有機性廃棄物からの嫌気性水素発酵に及ぼす有機酸濃度の影響

河野 孝志*
李 玉友*和田 克士**
野池 達也*

Effect of Volatile Fatty Acid on Hydrogen Fermentation of Organic Waste

Takashi KAWANO*, Katsushi WADA**
Yu-You LI* and Tatsuya NOIKE*

* Department of Civil Engineering, Graduate School of Engineering, Tohoku University, 06 Aoba, Sendai, Miyagi 980-8579, Japan

** Energy and Environmental Development Dept., Takuma Co., Ltd., 2-33 Kinrakuji-cho 2-chome, Amagasaki, Hyogo 660-0806, Japan

Abstract

The Influence of volatile fatty acids on hydrogen fermentation from an organic waste by a mixed microflora was investigated in a batch experiment. The batch reactor with a working volume of 1.0 liter was operated at 35°C and a constant pH (5.5 or 6.5) for each experimental run. Dog food was used as the substrate. The seed microflora was a mixed culture obtained by acclimatizing a thermophilic digested sludge by treating the organic fraction of municipal solids waste using glucose as the substrate. The experiments were conducted by changing the initial concentrations of acetic acid and butyric acid from 0 to 50,000mg·l⁻¹ at the substrate concentrations of TS2% to evaluate the substrate decomposition, gas production and metabolic production under each condition. Hydrogen production potential, gas production rate and hydrogen content in the biogas decreased with the increase in the initial concentration of volatile fatty acid. The inhibition effect at a pH of 5.5 was much stronger than that at a pH of 6.5 for a same fatty acid concentration. It was also found that the inhibition caused by fatty acids depends on not only the concentration, but also the type of fatty acid. Butyric acid exerted a stronger inhibition effect than acetic acid. In addition, it was found that an un-ionized fatty acid is a more powerful inhibitor and that hydrogen fermentation is significantly inhibited at an un-ionized fatty acid concentration higher than 200mg·l⁻¹.

Key words : hydrogen production, anaerobic fermentation, inhibition, volatile fatty acid, mixed culture

1. はじめに

農林水産資源などの有機性資源を総合的に利活用することを促進するために、政府は2002年12月に「バイオマス・ニッポン総合戦略」を公表し、その推進・対策を行っている。一方、化石燃料の大量利用に伴って生じる地球温暖化問題が広く認識され、温室効果ガスの削減のため、燃料として利用しても水しか発生しない水素が将来のエネルギー源として考えられている¹⁾。両者の観点から、有機性資源から水素を取り出す技術は注目を集めている。その技術としては、光合成微生物の*Rhodobacter*属、非光合成微生物の*Clostridium*属などの微生物を利用する方法が知られており、研究が進められている。特に、嫌気性非光合成微生物は増殖速度が早く、光合成微生物のように増殖に光を必要としないために連続的な水素の生産(水素発酵)が可能であり、近年注目されている。

嫌気性非光合成の水素生成微生物としては、*Clostridium*属、*Enerobacter*属などがあげられ、既往研究においてはこれらの微生物群の取得または優占化方法^{2~4)}、グルコース、スクロースなどの炭水化物を主成分とする基質での回分

実験^{5,6)}、連続実験^{7~9)}により温度、pH、水理学的滞留時間(HRT)などの操作因子を検討、また、その代謝経路^{10,11)}などについて検討している場合が多い。しかし、回分実験の最適条件で得られた水素収率が、連続実験で必ずしも得られてはいない¹²⁾。この要因の一つとして、発酵液中の水素分圧の上昇が考えられる。Mizunoら¹³⁾は連続実験において発酵液中に窒素を曝気すること、また、Layら¹⁴⁾は反応槽の攪拌速度を上昇させることで発酵液中の水素をガス中へと排除し、その結果発酵液中の水素分圧が減少したため、水素発生ポテンシャルが増加したと報告している。また、別の要因として有機酸による阻害も考えられる。

水素発酵においては、理論的には(1)式のような1molのグルコースから4molの水素が発生する酢酸生成パターンが最も高い水素収率を示し、また(2)式のような1molのグルコースから酪酸を生成する場合には2molの水素が発生する。

このように、水素発酵による水素発生過程では有機酸の生成を伴う。回分実験では発酵の前後で有機酸が増加するの

* 東北大学大学院工学研究科土木工学専攻 〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-06

** 株式会社タクマ 技術開発部 〒660-0806 兵庫県尼崎市金楽寺町2-2-33

に対し、連続実験では生成した有機酸を含む発酵液の中に水素発酵基質が投入されるので、生成した有機酸により、水素生成微生物群が制限を受ける可能性がある。連続実験でHRTが短い、つまり、希釈率が大きい方が水素発酵にとって有利である^{15,16)}ということは、有機酸の希釈率が大きいと制限要因が減少したためとも考えられる。

著者らが行った35℃の条件下、ドッグフードを基質とし、その固形物濃度(Total Solid: TS濃度)を2, 5, 10%と変化させてpHを4.0から7.5の範囲で制御した水素発酵実験¹⁷⁾を考察した。実験終了時の酢酸、酪酸、また、各有機酸を酢酸換算した全有機酸濃度と水素ガス発生ポテンシャルの関係をFig. 1に示す。その結果、TS濃度が高くなると生成する有機酸が多くなった。また、発酵終了時の酢酸、酪酸の生成量が多いほど水素ガス発生ポテンシャルが大きくなった。一方、ギ酸、プロピオン酸、エタノールと水素ガス発生ポテンシャルとの相関は見られなかった。さらに、酢酸、酪酸の生成量に比べてその他有機酸、エタノール生成量が少なかったため全有機酸で評価しても、水素ガス発生ポテンシャルと正の相関が見られた。しかし、ガス発生ポテンシャルが最大となる最適pHはTS濃度の上昇とともに酸性側から中性側へと変化した。そのことから、有機酸はpHにより解離状態が異なるため非解離有機酸(Un-ionized volatile fatty acid)が影響を及ぼしている可能性がある。一般に細胞内のpHは細胞外のpHよりも高く保たれ、細胞膜を通過できるのは非解離の酸である。そのため、発酵液の濃度が高くなると非解離の酸が能動的に細胞内へと輸送され、微生物の代謝に影響を及ぼすと言われている。

本研究では水素生成能をもつ混合微生物群に及ぼす有機酸の影響を検討するため、模擬食品廃棄物系バイオマスに対し初期有機酸濃度を調整し、pH一定制御の回分実験を行った。添加した有機酸は、特に水素発酵で副生成物として多くを占めた酢酸、酪酸を用いた。そして、酢酸、酪酸の初期濃度と制御pHを変化させ、有機酸がガス発生ポテンシャル、基質の分解特性、分解生成物に及ぼす影響を検討した。また、非解離有機酸としての評価を行った。

2. 実験方法及び実験装置

回分実験装置で混合微生物群を用い、初期のTS濃度を2%, 初期の酢酸、酪酸濃度を変化させてpH5.5, 6.5で一定制御し培養した。同じ有機酸濃度でもpH5.5よりもpH6.5の方が非解離有機酸は小さいので、pH5.5制御では約10,000mg・l⁻¹, pH 6.5制御では約50,000mg・l⁻¹までその濃度を変化させた。

2.1 種菌の培養

本研究に用いた種菌は、生ごみのメタン発酵後の消化汚泥を用い、グルコースを主体とする培地 (1lに対し、グルコース5g, 酵母エキス0.5g, NH₄Cl 2.6g, K₂HPO₄ 0.25g, MgCl₂・6H₂O 125mg, FeSO₄・7H₂O 5mg, CoCl₂・6H₂O 2.5mg, MnCl₂・4H₂O 2.5mg, KI 2.5mg, Na₂MoO₄・2H₂O 0.5mg, H₂BO₄ 0.5mg, NiCl₂・6H₂O 0.5mg, ZnCl₂ 0.5mg)で連続的に培養して得られたものである。実験装置は後述するFig. 2と同様であり、反応槽の有効容積は2l, 35℃の温度条件下でNaOH溶液(10N)を用いてpH5.5で一定制御を行った。培地を連続的に供給し、オーバーフローにて排出を行い、HRTは16~18時間であった。その結果、水素の発生が確認

Fig. 1 Correlation of hydrogen gas potential with (a)acetic acid, (b)butyric acid and (c)total volatile fatty acids after the hydrogen fermentation

できた(平均収率0.71mol H₂・mol⁻¹ glucose)。発酵後液中の残存グルコース濃度はほぼゼロであり、VSS (Volatile Suspended Solid)は平均513mg・l⁻¹で、主な生成物はn-酪酸、酢酸、乳酸であった。

2.2 実験用の複合基質

実験に用いた基質は模擬食品廃棄物系バイオマスとして、ドッグフード(日本ペットフード、ビタワンシニア期犬用: 以下DF)をブレンダー(WARLING SB-990)にて粉碎し、850μmメッシュのふるい通過後のものを使用した。DFの性状はTS濃度91.1%, 有機物濃度(Volatile Solid: VS濃度)85.4%, 炭水化物48.9%-dry, タンパク質18.3%-dry, 脂質6.4%-dryであり、炭水化物が主成分であるが、タンパク質、脂質も含まれている。

2.3 実験装置

回分実験に用いた装置をFig. 2に示す。反応槽はアクリル製で全容積1.43l(直径110mm×高さ150mm)であった。初期の投入基質濃度が2%となるようにDFを投入し、種菌を0.20l入れ、そして水で1.0lとした。そして、酢酸、酪酸を所定量添加後、反応槽を35℃に一定制御した恒温水槽内に設置し、pH計(本体: HORIBA D-21, 電極: HORIBA 6378-10D), pH制御装置(SUGAI U-101), 発酵液サンプリング口, ガス捕集装置を取り付け、槽内を窒素置換して嫌気状態とした。槽内発酵液の攪拌はマグネチックスターラー

で行った。初期のpHはHCl溶液(5N)及びNaOH溶液(5N)を用いて調整し、また培養期間中のpHは、pH制御装置によりNaOH溶液(10N)を添加し一定に制御した。ガス発生量は酸性飽和食塩水を用いた水上置換法により経時的に測定した。発酵液は実験開始と終了後にサンプリング口からシリンジで採取し分析に用いた。実験は各設定有機酸濃度の条件に対して複数回行った。

2.4 分析方法

発生ガス中の水素、メタン、二酸化炭素の割合は、TCDガスクロマトグラフ(SHIMADZU GC14B, カラム: SHIN-CARBON ST 3mm×2.0m, キャリアガス: Ar 50ml・min⁻¹)により測定した。炭水化物はグルコースを標準物質としてフェノール硫酸法¹⁸⁾で、タンパク質はアルブミンを標準物質としてModified Lowry Protein Assay Reagent Kit(PIERCE)でそれぞれ定量した。有機酸(ギ酸、乳酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸)は高速液体クロマトグラフィー(Waters アライアンスUVシステム, カラム: SPR-H(G), カラム温度: 40℃, 移動相: 5mM過塩素酸)にて分析を行った。エタノールはFIDガスクロマトグラフ(GL Science GC7000, カラム: PorapackQ, カラム温度: 200℃, キャリアガス: N₂)にて分析した。TS濃度、VS濃度の分析はStandard Methods¹⁹⁾に準拠して行った。溶解性成分は遠心分離(31,200×g, 15分, TOMY GRX -220)後の上澄み液を孔径0.45μmのメンブレンフィルター(ADVANTEC TOYO DISMIC-25CS)でろ過したものを用いた。

3. 実験結果及び考察

3.1 水素発酵に及ぼす初期有機酸濃度の影響

3.1.1 回分実験におけるガス発生量の経時変化

回分式水素発酵実験におけるガス発生量のパターンを例示するため、pH5.5制御の有機酸を添加しないブランク時と初期酢酸濃度5,210mg・l⁻¹における全ガス発生量、水素ガス発生量の経時変化をFig.3に示す。ブランクでは実験開始後すぐにガス発生が起こっているのに対し、初期酢酸濃度5,210mg・l⁻¹では約30時間の遅滞時間の後ガス発生が見られた。このような回分実験における最終的な累積ガス発生量を当該条件でのDFからのガス発生ポテンシャル(P)とし、急激なガス発生が起こった時の単位時間あたりのガス発生量をガス発生速度(V)と定義した。同じ解析方法を用いて各実験条件下のガス発生ポテンシャルとガス発生速度を求めた。

3.1.2 ガス発生ポテンシャル、ガス発生速度への初期有機酸濃度の影響

初期酢酸、酪酸濃度が及ぼすガス発生ポテンシャル、ガス発生速度、水素ガス濃度への影響をFig. 4(以下、各有機酸濃度は酢酸換算で表記)に示す。発生ガス中の主なガス成分は水素、二酸化炭素であり、いずれの実験条件においてもメタンは検出されなかった。

pH5.5制御では、ガス発生ポテンシャルは初期有機酸濃度の増加とともに減少し、ブランクで平均157ml・g⁻¹ VSであるのに対し、酢酸10,100mg・l⁻¹ではブランクの15%, 酪酸7,180mg・l⁻¹では3%まで低下した。ガス発生速度も同様、ブランクで5.2l・l⁻¹・d⁻¹であるのに対し、酢酸10,100mg・l⁻¹では9%, 酪酸7,180mg・l⁻¹では1%以下まで低下した。このようにガス発生ポテンシャル、ガス発生速度とも初期有機

1. Water Bath (35°C) 2. Reactor 3. Magnetic Stirrer
4. Stirring Bar 5. pH Electrode 6. pH Controller
7. NaOH Solution 8. Magnetic Valve 9. Gas Collection system
10. Broth Sampling Port 11. Gas Sampling Port

Fig. 2 Schematic of the experimental apparatus

Fig. 3 Cumulative gas production from DF fermentation on condition of TS 2% without / with acetic acid 5,210mg・l⁻¹ (bk : blank test, aa : acetic acid addition, TG : Total Gas Production, HG : Hydrogen Gas Production)

Fig. 4 Effect of volatile fatty acid on (a)total gas potential, (b)volumetric total gas production rate and (c)hydrogen gas concentration

酸濃度の増加により減少し、酢酸よりも酪酸の方がその影響が大きかった。

pH6.5制御では、ガス発生ポテンシャルはブランクで $52.1\text{m}^3\cdot\text{g}^{-1}$ VSであるが、酢酸 $16,400\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ では $89.8\text{m}^3\cdot\text{g}^{-1}$ VS、酪酸 $11,000\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ では $90.3\text{m}^3\cdot\text{g}^{-1}$ VSまで増加したのを境にそれ以上では減少し、酢酸 $52,000\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ で、酪酸 $34,000\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ でガス発生が見られなくなった。ガス発生速度も同様の傾向を示した。また、水素ガス濃度は初期有機酸濃度の増加によりブランクの70%から減少傾向を示したが、酢酸、酪酸の相違はなく、pH5.5制御に比べ減少割合は小さかった。

これらのことから、ガス発生ポテンシャル、ガス発生速度は、初期酢酸、酪酸濃度により影響を受け、pH5.5制御では濃度の増加により減少し、pH6.5制御では一時的に上昇するがその後減少した。そして、pH5.5制御ではpH6.5制御よりも低い有機酸濃度でガス発生が見られなくなり、pH6.5制御の方がその影響が小さかった。また、酢酸よりも酪酸の方がガス発生ポテンシャルに対する影響が大きかった。

3.1.3 炭水化物、タンパク質分解への初期有機酸濃度の影響

初期酢酸、酪酸濃度が及ぼすDFの炭水化物とタンパク質の分解率への影響をFig. 5に示す。pH5.5制御では炭水化物の分解率は、初期酢酸、酪酸濃度とも約 $3,000\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ までは80%以上の分解率である。しかし、それ以上の濃度では酢酸 $10,100\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ で43%、酪酸では $7,180\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ で22%となり、酪酸の方が低い濃度で分解率が小さくなった。タンパ

Fig. 5 Effect of volatile fatty acid on the decomposition efficiency of carbohydrates and proteins

ク質の分解率は、初期酢酸、酪酸濃度とも同様に、40%前後の分解率を維持しており、その濃度が高くなると分解率はやや低下傾向を示した。

一方、pH6.5制御では、炭水化物の分解率は初期酢酸、

Table 1 End products yields of batch H_2 fermentation at a constant pH of 5.5

initial total VFAs [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ as CH_3COOH]	blank	acetic acid				butyric acid			
		2,100	3,680	5,210	10,100	1,680	2,920	4,010	7,180
Hydrogen	10.2	4.2	3.9	2.1	0.6	6.2	2.7	1.4	0.0
Lactic acid	1.7	1.3	1.1	-0.1	-2.8	2.9	1.2	5.2	8.4
Acetic acid	7.8	-1.4	-8.2	15.7	-6.6	11.9	8.6	3.7	0.8
Propionic acid	8.5	9.1	8.0	6.8	4.1	17.7	10.4	4.0	2.2
n-Butyric acid	29.1	40.4	47.0	34.3	23.0	28.2	24.4	12.9	4.3
n-Valeric acid	23.2	33.5	20.7	8.4	4.6	27.5	35.8	15.8	1.7
other VFAs ^{※1)}	3.8	6.8	5.4	5.0	1.9	6.1	7.3	5.8	1.0
Ethanol	2.1	3.7	5.2	7.3	3.6	3.7	6.2	4.9	1.7
residue ^{※2)}	15.3	14.4	8.2	21.0	68.1	9.6	10.4	44.6	95.3
recovery	102	112	91.2	101	96.4	114	107	98.3	115

※1) other VFAs: Formic acid, iso-Butyric acid and iso-Valeric acid ※2) residue : residue Carbohydrates

Table 2 End products yields of batch H_2 fermentation at a constant pH of 6.5

initial total VFAs [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ as CH_3COOH]	blank	acetic acid					butyric acid					
		2,610	4,350	6,260	16,400	34,000	1,960	3,170	4,570	11,000	22,400	34,400
Hydrogen	5.7	6.3	8.2	7.9	9.0	3.6	5.1	4.9	5.3	9.3	5.2	0.0
Lactic acid	0.9	8.0	9.4	15.9	6.2	-0.8	24.7	36.8	22.1	30.5	48.2	23.8
Acetic acid	13.2	10.1	4.1	0.2	-1.7	-9.2	14.4	9.9	12.6	8.6	6.2	0.5
Propionic acid	14.4	9.6	4.4	3.4	5.8	9.0	9.0	5.1	6.1	-0.5	4.2	0.2
n-Butyric acid	25.1	29.8	41.5	40.3	45.0	32.1	19.1	20.2	14.3	24.2	7.2	-12.0
n-Valeric acid	20.8	17.2	12.9	7.8	6.6	11.1	16.7	9.8	12.1	2.9	12.7	0.0
other VFAs ^{※1)}	2.6	8.2	14.6	8.6	30.3	7.6	3.2	17.8	9.3	32.9	11.5	5.7
Ethanol	8.1	5.0	4.5	4.5	3.5	9.4	5.9	7.4	9.3	2.6	6.9	0.6
residue ^{※2)}	15.2	17.5	16.2	15.4	13.9	43.2	11.0	14.6	20.5	20.5	19.0	85.3
recovery	106	112	116	104	119	106	109	127	112	131	121	104

※1) other VFAs: Formic acid, iso-Butyric acid and iso-Valeric acid ※2) residue : residue Carbohydrates

酪酸濃度約11,000mg・l⁻¹までは80%以上であり、それ以上の濃度では分解率が低下し、酢酸52,000mg・l⁻¹で24%、酪酸34,400mg・l⁻¹で23%まで低下した。タンパク質の分解率は、初期酢酸、酪酸濃度とも同様にばらつきが大きく、全範囲で約30%以下の分解率となった。

炭水化物の分解率は初期有機酸濃度の影響を受け、pH6.5制御よりもpH5.5制御での影響が大きかった。また、タンパク質の分解率は初期有機酸濃度に関係なく、pH6.5制御よりもpH5.5制御での分解率が高かった。

有機性排水などは炭水化物とタンパク質が複合した状態であり、嫌気排水処理では炭水化物の存在下でタンパク質は完全には分解できないと言われている。炭水化物とタンパク質それぞれ単独基質の分解における最適pHについては多くの研究がされている。炭水化物の単独分解の最適pHは酸性から中性域であり、ほぼ100%近くが有機酸などへ転換されている。一方、タンパク質の単独分解の最適pH条件は中性域であるが、Breureら²⁰⁾はゼラチンを用いてpH5.3で65%、pH7.0で68%の分解率、またYuら²¹⁾はゼラチンを用いてpH5.5以上で94%以上、pH5.0では85%とpHの低下に伴い分解率も低下すると報告した。このように、タンパク質の分解率に関しては研究により開きがある。また、グルコースとゼラチンの混合基質での分解率を検討した研究において、混合基質ではゼラチンの分解率が低下したこと、また、その低下の要因はグルコースの分解により生成した有機酸が要因ではない²²⁾と報告されている。本研究でも、用いたDFは炭水化物とタンパク質の複合基質であり、有機酸のタンパク質の分解率への影響は小さく同様の結果が得られた。

3.1.4 代謝産物への初期有機酸濃度の影響

水素発酵では(1)(2)式のように、炭水化物を主な基質とし、本研究の結果においても初期有機酸濃度の増加によって、水素ガス発生ポテンシャルが減少した際、炭水化物分解率が減少したが、タンパク質分解率は減少せず一定の関係は見られなかった。よって、代謝産物量を解析するために、炭水化物の分解により水素や有機酸などが生成したものととして、投入したDFの炭水化物に基づく各分解生成物のCOD収支を計算し、pH5.5制御の結果をTable 1、pH6.5制御の結果をTable 2にまとめた。なお、Tableの有機酸はドッグフードからの生成有機酸を示している。また、本実験ではCOD濃度は直接測定しておらず、本論文でのCODの値は、生成物の量から換算して求めた値である。

pH5.5制御と6.5制御のブランクにおいて、酪酸生成量はほぼ同量で、酢酸生成量がpH6.5の方が多量にも関わらず、水素ガス発生ポテンシャルはpH6.5で小さかった。また、pH6.5ではプロピオン酸、エタノール生成量が多かった。嫌気性発酵ではプロピオン酸の生成が中性付近で多くなる²³⁾こと、炭水化物の発酵によりプロピオン酸が生成する際には水素ガスが吸収される²⁴⁾ことから、pH6.5制御での水素ガス発生ポテンシャルが小さくなったと考えられる。

また、pH5.5制御では初期有機酸濃度の増加により、水素ガス発生ポテンシャルが減少し、その際、プロピオン酸、酪酸、吉草酸生成量が減少し、特に酪酸生成量が大きく減少している。一方、pH6.5制御では初期有機酸濃度の増加により、水素ガス発生ポテンシャルが増加した際、

Fig. 6 Effect of hydrogen gas potential and volumetric total gas production rate on initial un-ionized total volatile fatty acids

酪酸生成量は増加し、酢酸、プロピオン酸生成量は減少している。水素生成には酢酸、酪酸生成が有利であり、本研究は水素生成時には酪酸生成量が増加しているが、酢酸生成量がゼロまたは吸収されマイナスとなった場合にでも水素が発生している。このことから、水素発酵では酪酸生成がより重要な役割を果たしていると考えられる。

3.2 非解離有機酸の影響

ガス発生ポテンシャル、ガス発生速度は、pH6.5制御よりもpH5.5制御で低い有機酸濃度で影響が大きかった。つまり、ガス発生ポテンシャルとガス発生速度は有機酸濃度だけでなく、pHにも依存していると考えられるため、酢酸、酪酸を全有機酸換算し非解離有機酸について検討した。非解離有機酸は式(3)により求められる。

$$\frac{UVFA}{VFA} = \frac{10^{(pK-pH)}}{1+10^{(pK-pH)}} \quad (3)$$

この式では非解離有機酸はpHに依存し、解離定数Kは温度に依存する。35℃における酢酸の解離定数は 1.75×10^{-5} であるので、(3)式を用いて初期の非解離有機酸と水素ガス発生ポテンシャル及びガス発生速度の関係をFig. 6に示す。ここで、pH5.5、6.5制御で水素ガス濃度は異なったので、ガス発生ポテンシャルではなく、水素ガス発生ポテンシャルで示した。

非解離有機酸が約200mg・l⁻¹までは、水素ガス発生ポテンシャル、ガス発生速度ともpH5.5と6.5制御では異なる傾向を示している。水素発酵最適pHを検討した研究¹⁷⁾からTS2%における最適pHは4.5～5.5であった。その最適pHである5.5では非解離有機酸の増加により水素ガス発生ポテンシャル、ガス発生速度は阻害影響が見られた。一方、最適pHでない6.5制御では初期有機酸濃度の増加により、プロピオン酸生成細菌、酪酸生成細菌へ影響を与え、結果的に水素ガス発生ポテンシャル、ガス発生速度が増大する方向に働いた。つまり、最適pHではない代謝へは

非解離有機酸だけではなく、有機酸濃度が影響を与えていると考えられる。

一方、非解離有機酸が約 $200\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 以上では、水素ガス発生ポテンシャル、ガス発生速度がpH5.5, 6.5制御とも同様に減少し、非解離有機酸が大きく影響を及ぼしていると考えられる。

水素発酵では水素分圧の上昇だけでなく、非解離有機酸の上昇も水素ガス発生ポテンシャルの低下を招いた。このことから、水素発酵において基質濃度を高めた場合には最適pHが酸性側からアルカリ側へ変化するの非解離有機酸濃度が影響していると考えられた。

これらのことから、水素発酵において回分から連続実験に移行するにあたり、水素分圧を低減するための工夫も必要であるが、連続実験では水素生成微生物群と副生成物である有機酸が混在した発酵液中に水素発酵基質が投入されるので、有機酸存在下での水素発酵、つまり本研究による実験と同条件になる。よって、連続実験で水素発生の増大のためには、連続的な基質の供給ではなく、基質の供給排出を数時間に1回バッチ運転し、それを連続的に行うなど、発酵槽内の発酵液中の有機酸の低減を図る運転方法の検討も必要であることが示唆された。

4. まとめ

混合微生物系による食品廃棄物系バイオマスの水素発酵に及ぼす有機酸の阻害影響を検討した。炭水化物、タンパク質などが混在する基質としてドッグフードを選び、メタン発酵汚泥から培養した混合微生物群を用いて、 35°C の条件下でpHを5.5, 6.5に一定制御し、初期酢酸、酪酸濃度を変化させ回分実験を行った。本研究より以下の知見が得られた。

1) 初期の有機酸濃度の増加に伴い、ガス発生ポテンシャル、ガス発生速度、水素ガス濃度は影響を受け、pH6.5制御よりもpH5.5制御の方が低い有機酸濃度でガス発生が見られなくなった。また、ガス発生に対して酢酸よりも酪酸の方がその影響が大きかった。

2) 炭水化物の分解率は初期有機酸濃度の増加に伴って減少した。一方、タンパク質の分解率への有機酸の影響はほとんどなかった。

3) 非解離有機酸が約 $200\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ まではpH, 有機酸による影響が見られ、 $200\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 以上の濃度では非解離有機酸による水素発酵への強い影響が見られ、ガス発生ポテンシャル、ガス発生速度がいずれも濃度の増加にしたがい低下した。

(原稿受付2004年6月22日)

(原稿受理2004年10月27日)

参考文献

- 西川正史(2004) 水素エネルギーシステムの開発課題と現状, *Journal of Plasma and Fusion Research.*, **80**(1), 5-11.
- Daungmanee, T., Chyi, Y. and Sung, S. (2002) Biohydrogen production in a mixed culture fermentor, *14th World Hydrogen Energy Conference*.
- Ginkel, S.W.V., Lay, J.J. and Sung, S. (2000) Biohydrogen production potential using variable natural inocula, *Proceedings of Water Environment Federation.*, 73.
- Thiel, P.G. (1969) The effect of methane analogues on methanogenesis in anaerobic digestion, *Wat. Res.*, **3**, 215-223.
- Fang, H.H.P. and Liu, H. (2002) Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture, *Biores. Technol.*, **82**, 87-93.
- Khanal, S.K., Chen, W.-H., Li, L. and Sung, S. (2004) Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products, *Int. J. Hydrogen Energy.*, **29**(11), 1123-1131.
- Zoetemeyer, R.J., Arnoldy, P., Cohen, A. and Boelhouwer, C. (1982) Influence of temperature on the anaerobic acidification of glucose in a mixed culture forming part of a two-stage digestion process, *Wat. Res.*, **16**, 313-321.
- Andel, J.G., Zoutberg, G.R., Crabbendam, P.M. and Breure, A.M. (1985) Glucose fermentation by *Clostridium butyricum* grown under a self generated gas atmosphere in chemostat culture, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 21-26.
- 沈建権, 李玉友, 野池達也(1996) 嫌気性細菌による糖類排水の水素発酵特性の比較, 土木学会論文集, **552**(VII-1), 23-31.
- Ueki, A., Ueki, K., Tanaka, K., Takahashi, R. and Takano, T. (1991) End products and molar growth yield of *Clostridium fallax* isolated from an anaerobic digester, *J. Ferment. Bioeng.*, **72**(4), 274-279.
- Zhu, Y. and Yang, S.-T. (2004) Effect of pH on metabolic pathway shift in fermentation of xylose by *Clostridium tyrobutyricum*, *J. Biotechnol.*, **110**(2), 143-157.
- Reith, J.H., Wijffels, R.H. and Barten, H. (2003) Bio-methane & Bio-hydrogen, in "5. Dark hydrogen fermentations" (Ed. Vrije, T.D. and Claassen, P.A.M.), pp.103-122, Netherlands Agency for Energy and the Environment, Netherlands.
- Mizuno, O., Dinsdale, R., Hawkes, F.R., Hawkes, D.L. and Noike, T. (2000) Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging, *Biores. Technol.*, **73**, 59-65.
- Lay, J.-J. (2002) Modelling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen, *Biotech. Bioeng.*, **68**(3), 269-278.
- 小木曾直行, 中村玄正, 松本順一郎(1997) 嫌気性酸生成相におけるグルコースの分解と水素ガス生成に及ぼすHRTの影響, 工業用水, **466**, 20-26.
- Chen, C.C. and Lin, C.Y. (2001) Start-up of anaerobic hydrogen production reactors seeded with sewage sludge, *Acta. Biotechnol.*, **21**(4), 371-379.
- 河野孝志, 和田克士, 李玉友, 野池達也(2004) 複合基質からの嫌気性水素発酵に及ぼす基質濃度とpHの影響, 水環境学会誌, **27**(7), 473-479.
- 福井作蔵 (1990) 還元糖の定量法(第2版), pp.50-52, 学術出版センター, 東京.
- APHA-AWA-WPCF. (1995) Standard methods for the examination of water and wastewater, 19th ed. American public health association. Washington DC.
- Breure, A.M., Beertink, H.H., Verkuijlen, J. and Andel, J.G. (1986) Acidogenic fermentation of protein/carbohydrate mixtures by bacterial populations adapted to one of the substrates in anaerobic chemostat cultures, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 245-249.
- Yu, H.Q. and Fang, H.H.P. (2003) Acidogenesis of gelatin-rich wastewater in an upflow anaerobic reactor: influence of pH and temperature, *Wat. Res.*, **37**, 55-66.
- Breure, A.M. and Andel, J.G. (1984) Hydrolysis and acidogenic fermentation of a protein, gelatin, in an anaerobic continuous culture, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 40-45.
- Horiuchi, J.I., Shimizu, T., Tada, K., Kanno, T. and Kobayashi, M. (2002) Selective production of organic acids in anaerobic acid reactor by pH control, *Biores. Technol.*, **82**, 209-213.
- Cohen, A., Gemert, J.M., Zoetemeyer, R.J. and Breure, A.M. (1984) Main Characteristics and stoichiometric aspects of acidogenesis of soluble carbohydrate containing wastewaters, *Process Biochemistry.*, 228-232.