

家畜糞尿の嫌気性消化によるメタンガス生成効率の安定化に向けた メタボローム解析

Metabolomic Analysis for Stabilization of Methane Gas Production Efficiency by Anaerobic Digestion of Livestock Manure

代表研究者 北海道大学 大学院工学研究院 助教 中屋 佑紀

共同研究者 北海道大学 大学院工学研究院 教授 佐藤 久

In order to follow up the gas production efficiency and the metabolites in the digester at high frequency when methane gas is produced by anaerobic digestion of cattle manure in a biogas plant, the following were examined during the period of this research grant: Pretreatment of samples, storage, and analysis conditions for metabolome analysis by using $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy. With the future high-frequency water sampling and analysis in view, the following were examined. Samples frozen at several stages of the pretreatment and resumed after thawing were analyzed and compared. As a result, it was found that even if the samples were frozen immediately after the water sampling in the biogas plant, the same NMR spectra as those obtained when the samples were analyzed immediately after the water sampling could be obtained. As a result of the analysis of the NMR spectra, it was found that aromatic and aliphatic metabolites originally contained in the manure decreased by anaerobic treatment of cattle manure in the biogas plant.

研究の背景と目的

メタボロミクスとは、あるサンプル内のメタボローム（代謝混合物）を一斉に検出し複数の成分の変化を観測する研究の総称であり、農業分野では農産物や食品の多様な成分を検出し品質ごとに分類するなど、活用が進められている [1]。また、医学分野では特定の病気の診断に糞内の代謝物のメタボロミクスを活用することを目指した研究が進められている [2]。本研究は、NMR法とデータベースとの照合により糞便・食品などに含まれる様々な成分を同時に検出しサンプルの特徴づけや分類に活用するメタボロミクス研究に着想を得て、ウシ糞尿を処理するバイオガスプラント内代謝物のNMR分析およびメタボロミクス解析に取り組むことにした。

嫌気性処理によるメタン発酵は、微生物による代謝が複数の段階に渡っており様々な代謝生成物が様々な代謝過程を互いに阻害・促進しあっているため処理効率の維持が難しい [3]。本研究では、バイオガスプラントでのウシ糞尿の嫌気性消化処理によりメタンガスを生成する際のガス生成効率と消化槽内代謝物を高頻度で追跡する。具体的には、消化槽内のメタボロームのNMR分析により代謝物量のバランスの変化を観測し、ガス生成効率の低下に相関する成分や、その予兆となる成分を特定することを目的とする。さらに、特定の代謝成分の変動やガス生成効率に関与する消化槽の運転パラメータを検討し、ガス生成効率の維持や突発的な効率低下の対策、さらには高効率化の手法を実装

する。

本研究の助成期間では、試料の前処理・保存・分析条件の検討を行った。液体でのプロトン（水素原子核）NMR（核磁気共鳴）分光測定（ $^1\text{H-NMR}$ ）では、懸濁物の混入を避ける必要がある。また、有機物濃度が薄すぎると十分なS/N比を得られない。そこで、懸濁物を遠心分離により除去しつつ、できるだけ試料の液相を希釈しない前処理方法を検討した。また、今後の高頻度採水と分析を視野に入れて、前処理をどの段階まで進めてから冷凍すれば試料の元の状態を損なわないのかを検討した。すなわち、前処理のいくつかの段階で冷凍保存し、解凍後に作業を再開した試料を分析し比較した。

方法

2022年12月15日に、北海道大学北方生物圏フィールド科学センターのバイオガスプラントの消化液およびプラント投入前のウシ糞尿（加水）を採取した。それぞれを消化後試料、消化前試料と呼ぶことにする。前処理として、それぞれ50 mlを遠心チューブにとり、22260×gで5分間遠心した。その上澄み20 mlを再遠心し、その上澄みを得た。これを精製水で10倍希釈し、そのうち1 mlを20600×gで1分間遠心した。この上澄み0.54 mlにNMR測定用の内部標準を含むバッファー 0.06 mlと混合し、20600×gで1分間遠心した上澄み0.55mlをNMR管に封入した。これにより、NMR測定に供する試料

溶液内のバッファー成分の最終濃度は NaH_2PO_4 が50 mM、3-(Trimethylsilyl)propionic acid-d 4 sodium salt (TSP) が0.5 mM、 NaN_3 が0.004%、 D_2O が10%となった。

NMR測定条件は、先行研究 [4]に基づき以下のように設定した。測定には、Bruker 600MHz Avance IIIを用いた。zgprパルスシーケンスを用いて水の信号を抑制した。データ取り込み時間は3.4秒、緩和待ち時間は2.27秒、観測幅は12 ppm、積算回数は128回、温度は298 Kとした。その後、Delta NMRソフトウェア (Jeol) を用いてフーリエ変換、位相補正、ベースライン補正を行った。得られたスペクトルからnmr suit 9.0 (Chenomx) を用いて、いくつかの代謝物の同定を行った後、バッファーによる90%希釈を考慮し、濃度を求めた。

結果と考察

バイオガスプラントでの採水直後に試料の前処理を行って速やかにNMR測定を行った場合(A)と、その前処理時にNMR管封入前の試料の一部を冷凍保存し1週間後に解凍しNMR測定を行った場合(B)と、採水直後に試料を冷凍し1週間後に解凍し速やかに前処理とNMR測定を行った場合(C)のNMRスペクトルを比較した。それぞれのNMRスペクトルは互いに類似していた。このことから、高頻度に採水する場合も(C)のように逐次採水直後に試料を冷凍保存し、NMR測定を行う日にまとめて解凍と前処理を行っても問題ないと考えられた。本報告では(C)の場合のNMRスペクトルについて解析した。

図1に消化前・消化後試料の ^1H -NMRスペクトルを示す。これにより、ウシ糞尿をバイオガスプラント内で嫌気処理することにより、糞尿にもともと含まれていた芳香族・脂肪族の代謝物が減少することが確認された。Chenomxにより、データベースにある代謝物ごとのスペクトル成分が試料のスペク

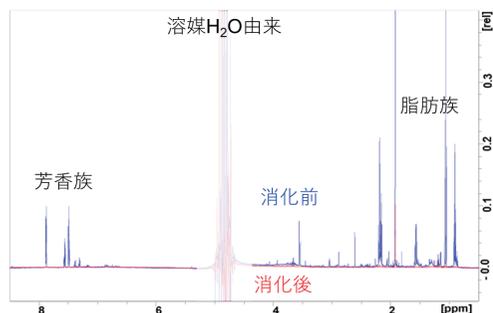


図1. 消化前・消化後試料の ^1H -NMRスペクトルの比較

トルに重なるようにフィッティングし、その寄与度から濃度を定量した。検出された代表的な代謝物の濃度を表1に示す。嫌気処理により有機酸や芳香族の一部の濃度は1~2オーダー程度減少することが分かった。

表1. Chenomxにより同定・定量された代表的な代謝物の濃度

代謝物	反応前 (mM)	反応後 (mM)
酢酸	77.7	1.17
安息香酸	8.93	0.081
酪酸	6.90	0.037
ギ酸	0.151	0.019
フェニル酢酸	1.45	0.029
プロピオン酸	15.1	0.173

今後の展望

本研究を通して検討した試料の前処理・保存条件を利用して、バイオガスプラントへの糞尿の投入が行われる冬期を中心に高頻度な採水を行うことができるようになった。しかし、バイオガスプラントからのガスの取り出しは間欠運転となっているため、プラント内代謝物の増減とガス生成の増減を対比することが難しいことが分かった。そこで、実際のバイオガスプラント内汚泥を種汚泥としたバッチ実験を検討する。一方で、NMRスペクトルから定量できた代謝物成分の多くは高速液体クロマトグラフ法でも分析できる成分が多く、手法としての新規性をまだ活かすことができていない。NMRスペクトルでは、各成分を同定することなく多変量解析に供する先行例がある [2]。今後、バッチ試験でのガス生成量とNMRスペクトルを多変量解析し、ガス生成量と相関する成分を見出す。

謝辞

本研究は、岩谷直治記念財団の助成を受けて行われました。深く感謝申し上げます。NMR測定に関して多大なご助言ご協力をいただいた、北海道大学・大学院生命科学院の相沢智康教授、大西裕季博士、同・理学研究院の熊木康裕博士に深く感謝の意を表します。プラントデータや参考資料を提供いただいた、北海道大学・ロバスト農林水産工学国際連携研究教育拠点関係者の皆様、並びにサンプル採集にご協力いただいた、同・北方生物圏フィールド科学センター生物生産研究農場酪農生産研究施設の川畑昭洋氏、平克郎氏、八巻憲和氏に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- [1] 関山恭代, 池田成志, 浅野賢治, 岡崎和之 (2020)NMRによる農業メタボロミクスの活用と展望—農業現場と分析現場のスムーズな連携に向けて—. 日本土壤肥科学雑誌 91 (4), 272-279.
- [2] Komatsu, Y., Shimizu, Y., Yamano, M., Kikuchi, M., Nakamura, K., Ayabe, T., Aizawa, T. (2020)Disease Progression-Associated Alterations in Fecal Metabolites in SAMPl/YitFc Mice, a Crohn's Disease Model. *Metabolomics* 16, 48.
- [3] 前田憲成 (2016)下水汚泥のメタン発酵向上化のための細菌間相互作用の解明. 環境バイオテクノロジー学会誌 16 (1), 17-21.
- [4] Kuroda, K., Narihiro, T., Nakaya, Y., Noguchi, T. Q. P., Maeda, R., Nobu, M. K., Ohnishi, Y., Kumaki, Y., Aizawa, T., Satoh, H. (2022) Elucidation of the biodegradation pathways of bis (2-hydroxyethyl) terephthalate and dimethyl terephthalate under anaerobic conditions revealed by enrichment culture and microbiome analysis. *Chemical Engineering Journal* 450 (1), 137916.