

高温水素発酵における微生物叢の解析

東北大学工学部土木工学科

学生会員

○ 林 諒一

東北大学大学院工学研究科土木工学専攻

堆 洋平

東北大学大学院工学研究科土木工学専攻

正 会 員

李 玉友

東北大学大学院工学研究科土木工学専攻

正 会 員

原 田 秀 樹

1. はじめに

水素は燃焼すると水しか発生せず，化石燃料を燃やした場合のように地球温暖化の主要な原因とされる二酸化炭素の排出がないので，地球環境の保全の観点から理想的な燃料といえる．

一方，バイオマスは再生可能なエネルギー源であり，「バイオマス・ニッポン総合戦略」によりその利活用を促進されている．水素発酵においては，微生物の代謝作用を利用してバイオマスから水素を生産することが可能であり，近年注目されている．

従来の水素発酵の研究は，温度を中温に制御し，pH，滞留時間，基質などの影響が検討されてきた．近年，高温においても高い水素収率が得られることが報告されているが，研究例が少なく，高温水素発酵における水素発酵パターン，水素生成細菌群の構造についてはまだ詳しいことが明らかになっていない．

そこで，本研究ではこれまでに高温で利用された例のないでんぷんを基質とし，高温水素発酵特性および水素生成細菌群を解析した．水素生成細菌群の解析には分子生物学的手法である，PCR-DGGE 法，クローニング法を用いた．

2. 実験方法

2.1 高温水素発酵の連続運転

本研究では，S 処理場から得た余剰活性汚泥の高温消化汚泥を用いて，でんぷんを基質とし，55℃，HRT24 時間の条件で連続運転を行った．実験装置の概略図を図 1 に示した．

2.2 微生物解析

2.2.1 PCR-DGGE 法

DNA の抽出は Ultra Clean Soil DNA kit(MO BIO)を用い，添付の説明書に従い行った．PCR は，抽出した DNA をテンプレートとし，プライマーは EUB341f-GC と Uni518r を使用した¹⁾．また，アクリルアミドゲルの変性剤の濃度勾配は 15-55% となるように調整した．電気泳動は 58℃，130V の条件で 300 分間行った．DNA

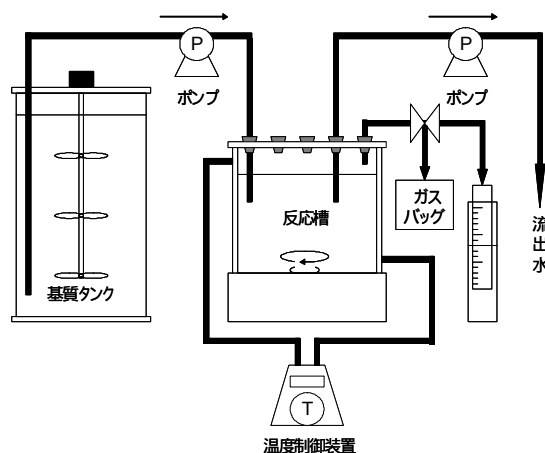


図 1 実験装置の概略図

の検出にはエチジウムブロマイドを用い，UV 照射および画像の取り込みには CheniDoc XRS(BIO-RAD)を用いた．

2.2.2 クローニング法

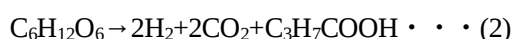
クローニング法は TA Cloning kit(invitrogen)を使用し，添付のプロトコルに従った DNA の抽出は PCR-DGGE 法の時と同様の方法で行い，プライマーは 27f と 1492r を使用した²⁾．OTU は RFLP 解析により得られたバンドパターンにより決定した．制限酵素には *MspI* を用いた．

3. 実験結果および考察

3.1 水素発酵特性

pH およびガス発生特性を表 1，COD_{Cr} 物質収支を表 2 にそれぞれ示した．水素収率は 2.32mol/hexose と比較的高くなった．代謝産物として酪酸，酢酸が投入 COD_{Cr} あたり，それぞれ 45.9%，14.7%生成した．

水素生成細菌による水素生成は主に以下の式(1)の酢酸発酵パターンと式(2)の酪酸発酵パターンの 2 つのパターンにより行われる．



本研究における COD_{Cr} 物質収支では，代謝物として酪酸が大きな割合を占めていることから，(2)式の酪酸発

酵パターンが水素生成に大きく寄与していると考えられる。

3.2 微生物解析

DGGE によるバンドプロファイルの経時変化を図 2 に示した。ガス生成が安定状態に達するまでの間に細菌群の構造が植種源から大きく変化し、34 日以降には構築されたバンドパターンが安定した。よって、今回の実験では、微生物叢が安定したと考えられる、44 日目のサンプルで解析を行った。PCR-DGGE 法による結果を表 3 に示した。PCR-DGGE 法により band1 の菌は *Thermoanaerobacteriaceae* 科の *T.thermosaccharolyticum* に近縁な細菌、band2 の菌は *Flavobacteriaceae* 科の *Flavobacterium.sp* に近縁な細菌であることが分かった。

さらに 44 日目のサンプルを用いて、クローニングを行った結果を表 4 に示した。OTU-1 の *T.thermosaccharolyticum* は全 89 クローン中 79 クローン、OTU-2 の *Flavobacterium.sp* は全 89 クローン中 7 クローンを占めた。*Thermoanaerobacterium* 属の細菌は好熱性水素生成細菌として既往の研究でも検出されている³⁾、また、*Flavobacterium* 属の細菌は通性嫌気性細菌で、炭水化物からはガスを生成しないこと⁴⁾から、今回の実験では *T.thermosaccharolyticum* が水素生成を担っていると考えられる。また、本研究は混合微生物系にもかかわらず、単純な細菌群の構造をとった。その理由として、55℃、HRT24 時間、pH4.9 という条件が優占種のスクリーニングに寄与したということが考えられる。

5. まとめ

高温消化汚泥を植種源とし、55℃、HRT24 時間の条件で、でんぷんの高温水素発酵、微生物叢の解析を行い、以下の結果が得られた。

- 1) 水素収率は 2.32mol/hexose となった。
- 2) 微生物叢には水素生成細菌として知られる *T.thermosaccharolyticum* の近縁種が優占して存在していることが分かった。

参考文献

- 1) Muyzer, G : Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding 16S rDNA, *Applied and environmental Microbiology*, Vol.59, No3, pp.695-700, 1996

表 1 pH およびガス発生特性

pH	水素生成速度 [L H ₂ /L/d]	比水素生成速度 [L H ₂ /gVSS/d]	水素収率 [mol H ₂ /mol hexoseconverted]	ガス組成 [%]		
				H ₂	CO ₂	CH ₄
4.9	2.80	4.01	2.32	52	48	-

表 2 COD_{Cr} 物質収支

COD _{Cr} 物質収支 [%]									
水素	ギ酸	コハク酸	酢酸	乳酸	プロピオン酸	酪酸	エタノール	VSS	残留糖
18.1	0.0	0.0	14.7	0.5	1.5	45.9	0.0	9.0	108.0



図 2 DGGE によるバンドプロファイルの経時変化
S: 植種源, 数字: 経過日数

表 3 PCR-DGGE 法による微生物解析の結果

band	accession No.	closest relatives	sequence determined [bp]	similarity [%]
1	AJ319015	<i>Flavobacterium</i> sp.	160	100
2	AF247003	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	130	100

表 4 クローニング法による微生物解析の結果

OTU	similarity [%]	closest relatives	number of clone
OTU1-1	98	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	79
OTU1-2	98	<i>Flavobacterium</i> sp. YO15	7
others	-	-	3

- 2) Suzuki, M.T. : Bias caused by Template Annealing in the Amplification of Mixture of 16S rRNA Genes by PCR, *Applied and environmental Microbiology*, Vol.62, No2, pp.625-630, 1996
- 3) 植田充美, 近藤昭彦: エコバイオエネルギーの最前線, ゼロエミッション型社会を目指して, シーエムシー出版, pp.180-188, 2005
- 4) John.G.Holt: Bergy's Manual of Determinative Bacteriology ninth edition, Williams & wilkins, pp.83, 1994