

通性嫌気性細菌を利用した廃棄物処理と水素生産の検討

伊藤 武志*・中島田 豊**・仙波 光太郎**・松井 知彰**・西尾 尚道**

The production of hydrogen from waste by facultative anaerobes

Takeshi Ito*, Yutaka Nakashimada**, Koichiro Senba**, Tomoaki Matsui** and Naomichi Nishio**

Abstract

H₂ and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after a manufacturing process for biodiesel fuel (biodiesel wastes) using *Enterobacter aerogenes* HU-101 was evaluated. The biodiesel wastes should be diluted with a synthetic medium to increase the rate of glycerol utilization and the addition of yeast extract and tryptone to the synthetic medium accelerated the production of H₂ and ethanol. The yields of H₂ and ethanol decreased with an increase in the concentrations of biodiesel wastes and commercially available glycerol (pure glycerol). Furthermore, the rates of H₂ and ethanol production from biodiesel wastes were much lower than those at the same concentration of pure glycerol, partially due to a high salt content in the wastes. In continuous culture with a packed-bed reactor using self-immobilized cells, the maximum rate of H₂ production from pure glycerol was 80 mmol/l/h yielding ethanol at 0.8 mol/mol-glycerol, while that from biodiesel wastes was only 30 mmol/l/h. However, using porous ceramics as a support material to fix cells in the reactor, the maximum H₂ production rate from biodiesel wastes reached 63 mmol/l/h.

1. はじめに

現在のディーゼル車の排気ガス中にはSO_x、NO_x、浮遊粒子状物質 (Suspended particulate matter, SPM) 等が含まれ、大気汚染の問題が深刻化している。SO_xやNO_xは酸性雨や光化学スモッグの原因となり、SPMは呼吸器疾患や肺がんの原因になると懸念されている。一方、わが国で発生する廃食用油の総量は年間50万トンと言われており、その有効な処理法の開発が必要である。これら二つの問題を同時に解決する方法として、クリーンエネルギーであるバイオディーゼル燃料生産の開発がある。バイオディーゼル燃料は軽油代替エネルギーとして車、船、自家発電用燃料など様々な用途が期待されている¹⁾。バイオディーゼル燃料 (BDF) はパーム油、ナタネ油、廃油などの混合物とメタノールを反応させてできるメチルエステルで、排気ガス中にSO_xはほとんど排出されず、SPMの排出量も従来のディーゼル燃料と比べて1/3に抑えられる。バイオディーゼル燃料生産には現在、化学触媒法が利用されているが、この方法ではグリセロールを含む廃液が副産物として生成され、その処理が問題となっている。

近年、グリセロールを基質とした微生物による様々な化合物の発酵が報告されているが、特にポリエステルの成分である1, 3-プロパンジオール発酵が注目されている²⁾。グリセロールからの1, 3-プロパンジオール生成は*Klebsiella pneumoniae*³⁾、*Citrobacter freundii*⁴⁾、*Clostridium butyricum*⁵⁾、*Enterobacter agglomerans*⁶⁾等の微生物によって行われている。しかし、H₂はクリーンエネルギーとして期待され、エタノールはガソリンの添加剤として用いられていることから、グリセロールからのH₂およびエタノール生産は魅力的な方法である。

H₂生産菌である*E. aerogenes*は表1にみられるように、グリセロールを基質としたとき他の基質と比べて、H₂生成が非常に高いということが確認されている⁷⁾。本菌はグリセロールを基質とした場合、主にH₂、エタノール、1, 3-プロパンジオール生成し、酢酸、乳酸、コハク酸生成は僅かである。そこで本研究では、*E. aerogenes*を用いてグリセロールを主成分としたバイオディーゼル廃液を基質とし、H₂およびエタノール生成のための培地検討を行った。また、充填床式リアクターを用いた連続培養でのH₂生産も検討した。

* 総合教育科

** 広島大学大学院 先端物質科学研究科

表1 *Enterobacter aerogenes*による様々な炭素源からの水素、エタノール収率

Substrate	H ₂ (mmol/g substrate)	Ethanol (mmol/g substrate)
Glucose	1.97	2.59
Fructose	2.17	2.73
Galactose	1.90	2.65
Sorbitol	4.96	5.80
Mannitol	5.20	5.30
Glycerol	6.69	7.05

基質濃度 10 g/l、培養時間 14 h

2. 実験方法

2.1 培養方法

使用菌株は、広島大学大学院先端物質科学研究科代謝変換制御学研究室でメタン発酵汚泥より単離された *Enterobacter aerogenes* HU 101を使用した。

前培養は15%グリセロールで冷凍保存 (-80°C) した保存株を 5 mlの複合培地または最小培地に 4% (v/v) 接種し、37°C、120rpmで好氣的に一晩振盪培養した。嫌気培養の際、各培地を100°C、20minボイルした後、水中にて急冷しながらN₂ガスを吹き込み、脱気を行った⁸⁾。なお、滅菌する際、培地中にグリセロール、リン酸塩、マグネシウム塩が同時に存在すると、培地が褐変するため、それぞれ別々に調整し、滅菌後 (18min、121°C)、シリンジで、嫌氣的に混合した。前培養液を125ml容バイアル瓶中の50mlの培地に 4%接種し、37°Cで振盪培養した⁹⁾。

2.2 使用培地

本研究で用いたバイオディーゼル廃液は広島県大朝町で回収されたものを使用し、グリセロール413g/lを含む。また、25%のメタノールおよび8%の灰分を含んでおり、全TOCは540g/lであった。

本研究で用いた合成培地にはリン酸二水素カリウム 7.0g/l、リン酸水素二カリウム5.5g/l、硫酸アンモニウム 1.0g/l、硫酸マグネシウム七水和物0.25g/l、塩化カルシウム二水和物0.021g/l、モリブデン酸ナトリウム二水和物0.12g/l、ニコチン酸2.0mg/l、セレン酸ナトリウム 0.172mg/l、塩化ニッケル0.02mg/lおよび微量元素が含まれる。複合培地は0.5~5 g/lの酵母エキスとトリプトンを実験に応じて各濃度で合成培地に加えた。

2.3 連続培養

連続培養は図1示す充填床式リアクター (培地容量 60ml、φ2.7×17cm height) を使用した。培養は嫌気条件下で37°CでpHコントロールおよび攪拌なしで行われた。

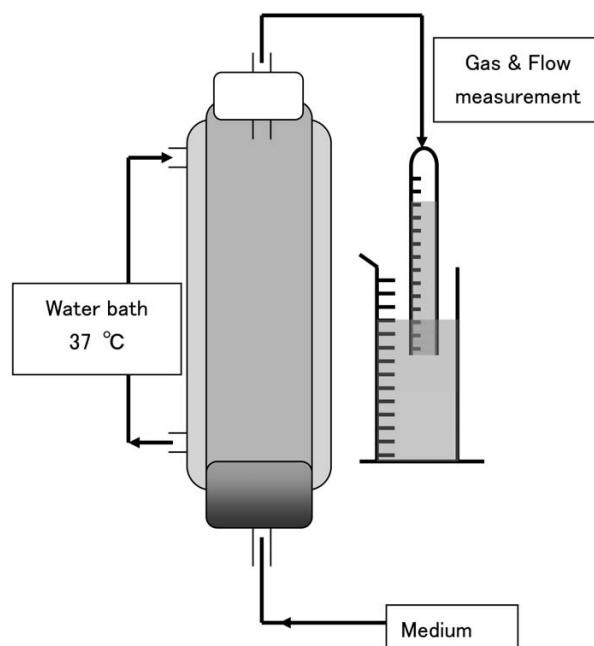


図1 充填床式リアクターによる連続培養

2.4 分析方法

H₂およびCO₂はガスタイトシリンジを用いてサンプルを引き取り、ガスクロマトグラフィーで分析した。

エタノール、酢酸、乳酸、コハク酸、1, 3-プロパンジオール、2, 3-ブタンジオールはサンプルを遠心分離後、上清を適度に希釈した後、液体クロマトグラフィーで分析した。

グリセロール濃度はF-キット グリセロール (Roche Diagnostics K. K., Tokyo, Japan) を用いて測定した。

3. 実験結果および考察

3.1 バイオディーゼル廃液における最適培地の検討

E. aerogenes HU101によるバイオディーゼル廃液を基質としたH₂およびエタノール発酵はコスト面または発酵後の処理を考えた場合、できるだけ添加物を加えない方が望ましい。そこで、最初にバイオディーゼル廃液の培養は脱イオン水希釈液を培地として希釈しただけで検討を行った。バイオディーゼル廃液を10g/l (80mM) グリセロール濃度になるように希釈した時、48時間の培養でも完全にグリセロールを消費せず、菌の生育もほとんど見られなかった。この結果より、バイオディーゼル廃液の成分だけでは栄養が不足している、もしくはバイオディーゼル廃液に阻害物質が含まれていることが示唆された。

そこで、栄養不足の検討を行うため、合成培地を用いて、バイオディーゼル廃液を希釈し培養を行った。硫酸アンモニウムおよび硫酸マグネシウム濃度を変えて、12時間培養した結果を表2、3に示す。水のみでの培養ではほとんどグリセロールが消費されなかったのに対して、合成培地では12時間の培養において最大で約70mMのグ

リセロールを消費することができた。また、硫酸アンモニウム濃度1.0g/l、硫酸マグネシウム濃度で0.25g/lにおいてグリセロール消費量および水素生産量が最大であった。今後、この濃度を用いて実験を行った。

表2 完全合成培地における硫酸アンモニウムの最適濃度検討

	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/l)			
	0.1	1	5	10
H ₂ (mM)	40.5	61.0	55.3	49.3
Residual Glycerol (mM)	33.4	9.6	18.0	36.0

表3 完全合成培地における硫酸マグネシウムの最適濃度検討

	MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/l)		
	0.25	0.5	1
H ₂ (mM)	61.0	45.10	48.7
Residual Glycerol (mM)	9.6	34.5	26.5

次に酵母エキスとトリプトンを加えた複合培地を使用することで、H₂およびエタノール生成速度が促進した。(図2) 12時間後のグリセロール消費速度は0.5g/lの酵母エキスとトリプトンの添加でさえ、合成培地と比べ大きく促進し、酵母エキスとトリプトンを5g/l添加することでグルコースを12時間で完全に消費することができた。これら結果から*E. aerogenes* HU101の生育にはアミノ酸やビタミンなど複合培地に含まれる栄養が必要であることが示唆された。

3. 2 バイオディーゼル廃液濃度の効果

なるべくランニングコストを安く、リアクターサイズを小さくするには、可能な限りバイオディーゼル廃液の濃度が高いほうが望ましい。そこで、グリセロール濃度を1.7, 3.3, 10, 25g/lにそれぞれ調製し、5g/lの酵母エキスとトリプトンを添加した複合培地で、回分培養を行った(表4)。グリセロールを基質とした場合、理論上1.0 mol/molのH₂生成が最大である。しかし、グリセロール濃度1.7g/lの培養において、1.12mol/molのH₂を生成した。これはバイオディーゼル廃液に含まれる未知の炭素源がH₂生成に使われたためだと考えられる。また、グリセロール濃度が高くなるにつれて、H₂、エタノール、酢酸生成が減少し、乳酸生成が増加した。さらに、グリセロール濃度25g/lの時、48hの培養ですら、グリセロールを完全に消費できなかった。

グリセロール濃度のみの効果を検討するため、市販されているグリセロール(純グリセロール)を用いて、同様にグリセロール濃度を調製し、回分培養を行った(表

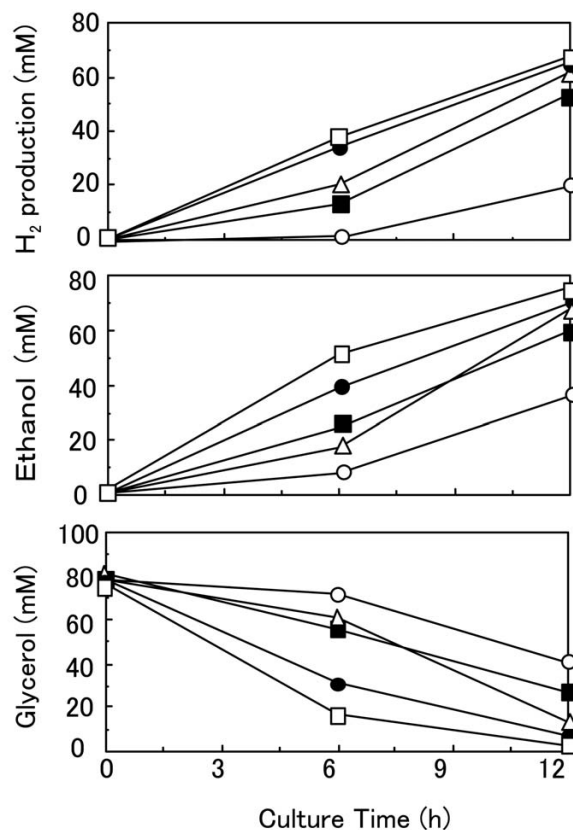


図2 複合培地での回分培養。

- ：トリプトン、酵母エキスなし
- ：トリプトン、酵母エキス共に0.5 g / l
- △：トリプトン、酵母エキス共に1.0 g / l
- ：トリプトン、酵母エキス共に2.5 g / l
- ：トリプトン、酵母エキス共に5.0 g / l

5)。その結果、純グリセロール濃度5g/l, 10g/lでは6時間でグリセロールは消費され、25g/lでも12時間で消費した。グリセロール濃度5g/lの培養において、H₂およびエタノールは1 mol/mol-glycerol生成したが、グリセロール濃度が増加するにしたがい、H₂、エタノールの生成は減少した。このことより、高濃度のグリセロールはH₂、エタノールの収率を減少させることが示唆された。

3. 3 *E. aerogenes* によるH₂生産における不純物濃度の効果

表4と表5を比較すると、グリセロール濃度10g/l, 25g/lにおいて、バイオディーゼル廃液のグリセロール消費速度が純グリセロールのグリセロール消費に比べ著しく低いことがわかる。また、バイオディーゼルはアルカリ触媒法によって作られる。アルカリ触媒法は主に水酸化ナトリウム、メトキシドナトリウム、水酸化カリウムが使われており、エステル化後、中和が行われるため、バイオディーゼル廃液はNaClなどの塩を大量に含んでいる。これら中和を伴う塩の存在が生育に障害を与えている可能性があるため、H₂およびエタノール生産における

表4 バイオディーゼル廃液のグリセロール濃度の検討

	Glycerol concentration (g/l)			
	1.7	3.3	10	25
Time required for complete glycerol consumption (h)	4	4	12	> 48*
Yield (mol/mol-glycerol)				
H ₂	1.12	0.90	0.71	0.71
Ethanol	0.96	0.83	0.67	0.56
Lactate	ND	0.05	0.11	0.17
Acetate	0.2	0.1	0.09	0.06
1,3-Propanediol	0.2	0.22	0.12	0.17
Formate	0.14	0.2	0.19	ND

※複合培地を使用。

表5 市販のグリセロールを用いた濃度検討

	Glycerol concentration (g/l)		
	5.0	10	25
Time required for all glycerol consumption (h)	4	6	12
Yield (mol/mol-glycerol)			
H ₂	1.05	0.89	0.82
Ethanol	1.00	0.86	0.80
Lactate	0.06	0.14	0.12
Acetate	0.07	0.09	0.02
1,3-Propanediol	0.06	0.16	0.14
Formate	0.10	0.12	0.01

NaCl濃度の効果を検討した(図3)。基質に純グリセロールを用いた場合、1%のNaCl添加はNaClを含まない培地と比べてH₂、エタノール生成に変化は見られなかった。一方、バイオディーゼルを基質として用いた場合、1%のNaClでH₂、エタノール生成が減少した。バイオディーゼルのグリセロール濃度10g/lに希釈したときの灰分濃度は約0.2%である。図3で灰分をすべてNaClと考えた場合、バイオディーゼル廃液に1%のNaClを加えた時の実質のNaCl濃度は1.2%である。純グリセロールのH₂、エタノール生成は塩濃度を増やすと減少しているため、バイオディーゼル廃液に含まれる高い塩濃度は生産物形成を阻害している因子の1つかもしれない。しかし、バイオディーゼル廃液のグリセロール濃度10g/l、25g/lに含まれる灰分濃度はそれぞれ、0.2%、0.5%であるので、純グリセロールはNaCl濃度1%まで水素を生産していることを考慮すると、バイオディーゼルに灰分以外の阻害物質が含まれている可能性が考えられる。

また、今回使用したバイオディーゼル廃液には25%のメタノールが含まれている。そこで、本培養において、メタノールの効果を検討した。その結果、純グリセロール濃度10g/lに3%メタノールを添加した培養において、全く阻害がなかった。今回、著しくグリセロール消費が減少したバイオディーゼル廃液をグリセロール濃度25g/lに希釈したときのメタノール濃度は約1.5%である。このことは、今回の培養において、メタノールは阻害の一因ではないことが確認された。

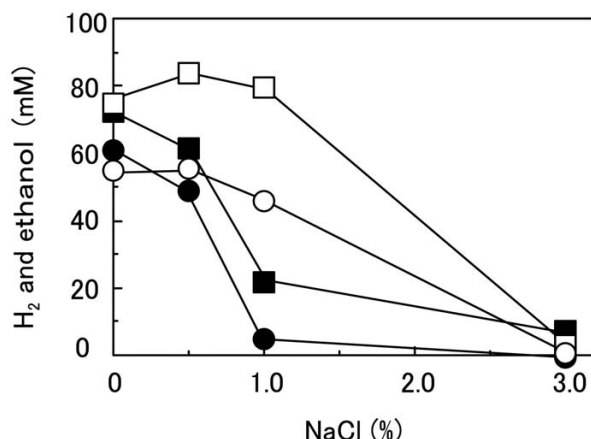


図3 H₂およびエタノール生産におけるNaCl濃度の効果

- ：純グリセロールにおける水素生産量
- ：廃液における水素生産量
- ：純グリセロールにおけるエタノール生産量
- ：廃液におけるエタノール生産量

3.4 充填床式リアクター (packed-bed reactor) を用いた連続培養

バイオディーゼル廃液からのエタノール生産速度、H₂生産速度を測定するため、固定化菌体を用いて連続培養を行った。自己固定化菌体や様々な担体を用いた固定化菌体システムは水素発酵の連続培養に適合していることが近年報告されている¹⁰⁻¹²⁾。

図4に自己固定化菌体を用いた連続培養の結果を示す。110mMのグリセロール(純グリセロール、バイオディーゼル廃液)、複合培地(5.0g/l酵母エキス、5.0g/lトリプトン)の培養条件で行った。純グリセロールを基質とした場合、最大H₂生産速度は80mmol/l/hでグリセロールは1.3h⁻¹まで完全に消費した(図4-A)。また、希釈率が高くなると1,3-プロパンジオール生成が増加したが、エタノール収率は0.9mol/mol-glycerolを維持した。

一方、バイオディーゼル廃液を用いた場合、純グリセロールと比較して菌体の凝集性が悪かった。希釈率0.8h⁻¹において最大H₂生産速度は30mmol/l/hであった。そこで担体に発泡練石(サイズ4-14mm、空隙率81%、孔長径128μm)¹³⁾を、菌体をより多く付着するために用いた。その結果、希釈率1.2h⁻¹、最大H₂生産速度63mmol/l/hまでH₂生産が改善された(図5)。純グリセロールと比較してH₂生産速度は低いが、発泡練石を用いることでバイオディーゼル廃液の連続培養が可能であった。

4. まとめ

近年、地球温暖化防止のために二酸化炭素放出の国別総量規制の交際の合意がなされたことにより、石油などの化石燃料に代わる循環型エネルギーの利用が急務となっている。特にH₂は燃料電池の開発に伴い、次世代

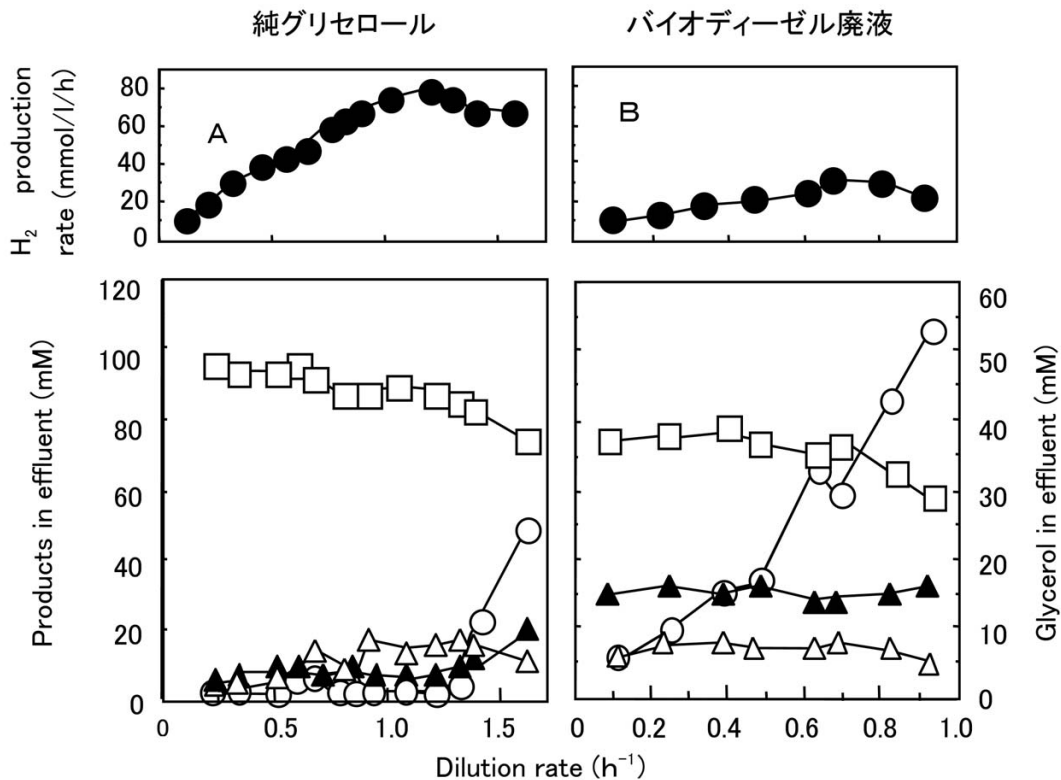


図4 自己固定化菌体を用いた連続培養
 ●：水素生産速度、○：グリセロール、□：エタノール
 △：1,3-プロパンジオール、▲：ギ酸

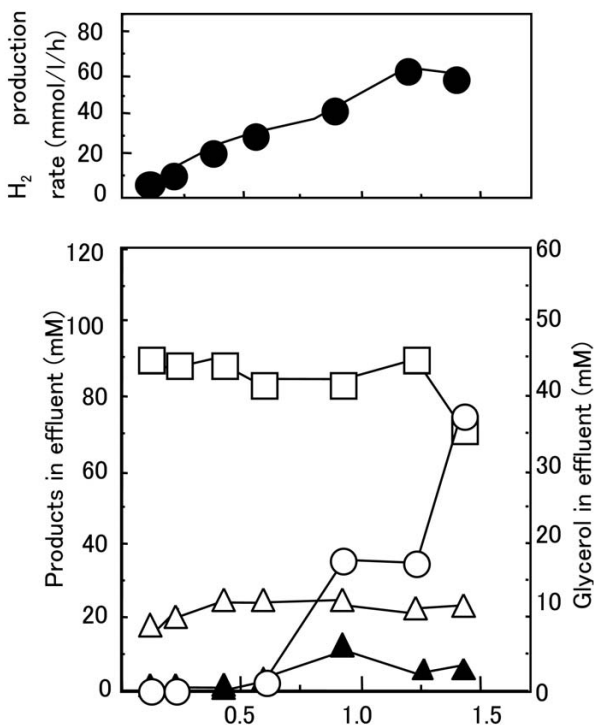


図5 発泡練石を用いた連続培養
 ●：水素生産速度、○：グリセロール、
 □：エタノール、△：1,3-プロパンジオール、
 ▲：ギ酸

クリーンエネルギーとして注目されている。H₂はこれまで、各種のH₂生産法が検討されているが、その中で微生物を利用したH₂生産の研究が盛んに行われている。また、近年ナタネ油等からバイオディーゼルを精製する際、廃油も同時に生成され近年その処理が問題になっている。そこで本研究では、廃油の主成分であるグリセロールを基質とした*E. aerogenes* HU101の培養条件及びH₂生産の最適化を検討し、本菌を使った環境廃棄物からの発酵H₂生産の実用化を目指した。回分培養でグリセロール濃度の検討をおこなった結果、グリセロール濃度が高くなると副生成物である乳酸、酢酸、1,3-プロパンジオールの生成量が増加しH₂収率が低くなった。合成培地で(NH₄)₂SO₄、MgSO₄の最適濃度を検討したところ、廃液中のグリセロール濃度10g/lに対しそれぞれ、1.0g/l、0.25g/lだった。同様にNaCl濃度の検討も行ったが、0.5%の添加でさえH₂生産が減少することから、廃液中の塩濃度が高いことが考察される。また、この合成培地は複合培地に比べ、H₂生産、グリセロール消費が低く、さらなる条件検討が必要である。次に複合培地を用いグリセロール濃度10g/lで自己固定化菌体を用いた固定相リアクターによる連続培養を行った。その結果、基質が純グリセロールの時、希釈率1.3 h⁻¹、最大H₂生産速度80mmol/l/hまでH₂生産が可能だったのに対し、基質がグリセロール廃液の時、希釈

率 0.9 h^{-1} 、最大 H_2 生産速度 30mmol/l/h と低い H_2 生産であった。そこで担体に発砲練石を用いたところ、希釈率 1.2 h^{-1} 、最大 H_2 生産速度 63mmol/l/h まで H_2 生産が改善された。今後、さらなる最適条件の検討、高 H_2 生産株の構築および解析を行なうことで、将来的実用可能な高 H_2 生産系の構築が期待される。

参考文献

- (1) Eggersdorfer, M., Meyer, J., and Eckes, P.: Use of renewable resources for non-food materials. *FEMS Microbiol. Rev.*, 103, 355-364 (1992).
- (2) Streekstra, H., Teixeira de Mattos, M. J., Neijssel, O. M., and Tempest, D. W.: Overflow metabolism during anaerobic growth of *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 on glycerol and dihydroxyacetone in chemostat culture. *Arch. Microbiol.*, 147, 268-275 (1987).
- (3) Ogbe Solomon, B., Zeng, A. P., Biebl, H., Okechukwu Ejiofor, A., Posten, C., and Deckwer, W. D.: Effects of substrate limitation on product distribution and H_2 / CO_2 ratio in *Klebsiella pneumoniae* during anaerobic fermentation of glycerol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 42, 222-226 (1994).
- (4) Boenigk, R., Bowien, S., and Gottschalk, G.: Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol in continuous cultures of *Citrobacter freundii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 453-457 (1993).
- (5) Abbad-Andaloussi, S., Durr, C., Raval, G., and Petitdemange, H.: Carbon and electron flow in *Clostridium butyricum* grown in chemostat culture on glycerol and on glucose. *Microbiology*, 142, 1149-1158 (1996).
- (6) Barbirato, F., Bories, A., Camarasa-Claret, C., and Grivet, J. P.: Glycerol fermentation by a new 1,3-propanediol producing microorganism : *Enterobacter agglomerans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43, 786-793 (1995).
- (7) Nakashimada, Y., Rachman, M. A., Kakizono, T., and Nishio, N.: H_2 production of *Enterobacter aerogenes* altered by extracellular and intracellular redox states. *Int. J. Hydrogen Energy*, 27, 1399-1405 (2002).
- (8) Miller, T.L. and Wolin, M.J.: A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *Appl. Microbiol.*, 27, 985-987 (1974).
- (9) Rachman, M.A.: Studies on enhancement of H_2 production by fermentative H_2 -producing bacterium, 広島大学大学院工学博士論文 (1998).
- (10) Chang, J.S., Lee, K.S., and Lin, K.S.: Biohydrogen production with fixed-bed bioreactors. *Int. J. Hydrogen Energy*, 27, 1167-1174 (2002).
- (11) Zhu, H., Suzuki, T., Tsygankov, A.A., Asada, Y., and Miyake, J.: Hydrogen production from tofu wastewater by *Rhodobacter sphaeroides* immobilized in agar gels. *Int. J. Hydrogen Energy*, 24, 305 - 310 (1999).
- (12) Kumar, N. and Das, D.: Continuous hydrogen production by immobilized *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 using lignocellulosic materials as solid matrices. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 29, 280 - 287 (2001).
- (13) Mazumder, T.K., Nishio, N., Fukuzaki, S., and Nagai, S.: Production of extracellular vitamin B-12 compounds from methanol by *Methanosarcina barkeri*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 26, 511-516 (1987)