

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18360249
 研究課題名（和文） 水素・メタン二相循環発酵による廃棄物系バイオマスエネルギー変換の
 高効率化
 研究課題名（英文） Upgrading of conversion of waste biomass to energy using hydrogen
 and methane two-phase fermentation
 研究代表者
 李 玉友 (LI YU-YOU)
 東北大学・大学院工学研究科・准教授
 研究者番号：30201106

研究成果の概要：本研究は、廃棄物系バイオマスからバイオエネルギー（水素・メタン）の回収を行うためのプロセスの開発を目的とし、高温（55℃）酸発酵槽と中温（36℃）メタン発酵槽からなる二相循環式水素・メタン発酵プロセスを提案し、食品加工廃棄物（ジャガイモ）を処理対象とした連続実験を行った。異なる HRT 条件での水素発酵特性とメタン発酵特性を明らかにし、PCR-DGGE 法を用いた微生物群集構造解析により、二相循環式水素・メタン発酵プロセスの微生物菌叢を把握した。また、水素発酵の効率化を図るため、様々な基質の水素生成ポテンシャルを把握したとともに、膜分離型発酵における水素発酵特性を検討した。微生物群集構造解析からプロセスの高温酸発酵槽と廃液循環の有用性を検討した。さらに、余剰汚泥のメタン発酵を行い、効率化のためのプロセス構築および微生物解析を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2007年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
総計	11,300,000	3,390,000	14,690,000

研究分野： 工学

科研費の分科・細目： 土木工学・土木環境システム

キーワード： エネルギー施設

1. 研究開始当初の背景

持続的に発展可能な社会の形成に向け、わが国ではバイオマスの有効利用を推進するため、2002年に「バイオマス・ニッポン総合戦略」が閣議決定された。この中でバイオマスの高効率エネルギー転換技術として、バイオテクノロジーを活用した生物学的プロセスの開発が求められている。また、嫌気性微生物による廃棄物系バイオマスからの水素やメタンなどのバイオガスの生産が世界的に注目され始めているところであった。

2. 研究の目的

本研究では、食品廃棄物を代表とする廃棄物系バイオマスや今後導入される資源作物などの高濃度基質から効率よくエネルギーを回収する手法として、「水素・メタン二相循環発酵システム」の確立を目指す。この二相循環システムは、(1)水素発酵、(2)メタン発酵、(3)メタン発酵液の循環処理という3つの要素技術(ユニット)によって構成されている。申請者はこれまでの研究成果から、二相循環システムは従来の生物学的手

法であるメタン発酵法単独に比べ、エネルギー転換効率だけでなく有機物分解率も向上することを見出し、循環型社会の形成に必要な新技術として着目した。

3. 研究の方法

(1) 二相循環式水素・メタン発酵プロセスに関する研究

反応装置は図1に示す通り、高温（55℃）水素発酵槽と中温（36℃）メタン発酵槽からなる二相循環式水素・メタン発酵プロセスを用いた。基質はフードプロセッサーで微破碎し、ペースト化したジャガイモを用いた。混合槽においてメタン発酵廃液と重量比で1:1の割合で混合した。ジャガイモペースト(Po)とメタン発酵廃液混合物(MT; 4℃)は高温水素発酵槽(TAR; 55℃, 有効容量3L)に投入し、可溶化、水素発酵および酸発酵を行った。次に高温水素発酵後の混合液を中温メタン発酵槽(MMR; 36℃, 有効容積1.2L)に投入し、メタン発酵を行った。温度はウォータージャケットに投げ込み式恒温水槽により水を循環し、混合槽は4℃、高温水素発酵槽は55℃、および中温メタン発酵槽は36℃に維持した。各反応槽の攪拌は混合槽および高温水素発酵槽ではモーターに攪拌翼を付けた機械攪拌方式とし、中温メタン発酵槽は生成したバイオガスをガス循環ポンプにより循環させるガス攪拌方式とした。生成したバイオガスはガスメーターにより計測した。

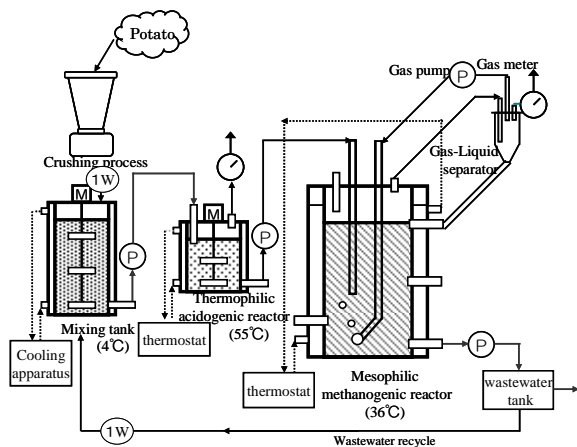


図1 水素・メタン二相循環プロセスの実験装置

各発酵槽への基質の投入および中温メタン発酵廃液の貯留槽お排出はHRTに応じて1日に数回、タイマーにより作動の制御をしたローラーポンプで行った。中温メタン発酵廃液の一部をジャガイモペーストとの混合に用いた。本項目では、異なるHRT条件での水素発酵特性とメタン発酵特性を明らかにし、PCR-DGGE法を用いた微生物群集構造解析に

より、二相循環式水素・メタン発酵プロセスの微生物菌叢を把握した。また、微生物群集構造解析からプロセスの高温水素発酵槽と廃液循環の有用性を検討した。

(2) 水素発酵の研究

水素生成ポテンシャルの実験には120mlバイアルびんを用いた。バイアルびんは各系で3本以上用意した。バイアルびんには濃塩酸を用いてpHを6.0にした培地50mlに植種源10mlを加え、初期気相部を窒素(80%)と二酸化炭素(20%)の混合ガスで2分間換気してブチルゴム栓とアルミシールで密栓した。実験開始時のpHは 6.5 ± 0.1 であった。実験は振とう培養器を用いて35℃、90rpmの条件で行った。有機物として、でんぷん、ペプトンおよび食用油を選び、それぞれ、実験開始時の濃度が5gCODCr/lとなるように調整した。実験に用いた植種源は8つあり、それぞれ①食品廃棄物の高温酸発酵槽、②余剰活性汚泥の中温消化槽、③余剰活性汚泥の高温消化槽、④大豆サイロ、⑤食堂から排出された生ごみ、⑥活性汚泥、⑦乳牛糞および⑧土壌微生物であった。

また、水素発酵の効率化を図るため、中温膜分離型反応槽を用いて、グルコースを基質とした連続水素発酵実験を行い、CSTR型発酵槽の結果と比較した。

(3) メタン発酵の研究

本研究項目ではまず幅広い文献調査を行い、わが国におけるメタン生成ポテンシャルおよび技術課題をまとめた。そして、生成量が多い余剰汚泥を実験研究の対象として連続実験を行った。各消化槽の定常状態である運転109日目においてHRT20日で運転中の中温及び高温消化槽から採取した消化汚泥と基質タンクから採取した余剰汚泥からそれぞれDNAを抽出し、解析に用いた。各DNAサンプルについて、真正細菌を標的とするEUB341F&UNIV1500R及び古細菌を標的とするA109F&ARC1059RのプライマーセットでそれぞれPCRを行った。それから、より効率的なメタン発酵プロセスを構築するため、オゾン酸化処理と嫌気性消化の組み合わせについて8つのプロセスについて比較検討を行った。中温条件のプロセスは、①中温消化、②OM、③MORの3つである。高温条件のプロセスは④高温消化、⑤OT、⑥TORの3つである。温度フェーズのプロセスは⑦TM、⑧TOMの2つである。すべてのプロセスで使用した消化槽は有効容量5Lの完全混合型リアクターである。プロセスのHRTは全て30日で統一した。中温消化槽の温度は35℃、高温消化槽の温度は55℃に設定した。オゾン処理は、処理汚泥のTS1gあたり0.02gの反応量で回分的に行なった。

(4)メタン発酵のスタートアップ方法の研究
 余剰汚泥を種汚泥培養源として嫌気性自己分解を経たメタン発酵スタートアップを研究するため、実験1と実験2を行った。

実験1はバイアル瓶を用いた実験であり、培養には、容量120mlのバイアル瓶を使用した。下水処理場から採取した余剰汚泥を用い、3種類の濃度で実験を行った。

実験2は連続運転実験であり、機械攪拌方式の基質タンクと、有効容量51である機械攪拌方式のCSTR型反応槽からなる装置を用いた。スタートアップに用いた余剰汚泥は水道水によりTS15g/Lまで希釈し、5Lをメタン発酵槽に投入した。運転方法は、回分モードと連続モードの二つに分かれる。0日目から37日目までは基質を投入せず回分モードで運転した。37日目からは基質余剰汚泥の連続投入を開始し、HRT100日から、50日、30日と段階的に短縮を行いながら連続モードで運転した。また、運転期間中にpHの調整は行わなかった。

4. 研究成果

(1)二相循環式水素・メタン発酵プロセスに関する研究

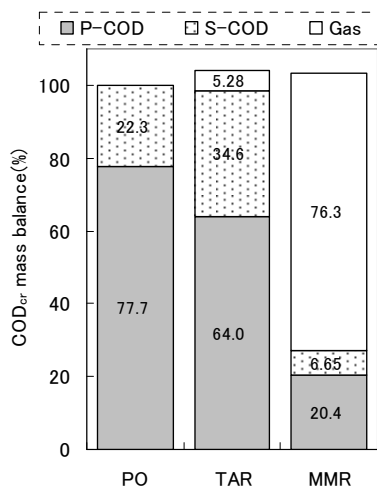


図2 ジャガイモの水素・メタン二相発酵におけるCOD_{Cr}物質収支(HRT=20)

①ジャガイモを基質とした二相循環式高濃度水素・メタン発酵プロセスの連続運転により、無希釈、添加物ゼロの条件で安定運転ができる最短HRTは20日であることがわかった。対応している高温水素生成槽および中温メタン発酵槽の実質HRTはそれぞれ2日と8日であった。プロセスHRT20日とHRT30日の定常状態において、TS分解率、VS分解率、およびCOD_{Cr}分解率はそれぞれ87%程度、92%程度および85%~90%であった。従来の有機性廃棄物のメタン発酵のCOD_{Cr}分解率が70%

~75%程度であるので、これと比較しても本研究は、高いCOD_{Cr}分解率であると言える。本研究で得られた結果をCOD_{Cr}物質収支で表現すると図2になる。高温水素発酵槽(TAR)ではCOD成分の5.28%が水素ガス、中温メタン発酵槽(MMR)では76.3%がメタンガスに転換された。

②高温水素発酵において水素は、約260日間の長期間に渡って連続的に生成した。プロセスHRTが20日の際に高温水素発酵槽のバイオガス生成速度は、約8.01/1・d、水素の組成は45%であり、安定した連続的な水素生成が実現した。また、除去ヘキソースあたりの水素収率は1.67mol-H₂/mol-hexoseであった。本研究のようなTSが高濃度の基質を対象とした水素発酵において、長期間に渡り連続的な水素生成が行われた既往の研究は見当たらない。中温メタン発酵槽のバイオガス生成速度は約5.3 1/1・dで、そのうちのメタンガスの組成は58%であり、メタン生成も安定していた。

③PCR-DGGE法による解析および顕微鏡観察により得られたシステム全体のHRT20日の際の二相循環式水素・メタン発酵槽の微生物群集構造を把握できた。高温酸発酵槽では水素生成細菌の*T. thermosaccharolyticum*, *C. sporosphaeroides* および乳酸菌の*V. salmoninarum*に近縁な種が定着した。また、*Bacteroides*と*Flavobacterium*に近縁な種が高温酸発酵槽および中温メタン発酵槽から検出された。中温メタン発酵槽のに検出された真正細菌はspirocheteおよびの近縁種であった。メタン生成を担う古細菌は酢酸資化性メタン生成古細菌の*Methanosarcina siciliae*に近縁な種と水素資化性メタン生成古細菌の*Methanoculleus bourgensis*に近縁な種が検出された。

(2)水素発酵に関する研究

①8つの異なる植種源を用いた回分実験により様々な基質の水素生成ポテンシャルを検討した。植種源は、高温酸発酵槽、中温消化槽、高温消化槽、大豆粕、生ごみ、活性汚泥、乳牛糞および土壌から得られた。基質には、でんぷん、ペプトンおよび食用油をそれぞれ炭水化物、たんぱく質および脂質の代表として用いた。でんぷんの水素生成ポテンシャルは17.8-186ml H₂/g starchと大きかったのに対して、ペプトンおよび食用油の水素生成ポテンシャルはわずかであった。でんぷんを基質とした実験系に対してPCR-DGGE法により細菌群の解析を行った結果、*Clostridium*属細菌や*Citrobacter*属細菌などの水素生成細菌が様々な廃棄物系バイオマスに広く分布していることが明らかになった。なお、本研究から、廃棄物系バイオマスからの非意図的水素生成に対する安全管理の重要性が示唆

された。

②中温膜分離型反応槽を用いて、グルコースを基質として連続水素発酵実験を行った結果、長期間の連続的水素発酵を行うことができた。膜分離型反応槽における水素生成速度はCSTR型反応槽の約3倍以上であった。

(3)メタン発酵に関する研究

①文献調査によればメタン発酵の最大の特徴はエネルギーを回収できることにある。この特徴を活用すれば、廃棄物系バイオマスの3大カテゴリである下水汚泥(年間7,600万トン)、食品廃棄物(年間約2,200万トン)、家畜排せつ物(年間約9,100万トン)から、最大年間390万kLの原油に相当するエネルギーを生産できる。従って、メタン発酵は廃棄物系バイオマスからバイオエネルギーを生産する有力技術として位置づけられ、今後ともその普及が望まれる。また技術的な弱点や課題についてもまとめた。

②下水汚泥の中でも難分解性である余剰汚泥の嫌気性消化において、2つの基本的運転条件である中温消化と高温消化の処理特性について詳細な解析を行い比較した。その結果は次のようにまとめられる。加水分解能力、COD_{Cr}分解率、HRT短縮効果において中温消化と比較して高温消化の方が優れていた。消化汚泥の凝集性、VFAおよび溶解性成分の残留の点では高温消化と比較して中温消化の方が優位であった。

③中温消化と高温消化の処理特性違いの決定要因と考えられる中温と高温の微生物群集構造の比較を行った。その結果は以下のようになる。余剰汚泥由来の細菌のDNAは高温消化では全く検出されないのに対して、中温消化ではライブラリの10%程度検出された。高温消化は*Coprothermobacter*属を中心とした*Firmicutes*の細菌が顕著に優勢であり、真正細菌、古細菌群集ともに中温消化と比較して多様性の乏しい群集構造であった。以上のことから中温消化と高温消化の間には、処理特性の相違と関連した特徴的な微生物群集構造の相違があることがわかった。

④余剰汚泥に対する分解促進処理としてオゾン酸化に着目し、嫌気性消化とオゾン処理を組み合わせた各種プロセスの比較検討を行った。その結果はつぎのようになる。

前処理と後処理循環プロセスの比較では、中温条件においては前処理、後処理循環どちらのプロセスも、単独の中温消化と比較してCOD_{Cr}分解率の向上が観察されたが、前処理よりも後処理循環の方がより少ないオゾン反応量でCOD_{Cr}分解率の向上効果が大きかった。高温条件では、前処理、後処理循環どちらのプロセスも、単独の高温消化と比較してメタン生成収率、COD_{Cr}分解率の向上はほとんどなかった。また、前処理と後処理循環のプロセ

ス間においても処理特性に顕著な違いはなかった。

TMプロセスとTOMプロセスの比較では、メタン生成収率、COD_{Cr}分解率ともにTMプロセスと比較してTOMプロセスの方が優位であり、中間オゾン処理による分解促進効果が確認された。

TOMプロセスを本研究の他のプロセスと比較すると、メタン生成収率、COD_{Cr}分解率が最も高く、オゾン反応量も後処理循環と同等で前処理の場合の1/2程度で効果的な処理ができた。また、消化汚泥の凝集性は中温条件のプロセスに次いで良好であり、脱水ろ液のCOD_{Cr}濃度は中温消化と同等であった。以上のことから、TOMプロセスは総合的に判断して本研究で検討したプロセスの中で最も高い性能を示した。特に、COD_{Cr}分解率は中温消化の1.36倍と大きく向上した。

(4)メタン発酵のスタートアップ方法

①実験1の結果から、内来植種源のTS濃度を調整することでVFAの蓄積量を抑制でき、より安定したメタン発酵が可能であることが示唆された。

②Real-time PCRによる解析結果から、実験2の発酵槽の古細菌rDNA濃度が連続運転発酵槽のそれと同程度まで増加するのに約30日の時間を要した。本研究では、運転初期に回分培養を行うことにより、発酵槽内の古細菌の増殖が順調に行われたと考えられる。

③実験2の結果から、回分モードでの運転期間はVFAの蓄積が最高約1500mg-HAc・l⁻¹に留まり、連続モードでの運転後はVFAが蓄積することなく安定した運転を行うことができた。HRT30日の定常状態運転結果から、外来植種を行った中温消化と同等の処理性能が得られ、良好なスタートアップが達成できたといえる。

④古細菌群集のクローン解析の結果から、実験2で自己分解が進行した30日目においては0日目に優勢であった古細菌は検出されず、0日目に4%検出された*Methanosarcina*属古細菌がライブラリの39%、0日目には検出されなかった*Methanoregula*属古細菌が34%検出された。

⑤古細菌群集のReal-time PCRによる解析結果から、実験2の自己分解期間において、酸生成期からメタン生成期への移行時期に*Methanosarcina*属古細菌のrDNAが顕著に増加しており、メタン生成速度の増大は*Methanosarcina*属古細菌のpopulation増大と相関していた。

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 10 件)

- ① T. Kobayashi, Y. Y. Li, H. Harada, H. Yasui and T. Noike: Upgrading of the anaerobic digestion of waste activated sludge by combining temperature-phased anaerobic digestion and intermediate ozonation, *Water Science and Technology*, 59(1), 185-193 (2009), 査読有.
- ② Dong-Yeol Lee, Yu-You Li, Tatsuya Noike, Continuous H₂ production by anaerobic mixed microflora in membrane bioreactor, *Bioresource Technology*, 100, 690-695 (2009), 査読有.
- ③ Dong-Yeol Lee, Yu-You Li, Mi-Sun Kim, You-Kwan Oh, Tatsuya Noike, Influence of iron concentration on continuous H₂ production using membrane bioreactor, *International Journal of Hydrogen Energy*, 34,1244-1252 (2009), 査読有.
- ④ T. Kobayashi, Y. Y. Li and H. Harada: Analysis of microbial community structure and diversity in the thermophilic anaerobic digestion of waste activated sludge, *Water Science and Technology*, 57(8), 1199-1205 (2008), 査読有.
- ⑤ 李玉友, 小林拓朗, 下水汚泥の嫌気性消化のシステム評価およびプロセスの高効率化, *水*, 50-9 (No. 719), 20-34 (2008), 査読無.
- ⑥ 小林拓朗, 安田大介, 李玉友, 久保田健吾, 原田秀樹, 岡庭良安, 余剰活性汚泥の嫌気性自己分解によるメタン発酵スタートアップ方法及びその過程における微生物群構造の変化, *水環境学会誌*, 31, 525- 532 (2008), 査読有
- ⑦ 小林拓朗, 李玉友, 原田秀樹, 濃縮余剰汚泥の中温消化と高温消化における微生物群集構造の変化, *下水道協会誌*, 44(542), 135-148 (2007), 査読有.
- ⑧ 堆洋平, 李玉友, 水素生成ポテンシャルに及ぼす基質と細菌群の影響, *廃棄物学会論文誌*, 17, 335-343 (2007), 査読有.
- ⑨ 李玉友, 西村修: メタン発酵法による廃棄物系バイオマスの循環利用, *混相流*, 21(1), 29-38(2007), 査読有.
- ⑩ 大羽美香, 李玉友, 野池達也, 二相循環式水素・メタン発酵プロセスにおける微生物群集の構造解析, *水環境学会誌*, 29, 399-406(2006), 査読有.

[学会発表] (計 2 件)

- ① T. Kobayashi, Y. Y. Li, H. Harada, H. Yasui and T. Noike, Upgrading of the anaerobic digestion of waste activated sludge by combining temperature-phased anaerobic digestion and intermediate ozonation, *The Proceedings of the 5th International*

symposium on the Anaerobic digestion of Solid wastes, P.27 (2008.5.26, Hammamet, Tunisia)

- ② T. Kobayashi, Y. Y. Li and H. Harada: Analysis of microbial community structure and diversity in the thermophilic anaerobic digestion of waste activated sludge, *Proceedings (CD) of the 11th World Congress on Anaerobic Digestion (AD11)*, PP4C.4 (2007.9.25, Brisbane, Australia)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

李玉友 (LI YU-YOU)
東北大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 3 0 2 0 1 1 0 6

(2) 研究分担者

中野 和典 (NAKANO KAZUNORI)
東北大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 3 0 2 9 2 5 1 9

野池達也 (NOIKE TATSUYAMA)
日本大学・大学院総合科学研究科・教授
研究者番号: 9 0 0 0 5 3 9 8

(3) 研究分担者