

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780074

研究課題名(和文) エネルギー資源ガス生産反応を高効率で触媒する低炭素型微生物電極システムの創出

研究課題名(英文) Development of low-carbon bioelectrode systems to catalyze fuel gas production

研究代表者

小林 肇 (Kobayashi, Hajime)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50549269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：バイオ電気化学的システムで、メタンと水素の生産を触媒するバイオカソードを、好熱性微生物を菌源として構築、性状と触媒機構を解析した。メタン生産を触媒するバイオカソードは既往研究中で最も高い電気化学的メタン生産速度を示し、電流-メタン変換効率は95%以上だった。同バイオカソードの電気化学的特性を解析したところ、電位に依存して異なる経路で反応が起こっている可能性が示唆された。水素生産を触媒するバイオカソードでは、電流-水素変換効率は約80%であり、希金属触媒に匹敵する触媒活性が示された。これらバイオカソード上の微生物叢解析から、多様な好熱性微生物が電気化学反応の触媒能を持っている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Biocathodes capable of catalyzing CH₄ and H₂ production in bio-electrochemical systems were established by using thermophilic microorganisms as biocatalysts. The CH₄-producing biocathode showed the highest electromethanogenic activity so far reported with the current to CH₄ conversion efficiency of over 95%. The electrochemical analyses showed that the biocathodic electromethanogenesis was catalyzed via two pathways depend on the cathode potential. The H₂-producing biocathode showed the current to H₂ conversion efficiency of ca. 80%, which was comparable to those of the metal catalysts. Molecular phylogenetic analyses of microbial consortia associated with the biocathodes suggested a possibility that diverse thermophiles have catalytic activities for electrochemical reactions.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：バイオエネルギー エネルギー変換 バイオ水素 バイオメタン 生電気化学的反応 バイオカソード

1. 研究開始当初の背景

本研究は「微生物電解反応を応用したエネルギー資源ガス生産技術の実用化」を全体構想とした。「微生物電解」とは、微生物を電気分解反応の触媒として利用する新技術で、再生可能資源であるバイオマス等を原料に高効率の資源ガス(一般的に水素)生産を可能とする。微生物電解では、一般的に、培養槽(電解培養セル)中の培養液にカーボン製の電極が挿入され、イオン交換膜で隔てられたリアクター系が用いられている。アノードとカソードが電源装置と電線で結ばれ回路を形成している。アノード側で微生物によって有機物(バイオマス等)が分解され、放出された電子(e^-)とプロトン(H^+)がそれぞれ電線と溶液中をカソードへと流れる。カソード上の触媒により、電源が印加する微小な電圧で、カソードで e^- と H^+ から資源ガス(一般的には水素)が生成される。

研究開始当初、既往研究は殆どがアノード反応(微生物による有機物分解・電子放出反応)に集中しており、カソードでのガス生産反応は金属(主に白金)触媒を利用した非微生物的プロセスが主流であった。しかし、金属触媒は高コスト、不安定性等、実用化を考慮すると課題が多い。そこで本研究では、金属触媒に代わり、カソード電極上の微生物による反応の触媒(バイオカソード)の可能性に着目した。研究代表者がカソードに金属触媒の代わりに微生物群を添加する予備実験を行った結果、電解セルでの培養初期で水素が発生し、バイオカソードによる水素生産の可能性が示された。また培養初期以降は、水素が変わって天然ガスの主成分であるメタンが継続的に生産された。これらエネルギー資源ガス生産機能を持つバイオカソードを低炭素型エネルギー生産・利用システムの基幹に用いる事を着想し、本研究に至った。

2. 研究の目的

萌芽技術である微生物電解を、特に社会の低炭素化に貢献するエネルギー資源の利用・生産技術として発展開発し、将来的な実用化(低炭素型資源ガス生産プラント等)を目指した。本研究は、その中で特に低炭素化に寄与する要素技術として「エネルギー資源ガス(水素とメタン)生産反応を高効率で触媒する次世代の機能性バイオカソード創出」を目的とした。従来ほとんど考慮されなかった「微生物が触媒するカソード電極(バイオカソード)反応」に焦点を絞り、バイオカソードで「金属触媒が不要な水素の生産反応」と「二酸化炭素の再利用(還元)によるメタン生産反応」を触媒する微生物系に関して触媒機構の解明と反応の高効率化を行い、次世代のバイオカソードを開発した。

3. 研究の方法

電気化学的メタン生成(Electromethanogenesis: EM)活性を持つバ

イオカソードの構築には、一槽型の電気化学的培養セルを用いた。バイアル瓶を加工した全量 250 ml の容器にカーボクロス製の電極を挿入、チタニウムワイヤーで回路と接続した。前培養液 10 ml と液体培地 140 ml を電気化学的培養セルに添加、開口部をブチルゴム栓とストッパーで密閉した後、気相部を $N_2:CO_2$ (80:20)混合ガスで置換加圧した。直流電源装置に電流測定用の外部抵抗 1.0 Ω を挟んで接続し、0.75 V の電圧を印加しながら 55 $^\circ C$ で静置培養(電圧印加培養)した。液相部を一定期間ごとに新しい(微生物源を添加していない)液体培地 150 ml と交換する Fed-batch 培養を繰り返した。

電気化学的水素生成活性を持つバイオカソードの構築、並びに、バイオカソードの電気化学的特性解析には、二槽型の電気化学的培養セルを用いた。容積 250 mL の、側管付きバイアル瓶の間に陰イオン交換膜を挟んで金具で固定した。電極にはカーボクロスを使用し、チタニウムワイヤーで回路と接続した。一槽型培養セルからバイオカソードを採取し、二槽型培養セルのカソードとして用いた。カソード槽には液体培地を、またアノード槽には電子源として 50 mM フェロシアン化カリウム水溶液をそれぞれ 180 ml 添加した。開口部をブチルゴム栓とストッパーで密閉した後、気相部を $N_2:CO_2$ (80:20)混合ガスで置換加圧した。その後、一槽型培養セルと同様に回路に接続し、55 $^\circ C$ で電圧印加培養した。0.7 V の電圧を印加しながら 55 $^\circ C$ で Fed-batch 培養を繰り返した。

マルチメータを用いて外部抵抗両端の電位差を測定、それ元に回路に流れる電流を算出した。培養セル気相部のガス組成をガスクロマトグラフィーで測定した。Cyclic Voltammetry, Linear sweep voltammetry により電気化学的特性を解析した。これは時間とともに電極電位をある範囲において増減させ、その時の電流を測定し電流-電位曲線として記録する方法である。また、集積された微生物群の群衆構造を調査するため、16S rRNA 遺伝子を指標とした菌叢解析を行った。バイオカソードを無菌的に裁断、DNA を抽出して鋳型とし、16S rRNA 遺伝子断片を PCR 増幅、クローニングし、塩基配列を決定、分子系統解析に用いた。

4. 研究成果

(1) EM 反応の触媒能を持つバイオカソードの構築と解析: 多種の微生物源(地下水、消化汚泥、土壌、バイオリアクター培養液、単離菌株等)を一槽式の電気化学的培養セルに植菌、電圧(0.7 V)を印可しながら半回分培養し、メタンと電流の発生を指標に EM 活性を計測した。複数の反応系で良好な EM 活性が検出され、EM 反応を触媒出来る微生物は環境中に広く分布していること、EM によりメタンを産出する反応系は比較的簡便に構築出来ることが示された。

その中で、油田から産出された地層水（油層水）に由来する好熱性の地下微生物群を用いた反応系は、既往研究中で最高の EM 活性を示した。そこで、同反応系に関して詳細な解析を進めた。培養セル中の培養液を無菌的な新しい培地に交換した直後も、高い EM 活性が維持される事から、EM 反応がカソード表面に付着した微生物により触媒されている、即ち同反応系の EM 活性はバイオカソードによるものである事が示された。同反応系の EM 活性を印可電圧の大きさを变化させて測定したところ、測定した範囲内（0.4 - 0.8 V）では、メタン生産速度は印可電圧の大きさに依存して増大した。この時、電子の利用効率は全ての印可電圧条件下で 100%近くであった。

上述の高性能バイオカソードの電気化学的反應特性を解析した。二槽式の電気化学的培養セルに同バイオカソードを移植し、ポテンショスタットにより定電位（-0.5 V vs. SHE）を与えて培養したところ、EM 反応の触媒能が培養継続により向上した。触媒能が向上した同バイオカソードでの電気化学的反應を Cyclic Voltammetry により解析した結果、電位に依存した 2 種類の反應経路が存在する事が示唆された。詳細な反應実験から、-0.32 - -0.6 V (vs. SHE)の電位では「直接的な EM 反応 ($\text{CO}_2 + 8\text{H}^+ + 8\text{e}^- \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$)」が、-0.6 V (vs. SHE)より低い電位では水素分子の生成を介した「間接的な EM 反応 ($2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$ および $\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$)」が起こっている事が示唆された。これらはバイオカソードの EM 反応の電気化学的特性を明らかにした初めての知見である。

同バイオカソードから DNA を抽出し、EM 反応を触媒する微生物群の構成種を調査した。EM 活性が見られた全ての反応系で水素資化性のメタン生成古細菌（メタン菌）の優占化が検出された。同様の現象は既往研究でも報告されている。水素資化性メタン菌種は水素分子を還元力源として CO_2 をメタンへと還元する ($\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$)。これら知見は、同菌種が EM 反応にも関与している事を示唆している。一方、同菌種の単離株を微生物源とする反応系の EM 活性は比較的低く、電子の利用効率は 20%と低い値を示した。さらに同反応系では低い電位での「間接的 EM 反応」のみ検出され、高い電位での「直接的な EM 反応」は観察されなかったことから、EM 反応の触媒には、メタン菌単独では不十分であることが示唆された。同バイオカソードでは、メタン菌の他に数種の細菌の優占化が見られている。また、バイオカソード表面では、複数種の微生物による共凝集体様の構造が観察されている。これら知見から、メタン菌と他の微生物種の共生的代謝ネットワークが「直接的な EM 反応」を触媒していると考えられる。

今後、この高性能の EM 触媒能を持つバイオカソードに関して、異なる反応条件下での

表面菌叢の比較と共培養実験から、メタン菌の共生パートナーを特定する。さらに EM 反応の触媒能を持つ微生物系の性能向上手法を検討し、同バイオカソードの「反応素子」確立を図る。

(2) 電気化学的水素生成反応の触媒能を持つバイオカソードの構築と解析：高温性消化汚泥由来の微生物群を一槽型培養セルで電圧印可培養し、電気化学的水素生成活性を持つ微生物の集積培養を行った。良好な水素発生が見られた一槽型培養セルからカソードを回収し、二槽型培養セルのカソードとして使用した。これは、水素はアノードで電子供給源として消費され得るので、一槽型培養セルでは水素生成の評価が難しいためである。電圧を印加したセルと印加しなかったセルを比較すると、電圧印可セルでは水素の生成活性が顕著に高く、カソード上に電気化学的水素生成活性を持つ微生物群が集積されていることが示された。

電気化学的水素生成活性を持つバイオカソードに関して、印加電圧の大きさの水素生成速度と回路に発生する電流への影響を解析した。電圧の大きさに依存した水素生成速度の上昇がみられた。また、印加電圧の大きさに依存して、発生した電流密度が大きくなる傾向が見られた。電流-水素変換効率は 80%に近かった。Linear sweep voltammetry による電流発生挙動解析の結果、バイオカソードでは顕著な電流が発生しており、電極表面上における反応には、微生物の触媒としての関与が確認された。電気化学的水素生成に関わる微生物種を特定するため、バイオカソード上の微生物群の群集構造を解析した。硝酸還元菌である *Vulcanibacillus modesticaldus* 近縁種の優占化が検出された。近年、他の硝酸還元菌が電子放出活性を持つことが確認されていることから、この細菌種が水素生成反応の触媒微生物である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

小林 肇, 佐藤光三 (2014) “ CO_2 から資源を生み出す微生物電解合成システム.” 水素エネルギー協会(HESS)会誌, 39: 24-32. 査読無 (総説)

Q. Fu, H. Kobayashi, Y. Kuramochi, J. Xu, T. Wakayama, H. Maeda and K. Sato (2013) “Bioelectrochemical analyses of a thermophilic biocathode catalyzing sustainable hydrogen production.” *Int J Hydrogen Energ*, 38:15638-45. 査読有

DOI: 10.1016/j.ijhydene.2013.04.116

Q. Fu, H. Kobayashi, H. Kawaguchi, T. Wakayama, H. Maeda and K. Sato (2013) “A thermophilic Gram-negative nitrate-reducing bacterium,

Calditerrivibrio nitroreducens, exhibiting electricity generation capability.” *Environ Sci Technol*, 47:12583-90. 査読有
DOI: 10.1021/es402749f
M. Hara, Y. Onaka, H. Kobayashi, Q. Fu, H. Kawaguchi, J. Vilcaez and K. Sato (2013) “Mechanism of electromethanogenic reduction of CO₂ by a thermophilic methanogen.” *Energy Procedia*:37, 7021-8. 査読有の国際学会プロシーディング
DOI:10.1061/j.egypro.2013.06.637
Q. Fu, H. Kobayashi, H. Kawaguchi, J. Vilcaez and K. Sato (2013) “Identification of new microbial mediators for electromethanogenic reduction of geologically-stored carbon dioxide.” *Energy Procedia*, 37:7006-13. 査読有の国際学会プロシーディング
DOI: 10.1061/j.egypro.2013.06.635
Y. Kuramochi, Q. Fu, H. Kobayashi, M. Ikarashi, T. Wakayama, H. Kawaguchi, J. Vilcaez, H. Maeda and K. Sato (2013) “Electromethanogenic CO₂ conversion by subsurface-reservoir microorganisms.” *Energy Procedia*, 37:7014-20. 査読有の国際学会プロシーディング
DOI: 10.1061/j.egypro.2013.06.638
H. Kobayashi†/N. Saito†/Q. Fu† (†contributed equally), H. Kawaguchi, J. Vilcaez, T. Wakayama, H. Maeda and K. Sato (2013) “Electrochemical and microbial analysis of the bio-electrodes of the electromethanogenic reactor.” *J Biosci Bioeng*, 116:114-7. 査読有
DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.01.001
Q. Fu, H. Kobayashi, H. Kawaguchi, J. Vilcaez, T. Wakayama, H. Maeda and K. Sato (2012) “Electrochemical and phylogenetic analyses of current-generating microorganisms in a thermophilic microbial fuel cell.” *J Biosci Bioeng*, 115:268-71. 査読有
DOI: 10.1016/j.jbiosc.2012.10.007

〔学会発表〕(計 16 件)

H. Kobayashi. “Thermophilic bio-electrochemical systems for CO₂-to-methane conversion technology (invited lecture).” The 1st ASEAN Microbial Biotechnology Conference 2014 (AMBC2014), Bangkok, Thailand, 2014/2/20 (招待講演)
小林 肇. “Electromethanogenesis: CO₂ からカーボンニュートラルな資源を生み出す.” 第 21 回静岡フォーラム/

第 46 回研究交流セミナー・メタン利用技術の最前線, 静岡, 2013/12/11 (招待講演)

小林 肇. “Electromethanogenesis: CO₂ からカーボンニュートラルな資源を生み出す.” 第五回システム創成学術講演会, 東京, 2013/12/7

Q. Fu, H. Kobayashi, T. Wakayama, H. Maeda, K. Sato. “Electrochemical evidence of direct electron transfer in a thermophilic biocathode for carbon dioxide reduction.” BioH₂ 2013 Conference, Montreal, Canada, 2013/8/7 (査読により口頭発表に選出)

小林 肇. “持続型炭素循環システム.” さいたま・水とみどりのアカデミー, 埼玉, 2013/7/24 (招待講演)

Q. Fu, H. Kobayashi, H. Kawaguchi, J. Vilcaez, K. Sato. “Identification of new microbial mediators for electromethanogenic reduction of geologically-stored carbon dioxide.” 11th International Conference on Greenhouse Gas Control Technologies (GHGT-11), Kyoto, Japan, 2012/11/22 (査読により口頭発表に選出)

Q. Fu, H. Kobayashi, Y. Kuramochi, J. Xu, K. Sato. “Bioelectrochemical analyses of a thermophilic biocathode catalyzing sustainable hydrogen production.” The 2012 Asian Biohydrogen and Bioproducts Symposium, 重慶, 中国, 2012/11/9-12 (査読により口頭発表に選出. Merit Award 受賞)

Q. Fu, H. Kobayashi, H. Kawaguchi, J. Vilcaez, K. Sato. “Exoelectrogenic ability of thermophilic microorganisms from various environments.” American Chemical Society 243th National Meeting & Exposition, San Diego, CA, USA, 2012/3/29 (査読により口頭発表に選出)

〔図書〕(計 1 件)

若山 樹, 小林 肇, 前田治男 (2014) “枯湯油・ガス田をジオバイオリアクターとしたバイオエネルギー生産の可能性.” in 光合成のエネルギー利用と環境応用, 三宅淳, 佐々木健 Eds, シーエムシー出版, 東京, p. 118-30.

〔その他〕

ホームページ等
<http://esc.frcer.t.u-tokyo.ac.jp>

6. 研究組織
(1) 研究代表者

小林 肇 (Kobayashi Hajime)
東京大学・大学院工学系研究科・助教
研究者番号：50549269

(2)研究分担者
無し()

研究者番号：

(3)連携研究者
無し()

研究者番号：