

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：13801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25630224

研究課題名(和文)腐食連鎖系の人工構築による新しいメタン発酵法の創成

研究課題名(英文)Development of methane fermentation with detritus food chain enhancement

研究代表者

宮原 高志(MIYAHARA, TAKASHI)

静岡大学・工学研究科・教授

研究者番号：70239432

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文):メタン発酵法は嫌気性細菌および古細菌による加水分解、酸生成、メタン生成を経て有機物をメタンへ転換する方法である。本研究はエタノールを利用可能なメタン生成古細菌とエタノールを生成する酵母を共生させることによって、エタノールを中間生成物とする新しいメタン発酵法について検討を行ったものである。エタノール発酵を行った後、メタン発酵を行う2段階培養法において、25 °Cの場合と比較して35 °Cにおけるメタン生成速度が高いことが示された。その主な要因はメタン生成古細菌によるメタン生成反応であると考えられた。また25 °Cおよび35 °Cのメタン生成ポテンシャルに大きな違いはなかった。

研究成果の概要(英文):Methane fermentation is a process which decomposes organic matter to methane. The decomposition occurs in three stages hydrolysis, acidogenesis, and methanogenesis carried out by anaerobic microorganisms and methanogenic archaea. In this study, methane fermentation characteristics were studied by using yeast and methanogenic archaea. Two step fermentation was considered to be an appropriate system, organic matter was first carried out ethanol fermentation and then methanogenic reaction was occurred in the reactor. The methane production rate at 35 °C was higher than that at 25 °C because of the higher methane production activity of the methanogen, however the methane production potential was not significantly affected in the temperature range of 25 to 35 °C.

研究分野：環境工学

キーワード：メタン発酵 エネルギー回収 嫌気性処理

1. 研究開始当初の背景

メタン発酵法は有機物を分解する過程で減量化、安定化を行うと共に、メタンガスとしてエネルギー回収できる特徴を有している。下水汚泥のような有機性廃棄物からもエネルギー回収が可能なることから、分散型エネルギー施設として廃水から廃棄物まで様々な含水率の有機物を対象とした研究が行われてきている。

高効率化の研究は、主に反応槽内の微生物濃度を高める方法および反応を担う微生物に適した条件とする方法に分類される。前者では嫌気性ろ床法や嫌気性流動床法、UASB法、膜分離法といった方法が代表的であり、担体と呼ばれる支持体へ微生物膜を形成させる方法や自己造粒現象を利用する方法そして分離膜を使う方法によって水理学的滞留時間と固形物滞留時間を独立させることで反応槽内の微生物濃度を高めることが研究されてきている。後者では二相嫌気性消化法に代表される酸生成細菌とメタン生成古細菌の最適な培養条件が異なることに注目しそれぞれを独立した反応槽で培養する方法、ルーメン菌を活用する方法、必須の微量元素を加える方法などによって全体の反応速度を高める研究が行われてきている。

一般的なメタン発酵法は、嫌気性の細菌および古細菌によって担われており、加水分解反応、酸生成反応、共生酢酸生成反応、メタン生成反応といった多段階反応を経て、有機物をメタンへ転換する方法である。実規模のメタン発酵施設は世界中で稼働している。製麺工場廃水、パルプ工場廃水、下水など様々な廃水に適用されており、その歴史は100年以上に亘り、その高効率化についても上述した様々な研究が行われてきているが、依然として中間生成物であるプロピオン酸に代表される揮発性脂肪酸(VFA)の蓄積による処理性能の低下や発酵残渣である余剰汚泥の固液分離の悪さが指摘され続けており、嫌気性細菌を中心とした従来のメタン発酵法はその機能の向上が困難な状況にある。

近年、その産業利用が進められているバイオエタノール製造の分野では、メタン発酵法においても重要な基質として知られているデンプンやセルロースの分解で得られる6炭糖(グルコース等)が原料として使用されてきている。これは従来、酵母が6炭糖しか利用できないと考えられていたことによるが、近年では6炭糖と共に5炭糖からもエタノール産生できる酵母の分離も報告されていることから、これまでのバイオエタノール製造では未利用であったヘミセルロースなどもその原料として活用できる可能性が高まっている。

酵母の代謝産物はメタン発酵において様々な問題を引き起こすことが知られている揮発性脂肪酸ではなくエタノールであり、また嫌気性細菌と比較してその反応速度は高いという特徴がある。メタン生成古細菌は

これまで酢酸、水素、ギ酸、メタノールといった限定された基質のみを利用することが可能であるとされてきたが、近年、エタノールを直接利用できる種が報告されてきている。

2. 研究の目的

本研究は、エタノールを利用するメタン菌とエタノールを生成する酵母を人工的に共生させることによるメタン発酵法を確立することを目的としている。阻害性のある中間性生物であり、酢酸生成を行う細菌と水素を利用するメタン菌の共生によって分解されるプロピオン酸や酪酸に代表される揮発性脂肪酸を経由する代わりに、中間生成物としてエタノールを経由するメタン発酵法の構築を行うものである。

本研究は、メタン発酵法の脆弱な安定性の要因として従来より様々な対策が検討されてきた中間生成物を揮発性脂肪酸からエタノールへ代替することによる安定化に重点を置き、エタノールを利用可能なメタン菌と組み合わせることで、頑健なメタン発酵法を構築するものである。

3. 研究の方法

(1) 培養方法

実験にはブチルゴム栓とスクリュウキャップで外気の混入を防ぐ構造の特殊な試験管およびブチルゴム栓を使用したバイアルビンを用いた。培養は静置培養および振盪培養で検討を行った。培養温度は中温域でのメタン発酵の至適温度を考慮して35°Cおよび反応槽の加温エネルギーを減らすことを考慮して25°Cに設定して検討を行った。

(2) 微生物

メタン発酵実験に使用した酵母およびメタン生成古細菌の菌株は製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンターより入手した。

(3) 基質

酵母の培養および回分実験に用いた基質は表1に示す液体培地および寒天を加えた固形培地を用いた。メタン生成古細菌の増殖速度実験は表2～表5に示す培地組成を使用した。振盪培養では70回/分で振盪を行った。メタン発酵実験は酵母の培養に用いた培地の濃度を調整して使用した。静置培養および振盪培養においては共に気相部を高純度窒素で置換した。

(4) 分析方法

バイオガス中のメタンおよび二酸化炭素の濃度はガスクロマトグラフ法を用いて分析した。検出器に熱伝導度検出器(TCD)を使っているSHIMADZU GC-8APTを用いて、活性炭が充填されたパックドカラム(SHINCARBON ST)で、キャリアガスをヘリウムとして分析を行った。pHはHORIBA D-71を用いて測定した。培養液の吸光度は紫外可視分光光度計(SHIMADZU UV-1800)および小

表1 培地組成 1

Glucose	10 g/L
Peptone	5 g/L
Yeast extract	3 g/L
Malt extract	3 g/L

表2 培地組成 2

Ethanol	0.5 ml/L
Yeast extract	0.1 g/L
KH ₂ PO ₄	0.1 g/L
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.2 g/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.2 g/L
NH ₄ Cl	0.5 g/L
Sodium acetate	0.8 g/L
Vitamin solution	2 ml/L
Trace element solution	2 ml/L
Se/W solution	1 ml/L
Resazurin solution	1 ml/L
NaHCO ₃	2.5 g/L
Na ₂ S·9H ₂ O	0.3 g/L
Cysteine-HCl	0.3 g/L

表3 ビタミン溶液組成

Biotin	0.5 mg/L
Folic acid	0.9 mg/L
Pyridoxine-HCl	0.4 mg/L
Thiamine-HCl	0.7 mg/L
Riboflavin	0.8 mg/L
Nicotinic acid	0.2 mg/L
Ca-pantothenate	0.5 mg/L
Vitamin B ₁₂	2.7 mg/L
p-Aminobenzoic acid	0.3 mg/L
Lipoic acid	0.4 mg/L

表4 微量元素溶液組成

Nitritotriacetic acid	13 g/L
FeCl ₃ ·6H ₂ O	1.4 g/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.1 g/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	24 mg/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1 g/L
ZnCl ₂	0.1 g/L
CuCl ₂ ·2H ₂ O	25 mg/L
H ₃ BO ₃	10 mg/L
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	24 mg/L
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.1 g/L

表5 Se/W溶液組成

Na ₂ SeO ₃	4 mg/L
Na ₂ WO ₄	4 mg/L

型振盪培養装置 (ADVANTEC TVS062CA) を用いた。

(5)メタン発酵実験

メタン生成古細菌および酵母とメタン生成古細菌の混合培養系を用いて回分実験および2段階回分実験で評価した。混合培養系では2者を同時に混合して培養する場合と酵母による前反応が進んだ後メタン生成古細菌を添加して培養する場合の2種類について検討を行った。

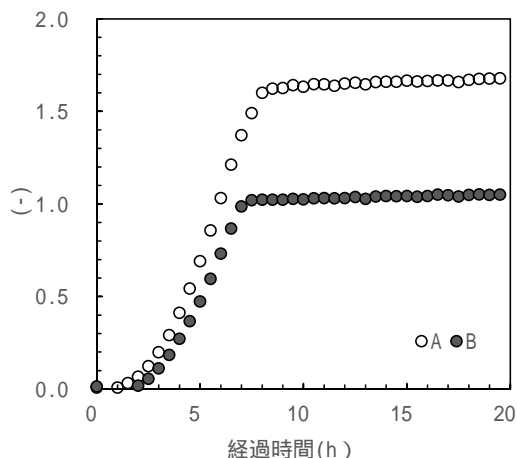


図1 酵母の増殖特性 (35)

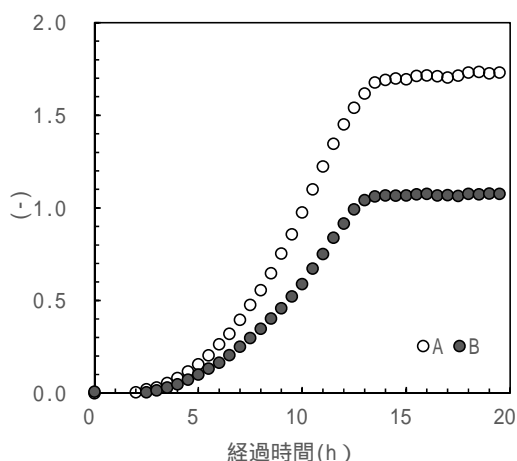


図2 酵母の増殖特性 (25)

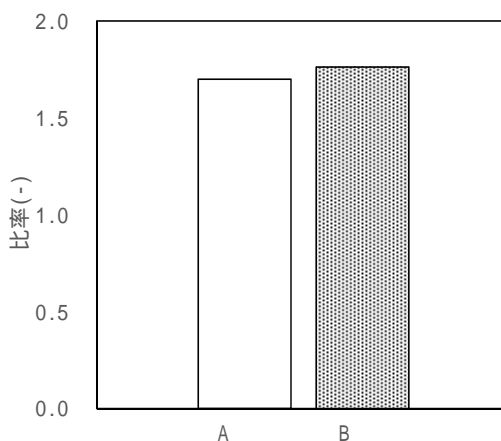


図3 酵母の増殖特性に及ぼす温度の影響

4. 研究成果

メタン発酵法は嫌気性細菌および古細菌による加水分解、酸生成、メタン生成を経て有機物をメタンへ転換する方法であり、本研究はエタノールを利用可能なメタン生成古細菌とエタノール生成する酵母の共培養によって中間生成物がエタノールであるメタン発酵法について検討を行ったものである。図1は酵母を35°Cで培養した場合の増殖特性を示す。A,Bは基質濃度を变化させて複数

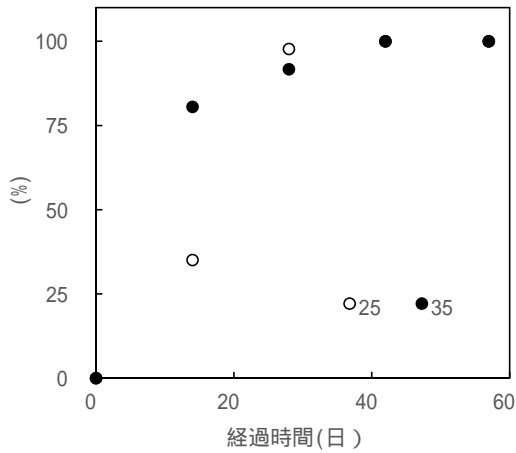


図4 メタン生成古細菌の増殖特性に及ぼす温度の影響

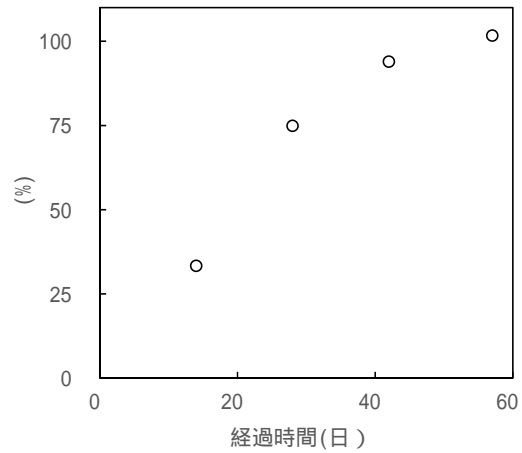


図7 2段階培養法におけるメタン生成の経時変化に及ぼす温度の影響

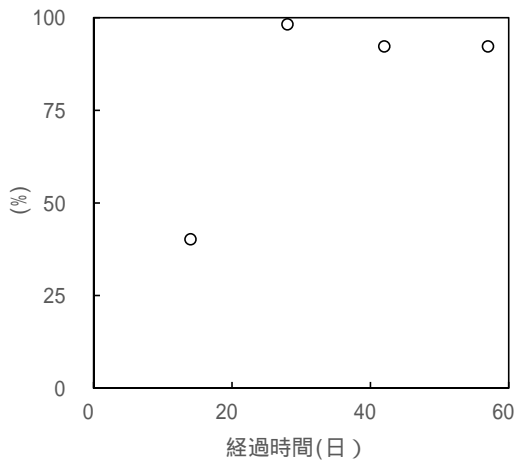


図5 中温域におけるメタン生成量の経時変化に及ぼす培養温度の影響

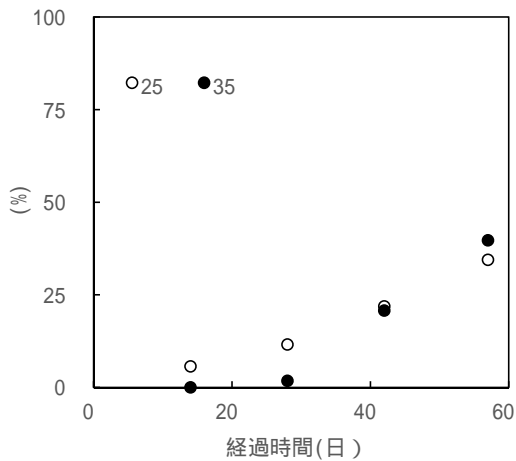


図6 2段階培養法に対する通常の培養法におけるメタン生成割合の経時変化

回培養を行いその吸光度の平均をプロットした。同様に図2は培養温度を25に低下させた場合の酵母の増殖特性を示す。図3は酵母の増殖曲線より得られた35および25における増殖速度の低下を示しており基質濃度が基準組成Aおよび希釈したB共に培養温度の低下に伴って1.7倍程度遅くなることが示された。図4はメタン生成古細菌の増殖

特性に及ぼす培養温度の影響を示す。初期の増殖速度は35の場合が高いが、4-6週間で25の場合においてもメタン生成は停止することが示された。図5は35で培養した場合を基準として25のメタン生成量の割合をプロットしており、図4と同様に初期の増殖速度に明瞭な差があること及びメタン生成ポテンシャルにおいては両者の間に温度の影響はほとんどみられないことが示された。

図6は酵母とメタン生成古細菌の二者培養において、2段階培養法に対する通常の培養法のメタン生成割合の経時変化を示している。25および35それぞれの場合において、2段階培養法は培養初期から通常の培養方法と比較して効率よくメタン生成を達成していることが明らかにされた。図7は2段階培養法における培養温度35に対する25のメタン生成の割合を示しており、長期間の培養の場合、両者の違いはほとんどないことが示された。

本研究では、酵母を用いたエタノール発酵に続けてメタン生成古細菌によってメタン発酵を行う2段階培養を行うことで効率的にメタン発酵を行うことができること、25の場合と比較して35におけるメタン生成速度が高いこと、酵母によるエタノール生成反応ではなくメタン生成古細菌によるメタン生成反応の低下がその主な要因として考えられたこと、培養温度25および35におけるメタン生成ポテンシャルには大きな違いがないことが示された。

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)

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮原 高志 (MIYAHARA, Takashi)
静岡大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：70239432