微生物によるメタン生産

—1980. 1. 12 受理—

微生物工業技術研究所 田 中 一 裕

1. はじめに

近年、石油事情のひっ迫とともに、石油に代わるエネルギーへの要請がにわかに高まってきた。この石油代替エネルギーとして検討されているもののうちで、太陽エネルギーはその絶対量の点で最も期待されているものの一つである。地球上の生物体は化学熱力学的には太陽エネルギーにより形成されたものと言える。メタン発酵は生物体由来の有機物から天然ガスの主成分であるメタンを生産できることから、太陽エネルギー燃料化システムとして利用することができるのである。有機物としてセルロースを例にとれば、セルロースは炭酸ガスと水から光合成により合成されたものであるが、これはメタン発酵菌により最終的にはメタンと炭酸ガスに分解される。この生成ガスを人間が燃料として利用すれば、クローズドシステムが出来上がる(図1)。

図1 太陽エネルギー燃料化システム

このメタン発酵に関する微生物の生理、生態、利用に関する知識は近年、急速に増大しており多くの総説^{1)~10)}および著書¹¹⁾¹²⁾が出されているので、ここでは一般的な解説は重要なものととどめ、出来るだけ新しい情報および最近のトピックを紹介したい。

2. メタン発酵菌の生理および生態

メタン発酵菌は、有機物を酢酸、プロピオン酸、*n*-酪酸などの有機酸に分解する細菌と、有機酸をメタンと炭酸ガスに分解するメタン生成菌から成っている。それらの有機酸を直接メタンと炭酸ガスに分解するメタン生成菌を分離したとの報告があるが、現在ではプロピオン酸、*n*-酪酸を基質とするものについては、さ

らに二種以上の菌の混合体であり純粋菌ではないのではないかとみなされている⁷⁾。

現在までに報告されている^{18)~24)}メタン生成菌とその性質を表1に示すが、プロピオン酸、*n*-酪酸など C_3 以上の有機酸を基質とするものはない。これらの有機酸が嫌気的環境で、どういう微生物によって、メタン生成菌が利用できる基質に変換されるのか、まだ明らかにされていない。

メタン生成菌の生育温度は、65~70℃に至適温度をもつ *Methanobacterium thermoautotrophicum* を除けばすべて30~45℃に至適温度をもつ中温菌である。混合培養系による、いわゆるメタン発酵は、30~40℃(中温域)および50~60℃(高温域)という二つの至適温度領域が知られており、中温域は中温菌の至適温度にほぼ一致しているが、高温域は *M. thermoautotrophicum* の至適温度より10℃程低い。高温域に至適温度を有するメタン生成菌が存在するが未だ発見されていないのか、メタン発酵に関与する非メタン生成菌の至適温度が、50~60℃かそれ以下にあるため、全体として50~60℃に至適温度があるように見えるのか、今後の研究に期待したい。

メタン生成菌の至適 pH は報告されていないものもあるが、その場合にはその菌を使った実験に用いられている温度を示し、?をつけている(表1)。すべての菌が pH6-8 の範囲内に至適 pH があるようである。

既知のメタン生成菌はすべて、水素/炭酸ガスを利用するが、酢酸、ギ酸、メタノールを利用できるのはそのうちの一部の菌のみである。Zeikus ら²⁴⁾は、*Methanosarcina barkerii* と *M. thermoautotrophicum* は水素存在下では酢酸を利用するが、水素が存在しないと酢酸を利用しない事を示した。しかし、その後、Mah ら²¹⁾は、水素がなくても酢酸を利用できるメタン生成菌 *Methanosarcina* strain 227 を分離した。水素/炭酸ガス系、酢酸系、および酢酸/水素系のメタン生成反応の反応式と生成自由エネルギーは次式のようにになる²⁴⁾。

表 1 メタン生成菌とその性質^{18)~24)}

菌 名	起 源	基 質	至適温度	至適dH
<i>Methanobacterium arbohilicum</i>	湿った木	H ₂ /CO ₂	30-37℃	7.5-9.0
" <i>formicicum</i>	泥, 汚泥	H ₂ /CO ₂ , ギ酸	38-45	?
" <i>mobile</i>	ルーメン	H ₂ /CO ₂ , ギ酸	40-43	6.1-6.9
" <i>ruminantium</i>	ルーメン	H ₂ /CO ₂ , ギ酸	37	6.0-8.0
" <i>thermoautotrophicus</i>	汚 泥	H ₂ /CO ₂ , H ₂ /酢酸	65-70	7.0-7.6
" strain AZ	汚 泥	H ₂ /CO ₂ ,	33-40	6.8-7.2
" strain MOH	<i>Methanobacillus omelianskii</i>	H ₂ /CO ₂	40 ?	7.0 ?
<i>Methanococcus vannielii</i>	泥	H ₂ /CO ₂ , ギ酸	30-40	8.0
<i>Methanosarcina barkeri</i>	泥, 汚泥	H ₂ /CO ₂ , H ₂ /酢酸, メタノール	30 ?	7.0
" strain 227	汚 泥	H ₂ /CO ₂ , 酢酸, メタノール	35 ?	7.0 ?
<i>Methanospirillum hungatii</i>	汚 泥	H ₂ /CO ₂ , ギ酸	35	7.0

$$\Delta G^\circ = -32.3 \text{ kcal/mole (pH7)}$$

$$\Delta G^\circ = -6.71 \text{ kcal/mole (pH7)}$$

$$\Delta G^\circ = -39 \text{ kcal/mole (pH7)}$$

M. strain 227 が反応式②により小さなエネルギーを得ながらどのように ATP を生産し, 増殖しているのか, 今後の研究を待たねばならない。

このように種々のメタン生成菌の生理が明らかにされつつある一方, メタン生成菌と非メタン生成菌との共生関係も次第に明らかにされてきている。

Bryant¹⁹⁾ は 10 年以上前に始めてこの共生関係を純粋菌のレベルで明らかにした。彼らは, エタノールからメタンを生産する細菌と考えられていた *Methanobacterium omelianskii* が実はエタノールから水素を生産する細菌 *Methanobacterium strain MOH* と水素/炭酸ガスからメタンを生産する細菌 *S* 菌の混合体である事を示したのである。

その後, この *S* 菌の性質を調べるために, *S* 菌と *Methanobacterium ruminantium* との共生関係も調べられた²⁰⁾ が, *S* 菌は *M. ruminantium* の存在または非存在下にエタノール, *n*-プロパノール, *n*-ブタノール, イソブタノール, *n*-ペンタノール, アセトアルデヒド, オキザロ酢酸, ビルビン酸を利用するが, 水素存在下ではこれらのものを利用して生育できない事が示された。すなわちメタン生成菌 *MOH* 株や *M. ruminantium* は *S* 菌が生産する水素を消費する事により, 結果的に *S* 菌の生育を促すという共生関係を有している事がわかったのである。

Scheifinger²⁷⁾ は嫌気性菌 *Selenomonas rumina-*

nium を *M. ruminantium* や *MOH* 株と混合培養する事により, *S. ruminantium* の水素生産量が 60~90 倍増大する事を示した。また, 気相を炭酸ガス 100 % で培養した場合, *S. ruminantium* 単独では, 乳酸やグリセリンから水素は生成しないが, *M. ruminantium* や *MOH* 株との混合培養では水素を生成する事を示した。

Weimer と Zeikus は²⁸⁾ 高温性のメタン生成菌 *M. thermoautotrophicum* と高温性のセルロース分解菌 *Clostridium thermocellum* を用いて, 60℃ でセルロースでの生育を調べ, 両者の混合培養は生育とセルロース分解の開始の誘導期を短くする事, 水素および酢酸の生産を増やし, エタノール生産を減らす事を示した。

Bryant らは²⁹⁾ 下水汚泥の嫌気性消化槽よりエタノール/炭酸ガス系で集積培養を行い, *Desulfovibrio vulgaris* と思われる硫酸還元菌と, *Methanobacterium formicicum* に似たメタン生成菌を分離し, その硫酸還元菌は, このメタン生成菌と混合培養すると, エタノールや乳酸を利用して生育し, 水素を生産する事を示した。*D. vulgaris* の典型株や *Desulfovibrio desulfuricans* もメタン生成菌らの混合培養で, 同様の結果を得ている。*Desulfovibrio* と *MOH* 株をエタノール, 乳酸またはビルビン酸で生育させる場合, 硫酸イオンの添加に比例してメタンの生成は減少した。

Lathan と Wolin は³⁰⁾ メタン生成菌 *M. ruminantium* とセルロース分解菌 *Ruminococcus flavefaciens* を用いてセルロースの発酵を調べ, *R. flavefaciens* の単独培養に比べて混合培養では, 酢酸が主生産物になり, コハク酸およびギ酸が減少し, 水素が生成するかわりにメタンが生成する事を示した。

Chen と Wolin は³¹⁾ *S. ruminantium* を *M. ruminantium* がすでに生育している培養液にくり返し移植する事によって、*S. ruminantium* によるグルコースや乳酸からの水素生成が増大する事を示した。*S. ruminantium* 単独ではグルコースからの主生産物は乳酸であるが、メタン生成菌との混合培養では乳酸の生成が減り酢酸の生成が増加した。乳酸を基質とした場合には *S. ruminantium* 単独ではプロピオン酸、酢酸、および炭酸ガスを生産するが、メタン生成菌との混合培養ではプロピオン酸生産が減り、酢酸生産が増加した。彼らの結果を *S. ruminantium* によるグルコースおよび乳酸代謝系のメタン生成菌の共存による変化ということとまとめると図2のようになる。実線がメタン生成菌の共存により強められた流れである。

図2 *Selenomonas ruminantium* によるグルコースおよび乳酸の代謝³¹⁾

Ward らは³²⁾ 酢酸および無機塩を含む培地で2年間集積培養を行った培養系から、栄養要求の高い非メタン生成菌を分離し、この菌がアミノ酸、ペプチド、プリン塩基、ビタミン B₁₂、および他のビタミン類を要求し、グルコース、マニトール、デンプン、ピルビン酸、シスチン、リジン、ロイシン、イソロイシン、アルギニン、およびアスパラギンが生育と水素生産を促進した。酢酸はこの菌に取り込まれも代謝もされなかった。酢酸はこの系では唯一の炭素源であるから、メタン生成菌がこの菌のための基質や生育因子を生産しているものと推定された。

以上のように種々の有機物のメタン発酵が行われている混合培養系から菌を純粋に分離する事により、メタン生成菌と非メタン生成菌との、基質や生育因子や代謝系の点での共生関係が次々と明らかにされてきている。

3. メタン発酵菌の利用

メタン発酵法は嫌気性消化法とも呼ばれ、従来から下水汚泥処理、畜産廃水処理、産業廃水処理などに利用され、技術的改良も加えられて来たが、最近メタン発酵の原料も広く検討され始めており、特に米国においては、非常に活発に研究が行われている。

ロサンジェルスなどでは20年以上前から都市ゴミの

メタン発酵が行われているという³³⁾。わが国でも、通産省工業技術院の「資源再生利用技術システムの研究開発」（昭和48年～54年）の一環として都市ゴミから仕分けされた厨芥類のメタン発酵が検討されている³⁴⁾。

また、わが国においては三次処理（活性汚泥処理の次に行う高次処理）は、まだまだ普及していないが、米国では広大なラグーンに二次処理水を導いて、SS（浮遊物質）や残存 BOD を高度に除去する方法が一般にとられているそうである³⁵⁾。このラグーンで増殖する藻類が沈殿し、嫌氣的分解が起こると、水質の悪化をひき起こすことから、藻類を濃縮分離し、メタン発酵の原料とすることが検討されたのは20年以上前のことである³⁶⁾。

Golueke と Oswald は³⁶⁾³⁷⁾ これを一步進めて、太陽エネルギーで藻類を培養し、これをメタン発酵の原料として燃料を生産するシステムを検討した。

また、NASA では³⁸⁾ ホテイアオイ（ウォーターヒヤシンス、*Eichhornia crassipes*）やアオウキクサ（ダクウィード、*Lemna* または *Spirodela*）をラグーンで栽培すると、これらの植物がラグーン中の栄養塩を吸収したり、日光をささぎることにより、藻類の増殖を抑制し、増殖変動による水質悪化を防ぐことができるという。また、それらの水生植物のメタン発酵も検討されているそうである。ただし、ホテイアオイは温帯では冬期枯れてしまうのが問題である。NASA ではこのように、廃水処理システムと組み合わせた太陽エネルギーの燃料化を検討しているだけではなく、以前、家畜の飼料として日本から持ち込まれ雑草化したクズ（*Pueraria*）のメタン発酵も検討していると報道された³⁹⁾。また、米国では海藻（ジャイアントケルプ、*Macrocystis pyrifera*）のメタン発酵も検討されているという⁴⁰⁾⁴¹⁾。

廃水や廃棄物を原料とするにしろ、栽培植物を原料とするにしろ、メタン発酵を実際に行う場合の一つの重要な問題は温度管理である。メタン発酵は30～40℃の中温域または50～60℃の高温域をはずれると発酵速度が非常に遅くなるので、どちらかの範囲内に槽内温度を維持しなければならない。このため、従来、し尿処理や産業廃水処理用のメタン発酵槽はスチームにより加温されている。このスチームの発生に生成メタンが燃料として使われるが、そのエネルギー収支は、気温、原料の種類、量、温度、負荷条件、発酵槽の形状、規模などに依存する。園田の試算によれば⁴⁰⁾ 豚ふんを原料とした場合、冬期、気温を10℃、原料の温度10℃とし、37℃の中温発酵を行うとすれば、約50頭の規模

- J. Bacteriol.*, **109**, 539 (1972)
- 27) C.C. Scheifinger, B. Linehan, M. J. Wolin, *Appl. Microbiol.*, **29**, 480 (1975)
- 28) P. J. Weimer, J. G. Zeikus, *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 289 (1977)
- 29) M. P. Bryant, L. L. Campbell, C. A. Reddy, M. R. Crabill, *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 289 (1977)
- 29) M. P. Bryant, L. L. Campbell, C. A. Reddy, M. R. Crabill, *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 1162 (1977)
- 30) M. J. Lathan, M. J. Wolin, *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**, 297 (1977)
- 31) M. Chen, M. J. Wolin, *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**, 756 (1977)
- 32) D. M. Ward, R. A. Mah, I. R. Kaplan, *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**, 1185 (1978)
- 33) 西出, 工業技術, **20**, 84 (1979)
- 34) 高松, 工業技術, **20**, 44 (1979)
- 35) C. G. Golueke, W. J. Oswald, H. B. Gotaas, *Appl. Microbiol.*, **5**, 47 (1957)
- 36) C. G. Golueke, W. J. Oswald, *Adv. Appl. Microbiol.*, **7**, 219 (1959)
- 37) W. J. Oswald, C. G. Golueke, *Adv. Appl. Microbiol.*, **2**, 223 (1960)
- 38) B. C. Wolverton, R. C. McDonald, *J. WPCF*, **51**, 305 (1979)
- 39) 朝日新聞(夕刊) 12月7日 (1979)
- 40) 徳山, “未来産業技術”, VOL. II, 科学技術広報財団, p. 836 (1979)
- 41) 山崎, 工業技術, **20**, 41 (1979)
- 42) 園田, 産業公害, **15**, 1006 (1979)
- 43) 上原, 吉野, 新田, クリーンジャパン, **18**, 28 (1979)

Methane Production by Microorganisms

Kazuhiro TANAKA

(Fermentation Research Institute. Agency of Industrial Science & Technology)

SYNOPSIS :—Methane fermentation can be utilized as a fuel gas producing process from solar energy because plant-body can become the raw material for methane fermentation. The bacteria which cause methane fermentation can be grouped into methanogenic bacteria which produce methane and non-methanogenic bacteria which produce substrates for methanogenic bacteria. The substrates for methanogenic bacteria are hydrogen and carbon dioxide, acetate, formate, and methanol. Acetate is utilized only in the presence of hydrogen by some species of bacteria, and is utilized even in the absence of hydrogen by other species. The existence of bacteria which produce methane from propionate or n-butyrate is doubted. Some examples of symbiotic relation between methanogenic and non-methanogenic bacteria are known. Methane fermentation of algae, water hyacinth, arrowroot, giant kelp etc. has been studied in U.S.A. In Japan methane fermentation of urban wastes has been studied. Now we are needed to carried out not only macroscopic studies on a total system of waste water treatment processes, [wastes treatment processes, and solar energy-utilizing processes but also microscopic studies on the phenomenon of methane fermentation itself.