

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月7日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658199

研究課題名（和文） 繊維質有機廃棄物を資化する水素生成マイクロフローラの菌叢制御

研究課題名（英文） Control of hydrogen producing microflora for assimilating fibrous organic waste

研究代表者

東城 清秀 (TOJO SEISHU)

東京農工大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：40155495

研究成果の概要(和文):本研究では、微生物による安定した水素製造の技術を進展させるため、水素生成能の高い複合微生物群（マイクロフローラ）を人為的に形成して、繊維質有機性廃棄物を原料にした水素生産に利用することを目的とした。熱ストレス処理により *Clostridium* 属と *Bacillus* 属の菌叢を優占化し、さらに HRT、窒素濃度、温度条件を変えて水素発酵に資する菌叢を制御する手法について検討した。その結果、熱ストレス処理による優占化と発酵温度の調節は繊維質有機廃棄物を資する水素生成マイクロフローラの菌叢制御に有効であるとの見通しが得られた。

研究成果の概要(英文): This study aims to form artificially complex microbial communities with high hydrogen producing microflora in order to develop a technology of hydrogen production by assimilating fibrous organic waste. The complex microorganisms dominated by the heat stress treatment were studied on the hydrogen-producing ability, metabolites and the flora control. The heat stress treatment of the microbial source and the temperature control of the hydrogen fermentation might be effective to form the hydrogen producing microflora.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農業工学・農業環境工学

キーワード：菌叢制御・水素生産・マイクロフローラ・優占化・微生物ストレス

1. 研究開始当初の背景

地球温暖化など深刻化するエネルギー・環境問題を解決するため、バイオマス利用研究が進められている。バイオマスのカーボンニュートラルの特徴を活かすためには、燃焼時に水だけしか生成しないクリーンなエネルギーキャリアである水素の生産技術の開発が望まれる。

微生物を用いた水素製造研究では、水素生成に優れた水素生成細菌を単離し、生成速度の向上や安定的な水素生成法が検討されてきた。しかし、単離菌を用いた発酵法はいま

だ安定した水素生産技術となっていない。これに対して、マイクロフローラ(複合微生物群)による水素製造は、多様な有機性廃棄物を原料として利用でき、原料の負荷変動に対して安定で、原料の殺菌も不要であるなど、単離菌とは異なる優位性が報告されている。廃棄処分される有機性廃棄物から水素を抽出する手法は、膨大な有機性廃棄物を抱えている食品業界や畜産廃水処理の分野での利用が期待されている。また、今後バイオエタノール製造工程で排出される発酵残渣を水素発酵原料として利用することも想定される。

2. 研究の目的

本研究では、水素生成能の高い優良な水素生成菌を簡便に優占化する手法を開発し、難分解性の有機性廃棄物を原料として水素発酵を安定的に実現できる有用なマイクロフローラを人為的に構成し、菌叢を制御する手法の開発を目的とする。本研究期間では、繊維質バイオマスを効率的に資化できるマイクロフローラを作出すべく、水素生成菌とその共生菌の構成を明らかにするとともに、マイクロフローラによる安定的な発酵を維持する菌叢制御手法を検討する。

3. 研究の方法

(1) 実験装置および分析方法

温度調節機能を備えた水槽内に、有効容量 2L の広口ガラス製発酵槽を設置して、実験に使用した。密閉できる発酵槽の蓋にはガス排出口、発酵液排出口、基質供給口および攪拌装置を設けた (図 1)。発酵液の排出および基質の供給にはマイクロチューブポンプ (東京理器器械、MP-1000) を用いた。温度調節器 (KEYENCE、TF4-10V) を用いて、発酵温度を設定温度 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ で制御した。また、発酵槽の攪拌機は 250 rpm で、発酵液の排出前と基質供給後に攪拌した。

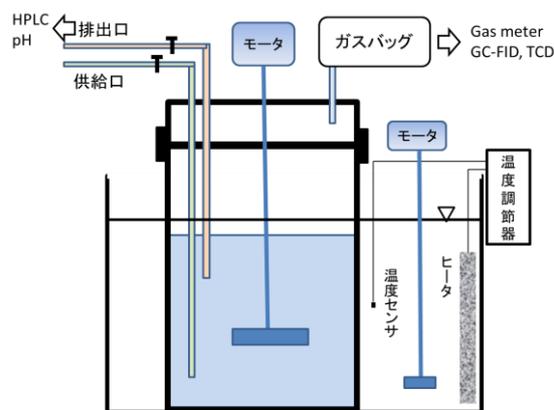


図 1 水素発酵実験装置の模式図

ガス生成量はガスタイトシリンジ (最小単位 50 mL) で計量し、ガス組成はガスクロマトグラフ (島津、GC-14A, 14B) で分析した。発酵液の有機酸 (VFA) 濃度を調べるため、採取液を遠心分離し、シリンジフィルタで濾過してから測定に供試した。分析では HPLC (島津、UFLC Prominence) を使用し、乳酸、酪酸、酢酸、プロピオン酸、ギ酸の 5 種類を測定した。

微生物群集構造の解析では、PCR-SSCP 法を用いて、次の手順で実施した。①試料からの DNA 抽出、②1% アガロースゲルでの検定、③PCR による DNA の増幅、④2% アガロース

ゲルによる検定、⑤PCR 産物の精製、⑥SSCP によるバンドのプロファイリング、⑦切り出したバンドからの DNA 溶出、⑧Big Dye Terminator を用いたシーケンシング、⑨BLAST による塩基配列検索。

(2) 微生物源と微生物ストレス処理

本実験では、微生物源として、主原料を牛糞とするメタン発酵消化汚泥 (東京農工大学農学部付属施設)、牛糞堆肥化施設汚泥 (東京農工大学農学部付属施設)、下水処理施設返送汚泥 (水再生センター) を用いた。

微生物ストレスとして、①熱ストレスおよび②凍結融解ストレスを用いた。予備的な発酵実験に供試した結果、メタン発酵消化汚泥に熱ストレス処理を施して得られたマイクロフローラが水素発酵に優れていたことから、以下の本実験ではこの材料を使用することとした。

熱ストレス処理は次のように行った。消化汚泥を薄く堆積させたホウロウバットを電気乾燥炉内で 105°C 、2 時間加熱して、乾燥させた。熱ストレス処理後は冷凍保存バッグに入れて 4°C にて冷凍保存し、実験には熱ストレス処理した試料をミルで粉碎し、2 mm 目篩を通過した粉碎物をマイクロフローラとして供試した。

発酵槽には、グルコースを 4 gCOD/L で添加した栄養培地 1500 mL と、微生物源として熱ストレス処理を施した試料を 48 gDM 投入した。また、緩衝剤として KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 を混合した。

(3) HRT による菌叢制御実験の方法

HRT による菌叢制御実験では、HRT を 1 日 (HS 区) と 4 日 (HL 区) とする実験区を設けた。実験区の基質供給量と発酵液排出量は表 1 に示すとおりで、8 時間毎に 1 日 3 回行った。実験は発酵開始 72 時間で、終了とした。

表 1 HRT による菌叢制御実験の条件

実験区	HRT (day)	1 回の供給・排出量 (mL)	1 日の供給・排出回数 (回)
HS 区	1	500	3
HL 区	4	125	3

(4) 窒素濃度による菌叢制御実験の方法

栄養培地の窒素濃度を表 2 のように変えて、窒素濃度による菌叢制御実験を行った。CS 区では、 NH_4HCO_3 濃度を 2000mg/L とし、Ch 区では 1000mg/L とした。発酵開始時には両区とも NH_4HCO_3 濃度 2000mg/L の培地を用い、

発酵開始 24 時間以降から投入する培地を変化させた。本実験では HRT を 1 日とし、1 回の基質供給量および発酵液排出量を 500 mL とし、8 時間毎に 1 日 3 回行った。実験は発酵開始 104 時間で終了とした。

表 2 窒素濃度による菌叢制御実験の条件

実験区	NH ₄ HCO ₃ 濃度 (mg/L)	1 日の投入及び採取回数 (回)	HRT (day)
CSt 区	2000	3	1
CHa 区	1000	3	1

(5) 温度による菌叢制御実験の方法

メタン発酵消化液を微生物源として、採取した消化液を恒温水槽で 95°C、20 分水浴させる処理を施し、供試マイクロフローラを選抜した。有効容積 900mL の密閉容器を発酵槽とし、種汚泥 150mL、基質として微結晶セルロース 20gCOD/L、栄養培地 300mL を投入して、バッチ実験を実施した。発酵温度を 37°C、55°C、80°C の 3 条件に設定して、最大 60 時間発酵させた。

4. 研究成果

(1) HRT による菌叢制御

メタン発酵消化液に熱ストレス処理を施して優占化したマイクロフローラを用いて発酵実験を実施したところ、バイオガス生成量、水素生成速度、水素収率を比較すると全て HL 区の方が HS 区より高い結果であった(図 2)。HS 区は HL 区より多くの発酵液を採取したことにより、系外に排出された微生物が多かったことによると考えられた。

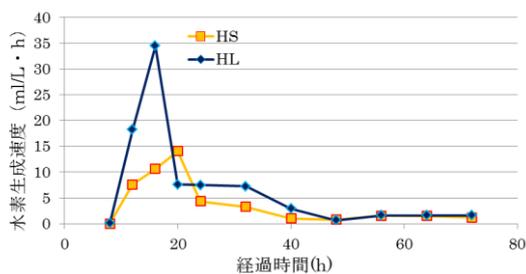


図 2 水素生成速度の経時変化

このことは、バクテリアの SSCP バンドプロファイルの比較からも、HL 区に比べ HS 区のバンドの種類が少ないことによって確認された。HS 区では、系外にウォッシュアウトする微生物量が発酵で増殖する微生物量より多くなって、微生物叢が単純化していくものと考えられた。

SSCP バンドプロファイルから取り出してシーケンス後に、相同性検索した結果、*C. acetobutylicum* は比較的増殖が早く、HRT に影響されにくいことが判明した。また、増殖速度が遅いものの水素生成能が高い *Clostridium* 属 (名称未定) も推定された。

図 3 に HL 区の水素生成能および pH の経時変化を示す。本実験区において酢酸と酪酸が主な VFA であり、実験中盤 (HS 区では 40 時間、HL 区では 48 時間) から酪酸濃度を酢酸濃度が上回った。HS 区では発酵開始 32 時間までは酪酸生成が優位であるため酪酸/酢酸比 (B/A 比) は 1.0 より高い値を示したが、40 時間以降は 1.0 を下回った。HL 区では 40 時間までは B/A 比は増加傾向であったが、それ以降は減少した。B/A 比が高いほど水素発酵は活発であるとの報告があるが、本研究では異なる結果であった。

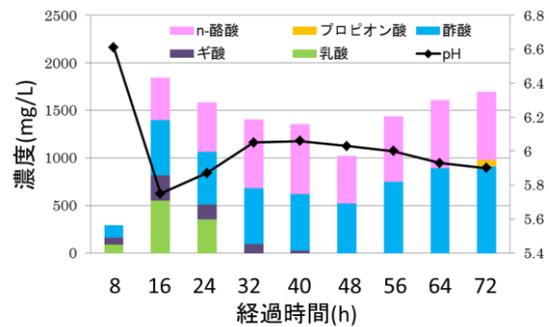


図 3 HL 区の有機酸濃度の変化

(2) 窒素濃度による菌叢制御

栄養培地の窒素濃度を変えた実験では、実験開始から水素生成量は比較的安定していたが、CSt 区が発酵開始 64 時間以降減少傾向を示し、CHa 区では発酵開始 88 時間以降減少傾向を示した。この傾向は図 4 の水素収率の経時変化でも確認された。実験区のグルコース濃度の測定結果から、過剰な基質負荷量による発酵不良が発生しておらず、ガス生成よりも VFA 生成が活発に行われたため水素生成量が減少したと考えられた。

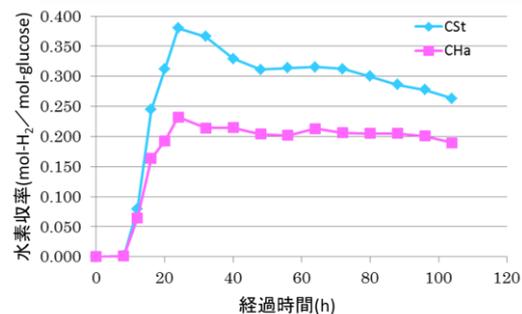


図 4 窒素濃度による水素収率の変化

CSt 区では酢酸と酪酸が主要な VFA であるのに対し、CHa 区では酢酸濃度が徐々に減少し乳酸濃度が上昇することが確認された。プロピオン酸は、CSt 区では発酵開始 80 時間、CHa 区では発酵開始 64 時間から生成が確認された。CSt 区における pH は初期 pH6.5 からの変化は小さいが、CHa 区では 8 時間おきに約 0.1 ずつ減少し約 4.70 にまで下がった。Total VFA 濃度に大きな違いは見られないため、この pH の差は主要な有機酸の違いによるものと考えられた。

図 5 に各実験区の B/A 比の経時変化を示す。CSt 区では B/A 比の大きな変化はなく 1.0 よりも低い値で推移した。一方、CHa 区では酪酸の蓄積および酢酸の減少により B/A 比が増加した。先行研究の結果と異なる理由としては次の 2 つが挙げられる。1 つは、本実験では微生物源に熱ストレス処理を施しているため、先行研究と初期菌叢が異なることに起因するのではないかと考えられた。もう 1 つは、発酵の短い HRT で、これが微生物群集構造あるいは発酵経路に影響を与えたのではないかと考えられた。

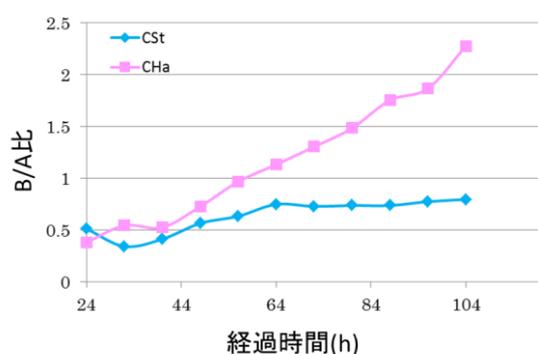


図 5 栄養培地の窒素濃度の B/A 比への影響

遺伝子解析の結果、実験開始 24 時間では、*C. bifementans*、*C. butyricum* が優占化していることが判明した。*C. butyricum* は酪酸生成を伴う水素発酵が知られており、発酵開始 48 時間以前の酪酸の蓄積はこの菌の代謝によるものと考えられた。*Bacillus licheniformis* は CSt 区の 96 時間後、CHa 区の 48 時間後に確認された。*Bacillus* 属は *Clostridium* 属と同様に加熱処理に対して芽胞を形成することが知られている。また、CHa 区の 96 時間では *Bacillus coagulans* の近縁種が確認された。

(3) 温度による菌叢制御

高温熱ストレス処理を行ったマイクロフローを用いて、温度条件を変えて、発酵実験を行った結果、55°Cの実験区で生成された水

素量が最大であった。また、55°Cの実験区で著しい pH の低下が観察された。遺伝子解析の結果、*Clostridium thermoCELLUM* が観察され、今回の優占化と温度制御により、セルロースを資化できる水素生成菌が優占化されたものと考えられた。

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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 常川 哲央、帖佐 直、東城清秀：水素発酵の HRT が微生物群集構造に及ぼす影響。農業環境工学関連学会 2012 年合同大会。2012 年 9 月 14 日。栃木県宇都宮市
- ② 常川 哲央、帖佐 直、東城清秀：熱処理マイクロフローを用いた連続水素発酵における微生物群集構造の変化。2011 年度農業施設学会大会。2011 年 8 月 26 日。香川県高松市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東城 清秀 (TOJO SEISHU)
東京農工大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：40155495

(2) 研究分担者

帖佐 直 (CHOSA TADASHI)
東京農工大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：10355597

(3) 連携研究者

丹生谷 博 (NYUNOYA HIROSHI)
東京農工大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：60135936

(4) 研究協力者

常川 哲央 (TSUNEKAWA NORIO)
東京農工大学・大学院農学府・修士学生