

高度メタン発酵処理システム

High Performance Methane Fermentation System

中 崎 清 彦*

KIYOHICO NAKASAKI

東京工業大学環境・社会理工学院融合理工学系 〒152-8550 目黒区大岡山 2-12-1

* TEL & FAX: 03-5734-3169

* E-mail: nakasaki@ide.titech.ac.jp

School of Environment and Society, Tokyo Institute of Technology, 2-12-1, Ookayama, Meguro-Ku, Tokyo 152-8550, Japan

キーワード：メタン，微生物叢，指標微生物，高性能装置

Key words: methane, microbial consortia, indicator microorganism, high-performance reactor

(原稿受付 2017年3月31日/原稿受理 2017年4月18日)

1. 目 的

メタン発酵は、高濃度有機性廃水や汚泥等の嫌気性微生物による処理技術として開発されてきた。中でもUASB法（上向流嫌気性汚泥床法）は汚泥保持濃度が高く、高負荷処理が可能¹⁾であることから多くの実用例がある。UASB法では、1~3 mm程度に自己造粒した高密度グラニューール菌体（真正細菌および古細菌を含む）を利用するが、グラニューール菌体は沈降性が良いことから、それまでの懸濁型メタン発酵に見られる固液分離が困難という欠点を解決できる優れた方法である。

メタン発酵は、共生する多くの微生物の作用により有機物を分解し、その過程で生成する有機酸などの中間生成物をメタンに還元する方法であって、大雑把に4段階で進行すると説明されている。第1段階の加水分解過程では、複雑な高分子有機物から、単糖類、アミノ酸などの低分子量の物質が生成される。引き続き、第2段階では、加水分解産物である低分子量物質が酸生成過程を経て、酢酸、プロピオン酸、ギ酸、酪酸などの揮発性脂肪酸、乳酸およびエタノールなどになる。第3段階の酢酸生成過程においては、酢酸以外の揮発性脂肪酸、乳酸およびエタノールは、水素および酢酸に変換される。そして、最終の第4段階においては、基質特異性の高いメタン生成古細菌群により、メタンおよび二酸化炭素などが生成される²⁾。ここで、酢酸およびプロピオン酸などの揮発性脂肪酸はメタン発酵プロセスにおける主要な中間生成物であり、真正細菌がそれらを生成する役割を担っている。

メタン発酵においては、その原料となる有機物の供給量（有機物負荷）が大きくなると、供給量に応じてメタンガスの発生量も増加するが、有機物負荷を増加させる速度が速すぎたり、有機物負荷量が過剰になると、メタン生成に関与する真正細菌および古細菌の活性が著しく

低下し、メタンガスが全く生成されなくなる（メタン発酵の破たん）。この限界の有機物負荷をリアクター内への廃液の流速や有機物濃度などから決定することは困難であり、限界の有機物負荷は熟練のオペレータの判断に任されていた。これまでも、メタン発酵が破たんしたときには、リアクター内のpHが低下して、有用な微生物の活性が著しく低下する³⁾（pH低下はメタン発酵破たんの原因であり、結果である。一旦、中間生成物である揮発性脂肪酸からメタンへの変換が滞ると急速に揮発性脂肪酸が蓄積する負のフィードバックがおこる）ことは経験的によく知られており、これらの変化は、メタン発酵の破たんと密接に関係しているが、メタン発酵の破たんを後付け的に説明することはできず、メタン発酵の破たんを予測することができず、メタン発酵が一旦、破たんすると、メタン発酵を回復させることは困難であった。

本研究では果実入りのゼリーや缶詰の製造過程において大量に発生するシロップ廃液のUASBメタン発酵における操作条件とグラニューール中の微生物叢変化の関係を明らかにし、過負荷条件でメタン発酵が突然に破たんして失敗するときの指標微生物を見出すことを目的とした⁴⁾。また、指標微生物の動態をモニターし安定的で高効率のメタン発酵に結びつける、高度メタン発酵システムの考え方を紹介することとした。

2. 実験方法

2.1 UASB発酵槽を用いたメタン発酵

メタン発酵にはUASB法を使用し、原料には静岡県内にある果実入りのゼリーや缶詰を製造している工場で廃棄されるシロップ廃液を用いた。シロップ廃液の主成分はショ糖で、TOC濃度は71 g/Lとなっている。UASB発酵槽の容積は20 m³（φ2500×H5000 mm）であり、シロップ廃液はそのままの濃度で発酵槽へ投入すると負荷

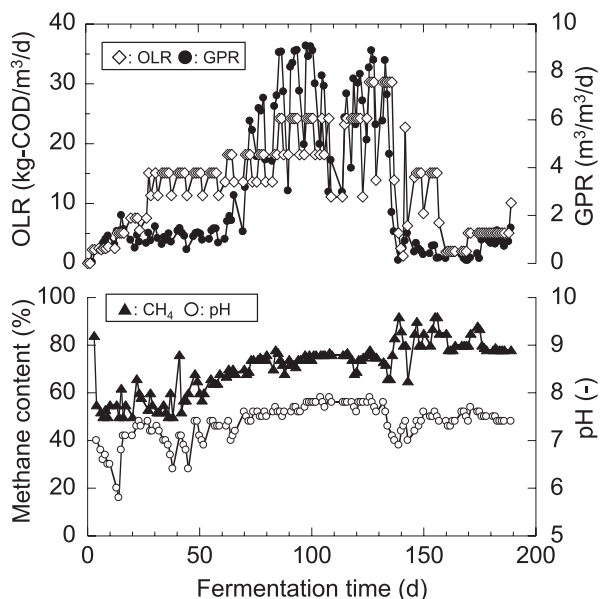


図1. メタン発酵過程における有機物負荷量, バイオガス発生速度, メタン濃度, pHの経時変化。

が高すぎるため、調整槽にて水で適宜希釈した。その後、pH 7.5 付近に調整し、39°C まで昇温した後に発酵槽に導いた。実験開始2日間はグラニューール菌体をUASB 発酵槽に充填し、シロップ廃液を供給せずに温度を39°Cに維持した。操作開始3日から145日後にかけてはシロップ廃液を水で希釈して供給したが、段階的に有機物負荷を増加させ、シロップ廃液と水の体積比が最終的に50%となるように調整した。なお、145日以降は再び負荷量を低下させた。有機物負荷の経時変化を図1に示す。なお、運転開始49日後にはメタン発酵を担う微生物の活性を高める³⁾ 目的で金属塩を添加し、64日後にはC/N比が15になるように尿素を添加した。ガス発生量は発酵槽上部に取り付けたガス流量計(山武, CMS0500)で測定し、pHは槽内に設置したpHメータ(YOKOGAWA, pH 100)で計測した。なお、発生するガスは、1日1回、テドラーバッグに捕集し、その中に含まれるメタンガス濃度をガスクロマトグラフ分析装置(ヤナコ, G-1011)で定量した。また、グラニューールを含む発酵液サンプルを発酵槽下部から1700 mm、壁面から750 mmのサンプリング口から所定の時間間隔で、約200 mLを採取して、発酵液中の揮発性脂肪酸濃度、 Fe^{2+} 濃度、および微生物叢の解析に用いた。メタン発酵の設定温度は39°Cとした。なお、揮発性脂肪酸濃度は、YMC-UltraHT Pro C18カラムを備えた高性能液体クロマトグラフ分析装置(LC-2000 plus HPLCシステム, Jasco)で測定した。また、発酵液中の Fe^{2+} 濃度は Fe^{2+} と α -フェナントロリンのキレート生成を原理とするキットPACKTEST WAK- Fe^{2+} の色の変化をdigital PACKTEST (DPM-MT, 共立理化学研究所)で測定することによって定量した。

2.2 グラニューール中微生物叢の解析

微生物叢の解析にはPCR-DGGE法を用い、まず真正細菌および古細菌の16S rRNA 遺伝子領域をPCRで増

幅し、増幅後、変性剤の濃度勾配をもつゲルを用いて電気泳動(DGGE)をおこない、泳動パターンを取得した。採取した発酵液サンプル中グラニューールに含まれる真正細菌および古細菌のDNA抽出にはグラニューール1 g程度を滅菌したスパーテルですくい取り、30 mLの滅菌水で洗浄してグラニューール表面に付着している微生物を除去し、その後、グラニューールの約0.3 gを使用して、Isoil for Beads Beating Kit (Nippon Gene Co., Ltd.)によりDNAを抽出した。なお、グラニューールから抽出したDNAのうち、真正細菌に由来するDNAを増幅させる目的で、プライマーセットI(プライマー357FGC, 5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3' (*Escherichia coli* 341-357)とプライマー518R, 5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3' (*E. coli* 518-534))⁶⁾を用いた。増幅後、変性剤として尿素とホルムアミドの濃度勾配をもつポリアクリルアミドゲルを用いて、TAE溶液中で60°C, 200 V, 3.5時間の条件で電気泳動をおこなった。また、古細菌に由来するDNAの増幅と電気泳動もおこなったが、その条件の詳細については、著者らの前報に示されている³⁾。

引き続きDGGE法で検出されたポリアクリルアミドゲル中のバンドからDNA断片を抽出・回収した。抽出したDNA断片から目的とするDNA断片を分離および精製するために、TAクローニング法を用いた。まず、抽出された真正細菌のDNA断片は、前述のプライマーセットIを用い、同一の増幅条件で増幅させた。得られたPCR増幅産物は、TOPO TA cloning Kit (Invitrogen Corporation, USA)を用いてプラスミドにライゲーションし、大腸菌に形質転換した。この形質転換した大腸菌を、アンピシリンを添加したLB寒天培地に塗抹し、カラーセクションをおこなった。このようにして得られた目的とするDNA断片はWizard SV Gel and PCR Clean-UP system (Promega Corporation, USA)を用いて精製し、精製したPCR増幅物はBigDye terminator Kit Perkin Elmer Japan, Applied Biosystems Division)を用いてシーケンス反応をおこなった。なお、塩基配列はABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)で解析した。得られた塩基配列については、DDBJ (<http://ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html>)に登録されている配列に対して相同性検索をおこない最も近縁な微生物名を決定した。

2.3 メタン発酵過程における特定微生物の濃度変化

メタン発酵過程で特徴的に出現する微生物B6の菌体濃度変化をリアルタイムPCR法で測定した。B6検出のためのプライマーは、BioEdit v7.0.9 General Informationを用いて、その他微生物との塩基配列の相同性を確認し、塩基配列の中で保存性の低い領域を検索して、Fast PCRの推奨結果を参考に設計した。設計したプライマーセットII(プライマーGMP478F, CGGGTGCTAA TATCATCTGC GCとプライマーGMP575R, ATCAAACCGC CTACACGCGC)がB6に選択的であることを、プライマーの塩基配列と目的菌以外の微生物群の塩基配列とを比較することで確認するとともに、実際のメタン発酵グラニューールサンプルに設計したプライマーセットIIを作用させて、増幅される複数のDNA断片の塩基配列が

すべて同一であることから確かめた（ここにはデータの詳細は示さない）。増幅される DNA 断片の塩基配列が同一であれば、設計したプライマーが類似の塩基配列を有する複数種類の微生物を検出している可能性は極めて小さくなる。引き続いて、設計したプライマーセット II を用いてメタン発酵グラニューールサンプル中の B6 濃度を定量した。リアルタイム PCR 装置は Smart Cycler II（タカラバイオ株式会社）を用い、PCR 反応には、プライマーセット II と SYBR Premix Ex Taq（タカラバイオ株式会社）を用いた。PCR 増幅条件は最初に 95°C、10 sec の変性をおこなった後、95°C、5 sec（変性）、60°C、20 sec（アニーリング／伸長）を 40 サイクルとした。

3. 結果と考察

3.1 UASB 発酵槽を用いたメタン発酵³⁾

図 1 にシロップ廃液の負荷（有機物負荷）とガス発生速度、メタンガス濃度、および pH の経時変化を示す。有機物負荷の増加にともない 120 日付近過ぎまでガス発生速度は増加し、最大のメタン発生速度は 6.76 m³/m³/d となった。廃シロップからのメタン発生速度が大きいのはシロップが微生物に利用されやすい有機物のためと考えられた。その後、最大の有機物負荷 30.3 kg-COD/m³/d を維持し続けるとガス発生速度は急激に低下し、メタン発酵は破たんした。このため、この有機物負荷は、安定的に本装置を運転するには高すぎたと考えられた。なお、メタン発酵が破たんした後には有機物負荷を低減したが、ガス発生速度は元のレベルにまで戻らず、高負荷で

メタン発酵が一旦阻害されるとその変化は不可逆であることが確かめられた。なお、130 日付近で発酵液の pH は大幅に低下した。

図 2 に、メタン発酵過程における揮発性脂肪酸と乳酸の経時変化を示す。揮発性脂肪酸のうち酢酸はメタン発酵初期にも検出されるが、プロピオン酸はメタン発酵の破たんに向けて高濃度になった。酢酸とプロピオン酸の濃度は、発酵 115 日で 475、および 963 mg/L であったが、それらは 136 日後に 7480、および 1610 mg/L にまで増加し、メタン発酵が破たんしたときには、これらの濃度が著しく高くなった。また、これらの酸の蓄積は図

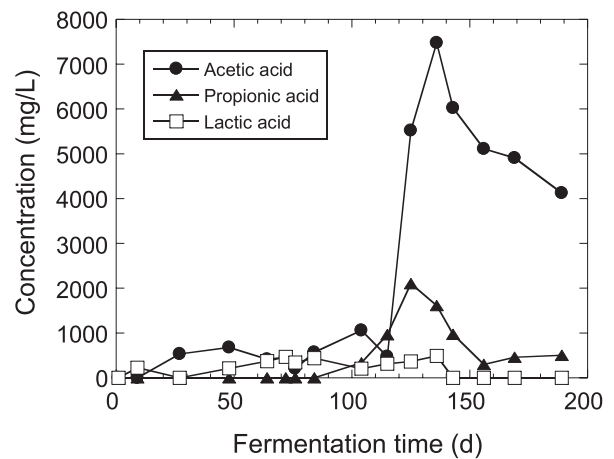


図 2. メタン発酵過程における酢酸、プロピオン酸、および乳酸の経時変化。

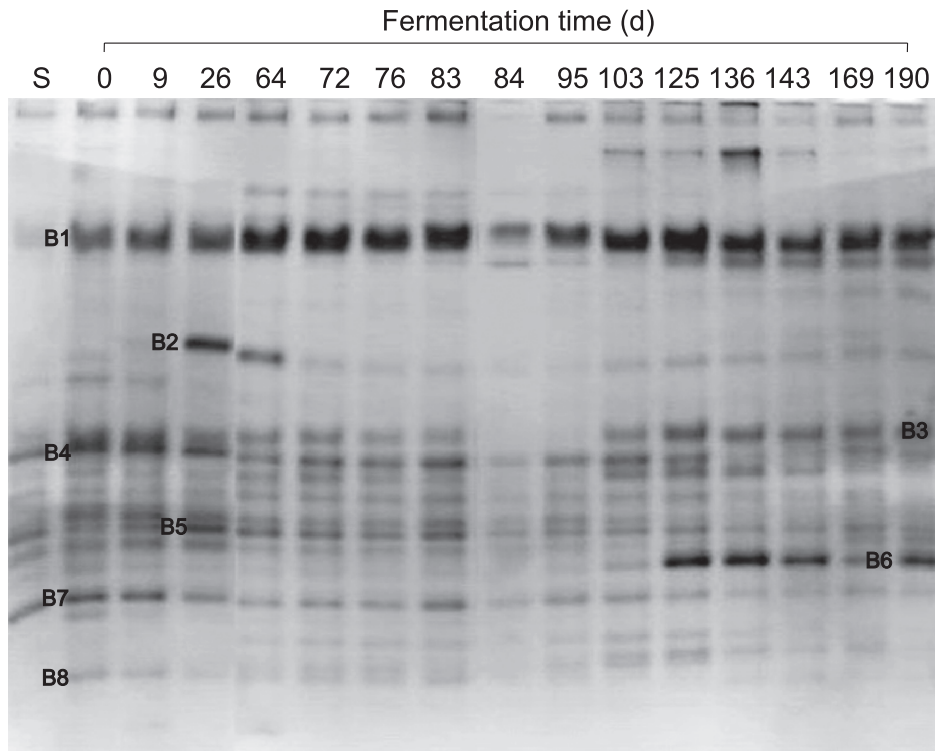


図 3. メタン発酵過程における真正細菌叢の PCR-DGGE パターン (S: 発酵開始時に用いたグラニューール, 写真上の数字はメタン発酵の日数)。

表 1. PCR-DGGE にみられたバンドに近縁の微生物

Band name	Closely related sequences (accession no.)	Identity (%)	Accession no.	Taxonomic category related sequences
B1	<i>Thermotogaceae</i> bacterium 30bM (GU129117)	100	AB624447	genus <i>Kosmotoga</i>
B2	<i>Syntrophomonadaceae</i> bacterium 11bR (GU129077)	98	AB624448	genus <i>Aminobacterium</i>
B3	Uncultured bacterium clone NBLE39G (GU389901)	97	AB624449	unclassified Bacteria
B4	<i>Pelotomaculum propionicicum</i> MGP (AB154390)	97	AB624450	genus <i>Pelotomaculum</i>
B5	Uncultured <i>Chloroflexi</i> bacterium (AB265902)	97	AB624451	family Anaerolineaceae
B6	Anaerobic syntrophic bacterium NE23-3 (AB231802)	100	AB624452	genus <i>Geobacter</i>
B7	Uncultured bacterium clone SGE34G (GU390032)	98	AB624453	genus <i>Syntrophobacter</i>
B8	Uncultured bacterium clone 93a (FJ462122)	100	AB624454	unclassified Bacteria

発酵 130 日付近のメタン発酵の急激な破たんに対応して増殖するものは観察されなかった。このため PCR-DGGE 解析をおこなったときには、メタン発酵の破たんにもなって、古細菌よりも真正細菌に大きな変化が表れることがわかった。

3.3 メタン発酵の破たん予測

図 5 にリアルタイム PCR を用いて測定した B6 に対応する微生物、*Geobacter* 属細菌濃度の経時変化を示す。細菌濃度はメタン発酵 125 日後のその濃度が最大になる

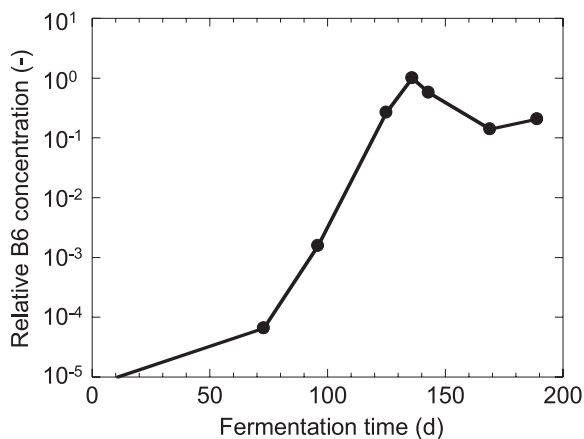


図 5. リアルタイム PCR を用いて測定した Band B6 に対応する微生物濃度。

ときを 1 とした相対濃度で表した。*Geobacter* 属細菌はメタン発酵過程の長時間にわたって増殖することがわかった。

図 6 に *Geobacter* 属細菌が増殖してメタン発酵を抑制するときの抑制機構を示す。メタン生成菌は炭素を含む化合物を還元してメタンを生成する。一方、*Geobacter* 属細菌は Fe^{3+} を Fe^{2+} に還元する。すなわち、これらの微生物はメタン発酵の初期過程で生成する還元力の獲得を巡って競合するが、有機物負荷の増大にもなって流入する廃水の流入量が多くなれば、廃水に溶解して持ち込まれる溶存酸素も増加して、ORP も上昇し、メタン発酵の最終段階を担う絶対嫌気性菌であるメタン生成菌の活性を阻害する。このため、酢酸やプロピオン酸などの揮発性脂肪酸が消費されずに蓄積し、pH が低下することによって発酵装置内の微生物全体の活性が抑制され、メタンガス発生速度は急激に低下すると説明された。メタン生成は Fe^{3+} の還元よりも低い ORP でおけるとされている⁷⁾。すなわち、メタン発酵が活発におこるためには高度の嫌気状態が必要であり、高度の嫌気状態にないときには、 Fe^{3+} 還元が優先すると考えることができる。もし、*Geobacter* 属細菌がメタン生成菌の必要とする還元力を奪って増殖しているならば、発酵液中の Fe^{2+} 濃度はメタン発酵の経過にもなって上昇するはずである。図 7 は、メタン発酵過程における Fe^{2+} 濃度の経時変化を表している。メタン発酵開始以降、破たんに至るまでに Fe^{2+} 濃度は徐々に増大した。この結果は前述の説明を裏付けるものと考えられた。

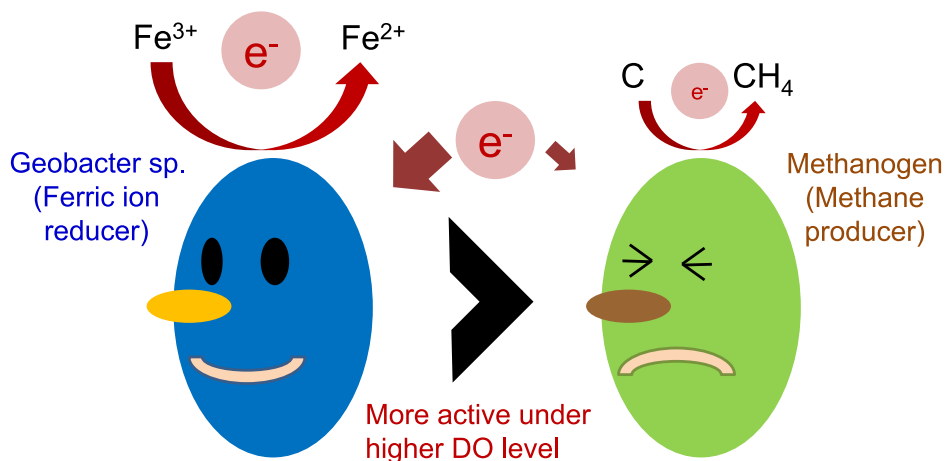


図 6. *Geobacter* 属細菌が存在するときのメタン発酵抑制機構。

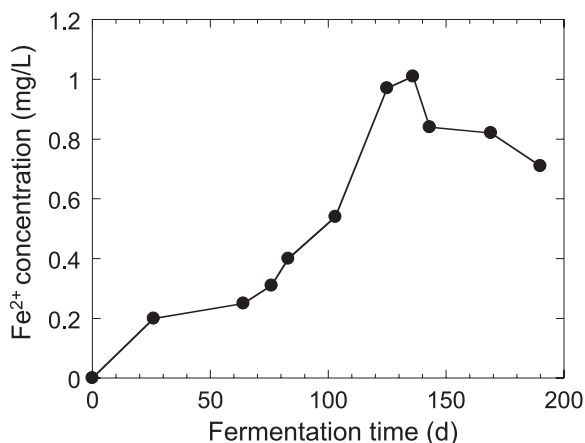


図7. メタン発酵過程における Fe²⁺ 濃度の経時変化。

メタン発酵においては、装置への有機物負荷を増加させると、ある負荷量まではメタンガス発生量が增大するが、負荷量が限界に達するとその負荷量でしばらく高いガス発生量が見られた後に、突然、メタンガスが全く発生しなくなる。前述のとおり、この破たんにもなって、メタン発酵液中に揮発性脂肪酸の蓄積と pH の低下が見られることが知られているが、これらの測定値の変化が見られたときには、もはや破たんを回避するための手段を講じる時間的余裕はない。このため、実際のメタン発酵処理の現場では最大の性能でメタン発酵をおこなわず、有機物負荷量を制限して十分に安全をみた運転になってしまっていることも多い。もしメタン発酵の破たんを、時間的な余裕をもって予測し、破たんを回避する手段を講じることが可能となれば、有機物負荷を大きくし、これまでと比べて格段に高効率なメタン発酵が可能になると期待される。先に述べたように破たんの指標となる微生物は長時間をかけて増殖する。この破たんの指標となる微生物の動態をモニターし、メタン発酵の破たんを予測することに使用すれば、例えば有機物負荷量を調整するといった簡単な操作で、安定的に高効率なメタン発酵を可能にする高度メタン発酵システムが構築できると考えられた。

4. ま と め

果実入りゼリーや缶詰の製造過程で大量に発生するシロップ廃液を UASB 発酵装置にてメタン発酵した。装置

に供給する有機物負荷を次第に上昇させるとメタンガスの発生量は増加するが、負荷量が過剰になるとメタンガスの発生速度は急激に低下した。このとき DGGE 法で測定した微生物叢はメタン発酵の経過にもなって変化し、メタン発酵の運転条件が細菌叢の変化に影響が大きいこと、また、メタン発酵の破たんにもなって特徴的に増殖する微生物（指標微生物）が存在することを確かめた。

メタン発酵は廃棄物処理とエネルギー生産を兼ねた優れた技術であるが、複数の微生物が複雑な相互作用を及ぼしながら共存する複合微生物の系であり、反応機構の詳細と最適操作条件については、いまだ十分に明らかになっていないといえず、効率的で安定的にメタンガスを生産するための技術の開発が強く求められている。近年の分子生物学の急速な発展により、メタン発酵のような複合微生物系についてもクリアボックス化をめざした解析が盛んにおこなわれるようになってきた。そして、複合微生物系を形成する微生物叢について多くの知見が集積されつつある⁸⁻¹³⁾。エキスパートの暗黙知を形式知に変えて、さらにエキスパートの暗黙知を凌駕することで、どこでも、だれでも高性能のメタン発酵が可能になれば、本来大きな潜在的なニーズのあるバイオマスの利活用、廃棄物処理に欠かすことのできない技術として広く普及させることができると期待された。

文 献

- 1) Lettinga, G. et al. 1980. *Biotech. Bioeng.* 22: 699-734.
- 2) 野池達也編著. 2009. メタン発酵. 技報堂出版.
- 3) Nakasaki, K. et al. 2013. *Process Biochemistry.* 48: 912-919.
- 4) Kida, K. et al. 2001. *J. Biosci. Bioeng.* 91: 590-595.
- 5) Ueno, Y. et al. 2001. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 65-73.
- 6) Childers, S. 2002. *Nature.* 416: 767-769.
- 7) Madigan, M.T. et al. 2006. *Brock Biology of Microorganisms* Pearson Prentice Hall, Inc.
- 8) 重松 亨他. 2009. *生物工学会誌.* 87: 570-596.
- 9) Sekiguchi, Y. and Y. Kamagata. 2004. In *Strict and facultative anaerobes: Medical and environmental aspects*, pp. 361-384. In M.M. Nakano and O. Zuber (eds.), Horizon Scientific Press.
- 10) Keyser, M. et al. 2006. *Syst. Appl. Microbiol.* 29: 77-84.
- 11) Li, P. et al. 2010. *Water Sci. Technol.* 61: 243-252.
- 12) Ye, J. et al. 2011. *Bioresour. Technol.* 102: 5498-5503.
- 13) Vasquez, J. and K. Nakasaki. 2016. *Biomass and Bioenergy.* 86: 129-135.