

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 29 年 9 月 26 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26420881

研究課題名(和文) 好熱性発酵細菌 - メタン菌栄養共生系による高速メタン生産の基本原則

研究課題名(英文) Principles of high-speed methane production by thermophilic fermenter-methanogen syntrophy

研究代表者

桑原 朋彦 (KUWABARA, Tomohiko)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：80153435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では、硫化水素を含まず、点火可能なメタン標品を毎日生産するシステムの確立を通して、発酵細菌 - メタン菌栄養共生系によるメタン生産の基本原則を明らかにすることを目的とした。我々は好熱性発酵細菌 *T. globiformans* と超好熱性メタン菌 *M. jannaschii* との栄養共生系に、好気下軽石持込培養を適用し、二酸化炭素を除去する水酸化ナトリウムの配置により、以下の基本原則を明らかにした。1. 軽石の使用により絶対嫌気性菌の培養が好気相下で可能となる。2. 1により、硫化水素は気相中の酸素によって自然に除去される。3. 二酸化炭素はメタン生産の基質であるが、気相からは除去することが望ましい。

研究成果の概要(英文)：The principles of biological CH₄ production were studied through establishment of a system where combustible H₂S-free CH₄ can be produced daily. Toward this objective, we applied a solid-phase cultivation method, using dacite pumice, to a syntrophic system of *T. globiformans* and *M. jannaschii*. Dacite pumice, used as a solid support for anaerobic co-cultivation of these microorganisms, was the inoculum for solid-phase carried-over cultivation (SCC). When SCC was conducted with an aerobic medium under gas phase (air), H₂S-free CH₄ was produced. Microporous structures of the dacite pumice preserved the anaerobic environment, and H₂S from microbial metabolic activities made the bulk liquid phase anaerobic. This was scavenged by O₂ in the air. When CO₂ was removed by placing solid NaOH, separated from the medium, the CH₄ concentration increased to a combustible level after 24 h of aerobic SCC. These results together indicate that the removal of O₂ and CO₂ had effects of decompression.

研究分野：微生物学

キーワード：発酵細菌 - メタン菌栄養共生 固相培養 メタン生産 硫化水素

1. 研究開始当初の背景

(1) 食料廃棄物からのメタン (CH₄) 生産はすでに実用化されている。この生産系は、様々な種類の有機物を分解する好気性微生物、分解産物を小さな有機物にまで分解する通性嫌気性微生物、小さな有機物を代謝して H₂ と CO₂ (あるいはメタン菌の基質となる C1 有機物) を放出する発酵細菌、そして 1 式によりメタンを生産するメタン菌の、4 種の微生物からなる。

$4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$ ----- 1
 常温性メタン菌の増殖速度は一般に遅いため、メタン生産の速度は遅い。また、上記のさまざまな微生物の代謝副産物として発生する硫化水素を除去しなければならない。

(2) 好熱性の発酵細菌とメタン菌のみからなる単純栄養共生系は、複雑栄養共生系に比べてメタン生産が格段に速い。しかし、同時に硫化水素の発生速度も上昇する。発酵細菌の栄養となる有機物の種類が限られることから、コスト面で、実用化には適さないと考えられている。

2. 研究の目的

(1) 単純栄養共生系を用いて、硫化水素を含まず、点火可能なメタンを毎日生産する系を開発し、災害時等において、緊急にエネルギーを供給できるシステムの原型を作ること。

(2) 開発を通して、栄養共生によるメタン生産の基本原則を明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) 好熱性発酵細菌 *Thermosipho globiformans* と超好熱性メタン菌 *Methanocaldococcus jannaschii* を 68 ml 容のセラム瓶を用いて 68 ℃ で 24 h 共培養した。

(2) 軽石等、微細孔をもつ固体を培養液に加えた固相培養法(図 1)を適用した。微細孔周辺の発酵細菌から出る硫化水素は、好気性培地中でも、微細孔の嫌気性を保つことができると期待される。

(3) 両菌の共培養を嫌気性培養液中、固相の存在下で行い(図 1, a)、微細孔周辺に両菌を付着させた(図 2)。培養液と気相を除去して両菌が付着した固相だけを残した(図 1, b)。ここに好気性培養液と空気を入れて密栓し、好気環境下で次の培養をスタートさせた(好気性 SCC, Solid phase Carried-over Cultivation)(図 1, c)。

4. 研究成果

本研究により明らかとなった、栄養共生系におけるメタン生産の基本原則には下線を付して著した。

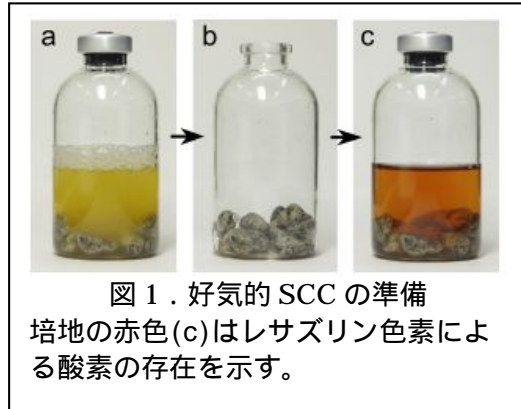


図 1. 好気的 SCC の準備
 培地の赤色(c)はレサズリン色素による酸素の存在を示す。

(1) 最適有機物濃度の調査

長時間メタン生産を行うには有機物(イーストエキストラクトとトリプトン)の濃度の最適化が必要である。調査した結果、両者とも 2% が最適であった。濃すぎる栄養物は微生物増殖を阻害することがわかった。

(2) 固相担体の選択

軽石、多孔質性ガラス、およびヘマタイト粒(硫化水素吸着性を有する)を担体として好気性 SCC を行った。全ての担体に両菌の付着が観察され(図 2)、メタン生産が見られた。差はわずかであったが、軽石がもっとも大きなメタン生産を与えたことから、以後の研究では軽石を固相担体として使用した。

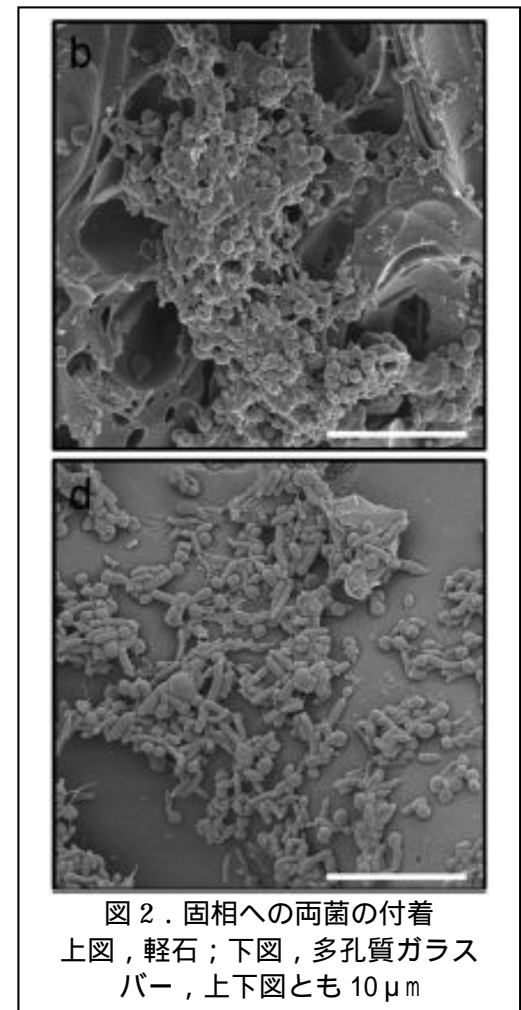


図 2. 固相への両菌の付着
 上図、軽石；下図、多孔質ガラス
 バー、上下図とも 10 μm

(3) 最適固相：液相：気相比の決定
まず、28 ml の培養液を用いた時の最適固相量を、好気性 SCC により、決定した。セラム瓶は一定体積なので、固相の量が増えると気相の体積が減少し、メタンの生産性が影響を受ける。固相量は 5 g が最適であった。次に固相：液相の比を 5:28 (g/ml) に固定し、気相の体積を変化させた。その結果、固相：液相：気相の比が 5 g:28 ml:34 ml のときに最大のメタン生産量が得られた。

(4) O_2 とメタンの濃度の推移
好気性 SCC では、培養初期のメタン濃度上昇は嫌気性 SCC のそれに比べて若干遅かったが、24 h 後のメタン濃度はほぼ同定度 (39%) であった。また、気相の O_2 濃度は常に 10% 以上であった。これらの事実は、液相で生じた硫化水素が気相の O_2 と反応して消去されたことを示唆する。実際、液相の深度により硫化水素濃度は変化した。固相における発酵細菌の活発な硫化水素生産が、好気気相(空気)下でも液相を嫌気性にして、硫化水素を含まないメタン生産を可能にすることが示唆された。

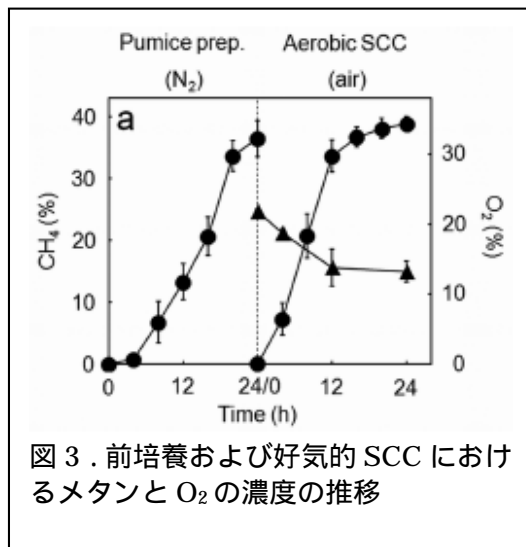


図3. 前培養および好気的 SCC におけるメタンと O_2 の濃度の推移

(5) 好気性 SCC の持続性
固相と気相を好気的なものに入れ替えることにより、好気的 SCC を連続 10 回行っても 24 h 後のメタンと O_2 の濃度は変わらなかった。この結果は、本法が培養液の交換によりほぼ永続的にメタン生産可能であることを示唆した。

(6) CO_2 除去と減圧化の効果
好気的 SCC と嫌気的 SCC のメタン生産が同程度であったことは、気相の O_2 がメタンに置き換わったことを示唆する。もし、この理解が正しければ、他の気体を消去してもメタン生産は増加するはずである。発酵細菌が出した CO_2 を吸収するため、水酸化ナトリウムを入れた小試験管をセラム瓶内に配置して好気的 SCC を行った。すると、24 h 後のメタン濃度は 53% にまで上昇し、メタンは点火可能になった。この結果は、液相中で発酵細菌から CO_2

供給がある栄養共生系では、気相の CO_2 はメタン生産の阻害剤として働くことを示唆した。さらに、気相減圧化の効果を確認するために、気相から 40 ml を注射器で引き、減圧化して好気的 SCC を行くと、メタン濃度はさらに上昇した (58%)。この事実は、 O_2 や CO_2 の除去によるメタン生産の促進と矛盾しない。

表1. 本系におけるメタン生産のまとめ

co-cultivation	CH ₄ concentration (%)
batch cultivation in Tc-S ^{0b} medium (0.3% of each organic)	11 ± 1 ^c
batch cultivation in MP medium (2% of each organic)	30 ± 2 ^c
aerobic SCC in aerobic MP medium	39 ± 1 ^d
with CO ₂ removal ^f	53 ± 2
with CO ₂ removal ^f plus manual decompression ^g	58 ± 2

(7) コストとしての培養液量の評価
使用する培養液の量はコストとなる。そこで‘点火可能なメタンの生産’を条件にして、培養液の量を 23, 28, および 33 ml と変化させ、好気的 SCC により生産されるメタンの量を測定した。その結果、1 g 有機物あたりのメタン生産量は 23 および 28 ml 培養液の時に最大で 700 μ mol であった。24 h 培養後の気相は全て点火可能であった。この結果は、コスト面からは培養液の量をさらに減らす余地が残されていることを示唆する。

(8) スフェロイド形成の効果
T. globiformans は増殖初期にスフェロイドを形成した。スフェロイドは微好気条件でも増殖を開始した。一旦開始すれば、あとは硫化水素の発生により安定して増殖した。スフェロイドの形成が、共生系の好気下での増殖開始に寄与する可能性が示唆された。

(9) グレイガイトの効果
M. jannaschii の単独培養では、グレイガイトを添加すると、 H_2 を効率的に利用できるためにメタン生産は 10 倍に増大した。軽石持込培養でも、軽石中の酸化鉄が硫化水素によりグレイガイトに変化することが予想された。しかし、合成グレイガイトを添加してもメタン生産は顕著に増大しなかった。共生系では発酵細菌からの水素供給の絶対量に限りがあることが示唆された。

本研究で開発されたメタン生産系は、微生物の付着した軽石に新しい培地を加えて密閉容器内で培養するだけで素早く点火可能なメタンを生産した。ごみ処理場などと併設すれば熱源は低コストで得られるであろう。硫化水素を発生しない点がオペレーターフレンドリーである。有機物のコストがかかるが、将来遺伝子操作により発酵細菌が多種類の有機物を利用できるようになればコスト的にもメタン生産系として実用化可能であろう。現状で

も、災害時等の緊急なメタン生産には利用可能である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

(1) Tomohiko Kuwabara, Kensuke Igarashi (2017) Progeny production in the periplasm of *Thermosipho globiformans*. *Extremophiles* 21, in press. 査読有
DOI: 10.1007/s00792-017-0944-0

(2) Kensuke Igarashi, Yasuhisa Yamamura, Tomohiko Kuwabara (2016) Natural synthesis of bioactive greigite by solid-gas reactions. *Geochim. Cosmochim. Acta* 191, 47-57. 査読有
DOI: 10.1016/j.gca.2016.07.005

(3) Kensuke Igarashi and Tomohiko Kuwabara (2016) Hydrogen-Sulfide-Free Methane Production by Fermenter-Methanogen Syntrophy Using Dacite Pumice under Aerobic Gas Phase. *Energy Fuels* 30 (6), 4945-4950. 査読有
DOI: 10.1021/acs.energyfuels.6b00494

〔学会発表〕(計 5 件)

(1) Kensuke Igarashi, Yasuhisa Yamamura, Tomohiko Kuwabara (2016) Activation of Methanogenesis by Greigite. 11th International Congress on Extremophiles, September 12-16, Kyoto, JAPAN

(2) Tomohiko Kuwabara, Kensuke Igarashi (2016) Proliferation of *Thermosipho globiformans* Studied Using High-Temperature Microscopy. 11th International Congress on Extremophiles, September 12-16, Kyoto, JAPAN

(3) 五十嵐健輔、桑原朋彦 (2015)
発酵細菌 - メタン菌栄養共生系の空気下固相培養法によるメタン生産
第 16 回極限環境生物学会年会, 2015 年 11 月 8, 9 日, 東京海洋大学, 東京都港区

(4) 桑原朋彦、五十嵐健輔 (2015)
Thermosipho globiformans のペリプラズムにおける子孫形成
第 16 回極限環境生物学会年会, 2015 年 11 月 8, 9 日, 東京海洋大学, 東京都港区

(5) 五十嵐健輔、山村泰久、桑原朋彦 (2015)
グライタイト(Fe_3S_4)の新奇合成法とメタン菌への効果
第 28 回日本アーキア研究会 2015 年 7 月 23, 24 日, 愛媛大学, 愛媛県松山市

〔その他〕

ホームページ等

Kuwa lab.

<http://www.biol.tsukuba.ac.jp/~kuwabara/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑原 朋彦 (KUWABARA, Tomohiko)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号: 80153435

(2) 研究分担者

五十嵐 健輔 (IGARASHI, Kensuke)

産業技術総合研究所・生物プロセス研究部

門・特別研究員

研究者番号: 90759945