

(2001EF002)

バイオマス/バイオエネルギー変換技術

研究代表者

Ma Ah Ngan マレーシアパームオイル局：マレーシア

研究分担者

谷生 重晴 横浜国立大学：日本

森本 昌義 マレーシアパームオイル局：マレーシア（2003年3月2日死去）

吉野 貞蔵 九州大学：日本

研究期間：2001年4月～2004年3月

概要

マレーシア国の主産業のパームオイル製造工業から出る廃液は、年間4,250万トンにも上る。この廃液にはまだ利用可能な有機物が含まれているので、我々はこの有機物からエネルギー物質を生産することを目指した。

工場やロットによって成分が異なるが、廃液の分析から、バイオマス/バイオエネルギー変換物質として利用可能なデンプン、グルコース、グリセリンなどが含まれていることが明らかになった。この物質から水素、アセトン、ブタノール、エタノールなどを発酵法によって生産するため、*Enterobacter aerogenes*, *Clostridium butyricum*, *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 や、汚泥中から分離した高温バクテリア群などを使って生産特性を調べた。

その結果、POME 1 Lには水素 4.7 L以上、ABE 4.3 g以上の基質が含まれており、450 L-H₂ m⁻³ h⁻¹以上の速さで水素生産できることが明らかになった。すなわち、マレーシアでは、POMEから確実に 62,300TOE以上の石油相当エネルギーが回収できると言うことである。

キーワード：パームオイル搾汁廃液（POME）、水素発酵、アセトン - ブタノール発酵、エネルギー変換、バイオマス

1. はじめに

マレーシアは2001年には1180万トンのパームオイルを生産した世界一のパームオイル生産国である。この生産に伴って発生するバイオマス残滓の有効利用はマレーシアにとって厳しい課題である。なぜなら、パームオイル搾汁工場の廃液（POME）はオイル生産量の3.6倍、10トンの搾汁処理に対して7.7トン発生するので、溜池での天然蒸発による処理だけではだんだん難しくなっているからである。このような訳で、POMEから有用な物質や革新的有機物質を回収する技術の開発が進んでいる。

この国際共同プロジェクトは、POMEを水素やアセトン、ブタノール、エタノール（ABE）などバイオマスエネルギーの生産に利用する技術開発である。水素、ブタノールそれにエタノールは燃料電池や自動車の燃料として期待されるクリーンなエネルギーである。そのため、このような物質の効果的生産のために、新しい嫌気性微生物の探索もプロジェクトの期間中続けられた。

メタンやABE生産技術、光合成バクテリアによる水素生産などは、基礎技術が確立していた

り精力的に研究されていたが、経済性の観点から実用化に問題がある。そこで、このプロジェクトでは実用化の観点から検討することが当初の目的であったが、これについては残念ながら検討できなかった。

2. 実験方法

2.1 POME の成分分析

実験には多くのロットの POME を使用した。主に使用したのは Havys Oil Mill Sdn. Bhd. のものであったがマレーシアパームオイル局のテストプラントからのものや工場名の判然しないものもあった。これらの POME や発酵廃液の成分分析を液体クロマトグラフ、ガスクロマトグラフ(TCD と FID)、キャピラリー電気泳動で分析した。液クロのカラムには GL-C610H(日立化成)、ガスクロのカラムには Gaskuropack 54(ジーエルサイエンス)とモレキュラーシーブ 5A それに活性炭を用いた。

2.2 水素発酵実験

実験には、既知の優良細菌である *Enterobacter aerogenes*、*Clostridium butyricum* のほか、POME 溜池から汚水や泥を採取し、POME から活発に水素を発生する微生物群を選び出した。

多くの実験は pH を一定にコントロールしながら 38 で行ったが、スクリーニングした高温細菌群では 60 でバッチ、フェッドバッチ連続実験などを行った。

発生した気体の発生速度は強酸性または強アルカリ性の液で水上置換して行った。ガス組成はガスクロで分析した。

2.3 アセトン、ブタノール、エタノール(ABE)発酵実験

ABE 発酵実験はバッチ培養と充填層型流通反応器で行った。充填物はアルギン酸カルシウムで作成、*Clostridium saccharoper-butylaceticum* N1-4 を固定した。

窒素源の影響を調べたときと炭素源の濃度の影響を調べたとき以外は、薄めたり栄養源を加えることなく POME 原液だけを使用した。

3. 結果と考察

3.1 POME の成分分析

POME の成分は、一つの分析方法だけでは決定が難しいものがあり、液クロ、ガスクロ(FID)、キャピラリー電気泳動で確認しながら行った。図 1 は *C. butyricum* による発酵実験の前と後の培養液の分析結果である。図から、培養前の POME(ハッチング部分)に含まれる多くの物質のピークが、発酵培養後には非常に小さくなって、バクテリアに利用されたことがわかる。

POME に特に多く含まれていたのは、デンプン、グルコース、フラクトース、グリセロールであった。この他にも、ロットによってはリテンションタイム 12 分から 14 分頃に非常に大きなピークがあり、基

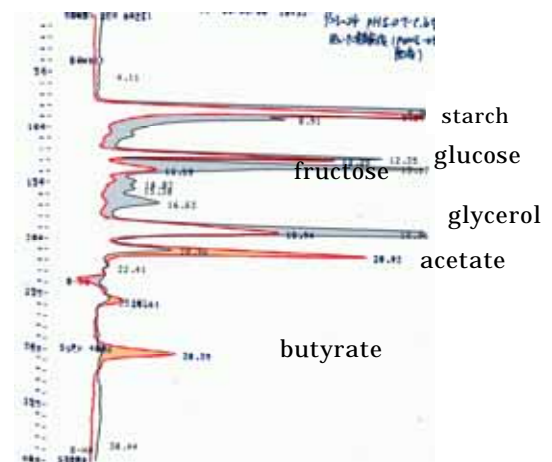


Fig. 1. Chromatogram of POME.

質として利用される物質が見られたが、完全な同定には至らなかった。

グリセロールのピーク付近にはコハク酸、乳酸、ギ酸などのピークが有るが、FID 分析と照らし合わせることでグリセロールであることが確定した。

リテンションタイムがグリセリンより大きいところでの3つのピークは、順に酢酸、エタノール、酪酸であり、これらは基質から生成された代謝産物である。

図1は、POMEの成分決定情報だけでなく、バクテリアがPOME液だけの培地でも種々の物質を利用してよく育つことを示している。

3.2 POMEのpHと水素発生のpH

POMEのpHはロットにより変化したが、図2に示すように3.8~4.7とかなり低かった。一方、発酵による水素発生では、図3に示すように、*C. butyricum*で6.0、*E. aerogenes*で5.0のときもっとも水素発生量が多く、それぞれ1LのPOMEから3.3L、3.4Lの水素を発生した。しかし、最大水素発生速度では、*C. butyricum*がpH 5.0で、*E. aerogenes*がpH 6.0で最も速い速度で発生し、それぞれ0.12、0.10 L-H₂ L-culture⁻¹ h⁻¹であった。このように培養pHは非常に重要な制御ファクターで、POMEを使用する水素生産ではpHの調整が必要であることが明らかになった。

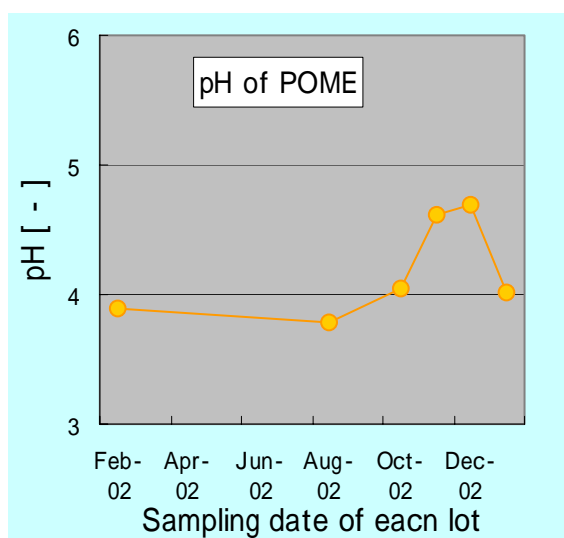


Fig.2 pH of POME

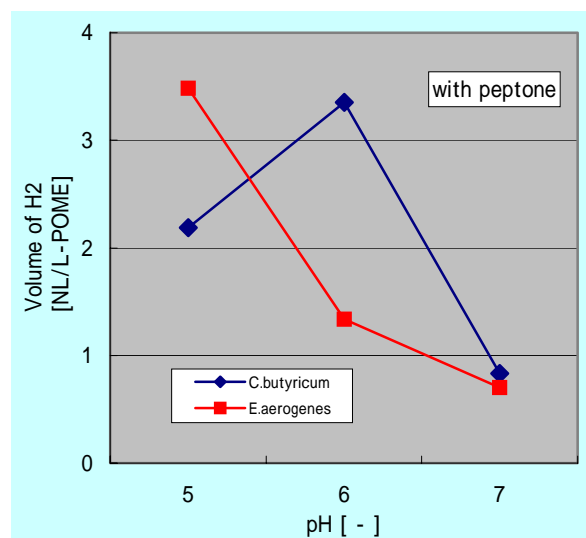


Fig.3 Effect of culture pH

3.3 水素収率の改善の可能性

発酵水素生産でもっとも重要な開発課題は基質からの水素収率を高めることである。理論発酵水素収率は酢酸のみを代謝するとき最大で、1molのグルコースから4molの水素が発生する。このとき、エンタルピー回収率はほぼ40%になるが、メタン発酵の回収率が94%であることを考慮すれば、改善する必要がある。

Tanishoの理論によれば[1]、通性嫌気性菌の電子伝達鎖の一部を阻害すれば、最大10molの水素収率が可能になる。その理論の検証を*E. aerogenes*で試みたところ、図4に示すように、阻害後の水素収率が1molから3molに増加した。*E. aerogenes*の水素収率は1molであるから、この増加は理論を支持する強い証拠データであるといえる。

この結果から、変異誘発法などで電子伝達鎖の一部を欠損する変異株の探索を行ってきたが、現在のところ発見には至っていない。

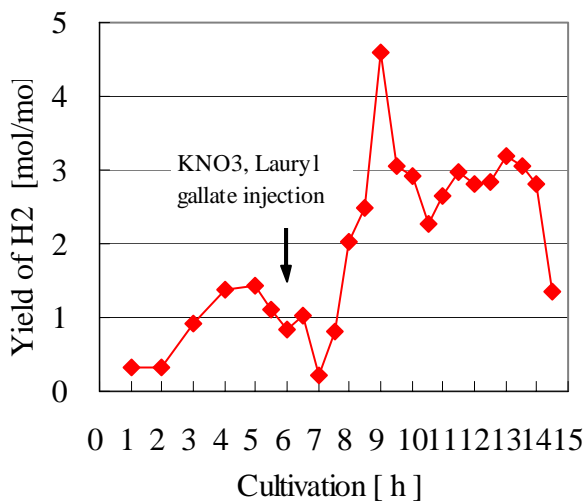


Fig.4. Development of H₂ yield by the electron transport chain inhibition

3.4 高温細菌群によるフェッドバッチ培養

我々はPOME貯水池の汚水や泥からPOMEから非常に効果的に水素を発生する高温細菌群の選別に成功した。この高温菌群はpH 5.5、60 におけるバッチ培養では、図5に示すように、50時間の培養でPOMEから 4.7 L-H₂/L-POMEの収率、最大 0.45 L-H₂ L-culture⁻¹ h⁻¹の速さで水素を発生した。この速さは*E. aerogenes*がペプトン培地でグルコースから水素発生する速さとはほぼ同等で、劣悪な栄養条件と思われたPOMEからの発生速度としては実用化に非常に期待を抱かせる結果である。

この高温菌群を使用して実験室で簡単に連続実験を行うために、4.4 Lの発酵液から 2 Lを定期的に取り替える半回分式のフェッドバッチ連続実験を行った。24 時間周期のフェッドバッチでは、2 Lの新鮮なPOMEから平均 5.2 L-H₂/L-fresh POMEの収率、最大 0.31 L-H₂ L-culture⁻¹ h⁻¹の速さで水素を発生し、約 12 時間で利用し尽くすことがわかった(図6)。そこで、周期を8時間に短縮し、生産性の上昇を試みた(図7)。その結果、平均 3.5 L-H₂/L-fresh POMEの収率、最大 0.44 L-H₂ L-culture⁻¹ h⁻¹の速さで水素を発生した。すなわち、収率はわるくなるが、24 時間周期における 12 時間での平均生産速度 0.1 L-H₂ L-culture⁻¹ h⁻¹が 8 時間周期では 0.2 L-H₂ L-culture⁻¹ h⁻¹の速さ

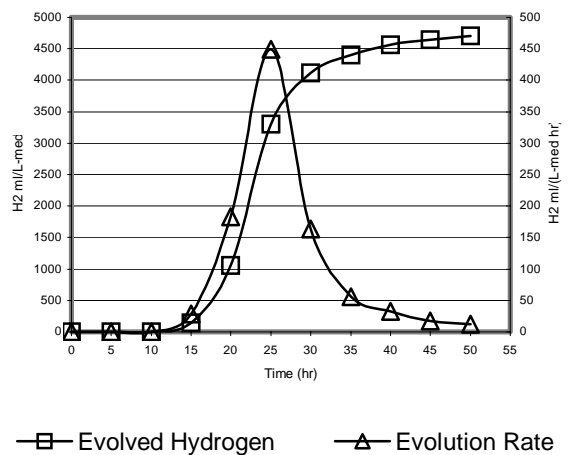


Fig.5 H₂ rate and volume from POME by thermophilic micro flora at 60°C, batch cultivation.

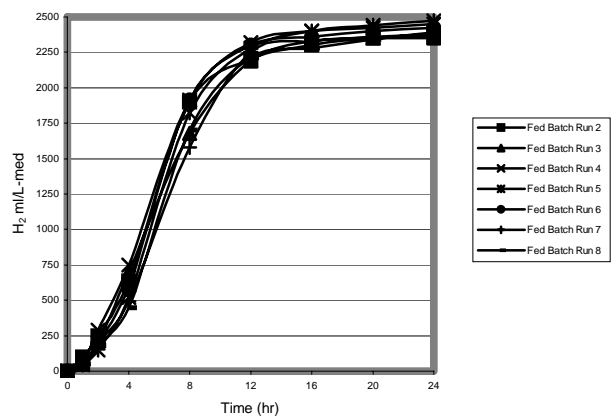


Fig.6 Results of 24h period fed-batch experiment (60 °C, pH 5.5)

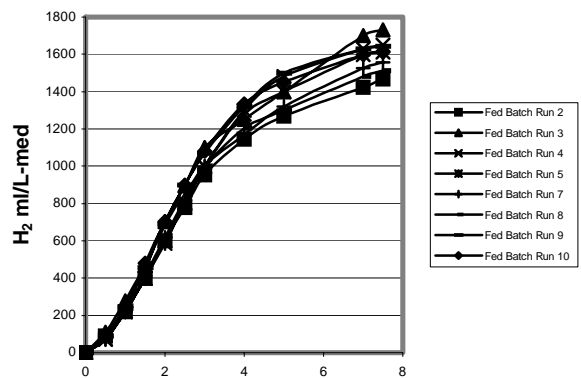


Fig.7 Results of 8h period fed-batch experiment (60 °C, pH 5.5)

の生産性になった。これは、1日1,000トンの搾汁工場にわずか30m³の発酵槽を設置するだけで、毎日約150m³の水素が生産できることを意味し、実用化に期待を抱かせる結果である。

3.5 グリセリンからの水素生産

グリセリンは油脂の成分でありケン化により生産される。パームオイルから石鹸、バイオジゼルオイルなどを生産したとき、副産物として多量に生成するため、利用法の開発が必要であった。POMEの分析からバクテリアが基質として利用することが明らかになったので、*E. aerogenes*、*C. butyricum*による利用特性を調べた。

グリセリン濃度と水素収率の関係は、50~250mMの範囲で約0.9 mol-H₂/mol-glycerineであった。図8はpH 6.0における代謝産物を示したものである。エタノールが主な産物であることがわかる。エタノール収率もやはり約0.9 mol/mol-glycerineであったので、この代謝反応はほぼホモ反応といえる。初期グリセリン濃度が低いほどエタノール収率が高い傾向をしめしたことから、代謝生成したエタノールがエタノールの生成阻害をしていると考えられる。水素発生速度はわずかではあるが培地pHの影響を受けた。しかし、速度は速くなく、0.15 L L-culture⁻¹ h⁻¹であった。

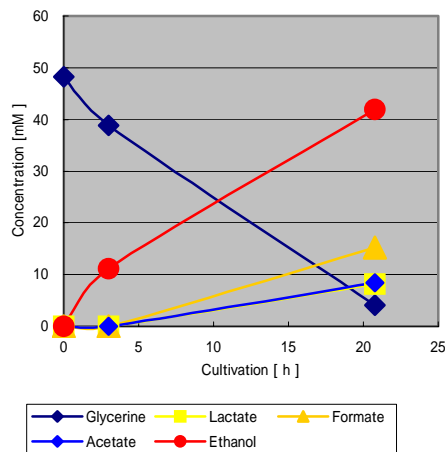
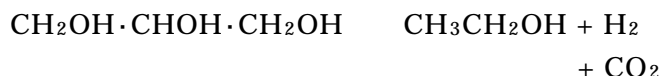


Fig.8. Metabolites of glycerol fermentation

3.6 アセトン、ブタノールとエタノール (ABE) 発酵の改善

ABE発酵は古くからあるアセトンとブタノールの製造法であるが、生産性が高くなく、培養時間が長くなると代謝阻害により生産性がさらに悪くなるという問題があった。そのため、経済性に難点のある生産法であった。しかし、発酵という非常に単純でマイルドな方法でバイオマスから生産できることから、発酵法の欠点であるブタノールの低効率生産性の改良を行い、経済性の確立を試みた。また、これらの研究は、POME生産地で応用されることが必須であり、そのため、現地の機関と密接な情報交換を行いつつ研究を進め、多大な処理費用あるいは遺伝子操作など高度の処理技術を必要とする技法を避けた再現性の高い処理法を開発することを期した。

図9に示したように、使用したバクテリアは、*Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4と*C. acetobutylicum*それにPOME溜池から選別した水素生産性の高い細菌群(micro flora)である。

Time course of total ABE production in the six cultures investigated

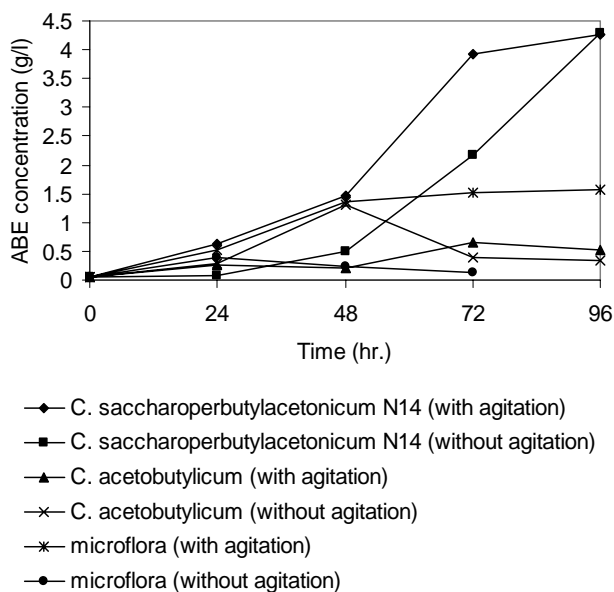


Fig.9 Comparison of total ABE productivity.

C. acetobutylicum と細菌群の生産性はほぼ同じで水素生産性は高かったが、ABE 生産性は *C.a.N1-4* 菌よりかなり劣っていた。

そこで、*C.a.N1-4* 菌を使って固定化連続生産による安定的高速生産をめざした。固定化細胞の形成は、アルギン酸カルシウムを用いた。2%アルギン酸ナトリウムと 2.5%CaCl₂で固定化細胞ゲルを調製したあと半合成培地TYAで順養し、細胞数の増大を図った後、POMEによる発酵実験をおこなった。

図 10 に示したように、固定化による 13 日間の連続発酵では、最高濃度で 4.0 g/Lのブタノールが生産され、最低でも 3.0 g/Lの濃度で生産可能であることがわかった。このブタノール生産は希釈率 0.75 h⁻¹で可能であり、ブタノール生産性としては 2.92 g L-culture⁻¹ h⁻¹と非常に高い値を得た。この値は従来開発されてきた、回分発酵の 73 倍、連続発酵の 18 倍に相当する。この高いブタノール生産性が達成できた理由は、*C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 菌が偏性嫌気性菌であるため、カラムへの充填という通気攪拌の無い条件下でも増殖し、しかもバイオフィルムをゲル表層で形成するため、高い菌濃度となり、達成されたものと推考した。

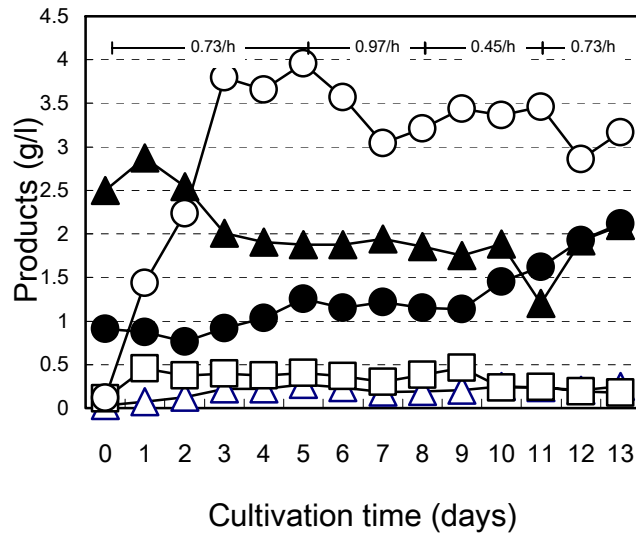


Fig.10. Continuous fermentation of modified POME by immobilized cell of *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4.

, butanol, ; acetone, ; ethanol, ; acetate, ; butyrate

4. 結論

工場やロットによって成分が異なるが、POMEのガスクロや液クロ分析から、エネルギー変換物質として利用可能なデンプン、グルコース、グリセリンなどが含まれていることが明らかになった。培地のpH制御、バクテリアの固定などを行い、汚泥中から分離選別した高温バクテリア群や *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 菌を使用すれば、POME 1 Lから水素 4.7 L以上、ABE (アセトン、ブタノール、エタノール) 4.3 g以上、また水素発生速度 450 L-H₂ m⁻³ h⁻¹以上でバイオエネルギー物質を生産できることが判明した。換言すれば、マレーシアでは、POMEから確実に 62,300 TOE以上の石油相当エネルギーが回収できると言うことである。また、パームオイル産業の副産物であるグリセリンのエネルギー利用についても技術的知見を得ることができた。

今後、地球温暖化防止のためにバイオマス由来のエネルギー要求が高まると、パームオイルの産業廃棄物や副産物がマレーシア国だけでなく日本のエネルギー資源として重要な物質になると考えられる。我々チームは本プロジェクトで開発された技術が生かされるであろうと信じている。

謝辞

この研究プロジェクトは、新エネルギー産業技術開発機構の国際共同研究助成事業の1プロジェクトとして2001年4月から2004年3月まで行われた。POMEからバイオエネルギーを生産する技術を開発できたことを感謝する。

引用文献

- [1] S. Tanisho, "A scheme for developing the yield of hydrogen by fermentation", BIOHYDROGEN II, ed. by Jun Miyake et al., Pergamon, 131-140 (2001).