

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850045

研究課題名(和文) 二酸化炭素をエネルギー資源に変換する次世代の微生物電解合成システムの創出

研究課題名(英文) Construction of next-generation microbial-electrosynthesis systems which convert carbon dioxide into energy resources

研究代表者

小林 肇 (Kobayashi, Hajime)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・准教授

研究者番号：50549269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：電気化学的メタン生成とは、電気化学的な還元反応の触媒に微生物を利用した電極(バイオカソード)により、二酸化炭素をメタンへと変換する反応で、エネルギー変換等での応用が期待されている。本研究では、私達が開発した高性能の好熱性バイオカソードに関して、同バイオカソードによる電気化学的メタン生成の反応経路の解明、同反応を触媒する微生物系のメタゲノム解析、さらに同反応の数値モデルの構築・検証を行った。

研究成果の概要(英文)：Electromethanogenesis is a bio-electrochemical reaction mediated by a microbially-catalyzed cathode (biocathode), in which carbon dioxide is reduced into methane. This study examined the mechanism of electromethanogenesis catalysed by a high-performance thermophilic biocathode. Metagenome of the catalytic microorganisms was also analysed. Moreover, the first mathematical model of electromethanogenic biocathode was developed.

研究分野：応用微生物工学

キーワード：電気化学的メタン生成 バイオカソード バイオ電気化学的システム メタン菌

### 1. 研究開始当初の背景

バイオ電気化学的システム (Bio-Electrochemical Systems: BESs) とは、個体電極上での電気化学的反応の触媒として微生物を用いる萌芽技術系の総称で、エネルギー生産・変換、ケミカル生産、排水処理、バイオセンサー、バイオレメディエーション等、幅広い分野での応用が期待されている。その中で、私達は微生物をカソード反応の触媒として利用する「バイオカソード」による「電気化学的メタン生成 (Electromethanogenesis: EM)」に着目している。カソード反応とは、アノードから回路を経て流入した電子を消費する還元反応である。バイオカソードでは、触媒である微生物の代謝活性を利用し、還元反応の産物である有用化合物 (燃料、原料等) の生産を行う。バイオカソードの特徴は、微生物が電極を電子供与体として利用する、すなわち電極から電子を直接受容し、代謝に利用する点にある。この特性から、化学触媒を用いる従来技術と比べ、過電圧が低減され、電子の利用効率が高い事が示されており、エネルギー変換・物質生産での利用が期待されている。

電気化学的メタン生成 (EM) とは、バイオカソード上で電子 ( $e^-$ ) とプロトン ( $H^+$ ) を  $CO_2$  還元に使ってメタンを生産する反応系である ( $CO_2 + 8H^+ + 8e^- \rightarrow CH_4 + 2H_2O$ )。この反応に必要な電極電位は理論上は  $-0.24$  V (vs. SHE) と高く、投入する電力エネルギーは少なくても良い。また、バイオカソードにおける電子回収効率 (カソードで消費された電子がメタンに組み込まれる割合) は 96% と極めて高い。電源として再生可能エネルギーを利用することで、供給と出力が不安定な再生可能エネルギーを化合物の形態で貯留 (蓄電) することが可能となる。さらに、 $CO_2$  を還元利用するため、産物であるメタンは炭素中立的である。研究開始当初、電気化学的メタン生成は発見されたばかりの反応であり、反応機構等に未知の点が多く、特にバイオカソード性能の向上に向けた研究が必要であった。

### 2. 研究の目的

私達は「 $CO_2$  を有効利用し、電力を化合物に変換して利用 (貯蔵) する」技術による社会の低炭素化への寄与をめざし、高性能のバイオカソードを開発し、その反応と触媒機構の解明に取り組み、この分野の推進に貢献して来た。本研究では、このバイオカソードによる EM 反応をエネルギー変換・ $CO_2$  利用技術として確立するために、電気化学的メタン生成の反応経路の同定と触媒である微生物系の遺伝的機構の理解、さらにバイオカソードの性能を決定する因子の解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

秋田県の油田の地層水に由来する地下微

生物を微生物源として使い、EM 反応系を構築した。培地にはメタン菌の培養に広く用いられている *Methanobacterium* medium から電気化学的反応に干渉する成分 (還元剤、電子シャトル等) を除いたものを用いた。

一槽式の電気化学的培養セル (全量約 250 mL) に微生物源を植菌し、直流電源装置により  $-0.7$  V の電圧を印加、嫌気条件下 55 °C で攪拌培養を行った。培地としては、メタン菌の培養に広く用いられる *Methanobacterium* medium から還元剤、電子シャトルを除外したものを用いた。培養セルは、電気化学的メタン生成活性を確認した後、一定時間において液相を微生物源未添加の培地に交換する fed-batch 方式で運転された。fed-batch 培養を繰り返すことにより電気化学的触媒能を持つ微生物群を電極上へ集積、バイオカソードの構築を行った。

形成したバイオカソードを二槽式の電気化学的培養セルに移し、ポテンショスタットを用いた定電位培養 ( $-0.5$  V vs SHE) を行い、高い触媒能を持つ微生物のさらなる集積を図った。バイオカソードの電気化学的メタン生成の触媒能を確かめるため、ガスクロマトグラフィー、Cyclic Voltammetry (CV) 解析を行い、メタン生成速度と電気化学的特性を評価した。

バイオカソードから DNA を抽出、約 100 Gbp のショットガン配列の塩基配列を決定した。その中から 60 Gbp のショットガン配列に対し、MetaPhlAn による系統解析を行った。また、同ショットガン配列を、MEGAHIT メタゲノムアセンブラーを用いてアセンブルしたコンティグ配列に対し、AMPHORA による系統解析を行った。また、メタゲノム配列から優占種の全ゲノム情報を再構築するため、全メタゲノムデータから約 2 Gbp の配列をランダムサンプリングしてマイナー種由来の配列を検出感度外とした上で、Velvet ゲノムアセンブラーを用いた最優占種ゲノムのアセンブリー解析を行った。

電気化学インピーダンス分光解析を行い、バイオカソードの内部抵抗を測定した。対照実験として、無菌カソードを用いたリアクターについても測定を行った。測定条件は、開始周波数 10 kHz、AC 振幅 10 mV、終了周波数 10 mHz とした。

既往の BESs の数理モデルから得られた知見をもとに数理的な解析を行った。内部抵抗と微生物数がメタン生成能にもたらす影響を調べた。メタン生成速度の計算に関しては前述の間接的経路と、直接的経路の 2 つを考慮した。

### 4. 研究成果

(1) 好熱性バイオカソードによる電気化学的メタン生成の反応経路の解明

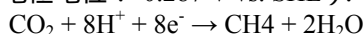
既往研究で広く用いられている常温性微生物に比べ、好熱性微生物はより高い触媒活性と安定性を持つことが期待できる。そこで

私達は、微生物源として好熱性微生物群を使用し、BESsの基礎研究を行った。

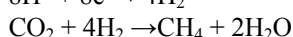
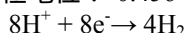
油田の地層水由来の微生物群を電気化学的培養リアクターで電圧を印可しながら培養し、EMの触媒活性を持つ微生物をカソードに集積した。形成された反応系では、メタン生成速度と発生する電流が電圧の大きさに依存して大きくなる傾向が見られた。また、印加電圧の大小によらず、電流-メタン変換効率は100%に近かった。さらに、同リアクターの電気化学的メタン生成速度は既往研究中で最高であった。以上の事から、好熱性微生物群を用いて高性能のEM反応系の構築が可能である事が示唆された。

このEM反応系のバイオカソードの電気化学的特性をCVにより解析したところ、同バイオカソードによる電気化学的メタン生成反応は、それぞれ-0.3 Vと-0.6 V (vs. Standard Hydrogen Electrode: SHE) 付近に平衡電極電位を持つ2つの電気化学的反応により成されていることが示唆された。各反応の平衡電極電位から、これら2つの電気化学的反応は、それぞれ直接的または間接的EM反応(下記の反応経路A, B)に対応している事が示唆された:

・反応経路A(直接的EM反応, 理論平衡電極電位: -0.287 V vs. SHE):



・反応経路B(間接的EM反応, 理論平衡電極電位: -0.456 V vs. SHE):



同バイオカソードが触媒する反応を理解するため、-0.3~-0.8 V (vs. SHE)の異なる電位で電流とメタンの生産を測定した。-0.3 V vs. SHEではメタン生成は検出されなかったが、それより低い電位では電位に依存したメタン生成速度の向上が見られた。特に-0.35 V、-0.4 Vといったプロトン還元の理論的平衡電極電位(-0.456 V vs. SHE at pH 7 at 55°C)よりも高い電位でもメタン生成が見られたことは、バイオカソードでのメタン生成が水素分子による仲介を経ない可能性を示唆した。また、反応がCO<sub>2</sub>の存在に依存していること、さらに微生物的なメタン生成を行うメタン生成古細菌の特異的阻害剤2-bromoethanesulphonate (BES)によりメタン生産と電流生産が共に阻害されることから、バイオカソードでのメタン生成と電流生産が直接的に結びついていることが示され、直接的EM反応(反応経路A)がバイオカソードで実際に起こっている事が強く示唆された。

## (2) 電気化学的メタン生成反応を触媒する微生物系のメタゲノム解析

バイオカソードにおけるEM反応の微生物的機構の理解を目的に、バイオカソードの微

生物叢の解析を行った。16S rRNA 遺伝子を指標とした分子系統解析の結果、20種類以上の細菌と数種の高古細菌が検出された。細菌種の構成は各バイオカソードで比較的異なっていたが、高古細菌種は各サンプルではほぼ同様の構成を示し、メタン生成古細菌 *Methanothermobacter thermautotrophicus* の近縁種の優占化が見られた。

バイオカソード上の微生物種のEM反応における役割を理解するため、バイオカソードのメタゲノム情報を解析した。長時間(約3ヶ月間)の定電位(-0.5 V vs. SHE)培養後、EM触媒能が確認されたバイオカソードからDNAを抽出、メタゲノム解析に供した。

アセンブリー解析の結果、新規の細菌種とメタン生成古細菌 *M. thermautotrophicus* 近縁種に由来するゲノム情報が全メタゲノム情報のそれぞれ60%と30%を占めていた。最も優占していた細菌種は *Actinobacteria* 門 *Coriobacteriales* 目に属する新規の細菌で、既知の既培養株と16S rRNA 遺伝子の相同性が90%程度しかない。そこで、この細菌種のゲノム情報を再構築し、その代謝能とバイオカソードにおける機能の解明を試みている。さらに、全メタゲノム配列から同細菌種由来の配列を取り除いた上でアセンブリー解析を行う事で *M. thermautotrophicus* に近縁のメタン菌種の全ゲノム情報の再構築を試みた。上記の新規細菌種のEM反応への寄与は不明だが、*M. thermautotrophicus* 近縁種はCO<sub>2</sub>のメタンへの還元反応に必須な触媒性のメタン菌である可能性が示唆される。バイオカソード上で濃縮されている同メタン菌種のゲノムを他のメタン菌種のゲノムと比較解析することで、同メタン菌種の代謝能とEM反応への寄与を検証する予定である。

## (3) 電気化学的メタン生成反応の数理モデルの構築と検証

EM技術の実用化に向けた反応機構の更なる理解、反応効率の最大化、反応の制御法の確立を行っていく上で、EM反応の数理モデルの構築が有用である。メタン生成量を予測可能なEM反応の数理モデル構築を目的に、バイオカソードの数理的解析と実験検証を行った。

EM反応系の数理モデルを構築するためには、メタン生成に関わる微生物数の定量と、バイオカソードの電気化学的特性の把握を行う必要がある。EMリアクターを構築、走査型電子顕微鏡を用いてバイオカソード表面の微生物数の定量を行った。また、電気化学インピーダンス分光解析により、バイオカソードの内部抵抗を測定した。バイオカソードの内部抵抗は、無菌カソードと比べて平均で75%低下した。これにより、微生物がカソードでの電子の授受を触媒していることがさらに確認された。

他のBESに関する研究では、内部抵抗 $R_{int}$ は式(1)により計算される。

$$R_{\text{int}} = R_{\text{min}} + (R_{\text{max}} - R_{\text{min}})e^{-K_R x} \quad \text{式(1)}$$

ここで、 $R_{\text{min}}$ 、 $R_{\text{max}}$ は内部抵抗の最小値と最大値、 $K_R$ は曲線の傾きを決定するパラメータ、 $x$ は微生物密度である。上述のバイオカソードにおいても微生物密度の増加が内部抵抗の低下をもたらすことが確認されたため、この式を用いてパラメータ推定を行った。 $R_{\text{min}}$ は実験値の  $84.2 \Omega$  を用いた。その結果  $R_{\text{max}} = 313 \Omega$ 、 $K_R = 1.56 \times 10^{-4}$ と推定された。この推定された  $R_{\text{max}} = 313$ は対照実験の内部抵抗である  $573 \Omega$  より小さくなっており、微生物が触媒能を持つという仮定から妥当な結果である。この結果は微生物の密度がある値に達した時点で電子授受の触媒能の向上が見られなくなることを示唆しており、今回の実験で確認された傾向と矛盾しない。パラメータ推定の精度については、更なる実験により向上させることが望ましい。

EM 反応において、発生する電流とメタン生成速度は強い相関を持つことが今回の実験からも確認され、電流値の予測が反応系の性能向上に重要である事が示された。そこで、バイオカソードの電気化学的特性を示す内部抵抗と電流値との相関を調べた。リアクターに流れる電流値  $I_{\text{EM}}$ (mA)は理論分解電圧  $E_0$ (V)、濃度過電圧  $\eta_{\text{conc}}$ (V)、活性化過電圧  $\eta_{\text{act}}$ (V)を用いて以下の式(2)により表すことができる。

$$I_{\text{EM}} = \frac{|E_{\text{applied}}| - |E_0| - |\eta_{\text{conc}}| - \eta_{\text{act}}}{R_{\text{int}}} \quad \text{式(2)}$$

過電圧の変化による影響を無視できると仮定すると、電流値は内部抵抗に反比例することが予測されるため、今回は以下の式(3)を用いる。

$$I_{\text{EM}} = \frac{K_1}{R_{\text{int}}} \quad \text{式(3)}$$

$K_1$ を回帰分析により求めると  $K_1 = 66.1 \text{ mV}$ と推定され、決定係数  $R^2$ は  $0.776$  となった。これらを用いて、内部抵抗と電流値の計算結果と実験値を比較したところ、プロットしたリアクターによっては計算値との乖離がみられ、微生物数の時系列的変化を考えたうえで過電圧を計算することにより、精度を上げる必要があることが示唆された。

数理モデル構築の主目的の1つはメタン生成速度の予測であり、メタン生成速度を計算する式の検討が不可欠である。まず直接的EM反応(前述の反応経路A)について、カソード電位を  $-0.35 \text{ V vs SHE}$  とした実験データを用いて検討した。この電位では水素分子の生成が起こりにくいので直接的EM反応のみが起きると仮定でき、以下の式(4)によりメタン生成速度  $v_m$ (mol/hour)が計算できると考えられる。

$$v_m = f_d \frac{I_{\text{EM}}}{mF} \quad \text{式(4)}$$

$m$ は反応で消費される電子数、 $F$ はファラデー

一定数、 $f_d$ は流れた電流のうち直接的EM反応に使われたものの割合を表す。パラメータ推定の結果  $f_d = 1.0$ と推定された。計算結果と実験値の比較から、カソード電位が高い場合、電気化学的メタン生成は直接的経路を主とし、式(4)によって計算できることが確認された。

一方、カソード電位が低い場合、式(4)による計算ではメタン生成量を正しく表現できない。これは電流が水素分子の生成などの反応にも用いられること、メタン生成が間接的EM反応(上述の反応経路B)からも起こることが原因として考えられる。そこで第2項として間接的経路による電気化学的メタン生成を考慮する。これは水素分子を還元力源として用いる反応であり、通常の水素酸化性メタン生成と同様であることが想定されている。

$$v_m = f_d \frac{I_{\text{EM}}}{mF} + Y_{\text{H}_2/\text{CH}_4} Y_m x A_{\text{sur}} \quad \text{式(5)}$$

$Y_{\text{H}_2/\text{CH}_4}$ は水素-メタン収率であり  $0.25$ 、 $A_{\text{sur}}$ はカソードの面積 ( $8.0 \times 10^3 \text{ mm}^2$ )、 $Y_m$ は微生物1体当たりの水素消費能 ( $\text{mmol-H}_2 \text{ hour}^{-1} \text{ count}^{-1}$ )である。パラメータ推定を行ったところ  $Y_m = 5.4 \times 10^{-12}$ 、 $f_d = 0.66$ と推定された。さらに推定されたパラメータを用いて、式(5)からメタン生成速度を計算し実験値と比較したところ、高い精度でメタン生成速度を推定できた。異なる電流メタン変換効率を示すリアクターに対して同じパラメータを用いてメタン生成速度が再現されており、微生物数と電流値を数値シミュレーションによって正しく求められれば、メタン生成速度を予測できることを示唆している。

以上の式(1)、(3)、(5)を組み合わせた微生物密度からメタン生成速度を予測することができる。しかし、計算結果は実験値との乖離が見られた。原因は式(3)では電流値を正しく予測できていないことにある。予測精度を向上させるためには、微生物数に関して更なる解析を行い、メディエーターの割合等から過電圧を計算する必要がある。また、式(5)では微生物数を一定(定常状態)としているが、カソード上での微生物の増殖速度等を考慮する必要がある。

## 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)

[雑誌論文](計4件)

H. Kobayashi, A. Nagashima, M. Kouyama, Q. Fu, M. Ikarashi, H. Maeda and K. Sato (2017) "A high-pressure thermophilic electromethanogenic system producing methane at 5 MPa, 55 °C." J Biosci Bioeng, 査読有, in press.

H. Kobayashi, Q. Fu, H. Maeda and K. Sato (2017) "Draft genome sequence of a novel *Coriobacteriaceae* sp. strain

EMTCatB1 reconstructed from the metagenome of a thermophilic electromethanogenic biocathode.” Genome Announc, 査読有, 5: e00022-17.

Q. Fu, N. Fukushima, H. Maeda, K. Sato and H. Kobayashi (2015) “Bioelectrochemical analysis of a hyperthermophilic microbial fuel cell generating electricity at temperatures above 80 °C.” Biosci Biotechnol Biochem, 査読有, 79:1200-6.

Q. Fu, Y. Kuramochi, N. Fukushima, H. Maeda, K. Sato and H. Kobayashi (2015) “Bioelectrochemical analyses of the development of a thermophilic biocathode catalyzing electromethanogenesis.” Environ Sci Technol, 査読有, 49:1225-32.

#### [学会発表](計6件)

Y. Nakasugi, M. Himeno, Q. Fu, M. Ikarashi, H. Maeda, K. Sato, H. Kobayashi. “Experimental and mathematical analyses of bio-electrochemical conversion of carbon dioxide to methane.”, 13th International Conference on Greenhouse Gas Control Technologies Conference (GHGT-13), 2016年11月16-18日, Lausanne (Switzerland)

H. Maeda, M. Ikarashi, N. Fukushima, H. Kobayashi, K. Sato. “Subsurface bio-electrochemical conversion of carbon dioxide into methane by using indigenous microorganisms.” 249<sup>th</sup> ACS National Meeting & Exposition Chemistry of Natural Resources, 2015年3月22日, Denver (USA)

前田治男, 五十嵐雅之, 小林肇, 福島直哉, 佐藤光三. “持続型炭素循環に向けたCO<sub>2</sub>の電気化学的微生物メタン変換技術.” 第44回石油・石油化学討論会, 2014年10月16-17日, 旭川グランドホテル(北海道旭川市)

N. Fukushima, H. Maeda, K. Sato, H. Kobayashi. “Subsurface bio-electrochemical conversion of carbon dioxide into methane by using indigenous microorganisms.” 21<sup>st</sup> World Petroleum Congress, 2014年6月14-15日, Moscow (Russia)

香山幹, 付乾, 佐藤光三, 小林肇, 福島直哉. “電気化学的メタン生成の触媒活性向上に関わるバイオカソード微生物叢の解析.” 石油技術協会春季講演会, 2014年6月2-5日, 朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

前田治男, 五十嵐雅之, 宮川喜洋, 小林肇, 福島直哉, 佐藤光三. “持続型炭素循環を目指した地下環境におけるCO<sub>2</sub>の電気化学的微生物メタン変換研究.” 石油技術協会春季講演会, 2014

年4月2-5日, 朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小林 肇 (KOBAYASHI HAJIME)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・  
准教授

研究者番号: 50549269