

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780067

研究課題名(和文) 通電式水素・メタン醗酵の検討

研究課題名(英文) Investigation of bioelectrochemical hydrogen and methane fermentations

研究代表者

佐々木 建吾 (Sasaki, Kengo)

神戸大学・自然科学系先端融合研究環重点研究部・特命助教

研究者番号：50558301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：有機性廃棄物から水素を回収する技術が確立できれば持続可能な社会の構築に寄与することができる。水素発酵は高効率に水素を回収できるが安定性に欠ける。電気化学システムを用いて微弱の電流を流して水素発酵を安定化できる事を見出した。通電式水素発酵では3電極方式を採用しており、電極として比較的安価な炭素電極を使用して、作用電極上の電位を-0.9V(vs. Ag/AgCl)に設定している。微生物学的な知見として、メタン菌を抑制し水素生成に好適である酢酸/酪酸の生成が優先化している事を明らかにした。さらに、*Corynebacterium glutamicum*の増殖時に乳酸収率を高められる事を確認した。

研究成果の概要(英文)：The technology to recover hydrogen from organic solid waste can contribute to construction of sustainable society. However, unstability is the problem in hydrogen fermentation although it can efficiently recover hydrogen. It was found that the bioelectrochemical reactor can stabilize hydrogen fermentation by inputting low level of the current. Bioelectrochemical reactor utilize three electrode system using carbon electrode that is relatively cheap. The potential on the working electrode was regulated to -0.9V (vs. Ag/AgCl). The bioelectrochemical hydrogen fermentor inhibited methanogenic archaea and dominated acetate/butyrate fermentation, which is favorable for hydrogen production. In addition, bioelectrochemical reactor increased lactate yield in growing *Corynebacterium glutamicum*.

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：微生物生態学 電気培養 水素 複合微生物系 乳酸

1. 研究開始当初の背景

有機性廃棄物から高効率に水素を回収できる事ができれば持続可能な社会の構築に貢献できる。複合微生物系を用いた水素発酵は、他の微生物プロセスと比べて水素生成速度が格段に高いために有用な方法と考えられている。しかし、水素発酵を運転するためには従来は低 pH、および短い滞留時間が必要となるが、低 pH であるがために水素発酵は不安定である。なぜなら、低 pH 条件は乳酸発酵が起こりやすく、乳酸発酵では水素生成は抑制されてしまう。そのために、水素発酵をより安定的に制御するための技術の確立が望まれている。

一方、電気化学システムは通電により微生物の代謝を制御できる方法として注目されてきた。しかし、電気化学システムを単一の微生物に適用した事例は多いが、複合微生物系に適用した事例は我々の研究以外、乏しかった。また、工業的アミノ酸生成菌である *Corynebacterium glutamicum* についても電気化学システム下で培養した事例は乏しかった。*C. glutamicum* は乳酸を生成する事が知られており、電気培養下での増殖や乳酸生成に興味を持たれた。

2. 研究の目的

(1) 不安定な水素発酵に対して、電気化学システムを用いて制御する方法を確立する。

(2) 電気培養下にて、水素生成を担っている複合微生物系を明らかにして、電気化学システムが水素発酵を制御する要因を見出す。

(3) 電気化学システムの *C. glutamicum* の増殖・乳酸生成に対する影響を調べる。

3. 研究の方法

・電気培養

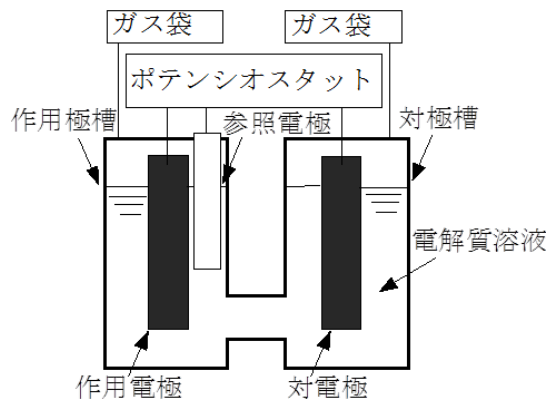


図1 使用した3電極方式の発酵槽

3電極方式を採用している。ポテンシオスタットを用いて、作用電極上の電位を

-0.9V(vs. Ag/AgCl)( : 水素発酵)もしくは-0.6V( : 乳酸生成)に制御した。電極として比較的安価な炭素電極を使用した。乳酸生成時には、0.2mM AQDS(anthraquinone 2,6-disulfonate)を添加して、作用電極と対電極の間をプロトン交換膜で仕切った。

・水素発酵

メタン発酵に使用していた汚泥を種汚泥として、55 で培養した。pHは6.5に制御した。グルコースを炭素源としてグルコース2g/日の負荷で供給した。

・乳酸生成

*C. glutamicum* を初期 OD<sub>600</sub> を 0.1 として 30 で増殖させた。110mM のグルコースを添加した。初期 pH を 7.1 に調整して、NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> を添加して pH の低減を防いだ。

4. 研究成果

(1) 通電式水素発酵の運転

3電極方式にて作用電極上の電位を-0.9V(vs. Ag/AgCl)に制御して初期 pH を 6.5 に調整した場合において、水素発酵を構築する事に成功した。対照として行った通電していない発酵槽ではメタン生成が優先しており、通電によりメタン生成を抑制して水素生成を優先にしている事が明らかとなった(表1)。廃出液中の pH<sub>out</sub> は通電式発酵槽および非通電式発酵槽ではそれぞれ 6.2 および 6.3 であり差は認められず、乳酸発酵である pH5 付近に比べると高かった。以上より、本 pH 条件は比較的が高いために安定性を増す事に成功した。

表1 通電式発酵と非通電式発酵槽の比較

	pH <sub>out</sub>	メタン生成 (mg-C/L/日)	水素生成 (mg-H/L/日)
通電式	6.2	19.8	12.6
非通電	6.3	239.3	0.2

通電式発酵槽と非通電式発酵の有機酸の組成を比較した(表2)。その結果、通電する事により酪酸の生成が増加している事が明らかとなった。酢酸/酪酸発酵において水素生成が効率よく生成する事が報告されている。以上より、通電による電位制御により酢酸/酪酸発酵を優先化している事が示唆された。

表2 有機酸の組成

	酢酸 (mM)	プロピオン酸 (mM)	酪酸 (mM)
通電式	12.3	14.0	24.9
非通電	9.4	15.2	6.7

(2) 通電式水素発酵槽中の微生物叢解析

定量的 PCR(polymerase chain reaction) 解析より、通電式発酵槽中の複合微生物系中にメタン生成菌が検出されなかった(表3)。しかし、非通電式発酵槽ではメタン菌が検出された。メタン菌の中でも水素資化性メタン生成菌は水素を利用できる事が報告されている。以上より、水素を消費するメタン菌の除去が効率的な水素生成に寄与している事が示された。これは対電極上の電位が 2.4V(vs. Ag/AgCl)に維持されており、高い電位が低電位を好むメタン菌の除去に寄与したと考えられる。

表3 メタン菌の定量 PCR 解析結果

	メタン菌 (x10 <sup>7</sup> コピー/mL)
通電式	48
非通電	-

非通電式発酵槽中の古細菌について解析した結果、水素資化性メタン菌である *Methanobacterium formicicum* が検出された。しかし、通電式発酵槽中からはメタン菌は検出されず、上記の結果を裏付けるものとなった。

通電式発酵槽中の細菌について解析した結果、優先した菌の中に *Defulviitoga tunisiensis* の近縁種が検出された。*D. tunisiensis* はグルコースを消費して水素生成を行う事が報告されており、本菌が水素生成の主要な役割を担っていたと推察される。さらにマイナーな種としては *Clostridium thermopalmarium* の近縁種が検出された。*C. thermopalmarium* もグルコースより水素を生成する事が報告されており、本菌も水素生成に対して役割を担っていたと推察される。

### (3) 通電の *C. glutamicum* に対する効果

*C. glutamicum* 増殖時に 0.2mM AQDS を添加して -0.6V(vs. Ag/AgCl) を印加した。その結果、通電式発酵槽中での *C. glutamicum* の比増殖速度は 0.18/時間であったのに対して、非通電式発酵槽中では 0.23/時間に増加していた。以上の結果より、通電により *C. glutamicum* の増殖が抑制される事が明らかとなった。*C. glutamicum* のグルコース消費速度も非通電式発酵槽中の 10.3 mM/時間から通電式発酵槽中では 6.4 mM/時間に減少しており、増殖の減少を裏付ける結果であった。

また、グルコースからの乳酸収率について通電式発酵槽と非通電式発酵槽について比較した結果、通電により 24 時間後に乳酸収率が 1.10 から 1.62 に上がっていた(表4)。以上の結果より、*C. glutamicum* 増殖時にグルコースからの乳酸の収率が増加する事が明らかとなった。なお、コハク酸および酢酸の収率は通電により、減少する結果となった。また、増殖後の *C. glutamicum* を高濃度に詰めて上記の条件で印加しても残念ながら乳

酸収率は変化しなかった。

表4 *C. glutamicum* の乳酸収率

	乳酸収率 (mol/mol-グルコース)
通電式	1.62
非通電	1.10

溶存酸素量を比較した結果、通電式発酵槽と非通電式発酵槽において差は認められなかった。以上より、-0.6V に作用電極上の電位を設定して還元電流を流す事により、電子が電子メディエーターである AQDS を介して *C. glutamicum* に渡され、還元力として利用されて乳酸生成に寄与したものと考えられるが、今後の解明が待たれる。

### (4) まとめ

通電式水素発酵は微弱の電流を流す事により、水素発酵を安定化できる事が明らかとなった。水素発酵は複合微生物系により行われており、系内の水素消費を行う菌群を通電により除く事ができており、通電式発酵の複合微生物系への有用性を示す事に成功した。

一方、単菌に対する効果については増殖時のみしか効果は認められず、さらなる改良が必要となる。今後は、通電に加えて膜プロセスを適用する事により微生物発酵を最適化していきたい。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者には下線)

[雑誌論文](計 4件)

Sasaki K., Tsuge Y., Sasaki D., Kondo A. Increase in lactate yield by growing *Corynebacterium glutamicum* in a bioelectrochemical reactor. Journal of Bioscience and Bioengineering, 117(5) pp. 598-601. 2014 「査読有」

佐々木建吾, 近藤昭彦, 「Part II 1章 バクテリアによる水素発酵および電気化学の適用」, 日本化学会 編 (株)化学同人, 次世代のバイオ水素エネルギー - 再生可能エネルギーの創出と変換をめざして CSJ Current Review 15, (2014), pp. 44-50 「査読無」

Sasaki K., Morita M., Sasaki D., Ohmura N., Igarashi Y. The membraneless bioelectrochemical reactor stimulates hydrogen fermentation by inhibiting methanogenic archaea. Applied Microbiology and Biotechnology, 97(15) pp. 7005-7013. 2013 「査読有」

佐々木建吾, 佐々木大介, 森田仁彦, 五十

嵐泰夫, 近藤昭彦, 特集「電気化学システムを用いた模擬生ごみからの水素発酵の制御」, 一般社団法人 水素エネルギー協会(HESS) 会誌, 水素エネルギーシステム Vol. 38, No. 1, (2013), pp. 33-37 「査読無」

〔学会発表〕(計 4件)

佐々木建吾・柘植陽太・佐々木大介・近藤昭彦「*Corynebacterium glutamicum* 増殖時の電気培養下での乳酸生成」『日本農芸化学会 2014 年度大会』, 明治大学, 2014 年 3 月 27-30 日

Sasaki K. 「Application of membrane separation technology on ethanol fermentation」『Asian Congress on Biotechnology 2013』, India Habitat Centre, New Delhi, India, (December 15-19, 2013)

佐々木建吾・森田仁彦・佐々木大介・松本伯夫・大村直也・石井正治・五十嵐泰夫「電気化学システムにより制御した水素発酵槽内の微生物叢」『日本生物工学会 2012 年度大会』, 神戸国際会議場, 2012 年 10 月 23-26 日

佐々木建吾・佐々木大介・森田仁彦・五十嵐泰夫「電気培養によるメタン発酵微生物群集の制御」『微生物生態学会 2012 年度大会』, 豊橋技術科学大学, 2012 年 9 月 19-22 日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ：  
<http://www2.kobe-u.ac.jp/~akondo/sasaki.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者  
佐々木 建吾 (SASAKI, Kengo)  
神戸大学・自然科学系先端融合研究環重点研究部・特命助教  
研究者番号：50558301

(2)研究分担者  
特になし

(3)連携研究者  
特になし