

生物化学的実験手法によるメタン発酵システムの効率化に関する検討 ー消化工程に關与する菌体の分離・同定ー

日大生産工 ○大木 宜章 小森谷 友絵 神野 英毅
日大生産工 (院) 木科 大介

1. はじめに

資源循環型社会の形成に向けて廃棄物のリサイクル等による再資源化およびガスエネルギー化の取り組みは、21 世紀の重要なテーマであり、世界的急務とされる。すなわち急激に高沸している石油価格と気候変動における高まる緊迫性からまり、バイオエネルギーへの需要が高まっている。このバイオエネルギーは、二酸化炭素の発生と固定化を平衡とするカーボン・ニュートラルと考えられ、化石燃料の代替燃料として、さらに地球温暖化対策としても位置付けられる。しかし、我が国では世界情勢に遅れること 2001 年に総合エネルギー調査会の答申により、新エネルギーとして認定された。また、答申では電気利用分野のバイオエネルギーは、原油換算として 2010 年に 34 万 k ℓ (1999 年実績は 5.4 万 k ℓ)を導入目標としているが、現状での達成は困難といえる。このバイオエネルギー変換技術は現行で熱化学的プロセスと生物化学プロセスに大別される。

本研究は、生命工学プロジェクト第 1 グループによるプロテオーム研究における微生物レベルでの研究および技術の指導を賜り、効率的なメタン発酵を基としたバイオエネルギー変換技術の開発を目的として、有機・無機的要因の現象解明を行うものである。ここでの報告として、消化槽および発酵槽から構成される二段階メタン発酵システムを構築し、長期稼動実験における各工程の有機酸挙動からエネルギー生産性能と同時に効率的発酵条件を求める事とした。また、同システムの効率化を目的に、消化工程に關与する菌体の分離・同定を生物化学的実験手法により行った。

2. 実験概要

2. 1 長期稼動実験における各工程の有機酸挙動

Fig. 1 にシステムの決定フローを示す。メタン発酵における有機物の分解は大きく消化工程(酸生成)と発酵工程(メタン生成)の 2 つに分けられる。まず、消化工程では加水分解細菌により液化の後、酸生成細菌が有機酸およびエタノール等を生成する。発酵工程では酸生成過程で生成された中間物をメタン生成細菌により CH₄および CO₂等のガスを生成する。本実験は各工程の至適環境を整え効率的分解を図るべく、二段階発酵で行った。装置規模は消化槽を 4.0 ℓ 、発酵槽は 20.0 ℓ とし、槽内温度は各槽とも 36 $^{\circ}$ Cに保持した。また、装置上部の測定孔からサンプリングバックを取り付けた。

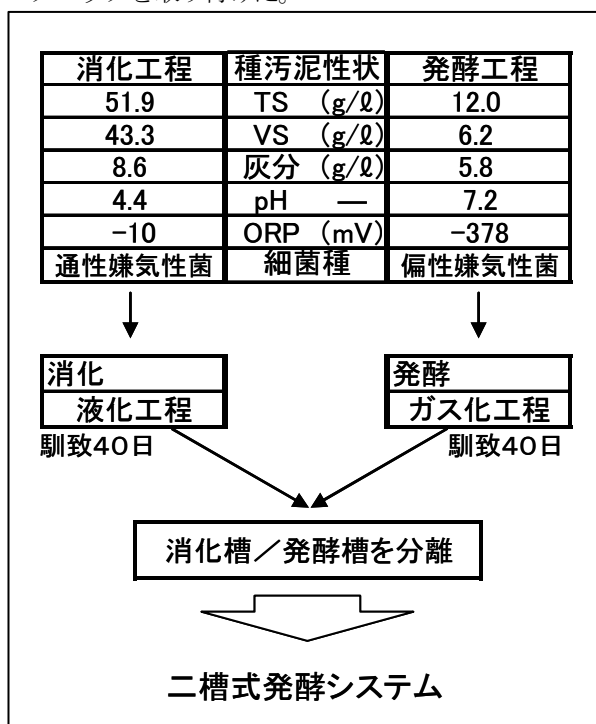


Fig. 1 システムの決定フロー

〔種汚泥条件〕種汚泥は下水処理場より採取した消化汚泥を用いて、消化工程は有機物を、発酵工程は有機酸等の中間物を低負荷により馴致させた。なお、各実験では稼働開始に種付けを行い、追種はしない。

〔試料条件〕試料は仮想生ごみとしてキャベツを使用した。この理由として、単位体積あたりに含有する有機物量が少なく含有率が判明している事、年間試料として確保できる事を考慮した。前処理としてキャベツは破砕機によってスラリー状とし、投入試料とした。試料量は 48 時間置きに 300ml を消化に投入した。また、消化内の容量が一定に維持する量 (250ml) をあらかじめ抜き取り、発酵の試料とした。

〔測定条件〕本実験は、試料投入の直前に各槽からサンプリングし、有機酸濃度およびガス分析の測定を行った。有機酸濃度は NaOH 滴定による中和法から定量し、ガス分析は理研計器製：ポータブルマルチガスモニター GX-2003 およびオールザットガス吸収液法により測定した。また、有機物分解のメカニズムについて検討すべく、高速液体クロマトグラフィー(以下 HPLC)により有機酸分析を行った。

2. 2 消化工程における菌体の分離・同定

菌体同定のプロセスを Fig.2 に示す。本実験では消化工程における槽内の種汚泥をサンプルとした。培地には非選択性の LB、GAM、BHI、GYP を用いた。減菌シャーレに固定した寒天培地にサンプルを塗布し、35℃ の恒温槽で 3、4 日嫌気培養した。その後、増殖した菌体毎に新たな培地に塗布し(スクリーニング)嫌気培養した。これを 3～4 回繰り返し、菌体の分離を行った。分離した菌体は目視および光学顕微鏡による菌体集合群(以後、コロニーと称す)

の観察を、またグラム染色後で菌形状を顕鏡観察で行った。

次に、単離した菌体は PCR 法により DNA の増幅を行った。PCR 法の手順として、まず分離した菌体をサンプルとして、サーマルサイクラーにより DNA 増幅を行った。なお、増幅でのプライマーは全細菌に特異的な 16SrRNA ユニバーサルプライマー 27f および 800r を用いた。PCR 条件は 94℃5min + (94℃30sec - 50℃30sec - 72℃60sec) × 35 サイクル + 72℃6min である。PCR 産物は DNA 増幅確認のため 1.5% アガロースゲル電気泳動によりバンドを確認した後、吸光度計を用いて DNA 濃度を測定した。この PCR 産物を塩基配列の解読を行った後、相同性検索プログラム BLAST を用いて、解読した塩基配列と相同性の高い既知種を検索し同定を行った。

3. 結果および検討

3. 1 消化工程における測定結果

Fig.3 に消化工程における有機酸挙動の経時変化

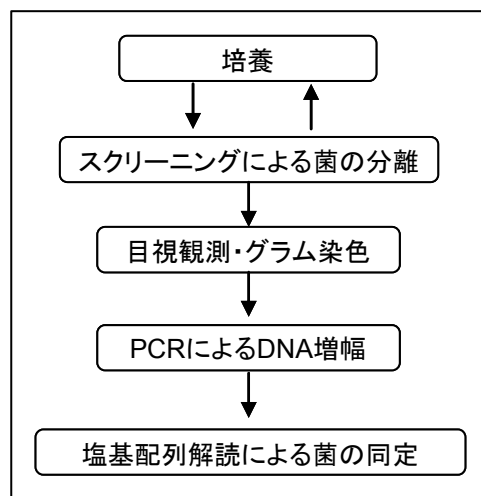


Fig. 2 菌体同定のプロセス

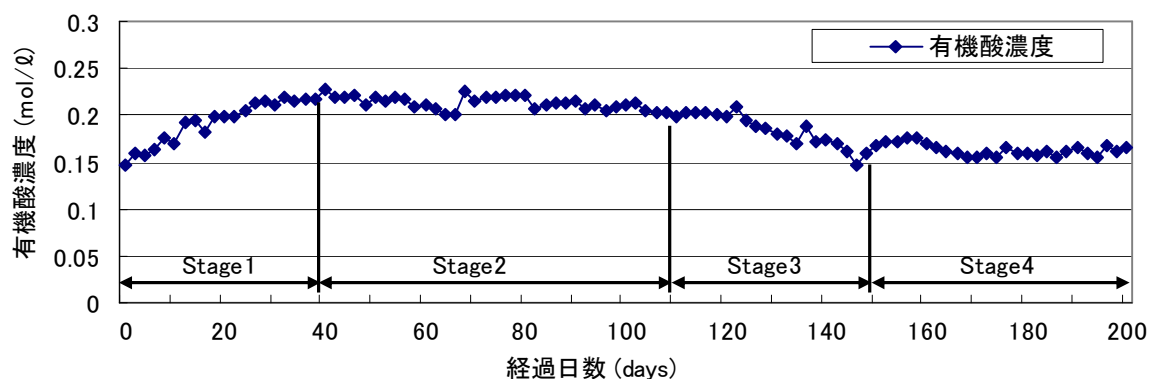


Fig. 3 消化工程における有機酸濃度変化

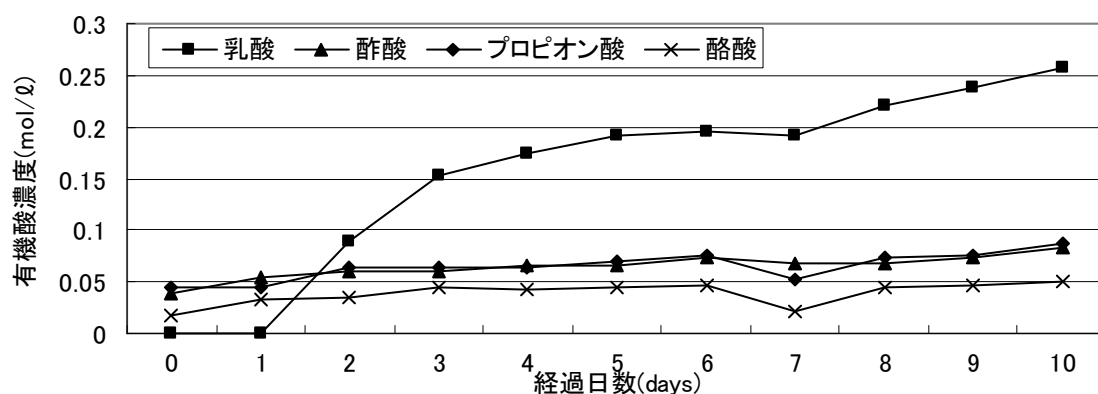


Fig.4 消化工程における HPLC 有機酸分析

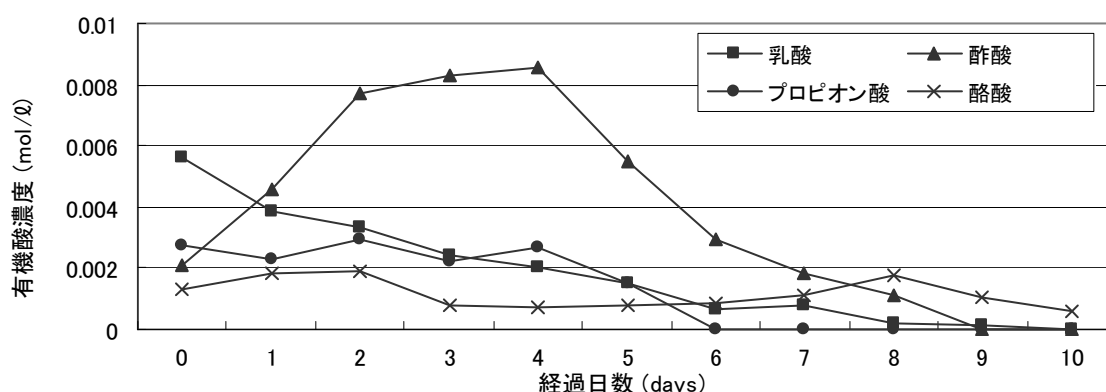


Fig. 5 発酵工程における HPLC 有機酸分析

を示す。有機酸濃度の挙動から消化工程では4 Stageに分けられる。Stage 1では、システム移動により有機酸濃度は40日目までに4,000ppm増加した。すなわち投入有機物分解による有機酸生成が活発に行われたことと、一部種汚泥からの有機酸も加わったものといえる。また、Stage 3では、有機酸濃度は減少を示し、初期有機酸濃度と同じとなった。この要因として、エタノール等の中間物の生成が多くこのため有機酸濃度は減少したものといえる。なお Stage 1およびStage 3の有機酸濃度の変動は、40日間で安定したことから、槽内の環境変化に伴う馴致期間は40日間必要といえる。また、Stage 2およびStage 4での有機酸濃度に変動のない期間を定常期間とする。Stage 4では Stage 2に比し有機酸濃度に3,500ppmの差異を生じたが両 Stageの発生ガスは一律に600~800mL/2days得られ、この約80%がCO₂であった。

Fig.4にHPLCによる有機酸分析結果を示す。この図から、多くの生成物は乳酸であり、他の有機酸は少量なものであった。したがって、消化工程では、

乳酸菌による分解が活発であるといえる。

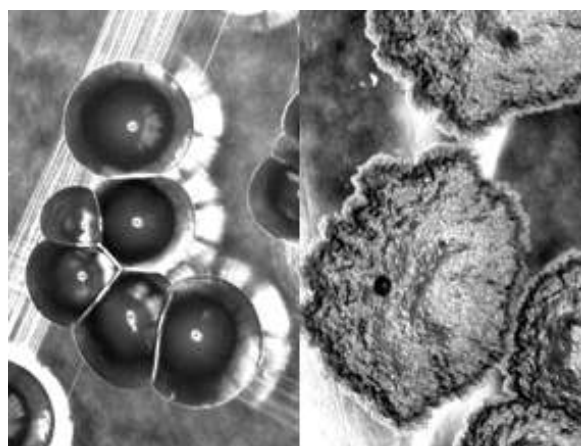
3. 2 発酵工程における有機酸挙動

消化工程で生成された有機酸はさらに発酵工程に投入されるがこの挙動をFig. 5のHPLCによる有機酸分析より示す。これより、発酵工程において各有機酸の分解速度には相違が認められた。乳酸およびプロピオン酸は初期段階より低下傾向を示し6日目の段階でほぼ分解が終わっているのに対し、酪酸は10日目の段階においても残存した。また、酢酸は初期段階に増加した後、低下傾向を示した。これは、酪酸やプロピオン酸等の高分子有機酸およびエタノールの一時的な酢酸変換によるものと考えられる。

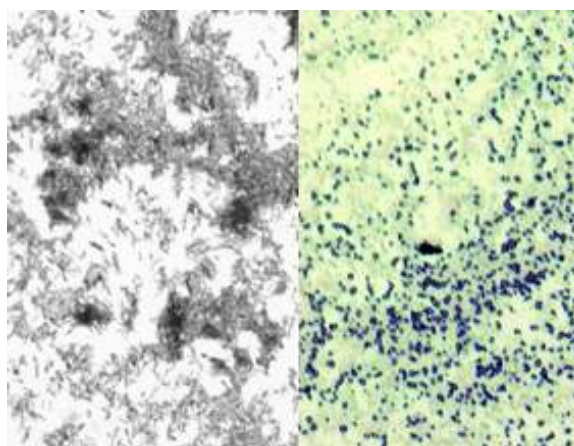
3. 3 菌体の分離および視適観察

スクリーニングにより分離した菌体のコロニーの顕微鏡写真をPhoto1に、グラム染色後の顕微鏡写真をPhoto2に示す。この写真から菌体は外形が円状および不規則なものが、またコロニー辺縁が円形状、波形状のものが確認された。また、菌形には、桿菌および球菌が確認された。

Photo3にPCRによるDNA増幅後のアガロース



(円形状) (波形状)
Photo 1 菌体のコロニー顕微鏡写真



(桿菌) (球菌)
Photo 2 グラム染色後の菌形顕微鏡写真

ゲル電気泳動により確認された DNA バンドの写真を示す。これより、スクリーニングによって得られた 16 のサンプルにおいて 800bp 付近にバンドが確認された。また他の部位にバンドが見られないことから単一の菌体であるといえ、これらのサンプルについて塩基配列の解読を行った。

Table 1 に解読した塩基配列と相同性の高い最近種を示す。16 サンプルについて塩基配列の解読を行った結果、13 サンプルから塩基配列が得られた。これらを相同性検索にかけたところ、確定した中で最も多く一致したのは *Clostridium butyricum* の 8 サンプルであり、次に *Clostridium glycolicum* の 3 サンプルが近縁種として確認された。また、残る 2 サンプルについては *C.beijerinckii* や *C.metallolevans* の細菌とも一致し、近縁種の特定をするに至らなかった。

4. まとめ

長期稼働実験によりバイオガス生産性能および長期システム稼働への実用性能について確認をおこなった。HPLC の分析結果から、消化工程で生成される各有機酸は、発酵工程において分解速度、すなわち発酵効率に相違をもたらす事が確認された。さらに、消化工程で生成される有機酸の割合は槽内の環境状態に影響される菌体バランスの変化に起因するといえる。したがって、消化槽内における菌体の生息状況を調べるべく、槽内より菌体の分離・同定を

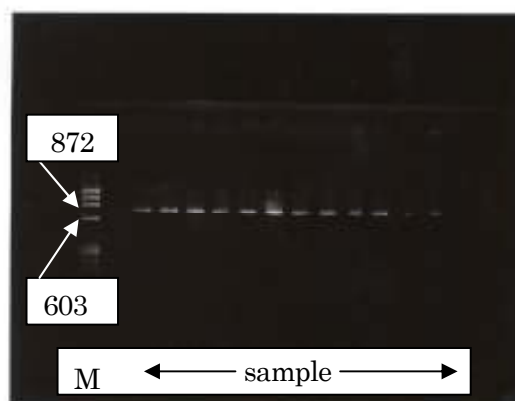


Photo 3 電気泳動により確認された DNA バンド

Table 1 同定が行えた菌の種類

サンプル数	最近縁種	相同性の高かったサンプルの相同塩基数
8	<i>Clostridium butyricum</i>	515/515(100%)
3	<i>Clostridium glycolicum</i>	367/373(98%)

行った結果、2 種類の菌体の同定が行えた。しかし、消化槽内においては更に数多くの菌が生息していると考えられ、この結果は当初予測していた数を大きく下回る結果となった。これらの結果を踏まえ、今後、培地選択や培養条件を変更し菌の分離を行い、また同定方法を考慮して消化槽内における菌体バランスの構造解析について検討を行っていく予定である。