

バイオ技術による廃棄物の再資源化に関する調査研究

—水素生成菌の分離とその性質及び廃棄物処理への応用—

Studies on the cyclical use of solid wastes using biotechnology
— Isolation and characterization of hydrogen producing bacteria
and their application to the solid wastes treatment —

板谷 勉, 斎藤直己 (水質第一科)

Tsutomu Itadani, Naomi Saitou

【調査研究】

バイオ技術による廃棄物の再資源化に関する調査研究

—水素生成菌の分離とその性質及び廃棄物処理への応用—

Studies on the cyclical use of solid wastes using biotechnology
— Isolation and characterization of hydrogen producing bacteria
and their application to the solid wastes treatment —

板谷 勉, 斎藤直己 (水質第一科)

Tsutomu Itadani, Naomi Saitou

要 旨

廃棄物の減容化と再資源化をめざし、特に食品廃棄物からの水素生産について検討している。今回、岡山県内下水処理場の汚泥から水素生成菌の分離を行い、2種類の細菌を得た。1種類はグラム陰性無芽胞桿菌でその生化学性状から *Clostridium beijerinckii* と同定され、他の1種類はその生化学性状から *Enterobacter cloacae* と同定された。前者は、基質としてグルコース、ショ糖等の単糖類および二糖類のほか多糖類のデンプンを利用することが可能であった。後者は、グルコースおよびショ糖を資化することはできたが、デンプンを利用することはできなかった。生成ガス中の水素ガス組成が前者は50%であるのに比べ、後者は25%と低かった。前者の *Clostridium* 属菌株を用いたモデル実験から1モルのグルコースから1.5モルの水素ガスを生成した。実際の廃棄物として家庭の台所から排出された生ゴミを用いた *Clostridium* 属菌株による水素生産実験では、モデル実験と同様に約50%の水素ガス組成を有するガスを生産することが確認され、また、固形物重量(乾重量)が約60%減少することが確認された。このことから、生ゴミ等食品廃棄物を水素生成菌により処理し、水素ガスを回収することは、有機性廃棄物の減容化と再資源化の有力な手段となりうる可能性があることが示唆された。

[キーワード：水素生産、水素生成菌、*Clostridium*、有機性廃棄物、再資源化]

1 はじめに

わが国で排出されるバイオマス系廃棄物は畜産廃棄物が1億トン、汚泥が1億トン、生ごみを含む食品関連廃棄物が2,000万トン、古紙や廃木材を含めた木質系廃棄物4,000万トン、農業残渣2500万トン、合計約2億8500万トンで、全廃棄物の63%を占めている¹⁾。岡山県では食品関連(ホテル、レストラン、デパート・スーパー等を含む。)の事業系有機性廃棄物が、年間約73,000トン排出され、このうちリサイクルされている量は約2,000トン(発生量の2.6%)である。また、厨芥ゴミの年間排出量は約14万トンと推定され、そのほとんどは焼却処分されているのが現状である²⁾。一方、わが国は、京都議定書の締結により、2008年から2012年までに温室効果ガスを1990年比で6%削減が義務づけられている。しかし、温室効果ガスの2001年時点で

の排出量は1990年比で8.6%の増加となっており、14.6%以上を削減しなければならず、着手可能な温暖化対策から早急に取り組んでいかなければならない状況にある。岡山県においても2002年3月岡山県地球温暖化防止行動計画を策定し、2010年を目標に国より厳しい1990年比で6.5%削減するために様々な取り組みを行っている³⁾。

我々は、廃棄物の減容化と地球温暖化防止という視点に立ち有機性廃棄物からのクリーンエネルギーの一つである水素ガス生産の検討を行っている。これまでの「光合成細菌を用いる廃棄物処理とそれに伴う水素ガス生産法の検討」の中で汚泥中に水素生成を行う微生物が常在することが推定された⁴⁾。そこで、光合成細菌の検討の際に使用した汚泥を分離源とした水素生成菌の分離とその生化学的特性及び廃棄物処理への応

用の可否について検討したので報告する。

2 材料および方法

2.1 材料

水素生成菌分離材料として前報⁴⁾で用いた下水処理場汚泥を使用した。

2.2 水素生成菌の分離および生化学性状

分離源の汚泥を0.5%酵母エキス（以下YEと略す）、2%グルコース及び2%デンプンを含む溶液中で1ヶ月間馴養したのち、同組成の寒天培地を用い30℃3日間嫌気培養後得られたコロニーを同組成の液体培地に植え継ぎ、ガスの活発に発生する菌株は標準寒天培地（日水製薬製）を用い、上記操作を繰り返すことで純化し、ガス生成菌株を得た。ガス生成菌株から得られたガスの濃度を、水素ガス検知管（ガステック製）で推定し、濃度が比較的高く、性状の異なる菌株を最終的に水素生成単離菌株とした。単離菌株のグラム染色、酸素に対する性質、オキシダーゼ、カタラーゼの有無、生化学性状及びGMB培地並びにPYG+Bile培地での発育⁵⁾等から菌の同定を行った。菌の生化学性状検査はapiシステム（ビオメリユウ製）を用いた。

2.3 分離株による各種糖質からの水素生産

グルコース、廃糖蜜、乳糖及びデンプンを用いて生成ガスの生産実験を行った。0.5%酵母エキス溶液に2%の各々の糖質を含む溶液1リットルを121℃15分間高圧滅菌した後、あらかじめ分離に用いたグルコース及びデンプンの両方を含む培地で培養した前培養液5 mlを添加し、30℃で72時間静置培養し、この間発生したガスをテドラーバッグ（アズワン製）で捕集した後、容量測定とガス組成分析を行った。なお、乳糖からの水素生産実験ではBGLB培地（日水製薬製）を用いた。

2.4 模擬廃棄物による水素生産

国産I社製ドッグフードを模擬廃棄物として使用した。本ドッグフードの保証分析値を表1に示す。ハンドリングの容易さから、上記ドッグフードを50g、100g及び150gを蒸留水と混合し、それぞれ1リットルにメスアップした。5%から15%濃度のドッグフード懸濁液を121℃15分間高圧滅菌した後、実験2.3で行ったと同様の条件で実験を行い、生産ガス量、ガス組成分析を行った。また、実験前後の乾燥重量の差から

表1 ドッグフードの保証分析値

粗蛋白質	18.0%以上	NaCl	0.3%以上
粗脂肪	5.0%以上	リノール酸	1.0%以上
粗繊維	6.0%以上	Vitamin A	5,000IU/Kg以上
粗灰分	8.0%以下	Vitamin B1	1.0mg/Kg以上
水分	10.0%以下	Vitamin B2	2.2mg/Kg以上
Ca	0.8%以上	Biotin	0.1mg/Kg以上
P	0.6%以上	その他 (でんぷん等)	50%以下

(I社による)

処理固形物量を求めた。乾燥重量はJISK-0102のSS測定法に準拠し、120℃2時間乾燥後の重量とした。

2.5 Clostridium 属菌株の水素生産効率

実験2.3と同様グルコースを用いた水素の生成実験終了後（30℃72時間静置後）、生成ガス中の組成から生成水素ガス量を求め、別に並行して測定した実験前後のグルコース量とからグルコース1モル当たりの水素ガス生成モル数を求め、水素生産効率とした。グルコースの測定はHodge⁶⁾らのフェノール硫酸法によった。ドッグフードからの水素生産効率は次のように概算した。すなわち、実験2.4前後の固形物減少量を消費デンプン量と仮定し、その値と0.9で除した値を消費グルコース量とした。この値で生産水素量を除して1モルグルコース当たりの水素生産モル量を算出し、水素生産効率を概算した。

2.6 実廃棄物による水素生産

実際に家庭の台所から排出された生ゴミを用いた。実験は2回連続して行った。生ゴミの湿重量を測定後、ワーリングブレンダーでスラリーとし、蒸留水で1リットルにメスアップし、120℃15分間高圧滅菌し、pHを7.0に調整し、Clostridium 属水素生成菌前培養液10 mlを添加し、気相を窒素ガスで置換したのち1回目の反応を開始した。反応は30℃で静置し、8日間行った。第2回目は、第1回目の反応液を100 ml残し、新たに台所廃棄物のスラリーを1リットル添加した後、今度は70℃5分間加熱処理したのち、高圧滅菌および窒素ガス置換は省略し、第1回目と同じ条件下で反応させた。同時に実験前後の乾燥重量を測定し固形物減

少量を求めた。

2.7 生成ガスの組成分析等

ガスの組成分析はTCDガスクロマトグラフ法で行った。また、使用した試薬は市販の特級試薬であった。

3 実験結果および考察

3.1 分離株の性状

下水処理場汚泥から2種類の水素生成菌を分離した。1種類は表2に示すように絶対嫌気性のグラム陽性の芽胞を有する桿菌でその生化学性状から、*Clostridium beijerinckii*（以下Clostridium属菌株称す）と同定された。図1にそのグラム染色像を示す。

本菌株は図1に示されているように培養後にヨードデンプン反応を行ったところ、菌の増殖したコロニーの周囲が反応を起こさず、デンプンの加水分解能を有することが判明した。このことは、実廃棄物である生ゴミ中の主たる炭水化物であるデンプンを水素生産の基質として利用できる可能性があり、実際の廃棄物処理上実用面で優れていると考えられた。消化汚泥を種汚泥とした食品廃棄物の混合微生物系での水素生産に関する研究でも、ガス生成槽での優先微生物はクロストリジウム属に属する細菌であるとの報告がある⁷⁾。我々が今回分離源としたのも下水処理場汚泥であり、馴養の過程でクロストリジウム属に属する菌が優先したものと思われる。もう1種類は表3に示すように、通

表2 グラム陽性桿菌の性状

- 細胞形態
桿菌（大きさ0.5-1.5×2.0-7.0 μ m）、グラム染色+、内生孢子+
- 生理的性質
カタラーゼ-、チトクロームオキシダーゼ-、ゼラチン液化能+、インドールの生成-、ウレアーゼ-、エスクリン加水分解+、デンプン加水分解+
- 酸素に対する態度 偏性嫌気性
- 糖からの酸生成
グルコース+、D-マンニトール+、ラクトース+、サッカロース+、マルトース+、サリシン+、D-キシロース+、L-アラビノース+、グリセリン+、D-セロビオース+、D-マンノース+、D-メレチトース+、D-ラフィノース+、D-ソルビトール+、L-ラムノース+、D-トレハロース+、デンプン+
- GMBでの増殖-
- PYG+Bileでの増殖+
- 70℃5分加熱処理後の増殖+

表3 グラム陰性桿菌の性状

- 細胞形態
短桿菌（大きさ0.5-1.5 μ m×1.5-2.0 μ m）、グラム染色-、内生孢子-
- 生理的性質
カタラーゼ+、チトクロームオキシダーゼ-、乳糖分解能+、ONPG-、ADH（アルギニン脱水素酵素）+、LDC（リジン脱炭酸酵素）-、ODC（オルニチン脱炭酸酵素）+、クエン酸資化性+、H₂S産生性-、尿素分解能-、TDA（トリプトファンデアミナーゼ）-、インドール産生能-、VP（ボーグスプロスカウアー）テスト+、ゼラチン液化能-
- 酸素に対する態度 通性嫌気性
- 糖からの酸生成
グルコース+、D-マンニトール+、イノシトール+、ラフィノース-、サッカロース+、D-メリビオース+、D-アミグダリン+、L-アラビノース+、硝酸還元能+
- 脱窒素能+

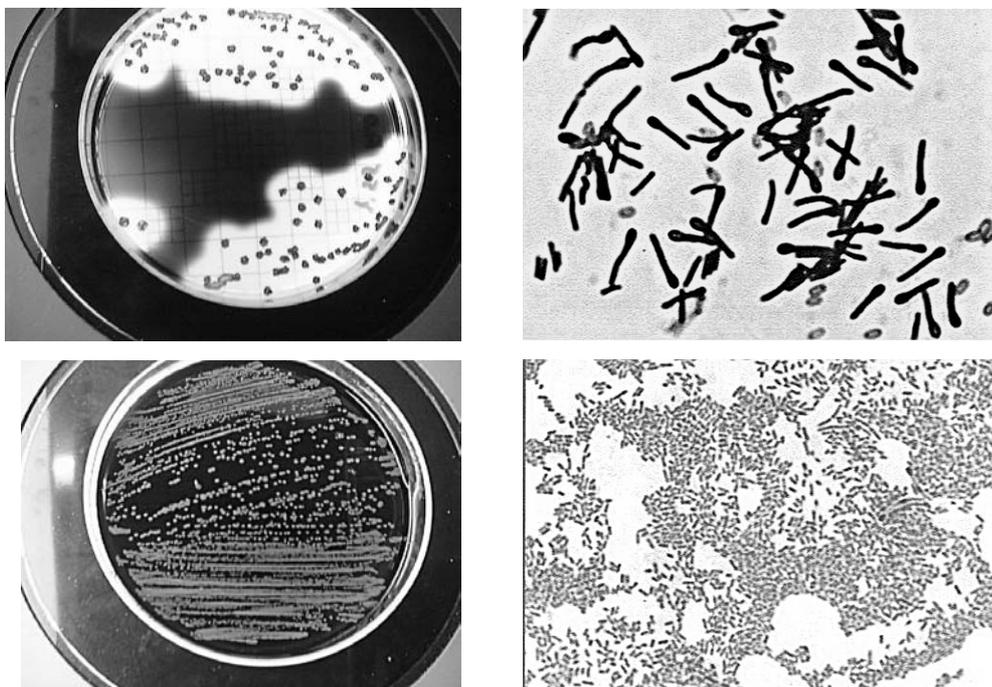


図1 水素生成菌グラム染色像とデンプン分解活性

上図：Clostridium 属菌株のデンプン分解能（左図）とグラム染色像（右図）
 下図：Enterobacter 属菌株のデンプン分解能（左図）とグラム染色像（右図）
 デンプン分解能は培養後ヨードデンプン反応を行い判定した。

性嫌気性のグラム陰性の無芽胞桿菌であり、その生化学性状から *Enterobacter cloacae*（以下Enterobacter 属菌株と称す）と同定された。本菌株は図1に示されたようにデンプンの加水分解活性を有しなかった。このことから、本菌株を、デンプンを主とする食品廃棄物の処理に応用することは困難であり、Enterobacter 属菌株は Clostridium 属菌株に比べて実用面で不利と考えられた。とはいえ、水素生産の面から考えると、基質の利用範囲が低くとも水素生産効率が高ければそれは有利な性質といえることから、グルコース、ショ糖としての廃糖蜜、乳糖及びデンプンからの水素生産について検討した。

3.2 グルコース、廃糖蜜、乳糖及びでんぷんからの水素生産

グラム陽性でデンプン分解能を示した Clostridium 属菌株によるグルコース、ショ糖及びデンプンからの水素生成実験の結果を示したのが表4及び表5である。Clostridium 属菌株はグルコース、ショ糖に加え、デンプンからもガスを生成し、その生成ガス量は6.7リットルとグルコ

ースの場合の6.5リットルとほぼ同量であり、また、生成ガス中の水素ガス組成も約50%とグルコースの場合と同じ結果を得た。

即ち、Clostridium 菌株はデンプンからもグルコー

表4 Clostridium 属菌株によるグルコース及びショ糖からの水素生成

培地		YE加2%グルコース	YE加2%廃糖蜜
発生ガス量(1)*		6.5	3.5
ガス組成 (濃度%)	H2	55.06	54.11
	CO2	41.41	44.18
	その他	3.52	1.7
	合計	100	100

*：30℃、72時間培養後の積算ガス生成量

表5 Clostridium 属菌株及び Enterobacter 属菌株によるデンプンからの水素生成

		Clostridium 属菌株	Enterobacter 属菌株	Clostridium 属菌株+ Enterobacter 属菌株
発生ガス量(1)*		6.7	0.2	6.3
ガス組成 (濃度%)	H2	54.05	---	42.5
	CH4	0	---	0
	CO2	40.85	---	55.82
	その他	5.09	---	1.68
	合計	100	---	100

*：YE加2%デンプン培地中、30℃72時間培養後の積算ガス生成量

スの場合と同程度の水素ガス組成を持つ生成ガスを同量生成することが明らかとなった。一方、グラム陰性桿菌でデンプン分解能を示さなかった *Enterobacter* 属菌株では、表5及び表6に示されているように、グルコース、ショ糖及び乳糖といった単糖類又は二糖類から水素ガスを生成し、特に、グルコースからは *Clostridium* 属菌株とほぼ同様の6.0リットルのガスを生成したものの、デンプンからはガス生成が殆ど認められなかった。また、生成ガス中の水素ガス組成はいずれの糖の場合も約25%と、*Clostridium* 属菌株の

表6 *Enterobacter* 属菌株による水素生成

培地	YE加2% グルコース	2%廃糖蜜	YE加2% 廃糖蜜	BGLB* *	
発生ガス量(ℓ)*	6.0	1.5	3.6	1.0	
ガス組成 (濃度%)	H ₂	25.04	28.51	25.87	21.91
	CO ₂	74.36	71.45	74.13	77.71
	その他	0.62	0.33	0	0.37
	合計	100	100	100	100

*：反応液各1.0ℓ、30℃、72時間培養後の積算ガス生成量

**：乳糖濃度1.0%

場合と比較して1/2と低かった。

以上の結果から、実際の廃棄物処理に応用するには *Clostridium* 属菌株の方が水素生産に有利であることが明らかとなった。従って、以下の実験ではグラム陽性の *Clostridium* 属菌株のみ使用することとした。

3.3 擬廃棄物による水素生産

模擬廃棄物としてドッグフードを使用し、その濃度を変化させたときの水素生産の状況を図2に示した。固形物濃度5%、10%および15%の条件下で *Clostridium* 属菌株は良好に水素生成を行うことが示された。生成してきたガス中の水素組成はそれぞれ51%、49%および50%で固形物濃度による水素組成に

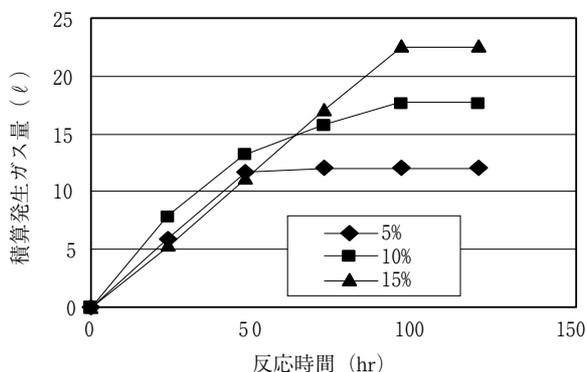


図2 *Clostridium* 属菌株による模擬廃棄物からの水素生成

差は認められなかった。このことから、*Clostridium* 属菌株は成分の複雑な廃棄物にも適用可能であることが示された。

3.4 *Clostridium* 属菌株の水素生産効率

グルコースを用いて *Clostridium* 属菌株の水素生産効率を求めたのが表7である。その結果 *Clostridium* 属菌株は1モルのブドウ糖から1.5モルの水素を生産することが可能であった。微生物による水素の生成については多くの報告がある。Taguchi⁸⁾らは *Clostridium beijerinckii* AM21B株を用いたグルコースからの水素ガス生産実験を行い、水素生産効率1.8-2.0を得ているが、本研究で得られた水素生産効率はそれより小さい値となった。これは、我々の実験が廃棄物処理を想定しており、低濃度のYEとグルコースしか含まない限定された条件でのものであり、グルコースが当該菌の増殖や、エネルギー獲得のために消費され、結果として水素収率が小さくなったものと推定される。一方、模擬廃棄物であるドッグフードを用いた我々の実験では水素生産効率1.5-2.4と概算できた。腸内細菌科の *Enterobacter aerogenes*⁹⁾、*E. coli*¹⁰⁾ や *Enterobacter cloacae*¹¹⁾ でも水素生成についての検討がなされ、それらの水素生産効率はそれぞれ1.0、0.9および2.2であった。また、好熱菌あるいは超好熱菌を用いた水素生成についても研究が進められており^{12),13)}、特に、*Thermotoga matitima*¹²⁾ の場合には水素生産効率は4.0と非常に高い値となったとの報告がされている。しかし、この実験条件下では、菌体濃度が 1.4×10^8 個/mlと低く、また、グルコース消費量が1.6mMと極端に低かったことから、高い水素生産量を得るには菌体濃度をさらに高くする必要があると考えられる。このことが可能となれば、好熱菌あるいは超好熱菌を用いる方法は、高温での処理が可能で、雑菌汚染を最小限に抑えつつ高い水素生産効率を維持することが可能と考えられ、水素生産の有効な手段となりうると思われる。

以上の実験により、*Clostridium* 属菌株はデンプン或いは模擬廃棄物としてのドッグフードから、水素生産が可能であることが明らかとなったので、実際の廃棄物として、一般家庭から排出される生ゴミを用いて *Clostridium* 属菌株による水素生産を行い、実廃棄物への適用の可否について検討した。

表7 グルコースを使用したときの水素生産効率

消費グルコース量 (mol)	生産水素量 (mol)	生産効率 (mol H ₂ /mol glucose)
0.104	0.157	1.5

表8 模擬廃棄物を用いたときの水素生産効率

ドッグフード濃度	5%	10%	15%
消費ドッグフード量 (g 乾重)	18	41	43
生産水素量(mol)	0.27	0.34	0.49
生産効率*(mol/mol)	2.4	1.5	1.8

*：減少固形物量を消費デンプン量と仮定し、消費デンプン量を0.9で除して消費糖量として計算した。

3.4 実廃棄物からの水素生産

実廃棄物として、生ゴミを使用したときの水素生産を行った結果が表9である。2回連続して行ったバッチ処理の1回目と2回目で、生成ガス量、固形物減少率、生成ガス中の水素ガス組成に大きな差異は認められなかった。固形物減少量、ガス生成量は使用する材料中の *Clostridium* 属菌株の基質となる炭水化物量によって決まってくるものの、今回の実験によって、乾燥重量の約60%の減少が認められた。このことから、生ゴミ等食品廃棄物を *Clostridium* 属菌株で処理し、水素ガスを回収することは、有機性廃棄物の減容化及び再資源化の有力な手段となりうる可能性があることが示唆された。しかし、処理後の混合物中にはまだ約40%の固形物が残存しており、この残存固形物の処理が大きな課題である。近年、水素・メタン2段発酵の研究が廃棄物、特に食品廃棄物の処理領域で活発に研究されるようになってきた^{14), 15), 16), 17)}。これらの研究は混合微生物系で処理しており、条件設定を変えることによって、水素生成槽では水素の回収を行い、残渣をメタン発酵槽で処理し、固形物のさらなる減容化を図るとともに生成するメタンを回収しようというものである。混合微生物であるため、様々な成分を含む廃棄物に対する適用範囲は広いものの、基質である炭水化物を水素ガスやメタンガス等の有用なガスに変換することのできない多量で多種類の菌が、有用な菌と炭水化物の獲得で競合することとなり、基質の炭水化物の有効利用の面からは必ずしも優れているとはいえない、といった一長一短を有する処理方法と考えられ

表9 *Clostridium* 属菌株による生ゴミからの水素生成

	1 回目	2 回目	
ガス発生量 (l)	17.4	16.8	
固形物減少率(%)	59.8	57.3	
ガス組成 (濃度 %)	H ₂	47.5	44.25
	CH ₄	0	0
	CO ₂	52.2	55.75
	その他		
	合計	100	100

る。

我々が今回使用した *Clostridium* 属菌株は耐熱性を有しており、実廃棄物を使用した2回目のバッチ実験では加熱処理により他の微生物汚染をできる限り防止する方法をとった。

今後、この方法が長期間可能かどうかも含め、また、水素・メタン二段発酵法の前段部に本法が適用可能かどうかなどの検討を進めていきたい。

謝 辞

研究を進めるに際し、生産ガスの組成分析についてその一部を岡山ガス株式会社築港工場にご協力いただきました。記して謝意を表します。

文 献

- 1) 廃棄物学会バイオマス系廃棄物研究部会編、バイオマス・ニッポンを廃棄物学で切る、藤本 潔：バイオマス・ニッポン総合戦略の推進について、3-18、廃棄物学会、東京、2003年10月
- 2) 岡山県廃棄物新処理技術検討委員会編：「生ごみ等バイオマスの発酵等に係る新処理技術調査報告書」、3、平成14年3月
- 3) 岡山県地球温暖化防止行動計画、2003年3月
- 4) 板谷勉、山本淳、小野質、北村雅美、斎藤直己、杉本盛正：バイオ技術による廃棄物の再資源化に関する研究—光合成細菌の応用—、岡山県環境保健センター年報、28、17-21、2004
- 5) Cummins, C.S., Johnson, J.L. : Taxonomy of Clostridia: Wall Composition and DNA Homologies in *Clostridium butyricum* and Other Butyric Acid-producing Clostridia, J. General Microbiol., 67,33-46, 1971

- 6) Hodge, J. E., Hofreiter, B.T. : Method in Carbohydrate, Chemistry, 1 338,1962
- 7) 西村和之, 金田一友規, 川本克也: 有機廃棄物からの2段階嫌気性発酵プロセスの構築と菌叢特性, 平成16年度水環境学会講演要旨集,194, 2004
- 8) Taguchi, F. , Chang, J.D., Takiguchi, S. , Morimoto M. : Efficient hydrogen production from starch by a bacterium isolated from termites. J Ferment Bioeng 73, 244-245, 1992
- 9) Tanisho S. , Wakao N. , Kosako Y. : Biological hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*. J. Chemm. Eng. Japan, 16, 529-530, 1983
- 10) Blackwood A.C., Neish A.C., Ledingham G.A. : Dissimilation of glucose at Controlled pH values by pigmented and non-pigmented strains of *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 72, 497, 1956
- 11) Kumar N., Das, D. : Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* HT-BT 08. Process Biochem., 35, 589-593, 2000
- 12) Sch r oeder, C., Selig, M., Schoenheit, P. : Glucose fermentation to acetate CO₂ and H₂ in the anaerobic hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima* involvement of the Embden-Meyerhof pathway. Arch. Microbiol., 161, 460-470, 1994
- 13) Kanai, T. , Imanaka, H. , Nakajima, A. , Uwamori, K. , Omori, Y. , Fukui, T. , Atomi, H. , Imanaka, T. : Continuous hydrogen production by the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis* KOD1”, J. Biotechnol., 116(3), 271-282, 2005
- 14) 片岡直明, 菖蒲昌平, 宮晶子, 石田健一, 鈴木隆幸 : セルロース系廃棄物の水素・メタン2段発酵に関する研究, 第15回廃棄物学会研究発表会講演論文集,518-520(2004)
- 15) 竹本裕, 片岡直明, 上野嘉之, 澤山茂樹, 横田長雄, 二段発酵法による食品系廃棄物および生ゴミ・紙ゴミからの水素・メタン回収システム, 平成16年度水環境学会講演要旨集,194,2004
- 16) 片岡直明, 菖蒲昌平, 宮晶子 : 有機性廃棄物の水素・メタン二段発酵における可溶化・水素発酵特性, 第16回廃棄物学会研究発表会講演論文集, 529-531,2005
- 17) 福井久智, 上野寿之, 片岡直明, 大下信子, 澤山茂樹, 横田長雄 : 水素・メタン二段発酵システムによる有機性廃棄物のエネルギー転換, 第16回廃棄物学会研究発表会講演論文集, 523-525, 2005