泥200mLに対するもの)
- ・栄養塩…NH<sub>4</sub>Cl 340mg/L  
Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 400mg/L  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 25mg/L  
CuSO<sub>4</sub>・5H<sub>2</sub>O 1mg/L  
MgCl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>O 20mg/L  
MnCl<sub>2</sub>・4H<sub>2</sub>O 2.7mg/L  
CoCl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>O 0.025mg/L  
FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 5mg/L
- ・初期pH…6.7
- ・培養温度…37℃, 50℃

消化汚泥の煮沸処理は、ねじロボトルを用いて沸騰水浴中で30分間加熱し、冷却して用いた。

回分実験装置の概略を図1に示す。容積200mLのバイアル瓶に種菌汚泥を200mLずつ入れ、各濃度になるように基質を添加した後、栄養塩を加えN<sub>2</sub>置換で嫌気条件にして密栓し、インキュベーター内でスターラーにて攪拌しながら24時間培養した。発生ガスは、アルミ製のガスバッグに回収した。24時間後、発酵液を100mL除去し新たに初日と同量の基質と栄養塩を加えたのち、蒸留水で200mLまでメスアップし、繰り返しバッチ試験を8バッチまで行った。

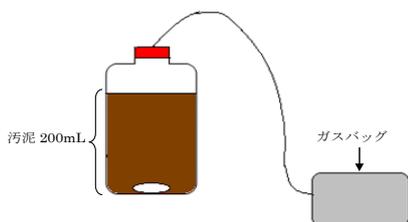


図1 水素発酵試験装置の概要

## 2.3 分析法および条件

ガスバッグに回収した発生ガスの組成は表1の

TCD-GCにて測定したのち、発生ガス量を水上置換法にて測定した。

また、有機酸は発酵液に5倍量のメタノール、アセトニトリル1:1混液を加えて除たん白を行い、3500rpmで5分間遠心分離しHPLC用試料とした後、表2のポストカラム反応による可視検出法で乳酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸を測定した。全糖度消費率については、発酵液中の全糖分量をフェノール硫酸法でグルコースを標準として測定した。フェノール硫酸法を次に示す。

1. 試験管に発酵液を適宜希釈し、ろ過したものを0.5mLとる。
2. 5%(w/v)フェノール試薬を0.5mL加え攪拌する。
3. 濃硫酸を2.5mL加え、すぐに激しく攪拌する。
4. 室温に20分以上放置する。
5. 分光光度計で490nmでの吸収を測定しグルコースの検量線より濃度を求める。

表1 ガス組成分析条件

装置	Yanaco G3800
カラム	MS5A+Porapak(2m×6φ+1.5m×5φ)
① キャリアーガス	He 28mL/min
カラム温度	50℃
TCD 温度	150℃
TCD 電流	100mA
分析ガス	CO <sub>2</sub> , CH <sub>4</sub> , N <sub>2</sub> , O <sub>2</sub>
カラム	Unibeads(2m×3φ)
② キャリアーガス	Ar 50mL/min
カラム温度	125℃
TCD 温度	150℃
TCD 電流	60mA
分析ガス	H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , CH <sub>4</sub> , Air(N <sub>2</sub> +O <sub>2</sub> )

表2 有機酸分析条件

装置	DIONEX DX-100
カラム	Rspak KC-811(300mm×8φ)
ガードカラム	Rspak KC-LG(50mm×8φ)
カラム温度	50℃
溶離液	1mM HClO <sub>4</sub>
流速	0.8mL/min
注入量	20μL
反応液	1/10 ST3-R(Shodex)
反応ポンプ	SNK FI-710L
検出器	SOMA S-3702(430nm)
データ処理ソフト	SIC480 II データステーション

## 3 結果および考察

### 3.1 培養温度およびpH

前報では培養温度37℃, 50℃においても発生ガス量に違いがなかったため、37℃, 50℃で繰り返しバッチ試験を

表3 37℃における繰り返しバッチ試験結果

発生ガス量と発酵終了時のpH 単位 [ L ]/Bottle

基質濃度	1バッチ目	2バッチ目	3バッチ目	4バッチ目	5バッチ目	6バッチ目	7バッチ目	8バッチ目
7.5g	1.6 (pH5.0)	1.3 (pH4.9)	1.2 (pH5.0)	1.2 (pH5.0)	0.8 (pH4.4)	0.1 (pH4.6)	<0.1 (pH5.1)	<0.1 (pH4.5)
10g	1.7 (pH4.8)	0.8 (pH5.0)	1.2 (pH5.0)	0.8 (pH4.8)	0.7 (pH4.5)	<0.1 (pH4.6)	<0.1 (pH4.9)	1.2 (pH4.6)
15g	1.9 (pH4.9)	0.8 (pH5.0)	1.1 (pH5.0)	0.7 (pH4.9)	0.9 (pH4.5)	0.1 (pH4.7)	<0.1 (pH5.0)	0.2 (pH4.7)

発生ガス中の水素の割合 単位 [ % ]

基質濃度	1バッチ目	2バッチ目	3バッチ目	4バッチ目	5バッチ目	6バッチ目	7バッチ目	8バッチ目
7.5g	40.0	49.1	44.9	46.1	42.0	35.5	-	-
10g	40.8	46.1	44.1	42.4	30.0	-	-	33.3
15g	40.9	44.9	44.4	41.0	28.7	33.1	-	-

※ - , ガス発生量が0.1L未満の場合は組成分析なし

乳酸濃度 単位 [ % ]

基質濃度	1バッチ目	2バッチ目	3バッチ目	4バッチ目	5バッチ目	6バッチ目	7バッチ目	8バッチ目
7.5g	0.05	0.00	0.00	-	0.70	1.14	0.92	1.57
10g	0.08	0.34	0.15	-	1.57	1.26	1.24	0.08
15g	0.10	0.33	0.35	-	1.39	1.77	1.72	2.07

※ 4バッチ目装置不良のため乳酸データ欠測

全糖分消費率 単位 [ % ]

基質濃度	1バッチ目	2バッチ目	3バッチ目	4バッチ目	5バッチ目	6バッチ目	7バッチ目	8バッチ目
7.5g	78	53	49	44	72	65	43	65
10g	65	32	39	32	51	56	52	47
15g	55	34	34	30	56	59	53	53

表4 50℃における繰り返しバッチ試験結果

発生ガス量と発酵終了時のpH 単位 [ L ]/Bottle

基質濃度	1バッチ目	2バッチ目	3バッチ目	4バッチ目	5バッチ目	6バッチ目	7バッチ目	8バッチ目
7.5g	1.5 (pH5.0)	<0.1 (pH4.4)	0.1 (pH4.4)	<0.1 (pH4.4)	<0.1 (pH4.4)	<0.1 (pH4.8)	<0.1 (pH5.1)	<0.1 (pH5.1)
10g	1.4 (pH4.9)	<0.1 (pH4.4)	0.3 (pH4.6)	<0.1 (pH4.5)	<0.1 (pH4.4)	0.1 (pH4.7)	<0.1 (pH4.9)	<0.1 (pH5.0)
15g	1.8 (pH5.1)	<0.1 (pH4.4)	<0.1 (pH4.4)	<0.1 (pH4.4)	0.1 (pH4.4)	0.2 (pH5.0)	<0.1 (pH4.9)	<0.1 (pH4.9)

発生ガス中の水素の割合 単位 [ % ]

基質濃度	1バッチ目	2バッチ目	3バッチ目	4バッチ目	5バッチ目	6バッチ目	7バッチ目	8バッチ目
7.5g	34.1	-	22.2	-	-	-	-	-
10g	32.1	-	43.4	-	-	28.4	-	-
15g	34.3	-	-	-	20.2	39.0	-	-

※ - , ガス発生量が0.1L未満の場合は組成分析なし

乳酸濃度 単位 [ % ]

基質濃度	1バッチ目	2バッチ目	3バッチ目	4バッチ目	5バッチ目	6バッチ目	7バッチ目	8バッチ目
7.5g	0.14	1.38	1.75	1.93	1.82	1.43	1.34	1.07
10g	0.19	1.84	1.57	2.36	2.49	2.15	1.44	1.54
15g	0.10	1.96	2.40	2.66	3.20	1.95	2.39	2.34

全糖分消費率 単位 [ % ]

基質濃度	1バッチ目	2バッチ目	3バッチ目	4バッチ目	5バッチ目	6バッチ目	7バッチ目	8バッチ目
7.5g	64	20	8	<1	3	34	19	44
10g	25	7	<1	<1	<1	29	26	38
15g	31	2	5	10	8	28	33	42

行った。37℃における発生ガス量、ガス組成、乳酸濃度、全糖分消費率の結果を表3に、50℃における結果を表4に示す。

50℃において1バッチ目は37℃と同様ガスは発生したが、2バッチ目以降は、ガス発生量はどの基質濃度でもほぼ0.1Lを下回った。一方、37℃では2バッチ目以降、一時的にガスの生成が極端に減少することもあったが、バッチ数が増すごとに少しずつ減少しつつも、継続的にガスが発生した。50℃での培養は1バッチのみでの発生水素ガス回収には有効であるが、連続ガス回収には適さ

ないと考えられる。また、基質7.5g、10.0g、15.0gでは基質を多く入れた場合でも発生ガス量に大きな違いはなかった。むしろ15.0g/200mLの場合、消費率が50%程度であることから、濃度が高すぎるのではないかと考えられる。*C.acetobutylicum*の回分培養では、水素生成を伴って酸生成が進行し、酢酸と酪酸の蓄積でpHが4.5位まで低下する<sup>4)</sup>との報告があるが、本実験ではpH5.0付近で推移することが多かった。

### 3.2 有機酸生成とガス生成

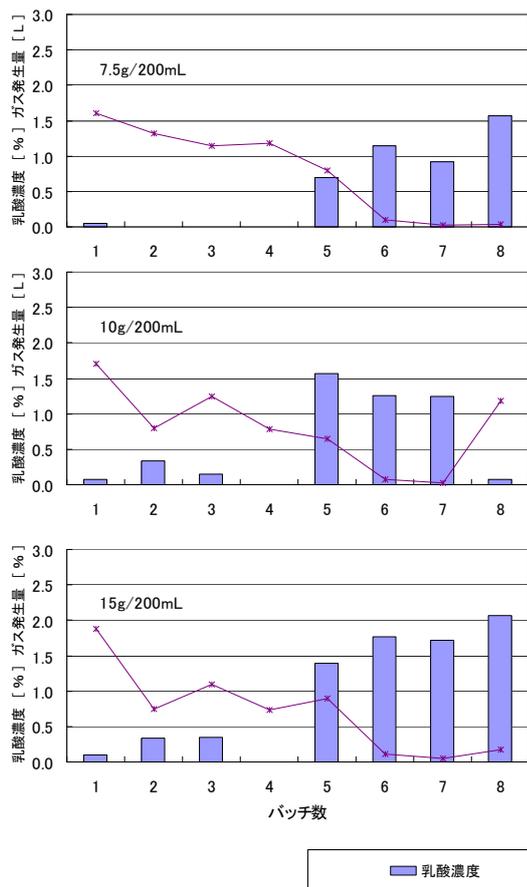


図2 37°Cにおけるガス量と乳酸濃度の関係

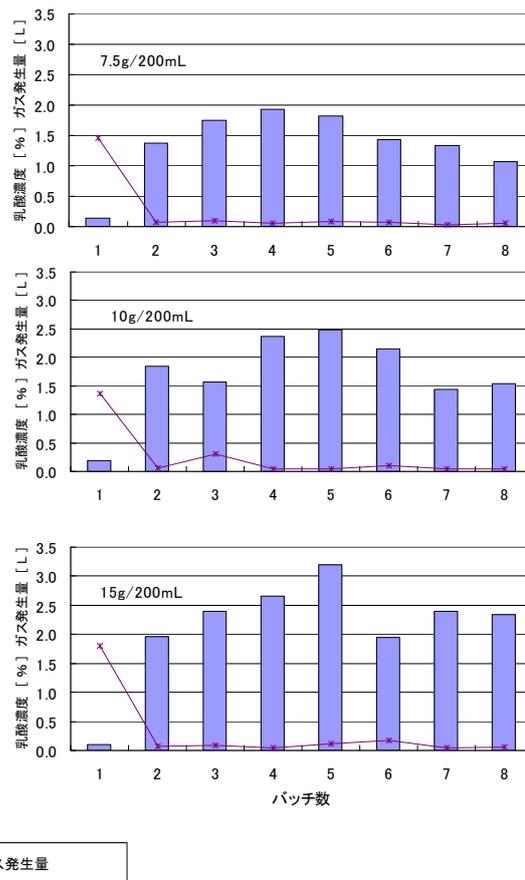


図3 50°Cにおけるガス量と乳酸濃度の関係

水素発酵と有機酸の関係を調べるため、発酵液に含まれる有機酸の組成を調べた。37°Cでのガス発生量と乳酸濃度の関係を図2に、50°Cでの関係を図3に示す。その結果、50°Cにおいて2バッチ目以降ガス発生量が減少するにつれ、有機酸中に含まれる乳酸の割合が増加した。上木ら<sup>4)</sup>によれば *Clostridium* 属の細菌はグルコース濃度の増加に伴い酢酸・酪酸発酵から乳酸発酵へと発酵を変換する。この場合、グルコース濃度をあげても、水素生成は発生量が一定のレベルに達すると水素生成が停止し、以降のグルコース消費量の増加分は乳酸発酵にまわされるとの報告がある。37°C、基質濃度 10g/200mL、15g/200mL の高濃度で培養を行ったときより、7.5g/200mL の低濃度で培養を行った場合に安定したガス量が得られたのは、表3の消費率より、基質15gの消費率は、およそ30~50%程度と低くなっており、このことから高濃度では基質が消費されずにかかり残っているため、発酵液中のグルコース濃度が高くなり乳酸発酵が行われたためであると考えられる。また、7.5g/200mL の低濃度においても繰り返しバッチ数が増すごとにガス発生量、水素生成率が減少した。これは発酵液に消費されずに残った糖分が実験を繰り返すごとに蓄積されることにより発酵液中のグルコース濃度が高くなり、実験初期

では酢酸・酪酸発酵により水素ガスが生成されていたものが、乳酸発酵へと転じたためではないかと考えられる。今後、糖濃度が高くなりすぎないような基質の供給量や濃度、引抜き量などについて検討が必要である。

ガス組成については発生ガス量が多い時はおよそ、 $H_2$  : 45~50%、 $CO_2$  : 55~50%、ガス生成量が低いときは  $H_2$  : 30~40%、 $CO_2$  : 70~60%、の割合であった。50°Cでの培養実験で乳酸が多く生成されていたことから乳酸発酵が行われる条件として、グルコース濃度の他に培養温度も影響するのではないかと考えられる。発生ガス中の水素の割合が高くなったのは、培養温度37°C、基質濃度7.5g/200mL 糖消費率45~50%の場合であった。これは基質濃度が低いため酢酸・酪酸発酵が持続したためであると考えられる。今後、継続的な水素発生のためには乳酸濃度を増加させないよう引抜き量を調整する等の工夫が必要であると考えられる。

#### 4 まとめ

乾燥食品残渣と下水消化汚泥を用いた繰り返しバッチ試験を37°C、50°Cで行ったところ、次のことが分かった。

1. 50℃で培養を行った結果、1 バッチ目を除き、ガスがほとんど出なかったことから、37℃でのガス発生は37℃での培養が適していると考えられる。
2. 基質濃度が高くなると安定したガス量が得られなかったのは、発酵液中のグルコース濃度が高くなり乳酸発酵がおこるためであると考えられ、基質濃度7.5g/200mLでのガス発生量が安定していた。
3. 低濃度の7.5g/200mLにおいてもガス発生量、水素生成率が低下したのは発酵液中に未消費のグルコースが蓄積することによりグルコース濃度が高くなり、乳酸発酵へと転じたからであると考えられる。
4. 50℃で培養を行うと、ほとんどガスが発生しなかったが、発酵液中の有機酸のほとんどが乳酸であった

ため、主に乳酸発酵が行われていると考えられる。

#### 文献

- 1) 雷書紅:微生物を利用した生ごみからの水素製造技術, ECO INDUSTRY, 8(9), 19-25, 2003
- 2) 草野陽子, 久保倉宏一, 吉武和人:食品廃棄物を用いた水素発酵条件の最適化, 福岡市保健環境研究所報, 32, 45~49
- 3) 日本食品科学工学会, 新・食品分析法編集委員会編, 新・食品分析法, 光琳(1996), p531
- 4) 上木勝司:嫌気性微生物学, 賢養堂(1993), p41