

脱炭素社会実現を志向するメタン発酵の安定的高効率化のための中温メタン菌の耐熱化

山口大学 大学院創成科学研究科建設環境系専攻

今井 剛



1. はじめに

一般廃棄物処理における脱炭素に関わる重要な課題が、生ごみを対象とした資源循環システムの構築である。そのためには生ごみの分別収集、エネルギーを含む資源回収を伴った生ごみの中間処理プロセス、および最終処分場を不要とする最終副産物（発酵廃液の利活用）のリサイクルプロセスの確立が必須である。“生ごみを制すればごみ処理を制す”，これを実現することにより，生ごみ分別による資源循環の環（わ）創成による脱炭素社会の実現に資することができる。エネルギーを含む資源回収を伴った生ごみの中間処理プロセスに主に用いられている技術がメタン発酵である。通常メタン発酵は 35～37℃ 程度の中温発酵が主流でありその発酵速度は遅く大きな施設を必要とするため，地方都市（10 万人規模以上）において生ごみを処理する場合，広大な設置場所と膨大な設備投資コストが必要になり，その改善が必要である。一方，その発酵速度を向上させるため，あるいは難分解性物質の分解促進のために 55～60℃ 程度の高温発酵が用いられることもある。しかしながら，高温発酵はその発酵速度の速さという利点がある一方で，高温であるために阻害要因（負荷の変動や pH の低下など）に対して脆弱，プロセスが破綻した後のリカバリーに時間を要するという欠点がある。また，高温発酵に適応する微生物の種類が中温発酵に比べて極端に少ないことから，阻害要因に対応できる高温メタン生成菌（以下高温菌と称す）を見出すことは極めて難しいと考えられる。以上の社会的・学術的背景から，「阻害耐性を維持しながら中温発酵の速度を改善するための方法」を見出すために，本研究では中温菌の耐熱化に取り組む。耐熱化とは通常 35～37℃ 程度が適温とされる中温菌を 45℃ 程度の温度域（耐熱域 1）と呼ばれる）でも十分なパフォーマンス（目標：中温菌の 2 倍の発酵速度）を発揮できるようにすることである。中温菌の耐熱化プロセスに関する研究はこれまで国内外にも例がなく，その馴致方法もまったく未確立，どのような中温メタン菌が耐熱化できるのか，一切明らかになっていない。そこで，本研究では分子生物学的手法を駆使してどのような中温メタン生成菌が耐熱化できるのか，それを解明することでその最適な耐熱化の手法を開発・確立することを研究目的とする。

2. 研究内容及び成果

下水処理場にて採取した消化汚泥 30mL のサンプルを表 1 の通り培養条件を変えて計 10 個作成した。なお，バイアル瓶中はあらかじめ水中にて窒素置換を行い，さらにブチルゴム栓とアルミキャップで気密性を維持した。これによってサンプル中の嫌気状態を確保した。シリンジによりガス発生量の測定を行い，ガスクロマトグラフによるガス組成分析に

よりメタン発生量を計算した．さらに汚泥サンプルを採取し，次世代シーケンサー（NGS）を用いて各汚泥サンプルの網羅的菌叢解析を行った．

表 1 の培養条件に基づいて培養した10つのサンプルが条件通りに培養されているかどうかを確認した．その結果を表 2 に示す．表より，No. 1, 2, 5, 6, 7, 10 のサンプルでは COD 濃度が目標としていた1000[mg/L]に近い値とすることができた．一方で，水素を添加した No. 3, 8 のサンプルの COD は

表 1 各サンプルの培養条件

No.	培養温度	主な基質	添加頻度
1	38→42→45℃	グルコース	1回
2	38→42→45℃	酢酸	1回
3	38→42→45℃	水素	1回
4	38→42→45℃	グルコース	5回(2日に1回)
5	38→42→45℃	酢酸:水素=7:3	1回
6	45℃	グルコース	1回
7	45℃	酢酸	1回
8	45℃	水素	1回
9	45℃	グルコース	5回(2日に1回)
10	45℃	酢酸:水素=7:3	1回

表 2 各サンプルの培養条件の確認

No.	投入汚泥量 [mL]	添加基質	添加量 [mL/回]	液相部体積 [mL]	1度目の基質添加後の 瓶中COD濃度 [mg/L]
1	30.30	グルコース (3000[mg/L])	15.00	42.71	1123.86
2	30.39	酢酸 (3000[mg/L])	15.00	43.58	1101.42
3	30.23	水素	30.00	30.23	708.85
4	30.02	グルコース (3000[mg/L])	2.00	42.89	149.22
5	30.52	酢酸 (3000[mg/L])	10.50	37.60	893.62
		水素	9.00		170.97
					計1064.59
6	30.30	グルコース (3000[mg/L])	15.00	43.64	1099.91
7	30.19	酢酸 (3000[mg/L])	15.00	43.60	1100.92
8	30.75	水素	30.00	30.75	696.86
9	30.09	グルコース (3000[mg/L])	2.00	43.23	148.05
10	30.13	酢酸 (3000[mg/L])	10.50	37.90	886.54
		水素	9.00		169.62
					計1056.16

1000[mg/L]を目標としていたにも関わらず，700[mg/L]近くと，低い値となってしまった．水素添加量を増やせば COD 濃度を高めることができるが，瓶の容積を過度に超える体積の水素を添加することは瓶が割れる危険性があることと，水素を添加時にシリンジを瓶から抜くときに一定の水素が抜けてしまうために，これ以上の改善は見込むことができないと考えられる．また，No.4, 9 のサンプルは一度目の基質を添加した後の COD 濃度は200[mg/L]近い値だが，その後同量の基質を4回添加することで，5回目の基質添加後の COD 濃度が1000[mg/L]となることを目指した．なお，本実験では5回目の基質添加後の瓶重量を測定しなかったため，その COD 濃度は計算できなかった．図 1 に培養時における各サンプルのメタン発生量の積算値を示す．培養時に最も多くのメタンを生成したのは No.9 のグルコースを高頻度で添加したサンプルであった．また，このサンプルでは No.4 の結果

と比べて、45[°C]での直接培養による効果もみられた。同様に、No.10 のサンプルも45[°C]での直接培養による効果がみられ、多くのメタンが生成された。しかし、グルコースを添加し45[°C]で培養された No.6 のサンプルでは、菌体量が多いと考えられたにも関わらずメタン生成量が少なかった。上述のように、No.6 のサンプルは培養時と試験時の条件が類似しており、菌叢が変化しにくかったと考えられたことも踏まえて、この瓶中ではメタン生成を担う菌以外の加水分解菌や酸生成菌が多く存在した、逆の見方ではメタン菌の存在量が少なかったと考えられる。

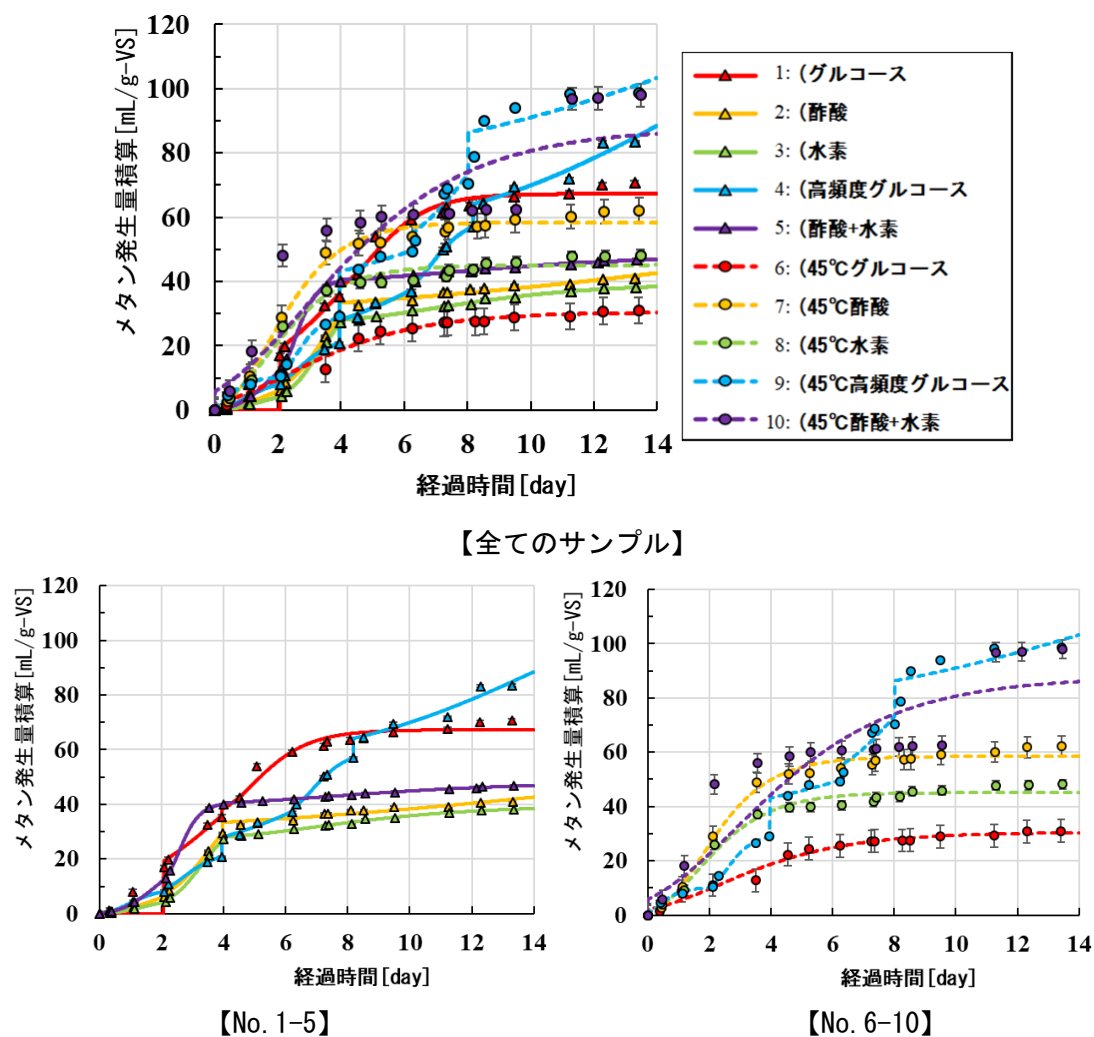
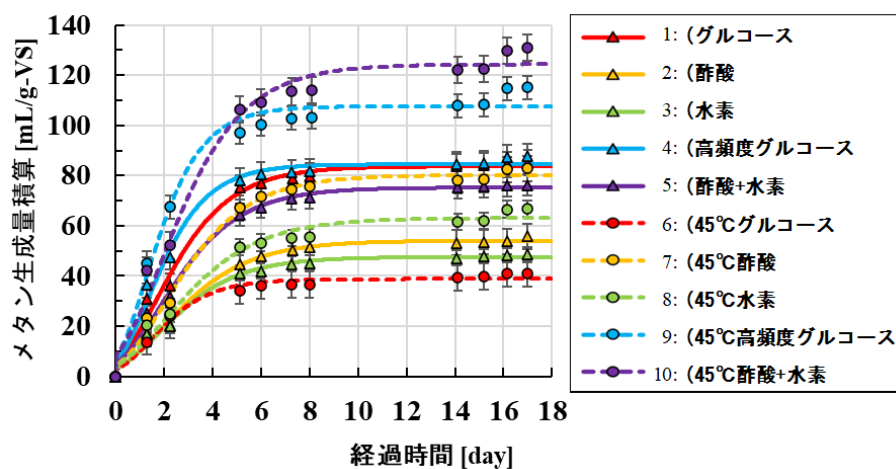
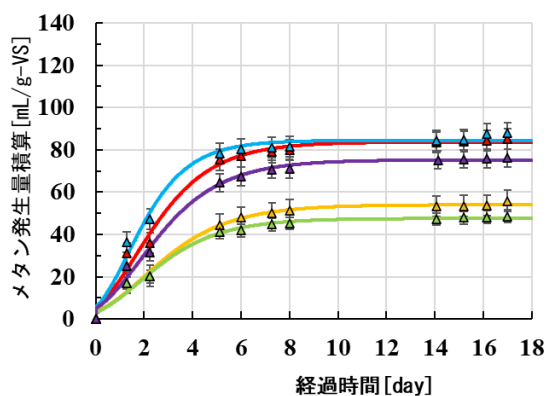


図1 培養時のメタン発生量積算値

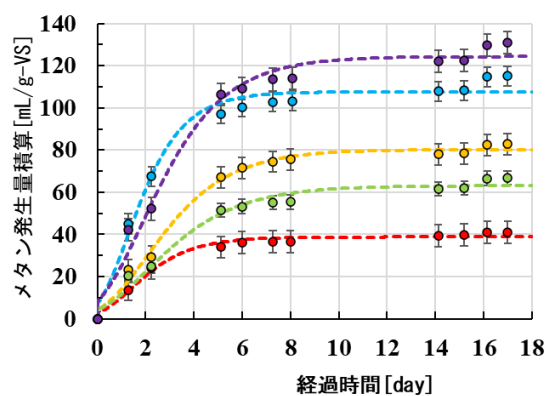
活性試験時の各サンプルにおけるメタン発生量を図2に示す。活性試験時にメタン生成量が最も多かったのは酢酸と水素の混合基質を添加し45[°C]で直接培養を行った No.10 のサンプルであった。No.10 の最終的なメタン発生量の積算は約131 [mL/g-VS]で、同様の基質を添加して段階的に45[°C]へ馴致させた No.5 のサンプルと比べて、約1.5[倍]のメタンを生成した。このことから、No.10 のサンプルにはメタン菌が多く存在し、基質の酢酸と水素の混合比がサンプル中の酢酸資化性メタン菌と水素資化性メタン菌の存在比と近かったために、基質阻害を受けずに十分に活性化したと考えられる。また、同様に、No.7, 8, 9 のサンプルでも45[°C]での直接培養によるメタン生成量の増加効果がみられた。



【全てのサンプル】



【No. 1-5】



【No. 6-10】

図 2 活性試験時のメタン発生量積算値

表 3 に、実験結果から計算されたゴンペルツの成長曲線式の P [mL], R_m [mL/day], エクセルのソルバー機能により示された馴致時間 λ [day] を示す。

表 3 各サンプルの P , R_m , λ

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
P [mL]	85.08	55.85	48.61	87.90	76.23	41.12	82.78	66.77	115.16	131.02
R_m [mL/day]	23.98	13.26	13.18	28.23	19.52	10.86	17.97	16.02	35.12	32.80
λ [day]	0.41	0.52	0.44	0.27	0.40	0.12	0.45	0.58	0.19	0.48

No.9 と 10 のサンプルでは、他のサンプルと比べてメタン生成量が多かったことに加え、メタンの最大生成速度 R_m も大きいことがわかった。よって、No.9,10 のサンプルではメタン菌がその基質の消費を終える前に短時間で急速にメタンを生成させたと考えられる。また、馴致時間 λ が最も小さかったのは No.6 のサンプルであった。このサンプル内では加水分解菌や酸生成菌、メタン菌やそれ以外の菌が多く存在すると考えられ、このため試験時にもグルコースを加水分解してメタンを生成するまでのプロセスがスムーズに行われたことで馴致期間の短縮につながった。

たとえられる。一方、でメタン生成量が最も多かった No.10 のサンプルの馴致期間は0.476 [day]と他のサンプルより長かった。このことから、メタン菌がメタンを多く生成することと馴致期間を短縮することは直接関係がないと推察される。別の見方をすれば、メタン菌の活性がピークに達するのに長めの馴致期間が必要であるとも考えられる。これについてはより多くの実験データからより詳細に判断すべきと考えられる。

最後に菌叢解析の結果を図 3 に示す。まず、各サンプルで検出された属のうち、0.5[%]以上検出されたものをまとめたもの、relative abundance（出現割合）を図 3 に示す。

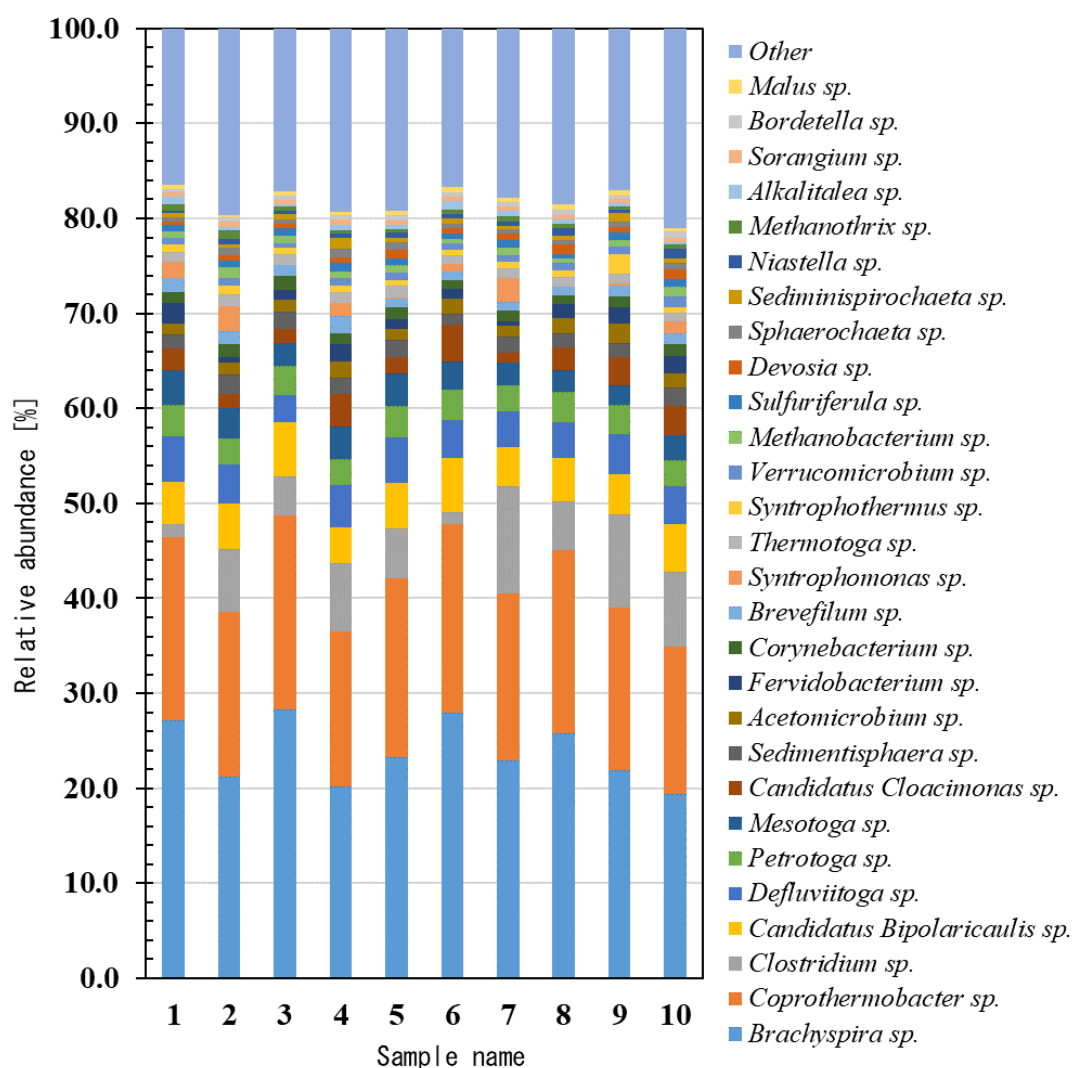


図 3 出現割合の結果（上位 0.5%抽出）

この結果からサンプルの多くを占める菌はメタン菌ではなかったことがわかり、下水汚泥からのメタン生成には様々な役割を持った菌が必要であることが改めて確認された。出現割合の特に高かった *Brachyspira* 属, *Coprothermobacter* 属, *Clostridium* 属はそれぞれ腸内感染を引き起こす病原菌、嫌気性の加水分解菌、嫌気性の酸生成菌であり、いずれも熱耐性のある菌である。特に加水分解菌、酸生成菌が多かったことが上述の考察（メタン生成には様々な役割を持った菌が必要である）を裏付けるものとなった。これらの菌は、45[°C]で培養をしたことで優勢と

なり，メタン発酵の前段階の活動（加水分解や酸生成）に大きく貢献していたと考えられる．また，0.5[%]以上の出現割合を持ったメタン菌は，*Methanobacterium* 属と *Methanothrix* 属のみであり，どちらも高温でも適応できるメタン菌であったことから，耐熱域へのメタン菌の適応メカニズムは本研究のねらいであった中温メタン菌の 45℃付近の耐熱域への適応がメインではなく，高温メタン菌の耐熱域への適応が主である，ということが示唆された．

3. まとめ

本研究をまとめると以下の通りである．

耐熱域へのメタン菌の適応メカニズムは本研究のねらいであった中温メタン菌の 45℃付近の耐熱域への適応がメインではなく，高温メタン菌の耐熱域への適応が主である，ということが示唆される結果が得られたことから，本研究の当初の目的である「中温メタン菌」の 45℃付近の耐熱化は難しいことが明らかとなった．しかしながら，耐熱域へのメタン菌の適応は 55～60℃付近の高温メタン菌が主であるという全く新しい知見が得られた．

今後は，より長期間にわたる 45℃付近の耐熱域へのメタン菌の馴致実験を実施し，その実験を通して次世代シーケンサーを駆使したより詳細で網羅的な菌叢解析を行いそれを解析することで，さらに詳しく 45℃付近の耐熱域へのメタン菌の馴致のメカニズムを解明していくことを計画している．

なお，タイの共同研究者 2 名とは以下の研究論文 2 本の共同執筆の形で成果を形にした．

謝辞

本研究は（公益財団法人）天野工業技術研究所、2023 年研究助成（許可を得て 1 年延長をいただいた）を受けて実施されました。

< 研究論文 >

Gede Adi Wiguna Sudiarta, Tsuyoshi Imai, Alissara Reungsang. 2024. Syntrophic Relationship Among Microbial Communities Enhance Methane Production During Temperature Transition from Mesophilic to Thermotolerant Conditions, Journal of Environmental Chemical Engineering, 12(6), 114903.

<https://doi.org/10.1016/j.jece.2024.114903>

Gede Adi Wiguna Sudiarta, Tsuyoshi Imai, Prapaipid Chairattananokorn, Alissara Reungsang. 2024. Unveiling the impact of temperature shift on microbial community dynamics and metabolic pathways in anaerobic digestion, Process Safety and Environmental Protection, 186, 1505-1515.

<https://doi.org/10.1016/j.psep.2024.04.121>

< 研究発表 >

高橋律穂，梶山茄汰，中村慎吾，今井剛: 45℃付近の耐熱域でのメタン菌の適応挙動の解明，第 59 回日本水環境学会年会，2025.3.

Riho Takahashi, Kanta Sugiyama, Shingo Nakamura, Tsuyoshi Imai: Unlocking Thermotolerance Mechanisms of Mesophilic at 45℃, Water and Environment Technology Conference 2024, 2024.7.