

令和元年6月24日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19313

研究課題名（和文）蛍光分光センシングとメタゲノミクスを統合したメタン発酵モニタリング手法の開発

研究課題名（英文）Development of methane fermentation monitoring method integrated spectroscopy and metagenomics

研究代表者

遠藤 良輔（Endo, Ryosuke）

大阪府立大学・生命環境科学研究科・講師

研究者番号：10409146

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、メタン発酵液を対象として蛍光分光センシング情報ならびに微生物メタゲノム情報を同時に取得してこれらを統合的に解析し、メタン発酵槽内部動態を診断することに挑戦した。結果として、pHやバイオガス中のメタン含有率といったメタン発酵特性は特定波長域の分光反射あるいは蛍光強度の組み合わせを用いて精度よく回帰できた。さらに、回帰に用いた分光反射波長域あるいは蛍光波長域に関連づけられている物質および微生物情報によって、発酵動態の変化の要因について診断することが可能であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メタン発酵プロセスの代謝系は複雑であり、発酵阻害に対する処置はこれまで対症的で、根本原因の特定は困難だった。本研究で確立した分光・蛍光情報による発酵阻害の診断手法は、発酵阻害の原因を特定するという原因療法が実現しうることを示している。メタン発酵は、有機性廃棄物からエネルギーと肥料成分を回収する資源化技術であり、社会の持続性向上に寄与する基幹技術として期待されている。本研究は、メタン発酵の安定的運転を可能とし、本技術のさらなる普及に貢献しうる。また、分光データと微生物情報のネットワーク解析は世界初の試みであり、多様な微生物群集と複雑な代謝系の変動を可視化例として学術的に重要な知見である。

研究成果の概要（英文）：To diagnose the dynamics inside the methane fermentation process, fluorescence spectra and microbial genome inside methane fermentation digestate were acquired simultaneously and analyzed multivariately. As a result, methane fermentation characteristics such as pH and methane content in biogas were able to be accurately regressed by using partial least square method with input of a combination of fluorescence intensity and spectral reflection of a specific wavelength range. Furthermore, it was possible to diagnose the cause of the change in fermentation dynamics by the substance related to the spectral reflection wavelength range or the fluorescence wavelength range and microorganism information used for the regression.

研究分野：生物環境情報工学

キーワード：ケモメトリクス メタゲノミクス メタン発酵 診断技術 生物情報 バイオマス 資源循環 持続可能性

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

単一の投入原料を用いて連続メタン発酵を続けていると、微生物反応に必要な鉄などの金属イオンが不足して、あるときにメタン生成速度が急激に低下する。鉄欠乏時の予備実験を行ったところメタン発酵液の色や照りに目に見えて変化が生じた (Fig. 1A)。しかしながら、メタン発酵槽内部では微生物群集の構造や応答も環境により大きく変動し (例えば Fig. 1B)、このことがメタン発酵特性に大きく影響する。これまでの光センシングはこのような微生物動態を捉えることができず、生物学的な説得力に欠けていた。本申請を行うにあたり、申請者は上記手法の利用可能性を向上させる2つの点に注目した。1点目は、申請者が近年進めているメタン発酵メタゲノミクス研究を応用して、微生物群集データと光センシングデータを同時に取得し、計測上のメタン発酵のブラックボックスを削減することである。2点目は、本研究で取得する全てのデータを統合して多変量解析を行い、蛍光分光情報・環境情報・微生物情報・メタン発酵特性の相互の関連性をより多く見出すことである。統合解析は、ヒト腸内細菌における医学研究から部分的に着想を得たが、メタゲノミクスをセンシングデータと統合して多変量解析する方法論は、世界的にも類例を見ない。

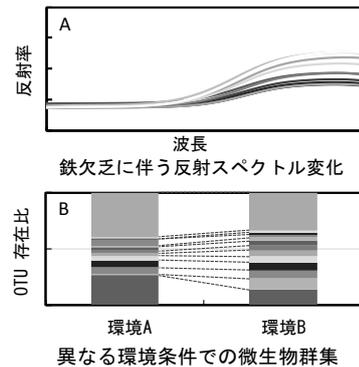


Fig. 1 鉄欠乏に伴うメタン発酵反射スペクトル変化 (A) および微生物群集構造の一例 (B)。

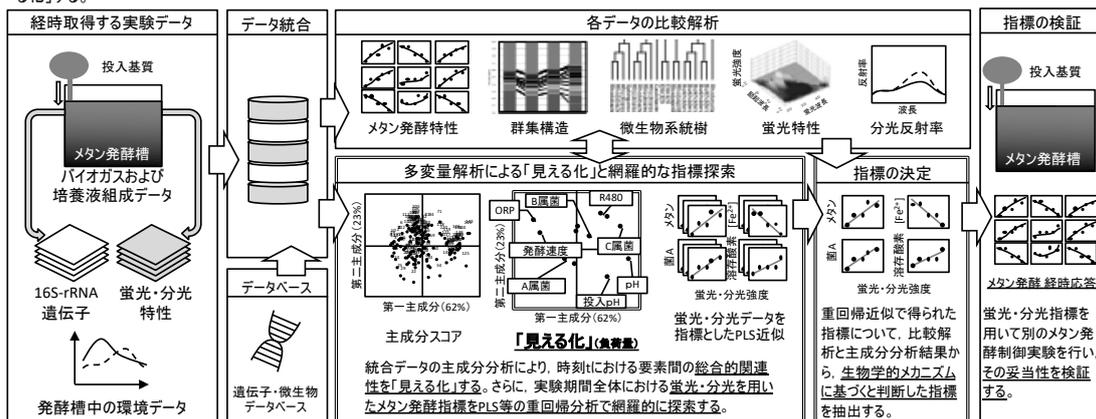
2. 研究の目的

本研究課題では、メタン発酵液を対象として蛍光分光センシング情報ならびに微生物メタゲノム情報を同時取得してこれらを統合的に多変量解析し、メタン発酵槽内部状態の「見える化」に挑戦する。これにより、蛍光分光情報や微生物情報を説明変数としたメタン発酵反応の重回帰モデルを作成し、メタン発酵反応障害を迅速に検知する手法を開発する (Fig. 2)。

メタン発酵は、有機性廃棄物を嫌氣的微生物群による多段反応系によって処理し、メタンガスをエネルギーとして、また発酵残渣を植物生産のための液体肥料として利用することができる農業環境技術である。メタンや肥料成分の生成量は発酵状態に伴って日々変動することから、モニタリングに基づいた精密な発酵環境制御が強く求められているが、発酵反応に大きく影響する微生物群集を外部からは把握できないこともあり、迅速に発酵状態の異変を検知し、そのメカニズムを解釈できるセンシング手法はこれまで開発されていない。本研究は、鉄欠乏状態のメタン発酵を事例として、複数種類の計測メタデータを統合解析して発酵状態を「見える化」することで、発酵状態の異変が「どこに」「なぜ」起こったか検知できるようにする。

平成29年度

Fe<sup>2+</sup>欠乏状態にあるメタン発酵反応槽を対象に、Fe<sup>2+</sup>添加前後の微生物16S-rRNA遺伝子と蛍光・分光データを経時的に同時取得する。全ての実験データを統合したデータセットを用いて、任意のデータ間の比較解析ならび統合データの主成分分析を行う自動演算プログラムを作成する。これにより、各データの関連性を総合的に「見える化する」。



平成30年度

平成29年度に作成したプログラムにPLS(主成分による重回帰)演算処理を組み込み、メタン発酵特性の動態変化を説明可能な蛍光・分光指標候補を自動的に複数取得する。取得した指標を、「見える化」した各要素の相互関連性と照合して、生物学的に整合性のとれるものを選抜し、その利用可能性について検証する。

Fig. 2 研究の概要。

3. 研究の方法

<平成 29 年度>

標準生ごみを基質として長期間馴養したメタン発酵消化液 (以下、消化液) を用意した。消化液 30 mL を入れたバイアル瓶に標準生ごみを 3.6 mL 加えた。消化液の鉄濃度について、3 (無処理)、8、13 または 23 mg L<sup>-1</sup> の 4 試験区を設けた。鉄の添加には FeCl<sub>2</sub> 水溶液を用いた。標準生ごみおよび鉄を添加後、バイアル瓶内は嫌気条件を保つために窒素置換を行い、温度が 37 ±

1°C に保たれたインキュベーターに静置して 40 日間回分実験を行った。実験終了時に蛍光光度計(日立 F-4500)を用いて励起波長範囲 200~350 nm, 蛍光波長範囲 200~500 nm における消化液の蛍光スペクトルを計測した。分光光度計 (Stellar Net Inc) を用いて波長範囲 400~1000 nm における消化液の反射スペクトルを計測した。消化液の pH および酸化還元電位を計測した。実験開始から実験終了までに発生したメタン積算生成量を測定した。

#### <平成 30 年度>

スクロースを炭素源とする合成基質を、容積 2 L のメタン発酵槽に 1 日 50 mL 投入した。メタン発酵消化液 (以下, 消化液) の pH やバイオガス発生量が定常になった後, 基質投入量を 1 日に 200 mL として有機物負荷を高め実験を開始した。この発酵槽から 1 日に 4~8 回, 消化液を 10 mL 採取し, 紫外可視分光光度計 (Shimadzu, UVmini-1240) で 190~800 nm, フーリエ変換赤外分光光度計 (JASCO, FT/IR-660Plus) で 4000~650 cm<sup>-1</sup> (2500~15384 nm) の吸光スペクトル, 蛍光分光光度計 (日立, F-4500) で励起波長 (Ex), 蛍光波長 (Em) とともに 200~700 nm の蛍光スペクトルをそれぞれ計測し, 自家蛍光物質を含む内部物質の吸光・蛍光特性を調べた。同時に, 消化液の pH, バイオガス発生量およびメタン発生量を測定した。1 日に複数回採取した消化液から, 代表として一つ選び, 次世代シーケンサー (illumina, MiSeq) を用いて微生物の群集構造を調べた。分光計測値と pH およびガス特性の関係の解析には, 部分最小二乗法 (以下, PLS) を用いた。回帰式に対する各説明変数の影響度を表す指標である変数重要度を用いて, 波長の選抜を行った。選抜波長を用いて再度回帰を行い, 分光計測によって得られた内部物質の情報による診断の可能性を評価した。

### 4. 研究成果

#### <平成 29 年度>

励起波長 200~250 nm において蛍光波長 300~500 nm の範囲で蛍光が検出された (Fig. 3)。この波長範囲では励起波長 220~225 nm, 蛍光波長 335~340 nm に芳香族タンパク質様物質, 励起波長 200~250 nm, 蛍光波長 380~550 nm に腐植酸がそれぞれ蛍光を示すことが知られている (Luo et al. 2013)。芳香族タンパク質様物質は嫌気性分解されにくい有機物であり, 腐植酸は有機物から生成する二次代謝物で黒褐色を示す。これら 2 つの蛍光物質の波長範囲において蛍光強度は鉄濃度 3, 8 mg L<sup>-1</sup> と比べて 13, 23 mg L<sup>-1</sup> では大きくなったが, 最も高い蛍光強度を示した鉄濃度は 13 mg L<sup>-1</sup> だった (Table 1)。このことから鉄濃度の増加は蛍光物質を増加させる傾向を持つが, 多すぎると減少することがわかった。

反射率は波長 470~1000 nm の範囲で, 鉄濃度の増加に伴い直線的に低下した (Fig. 4A, B)。蛍光測定からは黒褐色の腐植酸の存在が推定されたが, この蛍光強度と反射率の関係は直線的ではなく, 反射率の低下は別の黒色沈殿物の生成量増加を反映していることが示唆された。消化液の酸化還元電位が鉄濃度の増加に伴い上昇した (表 2) ことから, 鉄によって消化液中の電子消費が促進されたことがわかる。これらの結果から, 硫化物と鉄イオンの還元反応で生じる黒色沈殿物の硫化鉄が, 反射率低下の原因物質として考えられた。硫化鉄は蛍光を発しない物質であることが知られている。反射率と鉄濃度には高い負の相関関係が見られた (Fig. 4B) ことから, この沈殿物の量は反射率によって予測できる可能性がある。

バイオガスおよびメタン積算生成量には, 鉄の影響が見られなかった (Table 2)。一般にメタン発酵における最適鉄濃度は 10 mg L<sup>-1</sup> とされているが, 本研究で設定した鉄濃度範囲では鉄欠乏や鉄過剰によるメタン生成阻害が生じないことがわかった。

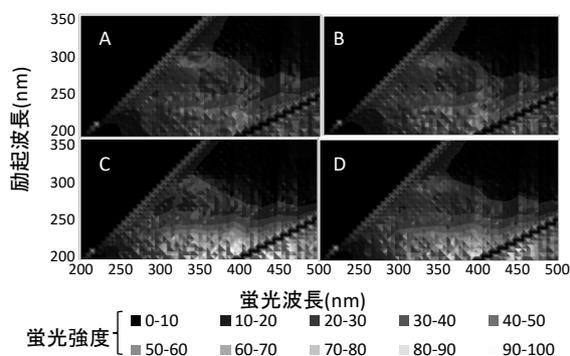


Fig. 3 実験終了時における異なる鉄濃度(A:3 mg L<sup>-1</sup>, B:8 mg L<sup>-1</sup>, C:13 mg L<sup>-1</sup>, D:23 mg L<sup>-1</sup>)のメタン発酵消化液の励起-蛍光スペクトル。蛍光は励起波長よりも長波長側に現れる。また励起波長の 2 倍の蛍光波長には 2 次光の影響が含まれるため, これらは解析の対象から除外した。

Table 1 異なる鉄濃度の消化液の蛍光ピーク A および B における蛍光強度。

鉄濃度 (mg L <sup>-1</sup> )	蛍光強度 (相対値)	
	ピーク A (Ex220 / Em335)	ピーク B (Ex220 / Em460)
3	32.9 ± 0.6	38.7 ± 0.6
8	34.0 ± 0.8	41.1 ± 0.5
13	58.1 ± 2.0	86.0 ± 2.2
23	48.1 ± 0.6	64.7 ± 1.3

Ex: 励起波長 (nm), Em: 蛍光波長 (nm)。

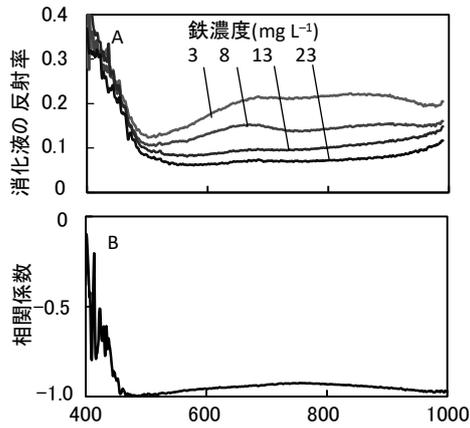


Fig. 4 異なる鉄の消化液における反射スペクトル(A)および鉄添加量と反射率変化の回帰決定係数スペクトル(B).

Table 2 異なる鉄濃度の消化液における pH, ORP, バイオガスおよびメタン積算生成量.

鉄濃度 (mg L <sup>-1</sup> )	pH	酸化還元電位 (mV)	メタン (L g <sup>-1</sup> -VS)
3	8.49	-416.8 a	0.64
8	8.51	-402.0 b	0.62
13	8.53	-390.8 c	0.65
23	8.43	-376.0 d	0.65
<i>P</i> 値	0.08	< 0.001	0.223

値は平均値±標準誤差(n=5). *P*値は一元配置分散分析で求めた. アルファベットは Tukey-Kramer 法で危険率 5%水準で有意差があることを示す.

<平成 30 年度>

### pH およびガス特性

消化液の pH は経時的に低下した (Fig. 5A). これは、有機物負荷が高くなったことにより、発酵中間生成物の有機酸が蓄積したためと考えられた. バイオガス中のメタンの割合 (メタン含有率) も同様に経時的に低下した (Fig. 5B). これは、メタンの生成を行うメタン生成古細菌の活性が低下したためと考えられた.

### 吸光・蛍光特性

吸光・蛍光センシングによる分光スペクトルから、複数のピークが確認できた (Fig. 6). PLS 分析を行い、これらのスペクトルデータの中から pH 動態への影響度が高い波長を選抜し回帰式を得たところ、決定係数が 0.97 と良好だった. 既往の文献より、選抜波長の吸光度や蛍光強度は特定の物質に起因していることが分かった (Table 3). これらから、選抜波長の起因物質によって、pH 低下の原因を診断できることが示唆された. 本研究では、アルコールや芳香族タンパク質、フミン酸などが pH の低下に関与していることが推定できた. メタン含有率に対する PLS 分析では、pH の場合と異なる波長が選抜された (決定係数 0.86). 選抜波長より、メタン含有率の低下には溶存有機物やペプチドなどの関与が推定できた.

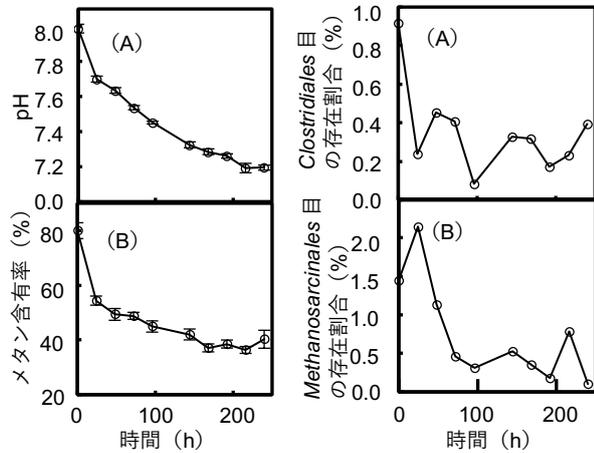


Fig. 5 有機物負荷を高めてからの pH (A) とメタン含有率 (B) の経時変化. プロットは 1 日の計測の平均値, 誤差線は標準誤差.

Fig. 7 有機物負荷を高めてからの Clostridiales 目 (A) と Methanosarcinales 目 (B) の存在割合の経時変化.

### PLS 分析によって選抜した波長と微生物群集構造の関係

pH およびメタン含有率への関与が推定された内部物質と微生物の関係を調べるため、選抜波長と微生物群集構造の関係の解析を行った.

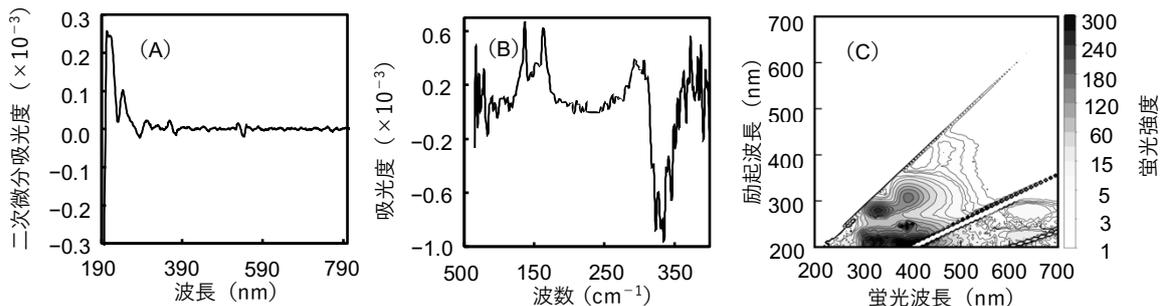


Fig. 6 実験期間中の消化液の各分光計測によるスペクトルの代表例 (紫外可視域吸光スペクトルはピークの視認性を向上させるために吸光度を二次微分した). (A) 紫外可視域吸光スペクトル (B) 中赤外域吸光スペクトル (C) 蛍光スペクトル.

Table 3 pHおよびメタン含有率に対して、PLS分析における変数重要度が高かった主な選抜波長とその起因物質.

	pH			メタン含有率		
	紫外可視域 吸光スペクトル	中赤外域 吸光スペクトル	蛍光スペクトル	紫外可視域 吸光スペクトル	中赤外域 吸光スペクトル	蛍光スペクトル
選抜された波長, 波数 (nm, cm <sup>-1</sup> )	選抜波長なし	960	Ex:295 Em:350 Ex:375 Em:465	245	1550	Ex:285 Em:360 Ex:375 Em:470
起因物質, 起因振動		アルコールの C-OH伸縮	芳香族タンパク質 フミン酸	溶存有機物	ペプチド結合の N-H変角, C-N伸縮	芳香族タンパク質 フミン酸

次世代シークエンサーにより、消化液中に多様な微生物種が存在し、それらの存在割合は様々な傾向で経時的に変化したことが明らかになった。pHでの選抜波長の一つである960 cm<sup>-1</sup>の吸光度と微生物種との関係を調べたところ、Clostridiales目の存在割合の経時変化 (Fig. 7A) と高い正の相関が見られた (R = 0.93)。Clostridiales目は有機物の分解とエタノールの生成を行うことが知られている。960 cm<sup>-1</sup>での吸光度は、アルコール類による分子振動に起因していると考えられることから、Clostridiales目によるエタノール生成が960 cm<sup>-1</sup>での吸光度に反映されている可能性がある。

メタン含有率に着目すると、溶存有機物に起因する245 nmでの吸光度とメタン生成古細菌の一種であるMethanosarcinales目 (Fig. 7B) に高い負の相関が見られた (R = -0.9)。このことは、Methanosarcinales目の存在割合と消化液中の溶存有機物に何らかの関連があることを示唆している。

以上の結果から、分光技術がメタン発酵内部の微生物や物質の動態を診断できる可能性が示唆された。今後、分光情報を用いたメタン発酵診断技術の確立にあたって、汎用性に優れた、指標となる波長や、発酵阻害の兆候を迅速に検知できる波長などを見出すことが重要である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計2件)

Takemura Kenji, Endo Ryosuke, Shibuya Toshio, Kitaya Yoshiaki. 2019. Application of Biogas Digestate as a Nutrient Solution for the Hydroponic Culture of *Chrysanthemum morifolium* Ramat with Rockwool Substrate. Waste and Biomass Valorization. in press.  
<https://doi.org/10.1007/s12649-018-00576-8>

遠藤 良輔, 福嶋 志隆. 2017. トマト栽培残渣の嫌気性消化におけるメタン生成および2つのモデルの検証. 生態工学, 29, 93-99.  
<https://doi.org/10.11450/seitaikogaku.29.93>

〔学会発表〕 (計5件)

遠藤良輔, 中口貴博, 渋谷俊夫, 北宅善昭. 2018. 蛍光分光センシングとメタゲノミクスを統合したメタン発酵モニタリング手法の開発. 農業情報学会 2018 度年次大会

遠藤良輔, 真鍋尚哉, 渋谷俊夫, 北宅善昭. 2019. 吸光・蛍光センシングによるメタン発酵動態の診断. 農業情報学会 2019 度年次大会

Ryosuke Endo, Kouki Nakamura, Nan Qin, Toshio Shibuya, Yoshiaki Kitaya. 2017. Recovery of Energy Resources from *Azolla* Plants Using Anaerobic Digestion. Eco-Engineering Symposium 2017

Ryosuke Endo. 2017. Improvement of anaerobic digestate for usage as nutrient solution in plant hydroponics. CIGR World Workshop(招待講演)(国際学会)

Ryosuke Endo, Masatoshi Maeda, Toshio Shibuya and Yoshiaki Kitaya. 2017. Calcium carbonate addition can facilitate the conversion of anaerobic digestate into hydroponic nutrient solution. International symposium of greener cities (国際学会)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

〔その他〕 生物環境調節学研究グループ <http://envbio.envi.osakafu-u.ac.jp>

## 6. 研究組織 代表者のみ

※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。