

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者氏名 佐々木 大介

化石燃料の枯渇が深刻化している一方で、生ごみ、各種汚泥などの未利用バイオマスは年々増加している。特に未利用バイオマスの大部分を占める生ごみは、水分含量が多く、焼却や埋立てによる処理が難しい状況にある。そのため生ごみからエネルギー回収は重要な課題であり、その技術としては嫌気性消化法が挙げられる。嫌気性消化のプロセスは嫌氣的に生育する微生物の働きにより高分子有機物を水素やメタン、二酸化炭素に還元分解するものであり、可溶化過程、酸生成過程、メタン生成過程の 3 段階からなる。これらの反応は複数の微生物種によって同時並行的に行われる複雑な反応である。本研究では、模擬生ごみを処理する水素発酵、メタン発酵を対象として、高効率なリアクターの構築と、高効率処理に関与する微生物群集の構造と機能を明らかにすることを目的とした。生ごみからの嫌気性消化における各代謝段階に関与する微生物の知見は、安定なリアクターの運転維持や、さらにはエネルギー回収の高効率化につながると期待される。

### 1. 高効率な可溶化および水素発酵の研究

水素発酵とは、運転条件の制御によってメタン生成菌の生育を抑制し、可溶化・酸生成過程までのみを進行させることで生じる余剰電子を水素ガスとして回収する発酵様式である。しかし固形分を含む廃棄物からの高効率な水素発酵に関する報告はない。そこで、嫌気性マイクロフローラの接種による可溶化および水素発酵の最適化のため、pH と水理学的滞留時間 (HRT) を制御したリアクターを運転した。各運転の定常状態時の細菌群集構造を解析することで、発酵様式と細菌を特徴付けることを目的とした。解析の結果、弱酸性の pH (5,6) 且つ短い HRT (< 1.0 日) の運転で、顕著な水素ガス生成が観察された。その回収率は、他の水素発酵の報告と比較して非常に高い値であった。水素生成が活発な運転では *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* が主要な細菌として同定された。一方、中・アルカリ性 pH (7,8) 且つ長い HRT (> 4.0 日) の運転において、可溶化の効率が低いことが明らかになった。可溶化率が高い運転では、生ごみ中のタンパク質や繊維分分解などに関わると考えられる未培養細菌群やセルロース分解能を有する *Clostridium stercorarium* が優占化していた。

### 2. 高効率なメタン発酵の研究

メタン発酵は有機物の可溶化、酸生成過程に続き、嫌気性消化の最末端段階を担うメタン生成菌の共生により、メタンや二酸化炭素を発生させる発酵様式である。酸生成過程で生じる低級脂肪酸は共生酸化によってのみ酢酸や水素、二酸化炭素に分解され、メタン生成菌によりメタンへと変換される。特に酢酸は嫌氣的有機物分解における中心中間代謝産物であり、酢酸からメタン生成反応は全有機物分解の 70%を占めると報告されている。しかし酢酸の分解経路は知られて

いるものの、その寄与の割合に関する知見はない。またメタン発酵は未利用バイオマスの有効利用を目的に研究開発が進んでいるが、生ごみのような負荷量が高い廃棄物を長期間、高効率に処理するメタン発酵リアクターを解析した研究は少なく、その理解は十分ではない。そこで本研究では、はじめに模擬生ごみを高効率に処理するメタン発酵を構築し、次に各発酵段階を担う微生物群集の経時的および空間的な変遷、さらにはメタン生成活性、酢酸からのメタン生成経路を説明することを目的とした。

HRT を段階的に短くして負荷量を上げる運転により、最終的に HRT 4.0 日という短い滞留時間にもかかわらず、長期間、安定で高効率なメタン発酵リアクターの構築に成功した。次に、経時的に採取した発酵液をもとに、HRT の変化に伴う微生物群集の変遷、高効率運転時の微生物種を、細菌・アーキアの T-RFLP および TA クローニングにより解析した。その結果、本メタン発酵における細菌群集は、十分に定常状態に至っていると考えられる地点においても変遷し続け、アーキア群集は 1 種に集積していることが明らかとなった。高効率運転時に最も優占化していた細菌は、*Thermotogales* に属する未培養細菌であり、酢酸の酸化分解を担うと示唆された。また模擬生ごみの固形分上では、タンパク質や繊維分分解に関与する細菌群が優占化しており、これらは高効率な可溶化を担っているものと考えられた。一方、アーキアでは水素資化性メタン生成菌である *Methanoculleus thermophilus* が唯一、優占化して検出された。しかし固形分上でのみ、酢酸資化性メタン生成菌の *Methanosarcina thermophila* が優占化して検出された。それらのメタン生成活性を rRNA の定量により見積もったところ、水素資化性メタン生成菌の活性が検出されたメタン生成菌のうちの 90%以上を占め、優先化していた。よって、高効率メタン発酵時には水素からのメタン生成が、主要な役割を担っていることが明らかになった。さらに、安定同位体標識された酢酸を用いて、発生したガスの同位体分布から酢酸の分解経路の比率を算出した。その結果、酢酸酸化細菌と水素資化性メタン生成菌によるメタン生成が約 80%、酢酸資化性メタン生成菌によるメタン生成が約 20%であることが明らかになった。

本研究では、嫌気性マイクロフローラの接種による高効率な水素発酵について、エンジニアリングおよび微生物学的な知見を新規に得た。本研究による高効率な水素生成に関する知見は、実機の水素発酵の運転に役立つと期待される。メタン発酵では、酢酸酸化細菌と水素資化性メタン生成菌の共役による高効率な酢酸分解によって、メタンが生成されていることをはじめて明らかにした。また固形分上に存在する微生物を直接的に検出し、評価した。以上、本研究は、目的の発酵様式に最適なマイクロフローラのデザイン化を可能とする道を切り開いたものとして、応用上また学術上寄与するところが多い。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位としてふさわしいと認めた。