

平成 15 年度、16 年度及び 17 年度

「水素安全利用基盤技術開発

- 水素に関する共通基盤技術開発 」

## 水素発酵菌による水素製造の研究 成果報告書

平成 18 年 4 月 19 日

横浜国立大学

産業技術総合研究所

バブコック日立株式会社

本報告は、 部、 部及び 部から成る。 部・ 部・ 部は、それぞれ平成 15 年度、16 年度及び平成 17 年度の成果をまとめたものである。

部では既存の結果に対する進捗を、 部では手段を変更し水素生産能力がさらに増大したことを、 部では新たに発見した菌株の成果主としてプロジェクト全体をまとめた。

目 次

1. はじめに
2. プロジェクトの目的
3. スケジュール
4. 研究開発体制
5. 実施内容及び結果
  - 5.1 システムの構成
  - 5.2 試験結果
    - 5.2.1 優良株選別
    - 5.2.2 発酵基礎試験装置の概要
    - 5.2.3 金属イオン添加の影響
    - 5.2.4 廃糖蜜を使用する連続水素生産
    - 5.2.5 水素生産装置のための知見
6. 南西諸島の製糖会社調査
7. 経済性試算
8. まとめ
9. 今後の課題

文 献

補足資料

## 要 旨

まず、優良株の選定を実施した。WO<sub>3</sub>を青変する変異菌株を評価し、好気状態でも水素を発生する可能性株を選出した。

次に、合成培地を用いる水素発酵試験を行い、水素生成速度に及ぼす各種金属イオンの影響を調べた。その結果、Fe<sup>3+</sup>を添加することで水素生成速度が増大する顕著な効果を見出した。この際に、菌体濃度の上昇や代謝産物の顕著な変化が伴うことが分かったが、基本的メカニズムの解明は今後の課題である。

実際の廃糖蜜を用いる水素発酵試験を行い、Fe<sup>3+</sup>を添加することでこれまでの実績の2倍以上の水素生成速度が得られた。これにより、本プロジェクトの目的が達成できた。尚、菌は凝集させるよりも適度に分散させたほうが水素生産には有利である。

上記試験を通じて、連続水素生産を安定に実施するために不可欠なノウハウを得ることが出来た。

南西諸島の製糖会社・工場三箇所を訪問し、各種ヒヤリング調査を行い、水素生産システムの普及に関するフィージビリティ・スタディも実施し、見通しと課題を明らかにした。

## Abstract

First, we selected feasible mutants, which made WO<sub>3</sub> blue-coloured under aerobic condition.

Next, we conducted the hydrogen fermentation experiments using artificial culture medium. We investigated the effects of some kinds of metal-ion on the rates of hydrogen production. As a result, we found that hydrogen production rates increase extremely by adding Fe<sup>3+</sup> ions. On occurring the behavior mentioned above, we found that the density of bacterium and the metabolism materials change simultaneously.

We conducted the hydrogen fermentation experiments for actual waste-molasses. From the systematic experiments, we obtained that 2-times hydrogen production rates by adding Fe<sup>3+</sup> ions compared with the previous data. We achieved the goal of our project. Furthermore, we clarified that bacteria became more active under the moderate dispersed condition than under the condensed condition. Through these basic experiments, we obtained the useful know-how concerning to stable hydrogen production.

We visited the three sugar companies in the Nansei Islands, and got the important information about use of waste-molasses. On the basis of the information, we carried out the feasibility studies on hydrogen production plants.

## 1. はじめに

現在、固体高分子形燃料電池及びそのシステムの技術開発促進の観点から、電池システムの燃料である水素の貯留方法の検討及び触媒等を用いて各種燃料を水素に変換する等の技術開発が、国内外において実用化に向け進められている。本提案においては、1) 環境適合性及び安全性の高い(環境共生型)水素発生装置の開発、2) 菌体による水素発生及び水素収率の高効率化を進め、信頼性の高い水素発生装置の実用化を目的とするものである。

本研究開発は、「水素に関する共通基盤技術開発」を対象として「発酵菌による水素製造の研究」を行うこととする。

本研究では、従来よりも高効率の発酵式水素製造技術を開発し、システムを実証することを目的とする。

本研究において、最も注力するのは、水素生産能力を高める発酵方式に見通しをつけることである。これまでの水素発酵方式では、水素の生産速度、収率及び対象と出来る原料に限界があった。本研究では、

水素生産性の向上を図るために前処理法及び高濃度培養法を確立する。

菌体の基礎的スクリーニングを行って適正な高温菌を選定し、水素生産性を2倍以上に向上させる。

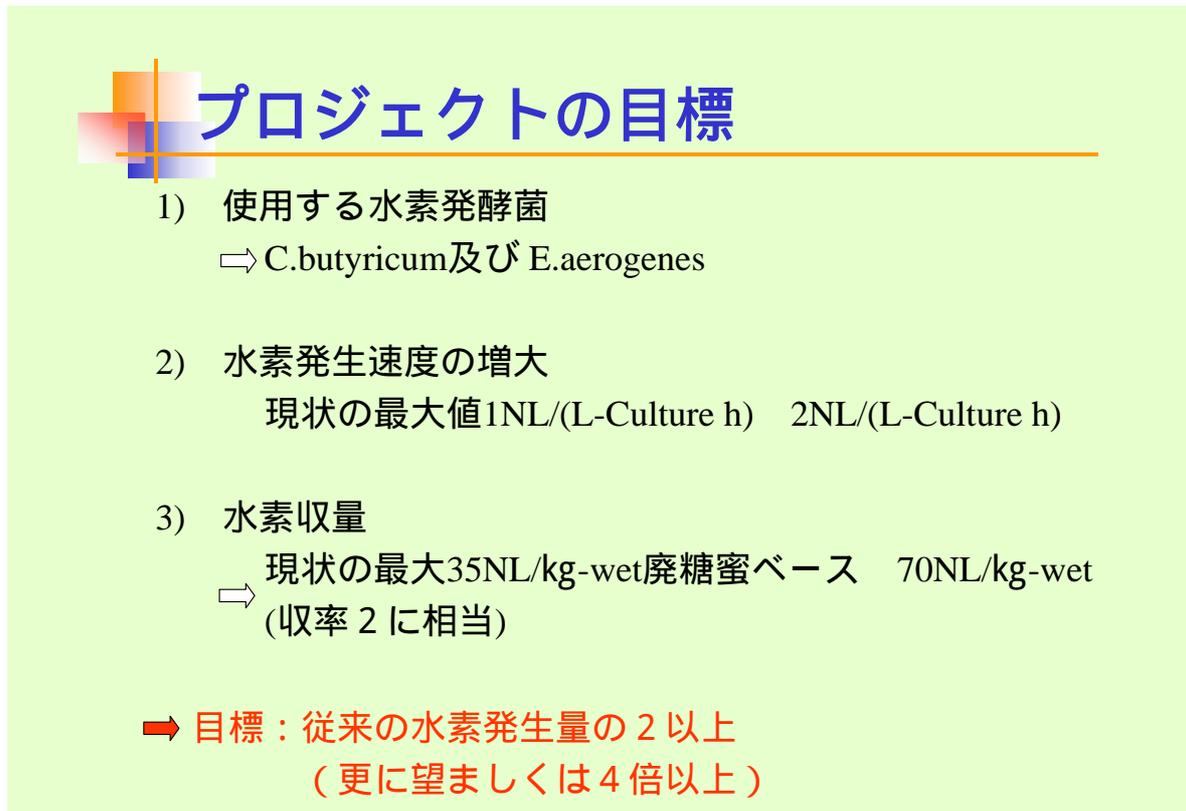
を行う。

上記試験の過程より、連続水素生産装置の設計に資する有用な情報を入手する。

さらに、将来の事業化の観点から、南西諸島の製糖会社・工場を訪問し、市場調査と経済性試算も実施する。

## 2. プロジェクトの目的

本研究プロジェクトの目標は、実機設計のためのエンジニアリング内容を除けば、発酵による水素生産能力を従来よりも大幅に向上させることにある。図1にそれらのポイントをまとめた。



The diagram is a light green rectangular box containing the title 'プロジェクトの目標' (Project Goals) in blue text, preceded by a decorative graphic of overlapping colored squares. Below the title are three numbered points in black text, each with a sub-point indicated by a right-pointing arrow. A final summary point is highlighted in red text with a red arrow pointing to it.

### プロジェクトの目標

- 1) 使用する水素発酵菌  
⇒ C.butyricum及び E.aerogenes
- 2) 水素発生速度の増大  
現状の最大値1NL/(L-Culture h) 2NL/(L-Culture h)
- 3) 水素収量  
⇒ 現状の最大35NL/kg-wet廃糖蜜ベース 70NL/kg-wet (収率2に相当)

⇒ **目標：従来の水素発生量の2以上  
(更に望ましくは4倍以上)**

図1 水素生産能力向上に関する目標

まず使用する発酵菌については、C.butyricumとE.aerogenesの使用をベースとする。水素発生速度については、1Lの培地・1時間当りで1L(Normal)の水素を作り出すのが現状の最高レベルであるが、これをさらに2倍に高めることを目標とする。水素の収量に関しては、wet廃糖蜜を対象とした場合、1kg(wet廃糖蜜)当りの現状最高値35L(Normal)を倍増することが本研究のターゲットである。

図中に赤字で記したが、纏めると、本プロジェクトにおいて目指すのは、従来方式に比べて水産生産量を2倍以上に、さらに望ましくは4倍以上(速度2倍×収量2倍=トータル4倍となる)にすることである。

### 3. スケジュール

平成 15 年度における本プロジェクトの工程を図 2 に示す。

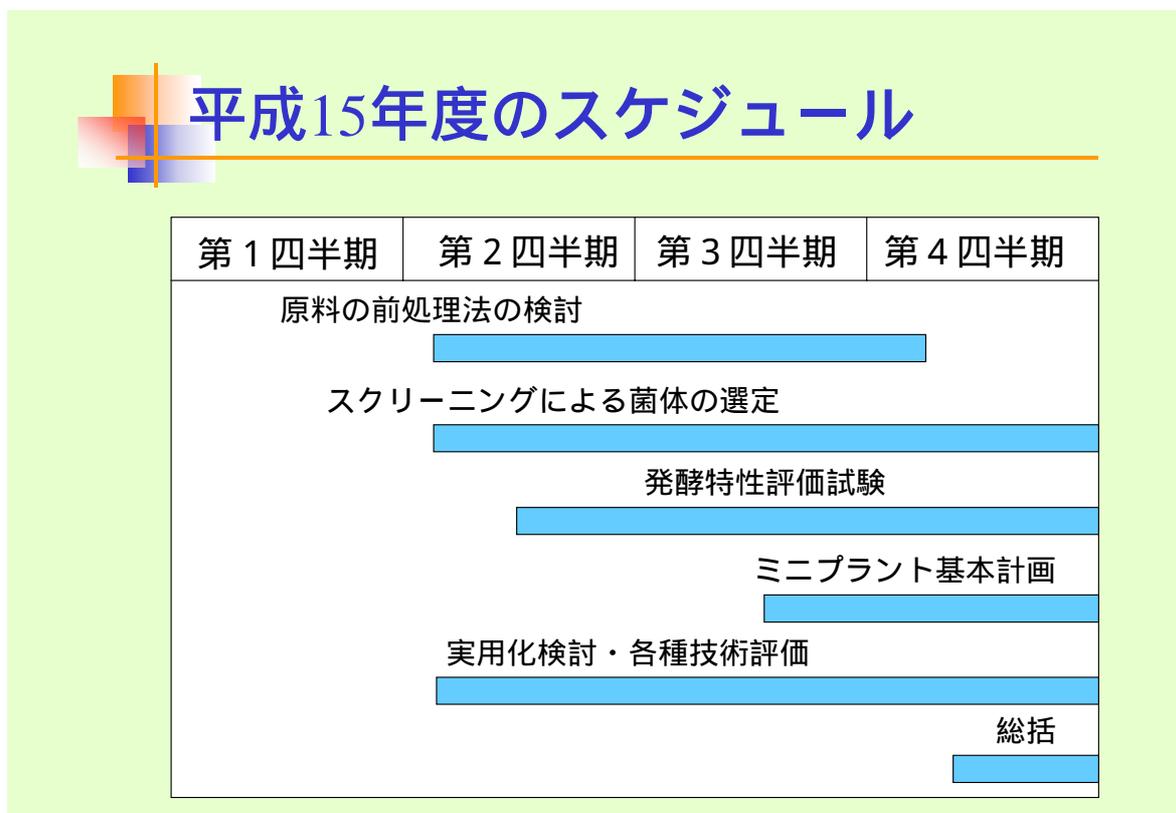


図 2 本プロジェクトの実施工程

まず第 2 四半期において、原料の前処理法と菌体選定スクリーニングに着手した。原料の前処理法については、主対象原料である廃糖蜜の滅菌処理有・無の違いについて、予備試験的に調べた。一方、対象原料の拡大を意図して、大手食品製油会社より入手した大豆の絞り粕(いわゆるオカラ)及び大手製紙会社より入手した製紙スラッジの前処理法を試みたが、芳しい結果が得られなかったため、本報告には成果としては記載しない。

菌体スクリーニングの結果については 5.2.1 に述べる。

本プロジェクトにおいて最も注力したのは、基礎試験装置を用いて実施した発酵特性評価であり、第 2 四半期中途から開始した。この結果は 5.2.2 で報告する。

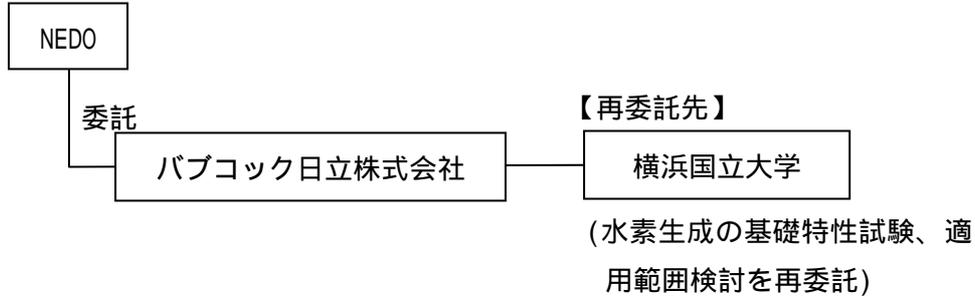
以上のテーマを並行して、ミニプラント(次年度以降)の構想計画や各種の調査・評価を実施した。本プロジェクトの成果が実機(商用機)となった場合を想定し、有力な「顧客」候補となるであろう沖縄の製糖会社(うち二箇所は工場)を訪問し、供試材としての廃糖蜜を入手するとともに、廃糖蜜の現状や処分法やその問題、さらに水素製造装置の導入の可能性についても意見交換を行った。

#### 4. 研究開発体制

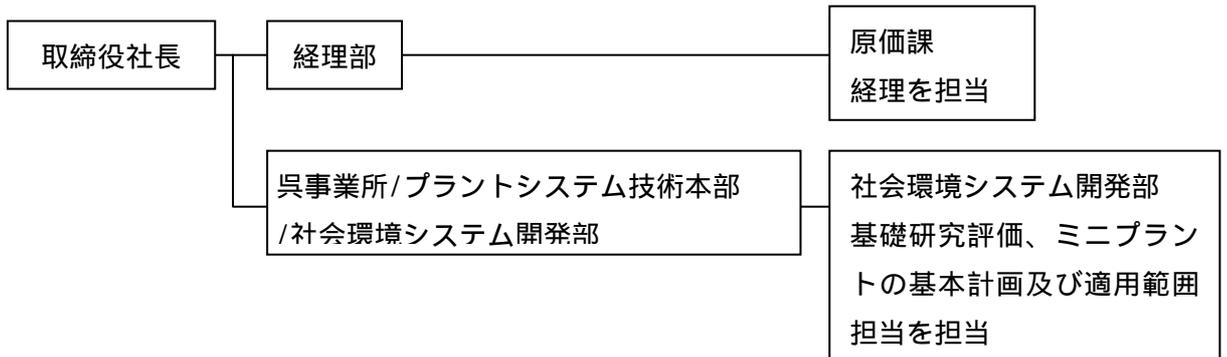
以下に、本プロジェクトにおける全体研究体制、委託先であるバブcock日立㈱及び再委託先である横浜国立大学の体制をまとめて示す。

委員会等は特に設けなかった。外部への指導・協力要請も行わなかった。

##### (1) 研究体制の全体スキーム



##### (2) バブcock日立内体制スキーム



## (3) バブコック日立の研究体制

委託先名	バブコック日立株式会社		
業務管理者	呉事業所 プラントシステム技術本部 社会環境システム開発部 副部長 佐藤 一教 TEL:0823-21-1127 FAX:0823-21-1296		
経理責任者	呉事業所 経理部 副部長 亀谷 隆司 TEL:0823-21-1157 FAX:0823-21-4471		
主な研究 実施場所 及び 登録研究員	バブコック日立株式会社 呉事業所 プラントシステム技術本部 社会環境システム開発部 〒737-8508 広島県呉市宝町6番9号(最寄駅：JR 呉線呉駅) TEL:0823-21-1127 FAX:0823-21-1296 連絡担当者：佐藤 一教		
	氏名	所属・役職	担当事業内容
	佐藤 一教	社会環境システム開発部・副部長	
	河本 昌浩	社会環境システム開発部・技師	
	谷口 幸久	社会環境システム開発部・技師	

担当事業内容 プロジェクト全体の統括  
ミニプラントの基本計画・設計及び運用  
水素発酵基礎研究の計画・実行  
研究成果の評価  
運用範囲及び事業性評価

## (4) 再委託先である横浜国立大学の研究体制

委託先名	横浜国立大学(国立)		
業務管理者	教育人間学部 自然環境講座 教授 谷生 重晴 TEL:045-339-3993 FAX:045-339-3993		
経理責任者	経理部 資金・協力課 外部資金係 藪原 公德 TEL:045-339-3077 FAX:045-339-3057		
主な研究 実施場所 及び 登録研究員	横浜国立大学 大学院環境情報研究院 〒240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台79-7(最寄駅：JR 横浜駅) TEL:045-339-3993 FAX:045-339-3993 連絡担当者：谷生 重晴		
	氏名	所属・役職	担当事業内容
	谷生 重晴	教育人間科学部 自然環境講座 教授	

担当事業内容 プロジェクト全体の統括  
ミニプラントの基本計画・設計及び運用  
水素発酵基礎研究の計画・実行  
研究成果の評価

## 運用範囲及び事業性評価

## 5. 実施内容及び結果

まずシステムを提案する。このシステムは、大略

- a) 原料供給部
- b) 水素発酵部(水素製造部)
- c) 残渣処理・再利用部
- d) 水素貯蔵・利用部

から構成されるが、本プロジェクトでは主要素である b)を研究開発対象とする。

### 5.1 システムの構成

図3に、廃糖蜜を原料とする連続発酵水素生産システムの構成を示す。

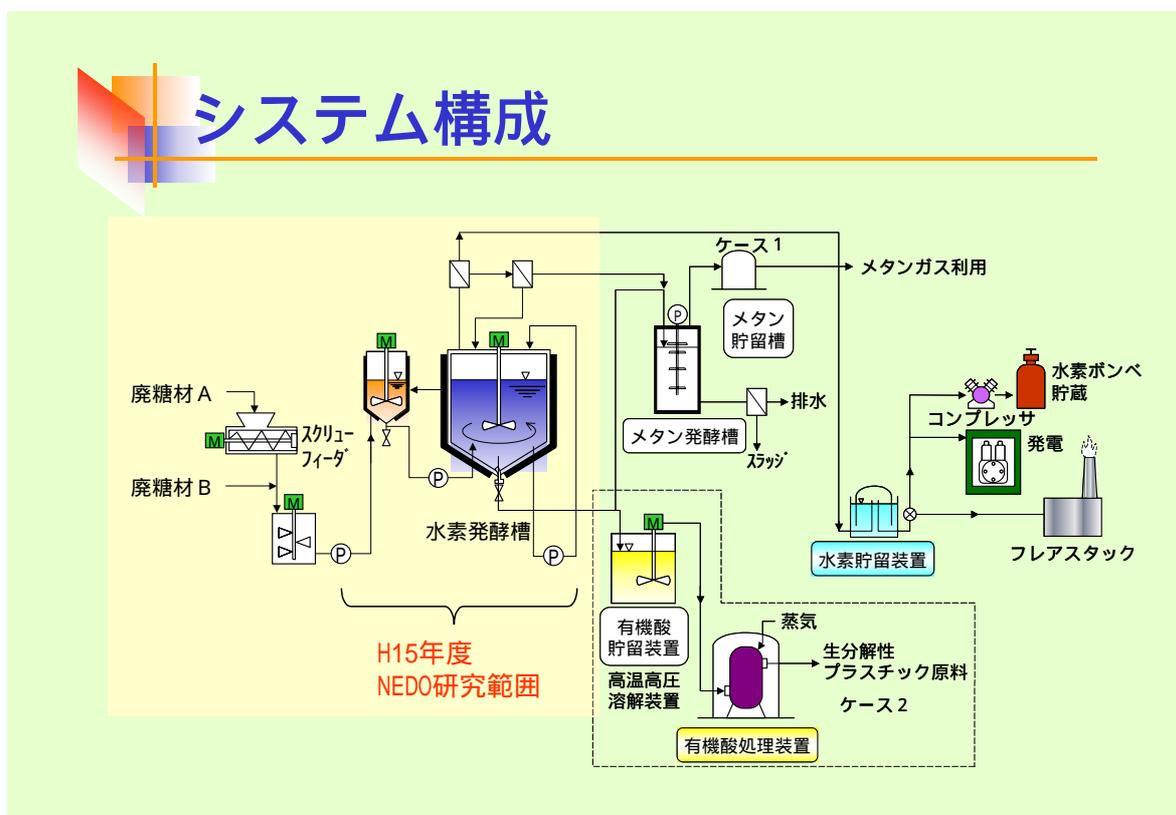


図3 発酵による水素製造のシステム構成

このシステムは、原料供給系、水素発酵部、残渣汚泥処理系及び水素回収・利用系から構成される。本プロジェクトにおいて主眼を置き、注力するのは、図中に範囲として示したように、システムの心臓部である水素発酵部の性能向上に関するものである。

水素発酵した後は、必ず残渣が生じる。これを廃棄物扱いにすると、経済性評価の観点からは不利となる。したがって、残渣・処理系は、システムの構成上避けて通れぬ重要な要素である。図示したように、残渣汚泥の処理として、

ケース1

メタン発酵によりメタンを回収(ただし、これによっても残渣は依然として生じる)

## ケース2

残渣の性状にもよるが、有価な有機酸を回収という方式が考えられる。

ケース1 で生じるメタンは、発電用ガスエンジンの燃料とすることが出来る。ケース2 では、製造する有機酸の種類やその純度によって、商用ルートに乗るか否かが決まる。生分解性プラスチックの原料等も作れるのではないかと期待される。

生産した水素は、純度を高めたあと燃料電池への利用を想定している。事業所の外部へ販売するためには、圧縮機にて高圧ボンベに充填する必要がある。

### 5.2 試験結果

まず初めに、菌体スクリーニングの結果を述べる。

次に発酵基礎試験の結果について、金属イオン添加の効果を調べた合成培地の試験結果、さらに実際の廃糖蜜を栄養素とした試験の結果について報告する。

#### 5.2.1 優良株選別

水素発酵菌のスクリーニング試験を実施した。図4に、菌体スクリーニングの実施状況の例を写真にて示す。



図4 菌体選別のスクリーニング状況

酸化タングステン( $WO_3$ )が青変する変異菌株の選別を実施した。これは、空気中において(好気状態において)、還元物質である水素を出さざるを得ないような径路、すなわち NADH をたくさん出せる径路を選ぶ菌を選び出すためである。写真の左上で、シャーレ中の培地において小さな青い点として見える(シャーレの中心と上縁

の中間ぐらいの位置)のが、 $WO_3$ が青変した証拠である。

API 試験の結果、多くの株で変異性を有することが分かった。これは、スタンダード株となっている理研株と比較した上での評価である。

これら変異株の水素発酵性能については、次年度(平成 16 年度)に実施したいと考えている。

### 5.2.2 発酵基礎試験装置の概要

図 5 及び図 6 に、それぞれ試験装置の系統と概観写真を示す。図 6 には試験条件も示した。

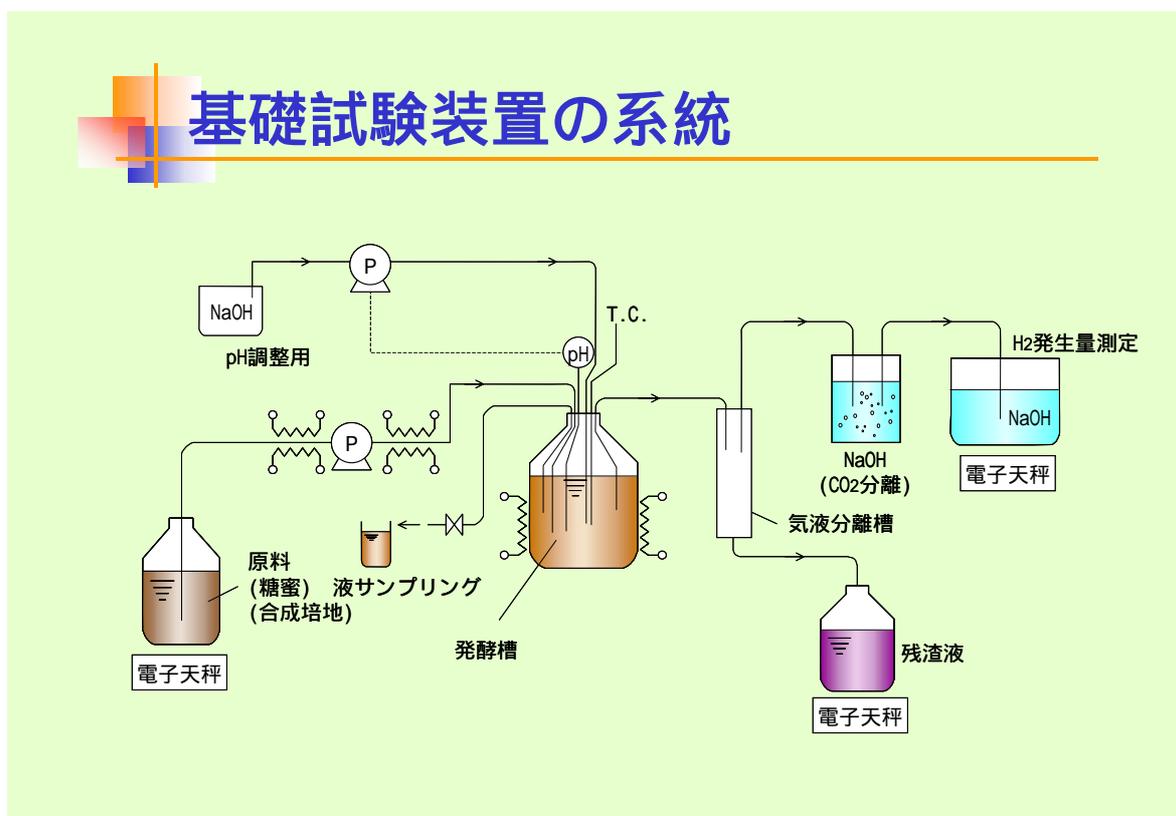


図 5 基礎水素発酵試験装置の全体系統

## 基礎試験装置の外観

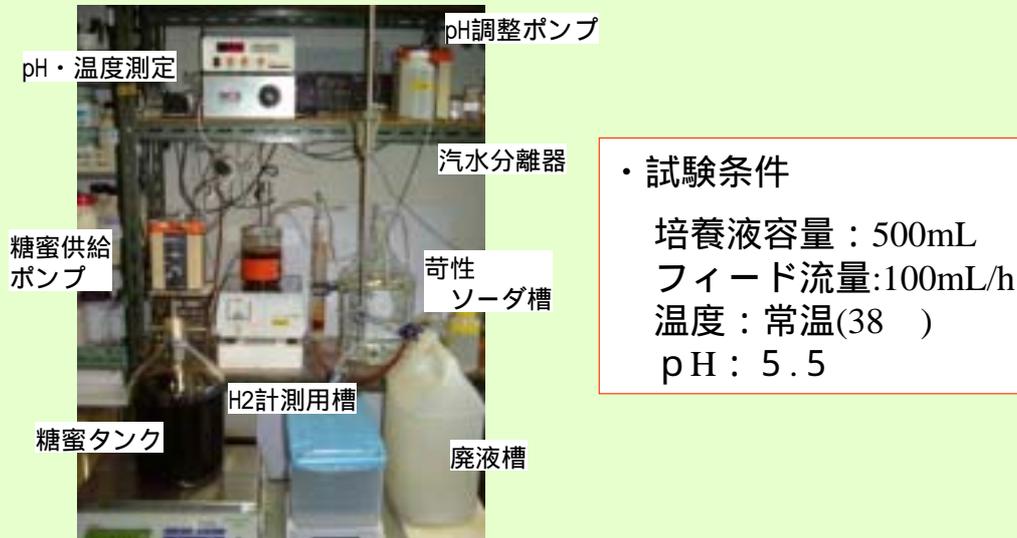


図6 装置の概観と試験条件

原料である合成培地あるいは廃糖蜜をポンプにより汲み上げ、発酵槽へと供給する。そのフィード流量は100mL/hである。発酵槽までの供給管はできるだけ短くし、さらにヒータを設けて加熱(60以上)した。これは、後述するが(5.2.5)、菌の「逆走」による汚染を防ぐためである。発酵槽の容量は500mLであり、温度はやや高めの常温(約38)とした。この温度に設定したのは、取り扱う水素発酵菌が哺乳類の体内に生棲する大腸菌と「近縁」であって、哺乳類と同じ温度を好むからである。発酵槽内液は、苛性ソーダ(NaOH)により、pHが5.5となるように調整した。水素を含む発酵ガスは、気液分離槽において污泥残渣を除去し、NaOH液中を通してCO<sub>2</sub>を分離した後にH<sub>2</sub>を秤量する。各要素における液バランスは、精密電子天秤により液量を測定することにより確認した。

なお、供試廃糖蜜は、球陽製糖(株)具志川工場の厚意により入手したものである。

### 5.2.3 金属イオン添加の影響

明確な根拠に裏づけされていないが、金属イオンを添加することによって代謝経路が大きく変わり、水素が発生し易い発酵系すなわち金属イオンが酸素代替となって呼吸的な経路が実現するのではないか、という発想に至った。

ランニングコストの負担にならぬことを前提としたため安価な鉄系を中心として、さらにニッケル・マグネシウム・亜鉛イオンの影響について調べた。また、これらと組み合わせる陰イオンの効果も試験した。

(1) 各種イオン添加が菌体濃度と水素発生速度に及ぼす影響

図7は、各種金属イオンを随時添加し、それに対する「反応」としての菌体濃度と水素発生速度の変化を整理したものである。鉄系については  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  と  $\text{FeCl}_3$  を、ニッケル系は  $\text{NiSO}_4$  と  $\text{NiCl}_2$  を、さらに  $\text{MgCl}_2$  と  $\text{ZnCl}_2$  の各溶液の添加を試みた。

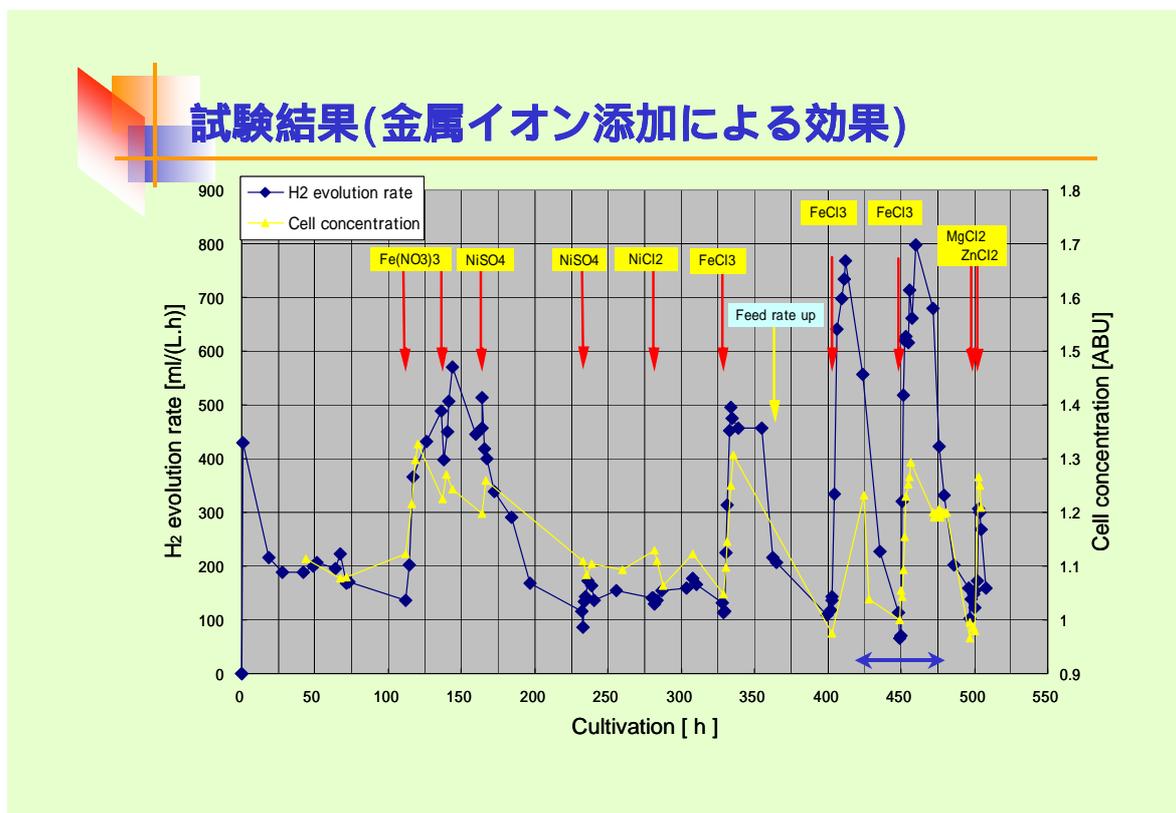


図7 各種イオン添加が菌体濃度と水素発生速度に及ぼす影響

まず、 $\text{Fe}^{3+}$ の添加によって、水素発生速度が3～7倍と著しく上昇することが分かる。 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 添加と $\text{FeCl}_3$ 添加の場合を比べると、ばらついてはいるが幾分 $\text{FeCl}_3$ の方が水素発生速度増大の割合が大きい。いずれにせよ、 $\text{Fe}^{3+}$ の場合には、陽イオンによる違いは大きくなさそうである。一方、 $\text{Ni}^{2+}$ や $\text{Mg}^{2+}$ は、添加することによる効果は乏しかった。水素発生速度が増大した場合には菌体の濃度も高くなって同調しており、水素発生速度と菌体速度の間には強い相関のあることが見て取れる。

$\text{Fe}^{3+}$ イオン添加による効果が持続しないのは、連続系で試験をしているため、発酵系から $\text{Fe}^{3+}$ イオンが徐々に流出してしまうからである。

(2) 水素発生速度に及ぼす FeCl<sub>3</sub> 添加効果

図 7 における 420 ~ 480 時間のスケールを拡大し、FeCl<sub>3</sub> 添加後のグルコース(栄養分)の変化と水素発生速度の関係を調べた。結果を図 8 に示す。

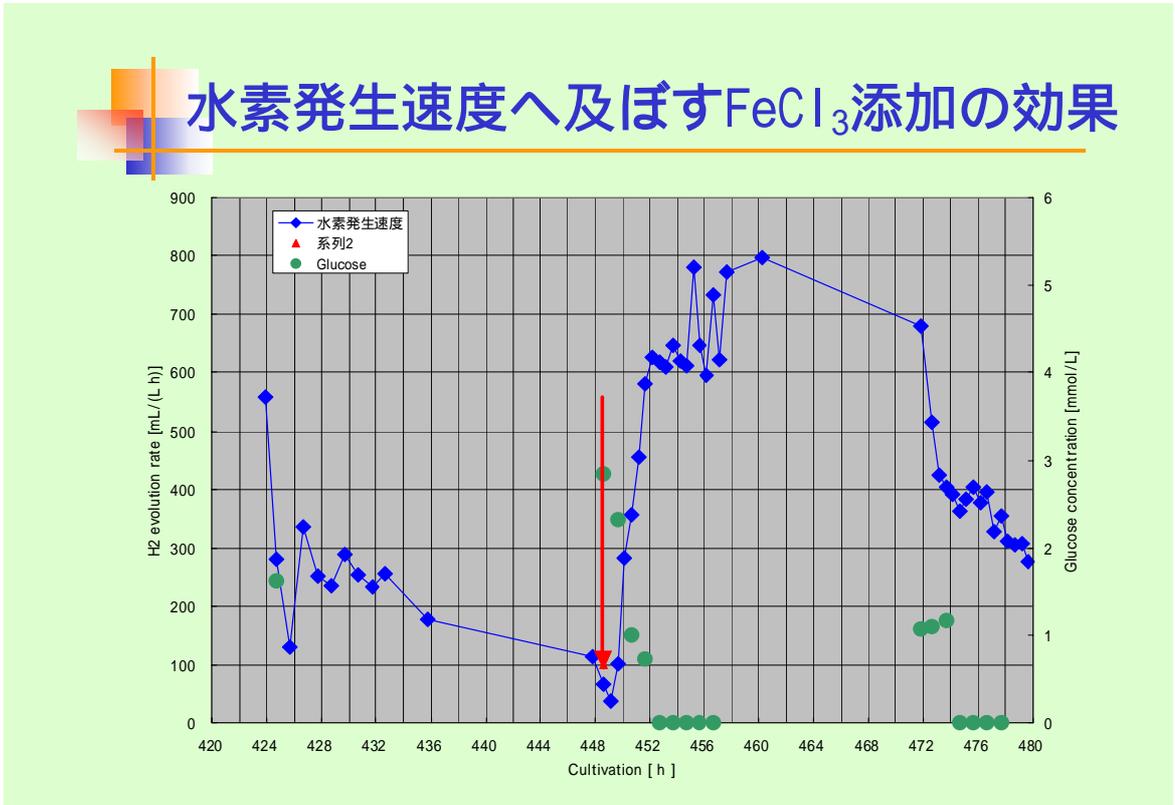


図 8 グルコース(栄養分)の消費と水素発生速度の関係

FeCl<sub>3</sub> 添加のタイミングは赤色の大きな矢印で示した。FeCl<sub>3</sub> の添加とともに、栄養分であるグルコースが急減し、4 時間経過時には、分析困難な濃度になることが分かる。一方、水素発生速度は、グルコースの消費に合わせて急増し、700 ~ 800 mL/l·h のレベルに到達する。グルコースを消費し尽くして、水素発生速度が高い水準に維持される期間は 20 時間にも及ぶ。これは、フィードの平均滞留時間のおよそ 4 倍である。

いずれにせよ本結果からは、FeCl<sub>3</sub> の添加によって栄養分であるグルコースが発酵菌によって急激に消費され、水素生産が増大するという事実が分かった。

(3) 水素発生速度増大時における代謝産物

図 9 は、FeCl<sub>3</sub> 添加後の代謝産物の変化をまとめたものである。当該時間帯と時間スケールは、図 8 のそれと同じである。

## 水素発生速度増大時における代謝産物の変化

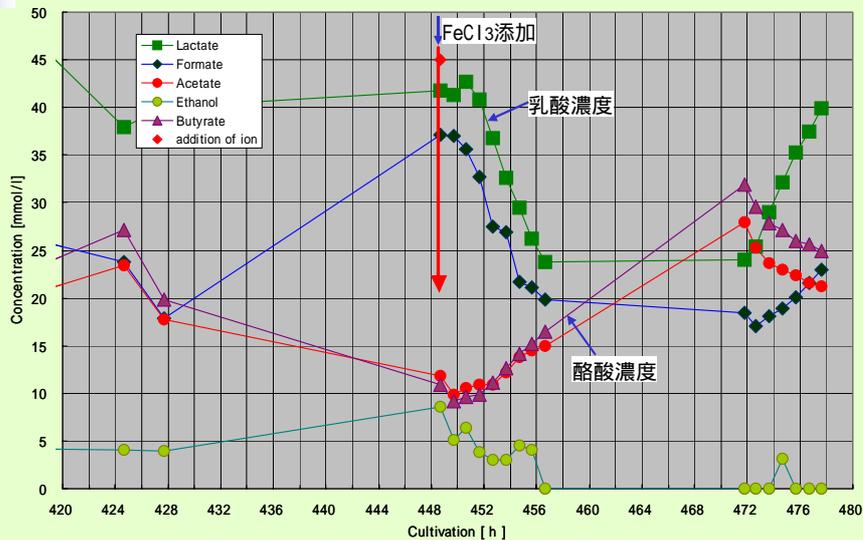


図9 FeCl<sub>3</sub>添加後の乳酸と酪酸の濃度変化

FeCl<sub>3</sub>添加のタイミングを、下向きの赤い大きな矢印で示した。Fe添加とともに酪酸濃度は増加し、一方乳酸濃度は減少することがわかる。さらに、少量ではあるがエチルアルコールの減少も見られる。いずれにせよ、水素発生増大時には代謝産物が大きく変化することが分かる。Fe<sup>3+</sup>の供給によって、水素を生成し易い代謝経路が実現したものと考えられる。

#### (4) 水素発生速度と酪酸濃度の関係

図10は、水素発生速度の増大に連動する酪酸の変化を示すものである。

図9が420～480時間経過の短い時間範囲における挙動を示すものであるのに対し、この結果は一連の試験550時間全域にわたる特性を見渡したものである。図10中の水素発生速度のデータは前出図7と同じものであるが、水素発生量の増大に伴い酪酸も増大することが明瞭に分かる。やはり、特にFeイオン添加時には代謝産物に著しい変化が生じたものと考えられる。

## 水素発生速度と酪酸濃度との関係

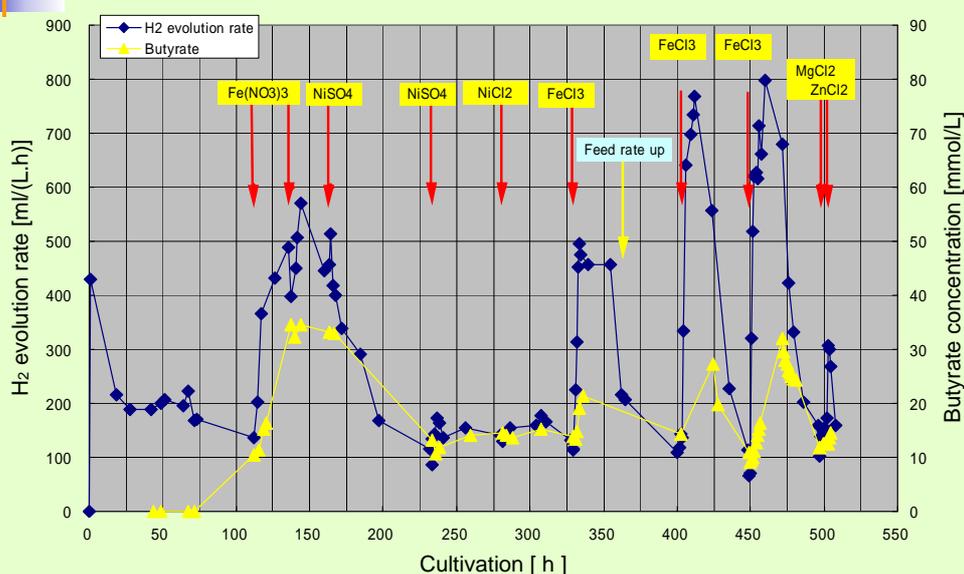


図 10 水素発生の増減に対応する酪酸濃度の変化

### (5) メカニズムについての考察

以前、横浜国立大学において実施した実験において、バクテリアの水素生産における好気状態の影響を調べる際に、酸素以外の物質で微好気状態を作るため、酸素に近い酸化還元電位を持つ 3 価の Fe イオンを利用することにした(酸化還元電位：酸素 = 0.82V、 $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+} = 0.77\text{V}$ )。その際、好気条件下では水素の発生は抑制されるはずなのに、水素の発生が活発になることが観察された。当時は疑問が生じた程度であり、深く追求することは無かった。今回のプロジェクトにおいて、これまでの疑問を確かめるため、 $\text{Fe}^{3+}$ イオンを培地に添加したところ、やはり水素発生が活発になり、Fe の効果があることが認められた。

3 価のイオンは電子受容体として働いていると考えられたので、2 価では効果が無いだろうと考え、2 価の Fe イオンを加えたところ、予想に反して水素発生が活発になった。つまり、電子の受容体であるか無いかの水素発生を活発にした訳ではないという事である。そこで、Fe と同じ原子的性質を持つ Ni で試したが、Ni イオンでは水素の活性は高くなり、影響を持たないことが分かった。Mg、Zn など実験室で手に入る金属イオンを試したところ、Zn には、少しであるが活性を高める効果があることが分かった。

水素発生を触媒する酵素のヒドロゲナーゼでは、Fe が電子伝達中心を構成する重要な原子であり、酵素量が増えれば水素発生速度に影響が現れることは考えられる。しかし、収率を高める理由にはならないので、現時点においてまだその

理由については明らかになっていない。メカニズムの解明については今後の課題と考えている。

最後に、参考資料を添付する。

#### 5.2.4 廃糖蜜を使用する連続水素生産

南西諸島の製糖会社から入手した廃糖蜜を 3 wt% の供試液として、連続水素生産の試験を行った。本試験に使用したのは、前述(5.2.2)の発酵基礎試験装置である。

##### (1) 水素発酵菌の凝集

図 11 に、コイル状に巻いたガーゼ(木綿)上に水素発酵菌が凝集した状態の写真を示す。



図 11 水素発酵菌がコイル状ガーゼに凝集した状態

左側の写真は、右側の写真を部分的に凝集した水素発酵菌である。このように、ガーゼをあたかも「振り所」とするかのようには菌は容易に凝集する。ガーゼのコイルは、ステンレス鋼製のワイヤメッシュに貼って作成したものであるが、ワイヤメッシュ側よりもガーゼ側に多く凝集している。また、蟹泡状の微細な水素気泡が生じている様子も分かる。

##### (2) ガーゼを用いる場合の連続水素発生

図 12 は、図 11 の写真のようにガーゼ上に水素発酵菌を凝集させた場合の累積水素量の時間変化を整理したものである。

## ガーゼ上に菌を凝集させた場合の連続水素発生

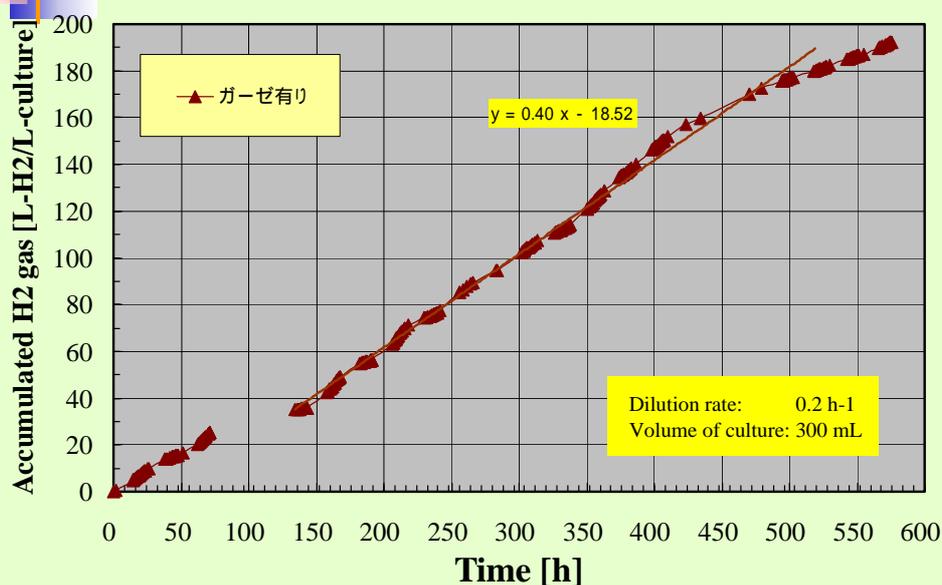


図 12 累積水素発生量の時間変化(ガーゼ上に菌を凝集させた場合)

累積水素量の変化は時間に比例しており、およそ 500 時間の長期にわたり安定な水素生産が行われていることが分かる。ただしこの結果のみでは、安定な水素生産が菌体の凝集によるものであるか否かは分からない。図 12 における縦軸の累積水素生産量を  $y$ 、横軸の時間を  $t$  とすると、

$$y = 0.40x - 18.52 \quad \dots\dots\dots \text{(式 1)}$$

と近似できる。

### (3) Fe イオン添加の効果

図 13 は、3% 廃糖蜜に対して、 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  添加による水素発生速度の変化をまとめたものである。図中には、 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  添加のタイミングを青色のプロットと矢印で示した。連続実験開始後 22 時間で最大水素発生速度 ( $1,320\text{mL/l}\cdot\text{h}$ ) に達したが 24.4 時間のときフィード流量を  $84\text{mL/h}$  から  $105\text{mL/h}$  に増やしたため、菌の流出量が増えて、水素発生速度も遅くなった。また、45.8 時間における水素発生速度が  $90\text{mL/l}\cdot\text{h}$  と非常に遅い値を示したのは、液クロで成分を分析するため槽内の発酵液を採取したために、累積水素量が少く現れたためである。

## Feイオン添加による水素生産速度倍増の達成

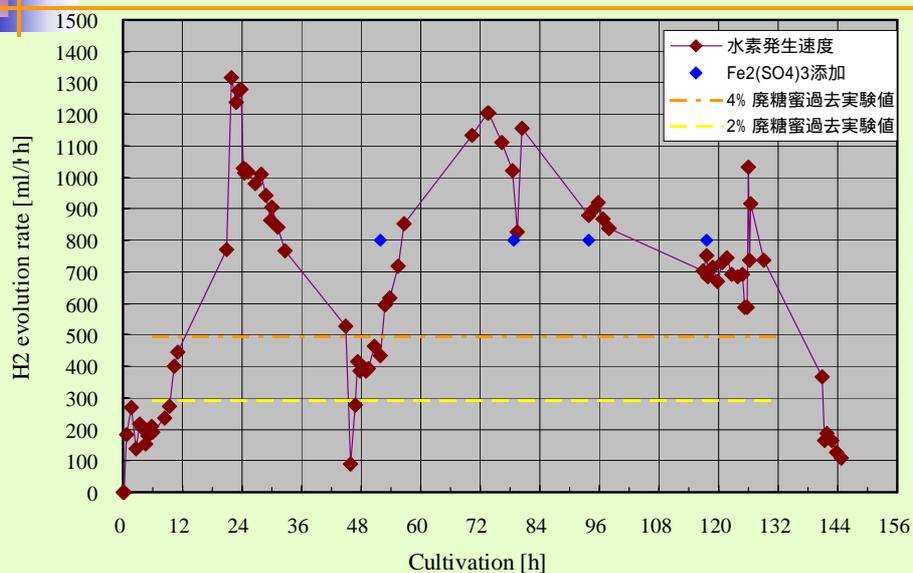


図 13 Fe イオン添加による水素生産速度倍増の達成

また図中には、いずれも過去の実績である 4 % 廃糖蜜と 2 % 廃糖蜜からの水素発生速度のレベルを示す。本実験は 3 % 廃糖蜜を対象としたものであるので、これらの実績のほぼ中間の値(約 400mL/l・h)に来るものと予想される。これに対し本研究では、1000mL/l・h を超える結果を出しており、「過去実績の 2 倍以上の水素発生速度達成」という目標( 2 章参照)を達成できたことになる。

#### (4) ガーゼ有・無(菌凝集・分散)の比較

図 14 は、前出図 12 と同様の整理方法で、ガーゼの有無すなわち菌凝集と菌分散の違いを比較したものである。

## ガーゼの有・無(菌凝集・菌分散)の比較

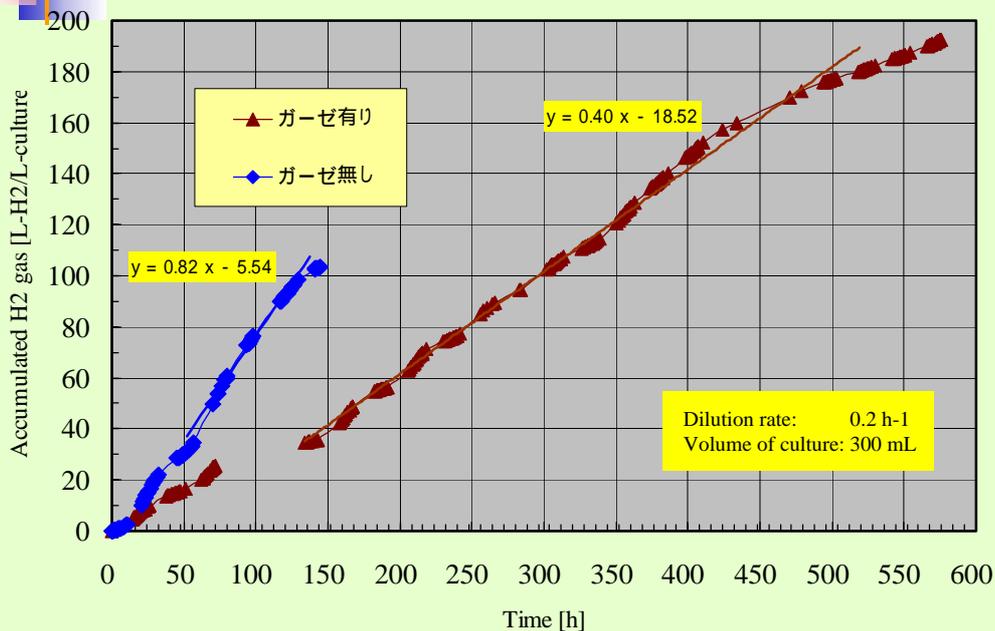


図 14 菌の凝集・分散が水素生産に及ぼす影響

いずれも、時間  $t$  に対して累積水素生産量はほぼ比例して増大することが分かる。ガーゼ無しの場合には、縦軸の累積生産量を  $y$ 、横軸の時間を  $t$  とすると、  
 $y = 0.82x - 5.54$  ..... (式 2)

と近似的にまとめられる。式(1)と比べれば、水素生産の速度を表す勾配は 2 倍以上であることが分かる。すなわち、本研究で取り扱った水素発酵菌に関しては、菌を凝集担持するよりも液中に菌を分散させる方が水素を効率良く生産する、と結論付けられる。

尚、ガーゼ無しの試験は、150 時間で打ち切っているが、その後試験を継続してもリニアな状態は維持されると推定した。

### 5.2.5 水素生産装置のための知見

#### (1) 設計上の留意事項

5.2.3 及び 5.2.4 の試験は決してスムーズに実施されたわけではなく、試験が順調に進みだすまでは試行錯誤の連続であり二ヶ月近くも要した。その過程において様々な重要なノウハウを得ることが出来た。これらは装置の大小に関わらず重要なものであって、いずれも実機水素生産装置の設計に直接反映すべきものである。図 15 に、それらの中で主要なものをまとめた。

## 連続水素生産装置設計のための知見

- (1) フィードタンクと発酵槽の間にヒータを設け高温化することで、フィードタンクの汚染を防ぐことが可能。
- (2) 配管途中の増菌抑制のため、高温部～発酵槽間の距離はできる限り短くした方が良い。
- (3) 泡が液面を覆うと水素生成速度が低下するため、装置に除泡機能を設ける必要がある。

図 15 装置設計上の留意事項

(1)と(2)はともに、水素発酵菌が勝手に動き回るのを抑止するための方策である。水素発酵菌は、栄養分を求めて発酵槽から上流側のフィードタンクへと遡るように移動する傾向がある。このようなアクティブな菌がフィードタンク内で増殖すると、フィードタンク内で水素を発生させたり栄養分を消費するなど装置のコントロールが不可能となってしまう。したがって、配置を加熱して、さらに非加熱部を極力短くして、菌を死滅させるかあるいは菌が近づかぬようにする必要がある。

発酵槽の液表面は発泡する。この泡の内部は主として水素と二酸化炭素であるが、泡の表面に生存している菌がこの水素を消費してしまう嫌いがある。したがって、水素生産の効率を高めるためには、泡を取り除く必要がある。泡の除去に用いる薬剤は有機シリコンが含まれているので、生産した水素の利用の場合、シロキサンとして機器(例えば燃料電池の改質器)に様々なトラブルを誘発する可能性が高い。したがって、スクレーパ等の機械的手段によって除泡するのが良いと考えられる。

### (2) ミニプラントの構想

図 16 に、連続的に水素を生産する試験設備(ミニプラントと呼ぶ)の構想を示す。

## 試験装置(ミニプラント)の構想

[ 次年度以降の構想 ]

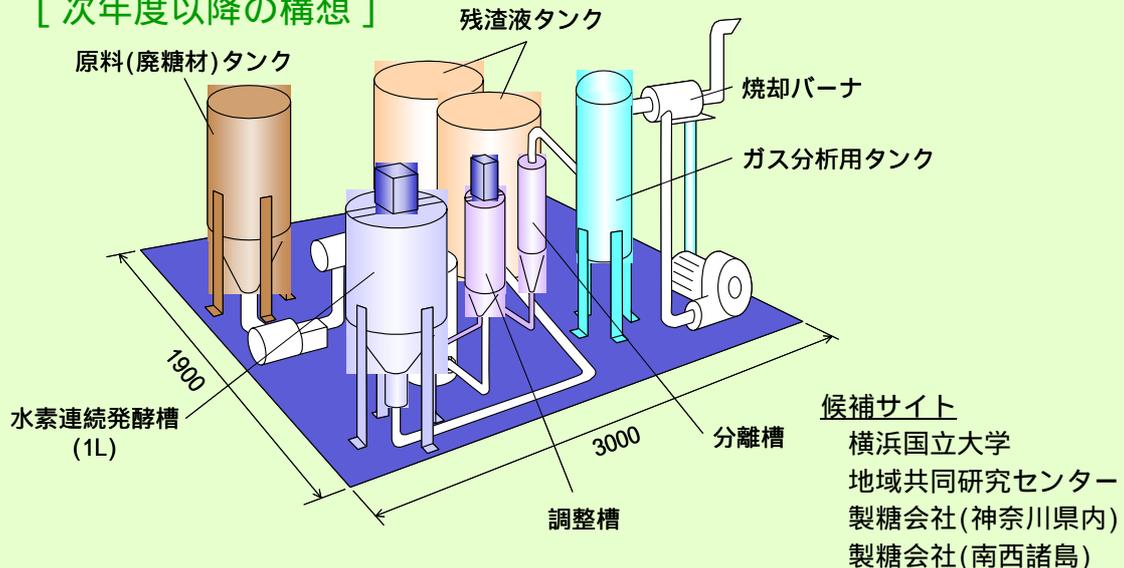


図 16 連続水素生産のミニプラント(案)

実際の原料(廃糖材)を用いて、発酵槽における廃糖材ホールドアップは約1リットルとし、およそ $2\text{ m}^3$ (Normal)/日の水素を連続的に作り出そうという計画(次年度以降)のものである。主要な構成要素は、原料タンク・供給系・発酵槽・生成ガス処理部及び残渣タンクから構成される。各要槽は小型であるので、作業スペースを含めても $2,000 \times 3,000$ の可動(可搬)プレート上に乗せる計画である。

このミニプラントを設置するサイト候補は、

横浜国立大学の地域共同研究センター

あるいは、原料である廃糖蜜の供試元である

製糖会社(神奈川県内)

製糖会社(南西諸島)

が考えられる。南西諸島の製糖会社については、次章にて述べるが、この一角にミニプラントを設ける場合は、装置の運転のために研究員の常駐あるいは頻繁な往復が必要となり、さらに製糖会社の方々の協力も不可欠であるため、次年度に即実現するのは難しいと考えられる。

## 6. 南西諸島の製糖会社調査

図 17 に、南西諸島の製糖会社のマップを示す。本プロジェクトでは、この中から三箇所を訪問し、廃糖蜜の現状についてヒヤリングを行い、有効利用法の可能性について意見交換した。

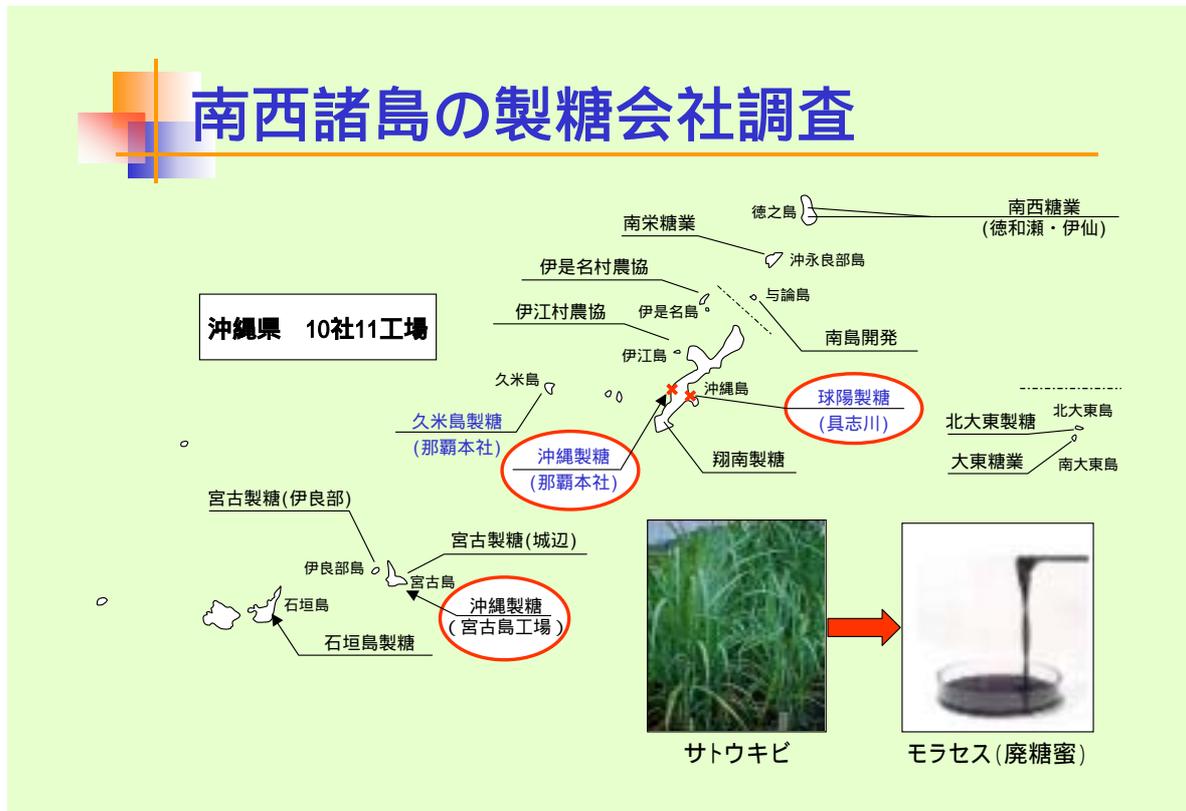


図 17 沖縄県の3工場を訪問・調査

( ) 期 日：平成 15 年 9 月 16 日

場 所：球陽製糖(株)具志川工場

面会者：新里常務取締役

訪問者：谷口(パプコック日立)

谷生(横浜国立大学)

内 容：・現状、廃糖蜜の大半は肥料として畑に撒いている。

・海洋投棄が出来なくなったため、エタノールの原料とするのが有力ではないか？

・有価処理としては、某商社が南西諸島で独占的に購入している(2,500 円/t)。

・以前販売していた総合食品 A 社には売れなくなった。

・製糖会社としては、6,000 円/t くらいで引き取って欲しいところ。

・現有の水素発酵能力から見積ると、4,000 円/t 程度が上限と思われる。

・サトウキビに関しては、地元琉球大学にも専門家が少ない。廃糖蜜の

糖分は、29～35%である。

- ・廃糖蜜の処分は、ブラジルでも問題となっている。
- ・廃糖蜜を試験用にいただくことにした。
- ・会社経営に直接関わる具体的数字については省略する。

( ) 期 日：平成 15 年 9 月 16 日

場 所：沖縄製糖(株)本社

面会者：川満社長、池原係長

訪問者：谷口(パブコック日立)

谷生(横浜国立大学)

内 容：・工場が宮古島にあり、台風で大きな被害を受けた。

- ・年間の廃糖蜜は 3,200t。1500t の貯蔵タンクがある。長期間貯えておくと気泡が発生する。
- ・原糖(サトウキビ由来の廃糖分)と精白糖(砂糖精製で生じる廃糖分)では、含有ミネラルの影響か、発酵特性が異なる可能性がある。
- ・本プロジェクトの内容には興味がある。水素発酵システムが完成したら、試験プラントを設けても良い。

( ) 期 日：平成 16 年 3 月 8 日

場 所：宮古製糖(株)

面会者：宮里工務次長

訪問者：谷口(パブコック日立)

内 容：・現状、廃糖蜜は肥料として処理している。有価の場合、1,100 円/t で販売。ただし輸送費が 1,500 円/t もかかり、販売するだけで赤字となっている。

- ・石灰を混ぜて固形化する特許を出したが、コスト的に合わず、実施していない。
- ・沖縄県から、エタノール生産の話を持ちかけられたこともある。しかし、コスト的に難がある。
- ・地産地消が是であり、本プロジェクトの水素生産システムが出来上がった際には、装置導入も考える。ただし、廃棄物(汚泥残渣のこと)が出るのは拙い。
- ・工場運営に直接関係する経営数字については省略する。

<まとめ>

- ・廃糖蜜は余剰になっており、現状一部が肥料にしているのみであり、有価物としての活用は殆どされていない。
- ・本プロジェクトの水素生産システムが受け入れられるためには、コストが安い(イニシャル、ランニングコストともに)ことが前提である。

図 18 に製糖工場の外観写真を示す。



図 18 製糖工場の外観

7. 経済性試算

図 19 に、フィージビリティ・スタディ (FS) の一実施例を示す。

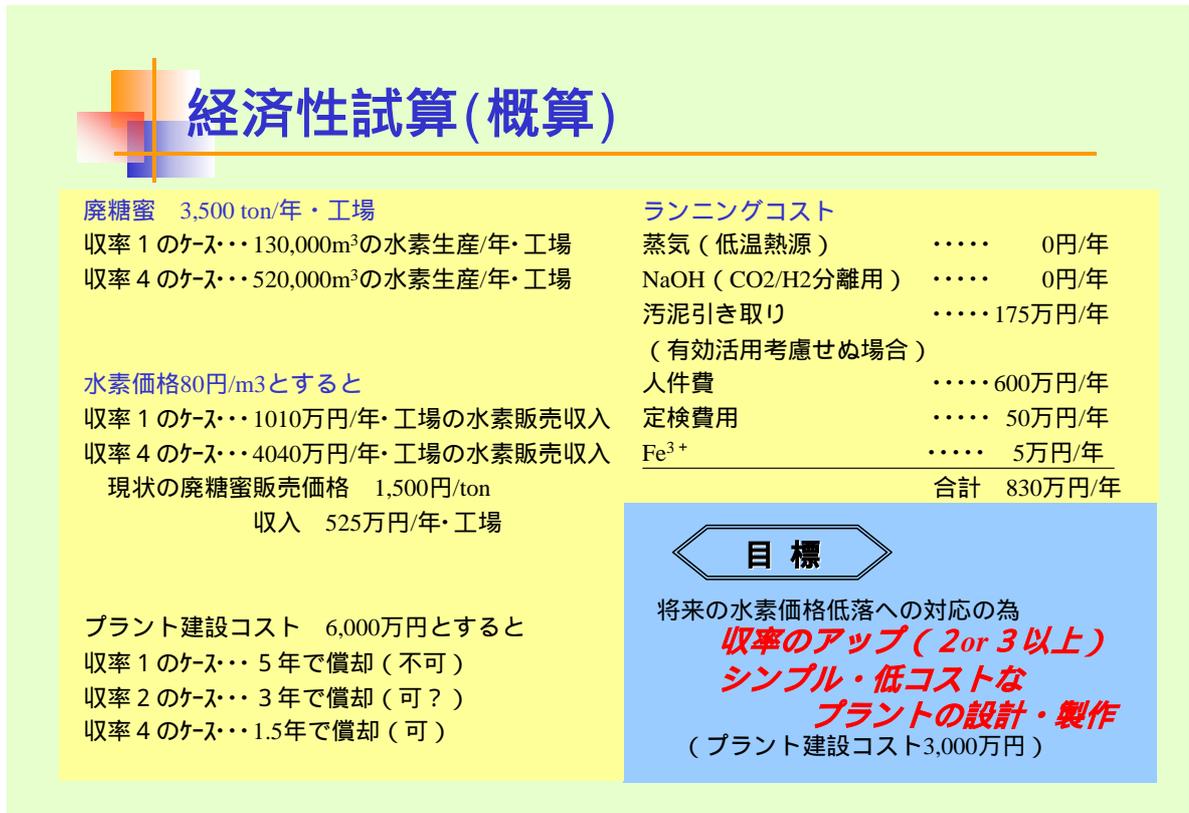


図 19 事業化検討のケーススタディ

廃糖蜜の生産(排出)量を、沖縄製糖の数字を参考にして、3,500t/年・工場とする。

水素収率を現状レベルの 1、及び将来高まった場合に 4 となった二ケースとして求めると、それぞれ 130,000m³/年・工場及び 520,000m³/年・工場の水素が生産されることになる。

燃料電池用水素の価格は、現時点では固まっておらず、将来的には確実に安価になると予想されるが、ここではひとまず 80 円/m³(Normal)と仮定する。

この水素販売価格であれば、収率 1 及び収率 4 のケースにおいて、工場としてそれぞれ 1,010 万円/年及び 4,040 万円/年の外販収入があることになる。現在の廃糖蜜の販売価格は 1,500 円/t であるので(宮古製糖の例よりも高く見積ったが、実質的にはこのような販売はされていない)、収入の差額は 525 万円/年・工場となる。

プラント建設コストを 6,000 万円とすると、収率 1.2 及び 5 とする各ケースでは、減価償却期間はそれぞれ 5.3 及び 1 年となる。ここではキャッシュフロー的試算を行ってはいないものの、経営償却期間 5 年は実質的に不可能であろう。また、南西諸島の製糖会社は決して大企業ではなく、例え半額の公的助成があったとしても、イニシャルコスト 6,000 万円は多大な負担となるであろう。この半額程度が、投資の許容上限ではないかと思われる。

ランニングコストのうち蒸気(冬季に発酵槽の加温に用いる)は余っており、コストに含めない。生成ガスから CO<sub>2</sub>を除くために NaOH を用いるが、これも工場内には余剰であり、コストは発生しない。汚泥残渣を有効活用せぬ場合、産業廃棄物として引取りとなる場合には、175 万円/年の費用が発生すると見積った。現実には、畑に撒くことで費用を 0 にすることも可能であろう。専任の担当者は不要であるが、プラント運営に関わる人件費を 600 万円/年と見積った。この他、メンテナンスに関連するコストを 50 万円とした。水素生産能力を高めるために Fe<sup>3+</sup>を添加するが、これは安価であり、5 万円/年とした。以上、ランニングコストは 830 万円/年となる。いずれにせよ、このコストを圧縮するためには運用に関わる人的負担の少ないシンプルで信頼性の高いシステムの提供が不可欠であることが分かる。

以上の経済性試算から、今後の目標が明らかになってくる。まとめると、以下の 2 点に集約されよう。

まず、収率を少なくとも 2 以上として、水素の生産能力を高めることが不可欠である。

次に、シンプルで低コストな水素生産システムを提供することが肝要である。

は今後の研究開発に期待するところ大の課題であり、一方はプラントメーカーのエンジニアリング的な創意工夫によって達成されるものである、と考えられる。

## 8. まとめ

### ・ 優良株選別

- (1)  $WO_3$ を青変する変異菌株の選別を実施した。
- (2) 好気状態でも水素を発生する菌の可能性株を選別した。

### ・ 水素生成速度に及ぼす各種金属イオン・陰イオン添加の影響(合成培地試験)

- (1)  $Fe^{3+}$ で強い効果が生じる。 $Ni^{2+}$ や $Mg^{2+}$ では効果が乏しい。
- (2) 陰イオンは、水素生成速度には直接関わらないようである。
- (3) 水素生成速度増大時には、

菌体濃度の上昇

代謝産物の顕著な変化(酢酸濃度増加、乳酸濃度減少)

を伴う。

基本的メカニズムの解明は今後の課題である。

### ・ 廃糖蜜を使用する連続水素生産

- (1) 菌は、コイル状ガーゼ(木綿)によく凝集した。しかし水素生成速度は増大しなかった。
- (2)  $Fe^{3+}$ を添加することで、過去実績の2倍以上の水素速度となり、目標を達成することが出来た。

### ・ 連続水素生産装置のための知見

- (1) 菌汚染・雑菌増殖の抑制のためには、  
フィードタンク～発酵槽間にヒータを介設  
高温部～発酵槽間の管短縮  
により菌の移動を抑止する必要がある。
- (2) 発酵槽液面を除泡する。

## 9. 今後の課題

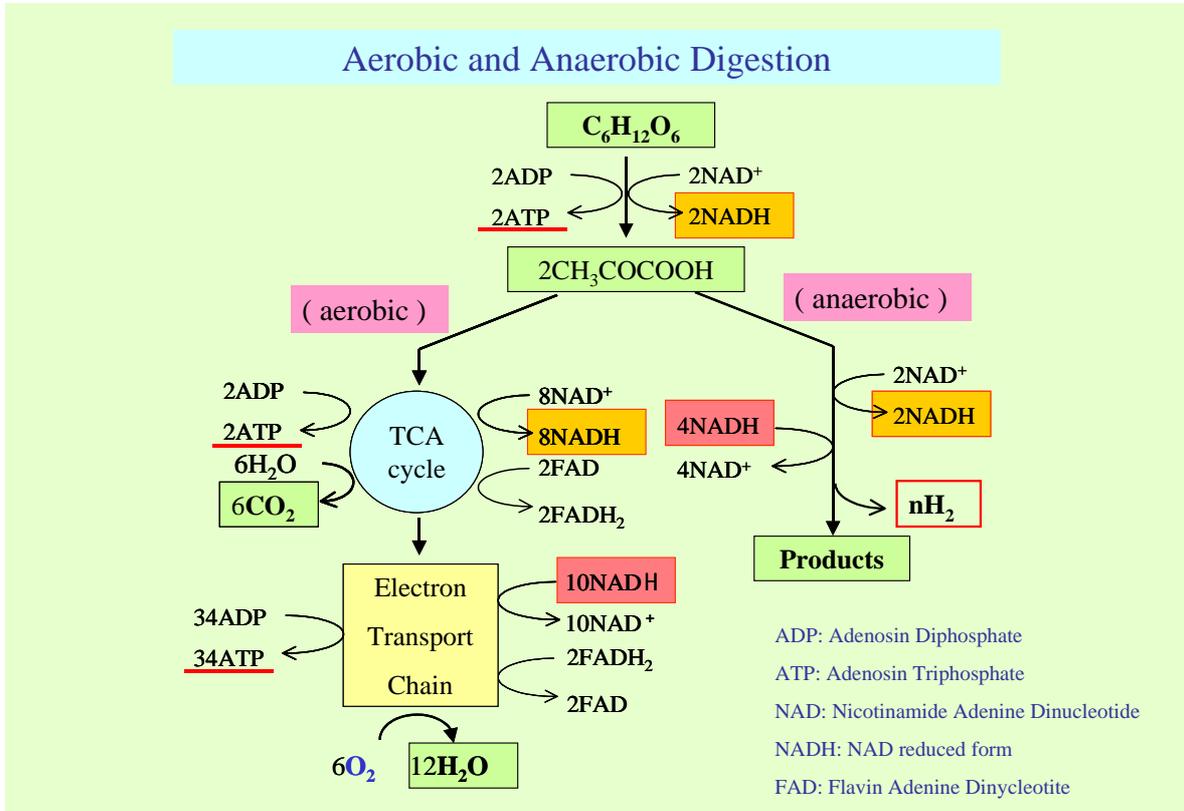
- (1) 発酵槽容積 1 ~ 2L のミニプラントを設計・製作し、実際の廃糖蜜を原料とし、連続的な水素生産のフィールド試験を行う。これにより、課題を抽出しその解決を検証するとともに、実装置の設計に必要なエンジニアリングデータを取得する。
- (2) 水素生産能力を飛躍的に向上させる菌の選定を行う。目標は、これまでの実績の 100 倍とする。(a)水素収率 10 倍 × (b)水素生成速度 10 倍にての実現を目指す。(a)については、遺伝子組み換え操作も試みる。(b)は、60 ~ 70 °C における高温発酵により目途を付けたい。平成 16 年度は、上記(1)(2)の課題のうち、実用化へ向けて進展させる(1)よりも、基礎レベルの躍進が不可欠という考えのもとに、(2)を優先的に実施したい、と考えている。

## 文献

- 1) 太田・石原；水素エネルギー社会への展望、化学工学、68-3、(2004)、156
- 2) 福田；我が国ならびに欧米の水素エネルギー導入戦略、化学工学、68-3、(2004)、162
- 3) 亀山；水素製造技術、化学工学、68-3、(2004)、166
- 4) 谷生；微生物の水素発生メカニズムとバイオ水素を利用した水素生産、化学装置、1991-6、105
- 5) 谷生他；水素エネルギーシステム、22-1、(1997)、2
- 6) Tanisho, S., et al；Biochem Biophys Acta, 974, (1988), 1
- 7) 田口・矢野；小麦フスマからの水素ガスの自然発生、廃棄物学会論文誌、14-6、(2003)、329
- 8) 野地他；有機性廃棄物からの連続的水素生成技術、環境技術、33-2、(2004)、127

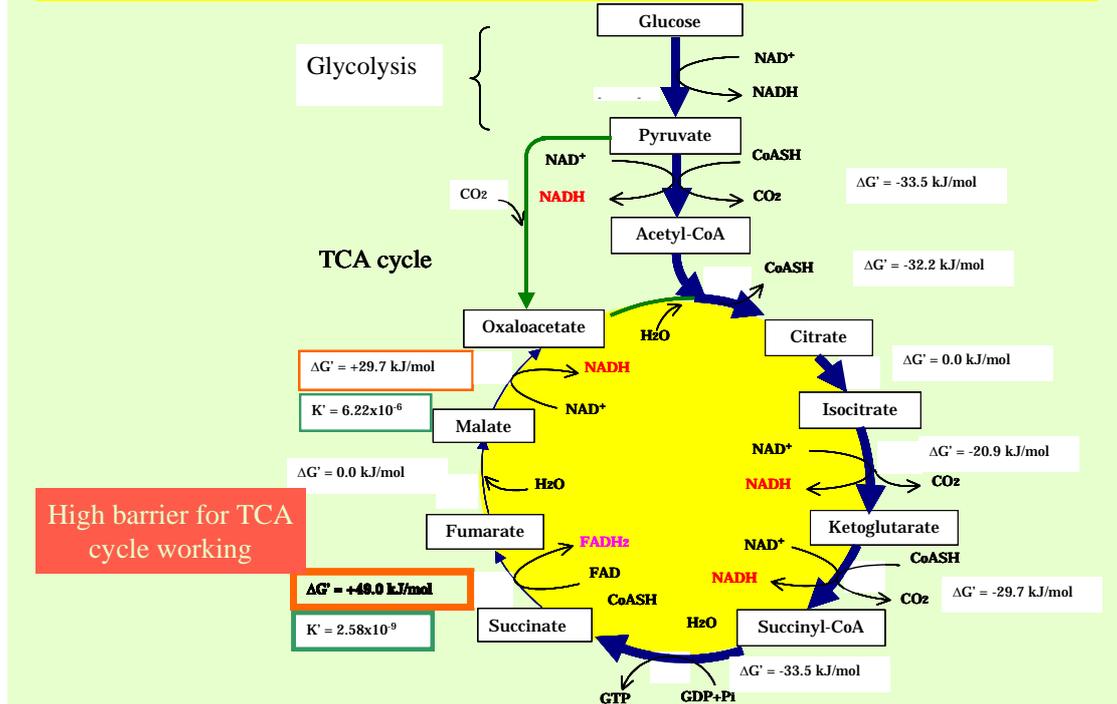
補足資料

添付参考資料図 1 ~ 6 は、5.2.3(5)に関係する。いずれも金属イオン添加効果のメカニズムを「代謝経路の選択・スイッチ」で説明しようとする場合に使用する参考資料である。



添付参考資料図 1

## Significant problem to get much NADH in the TCA cycle



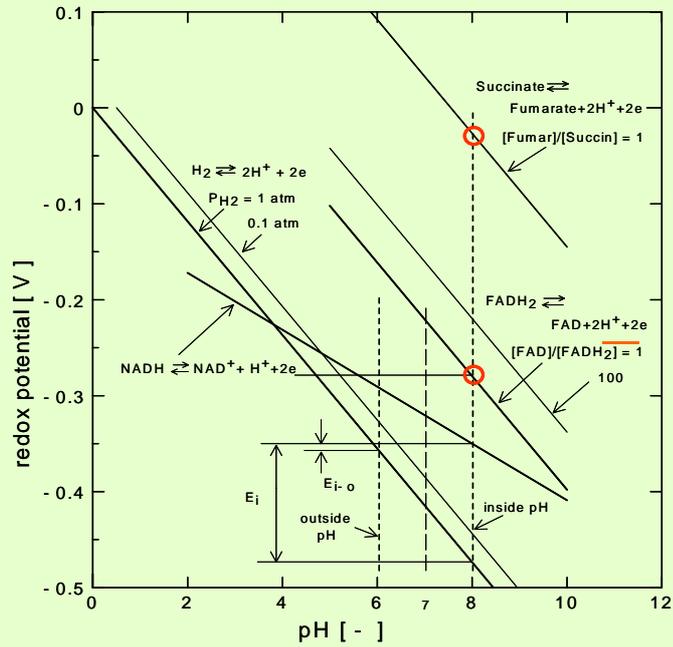
添付参考資料図 2

## Reduction-oxidation potentials of various compound

Redox compound	$E_0'$ [mV]
$\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$	818
$\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$	433
Ubiquinon	113
Fumarate/succinate	33
Oxaloacetate/malate	-172
$\text{FAD}/\text{FADH}_2$	-220
$\text{NAD}/\text{NADH}$	-320
$\text{H}^+/\text{H}_2$	-414

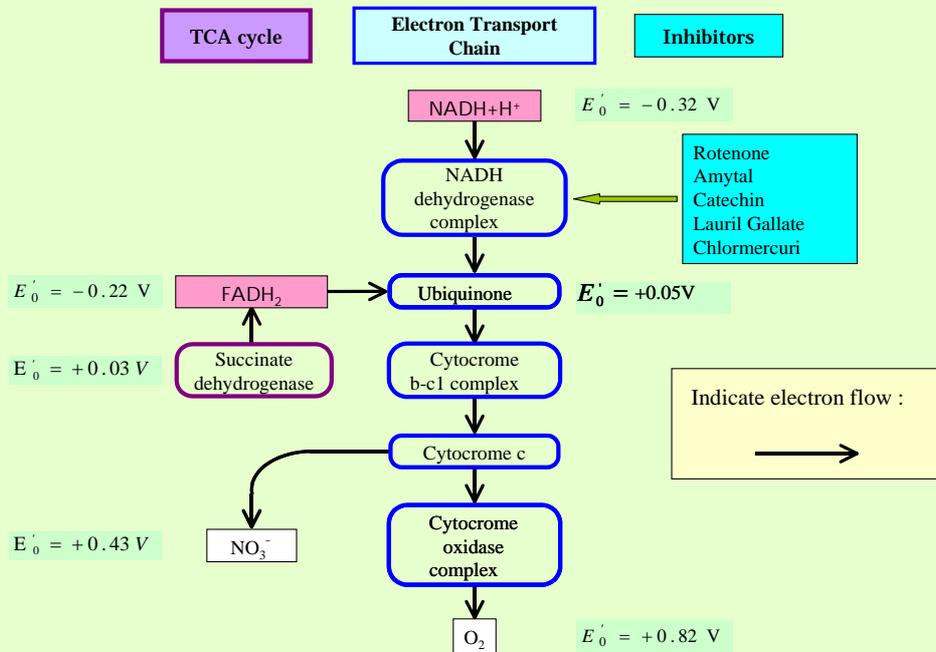
添付参考資料図 3

## Redox potential vs. pH



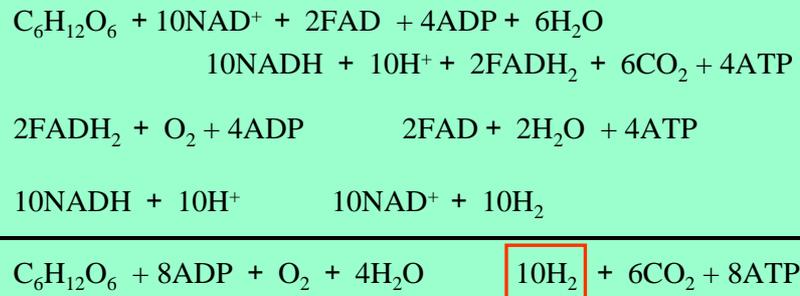
添付参考資料図 4

## Strategy to circulate the TCA cycle while evolving $\text{H}_2$ through NADH pathway



添付参考資料図 5

Expected yield of H<sub>2</sub> under aerobic condition by the inhibition of NADH dehydrogenase complex



添付参考資料図 6

1. はじめに
2. プロジェクトの目的
3. スケジュール
4. 研究開発体制
5. 実施内容及び結果
  - 5.1 高性能高温菌の探索
    - 5.1.1 採取調査
    - 5.1.2 高温菌の特性(1)
    - 5.1.3 代表的微生物の水素発生速度
    - 5.1.4 高温菌の特性(2)
  - 5.2 原料基質の検討
    - 5.2.1 グリセリンの検討
    - 5.2.2 水素及びエタノールの発生量
    - 5.2.3 水素生産量の試算
  - 5.3 遺伝子組み換えによる水素収率の改善
  - 5.4 水素発酵システムの検討
    - 5.4.1 キャビテーションを利用する新システムの提案
    - 5.4.2 キャビテーションが菌体に及ぼす影響
    - 5.4.3 廃糖蜜を用いる試験
    - 5.4.4 発酵汚泥に対する可溶化の効果
    - 5.4.5 凝集体微細化への効果
    - 5.4.6 発酵槽/気液分離の検討

6. 経済性試算

7. まとめ

8. 今後の課題

文 献

補足資料

## 和文要旨

### 発酵菌の水素生産性向上(横浜国立大学にて実施)

高温菌の探索を実施し、ハワイ及び沖縄において菌体を採取した。スクリーニングの結果見出した高温菌を用いることで、従来菌(*E. aerogenes*)に比べて水素収率が2.5倍、水素生成速度10倍、すなわち水素生産量を25倍に高めることができるという結果を得た。原料基質の拡大を目的とし、パームオイルから副生するグリセリンを検討した結果、グリセリン濃度1%及びpH6が好適な条件であることがわかった。さらに、遺伝子操作による菌改質に着手し、プラスミドの組み込みに成功した。

### 水素発酵システム最適化のための検討(パブコック日立にて実施)

キャビテーションジェットを吹き込むリアクタと発酵槽間を循環させる新しい水素発酵システムを提案した。まず、菌体が死滅せずフロックが分散するキャビテーション条件を確定した。次いで汚泥の可溶化にキャビテーションジェットが有効であることを示した。さらに、廃糖蜜を原料とする場合、キャビテーションジェットによって異常な泡立ちが生じないことも確認した。一方、二相流動解析も実施し、発生した水素泡と循環液流を気泡分離する発酵槽を提示した。

## Abstract

First, we conducted a research work of new high-temperatures bacterium in Hawaii and Okinawa, and discovered an efficient bacterium 'Meso Philic' by screening tests for many bacterium sampled in both islands. The bacterium 'Meso Philic' gives 2.5-times yields, 10-times production rates, and resulted in 25 times hydrogen production ability compared with the previous data of *Enterobacter aerogenes*.

Next, we investigated glycerin as feed material, and clarified that glycerin concentration of 1wt% and pH of 6 were optimum condition for hydrogen production. Furthermore, we did the gene-manipulation with more challenge, and then succeeded in injection of plasmid into bacterium.

We proposed a new hydrogen fermentation process. The facility is composed of one fermentation vessel and one high-temperature reactor in which cavitating jets are used. Best cavitating condition was found to be 5MPa of injection pressure in destroying agglomerated material and not giving damage to bacterium cell. Overflowing bubbling behavior did not occur when cavitating jets were injected to waste-molasses. Next, we showed clearly that cavitating jets were efficient to liquidization of fermentation sludge bacterium. Furthermore, we conducted computational fluid analysis, and proposed a new fermentation vessel from the analytical results. In a new vessel, hydrogen bubbles swirl many times not being sunk

to high temperature reactor, and move to fermentation surface.

Last, on the basis of the results above, we carried out the feasibility studies on hydrogen production plants.

## 1. はじめに

研究初年度であった昨年度は、金属イオンの注入により、水素生産能力を2倍以上に高めることができる、という成果を得た。本年度は、高温菌を探索し、飛躍的な水素生産能力の向上に見通しをつけることを目的とする。更に発酵原料基質の拡大や、新しい発酵システムの検討等も実施し、研究のスコープも大幅に拡大する。

内・外の有力候補地で菌体の採取を行い、スクリーニングにより最適な高温発酵菌を見出す。この有力菌に対して、水素収率や水素生成速度の特性を求め水素生産能力を明らかにする。本年度は、菌の探索のみならず、遺伝子組み替えにも着手する。原料基質として、グリセリンと生ゴミも扱う。

発酵システムとして、高温リアクタと発酵槽間を循環させる系に対し、蒸気のキャビテーションジェットを利用する新方式を提案する。この方式には、高温発酵場の実現や原料の混合・分散、汚泥の可溶化等の効果を狙うものであり、各項目に着手した要素試験を行う。更に、発酵槽における水素気泡の挙動を数値解析によりシミュレートし、発酵槽の新しい構成についても提案する。

以上の成果をもとに、昨年度も実施した経済性試算の内容を見直す。研究開発の進捗とともに、採算性の観点から、新規な水素発酵プラントの実現が近づくことを明らかにする。

## 2. プロジェクトの目的

前章の内容を繰り返すことになるが、図1に本研究の目的をまとめて示す。

最適高温菌種の選定が第一の目的である。このテーマは横浜国立大学が担当する。まず高温菌を探索する。採取位置は、海外でも実施することにした。

# 研究の目的



## 1. 菌選定による水素発生速度及び水素収率の向上

高温菌の探索  
遺伝子組み替えによる菌体改良  
原料基質の拡大  
(例：グリセリン、生ゴミ)

## 2. 水素発酵菌システム最適化の検討

改良型発酵システムの提案  
(1) 蒸気凝縮キャビテーション法による  
原料のミクロ混合とフロック菌体群分散の促進  
(2) 気(水素)/液(原料)分離の改善

図1 本研究の目的

高温菌を見出すことができれば、高温場の実現により水素生成速度の増大に結びつくことになる。

次に、水素収率を高めるため、人為的に水素生産に最適な菌を見出すべく遺伝子組み替えにトライする。

昨年度に扱った原料基質は、合成培地と廃糖蜜であった。本年度は、グリセリンと生ゴミについても検討することにした。

本プロジェクトにおける第二の目的は、水素発酵システムの最適化である。具体的にはキャビテーションジェットを用いる新しいプロセスを提案する。このテーマはパブコック日立㈱が担当する。

キャビテーションの作用は不明な点が少なくない。まして発酵プロセスへ応用した例は極めて限定されている。本研究では、様々な角度からキャビテーションによる効果あるいは弊害について明らかにすることを目的としている。

まず、蒸気凝縮キャビテーションジェットによる昇温特性を調べる。次に高圧水をキャビテーションジェットとして吹き込む手法により、細菌死滅への影響や汚泥フロック

の分散、さらに汚泥の可溶化についての特性を実験的に明らかにする。次いで数値解析により、気泡分離がスムーズにいく発酵槽の構造を提案する。

### 3. スケジュール

図2に研究工程を示す。

まず初めに高温水素発酵菌の探索を優先的に実施した。遺伝子組み換えによる菌改良の研究は、第3四半期から着手した。

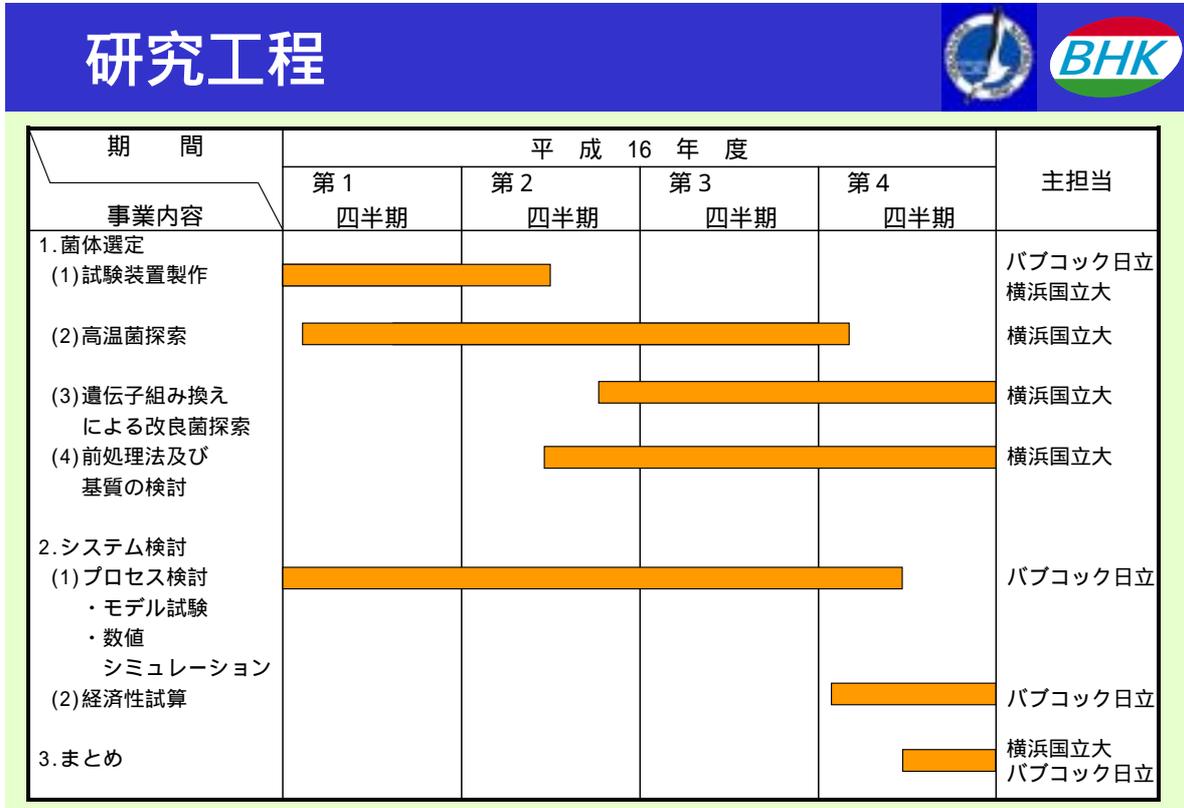


図2 研究開発スケジュール

そのため、遺伝子組み換えによる研究は、現時点では十分な成果に結びついていない。本報告では、遺伝子組み替えの考え方と途中経過について述べる。基質の拡大は、合成培地や廃糖蜜にとどまらず、本年度は生ゴミや生ゴミに魚のはらわたを加えたものを原料基質として実験的に試みた。さらに、パームオイルを原料とするグリセリンを基質とする水素生産量についても試算を行った。

システム検討のモデル試験は、バブコック日立(株)が別目的のために試作あるいは購入した装置類を流用して実施した。経済性試算は、昨年度の検討結果をベースとし、本年度の主として高温菌の成果を反映させたものである。

#### 4. 研究開発体制

本研究は、(財)エネルギー総合工学研究所からの委託により、横浜国立大学とバブコック日立㈱が分担する。体制を図3に示す。

横浜国立大学・環境生命学講座(谷生研究室)は、高能力の高温水素発酵菌の選定、及びそれらによる水素発生速度と収率向上の基礎的検討を行う。バブコック日立㈱・社会環境システム開発部は、新しい水素発酵システムの提案とそのシステム最適化の検討を行う。

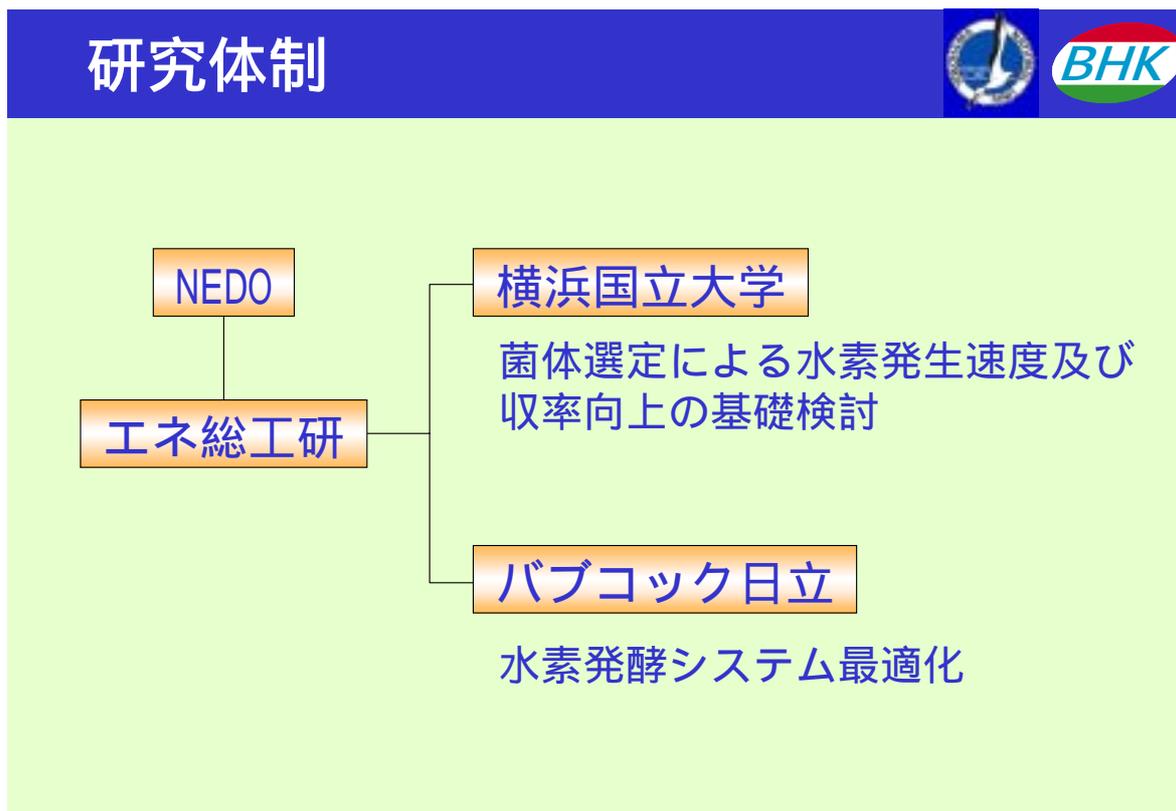


図3 研究体制と研究分担内容

## 5. 実施内容及び結果

本章では、高性能菌の選定(5.1～5.3 節)及び発酵システムの最適化(5.4 節)についてまとめて述べる。

### 5.1 高性能高温菌の探索

水素発酵に使用できる高温菌は、50～80℃にて生育できる種(株)とみなせる。このような高温菌は、意外にも身近な環境に生棲している。例えば、ボイラのドレン水が排出されている側溝などが一例である。一方、火山や高温泉の近隣地域や、亜熱帯・熱帯地方も有力な高温菌が見つかる可能性が高い。

本研究では、まず横浜国立大学構内を探し、さらに渡航が容易な海外の火山地帯や亜熱帯地域を探索することにした。

#### 5.1.1 採取調査

今回の調査では、ハワイ諸島(ハワイ本島とオアフ島)及び沖縄本島で菌の採取を実施した。各地の水溜りやため池等計五十箇所を採取し、含有する菌を供試した。図4に示すのは、今回の採菌探索で水素発生速度が最大の菌が採取できたポイントである。場所は、オアフ島の濁り水からなるため池である。ちなみにオアフ島は火山由来の島であるが、現在は休火山である。

## 菌採取調査



・ハワイ島、オアフ島及び沖縄にて菌を採取し供試した。



**場所: Oahu島**  
**採取日: 2004/11/7**

上図: ハワイと沖縄の採菌調査で水素発生速度が最大の菌が採取できた箇所



図4 菌採取地点の一例

図5は、今回採取した菌サンプルのリストを表にまとめたものである。50℃で増殖し、要するに高温菌で、しかも水素発生があった有力な菌を赤文字で示した。

このように、火山の地で熱帯・亜熱帯であっても、高温水素発酵菌の見つかる可能性は高いというわけではない。

## 採取した菌のリスト




採集場所	サンプル番号	住所	年月日	50	増殖	水素発生
オアフ島	1	Waimanalo	2004/11/7		×	×
オアフ島	2	Waimanalo	2004/11/7			×
オアフ島	3	欠				
オアフ島	4	Kaelepulu pond	2004/11/7			×
オアフ島	5	Kaelepulu pond	2004/11/7			×
オアフ島	6	Kaelepulu pond	2004/11/7		×	×
オアフ島	7	Kaelepulu pond	2004/11/7			
オアフ島	8	Oneawa bridge	2004/11/7			×
オアフ島	9	Oneawa bridge	2004/11/7			×
オアフ島	10	Hoomaluhia reservoir	2004/11/7			
オアフ島	11	Hoomaluhia reservoir	2004/11/7			
オアフ島	12	Hoomaluhia reservoir	2004/11/7			×
中略						
ハワイ島	31	Naalehu Primary School	2004/11/5			×
ハワイ島	32	Naalehu Primary School	2004/11/5		×	×
ハワイ島	33	Punaluu Golf- Pond	2004/11/5		×	×
ハワイ島	34	Punaluu Golf- Pond	2004/11/5			×
ハワイ島	35	Punaluu Golf- Pond	2004/11/5		×	×

図5 採取した菌リストと有力な高温水素発酵菌の例

図6は、増菌とガス発生に着目し、採取したサンプルのスクリーニングを実施しているところである。増菌操作は50 で実施した(左側の写真)。右側の写真は、スクリーニング検査を開始してから3～4時間後の状況を示すものである。 は多くのガスが発生したサンプルであり、有望と判断できるものである。一方 はガス発生が全く無く、ガスを発生する高温菌はまず生棲していないと見なせるサンプルである。



上図：増菌操作(50 )



右図：ガス発生検査

多量のガスが発生している例  
ガス発生が無い場合の例

図6 スクリーニング中のサンプル

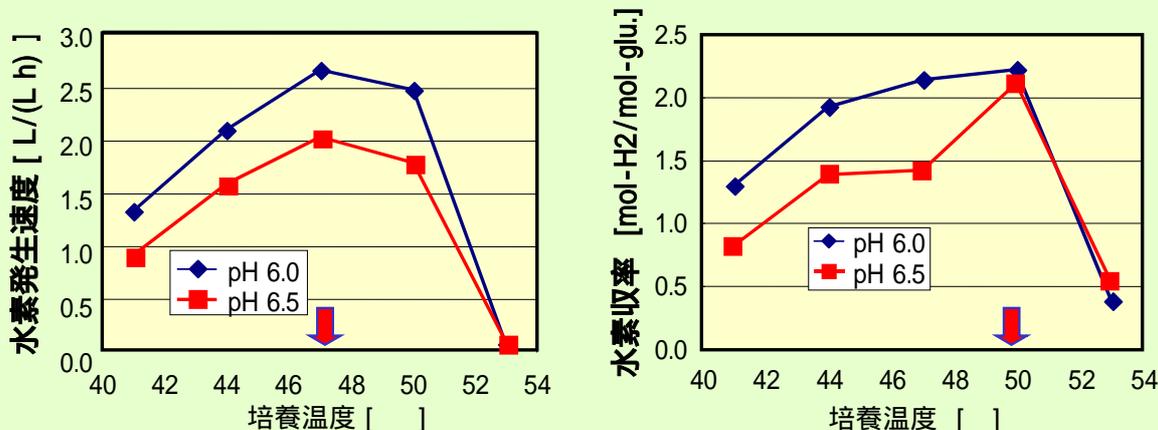
## 5.1.2 高温菌の特性(1)

図7は、見出した高温菌に対し、培養温度に対する水素発生速度及び収率の変化をまとめたものである。培養液の pH6.0 及び 6.5 をパラメータとしてデータを整理した。pH が異なっても大概の傾向は変わらない。培養液の温度がおよそ 45 の条件において、水素発生速度が最大となる。一方、水素収率は、ほぼ 50 の条件で最大となる。両特性から、この高温菌は、47~50 が水素生産にとって最適な発酵温度であることがわかる。47 以下あるいは 50 以上においては、水素生産能力は低下する。

# 高温菌の特性(1)



高温菌(MesoPhilic)の水素発生速度および水素収率を調べた。



培養温度は、47～50 が最適．それ以上では、水素の生産速度及び収率が低下する．

図7 培養温度に対する水素発生速度及び収率の変化

## 5.1.3 代表的微生物の水素発生速度

ここで、水素を生産するものとして知られる既知の微生物の中で、本研究で発見した高温菌の位置付けについて述べる。

図8は各種微生物をリストにまとめたものであり、各々の水素発生速度を比較して示している。これらの微生物は、大きくA．光合成で水素を生成するタイプとB．発酵によって水素を生産するタイプの大きく二つのカテゴリーに分けられる。Aのタイプは光を必要とするのに対し、Bの発酵菌は光は不要であるが栄養源を要する。図中でA．水素発生のカテゴリーに括った5種は、水素発生速度が0.4～3 mmol/L·h といずれも低い。これに対し発酵のカテゴリーに入るタイプは、一桁近く水素生産能力が高い。

# 代表的微生物の水素発生速度



カテゴリー	倍加速度 h	水素発生速度	
		mmol/L h	mmol/g h
A. 光水素発生			
1. 酸素生成光合成微生物			
	4 ~ 24h		
	<i>Oscillatoria</i> Sp. Miami BG7	0.4	0.4
	<i>Anabaena cylindrica</i>	1.2	1.3
2. 酸素無生成光合成微生物			
	2.2 ~ 9h		
	<i>Rhodospseudomonas capsulata</i>	5.3	5.3
	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	3	2.5
	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 8703	-	10.4
B. 発酵水素発生			
1. 嫌気性バクテリア			
	0.16 ~ 2h		
	<i>Clostridium butyricum</i>	-	18
	<i>Clostridium beijerinckii</i> AM21B	17	25
	<b>新発見バクテリア(高温菌 MesoPhilic)</b>	119	26
2. 通性嫌気性バクテリア			
	0.25h		
	<i>Citrobacter intermedius</i>	11	9.5
	<i>Enterobacter aerogenes</i> E.82005 (従来菌)	11	17
	<i>Enterobacter aerogenes</i> HU-101 m AY-2 (連続)	58	

図8 各種水素発生微生物における本研究菌の位置付け

一連の我々の研究の中で、昨年度は *Enterobacter aerogenes* E.82005 を用いた (図中では「従来菌」と付記している)。この菌と比較し、本年度に発生した高温菌 Meso Philic は 10 倍近くも水素発生速度が大きい。

広島大学の西尾研究室の菌 *Enterobacter aerogenes* HU-101mAY-2 (HU は Hiroshima University の略) は、本研究で発見した高温菌 Meso Philic の約半分であるものの有力な「ライバル」と見なせるものである。広島大学の発酵は連続式で行われたものであるのに対し、本研究ではバッチ式であることに留意する必要がある。すなわち、本研究の高温菌は、更に水素発生速度を高めることができる可能性が高いわけである。

以上のように、本研究では従来までの実績に比べ、飛躍的に高い能力を有する菌の発見に至ったわけであり、大いなる成果と考えられる。

#### 5.1.4 高温菌の特性

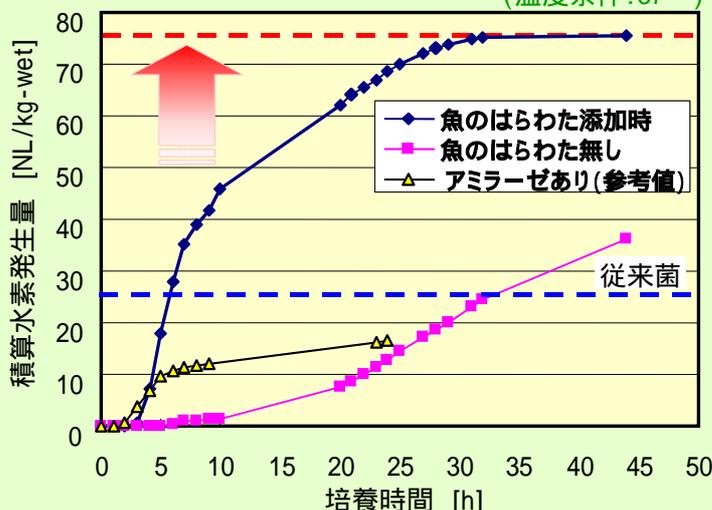
図9は、模擬ゴミを基質とし前出の高温菌を用いた場合の水素生成特性を示すものである。高温菌ではあるが、従来菌との比較のためここでは液条件を 37 とした。模擬生ゴミは、基質の条件を揃えるために、米飯や野菜はそれぞれ市販のパック食品及び冷凍食材を混合させて調整した。

## 高温菌の特性(2)



高温菌(MesoPhilic)を用いて、模擬生ごみを基質とした試験を実施した。

(温度条件:37 )



積算水素発生量は、75NL/kg-wetに向上。

図9 生ゴミを基質とする場合の水素生成特性

培養時間が20時間を越えた時点ではようやく目立った水素生成が始まり、培養が45時間を経過した時点の積算水素生成量は47NL/kg-wetとなる。従来菌における上限26NL/kg-wetを大幅に越えることができた。参考までにアミラーゼを加えたものも示すが、25時間経過時の成績は同等である。

一方、新鮮な魚のはらわたを加えたものは(魚のはらわたの割合は約1/3)著しく水素生成量が増大し、75NL/kg-wetまで向上した。魚のはらわたには、基質として水素発酵を促進する栄養分が含まれていることが分かる。

以上をまとめると、本研究において見出した高温菌を用いると、常温に近い条件であっても、従来菌に比べて生ゴミからの水素生成を増大できる。水素収率は、従来菌に比べて少なくとも2.5倍以上に向上できることがわかった。これは、本高温菌にはデンプン質を直接資化する能力があるためではないか、と推察される。

### 5.2 原料基質の検討

マレーシアは近年になり、天然ゴムからパームオイルへと資源産業を大きく転換した。パームオイルはヤシの実を原料とし、多くは日本に輸出され石鹸等の原料となる。このパームオイルはメチルアルコールとエステル化反応させることにより、バイオディーゼル油とグリセリンが生じる。グリセリンは、他の生産過程でも大量に生じ、純度のさほど高くないものは日本国内では余剰となっている。

本研究では、このグリセリンを原料基質として取り上げることとする。バイオディーゼルの普及に伴い、余剰物のグリセリンが廉価に出回ることが容易に予想されるか

らである。

### 5.2.1 グリセリンの検討

図 10 は、パームオイル由来のグリセリンを基質とする水素生産のスキームを説明する図である。

パームオイルは、メタノールとのエステル化反応によってバイオディーゼル油とグリセリンに分解する。高濃度のグリセリンは、そのままでは水素発酵の栄養基質にはできない。グリセリンは約 100 倍に希釈して水素発酵に供試する。グリセリンの水素発酵からは、エタノール・水素・CO<sub>2</sub> が 1 : 1 : 1 の等モル比で生じる。このようにグリセリンを基質とする水素発酵の場合、水素 1 モルが生産される際に、エタノールも 1 モル生産されるという特徴がある。

## 原料気質の検討 ( 1 )

・パームオイルから副生するグリセリンを原料基質として検討した。

(1) Palm Oil + Methanol → Bio-diesel oil + Glycerine

$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{OCOR}_1 \\   \\ \text{CH} - \text{OCOR}_2 \\   \\ \text{CH}_2 - \text{OCOR}_3 \end{array} + 3\text{CH}_3\text{OH}$	$\begin{array}{c} \text{R}_1\text{COOCH}_3 \\ \text{R}_2\text{COOCH}_3 \\ \text{R}_3\text{COOCH}_3 \end{array}$	$+$	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{OH} \\   \\ \text{CH} - \text{OH} \\   \\ \text{CH}_2 - \text{OH} \end{array}$
--	---	-----	--

(2) Glycerine → Ethanol + Hydrogen + Carbon dioxide

$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{OH} \\   \\ \text{CH} - \text{OH} \\   \\ \text{CH}_2 - \text{OH} \end{array}$	$\rightarrow$	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH} + \text{H}_2 + \text{CO}_2$
--	---------------	--

培養前後の成分の比較

図 10 パームオイル由来グリセリンを原料基質とする水素とエチルアルコールの生産

### 5.2.2 水素及びエタノールの生成量

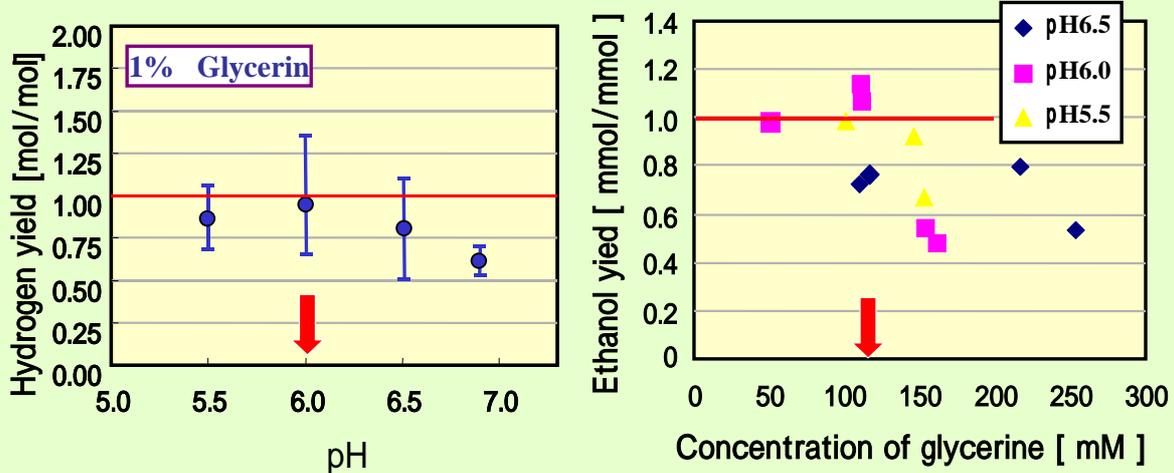
グリセリンを原料とした場合、水素生成量に及ぼす pH の影響及びエタノール生成量に及ぼすグリセリン濃度の影響について調べた。結果を図 11 に示す。

1 %濃度グリセリン水溶液を対象に、pH を 5.5 ~ 6.9 まで変化させて調べた。プロットの点は、ばらつくデータの算術平均値である。ばらつくことを認めた上で、これら算術平均値を見比べると、pH 6 において水素生産量が最大になることがわかる。

## 原料気質の検討（２）



・グリセリンから副生する水素及びエタノールの発生量について検討した。



最適なpHは6.0。pH 6.0以上では水素発生量が低下。  
エタノール発生量から、グリセリン濃度は、約100mMが最適。

このグラフには「NEDO-Grant」および「NEDO助成事業」で得られたデータも併せて記載しています。

図 11 グリセリンを原料とする水素及びエタノールの生成量

一方、pH=6.5、6.0及び5.5をパラメータとして、グリセリン濃度を50~250mMの範囲で変化させ、エタノール生成量が最大になる条件を求めた。この結果も、データはばらついているものの、グリセリン濃度は高過ぎても低過ぎてもエタノール生成量は減少し、グリセリン濃度約100mMにおいてエタノール生成量が最大になることがわかる。

### 5.2.3 水素生産量の試算

パームオイル由来のグリセリンを原料とする水素生産量を試算した。結果を図12に示す。

# 原料基質の検討(発生量試算)



・パームオイル由来グリセリンを原料とする水素の発生量を試算した。

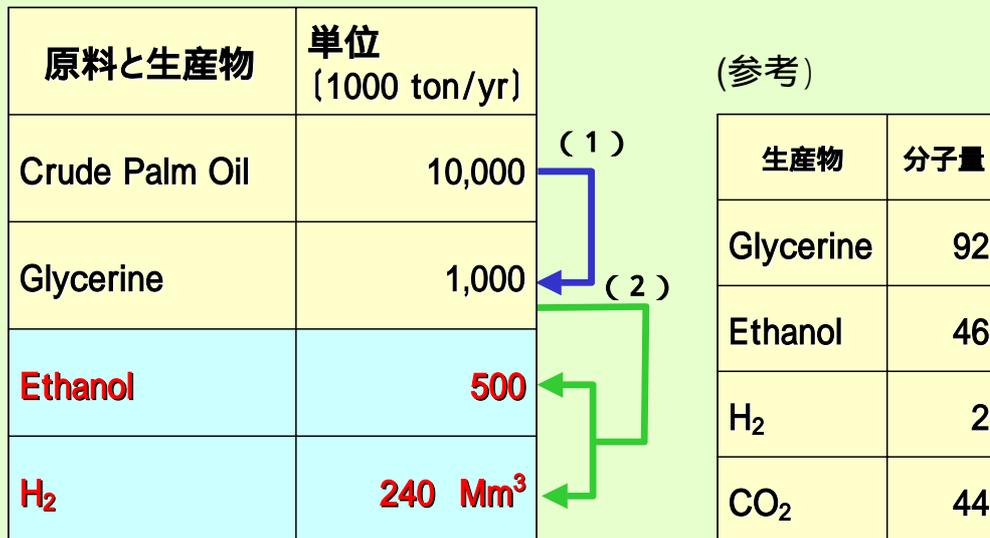


図 12 パームオイル由来粗グリセリンを原料とする水素生産量の試算

マレーシアにおける原パームオイルの年間生産量は1千万トンと膨大である。これを全部図7に示すように、バイオディーゼル用に供すると仮定する。このパームオイルからは、年間1,000,000トンの粗グリセリンが生産され、エタノールは50万トンそして水素は240Mm<sup>3</sup>が生産される。要約すれば、1トンのパームオイルから約24m<sup>3</sup>の水素を生産できることになる。

### 5.3 遺伝子組み換えによる水素収率の改善

発酵を利用すると水素収率は最大でも「4」で頭打ちとなる。これを、呼吸を利用するすなわち好気性菌を利用するように遺伝子組み換えを行えば、収率を高めることができる、と考えられる。この考え方を模式的に表して図13に示す。図の左側に示すTCAサイクルを利用するわけである。図中でElectron Transportと記述するように、電子伝達鎖を操作することになる。このようにすれば、図の右下に表すように、理論上の収率を最大「10」とすることができる。

図14は、電子伝達鎖のタンパク質配列と遺伝子改良のスキームをまとめたものである。プラスミド(遺伝子が付いている短い遺伝子の輪)を当該細菌ゲノムに注入する。尚、図右下の写真における試験管の蛍光状の輪は、分子量を知るためのマーカである。

# 呼吸を利用した水素収率の改善



・遺伝子組替えによる水素収率の改善を検討した。(好気性菌利用)

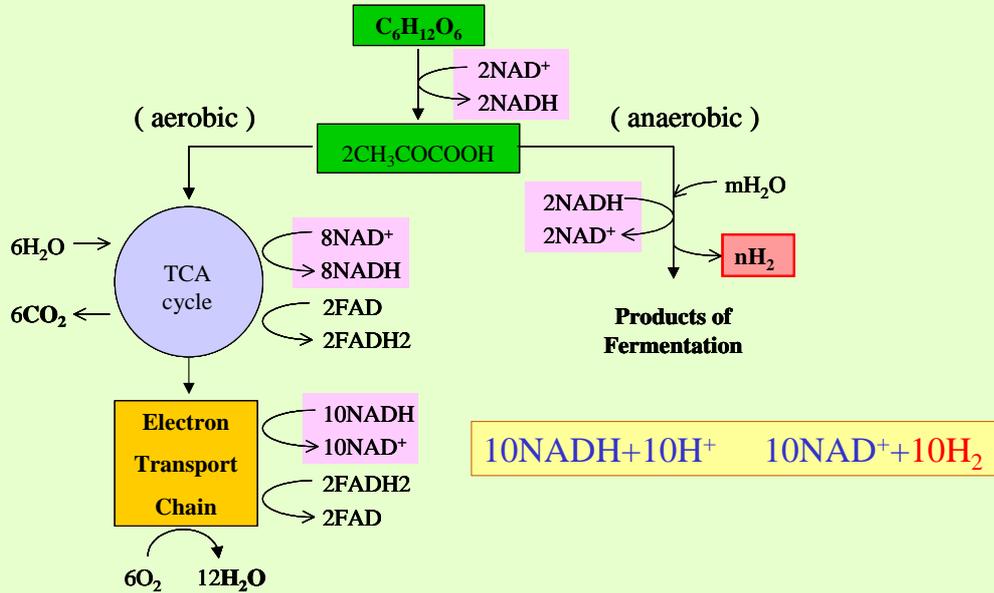


図 13 呼吸を利用した水素収率の改善

# 電子伝達鎖のタンパク質配列と遺伝子改良



・以下の遺伝子改良を実施した。

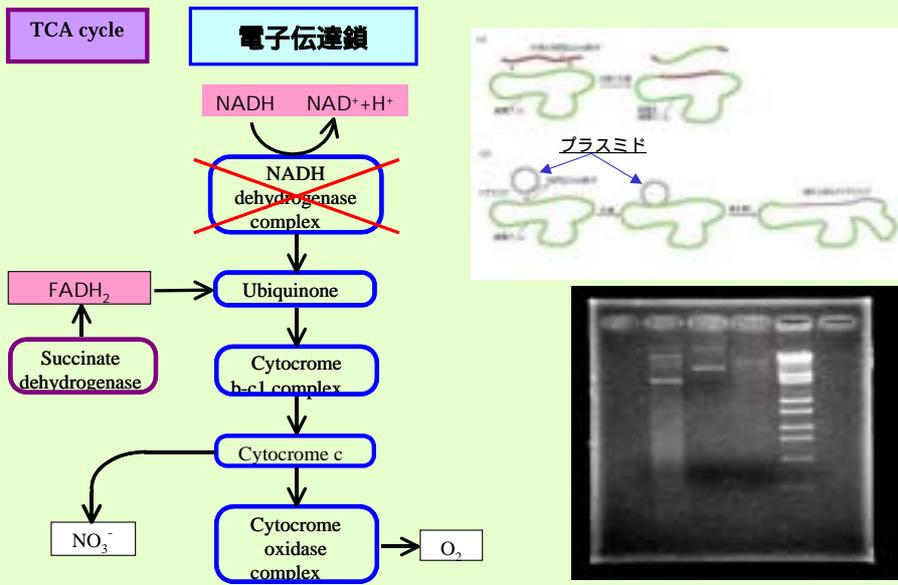


図 14 電子伝達鎖のタンパク質配列と遺伝子改良

図 15 は、遺伝子改良操作方法を示すものである。本年度は、図中左側の「DNA 結合ブ

ラスミドをバクテリアに挿入」まで進捗した。これに続く「プラスミドを内包したバクテリアの増殖」以降は次年度の課題としたい。

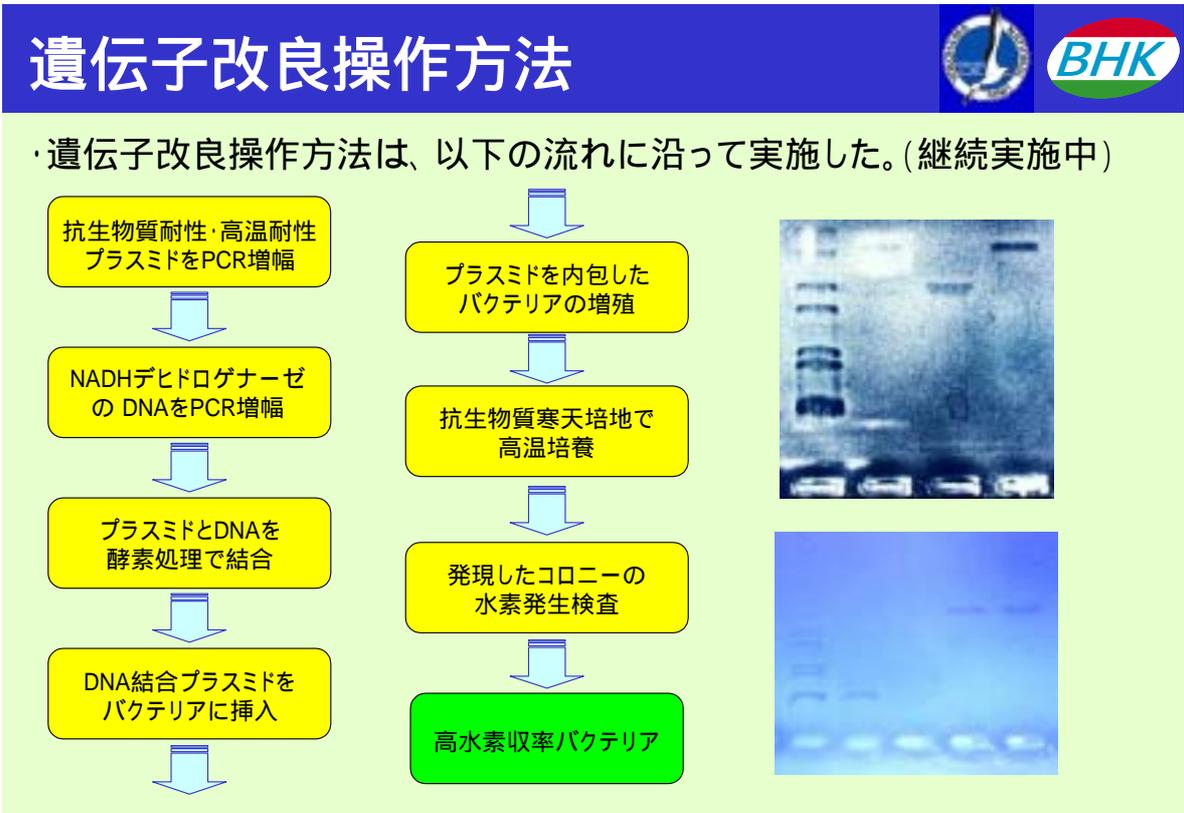


図 15 遺伝子改良操作の方法

#### 5.4 水素発酵システムの検討

バブコック日立(株)では、これまでキャビテーションジェット(Cavitating Jets)を様々な排水処理に応用してきた。殺菌や下水汚泥現用減容、さらに後者を発展させた発酵汚泥の可溶化等である。キャビテーションの作用(メカニズム)については不明な点が少ないが、原理は気泡が急速崩壊する際に生じる衝撃力で「固体が破壊」することである。

本研究では、このキャビテーションジェットの作用を積極的に活用する新しい発酵システムを提案する。ねらいは、まとめると以下ようになる。

原料基質の微細化

破壊したり、あるいは凝集体を分散させる

ミクロ及びマクロな混合促進

ジェットによりマクロな混合が生じ、そしてキャビテーションの作用が加わりミクロな混合が進むと期待

高温発酵用の昇温

蒸気をリアクタへ吹き込む昇温の場合には、強い凝縮作用による凝縮キャビテーション(この表現は学術的には認知されていない)も活用できる。

水素発酵菌は、凝縮する特性(発酵液中で雪のように見える)があるが、水素生産量増大にとってこの凝集を維持した方が良いのか、あるいは分散させた方が有効かはわからない。

尚、少なくとも百リットル以上が必要なモデルリアクタ用の供試液として、横浜国立大学における水素発酵液は大量に用意できない。そこで、廃糖蜜と食品工場排水汚泥を用いることにした。

さらに、水素気泡の安定な浮上と循環ラインへの吸込みは抑制を主目的として、発酵槽の数値シミュレーションを実施した。

#### 5.4.1 キャビテーションを利用する新システムの提案

図 16 に、本研究において提案する新システムの概念を示す。

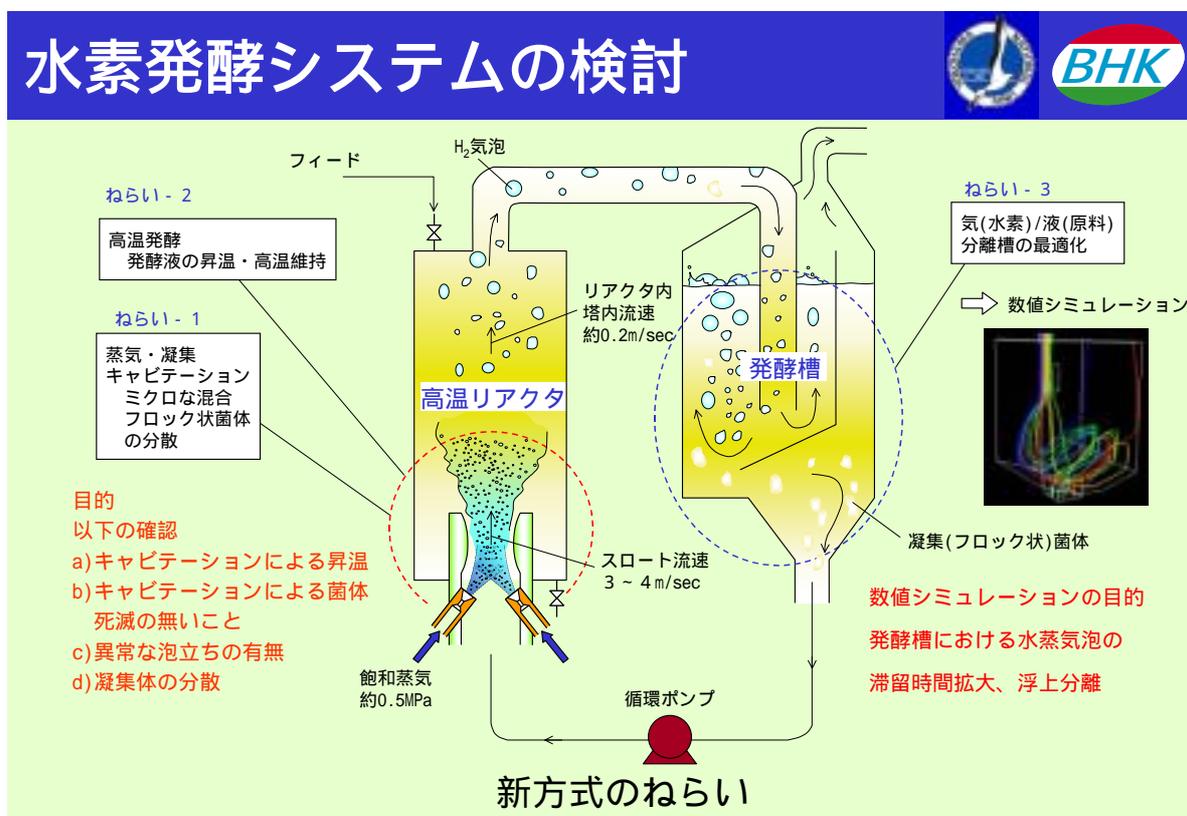


図 16 キャビテーションジェットを吹き込むリアクタと発酵槽を循環させる新システム

基本的な構成は、キャビテーションジェットを吹き込む高温リアクタと発酵槽からなり、水素発酵液を循環させる準パッチ式である。原料のフィードは高温リアクタの上方から行われ、スラッジは高温リアクタの底部から抜き出される。

高温リアクタの底部には、飽和蒸気(約 0.5MPa)を吹き込むノズルが複数個装着されている。この飽和蒸気は凝縮キャビテーションとなり、まず発酵液を昇温したり(起動時)、高温に維持する機能がある。更に、キャビテーションの作用によってマイクロ・マクロの両混合を促進したり、フロック状凝集体の分散効果も期待できる。本図には記していないが、発酵汚泥の可溶化にも応用できる。

本研究における、このリアクタ部の検討目的は、

- a) 蒸気の凝縮キャビテーションによる昇温特性の把握
- b) キャビテーションによって菌体が死滅しないことの確認
- c) キャビテーションによって、原料に異常な泡立ち(これが生じると水素生産を阻害する)が生じないことの確認
- d) フロック(凝集体)の分散
- e) 汚泥の可溶化

の5項目である。

高温リアクタ及び発酵槽において水素気泡が生じるが、本研究では、発酵槽において水素気泡の滞留時間を長くするとともに、高温リアクタへの最流入を抑止する気/泡分離機能を持たせることを目的とする。そのために、数値解析を実施する。

#### 5.4.2 キャビテーションが菌体に及ぼす影響

ここでは、キャビテーションジェットによる菌体死滅の割合について調べた。横浜国立大学の基礎試験から百リットル以上のまとまった量の発酵液を入手することは困難であるため、側溝の汚水を用いることにした。後述する(5.4.4)余剰汚泥では菌体が高密度すぎるため、側溝の汚水は発酵液に近いものとして使用することにした。汚水は、呉市の阿賀地区で採取した。この汚水の由来は不明であるが、雨水に生活排水が混じったもののようである。この汚水中には一般的な雑菌に加えて大腸菌等も生棲しているが、一般細菌用の簡易試験紙法で分析した。試験紙は柴田化学(株)製である。

図 17 に、試験方法とキャビテーションジェットの噴射圧力に対する菌体死滅等の変化を示す。汚水からは、まずフィルタで枯葉やビニール破片等の異物を除いた。液槽に入れた汚水は、水中ポンプによりリアクタ内へ送給され、液槽へと戻る。試験はワンパス(一度だけリアクタを流通させる)で実施した。

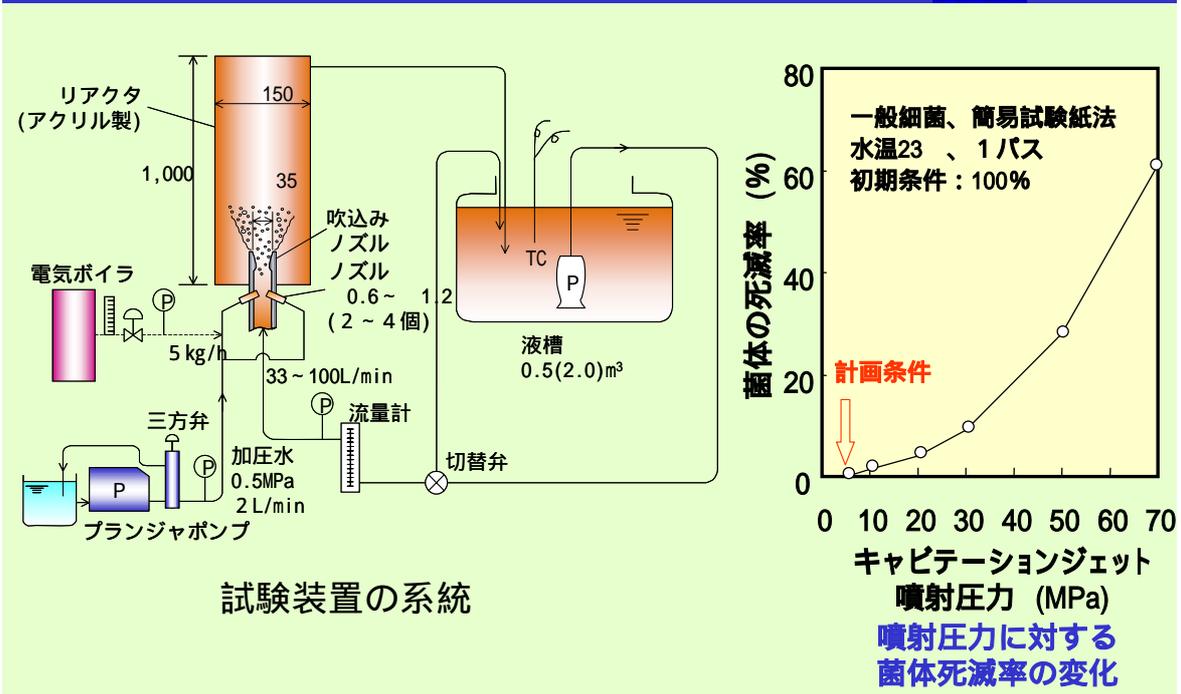


図 17 キャビテーションジェットの吹き込みが菌体に及ぼす影響

菌体の死滅等は、リアクタ出口の生体菌数(試験紙上ではコロニーとしてカウントされる)を、初めに液槽に入れた汚水中の生体数で割ることにより求めた。リアクタへは、プランジャポンプで加圧された清水がキャビテーションジェットとして吹き込まれる。この清水による「希釈」は死滅等を求める際に補正したため、死滅率中には「希釈」の影響は入っていない。

図中の右側が試験結果である。キャビテーションジェットの噴射圧力の増加とともに菌体の死滅等は上昇する。しかし、本研究で計画している 5 MPa 程度の噴射圧力では、菌体の死滅率は 0% に近いことがわかる。したがって、発酵液中へのキャビテーションジェットの吹き込みが、その噴射圧力が 5 MPa 程度であれば、発酵菌を死滅させてしまう不具合は生じないことがわかる。

本試験装置を用いて、リアクタ～液槽の系全体の昇温状態を調べた。高压水のキャビテーションの代わりに、電気ボイラから飽和蒸気(圧力 0.5MPa、流量 5 kg/h)を吹き込み、凝縮キャビテーションを発生させた。液槽の水(湯)オールドアップは約 2 トンである。試験は、8 月下旬に室内で行った。室には換気扇があるのみで冷房は行っていない。配管には、断熱保温施工は特に実施しなかった。

水温はゆっくり上昇し、約 6 時間で 24 から 60 へと上昇した。発酵槽は急速起動が必要なわけではないので、この程度の昇温速度で十分ではないかと思われる。サイトが南西諸島で、装置が天井付きの屋外置きになることを考えれば、本試験結果が大まかな目安になると考えられる。サトウキビ工場では、場内の余剰

蒸気を用いることで高温発酵が実現すると考えられる。

#### 5.4.3 廃糖蜜を用いる試験

下水処理場の余剰汚泥や食品工場の排水汚泥にキャビテーションを発生させると、激しい泡立ちが生じる。この泡は、キャビテーション気泡とは別であって、サイズ数mm～数cmの大きなものである。このような挙動は、バブコック日立㈱のこれまでの研究で経験し明らかになったものである。

水素発酵槽において、特に液面でこのような泡立ちが生じると水素が放出されにくくなり、泡の内側界面に生棲する水素発酵菌が自身が生成した水素を自身の栄養源として消費してしまう。したがって、水素発酵においては、液面の泡立ちを極力抑制する必要がある。

本研究では、図 17 に示す試験装置(リアクタ本体は透明なアクリル製)を用いて、循環する廃糖蜜に清水のキャビテーションジェットを吹き込む試験を行った。この廃糖蜜は、三井製糖㈱の白精糖生産過程で生じたものを関連商社を通じて有償で入手したものである。廃糖蜜は初め 5 倍に水で希釈したが、循環中に清水のキャビテーションジェットを吹き込むので、最終的には約 10 倍の希釈となった。キャビテーションジェットの噴射圧力は 5 MPa である。図 18 に、リアクタ上部の糖蜜水液面の写真と、循環タンクの液面の写真を示す。危惧された異常な泡成りは認められなかった。汚泥中には界面活性剂的な作用をする微量成分が含まれているのに対し、糖蜜はより「ピュア」であったことがこの違いの原因であると考えられる。

### リアクタへのキャビテーションジェット噴射(2)



(1) リアクタ頂部液面

(2) 槽内液面

→ 糖蜜の場合、リアクタ内部及び槽内に異常な泡成りは認められなかった

図 18 キャビテーションを発生させた糖蜜水の液面

#### 5.4.4 発酵汚泥に対する可溶化の効果

排水処理における活性汚泥処理においては、生分解されにくい汚泥すなわち菌体を可溶化することで生分解性を向上させて、余剰汚泥排出量を減らす試みがなされている。水素発酵プロセスにおいても、発酵液から余剰汚泥が生じる。この余剰汚泥を強制的に減らすことで、その分水素の生産量を拡大できる、という期待が持てる。

横浜国立大学で基礎研究中の水素発酵液から可溶化試験に使用可能な量の汚泥を得ることは困難であるため、バブコック日立が参画した平成 13・14 年度の地域新生コンソーシアム事業のモデルプラント試験で得られたメタン発酵汚泥を用いて実験の結果を紹介する。図 19 に試験結果として、可溶化とバイオガス増量の効果を示す。試験は準バッチ式であり、図左上に示すように、メタン発酵汚泥をスネークポンプで 1 ~ 2 MPa まで昇圧し、キャビテーションジェット用のノズルを介してリアクタへ吹き込み、循環させながらこの処理を繰り返す、というものである。

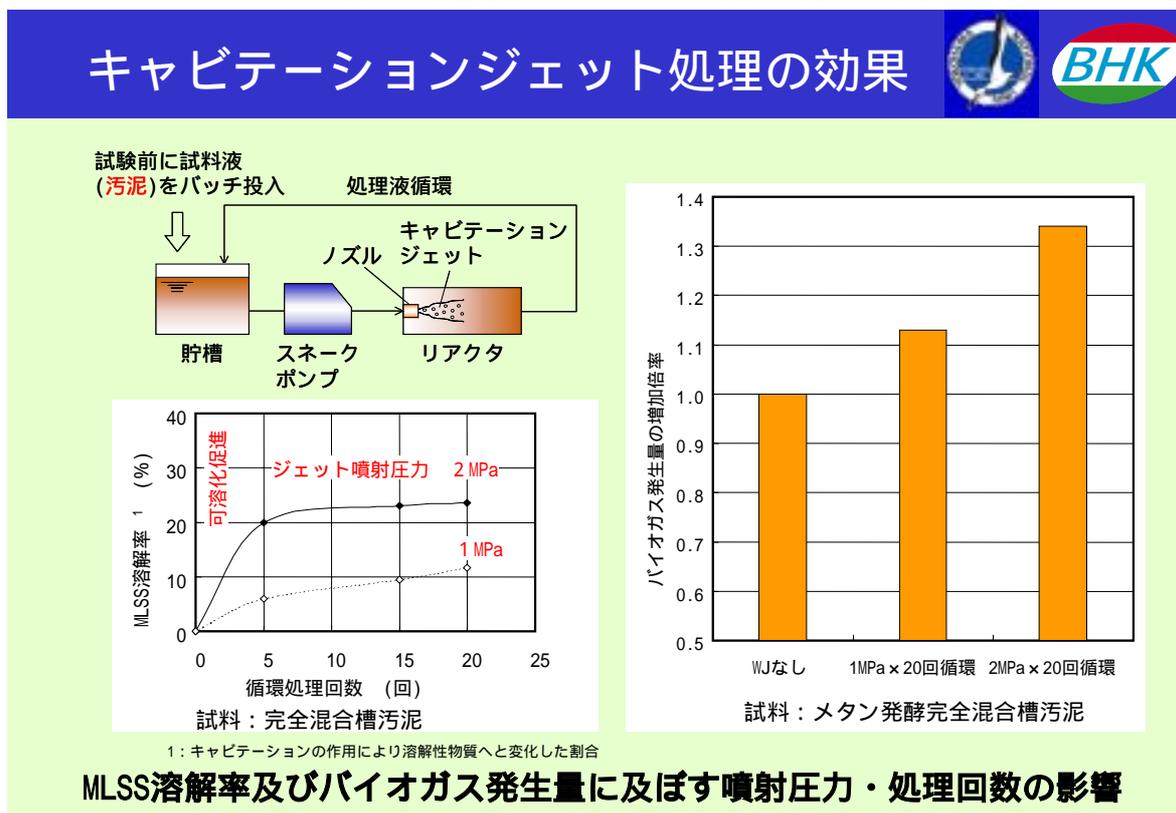


図 19 キャビテーションジェットによる汚泥の可溶化とバイオガス増量への効果  
(平成 13・14 年度の地域新生コンソーシアム事業の成果からの引用)

図左下は、キャビテーションジェット処理の循環回数に対する MLSS 溶解率の変化を整理したものである。MLSS とは、Mixed Liquor Suspended Solid の略号であって、キャビテーションの作用により溶解性物質へと変化した割合を示している。MLSS 溶解率が上昇するという事は、菌細胞膜内から溶出する物質が増加するこ

と、すなわち可溶化が進むということを表している。試験結果は、キャビテーションジェット処理において、明らかに可溶化が進むことを示している。また、ノズルからの吐出(噴射)圧力が高いほど、また循環回数が多いほど可溶化の程度が高まることがわかる。

図右には、メタンを主成分とするバイオガス発生量の変化を示す。キャビテーションジェット処理を行わない場合を「基準」として比較すると、二十回循環の場合、噴射圧力 1 MPa のキャビテーションジェットでは約 13%、さらに噴射圧力 2 MPa まで高めると 1.34 倍までバイオガス量が増大することがわかる。

高性能菌のように一気に数倍まで増加させることは難しいものの、このようなキャビテーションジェット処理によるシステム改良によっても、バイオガス量を増大させることができることがわかった。

なお、ここでは可溶化のみに着目したが、キャビテーションには混合や凝集体を分散させる作用があるので、この効果も相乗してバイオガス量の増大へ結びついたものと考えられる。

#### 5.4.5 凝集体微細化への効果

生ゴミのような不均質な原料基質をより微細化できれば、水素生産に有効であると考えられる。

本研究では、食品工場の排水処理施設の活性汚泥を入手し、キャビテーションジェット処理試験を行った。試験方法はワンパス処理とした。活性汚泥を噴射するポンプはプランジャポンプで、ここでは最大 70MPa まで吐出圧力を高める試験を行った。

図 20 は、キャビテーションジェットの噴射圧力に対する凝集体サイズの変化をまとめたものである。縦軸の凝集体サイズは、対数目盛上に表記していることに注意されたい。凝集体(フロック)のサイズは、実体顕微鏡で測定した。

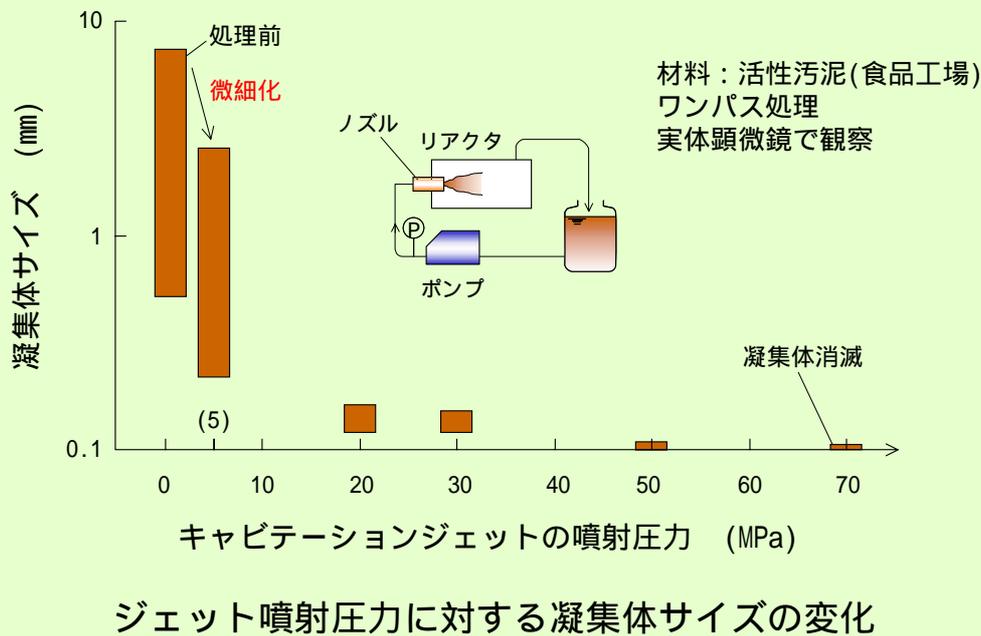


図 20 キャビテーションジェットの噴射圧力に対する凝集体サイズの変化

噴射圧力の上昇とともにフロックのサイズは急速に減少し、20MPa 以上になると実質的にフロックは消滅したものと見なせる。本研究では 5 MPa を噴射圧力の目標にしているが、この条件でもフロックのサイズは処理しない場合に比べて約 1/10 に小さくできることがわかる。

以上の結果から、キャビテーションジェット吹き込みによる処理は、凝集体(フロック)の分散・破壊に有効であることが実施された。

#### 5.4.6 発酵槽/気液分離の検討

5.4.1(図 16)で示したように、本研究ではリアクタと発酵槽を循環させる発酵システムを提案している。発酵槽においては、生成した水素気泡を再びリアクタへは戻さず速やかに浮上させる必要がある。ここではリアクタから供給される発酵液を、発酵槽内で旋回させる方式を数値シミュレーションにより検討した。

図 21 に数値解析結果を示す。乱流モデルとしては LES(Large Eddy Simulation) を用いた。計算条件として、液の流れ場を作り出し、その中に水蒸気泡を投入して粒子挙動を計算した。解析結果を図の右側に示すが、発酵槽の入口管(ここではノズルと呼ぶ)から気泡を 40 個飛ばした結果、発酵槽の底部に設けた出口配管から液に同伴して出るものは無かったことがわかる。したがって、発酵槽への液巡回投入は妥当な手段であると思なせる。

# 経済性試算(概算)



昨年度に対する向上・変更内容：収率 1 → 2.5  
速度 10倍

廃糖蜜 3,500 ton/年・工場

収率 1 のケース・・・130,000m<sup>3</sup>の水素生産/年・工場

収率2.5のケース・・・325,000m<sup>3</sup>の水素生産/年・工場

プラント建設コスト水素生産速度10倍に向上したため 6,000 3,000万円(仮定)に低減

< 水素売価 / Case : 収率2.5 >

3年で回収・・・約60円 / m<sup>3</sup>

5年で回収・・・約40円 / m<sup>3</sup>

建設費回収後の利益

水素売価40円 / m<sup>3</sup>と仮定：475万円 / 年

ランニングコスト(計算条件)

蒸気(低温熱源) …… 0円/年

NaOH(CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>分離用) …… 0円/年

汚泥引き取り …… 175万円/年

(有効活用考慮せぬ場合)

人件費 …… 600万円/年

定検費用 …… 50万円/年

合計 825万円/年

## 目標

将来の水素価格低落への対応の為

**更なる水素生産能力アップ**

**シンプル・低コストな**

**プラントの設計・製作**

(プラント建設コスト2,000万円以下)

図 21 発酵槽における気液分離挙動の数値解析

今後の課題は、

流れ場のコントロールに邪魔板をより巧みに利用すること

実機設計に資するスケールアップ

の2点である。

## 6. 経済性試算

昨年平成 15 年度に続いて、本年度も成果をベースにして経済性試算を実施した。図 22 に結果をまとめて示す。昨年度との違いは、

- ・収率が 2.5 倍に増大
- ・速度が 10 倍に増大

したことである。廃糖蜜を 3,500 トン/年排出する工場であれば、収率 2.5 の場合年間 325,000m<sup>3</sup>の水素を生産することになる。

図 22 経済性試算の結果

水素生産速度が増大することは、設備もコンパクトにできることである。速度が 10 倍になったからといって、設備コストが 1/10 になるわけではない。ここでは、速度 10 倍によって、設備コストが 1/2 になると仮定した。すなわち 3,000 万円である。収率 2.5 で速度 10 倍、すなわち水素生産能力が 25 倍となるケースにおいて設備投資回収を 3 年で行おうとする場合には水素の売価は約 60 円/m<sup>3</sup>、回収に 5 年を要する場合には水素の売

価約 40 円/m<sup>3</sup> が大まかな目安となる。

ランニングコストの大半は、人件費(労務費)と汚泥の産廃扱い引取費用である。南西諸島の地域性や設備を扱うに要する熟練度や専任度を考えると、600 万円/年の人件費は高すぎるかもしれない。設備が順調に稼動する場合には、一日数回の見回りのみでよく、専任者は不要である。しかし、想定外の不具合が生じないとは限らぬことや、福利厚生費までも含めることにして、600 万円を計上した。原料基質を加熱するために必要な蒸気や、生成ガスから CO<sub>2</sub> を分離するための NaOH は、ともに工場内に余剰物として十分にあるためコストは ' 0 ' と見なした。また、年間の補修費用は、主要機器の交換等を行わないと仮定し、50 万円とした。

水素の売価を 40 円/m<sup>3</sup> とすると、水素販売による利益は 475 万円/年となる。

今後の目標は、

水素の生産能力(収率、速度)の更なる増強

よりシンプルな構造で低コストプラントの提供

である。南西諸島のサトウキビ工場が顧客の場合、プラント設備費は、2,000 万円以下/基を目標の目安としたい。

## 7. まとめ

本研究における成果をまとめると以下ようになる。

### [ ]高温発酵菌の探索について

- (1) ハワイ及び沖縄で調査・探索を行い、50℃で活発に水素を生成する高温菌(Meso Philic)を発見した。
- (2) 上記菌を用いることで、従来菌に比べて水素収率が2.5倍に増加した。
- (3) 高温発酵菌であるため、水素発酵速度が10倍に向上した。
- (4) 上記(2)(3)により、水素の生産能力は $2.5 \times 10 = 25$ 倍に高めることができる。
- (5) 原料基質としてグリセリンを用いる場合、液体代謝物はエタノールとなる。
- (6) 原料基質が模擬生ゴミの場合には、生ゴミ1kgから75NLの水素を生産できる。また上記高温菌には、デンプン質を直接資化できる能力のあることがわかった。
- (7) 遺伝子操作による菌体の改良を試み、プラスミドの組み込みに成功したが、この菌種の高温培養にまでは至らなかった。

### [ ]水素発酵システムの検討

- (1) キャビテーションジェットを吹き込むリアクタと発酵槽を組み合わせる新しい水素発酵システムを提案した。
- (2) 南西諸島を想定し、高温発酵場実現のため蒸気の凝縮キャビテーションを利用すると、発酵液のホールドアップ2トンの場合には約6時間で60℃に昇温する。
- (3) 噴射圧力5MPa程度のキャビテーションジェットでは、汚水中の菌体は死滅しない。
- (4) キャビテーションジェットの吹込みによって廃糖蜜には異常な泡立ちは生じない。
- (5) キャビテーションジェットを用いると、排水汚泥中のフロック(凝集体)を分解することができる。
- (6) 数値解析を行い、気/液分離機能を備える発酵槽の構成を提案した。

### [ ]経済性試算

- (1) 上記[ ](2)~(4)の成果に基づき、プラント建設コストを安くできること、また投資回収期間も短縮(3~5年)できる可能性が高くなったことを定量的に検討した。

## 8. 今後の課題

図 23 に次年度以降の課題をまとめて示す。

まず、収率を次年度の成果 2.5 からさらに 2 倍すなわち収率 5 を目指したい。このためには遺伝子改良や高性能菌の探索を鋭意継続する必要がある。

### 今後の予定



#### 1) 水素収率向上を目指す(5 以上)

遺伝子改良および優良菌の探索継続

#### 2) 発生速度の向上を目指す(20 倍:目標)

更なる高温菌の探索(50 以上 60 )

#### 3) 原料基質の拡大(グリセリン、海藻 等)

#### 4) 発酵槽の構造検討(水素発生速度増大に寄与)

#### 5) 全体システムの検討(発電・廃液処理等も含む)

図 23 次年度以降の課題

次に水素生成速度の増大が目標である。本年度は、50 まで活性のある高温菌で従来比約 10 倍の速度アップを達成できた。次年度は倍増させて、従来比 20 倍とするのが目標である。60 で最大活性を示す高温菌の選定がキーポイントである。

収率 5 倍と速度 20 倍がともに達成できたならば、それらを組み合わせることで、「一年前には単なる「大風呂敷」であった水素生産能力 100 倍が実現できることになる。

原料基質の拡大も課題である。グリセリンと生ゴミは本年度に継続して研究を進める物質である。海藻(マンニトール)は、本年度は着手できなかったが、次年度には本格的に扱いたい、と考えている。この他、有効な用途が無く大量に排出される食品廃棄物である大豆の絞り粕についても、適切な前処理技術を見出したいと考えている。

水素生産速度増大に貢献できる発酵システムについても検討を進めたい。バブコック日立におけるこれまでの研究によると、常圧の場合、水温 50~60 でキャビテーションの威力は最大となることが知られている。高温発酵の条件は、キャビテーションを活用するのに好適な場所であると言える。

さらに、ここまで断片的にしか検討対象としてこなかった廃液や汚泥の有効活用や処

理技術についても踏み込み、トータルシステムの検討も進めたいと考えている。

## 文献

- 1) 日本材料科学会編；微生物と材料、裳華房、(2001)
- 2) 佐藤；キャピテーション・ジェット法による洗浄技術の開発、日本液体微粒化学会誌、No.11、(1999)
- 3) 中村ほか、ウォータージェットを用いた下水汚泥減量化の検討、噴流工学、Vol.18、No.1、(2001)
- 4) 下平ほか；生ごみを中心としたメタン発酵システムの実証、第24回全国都市清掃研究発表会講演論文集、(2003)
- 5) 山本・西野；攪拌技術、佐竹化学機械(株)、(1992)

1. はじめに
2. プロジェクトの目的
3. スケジュール
4. 研究開発体制
5. 実施内容及び結果
  - 5.1 遺伝子操作による高水素生産菌への改良
    - 5.1.1 好気/嫌気状況での NADH の生成と再酸化
    - 5.1.2 電子伝達鎖破壊による水素収率の改善計画
    - 5.1.3 遺伝子破壊実験と結果
  - 5.2 電子伝達剤を使用した高水素生産機能の実証試験
    - 5.2.1 電子伝達剤のクーロン収率
    - 5.2.2 実験方法
    - 5.2.3 実験結果と考察
  - 5.3 採取調査と選別菌の性能検査
    - 5.3.1 合成培地での水素発生特性
    - 5.3.2 デンプン培地での水素発生特性
    - 5.3.3 擬似生ゴミ培地による水素生産と魚のはらわた添加効果
  - 5.4 Fed-batch 式連続水素生産への応用
  - 5.5 水素発酵菌による水素生産のフィージビリティの検討
    - 5.5.1 廃糖蜜を使用した連続水素生産
    - 5.5.2 廃糖蜜からの水素生産における原料コストの試算
    - 5.5.3 サトウキビからの水素生産における原料コストの試算
    - 5.5.4 水素生産における経済性試算
6. まとめ
7. 発表論文

## 和文要旨

発酵菌の水素生産性向上(横浜国立大学にて実施)

高温菌の探索を実施し、グアム、ハワイ、ブラジル、沖縄および本土各地において菌体を採取した。スクリーニングの結果見出した高温菌を用いることで、従来菌(*E. aerogenes*)に比べて水素収率で 2.5 倍、水素生成速度で 13 倍、すなわち水素生産量を 32 倍に高めることができるという結果を得た。HN001 株は 1g の菌体重量あたりでも 44 mmol-H<sub>2</sub>/h の速さで水素を生産し、従来のどの菌より速い速度で水素生産することがあきらかになった。さらに、従来菌の遺伝子操作による菌改質に着手し、直鎖組み込み遺伝子の合成に成功した。

水素発酵システム構築の検討(産業技術総合研究所にて実施)

酸素に代わる高い酸化還元電位を持つ有機物を電子受容体を使用し、電子伝達鎖を破壊した遺伝子操作菌の水素発生を検証する生物電池実験装置を構築、実証試験を試みた。その結果、水素生成、代謝反応とも高酸化還元電位物質を使用すれば嫌気状態と同様の効果を得ることが明らかになった。

## Abstract

We tried to get high hydrogen yielding mesophilic bacteria at everywhere we visited and every opportunity. By these efforts, we found many good bacteria. One of them, such as strain HN001, showed 2.5 times higher hydrogen yield and 13 times faster hydrogen production rate than the famous hydrogen producing bacterium *E. aerogenes*. This means that HN001 has 32 times higher hydrogen producing ability than *E. aerogenes*. The bacterium also showed a very high hydrogen production rate per unit dry cell weight at 44 mmol-H<sub>2</sub> g-dry cell<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. We also tried gene manipulation on *E. aerogens* to get high yield bacterium but not yet obtained good bacteria.

We constructed a microbial electric cell to prove the yield promoting theorem by gene manipulation. The electric cell affected on the productivity of cell mass and hydrogen production like aerobic and/or anaerobic cultivation.

## 1. はじめに

研究初年度の平成 15 年度は、金属イオンの注入により、水素生産能力を 2 倍以上に高めることができる、という成果を得た。また平成 16 年度は、新しい菌の探索によって 47 で非常に速い水素生産速度を持つ中温菌株の発見に成功し、飛躍的な水素生産能力の向上を可能にすることができた。更に発酵原料基質の拡大や、新しい発酵システムの検討、遺伝子操作等も実施した。

本年度は 60 で水素発生する新しい菌株の探索を行い、さらに生産能力を向上することを旨とする。また、昨年に引き続き遺伝子操作を進めて、水素収率の高い菌株の製造を目指した。

一昨年度、昨年度はバブコック日立株式会社との共同研究でシステムの開発をおこなったが、本年度は産業技術総合研究所との共同研究で、遺伝子操作による収率改善菌の実利用におけるシステム研究をおこなった。

以上の成果をもとに、例年のように経済性試算おこない、3 年間のまとめを行った。

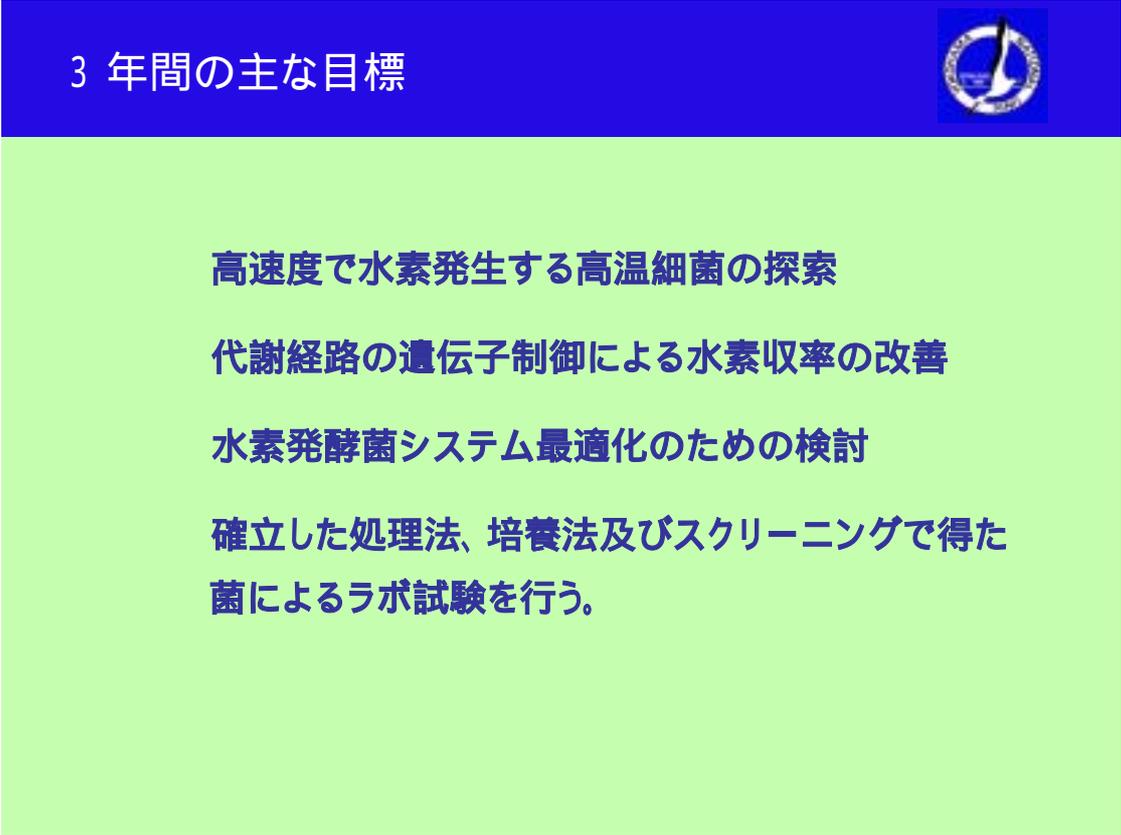
## 2. プロジェクトの目的

図 2.1 に本年度の研究の目的を示す。3年間のまとめの意味も含めて研究を進める。

高温水素発生菌株の選別が第一の目的である。さらに、既存の菌株を使用して遺伝子操作で水素収率の高い菌株の製造を目指す。選別菌株、改造菌株の性能試験を行い、最適菌株を選ぶ。これらのテーマは横浜国立大学が担当する。

遺伝子改造菌株が製造出来ても、特殊な条件下で性能が発揮されるので、実用に向けてのシステムの構築を本年度は行う。このテーマは産業技術総合研究所が担当する。

図 2.1 本プロジェクトの研究目標



**3年間の主な目標**

**高速度で水素発生する高温細菌の探索**

**代謝経路の遺伝子制御による水素収率の改善**

**水素発酵菌システム最適化のための検討**

**確立した処理法、培養法及びスクリーニングで得た菌によるラボ試験を行う。**

### 3. スケジュール

図 3.1 に研究工程を示した。

高温水素発酵菌の探索は出張などがある度に試料を採取し、選別と単離操作を行った。単離操作で発生したコロニーは簡便な水素発生試験で優良株を選択し、水素発生能と代謝特性を測定した。

昨年に引き続き発生遺伝子組み換えによる菌改良の研究を行った。

また、遺伝子操作を受けた菌は、好気条件下で水素を発生するので、微好気または酸素に代わる高い酸化還元電位を持つ物質を電子受容体にして実験をおこなった。酸素に代わる物質は酸素と同程度に豊富に存在するか、または簡単に再生出来なければならない。そのような条件を満たすシステムを産総研で構築し、検証実験をおこなった。この研究はテーマの採択後にスタートしたので、第3四半期から始まった。

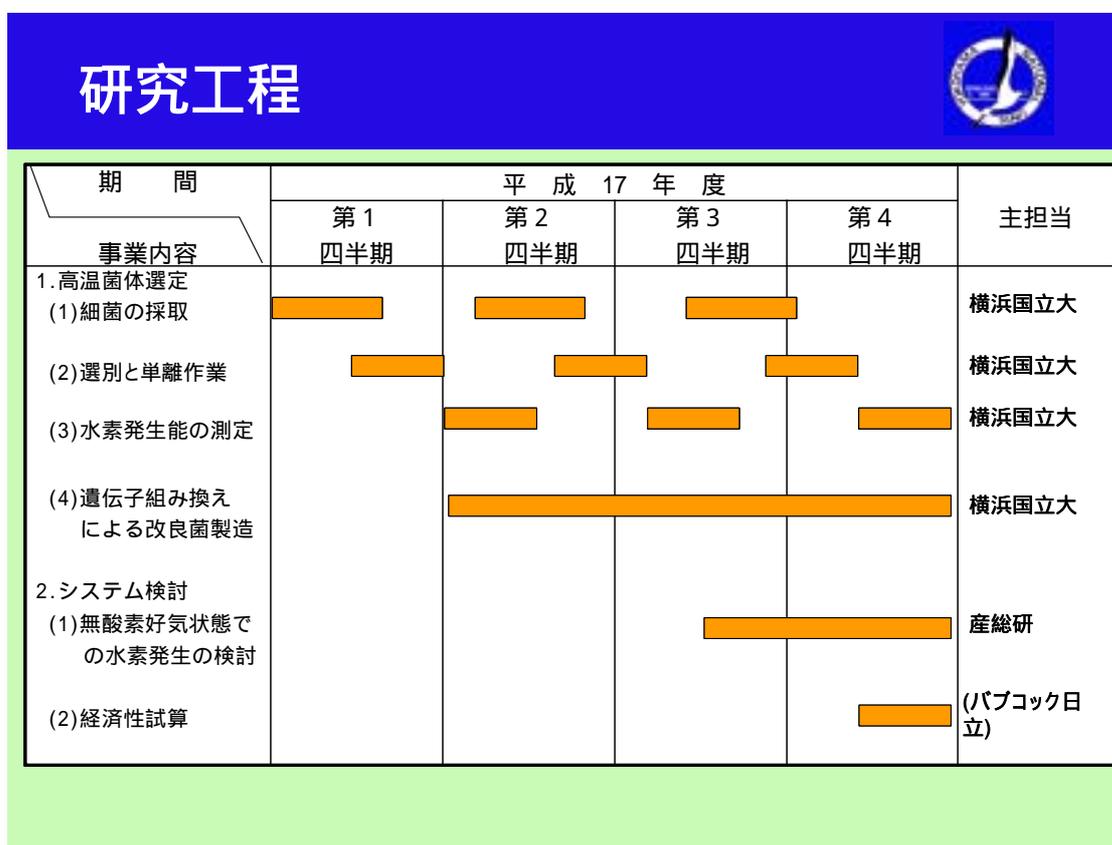


図 3.1 研究スケジュール

#### 4. 研究開発体制

研究体制は、本年度は横浜国立大学と産業技術総合研究所とで組んだ。その体制を図4.1に示す。

横浜国立大学教育人間科学部自然環境講座（谷生研究室）は高温菌株の選別と遺伝子操作による高収率菌株の設計・製造をおこない、産業技術総合研究所循環バイオマス研究室（柳下主任研究員）は有機物電子伝達剤を使用した微生物電池で高水素生産機能の実証試験を行った。

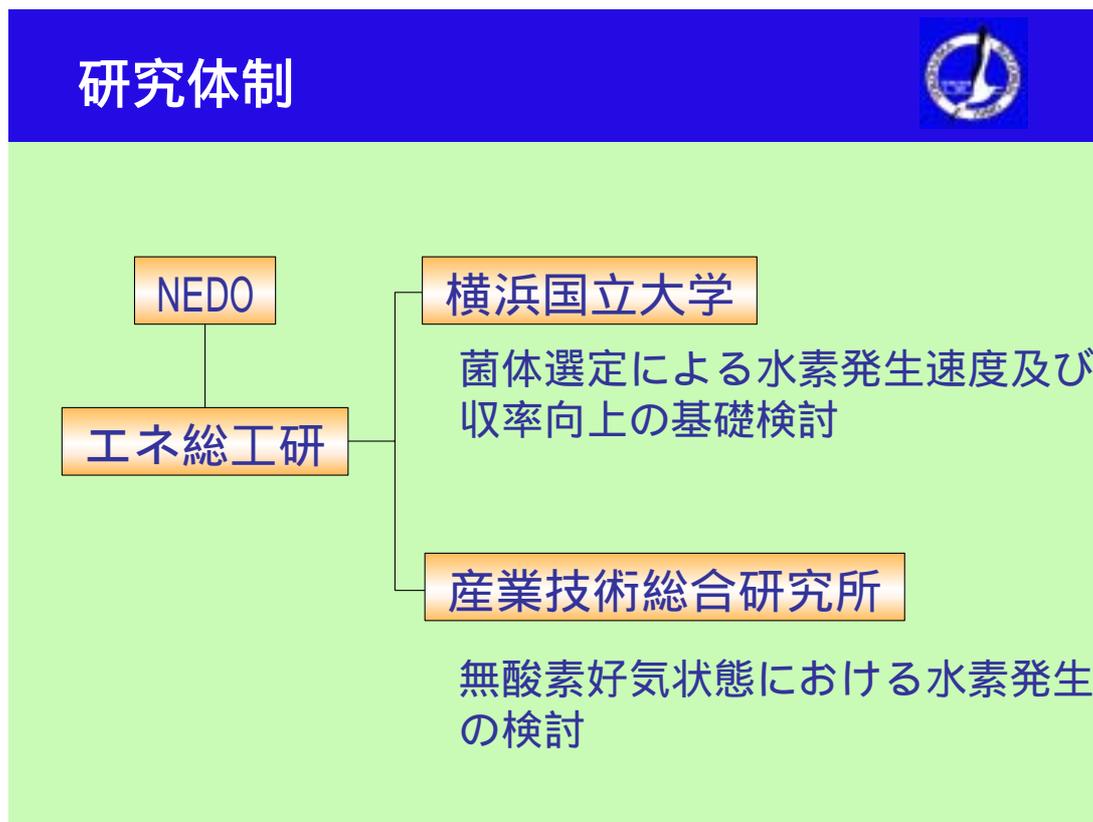


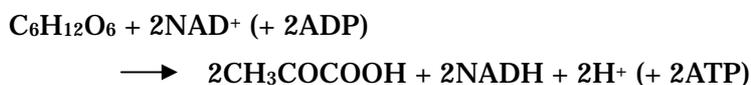
図 4.1 研究体制と研究分担内容



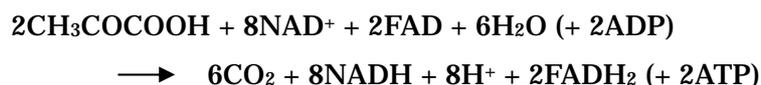
一方、酸素がある状況の下では、図 5.1.1 の左側の経路を通してピルビン酸をさらに酸化する。TCA サイクル (Tri-Carboxylic Acid サイクル) ではグルコースの炭素が酸化されて 6 モルの二酸化炭素になり、水素は NAD (Nicotinamide Adenine Dinucleotide) と FAD (Flavin Adenine Dinucleotide) を還元して 8 モルの NADH と 2 モルの FADH<sub>2</sub> になる。

解糖系で還元された 2 モルの NADH と TCA サイクルで還元された計 10 モルの NADH と FADH<sub>2</sub> は電子伝達鎖 (Electron Transport Chain) で電子を酸素に伝えて再酸化され、プロトンは酸素と結合して水になる。この間、TCA サイクルと電子伝達差でトータル 36 モルと多量の ATP が生成される。このように、好気状況下では、酸素によって NADH は再酸化されるので、NADH が多量に生成されても水素を発生することはない。

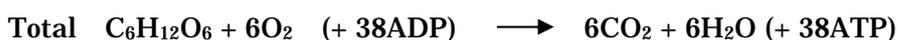
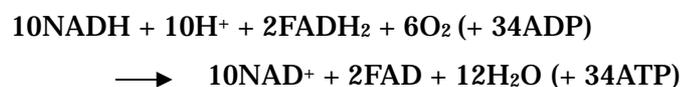
### Glycolysis



### TCA cycle

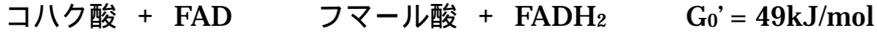


### Electron Transport Chain



5.1.2 電子伝達鎖破壊による水素収率の改善計画

好気条件では多量の NADH が生成されることから、水素収率を高めるために TCA サイクルを利用することが考えられる。しかし、TCA サイクルは次の反応が非常に大きな正のギブス自由エネルギーを持つので、巧妙な戦略を立てなければならない。



すなわち、TCA サイクルが回転するのは酸素の標準酸化還元電位が非常に高いため、FADH<sub>2</sub> を常に完全に酸化することができるためである。だから、FADH<sub>2</sub> の酸化は酸素または酸素に匹敵する酸化還元電位を持つ物質で進行させ、NADH は水素を発生して酸化させるように酵素系を組む、という戦略である。そのために考案されたのが、次のような電子伝達差の NADH デヒドロゲナーゼ複合体の破壊または欠損株の製造である。

電子伝達鎖は、図 5.1.2 に示すように、いくつかの酵素複合体からなっている。NADH は複合体 I で電子を伝達鎖に渡し、FADH<sub>2</sub> はそれに続くユビキノンに電子を渡すので、複合体 I を破壊または欠損する株を製造すれば、酸素または酸素に匹敵する酸化還元電位をもつ物質を電子受容体を使用することで TCA サイクルを回すことができる。酸素が存在すると、発生した水素と酸素を分離しなければならないので、電子受容体には酸素に匹敵する酸化還元電位を持つ物質を使用することが望ましいが、サイクリックに使用できる物質(メディエーター)であることが要求される。

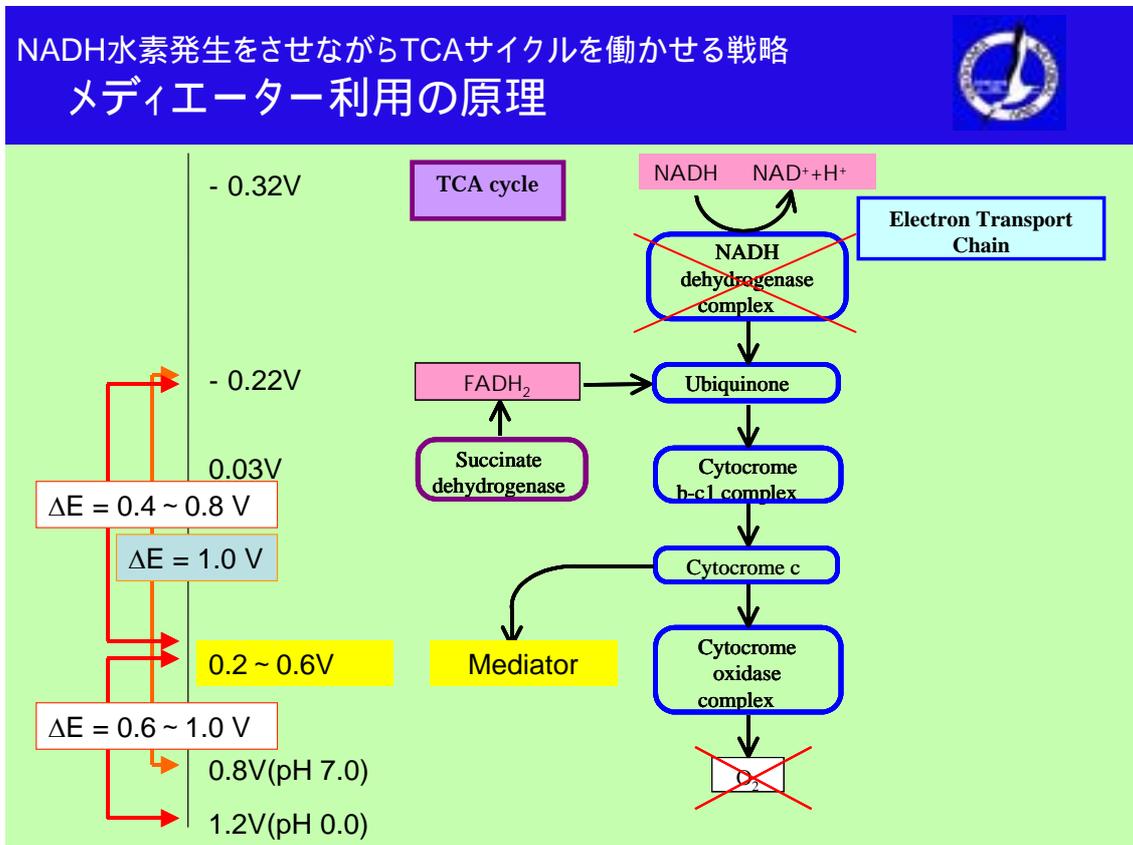


図 5.1.2 高水素生産機能発現の原理

### 5.1.3 遺伝子破壊実験と結果

電子伝達鎖破壊実験には *Escherichia coli* の *nuoG* 遺伝子を修飾し、水素発生能の高い *Enterobacter aerogenes* に導入して NADH デヒドロゲナーゼ複合体の破壊を試みている。環状破壊用コンストラクトの作成は成功しなかったため、Fusion PCR 法による直鎖状破壊用コンストラクトを作成し *E. aerogenes* に導入したが、この方法でも現在まだ導入が成功していない。

今後、*E. coli* で同様の実験を行い、検証を試みる予定である。

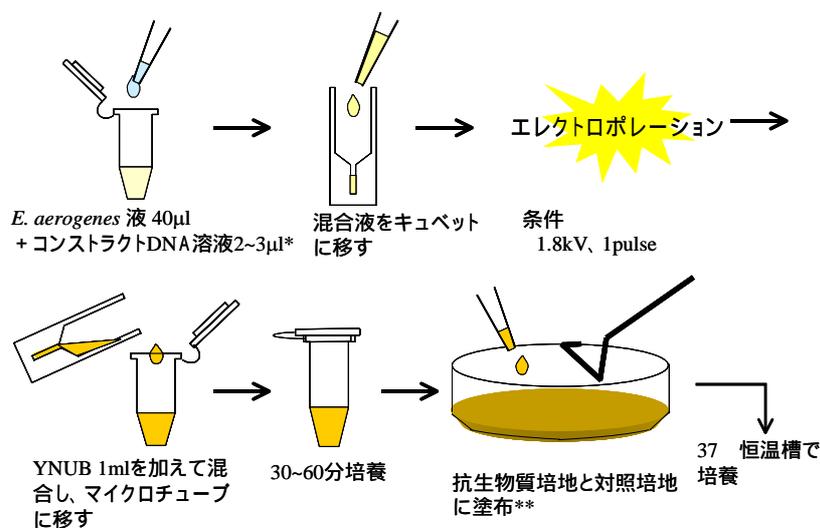


図 5.1.3 遺伝子組み込みの操作

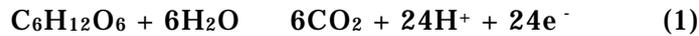


図 5.1.4 操作結果の判定写真

## 5.2 電子伝達剤を使用した高水素生産機能の実証試験

### 5.2.1 電子伝達剤のクーロン収率

好氣的条件下では、好気性生物は呼吸を行い、理論的には次式のように糖を二酸化炭素に完全に分解し、24 mol の電子を生産する。



この電子は、電子伝達系と呼ばれる一連の電子キャリアに次々と渡されて、最終的には酸素を還元して水になる反応に用いられる。この反応の過程で、生物の生育に必要なエネルギー貯蔵物質である ATP が生産される。

生物電池は、電子伝達剤を用いて有機物を電気に変換するデバイスのことである。そのような生物電池では、嫌氣的条件化でグルコースの酸化的分解から発生した電子は電子伝達剤によって捕らえられ、電極へと運ばれる。例として *Proteus vulgaris* と電子伝達剤として thionin を用いた生物電池では、添加したグルコースの分解から発生したクーロン量（電流の積分）は発生した CO<sub>2</sub> の量と比例し、式 1 に基づいて得られた理論クーロン出力から計算されたクーロン収率は 60%であった。これまで報告されている種々の生物電池のクーロン収率は 30~60%程度であるが、基質がスクロースの場合にその効率が 100%、すなわち糖が完全に分解した例もある。一方、発酵反応として式(2)の反応の場合、発生した水素を燃料電池にて 100%電流に変換させたとき 8 mol/mol-glucose の電子の発生、すなわちクーロン収率は 33%である。



したがって、生物電池のクーロン収率は水素発酵反応によるクーロン収率より大きい。このことは、生物電池では嫌氣条件下であっても電子伝達剤が電子受容体として働く呼吸が部分的に行われていることを示唆している。呼吸反応では、より多くの NADH が嫌氣性水素発酵プロセスに比べて生産されると考えられる。

生物電池では、バクテリアが電子伝達剤を電子受容体とした呼吸反応を行うことが可能であり、発酵に比べて NADH のような還元力を多く生産することから、生物電池に *E. aerogenes* のような水素生産菌を用いることにより、水素収率の向上が期待される。ただしこの場合、バクテリアの水素生産は電子伝達剤による電気生産と競合することが考えられる。本研究では、好氣的な条件下での *E. aerogenes* による糖の分解と、低酸素濃度条件下、そして嫌氣条件下での反応挙動を明らかにし、電子伝達剤を用いた生物電池での *E. aerogenes* の生物電気化学的水素生産と比較した。

## 5.2.2 実験方法

### 1) 微生物と培養条件

本研究では独立行政法人製品評価技術基盤機構生物遺伝資源部門より入手した *Enterobacter aerogenes* NBRC12012 を用いた。*E. aerogenes* は NBRC702 培養液 (pH7.0) にて 30 で 1 日培養した。

図 5.2.1、写真 5.2.1 で示されるような 500 ml の発酵槽中に上記の培養菌株を 4% (v/v)、最終濃度が 1.0% となるグルコースを培養液に加え、最終的な反応溶液を 300 ml とした。イオン交換膜 (旭化成、セレミオン CMV) によって隔てられているもう一方の発酵槽にはリン酸緩衝液 (0.5 M、pH7.0) 300 ml を加えた。また、生物電池として作用させる場合には、2 mM の thionin を菌体懸濁液に加え、炭素繊維電極 (日本カーボン、GF-20) ならびに Ag/AgCl 参照電極を設置した。また、白金メッシュ電極をもう一方の反応槽溶液内に設置した。炭素繊維電極、Ag/AgCl 参照電極、白金メッシュ電極はポテンシostat (北斗電工、HAB-151) によって制御され、Ag/AgCl 参照電極に対して +0.2 V の電位を炭素繊維電極に印加した。実験は 30 に調整された恒温槽で行った。反応溶液をマグネチックスターラーで連続的に攪拌し、pH メーターによって溶液の pH をモニターした。好気条件下、微好気条件下ではエアープンプ (柴田、ミニポンプ MP-30) によって空気を 50 ml/min、300 ml/min で溶液を通気した。

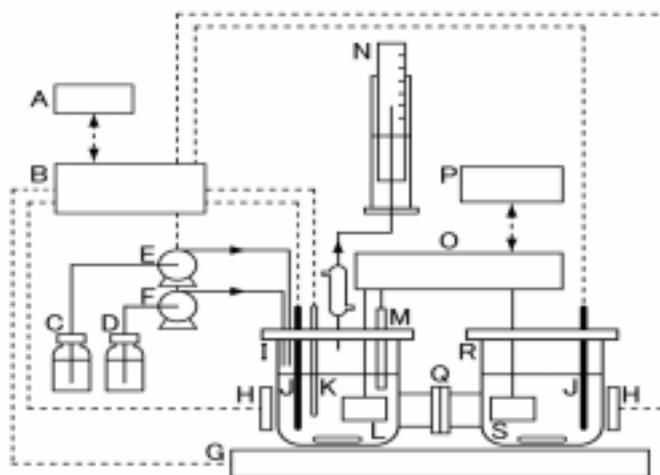


図 5.2.1 生物電気化学的リアクターの模式図

A, パーソナルコンピュータ; B, コントローラー; C, アルカリ溶液; D, 酸溶液; E, アルカリ溶液用ポンプ; F, 酸溶液用ポンプ; G, マグネチックスターラー; H, ヒーター; I, アノード槽; J, 熱伝対; K, pH 電極; L, 作用電極; M, 参照電極; N, ガスホルダー; O, ポテンシostat; P, データ収集システム; Q, カチオンイオン交換膜; R, カソード槽; S, 対電極.

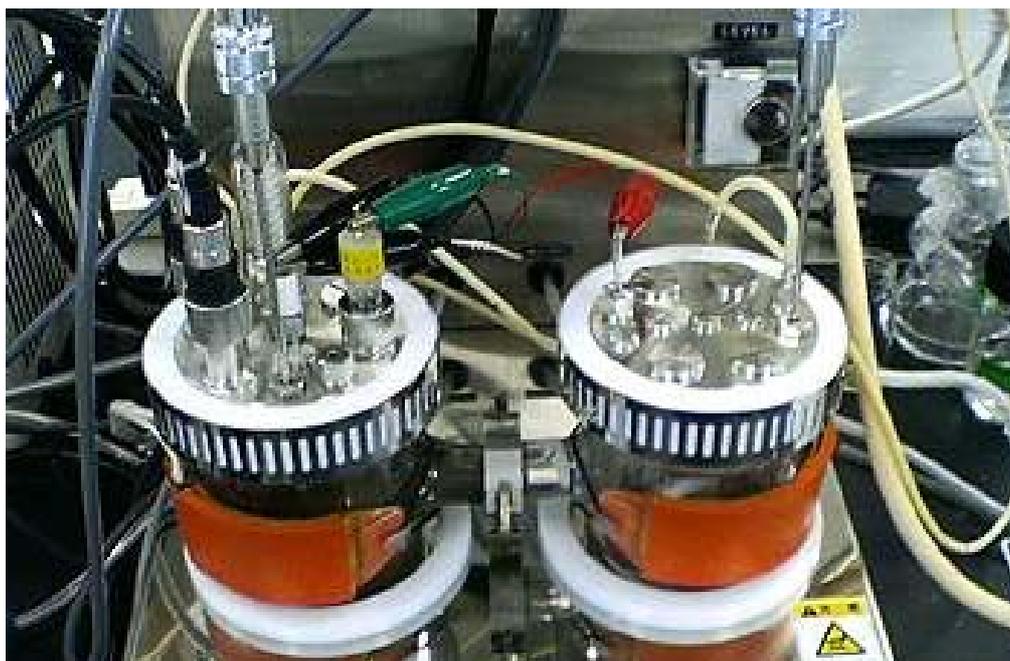


写真 5.2.1 リアクターシステム

## 2) 分析方法

嫌気性条件下、生物電池で発生したガスを飽和食塩水溶液によって水上置換してガス発生量を測定した。微好気条件下では、常時通気を行っているため、30 分間水上置換し、エアープンプによる通気量と水上置換されたガス量の差から *E. aerogenes* によるガス発生量を求めた。好気条件下での *E. aerogenes* からのガス発生量は測定しなかった。発生したガス中の水素と二酸化炭素の組成は、熱伝導検出器によるガスクロマトグラフィ（島津、GC-8A）にて決定した。溶液中の残存グルコース、発酵代謝物である酢酸、乳酸、ギ酸は、それぞれ電気化学的検出器（島津、CCD-6A）、電気伝導度計検出器（島津、RID-10A）による HPLC（島津、LC-10A システム）によって測定した。

### 5.2.3 実験結果と考察

#### 1) 嫌気条件下、微好気条件下、好気条件下での糖代謝

図 5.2.2、5.2.3、5.2.4 に、それぞれ嫌気条件下、微好気条件下、好気条件下におけるガス発生と代謝産物の生成の経時変化を示す。微好気条件下より嫌気条件下の方がガス発生量が高い。グルコースは好気条件下 4 時間で 10 mM となり、一方微好気条件下では 6 時間で 10 mM となった。嫌気条件下ではよりグルコース消費は遅くなり、8 時間で 28 mM であり、好気条件下に近づくほどグルコース消費速度が増加することが分かった。代謝産物については、好気条件下でもほぼ嫌気条件下に近い濃度の 2,3-ブタンジオール等が得られた。溶存酸素濃度を調べると、溶存酸素は菌体成長に伴いすぐに菌体に吸収され、好気条件下においても溶存酸素量はほとんど 0 であった。したがって、酸素を通気しても、菌体がある程度以上育つと、嫌気条件と同様になってしまうのであろう。好気条件下における OD660 での吸光度は 3.49 Abs に達しており、嫌気条件下での 2.59 Abs に比べて菌体増殖速度が高いことが分かる。

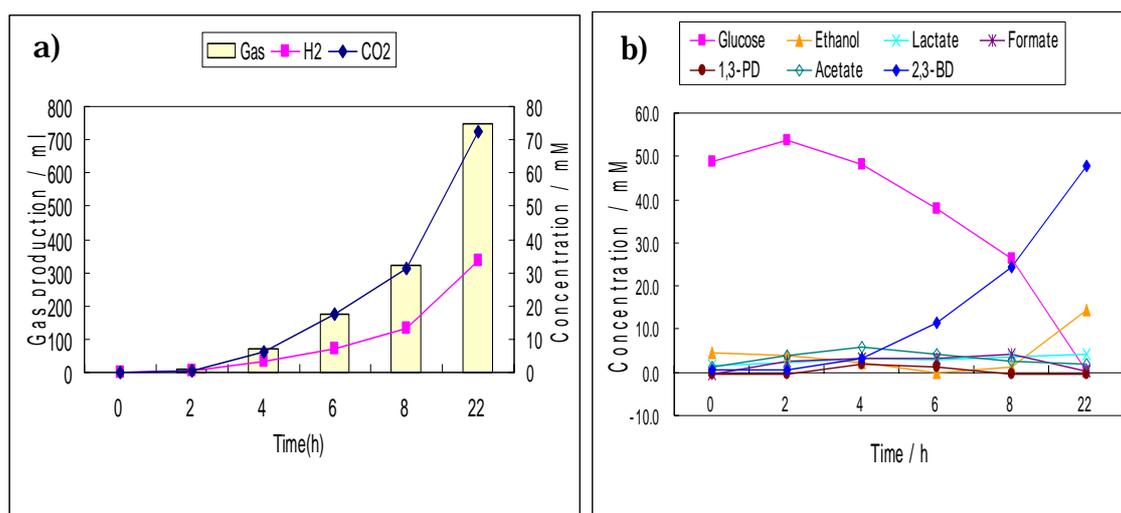


図 5.2.2 嫌気条件下におけるガスと代謝産物生成の経時変化

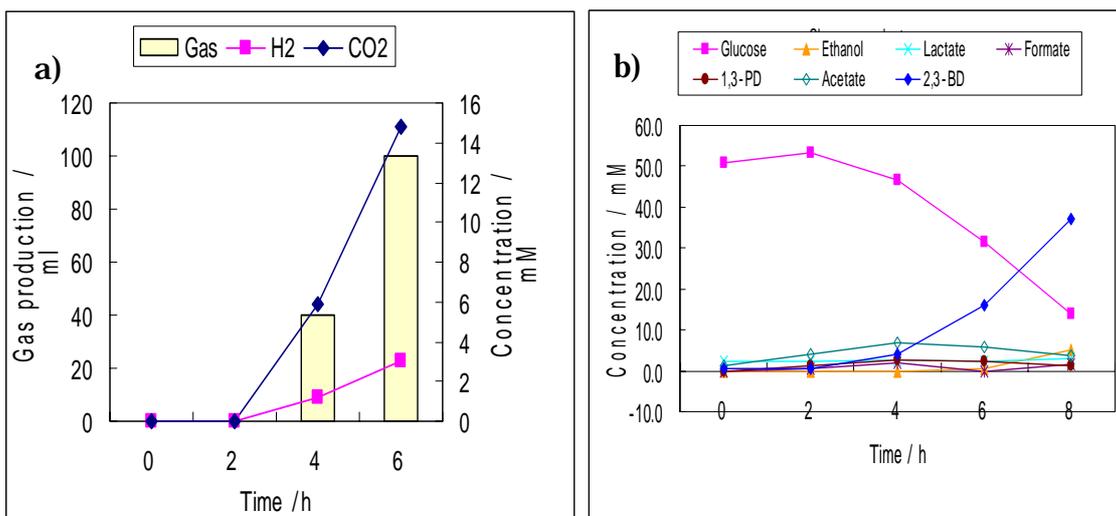


図 5.2.3 微好気条件下におけるガスと代謝産物生成の経時変化

## 2) 生物電池における生物電気化学的水素生産

図 5.2.5 で示されるように、生物電池内においても水素は生成される。グルコース消費速度は嫌気条件下よりも速かった。水素生成量、溶液中の代謝産物は嫌気条件下とほぼ同等であった。また吸光度は 1.80 Abs であり、嫌気条件下における水素発酵よりも菌体の増殖が抑制されていた。

以上の結果をまとめる。

1. グルコースの消費の比較から、生物電池は嫌気条件下と好気条件下の中間に位置する。
2. 生物電池におけるガス発生、溶液中の代謝産物の挙動は、嫌気条件下とほぼ

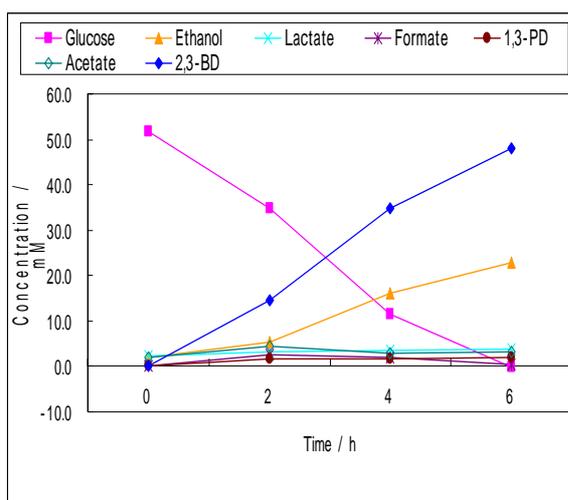


図 5.2.4 好気条件下における代謝産物の経時変化

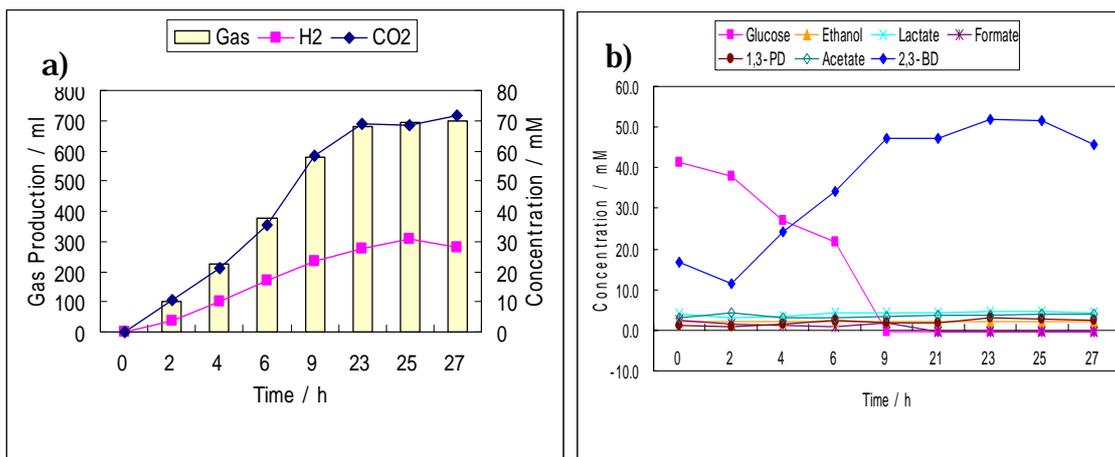


図 5.2.5 生物電気科学的水素生産におけるガス発生と代謝産物の経時変化

等しい。

3. 生物電池では、菌体の増殖が抑制されるが、菌体当たりの水素・エタノール発生量は増加した。

水素収率に関して嫌気条件下と生物電池ではほぼ等しかった。また、thionin の濃度を変えてみても、ガス発生量や溶液中の代謝物に大きな変化が見られなかった。今後は、電極面積等を変えて、より多くの電流を取り出すことにより、菌体の活性化と水素生産収率の改善を図る予定である。

### 5.3 新しい菌の採取調査と選別菌の性能検査

#### 5.3.1 新しい菌の採取調査と採取結果

新しい菌の採取は非常に多くの場所で行った。とくに、気候が温暖または高温地域への出張、旅行では、いつでも採取活動を行った。

採取した試料は先ず増菌操作を行い、あらためて図 5.3.1 のように試験管培地に植菌して水素発生能の強弱判別を行った。この操作ではいろいろな菌が増えているので、純粋な菌を選り分けるために、水素発生能の高い菌が居ると思われる培地から培養液を採り、図 5.3.2 のように嫌気状態でコロニーを発生させた。コロニーは単一菌の固まりであるから、さらにこれらのコロニーを試験管培地に植菌し、選別した。

選別した菌株は 500ml または 1 L の発酵槽で水素発生実験を行い、水素発生速度、代謝特性を調べた。その結果を表 5.3.1 に一覧で示した。表中 No.1 と No.2 のみ同じ菌株でグルコース濃度を変えた実験結果を載せている。この菌株は HN001 株で、グルコース 1.5% 濃度では  $3.34 \text{ L-H}_2 \text{ L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$  ( $= 149 \text{ mmol-H}_2 \text{ L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )、2.0% 濃度では  $3.61 \text{ L-H}_2 \text{ L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$  ( $= 160 \text{ mmol-H}_2 \text{ L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) の速さで水素発生した。表 5.3.2 にも示したが、現在、世界で最も速いバクテリアによる水素生産速度である。網掛けで示した  $2.0 \text{ L-H}_2 \text{ L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$  ( $= 90 \text{ mmol-H}_2 \text{ L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) より速い菌も、特筆すべきチャンピオンデータを示したといえる。



図 5.3.1 試験による選別試験



図 5.3.2 単離操作

表 5.3.1 水素発生速度が速い順に並べた選別株のリスト

	pH	温度	基質	濃度	本培養	Max rate	収率
	[-]	[ ]		[%]		[L L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	[L-H <sub>2</sub> /L-sub.]
1	6.00	47	グルコース	2.0	YNU嫌気培地+FeCl3(0.1g/L)	3.61	2.18
2	6.00	47	グルコース	1.5	YNU嫌気培地+FeCl3(0.1g/L)	3.34	2.25
3	6.00	48	グルコース	1.5	YNU嫌気培地+FeCl3(0.1g/L)	2.94	2.31
4	6.00	48	グルコース	1.5	YNU嫌気培地+FeCl3(0.1g/L)	2.93	2.81
5	6.00	48	グルコース	1.5	YNU嫌気培地+FeCl3(0.1g/L)	2.92	2.35
6	6.00	48	グルコース	1.5	YNU嫌気培地+FeCl3(0.1g/L)	2.87	2.31
7	6.00	48	グルコース	1.5	YNU嫌気培地+FeCl3(0.1g/L)	2.77	2.66
8	6.00	50	グルコース	1.5	YNU嫌気培地	2.77	1.96
9	6.00	50	グルコース	1.5	YNU嫌気培地 + Fecl3(0.1/L)	2.65	2.49
10	6.00	48	グルコース	1.5	YNU嫌気培地+FeCl3(0.1g/L)	2.64	2.20
11	6.00	48	グルコース	1.5	YNU嫌気培地+FeCl3(0.1g/L)	2.50	1.77
12	6.00	50	グルコース	1.5	YNU嫌気培地 + Fecl3(0.1/L)	2.43	1.85
13	6.00	48	グルコース	1.5	YNU嫌気培地+FeCl3(0.1g/L)	2.37	2.00
14	6.00	48	グルコース	1.5	YNU嫌気培地+FeCl3(0.1g/L)	2.36	2.05
15	6.00	48	グルコース	1.5	YNU嫌気培地+FeCl3(0.1g/L)	2.32	1.04
16	6.00	47	グルコース	1.5	YNU嫌気培地 + Fecl3(0.1/L)	2.30	2.12
17	6.00	55	グルコース	1.5	YNU嫌気培地 + Fecl3(0.1/L)	2.26	2.17
18	6.00	40	グルコース	1.5	YNU嫌気培地 + Fecl3(0.1/L)	2.24	2.30
19	6.00	49	グルコース	1.5	YNU嫌気培地	2.22	2.94
20	6.00	50	グルコース	1.5	YNU嫌気培地 + Fecl3(0.1/L)	2.12	2.36
21	6.00	50	グルコース	1.5	YNU嫌気培地 + Fecl3(0.1/L)	2.12	2.64
22	6.00	48	グルコース	1.5	YNU嫌気培地+FeCl3(0.1g/L)	1.98	2.69
23	6.00	49	グルコース	1.5	YNU嫌気培地	1.96	2.57
24	6.00	48	グルコース	1.5	YNU嫌気培地+FeCl3(0.1g/L)	1.93	2.18
25	6.00	48	グルコース	1.5	YNU嫌気培地+FeCl3(0.1g/L)	1.91	2.39
26	6.00	48	グルコース	1.5	YNU嫌気培地+FeCl3(0.1g/L)	1.85	0.99
27	6.00	48	グルコース	1.5	YNU嫌気培地 + Fecl3(0.1/L)	1.85	1.79
28	6.00	48	グルコース	1.5	GAM糖分解用半流動培地	1.78	1.96
29	6.00	50	グルコース	1.5	YNU嫌気培地 + Fecl3(0.1/L)	1.76	1.75
30	6.00	48	グルコース	1.5	YNU嫌気培地+FeCl3(0.1g/L)	1.75	2.53
31	6.00	48	グルコース	1.5	YNU嫌気培地+FeCl3(0.1g/L)	1.73	1.98
32	6.00	49	グルコース	1.5	YNU嫌気培地	1.65	2.57
33	6.00	48	グルコース	1.5	YNU嫌気培地+FeCl3(0.1g/L)	1.51	2.60
34	6.00	49	グルコース	1.5	YNU嫌気培地	1.51	2.68
35	6.00	49	グルコース	1.5	YNU嫌気培地	1.49	2.65
36	6.00	49	グルコース	1.5	YNU嫌気培地	1.46	2.51
37	6.00	49	グルコース	1.5	YNU嫌気培地	1.45	2.71
38	6.00	50	グルコース	1.5	YNU嫌気培地 + Fecl3(0.1/L)	1.43	1.74
39	6.00	50	グルコース	1.5	YNU嫌気培地 + Fecl3(0.1/L)	1.43	2.31
40	6.00	49	グルコース	1.5	YNU嫌気培地	1.42	2.50
41	6.00	48	グルコース	1.5	YNU嫌気培地+FeCl3(0.1g/L)	1.32	1.66
42	6.00	49	グルコース	1.5	YNU嫌気培地	1.32	2.34
43	6.00	48	グルコース	1.5	YNU嫌気培地+FeCl3(0.1g/L)	1.27	2.52
44	6.00	49	グルコース	1.5	YNU嫌気培地	1.27	2.99
45	6.00	49	グルコース	1.5	YNU嫌気培地	1.23	2.13
46	6.00	47	グルコース	1.5	YNU嫌気培地 + Fecl3(0.1/L)	1.22	2.52
47	6.00	48	グルコース	1.5	YNU嫌気培地 + Fecl3(0.1/L)	1.21	1.35
48	6.00	48	グルコース	1.5	YNU嫌気培地 + Fecl3(0.1/L)	1.20	2.00
49	6.00	55	グルコース	1.5	YNU嫌気培地 + Fecl3(0.1/L)	1.18	1.75
50	6.00	49	グルコース	1.5	YNU嫌気培地	1.18	1.90
51	6.00	48	グルコース	1.5	ABCM糖分解用培地	1.17	1.36
52	6.00	48	グルコース	1.5	YNU嫌気培地+FeCl3(0.1g/L)	1.12	2.26
53	6.00	49	グルコース	1.5	YNU嫌気培地	1.10	2.27
54	6.00	48	グルコース	1.5	YNU嫌気培地+FeCl3(0.1g/L)	1.10	1.64
55	6.00	50	グルコース	1.5	YNU嫌気培地 + Fecl3(0.1/L)	1.07	2.49
56	6.00	50	グルコース	1.5	YNU嫌気培地 + Fecl3(0.1/L)	1.06	2.25
57	6.00	55	グルコース	1.5	YNU嫌気培地 + Fecl3(0.1/L)	1.06	0.67
58	6.00	50	グルコース	1.5	YNU嫌気培地 + Fecl3(0.1/L)	1.06	0.73
59	6.00	55	グルコース	1.5	YNU嫌気培地 + Fecl3(0.1/L)	1.04	1.25
60	6.00	49	グルコース	1.5	YNU嫌気培地	1.02	2.50
61	6.00	48	グルコース	1.5	YNU嫌気培地+FeCl3(0.1g/L)	1.01	2.16
62	6.00	47	グルコース	0.3	YNU嫌気培地	1.00	3.48

表 5.3.2 は代表的な発酵水素発生菌の一覧である。この NEDO プロジェクトで選別した Mesophilic bacterium HN001 株は、絶対嫌気性 (strict anaerobe) 中温菌で、この表から極めて水素発生速度の速い菌であることが容易に見て取れる。

表中、高温菌 (thermophile) は収率が高く、中でも *Thermotoga maritima* は 80 の高温培養で 4.0 mol-H<sub>2</sub>/mol-glucose と理論収率に対して 100%を示している。しかし、発生速度はかなり遅く、高温培養が実用に適しているかどうか検討が必要である。また、表中第 2 列で B はバッチ培養、C は連続培養を意味する。B と C の水素発生速度を比べると、Cの方が全体的に B より発生速度が速い。したがって、HN001 株も連続培養を行えば、さらに速い速度で水素発生する可能性がある。しかし、これは今後の検討課題である。

表 5.3.2 代表的微生物の培養温度と水素発生速度、収率一覧

List of microorganisms 1							
Table. Hydrogen yields and production rates by microorganisms as reported in the literature.							
	culture	pH	Temp.	substrate	yield <sup>1)</sup>	rate	Author
		[ - ]	[°C]		[mol/mol]	[mmol/L.h]	
<b>Strict anaerobes</b>							
Clostridium sp. no 2	B	6.0	36	glucose	2.0	24	1992 Taguchi et al.
C. paraputrificum M-21	B	-	37	GlcNAc	2.5	31	2000 Evyernie et al.
C. butyricum LMG1213tl	C	5.8	36	glucose	1.5	22	1986 Heindrichx et al.
Clostridium sp. no 2	C	6.0	36	glucose	2.4	21	1990 Taguchi et al.
Mesophilic bacterium HN001	B	6.0	47	glucose	2.3	147	2004 Nishiyama et al.
<b>Thermophiles</b>							
Thermotoga maritima	B	-	80	glucose	4.0	10	1994 Schroder et al.
Thermotoga elfii	B	7.4	65	glucose	3.3	3	2002 van Niel et al.
Caldicellulosiruptor saccharolyticus	B	7.0	70	sucrose	3.3	8	ibid.
<b>Facultative anaerobes</b>							
E. aerogene E.82005	B	6.0	38	glucose	1.0	21	1983 Tanisho et al.
E. cloacae IIT-BT 08 wt	B	-	36	glucose	3.0	35	2000 Kumar et al.
E. aerogenes E.2005	C	6.0	38	molasses	0.7	36	1993 Tanisho et al.
E. aerogenes HU-101 m AY-2	C	-	37	glucose	1.1	58	1998 Rachman et al.
<b>Co-culture or Mixed cultures from:</b>							
C. butyricum IFO13949 + E. aerogenes HO-39	C	5.2	36	starch	2.6	53	1998 Yokoi et al.
-sludge compost	C	6.8	60	waste water	2.5	8	1996 Ueno et al.
-sewage sludge	C	5.7	35	glucose	1.7	30	1999 Lin et al.
-fermented soybean meal	C	6.0	35	glucose	1.4	8	2000 Mizuno et al.
* Vrije & Claassen, "Dark hydrogen Fermentation", in Bio-methane & Bio-hydrogen, ed. Reith et al. (2003), ISBN90-9017165-7							
1) [mol/mol-monosacch.]							

### 5.3.2 新発見株によるデンプンからの水素生産特性

発酵水素生産への実利用を念頭に、新発見 HN001 株のデンプン基質からの水素発生特性を調べた。培地は、ペプトンやイースト抽出物を含む YNU 嫌気培地にデンプンを種々の濃度で加えたもので、培養温度や培地 pH を変化させて調べた。

デンプン培地では、温度による水素生産への影響がグルコース培地とことなり、37 が最適培養温度になった。また培養 pH もグルコース培地と異なり、6.5の方が6.0より適していたが、pH 6.0で特性検査の実験を行った。

図5.3.3はデンプン濃度が水素発生量と水素発生速度に及ぼす影響を調べたものである。水素発生量はデンプン濃度が濃くなるにつれて少なくなり、1kgあたりのデンプンから0.5%濃度では320Lの水素を生産できるが、5.0%濃度では150Lまで減少した。一方、水素発生速度については、0.5%から1.5%濃度まではほぼ直線的に増加するが、2%を超えると濃度に無関係に一定になり、約1.5L L-cultuer<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>で発生した。これらの結果から、デンプン濃度は1.5%がもっとも適していることがわかった。

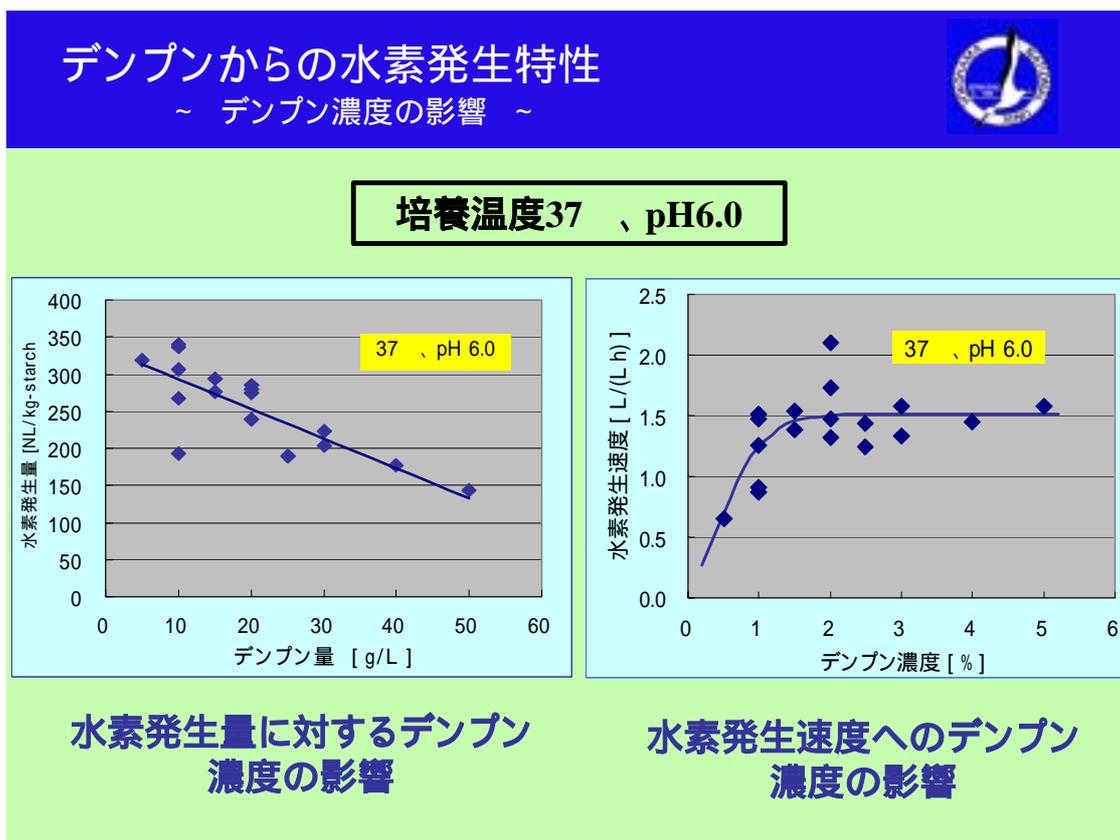


図 5.3.3 水素発生量と発生速度に与えるデンプン濃度の影響

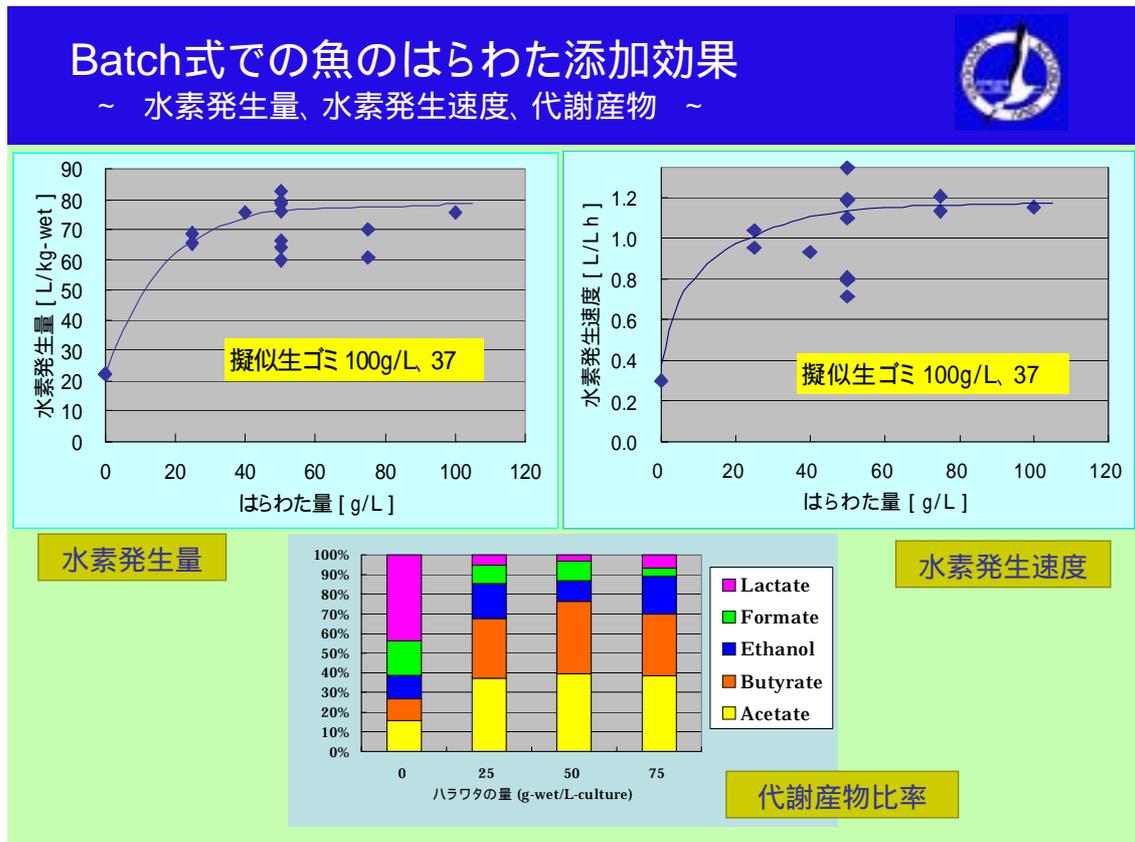
### 5.3.3 擬似生ゴミ培地による水素生産と魚のはらわた添加効果

NH001株はデンプンからも非常に速い速度で水素発生することが明らかになったので、冷凍ご飯と茹でたニンジン、グリーンピース、コーンからなるミックスベジタブルを擬似生ゴミとする水素生産実験と、この擬似生ゴミに魚のはらわたを加えてさらに生ゴミに近づけた材料による水素生産実験を行った。この培地には栄養塩などは何も加えていない。

図 5.3.4 に擬似生ゴミを使用した水素生産の実験結果を示した。湿重量で 1kg の擬似生ゴミだけの培地からは、わずか 22L の水素が  $0.3\text{L-H}_2 \text{ L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$  の非常に遅い速さで生産されたが、擬似生ゴミに魚のはらわたを加えた培地からは約 80L の水素が  $1.2 \text{ L-H}_2 \text{ L-culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$  の速さで生産された。はらわたの効果は、湿重量でわずか 2.5% の添加でも顕著に表れたので、実際の生ゴミにおいても効果が期待できる。

魚のはらわたは、バクテリアの増殖におけるチッ素源として利用されることを期待したが、液クロによる代謝産物の分析から、図 5.3.4 に示したように、乳酸の生成が抑えられ、酢酸、酪酸の生成が促進されるためであることが明らかになった。代謝に影響を及ぼす物質、機構などについては今後さらに検討したい。なお、水素生産量の増加は、はらわたが水素の基質として利用されたためではないかと推測されるが、擬似生ゴミを含まないはらわた培地からはほとんど水素発生が見られず、はらわたが水素の基質ではないことも確かめた。

図 5.3.4 擬似生ゴミからの水素生産と魚の添加効果



#### 5.4 フェッドバッチ法による擬似生ゴミからの連続水素生産

FS 実験を目指して、擬似生ゴミによる連続水素生産を試みた。生ゴミは間歇的に発生するので、フィードを連続的に供給するよりは間歇的に発酵槽に供給する方がより実用的と考えた。

実験は、擬似生ゴミに魚のはらわたを加え、10 時間バッチ培養した後、発酵液の 80% を新しい培養液と入れ替える方法で行った。図 5.4.1 は 2 回行った実験結果を示している。擬似生ゴミの濃度が 10% の実験では、10 時間で擬似生ゴミ 1kg-wet あたり約 60L の水素が発生し、バッチ培養と非常によい一致を示した。一方、20% の濃度では、消費速度が遅いので、10 時間ではまだ直線的に水素発生をしている段階にあり、約 35L しか発生が進んでいなかった。したがって、濃い濃度では培養時間を長く取る必要があることがわかった。また、いずれの場合も安定的に水素発生しているが、繰り返し 3 回目の培養では異常に多い水素が発生しているデータを得た。これは、水素発生量の測定に使用している CO<sub>2</sub> 吸収用の 1N の NaOH が飽和し、CO<sub>2</sub> の未吸収気体を含んだ混合気体を水素発生量として測定したことが考えられる。しかし、この原因の解明は今後の課題としたい。

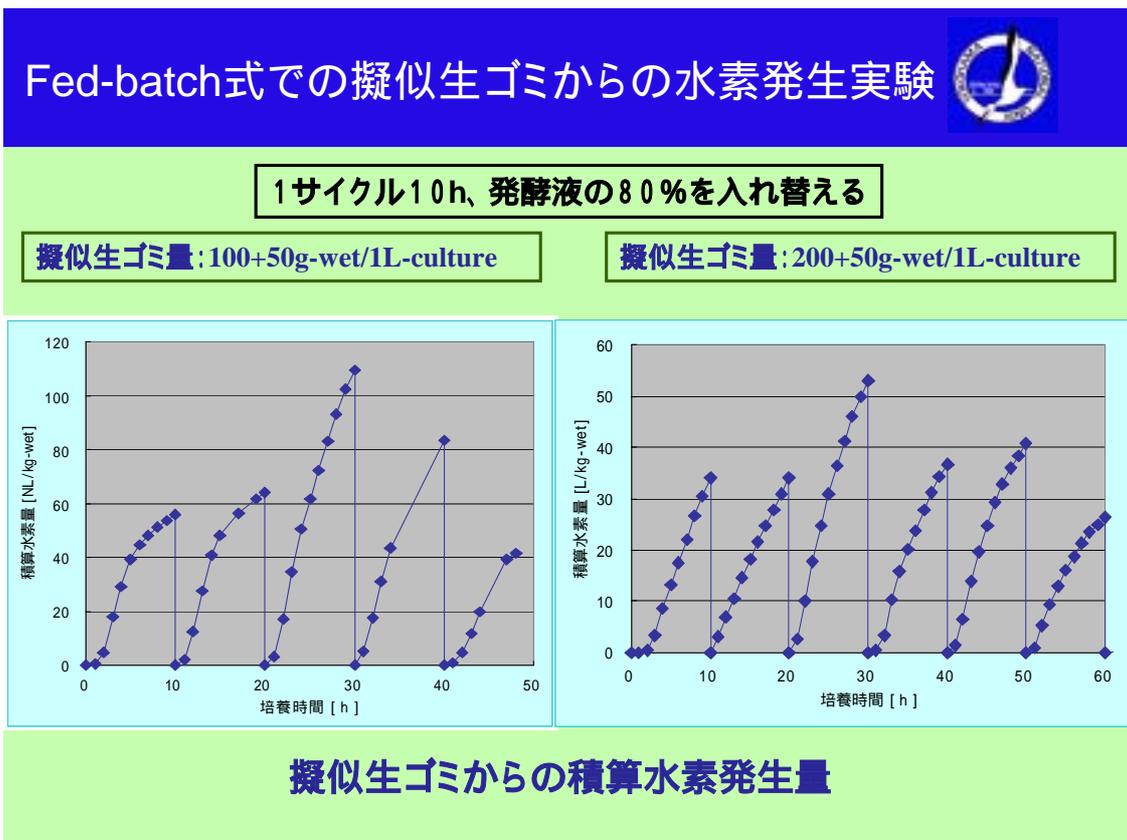
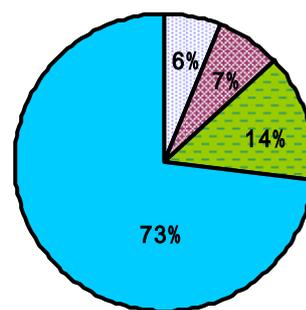


図 5.4.1 擬似生ゴミと魚のはらわたからなる基質からのフェッドバッチ連続実験の結果

図 5.4.2 はファミリーレストランから提供されたサンプル生ゴミを分析した結果である。湿重量と乾燥重量の測定から、水分含量は 73%であることがわかった。タンパク質などは分析の対象外であったので、必ずしもセルロース、糖類、デンプンのみが固形物中の成分ではないが、およそセルロースが 6%、糖類が 7%、デンプンが 14%の割合で含まれていた。この成分中、糖類、デンプンから収率 2 で水素発生するとすれば、約 52 L-H<sub>2</sub>/kg-wet の水素生産可能量が可能であり、成分割合、水素生産可能量など、すべて基礎実験と適合する分析結果であった。



セルロース 糖類  
デンプン 水分

図 5.4.2 ファミリーレストランの生ゴミ成分

表 5.4.1 は、湿重量 1kg の生ゴミから 50L の水素が生産できると仮定したときの日本国内の生ゴミ発生源からの水素生産可能量の計算結果である。

多量の生ゴミが発生すると言われる発生源でも、1日の生ゴミ発生量は多くて 2 トン程度であり、50～100m<sup>3</sup> の水素生産量にしかない。したがって、生ゴミを水素生産の原料とするなら、今後いかに集めるかが一つの問題になるであろう。一方、沖縄などサトウキビ生産地で発生する廃糖蜜は、非常に良い地域の水素エネルギー源になると考えられる。

表 5.4.1 生ゴミおよび廃糖蜜からの水素生産可能量

場所	規模 人 or m <sup>2</sup>	単位など		1日当たり水素発生量		
				mol-H <sub>2</sub> /d <sup>(1)</sup>	m <sup>3</sup> -H <sub>2</sub> /d <sup>(1)</sup>	m <sup>3</sup> -H <sub>2</sub> /d <sup>(2)</sup>
団地 高層住宅	1,000	250	g/人日	556	13	13
	5,000	250		2,778	67	63
	10,000	250		5,556	134	125
ホテル	10,000	33	g/m <sup>2</sup> 日	733	18	17
	50,000	16		1,778	43	40
	100,000	14		3,111	75	70
デパート	10,000	29	g/m <sup>2</sup> 日	644	15	15
	50,000	25		2,778	67	63
	100,000	23		5,111	123	115
日本全体	2000万 t/年	10	%	60,882,801	1,453,040	
		20		121,765,601	2,906,080	
東京区部	142万 t/年	10	%	4,322,679	103,166	
		20		8,645,358	206,332	
沖縄本島	廃糖蜜の	3470	ton	105,632	2,521	
宮古島	糖重量 <sup>(3)</sup>	2490		75,799	1,809	

\*1 湿重量の20%がグルコースで、水素収率 2 と仮定

\*2 湿重量1kgの生ゴミから50L水素生産できると仮定

「ディスポーザーによる生ゴミリサイクルシステムの開発に関する基礎調査」報告書  
(財)日本建築センター、平成 7 年 3 月、p.79、p.82

## 5.5 水素発酵菌による水素生産のフィージビリティの検討

### 5.5.1 廃糖蜜を使用した連続水素生産

沖縄の廃糖蜜が非常に良好な水素源になることが判明したので、連続培養を試みた。糖蜜を10倍に薄め、希釈率が約 $0.2\text{h}^{-1}$ になるようフィードを供給した。使用したバクテリアは *Enterobacter aerogenes* で、 $38^\circ\text{C}$ 、 $\text{pH}6.0$  で培養した。図5.5.1は水素発生速度の変化と、積算水素発生量を示している。400時間ほどの間 $1\text{L L-culture}^{-1}\text{h}^{-1}$ 前後の水素発生速度であったが、その後、発酵槽の壁面に菌が付着し始め、発生速度が増加した。900時間の培養で、水素発生速度は $2\text{L L-culture}^{-1}\text{h}^{-1}$ に達し、さらに増加する傾向を示したが、原料の廃糖蜜が無くなったので実験を止めた。図5.5.2には発酵槽に付着したバクテリアの様子を示した。

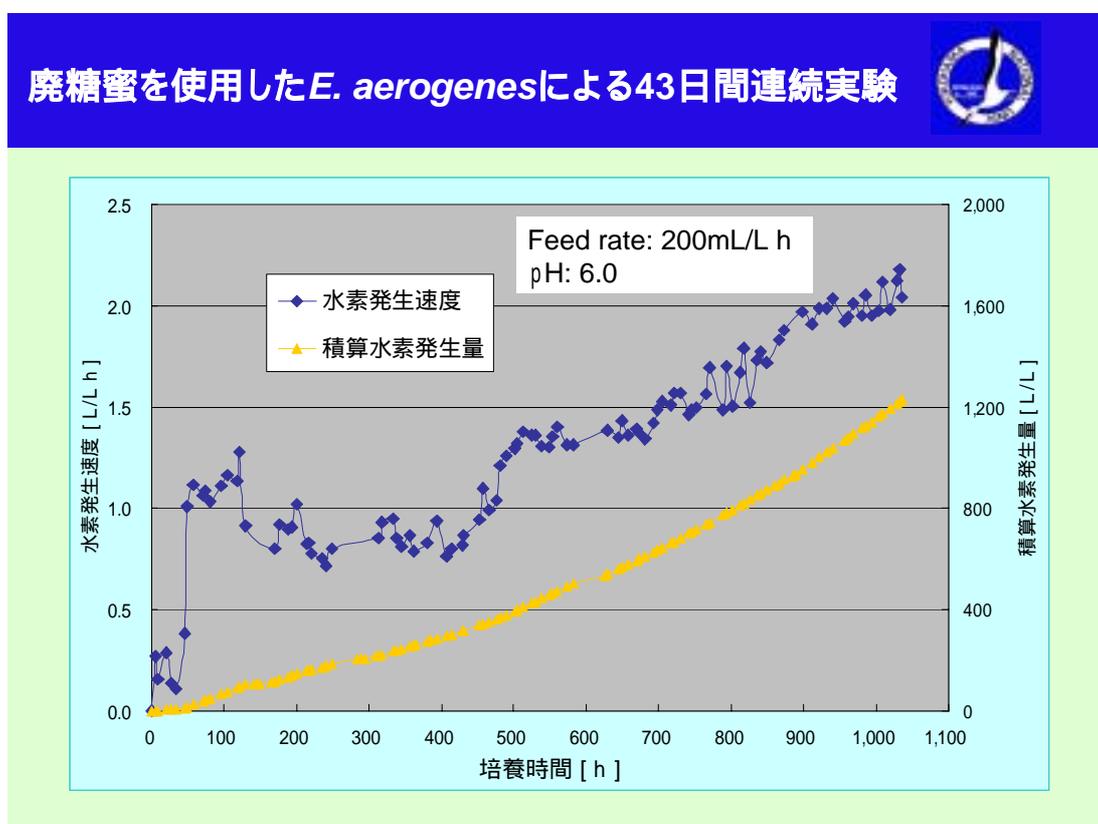


図 5.5.1 廃糖蜜を使用した連続水素発生



図 5.5.2 実験開始時の発酵槽と、連続培養により発酵槽に付着したバクテリアの様子

### 5.5.2 廃糖蜜からの水素生産における原料コストの試算

菌体濃度を増やせば、廃糖蜜から  $2\text{L-H}_2\text{L-culture}^{-1}\text{h}^{-1}$  以上の速さで水素生産できることが明らかになったので、沖縄の製糖工場で発生する結晶化できなかった蔗糖（廃糖蜜）を原料とした水素生産の原料コストを計算した。

$1\text{m}^3$  あたりの水素の値段を次のようにして計算した。

蔗糖は分子量  $362\text{g/mol}$  で 2 モルのグルコースに相当する。

$$1\text{m}^3 \text{ の水素モル数} = 1/0.0224 = 44.6 \text{ mol-H}_2/\text{m}^3$$

$$1\text{kg} \text{ の蔗糖モル数} = 1/0.342 = 2.92 \text{ mol-sucrose/kg}$$

$$\text{廃糖蜜の含糖率} = 30\% = 0.3$$

$$\begin{aligned} 1\text{kg} \text{ の水素生産モル数} &= (1\text{kg} \text{ の蔗糖モル数}) \times (\text{蔗糖からの収率}) \\ &= (2.92 \text{ mol/kg}) \times (\text{蔗糖からの収率}) \text{ [mol-H}_2/\text{kg]} \end{aligned}$$

$$1\text{m}^3 \text{ 水素量に必要な蔗糖量} = (1\text{m}^3 \text{ の水素モル数}) / (1\text{kg} \text{ の水素生産モル数}) \text{ [kg/m}^3\text{]}$$

$$\begin{aligned} \text{原料費} &= (1\text{m}^3 \text{ 水素量に必要な蔗糖量}) \times (\text{廃糖蜜原価}) / (\text{廃糖蜜の含糖率}) \\ &= (44.6 \text{ mol/m}^3) / (2.92 \text{ mol/kg}) \times (\text{蔗糖からの収率}) \times (\text{廃糖蜜原価}) / (0.3) \end{aligned}$$

沖縄では 1 トンの廃糖蜜が 2003 年の調査では 1,500 円で引き取られていた。廃糖蜜の価格を 1,000 円と 2,000 円で計算した結果が表 5.5.1 である。グルコースからの水素収率が  $1\text{mol-H}_2/\text{mol-glucose}$  のとき、蔗糖からは 2 モルの水素収率で水素生産できるので、HN001 株の水素収率なら  $1\text{m}^3$  の水素が 19 円弱の原料コストで生産できることになる。

表 5.5.1  $1\text{m}^3$  の水素生産にかかる原料コスト

## 1Nm<sup>3</sup> のH<sub>2</sub>発生に必要な廃糖蜜量と原料費

(30%含糖率のとき)

計算式= $44.6[\text{mol}/\text{m}^3] / 2.92[\text{mol}/\text{kg}] / \text{蔗糖収率} \times \text{廃糖蜜原価}[\text{円}/\text{t}] / 0.3 / 1000$

収率 <sub>gluc</sub>	収率 <sub>suc</sub>	廃糖蜜*	原料費[円/Nm <sup>3</sup> ]	
			1500円/t	2000円/t
1	2	25.5	38.2	50.9
2	4	12.7	19.1	25.5
3	6	8.5	12.7	17.0
4	8	6.4	8.5	12.7
5	10	5.1	6.4	10.2
10	20	2.5	3.2	5.1

\*糖濃度30%とする  
 沖縄の製糖会社の濃度と港渡し価格 1,500円/t (2003.2)

### 5.5.3 サトウキビからの水素生産における原料コストの試算

ブラジルではサトウキビの絞り汁から直接発酵によるエタノール生産を行っている。1トンのサトウキビからエタノールは平均 88.3L 製造出来、エタノールの製造コストは 15.01 ドル、内サトウキビの栽培コストは 11.47 ドルであると報告されている (NEDO 調査報告書 04002742-0)。つまり、ブラジルなら、製造コストの 76%を原料費が占める。水素発酵では蒸留工程を必要としないので、エタノール製造より操業コストは低くなると考えられるので、サトウキビの絞り汁を使用したら原料コストはどれくらいになるか計算した。表 5.5.2 にその結果を示した。

1 トンのサトウキビには 13.5%の蔗糖が含まれているので、収率 1 mol-H<sub>2</sub>/mol-glucose で水素生産出来ると、1 トンのサトウキビから生産出来る水素量は

$$\begin{aligned} \text{水素生産量} &= (1000) \times (0.135) / (0.342) \times (2) = 789 \text{ [mol-H}_2\text{/t-cane]} \\ &= 17.7 \text{ [m}^3\text{/t-cane]} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{原料コスト} &= (17.7) / (11.47) = 0.649 \text{ [$/m}^3\text{]} \\ &= 77.8 \text{ [¥/m}^3\text{]} \quad (\text{120 円/ドルで換算}) \end{aligned}$$

収率 2.5 で水素生産出来れば、32.4 円/m<sup>3</sup>の原料コストでサトウキビからでも製造出来る。我々の考案した菌の改良が成功すれば、10 円以下の原料コストになり、サトウキビからでも発酵で水素生産が可能になる。

表 5.5.2 ブラジルのサトウキビから発酵水素生産したときの原料コスト

ブラジルのサトウキビから水素生産したときの原料コスト					
水素収率	水素生産量		原料コスト		
	[mol/t-cane]	[m <sup>3</sup> /t-cane]	[US\$/m <sup>3</sup> ]	[¥/m <sup>3</sup> ]	
1	789	17.7	0.649	77.8	エタノール生産コスト: 15.01 US\$/t-cane  内 サトウキビ栽培コスト: 11.47 US\$/t-cane  エタノール生産量: 88.3 L/t-cane
2	1,579	35.4	0.324	38.9	
3	2,368	53.1	0.216	25.9	
4	3,158	70.7	0.162	19.5	
5	3,947	88.4	0.130	15.6	
6	4,737	106.1	0.108	13.0	
7	5,526	123.8	0.093	11.1	
8	6,316	141.5	0.081	9.7	
9	7,105	159.2	0.072	8.6	
10	7,895	176.8	0.065	7.8	

#### 5.5.4 水素生産における経済性試算

平成15年度、16年度につづき、本年度も経済性を試算した。本年度は昨年度を超える顕著な成果は得られなかったため、昨年度と同等の試算となった。非常に安い水素価格が要求されているので、やはり、現状の水素収率では単純に売却するより魅力となる利益を上げることは難しいと言うのが廃糖蜜からの水素生産の結論である。

今後、収率改善を成功させるべく研究を続けることと、処理経費を必要とするような、たとえば生ゴミや賞味期限が切れた食品など、多量に密度高く発生する原料の情報取得が必要である。

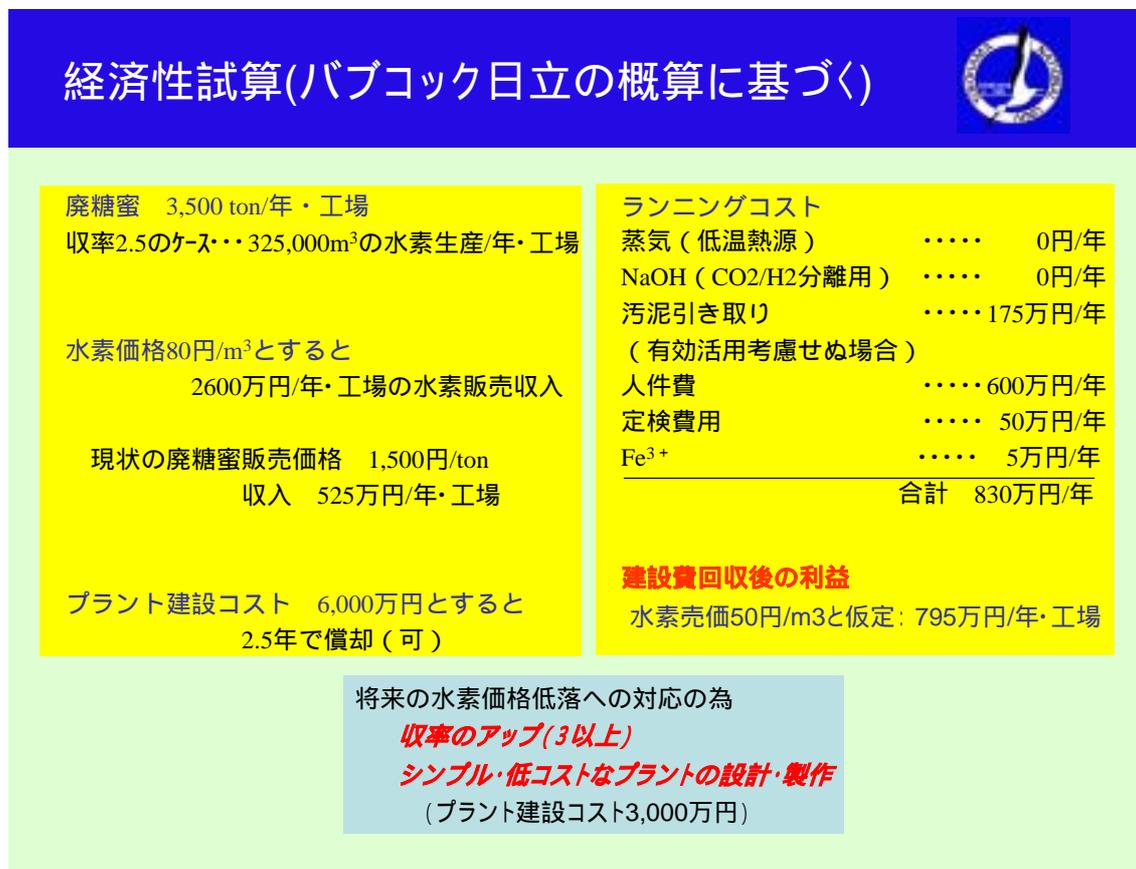


図 5.5.3 廃糖蜜からの水素生産経済性試算

## 6. まとめ

3年間の研究開発で特記すべき主な成果の一覧を以下に示す。

最大の成果は非常に高速で水素生産する中温菌 HN001 株を発見したことである。表 6.1 には代表的な水素発生菌の発生速度などを示しているが、HN001 株の発酵液あたりの速さが世界のチャンピオンデータであるだけでなく、単位菌体重量あたりの水素発生速度でも従来菌の 2 倍に近い速度を持ち、極めて発生速度の速い菌であることがわかる。またこの菌株の特徴は、培養温度を高くすると代謝産物に変化し、50℃では等量のエタノールと酢酸だけに近づくことである。これは、将来、発酵廃液の処理を画期的に簡易化する技術開発に発展すると考えられる重要な発見である。

表 5.3.1 に見られるように、他にも多くの中温菌株を発見しているが、まだその性能を詳しく調べるところには至っていない。これらは今後順次明らかにする予定である。

表 6.1 代表的微生物の水素発生速度

代表的微生物の水素発生速度			
カテゴリー	倍加速度 h	水素発生速度	
		mmol/L h	mmol/g h
A. 光水素発生			
1. 酸素生成光合成微生物			
	4 ~ 24h		
		<b>0.4</b>	<b>0.4</b>
		<b>1.2</b>	<b>1.3</b>
2. 酸素無生成光合成微生物			
	2.2 ~ 9h		
		<b>5.3</b>	<b>5.3</b>
		<b>3</b>	<b>2.5</b>
		-	<b>10.4</b>
B. 発酵水素発生			
1. 嫌気性バクテリア			
	0.16 ~ 2h		
		-	<b>18</b>
		<b>17</b>	<b>25</b>
		<b>160</b>	<b>44</b>
2. 通性嫌気性バクテリア			
		<b>11</b>	<b>9.5</b>
	0.25h	<b>11</b>	<b>17</b>
	(連続)	<b>36</b>	

## 主な成果 1



- 非常に高速で水素生産する 中温菌を発見。

回分培養における性能:

最大水素発生速度:

3.6 L-H<sub>2</sub>/L·h、47 合成培地

2.1 L-H<sub>2</sub>/L·h、37 擬似生ゴミ培地

水素収率: 2.6 mol-H<sub>2</sub>/mol-glucose

60 L-H<sub>2</sub>/kg-wet 擬似生ゴミ

副産物の割合:

50 で エタノール 46%、酢酸 44%

37 で エタノール 5%、酢酸 26%

## 主な成果 2



フェッドバッチ培養における性能:

培養条件: 37、10時間培養後 80%交換

培地: 擬似生ゴミ (冷凍ご飯、ミックスベジタブル、魚はらわた)

原料濃度: 0.1 kg- wet/L-culture

最大発生速度: 1.4 L-H<sub>2</sub>/L·h at 37

水素収率: 55 ~ 60 L-H<sub>2</sub>/kg-wet

副産物構成: Ethanol 13% , Acetate 38% and Butyrate 24%

43日間連続水素発生 (*E. aerogenes*)

培地: 廃糖蜜

水素発生速度: 2.1 L-H<sub>2</sub>/L·h at 37

積算発生量: 1,200 L-H<sub>2</sub>/L-培地

## 7. 発表論文

- 1) Tanisho, S.; "Hydrogen Production from Kitchen Garbage of Restaurant", Hydrogen and Fuel Cells 2003 Conference and Trade Show, Vancouver, Canada, in CD-ROM (2003)
- 2) 谷生重晴; "バイオマス水素製造", 個体高分子型燃料電池のすべて, 田村 英雄監修, エヌ・ティー・エス, pp.223-238 (2003)
- 3) 谷生重晴; "バクテリアはなぜ水素を発酵で発生するのか", 水素エネルギーシステム, Vol.29, No.1, pp.2-6 (2004)
- 4) Tanisho, S.; "The reason why bacteria evolve hydrogen by fermentation", 15th World Hydrogen Energy Conference, Yokohama, Japan, in CD-ROM (2004)
- 5) Yagishita, T., and S. Tanisho; "Improvement of hydrogen production yield of *Enterobacter aerogenes* by addition of electron transfer mediators", 15th World Hydrogen Energy Conference, Yokohama, Japan, in CD-ROM (2004)
- 6) Kurokawa, T., and S. Tanisho; "Effects of formate on fermentative hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*", 15th World Hydrogen Energy Conference, Yokohama, Japan, in CD-ROM (2004)
- 7) 谷生重晴、上江州志帆; "廃糖蜜を利用した連続発酵水素生産", 化学工学会沖縄大会, D126, (2004)
- 8) 西山大紀、谷生重晴; "中温水素発生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, A04, pp.13-16 (2004)
- 9) 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, P30, pp.271-274 (2004)
- 10) 谷生重晴、Ma Ah Ngan、森本昌義、吉野貞蔵; "バイオマス/バイオエネルギー変換技術の開発", 平成16年度研究助成事業成果報告会, H-02, pp.14-20 (2005)
- 11) Nishiyama, H. and S. Tanisho; "Fermentative hydrogen production by a newly isolated mesophilic bacterium", 8th Asian Hydrogen Energy Conference, Beijing, China, pp.107-112 (2005)
- 12) Yasuda, K. and S. Tanisho; "Fermentative hydrogen production from synthetic food wastes", 8th Asian Hydrogen Energy Conference, Beijing, China, pp.113-117 (2005)
- 13) 谷生重晴; "バクテリアの発酵水素発生機構", エコバイオエネルギーの最前線, 植田充美ら監修、シーエムシー出版, pp.154-162 (2005)
- 14) Yagishita, T. and S. Tanisho; "Biological and bioelectrochemical hydrogen production from glycerol", 14th European Biomass Conference & Exhibition, Paris, France, (2005)
- 15) Tanisho, S.; "Hydrogen production by fermentation", IPHE Renewable Hydrogen Workshop, Seville, Spain, in CD-ROM (2005)

- 16) 谷生重晴; "バイオマスを利用した発酵水素生産の可能性について", 第 25 回水素エネルギー協会大会, 招待講演, pp.IV-XIII (2005)
- 17) 西山大紀\*, 谷生重晴; "中温水素発生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, P13, pp.171-174 (2005)
- 18) 金子隆史\*, 谷生重晴; "酪酸発酵の遺伝子操作による制御設計の研究", 第 25 回水素エネルギー協会大会, P14, pp.175-178 (2005)
- 19) 原田禎子\*, 谷生重晴; "遺伝子操作による通性嫌気性菌の水素発生能力の改善の研究", 第 25 回水素エネルギー協会大会, P15, pp.179-182 (2005)
- 20) 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, B13, pp.109-112 (2005)