研究成果報告書 科学研究費助成事業



機関番号: 1 1 3 0 1
研究種目: 挑戦的研究(開拓)
研究期間: 2017~2020
課題番号: 17H06296・20K20315
研究課題名(和文)メタン菌の付着機構解明による先端的コーティング配置技術の開発と高性能電極の試作
研究課題名(英文)Development of advanced coating array technology and trial production of
The address of the ad
而交心主义
研究代表者
多田 千佳(Tada, Chika)
東北大学・農学研究科・准教授
〒〒〒〒〒−−−−−−−−−−−−−−−−−−−−−−−−−−−−−−−−

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 19.800.000円

研究成果の概要(和文): 『微生物プリンター』による電極作製を目標に メタン菌の付着メカニズム解明、 高付着CNT分散液の開発、 メタン菌の短時間集積、高性能電極作製を行った。その結果 Methanothermobacter thermautotrophicusは、COOH基とOH基が1:0.65比によく付着し、 単層SG-CNTと親和性が高く、BSA0.5 mg/Lが 分散に適した。 -600 mV(vs.Ag/AgCI)でメタン菌は2日で107copies/電極に付着し、2倍高密度付着電極の微生 物燃料電池では7.5倍高い電流密度だった。電極配向は非配向に比べ、微生物量1/10でも同程度のメタン変換速 度を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義 本研究により、メタン菌をカソード電極とした高性能な微生物燃料電池の作製が可能になるための基礎データを 得ることができた。これにより、これまで、白金などのレアメタルが必要だった、触媒反応が、メタン菌のよう な、どこでも手に入り、安価な材料として利用可能になること、また、CO2を有効なエネルギーガスのCH4に変換 しながら、電力を得る新たな微生物燃料電池技術の基礎技術ができ、今後、その応用に向けての足掛かりを得 た。

研究成果の概要(英文):With the goal of establishing "microorganism printer" that artificially and freely aligns and attaches methanogens to the electrode surface, (1) elucidation of the adhesion mechanism of methanogens, and (2) dispersion of highly attached CNT of methanogens (3) Accumulation methanogen on the electrode for a short time, and manufacture high-performance electrodes. As a result, (1) Methanothermobacter thermautotrophicus had a good adhesion to that COOH and OH groups on the electrode surface at a ratio of 1: 0.65, and (2) had a high affinity with single-layer supergrowth CNTs. In addition, BSA 0.5 mg / L was suitable as the CNT dispersion. (3) At -600 mV (vs. Ag/AgCI), methanogen adhered to 107 copies/electrode in 2 days. A 7.5-fold higher current density was obtained by microbial fuel cell which methanogen adhered twice as densely. As for the electrode orientation, the same methane conversion rate was obtained even with 1/10 of methanogen as compared with the non-alignment.

研究分野:環境微生物学

キーワード: メタン菌 カソード電極 プリンタ CNT 分散 付着

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、研究者個人に帰属します。

タイトル:

メタン菌の付着機構解明による先端的コーティング配置技術の開発と高性能電極の試作

研究目的

地球温暖化対策に CO₂削減が求められ、水素自動車などの燃料電池導入が増加している。燃料電池 は水素イオンを白金触媒によって酸素と反応させ、水をつくりながら電流を得る。白金は希少金属で 高価であり、採掘による環境破壊もあり、持続可能なシステムとは言えない。そこで、次世代燃料電 池には白金に代わる環境にやさしい触媒材料が求められる。申請者は、炭素素材に水素を利用するメ タン菌が付着することを示し、その結果を応用させ、メタン菌を炭素電極に自然付着させて触媒利用 し、CO₂とH*を反応させ、CH₄ガスを得ながら、電流を得るメタン菌触媒カソード電極を開発した。す でに白金含有電極とほぼ同等能力を発揮したが、培養液中のメタン菌が電極表面に十分付着していな い課題があった。これをふまえ、本研究では、斬新な新発想で、絵を描くように、人為的・自在にメ タン菌の電極表面へ整列・付着させる技術『微生物プリンター』を確立することを目標とし、まず、 化学的表面修飾や生物的付着を活用した メタン菌の着メカニズム解明とともに、 プリンターイン クとなるメタン菌付着力の高いカーボンナノチュープ分散液の開発、 インク原料のメタン菌を簡便 かつ短時間で外環境から選択的に集積できる技術を開発し、現在の性能のさらに高性能電極を作製す る。

A 水素資化性メタン菌の炭素電極への付着特性調査

A-1 炭素電極の表面修飾によるメタン菌の付着の評価

1. 接触角に対する化学処理の影響

カーボンフェルトの表面疎水性の比較に、精製水との 接触角を測定した。精製水(コントロール)処理したカ ーボンフェルトの接触角は、136±6:4°の高い疎水性 を示した。 他のすべての化学処理した担体は、やや親 水化する傾向を示した。



2表面官能基に対する化学処理の影響

図1 化学処理の違いによるメタン菌の付着量

コントロールに対する化学処理済み担体表面の官能基の強度比では、最小の接触角を特徴とする H₂SO₄処理カーボンフェルトでは、親水性基-COOH、-C=O、および-OH は、対照表面と比較して、それぞ れ5.55 倍、4.59 倍、および4.46 倍増加した。Na₂SO₄ と Na₂HPO₄ の両方の処理は、コントロールとほぼ 同じ接触角(134°)を示したが、各官能基の存在量は大きく異なった。この観察は、接触角が同じま まであるにもかかわらず、官能基の組成が異なる可能性があることを示した。 NaOH 処理担体とコント ロールの接触角に有意差は見られなかった。ただし、親水性官能基(-COOH、-C=O、および-OH)の量は 約2倍に増加した。親水性基の量は、HNO₃による酸処理後も対照とほとんど差がなかったが、疎水性-CH 基は 1/10 に減少した。

3.表面処理後のメタン菌の付着

21 日間の培養後、全 H₂ は CH₄ に変換された。異なる表面処理における炭素フェルトに付着したメタン 菌量を定量 PCR で比較した。図 1 に示すように、NaOH、HCI、H₂SO₄、および Na₂HPO₄ 処理カーボンフェ ルトでは、コントロールと比較して有意に付着量が高かった(p <0:05; t 検定)。それに対し、他の化 学処理担体では、対照との間に有意差はなかった。

図2のSEM画像は、化学処理後の担体に付着したメタン菌を示す。*M. thermautot rophicus*の棒状の細胞がフェルト繊維に付着する様子が観察できた。SEM 観察から単位面積あたりのメタン 菌の付着量を測定した結果(not shown data) NaOH、HCI、H₂SO₄、 および Na₂HPO₄処理担体では、対照と比較して付着量が大幅に増 加した (not shown data, p <0:05; t 検定)。

4 担体の表面特性とメタン菌付着量との関係

各カーボンフェルトの表面官能基とメタン菌の付着量との関係 を調べた。4つの官能基(-COOH、-C=O、-CH、および-OH)の量 は、この研究で適用された7種類の化学処理全体で変化した。各 官能基の存在量とメタン菌に対する親和性、メタン菌量と-COOH



および-OH 基との関係を調査した(図3)。メタン菌付着が高かった4つの処理済み担体(NaOH、H₂SO₄、 HCI、NaH₂PO₄)では、-COOH および-OH 基はより強い相関を示した(R2 = 0:9607)。 対照的に、付着 量が増加しなかった KOH および Na₂SO₄ 処理カーボンフェルトでは、-COOH 基と-OH 基の相関は低かっ た。これらの発見は、メタン菌に対する担体の親和性が、その表面の-COOH および-OH 基がバランスの とれた方法で修飾されたときに増強されたことを示唆する。近似曲線の程度と対照の官能基分布の基 準との比較から、官能基は-COOH:-OH = 1:0.65の比率で分布することが望ましいと考えられた。

A-2 様々な水素資化性メタン菌の付着特性の評価

Realtime PCR の結果(図 4)、炭素フェルトに付着したメタン菌 量は、それぞれ Methanosarcinae は 1.6*10⁴ copies/電極、 Methanomicobiales1.6*10⁴ copies/電極、Methanobacteriales は 6.3*10³ copies/電極であった。これまで、A-1 では、高温メ タン菌の純粋培養株として、*M. thermoautot rophicus* に着目し て、その付着特性をみてきたが、高温の多様なメタン菌を含む もので、付着を観察した結果、水素資化性メタン菌の Methanomicrobiales も付着しやすいことが明らかになった。高温 菌で Methanomicrobials に属するものとして、*Methanocul leus*





thermophilusが知られている。本実験では、HRT 5 minという高速 HRT 条件で培養を行なっており、 しっかり担体に付着していなければ、メタン菌の増殖は不可能な速度である。その条件下でも Methanomicrobialesが炭素フェルト上に付着していたことから、付着性は高いものと考えられた。今 後、Methanomicrobialsのメタン菌を電極に用いることも、付着性の面から良い結果を得られる可能 性が考えられた。

A-3 高比表面積ナノカーボン電極の開発によるメタン菌 付着性向上

2種の単層 CNT を用いたメタン菌の付着について カーボンナノチューブ(CNT)は粉状であり、接触面積 が大きく取れる利点、また、CNTの中でも単層 CNT は結 晶性が高く、導電性が高いといったメリットがあること から、単層 CNT と高温性メタン菌

M. thermoautotrophicusの付着性について検討した。本 実験では、単層 CNT の中でも結晶性の高い eDIPS(製造元: 名城ナノカーボン)と、比表面積が大きい特性を持つ Super Growth(製造元:日本ゼオン)の SG-CNT を用いて、これらに 対するメタン菌の付着特性について検討した。

図 5 にそれぞれの培養におけるメタン菌量を示す。SG-CNT および eDIPS-CNT ともにメタン菌が増殖し、2.61*10⁸ copies/5ml 培養液、8.68*10⁹ copies/5ml であることがわか った。溶液全体量としては、eDIPS の方がメタン菌量が高か った。しかし、それぞれの CNT に付着したメタン菌量を比 較すると、SG-CNT では、2.04 *10⁸ copies となり、一方、 e-DIPS-CNT では、4.18*10⁸ copies であった。これより、 SG-CNT では、培養されたメタン菌の 78.2%が CNT に付着し ていたのに対し、eDIPS-CNT では、培養されたメタン菌の 4.8%のみが CNT に付着している状態であることがわかった。

図 6 にそれぞれの CNT の XPS 分析の結果を示す。これよ

リ、SG-CNT は eDIPS-CNT に比較して、C-0 基や C=0 基が多く



図 5 SG および eDIPS に付着したメタン菌 量の比較





の表面特性

見られることがわかった。A-1 でも今回使用している高温性水素資化性メタン菌

*M. thermoautotrphicus*の付着において、COOH 基の関与がわかっており、本実験結果からも C-O 基や C=O 基が多い SG-CNT にメタン菌付着量が多かったことからも、表面が C-C のみの eDIPS-CNT に比較し て、SG-CNT はメタン菌の付着にとって適した表面構造をしていると考えられた。

A-3(2) SG-CNT の分散材の検討 分散剤にプロピレングルコールを用いたものでは、メタンガス発生 量がコントロールに比較して著しく低かった。また、BSA を用いて場合には、コントロールとほぼ同 等のガス量を得た。培養終了後のメタン菌量は、コントロールに比較してプロピレングリコール分散 したメタン菌では、メタン菌量もやや低かった。一方、BSA 分散剤では、メタン菌量はコントロール より高かった。これらの結果から、分散剤には、BSA の方がメタン菌との親和性がよいことがわかっ た。しかし、メタンガス発生量は、コントロールよりやや低い傾向があったため、少なからず、メタ ン生成に対して阻害を受けた可能性が考えられた。そのため次の実験では、BSA 濃度を変化させ、よ り最適な濃度を明らかにすることとした。

A-3(3)-1 分散剤 BSA 濃度の検討

図 12 に分散剤 BSA 濃度の違いによるメタンガス生成量を示す。非分散 CNT に比較して BSA1mg/ml を添加した系では、メタンガス生成量が著し く低かった。また、BSA0.25mg/ml 添加系でも、メタン生成の低下が見 られ、最終的に非分散区に追いついた。BSA0.5 mg/ml 添加が、非分散 に比較して、最初の 12 時間は多少の遅れが見られたが、その後は、ほ ぼ非分散 CNT と同等のメタンガス生成であった。また、このときの培養 5 日目のメタン菌量を比較すると、非分散では 2.36*10⁷copies/40ml であったが、BSA による分散によってメタン 菌量は増加傾向にあり、特に、BSA0.5mg/ml 添加区では 10⁹まで増 加していた。以上のことから、BSA 分散剤の添加量は 0.5 mg/ml が 望ましいことがわかった。



図 12 SG-CNT 分散剤としての BSA 濃度の違いによるメタン

A-4 EPS などの細菌由来付着物質を活用したメタン菌の付着性向上

今回、EPS ではなく、BSA のみでメタン菌の付着性やメタンガス生成量が高まるかを確認した。その 結果、培養5日目のメタン菌量は、BSAを0.5mg/ml添加したものとしないものを比較した結果、BSA 0.5mg/mlを添加した方が7.82*10⁹ copies/40mLとなり、コントロールの5.21*10⁷ copies/40mL に比 較して約100倍高く増加することがわかった。メタンガス生成量に大きな違いは認められなかった が、ややコントロールに比較して、BSA0.5 mg/L添加系では、培養1日目までのメタン濃度が0.86と なり、低かった。フィルターで濾過した場合、BSA添加系では、メタン菌が多いこと、また、BSAの 粘性作用によってフィルター上にメタン菌が捕捉されやすくなり、多く濃縮できることがわかった。

B,C,D 電圧印加による電極表面へのメタン菌の集積培養とターゲットメタン菌の環境からの選択集積 培養法の確立

電圧印加ありなしでの電極上の古細菌量は、-600 mV,-800mVの両区で電圧印加区の方が印加なしに 比較して多量だった。よって微生物電解セルによる電圧印加が古細菌の電極付着量増加有効であると 考えられた。次に、各種メタン菌量について定量 PCR の結果では、-600mV では *Methanosarcinaceae*(Msc)で約13倍、Methanomicrobiales(Mmb)では3.4倍、電圧印加ありで電圧印 加なしの実験区と比較して高い値となった。しかし、Methanobacteriales(Mbt)では電圧印加ありと なし区に大きな差は認められなかった。また、-800 mV では、いずれでも電圧印加による付着量の増 加は確認できなかった。これらの結果からメタン菌の電極付着量を増やすには-600 mV が有効と考え られた。今回の結果から、Methanomicrobialsの増加がおこったことから、実際の環境中では、電子 伝達の主な役割を担っているのは、微生物群衆の中では、優占種ではない、Methanomicrobialsが重 要な可能性がある。また、この菌を電位-600mV にすることで、容易に増やすことが可能であることが 明らかになった。以上より、-600mV で電極に付着した Methanomicrobials と Methanosaricinae は、 C02 と H2 から CH4 を生産することが考えられ、微生物燃料電池のカソード電極として利用可能である 可能性が示唆された。培養液中の古細菌量を測定した結果、-600 mV の2日目時点で、古細菌量の増 加が確認された。よって2日間の電圧印加でメタン菌を電極に付着させられる可能性が示唆された。

E 改良型高密度付着性メタン菌力ソード電極の試作と性能評価

E-2-2-3 NaOH 処理と無処理の比較

NaOH 処理をした炭素フェルトには、精製水処理に比較して、メタン菌量が約2倍多く付着した。また、これらの電流密度では、培養開始から約4000minで、NaOH 処理区では、1270mA/m2、一方、精製水の方では、165mA/m2と低いままであった。よって、NaOH 処理し、メタン菌の付着濃度を高めることで、高性能のバイオカソード電極になることが示され、本実験では約7.5倍高い値になった。

E-2-3 非分散 SG-CNT, 分散 SG-CNT と配向型フォレスト SG-CNT の比較

非分散 CNT,酸化 SG-CNT による分散 CNT 添加によるメタンガス生成については、非分散 CNT,酸化 SG-CNT による分散 CNT,SG-CNT フォレストにおいて、メタン生成速度に大きな違いは認められなかった。 培養 5 日後のメタン菌量を比較すると、非分散 CNT が 2.36*10⁷ copies/40mL,分散 CNT 1.97*10⁶ copies/40mL,フォレスト CNT 2.16*10⁶ copies/40mL であった。これらより、メタン菌数が非分散 CNT に比較して 1/10 の量でも、メタン生成速度が速かった配向型フォレストは、CNT が配向していること で、効率の良い電子伝達を行い、メタン生成変換率を高めている可能性が考えられた。また、同様に、 酸化によって分散した SG-CNT においても、メタン菌の存在量は、非分散に比較して 1/10 であったが、 メタン生成変換率は変わらなかったことから、分散も効果的であることが明らかになった。

また、前回の A-3 の分散剤の選定の結果と比較すると、BSA を添加することで分散させた方が、メタン菌の増殖量は酸化して分散させる場合に比較して、約 30 倍-約 800 倍高かったこと、また、メタン 生成速度も約 3.5 倍速かったため、分散には、BSA 添加の方が適していることが明らかになった。

総括

本研究では、人為的・自在にメタン菌の電極表面へ整列・付着させる技術『微生物プリンター』を確 立することを目標とし、まず、化学的表面修飾や生物的付着を活用した メタン菌の着メカニズム解 明とともに、 プリンターインクとなるメタン菌付着力の高いカーボンナノチューブ分散液の開発、

インク原料のメタン菌を簡便かつ短時間で外環境から選択的に集積できる技術を開発し、現在の性 能のさらに高性能電極を作製することを目的に、研究した。その結果、 高温性水素資化性メタン菌の Methanothermobacter thermoautotrophicus は、電極表面の官能基 COOH 基と OH 基の比が 1:0.65 のと きに、よく付着することがわかった。また、特に、今回使用したカーボンフェルトの場合、1M NaOH で 熱処理するとその条件になることが明らかになった。 単層 CNT の中では、スーパーグロース型の CNT との付着が、結晶性の高い eDIPS-CNT に比較して、よく付着することがわかった。また、分散剤には、 BSA 0.5 mg/L 添加が CNT 分散、メタン菌の増殖、ガス生成量において適していた。 多様な高温メタ ン菌が存在する溶液の中で、-600mV(Ag/AgCI)の電位で印加した場合、培養2日で10⁷copies/電極に付 着し、印加しない場合の 10 倍付着した。また、M.thermoautotrophicus が属する Methanobacterium 以 外に、MethanosarcinaeやMethanomicrobialsの付着も確認できた。これらの菌も微生物との直接的な 電子伝達が報告されていることから、-600mV(Ag/AgCI)電位印加することで、電子伝達に関与するメタ ン菌を早期に培養できることが明らかになった。さらに、NaOH 処理により、通常より2倍多くのメタ ン菌が付着した電極を用いた微生物燃料電池では、1270mA/m2 に達し、7.5 倍高い結果を得た。これよ り、メタン菌を高密度に付着させることで、高い性能の微生物燃料電池を製作できることが明らかと なった。また、電極そのものの配向性では、配向しないものに比較して、微生物量が1/10でも同程度 のメタン変換速度を得られたため、電極そのものの配向性も性能向上に重要な因子であることが明ら かとなった。さらに、分散することで、基質との親和性が高まることでも、微生物量が 1/10 でも同程 度のメタン生成を得たことから、基質の供給効率を分散することで高めることも効果的であることが 明らかになった。また、分散においては、CNT そのものを酸化処理する場合に比較して、CNT を BSA で 分散させた方が、メタン菌の増殖も高く、メタン生成も高いことがわかり、今後、プリンターのインク にアプライする上では、SG-CNTのBSA分散が望ましいことが明らかとなった。

5.主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件(うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件)

2.論文標題 Electricity Generation by a Methanogen Cathode Microbial Fuel Cell, 2020年	Takahashi, Chika Tada 19(1)
Electricity Generation by a Methanogen Cathode Microbial Fuel Cell, 2020年	5. 発行年
	athode Microbial Fuel Cell, 2020年
3.雑誌名 6.最初と最後の頁	6.最初と最後の頁
Journal of Animal Production Environment Science 17-27	Science 17-27
拘戦調又のDDT(テンタルオノシェット減加丁) なし 	
オープンアクセス 国際共著	国際共著
オープンアクセスとしている(また、その予定である)	いる(また、その予定である)

1.著者名	4.巻
Masaki Umetsu , Takaaki Sunouchi, Yasuhiro Fukuda, Hideyuki Takahashi, and Chika Tada	2020
2.論文標題	5 . 発行年
Functional Group Distribution of the Carrier Surface Influences Adhesion of Methanothermobacter	2020年
thermautotrophicus,	
3.雑誌名	6.最初と最後の頁
Archaea	1-8
掲載論文のD01(デジタルオプジェクト識別子)	査読の有無
10.1155/2020/9432803	有
オープンアクセス	国際共著
オープンアクセスとしている(また、その予定である)	-

〔学会発表〕 計9件(うち招待講演 0件/うち国際学会 5件)

1.発表者名

Masaki UMETSU, Yasuhiro FUKUDA, Hideyuki TAKAHASHI, Chika TADA

2.発表標題

Electricity Generation with a Fed-Batch Type and a Continuous Type Methanogen Cathode Microbial Fuel Cell

3 . 学会等名

Water and Environment Technology Conference2018(国際学会)

4 . 発表年 2018年

1.発表者名

Masaki UMETSU, Yasuhiro FUKUDA, Hideyuki TAKAHASHI, Chika TADA

2.発表標題

Methane production in the fed-batch Microbial Fuel Cell

3 . 学会等名

10th Asian Symposium on Microbial Ecology (ASME) (国際学会)

4.発表年 2018年

1.発表者名

梅津将喜,福田康弘,高橋英志,多田千佳

2.発表標題

微生物燃料電池におけるアノードでのメタン菌増殖とその解決法

3.学会等名日本畜産環境学会第17回大会

4 . 発表年

2018年

1 . 発表者名

Umetsu M, FukudaA Y, Takahashi H, Tada C.

2.発表標題

Electricity Generation with a Fed-Batch Type and a Continuous Type Methanogen Cathode Microbial Fuel Cell..

3 . 学会等名

The Water and Environment Technology Conference 2018(国際学会)

4.発表年 2018年

1.発表者名 梅津将喜,福田康弘,高橋英志,多田千佳.

2.発表標題

バッチ式微生物燃料電池におけるメタンガス生産

3.学会等名日本微生物生態学会 第32回大会

4 . 発表年

2018年

1.発表者名 梅津将喜,福田康弘,高橋英志,多田千佳.

2.発表標題

微生物燃料電池におけるアノードでのメタン菌増殖とその解決法.

3 . 学会等名

日本畜産環境学会 第17回大会

4 . 発表年 2018年

1.発表者名

Umetsu M, Fukuda Y, Takahashi H, Tada C. (2019)

2.発表標題

Power generation with a batch type Microbial Fuel Cell using a hydrogenotrophic methanogen as cathodic catalyst.

3 . 学会等名

16th World Conference on Anaerobic Digestion 2019(国際学会)

4.発表年 2019年

1.発表者名

Umetsu M, Fukuda Y, Takahashi H, Tada C.

2.発表標題

Simultaneous Power Generation and Methane Production by a Methanogenic Cathode Microbial Fuel Cell.

3 . 学会等名

Water and Environment Technology Conference 2019(国際学会)

4.発表年 2019年

1.発表者名

梅津将喜,多田千佳.

2.発表標題

メタン菌カソード微生物燃料電池の実用化の可能性についての検討

3 . 学会等名

日本畜産環境学会 第18回大会

4.発表年

2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6.研究組織

	い日 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
関	口 貴子	国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・主	
研究分 (Se	ekiguchi Atsuko)	任研究員	
担者	0738086)	(82626)	

6	. 研究組織 (つづき)	
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究 (t

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
	高橋 英志	東北大学・環境科学研究科・教授	
研究分担者	(Takahashi Hideyuki)		
	(90312652)	(11301)	

7.科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8.本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------