

機関番号：82111

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2010

課題番号：19780207

研究課題名 (和文) 内在性水素生産複合微生物系による牛糞バイオマスからの水素エネルギー一回収法の研究

研究課題名 (英文) Recovery of Hydrogen energy from cow waste by anaerobic microflora naturally present in the waste

研究代表者

横山 浩 (YOKOYAMA HIROSHI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・資源化システム研究チーム・主任研究員

研究者番号：40391370

研究成果の概要 (和文)：種菌を添加せずに牛糞内在性の水素生産細菌を活用した乾式牛糞水素発酵では最適発酵温度が60度であることを明らかにして、その発酵温度において700 mL-水素/kg-牛糞の水素が発生した。また、牛糞から集積された高度好熱嫌気性の水素生産細菌群 (最適増殖温度>65度) は連続培養系において、非常に高い水素発生収率 (3.32 mol/mol-グルコース) を示すことが判明し、特異な代謝特性を持つことが分った。

研究成果の概要 (英文)：Hydrogen (700 mL/kg-cow dung) was produced by dry fermentation of cow dung at a optimum temperature of 60°C using hydrogen-producing bacteria, naturally present in the dung. Extremely thermophilic microflora, enriched from cow dung, showed a high hydrogen yield of 3.32 mol/mol-glucose at the HRT of 3 days in continuous culture. The microflora was suggested to possess unusual fermentative properties, as compared with moderately thermophilic and mesophilic bacteria.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	700,000	0	700,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
総計	3,300,000	780,000	4,080,000

研究分野：微生物学、生化学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、畜産・草地学

キーワード：水素、バイオマス、嫌気性好熱細菌、牛糞

1. 研究開始当初の背景

地球温暖化に対する懸念から新しいエネルギー生産技術として、微生物を利用した水素発酵が注目されている。水素は、燃料電池の燃料として利用した場合、水のみを発生するクリーンなエネルギー源である。

2. 研究の目的

牛糞は、発酵原料としての有機物を含有している。更に、牛糞には多種多様な水素生産

細菌群が元々存在している。本課題は、その内在性水素生産細菌群に初めて着目・利用して、新しい水素発酵法の検討と菌叢解析を含む水素生産メカニズム解明が目的である。

3. 研究の方法

(1) 牛糞に水などを一切添加せず低い水分状態でそのまま発酵させる、所謂、乾式発酵と呼ばれている方式での水素発酵を検討した。200gの無希釈牛糞(TS=15%)を625mLのガ

ラス容器に投入して、ガス層を窒素に置換・密閉後、37°Cから75°Cで嫌気培養して水素発生量を定量した。また、その発酵に関連した菌叢変移を解析するために、60°C発酵後と発酵前の牛糞からDNAを抽出して一般細菌用のプライマー(GC-357F, 517R)を用いて16S遺伝子のV3領域をPCR増幅した。そのPCR産物をDGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)法で解析した。

(2) 至適増殖温度を65°C以上に持つ高度好熱細菌の発酵特性は殆ど研究されていない。そこで、その細菌の水素発生代謝特性を詳細に検討するために、牛糞から75°Cで嫌氣的連続バッチ培養で集積された高度好細菌群を人工培地での連続培養系で解析した。グルコース(5 g/L)を基質とした培地を用いてその細菌群を嫌氣的に75°Cで連続培養した。培地の滞留時間(HRT)を順次2, 1, 0.67, 3日と変化させ、発酵パターンの変化を測定した。

4. 研究成果

(1) 乾式牛糞水素発酵では、至適温度は60°Cであることが分かった(図1)。その60°C乾式発酵の糞から水溶性副産物を抽出し、それをガスクロで解析した結果、60°C牛糞乾式発酵の水溶性副産物として主に酢酸と酪酸が生成されていた(図2)。DGGE解析の結果、水素生産菌である*Clostridium cellulosi*に類似した細菌(図3、バンド2)が検出され、水素生産に関与する可能性が示唆された。*Clostridium cellulosi*は、その名の様にセルロースを分解して生育する嫌気性好熱細菌である。従って、その検出された細菌は、牛糞中の繊維分を分解して水素を発生させていると考えられる。また、本乾式発酵は繊維分解の結果、固形分が低減され牛糞処理にも貢献できると期待される。

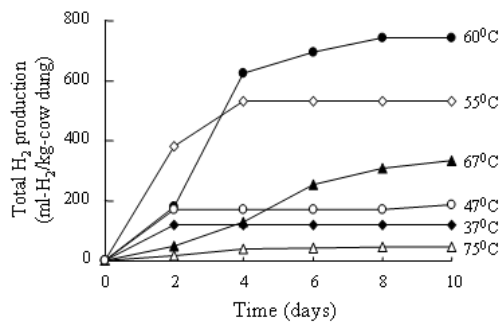


図1 様々な温度での乾式牛糞水素発酵における水素発生の経時変化

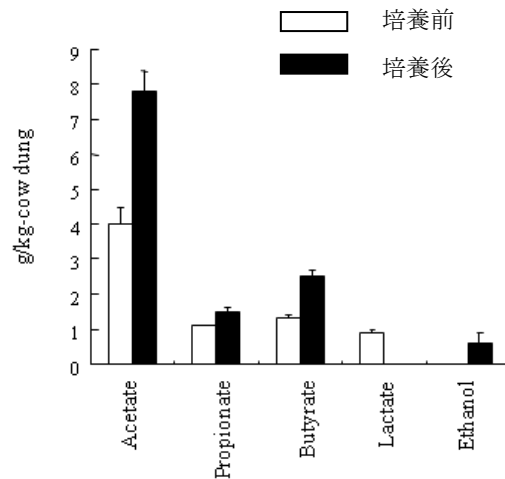


図2 60度での乾式水素発酵の副産物の分布

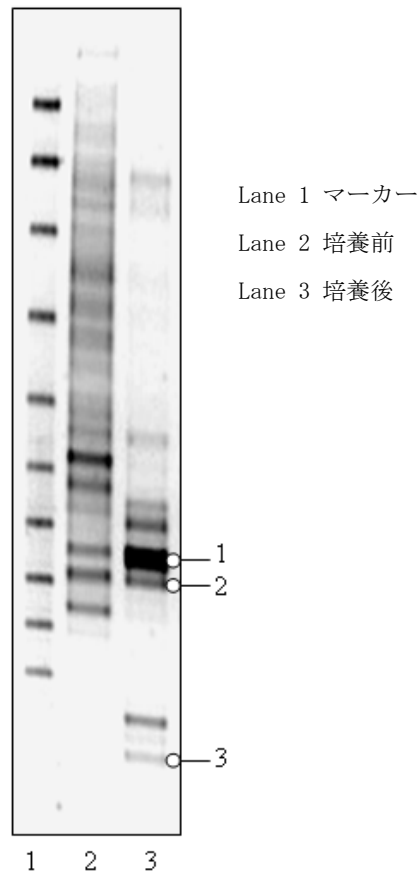


図3 DGGE解析像

(2) 牛糞から集積された高度好熱嫌気性細菌の完全混合槽型のバイオリアクター（培地 2L, 気相 1L）（図 4）を用いた連続培養における実験では、全ての HRT で水素発生が観られ（図 5）、主要な可溶性代謝産物は酢酸であった。菌体あたりの水素発生量は 1.96-4.15 L-H₂/g-VSS/d であった（表 1）。これは、中温菌や中度好熱細菌の一般的な値である 0.4-5.0 L-H₂/g-VSS/d と比較して同程度である。リアクター体積当りの水素発生量は 0.72-1.22 L-H₂/L/d であり、一般的な値の 3.0-20 L-H₂/L/d と比較して低い。これは、集積された高度好熱細菌群の菌体密度が低いことを意味している。HRT 3 d で最大水素収率、3.32 mol-H₂/mol-glucose が得られた（表 1）。これは、中温菌や中度好熱細菌の一般的な値である 0.8-2.5mol-H₂/mol-glucose と比較して非常に高い。集積された高度好熱細菌群はグルコースから菌体への変換率が低いために、結果としてグルコースから代謝産物への変換率が高まり、高い収率を示すと考えられる。これらの発酵特性は、高度好熱細菌独特の特徴と考えられた。これらの成果が認められ国際誌に 3 報の論文を發表することができた。



図 4 使用した完全混合型バイオリアクター

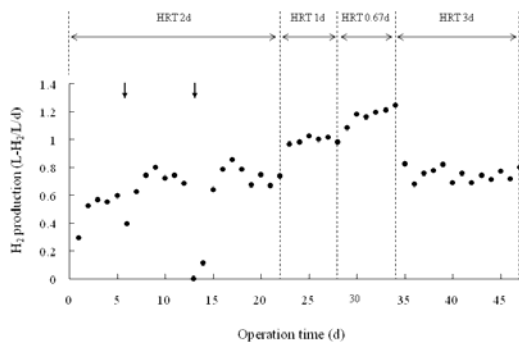


図 5 4つのHRTで高度好熱細菌群を連続培養した場合の時間経過に伴う水素発生量変化

表 1 水素発生特性

滞留時間 (d)	水素生産速度 (L/L/d)	菌体 (vss) 生産速度 (g/L/d)	水素生産速度 (per vss) (L/g-VSS/d)	水素収率 (mol/mol)
0.67	1.22	0.44	4.15	2.63
1	1	0.3	3.38	2.75
2	0.72	0.16	2.23	2.81
3	0.76	0.13	1.96	3.32

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 3 件)

① Yokoyama H., Ohmori H, Waki M, Ogino A, Tanaka Y., Continuous hydrogen production from glucose by using extreme thermophilic anaerobic microflora, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 査読有, vol. 107, 2009, pp. 64-66

② Yokoyama H., Waki M, Ogino A, Ohmori H, Tanaka Y., Hydrogen fermentation properties of undiluted cow dung, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 査読有, vol. 104, 2007, pp. 82-85

③ Yokoyama H., Moriya N, Ohmori H, Waki M, Ogino A, Tanaka Y., Community analysis of hydrogen-producing extreme thermophilic anaerobic microflora enriched from cow manure with five substrates, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 査読有, vol., 77, 2007, pp., 213-222

〔学会発表〕（計 1 件）

①横山浩、荻野暁史、和木美代子、田中康男、
内在性水素生産細菌を利用した牛糞の水素
発酵、第 59 回日本生物工学会大会、2007 年、
9 月 25-27 日、広島大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 浩 (YOKOYAMA HIROSHI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機
構・畜産草地研究所・資源化システム研究チ
ーム・主任研究員

研究者番号：4 0 3 9 1 3 7 0