

平成 27 年 4 月 20 日現在

機関番号：25406

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24656314

研究課題名(和文) 発現遺伝子の解析に基づく二段階水素発酵 - メタン発酵システムの構築

研究課題名(英文) Study on high performance hydrogen-methane fermentation process

研究代表者

西村 和之 (Kazuyuki, Nishimura)

県立広島大学・生命環境学部・教授

研究者番号：00261595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：バイオガス化の高度化を目的とした水素-メタン二段発酵プロセスの制御因子を解明するために、各々の発酵の制御因子の評価と各々の発酵に關与する微生物叢の分子生物学的解析を行い、ラボスケールの連続発酵プロセスを構築して運転状態を評価した。水素発酵の最適HRTは1日と判断され、水素発酵槽への基質の流入時にはpHを7.5付近に補正しておく方が良好な水素産生が維持でき、水素発酵槽とメタン発酵槽とでは10倍以上の容量差を持たせる必要であると結論された。リアルタイムPCRによりメタン発酵槽内のmcrA遺伝子量を定量することが可能であるが、mcrA遺伝子量だけでメタン産生活性を評価することは出来なかった。

研究成果の概要(英文)：In order to produce an efficient hydrogen-methane fermentation process, the behavior of microorganisms in a fermenter was examined by the activity of the gene. When hydrogen fermentation threw a raw material into a reactor, it was indicated that it's important to revise pH around 7.5. The hydrogen-methane fermented process needs one compared with the capacity of each reactor about 10 times. The determination method of mcrA gene created the primer set from the result of microflora or reference, and was examined by the real-time PCR method. The determination method of the amount of mcrA gene by the real-time PCR method has been established when the primer set of mcrA gene for Methanococcus obtained from reference was used. The expression level of mcrA gene in the continuous methane fermentation experiment system was quantified by real-time RT-PCR method which used the primer set of mcrA gene for Methanococcus.

研究分野：環境衛生工学

キーワード：水素発酵 メタン発酵 リアルタイムPCR mcrA gene

1. 研究開始当初の背景

循環型社会の形成に向けてバイオマスエネルギーの更なる活用が求められているが、その一環としてバイオガス回収プロセスの高効率化が追求されている。バイオガス化の高度化として、従来プロセスでは無視されてきた酸発酵段階を制御し、エネルギーガスである水素ガスの発生と回収を積極的に行うことにより総合的なエネルギー回収率の向上を目指すシステムが提案されている。しかしながら、メタンガスを最終生成物とするバイオガス回収プロセスでは、中間産物である水素の発生に関与する微生物種の増殖と水素生産を制御する事が難しく、水素-メタン二段発酵による高効率なバイオガス回収プロセスを確立には至っていない。

2. 研究の目的

本研究は、高効率なバイオガス回収プロセスの確立を目指し、水素-メタン二段発酵の各発酵段階におけるバイオガス産生に関与する微生物群の挙動を発現遺伝子レベルで解明し、水素-メタン二段発酵のプロセス制御因子を明らかとする事を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、水素-メタン二段階発酵プロセスの確立を目指し、回分実験による各々の発酵の制御因子の評価と各々の発酵に関与する微生物叢の分子生物学的解析を行い、ラボスケールの連続発酵プロセスを構築・運転することで二段階発酵プロセスの設計因子を評価した。

本研究では、グルコースを主成分とする人工基質、ドッグフードを主成分とする模擬生ごみ、ソルガム等のエネルギー作物の搾汁液や工業廃水の余剰汚泥等の様々な有機性廃棄物をバイオガス原料として回分または連続実験の試料とした。

回分実験は、50ml のバイアルを用い、水素発酵では 55 に設定した恒温槽内における振とう培養で最大 4 日間の培養を行った。一方、メタン発酵では、37 に設定した恒温槽内における振とう培養で最大 28 日間の培養を行った。

一方、連続実験では、水素発酵の HRT を 4 日、メタン発酵の HRT を 24 日とする連続発酵槽を構築し、温度条件は回分実験と同様として実験を行った。

評価項目は、CODCr、TS、VTS を定法により測定しバイオガス組成は TCG-GC で把握した。微生物叢の把握は、16SrRNA をターゲットとする PCR 法を用いたホモロジー解析を行い、水素発酵では、優占微生物の Hydrogenase をターゲットしメタン発酵では Methylcoenzyme M reductase をターゲットとするリアルタイム PCR 法による定量を試みた。

4. 研究成果

4.1 回分実験による水素発酵の制御因子

ドッグフードを主成分とする模擬生ごみを用いた水素発酵の回分実験を行った。発酵時間を変化させた結果、水素発酵では発酵時間が 1 日で最大の水素産生を示すことから、水素発酵プロセスの最適 HRT は 1 日と判断された。水素発酵は二相メタン発酵における酸発酵段階に相当することから、1 日の発酵により pH は 5 付近にまで低下するが、初期 pH は 7.5 の時が最大の水素産生を示したことから、水素発酵槽への基質の流入時には pH を中性付近に補正しておく方が良好な水素産生が維持できると判断された。また、水素産生に最適な有機物負荷は、比較的高めであり本研究では 150g/L において最も高い水素産生が認められた。

4.2 回分実験によるメタン発酵の制御因子

グルコースを主成分とする人工基質による回分実験では、37 におけるメタン発酵の HRT は 24 日が最適であると判断された。一方、工場排水の余剰汚泥を基質とした場合、HRT は 20 日が最適と判断されており、基質の分解性等によってメタン発酵の最適 HRT は変化すると考えられた。また、グルコースを主成分とするメタン発酵では、最適の CODCr 負荷量は 6.2~9.1g/L であるが、スイートソルガムの搾汁液を主基質とした場合、グルコース換算で 1.8g/L が、工場排水の余剰汚泥の場合 CODCr 負荷量として 9mg/L が最適であった。なお、工場排水の余剰汚泥を 630Wh で 1 分間分解処理すると 14mg/L の負荷量にまで増加した。これらのことから、メタン発酵における最適の有機物負荷量は、基質によって 9 倍程度変動する可能性があり、また、超音波処理等の可溶化処理によって負荷可能な有機物量が増加することから、処理対象のバイオマスに合わせたプロセス設計が重要であることが確認された。ここで示されたメタン発酵の最適の負荷量と 4.1 で示した水素発酵の最適の負荷量との間には 10~17 倍程度の差があることから、水素-メタン二段発酵プロセスでは、水素発酵槽とメタン発酵槽とでは 10 倍以上の容量差が必要であると結論された。

4.3 水素発酵における微生物叢の把握

水素発酵に関与する微生物を 27F と 1492R をプライマーとする真正細菌の 16SrRNA をターゲットとするホモロジー解析で把握した。活発な水素産生が行われている段階では、Clostridiales または Lactobacillales に属する微生物が優占していると判断された。このことから、水素を産生する微生物として知られているあああああ着目し、水素産生に関与すると考えられる Clostridiales の持つ Hydrogenase 遺伝子を 200 サンプルシーケンズ解析したところ Clostridium butyricum や Caldicellulosiruptor saccharolyticus が優占種であると判断された。これらの菌種

は水素産生が報告されていると同時に全ゲノムが公開されていることから、これらの持つ Hydrogenase 遺伝子からリアルタイム PCR用のプライマーを設計し遺伝子量の定量を試みた。しかしながら、何れの試料であっても、本研究で設計したプライマーでは Hydrogenase 遺伝子量を定量することは出来なかった。

4.4 メタン発酵における微生物叢の把握

メタン発酵に参与する微生物を 341F と 907R をプライマーとする古細菌の 16SrRNA をターゲットとするホモロジー解析で把握した。活発にメタンが産生している段階では、*Methanobacteriaceae* に属する *Methanobacteria* と *Methanomicrobia* の 2 種のメタン産生微生物が検出された。このことから、*Methanobacteriaceae* の methylcoenzyme M reductase の Subunit (mcrA) に対応するリアルタイム PCR 用プライマーを設計し mcrA 遺伝子量の定量を試みた。しかしながら、本研究で設計したプライマーでは mcrA 遺伝子量を定量することは出来なかった。一方、T.Nunoura らが発表している *Methanococcus* の mcrA 遺伝子量を定量するためのリアルタイム PCR 用プライマー-ME3MF と Me2r' を用いたところ、本研究で得られたメタンを産生している全ての試料中から mcrA 遺伝子量を定量することが可能であった。

このことから、グルコースを主成分とする 37 のメタン発酵の回分実験により、メタン産生量と微生物量に相当する VTS 量当たりの mcrA 遺伝子量との関係を求めると、図-1 に示すような結果が得られた。

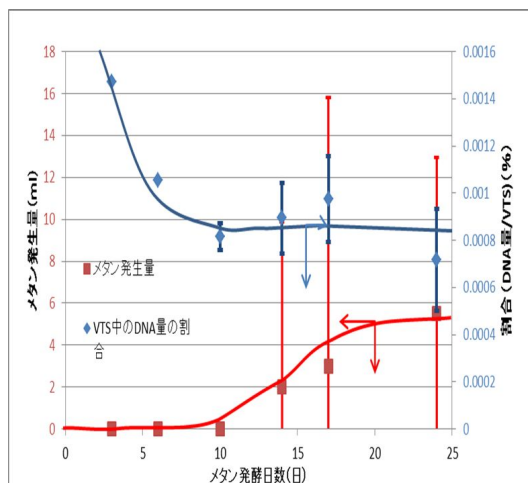


図-1 mcrA 遺伝子量とメタン産生量との関係

この図-1 に見る通り、VTS 中の mcrA 遺伝子量は、10 日目まで減少し、それ以降は一定割合で推移する一方、メタン産生量は mcrA 遺伝子が減少して一定となる以降に増加しており、メタン発酵に大きく関与すると考えられる mcrA 遺伝子量の増減だけではメタン産生量は推測できないことが示された。

4.5 連続実験による二段発酵の制御因子

図-2 に示すような水素-メタン二段階連続発酵装置を構築し連続実験を行った。投入バイオマスは工場排水の余業汚泥、またはその超音波破碎物とし、HRT は 24 日、CODCr とし 10g/L の負荷で連続処理を行った。なお、実験は、HRT の 1.5 にあたる 36 日間を 1 Run として実施した。

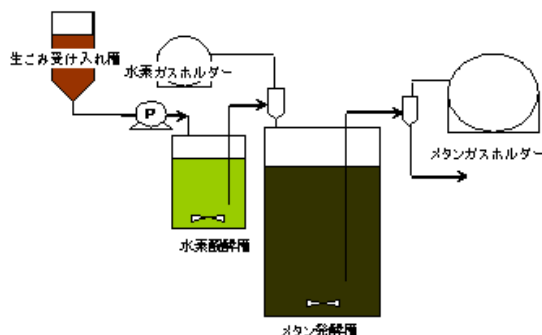


図-2 二段階連続発酵装置

連続実験の結果、水素の発生は何れの条件でも認められなかった。これは、図-3 に示す回分試験で確認された通り、初期 pH が低いと水素産生は低くなるが、ここで示した連続実験装置の水素発酵槽では pH 制御を行わず、pH 条件の低い状態が維持されたためと考えられた。従って、水素-メタン二段階発酵によりバイオガス化の効率化を図る場合は、水素発酵槽における pH 制御が水素産生には重要であると判断される。

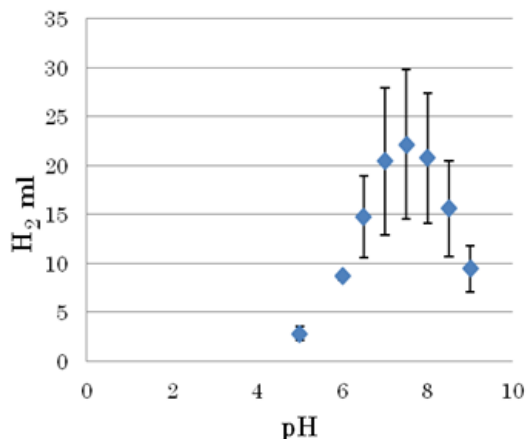


図-3 初期 pH と H₂ 産生量の関係

一方、後段のメタン発酵槽におけるメタン収率は、図-4 に示す通りに前段の水素産生の有無にかかわらず、良好な結果を示していた。

ここで示した Run- は、工場排水の余剰汚泥であり Run+ は、その超音波破碎物である。図に見る通り、先に示した 630Wh の 1 分間処理による僅かな可溶化処理であったも、メタン発酵によるメタン収率は 10 ~ 20% 程度の増加が認められた。

4.6 まとめ

バイオガス化の高度化を目的とした水素-メタン二段階発酵プロセスを想定し、プロセスの制御因子を解明するために、1) 回分実験

による各々の発酵の制御因子の評価と 2) 各々の発酵に關与する微生物叢の分子生物学的解析を行い、 3) ラボスケールの連続発酵プロセスを構築して運転状態を評価した。

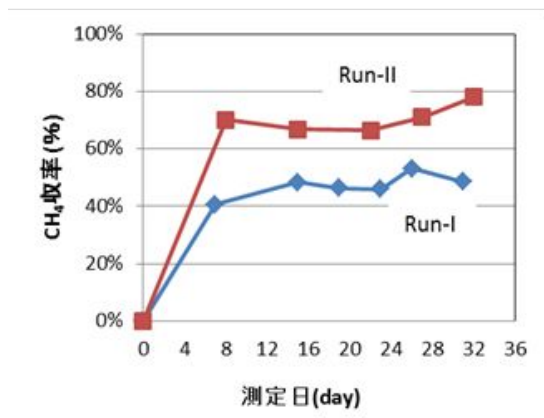


図-4 メタン発酵槽におけるメタン収率
本研究で得られた成果を下記に列挙する。

回分実験により水素発酵の最適 HRT は 1 日と判断され、水素発酵槽への基質の流入時には pH を 7.5 付近に補正しておく方が良好な水素産生が維持できると判断された。一方、メタン発酵の最適 CODCr 負荷量は、基質によって 9 倍程度の広がりを示し、超音波処理等の前処理によっても 1.5 倍程度に増加し得ることが示された。また、最適の負荷量等から考えて、水素発酵槽とメタン発酵槽とでは 10 倍以上の容量差を持たせる必要であると結論された。

分子生物学的手法を用いた評価では、水素発酵には *Clostridiales* が關与することが示唆されたものの水素産生に關与すると考えられる Hydrogenase 遺伝子の定量手法の確立は出来なかった。一方、メタン発酵では、*Methanobacteriaceae* に属するメタン生成微生物が優占している系であっても、*Methanococcus* の *mcrA* 遺伝子を把握するためのリアルタイム PCR 用プライマーによって *mcrA* 遺伝子量を定量することが可能であることが示された。しかしながら、単純に *mcrA* 遺伝子量だけではメタン産生活性を評価することは出来なかった。

本研究における回分試験の情報を利用して水素-メタン二段階連続発酵装置を構築することができた。構築したプロセスは、水素発酵槽の pH 制御を行わなかったことから水素産生は認められないものの、メタン発酵は十分なメタン収率を示していた。このことから、本研究で行った回分実験や分子生物学的手法を用いた評価を行うことにより実用的な水素-メタン二段階発酵プロセスを構築するための情報を取得することができると考えられる。

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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

倉本恵治, 松下修司, 竹林 賢, 霜崎 敏, 大橋晶良, 西村和之: 余剰汚泥の可溶性特性と嫌気 U A S B 処理への適用性評価、第 46 回日本水環境学会年会講演集、福岡、2013

尾末光, 西村和之, 崎田省吾: リアルタイム RT-PCR を用いたメタン発酵状態の評価、第 25 回 廃棄物資源循環学会研究発表会、2014 年 9 月

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

なし

6 . 研究組織

西村 和之 (KAZUYUKI NISHIMURA)
県立広島大学・生命環境学部・教授
研究者番号: 00261595