

平成21年 5月20日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18710065

研究課題名（和文） 嫌気性微生物の固定化メカニズムの解明とその制御技術の開発

研究課題名（英文） Immobilization of anaerobic microbes and their applications

研究代表者

野村 俊之（NOMURA TOSHIYUKI）

大阪府立大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：00285305

研究成果の概要：高効率メタン発酵プロセスを実現するには、発酵槽内のメタン生成菌を高濃度に保持することが必要不可欠である。本研究では、メタン発酵槽に棲息する代表的な嫌気性微生物を選定し、コロイド科学の観点から検討を行った。その結果、メタン発酵の中核を担う酢酸利用性メタン生成菌を固定化担体上に高密度に固定化するには、メタン菌叢に含まれる他の嫌気性菌の付着が抑制できる担体が適していることを、微生物の付着による自由エネルギー変化より明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,400,000	0	1,400,000
2007年度	900,000	0	900,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	330,000	3,730,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：嫌気性微生物、固定化、バイオコロイド、メタン生成菌、電気泳動移動度、疎水性、相互作用

1. 研究開始当初の背景

循環型社会の形成が叫ばれる状況の中で、“高水分で腐敗し易く、直接燃焼によってエネルギー回収できない有機性廃棄物”に対して有効なバイオエネルギー抽出技術としてメタン発酵技術が再注目されている。しかし、メタンを生産するには1ヶ月程度かかるうえに、消化率はそれ程高くないなど、処理速度や残渣処理などに開発課題が残されている。

メタン発酵は、酸生成菌が高分子有機物を

加水分解して水溶性の低分子に変化する過程（液化段階）と低分子化した有機物をメタン発酵菌が分解してメタンを生成する過程（メタン発酵段階）に分類される。メタン発酵の効率を大幅に改善するために、原料（有機性廃棄物）の液化（可溶化）技術として、効率のよい原料の粉碎法、水熱処理等による原料の加水分解の促進法などが開発されている。申請者も、余剰汚泥の可溶化技術（特開 2005-161253）について研究開発を進めている。メタン発酵の実用化にあたっては、原

料の液化段階に対して高効率化技術を探求するとともに、その下流工程にあたる低分子化した有機物からのメタン発酵技術に対しても高効率化を図ることが重要である。

2. 研究の目的

本研究では、低分子化した有機物からのバイオガス生産プロセスの高効率化に焦点を絞り、このような現行技術の深刻な問題点を解決するために、メタン生成細菌の細胞特性をコロイド科学の観点から解明し、斬新なコンセプトに基づいて発酵槽内の菌体を高密度に固定化する技術を開発することを目的とした。

具体的には、菌体の高密度固定化プロセスを“菌体の付着”、“菌体の固定化”、“バイオフィルムの形成”に分類し、メタン生成細菌を『生きたコロイド』として捉えたコロイド科学の観点から各ステップにおける現象を解明し、菌体の高密度固定化メカニズムを明らかにする。そして、これらの知見に基づき、菌体の固定化に適した担体の選定も含め高密度固定化を人為的かつ迅速に制御する方法を提案する。

3. 研究の方法

(1)実験に用いた試料

有機性廃棄物は、多糖、タンパク質、脂質などの高分子物質で構成される。これら3種類の高分子物質を低分子化する酸生成菌（タンパク質分解菌、炭水化物分解菌、脂質分解菌）を、京都府八木町にあるバイオエコロジーセンターの消化発酵槽より採取したメタン菌叢から集積培養した。また、酢酸資化性メタン菌はメタン菌叢からの集積培養が難しいので、消化発酵槽から単離された酢酸利用性メタン生成菌 *Methanosarcina barkeri* (JCM 10043 株) および *Methanosaeta concilii* (DSM 3671 株) を純粋培養した。これらの培養した微生物は、吸引濾過により培地不純物を取り除いた後、生理食塩水で3回洗浄し細胞外ポリマーを除去した菌体を実験試料に用いた。以上のように、メタン菌叢に多種類に存在する嫌気性菌群の中から代表的な5種類の菌体を選定した。また、菌体の固定化用担体には、大きさ約5mmの竹炭とアルミナの2種類を用いた。

(2)表面性状評価

微生物細胞の表面性状として、表面張力および表面電位を評価した。

表面張力はフィルター上に積層させた菌体層の接触角を動的接触角測定装置を用いて Sessile drop 法によって測定し、Young-Dupré の式から見積もった。

表面電位は、懸濁液のイオン強度を変化させた菌体の電泳動気移動度をゼータ電位測定装置によって測定し、Ohshima の式を用い

て推算した。さらに、フーリエ変換赤外分光法 (ATR-FTIR 法) を用いて微生物の表面官能基の分析を行った。

(3)自己凝集実験

イオン強度を 5~160 mol/m³ に調製した *Methanosarcina barkeri* もしくは *Methanosaeta concilii* 懸濁液を 180 rpm で振盪させた。24 時間経過後、懸濁液の吸光度 A_{660} を測定し、次式を用いて自己凝集率 F [%] を評価した。

$$F = (1 - A_t/A_0) \times 100$$

(4)共凝集実験

消化発酵汚泥から分離した3種類の酸生成菌（タンパク質分解菌、炭水化物分解菌、脂質分解菌）と、2種類のメタン生成菌の共凝集実験を行った。10 mol/m³ NaCl aq. に各微生物を懸濁させ、吸光度 A_0 が 0.2 になるように調製した。そのうち2菌種を選択して混ぜ合わせ、懸濁液を目視と光学顕微鏡により直接観察した。

(5)メタン生成菌の固定化とメタン発酵

容積 21 ml のバイアル瓶にメタン菌叢 4 ml と 100 mol/m³ の基質溶液 1 ml を入れ、初期基質濃度を 20 mol/m³ とした。用いた基質は酢酸ナトリウムとメタノールである。このバイアル瓶をブチルゴム栓とアルミキャップでシールした後、ガス置換装置を用いてヘッドスペースのガスを N₂ (80%) - CO₂ (20%) 混合ガスに置換した。嫌気状態としたバイアル瓶は 37°C のインキュベータで培養を行った。メタンガスの発生量は、ガスクロマトグラフにより定量した。

4. 研究成果

(1)表面性状

イオン強度を変えたときの酢酸資化性メタン菌の電気泳動移動度 (EPM) の測定結果を Fig.1 に、pH を変えたときの EPM の測定結果を Fig.2 に示す。Fig.1 より、EPM の変化は Ohshima の式によく一致し、*Methanosaeta concilii* は *Methanosarcina barkeri* に比べて表面電位が低く、*Methanosarcina barkeri* の方が柔らかい粒子であることがわかった。また、Fig.2 より、*Methanosarcina barkeri* は pH 2 付近に等電点を持つ負帯電性の微生物、*Methanosaeta concilii* は pH6 付近に等電点を持つほぼ無帯電の微生物であることが分かった。一般に、微生物表層には、カルボキシル基、リン酸基、アミノ基などの解離基が存在し、中性領域では、カルボキシル基、リン酸基が解離して負に帯電している。したがって、*Methanosaeta concilii* は中性領域でほとんど帯電していない特徴的な微生物であることがわかった。また、ATR-FTIR 分析により、*Methanosaeta concilii* 表層のカルボキシル基は、他の菌体よりも少ないことが分かった。このことが、*Methanosaeta concilii* の表面電位が小さい要因の一つと推察される。

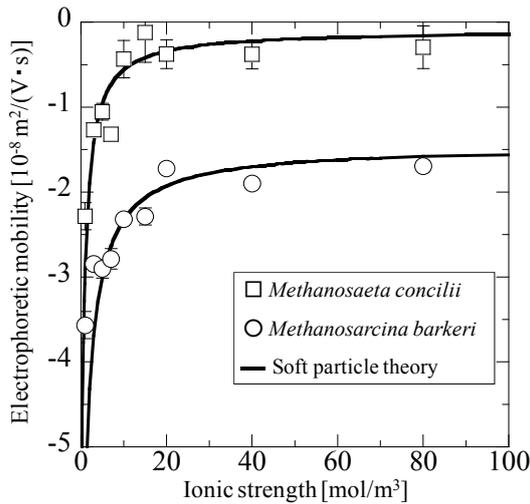


Fig.1 Change in the EPM of acetate-utilizing methanogens as a function of ionic strength.

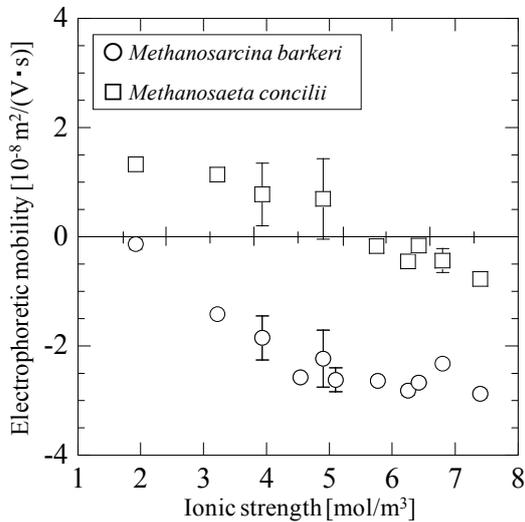


Fig.2 EPM of acetate-utilizing methanogens as a function of solution pH.

嫌気性微生物と固定化担体の接触角測定結果より算出した各種表面張力を Table 1 に示す。表には、同種の菌体が付着したときの自由エネルギー変化 ΔG の計算値も示した。これより、*Methanosarcina barkeri* は疎水性、それ以外の *Methanosaeta concilii* と酸生成菌（タンパク質分解菌、炭水化物分解菌、脂質分解菌）は親水性であることが分かった。また、竹炭は疎水性、アルミナは親水性であることも確認された。

(2) メタン生成菌の自己凝集

菌体懸濁液のイオン強度を変えたときの酢酸資化性メタン菌の自己凝集率を Fig.3 に示す。菌体懸濁液のイオン強度の増加とともに *Methanosarcina barkeri* の自己凝集率は増加するが、*Methanosaeta concilii* はほぼ一定であることが分かった。

一方、コロイド科学の分野において、コロイドの凝集・分散の評価によく用いられる

Table 1 Surface tensions of microbes and free energy of interactions between the same species.

Cell Support	Surface tension [mJ/m^2]					ΔG^{Total} [mJ/m^2]
	γ^{LW}	γ^+	γ^-	γ^{AB}	γ^{Total}	
<i>Methanosarcina barkeri</i>	23.9	1.62E-02	16.9	1.05	24.9	-18.6
<i>Methanosaeta concilii</i>	27.1	2.95E-05	28.0	5.74E-02	27.1	4.25
Amylolytic bacteria	17.9	9.33	47.8	42.3	60.2	14.5
Proteolytic bacteria	21.3	6.29	54.2	36.9	58.2	23.5
Lipolytic bacteria	25.3	4.04	30.0	22.0	47.3	4.98
Bamboo charcoal	38.9	1.14	12.9	7.67	46.6	-28.1
Alumina	48.7	0.18	56.7	6.39	55.1	35.2

*Wa: Water, Fo: Formamide, Di: Diiodomethane

DLVO 理論を用いて、酢酸資化性メタン菌の表面性状の実測値に基づいて評価を行った。その結果、*Methanosarcina barkeri*、*Methanosaeta concilii* はともに、イオン強度が増加すると、自己凝集率も増加すると予測され、*Methanosaeta concilii* の実験結果とは一致しないことが分かった。上述のように、*Methanosaeta concilii* は親水性であるため、菌体の付着が生じても安定的に付着できないためと推察される。このことは、メタン発酵の中核を担うメタン生成菌 *Methanosaeta concilii* は、単独ではグラニュールを形成し難いこと示唆しており、UASB リアクターで用いられるグラニュールの形成には、それらの形成を促進する物質が発酵槽内に存在することを示唆している。

(3) メタン生成菌と酸生成菌の共凝集

メタン生成菌と酸生成菌の共凝集実験を行った結果、たんぱく質分解菌と *Methanosarcina barkeri* が迅速に凝集することを発見した (Fig.4)。写真より、非常に大きなフロックができていることが確認でき、*Methanosarcina barkeri* の小さな凝集体をたんぱく質分解菌が接着剤の働きをするように凝集物を形成していることが確認できた。しかし、これらの表面性状の測定結果に基づいた DLVO 理論によると、両者は付着しないことが分かった。さらに、両者の付着による表面自由エネルギー変化も正の値となることから、両者は物理化学的に付着しないことが分かった。今回集積培養した酸生成菌が生成するバイオガスの成分をガスクロマトグラフで分析したところ、たんぱく質分解菌のみ水素を発生することが分かった。*Methanosarcina barkeri* は酢酸塩に加えて水素も資化できるメタン生成菌であることから、メタン発酵槽内において水素伝達を効率よく行うために、生物学的相互作用により凝集が促進されたものと推察される。このことより、本研究で分離したたんぱく質分解菌は、消化発酵槽内における生育状態を制御することによって、発酵槽内における迅速なグラニュール形成によるメタン生成古細菌の高密度を行うための微生物凝集剤（バイオサーファクタント）としての利用が期待できる。

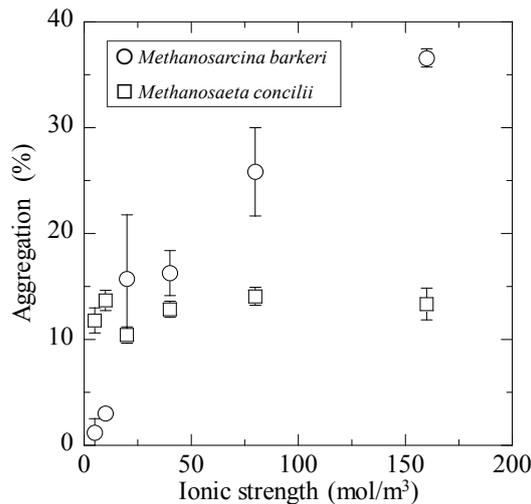


Fig.3 Aggregation ratio of acetate-utilizing methanogens as a function of ionic strength.

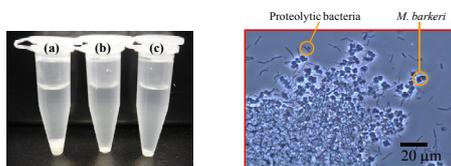


Fig.4 Rapid coaggregation test of acetate-utilizing methanogens and acidogens. Either (a) proteolytic (b) amylolytic or (c) lipolytic bacteria were added to *Methanosarcina barkeri*.

(4)メタン生成菌の担体への固定化

微生物を固定化した担体を用いてメタン発酵したときのメタンガス発生量の経時変化について酢酸塩を基質としたときの実験結果を Fig.5 に示す。固定化担体として竹炭を用いた時、メタンガスの発生が観察されたが、アルミナを用いた時、メタンはほとんど発生しないことが分かった。また、固定化担体の表面を電子顕微鏡により観察したところ、竹炭表面には鞘状の *Methanosaeta* 属が多く付着しているのに対して、アルミナ表面には微生物がほとんど付着していないことが分かった。これらの結果は、メタン生成菌は竹炭表面にのみ固定化されたことを示唆している。

メタン生成菌もしくは酸生成菌が固定化担体に付着したときの自由エネルギー変化の計算値を Table 2 に示す。これより、メタン生成菌と脂質分解菌は竹炭に付着し易いことが分かった。一方、メタン生成菌と酸生成菌はアルミナに付着困難であることが分かった。消化発酵槽中のイオン強度は高いことから静電的相互作用はほとんど働かないことを考慮すると、菌体の固体表面への付着は、菌体を固定化する担体の表面張力で制御できることが明らかとなった。

竹炭に固定化された微生物を長期培養したときの SEM 写真を Fig.6 に示す。竹炭上には鞘状の *Methanosaeta* 属が優占種となっており、コロイド科学的側面から得られた上記の推察を裏付ける結果である。

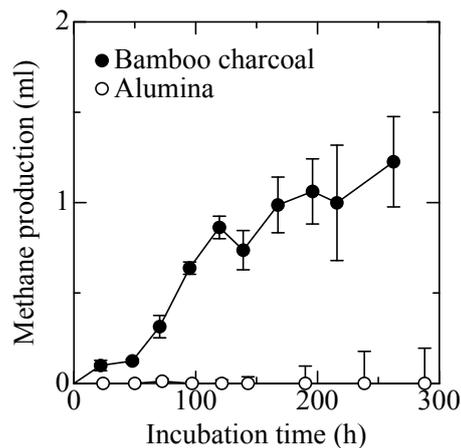


Fig.5 Methane production using immobilized microbes with incubation time.

Table 2 Free energy of interactions between microbe and support.

Cell	Bamboo charcoal			Alumina		
	ΔG^{LW}	ΔG^{AB}	ΔG^{Total}	ΔG^{LW}	ΔG^{AB}	ΔG^{Total}
<i>Methanosarcina barkeri</i>	-0.68	-21.8	-22.5	-1.01	15.7	14.7
<i>Methanosaeta concilii</i>	-1.68	-12.8	-14.4	-2.47	27.3	24.8
<i>Amylolytic bacteria</i>	1.37	9.1	10.4	2.02	27.2	29.2
<i>Proteolytic bacteria</i>	0.16	11.0	11.2	0.24	34.0	34.2
<i>Lipolytic bacteria</i>	-1.13	-5.4	-6.53	-1.67	19.1	17.4

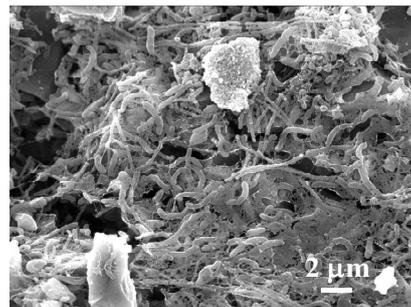


Fig.6 FE-SEM image of immobilized microbes on bamboo charcoal.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- ① T. Nomura, T. Nagao, A. Yoshihara, H. Tokumoto, Y. Konishi, Selective Immobilization of Aceticlastic Methanogens to Support Material, KONA Powder and Particle Journal, 26, 246-253, 2008, 無
- ② T. Nomura, A. Yoshihara, T. Nagao, H. Tokumoto and Y. Konishi, Effect of the Surface Characteristics of *Methanosarcina barkeri* on the Immobilization to Support Materials, Advanced Powder Technology, 18, 489-501, 2007, 有
- ③ 野村俊之、コロイド科学的手法による微生物の付着制御、粉体工学会誌、44、122-126、2007、無
- ④ 野村俊之、長尾孝徳、吉原章仙、徳本勇人、小西康裕、酢酸資化性メタン菌の担体への選択的固定化、粉体工学会誌、43、653-659、2006、有

〔学会発表〕（計 5 件）

- ① T. Nomura, Adhesion Phenomena of Biological Cells and Their Applications, The 17th Nisshin Engineering Particle Technology International Seminar (NEPTIS-17), 2008/12/8, Nara, Japan
- ② T. Nomura, Colloidal behavior of acetate-utilizing methanogens in the anaerobic digester, 5th International Conference Interfaces Against Pollution 2008 (IAP 2008), 2008/6/2, Kyoto, Japan
- ③ T. Nomura, Adhesion and Coadhesion Phenomena of Acetate-Utilizing Methanogens, The Ian Wark Research Institute Nano-interface Workshop, 2007/12/7, Adelaide, Australia
- ④ T. Nomura, Effects of Surface Properties of Bacterial Cells on Microbial Adhesion, 14th Advanced Particle Handling Science Seminar: Young Researchers Symposium, 2007/12/4, Melbourne, Australia
- ⑤ T. Nomura, Investigation on Early Stage of Microbial Adhesion using the Extended DLVO Theory, 8th UK Particle Technology Forum 2007, 2007/9/26, Cambridge, UK

〔図書〕（計 1 件）

- ① 野村俊之（分担執筆）、シーエムシー出版、亜臨界水反応による廃棄物処理と資源・エネルギー化、2007年、182-187

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 俊之 (NOMURA TOSHIYUKI)

大阪府立大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：00285305