

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450370

研究課題名(和文) デンプン含有廃液のブースト効果を利用したバイオガス生産系の確立

研究課題名(英文) Biohydrogen production from wheat straw enhanced by starch addition

研究代表者

大槻 隆司(OHTSUKI, Takashi)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号：70313781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：クロストリディウム属細菌を用いて麦ワラから水素生産を行う際に促進剤役としてのデンプン添加が水素生産性に与える影響について調べた。検討したクロストリディウム属細菌3株では、麦ワラにデンプンを添加することで、麦ワラ由来の水素はデンプン非添加に比して最大4倍の水素が生産され、デンプン添加により相乗的に水素生産性が増大することを示した。

*Clostridium cellulovorans*では、デンプン添加により総アミラーゼ、総セルラーゼの活性は最大19.2倍まで増大するが麦ワラ中のホロセルロース消費量は増大せず、むしろ資化した糖の細胞内代謝が変化し、水素生産性が著しく増大していることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：Cells of *Clostridium butyricum*, *C. cellulovorans*, *C. perfringens* were grown on GS medium containing 1% wheat straw powder, and the enhancing effect of starch addition on hydrogen production was investigated. Hydrogen production by all *Clostridia* tested, derived from wheat straw, were reached 4-fold volume compared to the culture without starch addition.

Activities of amylases and cellulases from *C. cellulovorans* culture with starch addition were increased up to 19.2-fold than the culture without starch addition, however, degradation of holocellulose in wheat straw was not enhanced. These results strongly suggested that sugar metabolism of *C. cellulovorans* would be altered to high hydrogen-yielding state.

研究分野：生物工学、応用微生物学

キーワード：水素生産 クロストリディウム 廃棄バイオマス デンプン 麦ワラ 相乗生産促進効果

## 1. 研究開始当初の背景

石油資源枯渇や地球温暖化への危惧、さらには 2011 年に発生した東日本大震災に端を発する脱原発の必要性から、再生可能資源であるバイオマスの長期的視野に立った活用、特にエネルギーへの変換の重要性が高まり、現在に至っている。当時までに多く検討されていたバイオマス由来燃料はエタノールとディーゼル燃料であるが、どちらも食糧作物を原料として生産されていたため、食糧供給との競合が起こり、食料価格の高騰を招くなど、本末転倒ともいえる状況であった。本研究代表者は、従来より、生ゴミや下水中有機物、あるいは農林水産廃棄物といった、経済的に価値が乏しく廃棄されているバイオマスから燃料を生産するべきであると主張し、利用が困難なバイオマスの分解・変換研究に取り組んできた<sup>1)</sup>。近年、ようやく世界中でその重要性が認知されるようになり、燃料物質生産においては廃棄物をメタン、水素、エタノールなどに変換することが検討されているが、組成変動の大きな混合物であったり、難分解性であることから微生物発酵プロセスでの利用は困難で、実用化が進んでいないのが実状である。この点については現在に至るまで変化していない。

## 2. 研究の目的

本研究では、未利用の廃棄バイオマスから低コストで燃料物質を生産することで廃棄物排出による環境負荷を減らすとともに廃棄物中の未回収エネルギーを回収して利用することで本来の生産物の生産コストを下げる手段を見いだすことを目的とした。木本および草本の難利用性バイオマスから生物変換により有用物質を生産する手法は数多く提唱されているが、変換効率や生産速度などの点で実用化には難があるものがほとんどである。そこで本研究代表者は、易利用性ではあるがまだ十分に活用されていない廃棄バイオマスを「促進剤」として添加することで、難利用性バイオマスからの有用物質生産性を向上させる手段に着目した。本研究では、「促進剤」の役割を担う廃棄バイオマスをデンプン工場廃液、難利用性バイオマスを麦わらとして、クロストリディウム属細菌による直接資化・水素生成を利用し、定置型燃料電池による電力回収の燃料として利用するための水素を生産する研究を行うこととした。

デンプンは、食品の原料としてだけでなく、液糖や膠着材の原料としても利用される。近年ではバイオエタノールの主要原料としても消費が増大しており、世界で年間 7 千万トン以上が生産されている。馬鈴薯やキャッサバ由来のデンプン製造においてはデンプン洗浄過程において生ずる廃水中にかなりのデンプンが溶出し、この廃水からのエネルギー

一回収は重要であることからメタン発酵によるエネルギー回収がすでに検討されているが十分ではない。日本においては、デンプン工場以外に大量のデンプン含有廃水が生ずる産業として清酒や焼酎の醸造業がある。原料のコメの精米で排出される米粉の多くは米菓原料などとして活用されているが、洗米で生ずる廃液は高濃度のデンプンを含んでいる。また、外食産業においてもうどんやパスタのゆで汁には高濃度のデンプンが含まれ、「促進剤」となるデンプン廃液の供給源は豊富である。

## 3. 研究の方法

麦わらを原料とし、クロストリディウム属細菌を用いた水素発酵をモデルとして、低濃度の可溶性デンプン添加による水素生産量および収率の向上に対する効果を調査した。

### (1) 使用菌株

水素生産を行わせるクロストリディウム属細菌として、*C. butyricum* JCM7834、*C. cellulovorans* ATCC35296、*C. pefringens* JCM1290 を用いた。

### (2) 培養

植菌等の操作はすべて嫌気チャンバー内で行い、培地も加圧試験管もしくはガスクロバイアルを用いてあらかじめ窒素置換・嫌気化を行ったものを用いた。

1.0% グルコースを含む GS medium (表 1) にて一晩静置培養した菌体を同培地に 1/100 希釈で植菌して前培養を行い、OD<sub>660</sub> = 2.0 となったところで嫌気条件下で無菌的に遠心回収し、炭素源を含まない GS medium で菌体を 2 回洗浄後、再懸濁したものを初発 OD<sub>660</sub> = 0.01 となるように異なる炭素源を含む 20 ml の GS medium に植菌し、37 °C、静置にて本培養を行った。本培養の炭素源は 1.0% 麦ワラ粉末を基本とし、デンプンを添加する場合には溶性デンプンを 0.5%、1.0%、2.0% で添加した。

表 1 GS medium

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.15	g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.29	g/l
MOPS	20.9	g/l
Yeast extract	4.5	g/l
Urea	0.13	g/l
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.25	mg/l
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	12.5	μg/l
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.25	μg/l
Resazurin sodium salt	2.0	mg/l
Cysteine·HCl	1.0	g/l
	pH	7.0

### (3) 水素生成量

培養中の水素生成量は Shimadzu GC-2014 システムにて分離カラムに

Molecular Sieve 5A (3 mm ID × 3m) を用い、N<sub>2</sub>をキャリアガスとして TCD により定量した。

#### (4) 生菌数

培養中の生菌数は、培養液を適宜滅菌水にて希釈し、Reinforced Clostridial Agar (Oxoid)プレートに塗布して 37 °C で培養し生育コロニー数を計数した。

#### (5) アミラーゼ、キシラナーゼ、セルラーゼ活性

麦ワラを添加した培養においては生産されたセルロソームが麦ワラに吸着されていることから、培養液を遠心して培養上清と沈殿に分け、沈殿は蒸留水にて洗浄、遠心分離を3回繰り返し吸着酵素を回収し、吸着画分とした。培養上清および吸着画分に含まれる多糖分解酵素の活性は、50 mM リン酸カリウムナトリウム緩衝液(pH 7.0)中にて、Red-Starch、Azo-CM-Cellulose、Azo-Xylan (Birchwood) (いずれも Megazyme) を基質として反応により増大する吸光度により測定した。活性は1分間に吸光度(Red = A<sub>510</sub>、Azo = A<sub>590</sub>)を1増大させる酵素量とした。

#### (6) 残存デンプン

デンプン添加培養において、培養液中に残存するデンプン量は、培養上清を適宜蒸留水で希釈したのち3/100量のルゴール液を混合し、A<sub>660</sub>を測定することで定量した。

#### (7) 残存麦ワラ

培養後、残存している残渣はガラス濾紙にて濾過して乾重量を測定したのち、Yokoyama らの方法<sup>2)</sup>に従い、含まれるアセトン可溶物、α-セルロース、ヘミセルロース量を定量した。また含有リグニン量は Klason 法<sup>3)</sup>により定量した。

### 4. 研究成果

#### (1) デンプン添加による麦ワラ由来水素生産量の増大

デンプンのみ、麦ワラのみ、ならびに麦ワラにデンプンを添加した場合の各クロストリディウム属細菌の水素生産の様子を図1に示した。いずれの菌株においても0.5%デンプンのみで5 ml、1.0%デンプンで8 ml 程度の水素生産が見られ、1.0%麦ワラのみを炭素源とした場合には5日間の培養では1 ml 程度の水素しか生産されなかった。対して麦ワラにデンプンを添加した場合には、0.5%デンプン添加で8 ml、1.0%デンプン添加では16 ml 程度の水素生産が見られた。これらの結果は、麦ワラおよびデンプンそれぞれを単独で炭素源とした場合に生産される水素量の合算値よりも明らかに増大しており、なんらかの相乗効果が存在することが強く示唆された。

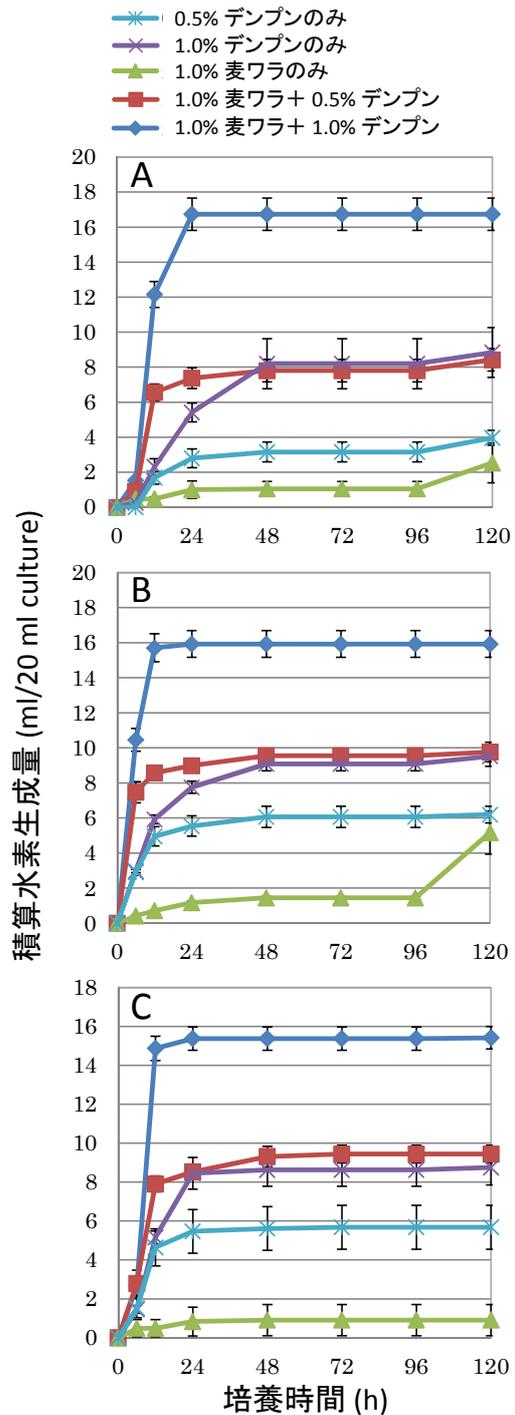


図1 デンプン添加のクロストリディウム属細菌株の水素生産に対する影響。(A) *C. butyricum*; (B) *C. perfringens*; (C) *C. cellulovorans*.

デンプンを添加した培養条件における培養中の経時的な残存デンプン量を定量したところ、いずれの菌株・培養条件においても培養24時間目にはほぼ完全に消費されていたことから、麦ワラにデンプンを添加した条件においては培養初期には利用しやすいデンプンが優先的に資化されていると考えられた。デンプンのみの条件で生成した水素量

が、麦ワラとの共存下でも同量生成すると仮定し、麦ワラに由来して生産されている水素量を算出した結果を図2Aに示した。

また、培養終了後の残渣中に残存していたホロセルロース ( $\alpha$ -セルロース+ヘミセルロース) の定量結果から培養中に消費されたホロセルロース量を算出して求めた、消費ホロセルロース量あたりの水素生産収率を図2Bに示した。*C. perfringens* はデンプンを添加しない場合でも麦ワラから多くの水素を生産する傾向があったが、すべての菌株においてデンプンを添加することで麦ワラに由来すると考えられる生成水素量が劇的に増大していることが明らかとなった。

特に、*C. cellulovorans* においては培養中に消費された麦ワラ中ホロセルロース量がデンプン添加の有無にかかわらずそれほど大きく変化しないのに対し、水素生産収率はデンプン添加なしの場合に比して 0.5%デンプン添加条件で 2.6 倍、1.0%デンプン添加条件で 4 倍以上に増大し、その水素生産促進機構に興味を持たれたことから、以降は *C. cellulovorans* を用いて実験を行った。

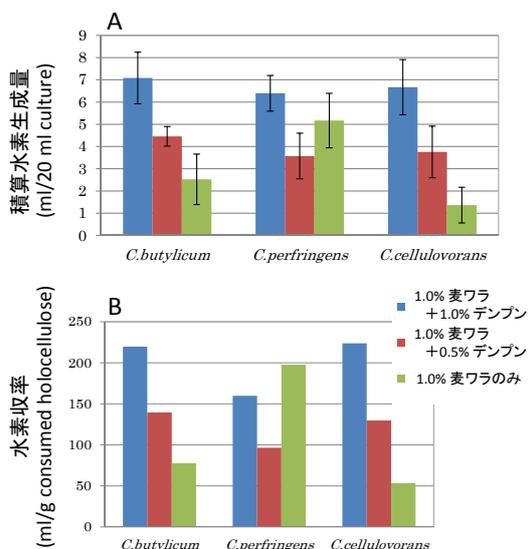


図2 麦ワラに由来する(A)水素生成量と(B)水素収率に及ぼすデンプン添加の影響。

## (2) 多糖分解酵素活性の調査

本実験では *C. cellulovorans* を用い、酵素活性変動が調べやすいように本培養時の初発 OD を 0.02 とし、添加デンプン濃度を 0.5、1.0、2.0% とした。菌体量はいずれの条件においても培養開始後 12 時間まで対数的に増大して  $2 \times 10^6$  cells/ml 程度で定常となったが、興味深いことに 2.0%デンプン添加区では麦ワラの有無にかかわらず培養 24 時間目以降は急激に減少した。この理由については現在のところまったく不明であるが、*C. cellulovorans* は低 pH 条件では生存率が著しく低下する菌株であることから、生育時に資化したデンプンの代謝で生じた有機酸により培地の緩衝域を超えて pH が大きく低下し

た可能性が考えられた。

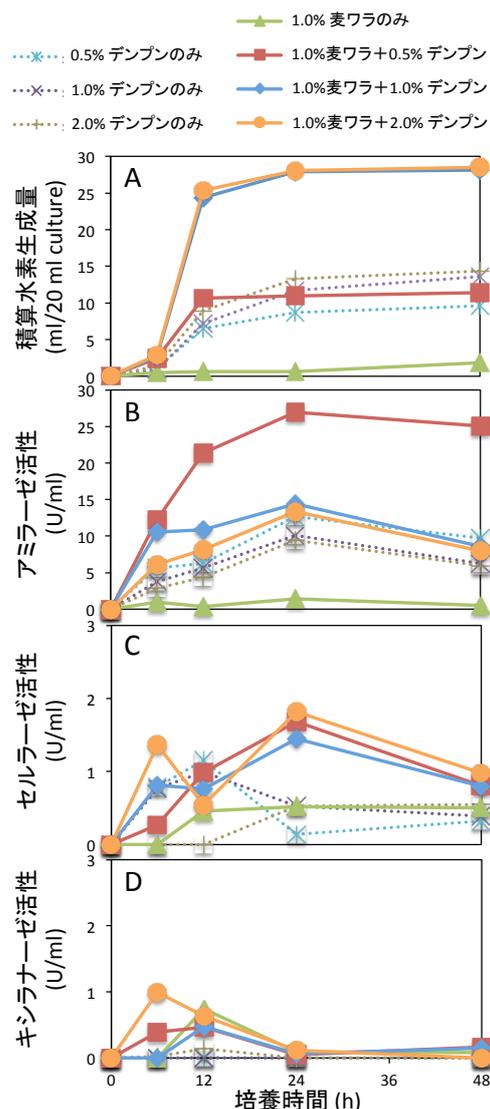


図3 各培養条件における(A)積算水素生成量、(B)アミラーゼ、(C)セルラーゼ、(D)キシラナーゼの活性の変化

積算水素生成量と各多糖分解酵素活性の変化を図3に示した。48時間の培養試験においては、麦ワラのみを炭素源とした場合には 20 ml 培養系において 1.9 ml の水素生産しか得られなかった。デンプンのみを炭素源とした場合には、0.5%デンプンで 9.6 ml、1.0%デンプンで 13.6 ml、2.0%デンプンで 14.4 ml の水素生産となった。麦ワラに加えてデンプンを添加した場合、0.5%デンプンではデンプンみの場合と大きな差は見られず、1.0%、2.0%のデンプンを添加した場合に著しい水素生産量の増大(28.0 および 28.5 ml の生産)が見られるという結果となった(図3A)。

アミラーゼの活性変化を見ると、麦ワラみの場合にはほとんど活性の増大は見られず、0.5%のデンプン添加によって劇的に増大(最大 26.9 U/ml)するが、1.0%、2.0%のデンプン添加では最大 14.4、13.4 U/ml と、デン

ブンのみで培養した場合(10 U/ml 程度)と大きな差は見られなかった(図 3B)。このことは、0.5%のデンプンを麦ワラに添加した場合にのみ、アミラーゼの発現が強く誘導される条件が整うことを強く示唆している。

セルラーゼは、*C. cellulovorans* においては多くの酵素種があることが知られており、個々の酵素種の量比は本結果から知ることはできないが、全体的な活性として、デンプンのみで培養した場合にも培養初期に僅かに増大がみられそのあと減少した。麦ワラのみでの培養では培養 12 時間目から 0.5 U/ml の活性がみられ、そのまま培養 48 時間まで維持された。麦ワラに対しデンプンを添加した培養では、いずれの試験区においても培養 6 時間目から活性増大が見られ、培養 48 時間目まで麦ワラのみの場合の 2 倍以上の活性が維持された。

キシラナーゼについては、デンプンのみで培養した場合にはほとんど活性が見られず、麦ワラで培養した場合には、デンプンを添加するとやや高めの活性が得られる傾向があるものの、いずれも培養 6~12 時間目にかけて僅かな活性がみられ、その後はほとんどみられなくなった。

*C. cellulovorans* においては、セルロースの一部分解で生じたセロビオースがセルラーゼ群の発現を誘導したり、キシランの一部分解で生じたキシロオリゴ糖がセルラーゼ群やキシラナーゼ群の発現を誘導することが報告されている<sup>4-6)</sup>。本研究では、麦ワラに加えてデンプンを添加することで、アミラーゼの作用により生じたマルトースがセルラーゼ群の発現を一部誘導する可能性が強く示唆された。本研究では、マルトースによるセルラーゼ群発現誘導の証明には至っていないが、デンプン添加により麦ワラ分解に有効なセルラーゼの活性が増大することは新たな知見である。

培養後の麦ワラ残渣の成分分析の結果からは、培養時に添加した麦ワラ 0.2 g のうち 0.136 g がホロセルロースであり、培養 48 時間で麦ワラのみの場合にはホロセルロースの 70.6%、麦ワラに 0.5%、1.0%、2.0%のデンプンを添加した場合にはそれぞれホロセルロースの 69.9%、65.4%、59.6%が資化されているという結果が得られた。このことは、デンプン添加によりセルラーゼ活性が 2 倍以上に増大しているにもかかわらずホロセルロースの消化量はむしろ減少していることを示している。添加したデンプンはいずれの濃度でも完全に消費されているのを確認している。麦ワラに 1.0%および 2.0%のデンプンを添加した場合には、麦ワラとデンプンを個別に炭素源として培養した場合の生産水素量の和の 1.8 倍の水素が生産されることから、麦ワラとデンプンが共存することで、ホロセルロースやデンプンが分解されて生じる糖の細胞内での代謝が変化し、水素生成が著しく増大していることが考えられた。今後、*C.*

*cellulovorans* 細胞内での多糖分解酵素群ならびに水素生成型ヒドロゲナーゼの発現量変化を精査するとともに、メタボロミクス手法により細胞内代謝産物動態を把握することで、デンプン添加による水素生産促進機構の解明をめざす。本研究の結果からは、培養液中 1%の麦ワラに対して 1%のデンプンが存在すると高い相乗的水素生産促進効果が得られ、クロストリディウム属細菌を用いた草本バイオマスからの水素生産において、デンプンを含む廃液を、添加濃度に注意して併用することで高い水素生産性が得られることが示された。

#### <引用文献>

- 1) 大槻隆司. オンサイトでの燃料電池発電のための水素生産ユニット~バイオによる家庭用燃料生産システムの現状と課題~. ファイバー・スーパーバイオミメティクス pp. 651-655 (2006)
- 2) Yokoyama T *et al.* Microanalytical method for the characterization of fiber components and morphology of woody plants. *J. Agric. Food Chem.* 50: 1040-1044 (2002)
- 3) Browning BL (ed). *Methods of Wood Chemistry*, Vol. 2, Wiley-Interscience, New York, pp. 589-590 (1967)
- 4) Morisaka H *et al.* Profile of native cellulosomal proteins of *Clostridium cellulovorans* adapted to various carbon sources. *AMB Express* 2: 37 (2012)
- 5) Cho W *et al.* Cellulosomic profiling produced by *Clostridium cellulovorans* during growth on different carbon sources explored by the cohesin marker. *J. Biotechnol.* 145: 233-239 (2010)
- 6) Kosugi A *et al.* Characterization of xylanolytic enzymes in *Clostridium cellulovorans*: expression of xylanase activity dependent on growth substrates. *J. Bacteriol.* 183: 7037-7043 (2001)

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- 1) Kuwabara T, Satake R, Guo H, Katsumata M, Takahashi M, Suzuki Y, Ohtsuki T, Sato T, Kurokawa H. Ion detection by intramolecular charge-transfer absorption of benzocrownbipyridinium conjugate appending octadecyl chain. *J. Ion Exchange* 査読あり. 27: 27-32 (2016)
- 2) Ohtsuki T, Hanagata M, Masuda T, Ui S. Acceleration of removal of high concentration-phenol by activated sludge with nitrate-oxidized lignite. *Jap. J. Water Treat. Biol.* 査読あり. 51: 37-47 (2015)

[学会発表] (計 2 件)

- 1) 松田修平, 大槻隆司. 雑草処理に特化した安定メタン発酵菌群の取得. 第 67 回日本生物工学会大会. 2015 年 10 月 28 日. 城山観光ホテル (鹿児島県・鹿児島市)
- 2) 長田萌, 大槻隆司, 宇井定春. 食用キノコを用いた木質バイオマス易利用化処理の検討. 第 66 回日本生物工学会大会. 2014 年 9 月 11 日. 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

[その他]

- 1) 大槻研究室ホームページ  
<http://www.ccn.yamanashi.ac.jp/~tohtsuki/bt4/index.html>
- 2) 山梨大学研究者公開情報 (大槻隆司)  
[http://erdb.yamanashi.ac.jp/rdb/A\\_Detail.Scholar?ID=6C31363F1B5567DB](http://erdb.yamanashi.ac.jp/rdb/A_Detail.Scholar?ID=6C31363F1B5567DB)
- 3) 山梨大学技術・研究情報 (大槻隆司)  
<http://sangaku.yamanashi.ac.jp/SearchResearcher/contents/6C31363F1B5567DB.html>
- 4) ようこそ、研究室へ (大槻研究室)  
[http://www.bt.yamanashi.ac.jp/modules/gaiyo/index.php?content\\_id=17](http://www.bt.yamanashi.ac.jp/modules/gaiyo/index.php?content_id=17)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大槻 隆司 (OHTSUKI Takashi)  
山梨大学・総合研究部・准教授  
研究者番号：70313781