

2-4 固形残渣の再利用技術の研究開発

森本兼司、ベル スブラマニ（(財)科学技術交流財団）

鈴木憲司（産業技術総合研究所、現名古屋大学）

大宮邦夫（三重大学）

1. 研究の目的と概要

本研究における主目的は、家庭から排出される生ゴミをディスポーザーで破碎し固液分離によって得る固体分（固形残渣）を微生物処理により可溶化し、発生するガスをエネルギー源として利用することにある。

処理方法としてはメタン発酵法を選択する。メタン発酵法は、実用化されている例もあるが、問題点もいくつか挙げられる。中でも処理時間が膨大に要することから迅速なメタン発酵法の確立が求められている。メタン発酵処理では発酵槽を二槽用いることにする。第一発酵槽では、水素生産菌叢で生ゴミを分解して発酵させ、水素や有機酸（酢酸など）を主に生産する。生ゴミ投入時の水素発酵槽の pH は 5～6 であるが、発酵が進むと 4 前後に低下する。第二発酵槽では、第一発酵槽で得られるメタン発酵にとって良い基質を含む液をメタン発酵菌叢で処理してメタンを生産する。この発酵槽では、pH は 7～8 に維持される。二槽に分離する理由としては、メタン発酵菌槽に固形残渣を直接投入すると増殖の早い水素発酵菌叢が主要菌叢となり上記の pH 変化のためにメタン発酵菌叢が激減するからである。また、メタン発酵後の廃液を水素発酵槽へ戻すことで、発酵槽の pH 調整を行うことができるとともに、この時持ち込まれるメタン発酵菌叢中の水素発酵菌が優勢となるため水素発酵が進行するという利点もある。一般に、水素・メタン発酵は長時間を要するので、関与する主要菌株（水素生産菌）に遺伝子を導入して固形残渣分解機能や水素生産その他の機能を高め、エネルギー物質への変換反応を促進することも研究目的に含まれる。また、生産したメタンガスは有機廃棄物の再資源化技術の研究開発 WG の高温ガス化炉へ供給する。

2. フェーズ I の成果

2-1. 目的および目標

生ゴミ中の固形残渣をメタン発酵により減少させエネルギー回収を行う技術を開発するため、フェーズ I ではメタン発酵に用いる菌叢を探索し、遺伝子組換え技術の導入や培養条件の最適化を行って、既存技術よりも効率的にメタン発酵を行うことが可能な条件を確立する。

2-2. 方法および結果

2-2-1. 水素発酵菌およびメタン発酵菌叢の探索

水素発酵菌およびメタン発酵菌叢のスクリーニングを行った。水素発酵菌については、優れた水素生産能を有するクロストリジウム パラプトリフィカム (*Clostridium paraputrificum*) を自然界から分離することができた。本菌は、1 モルの N-アセチルグルコサミン（炭素源）あたり約 2.0 モルの水素を生産することができる。一方、メタン発酵菌については、メタン発酵を行う菌叢として水田土壌、海底汚泥、既存のメタン発酵槽内の菌叢などが知られているため、①三重大学附属農場の水田土壌、②伊勢湾の海底汚泥、③鈴鹿市在住の石田氏所有の菌叢、④京都府八木町のバイオエコロジーセンター由来の菌叢を本開発技術に用いる候補として選択し、そのメタン発酵試験を行った。その結果、③の石田氏所有の菌叢が最もメタン発酵性能に優れていたため、この菌叢を以後の研究に用いることに

した。

2-2-2. メタン発酵条件の検討と分解時間の短縮化

大学の生協食堂から発生する生ゴミを INAX 製のディスポーザーを用いて破碎し、箆にて水気を切ったものを実験試料として用いた。メタン発酵は、ジャーフェーマンター（丸菱エンジニアリング製）と 1.5L のペットボトル（市販されているもの）を発酵器として用い、37°C にて行った。ディスポーザーで破碎した生ゴミを直接メタン発酵器に投与したところ、メタン発酵は進行せず、水素発酵へと移行し、水素、炭酸ガス、有機酸が発生したが、固形残渣はかなり未処理の状態であった。そこで、生ゴミを水素発酵させた後、発生する有機酸および残った固形物をメタン発酵槽へ投与する方法でメタン発酵実験を行った。

生ゴミ 100 g に対してメタン発酵菌叢液 1000ml を添加し水素発酵させた。経時的に水素濃度、有機酸濃度（乳酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸）を調べた。次に水素発酵液をメタン発酵液 1000ml に対して 10 から 200ml まで量を変えて投与した。投与する時期は、1 時間あたりの水素発生量が 10ml 以下に低下したあたりに設定した。また投与後のガス組成およびガス生産量を調べた。

実験開始当初、メタン発酵槽 1000ml へ水素発酵処理液 10ml（固形残渣 1 g に相当）を添加することにより安定してメタンガスが生産されることがわかった。次に水素発酵処理の添加量を徐々に増加させ生ゴミ処理に適応させた。その様子を図 1 に示した。なお、図中の総ガス発生量はメタンの他、二酸化炭素やその他の微量ガスを含んでいる。実験開始から 1000 時間までは、10-50ml の範囲で徐々に水素発酵液の添加量を増加させ馴致させた。その後 2000 時間までメタン発酵槽から上清 100ml 排出し、水素発酵処理液 100ml（固形残渣 10 g に相当）を添加し、さらにその後 150ml（固形残渣 15 g に相当）、200ml（固形残渣 20 g に相当）と添加量を増加させた。ガスの最大発生量は、水素発酵処理液を 100ml 添加した時には 100ml/L/h であり、150、200ml を添加した時と差がみられなかった。これはメタン発酵液が 1L におけるガス発生の限界が 100ml/L/h であり、許容量を超過した場合には、処理時間が増加する傾向にあることを示している。この処理能力は既存のメタン発酵施設とほぼ同等である。

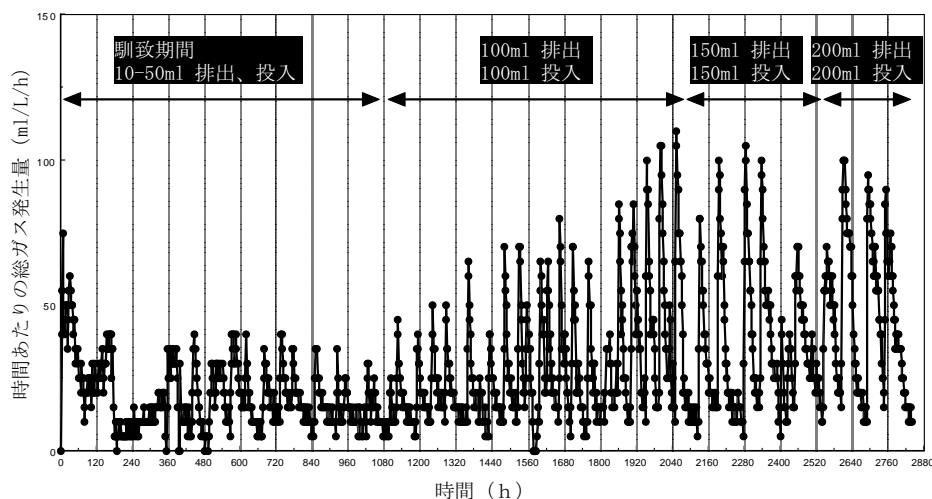


図 1. 水素発酵処理液を添加したメタン発酵における時間あたりの総ガス発生量の推移

2-2-3. 遺伝子組換え菌の作出

単離した絶対嫌気性細菌 *Clostridium paraputrificum* を遺伝子操作により水素生産能を向上させ

た菌を育種することにし、水素発生の直近の代謝反応に関与している遺伝子の一つである本菌のヒドロゲナーゼ遺伝子を大腸菌にクローニングした。これを用いてまずヒドロゲナーゼ遺伝子の塩基配列を決定し、これを本菌に遺伝子導入してその効果を評価した。

クローニングした本菌のヒドロゲナーゼ遺伝子を含んでいる DNA 断片約 9,000 塩基対を含むクローン pHYD101 から pHYD102- pHYD106 のクローンを作製し塩基配列を決定した。図2にその模様を示した。本ヒドロゲナーゼ遺伝子は、1,749 塩基対からなるアミノ酸 582 をコードする推定分子量 64,560 から構成されていた。またヒドロゲナーゼ遺伝子の発現を制御する領域（プロモーター領域）約 400 塩基対も見出された。

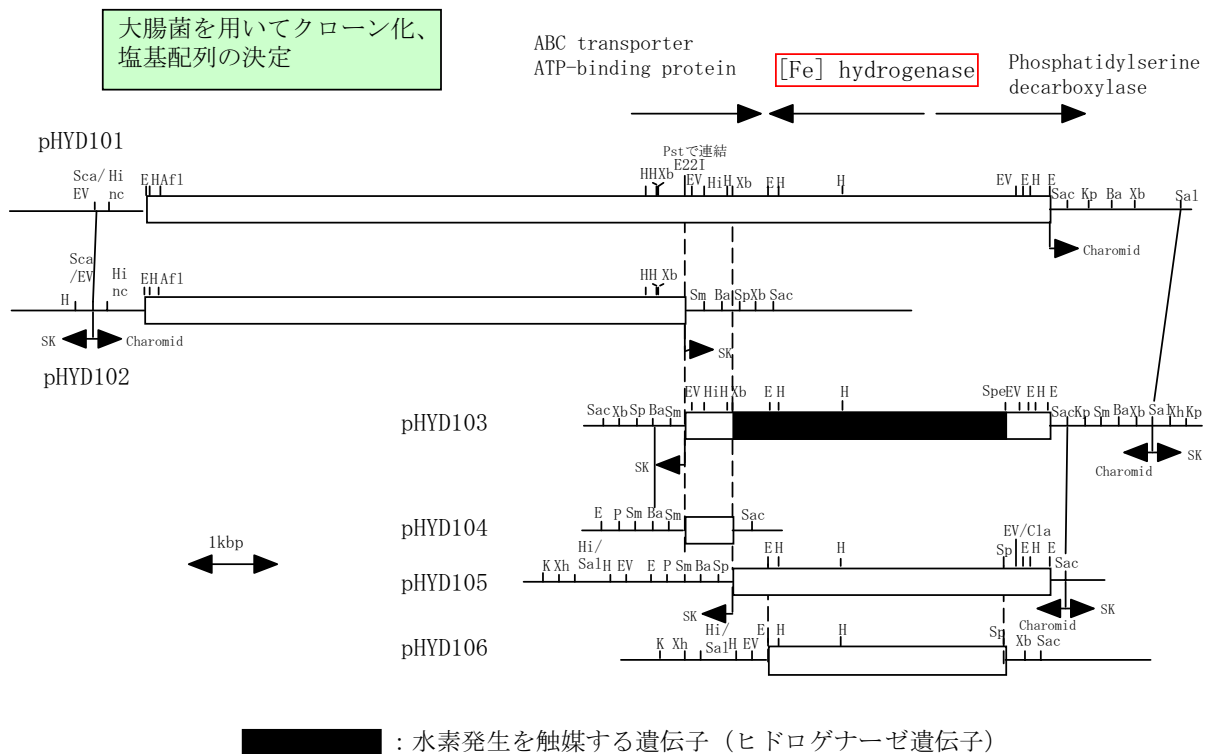


図2. *Clostridium paraputrificum*由来のヒドロゲナーゼ遺伝子の制限酵素地図

遺伝子導入により本菌内でヒドロゲナーゼが過剰に生産される菌の育種を行った。ヒドロゲナーゼ遺伝子を導入するのに用いたプラスミドは pJIR751 である。ヒドロゲナーゼ遺伝子、およびその調節遺伝子（プロモーター領域）を完全に含む DNA 断片 (*XbaI*-*SpeI* 断片) 2,347 塩基対を取り出し、pJIR751 の *XbaI* 部位に連結した。連結後のプラスミド pJIR751-hyd を最適条件下で導入した。図3にこの模様を示した。得られた組換え体からプラスミドを調製し PCR 法でヒドロゲナーゼ遺伝子の確認を行った。確認の後、ジャーファーマンター（丸菱バイオエンジニアリング社製）を用い、1% N-アセチルグルコサミンを炭素源とした GS 培地 500ml で、45°Cにてこの組換え体を培養し、ガス組成およびガス発生量を測定した。改良前、組換え体のそれぞれの総ガス量、最大発生量、効率を図4に実施例として示した。改良前の菌体は、2.0~2.8L/L-培養液のガス発生量を示した。一方、ヒドロゲナーゼ遺伝子を導入した菌体は、3.0~3.5 L/L-培養液のガス発生量を示した。改良前の菌体と比較して最大で 1.8 倍のガスが発生していることが確認された。ガス生成の最高比率も最大 1.8 倍であった。生育速度も改良前の菌体とさほど変わらなかった。

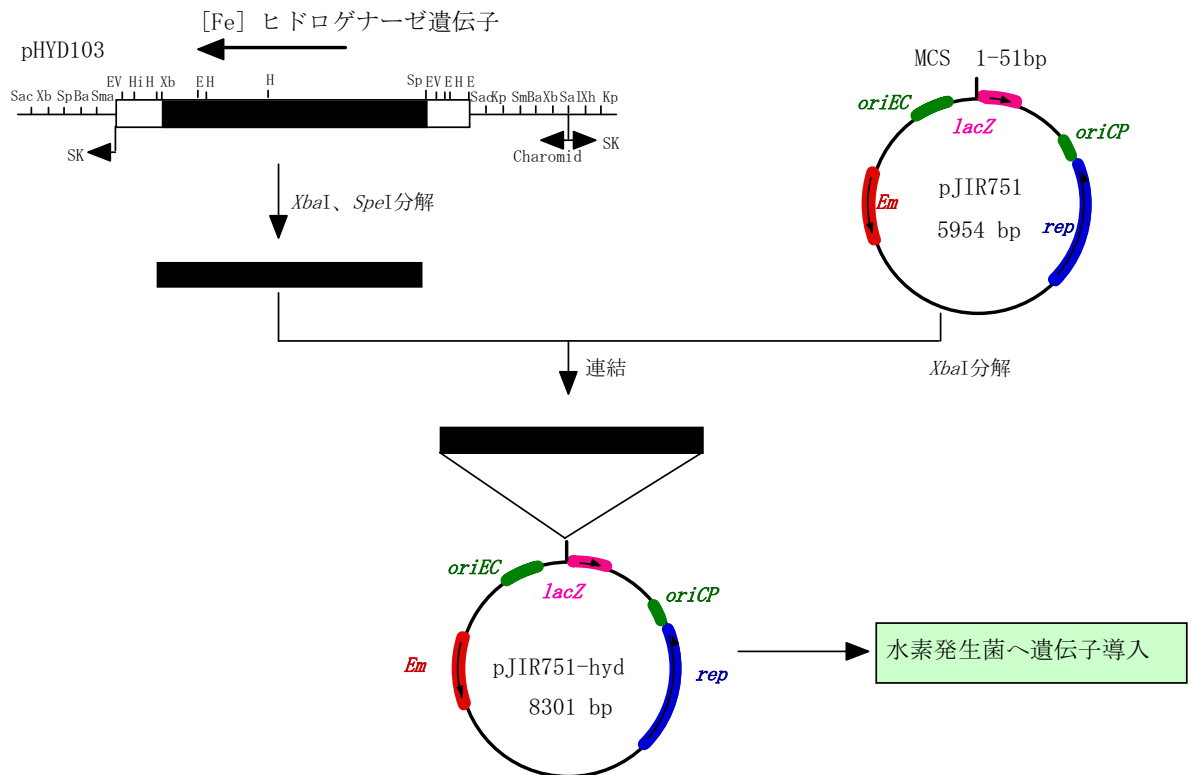


図3. 大腸菌-クロストリディウム間のシャトルベクターpJIR751へのヒドロゲナーゼ遺伝子の連結

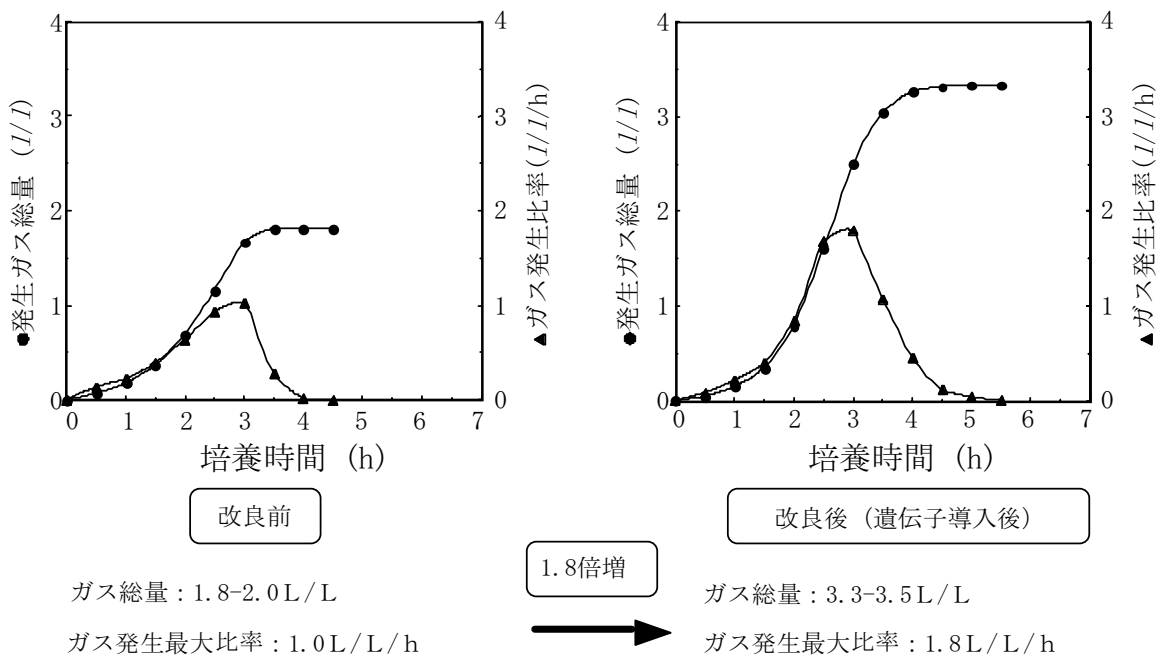


図4. 水素発生を触媒する酵素の遺伝子導入による効果

2-2-4. 組換え菌を含む水素発酵菌叢とメタン発酵菌叢との混合培養

遺伝子組換え菌をメタン発酵槽へ添加することによりメタン発酵効率の向上を図った。メタン発酵は、水素発酵処理した後にその処理液を添加することにより効率よく発酵が進行することがわかっているため、まず遺伝子組換え菌を既存のメタン発酵液と混合し生ゴミに添加し水素発酵させ、その後処理液をメタン発酵槽へ添加することを試みた。

生ゴミ 20-40 g に対してメタン発酵上清 100ml、GS 培地で純粋培養した各種組換え菌 4 種を 5-10ml (計 20-40ml) と量を変えて添加し全量を 200 から 300ml に水道水で調整した。これを 37°C で 2 晩培養し固形残渣の減少量、ガス組成、および有機酸の組成を調べた。組換え菌の添加効果を見るために組換え菌を添加しない (既存の技術) 発酵槽を用意し、総ガス発生量、ガス組成、および処理後の上清の未分解物の重量を測定した。

組換え菌添加によって水素発生効率が数%向上する結果が得られた。これはヒドロゲナーゼ組換え菌の効果が現れている結果である。また、一般的にメタン発酵に投与する有機酸として適しているのは酢酸であることが知られているが、今回水素発酵において酢酸を主要な産物にさせることに成功した。これらをメタン発酵槽へそれぞれ添加すると既存技術と比べて、組換え菌を添加した発酵槽ではメタンガスの占有量が高く (図 5)、かつ総ガス発生量が 1.4 倍程度増加する傾向が見られた (図 6)。図 5 からは有機酸を添加した直後に (矢印: 添加したポイント)、メタンガスの占める比率が組換え菌を添加することで高くなっていることから、初期のメタン生成に大きな影響を与えているものと考えられる。図 7 は図 5 のメタンガス占有率と図 6 の総ガス発生量からメタンガスの生産を計算したものであるが、組換え菌を添加することによりメタンガス生産能が向上していることがわかった。さらに固形残渣の分解率は、既存技術では約 80%であったのに対して、組換え菌を添加することで約 90%以上処理されることがわかった。

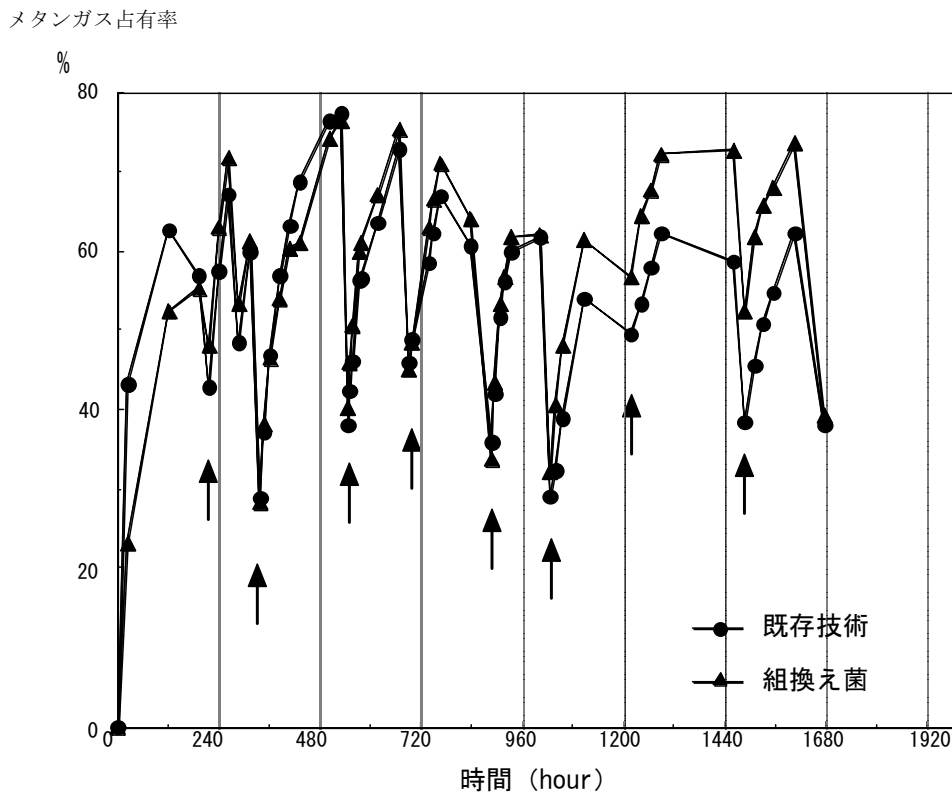


図 5. メタンガス占有率の推移

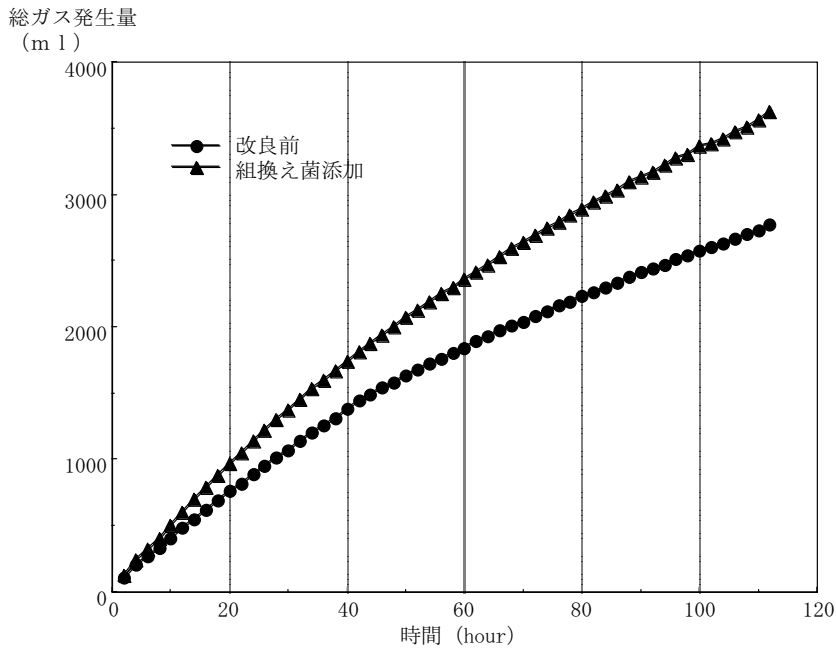


図6. 総ガス発生量の推移

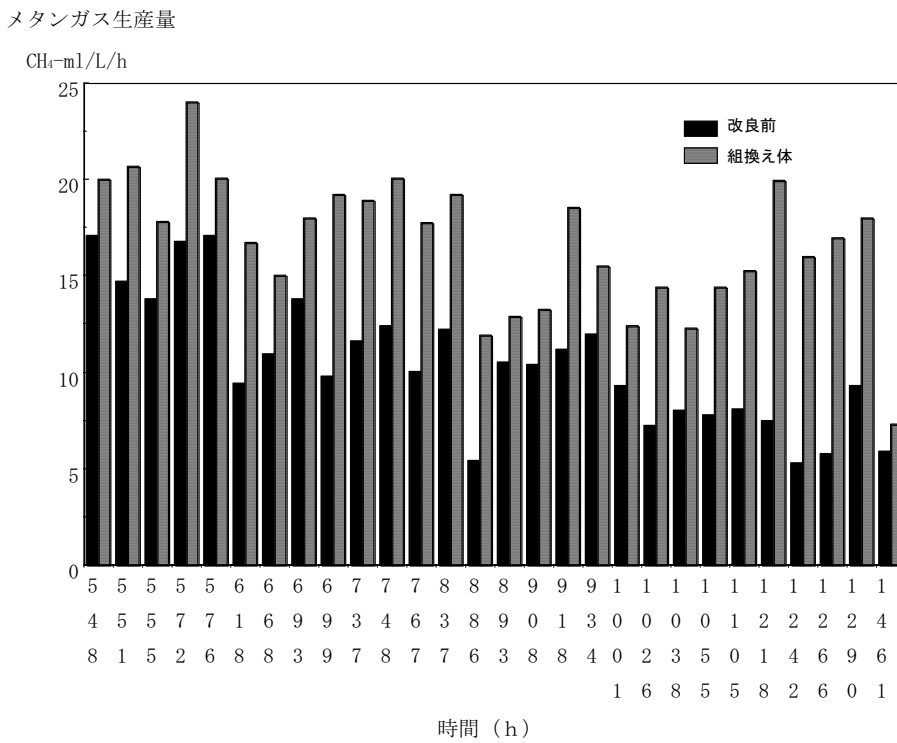


図7. メタンガス生産量の推移

2-3. 考察およびフェーズIのまとめ

本研究では、高効率メタン発酵システムの開発を目指しており、フェーズIではその基礎となる技術の確立を試みた。まず、メタン発酵に用いる菌叢の探索を行い、メタン発酵の効率化を図る上で重要となる水素発酵能に優れた菌、クロストリジウム パラプトリフィカム (*Clostridium paraputrificum*) を単離した。また、遺伝子組換え技術を導入することによりこの菌の水素生産能を向上させることに成功した。メタン発酵は、中温発酵法にて行った。一般にメタン発酵は 37°C の中温

発酵法と 55°C の高温発酵法の 2 種類が知られているが、本研究では遺伝子組換え菌を添加したメタン発酵を検討しており、遺伝子組換え菌の宿主の生育至適温度が 37°C であるためである。また、発酵槽を 2 つにし、水素発酵槽とメタン発酵槽を設けた。これは、メタン発酵菌叢は水素発酵菌叢と共生関係にあり、メタン発酵菌叢中には水素発酵菌叢も存在しているため、生ゴミの栄養源がかなり高い状態にある場合には水素発酵菌叢が優勢となってしまうためである。この現象には、発酵液の pH 変化が密接にかかわっており、メタン発酵菌叢は pH が中性付近でしか生育できないため、水素発酵時における pH の低下に対応できず、死滅してしまうのである。

以上の取り組みにより遺伝子組換え水素発酵菌を用い、水素発酵槽とメタン発酵槽の二槽にてメタン発酵を行うことによりメタンガス生成量の向上と固形残渣の減量化が実現できる可能性が示唆されたため、フェーズ II ではこのシステムを採用した小型メタン発酵装置を製作し、その性能を確認することとした。

3. フェーズ II の成果

3-1. 目的および目標

生ゴミ中の固形残渣をメタン発酵により減少させエネルギー回収を行う技術を開発するため、フェーズ I での検討から得られた基礎データを基に小型メタン発酵装置を製作し、システムの構築を図る。

<最終目標> メタンガス発生量：既存技術の 10% 増 (1.1 L-gas/L-culture/d)

固形残渣処理能力：既存技術の 10% 増

3-2. 方法および結果

3-2-1. 二槽分離循環型メタン発酵装置の開発

これまでペットボトルを用いて生ゴミをメタン発酵処理してきたが、実用化を視野に入れ小型メタン発酵装置を製作し、メタン発酵を実施した。小型メタン発酵装置には昇温装置、攪拌制御装置、pH 制御装置、ガス流量計、データロガーおよび制御計が接続されている。図 8、9 にその写真を示した。水素発酵槽の容量は 1.5 L (有効容積 1.3 L)、メタン発酵槽の容量は 4.5 L (有効容積 4.3 L) である。送液用シリンダ 1 は、水素発酵槽から液を抽出しメタン発酵槽へ送液するシリンダであり、もう一方の送液用シリンダ 2 は、メタン発酵槽から液を抽出し水素発酵槽へ送液するシリンダである。なお、ディスポーザーにより破砕した生ゴミは生ゴミ投入口から投入する。



図 8. 二槽分離循環型メタン発酵装置の各部説明

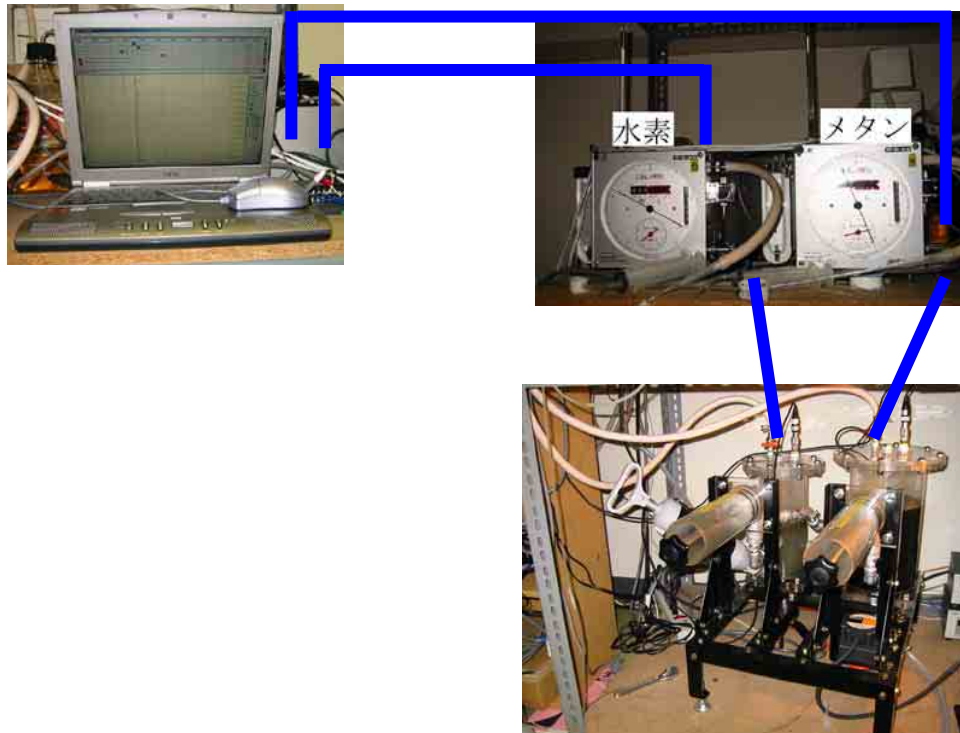


図9. 二槽分離循環型メタン発酵装置

メタン発酵菌液をメタン発酵槽に 3.0L 充填し、また水素発酵槽には、生ゴミを水素発酵させた液を 1.0L 充填し予備発酵を行った。ディスポーザーで破碎した生ゴミ 100 g を生ゴミ投入口から水素発酵槽へ投入した。水素発酵が進行しガス発生がほぼ停止した後、pH が低下した有機酸を含む処理液をメタン発酵に 100 から 300ml を送液し、メタン発酵を進行させた (図 10)。水素発酵槽の容量が 400ml に減るまでメタン発酵槽へ添加した。このためメタン発酵槽の溶液量は増加する。最終的にメタン発酵槽の容量が 3.5 から 3.6L くらいまで増加し、バイオガス生産量が低下した後に水素発酵槽へ液を増加分だけ戻し、再度生ゴミを投入し半連続的にメタン発酵処理を継続した。

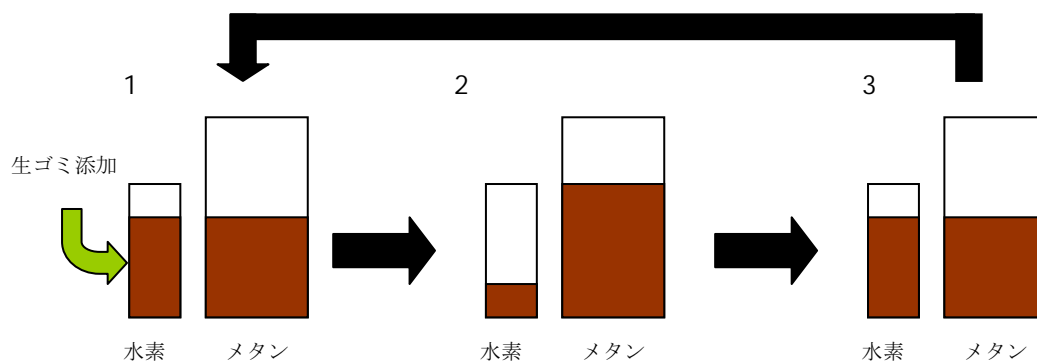


図 10. メタン発酵立ち上げ時の操作

立ち上げ時の問題として主に水素発酵槽から発生するガスの検出ができない、攪拌が強すぎる、送液するチューブの材質が無機性ガスをよく透過する等があった。これらの問題点を解決したのち、馴致期間に入った。有機酸を含む液をメタン発酵槽へ添加する目安は、バイオガス発生量が 10ml/h/L 以下になったときとした。この結果では、100g の生ゴミは約半日で水素発酵が終了し、1.0L の有機酸液のうち約 600ml については、おおよそ 1 週間要してメタン発酵処理が完了した。

馴致期間を終了したのち水素発酵槽では、処理開始時の pH が 6.3 前後、半日ほどで発酵が終了し、pH が 4.9、総ガス量が 3.0L であった。そのうち水素は最大で 30% であった。この水素発酵液をメタン発酵槽へ徐々に負荷を高めつつ投入した結果、発生ガス量が負荷の増加に伴い増加した。ペットボトルとは異なり、発酵装置では空気の混入がほとんど無いためメタン発酵が阻害されず、かつ発生するガス中のメタンの割合も 60-70% で安定していた。図 11 に立ち上げ時のメタン発酵の推移を示した。黒丸は総バイオガス発生量、青丸は一日あたりに発生したバイオガス発生量、赤い矢印は水素発酵槽液をメタン発酵槽に添加した時期、および添加量を示している。またグラフ上部の両端矢印は、有機酸を添加してから次に添加するまでに要した時間と発生したガス量を示している。なお、データは遺伝子組換え菌を使用していない場合の結果である。

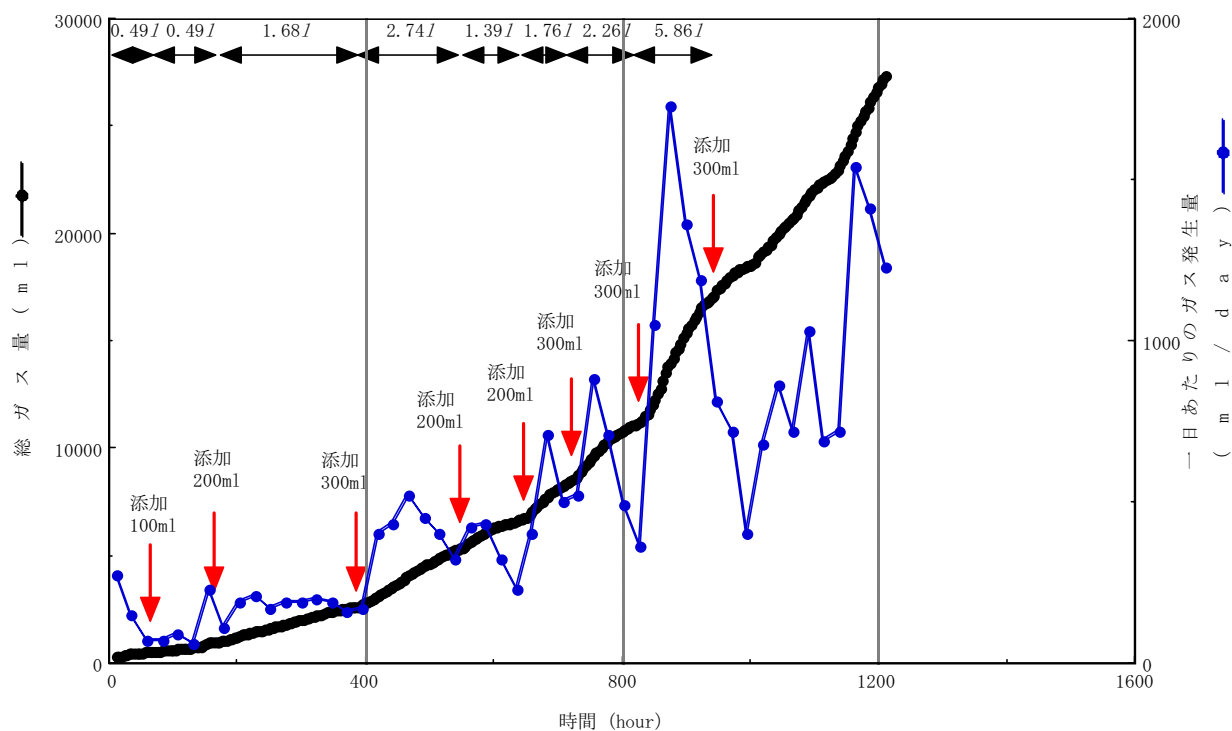


図 11. 立ち上げ時におけるメタン発酵の推移

次に、メタン発酵槽の pH の低下を軽減するために、生ゴミ投入量を減らし水素発酵槽での有機酸濃度を抑えるため両発酵槽の上清を循環させ、水素発酵槽の pH を 6.0 前後で維持させることによるメタン発酵への影響を調べ、pH を調整しない条件と比較した。また pH 緩衝剤 (リン酸ナトリウム)、重金属塩の影響も調べた。水素発酵槽では、pH 制御せず、投入生ゴミの負荷を高めた状態にすると水素が良く発生する。また pH を 6.0-7.0 に制御すると水素はほとんど発生せずメタンが生産される。逆にメタン発酵槽では、pH 制御なしでメタン発酵効率が低下し、pH 制御ありでメタン生産効率が上昇する。

両発酵槽で共通していえることは、pH 緩衝剤（リン酸ナトリウム）を添加することで水素発酵槽での pH の低下速度が抑制され全体的な効率が上昇し、メタン発酵菌に必須の金属イオンを添加することによっても効率が上昇した。またペットボトルで試験したときより良好な結果が得られ、発生するバイオガス量は、最大 2.2L/日（ペットボトル時: 1.7L/日）であった。この条件でのアンモニア態窒素濃度は 60-70ppm であり、固形物の分解率は 70%程度であった。

3-3. 考察およびフェーズⅡのまとめ

小型メタン発酵装置での検討によりメタンガス生産効率の向上、固形残渣分解効率の向上に目処がたち、二槽分離循環型メタン発酵システムを構築することができた。

生ゴミ添加量を増加させた場合の挙動の確認や、送液時に濾過フィルターを着用し、両発酵槽からの菌体の移動をなくした水素発酵・メタン発酵方法の検討が必要と考えるが、ラボ・レベルにおいて十分な結果が得られたとの判断から平成 14 年度にて研究を打ち切ることとなった。