

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：82101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18148

研究課題名(和文)高級脂肪酸の冷却晶析検出を利用したデュアル燃料製造プロセスの最適制御技術開発

研究課題名(英文) Operation optimization of dual-biofuel production using crystallization detection of long-chain fatty acids

研究代表者

小林 拓朗 (Kobayashi, Takuro)

国立研究開発法人国立環境研究所・資源循環・廃棄物研究センター・主任研究員

研究者番号：10583172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：メタン発酵においては、油脂の加水分解の結果生じる高級脂肪酸が数mmol/Lの濃度でさえ微生物に対して強い毒性を示す。本研究では、メタン発酵における高級脂肪酸濃度の監視技術として、水晶振動子センサーを用いた簡易な吸着検出法の構築に取り組んだ。溶液のpHアルカリ調節による脂肪酸の解離促進がセンサー感度の増大と選択性の向上に大きく寄与することがわかった。その条件では周波数の変化率は脂肪酸濃度に比例して直線的に増大した。実際のメタン発酵液を用いた測定においても、固形物の除去とpHの10.7への調節によって良好な測定が可能であり、脂肪酸濃度と周波数変化率との間に高い相関関係があることが確認された。

研究成果の概要(英文)：In anaerobic digestion, long-chain fatty acids (LCFAs) produced via hydrolysis of lipids, exhibit toxicity against microorganisms when their concentration exceeds several millimolar. In this study, an absorption detection system using a quartz crystal microbalance (QCM) was developed to simply monitor the LCFA concentration during an anaerobic digester's operation. The dissociation of the LCFAs considerably improved the sensor response and, moreover, enabled it to specifically detect LCFA. Under alkaline conditions, the frequency-shift rates linearly increased in accordance with palmitic acid concentration. Frequency changes caused by anaerobic digestate samples were successfully measured after removing suspended solids and adjusting the pH to 10.7. Finally, the measurements for digestate samples with different LCFA contents demonstrated that frequency-shift rates are highly correlated with LCFA concentrations.

研究分野：バイオマス・再生可能エネルギー

キーワード：廃グリース メタン発酵 阻害 高級脂肪酸

## 1. 研究開始当初の背景

油脂を含む有機性廃棄物は、単位重量あたりエネルギー密度の高さや発生量の大きさの点で、バイオ燃料生産にとって魅力的な原料である。油脂性の廃棄物から生産される燃料の形態は、主にバイオディーゼルかバイオガスである。中でも、油脂の純度が低く、油分の抽出が難しい食品廃棄物やグリーストラップ汚泥等はメタン発酵によるバイオガスへの変換に適している。乾燥重量 1g あたりのメタン発生ポテンシャルは、炭水化物が 375 mL、タンパク質が 525 mL であるのに対して、脂質は 1019 mL であり、高いメタン収率が期待できる。最近では、メタン収率を向上させるための取り組みとして、油脂高含有廃棄物と他のバイオマスとの混合発酵が広く検討されている。メタン発酵において、油脂すなわちトリグリセリドは、まず微生物群が分泌するリパーゼに触媒されてグリセリンと脂肪酸とに加水分解される。一般的に、発酵原料に含まれるトリグリセリドは炭素数 12 以上の高級脂肪酸で構成されている。高級脂肪酸は、わずかに数 mM の濃度でメタン生成菌を失活させ、メタン発酵槽の連続運転を破綻させるのに十分である。高級脂肪酸の $\beta$ 酸化は率速段階となりやすく、過剰な油脂の負荷、即ち高い油脂濃度の原料の処理は高級脂肪酸に由来する阻害を引き起こす可能性が高まる。このような問題に対して、カルシウムやベントナイト、ゼオライト添加等、阻害を低減するための対策も研究されてきた。このような対策によって活性の低下を抑制しつつ安定したメタン発酵を行うためには、発酵槽内の高級脂肪酸濃度をリアルタイムで把握し、阻害が危惧される水準に至った際には、対策のための意思決定を迅速に行うことが理想的である。しかしながら、従来メタン発酵における高級脂肪酸の測定は、ガスクロマトグラフや高速液体クロマトグラフによるものであり、測定場所が制限されるうえに長い測定時間が必要である。さらに、抽出や誘導体化等の複雑な前処理を必要とする。一般に、即日その濃度を特定することは困難である。

## 2. 研究の目的

上で述べた現状を踏まえて、簡素な前処理および測定方法であり、短時間で濃度を把握することが可能な、高級脂肪酸検出法が必要である。また、その検出法は高級脂肪酸と共存し、性質がやや類似する酢酸を主とする低级脂肪酸とトリグリセリドの誤検出を抑制する必要がある。本研究では、液相で使用可能な水晶振動子を用い、その表面が高級脂肪酸を吸着する物質で被膜されたセンサーによって、簡素な前処理と測定かつ従来法よりも短時間で、有機性廃棄物メタン発酵液中の高級脂肪酸の定量検出を行い、メタン発酵における有効性を確認した。

## 3. 研究の方法

### (1)高級脂肪酸測定システム

発振周波数 5M Hz の水晶振動子を使用し、負荷容量の大きい高粘度液相用発振器を使用した。振動子をセットした容量 0.15 mL のフローセルに対して、サンプル溶液を 0.12 mL/min の速度でポンプを使って供給した。周波数測定は約 5 分間実施した。

### (2)サンプル調整

標準溶液は、規定量のパルミチン酸を水に添加したあと、65 °C で pH を 10.7 に調節し、完全に溶解させて作成した。パルミチン酸濃度はそれぞれ 0, 12.5, 25, 50, 100 mg/L になるよう調整した。発酵液サンプルは、TS 約 10% のグリーストラップ廃棄物を連続処理する中温完全混合メタン発酵槽から採取した。発酵液は水で 40 倍希釈した後に 65 °C で pH を 10.7 で安定するまで調節した。さらに、5000 rpm で遠心分離後の上清を測定に供した。水晶振動子は、サンプル水に接する片面全体の絶縁を目的としてポリビニルブチラール(PVB)により被膜した。さらに、金電極上には高級脂肪酸吸着を目的としてポリスチレンジビニルベンゼン(PSDVB)で被膜し、二重膜を形成させた。

## 4. 研究成果

### (1)標準溶液を用いた定量性と選択性の検討

図 1 は異なる濃度のパルミチン酸標準溶液を用いた測定結果を示している。水晶振動子マイクロバランス法では、一定周波数で振動する振動子の電極表面に物質が付着することで周波数が減少する。そのため、本実験では周波数累積減少量を振動子への標的物質の吸着量として解釈した。累積周波数減少量の経時変化曲線がいつも直線を示した 50 秒後以降の変化率を評価の指標とした。図 1 が示すように、測定期間中周波数は減少し続けた。その変化率はパルミチン酸濃度に応じて有意に増大することが明らかであった。この結果は、本測定法が 0-100 mg/L の範囲で溶液中のパルミチン酸濃度の違いを有意に検知することができることを示している。

嫌気性処理では、トリグリセリドや酢酸が、運転中に高級脂肪酸と同様の挙動を示し(即ち不調時に濃度が増大する)、誤検出が危惧される。図 1(c)は、同一濃度のパルミチン酸、トリオレイン、酢酸溶液を用いた測定結果の比較である。トリオレインおよび酢酸溶液は、図 1(c)における 0 mg/L 溶液と比較してやや高い変化率を示しながらも、それはパルミチン酸溶液よりも明らかに低い値であった。トリオレインはサンプル液中にほとんど溶解せず、液滴が浮上分離していた。そのため、トリオレインは PSDVB 膜に吸着すると予想されたものの、フローセルへ供給されなかったと考えられる。一方、パルミチン酸は完全に溶解しており、全てフローセルへ供給されたと考えられ、このような差異を引き起こしたと考えられる。

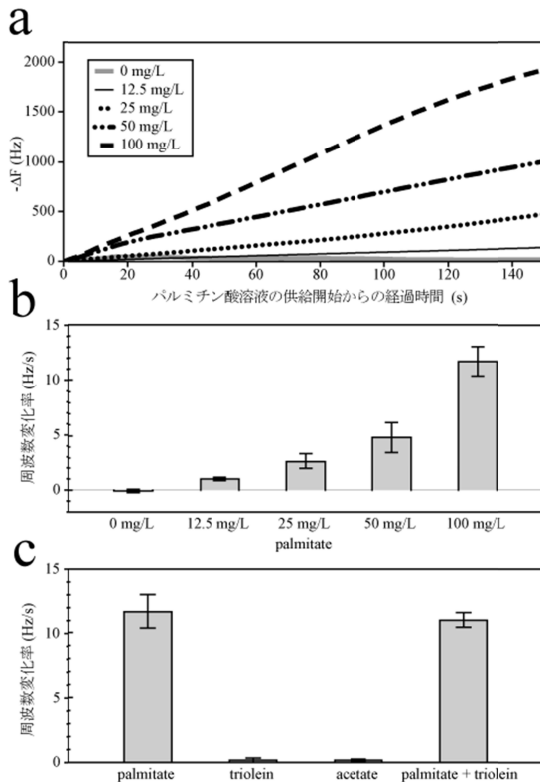


図 1 異なる濃度のパルミチン酸溶液を用いた測定における周波数の累積減少量経時変化(a)と変化率(b)、同一濃度(100 mg/L)のパルミチン酸、トリオレイン、酢酸およびパルミチン酸とトリオレイン混合溶液を用いた測定における周波数変化率(c)

(2)メタン発酵液中の高級脂肪酸濃度と測定された周波数変化率との関係

図 2 はサンプルを採取したメタン発酵槽の運転状況を示している。メタン発酵槽にはグリーストラップ廃棄物を原料として毎日投入し、次第に容積負荷を上昇させながら約 80 日間の運転を行った。図 2b には GC により分析した発酵液中の高級脂肪酸濃度(C8-C22 の合計)の推移が示されている。容積負荷上昇に従って高級脂肪酸濃度が上昇した。高級脂肪酸濃度が 6 mM を超える高水準に到達した時期にバイオガス生成が急減し、最終的に停止した。

図 3 は、同一の発酵液サンプルについて、GC で測定した高級脂肪酸濃度を横軸に、水晶振動子センサーで測定した周波数変化率を縦軸にプロットした結果を示している。図から明らかなように、発酵液中の高級脂肪酸濃度と周波数変化率は同様の挙動を示し、両測定値は高い相関を有していた。即ち、段階的な発酵槽への負荷上昇に伴って周波数変化率も上昇する傾向を見せ、特に最後の 3 サンプルは高い水準を示した。ここで得られた直線の傾きは、図 1 で得られているパルミチン酸系列のそれとほぼ同じであり、メタン発酵液のサンプルに対して適用する際も、標準液と同等の定量性を有していることが示されたといえる。

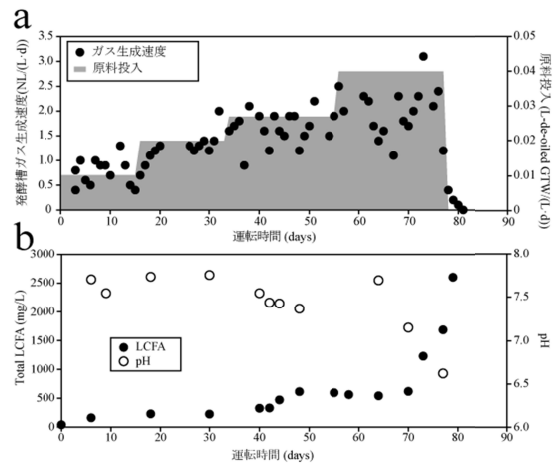


図 2 メタン発酵槽の連続運転におけるガス生成速度・原料投入量(a)、高級脂肪酸濃度・pH(b)の推移

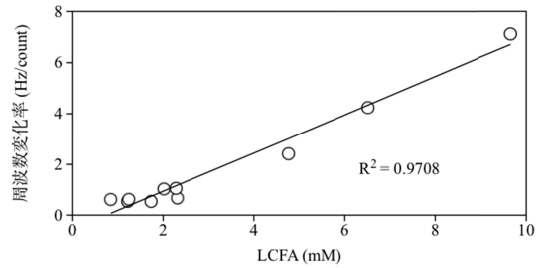


図 3 GC で測定したメタン発酵液中の高級脂肪酸濃度と、得られた周波数変化率との関係

以上のように、pH をアルカリ調整した上で PVB と PSDVB で二重に被膜した水晶振動子センサーを用いて分析を行ったところ、選択的かつ定量的に高級脂肪酸であるパルミチン酸の検出が可能であることが示された。また、実際のメタン発酵液に対してもセンサーを適用した結果、得られた周波数変化率と発酵液中の高級脂肪酸濃度は同様の挙動を示した。本法を使用することで、簡単に発酵槽中の高級脂肪酸濃度の推移をモニタリングでき、それに基づく阻害回避のための運転管理が期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Kobayashi T., Kuramochi H., Maeda K., Xu K.Q., A Simple Method for the Detection of Long-Chain Fatty Acids in an Anaerobic Digestate Using a Quartz Crystal Sensor, *Energies*, 査読有, 10, 2017, 19, <https://doi.org/10.3390/en10010019>

Wu L., Kobayashi T., Kuramochi H., Li Y.Y., Xu K.Q., Recovery strategies of inhibition for mesophilic anaerobic sludge treating the de-oiled grease trap waste, *International Biodeterioration &*

Biodegradation, 査読有, 104, 2015,  
315-323,  
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.06.020>

〔学会発表〕(計2件)

小林拓朗、倉持秀敏、徐開欽、前田光治、  
メタン発酵における高級脂肪酸検出用簡易  
センサーの開発. 日本水処理生物学会第53  
回大会(千葉大会)、2016年11月12日、千  
葉工業大学(千葉県・習志野市)

小林拓朗、倉持秀敏、徐開欽、前田光治、  
簡便な高級脂肪酸検出センサーを用いた油  
脂高含有原料を処理するメタン発酵槽の運  
転管理方法の開発. 第19回日本水環境学会  
シンポジウム、2016年9月13日、秋田県立  
大学(秋田県・秋田市)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称：高級脂肪酸検出センサー  
発明者：小林拓朗、倉持秀敏、徐開欽  
権利者：国立研究開発法人国立環境研究所  
種類：特許  
番号：PAT01434  
出願年月日：2016年9月1日  
国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林 拓朗 (KOBAYASHI, Takuro)  
(国研)国立環境研究所・資源循環・廃棄物  
研究センター・主任研究員  
研究者番号：10583172