

〈研究発表〉

バッチ式反応器での異なる水素添加量に対する
Biological Biogas Upgradingの応答

新田 大知¹⁾, 大下 和徹²⁾, 高岡 昌輝³⁾
 日下部 武敏⁴⁾, 伊藤 竜生⁵⁾, 佐藤 夏紀⁵⁾
 水野 志穂⁶⁾, 木村 克輝⁷⁾, 羽深 昭⁸⁾

¹⁾ 京都大学大学院 工学研究科 都市環境工学専攻
 (〒615-8540 京都市西京区京都大学桂Cクラスター1-3-467 E-mail: nitta.daichi.58e@st.kyoto-u.ac.jp)

²⁾ 京都大学大学院 工学研究科 都市環境工学専攻
 (〒615-8540 京都市西京区京都大学桂Cクラスター1-3-467 E-mail: oshita@epsehost.env.kyoto-u.ac.jp)

³⁾ 京都大学大学院 工学研究科 都市環境工学専攻
 (〒615-8540 京都市西京区京都大学桂Cクラスター1-3-467 E-mail: takaoka.masaki.4w@kyoto-u.ac.jp)

⁴⁾ 京都大学大学院 工学研究科 都市環境工学専攻
 (〒615-8540 京都市西京区京都大学桂Cクラスター1-3-467 E-mail: kusakabe.taketoshi.2w@kyoto-u.ac.jp)

⁵⁾ ㈱タクマ 研究部 研究1課
 (〒660-0806 尼崎市金楽寺町2-2-33 E-mail: wasteno7@takuma.co.jp)

⁶⁾ 東邦ガス(株) R&D デジタル本部
 (〒476-8501 東海市新宝町507-2 E-mail: mizuno-s@tohogas.co.jp)

⁷⁾ 北海道大学大学院 工学研究院 環境創生工学部門
 (〒060-0813 札幌市北区北13条西8丁目 E-mail: kkatsu@eng.hokudai.ac.jp)

⁸⁾ 北海道大学大学院 工学研究院 環境創生工学部門
 (〒060-0813 札幌市北区北13条西8丁目 E-mail: ahafuka@eng.hokudai.ac.jp)

概要

メタン発酵槽にH₂を注入することでバイオガス中のCO₂のメタン化が進行し、高品質化(Biological Biogas Upgrading: BBU)できることが期待されている。一方でH₂の添加量がCO₂に対して過剰になると、pHの上昇や有機酸の蓄積といった発酵阻害が生じる。そこで本研究では日本で発生する下水汚泥を基質としてバッチ式反応器を用いた水素添加メタン発酵を行った。投入する基質に対してH₂添加量を様々に変化させ、ガス発生量やガス組成、有機酸の蓄積量を明らかにし、H₂添加量130 mL/g-VS_m付近においてVS分解率は低下したものの、CH₄収率やCH₄濃度が増加し、BBUが最も進行するということを明らかにした。

キーワード: Power to Gas, メタン発酵, 汚泥, バイオマス, Biological Biogas Upgrading

原稿受付 2022.8.22

EICA: 27(2・3) 119-124

1. はじめに

下水汚泥は、含水率の高い湿潤バイオマスであり、そのエネルギー利用としてメタン発酵が主流となっている。しかし、得られるバイオガスの組成は、通常の場合CH₄: 40~60%, CO₂: 40~60%であり、CO₂はエネルギーとして用いることができない。都市ガス導管注入や、自動車燃料など高度な利用においても、エネルギーを投入してCH₄のみを分離し、残りのCO₂は大気中へ廃棄している例が多い¹⁾。

ところで、現在導入が進められている再生可能エネルギーの中でも、風力発電や太陽光発電などは自然変動型再生可能エネルギーと呼ばれ、気象条件によって発電量が変動し、発電量が電力需要を上回るときは余

剰電力が発生する。しかし、電力貯蔵のための蓄電池には立地の制約、大容量化・コスト低減、短時間の供給のみといった様々な課題がある。このような状況下で注目されているのが“Power to Gas”と呼ばれる技術である²⁾。具体的には余剰電力により水を電気分解し、得られたH₂を直接利用する、あるいはH₂とCO₂を反応させてCH₄を生成し利用する方法がある。特に後者は、パイプライン等のガスインフラが充実している欧州では注目され、その反応は反応式(1)により説明される。これはメタン発酵において、副次的に生じるH₂とCO₂から水素資化性メタン生成菌によってCH₄を生じる反応と同様の反応である。



すなわち、メタン発酵リアクターに、 H_2 を注入すれば、上記の反応によりエネルギー利用ができない CO_2 のメタン化が進行し、バイオガス中の CH_4 濃度を高め、高品質化 (Biological Biogas Upgrading: BBU) できることが期待される³⁾。一方で H_2 の添加量が CO_2 に対して過剰になると、酢酸が蓄積し、発酵阻害が生じるといった報告もある⁴⁾。日本の下水汚泥を対象としたこれまでの研究において、バッチ式反応器を用いて水素添加メタン発酵を行い、バイオガスの高品質化が確認されている⁵⁾。しかし、水素を過剰に投入した際のバッチ式反応器における BBU の報告事例は少なく、本研究ではバッチ式反応器に対して投入する H_2 添加量を様々に変化させ、投入する基質に対する最適な H_2 添加量の解明を目的とした。具体的には、これらの基質に添加する H_2 添加量を段階的に変化させたバッチ式実験を行ってガス発生量やガス組成の時間変化や微生物叢の変化を明らかにし、BBU がどの程度生じるのか基礎データを得ることを目的とした。

2. 実験方法

2.1 用いた試料

試料の下水汚泥は、 $55^\circ C$ で高温メタン発酵している A 下水処理場にて、消化槽投入汚泥と消化汚泥をサンプリングした後、 $4 \pm 1^\circ C$ で保存した。これらの試料の基礎特性を **Table 1** に示す。TS, VS に関しては磁皿に入れた試料をそれぞれ $105^\circ C$ で 24 時間、 $600^\circ C$ で 1 時間熱し、放冷後の重量を測定することで求めた。CHN は $105^\circ C$ で乾燥後粉末にした試料を CHN 分析装置 (MICRO CORDER JM10) で測定した。

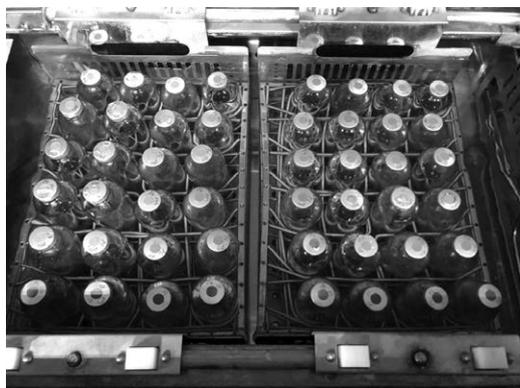


Photo. 1 batch reactors for methane fermentation

2.2 試料の作製と発酵

サンプリングした消化槽投入汚泥と消化汚泥を VS 比が 1:1 になるように混合し、発酵原料 (VS 濃度 16.5 g/L) とした。この発酵原料 20 mL を 122 mL のバイアル瓶に入れ N_2 で曝気し、ゴムおよびアルミ製のキャップで封をした。これらの操作により、バイアル瓶のヘッドスペースを 102 mL とした。次に、シリンジを用いて N_2 と H_2 を置換し、 H_2 添加量を $0, 40, 80, 120 \text{ mL}$ に調整した。この時の H_2 / 投入 VS 比は $0 \sim 390 \text{ mL/gVS}_m$ (VS_m : バイアルに投入した発酵原料中の VS) である。バイアル瓶を恒温振とう機 (ヤマト科学株式会社製: BT300) に入れ、 $55^\circ C$, 90 rpm で振とうした (Photo. 1)。同条件のバイアル瓶を複数用意し、発酵開始後 1, 2, 4, 7, 11, 15 日後に取り出し各分析に供した。

2.3 バイオガスの分析

所定の日数経過後のバイアル瓶にシリンジを刺し、内圧によりシリンジの押し子が上昇、停止時の目盛りをバイオガス発生量とした。また、同バイアル瓶中のバイオガスをシリンジで 50 mL 引き抜き、このガス中の CH_4, H_2, N_2, CO_2 を Micro-GC (Agilent 製 490) で測定した。定量は個別に標準ガスによる多点検量線法により実施した。

2.4 発酵残渣の分析

pH に関しては、発酵残渣 10 mL を pH メーターを用いて計測した。また、T-VFA_s に関しては発酵残渣を遠心分離 (3000 rpm , 15 min) した上澄みを $0.45 \mu\text{m}$ のフィルターでろ過し、これを高速液体クロマトグラフ CDD-10AVP (島津製作所製) にて測定した。また、発酵前後における微生物叢の変化を調査するために、消化汚泥及び 15 日経過後の H_2 添加量を $0, 130$ および 390 mL/g-VS_m とした場合のメタン発酵残渣に関して次世代シーケンシング (NGS 解析) による分析を行った。対象遺伝子領域は、細菌および古細菌を対象とした 16S rRNA 遺伝子 V4-V5 領域 (PCR プライマー U515F-926R) とした。Extrap Soil DNA Kit Plus Ver.2 (日鉄環境) を用いて DNA を抽出し、MiSeq (Illumina) を用いて、 $2 \times 250 \text{ bp}$ の条件でシーケンシングを行い、 $25,000 \sim 32,000$ のリード数が得られた。その後、類似性の高い (相同性 97% 以上の) 配列データを 1 つのグループのクラスタとしてまとめた。各クラスタ配列の中で最も出現頻度の高い配列を

Table 1 Characteristics of the samples used

	pH	TS[g/L]	VS[g/L]	C[%-TS]	H[%-TS]	N[%-TS]	T-VFAs[mg/L]
消化汚泥	7.73	18.6	11.7	32.45	5.41	4.76	203
消化槽投入汚泥	5.83	33.3	27.5	43.50	7.02	5.96	403

代表 OTU (Operation Taxonomic Unit; 操作的分類単位) 配列とし、その各代表の OTU 配列について、Greengene 2⁶⁾ の 16S rRNA 遺伝子データベースに対する相同性検索を行い、系統分類を推定した。

3. 結果と考察

3.1 水素添加によるバイオガスの高品質化と VS 分解率の変化

まず、H₂ の添加によるバイオガス組成の変化について検討した。H₂ 添加量を 0 ~ 390 mL/g-VS_{in} に変化させ、発酵を 15 日間行った時の CH₄ 収率 (バイアルに投入した発酵原料中 VS : 1 g あたりの CH₄ 生成量) と CH₄ 濃度及び VS 分解率を Fig. 1 に示す。H₂ 添加量 0 mL/g-VS_{in} の時の CH₄ 収率は 170 mL/g-VS_{in} であり、CH₄ 濃度は 64% であった。H₂ 添加量 130 mL/g-VS_{in} の際、CH₄ 収率は 219 mL/g-VS_{in}、CH₄ 濃度 72% となり、H₂ 添加による、バイオガスの高品質化が確認された。しかしながら、H₂ 添加量を 260, 390 mL/g-VS_{in} と増やしていくにつれて CH₄ 濃度は 83%, 99% と向上したが、CH₄ 収率は 150, 20 mL/g-VS_{in} と減少した。

H₂ 添加量 0 mL/g-VS_{in} における VS 分解率は 73.3% であった。H₂ 添加量が増加するにつれて VS 分解率は減少していき、H₂ 添加量 390 mL/g-VS_{in} における VS 分解率は 25.7% となった。H₂ 添加量 130 mL/g-VS_{in} の条件においては H₂ を添加していない条件と比較して CH₄ 収率並びに CH₄ 濃度のいずれもが向上していたにも関わらず VS 分解率は 42.4% と低下していた。従って、H₂ の添加は反応式 (1) による CO₂ のメタン化は進行させるが、有機物の分解は阻害する可能性が考えられる。特に、過剰量の H₂ の添加は有機物の分解を著しく阻害し、CH₄ 収率並びに CH₄ 濃度の低下を引き起こすことが分かった。

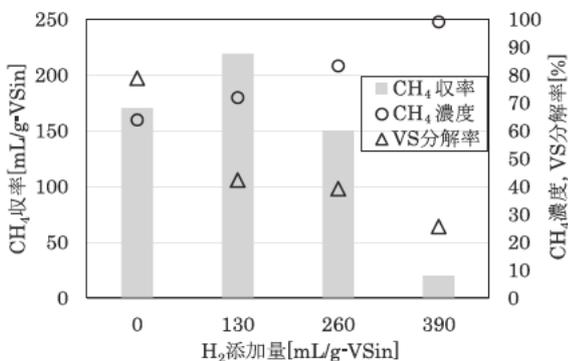


Fig. 1 Relation between CH₄ yield, CH₄ concentration, and VS decomposition rate by H₂ addition

3.2 バイオガスと有機酸の蓄積の経時変化

次に、時間経過によるバイオガス組成や消化汚泥の

性状の変化を検討した。発酵開始から発酵が終了したと考えられる 15 日後までの各ガス収率, pH, 各有機酸の蓄積量の経時変化の様子を、各 H₂ 添加量においてそれぞれ 1, 2, 4, 7, 11, 15 日後に回収したバイアル瓶中ガス、及び発酵残渣を分析した。

まず、Fig. 2 に H₂ 添加量 0 mL/g-VS_{in} の条件における各ガス量, pH, 各有機酸の蓄積量の経時変化を示す。発酵開始後 4 日までは CH₄, CO₂ とともに緩やかに増加し、4 日目以降においてバイオガスの発生が急激に進行した。その後はバイオガスの発生は低減し、15 日目における CH₄ 収率は 170 mL/g-VS_{in}、CO₂ 収率は 96 mL/g-VS_{in} となった。

また、発酵開始後酢酸の蓄積みられ、4 日目において 1.47 g/L となったが、その後分解が進み、発酵 15 日目における蓄積は認められなかった。また、プロピオン酸に関しては発酵 7 日目まで蓄積が進み、その後緩やかに減少したが、発酵 15 日目において 0.2 g/L まで低下した。

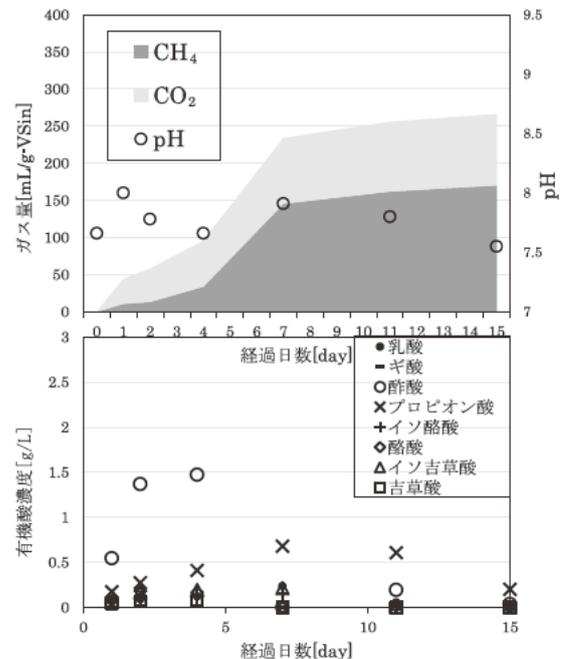


Fig. 2 Time trend of each gas, pH, and organic acid (H₂ addition amount : 0 mL/g-VS_{in})

次に、H₂ 添加量 130 mL/g-VS_{in} の条件における各ガス量, pH, 各有機酸の蓄積量の経時変化を Fig. 3 に示す。発酵開始後 2 日目において添加した H₂ の消費が確認された。また、4 から 7 日目にかけて CH₄, CO₂ 量が増加した。その後はバイオガスの発生は低減し、15 日目における CH₄ 収率は 219 mL/g-VS_{in}、CO₂ 収率は 85 mL/g-VS_{in} となった。また、発酵開始後酢酸の蓄積が進み、4 日目において 2.5 g/L となったが、その後分解が進み発酵 15 日目における蓄積は確認されなかった。プロピオン酸に関しては発酵 11 日目まで蓄積が進み、その後、発酵 15 日目において 0.2 g/L

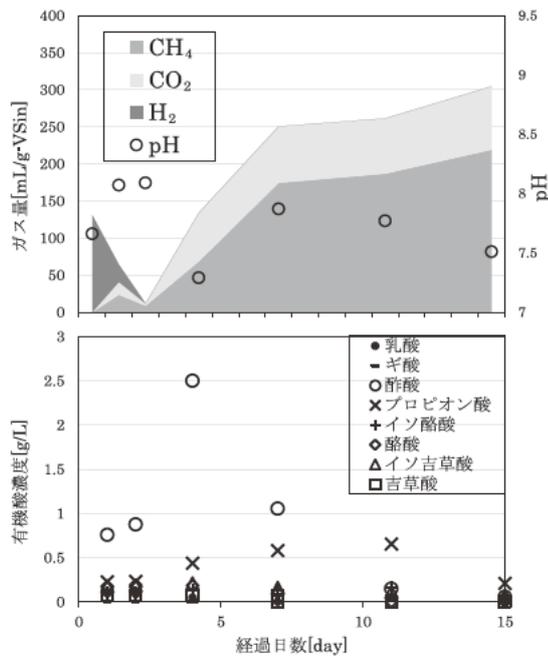


Fig. 3 Time trend of each gas, pH, and organic acid (H_2 addition amount : 130 mL/g- VS_{in})

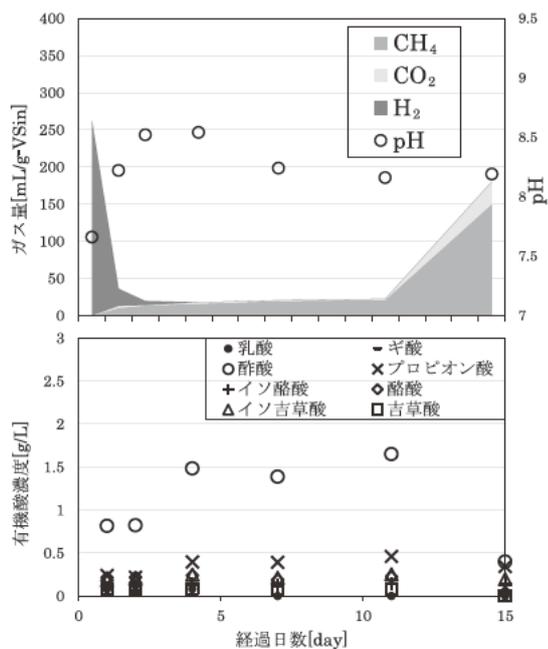


Fig. 4 Time trend of each gas, pH, and organic acid (H_2 addition amount : 260 mL/g- VS_{in})

まで低減した。これは水素を添加していない条件と同様の傾向となった。

次に、 H_2 添加量 260 mL/g- VS_{in} の条件における各ガス量、pH、各有機酸の蓄積量の経時変化を Fig. 4 に示す。発酵前に 260 mL/g- VS_{in} 投入していた H_2 は発酵開始後 1 日目においてそのほとんどが消費され、発酵開始後 4 日目において完全に消費された。また、 H_2 添加量 0, 130 mL/g- VS_{in} の条件の際と異なり、発酵開始後 11 日目にかけての CH_4 、 CO_2 量の発生が停滞していたが、15 日目において主に CH_4 を中心とし

たバイオガスの発生が確認され、 CH_4 収率は 150 mL/g- VS_{in} 、 CO_2 収率は 30 mL/g- VS_{in} となった。pH に関しては発酵開始後に上昇し、4 日目において 8.54 となった。その後日数経過と共に下降したが、最終日において 8.19 とメタン生成菌の適正 pH 範囲外となった。また、発酵開始後酢酸の蓄積が進み、11 日目において 1.65 g/L となったが、その後分解が進み発酵 15 日目において 0.4 g/L の蓄積が確認された。また、プロピオン酸、イソ酪酸、イソ吉草酸に関しては 15 日目まで蓄積が見られた。

最後に、 H_2 添加量 390 mL/g- VS_{in} の条件における各ガス量、pH、各有機酸の蓄積量の経時変化を Fig. 5 に示す。発酵前に 390 mL/g- VS_{in} 投入していた H_2 は発酵開始後 1 日目においてそのほとんどが消費され、発酵開始後 4 日目において完全に消費された。また、 H_2 添加量 0, 130 mL/g- VS_{in} の条件の際と異なり、発酵 15 日目までバイオガスの発生は CH_4 が低い状態で維持され、 CH_4 収率は 20 mL/g- VS_{in} 、 CO_2 収率は 0.2 mL/g- VS_{in} となった。本条件における pH も発酵開始後 2 日目にかけて急激に上昇し、発酵開始後 15 日目まで多少の増減がありつつもメタン生成菌の適正 pH 範囲外を維持し続けた。また、発酵開始後酢酸の蓄積が進み、11 日目において 1.52 g/L となり、15 日目まで蓄積が続いた。また、プロピオン酸、イソ酪酸、イソ吉草酸といったその他の有機酸関しても 15 日目まで蓄積が見られた。

H_2 添加量 260, 390 mL/g- VS_{in} においては発酵開始後に CO_2 の枯渇が確認された。これはメタン発酵により生成した CO_2 と添加した H_2 が式 (1) に基づいて

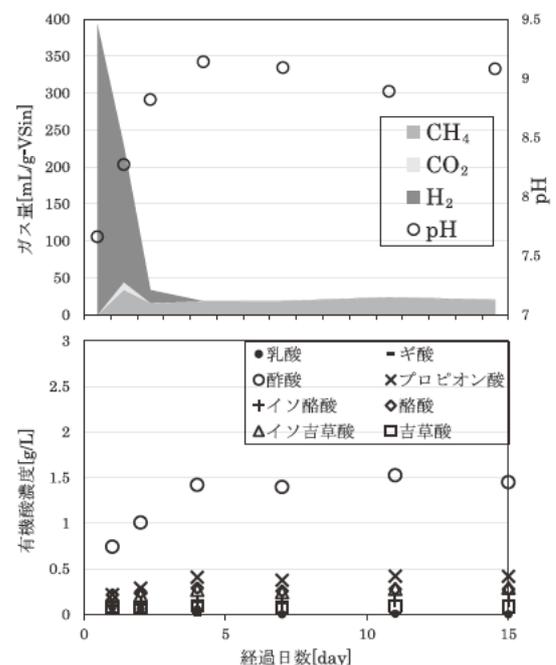


Fig. 5 Time trend of each gas, pH, and organic acid (H_2 addition amount : 390 mL/g- VS_{in})

Table 2 Number of 16SrRNA genes of methanogenic archaea in digested sludges in each H₂ addition.

メタン菌	16SrRNA 遺伝子数 (copies/mL)			
	消化汚泥	発酵 15 日後 (H ₂ : 0 mL/g-VS _m)	発酵 15 日後 (H ₂ : 130 mL/g-VS _m)	発酵 15 日後 (H ₂ : 390 mL/g-VS _m)
水素資化性	4.96E+07	3.93E+07	4.63E+07	1.06E+07
酢酸資化性	6.90E+06	2.99E+06	2.19E+06	2.20E+05
その他	1.60E+06	0.00E+00	1.68E+05	4.40E+05
合計	5.81E+07	4.23E+07	4.87E+07	1.12E+07

CH₄へと変換されたためと考えられる。このCO₂の枯渇によって発酵中に生じるアルカリ成分への緩衝能力が失われ、pHの上昇とそれに起因するメタン生成菌の発酵阻害が起こり、CH₄収率の低下に影響したと考えられる。H₂添加量の増加に従って発酵15日目におけるCH₄濃度が上昇したのはこういったCO₂の枯渇が影響している。そのため、H₂を添加していない条件と比較してCH₄収率とCH₄濃度の両方が向上しているH₂添加量130 mL/g-VS_m付近が今回の実験における最適H₂添加量となった。また、消費されたH₂はホモ酢酸生成反応による酢酸生成や、硫酸還元細菌によるH₂Sへの代謝などに関わっている可能性がある。

3.3 微生物叢の結果

消化汚泥と、発酵15日後におけるH₂添加量0, 130, 390 mL/g-VS_mの発酵残渣の微生物叢を対象にNGS解析した結果、メタン菌として、反応式(1)に従ってCH₄を生成する水素資化性のメタン菌 *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanothermobacter* の他に、酢酸を基質としてCH₄を生成する *Methanosarcina*, *Methanotrix* や、メタノールを基質としてCH₄を生成する *Methanosphaera*, *Methanomassiliicoccus* が確認された。

Table 2 に、特にメタン発酵に関与するとされている古細菌 (Archea) の属 (Genus) レベルの16SrRNA遺伝子数の解析結果を示す。

発酵15日経過後における水素資化性メタン菌の16SrRNA遺伝子数はH₂添加量0, 130, 390 mL/g-VS_mにおいてそれぞれ 3.93×10^7 , 4.63×10^7 , 1.06×10^7 copies/mLであった。今回の実験で最もCH₄収率が高かった条件であるH₂添加量130 mL/g-VS_mの条件における16SrRNA遺伝子数はH₂添加量0 mL/g-VS_mの条件と比較して1.18倍に増加しており、対して最もCH₄収率が低かった条件であるH₂添加量390 mL/g-VS_mの条件における16SrRNA遺伝子数はH₂添加量0 mL/g-VS_mの条件と比較して0.27倍にまで減少していた。この結果より、水素の最適量の添加によって水素資化性メタン菌の増殖が進むが、過剰量の水素添加は水素資化性メタン菌の減少に繋がりバイオガスの高品質化が阻害されることが分かった。

4. ま と め

本研究では、下水汚泥を基質としてH₂添加量を変化させたメタン発酵実験をバッチ式反応器において行い、以下の知見が得られた。

(1) H₂添加量を変化させてメタン発酵を行ったところ、H₂添加量の増加に伴って、VS分解率は減少したが、CH₄収率及びCH₄濃度の両方が向上するバイオガスの高品質化が起こるのはH₂添加量130 mL/g-VS_mの時であり、この時のCH₄収率は219 mL/g-VS_mであり、CH₄濃度は71.3%であった。これは水素を添加していない通常メタン発酵と比較して、CH₄収率が49 mL/g-VS_m増加し、CH₄濃度は8%増加した。H₂添加量260 mL/g-VS_m以上の条件においてはCH₄濃度が向上したものの、CH₄収率の低下が確認された。

(2) 水素を過剰添加した際にはCO₂の枯渇が起こり、液相の緩衝能力が下がりpHの上昇が起こった。これにより発酵阻害が生じた。

(3) 適正H₂添加量130 mL/g-VS_mにおいては水素を添加していない条件と比較して水素資化性メタン菌の16SrRNA遺伝子数が1.18倍に増加した。

謝 辞

下水汚泥の提供や採取にご協力いただいた自治体の担当者様に感謝致します。微生物叢解析結果の解釈については、京都大学の五味良太先生に助言いただきました。本研究はJSPS科研費20H02286基盤研究(B) Power to Gas由来の水素を用いた有機性廃棄物メタン発酵の高度化(研究代表者:京都大学大下和徹)の助成を受けた。

参 考 文 献

- 1) 齋藤安佐美, 加藤拓磨, 大坂典子: 膜分離法を用いたバイオガス精製システムの開発, 日本エネルギー学会大会要旨集, 第25回, pp.86-87 (2016)
- 2) 石川裕幸, 小松原充夫, 原卓也, 志知明: オフグリッドのCO₂排出ゼロ工場におけるP2G技術の経済性評価, Journal of Japan Society of Energy and Resources, Vol.42, Issue 2, pp.73-85 (2021)
- 3) Bernhard et al.: Biological hydrogen methanation - A

- review, *Bioresource Technology*, Vol.245, Part A, pp. 1220–1228 (2017)
- 4) Mulat et al.: Exogenous addition of H₂ for an in situ biogas upgrading through biological reduction of carbon dioxide into methane, *Waste Management*, Vol.68, pp. 146–156 (2017)
- 5) 新田大知, 大下和徹, 高岡昌輝, 日下部武敏, 高橋滋敏, 小中原亨, 水野志穂, 木村克輝, 羽深昭: バッチ式反応器による水素添加メタン発酵の検討, 第43回京都大学環境衛生工学研究会, pp. 100–102 (2021)
- 6) Desantis et al.: Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 72, No. 7, pp. 5069–5072 (2006)