

博士論文

発酵法による食品廃棄物からの水素エネルギー生産に関する研究

Biological hydrogen production from food waste by fermentation

国立大学法人 横浜国立大学大学院

環境情報学府

安田圭吾

Keigo Yasuda

2009年3月

## 目次

|                                |           |
|--------------------------------|-----------|
| 目次                             | i         |
| Table リスト                      | iv        |
| Figure リスト                     | v         |
| <b>第1章 緒言</b>                  | <b>1</b>  |
| 1.1 研究背景                       |           |
| 1.1.1 はじめに                     |           |
| 1.1.2 バイオマスエネルギー               |           |
| 1.1.3 日本における食品廃棄物の発生量及び再生利用の現状 |           |
| 1.1.4 水素エネルギー                  |           |
| 1.2 研究目的及び各章の概要                |           |
| 参考文献                           |           |
| <b>第2章 水素発酵に関する知見及び既往の研究</b>   | <b>12</b> |
| 2.1 水素発酵の利点と問題点                |           |
| 2.2 微生物による水素発生のメカニズム           |           |
| 2.3 水素発生細菌                     |           |
| 2.3.1 通性嫌気性菌                   |           |
| 2.3.2 絶対嫌気性菌                   |           |
| 2.3.3 好熱菌                      |           |
| 2.3.4 水素発生菌群                   |           |
| 2.4 水素発酵に影響を及ぼす諸因子             |           |
| 2.4.1 温度                       |           |
| 2.4.2 pH                       |           |
| 2.4.3 基質                       |           |
| 2.4.3.1 基質の種類及び分類              |           |
| 2.4.3.2 セルロースの利用及び前処理          |           |
| 2.4.4 栄養条件                     |           |
| 2.4.5 菌体濃度                     |           |
| 2.4.6 嫌気度                      |           |
| 2.4.7 水素分圧                     |           |
| 参考文献                           |           |

|                                       |           |
|---------------------------------------|-----------|
| <b>第3章 回分発酵によるデンプンからの水素発生特性</b> ..... | <b>38</b> |
| 3.1 目的                                |           |
| 3.2 実験方法                              |           |
| 3.2.1 実験条件                            |           |
| 3.2.2 実験装置                            |           |
| 3.3 結果及び考察                            |           |
| 3.3.1 発酵温度の影響                         |           |
| 3.3.2 pH の影響                          |           |
| 3.3.3 基質濃度の影響                         |           |
| 3.3.4 鉄イオンの影響                         |           |
| 3.3.5 デンプンからの水素発生に関する文献の水素発生能の比較      |           |
| 3.4 結論                                |           |
| 参考文献                                  |           |
| <br>                                  |           |
| <b>第4章 連続発酵によるデンプンからの水素発生</b> .....   | <b>58</b> |
| 4.1 目的                                |           |
| 4.2 実験方法                              |           |
| 4.2.1 実験条件                            |           |
| 4.2.2 実験装置                            |           |
| 4.3 結果及び考察                            |           |
| 4.3.1 HRT の影響                         |           |
| 4.3.2 固定化担体を用いた水素発生に対する HRT の影響       |           |
| 4.4 結論                                |           |
| 参考文献                                  |           |
| <br>                                  |           |
| <b>第5章 食品廃棄物からの水素発生</b> .....         | <b>74</b> |
| 5.1 目的                                |           |
| 5.2 実験方法                              |           |
| 5.2.1 実験条件                            |           |
| 5.2.2 実験装置                            |           |
| 5.3 結果及び考察                            |           |
| 5.3.1 擬似生ごみの元素分析                      |           |
| 5.3.2 回分発酵による擬似生ごみからの水素発生             |           |
| 5.3.2.1 魚のはらわた添加効果                    |           |
| 5.3.2.2 C/N 比の影響                      |           |
| 5.3.2.3 鉄イオンの影響                       |           |

5.3.2.4 擬似生ごみ添加量の影響

5.3.3 繰り返し回分発酵による擬似生ごみからの水素発生

5.4 結論

参考文献

**第6章 結言** ..... 89

6.1 水素発酵技術の導入可能性の検討

6.2 結論

6.3 今後の展望

参考文献

本研究に関連した論文及び発表 ..... 96

謝辞 ..... 98

## Table リスト

Table.1.1 食品関連産業における業種別の再生利用の仕向割合

Table.2.1 各種微生物の増殖速度

Table.2.2 好熱性水素発生菌の一覧

Table.2.3 生分解性による基質の分類

Table.2.4 セルロース及びセルロース系バイオマスの水素発酵に関する既往研究

Table.2.5 固定化担体または自己凝集による水素発酵に関する既往研究

Table.3.1 YNU 嫌気培地の組成

Table.3.2 水素発生能に対する鉄イオンの影響に関する文献の水素収率の比較

Table.3.3 回分発酵によるデンプンからの水素発生における水素発生能の文献値の比較

Table.4.1 連続発酵におけるフィードの組成

Table.4.2 代謝産物の物質収支

Table.4.3 連続発酵によるデンプンからの水素発生における水素発生能の文献値の比較

Table.5.1 擬似生ごみ培地の組成

Table.5.2 各擬似生ごみサンプルに含まれる N、C、H の比率及び C/N 比

Table.6.1 食品廃棄物からの水素発生可能量試算のための算出条件

Table.6.2 バイオ水素とバイオエタノールのエネルギー変換効率算出のための条件

## Figure リスト

Fig.1.1 バイオマスの分類

Fig.1.2 日本における廃棄物系及び未利用バイオマスの賦存量及び利用率

Fig.1.3 食品関連産業における食品廃棄物の発生量の推移

Fig.2.1 水素発酵を中心としたバイオマスのカスケード利用のフロー

Fig.2.2 グルコースからの代謝経路の概略図

Fig.2.3 ギ酸と水素の酸化還元電位と pH の関係

Fig.2.4 NADH と水素の酸化還元電位差と培地 pH の関係

Fig.2.5 セルロース系バイオマスの水素発酵における前処理プロセスのフロー

Fig.3.1 実験装置概略図

Fig.3.2 実験装置写真

Fig.3.3 最大水素発生速度に対する発酵温度の影響

Fig.3.4 積算水素発生量に対する発酵温度の影響

Fig.3.5 デンプン消費量に対する発酵温度の影響

Fig.3.6 Optical density に対する発酵温度の影響

Fig.3.7 最大水素発生速度に対する pH の影響

Fig.3.8 Optical density に対する pH の影響

Fig.3.9 最大水素発生速度に対するデンプン濃度の影響

Fig.3.10 Optical density に対するデンプン濃度の影響

Fig.3.11 水素収率に対するデンプン濃度の影響

Fig.3.12 有機酸及びアルコール生成に対するデンプン濃度の影響

Fig.3.13 最大水素発生速度に対する鉄イオンの影響

Fig.3.14 水素収率に対する鉄イオンの影響

Fig.3.15 鉄を含む水溶液の pH と酸化還元電位が鉄の化学種に及ぼす影響

Fig.3.16 有機酸及びアルコールの生成量に対する塩化鉄(II)の影響

Fig.3.17 有機酸及びアルコールの生成量に対する塩化鉄(III)の影響

Fig.4.1 実験装置概略図

Fig.4.2 実験装置写真

Fig.4.3 連続発酵における水素発生速度の経時変化

Fig.4.4 水素発生速度及び水素収率に対する HRT の影響

Fig.4.5 酢酸、酪酸及び乳酸の生成速度に対する HRT の影響

Fig.4.6 フロックの写真

Fig.4.7 固定化担体を用いた連続発酵における水素発生速度の経時変化

Fig.4.8 固定化担体を用いた連続発酵における水素発生速度及び水素収率に対する HRT の影響

- Fig.4.9 固定化担体を用いた連続発酵における酢酸、酪酸及び乳酸の生成速度に対する HRT の影響
- Fig.4.10 担体の写真
- Fig.5.1 擬似生ごみサンプルの写真
- Fig.5.2 擬似生ごみからの水素発生の経時変化
- Fig.5.3 水素発生速度に対する C/N 比の影響
- Fig.5.4 水素収量に対する C/N 比の影響
- Fig.5.5 酢酸、酪酸及び乳酸の生成量に対する C/N 比の影響
- Fig.5.6 水素発生速度に対する添加物の種類の影響
- Fig.5.7 水素収量に対する添加物の種類の影響
- Fig.5.8 *C.pasteurianum* のフェレドキシン合成における鉄濃度の影響
- Fig.5.9 *C.acetobutylicum* のヒドロゲナーゼ合成における鉄制限の影響
- Fig.5.10 水素発生速度に対する擬似生ごみ添加量の影響
- Fig.5.11 水素収量に対する擬似生ごみ添加量の影響
- Fig.5.12 酢酸、酪酸及び乳酸の生成量に対する擬似生ごみ添加量の影響
- Fig.5.13 半回分式での擬似生ごみからの水素発生の経時変化
- Fig.6.1 バイオ水素とバイオエタノールのエネルギー変換効率の比較

# 第 1 章

## 緒言



## 1.1 研究背景

### 1.1.1 はじめに

気候変動に関する政府間パネル（IPCC: Intergovernmental Panel on Climate Change）の第4次調査報告書によると人為的原因、つまり化石燃料由来の温室効果ガスが地球温暖化に寄与している可能性がかなり高いことが報告された[1]。またスターンレビューによると気候変動に対する対策を直ちに行えば国内総生産（GDP: Gross Domestic Product）の1%に相当する被害を受けるだけであるが、その対策を行わなければ毎年GDPの5%、最悪の場合20%になると警鐘を鳴らしている[2]。今、人類だけでなく地球上に住むすべての生物が環境制約に直面している。

また我々は環境制約だけではなく資源制約にも直面している。中国やインドなど新興国のエネルギー需要が伸び、また原油や天然ガスが政治的に不安定な地域に偏在していることもあり化石燃料を安定的に確保することが今後難しくなっていくことが予想される。また長期的には化石資源の枯渇に対する懸念もある。掘削技術の向上や新たな油田、ガス田の発見により埋蔵量が増加するにせよ、いずれ尽き果てることであろう。そして、昨夏には世界的な金融危機の影響によって原油価格が1バレル130ドル後半にも高騰し世界経済が混乱したことも大きな問題である。

上述したようなグローバルな問題に直面している現在、地球温暖化に寄与しない、そして自国のエネルギー自給率を少しでも高めるようなエネルギーに関する研究開発及びその導入が急務である。

### 1.1.2 バイオマスエネルギー

バイオマスとは、直訳すれば「生物資源」であり、化石燃料を除いた再生可能な生物由来の有機性資源である。Fig.1.1に代表的なバイオマスの分類例[3]のひとつを挙げる。これらバイオマスをエネルギーとして利用する利点は、バイオマスの燃焼によって放出されるCO<sub>2</sub>は光合成により大気中から吸収したものと考えることにより、カーボンニュートラルの特性を持っていることである。また賦存量が多い点でも注目されている。Fig.1.2に日本における廃棄物系及び未利用バイオマスの賦存量及び利用率[4]を示す。（食品廃棄物については1.1.3で詳しく述べる。）またバイオマスは貯蔵できる特性も持っている。これは他の再生可能エネルギーにはない特性である。したがって、必要なときに必要な量のエネルギーを得ることができる。しかし廃棄物系バイオマスや未利用バイオマスは薄く広く分布しているため、収集にはコストがかかり大規模集約的にエネルギー化することは難しいので、小規模分散型のエネルギー源として利用できると考えられる。これらの特性からバイオマスは環境調和型のエネルギー資源として有望である。

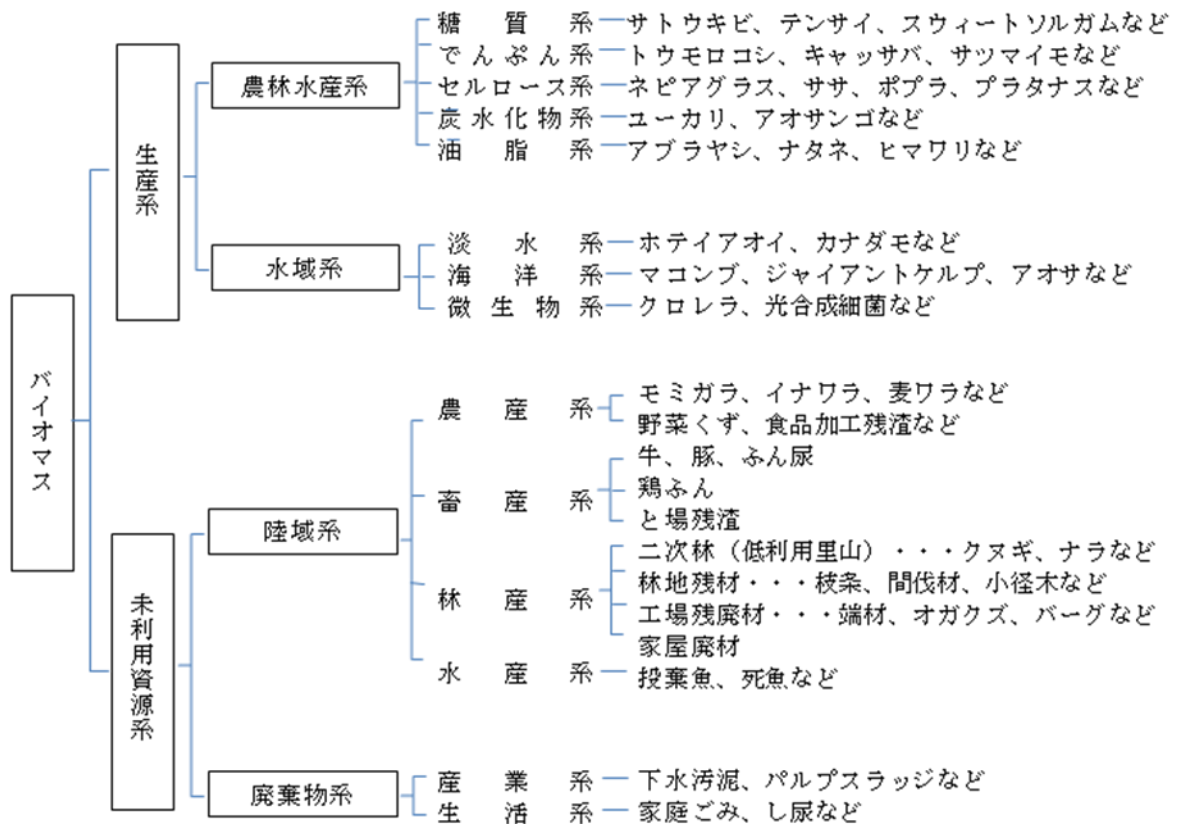


Fig.1.1 バイオマスの分類 [3]

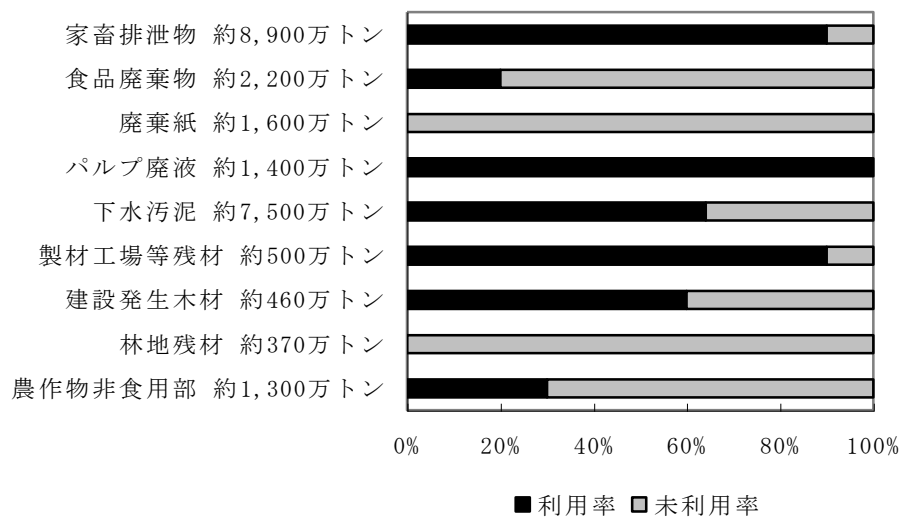
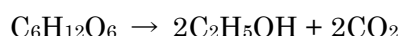


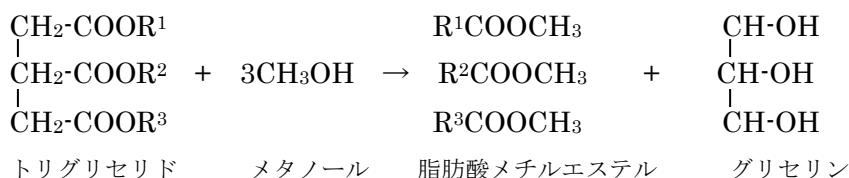
Fig.1.2 日本における廃棄物系及び未利用バイオマスの賦存量及び利用率 [4]

バイオマスのエネルギー変換方法には、直接燃焼、炭化、生物学的方法である発酵、熱化学的方法であるガス化や Bio Diesel Fuel (BDF) 化などが挙げられる。近年は特に発酵により得られるバイオエタノールや油脂のメチルエステル化によるバイオディーゼルなどバイオ燃料の導入が進んでいる。ここではバイオ燃料であるバイオエタノール及びバイオディーゼルに絞って述べる。

エタノール発酵は主に酵母 *Saccharomyces cerevisiae* による糖の代謝によってエタノールを生産する方法である。



油脂のメチルエステル化 (BDF 化) によって生成されるバイオディーゼルは軽油代替燃料として注目されている。



近年の日本におけるバイオマスの利活用の政策は、バイオマス・ニッポン総合戦略が 2002 年に閣議決定され、地球温暖化の防止、循環型社会の形成、競争力のある新たな戦略的産業の育成、農林漁業・農山漁村の活性化に向けてバイオマスをエネルギーまたは製品として利活用することが促進されている。バイオエタノールについては全国 6 ヶ所で原料作物の生産、バイオエタノールの製造、E3 ガソリンの走行等の実証試験を行っており、生産量は 2005 年度末時点で年間 30 万 kl 程度、バイオディーゼルについては年間 4,000~5,000 kl 生産されていると推計されている[4]。

### 1.1.3 日本における食品廃棄物の発生量及び再生利用の現状

食品廃棄物とは食品の製造、流通、消費過程で生じる動植物性残渣である。現在、日本では年間 2,000 万 t 程度発生していると見積もられている。食品廃棄物は食品製造業から廃棄されたものは産業廃棄物、食品流通業及び外食産業から廃棄される事業系廃棄物と家庭から廃棄される調理くず、食べ残しなどの生活系生ごみを合わせたものは一般廃棄物として分類される。Fig.1.3 に食品産業における食品廃棄物の発生量の推移[5]を示す。2001 年度からは微増しており、2006 年において 1,135 万 t とされている。先にも述べたように食品廃棄物の再生利用率は 20%に過ぎない。したがって、資源循環型社会を形成する点でバイオマスとしての食品廃棄物の利活用が望まれる。

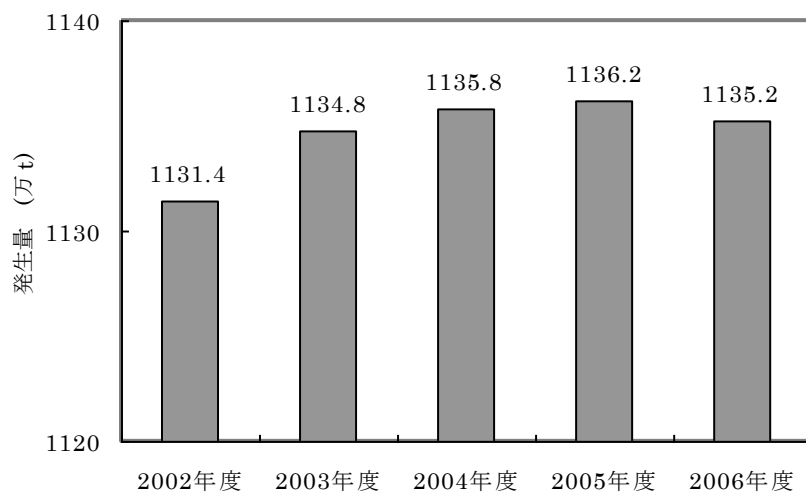


Fig.1.3 食品産業における食品廃棄物の発生量の推移 [5]

そこで、食品廃棄物を資源として利用するため食品循環資源の再生利用等の促進に関する法律（食品リサイクル法）が 2001 年に施行された。対象は食品関連事業者であり、事業者は食品廃棄物の発生抑制、減量、再生利用等を行い、年間 100 t 以上排出する事業者は食品廃棄物等多量発生事業者として報告義務が課せられることになった。Table1.1 に業種別の再生利用等の再生利用の仕向割合[5]を示す。再生利用の方法としては肥料化及び飼料化の割合が大きい。これは再生利用の優先順位としてまず飼料化、次にその他のたい肥化、油脂化、メタン化、炭化、エタノール化などと順位が決められているためである。しかし、昨今のエネルギーの情勢を考慮すると、エネルギー利用のための各技術の進展があれば食品廃棄物のエネルギー利用の比率は今後向上すると考えられる。

#### 1.1.4 水素エネルギー

水素は原子番号 1、原子量 1 の最も軽い元素であり、 $H_2$  として大気中には  $10^{-5}$  vol% 程度存在している。水素の単位重量あたりの燃焼熱はおよそ  $120 \text{ MJ kg}^{-1}$  であり、他の燃料と比較して高い。また水素は燃焼しても生成するのは水のみであり、また燃料電池を用いて反応させることにより電気エネルギーを得ることができるので二酸化炭素を排出しないクリーンなエネルギーキャリアとして注目されている。

その水素を利用した水素エネルギー社会の構築に向けて、水素の製造、輸送・貯蔵、利用などについて研究開発が進められている。日本では、1970 年代のオイルショックとともに当時の通商産業省工業技術院（現在、経済産業省）が新エネルギー技術開発のためサンシャイン計画を発足させ、そのなかに水素エネルギー利用技術開発があった。1993 年からはニューサンシャイン計画の一環である水素利用国際エネルギーシステム技術（WE-NET）プロジェクトを新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO: New Energy and Industrial Technology Development Organization）が実施した。これは水素の製造、輸送・貯蔵、利用に関する技術、またそれらに関する革新的・先導的技術の研究開発を推進するもので、2002 年まで行われた。2008 年現在では NEDO により水素や燃料電池に関する技術開発事業は 13 を数える。また 2005 年に NEDO は「燃料電池・水素技術開発ロードマップ」をまとめとっており[6]、そのなかで水素製造技術に関しては以下の 3 つに区分されている。

- ・化石燃料の改質
- ・再生可能エネルギー由来の電力による水電解
- ・再生可能エネルギー由来の電力によらない水素製造

都市ガスやナフサなど化石燃料の改質は実用化段階にあり、経済産業省が実施する水素・燃料電池（自動車）実証プロジェクト（通称：JHFC プロジェクト）における水素ステーションでの燃料電池自動車等へ供給する水素のほとんどは化石燃料の改質によって製造されたものが水素ステーションで供給されている。

再生可能エネルギー由来の電力による水電解は太陽光、風力、水力などによって発電し、

Table.1.1 食品産業における業種別の再生利用等の仕向量割合 [5]

| 業種    | 年度   | 再生利用への仕<br>向量 | 再生利用の用途別仕向量割合 |    |     |              |     |       |    |     |    |  |
|-------|------|---------------|---------------|----|-----|--------------|-----|-------|----|-----|----|--|
|       |      |               | 肥料            | 飼料 | メタン | 油脂及び油<br>脂製品 | 食品用 | 工業資材用 | 熱源 | その他 | 不明 |  |
| 食品産業計 | 2006 | 100           | 39            | 37 | 1   | 5            | 3   | 1     | 2  | 3   | 11 |  |
|       | 2005 | 100           | 39            | 35 | 1   | 5            | 2   | 1     | 2  | 2   | 13 |  |
| 食品製造業 | 2006 | 100           | 40            | 45 | 1   | 3            | 4   | 0     | 2  | 2   | 3  |  |
|       | 2005 | 100           | 43            | 43 | 1   | 3            | 3   | 1     | 2  | 1   | 4  |  |
| 食品卸売業 | 2006 | 100           | 41            | 41 | -   | 4            | 2   | 2     | 0  | 0   | 10 |  |
|       | 2005 | 100           | 38            | 41 | 1   | 7            | 1   | -     | 0  | 5   | 8  |  |
| 食品小売業 | 2006 | 100           | 42            | 23 | 0   | 10           | 2   | 1     | 0  | 2   | 20 |  |
|       | 2005 | 100           | 34            | 23 | 1   | 8            | 1   | 1     | 2  | 3   | 27 |  |
| 外食産業  | 2006 | 100           | 31            | 12 | -   | 8            | -   | 1     | 4  | 8   | 37 |  |
|       | 2005 | 100           | 24            | 11 | 1   | 9            | -   | 0     | 2  | 3   | 49 |  |

その電力で水電解を行うことによって水素を製造する技術であり、2010年から2020年の間に実用化する期間とした水素製造で中期的将来の技術としている。

再生可能エネルギー由来の電力によらない水素製造は長期的な水素製造法として位置づけられている。具体的にはバイオマスのガス化や水素発酵、太陽光を利用した光合成微生物による水素製造、光触媒による水素製造がある。

化石資源由来の水素は化石資源が容易に入手できる点、改質技術が実用段階である点において優れているが、CO<sub>2</sub>削減効果の点においては真にカーボンフリーとは言えない。再生可能エネルギー由来の水素こそ真に持続可能なエネルギーキャリアであると言えよう。

## 1.2 研究の目的及び各章の概要

地球温暖化やエネルギー安全保障の問題から再生可能エネルギーの導入が望まれている。また化石燃料依存社会から水素エネルギー社会への移行が期待されており、資源循環の観点からもバイオマスから新たなバイオ燃料になり得る水素を生産することは非常に意義がある。また日本においてはエネルギー作物からの大量エネルギー生産は国土面積が狭いこともあり難しいが、廃棄物系バイオマスは再生利用が十分に行われているとは言えない状況にあり、賦存量も多いことから利用価値が高い。

そこで、本研究は次世代のエネルギーキャリアとして注目されている水素を廃棄物系バイオマスである食品廃棄物から生物学的エネルギー変換方法のひとつである水素発酵により効率的に生産するために、デンプンや擬似生ごみを基質にしてラボスケールで水素発酵実験を行い、水素発酵技術の実用化に向けた基礎的データを得ることを目的とした。

本論文は「発酵法による食品廃棄物からの水素エネルギー生産に関する研究」と題し、以下の6章で構成した。

第1章では、本研究の背景について、また本研究の目的と各章の概要について述べた。

第2章は「水素発酵に関する知見及び既往の研究」と題し、水素発酵の利点と問題点、微生物による水素発生のメカニズム、これまでに報告されている水素発生細菌について通性嫌気生菌、絶対嫌気性菌、好熱菌、水素発生菌群に分けて述べた。また水素発酵に影響を及ぼす因子についてまとめた。

第3章は「回分発酵によるデンプンからの水素発生特性」と題し、単離されたバクテリア HN001 株のデンプンを基質にした回分発酵における水素発生特性（発酵温度、pH、デンプン濃度、鉄イオンの影響）を調べた。

第4章は「連続発酵によるデンプンからの水素発生」と題し、デンプンを基質にした連続水素発酵における水素及び有機酸生成、フロックの形成に対する HRT の影響を調べた。また固定化担体を用いた連続水素発酵も行った。

第5章は「食品廃棄物からの水素発生」と題し、擬似生ごみを基質を利用して回分発酵



及び半回分発酵での水素発生実験を行った。回分発酵では魚のはらわたを窒素源として使用してその特性（C/N、鉄イオン、擬似生ごみ添加量の影響）を調べた。

第6章は、食品廃棄物を原料にした水素発酵技術の導入可能性の検討を行った。また各章の結論をまとめ、今後の水素発酵技術の展望について述べた。

## 参考文献

- [1] IPCC 第4次評価報告書統合報告書政策決定者向け要約 気象庁ホームページ  
<http://www.env.go.jp/earth/ipcc/4th/interim-j.pdf>
- [2] スターンレビュー 農林水産省ホームページ  
[http://www.env.go.jp/press/file\\_view.php?serial=9176&hou\\_id=8046](http://www.env.go.jp/press/file_view.php?serial=9176&hou_id=8046)
- [3] エネルギー・資源ハンドブック オーム社
- [4] バイオマス・ニッポン総合戦略 農林水産省ホームページ  
[http://www.maff.go.jp/j/biomass/pdf/h18\\_senryaku.pdf](http://www.maff.go.jp/j/biomass/pdf/h18_senryaku.pdf)
- [5] 農林水産統計平成19年食品循環資源の再生利用等実態調査結果の概要 農林水産ホームページ  
<http://www.maff.go.jp/toukei/sokuhou/data/junkan-saisei2007/junkan-saisei2007.pdf>
- [6] 燃料電池・水素技術開発ロードマップ NEDO ホームページ  
<http://www.nedo.go.jp/nenryo/gijutsu/suiso.pdf>

## 第 2 章

### 水素発酵に関する知見及び既往の研究

## 2.1 水素発酵の利点と問題点

水素発酵は水素発生細菌がバイオマスを分解利用することによって副生する水素を得る技術である。

水素発酵の利点として同じ生物学的方法である光合成による水素発生と比較して水素発生速度が速いことが挙げられる。水素発酵を行うのはバクテリアであるが、Table.2.1 に示すようにバクテリアの倍化時間は光合成細菌のそれとくらべて速いため水素発生速度も速くなる。光合成による水素発生では太陽光が必要なために培養装置の面積を大きくする必要はあるが、水素発酵では太陽光を必要としないため装置が小さくて済み、昼夜を問わず水素が生産できるなどの利点も持つ。またメタン発酵やエタノール発酵など他の発酵法によるエネルギー生産と比較すると水素発酵には次のような利点がある。

- ・ 連続発酵においてメタン発酵の平均滞留時間 (HRT: Hydraulic Retention Time) は 10 日程度であるが水素発酵のそれは 1 日程度であり反応時間が短く発酵槽も小さく済むこと。
- ・ エタノール発酵ではデンプン質の基質を糖化するため前処理をする必要があるが、水素発酵ではデンプンを分解利用できる水素発生細菌も存在するためデンプン質を糖化処理の工程を経ずに直接水素に変換できること。またグルコースからのエネルギー変換効率はエタノールの方が高いが、それらの利用まで考慮した場合の総合エネルギー変換効率は水素とエタノールは同程度であること。

また熱化学的方法であるガス化と比較すると温和な温度条件で水素生成反応が進むことも利点である。

しかし水素発酵技術の実用化を念頭に考えると、以下のような問題点が挙げられる。

- ・ 水素生成能（水素発生速度及び水素収率）が低いこと
- ・ 廃液が発生すること

水素収率は理論的には以下に示す反応式のように、グルコース 1 mol から 2 mol の酢酸が生成されるときに最大  $4 \text{ mol mol-glucose}^{-1}$  である。



しかし、現状では  $2 \text{ mol mol-hexose}^{-1}$  程度の報告が多い。また水素発酵には有機酸を含む廃液の発生が伴うため、水素発酵単独ではシステムとして成り立たないので廃液処理を含めたシステムにしなければならない。そこで水素発酵の後段にメタン発酵を行う水素・メタン二段発酵システムが研究されている[2-5]。また光合成による水素発生を水素発酵の後段に利用することで有機酸の分解及び水素の生成するシステムも研究されている[6]。Fig.2.1 に水素発酵を中心としたバイオマスのカスケード利用のフローを示す。このように水素発酵技術を実用化する場合、他の技術と組み合わせることで廃液の処理とともにさらにそ

Table.2.1 各種微生物の増殖速度 [1]

| Microorganisms                      | Doubling time<br>(h) | Specific growth rate<br>(h <sup>-1</sup> ) | Temperature<br>(°C) | Culture media    |
|-------------------------------------|----------------------|--|---------------------|------------------|
| <i>Pseudomonas natriegens</i>       | 0.16                 | 4.3  | 37                  | Complex medium   |
| <i>Bacillus stearothermophilus</i>  | 0.18                 | 3.9  | 60                  | Complex medium   |
| <i>Escherichia coli</i>             | 0.28                 | 2.5  | 37                  | Bouillon         |
| <i>Escherichia coli</i>             | 0.35                 | 2  | 40                  | Complex medium   |
| <i>Bacillus subtilis</i>            | 0.43                 | 1.6  | 40                  | Complex medium   |
| <i>Bacillus megaterium</i>          | 0.52                 | 1.3  | 30                  | Bouillon         |
| <i>Pseudomonas putida</i>           | 0.75                 | 0.92                                       | 30                  | Synthetic medium |
| <i>Vibrio marinus</i>               | 1.35                 | 0.51                                       | 15                  | Complex medium   |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i>   | 6                    | 0.12                                       | 27                  | Complex medium   |
| <i>Photopseudomonas sphaeroides</i> | 2.2                  | 0.32                                       | 30                  | Complex medium   |
| <i>Chromatium D</i>                 | 9                    | 0.077                                      | 37                  | Synthetic medium |
| <i>nitrobacter agilis</i>           | 20                   | 0.035                                      | 27                  | Synthetic medium |

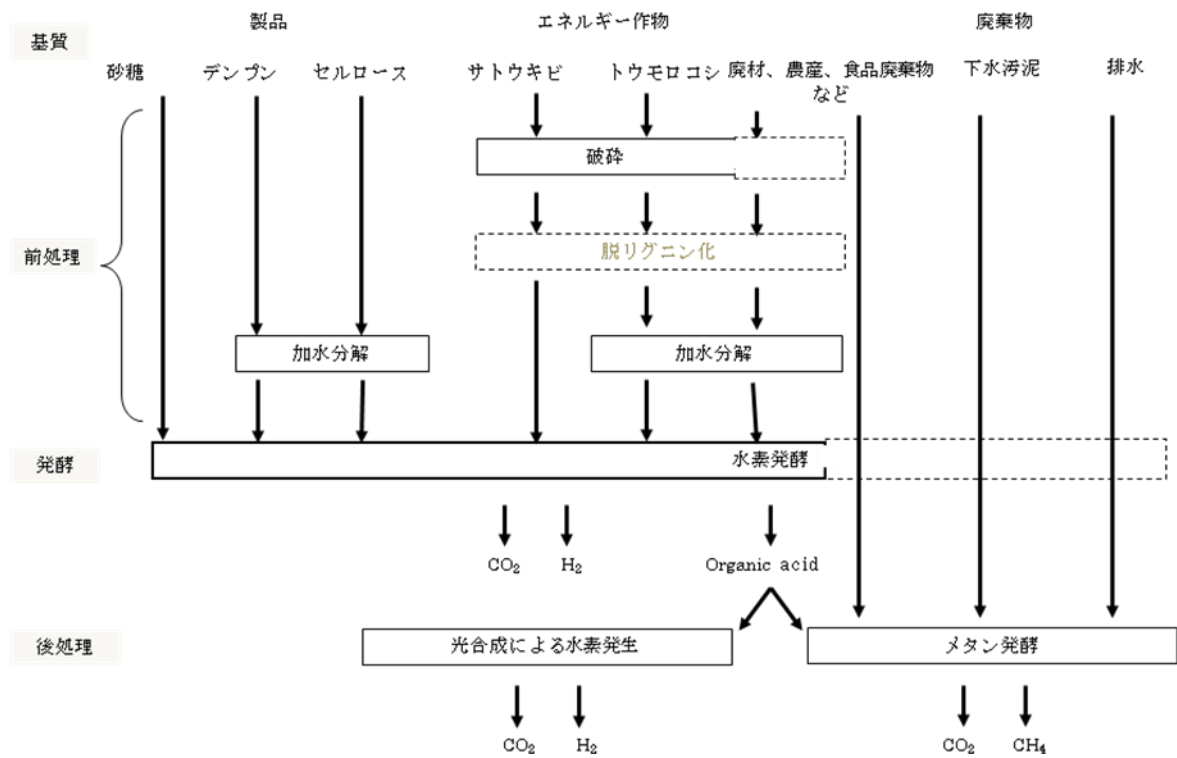


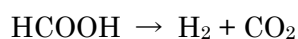
Fig.2.1 水素発酵を中心としたバイオマスのカスケード利用のフロー

れからエネルギー回収するトータルシステムを構築する必要がある。

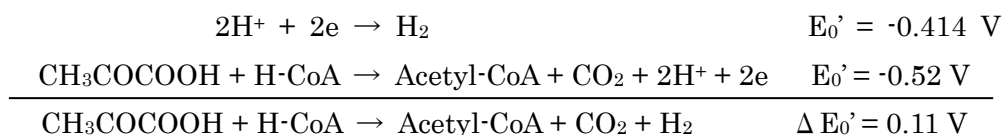
## 2.2 微生物による水素発生のメカニズム

Fig.2.2 に一般的な水素発生細菌のグルコースからの代謝経路の概要図を示す。水素発生細菌による水素発生は大きく分けて3つある [7]。

ギ酸分解による水素発生は *E. Coli* など大腸菌類にみられる反応である。ピルビン酸からアセチル-CoA 生成の途中にギ酸が生成され、そのギ酸が Fig.2.3 に示すように酸性条件下ではギ酸分解反応の酸化還元電位が水素生成反応の酸化還元電位よりも低くなるため以下に示すように水素と二酸化炭素に分解されることによって水素が生成される。

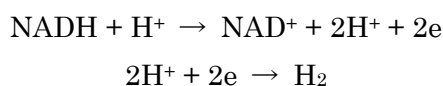


フェレドキシンからの水素発生は *Clostridium* 属に特徴的な経路である。フェレドキシンとは電子伝達体として機能するタンパク質である。*Clostridium* 属の場合、ピルビン酸からアセチル-CoA の反応の際にギ酸が生成されず、酪酸やブタノールが生成する。以下にピルビン酸からアセチル-CoA の反応とその酸化還元電位を示す。



ピルビン酸からアセチル-CoA の反応の  $\Delta E_0'$  は 0.11 V であり培地 pH に関係なく水素発生がおきなければならない。しかし *Clostridium* 属は培地 pH の影響を受ける。したがってフェレドキシンからの水素発生は培地 pH の影響を受けないような場合に起こると考えられる。

NADH の再酸化による水素発生は、培地 pH の影響が水素発生に及ぶ場合に考えられる。NADH とは NAD の還元体であり、電子伝達体として働く補酵素である。谷生は水素発生において膜結合ヒドロゲナーゼが水素生成に関与し細胞内外の pH の差が影響することを提案している [8]。以下にその概要を示す。



またそれぞれの酸化還元電位は以下のように示される。

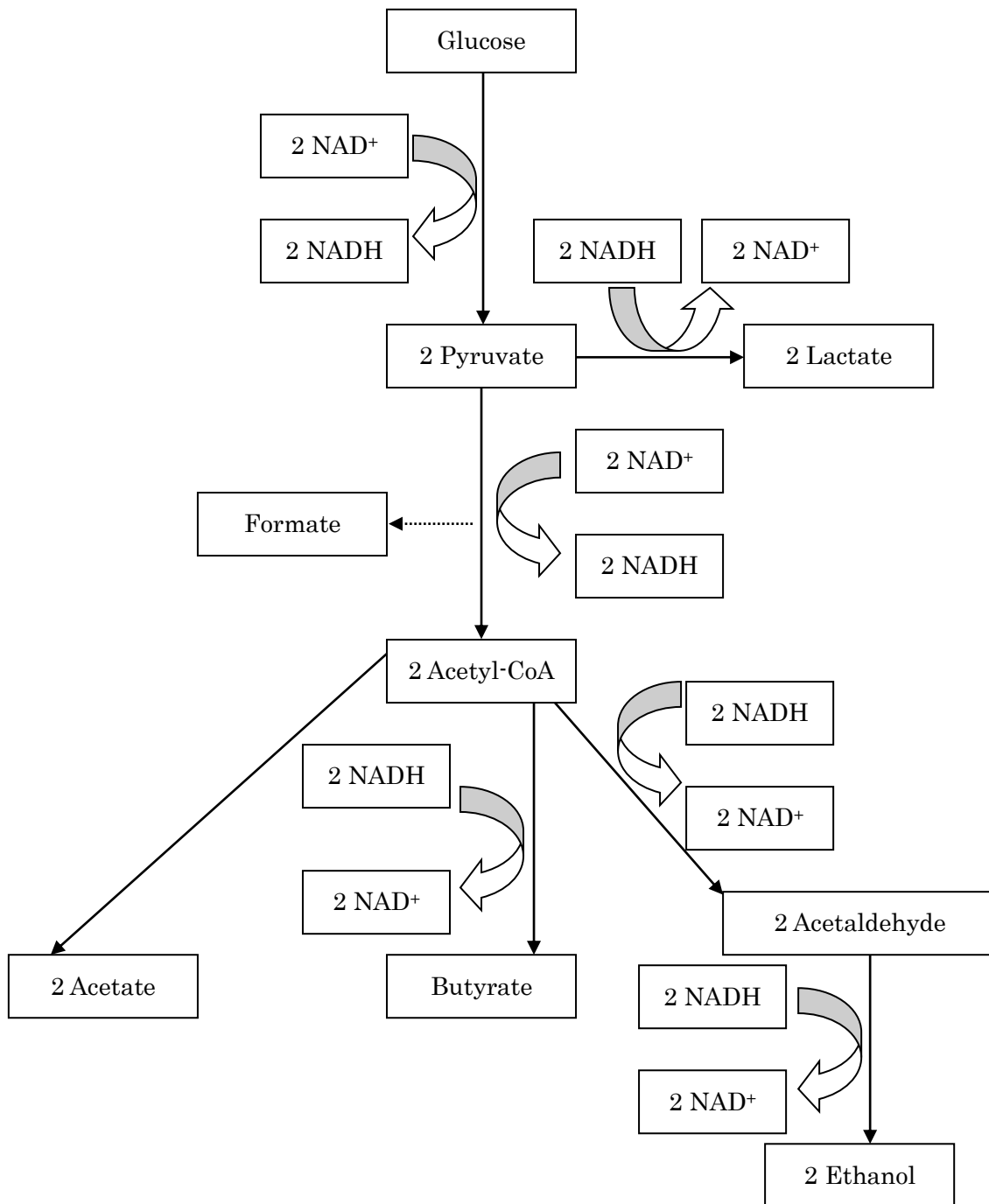


Fig.2.2 グルコースからの代謝経路の概略図



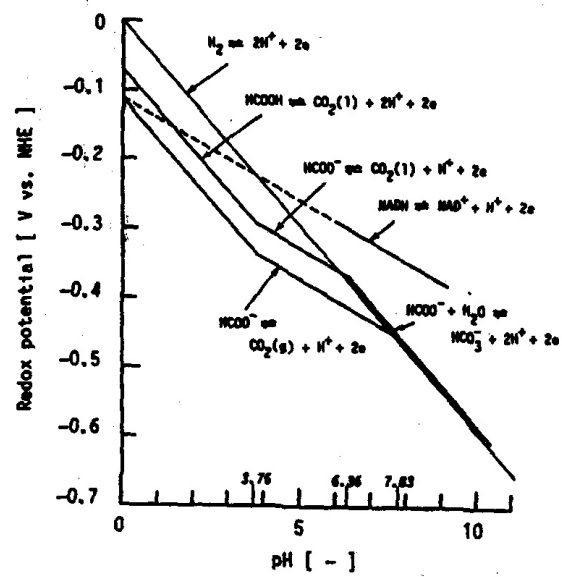


Fig.2.3 ギ酸と水素の酸化還元電位と pH の関係 [7]

$$E_{\text{NADH}} = E_0 + (RT / 2F) \ln \{ [\text{NAD}^+][\text{H}^+] / [\text{NADH}] \}$$

$$E_{\text{H}_2} = E_0 + (RT / 2F) \ln \{ [[\text{H}^+]^2 / P_{\text{H}_2}] \}$$

R は気体定数 : 8.314 J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>、T は絶対温度、F はファラデー定数 : 96485 J V<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>、P<sub>H<sub>2</sub></sub> は水素分圧である。

水素が生成するためには以下の式に示すように電位差 ΔE が正になればよい。

$$\Delta E = E_{\text{H}_2} - E_{\text{NADH}} > 0$$

細胞内の pH は 8.0 程度に保たれているとする。その場合の NADH と水素の酸化還元電位差と pH の関係を Fig.2.4 に示す。また [NADH] / [NAD<sup>+</sup>] = 1、水素分圧を 1 atm、または [NADH] / [NAD<sup>+</sup>] = 20、水素分圧を 0.1atm と仮定する。このグラフより pH が低いほど ΔE が正であるため水素が生成することがわかる。しかし実際は pH 5.0 付近では pH 6.0 付近と比較して水素発生は低い。これは一般的に菌体の増殖は pH が高い方が増殖しやすいためである。したがって、水素発生の活性は酸化還元電位と菌体増殖の両方を考慮する必要がある。また pH が高い場合 (また ΔE が正) でも水素は発生する。これはバクテリアが細胞の外側のプロトン濃度を内側より高くすることでプロトンが細胞の内側に侵入するとき、そのエネルギーを利用して ATP を生成する、つまりプロトンポンプがあるためである。その場合、Fig.2.4 の書かれた点線のように ΔE が正になり、pH が高くても水素発生する。そして、ΔE は [NADH] / [NAD<sup>+</sup>] と水素分圧にも影響を受けることを考慮しなければならない。もし細胞内の内側 (pH 8.0) で水素発生と NADH の再酸化が生じているとすれば ΔE は負になる。また細胞内の外側 (pH 4.0-8.0) の場合でも ΔE は負になる。したがって、水素発生と NADH の再酸化が細胞の内と外で生じていることが考えられる。これが膜結合ヒドロゲナーゼによる NADH からの水素発生である。

## 2.3 水素発生細菌

### 2.3.1 通性嫌気性菌

通性嫌気性菌とは、エネルギー代謝の際に酸素存在化では好氣的呼吸により ATP を獲得し、酸素がない場合には発酵により ATP を獲得する細菌である。大腸菌 *Escherichia coli* やブドウ球菌属 *Staphylococcus* などが挙げられる。これら通性嫌気性細菌は絶対嫌気性細菌と比較して酸素の影響を受けないため培養が容易である。

通性嫌気性の水素発生細菌としてはグラム陰性桿菌で腸官に常在している *Enterobacter* 属や *E. coli* が報告されている。

*Enterobacter aerogenes* : 谷生らはオシロイバナの葉をすり潰した葉汁から *E. aerogenes*

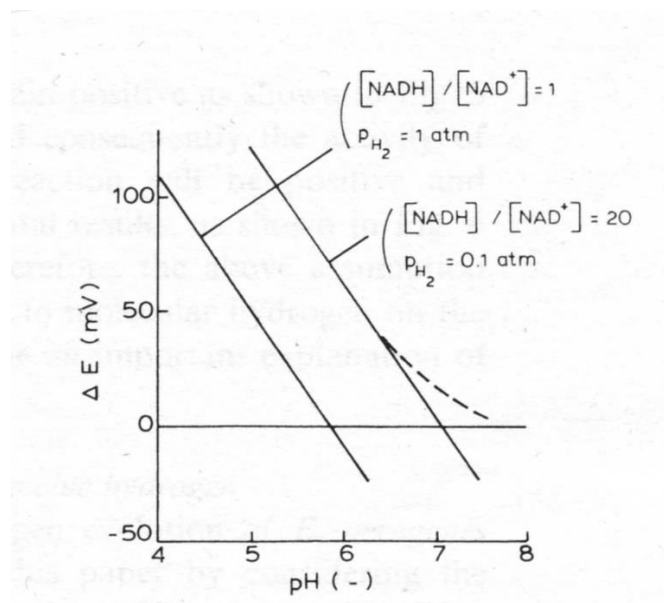


Fig.2.4 NADH と水素の酸化還元電位差と培地 pH の関係 [8]

st. 82005 を単離し、グルコースからの水素収率が  $1.0 \text{ mol-H}_2 \text{ mol-glucose}^{-1}$  であったことを報告している[9]。 *E. aerogenes* の利用できる基質はペントースやマンニトールなどであり、デンプンやキチンなどの多糖類は分解利用できない[10]。しかしグリセリンから水素及びエタノールを生成することができ、 *E. aerogenes* HU-101 はグリセリン濃度  $5.0 \text{ g L}^{-1}$  の条件下において水素収率は  $1.05 \text{ mol mol-glycerol}^{-1}$  であった。[11]。また *E. aerogenes* は NADH 経路で水素を生成しているとされている[12, 13]。

*Enterobacter cloacae* : Kumar らは *E. cloacae* IT-BY 08 を単離し、グルコースからの水素収率  $2.2 \text{ mol-H}_2 \text{ mol-glucose}^{-1}$ 、スクロースから  $6.0 \text{ mol-H}_2 \text{ mol-sucrose}^{-1}$  またセロビオースからは  $5.4 \text{ mol-H}_2 \text{ mol-cellobiose}^{-1}$  であったことを報告している [14]。

*E. coli*: *E. coli* は遺伝子操作が簡単であるので遺伝子操作による水素発生能の向上させる研究が行われている[15-19]。

### 2.3.2 偏性嫌気性菌

偏性嫌気性菌とは、酸素存在化では増殖はできず、酸素がない場合に発酵により ATP を獲得する細菌である。偏性嫌気性の水素発生細菌としては *Clostridium* 属に関する報告が多数なされている。*Clostridium* 属は土壌中や腸内にいるグラム陽性桿菌であり、高温になるなど生存環境が悪化した場合は芽胞を形成する。また通性嫌気生菌である *Enterobacter* 属はデンプンやセルロースを分解できないが、*Clostridium* 属はそれらを分解して水素を生成することができるものが多い。以下に水素発生が報告されている代表的な *Clostridium* 属を示す。

*Clostridium butyricum* : *C. butyricum* による水素発生の研究は 1970 年代から行われている[20]。 *C. butyricum* CGS5 は発酵温度  $37^\circ\text{C}$ 、pH 5.5、スクロース濃度  $20\text{g-COD L}^{-1}$  において水素収率  $2.91 \text{ mol-H}_2 \text{ mol-sucrose}^{-1}$  であった[21]。 *C. butyricum* W5 は廃糖蜜から水素収率  $1.63 \text{ mol-H}_2 \text{ mol-hexose}^{-1}$  で水素を生成した[22]。また *C. butyricum* LMG 1213t1 はグルコースから  $1.75 \text{ mol-H}_2 \text{ mol-hexose}^{-1}$  で水素を生成した[23]。

*Clostridium beijerinckii*: シロアリから単離した *C. beijerinckii* AM21B はグルコースから水素収率  $2.0 \text{ mol-H}_2 \text{ mol-glucose}^{-1}$ 、水素発生速度  $660\text{ml-H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、デンプンから水素収率  $1.8 \text{ mol-H}_2 \text{ mol-glucose}^{-1}$ 、水素発生速度  $410 \text{ ml-H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  で水素を生成したことが報告されている[24]。

*Clostridium thermocellum* : *C. thermocellum* はセルロースを分解利用し水素を生成することができる。カナダのマニトバ大学及びヴィクトリア大学の研究グループは *C. thermocellum* 27405 を用いて  $\alpha$ -セルロース、シュレツダーされた紙、脱リグニン繊維及びセロビオースを基質にした水素発酵を行った結果、脱リグニン繊維から水素収率  $1.60 \pm 0.67 \text{ mol-H}_2 \text{ mol-glucose}^{-1}$  であったことを報告している[25]。

*Clostridium paraputrificum* : 土壌中から単離された *C. paraputrificum* M-21 は、カニ類

などの甲殻類の構成物質で含窒素多糖であるキチンを分解利用することができ、その分解物であるN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)から水素収率  $1.9 \text{ mol-H}_2 \text{ mol-GlcNAc}^{-1}$  で水素を生成したことが報告されている[26]。

また *Clostridium* 属である HN001 株は発酵温度  $47 \text{ }^\circ\text{C}$  においてグルコースから  $3.3 \text{ L-H}_2 \text{ L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$  の水素発生速度であったことを報告している[27]

偏性嫌気性水素発生菌は通性嫌気性水素発生菌より水素収率が高いものが多い。しかし、偏性嫌気性水素発生菌は酸素存在下では増殖できないため、取り扱いや培養は通性嫌気性水素発生菌に比べて難しい。

### 2.3.3 好熱菌

好熱菌とは微生物を生育温度で分類した場合、 $55^\circ\text{C}$ 以上で生育可能な微生物の総称である。また  $90^\circ\text{C}$ 以上でも生育できるものを超好熱菌と呼ぶ。好熱菌の多くは古細菌である。古細菌とは分子生物学的手法により系統分類された微生物であり、原核生物ではあるが真正細菌とは細胞壁や細胞膜の構成成分が異なり、また遺伝やタンパク質合成の機構については真核生物と類似しているなどの特徴を持つ。古細菌は系統上、Euryarchaeota、Crenarchaeota、Korarchaeota に分類できる。また生育の特徴からメタン生成菌、好塩菌、超好熱菌に分けることができる。

好熱菌は通常の菌が死滅するような高温に至適温度があるため、水素発酵においてコンタミの影響を受けにくいことが利点である。好熱菌による水素発酵の研究は近年活発に行われており、*Thermococcus* 属、*Thermoanaerobacterium* 属、*Caldicellulosiruptor* 属、*Thermotoga* 属などが報告されている。Table2.2 に報告されている好熱性水素発生細菌を示す。*Thermoanaerobacterium* 属はグラム陽性嫌気性細菌である。*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2 や *T. thermosaccharolyticum* W16 はペントースやデンプン、セルロースも分解利用できる。*Thermotoga maritima* は酢酸のみを代謝し、理論的に最大の水素収率である  $4.0 \text{ mol-H}_2 \text{ mol-hexose}^{-1}$  を達成している[31]。鹿児島県子宝島にて発見されたことからこの名がついた古細菌である *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 はピルビン酸及びデンプンからの水素発生が報告されている[32]。これら好熱性水素発生細菌は、水素収率は高い。しかし、また発酵槽を高温に保つ必要があることが実用化を念頭においた場合の問題点である。

### 2.3.4 水素発生菌群

廃棄物系バイオマスを基質にして水素発酵を行う場合、下水汚泥などを種菌として用いている研究が多い。これは単離した菌ではコンタミが起こるのでそれのみを増殖させ水素を生産することは難しいためである。下水汚泥には水素発生菌以外にもメタン発生菌など

Table.2.2 好熱性水素発生菌の一覧

| microorganism  | temperature<br>(°C) | culture    | pH           | substrate | H <sub>2</sub> yield<br>(mol-H <sub>2</sub> , mol-hexose <sup>-1</sup> ) | H <sub>2</sub> production rate<br>(mmol-H <sub>2</sub> , L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> ) | reference |
|--|---------------------|------------|--------------|-----------|--|---|-----------|
| <i>Thermoanaerobacterium</i><br><i>thermosaccharolyticum</i> PSU-2 | 60                  | batch      | 6.25         | sucrose   | 2.53   | 12.12   | [28]      |
| <i>Thermoanaerobacterium</i><br><i>thermosaccharolyticum</i> W16   | 60                  | batch      | 6.5          | glucose   | 2.42   | 12.9  | [29]      |
|  | 60                  | batch      | 6.5          | xylose    | 2.19   | 10.7  |           |
| <i>Thermotoga elfii</i>  | 65                  | batch      | 7.4          | sucrose   | 3.3  | 2.7   | [30]      |
| <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>                        | 70                  | batch      | 7.0          | glucose   | 3.3  | 8.4   |           |
| <i>Thermotoga maritima</i>   | 80                  | batch      | uncontrolled | glucose   | 4.0  | 10  | [31]      |
| <i>Thermococcus kodakaraensis</i> KOD1                             | 85                  | continuous | —            | pyruvate  | 1.09   | 24.9 mmol/g-drycell·h   | [32]      |
|  | 85                  | continuous | 6.8          | starch    | 3.33   | 14.0 mmol/g-drycell·h   |           |
| <i>Pyrococcus furiosus</i>   | 95                  | batch      | —            | maltose   | 3.5  |   | [33]      |

様々な菌が含まれている。そこで水素発酵を行うためには水素発生菌群を優占化する必要がある。水素発生菌群を優占化するための方法には以下のようなものがある。

- ・熱処理による優占化
- ・発酵条件（HRT、pH）による優占化

*Clostridium* 属など孢子形成する菌は100℃に耐えることができるので熱処理によってそれらの水素発生菌群を優占化することができる。この方法は多くの研究で用いられている。また水素発生菌群に有利な条件で発酵を行うことにより水素発生菌群を優占化することができる。一般的にメタン発酵では HRT は 10 日程度であるが水素発酵は1日未満であるので、HRT を低くすることによりメタン発生菌群をウォッシュアウトさせ水素発生菌群を優先化することができる。汚泥に含まれる水素発生菌群の分析を PCR-DGGE 法により行った結果、HRT の条件によって水素発生菌の種類が変化することが報告されている[34-35]。またメタン発酵の至適 pH は中性付近であるが水素発酵でのそれは弱酸性であるので、pH を酸性に制御することによって水素発生菌群を優占化することもできる。

## 2.4 水素発酵に影響を及ぼす因子

### 2.4.1 温度

温度は水素発生細菌に限らず、すべての微生物の生育にとって最も重要な環境要因のひとつである。温度が数度異なるだけで増殖速度や代謝に影響を与える。水素発生細菌においても、効率的に水素を生産するためには至適温度を調べることは重要である。水素発酵に関する多くの文献から 35~40℃の中温に至適温度を持つ水素発生細菌が多いことがわかる。発酵による水素生成は生物反応であるが化学反応とみなすと、理論的にはアレニウスの式より温度が高い方が反応速度は速くなる。しかし、生物反応であるため高温になるとタンパク質や酵素が熱変性を起こし増殖が阻害される。先にも述べたように高温域での水素発酵について研究が行われているが、現状では水素発生速度が低いものが多い。

### 2.4.2 pH

pH は温度と同様、微生物の生育及び代謝に大きな影響を及ぼす。水素発生細菌は pH 5.5 から pH 5.8 に至適 pH を持つものが多い[36]。中性付近でも水素発生は可能であるが、メタン発酵の至適 pH は中性付近であり中性付近で水素発酵を行うとメタン発生細菌のコンタミの危険性がある。またアルカリを添加して pH を中性付近にすることは実用化を考えた場合コストがかかる。これらのことから弱酸性で水素発酵を行うことが安定的に水素を生産するための一要因になる。

## 2.4.3 基質

### 2.4.3.1 基質の種類及び分類

一般的な水素発生細菌は糖を代謝することにより水素を生成する。グルコースやスクロースなどのヘキソース、またグルコースのポリマーであるデンプンやセルロース、キシロースやアラビノース、そしてそのポリマーであるキシランなどペントースからの水素発生の報告がある。また他に水素発酵の基質になるものとして、グリセリンやマンニトールがある。バイオディーゼル製造廃液にはグリセリンが含まれており、そのグリセリンが水素発酵の基質になることが報告されている[11]。また海藻の成分であるマンニトールも水素発酵の基質になる[37]。

基質は、生分解性、賦存量、入手のしやすさ、コスト、含水率、糖質含有率などによって分類、評価することができる。生分解性の観点からは基質は3つに分けることができる(Table.2.3)。セルロース系は難分解であるため糖質系またはデンプン系と比較した場合、水素は得難い。しかし賦存量は膨大であるため高いポテンシャルを持っている。またコストの観点で分類すると、廃棄物系や未利用系は無償または逆有償であるが、エネルギー作物は有償である。したがって水素発酵の実用化にあたってはどの基質をターゲットにするかが非常に重要である。

Table.2.3 生分解性による基質の分類

| 分類     | 対象                     |
|--------|------------------------|
| 糖質系    | 廃糖蜜、飲料メーカーの廃ジュースなど     |
| デンプン系  | トウモロコシ、イモ類、食品製造工場の排水など |
| セルロース系 | 稲わら、廃木材、間伐材、バガスなど      |

### 2.4.3.2 セルロースの利用及び前処理

セルロースを基質とした水素発酵の研究に関する報告を Table2.4 に示す。セルロースから水素発生する細菌は確認されているが、利用しやすいグルコースなどを基質にした場合の水素発生速度と比較すると非常に遅い。したがって、現状ではセルロースを基質にして水素発酵を行う場合、前処理としてセルロースを分解する必要がある。

Fig.2.5 にセルロース系バイオマスの水素発酵における前処理プロセスのフローを示す。まずバイオマスを粉砕し、次にリグニンを除去する必要がある。その後、セルロースの糖化処理を行う。セルロースの糖化には酵素法や硫酸など酸を使用する酸処理、また超臨界による分解法が挙げられる。



Table.2.4 セルロース及びセルロース系バイオマスの水素発酵に関する既往研究

| Carbon source              | Concentration<br>(g L <sup>-1</sup> ) | Organism                       | Method | Temperature<br>(°C) | H <sub>2</sub> yield                                | Reference |
|----------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|--------|---------------------|---|-----------|
| Cellulose                  | 0.1                                   | sludge compost                 | Batch  | 60                  | 2.4 mol mol <sup>-1</sup> hexose <sup>-1</sup>      | [38]      |
| Microcrystalline cellulose | 12.5                                  | heat shocked digester sludge   | Batch  | 37                  | 2.18 mmol g-cellulose <sup>-1</sup>                 | [39]      |
| Cellulose                  | 4.7                                   | Heat shocked soil              | Batch  | 26                  | 0.003 mol mol <sup>-1</sup> substrate <sup>-1</sup> | [40]      |
| Delignified wood fibers    | 0.1                                   | Clostridium thermoCELLUM 27405 | Batch  | -                   | 2.32 mol mol <sup>-1</sup> hexose <sup>-1</sup>     | [41]      |
| Carboxymethyl cellulose    | 5                                     | <i>Thermotoga maritima</i>     | Batch  | 80                  | 95.5 ± 4.8 ml g-sugar <sup>-1</sup>                 | [42]      |
| Carboxymethyl cellulose    | 5                                     | <i>Thermotoga neapolitana</i>  | Batch  | 75                  | 96.4 ± 4.8 ml g-sugar <sup>-1</sup>                 | [42]      |
| Cellulose                  | 10                                    | Cow dung sludge                | Batch  | 55                  | 2.8 mmol g-cellulose <sup>-1</sup>                  | [43]      |

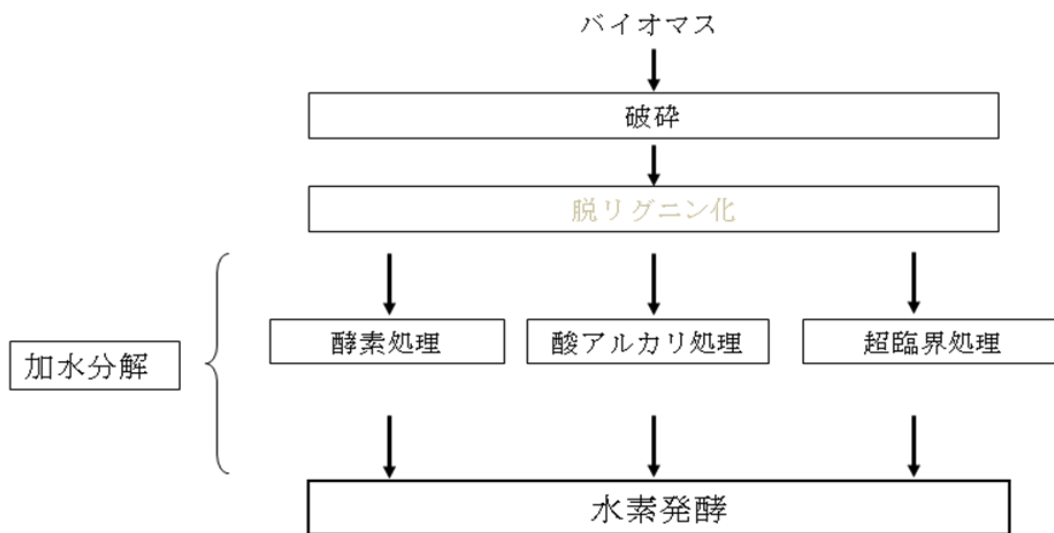


Fig.2.5 セルロース系バイオマスの水素発酵における前処理プロセスのフロー

田口らはコピー紙からの発酵法による水素生産の前処理としてセルラーゼによりコピー紙を 120 時間加水分解し、コピー紙の 67.5%に相当する還元糖を回収したことを報告している[44]。しかし、セルラーゼによるセルロースの分解は他の方法に比べ時間がかかる。

酸処理によるセルロースの糖化は、酵素法と比較して短時間で糖化できる。Zhang らはトウモロコシの茎からの水素発酵の前処理として HCl または NaOH を用いて 30 分間酸またはアルカリ処理を行い、0.2%の HCl を使用した場合において最も水素収率が高かったことを報告している[45]。しかし、セルロースは酸によって過分解されるとキシロースはアルデヒド類のフルフラールになる[46-48]。またリグニンはフェノール類になる。これらによりエタノール発酵において発酵阻害が生じる報告がされている[49]ので、水素発酵においても同様に阻害される可能性が高い。そこで阻害物質に耐性のある菌の育種や分解するバイオマスの種類に対して使用する酸の種類や濃度を検討する必要がある。産業技術総合研究所では前処理として水熱処理と湿式メカノケミカル処理を組み合わせ、糖化处理としてオンサイトで糸状菌のセルラーゼを利用して、セルロース系バイオマスからのバイオエタノールを製造する技術を実証している[50]。

超臨界による分解法は酸処理法よりも短時間でセルロースを分解できる。木質バイオマスからのエタノール生産の前処理法として 380°C、230 気圧の条件において 60 秒間超臨界処理を行い、木質バイオマスの乾重量に対して 23%の単糖が回収されたが、酵素処理や酸処理と比較して収量は低いことが報告されている[51]。超臨界による分解法は短時間で分解できるが、高温高压で分解するためコスト面では他の方法より劣る。

以上のようなセルロースの分解法があるが、それぞれ長所短所がある。したがってそれらの短所を克服する開発がなされれば飛躍的にバイオマスからの水素収量が高くなるであろう。

#### 2.4.4 栄養条件

水素発生細菌に限らず微生物は、増殖及びエネルギー獲得のために外部から栄養源の摂取を必要とする。炭素源は菌体のエネルギー源として必須であり、糖類や有機酸が利用される。窒素源は菌体合成に必要であり、無機体窒素として  $\text{NH}_4^+$  や  $\text{NO}_3^-$ 、有機体窒素源としてペプトンなどが用いられている。無機物としては金属イオンでは  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  など、陰イオンでは  $\text{Cl}^-$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{PO}_4^{2-}$  が必要である。これらは酵素や補酵素の成分、酵素の補助因子として利用される。

これら栄養源の濃度や種類は微生物の増殖及び代謝に影響を及ぼす。炭素源の濃度を高くすることによって水素収率が低下することが報告されている[27]。また窒素源においては無機体窒素より有機体窒素が水素発生には効果的であることが報告されている[52]。金属イオンでは特に  $\text{Fe}^{2+}$  は水素発生細菌にとっては重要な金属イオンのひとつである。フェレドキシンの合成が鉄濃度が制限されることにより抑制されること[53]、ヒドロゲナーゼも鉄制

限下では活性が低下すること[54]、 $\text{Fe}^{2+}$ を添加することにより水素発生能が向上したことが報告されている[55-58]。またヒドロゲナーゼは鉄-ニッケルを活性中心に持つものもあり  $\text{Ni}^{2+}$ も水素発生能に影響を及ぼすことが報告されている[59]。したがって水素発生細菌の活性を最大限活かすためには栄養条件の検討は非常に重要である。

#### 2.4.5 菌体濃度

菌体の単位重量あたりの水素発生速度は菌によって決まっているので、水素発生速度を高めるには菌体濃度をいかに高めるかが問題となる。連続発酵において HRT をある時間まで低くすると、菌体の発酵槽から流出（ウォッシュアウト）が起こる。したがって、HRT が低い状態で水素発生速度を高く保つためには菌体を発酵槽に留める必要がある。

発酵槽に菌体を留め、菌体濃度を高めるためには固定化担体に付着させる方法、自己凝集性の菌を利用する方法、ゲルによって菌体を包括する方法などがある。Table 2.5 に固定化担体または自己凝集による水素発酵の報告一覧を示す。水素発酵において固定化担体としてウレタンフォーム[62]、活性炭[64, 66-67]、シリコン[65, 70]を用いた報告がある。自己凝集性したフロックまたはグラニュールを利用して菌体濃度を高めて水素発生速度の向上を目指した報告もされている[60]。Wu らはシリコンゲルに汚泥と活性炭を固定化してスクロースを基質にした連続発酵において  $15\text{L}\cdot\text{H}_2\text{L}\cdot\text{culture}^{-1}\text{h}^{-1}$  の水素発生速度を達成した[70]。したがって、いかに高菌密度で水素発酵を行うかが水素発生速度を高める要因になる。

#### 2.4.6 嫌気度

発酵液の酸化還元電位は嫌気度の指標となる。Hussy らはスクロース及びテンサイを基質にした連続水素発酵において酸化還元電位が  $-300\text{ mV}$  程度から  $-210\text{ mV}$  程度まで低下した場合には水素収率は低下しないが、 $-150\text{ mV}$  以上では水素収率が低下したことを報告している[71]。酸化還元電位は溶存酸素を除去することにより低くすることができる。また還元剤を添加することによっても低くすることができる。

#### 2.4.7 水素分圧

水素発酵において液相の水素分圧は水素生成に対して影響を及ぼす。*Clostridium acetobutylicum* は水素分圧が高くなることで水素収率が 30%低下したことが報告されている[72]。また Chung は回分培養において水素分圧が高くなるにつれて *Clostridium cellobioparum* の増殖速度及び菌体量が低下したことを報告している[73]。

水素分圧を低くする方法として窒素を発酵槽に吹き込むことにより水素分圧を低下させることができる。Mizuno らは窒素を発酵槽に吹き込むことにより、水素収率が  $0.85\text{mol}\cdot\text{H}_2$

Table.2.5 固定化担体または自己凝集による水素発酵に関する既往研究

| Carbon source           | Organism                        | Immobilization matrix or carrier        | HRT (h) | H <sub>2</sub> production rate (L·H <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) | H <sub>2</sub> yield (mol·H <sub>2</sub> mol·hexose <sup>-1</sup> ) | Reference |
|-------------------------|---------------------------------|---|---------|--|---|-----------|
| Glucose                 | <i>E. aerogenes</i> II T-BT 08  | Lignocellulosic materials               | 1.1     | 1.85   | 2.04  | [60]      |
| Corn starch hydrolysate | <i>E. aerogenes</i> NCIMB 10102 | Sponge/glass beads                      | 10      | 0.25   | 1.36-3.02   | [61]      |
| Molasses                | <i>E. aerogenes</i> E.82005     | Urethane foam                           | 5       | 0.32   | 1.1-1.75  | [62]      |
| Glucose                 | <i>E. aerogenes</i> AY-2        | Self-flocculated cells                  | 1.5     | 1.42   | 1.1   | [63]      |
| Sucrose                 | Sewage sludge                   | Sponge, expanded clay, activated carbon | 1       | 1.32   | 0.59  | [64]      |
| Sucrose                 | Sewage sludge                   | Silicone                                | 2       | 0.925  | 1.34  | [65]      |
| Sucrose                 | Sewage sludge                   | Activated carbon                        | 0.5     | 7.41   | 1.45  | [66]      |
| Sucrose                 | Sewage sludge                   | Activated carbon                        | 0.5     | 7.3  | 1.5   | [67]      |
| Sucrose                 | Sludge microflora               | Glanular sludge                         | 6       | 0.54   | 1.96  | [68]      |
| Sucrose                 | Sewage sludge                   | Glanular sludge                         | 8       | 0.28   | 0.92  | [69]      |
| Sucrose                 | Sewage sludge                   | Silicone/granular sludge                | 0.5     | 14.5   | 1.93  | [70]      |

mol-glucose<sup>-1</sup>から 1.43mol-H<sub>2</sub> mol-glucose<sup>-1</sup>に向上させた[74]。Kraemer らは水素生成に対する窒素を吹き込み速度の影響について研究を行い、窒素吹き込み速度が 12ml L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> のとき水素収率が 1mol-H<sub>2</sub> mol-glucose<sup>-1</sup>から 2mol-H<sub>2</sub> mol-glucose<sup>-1</sup>に向上したことを報告している[75]。また Kim らは発生したバイオガス、窒素、二酸化炭素の3種類を発酵槽に吹き込むガスとして比較した結果、発生したバイオガス、窒素よりも二酸化炭素の方が効果的であったことを報告している[76]。

したがって、水素分圧を低くすることは水素収率を高めるためのひとつの方法である。

水素発酵技術の実用化に向けては、ラボスケールにおいて上述した因子を把握した上でスケールアップをする必要がある。そこで、次章において、有望な偏性嫌気性中温水素発生菌である HN001 株を用いて回分発酵によるデンプンからの水素発生特性を調べた。

## 参考文献

- [1] 日本生化学会編生化学データブックⅡ
- [2] 中島田豊、西尾尚道 食費廃棄物のメタン発酵及び水素・メタン二段発酵 208, 703-708 Foods Food Ingredients J Jpn (2003)
- [3] Kyazze, G., Dinsdale, R., Guwy, A.J., Hawkes, F.R., Premier, G.C., Hawkes, D.L., Performance characteristics of a two-stage dark fermentative system producing hydrogen and methane continuously. 97, 759-770 Biotechnol Bioeng (2006)
- [4] Venkata Mohan, S., Mohanakrishna, G., Sarma, P.N., Integration of acidogenic and methanogenic processes for simultaneous production of biohydrogen and methane from wastewater treatment. 33, 2156-2166 Int J Hydrogen Energy (2008)
- [5] Chu, C-F., Li, Y-Y., Xu, K-Q., Ebie, Y., Inamori, Y., A pH- and temperature-phased two-stage process for hydrogen and methane from food waste. 33, 4739-4746 Int J Hydrogen Energy (2008)
- [6] Yokoi, H., Maki, R., Hirose, J., Hayashi, S., Microbial production of hydrogen from starch-manufacturing wastes. 22 389-395 Biomass and Bioenergy (2002)
- [7] 谷生重晴 バクテリアはなぜ水素を発酵で発生するのか、またエネルギー生産利用における問題点はなにか 29, 2-6 水素エネルギーシステム (2004)
- [8] Tanisho, S., Kamiya, N., Wakao, N., Hydrogen evolution of *Enterobacter aerogenes* depending on culture pH: mechanism of hydrogen evolution from NADH by means of membrane-bound hydrogenase. 973, 1-6 Biochim Biophys Acta (1989)
- [9] Tanisho, S., Wakao, N., Kosaka, Y., Biological hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*. 16, 529-530 J. Chem Eng Japan (1983)
- [10] 谷生重晴、涂慧萍、若尾法昭、*Enterobacter aerogenes* の発酵水素発生と利用基質について、発酵工学会誌、第 67 巻 29-34 (1989)
- [11] Ito, T., Nakashimada, Y., Senba, K., Matsui, T., Nishio, N., Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. 100, 260-265 J. Ferment Bioeng (2005)
- [12] Tanisho, S., Ishiwata, Y., Continuous hydrogen production from molasses by the bacterium *Enterobacter aerogenes*. 20, 541-545 Int J Hydrogen Energy (1995)
- [13] Nakashimada, Y., Rachman, M.A., Kakizono, T., Nishio, N., Hydrogen production of *Enterobacter aerogenes* altered by extracellular and intracellular redox states. 27, 1399-1405 Int J Hydrogen Energy (2002)
- [14] Kumar, N., Das, D., Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* II T-BY 08. 35 589-593 Process Biochem (2000)
- [15] Bisailon, A., Turcot, J., Hallenbeck, P.C., The effect of nutrient limitation on

- hydrogen production by batch cultures of *Escherichia coli*. 31, 1504-1508 Int. J. Hydrogen Energy (2006)
- [16] Turcot, J., Bisailon, A., Hallenbeck, P.C., Hydrogen production by continuous cultures of *Escherichia coli* under different nutrient regimes. 33, 1465-1470 Int J Hydrogen energy (2008)
- [17] Yoshida, A., Nishimura, T., Kawaguchi, H., Inui, M., Yukawa, H., Enhanced hydrogen production from glucose using *ldh*<sup>-</sup> and *frd*-inactivated *Escherichia coli* strains. 73, 67-72 Appl Microbiol Biotechnol (2006)
- [18] Sode, K., Watanabe, M., Makimoto, H., Tomiyama, M., Construction and characterization of fermentative lactate dehydrogenase *Escherichia coli* mutant and its potential for bacterial hydrogen production. 77-79, 317-323 Appl Biochem Biotechnol (1999)
- [19] Chittibabu, G., Nath, K., Das, D., Feasibility study on the fermentative hydrogen production by recombinant *Escherichia coli* BL-21. 41, 682-688 Process Biochemistry (2006)
- [20] Karube, I., Matsunaga, T., Tsuru, S., Suzuki, S., Continuous hydrogen production by immobilized whole cells of *Clostridium butyricum*. 444, 338-343 Biochimica et Biophysica Acta (1976)
- [21] Chen, W-M., Tseng, Z-J., Lee, K-S., Chang, J-S., Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. 30, 1063-1070 Int J Hydrogen Energy (2005)
- [22] Wang, X., Jin, B., Mulcahy, D., Impact of carbon and nitrogen sources on hydrogen production by a newly isolated *Clostridium butyricum* W5. 30, 1063-1070 Int J Hydrogen Energy (2005)
- [23] Heyndrickx, M., Vansteenbeeck, A., De Vos, P., De Ley, J., Hydrogen gas production from continuous fermentation of glucose in a minimal medium with *Clostridium butyricum* LMG 1213t1. 8, 239-244 System Appl Microbiol (1986)
- [24] Taguchi, F., Chang, J.D., Takiguchi, S., Morimoto, M., Efficient hydrogen production from starch by a bacterium isolated from termites. 73, 244-245 J Ferment Bioeng (1992)
- [25] Levin, D.B., Islam, R., Cicek, N., Sparling, R., Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates. 31, 1496-1503 Int J Hydrogen Energy (2006)
- [26] Evvyernie, D., Yamazaki, S., Morimoto, K., Karita, S., Kimura, T., Sakka, K., Ohmiya, K., Identification and Characterization of *Clostridium paraputrificum* M-21, a chitinolytic, mesophilic and hydrogen-producing bacterium. 89, 596-601 J



Ferment Bioeng (2000)

- [27] 西山大紀, 谷生重晴 中温水素発生細菌による発酵水素生産の研究 第 25 回水素エネルギー協会大会予稿集, 171-174 (2005)
- [28] O-Thong, S., Prasertsan, P., Karakashev, D., Angelidaki, I., Thermophilic fermentative production by the newly isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2. 33, 1204-1214 Int J Hydrogen Energy (2008)
- [29] Ren, N., Cao, G., Wang, A., Lee, D-J., Guo, W., Zhu, Y., Dark fermentation of xylose and glucose mix using isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. Int J Hydrogen Energy
- [30] van Niel, E.W.J., Budde, M.A.W., de Haas, GG., van der Wal, F.J., Claassen, P.A.M., Stams, A.J.M., Distictive properties of high hydrogen producing extreme thermophiles, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermotoga elfii*. 27, 1391-1398 Int J Hydrogen Energy (2002)
- [31] Schröder, C., Selig, M., Schönheit, P., Glucose fermentation to acetate, CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> in the anaerobic hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritime*: involvement of the Embden-Meyerhof pathway. 161, 469-470 Arch Microbiol (1994)
- [32] Kanai, T., Imanaka, H., Nakajima, A., Uwamori, K., Omori, Y., Fukui, T., Atomi, H., Imanaka, T., Continuous hydrogen production by the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. 116, 271-282 J Biotechnol (2005)
- [33] Schäfer, T., Schönheit, P., Maltose fermentation to acetate, CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> in the anaerobic hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: evidience for the operation of a novel sugar fermentation pathway. 158, 188-202 Arch Microbiol (1992)
- [34] Wu, S-Y., Hung, C-H., Lin, C-Y., Lin, P-J., Lee, K-S., Lin, C-N., Chang, F-Y., Chang, J-S., HRT-dependent hydrogen production and bacterial community structure of mixed anaerobic microflora in suspended, granular and immobilized sludgesystems using glucose as the carbon substrate. 33, 1542-1549 Int J Hydrogen energy (2008)
- [35] Chang, J-J., Wu, J-H., Wen, F-S., Hung, K-Y., Chen, Y-T., Hsiao, C-L., Lin, C-Y., Huang, C-C., Molecular monitoring of microbes in a continuous hydrogen-producing system with different hydraulic retention time. 33, 1579-1585 Int J Hydrogen Energy (2008)
- [36] Hawkes, F.R., Hussy, I., Kyazze, G., Dinsdale, R., Hawkes, D.L., Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. 32, 172-184 Int J Hydrogen Energy (2007)
- [37] Heyndrickx, M., De Vos, P. Speybrouck, A., De Ley, J., Fermentation of mannitol by *Clostridium butyricum*: role of acetate as an external hydrogen acceptor. 31,

- 323-328 Appl Microbiol Biotechnol (1989)
- [38] Ueno, Y., Kawai, T., Sato, S., Otsuka, S., Morimoto, M., Biological production of hydrogen from cellulose by natural anaerobic microflora. 79, 395-397 J Ferment Bioeng (1995)
- [39] Lay, J-J., Biohydrogen generation by mesophilic anaerobic fermentation of microcrystalline cellulose. 74, 280-287 Biotechnol Bioeng (2001)
- [40] Logan, B.E., Oh, S-E., Kim, I.S., Van Ginkel, S. Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers. 36, 2530-2535 Environ Sci Technol (2002)
- [41] Levin, D.B., Islam, R., Cicek, N., Sparling, R., Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulose biomass substrates. 31, 1496-1503 Int J Hydrogen Energy (2006)
- [42] Nguyen, T.A.D., Kim, J.P., Kim, M.S., Oh, Y.K., Sim, S.J., Optimization of hydrogen production by hyperthermophilic eubacteria, *Thermotoga maritime* and *Thermotoga neapolitana* in batch fermentation. 33, 1483-1488 Int J Hydrogen Energy (2008)
- [43] Lin, C-Y., Hung, W-C., Enhancement of fermentative hydrogen/ethanol production from cellulose using mixed anaerobic cultures. 33, 3660-3667 Int J Hydrogen Energy (2008)
- [44] 田口文章、松下敏也、能見雅信、水素生成菌による使用済みコピー紙の水素への変換 32, 71-77 環境技術 (2003)
- [45] Zhang, M-L., Fan, Y-T., Xing, Y., Pan, C-M., Zhang, G-S., Lay, J-J., Enhanced biohydrogen production from cornstalk wastes with acidification pretreatment by mixed anaerobic cultures. 31, 250-254 Biomass Bioenergy (2007)
- [46] Téllez-Luis, S.J., Ramírez, J.A., Vázquez, M., Mathematical modeling of hemicellulosic sugar production from sorghum straw. 52, 285-291 J Food Eng (2002)
- [47] Herrera, A., Téllez-Luis, S.J., González-Cabriales, J.J., Ramírez, J.A., Vázquez, M., Effect of hydrochloric acid concentration on the hydrolysis of sorghum straw at atmospheric pressure. 63, 103-109 J Food Eng (2004)
- [48] Vázquez, M., Oliva, M., Téllez-Luis, S.J., Ramírez, J.A., Hydrolysis of sorghum straw using phosphoric acid: Evaluation of furfural production. 98, 3053-3060 Bioresource Technology (2007)
- [49] Klinke, H.B., Thomsen, A.B., Ahring, B.K., Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. 66, 10-26 Appl Microbiol Biothechnol (2004)

- [50] より環境に優しいバイオマス燃料の製造を開始 産総研ホームページ  
[http://www.aist.go.jp/aist\\_j/press\\_release/pr2008/pr20080131/pr20080131.html](http://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2008/pr20080131/pr20080131.html)
- [51] Lee, O-K., Lee, S-M., Choi, S.H., Choi, D-H., Choi, J-W., Han, J.K., Qadir, A.S., Lee, H.Y., Bio-ethanol production from wood by supercritical water treatment and fermentation. Proceeding of World Bioenergy 2008 195-197 (2008)
- [52] Wang, X., Jin, B., Mulcahy, D., Impact of carbon and nitrogen sources on hydrogen production by a newly isolated *Clostridium butyricum* W5. 33, 4998-5005 Int J Hydrogen Energy (2008)
- [53] Schönheit, P., Brandis, A., Thauer, R.K., Ferrdoxin degradation in growing *Clostridium pasteurianum* during period of iron deprivation. 120 73-76 Arch Microbiol (1979)
- [54] Junells, A.M., Janati-Idrissi, R., Petitdemange, H., Gay, R., Iron effect of acetone-butanol fermentation. 17 299-303 Current Microbiology (1988)
- [55] Lee, Y.J., Miyahara, T., Noike, T., Effect of iron concentration on hydrogen fermentation. 80, 227-231 Bioresource Technol (2001)
- [56] Yang, H., Shen, J., Effect of ferrous iron concentration on anaerobic bio-hydrogen production from soluble starch. 31, 2137-2146 Int J Hydrogen Energy (2006)
- [57] Zhang, Y., Liu, G., Shen, J., Hydrogen production in batch culture of mixed bacteria with sucrose under different iron concentration. 30, 855-860 Int J Hydrogen Energy (2004)
- [58] Chen, W-M., Tseng, Z-J., Lee, J-S., Chang, J-S., Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. 30, 1063-1070 Int J Hydrogen Energy (2005)
- [59] Wang, J., Wan, W., Influence of Ni<sup>2+</sup> concentration on biohydrogen production. 99, 8864-8868 Bioresour Technol (2008)
- [60] Kumar, N., Das, D., Continuous hydrogen production by immobilized *Enterobacter cloacae* II T-BT 08 using lignocellulosic materials as solid matrices. 29, 280-287 Enzyme Microbial Technol (2001)
- [61] Palazzi, E., Fabino, B., Perego, P., Process development of continuous hydrogen production by *Enterobacter aerogenes* in a packed-bed reactor. 22, 205-213 Bioprocess Eng (2000)
- [62] Tanisho, S., Ishiwata, Y., Continuous hydrogen production from molasses by fermentation using urethane form as a support of flocks. 20. 541-545 Int J Hydrogen Energy (1995)
- [63] Rachman, M.A., Nakashimada, Y., Kakizono, T., Nishio, N., Hydrogen production with high yield and high evolution rate by self-flocculated cells of *Enterobacter*

- aerogenes* in a packed-bed reactor. 49, 450-454 Appl Microbiol Biotechnol (1998)
- [64] Chang, J-S., Lee, K-S., Lin, P-J., Biohydrogen production with fixed-bed bioreactors. 27, 1167-1174 Int J Hydrogen Energy (2002)
- [65] Wu, S-Y., Lin, C-N., Chang, J-S., Hydrogen production with immobilized sewage sludge in three-phase fluidized-bed bioreactors. 19, 828-832 Biotechnol Prog (2003)
- [66] Lee, K-S., Lo, Y-S., Lo, Y-C., Lin, P-J., Chang, J-S., H<sub>2</sub> production with anaerobic sludge using activated-carbon supported packed-bed bioreactors. 25, 133-138 Biotechnol Lett (2003)
- [67] Lee, K-S., Wu, J-F., Lo, Y-S., Lo, Y.C., Lin, P-J., Chang, J-S., Anaerobic hydrogen production with an efficient carrier-induced granular sludge bed bioreactor. 87, 1648-657 Biotechnol Bioeng (2004)
- [68] Fang, H.H.P., Liu, H., Zhang, T., Characterization of a hydrogen-producing granular sludge. 78, 44-52 Biotechnol Bioeng (2002)
- [69] Chang, F-Y., Lin, C-Y., Biohydrogen production using an up-flow anaerobic sludge blanket reactor. 29, 33-39 Int J hydrogen Energy (2004)
- [70] Wu, S-Y., Hung, C-H., Lin, C-N., Chen, H-W., Lee, A-S., Chang, J-S., Fermentative hydrogen production and bacterial community structure in high-rate anaerobic bioreactors containing silicone-immobilized and self-flocculated sludge. 93, 934-946 Biotechnol Bioeng (2006)
- [71] Hussy, I., Hawkes, F.R., Dinsdale, R., Hawkes, D.L., Continuous fermentative hydrogen production from sucrose and sugarbeet. 30, 471-483 Int J Hydrogen Energy (2004)
- [72] Yerushalmi, L., Volesky, B., Szczesny, T., Effect of increased hydrogen partial pressure on the acetone-butanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum*. 22, 103-107 Appl Microbiol Biotechnol (1985)
- [73] Chung, K-T., Inhibitory effects of H<sub>2</sub> on growth of *Clostridium cellobioparum*. 31, 342-348 Appl Environ Microbiol (1976)
- [74] Mizuno, O., Dinsdale, R., Hawkes, F.R., Hawkes, D.L., Noike, T., Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. 73, 59-65 Bioresource Technology (2000)
- [75] Kraemer, J.T., Bagley, D.M., Optimisation and design of nitrogen-sparged fermentative hydrogen production bioreactors. Int J Hydrogen Energy (2008)
- [76] Kim, D-H., Han, S-K., Kim, S-H., Shin, H-S., Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production. 31, 2158-2169 Int J Hydrogen Energy (2006)

## 第3章

### 回分発酵によるデンプンからの水素発生特性

### 3.1 目的

単離された偏性嫌気性中温水素発生細菌 HN001 株は、回分発酵においてグルコースを基質にして発酵温度 47°C の条件において水素発生速度は非常に速く  $3.3 \text{ L-H}_2 \text{ L-culture h}^{-1}$  であった[1]。しかし様々なバイオマスを基質にした水素発酵の実用化を念頭におくと、他の種類の糖からの水素発生特性を知る必要がある。デンプンはグルコースが  $\alpha 1,4$  または  $\alpha 1,6$  グリコシド結合により結合した多糖類であるが、比較的分解利用しやすい点において水素発酵の基質として利用できるひとつに挙げられる。また賦存量が非常に多い点も利用の可能性が大きい。そこで本章では、回分発酵によるデンプンからの水素発生特性（発酵温度、pH、デンプン濃度、鉄イオンの影響）を調べることを目的とした。

### 3.2 実験方法

使用した HN001 株は嫌気性菌増菌・継代・保存用 ABCM 半流動培地（栄研器材株式会社）の高層培地 15 ml に植え付け、十分に増殖したものを実験に用いた。実験装置の概略図を Fig.3.1 に、その写真を Fig.3.2 示す。実験で発生したガスは 1N の水酸化ナトリウム水溶液を用いて水上置換し、押し出された水酸化ナトリウム溶液の重量を水素発生量として測定した。実験条件は発酵槽体積 860ml、発酵液体積 500ml、攪拌速度 200rpm、発酵液の pH はコントローラーにより 1N の水酸化ナトリウム水溶液を滴下することで一定に保ち、温度も PID 制御法により設定温度に保った。これらの発酵実験は 24 時間行った。

発酵液の組成は YNU 嫌気培地を用いた (Table.3.1)。

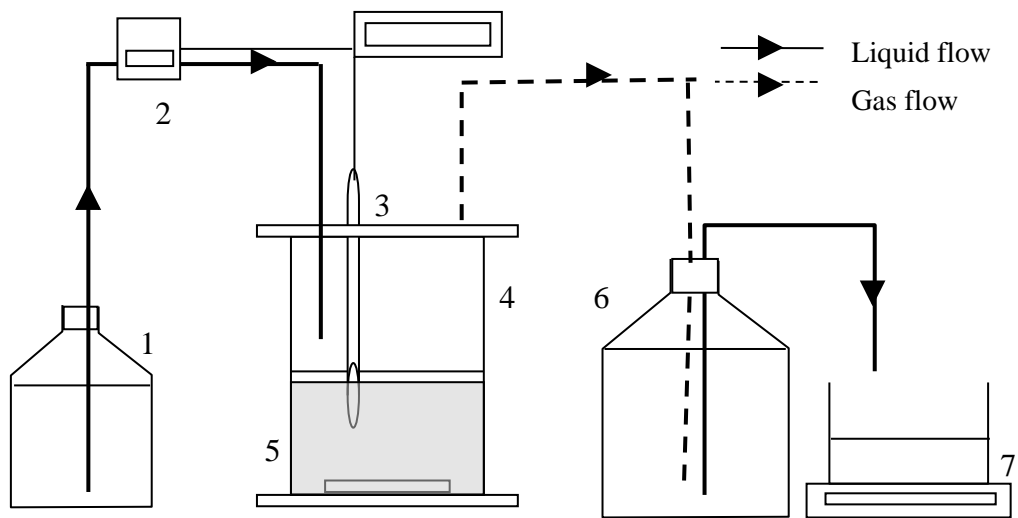
Table.3.1 YNU 嫌気培地の組成

|                        | g L <sup>-1</sup>  |
|------------------------|--------------------|
| 可溶性デンプン                | 10.0 <sup>※1</sup> |
| カゼインペプトン <sup>※2</sup> | 22.0               |
| 粉末酵母エキス-S              | 25.0               |
| L-システイン塩酸塩             | 0.3                |
| チオグリコール酸               | 0.3                |

※ 1：デンプン濃度の影響を調べる際はデンプン濃度を 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 g L<sup>-1</sup> に設定した。

※ 2：鉄イオンの影響を調べる際はカゼインペプトンの代わりにカザミノ酸を使用し、鉄イオンの供与体として FeCl<sub>2</sub> または FeCl<sub>3</sub> を使用した。

有機酸及びアルコールは高速液体クロマトグラフ装置（ポンプ：HITACHI 655-A、キャ



1. 1M NaOH 水溶液 2. ペリスタリックポンプ  
 3. pH 電極 4. 発酵槽 5. ヒーター  
 6. 1M NaOH 水溶液 7. 電子天秤

Fig.3.1 実験装置概略図

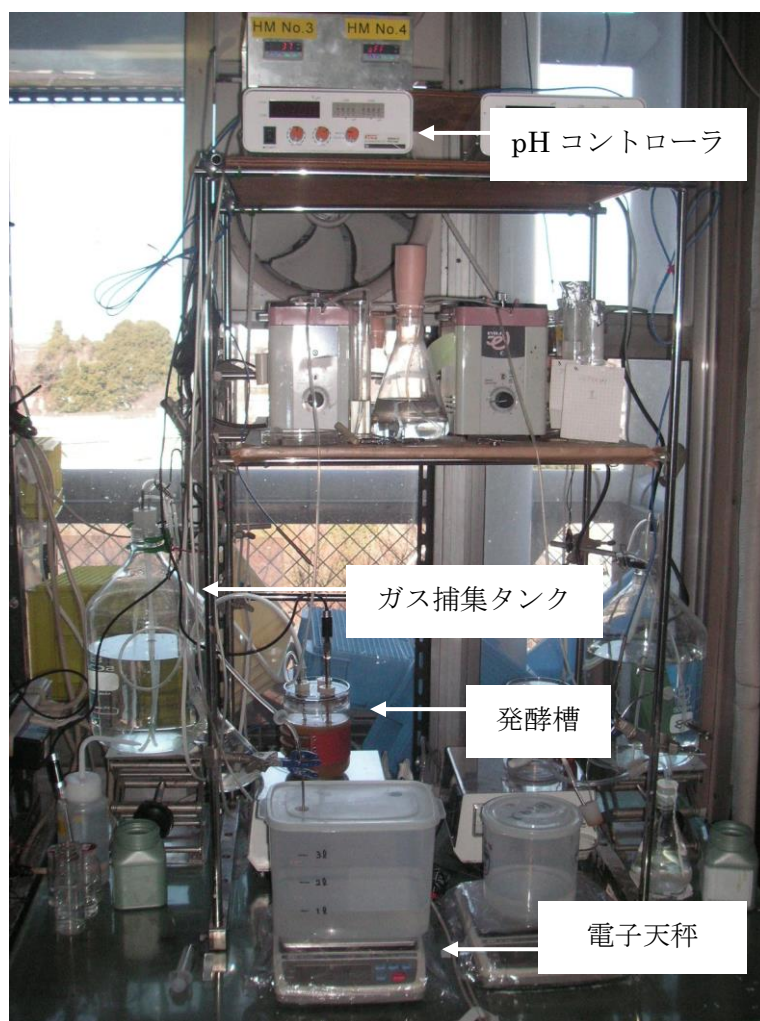


Fig.3.2 実験装置写真



リア：0.1%リン酸水溶液、キャリア流量：0.5 ml/min、カラム：日立化成 GL-C610H-S、検出器：HITACHI RI655A-30) で分析した。また、発酵液中の菌体濃度の指標として分光光度計 (APEL PD-303) を用いて波長 550nm における Optical Density (OD) を測定した。

### 3.3 結果及び考察

#### 3.3.1 発酵温度の影響

この実験は pH6.0、デンプン濃度 1.0% の条件で行い、発酵温度は 32、37、41、45 及び 50°C の 5 段階に設定した。Fig3.3 に最大水素発生速度に対する発酵温度の影響を示す。最大水素発生速度は 37°C において最も速く  $1.2 \text{ L-H}_2 \text{ L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$  であった。しかし、41、45 及び 50°C ではそれぞれ  $0.7 \text{ L-H}_2 \text{ L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、 $0.3 \text{ L-H}_2 \text{ L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、 $0.3 \text{ L-H}_2 \text{ L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、であり、温度が上昇するにつれ最大水素発生速度は低くなった。Fig3.4 に積算水素発生量に対する発酵温度の影響を示す。積算水素発生量も最大水素発生速度と同様に、37°C において最も高く約  $2.9 \text{ L-H}_2 \text{ L-culture}^{-1}$  となり、温度が上昇するにつれ少なくなった。

西山らは、HN001 株を用いてグルコースを基質にして水素発生に対する発酵温度の影響を調べ、47°C 付近で活発に水素発生したことを報告している [1]。しかしデンプンを基質にした本実験では、45°C 以上において著しく水素発生が低下した。そこでデンプン消費量及び菌体濃度によりその結果を考察した。Fig3.5 にデンプン消費量に対する発酵温度の影響を示す。32、37、41°C ではデンプンはほぼ消費されていたが、45、50°C と高温になるにつれてデンプン消費量は少なくなった。Fig3.6 に Optical density(OD) に対する発酵温度の影響を示す。OD は菌体濃度の指標になる。OD もデンプン消費量と同様の傾向を示し、32、37、41°C では値が高かったが、45、50°C では低くなった。したがって、グルコースを基質にした場合は 47°C 付近が水素発生の至適温度であるのに対して、デンプンを基質にした場合 45、50°C の高温で積算水素発生量が少なく、また最大水素発生速度も低かったのは、HN001 株は 45°C 以上の高温においてデンプンを分解利用することができなかったことが原因であることが明らかになった。

#### 3.3.2 pH の影響

この実験は発酵温度 37°C、デンプン濃度 1.0% の条件で行い、pH は 5.5、6.0、6.5 及び 7.0 の 4 段階に設定した。Fig3.7 に最大水素発生速度に対する pH の影響を示す。水素発生速度は pH5.5 において  $0.6 \text{ L-H}_2 \text{ L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、pH6.0 において  $1.2 \text{ L-H}_2 \text{ L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、pH6.5 において最も速く  $1.8 \text{ L-H}_2 \text{ L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$  となり、pH7.0 では  $0.4 \text{ L-H}_2 \text{ L-culture}^{-1}$

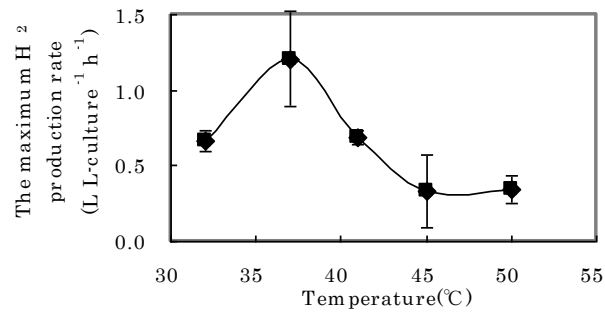


Fig.3.3 最大水素発生速度に対する発酵温度の影響

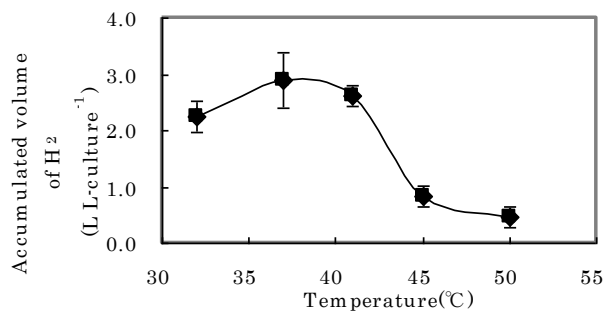


Fig.3.4 積算水素発生量に対する発酵温度の影響

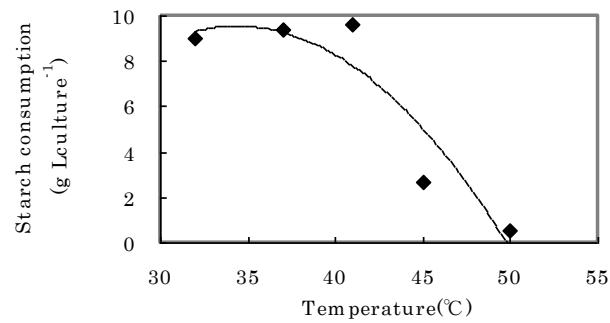


Fig.3.5 デンプン消費量に対する発酵温度の影響

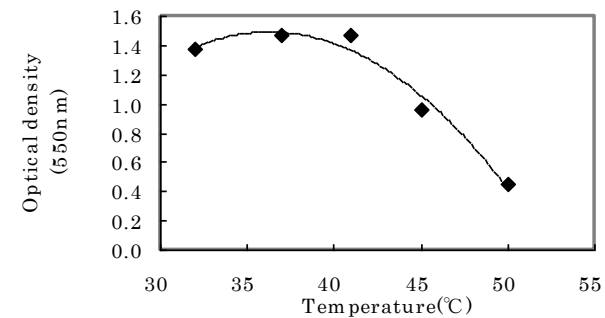


Fig.3.6 Optical densityに対する発酵温度の影響

$\text{h}^{-1}$ に低下した。これは Fig3.8 に示すように pH6.5 において OD の傾きが高く、つまり HN001 株の増殖が速かったためであると考えられる。

西山らは、HN001 株を用いてグルコースを基質にして水素発生に対する pH の影響を調べ、pH 6.0 から 6.5 で活発に水素発生したことを報告している[2]。また Taguchi らは、*Clostridium beijerinckii* AM21B を用いたデンプンからの水素発生において pH を 5.0、5.5、6.0、6.5 及び 7.0 の 5 段階に設定して pH の影響を調べたが、最大水素発生速度は pH6.5 において最も高かったことを報告している[3]。Tanisho らは *Enterobacter aerogenes* の比水素発生速度は pH 6.0 付近であることを報告している[4]。これらの報告と同様、デンプンを基質にした場合の HN001 株の水素発生における至適 pH は弱酸性であることがわかった。

### 3.3.3 基質濃度の影響

この実験は発酵温度 37°C、pH6.0 の条件で行い、デンプン濃度 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0 及び 5.0% の 8 段階に設定した。Fig3.9 に最大水素発生速度に対するデンプン濃度の影響を示す。最大水素発生速度はデンプン濃度 1.5% まではデンプン濃度を高くなるにつれて速くなったが、1.5% 以上では  $1.5 \text{ L-H}_2 \text{ L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$  にとどまった。Fig3.10 に Optical density に対するデンプン濃度の影響を示す。デンプン濃度が 3.0% までは濃度の上昇とともに OD も高くなったが 3.0% 以上では一定となっており、菌体濃度が一定になったことがデンプンが高濃度において水素発生速度が速くならなかった一因と考えられる。また Fig3.11 に水素収率に対するデンプン濃度の影響を示す。水素収率はデンプン濃度が高くなるにつれて直線的に低くなった。Fig3.12 に有機酸及びアルコール生成に対するデンプン濃度の影響を示す。酢酸や酪酸はデンプン濃度が高くなると生成量がほぼ一定になった。しかし乳酸生成量はデンプン濃度の上昇に比例して高くなった。乳酸の生成においては以下のグルコースから乳酸の総括反応式が示すように水素は生成されない。



これよりデンプン濃度が高くなるにつれて水素生成を伴わない乳酸の生成比率が高くなったため水素収率が低下したことが考えられる。ところで Pappenheimer Jr らは *Clostridium welchii* の代謝において培地中の鉄の欠乏が乳酸の生成を促進させることを報告している[5]。また Dabrock らも同様に、*Clostridium pasteurianum* を用いた回分及び連続発酵において鉄制限下では乳酸が生成されることを報告している[6]。したがって、本実験においても鉄の欠乏が乳酸の生成及び水素収率を低下させた原因であることが考えられたので、次に水素発生に対する鉄イオンの影響を調べた。

### 3.3.4 鉄イオンの影響

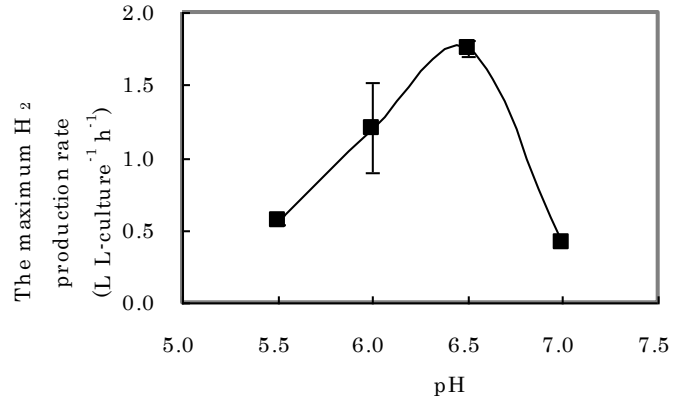


Fig.3.7 最大水素発生速度に対する pHの影響

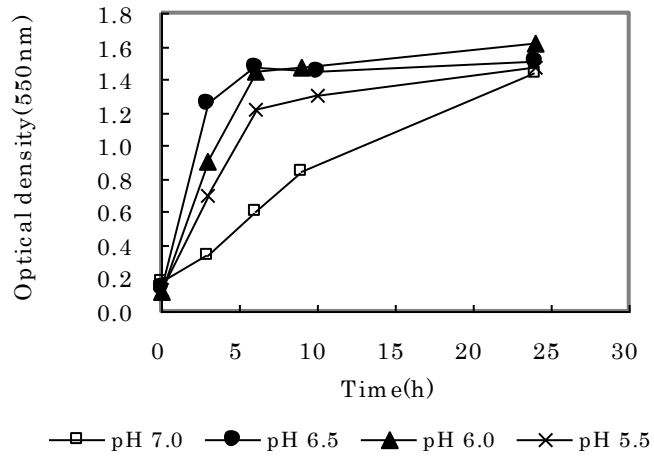


Fig.3.8 Optical densityに対する pHの影響

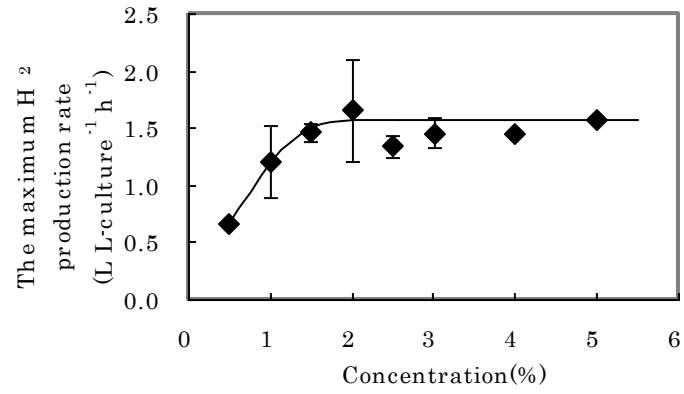


Fig.3.9 最大水素発生速度に対する  
デンプン濃度の影響

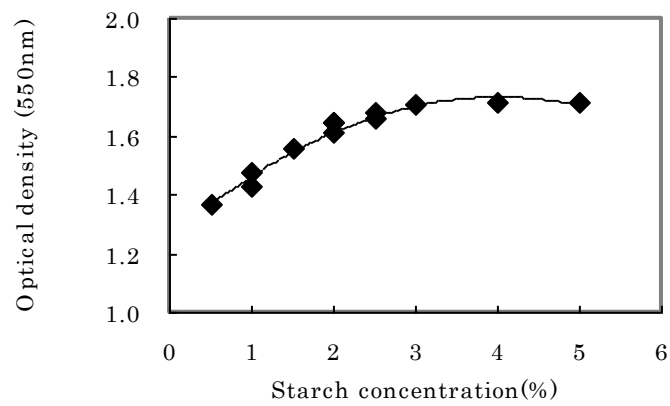


Fig.3.10 Optical densityに対する  
デンプン濃度の影響

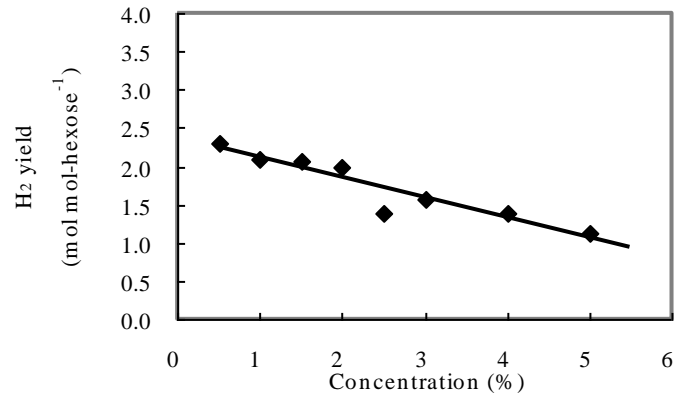


Fig.3.11 水素収率に対するデンプン濃度の影響

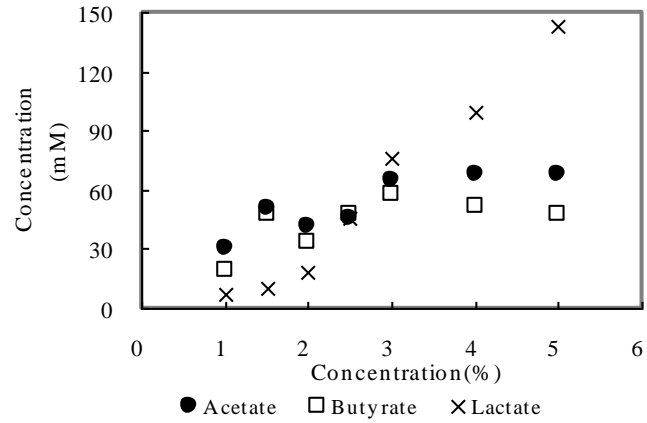
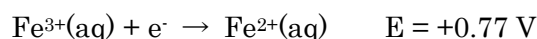


Fig.3.12 酢酸、酪酸、乳酸の生成量に対するデンプン濃度の影響

Fig.3.13 に最大水素発生速度に対する塩化鉄(II)及び塩化鉄(III)の影響を示す。最大水素発生速度は塩化鉄(II)を 100mg L<sup>-1</sup> 添加することにより 1.2L-H<sub>2</sub> L-culture<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> から 2.2L-H<sub>2</sub> L-culture<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> になり速くなった。しかし、100mg L<sup>-1</sup> 以上添加しても最大水素発生速度はより速くはならなかった。Fig.3.14 に水素収率に対する塩化鉄(II) 及び塩化鉄(III)の影響を示す。水素収率は鉄イオンを添加しない場合、0.8 mol mol-hexose<sup>-1</sup> であった。また塩化鉄(II)または塩化鉄(III)を添加することによりそれぞれ 1.7 mol mol-hexose<sup>-1</sup>、1.6 mol mol-hexose<sup>-1</sup> まで改善された。水素収率の増加の傾向は最大水素発生速度と塩化鉄(II)または塩化鉄(III)の添加量の関係と類似していた。

以上より、鉄イオンの添加により水素発生能が向上したが、塩化鉄(II)と塩化鉄(III)の違いはみられなかった。この理由には培地の pH と酸化還元電位の関係があることが考えられる。Fig.3.15 に鉄を含む水溶液の pH と酸化還元電位が鉄の化学種に及ぼす影響を示す。Fe<sup>3+</sup>は以下に示す還元半反応式より E = +0.77 V 以下では Fe<sup>2+</sup>に還元される。



また以下の反応式に示す Fe<sup>3+</sup>と Fe(OH)<sub>3</sub>の反応は酸化数に変化がないため酸化還元電位には影響しないが、pH に依存する。

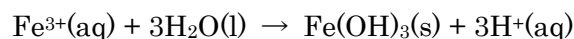
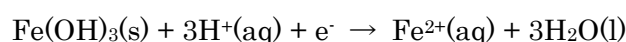


Fig.3.15 には Fe<sup>3+</sup>の濃度が 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> より高いか低いかを表した垂直線が引かれている。そして以下に Fe(OH)<sub>3</sub>と Fe<sup>2+</sup>の反応を示す。



また上述の反応式は以下に示す Nernst の式により酸化還元電位は pH に依存していることがわかる。

$$\begin{aligned} E &= E - 0.059 \log_{10} \{[\text{Fe}^{2+}] / [\text{H}^+]^3\} \\ &= E - 0.059 \log_{10} [\text{Fe}^{2+}] - 0.177 \times \text{pH} \end{aligned}$$

以上の3つの反応式により、培地の酸化還元電位は還元剤を添加しているので低く、また pH は 6.0 に調整している。したがって、添加された Fe<sup>3+</sup>は Fe<sup>2+</sup>に還元されているので塩化鉄(II)と塩化鉄(III)では水素発生能には違いがみられなかったと考えられる。

Table.3.2 に水素収率に対する鉄イオン添加の影響の比較を示す。Lee らは 37°Cにおいて基質にスクロースを使用した実験で、塩化鉄(II)を添加することにより水素収率が向上した

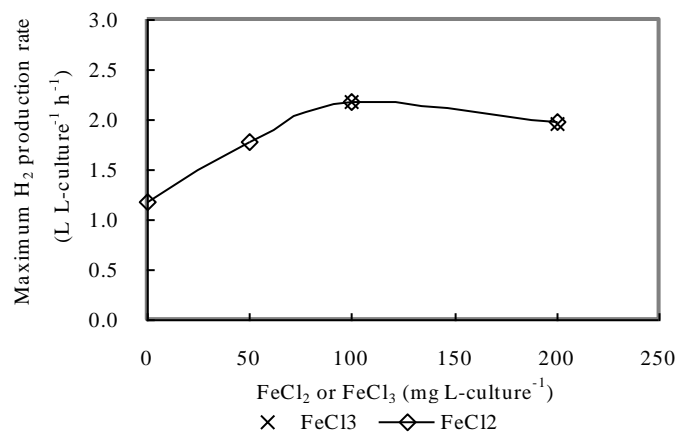


Fig.3.13 最大水素発生速度に対する鉄イオンの影響

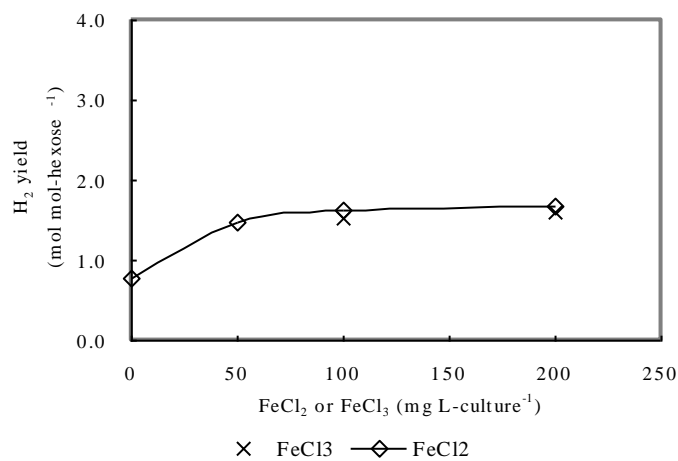


Fig.3.14 水素収率に対する鉄イオンの影響



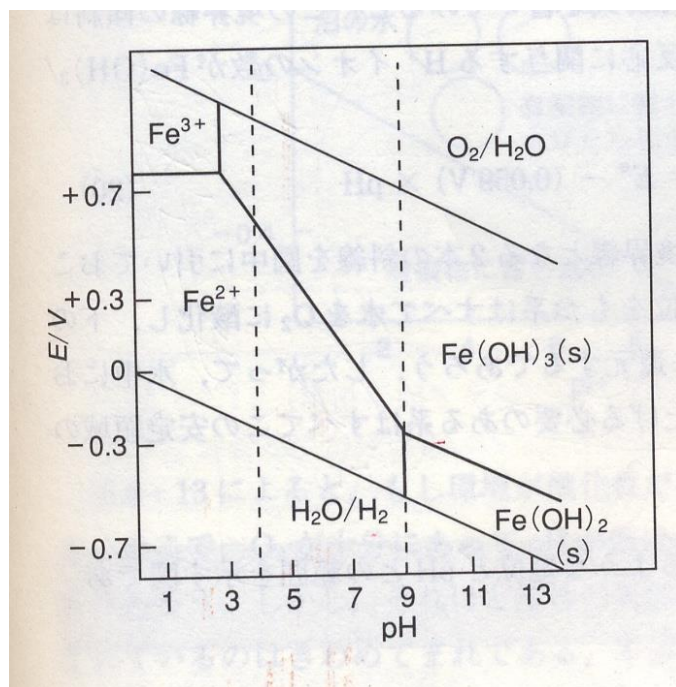


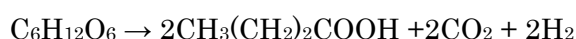
Fig.3.15 鉄を含む水溶液の pH と酸化還元電位が鉄の化学種に及ぼす影響 [6]

※  $[\text{Fe}^{3+}][\text{OH}^-]^3 = 10^{-38} \text{ mol}^4 \text{ L}^{-12}$ 、 $[\text{Fe}^{2+}][\text{OH}^-]^2 = 10^{-15} \text{ mol}^3 \text{ L}^{-9}$  として計算されている。

Table.3.2 水素生成能に対する鉄イオンの影響に関する文献の水素収率の比較

| Organisms                                       | Temperature<br>(°C) | Substrate<br>(g L <sup>-1</sup> ) | Iron donor<br>(mg L <sup>-1</sup> ) | H <sub>2</sub> yield                           |           | Reference  |
|---|---------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|--|-----------|------------|
|   |                     |                                   |                                     | without iron                                   | with iron |            |
|   |                     |                                   |                                     | (mol-H <sub>2</sub> mol-hexose <sup>-1</sup> ) |           |            |
| mixed microorganisms                            | 37                  | sucrose                           | FeCl <sub>2</sub>                   | 0.03   | 2.0       | [8]        |
| anaerobic mixed bacteria                        | 35                  | starch                            | FeSO <sub>4</sub>                   | 0.8  | 2.1       | [9]        |
| mixed bacteria dominated <i>C. pasteurianum</i> | 35                  | sucrose                           | FeSO <sub>4</sub>                   | 1.0  | 1.4       | [10]       |
| <i>C. butyricum</i> CGS5                        | 37                  | sucrose                           | FeSO <sub>4</sub>                   | —  | 1.5       | [11]       |
| the strain HN001                                | 37                  | starch                            | FeCl <sub>2</sub>                   | 0.8  | 1.7       | This study |

ことを報告している[8]。Yang らは 35°Cにおいて基質にデンプンを使用した実験で、硫酸鉄(II)を添加することにより水素収率が向上したことを報告している[9]。また Zhang らの実験では、*C. pasteurianum* が優先的な菌群を用いて 35°Cにおいて硫酸鉄(II)を添加することによりスクロースからの水素収率が改善された[10]。Chen らの実験では、*C. butyricum* CGS5 を用いて 37°Cにおいて硫酸鉄(II)を添加することで水素収率が向上した[11]。本実験においても、塩化鉄(II)を添加することにより水素収率は 0.8 mol-H<sub>2</sub> mol-hexose<sup>-1</sup> から 1.7 mol-H<sub>2</sub> mol-hexose<sup>-1</sup> に改善された。Fig.3.16 に有機酸生成に対する塩化鉄(II)の影響を示す。乳酸生成量は塩化鉄(II)を添加しない場合、219mM であり非常に多かったが、添加することにより生成量は減少した。一方で酢酸と酪酸の生成量は塩化鉄(II)を添加しない場合、それぞれ 73mM、40mM であり少なかったが、添加することにより生成量はそれぞれ増加した。またエタノール生成量は塩化鉄(II)を添加しても乳酸、酢酸、酪酸のような大きな増減はなく塩化鉄(II)の影響はみられなかった。Fig.3.17 に有機酸生成に対する塩化鉄(III)の影響を示す。塩化鉄(II)を加えた場合と同様、塩化鉄(III)を加えた場合にも酢酸及び酪酸の生成量が増加し、乳酸の生成量は減少した。水素発生細菌は以下のグルコースからの総括反応式が示すように乳酸、酢酸、酪酸を生成する。



酢酸、酪酸は代謝される過程で、ピルビン酸からアセチル-CoA が生成される際に鉄-硫黄クラスターを持った電子伝達体であるフェレドキシンが電子を受け取りヒドロゲナーゼの触媒作用を受けて水素を生成する。また乳酸はアセチル-CoA を介さずにピルビン酸から生成され、水素は生成されない。Schönheit らは *Clostridium pasteurianum* を用いて培地に鉄イオンを添加することでフェレドキシンが合成されたことを報告している[12]。また Junells らは *Clostridium acetobutylicum* のヒドロゲナーゼの比活性が鉄制限の条件下では 40%低下することを報告している[13]。したがって、本実験において添加した鉄イオンによりフェレドキシンがより合成されたこと、またヒドロゲナーゼの活性が低下しなかったことにより酢酸、酪酸の生成が促進されたために水素発生能が向上したことが示唆される。

### 3.3.5 デンプンからの水素発生に関する文献との水素発生能の比較

Table.3.3 に回分発酵によるデンプンからの水素発生における水素発生能の文献値の比較を示す。他の文献値と比較して、本実験ではデンプン濃度が高いにもかかわらず得られた水素収率及び水素発生速度は非常に高いことは明らかである。

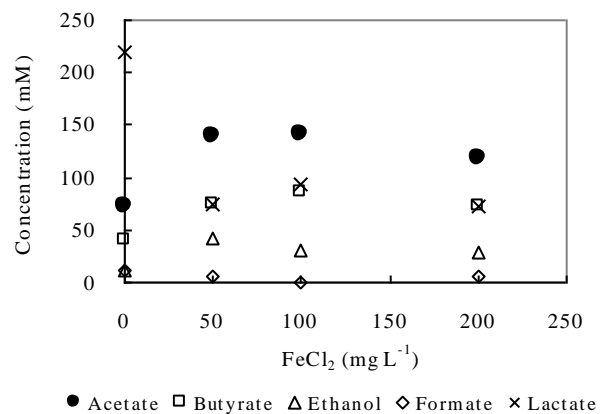


Fig.3.16 有機酸及びエタノールの生成量に対するFeCl<sub>2</sub>の影響

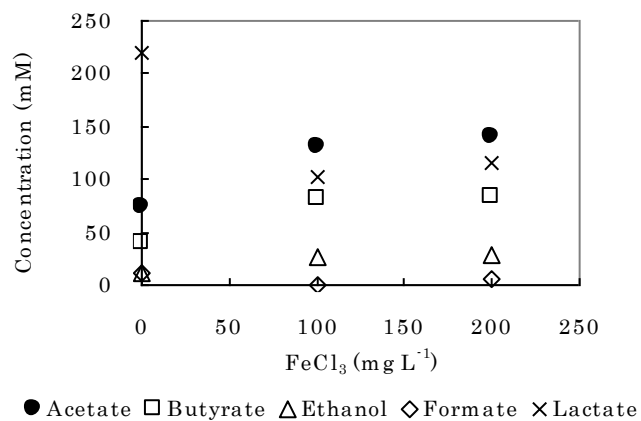


Fig.3.17 有機酸及びエタノールの生成量に対するFeCl<sub>3</sub>の影響

Table 3.3 3回分発酵によるデンプンからの水素発酵に関する報告

| organism                                 | temperature<br>(°C) | pH           | starch concentration<br>(g L <sup>-1</sup> ) | H <sub>2</sub> yield<br>(mol·H <sub>2</sub> ·mol <sup>-1</sup> ·hexose <sup>-1</sup> ) | H <sub>2</sub> production rate<br>(L·H <sub>2</sub> ·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> ) | reference  |
|--|---------------------|--------------|--|--|---|------------|
| <i>Clostridium beijerinckii</i><br>AM21B | 36                  | 6.5          | 10   | 1.8  | 0.4   | [3]        |
| sludge                                   | 55                  | 6.0          | 4.6  | 0.7  | -   | [14]       |
| heat shocked cereals                     | 35                  | uncontrolled | 2  | 1.4  | -   | [15]       |
| heat shocked sludge                      | 37                  | 6.5          | 24 g-COD L <sup>-1</sup>                     | 1.7  | 1.1   | [16]       |
| heat shocked sludge                      | 35                  | 5.5          | 20 g-COD L <sup>-1</sup>                     | 2.2  | 0.6   | [17]       |
| heat shocked sludge                      | 37                  | uncontrolled | 20 (wheat powder)                            | 0.7  | 0.04  | [18]       |
| HN001                                    | 37                  | 6.5          | 10   | —  | 1.8   | This study |
|  | 37                  | 6.0          | 10   | 2.1  | 1.2   |            |
|  | 37                  | 6.0          | 50   | 1.7  | 2.2   |            |

### 3.4 結論

回分発酵による偏性嫌気性中温水素発生細菌 HN001 株のデンプンからの水素発生特性を調べた結果、以下のことが明らかになった。

- ・至適温度は 37°C 付近であり、グルコースを基質にした場合の至適温度である 47°C 付近ではデンプンを分解利用して水素発生できないことがデンプン消費量及び菌体濃度から明らかになった。

- ・水素発生速度の至適 pH は 6.5 付近であり、水素発生速度は約  $1.8\text{L-H}_2\text{ L-culture}^{-1}\text{ h}^{-1}$  であった。

- ・水素収量はデンプン濃度が高くなるにつれて低下した。その理由として水素の生成を伴わない乳酸の生成量が増加したためであることが明らかになった。

- ・デンプン濃度が高い場合でも鉄イオンを添加することにより乳酸の生成が抑制され水素収率が向上することがわかった。

- ・HN001 はデンプンから水素発生する他の水素発生細菌と比較して水素発生速度が速いこと、またデンプン濃度が高い条件下でも水素収率が高いことから非常に水素発生能の高いバクテリアであることが判明した。



## 参考文献

- [1] 西山大紀、谷生重晴 中温水素発生細菌による発酵水素生産の研究 第 25 回水素エネルギー協会大会予稿集, 171-174 (2005)
- [2] 西山大紀、谷生重晴 中温水素発生細菌による発酵水素生産の研究 第 24 回水素エネルギー協会大会予稿集, 13-16 (2004)
- [3] Taguchi, F., Chang, J.D., Takiguchi, S., Morimoto, M., Efficient hydrogen production from starch by a bacterium isolated from termites. 73 244-245 J Ferment Bioeng (1992)
- [4] Tanisho, S., Kamiya, N., Wakao, N., Hydrogen evolution of *Enterobacter aerogenes* depending on culture pH: mechanism of hydrogen evolution from NADH by means of membrane-bound hydrogenase. 973, 1-6 Biochim Biophys Acta (1989)
- [5] Pappenheimer, Jr., A.M., Shaskan, E., Effect of iron on carbohydrate metabolism of *Clostridium welchii*. 155, 265-275 J Biol Chem (1944)
- [6] Dabrock, B., Bahl, H., Gottschalk, G., Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*. 58, 1233-1239 Appl Environ Microbiol (1992)
- [7] 東京化学同人：シュライバー無機化学（上）
- [8] Lee, Y.J., Miyahara, T., Noike, T., Effect of iron concentration on hydrogen fermentation. 80 227-231 Bioresource Technol (2001)
- [9] Yang, H., Shen, J., Effect of ferrous iron concentration on anaerobic bio-hydrogen production from soluble starch. 31 2137-2146 Int J Hydrogen Energy (2006)
- [10] Zhang, Y., Liu, G., Shen, J., Hydrogen production in batch culture of mixed bacteria with sucrose under different iron concentration. 30 855-860 Int J Hydrogen Energy (2004)
- [11] Chen, W-M., Tseng, Z-J., Lee, J-S., Chang, J-S., Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. 30 1063-1070 Int J Hydrogen Energy (2005)
- [12] Schönheit, P., Brandis, A., Thauer, R.K., Ferrdoxin degradation in growing *Clostridium pasteurianum* during period of iron deprivation. 120 73-76 Arch Microbiol (1979)
- [13] Junells, A.M., Janati-Idrissi, R., Petitdemange, H., Gay, R., Iron effect of acetone-butanol fermentation. 17 299-303 Curr Microbiol (1988)
- [14] Zhang, T., Liu, H., Fang, H.P., Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition. 69 149-156 J Environ Manage (2003)
- [15] Liu, G., Shen, J., Effects of culture and medium conditions on hydrogen production from starch using anaerobic bacteria. 98, 251-256 J Biosci Bioeng (2004)



- [16] Lee, K-S., Hsu, Y-F., Lo, Y-C., Lin, P-J., Lin, C-Y., Chang, J-S., Exploring optimal environmental factors for fermentative hydrogen production from starch using mixed anaerobic microflora. 33 1565-1572 Int J Hydrogen Energy (2008)
- [17] Lin, C-Y., Chang, C-C., Hung, C-H., Fermentative hydrogen production from starch using natural mixed cultures. 33 2445-2453 Int J Hydrogen Energy (2008)
- [18] Argun, H., Kargi, F., Kapdan, I.K., Oztekin, R., Batch dark fermentation of powdered wheat starch to hydrogen gas: Effect of the initial substrate and biomass concentrations. 33 6109-6115 Int J Hydrogen Energy (2008)

## 第4章

### 連続発酵によるデンプンからの水素発生

## 4.1 目的

第3章において、偏性嫌気性中温水素発生細菌 HN001 株はデンプンを基質にして水素発生できることが明らかになった。実用化を念頭におくと連続的に高速で水素を生産することが望まれる。連続発酵において水素発生速度を増加させるためには、フィード供給速度を高くすることで平均滞留時間 (HRT: Hydraulic Retention Time) を低くすること、発酵槽内の菌体濃度を高くすることなどが挙げられる。そこで、本章ではデンプンを基質にした連続発酵を行い、水素発生に対する HRT の影響を調べることに、また固定化担体として不織布を用いた連続発酵を試みることを目的とした。

## 4.2 実験方法

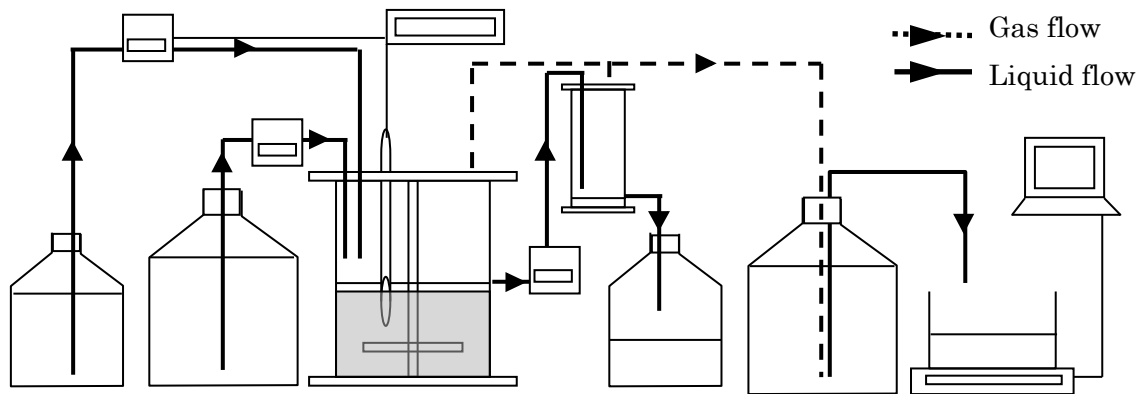
使用した HN001 株は嫌気性菌増菌・継代・保存用 ABCM 半流動培地 (栄研器材株式会社) の高層培地に植え付け、十分に増殖したものを実験に用いた。実験装置の概略を Fig.4.1 に、その写真を Fig.4.2 に示した。実験で発生したガスは 1N の水酸化ナトリウム溶液を用いて水上置換し、押し出された水酸化ナトリウム溶液の重量を水素発生量として測定した。実験条件は発酵槽体積 1000ml、攪拌速度 50rpm、発酵液の pH はコントローラーにより 3N の水酸化ナトリウム水溶液を滴下することで pH 6.0 に保ち、温度は 37°C に保った。フィードはペリスタリックポンプにより発酵槽に供給し、HRT が 9 h、6 h、3 h、1.5h になるよう流量を変化させた。また発酵液の排出はフィード流入量と同量の発酵液を別のペリスタリックポンプを用いて排出した。また固定化担体にはポリエチレン製の不織布を用い、それを発酵槽の内側の壁面を覆うように設置した。

フィードの組成は Table.4.1 に示す。

Table.4.1 フィードの組成

|                   | g L <sup>-1</sup> |
|-------------------|-------------------|
| 可溶性デンプン           | 30.0              |
| カザミノ酸             | 10.0              |
| 粉末酵母エキス-S         | 10.0              |
| L-システイン塩酸塩        | 0.3               |
| チオグリコール酸          | 0.3               |
| FeCl <sub>2</sub> | 0.1               |

有機酸及びアルコールは高速液体クロマトグラフ装置 (ポンプ : HITACHI 655-A、キャリア : 0.1%リン酸水溶液、キャリア流量 : 0.5 ml/min、カラム : 日立化成 GL-C610H-S、検出器 : JASCO RI-2031) で分析した。



1. 1M NaOH 水溶液 2. ペリスタリックポンプ 3. フィードタンク  
 4. pH 電極 5. 発酵槽 6. 気液分離槽 7. 廃液タンク  
 8. ガス捕集タンク (1M NaOH 水溶液) 9. 電子天秤 10. PC

Fig.4.1 実験装置概略図

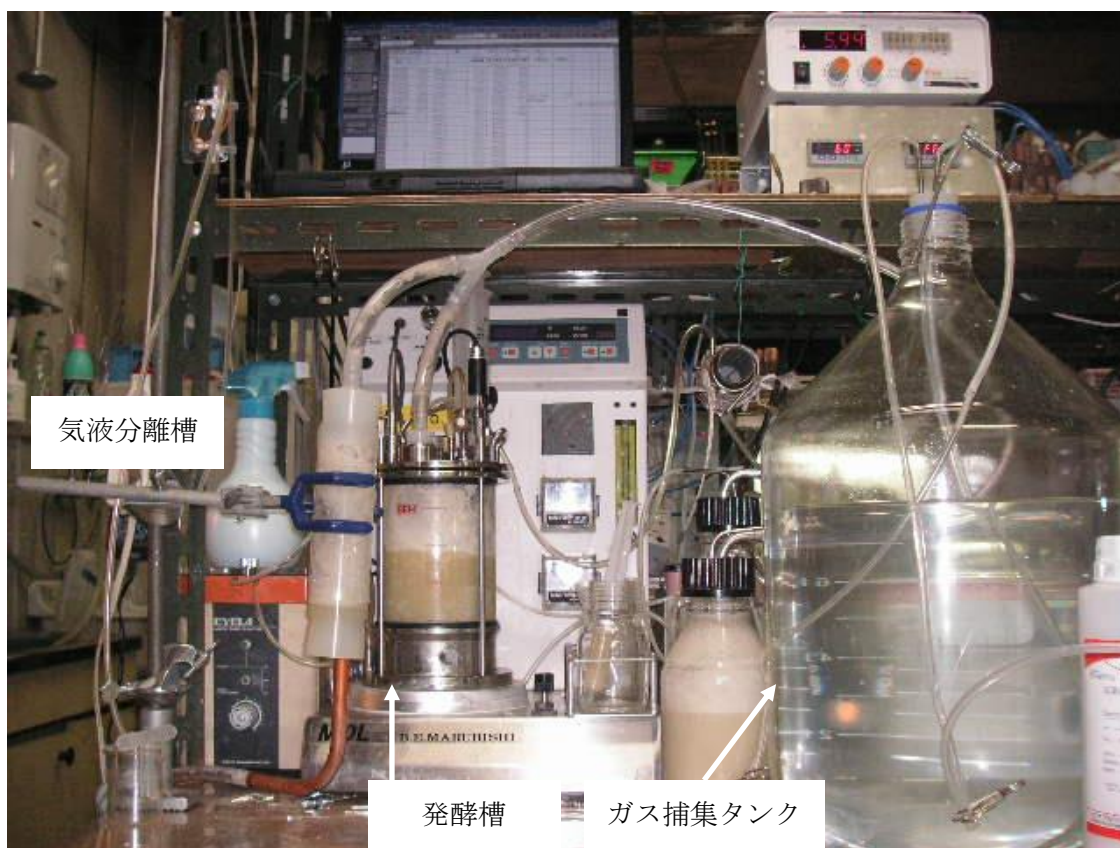


Fig. 4.2 実験装置写真

## 4.3 結果及び考察

### 4.3.1 水素発生に対する HRT の影響

Fig.4.3 に水素発生速度の経時変化を示す。フィード供給速度を段階的に高くすることで HRT を 9 h から 1.5h に低下させると、水素発生速度は段階的に高くなり、どの HRT の場合においても比較的安定していたことがわかる。

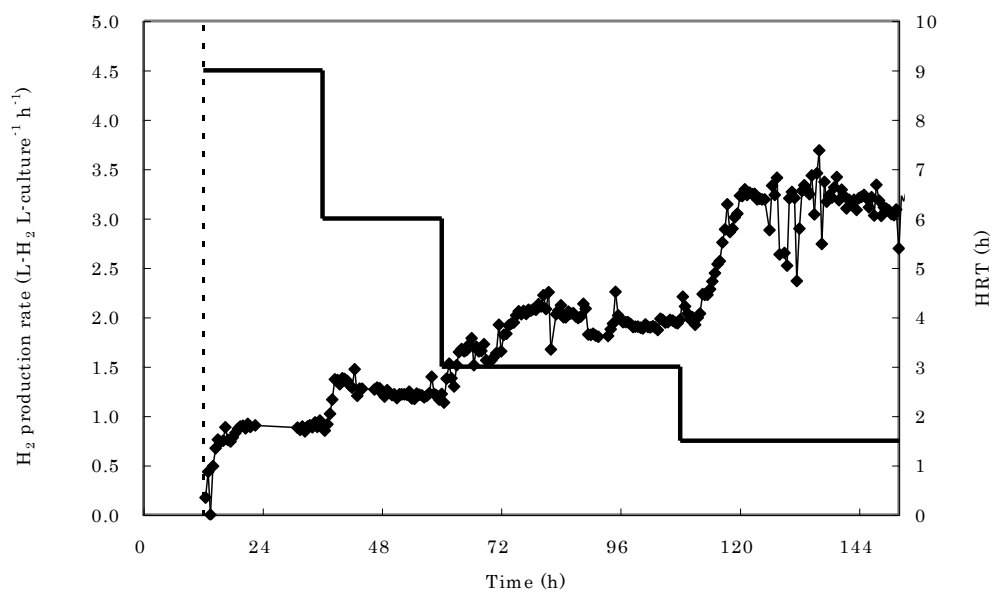
Fig.4.4 に水素発生速度及び水素収率に対する HRT の影響を示す。それぞれの HRT における平均水素発生速度は HRT が 9 h、6 h、3 h、1.5h のとき、それぞれ  $0.9 \text{ L-H}_2 \text{ L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、 $1.2 \text{ L-H}_2 \text{ L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、 $1.9 \text{ L-H}_2 \text{ L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、 $3.2 \text{ L-H}_2 \text{ L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$  であり、HRT が低下するにつれて水素発生速度は高くなった。また水素収率は HRT が 9 h のとき  $2.0 \text{ mol-H}_2 \text{ mol-hexose}^{-1}$ 、6 h のとき  $2.0 \text{ mol-H}_2 \text{ mol-hexose}^{-1}$ 、3h のとき  $1.5 \text{ mol-H}_2 \text{ mol-hexose}^{-1}$ 、1.5h になると  $1.3 \text{ mol-H}_2 \text{ mol-hexose}^{-1}$  になり、HRT の低下とともに水素収率も低下した。

Fig.4.5 に酢酸、酪酸及び乳酸の生成速度に対する HRT の影響を示す。酢酸の生成速度は HRT が 9 h のとき  $4.9 \text{ mmol L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、HRT が 6 h のとき  $7.3 \text{ mmol L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、HRT が 3 h のとき  $12.2 \text{ mmol L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、HRT が 1.5h のとき  $24.7 \text{ mmol L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、酪酸の生成速度は HRT が 9 h のとき  $9.3 \text{ mmol L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、HRT が 6 h のとき  $13.4 \text{ mmol L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、HRT が 3 h のとき  $19.7 \text{ mmol L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、HRT が 1.5h のとき  $46.1 \text{ mmol L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$  であり、HRT の低下とともに生成速度は高くなった。一方、乳酸は HRT が 3 h までは生成速度は  $2 \text{ mmol L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$  であったが、HRT が 1.5h になると  $15.8 \text{ mmol L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$  に増加した。

HRT が低下すると水素収率が低下する報告がある[1-7]。本実験においては、まず乳酸の生成速度の増大が一因として挙げられる。乳酸が生成する際には以下のグルコースからの反応式が示すように水素の生成は伴わないので、乳酸の生成速度の増大が HRT が 1.5h において水素収率が低下した一因であることがわかる。



また酪酸の添加により水素収率が低下した報告がある[8]。同様に、酢酸の添加によっても水素収率が低下することが報告されている[9]。つまり、酪酸及び酢酸の蓄積により乳酸に代謝がシフトしたことが水素収率の低下の一因になったことが示唆される。またギ酸の生成量が HRT が低いほどみられ、ギ酸が分解されなかったために HRT が低い場合に水素収率が低くなったことも考えられる。水素発生速度が高くなったことによる発酵液中の水素分圧の増大が一因であることも考えられる。Yarushalmi らは、*C. acetobutylicum* によるアセトン-ブタノール発酵において水素分圧が高くなることで水素収率が 30%低下したこと



◆ : H<sub>2</sub> production rate, — : HRT

Fig.4.3 連続発酵における水素発生速度の経時変化

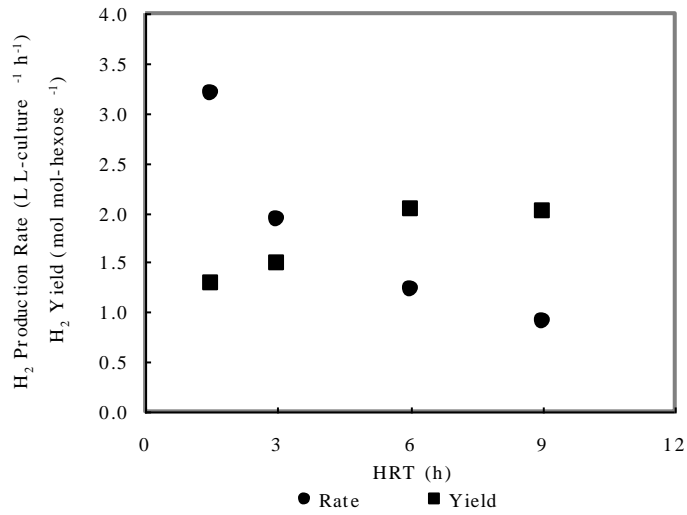


Fig.4.4 水素発生速度及び水素収率に対するHRTの影響

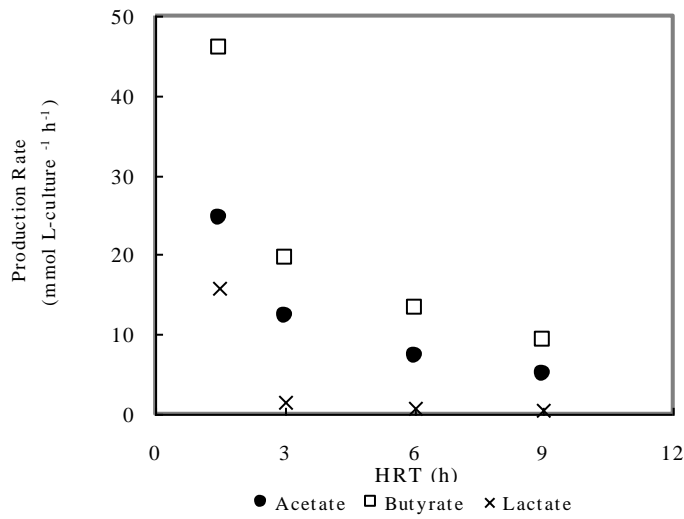


Fig.4.5 酢酸、酪酸、乳酸の生成速度に対するHRTの影響



を報告している[10]。水素発生細菌は解糖系を機能させるため NADH を再酸化する必要がある。水素は酢酸や酪酸が生成する際に NADH が再酸化されることによって発生する。本実験では、HRT が低下したことによって水素発生速度が高くなり水素分圧が高くなったことで、水素生成を伴う酢酸や酪酸は生成されにくくなり、水素の発生を伴わない乳酸が生成されたと考えられる。また酢酸と酪酸の生成の際には ATP が生成されるが、乳酸の生成の際には ATP は生成されない。ところで、HRT が 3 h のとき発酵槽中にフロックがみられた(Fig.4.6)。Van Ginkel らはヒートショックを与えた土を種菌に用いてグルコースを基質に連続発酵を行い、HRT が 10h のときにはフロックが見られなかったが、HRT が 5 h になると形成され水素発生速度が向上したことを報告している[6]。本実験においても HRT が低い状態で水素発生速度が高くなったのはフロックが生成したためであると考えられる。一方で、HRT が低下した状態では菌体が高密度になったことで、菌体増殖の必要性が低くなり ATP の生産性が低い乳酸に代謝がシフトしたと考えることもできる。これらの理由から、水素収率が低下したと考えられる。

#### 4.3.2 固定化担体を用いた連続発酵における水素発生に対する HRT の影響

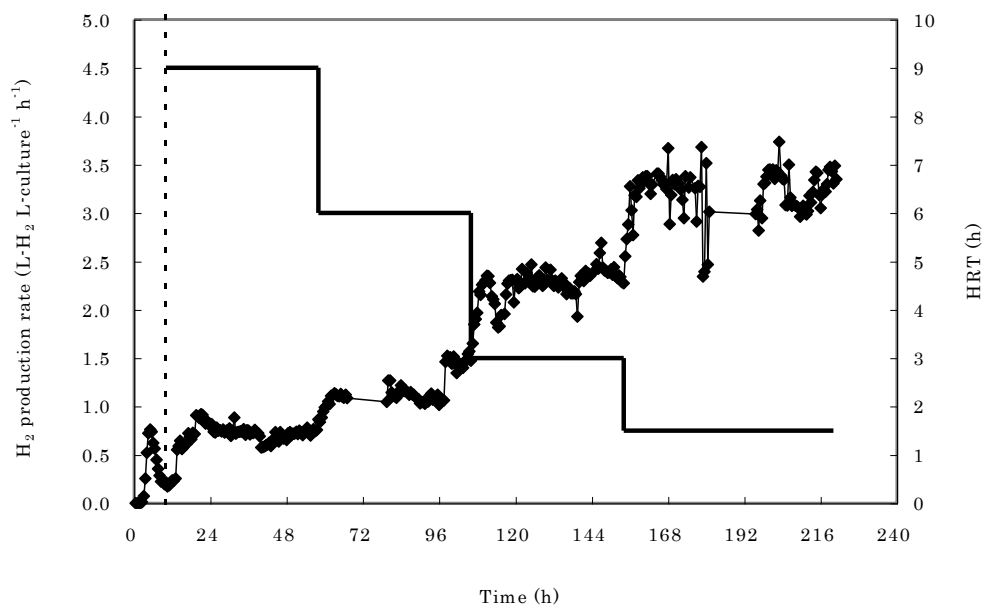
Fig.4.7 に水素発生速度の経時変化を示す。フィード供給速度を段階的に高くすることで HRT を 9 h から 1.5h に低下させると、水素発生速度は段階的に高くなり、どの HRT の場合においても比較的安定していたことがわかる。

Fig.4.8 に水素発生速度及び水素収率に対する HRT の影響を示す。それぞれの HRT における平均水素発生速度は HRT が 9 h から 6 h、3 h、1.5h のとき、それぞれ  $0.8 \text{ L-H}_2 \text{ L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、 $1.1 \text{ L-H}_2 \text{ L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、 $2.3 \text{ L-H}_2 \text{ L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、 $3.4 \text{ L-H}_2 \text{ L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$  であった。水素収率は HRT によらず  $1.8 \text{ mol-H}_2 \text{ mol-hexose}^{-1}$  であった。しかし、添加したデンプンあたりの水素収率は HRT が 9 h のとき  $1.6 \text{ mol-H}_2 \text{ mol-hexose}^{-1}$ 、6 h のとき  $1.6 \text{ mol-H}_2 \text{ mol-hexose}^{-1}$ 、3h のとき  $1.7 \text{ mol-H}_2 \text{ mol-hexose}^{-1}$ 、1.5h になると  $1.2 \text{ mol-H}_2 \text{ mol-hexose}^{-1}$  になり、HRT の低下とともに水素収率も低下した。

Fig.4.9 に酢酸、酪酸及び乳酸の生成速度に対する HRT の影響を示す。酢酸の生成速度は HRT が 9 h のとき  $6.4 \text{ mmol L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、HRT が 6 h のとき  $8.6 \text{ mmol L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、HRT が 3 h のとき  $21.0 \text{ mmol L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、HRT が 1.5h のとき  $34.5 \text{ mmol L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、酪酸の生成速度は HRT が 9 h のとき  $11.8 \text{ mmol L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、HRT が 6 h のとき  $15.7 \text{ mmol L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、HRT が 3 h のとき  $31.5 \text{ mmol L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、HRT が 1.5h のとき  $47.0 \text{ mmol L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$  であり、HRT の低下とともに生成速度は高くなった。一方、乳酸は HRT が 3 h までは生成速度は低かったが、HRT が 1.5h になると  $17.2 \text{ mmol L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$  に増加した。この傾向は固定化担体を用いない場合と同じであった。しかし、固定化担体を用いた場合と用いない場合を比較した場合、用いた場合の方が酢酸、酪酸、乳酸の生成速度が速い。特に酢酸と酪酸の生成速度が速かったため水素発生速度が速かったことが



Fig.4.6 フロックの写真



◆ : H<sub>2</sub> production rate, — : HRT

Fig.4.7 固定化担体を用いた連続発酵における水素発生速度の経時変化

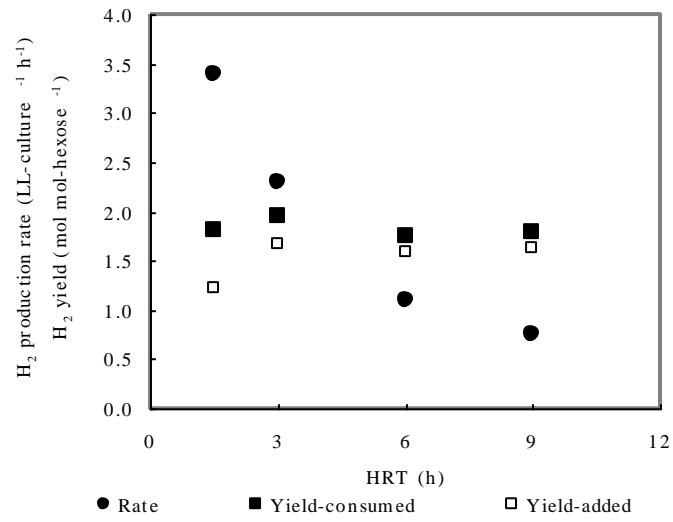


Fig.4.8 固定化担体を用いた連続発酵における水素発生速度及び水素収率に対するHRTの影響

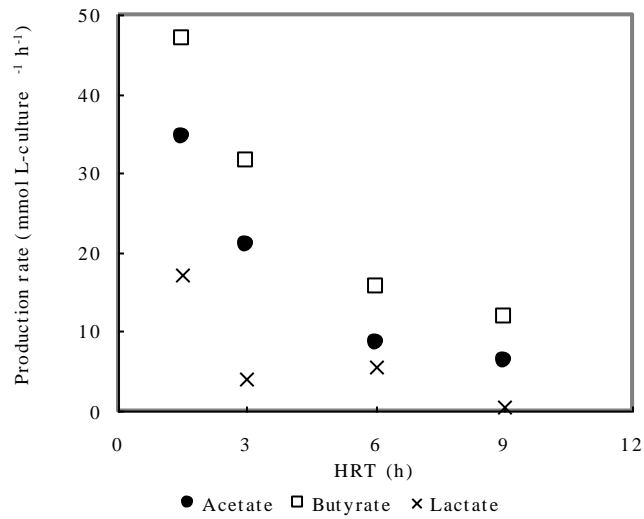


Fig.4.9 固定化担体を用いた連続発酵における酢酸、酪酸及び乳酸の生成速度に対するHRTの影響

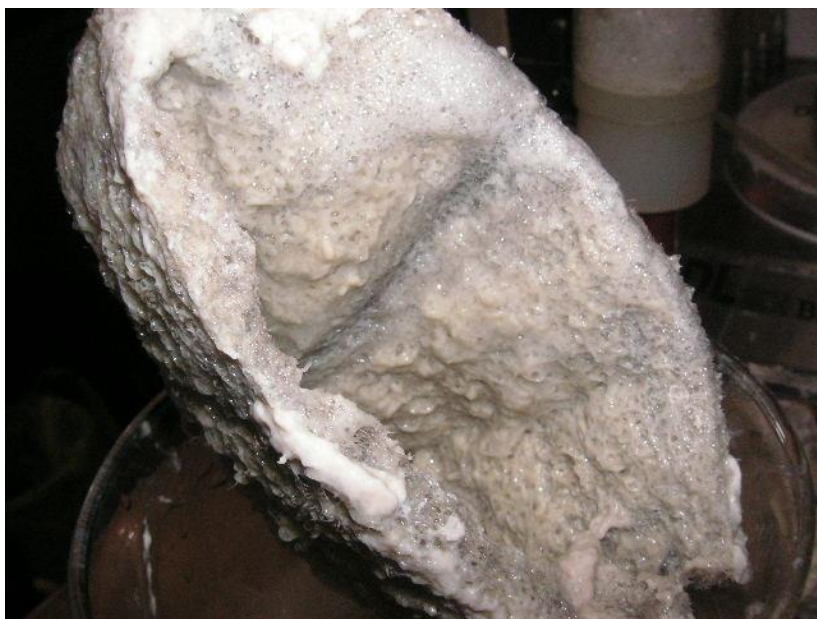


Fig.4.10 担体の写真

わかる。Fig.4.10 に固定化担体として用いた不織布の写真を示す。これより、不織布には白色のフロックを形成したと思われる菌体が付着していることがわかる。つまり、固定化担体を用いたことによって、菌体が発酵槽により留まって高菌密度になったため生成速度が向上したことが示唆される。

Table.4.2 に代謝産物の物質収支を示す。物質収支は HRT が 9 h のとき 91.8 %、6 h のとき 92.3 %、3 h のとき 94.1 %、1.5 h のとき 93.8 %であり、どの HRT の場合においても同様の値であった。また 100 %にならなかったのは、菌体の増殖に基質が利用されたことが一因であると考えられる。

Table.4.2 代謝産物の物質収支

| HRT<br>h | Acetate<br>mM | Butyrate<br>mM | Lactate<br>mM | Ethanol<br>mM | Starch consumption<br>g L <sup>-1</sup> | Recovery<br>% |
|----------|---------------|----------------|---------------|---------------|---|---------------|
| 9        | 57.3          | 105.5          | 3.6           | 5.4           | 27.2                                    | 91.8          |
| 6        | 51.9          | 94.3           | 33.7          | 4.6           | 27.2                                    | 92.3          |
| 3        | 62.8          | 94.6           | 12.1          | 3.6           | 25.6                                    | 94.1          |
| 1.5      | 44.8          | 70.5           | 25.8          | 0.0           | 20.3                                    | 93.8          |

Table.4.3 に連続発酵によるデンプンからの水素発生における水素発生能の文献値の比較を示す。他の文献値と比較して、本実験ではデンプン濃度が高いにもかかわらず得られた水素収率及び水素発生速度は非常に高いことは明らかである。

#### 4.4 結論

連続発酵によるデンプンからの水素発生について実験を行った結果、以下のことが明らかになった。

- ・ フィード供給速度を高くすることにより HRT を低くすると水素発生速度は高くなり、HRT が 1.5h のとき水素発生速度は、 $3.2 \text{ L-H}_2 \text{ L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$  であった。また HRT が高いほど水素収率は高くなる傾向があることがわかった。
- ・ 固定化担体として不織布を用いた結果、不織布がない場合と比較して水素発生速度及び有機酸生成速度が高かった。これより水素発酵において菌体を高密度で保持する固定化担体の有用性が示唆された。
- ・ 本実験で得られた水素発生速度は、報告されているデンプンからの連続水素発酵における水素発生速度より高く、水素発酵技術の実用化に近づいたと言える。

Table.4.3 連続発酵によるデンプンからの水素発酵に関する報告

| organism                         | temperature<br>(°C) | pH  | starch concentration<br>(g L <sup>-1</sup> ) | HRT<br>(h) | H <sub>2</sub> yield<br>(mol-H <sub>2</sub> , mol-hexose <sup>-1</sup> ) | H <sub>2</sub> production rate<br>(L-H <sub>2</sub> , L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) | reference  |
|----------------------------------|---------------------|-----|--|------------|--|---|------------|
| Anaerobically digested<br>sludge | 37                  | 5.2 | -  | 17         | -  | 0.056   | [11]       |
| Anaerobically digested<br>sludge | 35                  | 5.2 | 10   | 15         | 1.9  | 0.112   | [12]       |
| Sewage sludge                    | 35                  | 5.5 | 20 g-COD L <sup>-1</sup>                     | 4          | 1.5  | 0.42  | [13]       |
| HN001                            | 37                  | 6.0 | 30   | 3          | 1.9  | 2.3   | This study |
|                                  |                     |     |  | 1.5        | 1.8  | 3.4   |            |

## 参考文献

- [1] Lin, C-Y., Lee, C-Y., Tseng, I-C., Shiao, I.Z., Biohydrogen production from sucrose using base-enriched anaerobic mixed microflora. 41, 915-919 *Process Biochemistry* (2006)
- [2] Lin, C-N., Wu, S-Y., Chang, J-S., Fermentative hydrogen production with a draft tube fluidized bed reactor containing silicone-gel-immobilized anaerobic sludge. 31, 2200-2210 *Int J Hydrogen Energy* (2006)
- [3] Lee, K-S., Lin, P-J., Fangchiang, K., Chang, J-S., Continuous hydrogen production by anaerobic mixed microflora using a hollow-fiber microfiltration membrane bioreactor. 32, 950-957 *Int J Hydrogen Energy* (2007)
- [4] Chang, J-J., Wu, J-H., Wen, F-S., Hung, K-Y., Chen, Y-T., Hsiao, C-L., Lin, C-Y., Huang, C-C., Molecular monitoring of microbes in a continuous hydrogen-producing system with different hydraulic retention time. 33, 1579-1585 *Int J Hydrogen Energy* (2008)
- [5] Chen, S-D., Lee, K-S., Lo, Y-C., Chen, W-M., Wu, J-F., Lin, C-Y., Chang, J-S., Batch and continuous biohydrogen production from starch hydrolysate by *Clostridium* species. 33, 1803-1812 *Int J Hydrogen Energy* (2008)
- [6] Van Ginkel, S.W., Logan, B., Increased biological hydrogen production with reduced organic loading. 39, 3819-3826 *Water Research* (2005)
- [7] Yu, H., Zhu, Z., Hu, W., Zhang, H., Hydrogen production from rice winery wastewater in an upflow anaerobic reactor by using mixed anaerobic cultures. 27, 1359-1365 *Int J Hydrogen Energy* (2002)
- [8] Zheng, X-J., Yu, H-Q., Inhibitory effects of butyrate on biological hydrogen production with mixed anaerobic cultures. 74, 65-70 *J Environ Manage* (2005)
- [9] Wang, Y., Zhao, Q-B., Mu, Y., Yu, H-Q., Harada, H., Li, Y-Y., Biohydrogen production with mixed anaerobic cultures in the presence of high-concentration acetate. 33, 1164-1171 *Int J Hydrogen Energy* (2008)
- [10] Yerushalmi, L., Volesky, B., Szczeny, T., Effect of increased hydrogen partial pressure on the acetone-butanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum*. 22, 103-107 *Appl Microbiol Biotechnol* (1985)
- [11] Lay, J-J., Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen. 68, 269-278 *Biotechnol Bioeng* (2000)
- [12] Hussy, I., Hawkes, F.R., Disdale, R., Hawkes, D.L., Continuous fermentative hydrogen production from a wheat starch co-product by mixed microflora. 84, 619-626 *Biotechnol Bioeng* (2003)



- [13] Lin, C-Y., Chang, C-C., Hung, C-H., Fermentative hydrogen production from starch using natural mixed cultures. 33, 2445-2453 Int J hydrogen Energy (2008)

## 第5章

### 食品廃棄物からの水素発生

## 5.1 目的

第3章及び第4章より、デンプンから効果的に水素を生産できることが確認された。これより食品加工工場からのデンプンを含む排液やうどん等の茹で汁を基質として利用できることが示唆された。しかし、水素発酵技術の実用化に向けて、固形物を含む食品廃棄物などの廃棄物系バイオマスや農作物非食部などの未利用バイオマスを基質として用いた場合においてどの程度水素を生産することができるかを知る必要がある。そこで、本章では擬似生ごみを用いて、水素発生に対する魚のはらわたの添加効果、C/N比の影響、擬似生ごみ添加量の影響について調べ、また得られた実験結果から水素発酵技術の導入の検討を行い、有望なバイオマスのひとつである食品廃棄物からの水素発生ポテンシャルを知ることがを目的とした。

## 5.2 実験方法

使用した HN001 株は嫌気性菌増菌・継代・保存用 ABCM 半流動培地（栄研器材株式会社）の高層培地に植え付け、十分に増殖したものを実験に用いた。実験装置は第3章で行った実験と同じ装置を用いた。実験で発生したガスは 1N の水酸化ナトリウム溶液を用いて水上置換し、押し出された水酸化ナトリウム溶液の重量を水素発生量として測定した。実験条件は発酵槽体積 860ml、発酵液体積 500ml、攪拌速度 200rpm、発酵液の pH はコントローラーにより 1N の水酸化ナトリウム水溶液を滴下することで pH 6.0 に保ち、温度も PID 制御法により 37°C に設定した。

Table 5.1 に実験に用いた擬似生ごみの組成、Fig. 5.1 にそれらの写真を示す。これらを量りとり水道水で希釈し、ミキサーにかけたものを擬似生ごみ培地とした。

Table 5.1 擬似生ごみの組成

|                         | g-wet L <sup>-1</sup> |
|-------------------------|-----------------------|
| 五目飯                     | 100 <sup>*1</sup>     |
| ミックスベジタブル <sup>*2</sup> | 100 <sup>*1</sup>     |
| 魚のはらわた                  | 0-100                 |

※ 1 擬似生ごみ添加量の影響を調べる際は添加量を変えている

※ 2 トウモロコシ、ニンジン、グリーンピースを含む

擬似生ごみの元素分析は元素分析装置（Elementar, Vario III）により測定した。有機酸及びアルコールは高速液体クロマトグラフ装置（ポンプ：HITACHI 655-A、キャリア：0.1%リン酸水溶液、キャリア流量：0.5 ml/min、カラム：日立化成 GL-C610H-S、検出器：



Fig. 5.1 擬似生ごみサンプルの写真

HITACHI RI655A-30) で分析した。また発酵液中の鉄濃度は原子吸光分光光度計 (HITACHI AA- 660) により測定した。

### 5.3 結果及び考察

#### 5.3.1 擬似生ごみの元素分析

Table5.2 に各擬似生ごみサンプルの N、C、H の比率及び C/N 比を示す。

Table.5.1 Elemental composition of food waste

|                   | C N H |       |       | C/N   |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|
|                   | %     |       |       |       |
| Japanese pilaf    | 42.23 | 1.324 | 6.912 | 31.90 |
| corn              | 44.21 | 2.278 | 7.108 | 19.41 |
| vegetables carrot | 38.55 | 1.013 | 6.651 | 38.06 |
| green pea         | 42.26 | 3.818 | 6.871 | 11.07 |
| entrails          | 49.91 | 6.760 | 8.106 | 7.382 |

五目飯とミックスベジタブルにおける炭素の比率はニンジンが最小で 38.6%からトウモロコシが最大で 44.2%、窒素の比率はニンジンが最小で 1.0%、グリーンピースが最大で 3.8%、水素の比率はニンジンが最小で 6.5%からトウモロコシが最大で 7.1%であった。また C/N 比には大きな違いがみられ、五目飯は C/N=31.9、ニンジンは C/N=38.1 と C/N 比は高かったが、トウモロコシは C/N=19.4、グリーンピースは C/N=11.1 であり五目飯、ニンジンに比べ低かった。また魚のはらわたは窒素含有率が 6.8%と高く、C/N 比も他の食品サンプルと比較して非常に低いことがわかる。これにより魚のはらわたが窒素源として有効である可能性が高いことが示唆された。

#### 5.3.2 回分発酵による擬似生ごみからの水素発生

##### 5.3.2.1 水素発生に対する魚のはらわた添加の影響

Fig.5.2 に擬似生ごみからの水素発生の経時変化を示す。魚のはらわたを加えなかったときには質重量 1kg の擬似生ごみあたり 22L の水素を発生した。一方、擬似生ごみ 100 g に対してはらわたを 25 g 加えた方の積算水素発生量は 66L-H<sub>2</sub> kg-wet<sup>-1</sup> と増加した。また最大水素発生速度は、はらわたを加えなかったときには 0.3L-H<sub>2</sub> L-culture<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>、加えると 1.0L-H<sub>2</sub> L-culture<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> であった。これらより、魚のはらわたを加えると積算水素発生量及

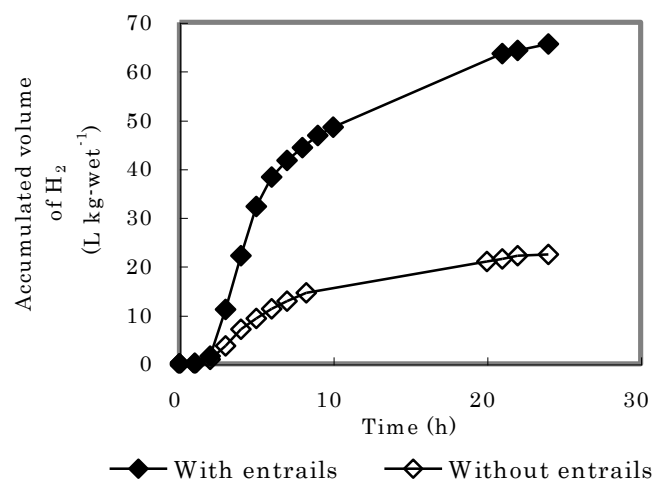


Fig.5.2 擬似生ごみからの水素発生の経時変化

び最大水素発生速度が増加することがわかった。

### 5.3.2.2 C/N 比の影響

Fig.5.3 に最大水素生産速度に対する C/N 比の影響を示す。最大水素生産速度は C/N=23 のとき  $0.3 \text{ L L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$  であった。しかし、魚のはらわたを擬似生ごみに添加することにより C/N を低くすると、最大水素生産速度は C/N =20 のとき  $1.0 \text{ L-H}_2 \text{ L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、C/N =14 のとき  $0.8 \text{ L-H}_2 \text{ L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、C/N=11 及び 9 のとき  $1.2 \text{ L-H}_2 \text{ L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$  であり改善された。しかし、C/N 比が減少しても最大水素発生速度に大きな違いはみられなかった。Fig.5.4 に水素収量に対する C/N 比の影響を示す。水素収量は C/N =23 のとき  $22.4 \text{ L-H}_2 \text{ kg-wet}^{-1}$ 、C/N =20 のとき  $67.0 \text{ L-H}_2 \text{ kg-wet}^{-1}$ 、C/N =14 のとき  $61.7 \text{ L-H}_2 \text{ kg-wet}^{-1}$ 、C/N =11 のとき  $65.3 \text{ L-H}_2 \text{ kg-wet}^{-1}$ 、C/N=9 のとき  $75.5 \text{ L-H}_2 \text{ kg-wet}^{-1}$  であった。ただし、水素収量は白米とミックスベジタブル 1 kg あたりであり、魚のはらわたの添加量は加味されていない。これより擬似生ごみに魚のはらわたを添加し C/N 比が低くなることで水素収量が向上したことがわかる。Fig.5.5 に有機酸生成に対する C/N 比の影響を示す。酢酸及び酪酸は C/N=23 のときそれぞれ 37 mM、26 mM であり、C/N 比が低くなるとそれぞれ 60 mM 程度まで向上した。一方、乳酸は C/N=23 のとき 103 mM であり生成量は多かったが C/N=20 になると 6 mM まで急激に低下した。そして C/N が減少しても乳酸生成量は低く保たれていた。以下に一般的な水素生産菌のグルコースからの酢酸、酪酸及び乳酸の総括反応式を示す。



グルコース 1 mol から酢酸 2 mol が生成される場合、理論的に最大の水素収率である  $4 \text{ mol-H}_2 \text{ mol-glucose}^{-1}$  になる。またグルコースから酪酸が生成される場合は  $2 \text{ mol-H}_2 \text{ mol-glucose}^{-1}$  になる。しかし、乳酸が生成されるとき水素は生成されない。Lin らはスクロースを基質として C/N 比を 40 から 130 までの 4 段階にしてその影響を調べ、C/N=47 において水素収率が  $4.8 \text{ mol-H}_2 \text{ mol-sucrose}^{-1}$  に向上し、C/N 比は水素発酵に影響を及ぼすことを報告している[1]。これらより、水素発生能が改善された一因は C/N 比が低くなったことで水素生成を伴う酢酸及び酪酸に代謝がシフトしたためであると考えられる。食品成分表によるとあゆの内臓は湿重量 100 g 中に水分が 68.6 g、たんぱく質が 9.5 g、脂質が 17.5 g、炭水化物が 0.3 g、灰分が 0.7 g であった[2]。これより、本実験で用いた魚のはらわたに

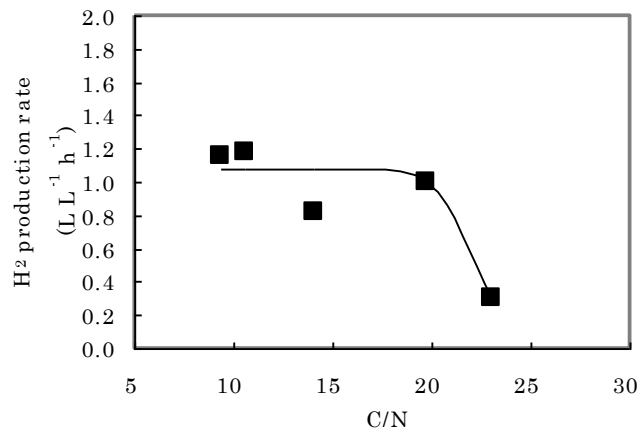


Fig.5.3 水素発生速度に対するC/Nの影響

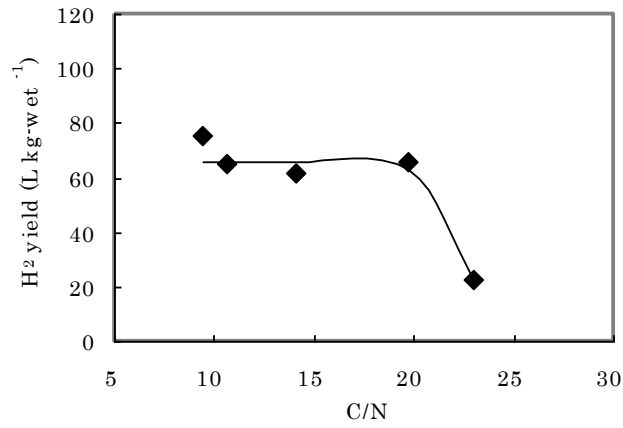


Fig.5.4 水素収率に対するC/Nの影響

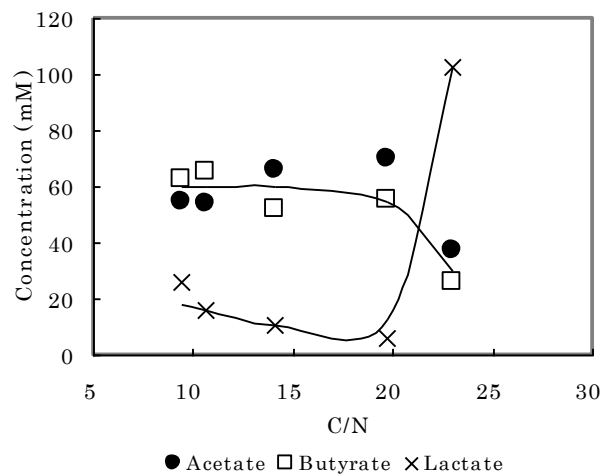


Fig.5.5 酢酸、酪酸、乳酸の生成量に対するC/Nの影響



は有機性の窒素が多く含まれていたことが示唆される。また中村は、各種厨芥類の元素組成比率を分析した結果、種類別でみると植物性厨芥では  $C/N=22.6$ 、動物性厨芥では  $C/N=10.5$ 、排出源別でみると家庭系厨芥では  $C/N=18.8$ 、事業系厨芥では  $C/N=13.9$  であったことを報告している[3]。したがって、本実験において  $C/N=20$  以下では水素発生速度及び水素収量が向上したことより、実際に廃棄される食品廃棄物からも高い水素収量が得られる可能性が大きいことが示唆された。

### 5.3.2.3 鉄イオンの影響

Fig.5.6 に栄養源を変えた場合における水素発生速度の比較を示す。擬似生ごみ（白米とミックスベジタブルのみ）と擬似生ごみに  $FeCl_3$  を添加した場合、水素発生速度はそれぞれ  $0.3 L-H_2 L-culture^{-1} h^{-1}$ 、 $0.2 L-H_2 L-culture^{-1} h^{-1}$  であった。擬似生ごみに窒素源及び栄養源としてカザミノ酸と酵母エキスを加えた場合、またそれらに  $FeCl_3$  を加えた場合はそれぞれ  $1.2 L-H_2 L-culture^{-1} h^{-1}$ 、 $1.4 L-H_2 L-culture^{-1} h^{-1}$  であった。魚のはらわたを添加した場合は  $1.2 L-H_2 L-culture^{-1} h^{-1}$  であり、カザミノ酸と酵母エキスを加えた場合と同程度であった。水素発生速度は菌体量に比例するので魚のはらわたがカザミノ酸及び酵母エキスと同等の菌体増殖のための栄養源になることがわかった。

Fig.5.7 に栄養源を変えた場合における水素収量の比較を示す。擬似生ごみ（白米とミックスベジタブルのみ）と擬似生ごみに  $FeCl_3$  を添加した場合、水素発生速度はそれぞれ  $22.4 L-H_2 kg-wet^{-1}$ 、 $30.9 L-H_2 kg-wet^{-1}$  であった。擬似生ごみに窒素源及び栄養源としてカザミノ酸と酵母エキスを加えた場合、またそれらに  $FeCl_3$  を加えた場合はそれぞれ  $55.1 L-H_2 kg-wet^{-1}$ 、 $70.8 L-H_2 kg-wet^{-1}$  であった。魚のはらわたを添加した場合は  $67.0 L-H_2 kg-wet^{-1}$  であり、カザミノ酸、酵母エキス、 $FeCl_3$  を加えた場合と同程度であった。

また原子吸光分光光度計により擬似生ごみ培地中の鉄濃度を分析した結果、魚のはらわたを添加しない場合には鉄は検出されなかったが魚のはらわたを添加した場合は  $47 \mu M$  検出された。水素発生細菌による水素発生には第2章の水素発生のメカニズムで述べたように、フェレドキシンやヒドロゲナーゼが関与している。Schönheit らは *Clostridium pasteurianum* を用いて培地中の鉄濃度が  $10 \mu M$  以下であるとフェレドキシン合成が抑制されることを報告した (Fig.5.8) [4]。また Junells らは *Clostridium acetobutylicum* のヒドロゲナーゼの比活性が培地中の鉄濃度が  $0.2 mg L^{-1}$  の制限下では 40%低下することを報告している (Fig.5.9) [5]。したがって、はらわたを添加することによって水素収量が多くなった理由のひとつとして、魚のはらわたが含有している鉄分が水素発生に関与するフェレドキシンやヒドロゲナーゼに影響したことが考えられる。

Wang らは窒素源として酵母エキス、ペプトン、尿素、リン酸アンモニウム、硝酸カリウム、硝酸アンモニウムを比較した結果、酵母エキスが最も菌体増殖が高く、積算水素発生量も多かったことを報告している[6]。したがって、本実験において酵母エキスを添加した

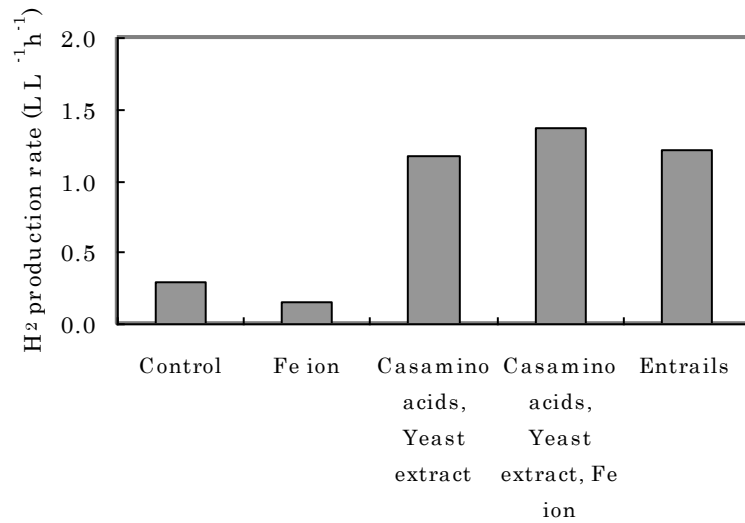


Fig.5.6 Comparison of H<sub>2</sub> production rate

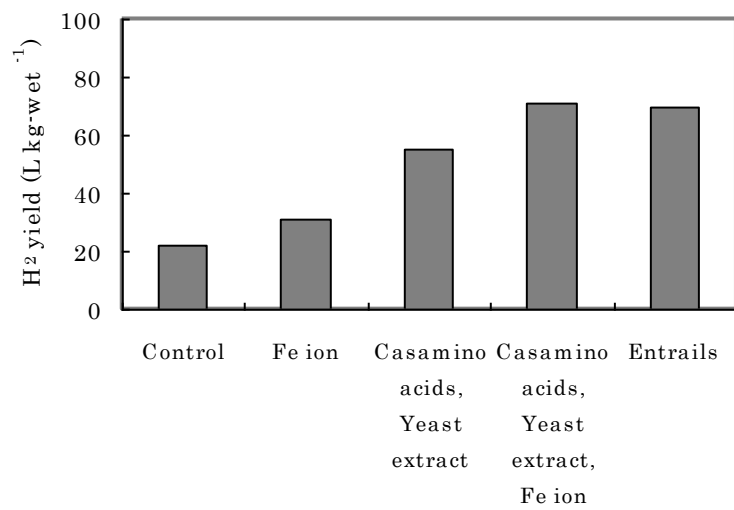


Fig.5.7 Comparison of H<sub>2</sub> yield

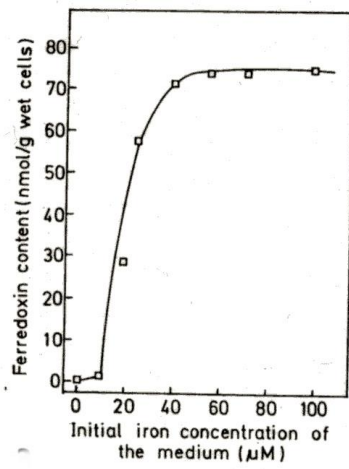
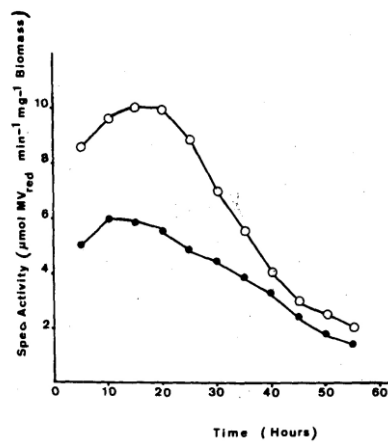


Fig.5.8 *C.pasteurianum* のフェレドキシン合成における鉄濃度の影響 [3]



○, control; ●, iron limitation

Fig.5.9 *C.acetobutylicum* のヒドロゲナーゼ合成における鉄制限の影響 [4]

場合と魚のはらわたを添加した場合の水素発生が同様であったことから、魚のはらわたが窒素源または栄養源として有効であることがわかった。

#### 5.3.2.4 擬似生ごみ添加量の影響

Fig.5.10 に水素発生速度に対する基質濃度の影響を示す。水素発生速度は基質濃度が 100 g-wet L<sup>-1</sup> のとき 0.8 L-H<sub>2</sub> L-culture<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>、200 g-wet L<sup>-1</sup> のとき 1.1 L-H<sub>2</sub> L-culture<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>、300 g-wet L<sup>-1</sup> のとき 1.3 L-H<sub>2</sub> L-culture<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> であり、基質濃度が高くなるにつれて上昇した。しかし基質濃度が 500 g-wet L<sup>-1</sup> になると水素発生速度は 1.2 L-H<sub>2</sub> L-culture<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> であった。Fig.5.11 に水素収量に対する基質濃度の影響を示す。水素収量は基質濃度が 100 g-wet L<sup>-1</sup> のとき 59.1 L-H<sub>2</sub> kg-wet<sup>-1</sup>、200 g-wet L<sup>-1</sup> のとき 59.6 L-H<sub>2</sub> kg-wet<sup>-1</sup>、300 g-wet L<sup>-1</sup> のとき 57.6 L-H<sub>2</sub> kg-wet<sup>-1</sup> であり、基質濃度に関係なくほぼ一定であった。しかし基質濃度が 500 g-wet L<sup>-1</sup> になると水素収量は 42.9 L-H<sub>2</sub> kg-wet<sup>-1</sup> になり低下した。Fig.5.12 に有機酸生成に対する基質濃度の影響を示す。酢酸は基質濃度が 100 g-wet L<sup>-1</sup> から 300 g-wet L<sup>-1</sup> までは基質濃度が高くなるにつれて生成量が増加し、300 g-wet L<sup>-1</sup> のとき 143 mM であった。しかし、500 g-wet L<sup>-1</sup> になると 136 mM になり 300 g-wet L<sup>-1</sup> のときのそれと同程度であった。酪酸は基質濃度の上昇とともに生成量も増加した。乳酸生成量はどの基質濃度においても酢酸及び酪酸と比較して少なかった。高木らは水素発生細菌群による水素発酵における固形物濃度の影響を調べ、非水溶性デンプンを基質にした場合において固形物濃度が 32%以上では水素生成活性が低くなること、またセルロースの割合が高くなることによっても水素生成活性が低くなることを報告している[7]。水野らはおからを基質にして水素発生に対する固形物濃度の影響を調べ、積算水素発生量に対しては固形物の影響はみられなかったが、水素生成活性は固形物濃度が 9.2%になると低下したことを報告した[8]。Shinらは生ごみからの水素発酵における VS 濃度の影響を調べ、VS 濃度が 6 g L<sup>-1</sup> において水素収率は 1.8 mol-H<sub>2</sub> mol-hexose<sup>-1</sup> で最大になり、VS 濃度が 8 g L<sup>-1</sup> 以上では水素収率が低下したことを報告した[9]。本実験においても、300 g-wet L<sup>-1</sup> 程度までであれば水素収量は低下しなかった。しかし 500 g-wet L<sup>-1</sup> になると水素生成活性は低下したのは、擬似生ごみにはセルロースが含まれているので発酵液中の固形物濃度が増加したことが一因であると考えられる。

#### 5.3.3 繰り返し回分発酵による擬似生ごみからの水素発生

Fig.5.13 に繰り返し回分式による擬似生ごみからの水素発生の経時変化を示す。各回の積算水素発生量にはばらつきがあるが、平均 71L-H<sub>2</sub> kg-wet<sup>-1</sup> であった。これは水素収率 2.3mol mol-glucose<sup>-1</sup> に相当する。Yokoi らは *Enterobacter aerogenes* HO-39 と *Clostridium butyricum* IFO13949 の混合培養でサツマイモ残渣から繰り返し回分式で水

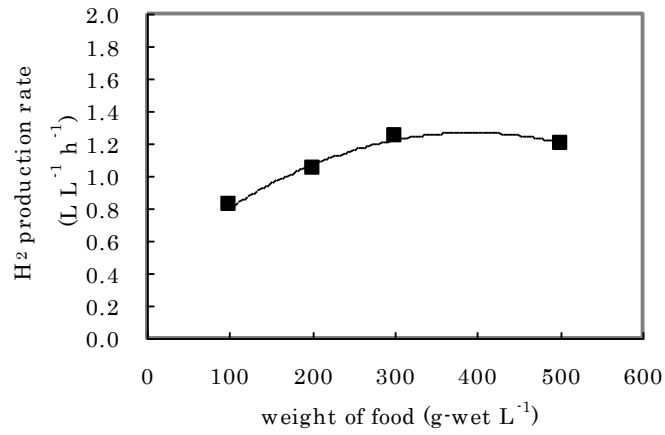


Fig.5.10 水素発生速度に対する  
疑似生ごみ添加量の影響

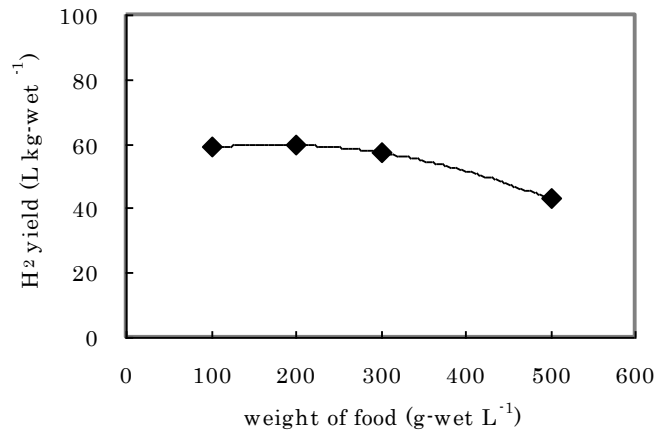


Fig.5.11 水素収量に対する  
疑似生ごみ添加量の影響

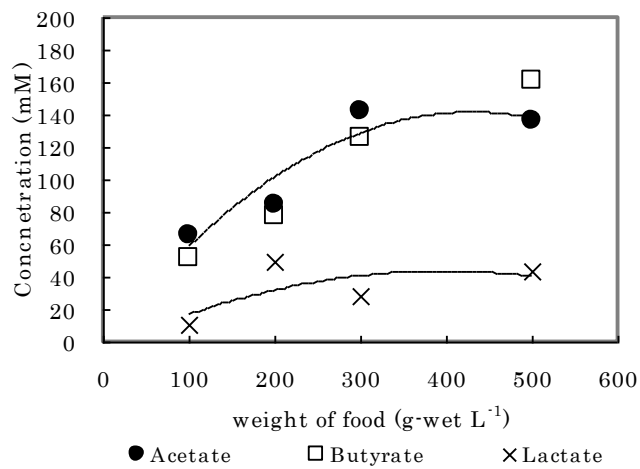


Fig.5.12 酢酸、酪酸、乳酸の生成量に対する  
疑似生ごみ添加量の影響

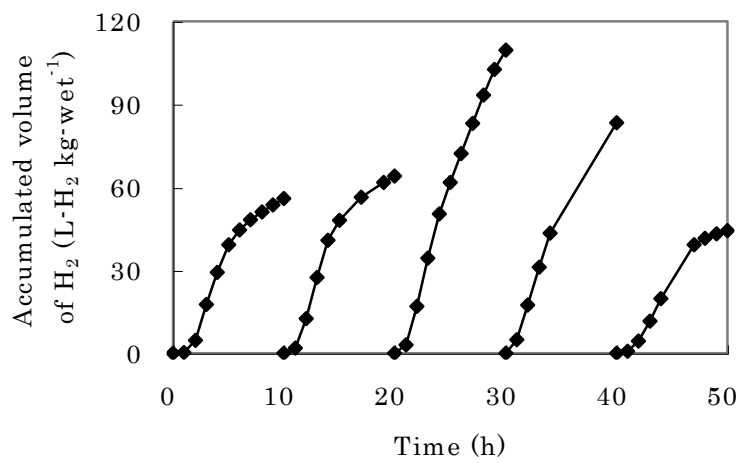


Fig.5.13 半回分式での擬似生ごみからの水素発生の経時変化

素発生を行い、 $2.7\text{mol}\cdot\text{H}_2\text{ mol}\cdot\text{glucose}^{-1}$ の水素収率を得たことを報告している[10]。また Atif らは POME を基質にして繰り返し回分発酵を行い、24 時間おきにフィードを供給した場合は水素収量が POME1L あたり 2382 ml、水素発生速度は  $313\text{ ml}\cdot\text{H}_2\text{ L}\cdot\text{POME}^{-1}\text{ h}^{-1}$ 、8 時間おきにフィードを供給した場合のそれらはそれぞれ 2419 ml、 $436\text{ ml}\cdot\text{H}_2\text{ L}\cdot\text{POME}^{-1}\text{ h}^{-1}$  で、フィードの供給時間間隔を短くした方が効率よく水素を生産したことを報告している[11]。

## 5.5 結論

擬似生ごみからの水素発生について実験を行った結果、以下のことが明らかになった。

- ・ 擬似生ごみ 1 kg あたりから 60 L 以上の水素を生成することができた。
- ・ C/N=20 以下では水素発生能が向上したことから C/N 比は水素発酵に大きく影響を及ぼすことが明らかになった。
- ・ また水素発酵において魚のはらわたは窒素源としてだけでなく、鉄分も含んでいることよりミネラル源としても有用であることがわかった。
- ・ 本実験で用いた擬似生ごみの C/N 比と実際に廃棄される食品廃棄物のそれは同程度であり、実際に廃棄される食品廃棄物も水素発酵に適した基質になることが示唆された。

## 参考文献

- [1] Lin, C.Y., Lay, C.H., Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. 29, 41-45 Int J Hydrogen Energy (2004)
- [2] 五訂食品成分表 2002 女子栄養大学出版部
- [3] 中村一夫 厨芥類を中心とする今後のごみ処理システムの方向性について 22, 44-48 エネルギー・資源 (2001)
- [4] Schönheit, P., Brandis, A., Thauer, R.K., Ferrdoxin degradation in growing *Clostridium pasteurianum* during period of iron deprivation. 120 73-76 Arch Microbiol (1979)
- [5] Junells, A.M., Janati-Idrissi, R., Petitdemange, H., Gay, R., Iron effect of acetone-butanol fermentation. 17 299-303 Curr Microbiol (1988)
- [6] Wang X., Jin, B., Mulcahy, D., Impact of carbon and nitrogen sources on hydrogen production by a newly isolated *Clostridium butyricum* W5. 33, 4998-5005 Int J Hydrogen Energy (2008)
- [7] 高木啓行、宮原高志、我妻貞男、野池達也 嫌気性細菌を用いた水素生成に及ぼす固形物濃度の影響 No.484, 26-32 工業用水 (1999)
- [8] 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 No.573/VII-4, 111-118 土木学会論文集 (1997)
- [9] Shin, H-S., Youn, J-H., Kim, S-H., Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis 29, 1355-1363 Int J Hydrogen Energy (2004)
- [10] Yokoi, H., Maki, R., Hirose, J., Hayashi, S., Microbial Production of Hydrogen from Starch-Manufacturing Wastes. 22, 389-395 Biomass and Bioenergy (2002)
- [11] Atif, AAY., Fakhru'l-Razi, A., Ngan, M.A., Morimoto, M., Iyuke, S.E., Veziroglu, N.T., Fed batch production of hydrogen from palm oil mill effluent using anaerobic microflora. 30, 1393-1397 Int J Hydrogen Energy (2005)



## 第 6 章

### 結言

## 6.1 水素発酵技術の導入可能性の検討

水素発酵技術の導入を念頭において、日本における食品廃棄物からの水素生産可能量の試算、水素発酵技術の CO<sub>2</sub> 排出削減効果及び経済性、バイオエタノールとの比較をすることで導入可能性を検討した。

食品廃棄物からの水素生産可能量を以下の Table.6.1 に示す条件で見積もった。

Table.6.1 食品廃棄物からの水素発生可能量試算のための算出条件

|                           |              |
|---------------------------|--------------|
| 日本における食品廃棄物発生量            | 2,000 万 t/年  |
| 本研究の実験により得られた擬似生ごみからの水素収量 | 60 L/kg      |
| 水素の発熱量                    | 286 kJ/mol   |
| ガソリンの発熱量                  | 34.6 MJ/L    |
| 日本における自動車用ガソリンの使用量(販売量)   | 6,053 万 kL/年 |

日本における食品廃棄物を 2,000 万 t としてそのすべてを水素発酵により水素を生産したとしてその水素発生可能量は、

$$2,000 \text{ 万 t/年} \times 60 \text{ L/kg} = 12 \text{ 億 m}^3/\text{年}$$

となる。これを石油換算すると、

$$12 \text{ 億 m}^3/\text{年} \times 286 \text{ kJ/mol} / 34.6 \text{ MJ/L} = 44 \text{ 万 kL/年}$$

となる。これが自動車用ガソリンのどれだけに相当するか換算すると、

$$44 \text{ 万 kL/年} / 6,053 \text{ 万 kL/年} \times 100 = 0.7\%$$

に相当する。

水素発酵技術を導入することで CO<sub>2</sub> 排出削減効果はあるのだろうか。ここでは水素発酵の後処理としてメタン発酵を組み込むことを想定する。酒井らは、家庭由来の厨芥の利用・処理方法として、直接焼却、堆肥化、メタン発酵によるメタンでガスエンジン発電し残渣は焼却、メタン発酵によるメタンをガス改質し燃料電池に利用し残渣は焼却という 4 つのシナリオを設定しそれらを評価するためのケーススタディを行った結果、メタン発酵によるメタンをガス改質し燃料電池に利用し残渣は焼却が CO<sub>2</sub> 排出量が最も少なく、次いでメタン発酵によるメタンでガスエンジン発電し残渣は焼却、直接焼却、堆肥化の順となったことを報告した[1]。(ここでは、評価対象はごみの収集から最終処分までとされ、システム

の運用段階のみが対象とされており施設の建設段階は対象外とされている。) メタン発酵を水素・メタン二段発酵にすることでエネルギー回収率がメタン発酵単独より 10%向上する[2]と仮定すると、水素発酵の後処理としてメタン発酵を導入すれば CO<sub>2</sub> 排出削減に寄与するだけでなく、エネルギー回収率も向上する。

しかし、CO<sub>2</sub> 排出削減効果はあっても経済性に見合わなければ社会への水素発酵技術の導入はできない。したがって、水素発酵技術に限らず新しい技術を導入する上で、経済性の検討は必要不可欠である。一般的にプラント建設費は規模が大きくなるほど建設単価は下がり、経済性で有利になる。メタン発酵を例にすると生ごみ処理量 3 t/日の場合、建設費の補助率が 50%では事業期間では黒字にはなるが初期投資を回収することはできないが、広範囲からの食品廃棄物の収集による規模拡大、廃棄物処理単価の上昇、運転維持費及びメンテナンス費の低減による事業採算性改善のための工夫があれば初期投資を回収できると試算されている[3]。また水素の供給価格は 2020 年までに 50~60 円/Nm<sup>3</sup> 程度、2030 年までに 50 円/Nm<sup>3</sup> 以下とされており、これをクリアするようなコストで水素を生産する必要がある。

次に、生産された水素を自動車用バイオ燃料として利用することを念頭におくとバイオエタノールとの競合が挙げられる。水素は燃料電池に用いられ、一方エタノールは内燃機関に用いられるので住み分けができると思われるが、これらを比較することは非常に重要である。Table.6.2 に水素は燃料電池、エタノールは内燃機関の自動車用燃料として用いた

Table.6.2 バイオ水素とバイオエタノールのエネルギー変換効率算出のための条件

|                | Heat Value<br>[kJ/mol] | Yield<br>[mol/mol-hexose] | Loss | Energy Efficiency |
|----------------|------------------------|---------------------------|------|-------------------|
| Glucose        | 2817                   |                           |      |                   |
| H <sub>2</sub> | 286                    | 2                         | 0.1  | 0.6               |
| Ethanol        | 1371                   | 1.8                       | 0.5  | 0.3               |

場合のエネルギー変換効率を算出する条件を示す。水素またはエタノールの理論最大収率はそれぞれ 4 mol-H<sub>2</sub> mol-hexose<sup>-1</sup>、2 mol-H<sub>2</sub> mol-hexose<sup>-1</sup>であるがここでは現状で得られている値を用いた。またそれらを回収する際のエネルギーの損失として、水素では圧縮に係る損失、エタノールでは蒸留に係る損失を想定した。

水素の最終的なエネルギー変換効率は、

$$286 \text{ kJ/mol} \times 2 \text{ mol/mol-hexose} / 2817 \text{ kJ/mol} \times (1 - 0.1) \times 0.6 = 0.11$$

エタノールの最終的なエネルギー変換効率は、

$$1371 \text{ kJ/mol} \times 2 \text{ mol/mol-hexose} / 2817 \text{ kJ/mol} \times (1 - 0.5) \times 0.3 = 0.13$$

となり、若干ではあるがエタノールのエネルギー変換効率が低い。また Fig.6.1 に燃料電池のエネルギー変換効率を3段階にして算出されたバイオ水素とバイオエタノールのエネルギー変換効率の比較を示す。これより、燃料電池のエネルギー変換効率が40%のときは水素収率  $3.6 \text{ mol mol-hexose}^{-1}$  以上、60%のときは  $2.4 \text{ mol-H}_2 \text{ mol-hexose}^{-1}$  以上、80%のときは  $1.8 \text{ mol mol-hexose}^{-1}$  以上で最終的なエネルギー変換効率は水素がエタノールに勝ることになる。水素収率や燃料電池のエネルギー変換効率が向上すれば水素がより有利になる。

## 6.2 結論

本研究における実験結果から以下のことが明らかになった。

第3章では、偏性嫌気性中温水素発生細菌 HN001 株を用いて回分発酵によるデンプンからの水素発生特性を調べた。発酵温度が  $37^\circ\text{C}$  付近に水素発生の高い活性があることが判明した。また水素発生速度は pH 6.5 付近で最も速くなることがわかった。水素収率はデンプン濃度が低いほど高く、デンプン濃度が高くなるにつれて乳酸の生成量が増加し水素収量は低下した。しかし、デンプン濃度が高い条件下において鉄イオンを添加することで水素収率を改善することができた。本実験で用いた HN001 株はデンプンから水素発生する他の水素発生細菌と比較して水素発生速度が速いこと、またデンプン濃度が高い条件下でも水素収率が高いことから、非常に水素発生能の高い水素発生細菌であることが判明した。

第4章では、連続発酵によるデンプンからの水素発生について実験を行った。水素発生速度は HRT が低くなるにつれて高くなり、HRT が 1.5 h のとき  $3.2 \text{ L-H}_2 \text{ L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$  の高い水素発生速度を達成した。一方、水素収率は HRT が低くなるにつれて低下する傾向がみられた。また固定化担体に不織布を用いることにより、水素発生速度が不織布を用いない場合と比較して向上した。本実験で得られた水素発生速度は、報告されているデンプンからの連続水素発酵における水素発生速度より高く、本研究から水素発酵技術の実用化に近づいたと言える。

第5章では、食品廃棄物からの水素発生について実験を行い、C/N 比が水素発酵に影響を及ぼすことがわかった。また水素発酵において魚のはらわたは窒素源としてだけではなく、鉄分も含んでいることよりミネラル源としても有用であることが示唆された。

また水素発酵技術の導入について食品廃棄物からの水素生産可能量、CO<sub>2</sub> 削減効果、経済性、バイオエタノールとの比較の点から検討した結果、日本で発生する食品廃棄物からの水素生産可能量は日本における自動車用ガソリン使用量の 0.7 %程度になることが試算された。また経済性には現段階では問題点があるものの、CO<sub>2</sub> 削減効果は直接焼却や堆肥化よりも高いことがわかった。バイオエタノールとの比較では水素を燃料電池に用いるこ

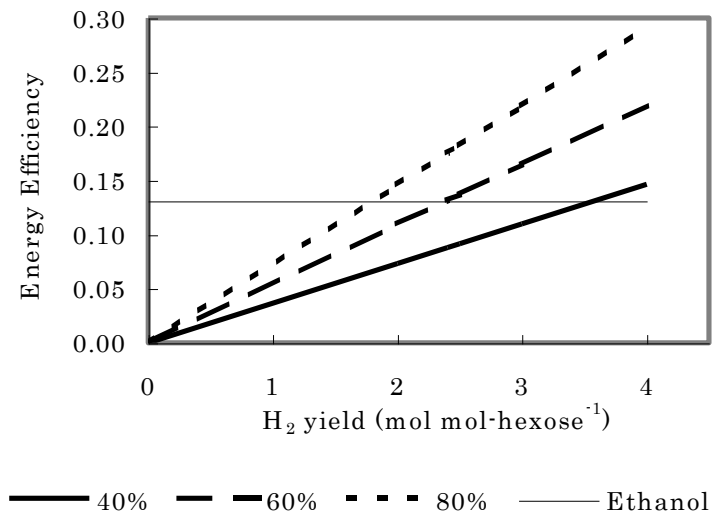


Fig.5.14 バイオ水素とバイオエタノールのエネルギー変換効率の比較

とでバイオエタノールより最終的なエネルギー変換効率が高くなる可能性が示唆された。これらのことから水素発酵技術の導入効果が高いことがわかった。

以上のことより、ラボスケールで効果的に水素を生産することができたので、本研究が水素発酵技術の実用化に向けた一歩になったと言える。

### 6.3 今後の展望

水素発酵技術の実用化に向けて以下の課題に取り組む必要がある。

スケールアップして安定的に水素を生産でき、廃液の処理・利用まで考慮したトータルシステムによる実証規模の試験を行う。またその結果から、ライフサイクルアセスメント (LCA: Life Cycle Assessment) や経済性の評価を行う必要がある。

理論的に最大の水素収率である  $4 \text{ mol-H}_2 \text{ mol-hexose}^{-1}$  に近づくよう、有望な水素発生細菌のスクリーニング、また水素発生細菌の遺伝子改良を行う。また水素発生速度をより高めるため高菌密度で発酵を行うことができるようなシステムを開発する。

セルロースを基質として利用することは必須であるため、セルロースの効果的な分解法を検討する。

## 参考文献

- [1] 酒井伸一、平井康宏、川本克也、稲森悠平 バイオ資源・廃棄物の賦存量分布と水素利用システム No.133 11-18 環境研究 (2004)
- [2] 世界初、生ごみから水素とメタンを高速回収できる新システム 産総研ホームページ  
[http://www.aist.go.jp/aist\\_j/press\\_release/pr2004/pr20040714/pr20040714.html](http://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2004/pr20040714/pr20040714.html)
- [3] バイオマスエネルギー導入ガイドブック (第2版) NEDO (2005)

## 本研究に関連した論文及び発表

### 査読付き論文

- 1) 安田圭吾、谷生重晴 「発酵によるデンプン質生ゴミからの水素生産」 水素エネルギーシステム、vol.31, No.1, 33-37 (2006)
- 2) 安田圭吾、谷生重晴 「食品廃棄物の水素発酵における C/N 比及び基質濃度の影響」 水素エネルギーシステム、投稿中

### 国際会議での発表

- 1) Yasuda, K. Tanisho, S “Fermentative Hydrogen Production from Synthetic Food Wastes” 8<sup>th</sup> Asian Hydrogen Energy Conference, Beijing, China, May 26-27 2005
- 2) Yasuda, K. Tanisho, S “Fermentative Hydrogen Production from Artificial Food Wastes” 16<sup>th</sup> World Hydrogen Energy Conference, Lyon, France, June 13-16 2006
- 3) Yasuda, K. Tanisho, S “Hydrogen Fermentation from Food Wastes by Mesophilic bacterium HN001” 9<sup>th</sup> Asian Hydrogen Energy Conference, Tokyo, February 5-6 2007
- 4) Yasuda, K. Tanisho, S “Fermentative Hydrogen Production from Food Wastes by the Strain HN001” 15<sup>th</sup> European Biomass Conference, Berlin, Germany, May 7-11 2007
- 5) Yasuda, K. Tanisho, S “Effect of Ferrous Chloride on Hydrogen Production from Starch by the Strain HN001” The 2007 Asian Bio-Hydrogen Symposium, Daejeon, Korea, November 9-11 2007
- 6) Yasuda, K. Tanisho, S “Continuous Hydrogen Production by Fermentation Using Nonwoven Fabric as an Immobilized Supporter of Cells” World Bioenergy 2008 Conference, Jönköping, Sweden, May 27-29 2008

### 国内学会等での発表

- 1) 安田圭吾、谷生重晴 「生ゴミからの発酵水素生産」 第 24 回水素エネルギー協会大会、埼玉、2004 年 12 月 10-11 日



- 2) 安田圭吾、谷生重晴 「生ゴミからの効果的発酵水素生産」 第 25 回水素エネルギー協会大会、東京、2005 年 12 月 14-15 日
- 3) 安田圭吾、谷生重晴 「発酵による生ゴミからの高速水素生産」 第 2 回国際水素・燃料電池展 大学・国公立研究所による研究成果発表フォーラム、東京、2006 年 1 月 25-27 日
- 4) 安田圭吾、谷生重晴 「嫌気性発酵による生ゴミからの水素生産」 平成 18 年度神奈川県産学公交流研究発表会、海老名、2006 年 10 月 18-20 日
- 5) 安田圭吾、谷生重晴 「中温水素発生細菌による厨芥からの水素発酵」 第 26 回水素エネルギー協会大会、東京、2006 年 12 月 14-15 日
- 6) 安田圭吾、谷生重晴 「発酵によるデンプンからの水素生産」 平成 19 年度神奈川県ものづくり技術交流会、海老名、2007 年 10 月 24-26 日
- 7) 安田圭吾、谷生重晴 「発酵によるデンプンからの水素生産における鉄イオンの影響」 第 27 回水素エネルギー協会大会、東京、2007 年 12 月 6-7 日

#### 受賞歴

- 1) 平成 19 年度神奈川県ものづくり技術交流会にてポスター賞

## 謝辞

本論文は横浜国立大学大学院環境情報学府に入学して以来の5年間の研究成果をまとめたものです。研究を進めるにあたりご指導とご助言を頂きました横浜国立大学教育人間科学部谷生重晴教授に心より感謝申し上げます。横浜国立大学教育人間科学部地球環境課程3年次に谷生研究室に所属して以来、谷生教授の水素に対する情熱に感化され、日夜研究に取り組むことができました。また海外で研究発表する機会も与えて頂き、見聞を広めることができました。

本論文の審査にあたっては、横浜国立大学中村栄子教授、菊池知彦教授、横山幸男准教授、大谷裕之准教授、松本真哉准教授にご助言を頂きました。ここにお礼申し上げます。

研究の遂行にあたっては、谷生研究室の諸先輩方、学生の皆様に協力と励ましを頂いたこと、心より感謝致します。

機器分析においては、元素分析では横浜国立大学機器分析評価センターにて、原子吸光法による鉄の分析では横浜国立大学教育人間科学部中村栄子教授に分析装置をお借りして分析することができました。ここにお礼申し上げます。

また短期留学先のイギリス Glamorgan 大学 Sustainable Environment Research Centre(SERC)では、研究を進めるにあたって、また博士論文の執筆にあたって大きなヒントを得ることができました。Prof. Richard Dinsdale、博士課程の学生 Mr. Des Devlin、その他 SERC の先生方、研究員の皆様に深く感謝致します。

その他、常日頃から支えてくださった数多くの方々にお礼申し上げます。

また末筆ながら、5年間研究ができたのは両親のお陰だと思っております。ここに深い感謝の意を表します。