

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06271

研究課題名(和文)反芻胃の機能的構造を組み入れた草本系バイオマス用メタン発酵システムの開発

研究課題名(英文)Development of methane fermentation system for herbaceous biomass mimicking the structure and function of the rumen stomach

研究代表者

松本 明人 (MATSUMOTO, Akito)

信州大学・学術研究院工学系・准教授

研究者番号：30252068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では反芻胃の構造と機能をモデルに、反応槽内の攪拌速度や担体投入が草本系バイオマスのメタン発酵に及ぼす影響を検討した。研究の目的は反応槽内で固形性基質や微生物を不均一に分布させることや多様な微生物を高濃度に保持することで高効率発酵を実現することである。研究の結果、攪拌は反応槽内が均一になる完全混合より、汚泥やセルロースが底部に沈降する程度の攪拌(今回は10 rpm)がメタン発酵に有利であり、その攪拌条件では水理学的滞留時間8日でセルロース分解率79%以上になること、浮上性担体の投入はメタン生成には大きな影響を及ぼさないが、菌叢の多様性が増し、細菌数も増大することが判明した。

研究成果の概要(英文)：The effects of stirring speed and injection of the carrier on the methane fermentation of herbaceous biomass were investigated in this study, mimicking the structure and function of the rumen stomach. The goal of this study is constructing a system that makes non-uniform distribution of solid substrate and microorganisms, maintains high concentration of various microorganisms in the reactor and realizes efficient processing. As a result of the research, stirring (at 10 rpm, this case) to such an extent that sludge and cellulose settle down to the bottom was more advantageous for methane fermentation than complete mixing inside the reactor. Over 79% cellulose decomposition efficiency was obtained at stirring speed 10 rpm on hydraulic retention time 8 days. The injection of floating carriers did not significantly affect the methane production, but it increased diversity of the bacterial flora and the number of bacteria.

研究分野：土木環境システム

キーワード：メタン発酵 セルロース 草本系バイオマス 低速攪拌 担体投入 メタン生成 セルロース分解率
菌叢解析

1. 研究開始当初の背景

近年、地球温暖化や化石燃料の枯渇の対策として、バイオマスからのエネルギー回収が注目されている。その中で、食糧生産と競合がなく、収集が容易で、かつエネルギー資源としての未利用量が多いものに、農作物の非食用部や刈草といった草本系バイオマスがある。草本系バイオマスは、含水率が高く、生物分解が早いという特徴を有しており、メタン発酵によるエネルギー生産への活用が期待される。そこで草本系バイオマスからメタンを高効率に回収することが出来るメタン発酵システムを開発することが求められている。

2. 研究の目的

当研究室では草本系バイオマスの発酵システムとして、反芻胃の構造と機能を参考に、反応槽内の攪拌を適度に抑え、槽内に不均一構造を作り出し、投入されたバイオマスの分解状況に応じた滞留時間を作り出すことと、反応槽内に微生物付着用担体を投入することで多種多様な微生物を高濃度で保持し、効率的なメタン発酵を実現するシステムの構築を目標としている。本研究では、草本系バイオマスの主成分であるセルロースを基質に用い、まず反応槽内を攪拌する攪拌子の回転速度がセルロース分解およびメタン生成に及ぼす影響を明らかにすること、また排水処理装置で使用される微生物付着用担体の投入がセルロース分解およびメタン生成に及ぼす影響を明らかにすること、さらに担体をはじめ、槽内に生息する細菌数や菌叢を把握することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験装置および材料 反応槽には市販のスピナー・フラスコ 1L(セルスター WHEATON 社製)を用い、槽内温度を 35 とした低温インキュベーター内に設置した。攪拌はマグネチック・スターラー(バイオスタ

ー WHEATON 社製)でおこなった。また槽内の液相部容積は 1 L とした。なお反応槽には反応槽の底から 8 cm、5 cm、1.5 cm のところから試料が採取できるようサンプリングポートを設置した(底から水面までの距離は 9cm)。そしてそれぞれのポートから採取した試料を上層、中層、下層の試料とした。基質は注射器を用いて一日一回投入し、同時に反応槽内容液の引き抜きを行った。基質はろ紙粉末(セルロース、100~200 メッシュ、ADVANTEC 製)を主成分とし、その濃度は 10000 mg/L とした。また、N、P、Fe など無機塩とともに槽内の pH を中性付近に保つため、緩衝剤やアルカリ剤を基質へ添加した。種汚泥には、流域下水道終末処理場の中温嫌気性消化槽から採取した消化汚泥を用いた。

(2) 実験方法

攪拌子回転速度の影響 水理学的滞留時間(以下、HRT と略記)を 8 日とし、回転速度を 10 rpm、30 rpm、100 rpm に設定し、セルロース分解やメタン生成に及ぼす影響を調べた。

担体投入の効果 槽内の攪拌が完全混合に近い攪拌子回転速度 75rpm の反応槽と槽内の固形物が沈降する緩やかな攪拌をおこなう攪拌子回転速度 10rpm の反応槽に担体を投入した。投入した担体は市販の水処理用担体(体積: 1 cm³、ポリオレフィン製、真比重 0.99)であり、液相部体積の 5 % (50 mL) になるように投入し、セルロース分解やメタン生成に及ぼす影響を調べた。なお HRT は 8 日である。

HRT の影響 固形物が沈降する緩やかな攪拌をおこなう攪拌子回転速度 10 rpm で、担体を投入しない反応槽において、HRT を 8 日から 5 日に短縮し、セルロース分解やメタン生成に及ぼす影響を調べた。

(3) 分析項目 測定項目はガス生成量(水上

置換法)、ガス組成(TCD式ガスクロマトグラフ法)、pH(ガラス電極法)、残存糖濃度(フェノール硫酸法)、VSS(下水試験方法に準拠)、揮発性脂肪酸濃度(酢酸濃度、プロピオン酸濃度 FID式ガスクロマトグラフ法)である。また適宜、反応槽内容液や担体の総細菌数と総古細菌数を定量 PCR法で測定し、さらに細菌 16S rRNA 遺伝子 v3-v5 領域のアンプリコン配列を次世代シーケンシングにより解析し、菌叢を調査した(外部委託)。

4. 研究成果

(1) おもな成果

撈拌子回転速度の影響 メタン生成量は回転速度 100rpm のとき 230 mL/d であったのに対し、30 rpm では 240 mL/d とほぼ同じ生成量であった。これに対し、10 rpm では 320 mL/d と 4 割ほどメタン生成量の増加がみられた。つぎに VSS に関しては、100 rpm のとき、どの高さにおいてもおよそ 4100 mg/L であり、反応槽内は完全混合状態であった。さらに、30 rpm でも上層で 3900 mg/L、下層で 4100 mg/L と槽内はほぼ完全混合状態であった。これに対し、10 rpm では、上層と中層の VSS がおよそ 1200 mg/L であるのに対し、下層は 7900 mg/L と約 6.5 倍高く、菌体およびろ紙粉末が反応槽底部に沈降していることを示していた。つづいてセルロース分解率であるが、100 rpm では鉛直方向にほぼ差がなく約 74% であった。一方、30 rpm でも 76~82% とほぼ均一であった。これに対し 10 rpm では上層と中層で約 95% であったのに対し、下層では 68% であった。

以上のように、反応槽内がほぼ完全混合状態にあった撈拌子回転速度 100 rpm および 30 rpm より、固形物が沈降していた 10 rpm のほうがメタン生成量は 1.4 倍多かった。この理由として緩やかな撈拌ではセルロースも沈降し、滞留時間が長くなることでセルロースの分解が進み、メタン生成量は増大した

と考えられる。

最後に撈拌子回転速度 10 rpm の反応槽上・中層および下層から採取した試料、そして撈拌子回転速度 100 rpm の反応槽から採取した試料についての細菌数測定および菌叢解析の結果を示す。総細菌数はいずれの試料でも $1.4 \sim 1.6 \times 10^9$ copies/g 湿潤汚泥とほぼ同一であり、総古細菌数は撈拌子回転速度 10 rpm の反応槽上・中層で 5.7×10^7 copies/g 湿潤汚泥、下層で 3.6×10^7 copies/g 湿潤汚泥、そして撈拌子回転速度 100 rpm で採取した試料では 9.6×10^7 copies/g 湿潤汚泥であった。細菌数に関しては撈拌による大きな影響は見られなかった。一方、菌叢の構成をみると撈拌子回転速度 10 rpm の反応槽上・中層および下層から採取した試料の違いは少なく、撈拌子回転速度 100 rpm で採取した試料と比較すると 100rpm では *Acidobacteria*、*Bacteroidetes*、*Firmicutes* が高い割合を占める傾向がある一方、*Acinobacteria*、*Proteobacteria*、*Verrucomicrobia* の割合が低くなる傾向にあった。なお、いずれの汚泥でも *Spirochaetes* が群集の半分を占めていた。

担体投入の影響 メタン生成量は担体を投入した撈拌子回転速度 75rpm の反応槽(以下、担体投入 75 rpm と略記)で約 260 mL/d と 100 rpm で担体投入のない系での生成量の 230 mL/d と比べ、1 割ほどメタン生成量の増大がみられた。一方、回転速度 10 rpm では担体投入ありで 350 mL/d、投入なしは 360 mL/d と変化はみられなかった。つぎに VSS に関しては担体投入 75 rpm で、上層、中層、下層それぞれ 3000 mg/L、3200 mg/L、3700 mg/L と若干、濃度勾配がみられた。担体投入のない 30 rpm の場合でも、VSS は 4000 mg/L とほぼ均一であったことを考えると、担体投入が固形物の沈降に寄与したことがわかる。一方、担体を投入した撈拌子回転速度 10rpm の反応槽(以下、担体投入 10

rpm と略記)では上・中層でおよそ 1200 mg/L、下層で 3900 mg/L であり、担体投入しない場合と VSS の鉛直分布の傾向に違いは見られなかった。つづいてセルロース分解率は担体投入 75 rpm で、上層、中層、下層がそれぞれ 86 %、84 %、82 %と鉛直方向の差は小さかった。担体のない 100 rpm での分解率が約 75 %であったことと較べると、担体投入により分解率が向上した。一方、担体投入 10 rpm では上層、中層、下層でそれぞれ 97 %、98 %、85 %であった。鉛直方向のセルロース分解率の変化は担体投入のない 10 rpm の場合と同じ傾向であるが、担体投入すると、下層における VSS は低く、セルロース分解率はやや高くなった。

以上のことをまとめると、担体投入 75 rpm のような反応槽内の攪拌が強い運転では担体投入が固形物を沈降させる効果があり、メタン生成量も若干、増大した。一方、担体投入 10 rpm のような担体投入にかかわらず固形物の沈降がおこる運転ではメタン生成の増大は観察されなかったが、反応槽下層におけるセルロース分解率は高くなった。

最後に担体投入 10 rpm の反応槽の中層および下層から採取した試料、さらに担体に付着した汚泥の細菌数測定および菌叢解析の結果を示す。総細菌数は中層で 1.9×10^9 copies/g 湿潤汚泥、下層で 4.2×10^9 copies/g 湿潤汚泥、担体で 7.5×10^{10} copies/g 湿潤汚泥であった。総古細菌数は反応槽中層で 27.0×10^7 copies/g 湿潤汚泥、下層で 58.2×10^7 copies/g 湿潤汚泥、担体で 4.6×10^9 copies/g 湿潤汚泥であった。以上のように細菌数はいずれも下層で中層の約二倍になった。また担体の細菌数は非常に多かった。一方、菌叢の構成をみるといずれも *Firmicutes*、*Bacteroidetes*、*Spirochaetes* が多かったが、下層ではその三つはほぼ均等で、中層では *Firmicutes* が多かった。一方、担体では、突出して *Bacteroidetes* が多かった。以上の

ように担体投入は菌叢に影響を及ぼしていた。

HRTの影響 メタン生成量は HRT8 日での 360 mL/d に対し、5 日では 440 mL/d と 2 割ほどメタン生成量の増大がみられたが、有機物負荷の増大 (1.6 倍) ほど大きくなかった。つぎに VSS は HRT5 日で定常状態に達せず、運転終了時までの 5 点の平均値として上層、中層、下層がそれぞれ 1800 mg/L、1800 mg/L、11800 mg/L となった。これらの値は HRT8 日での上層、中層、下層の定常値である 1100 mg/L、1200 mg/L、6500 mg/L と較べると大幅に増大した。つづいてセルロース分解率についても HRT5 日では定常状態に達せず、運転終了時までの 5 点の平均値として上層、中層、下層がそれぞれ 91 %、92 %、39 %であった。HRT8 日の上層、中層、下層での定常値 97 %、98 %、79 %と較べると下層で大きく低下した。

以上のことをまとめると、担体を投入しない攪拌子回転速度 10 rpm の装置において HRT8 日を 5 日に短縮したところ、反応槽下層を中心に VSS が増大し、セルロース分解率は低下し続け、定常状態に達しなかった。このことから、HRT5 日、セルロース容積負荷 $2 \text{ kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ は過負荷と判断した。一方、HRT8 日、セルロース容積負荷 $1.25 \text{ kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ では良好な運転が可能であった。

最後に HRT5 日の反応槽中層および下層から採取した試料についての細菌数測定および菌叢解析の結果を示す。総細菌数は中層・下層に関わらず、両試料で 1.8×10^9 copies/g 湿潤汚泥であったが、総古細菌数は反応槽中層で 8.0×10^7 copies/g 湿潤汚泥、下層で 11.8×10^7 copies/g 湿潤汚泥であった。一方、菌叢の構成をみると中層と下層に違いはなく、*Firmicutes*、*Bacteroidetes*、*Spirochaetes* が多かった。

(2) 得られた成果の国内外における位置づ

けとインパクト 従来の研究では、反応槽内は十分に攪拌することが常識であり、あえて攪拌を抑制する方向の検討はなされていなかった。そこでセルロースのメタン発酵では反応槽内を完全混合するより、汚泥やセルロースが底部に沈降する程度の攪拌（今回は10rpm）のほうがメタン発酵に有利であるという今回の結論は新規性がある上、草本系バイオマスをはじめ固形性有機物のメタン発酵効率化にとって重要な知見と考えられる。さらに良好な攪拌強度として、定性的であるが汚泥やセルロースが底部に沈降する程度の攪拌と、明確な基準を示せたことも有用である。

(3) 今後の展望 実際の草本系バイオマスを用いた実験は提案プロセスの実用化のために実施が不可欠である。そのため、企業との共同研究を模索する。また効率化のメカニズム（固形物滞留時間の影響など）を解明するため、でんぷんのような溶存性有機物を用いた緩速攪拌のメタン発酵実験を早急に実施する。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計1件)

所雄貴、高上洋輔、松本明人、セルロースのメタン発酵における攪拌速度の影響、平成 28 年度土木学会中部支部研究発表会、2017 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 明人 (MATSUMOTO, Akito)
信州大学・学術研究院工学系・准教授
研究者番号：30252068