

Environment Research and Technology Development Fund

環境研究総合推進費補助金 総合研究報告書

電気共生型メタン生成を利用した有機性廃棄物の

高効率バイオガス化技術の開発

(3K162002)

平成 28 年度～平成 29 年度

Development of Processes for Efficient Biogas Production from
Organic Wastes by Induction of Electric Syntrophy

産業技術総合研究所 加藤 創一郎

平成 30 年 5 月

目 次

I. 成果の概要	• • • • • 1
1. はじめに (研究背景等)	
2. 研究目的	
3. 研究方法	
4. 結果及び考察	
5. 本研究により得られた主な成果	
6. 研究成果の主な発表状況	
7. 研究者略歴	
II. 成果の詳細	
II-1 電気共生型メタン生成を利用した有機性廃棄物の 高効率バイオガス化技術の開発	• • • • • 8
要旨	
1. はじめに	
2. 研究目的	
3. 研究方法	
4. 結果及び考察	
5. 本研究により得られた成果	
6. 国際共同研究等の状況	
7. 研究成果の発表状況	
8. 引用文献	
III. 英文 Abstract	• • • • • 25

I. 成果の概要

補助事業名	環境研究総合推進費補助金 循環型社会形成推進研究事業（平成 28 年度～平成 29 年度）
所管	環境省 及び 独立行政法人 環境再生保全機構
研究課題名	電気共生型メタン生成を利用した有機性廃棄物の高効率バイオガス化技術の開発
課題番号	3K162002
研究代表者名	加藤創一郎（産業技術総合研究所）
国庫補助金	12,208,000 円（うち平成 29 年度：6,175,000 円）
研究期間	平成 28 年 4 月 1 日～平成 30 年 3 月 31 日
本研究のキーワード	微生物、メタン発酵、有機性廃棄物、電気共生、導電性粒子
研究分担者	なし

1. はじめに（研究背景等）

現在、農業・林業に由来する畜産廃棄物や農作物残渣、生活排水の活性汚泥法処理に伴い発生する余剰汚泥、都市部から発生する食品廃棄物など、多量の有機性廃棄物が未利用のまま処理されている。これらの有機性廃棄物は水分含量が高いという特徴から、焼却発電等の再エネルギー化が困難である。嫌気性微生物を利用したバイオガス化（メタン発酵）は高水分含量の有機性廃棄物処理に有効であるが、「固体基質や難分解性物資を含む廃棄物（余剰汚泥、油脂含有廃水など）の処理効率化」、「流入基質の変動による処理の不安定化・崩壊の防止」などの点では更なる改善が必要である。

メタン発酵は多様な微生物種の共同作業により進行する。一連の反応で律速段階となるのが「有機酸酸化細菌」と「水素利用メタン生成アーキア」による水素授受を介した共生反応（水素共生型メタン生成）である。この反応が停滞すると、有機酸が過剰に蓄積し最終的に系の崩壊を引き起こす。水素共生型メタン生成は、エネルギー（電子）のキャリアである水素が有機酸酸化菌からメタン生成アーキアに渡されることで成立する。しかしこの共生は「水素発生の酸化還元電位が非常に低くエネルギーギャップが生じる」、「微生物間の水素拡散輸送が非常に遅い」という理由から非常に非効率的な反応である。

研究代表者らは導電性粒子を流れる電流が異種微生物間の電子移動を媒介しうることを実証し、新規共生機構として「電気共生」を提唱した。電気共生型メタン生成では「反応電位が容易に変化可能でありエネルギーギャップが生じない」、「通常の律速段階である物質拡散に依存しない」という理由から、水素共生よりも高効率なメタン生成が可能である。本研究では、申請者らが発見した新規微生物代謝である電気共生型メタン生成を利用した、有機性廃棄物（特に食品系廃棄物、余剰汚泥）のバイオガス化の高効率化・安定化を達成するための基盤技術の創出を目的とした。

2. 研究開発目的

本研究では、研究代表者らが発見した新規微生物代謝「電気共生型メタン生成」を利用した有機性廃棄物の高効率バイオガス化技術を創出し、循環型社会の形成、バイオマス利用、温室効果ガス削減に向けた環境政策に貢献することを最終目的とした。メタンは有機物分解菌とメタン生成アーキアとのエネルギー（電子）伝達を介した共生により生成される。従来その電子伝達は水素などの電子キャリア物質の拡散輸送によってのみ媒介されると考えられていた。申請者らは新規かつ高効率な共生機構として、鉄鉱物などの導電性ナノ粒子を流れる電流を介した微生物間電子伝達にもとづく「電気共生型メタン生成」を発見した。本研究では「安価な導電性素材の添加により電気共生型メタン生成を人為的に誘発し、高効率かつ安定な有機性廃棄物

の分解・バイオガス化が可能である」ことを以下4点の研究開発により実証することを目的とした。

- (1) 導電性素材の検討：モデル共培養系を対象に、添加する素材の導電性、粒子サイズ、親水・疎水性などの物性が電気共生型メタン生成の誘発に及ぼす影響を調べ、効果が高く安価な導電性素材を開発・選定する。
- (2) 試験管レベルでの実証試験：実際のメタン発酵微生物群に(1)で選定した導電性素材を添加することで、有機性廃棄物（有機廃水、家畜糞尿、余剰汚泥など）の分解・メタン生成が促進可能であることを試験管レベルで実証する。
- (3) 電気共生型メタン生成に関与する微生物種の特定：(2)の実験において導電性素材の添加時に特異的に優占し電気共生型メタン生成に関与する有機物酸化菌、メタン生成アーキアを特定する。また有用微生物と導電性素材との付着性・凝集性を評価する。
- (4) ラボスケールリアクターでの実証試験：数 L 容の攪拌型バイオリアクターを使用し、実際の処理時に近い条件（基質の連続流入、負荷量変動など）で安定的に有機性廃棄物の高効率分解・メタン生成が可能であることを実証する。

3. 研究方法

(1) 導電性素材の検討

電気共生型メタン生成のモデル系には有機物を分解し導電性固体に電子を注入可能な *Geobacter metallireducens* と、導電性固体中の電子を利用し二酸化炭素からメタンを作ることで生育可能なメタン生成アーキア *Methanosarcina barkeri* の2種からなる培養系を使用した。モデル共生系は 20 mM のエタノールを唯一の基質として添加した無機培地で嫌氣的に培養し、継時的に気相中のメタン量をガスクロマトグラフィーによって測定した。添加する導電性粒子は、特に記載しない限り 20 mg/培養液 20 ml (0.1%相当) で添加した。添加する導電性素材としては、マグネタイト (Fe_3O_4 、当実験室で合成、一次粒径 20 nm 程度) 活性炭 (Sigma-aldrich 社、粒径約 150 μm)、カーボンブラック (Vulcan XC-72、Fuel Cell Earth 社)、酸化グラフェン、還元型酸化グラフェン (rGO)、Amino-PEG 基付加 rGO (rGO-NH₂) Octadecylamine 基付加 rGO (rGO-ODA) (以上 NanoInnova technologies 社) を使用した。また活性炭種としては大阪ガスケミカル株式会社より提供を受けた市販の活性炭 (FP-1, -3, -4, -6, -8, -9, カルボラフィン 6) も使用した。

(2) 試験管レベルでの実証試験

(2a) 油脂含有モデル廃水：食品系廃棄物のモデルとして油脂（サラダ油）を分解基質として実験をおこなった。微生物源としては余剰汚泥消化槽汚泥を使用した（神戸市より提供、運転温度約 42°C、採取後冷蔵保存したものを適宜使用、以下の実験も同様）。培養には 80 ml 容のバイアルを使用し、100 mg の市販サラダ油（日清サラダ油、日清オイリオ社）、および界面活性剤 (Tween80、12 mg) を添加した無機培地 18 ml と微生物源となる消化槽汚泥 2 ml からなる培養系を N₂:CO₂ (80:20) 気相下、静置条件、42°C で培養した。培養過程で培養液を一部採取し、HPLC により有機酸の定量をおこなった。

(2b) 固形食品廃棄物：固体状の食品成分としてタンパク粉末（大豆由来、Wako）、でんぷん粉末（トウモロコシ由来、Wako）、セルロース（濾紙、Advantec No1、5 mm 四方に裁断）、各 2.5~5 g/L を基質として使用した。その他の条件は 2a と同等のものを使用した。

(2c) 廃水処理余剰汚泥のバイオガス化：活性汚泥法による下水処理の余剰汚泥は、札幌市創成川水再生プラザより提供をうけ、採取後冷蔵保存したものを適宜使用した。基質となる余剰汚泥を 9 ml、微生物源となる消化槽汚泥を 2 ml、容量調整用の無機培地を 9 ml 添加し（総液量約 20 ml）、気相は N₂:CO₂ (80:20) で置換し、静置条件、42°C で培養をおこなった。余剰汚泥モデルとして実施した微生物菌体分解試験では、放線菌 *Micrococcus luteus* の凍結乾燥菌体 (Wako) を使用した。無機培地 18 ml、微生物源となる消化槽汚泥を 2 ml、乾燥菌体 100 mg からなる培養系を N₂:CO₂ (80:20) 気相下、静置条件、42°C で培養した。

(3) 電気共生型メタン生成に関与する微生物種の特定

2 の条件での集積培養を数回おこなった後、培養液の一部を採取し、遠心により菌体を回収した。回収した

菌体から FastDNA SPIN Kit for Soil (Q-biogene 社) により DNA を抽出し、バクテリアおよびアーキアを対象としたプライマーセット (515F, 805R) により 16S rRNA 遺伝子の一部を PCR 増幅し、その産物を MiSeq による次世代シーケンス解析に供した。得られた配列データを解析ソフトウェア Qiime に供し、微生物群集構造解析をおこなった。

4. 結果及び考察

(1) 導電性素材の検討

これまでの研究で、酸化鉄、グラファイト、木炭等の多様な導電性粒子が電気共生を媒介しうることが示されていたが、異なる素材間でその効果を体系的に比較した研究はなかった。また実際の処理には安価で大量に入手可能な材料が求められる。項目 1 では様々な導電性素材を使用し、素材の各特性 (導電性、粒子サイズ、親水・疎水性など) が電気共生の誘発に及ぼす影響を定量的に評価し、実証実験に使用する導電性素材を選定することを目的とした。

(1a) 電気共生型メタン生成のモデル系構築

電気共生型メタン生成に関するこれまでの研究では、主に多種多様な微生物が存在する複雑な微生物群集を使った研究がなされていた。しかし導電性素材の効果を定量的に、再現よく比較するためには、不安定な微生物群集の利用は適していない。そこで本項目ではまず、安定した実験を可能にするためのモデル共生系の構築に着手した。

導電性粒子に電子を注入する能力を持つ有機物酸化細菌として各種 *Geobacter* 属細菌を、導電性粒子から電子を受け取りメタンを生成する能力を持つメタン生成アーキアとして *Methanosarcina* 属、*Methanosaeta* 属のメタン生成菌各数種を使用し、酢酸、プロピオン酸、エタノール等のいくつかの低分子有機酸・アルコールを基質として使用し検討を行った。その結果、*Geobacter metallireducens* と *Methanosarcina barkeri* の組み合わせでエタノールを基質として使用することで、導電性粒子 (マグネタイトナノ粒子) の存在下でのみ活発なメタン生成がみられるモデル共生系を構築することに成功した。

(1b) モデル共生系を利用した導電性素材の効果比較検討

* 1b-1. 様々な導電性素材のメタン生成促進効果の比較検討

1a で構築したモデル共生系を使用し、様々な導電性素材のメタン生成促進効果の比較検討を行った。その結果、自然環境にも豊富に存在する導電性の酸化鉄 (マグネタイト) 粒子のみならず、カーボンブラック、グラフェン、活性炭といった人工の導電性炭素素材でも共生誘導効果が確認された。興味深いことに、電気共生の誘導効果は粒子の電気伝導度とは相関がみられなかった。このことから、粒子のサイズや形状、表面の親水・疎水性といった、導電性以外の粒子の物性が共生誘導効果に大きく寄与していることが示唆された。また炭素素材の中では、活性炭が特に高い共生誘導効果を示した。活性炭は比較的安価でかつ入手が容易であり、また現在すでに廃水処理等の分野で (主に吸着剤として) 広く利用され環境安全性も示されていることから、実際の廃棄物メタン発酵への応用には活性炭の利用が適していると考えられた。

* 1b-2. 粒子表面の親水・疎水性の影響評価

1b-1 の実験で導電性以外の粒子物性の重要性が示唆された。そこで本項では粒子表面の親水・疎水性が電気共生型メタン生成の誘導に及ぼす影響を評価した。基準となる導電性素材として還元型グラフェンオキシサイド (rGO) を使用し、これに親水基 (NH₂ 基) を付加した rGO-NH₂、疎水基 (Octadecylamine, ODA) を付加した rGO-ODA を使用し、モデル共生系のメタン生成活性を比較した。その結果、メタン生成活性は親水性の rGO-NH₂ で高く、疎水性の rGO-ODA で低くなる傾向が確認された。またこれらの培養物を走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察に供した結果、親水性の rGO-NH₂ 添加系では粒子表面に *G. metallireducens* と *M. barkeri* の細胞の付着が確認された一方、疎水性の rGO-ODA 添加系では特にメタン生成菌 *M. barkeri* の付着がほとんど見られなかった。微生物の表面は比較的親水性であるため、粒子の親水化により付着性が向上し、結果的

に共生代謝が促進されたと考えられる。以上の結果から、導電性粒子の親水化がメタン発酵の活性向上に大きく寄与していることが示された。

*1b-3. 添加活性炭種の検討

1b-1 の実験により、活性炭をメタン発酵活性化に使用する導電性粒子の候補として選択した。本項では、大阪ガスケミカル株式会社の協力の下、様々な市販の活性炭種を使用し電気共生型メタン生成の誘導効果の比較検討を行った。ここでは特に粒子賦活化の条件（表面親水性に影響すると考えられる）が異なる活性炭種を使用した。活性炭種によってメタン生成速度に多少の差がみられ、今回使用したものの中ではFP-3が最も高い効果を示したが、1b-2の実験から予想されたほどの大きな効果の差は見られなかった。この結果から、使用している活性炭自体がすでに電気共生の誘導に必要とされる程度を十分に満たすほどに親水性であり、これ以上の親水化による改善は見込めないものと判断した。

(2) 試験管レベルでの実証試験

電気共生による分解・メタン生成の促進効果は、メタン発酵の中間代謝産物である有機酸やアルコールに関して多くの研究がなされているが、本研究の開始当初、高分子の有機性廃棄物に対しても機能するのかわかり不明であった。そこで研究項目2では、項目1で選定した有用導電性素材（活性炭）を使用し、複雑な有機性廃棄物の分解・メタン生成促進が可能であることの実証を目的とした。

(2a) 油脂含有食品廃棄物

高分子の有機性廃棄物の一例として、嫌気分解が困難であり、かつ食品製造業者からのバイオガス化のニーズも高い油脂含有廃棄物をターゲットとして選定した。実験としてはサラダ油（5 g/L）を基質として使用し、メタン発酵リアクター由来の微生物群集を接種源として使用した。その結果、活性炭の添加（1 g/L）による明確なメタン生成の促進が確認された。活性炭を添加した培養系は5回以上にわたる継代培養ののうち高いメタン生成活性を保持しており、通算で半年以上にわたり安定的かつ高活性な油脂分解、メタン生成が継続された。

電気共生の誘導はメタン生成フローの下流、すなわち有機酸の共生的分解に特に寄与することが知られている。そこで油脂分解培養過程の有機酸濃度を測定した。今回の測定では酢酸、プロピオン酸以外の有機酸、アルコールは検出されなかった。活性炭の添加無しの系では、約11 mMの酢酸、および約5 mMのプロピオン酸の蓄積がみられたのに対し、活性炭添加の系ではいずれも検出限界以下であった。この結果は、活性炭の添加による電気共生の誘導により系の律速段階となっている有機酸分解が促進され、それによりメタン生成反応全体の促進、および安定化につながったことを示唆している。

(2b) 固形食品廃棄物

国内で排出される食品系廃棄物の多くは固体分を多く含む形で排出される。そこで本項では、食品廃棄物に含まれる主要な固形状成分（たんぱく、でんぷん、セルロース）について、それぞれのモデル物質を使用し、活性炭添加によるバイオガス化促進が可能であるかどうか検証した。

*2b-1. たんぱく粉末のバイオガス化

大豆由来たんぱく粉末（5 g/L）を基質とし、活性炭添加（1 g/L）による分解・バイオガス化促進試験を行った。3回の継代培養を行ったが、そのいずれにおいても活性炭添加時に高いメタン生成が確認された。継代培養3回目の培養物に対しHPLCによる有機酸分析を行った結果、いずれの培養物においても特に培養初期過程において酢酸・酪酸等の蓄積がみられた。酢酸、酪酸の双方とも、蓄積量は活性炭添加時に有意に低く抑えられていた。以上のことから、項目2aの油脂の実験と同様、固形状たんぱくの分解において、活性炭の添加は過剰な有機酸の蓄積を抑制し、バイオガス化を促進可能であることが示された。

*2b-2. でんぷん粉末のバイオガス化

トウモロコシ由来でんぷん粉末 (2.5 g/L) を基質とし、活性炭添加 (1 g/L) による分解・バイオガス化促進試験を行った。4 回の継代培養を行い、そのいずれにおいても活性炭添加によるメタン生成の促進がみられた。継代培養 4 回目の培養物に対し、HPLC による有機酸分析を行った。本培養系では酢酸・酪酸以外の有機酸種は検出限界以下であった。タンパク分解実験と同様、培養の初期に酢酸・酪酸等の蓄積がみられた。酢酸の最大蓄積量は活性炭添加・無添加時でほぼ同程度であったが、活性炭添加時により速やかな消費がみられた。酪酸の蓄積量は活性炭添加により有意に低く抑えられていた。以上のことから、油脂・タンパクの実験と同様、固形状でんぷんの分解において、活性炭の添加は過剰な有機酸の蓄積を抑制し、バイオガス化を促進可能であることが示された。

*2b-3. セルロースのバイオガス化

セルロース (5 mm 四方にカットした濾紙、5 g/L) を基質とし、活性炭添加 (1 g/L) による分解・バイオガス化促進試験を行った。4 回の継代培養を行い、そのいずれにおいても、活性炭添加によるメタン生成の促進がみられた。継代培養 4 回目の培養物について有機酸分析を行った結果、他の培養系と同様に酢酸、酪酸が検出され、その濃度は活性炭添加時に低い傾向にあった。以上のことから、固形状セルロースの分解においても、活性炭の添加は過剰な有機酸の蓄積を抑制し、バイオガス化を促進可能であることが示された。

(2c) 廃水処理余剰汚泥のバイオガス化

*2c-1. 廃水処理余剰汚泥のバイオガス化

余剰汚泥は活性汚泥法により発生する微生物菌体を主な成分とする廃棄物である。現状は主に乾燥後に埋め立てにより処理されており、その効果的な減容化、エネルギー変換技術が求められている。微生物源として汚泥消化槽由来のメタン発酵微生物群を使用し、下水処理場から分与された余剰汚泥の分解・メタン発酵をおこなった。その結果、導電性粒子として活性炭を添加した系でコントロールと比較しメタン生成が向上しており、電気共生の誘導によるメタン生成の促進が起こっていることが示唆された。しかし実際の余剰汚泥を使用した実験では、採取した余剰汚泥の季節変動や保存状態により結果に多少のばらつきが確認されることもあった。また活性炭の添加によるメタン生成の促進効果は、項目 2a、2b の食品廃棄物と比較すると小さいものであった。これはおそらく分解過程の上流部分(汚泥の溶解)が律速となっているためと予想され、今後その部分についての研究をおこなっていく必要があると考えられた。余剰汚泥の消化に関して、上流部分の反応を担っている微生物の明確な特定に至っている研究例すらないのが現状であり、まずは微生物種の特定を含めた基礎的な部分から研究を進める必要があると考えている。

*2c-2. 放線菌乾燥菌体 (余剰汚泥モデル) の分解・メタン生成

余剰汚泥のモデル基質として、市販の放線菌 (*Micrococcus luteus*) 乾燥菌体を基質として同様の実験をおこなった。その結果、実際の余剰汚泥を使用した場合に比べ、活性炭の添加によるメタン促進の効果が顕著にみられ、また実験間の再現も非常に良いものであった。この結果は本実験系が余剰汚泥バイオガス化の効率化を検討するための優れたモデル系として機能しうることを示している。今後このモデル系を対象とし余剰汚泥分解・バイオガス化の上流部分(菌体成分の溶解)に関与する微生物の特定、分子機構の解明を行っていくことで、余剰汚泥バイオガス化の促進技術の開発につながると考えている。

(3) 電気共生型メタン生成に関与する微生物種の特定

どのような微生物種が有機性廃棄物からの電気共生型メタン生成に関与するかについての知見は、研究開始当初全く得られていなかった。実際の反応を担う微生物に関する情報は、今後実廃水、廃棄物を使用したラボスケールでの実証試験の際に、電気共生型メタン生成が安定的に機能しているかどうかの判断指標として必要となる。

(3a) 油脂含有食品廃棄物

項目 2a で実施した油脂含有廃水分解メタン生成について、電気共生型メタン生成反応に関与している微生物群を特定するために、16S rRNA 遺伝子配列の次世代シーケンス解析をおこなった。バクテリア、アーキアともに活性炭の添加により群集構造が大きく変化した。さらに詳細な比較を行った結果、メタン生成菌については、活性炭添加無し条件では水素利用性の *Methanospirillum*、酢酸利用性の *Methanosarcina* が優占していたのに対し、活性炭添加条件では酢酸利用性の *Methanosaeta* が優占しており、明確な違いが見取れた。上述の通り *Methanosaeta* 属のメタン生成菌の中には *Geobacter* 属細菌との電気共生型メタン生成をおこなうものが知られており、今回の系でもこの微生物が電気共生に関与していると考えられた。

Bacteria については、*Syntrophomonas* 属に近縁なものが 2 種検出された。*Syntrophomonas* 属には水素共生的に長鎖脂肪酸を分解するものが知られており、今回の系でも油脂分解に寄与していることが予想される。活性炭添加の系で有意に優占化していた微生物が 2 種検出されたが、これらはいずれも未培養の系統群 (OP8、WWE1) に分類され、その代謝形式の詳細は全く不明である。これらの未培養系統群の中に、電気共生型の有機酸分解をおこなうものがあるとすれば大きな発見であり、今後これらの微生物をターゲットとした詳細な解析をおこなっていく必要がある。

(3b) 固形食品廃棄物

項目 2b で実施した固体状食品成分 (たんぱく、セルロース) 分解メタン生成について、電気共生型メタン生成反応に関与している微生物群を特定するために、16S rRNA 遺伝子配列の次世代シーケンス解析をおこなった。いずれの系でも、油脂分解や後述の活性汚泥分解の系と比較すると、活性炭の添加による大きな菌叢変化は観察されなかった。この理由としては、たんぱく、セルロースは上流の発酵性細菌が比較的エネルギーを得やすい基質であるため、それらに関与する微生物種が優占してしまい、電気共生に関与する下流部分の微生物の割合が低くなってしまったことがあげられる。この問題を解決するためには、例えば ^{13}C ラベルした有機酸を添加し、それを資化した微生物のみを追跡する手法 (Stable Isotope Probing 法) などの適用が必要であり、これは今後の課題と言える。

(3c) 廃水処理余剰汚泥

項目 2c の継代培養で集積した余剰汚泥分解微生物群集について、16S rRNA 遺伝子配列の次世代シーケンス解析による群集構造解析をおこなった。バクテリアの群集構造は活性炭の添加により大きく変動した。一方でアーキアについてはいずれも優占しているのは *Methanosaeta* 属のメタン生成アーキアであった。*Methanosaeta* 属は酢酸利用性のメタン生成アーキアであるが、それと同時に、電気共生的に導電性固体物質を利用したメタン生成能も有している。またアーキアでは水素利用性の *Methanospirillum*、*Methanothermobacter* も検出され、活性炭の有無によりその優占度に違いがみられたが、その理由は定かではない。

Bacteria に関しては、基質である余剰汚泥でのみ優占していた微生物は *Acidovorax*, *Thiothrix*, *Zoogloea* といった活性汚泥処理で一般的に優占する微生物種であった。またこれらの微生物の相対頻度がメタン発酵処理後に大きく低下しているということは、これらの微生物種の菌体成分が処理の過程で良好に分解されていることを示している。

添加無し、および活性炭添加の系で共通して優占化していたもの (種・株レベルではおそらく異なるが大きな分類体系としては一致するものも含む) には、Bacteroidetes 門、Spirochaetes 門に分類される、既知株との近縁性が低い (83-95%) 微生物が多数であった。これらの分類群の微生物は様々な有機物の嫌気的な発酵をおこなう微生物であるとされており、これらの中にはメタン発酵の上流部分、すなわち余剰汚泥中の菌体成分の分解に寄与しているものが含まれていると考えられる。

興味深いことに、活性炭添加条件でのみ優占する微生物の多くは、近縁種が鉄還元性細菌であるものであった (*Fervidicella*, *Caloramator*, *Desulfuromonas*)。これまでの研究で、中温環境で導電性粒子を添加し電気共生的メタン生成を誘導した際、優占してくるのは鉄還元細菌である *Geobacter* 属細菌であることが多かつ

た。今回の培養条件は 42℃と比較的高温であり、*Geobacter* 属細菌の中には高温で生育するものは知られていない。以上のことから、今回の活性炭添加をおこなった系では確かに電気共生反応が進行し、上記 3 種の微生物種が有機物分解・活性炭への電子注入反応を担っていることが示唆された。

(4) ラボスケールリアクターでの実証試験

本研究の開始時点で、電気共生型メタン生成が確認されているのは試験管レベルの培養のみであり、実際の処理条件（基質の連続流入、負荷量・環境要因変動）で機能するかは不明であった。そこで本項目では、数 L スケールのラボスケールリアクターを作製し、連続条件での培養を行い、実際の処理に近い条件で導電性粒子の添加によるバイオガス化促進が可能であることの実証を目的とした。

活性炭の添加により、微生物と活性炭粒子からなる粒子の形成促進がみられ、懸念していた活性炭粒子の外部流出はほとんど起こらなかった。しかし 4 か月ほどの連続運転の期間中、活性炭の添加による明確な COD 除去率・メタン生成の促進を観察するまでには至らなかった。この要因としては、基質として比較的分解しやすいセルロースを使用したことで、活性炭の添加無しでも良好な基質分解・メタン生成が起こったためと考えられる。今後は項目 2 で使用したような油脂や固体性の基質を使用することで、活性炭添加による促進効果を観察できればと考えている。

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

項目 1 の導電性素材の検討では、導電性素材の効果を定量的に評価するためのモデル共生系の構築に成功し、それを使用することで粒子の導電性だけでなく表面親水性が重要であることを見出し、安価で効果の高い素材として活性炭が実用化に有望であることを見出した。項目 2 の試験管レベルでの実証試験では、活性炭の添加により、油脂・でんぷん・たんぱく・セルロース・余剰汚泥（微生物菌体）といった多種多様な高分子有機物の分解・バイオガス化を促進可能であることを初めて実証できた。項目 3 の電気共生型メタン生成に関与する微生物種の特定では、これまでに電気共生への関与が知られていない新規微生物の同定に成功し、学術的観点からも興味深い知見を得ることができた。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

畜産廃棄物や農作物残渣、余剰汚泥、食品廃棄物などの多くは、現在焼却・埋め立てにより処理されている。焼却処理はその過程で大量の二酸化炭素を放出する。また埋立地からは二酸化炭素の約 20 倍の温室効果係数を持つメタンが大気中に大量に放散されている。本研究で実証に至った導電性粒子を利用した有機性廃棄物からの高効率バイオガス化技術は、これまで焼却・埋め立て処理されていた廃棄物を省エネルギーかつ温室効果ガスを出さずに処理することを可能にする。今後企業等の協力を得ての実証試験を経たのち、本技術の社会実装に至った際には、温室効果ガス削減を見据えた環境政策に貢献可能である。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

<査読付論文>

特に記載すべき事項はない。

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない。

(2) 主な口頭発表 (学会等)

- 1) 加藤創一郎：超循環型社会の創出に向けた微生物電気化学イノベーションワークショップ (2016)
「電気共生：導電性粒子を介した異種微生物間電子授受反応」
- 2) 加藤創一郎：異分野融合シンポジウム「微生物を基軸とした環境と電気と金属」(2017)
「導電性粒子との電子授受にもとづく微生物のエネルギー代謝」
- 3) S. KATO: Anaerobic Microbial Syntrophy Forum, Chengdu, China, 2017
“Electric syntrophy: Syntrophic methanogenesis via electric current through conductive materials.”
- 4) S. KATO: IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions, Nagoya Univ., Japan, 2017
“Microbial energy metabolisms based on electrochemical interaction with solid surfaces.”
- 5) S. KATO: The 3rd Solar Fuel Material workshop, Osaka Univ., Japan, 2018
“Microbial metabolisms based on electron exchange with solid materials.”

7. 研究者略歴

研究代表者：加藤 創一郎

東京大学農学部卒業、博士（農学）、現在、産業技術総合研究所主任研究員

研究分担者：なし

II. 成果の詳細

II-1 電気共生型メタン生成を利用した有機性廃棄物の高効率バイオガス化技術の開発

[要旨]

本研究では、申請者らが発見した新規微生物代謝である電気共生型メタン生成を利用した、有機性廃棄物のバイオガス化の高効率化・安定化を達成するための基盤技術の創出を目的とし、(1) 導電性素材の検討、(2) 試験管レベルでの実証試験、(3) 電気共生型メタン生成に関与する微生物種の特定、(4) ラボスケールリアクターでの実証試験、の4つの開発項目に沿って研究を行った。

研究項目1の導電性素材の検討では、再現性の高い実験が可能である電気共生型メタン生成を行うモデル系を構築し、添加する素材の導電性などの物性が電気共生型メタン生成の誘発に及ぼす影響を調べ、効果が高く安価な導電性素材の選定を試みた。その結果、これまでに知られていた導電性酸化鉄粒子に加え**人工的な炭素素材も電気共生誘導効果を持つこと**、中でも**安価で効果が高い粒子として活性炭が有望であること**、**導電性粒子表面の親水性が共生誘導効果に必須であること**を見出すことができた。

研究項目2の試験管レベルでの実証試験では、メタン発酵リアクター由来の微生物群集、および項目1で見出した活性炭粒子を使用し、多様な有機性廃棄物の分解・メタン生成が促進可能であることの実証を試みた。その結果、**油脂・たんぱく・でんぷん・セルロースといった多様な食品成分に加え、余剰汚泥（微生物菌体）といった多種多様な高分子有機物の分解・バイオガス化が活性炭の添加により促進可能であることを初めて実証することができた。**

研究項目3の電気共生型メタン生成に関与する微生物種の特定では、項目2の培養物に対し次世代シーケンサーを用いた微生物群集構造解析を行った。その結果、これまでに**電気共生への関与が知られていない新規微生物（*Fervidicella* など）の同定に成功し**、学術的観点からも興味深い知見を得ることができた。

研究項目4のラボスケールリアクターでの実証試験では、実際に上向流型のバイオリアクターを作製し、連続培養試験を行った。期間中に明確な活性炭による処理の効率化を観察するには至らなかったが、**懸念されていた活性炭流出などを抑え長期間のメタン発酵処理が可能であることを示すことができた。**

1. はじめに

嫌気性微生物を利用したバイオガス化（メタン発酵）による有機性廃棄物の処理は、活性汚泥法などの好氣的微生物処理と比較して、「酸素供給に必要な投入エネルギーを削減可能」、「余剰汚泥の発生が大幅に減少」、「発生したメタンをエネルギーとして利用可能」な省エネルギー型技術である。しかし「固体基質や難分解性物資を含む廃棄物（余剰汚泥、油脂含有廃水など）の処理効率化」、「流入基質の変動による処理の不安定化・崩壊の防止」などの点では更なる改善が必要である。

メタン発酵は多様な微生物種の共同作業により進行する（図1）。一連の反応で律速段階となるのが「有機酸酸化細菌」と「水素利用メタン生成アーキア」による水素授受を介した共生反応（水素共生型メタン生成）である（図2）（引用文献1）。この反応が停滞すると、有機酸が過剰に蓄積し最終的に系の崩壊を引き起こす。水素共生型メタン生成は、エネルギー（電子）のキャリアである水素が有機酸酸化菌からメタン生成アーキアに渡されることで成立する。しかしこの共生は「水素発生の酸化還元電位が非常に低くエネルギーギャップが生じる」、「微生物間の水素拡散輸送が非常に遅い」という理由から非常に非効率的な反応である。

研究代表者らは導電性粒子を流れる電流が異種微生物間の電子移動を媒介しうることを実証し、新規共生機構として「電気共生」を提唱した（引用文献2）。電気共生型メタン生成では「反応電位が容易に変化可能でありエネルギーギャップが生じない」、「通常の律速段階である物質拡散に依存しない」という理由から、水素共生よりも高効率なメタン生成が可能である（図2）（引用文献3,4,5）。本研究では、申請者らが発見した新規微生物代謝である電気共生型メタン生成を利用した、有機性廃棄物（特に食品系廃棄物、余剰汚泥）のバイオガス化の高効率化・安定化を達成するための基盤技術の創出を目的とした。

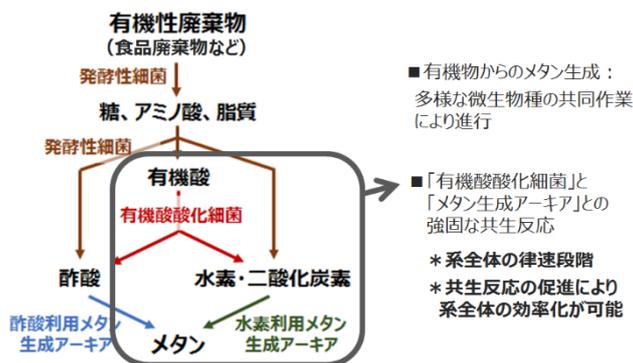


図1. 微生物による有機廃棄物からのメタン生成の代謝フロー。

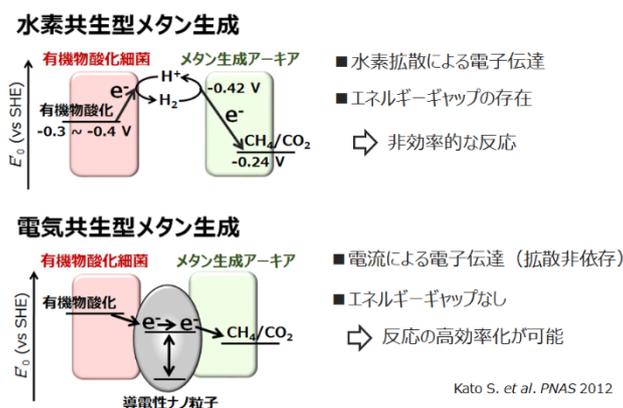


図2. 有機酸化細菌とメタン生成アーキアによる共生的メタン生成の概念図。

(上) 一般的によく知られる、水素を電子キャリアとした「水素共生型メタン生成」。

(下) 研究代表者らにより発見・提唱された、導電性粒子を流れる電流を介した新規共生系、「電気共生型メタン生成」。

2. 研究開発目的

本研究では、研究代表者らが発見した新規微生物代謝「電気共生型メタン生成」を利用した有機性廃棄物の高効率バイオガス化技術を創出し、循環型社会の形成、バイオマス利用、温室効果ガス削減に向けた環境政策に貢献することを最終目的とする。メタンは有機物分解菌とメタン生成アーキアとのエネルギー（電子）伝達を介した共生により生成される。従来その電子伝達は水素などの電子キャリア物質の拡散輸送によってのみ媒介されると考えられていた。申請者らは新規かつ高効率な共生機構として、鉄鉱物などの導電性ナノ粒子を流れる電流を介した微生物間電子伝達にもとづく「電気共生型メタン生成」を発見した。本研究では「安価な導電性素材の添加により電気共生型メタン生成を人為的に誘発し、高効率かつ安定な有機性廃棄物の分解・バイオガス化が可能である」ことを以下4点の研究開発により実証することを目的とした。

- (1) 導電性素材の検討：モデル共培養系を対象に、添加する素材の導電性、粒子サイズ、親水・疎水性などの物性が電気共生型メタン生成の誘発に及ぼす影響を調べ、効果が高く安価な導電性素材を開発・選定する。
- (2) 試験管レベルでの実証試験：実際のメタン発酵微生物群に(1)で選定した導電性素材を添加することで、有機性廃棄物（有機廃水、家畜糞尿、余剰汚泥など）の分解・メタン生成が促進可能であることを試験管レベルで実証する。
- (3) 電気共生型メタン生成に関与する微生物種の特定：(2)の実験において導電性素材の添加時に特異的に優占し電気共生型メタン生成に関与する有機酸化菌、メタン生成アーキアを特定する。また有用微生物と導電性素材との付着性・凝集性を評価する。

(4) ラボスケールリアクターでの実証試験：数 L 容の攪拌型バイオリアクターを使用し、実際の処理時に近い条件（基質の連続流入、負荷量変動など）で安定的に有機性廃棄物の高効率分解・メタン生成が可能であることを実証する。

3. 研究開発方法

(1) 導電性素材の検討

電気共生型メタン生成のモデル系には有機物を分解し導電性固体に電子を注入可能な *Geobacter metallireducens* と、導電性固体中の電子を利用し二酸化炭素からメタンを作ることで生育可能なメタン生成アーキア *Methanosarcina barkeri* の 2 種からなる培養系を使用した。モデル共生系は 20 mM のエタノールを唯一の基質として添加した無機培地で嫌氣的に培養し、継時的に気相中のメタン量をガスクロマトグラフィーによって測定した。添加する導電性粒子は、特に記載しない限り 20 mg/培養液 20 ml (0.1%相当) で添加した。添加する導電性素材としては、マグネタイト (Fe_3O_4 、当実験室で合成、一次粒径 20 nm 程度) 活性炭 (Sigma-aldrich 社、粒径約 150 μm)、カーボンブラック (Vulcan XC-72、Fuel Cell Earth 社)、酸化グラフェン、還元型酸化グラフェン (rGO)、Amino-PEG 基付加 rGO (rGO-NH₂) Octadecylamine 基付加 rGO (rGO-ODA) (以上 NanoInnova technologies 社) を使用した。また活性炭種としては大阪ガスケミカル株式会社より提供を受けた市販の活性炭 (FP-1, -3, -4, -6, -8, -9, カルボラフィン 6) も使用した。

(2) 試験管レベルでの実証試験

(2a) 油脂含有モデル廃水：食品系廃棄物のモデルとして油脂 (サラダ油) を分解基質として実験をおこなった。微生物源としては余剰汚泥消化槽汚泥を使用した (神戸市より提供、運転温度約 42°C、採取後冷蔵保存したものを適宜使用、以下の実験も同様)。培養には 80 ml 容のバイアルを使用し、100 mg の市販サラダ油 (日清サラダ油、日清オイリオ社)、および界面活性剤 (Tween80、12 mg) を添加した無機培地 18 ml と微生物源となる消化槽汚泥 2 ml からなる培養系を N₂:CO₂ (80:20) 気相下、静置条件、42°C で培養した。培養過程で培養液を一部採取し、HPLC により有機酸の定量をおこなった。

(2b) 固形食品廃棄物：固体状の食品成分としてタンパク粉末 (大豆由来、Wako)、でんぷん粉末 (トウモロコシ由来、Wako)、セルロース (濾紙、Advantec No1、5 mm 四方に裁断)、各 2.5~5 g/L を基質として使用した。その他の条件は 2a と同等のものを使用した。

(2c) 廃水処理余剰汚泥のバイオガス化：活性汚泥法による下水処理の余剰汚泥は、札幌市創成川水再生プラザより提供をうけ、採取後冷蔵保存したものを適宜使用した。基質となる余剰汚泥を 9 ml、微生物源となる消化槽汚泥を 2 ml、容量調整用の無機培地を 9 ml 添加し (総液量約 20 ml)、気相は N₂:CO₂ (80:20) で置換し、静置条件、42°C で培養をおこなった。余剰汚泥モデルとして実施した微生物菌体分解試験では、放線菌 *Micrococcus luteus* の凍結乾燥菌体 (Wako) を使用した。無機培地 18 ml、微生物源となる消化槽汚泥を 2 ml、乾燥菌体 100 mg からなる培養系を N₂:CO₂ (80:20) 気相下、静置条件、42°C で培養した。

(3) 電気共生型メタン生成に関与する微生物種の特定

2 の条件での集積培養を数回おこなった後、培養液の一部を採取し、遠心により菌体を回収した。回収した菌体から FastDNA SPIN Kit for Soil (Q-biogene 社) により DNA を抽出し、バクテリアおよびアーキアを対象としたプライマーセット (515F, 805R) により 16S rRNA 遺伝子の一部を PCR 増幅し、その産物を MiSeq による次世代シーケンス解析に供した。得られた配列データを解析ソフトウェア Qiime に供し、微生物群集構造解析をおこなった。

4. 結果及び考察

(1) 導電性素材の検討

これまでの研究で、酸化鉄、グラファイト、木炭等の多様な導電性粒子が電気共生を媒介しうることが示されていたが、異なる素材間でその効果を体系的に比較した研究はなかった。また実際の処理には安価で大量に入手可能な材料が求められる。項目 1 では様々な導電性素材を使用し、素材の各特性（導電性、粒子サイズ、親水・疎水性など）が電気共生の誘発に及ぼす影響を定量的に評価し、実証実験に使用する導電性素材を選定することを目的とした。

(1a) 電気共生型メタン生成のモデル系構築

電気共生型メタン生成に関するこれまでの研究では、主に多種多様な微生物が存在する複雑な微生物群集を使った研究がなされていた。しかし導電性素材の効果を定量的に、再現よく比較するためには、不安定な微生物群集の利用は適していない。そこで本項目ではまず、安定した実験を可能にするためのモデル共生系の構築に着手した。

導電性粒子に電子を注入する能力を持つ有機物酸化細菌として各種 *Geobacter* 属細菌を、導電性粒子から電子を受け取りメタンを生成する能力を持つメタン生成アーキアとして *Methanosarcina* 属、*Methanosaeta* 属のメタン生成菌各数種を使用し、酢酸、プロピオン酸、エタノール等のいくつかの低分子有機酸・アルコールを基質として使用し検討を行った。その結果、*Geobacter metallireducens* と *Methanosarcina barkeri* の組み合わせでエタノールを基質として使用することで、導電性粒子（マグネタイトナノ粒子）の存在下でのみ活発なメタン生成がみられるモデル共生系を構築することに成功した（図 3）（投稿論文準備中）。

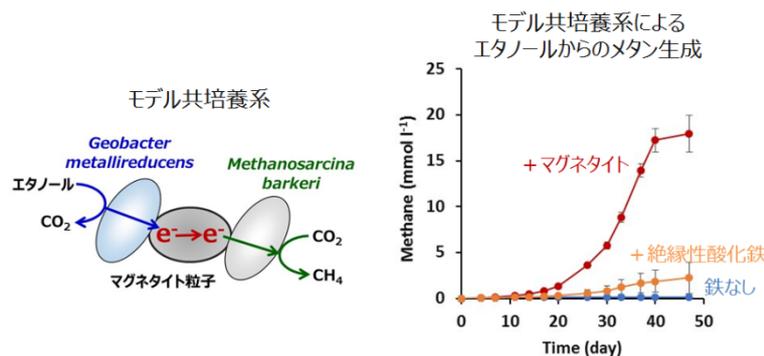


図 3. 電気共生型メタン生成のモデル系の構築。

(左) *Geobacter metallireducens* と *Methanosarcina barkeri* による電気共生型メタン生成の概念図。

(右) 導電性酸化鉄（マグネタイト）添加による電気共生型メタン生成の促進。

(1b) モデル共生系を利用した導電性素材の効果比較検討

* 1b-1. 様々な導電性素材のメタン生成促進効果の比較検討

1a で構築したモデル共生系を使用し、様々な導電性素材のメタン生成促進効果の比較検討を行った。その結果、自然環境にも豊富に存在する導電性の酸化鉄（マグネタイト）粒子のみならず、カーボンブラック、グラフェン、活性炭といった人工の導電性炭素素材でも共生誘導効果が確認された（図 4）（投稿論文準備中）。興味深いことに、電気共生の誘導効果は粒子の電気伝導度とは相関がみられなかった。このことから、粒子にサイズや形状、表面の親水疎水性といった、導電性以外の粒子の物性が共生誘導効果に大きく寄与していることが示唆された。また炭素素材の中では、活性炭が特に高い共生誘導効果を示した。活性炭は比較的安価でかつ入手が容易であり、また現在すでに廃水処理等の分野で（主に吸着剤として）広く利用され環境安全性も示されていることから、実際の廃棄物メタン発酵への応用には活性炭の利用が適していると考えられた。

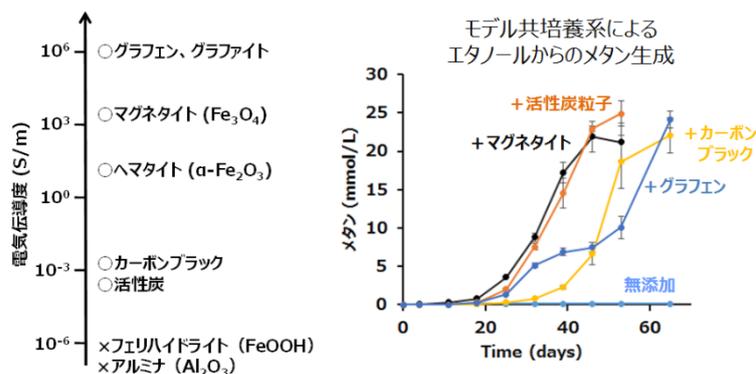


図 4. モデル共生系を利用した導電性素材の効果の比較検証。
 (左) 使用した導電性素材の電気伝導度。
 (右) 各種導電性素材を添加した際のモデル共生系によるエタノールからのメタン生成。

* 1b-2. 粒子表面の親水・疎水性の影響評価

1b-1 の実験で導電性以外の粒子物性の重要性が示唆された。そこで本項では粒子表面の親水・疎水性が電気共生型メタン生成の誘導に及ぼす影響を評価した。基準となる導電性素材として還元型グラフェンオキシサイド (rGO) を使用し、これに親水基 (NH_2 基) を付加した rGO- NH_2 、疎水基 (Octadecylamine, ODA) を付加した rGO-ODA を使用し、モデル共生系のメタン生成活性を比較した。その結果、メタン生成活性は親水性の rGO- NH_2 で高く、疎水性の rGO-ODA で低くなる傾向が確認された (図 5) (投稿準備中)。またこれらの培養物を走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察に供した結果、親水性の rGO- NH_2 添加系では粒子表面に *G. metallireducens* と *M. barkeri* の細胞の付着が確認された一方、疎水性の rGO-ODA 添加系では特にメタン生成菌 *M. barkeri* の付着がほとんど見られなかった (図 6) (投稿準備中)。微生物の表面は比較的親水性であるため、粒子の親水化により付着性が向上し、結果的に共生代謝が促進されたと考えられる。以上の結果から、導電性粒子の親水化がメタン発酵の活性向上に大きく寄与していることが示された。

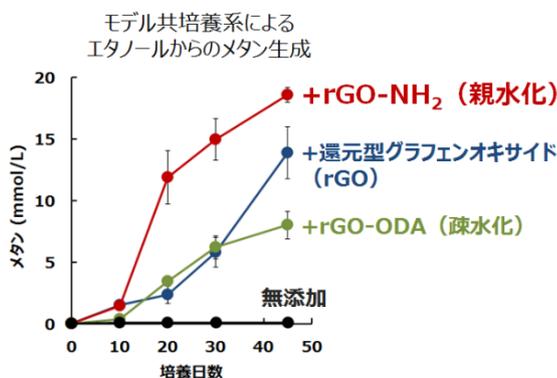


図 5. 粒子表面の親水・疎水性が電気共生型メタン生成の誘導に及ぼす影響。
 親水基 (NH_2) を付加した導電性粒子で誘導効果が上昇し、疎水基 (ODA) を付加した粒子では誘導効果が減少した。

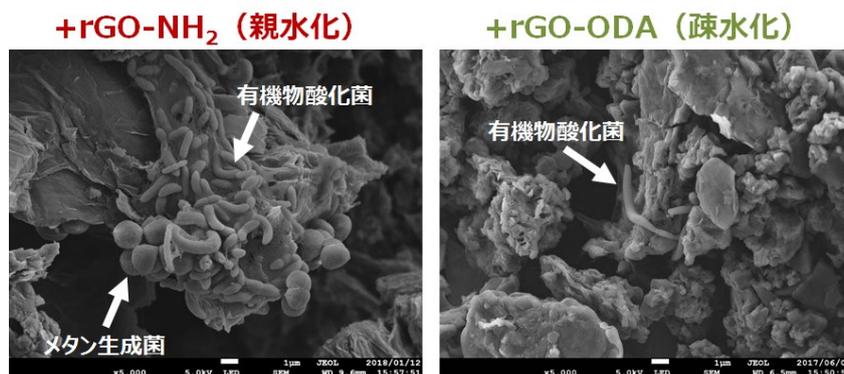


図6. 粒子表面の親水・疎水性が微生物の付着に及ぼす影響（図5培養物のSEM観察）。

（左）親水基（NH₂）を付加した導電性粒子を添加した系では、有機物酸化菌（桿状）とメタン生成菌（球状）双方の粒子への付着が観察された。

（右）疎水基（ODA）を付加した粒子添加系では特に球状のメタン酸化菌の付着が大幅に減少した。

*1b-3. 添加活性炭種の検討

1b-1の実験により、活性炭をメタン発酵活性化に使用する導電性粒子の候補として選択した。本項では、大阪ガスケミカル株式会社の協力の下、様々な市販の活性炭種を使用し電気共生型メタン生成の誘導効果の比較検討を行った。ここでは特に粒子賦活化の条件（表面親水性に影響すると考えられる）が異なる活性炭種を使用した。活性炭種によってメタン生成速度に多少の差がみられ、今回使用したものの中ではFP-3が最も高い効果を示したが、1b-2の実験から予想されたほどの大きな効果の差は見られなかった（図7）。この結果から、使用している活性炭自体がすでに電気共生の誘導に必要なとされる程度を十分に満たすほどに親水性であり、これ以上の親水化による改善は見込めないものと判断した。

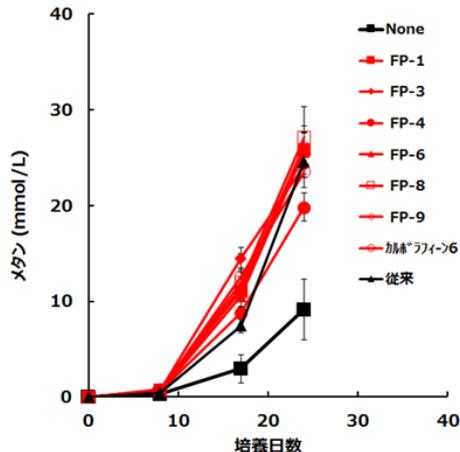


図7. 異なる活性炭種の比較検討。

(2) 試験管レベルでの実証試験

電気共生による分解・メタン生成の促進効果は、メタン発酵の中間代謝産物である有機酸やアルコールに関して多くの研究がなされているが、本研究の開始当初、高分子の有機性廃棄物に対しても機能するのかわ不明であった。そこで研究項目2では、項目1で選定した有用導電性素材（活性炭）を使用し、複雑な有機性廃棄物の分解・メタン生成促進が可能であることの実証を目的とした。

(2a) 油脂含有食品廃棄物

高分子の有機性廃棄物の一例として、嫌気分解が困難であり、かつ食品製造業者からのバイオガス化のニ

ーズも高い油脂含有廃棄物をターゲットの一つとして選定した。実験としてはサラダ油 (5 g/L) を基質として使用し、メタン発酵リアクター由来の微生物群集を接種源として使用した。その結果、活性炭の添加 (1 g/L) による明確なメタン生成の促進が確認された (図 8 左)。活性炭を添加した培養系は 5 回以上にわたる継代培養ののちも高いメタン生成活性を保持しており、通算で半年以上にわたり安定的かつ高活性な油脂分解、メタン生成が継続された。

電気共生の誘導はメタン生成フローの下流、すなわち有機酸の共生的分解に特に寄与することが知られている。そこで油脂分解培養過程の有機酸濃度を測定した (図 8 右)。今回の測定では酢酸、プロピオン酸以外の有機酸、アルコールは検出されなかった。活性炭の添加無しの系では、約 11 mM の酢酸、および約 5 mM のプロピオン酸の蓄積がみられたのに対し、活性炭添加の系ではいずれも検出限界以下であった。この結果は、活性炭の添加による電気共生の誘導により系の律速段階となっている有機酸分解が促進され、それによりメタン生成反応全体の促進、および安定化につながったことを示唆している。

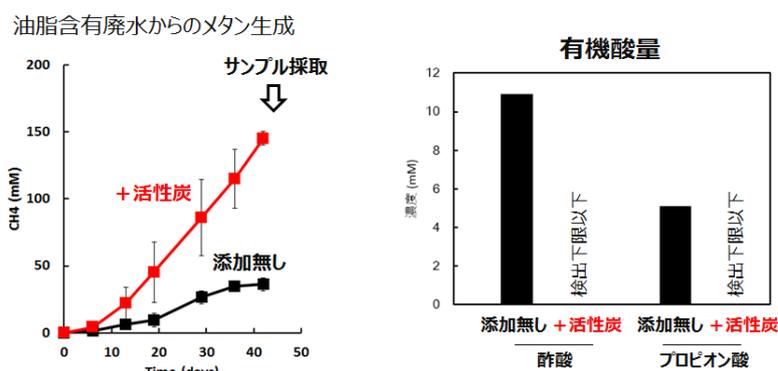


図 8. 活性炭添加が油脂含有廃水のバイオガス化に及ぼす影響。
(左) メタン発酵リアクター由来微生物群集によるメタン生成の経時変化。
(右) 培養終了時の有機酸定量結果。

(2b) 固形食品廃棄物

国内で排出される食品系廃棄物の多くは固体分を多く含む形で排出される。そこで本項では、食品廃棄物に含まれる主要な固形状成分 (たんぱく、でんぷん、セルロース) について、それぞれのモデル物質を使用し、活性炭添加によるバイオガス化促進が可能かどうかを検証した。

*2b-1. たんぱく粉末のバイオガス化

大豆由来たんぱく粉末 (5 g/L) を基質とし、活性炭添加 (1 g/L) による分解・バイオガス化促進試験を行った (図 9)。3 回の継代培養を行ったが、そのいずれにおいても活性炭添加時に高いメタン生成が確認された (図 9B)。継代培養 3 回目の培養物に対し HPLC による有機酸分析を行った結果、いずれの培養物においても特に培養初期過程において酢酸・酪酸等の蓄積がみられた (図 9C, D、他にプロピオン酸、乳酸も検出されたが少量のためデータは示さない)。酢酸、酪酸の双方とも、蓄積量は活性炭添加時に有意に低く抑えられていた。以上のことから、項目 2a の油脂の実験と同様、固形状たんぱくの分解において、活性炭の添加は過剰な有機酸の蓄積を抑制し、バイオガス化を促進可能であることが示された。

*2b-2. でんぷん粉末のバイオガス化

トウモロコシ由来でんぷん粉末 (2.5 g/L) を基質とし、活性炭添加 (1 g/L) による分解・バイオガス化促進試験を行った (図 10) (注:他の基質と同等の条件では pH 低下が顕著でメタン生成の阻害がみられたため、でんぷんの実験のみ以下 2 点を変更した: ①基質量を 2.5 g/L に削減、②40 mM の HEPES を添加し培養液の緩衝能を強化)。4 回の継代培養を行い、そのいずれにおいても活性炭添加によるメタン生成の促進がみられた (図 10B)。継代培養 4 回目の培養物に対し、HPLC による有機酸分析を行った (図 10C, D)。本培養系で

は酢酸・酪酸以外の有機酸種は検出限界以下であった。タンパク分解実験と同様、培養の初期に酢酸・酪酸等の蓄積がみられた。酢酸の最大蓄積量は活性炭添加・無添加時でほぼ同程度であったが、活性炭添加時により速やかな消費がみられた。酪酸の蓄積量は活性炭添加により有意に低く抑えられていた。以上のことから、油脂・タンパクの実験と同様、固形状でんぷんの分解において、活性炭の添加は過剰な有機酸の蓄積を抑制し、バイオガス化を促進可能であることが示された。

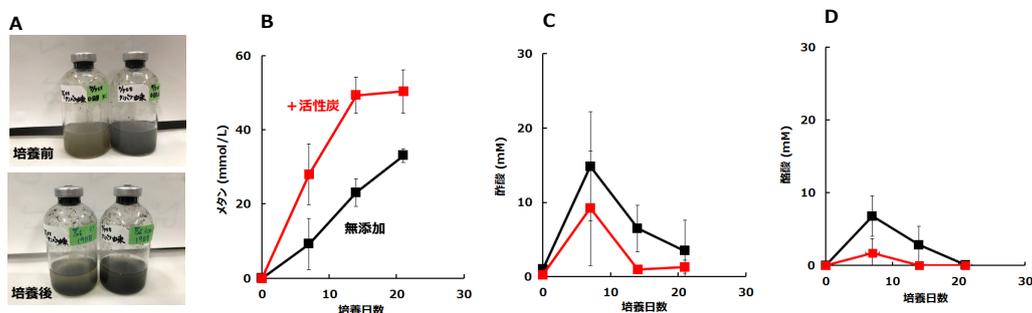


図9. タンパク粉末の分解・バイオガス化試験の結果。

- A. 分解前後のバイアルの写真。左が活性炭無添加、右が活性炭添加の培養系。
 B. 継代3代目の培養物のメタン生成測定結果、黒線が活性炭無添加、赤線が活性炭添加の培養系。
 C, D. 同じく酢酸、酪酸の定量結果。

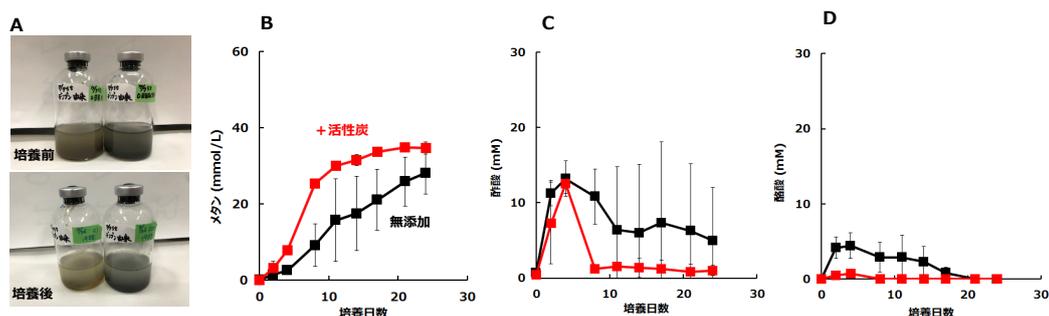


図10. でんぷん粉末の分解・バイオガス化試験の結果。

- A. 分解前後のバイアルの写真。左が活性炭無添加、右が活性炭添加の培養系。
 B. 継代3代目の培養物のメタン生成測定結果、黒線が活性炭無添加、赤線が活性炭添加の培養系。
 C, D. 同じく酢酸、酪酸の定量結果。

*2b-3. セルロースのバイオガス化

セルロース (5 mm 四方にカットした濾紙、5 g/L) を基質とし、活性炭添加 (1 g/L) による分解・バイオガス化促進試験を行った (図 11)。4 回の継代培養を行い、そのいずれにおいても、活性炭添加によるメタン生成の促進がみられた (図 11B)。継代培養 4 回目の培養物について有機酸分析を行った結果、他の培養系と同様に酢酸、酪酸が検出され、その濃度は活性炭添加時に低い傾向にあった (図 11C, D)。以上のことから、固形状セルロースの分解においても、活性炭の添加は過剰な有機酸の蓄積を抑制し、バイオガス化を促進可能であることが示された。

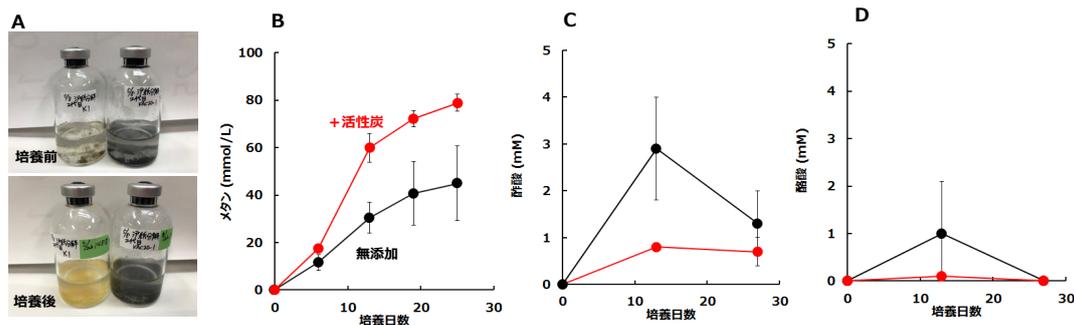


図 11. セルロースの分解・バイオガス化試験の結果。

- A. 分解前後のバイアルの写真。左が活性炭無添加、右が活性炭添加の培養系。
 B. 継代 3 代目の培養物のメタン生成測定結果、黒線が活性炭無添加、赤線が活性炭添加の培養系。
 C, D. 同じく酢酸、酪酸の定量結果。

(2c) 廃水処理余剰汚泥のバイオガス化

*2c-1. 廃水処理余剰汚泥のバイオガス化

余剰汚泥は活性汚泥法により発生する微生物菌体を主な成分とする廃棄物である。現状は主に乾燥後に埋め立てにより処理されており、その効果的な減容化、エネルギー変換技術が求められている。微生物源として汚泥消化槽由来のメタン発酵微生物群を使用し、下水処理場から分与された余剰汚泥の分解・メタン発酵をおこなった (図 12)。その結果、導電性粒子として活性炭を添加した系でコントロールと比較しメタン生成が向上しており、電気共生の誘導によるメタン生成の促進が起こっていることが示唆された。しかし実際の余剰汚泥を使用した実験では、採取した余剰汚泥の季節変動や保存状態により結果に多少のばらつきが確認されることもあった (例、図 12A、B の比較)。また活性炭の添加によるメタン生成の促進効果は、項目 2a、2b の食品廃棄物と比較すると小さいものであった。これはおそらく分解過程の上流部分 (汚泥の溶解) が律速となっているためと予想され、今後その部分についての研究をおこなっていく必要があると考えられた。余剰汚泥の消化に関して、上流部分の反応を担っている微生物の明確な特定に至っている研究例すらないのが現状であり、まずは微生物種の特定制を含めた基礎的な部分から研究を進める必要があると考えている。

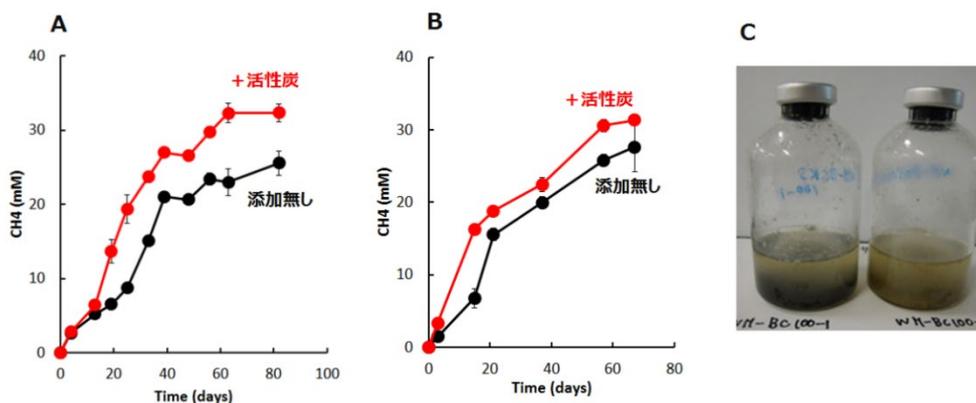


図 12. 活性炭 (0.1%) の添加による余剰汚泥の分解・メタン生成の促進。

- A, B は同一の実験を時期を変えて行った結果、C は培養時の写真 (左が活性炭添加)

*2c-2. 放線菌乾燥菌体 (余剰汚泥モデル) の分解・メタン生成

余剰汚泥のモデル基質として、市販の放線菌 (*Micrococcus luteus*) 乾燥菌体を基質として同様の実験をおこなった (図 13)。その結果、実際の余剰汚泥を使用した場合に比べ、活性炭の添加によるメタン促進の効果が顕著にみられ、また実験間の再現も非常に良いものであった。この結果は本実験系が余剰汚泥バイオガス化の効率化を検討するための優れたモデル系として機能しうること示している。今後このモデル系を対象と

し余剰汚泥分解・バイオガス化の上流部分（菌体成分の溶解）に関与する微生物の特定、分子機構の解明を行っていくことで、余剰汚泥バイオガス化の促進技術の開発につながると考えている。

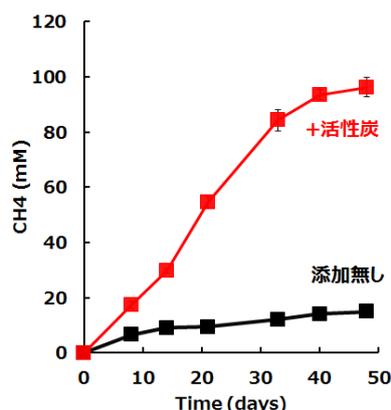


図 13. 活性炭の添加による *Micrococcus luteus* 乾燥菌体の分解・メタン生成の促進。

(3) 電気共生型メタン生成に関与する微生物種の特定

どのような微生物種が有機性廃棄物からの電気共生型メタン生成に関与するかについての知見は、研究開始当初全く得られていなかった。実際の反応を担う微生物に関する情報は、今後実廃水、廃棄物を使用したラボスケールでの実証試験の際に、電気共生型メタン生成が安定的に機能しているかどうかの判断指標として必要となる。

(3a) 油脂含有食品廃棄物

項目 2a で実施した油脂含有廃水分解メタン生成について、電気共生型メタン生成反応に関与している微生物群を特定するために、16S rRNA 遺伝子配列の次世代シーケンズ解析をおこなった。結果の概要を図 14 に示す。バクテリア、アーキアともに活性炭の添加により群集構造が大きく変化することが見て取れる。

さらに詳細な比較を行うため、主要な微生物種のみ結果をまとめたものを表 1 に示す。メタン生成菌については、活性炭添加無し条件では水素利用性の *Methanospirillum*、酢酸利用性の *Methanosarcina* が優占していたのに対し、活性炭添加条件では酢酸利用性の *Methanosaeta* が優占しており、明確な違いが見て取れた。上述の通り *Methanosaeta* 属のメタン生成菌の中には *Geobacter* 属細菌との電気共生型メタン生成をおこなうものが知られており、今回の系でもこの微生物が電気共生に関与していると考えられた。

Bacteria については、*Syntrophomonas* 属に近縁なものが 2 種検出された。*Syntrophomonas* 属には水素共生的に長鎖脂肪酸を分解するものが知られており、今回の系でも油脂分解に寄与していることが予想される。活性炭添加の系で有意に優占化していた微生物が 2 種検出されたが、これらはいずれも未培養の系統群 (OP8、WWE1) に分類され、その代謝形式の詳細は全く不明である。これらの未培養系統群の中に、電気共生型の有機酸分解をおこなうものがあるとすれば大きな発見であり、今後これらの微生物をターゲットとした詳細な解析をおこなっていく必要がある。

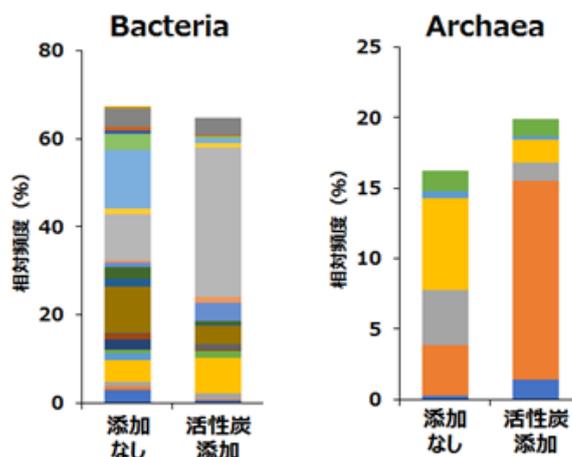


図 14. 油脂分解メタン生成の微生物群集構造解析結果の概要。いずれかの条件で 1%以上の相対頻度を示した微生物種のみを表示している。詳細な系統学的情報はスペースの都合上割愛し、表 1 に別途まとめた。

表 1. 油脂含有廃水分解微生物群集解析結果。いずれかの系で 2%以上の存在比を示した菌のみ表示 (赤太字)、青太字はメタン生成アーキア、緑太字は近縁種に油脂分解共生細菌を含むものを示す。

#	相対頻度 (%)		Phylum/Class	近縁種 (相同性%)
	なし	活性炭		
両方で優占				
1097	4.8	8.2	Spirochaetes	<i>Treponema</i> sp. HM (94)
2391	10.7	4.2	Firmicutes	<i>Coprothermobacter proteolyticus</i> (100)
4002	4.0	3.8	Firmicutes	<i>Syntrophomonas wolfei</i> (98)
添加無しで有意に優占 (3 倍以上)				
10	3.1	0.6	Synergistetes	<i>Anaerobaculum mobile</i> (100)
1779	2.2	0.1	Bacteroidetes	<i>Proteiniphilum</i> sp. S2 (91)
2562	2.7	0.8	Spirochaetes	Unidentified eubacterium vadinBA43 (94)
3160	13.5	1.1	β -proteobacteria	<i>Tepidiphilus margaritifera</i> (100)
3186	3.6	0.5	Firmicutes	<i>Syntrophomonas palmitatica</i> (98)
2161	3.9	1.3	Euryarchaeota	<i>Methanosarcina acetivorans</i> (100)
2392	6.5	1.6	Euryarchaeota	<i>Methanospirillum hungatei</i> (99)
活性炭添加で有意に優占 (3 倍以上)				
2623	0.9	4.3	Uncultured OP8	<i>Moorella stamsii</i> (84)
2910	10.6	34.1	Uncultured WWE1	Cloacim onetes bacterium JGI 0000059-L07 (89)
2034	3.6	14.1	Euryarchaeota	<i>Methanosaeta concilii</i> (99)

(3b) 固形食品廃棄物

項目 2b で実施した固体状食品成分 (たんぱく、セルロース) 分解メタン生成について、電気共生型メタン生成反応に関与している微生物群を特定するために、16S rRNA 遺伝子配列の次世代シーケンス解析をおこなった (図 15、16)。いずれの系でも、油脂分解や後述の活性汚泥分解の系と比較すると、活性炭の添加による大きな菌叢変化は観察されなかった。この理由としては、たんぱく、セルロースは上流の発酵性細菌が比較的能量を得やすい基質であるため、それらに関与する微生物種が優占してしまい、電気共生に関与する下流部分の微生物の割合が低くなってしまったことがあげられる。この問題を解決するためには、例えば ^{13}C ラベルした有機酸を添加し、それを資化した微生物のみを追跡する手法 (Stable Isotope Probing 法) などの適用が必要であり、これは今後の課題と言える。

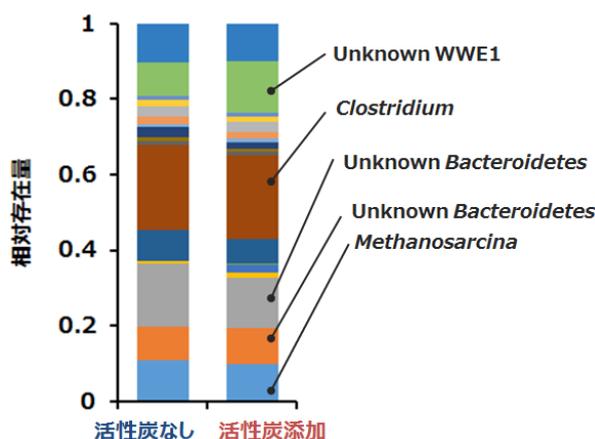


図 15. たんぱく分解メタン生成の微生物群集構造解析結果の概要。
いずれかの条件で 1%以上の相対頻度を示した微生物種のみを表示している。

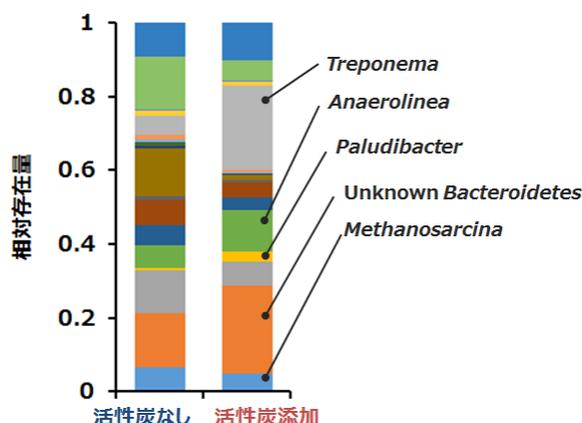


図 16. セルロース分解メタン生成の微生物群集構造解析結果の概要。
いずれかの条件で 1%以上の相対頻度を示した微生物種のみを表示している。

(3c) 廃水処理余剰汚泥

項目 2c の継代培養で集積した余剰汚泥分解微生物群集について、16S rRNA 遺伝子配列の次世代シーケンス解析による群集構造解析をおこなった。結果の概要を図 17 に示す。バクテリアの群集構造は活性炭の添加により大きく変動することが見て取れる（詳細は後述）。一方でアーキアについてはいずれも優占しているのは *Methanosaeta* 属のメタン生成アーキアであった。*Methanosaeta* 属は酢酸利用性のメタン生成アーキアであるが、それと同時に、電気共生的に導電性固体物質を利用したメタン生成能も有している。またアーキアでは水素利用性の *Methanospirillum*、*Methanothermobacter* も検出され、活性炭の有無によりその優占度に違いがみられたが、その理由は定かではない。

Bacteria の解析結果で、特徴的な変動を見せたものを表 2 にまとめた。基質である余剰汚泥でのみ優占していた微生物は *Acidovorax*、*Thiothrix*、*Zoogloea* といった活性汚泥処理で一般的に優占する微生物種であった。またこれらの微生物の相対頻度がメタン発酵処理後に大きく低下しているということは、これらの微生物種の菌体成分が処理の過程で良好に分解されていることを示している。

添加無し、および活性炭添加の系で共通して優占化していたもの（種・株レベルではおそらく異なるが大きな分類体系としては一致するものも含む）には、Bacteroidetes 門、Spirochaetes 門に分類される、既知株との近縁性が低い（83-95%）微生物が多数であった。これらの分類群の微生物は様々な有機物の嫌気的な発酵をおこなう微生物であるとされており、これらの中にはメタン発酵の上流部分、すなわち余剰汚泥中の菌体成分の分解に寄与しているものが含まれていると考えられる。

興味深いことに、活性炭添加条件でのみ優占する微生物の多くは、近縁種が鉄還元性細菌であるものであった (*Fervidicella*、*Caloramator*、*Desulfuromonas*)。これまでの研究で、中温環境で導電性粒子を添加し電気共生的メタン生成を誘導した際、優占してくるのは鉄還元細菌である *Geobacter* 属細菌であることが多かった。今回の培養条件は 42℃と比較的高温であり、*Geobacter* 属細菌の中には高温で生育するものは知られていない。以上のことから、今回の活性炭添加をおこなった系では確かに電気共生反応が進行し、上記 3 種の微生物種が有機物分解・活性炭への電子注入反応を担っていることが示唆された。

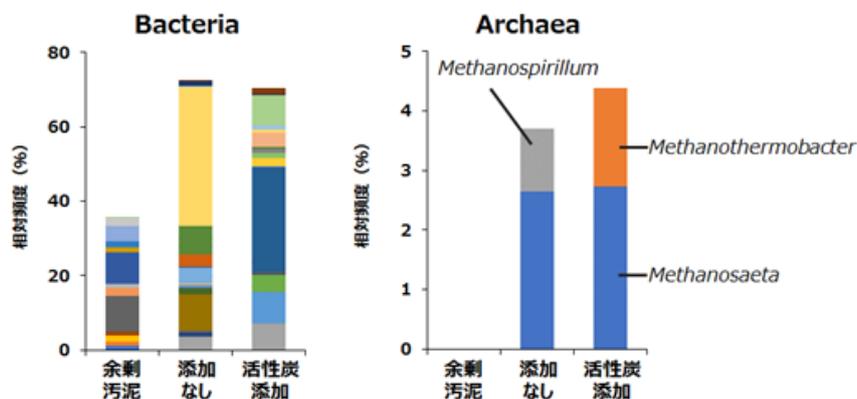


図 17. 余剰汚泥分解メタン生成の微生物群集構造解析結果の概要。
いずれかの条件で 1%以上の相対頻度を示した微生物種のみを表示している。
バクテリアの系統学的情報はスペースの都合上割愛し、表 2 に別途まとめた。

表 2. 余剰汚泥分解微生物群集解析結果。結果はバクテリアのみを対象とし、いずれかの系で 2%以上の存在比を示した菌のみを表示 (赤太字)、青太字で示した菌種は同属に鉄還元菌を含むものを示す。

#	相対頻度 (%)			Phylum/Class	近縁種 (相同性%)
	汚泥	なし	活性炭		
余剰汚泥でのみ優占					
1704	9.5	0.6	0.4	β -proteobacteria	<i>Acidovorax delafieldii</i> (100)
2416	8.5	0.1	0.0	β -proteobacteria	<i>Zoogloea caeni</i> (100)
2955	4.0	0.0	0.0	γ -proteobacteria	<i>Thiotrix disciformis</i> (100)
3102	2.1	0.0	0.0	δ -proteobacteria	<i>Kofteria flava</i> (93)
添加無し、+活性炭で優占					
389	0.0	3.4	7.1	Spirochaetes	<i>Treponema</i> sp. HM (95)
添加無しのみで優占					
1718	0.1	9.7	0.0	Bacteroidetes	<i>Bacteroides distasonis</i> (83)
2242	0.0	4.5	0.2	Firmicutes	<i>Clostridium</i> sp. SW002 (96)
2423	0.0	3.4	0.0	Spirochaetes	<i>Treponema</i> sp. HM (94)
2910	0.0	7.8	0.5	Uncultured WWE1	<i>Cloacim onetes bacterium</i> JGI 0000059-L07 (89)
3129	0.1	37.3	0.7	Thermotogae	<i>Fervidobacterium riparium</i> (93)
活性炭添加のみで優占					
526	0.0	0.0	8.4	Bacteroidetes	<i>Solitalea canadensis</i> (86)
978	0.0	0.0	4.6	Firmicutes	<i>Fervidicella metallireducens</i> (100)
1728	0.0	0.1	28.2	Bacteroidetes	<i>Pontibacter deserti</i> (85)
2159	0.0	0.1	2.2	Firmicutes	<i>Caloramator quimbayensis</i> (99)
3013	0.0	0.0	3.8	Spirochaetes	<i>Treponema</i> sp. HM (99)
3254	0.0	0.0	8.1	δ -proteobacteria	<i>Desulfuromonas svalbardensis</i> (88)

(4) ラボスケールリアクターでの実証試験

本研究の開始時点で、電気共生型メタン生成が確認されているのは試験管レベルの培養のみであり、実際の処理条件（基質の連続流入、負荷量・環境要因変動）で機能するかは不明であった。そこで本項目では、数Lスケールのラボスケールリアクターを作製し、連続条件での培養を行い、実際の処理に近い条件で導電性粒子の添加によるバイオガス化促進が可能であることを検証した。活性炭の添加により、微生物と活性炭粒子からなる粒子の形成促進がみられ、懸念していた活性炭粒子の外部流出はほとんど起こらなかった。しかし4か月ほどの連続運転の期間中、活性炭の添加による明確なCOD除去率・メタン生成の促進を観察するまでには至らなかった。この要因としては、基質として比較的分解しやすいセルロースを使用したことで、活性炭の添加無しでも良好な基質分解・メタン生成が起こったためと考えられる。今後は項目2で使用したような油脂や固体性の基質を使用することで、活性炭添加による促進効果を観察できればと考えている。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

項目1の導電性素材の検討では、導電性素材の効果を定量的に評価するためのモデル共生系の構築に成功し、それを使用することで粒子の導電性だけでなく表面親水性が重要であることを見出し、安価で効果の高い素材として活性炭が実用化に有望であることを見出した。項目2の試験管レベルでの実証試験では、活性炭の添加により、油脂・でんぷん・たんぱく・セルロース・余剰汚泥（微生物菌体）といった多種多様な高分子有機物の分解・バイオガス化を促進可能であることを初めて実証できた。項目3の電気共生型メタン生成に関与する微生物種の特定では、これまでに電気共生への関与が知られていない新規微生物の同定に成功し、学術的観点からも興味深い知見を得ることができた。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

畜産廃棄物や農作物残渣、余剰汚泥、食品廃棄物などの多くは、現在焼却・埋め立てにより処理されている。焼却処理はその過程で大量の二酸化炭素を放出する。また埋立地からは二酸化炭素の約20倍の温室効果係数を持つメタンが大気中に大量に放散されている。本研究で実証に至った導電性粒子を利用した有機性廃棄物からの高効率バイオガス化技術は、これまで焼却・埋め立て処理されていた廃棄物を省エネルギーかつ温室効果ガスを排出抑制して処理することを可能にする。今後企業等の協力を得ての実証試験を経たのち、本技術の社会実装に至った際には、温室効果ガス削減を見据えた環境政策に貢献可能である。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

特に記載すべき事項はない。

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表（学会等）

1) 加藤創一郎：超循環型社会の創出に向けた微生物電気化学イノベーションワークショップ（東京大学、2016）

「電気共生：導電性粒子を介した異種微生物間電子授受反応」

2) 加藤創一郎：異分野融合シンポジウム「微生物を基軸とした環境と電気と金属」（東京工業大学、2017）

「導電性粒子との電子授受にもとづく微生物のエネルギー代謝」

3) S. KATO: Anaerobic Microbial Syntrophy Forum, Chengdu, China, 2017

“Electric syntrophy: Syntrophic methanogenesis via electric current through conductive materials.”

4) S. KATO: IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions, Nagoya Univ., Japan, 2017

“Microbial energy metabolisms based on electrochemical interaction with solid surfaces.”

5) S. KATO: The 3rd Solar Fuel Material workshop, Osaka Univ., Japan, 2018

“Microbial metabolisms based on electron exchange with solid materials.”

(3) 知的財産権

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

特に記載すべき事項はない。

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

1) S. KATO, and K. WATANABE : *Microbes Environ*, 25, 145-151 (2010)

“Ecological and evolutionary interactions in syntrophic methanogenic consortia.”

2) S. KATO, K. HASHIMOTO, and K. WATANABE : *Proc Natl Acad Sci USA*, 109, 10042-10046 (2012)

“Microbial interspecies electron transfer via electric currents through conductive minerals.”

3) S. KATO, K. HASHIMOTO, and K. WATANABE : *Environ Microbiol* 14, 1646-1654 (2012)

“Methanogenesis facilitated by electric syntrophy via (semi)conductive iron-oxide minerals.”

4) C. YAMADA, S. KATO, Y. UENO, M. ISHII, and Y. IGARASHI: *J Biosci Bioeng* 119, 678-682 (2015)

“Conductive iron oxides accelerate thermophilic methanogenesis from acetate and propionate.”

5) S. KATO: *Microbes Environ*, 30, 133-139 (2015)

“Biotechnological aspects of microbial extracellular electron transfer.”

Ⅲ. 英文 Abstract

Development of Processes for Efficient Biogas Production from Organic Wastes by Induction of Electric Syntrophy

Principal Investigator: Souichiro KATO
Institution: Bioproduction Research Institute, National Institute of
Advanced Industrial Science & Technology
2-17-2-1, Tsukisamu-Higashi, Toyohira, Sapporo, Hokkaido,
062-8517 Japan
Tel: +81-11-857-8968 / Fax: +81-11-857-8915
E-mail: s.katou@aist.go.jp

Cooperated by:

[Abstract]

Key Words: Microbiology, Methane fermentation, Organic wastes, Electric syntrophy, Conductive materials

Methane fermentation using anaerobic microorganisms is now widely used as an energy-saving and energy-recovery technology for waste and wastewater treatment. Further improvements in the methanation rate, efficiency and process stability are required, however, especially in the treatment of organic waste including solid compounds. Our research group has discovered a novel microbial metabolism called electric syntrophy, in which electron exchange via conductive particles such as iron minerals promotes symbiotic metabolism, including methanogenesis, among multiple microorganisms. This study aims to develop a system for artificially inducing methane generation through supplementation with inexpensive conductive materials, based on the electric syntrophic principle, for highly rapid, efficient and stable organic waste decomposition and bio-gasification.

1) Investigation of inexpensive and highly effective conductive materials. In this section, we successfully developed a model co-culture conducting electric syntrophy, which enabled experiments with high reproducibility. By using the model system, we eventually got following findings; artificial carbon materials can induce electric syntrophy in addition to previously known conductive iron minerals, hydrophilicity of conductive particles is an important factor to effectively induce electric syntrophy, and activated carbon is the promising material as inexpensive and highly effective conductive particles for practical uses.

2) Demonstration of degradation of complex organic matters. Here we aimed to demonstrate that the addition of activated carbon particles can promote degradation and methanation of various organic compounds. We demonstrated for the first time that degradation of a wide variety of high molecular weight organic substances such as excess sludge (mainly containing microbial cells), in addition to diverse food ingredients such as fats, proteins, starch and cellulose, can be promoted by supplementation with activated carbon.

3) Identification of microorganisms involved in electric syntrophy. In this section, the cultures conducted in the section 2 were subjected to microbial community analysis using the next generation sequencing. We succeeded in identifying novel microorganisms (e.g. *Fervidicella* spp.) which have not been known to be involved in electric syntrophy.

4) Demonstration using lab-scale reactors. We conducted a continuous culture experiments for more than 4 months by using 1 L scale upward flow bioreactors. Although we did not get clear evidence for improvement of bio-gasification by addition of activated carbon during the limited experimental period, we successfully demonstrated that long-term operation is possible by suppressing the outflow of activated carbon.