

令和元年6月13日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05003

研究課題名(和文)メタン発酵の中間生成物情報を基にした異常検知と微生物電池を利用する発酵制御

研究課題名(英文)Control and anomaly detection algorithm for methane fermentation by using information of reaction intermediate and microbial fuel cell

研究代表者

東城 清秀 (TOJO, SEISHU)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40155495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：メタン発酵の発酵状態を適確に把握するため、中間生成物に着目して、その情報抽出の手法として3次元蛍光分析法を取り上げた。ピーク蛍光の波長帯と形状よりチロシン、トリプトファン、フミン酸に由来する物質が発酵状況を把握する上で有効な指標と考えられた。微生物電池を用いて発酵液内のプロピオン酸を消費し、併せて発電することは可能であることが実証された。アノードのバイオフィーム培養法を工夫することで、発電効率が高まることが分かった。有機酸の蓄積によるpH低下は、pH緩衝能の高い原料の組合せでも調節できることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来のメタン発酵の状態把握は、発酵液のpHや生成ガスの成分割合等で行われてきた。小型のプラントでは、有機酸の蓄積が進んでpHが低下し、発酵が酸敗に至ることがあった。このような変化をより事前に把握するため、メタン発酵過程の中間生成物に着目した。3次元蛍光分光分析を用いることで、実際にpHが低下するよりも早い時期に、pHの推移に影響を及ぼす物質の動態を観測できることが示された。

また、微生物電池は発酵過程で蓄積するプロピオン酸等を消費して発電することが実証され、メタン発酵の制御に微生物電池を組み入れた新たな発酵制御法の可能性が見いだされた。

研究成果の概要(英文)：Three dimensional fluorescence analysis was employed to extract the information of intermediate product in methane fermentation process for recognizing fermentation state serially. Tyrosine, tryptophan and humic acid oriented component obtained from the information of wave length and size of the peak fluorescence are reasonable indicators for the above mentioned purpose. Microbial fuel cell demonstrated to perform consuming propionate in fermentation solution and generating electricity. An appropriate culturing method for anode biofilm showed high Coulomb efficiency of microbial fuel cell. Reduction of pH of fermentation solution caused with the accumulation of organic acids was controlled by using high buffer capacity of combined raw materials.

研究分野：農業工学

キーワード：メタン発酵 バイオガス生産 中間生成物 pH 微生物電池 バイオフィーム 有機酸 pH緩衝能

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

食料由来の廃棄物は年間 1713 万トン (2010 年度) で、食用に仕向けられる農産物の 2 割に及ぶ。食品リサイクル法の施行や再生可能エネルギーの固定買取価格制度の推進によって、食料由来の廃棄物を原料とするメタン発酵による廃棄物の再利用やガス発電が計画されている。バイオガスプラントはメタン発酵技術で有機物からメタンガスを生産し、このガスを燃焼させて発電や熱利用をする施設であるが、施設構造が比較的単純で、低コストであることから、小規模施設での運用が期待されている。食品廃棄物を原料とする小規模バイオガスプラントでは、原料の影響を受けやすく、発酵が不調となって、バイオガスが産生されない事態に陥ることがある。投入された原料は、まず酸生成菌によって分解されて低分子の物質になり、その後の過程で有機酸が生成される。この有機酸をメタン生成菌が消費することで、メタンを 60% 程含有するバイオガスが産生される。しかし、生成される有機酸がメタン菌の消費量を上回ると、有機酸が蓄積して pH が低下し、いわゆる酸敗状態となってメタン菌の活性が失われてしまう。問題は、30 日程度でゆっくり進行するメタン発酵プロセスを現場では明確に把握できずに、酸敗状態に至ることが多い。

### 2. 研究の目的

本研究では、原料の影響を受けやすい小規模バイオガスプラントを対象にして、発酵の状態を高精度でモニタリングし、酸敗となる前に異常を検知あるいは予測して酸敗を回避するとともに、蓄積した有機酸を適正に消費させることで正常な発酵状態に制御する手法を開発することを目的とした。具体的には、(a) バイオガス生成の発酵過程を中間生成物に着目して状態を把握し、発酵の異常事態を識別する手法を開発すること、(b) 微生物電池を利用して蓄積した有機酸を消費し、発生電子を回収・移動させることで発酵過程を適正範囲に制御する手法の確立を目指す。

(a) バイオガスの生産では、原料が酸生成菌のはたらきで低分子の単糖類、アミノ酸、脂肪酸等に分解される。3次元蛍光分光計測によれば、複数のアミノ酸や NADH の増減動向を逐次把握することができる。本研究では、発酵過程におけるバイオガス生成量や pH と複数のアミノ酸の変化データを収集して、その関係を明らかにするとともに、発酵が酸敗に向かっているか否かを判定させる手法を検討する。

(b) 微生物電池は微生物が有機酸を消費するときに発生する電子を電極で回収して、発電する。本研究では、アノードの微生物が多様な有機酸や糖を消費できることに着目して、基質の消費と発生電力の特性を明らかにして、発酵の制御に利用することを検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) メタン発酵における中間生成物の情報抽出に関する検討

小型発酵槽を用いて、回分式中温メタン発酵 (発酵温度 37 ) を行い、経時的に発酵液を採取して蛍光分光光度計 (Shimadzu, RF-6000) で分析した。種汚泥として、給食残渣を原料とする小規模バイオガスプラントから採取した消化液 2L を使用した。原料として、デンブ 1g を栄養培地 5mL とともに投入した。蛍光分析は、励起波長を 200 ~ 600nm (10nm 間隔)、蛍光波長を 200 ~ 600nm (2nm 間隔) として、3次元計測を行った。

15L 容の発酵槽を用いて、連続式中温メタン発酵を行い、原料の負荷量を変えて、生成される中間生成物と発生バイオガス量について調査した。種汚泥は の実験と同じものを 9L 使用した。原料として、1 ~ 14 日はデンブ 1.0g/d (D1.0)、15 ~ 29 日はデンブ 1.5g/d (D1.5)、30 ~ 44 日は米糠 1.5g/d (K1.0) を、栄養培地 300mL/d とともに投入した。発酵液の中間生成物の同定には、3次元蛍光スペクトルから PARAFAC (Parallel Factor Analysis) 法を採用して、ピーク成分を検出した。

#### (2) 微生物電池を用いた発酵液内の有機酸消費と生成制御に関する検討

微生物電池は多様な有機酸を基質として発電できることから、発酵液内に蓄積する有機酸の消費特性と発電特性について検討した。試作した微生物電池はエアカソード型の 1 槽式 (容積 34mL) とし、カーボンブラシと活性炭をアノード電極として使用した。エアカソードはカーボンクロスに Pt 触媒と PTFE でコーティングして作成し、表面積を 7.8cm<sup>2</sup> とした。バイオフィーム形成のため、種汚泥として東京農工大学附属農場の水田から採取した泥土を供試した。本実験では、バイオフィームの形成法に着目し、植菌から 3 日間は外部抵抗を切断して培養する TermI とし、その後の 9 日間は 100 の外部抵抗を接続して培養する TermII とし、最後の 6 日間は負荷を与える TermIII とした。TermI ~ II においてプロピオン酸濃度を徐々に上昇させた培養液 (1.2mM/day) で培養する実験区 (A 培養) と一定濃度 (12mM) の培養液で培養する実験区 (B 培養) を設けて、バイオフィームの培養形成法がプロピオン酸の消費と発電に及ぼす影響を調査した。TermIII における負荷量は 12mM とした。

バイオマスの最小単位として一般にグルコースが基質として使われている。本研究では五炭糖のキシロースを基質とする微生物電池の基質消費特性と発電特性に関して検討した。特に、バイオフィームを形成する種汚泥を水田泥土、メタン発酵消化液、下水処理場返送汚泥から採取して培養し、種菌源が基質消費と発電に及ぼす影響を調べた。基質や酸の定量には有機酸用 HPLC と還元糖用 HPLC を使用した。発電特性は外部抵抗を 40Ω ~ 1000Ω まで数段階に変え

て、起電力を調査した。起電力の変化はデータロガー（GL240）に記録した。

### (3) 廃棄バイオマスの緩衝作用を利用する発酵安定化の検証

有機酸蓄積による異常発酵を抑制して、安定したバイオガス生産を行うため、卵殻の緩衝作用を利用した発酵の安定化について検討した。メタン発酵の前段階過程と位置づけられる水素発酵を実施して効果を検証した。100mLの発酵液に、0.5mm内に粉碎した卵殻（EP、主成分は炭酸カルシウム）と800の高温で処理した卵殻（CEP、主成分は酸化カルシウム）を1, 3, 5 g/L添加して、発酵液のpH安定性と水素生成量を調べ、バイオガス生産における緩衝効果を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) メタン発酵における中間生成物の情報抽出

メタン発酵消化液のEEMから分離された成分を図1に示す。各成分はピークの波長帯と形状より、1はチロシン、2はトリプトファン、3はフミン酸に由来すると考えられる。また、メタン発酵消化液のEEMで確認されたアミノ酸由来の蛍光ピークは2種類の成分で構成されている可能性が示唆された。主成分分析の各成分得点より、アミノ酸由来の蛍光はチロシン由来の蛍光の寄与が大きいことが示唆された。

負荷量と基質種類を変えた場合に、アミノ酸由来の蛍光は、期間ごとに異なる変化を示した（図2）。一方、フルボ酸、フミン酸系物質由来の蛍光は、実験開始時が最大、19日後まで減少傾向、以後おおむね一定となった。また、第1主成分による分類では条件の特徴を明確に把握することはできなかった。図3の主成分分析によって、基質負荷条件に応じた蛍光物質の変化が示された。第2主成分はフルボ酸、フミン酸系物質に由来する蛍光の寄与が大きく、D1.0が特徴づけられた。この要因の一つとして、フルボ酸、フミン酸系物質に由来する蛍光の強度が実験開始時に最大で、19日後まで減少傾向を示し、以後、おおむね一定であったことが挙げられる。これは、実験開始時に蓄積していた物質が消化液の採取と栄養培地の投入によって希釈され、以後、生成と希釈の速度が平衡に達したためであると考えられる。D1.5は、トリプトファン系物質に由来する蛍光の寄与が大きくなったことで特徴づけられた。第3主成分はチロシン系物質に由来する蛍光の寄与が大きく、K1.5が特徴づけられた。D1.5とK1.5は、タンパク質が分解されたことで消化液中に溶脱したチロシンとトリプトファンの量と比によってEEMが特徴づけられたと考えられる。これにより、負荷変動に伴う異常発酵プロセスへの見通しが得られた。

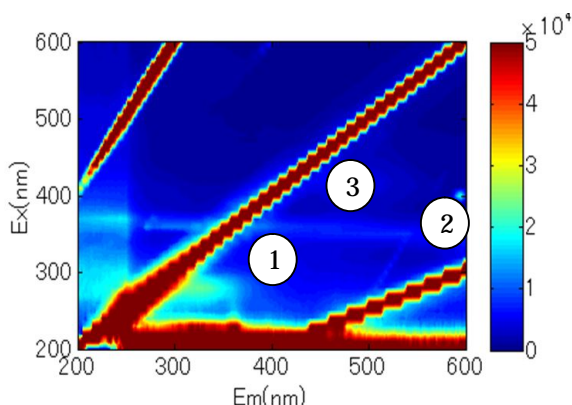


図1：メタン発酵消化液の3次元蛍光分析

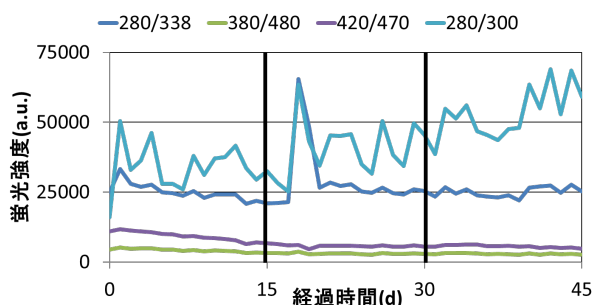


図2：負荷変化と特定物質蛍光強度の推移

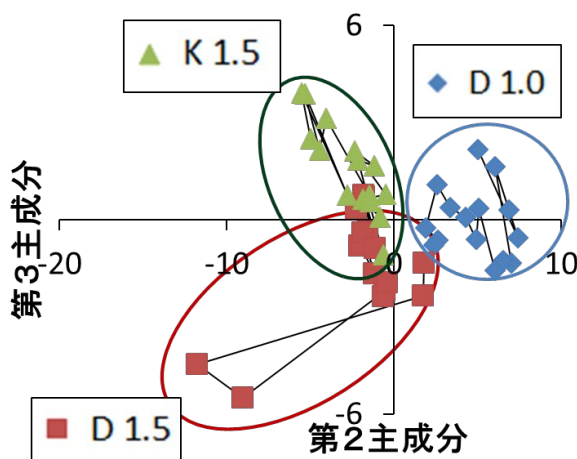


図3：負荷変化と蛍光物質主成分得点の関係

### (2) 微生物電池を用いた発酵液内の有機酸消費と発電特性

投入したプロピオン酸が微生物電池で消費されて残存あるいは生じた有機酸の濃度を図4に示す。プロピオン酸濃度を徐々に高めて培養したA培養の微生物電池では、TermIIの投入開始から2日間のみプロピオン酸がわずかに残存したが、それ以外は検出されなかった。一方で、一定濃度で培養したB培養の微生物電池では、基質として投入したプロピオン酸が

0.50–1.0mM 残存した。その後 TermIII ではプロピオン酸の濃度は 0.3mM 以下に減少した。プロピオン酸の消費率では、A 培養が 98.2%で、B 培養が 98.5%と同じ消費率であった。また、発電については、クーロン効率で比較すると A 培養が 27.9%で、B 培養が 40.1%となり、大きな差が生じた。この培養法の違いが形成されたバイオフィルムの微生物群集構造に影響を及ぼしており、結果として基質の消費特性と発電特性に差異を生じさせているものと考えられた。

バイオフィルムの種菌源が基質の消費に及ぼす影響については、下水返送汚泥を種菌源とする微生物電池において優れた五炭糖基質の消費特性が観察された。

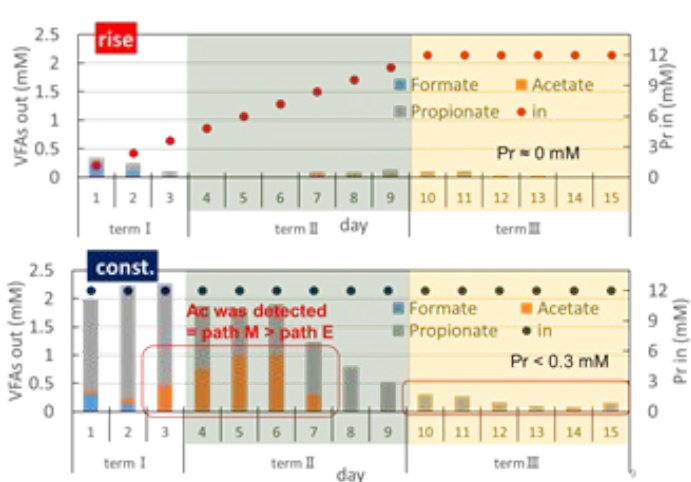


図 4：培養法の違いが有機酸の消費に及ぼす影響

### (3) 廃棄バイオマスの緩衝作用を利用する発酵安定化

pH バッファとして、粉碎卵殻(主として炭酸カルシウム) 1g/L を添加した試験区 (EP1) で、安定した pH が得られ、水素ガス生成量が最大となった。焼成した卵殻(主として、酸化カルシウム) の試験区は、pH を高く維持できたものの、生成された水素ガス量は粉碎卵殻を下回った。このことから、原料によっては、廃棄バイオマスを組み合わせ、pH 制御を行うことが有効と考えられた。

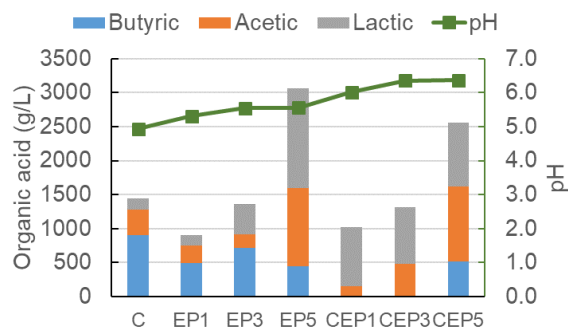


図 5：廃棄卵殻の pH 緩衝作用の影響

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Choiron M, Tojo S, Chosa T (2019) Natural Buffer Effect on Biohydrogen Production Using Hot Compressed Water Pretreatment. Proceedings of XXXVIII CIOSTA & CIGR V International Conference, Rodos, Greece in 24-26 June, 2019. 査読無.

Kuribayashi M, Tojo S, Chosa T, Murayama T, Sasaki K, Kotaka H (2017) Developing a New Technology for the Two Phase Methane Fermentation Sludge Recirculation Process. Chemical Engineering Transactions, 58: 475-480. 査読有. DOI:10.3303/CET1758080.

Ueda M, Ichioka T, Chosa T, Tojo S (2016) Electricity Generation Characteristics of Microbial Fuel Cell Using Substrate of Volatile Fatty Acids from Hydrogen Fermentation. Proceedings of 8th International Symposium on Machinery and Mechatronics for Agricultural and Biosystems Engineering (ISMAB 2016), Niigata, Japan. IV-13. 査読無.

[学会発表](計 2 件)

Ueda M, Chosa T, Tojo S (2018) Consumption characteristics of propionate in anaerobic digestate using microbial fuel cells. XIX World Congress of the International Commission of Agriculture and Biosystems Engineering (CIGR), April 22-25, 2018, Antalya, Turkey.

野村 環、東城清秀、帖佐 直 (2017) 光合成細菌を用いた水素生産における基質濃度の影響. 第 76 回農業食料工学会年次大会. 2017 年 9 月 8 日. 東京農業大学世田谷キャンパス.

[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〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：帖佐 直

ローマ字氏名：(CHOSA Tadashi)

所属研究機関名：東京農工大学

部局名：大学院農学研究院

職名：准教授

研究者番号（8桁）：10355597

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：小林 薫

ローマ字氏名：(KOBAYASHI Kaoru)

研究協力者氏名：上田 恵

ローマ字氏名：(UEDA Megumi)

研究協力者氏名：栗林 茉柚

ローマ字氏名：(KURIBAYASHI Mayu)

研究協力者氏名：ホイロン ミフタフル

ローマ字氏名：(CHOIRON Miftahul)

研究協力者氏名：劉 一特

ローマ字氏名：(LIU Yitec)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。