

戦略的創造研究推進事業(ALCA)  
技術領域(プロジェクト名)「生物資源の制御による  
バイオマス・有用成分の増産」

課題名「気相微生物反応を用いる革新的バイオプ  
ロセスによるメタン/メタノール変換」

## 終了報告書

研究開発期間 平成 26年 10月～令和 2年 3月

研究開発代表者:堀 克敏  
(名古屋大学 大学院工学研究科、教  
授)

## ○報告書要約 (和文)

研究開発代表研究者 :名古屋大学 教授 堀 克敏

研究開発課題名 :気相微生物反応を用いる革新的バイオプロセスによるメタン/  
メタノール変換

### 1.研究開発の目的

本研究では、「低質メタンをメタノールへとワンパス変換する高速気相バイオプロセス」の構築を目的とした。ここで低質メタンとは硫化水素など不純物を含んでおり、そのままでは燃料や発電には使えず、脱硫などの前処理が必要なものをいう。メタン酸化細菌を用いれば、低質メタンを前処理なしでメタノールへと直接変換できる。日本では年間 100 万トン (メタンの温暖化係数は CO<sub>2</sub> の 25 倍) も大気中に放散されている。さらに、日本で発生する有機性廃棄物の全てを微生物によるメタン発酵で処理するという仮定を置けば、低質メタンの潜在量は 1000 万トンを超え、天然ガスの国内生産量と輸入量の合計の約 1/9 になる。大気放散分と潜在量を合わせると CO<sub>2</sub> 換算で 4420 万トンの温室効果ガスの低減を見込める。しかし、従来のバイオ法によるメタン/メタノール変換は、速度が遅い、脆弱で安定性が悪い、水中反応であるため疎水性基質との接触効率が悪いという致命的な問題がある。これらの欠点を解決するゲームチェンジングテクノロジーとして新たに提案した「気相微生物反応プロセス」の構築を目指し、研究に取り組んだ。

### 2.研究開発の概要

(1)内容:

本研究では、微生物固定化と気相バイオリアクターの設計・作製(名大グループ)、メタノールデヒドロゲナーゼスイッチング株の分子育種とメタノール生産(東工大グループ)、還元状態モニタリングシステムの開発(阪大グループ)にそれぞれ取り組んだ。これらの研究成果を統合して、「プロトタイプ気相バイオリアクターを用いたメタン酸化細菌変異株によるメタン/メタノール変換と菌体内還元力モニタリング」を実現し、研究開発目標を達成した。

(2)成果:

気相バイオリアクターのプロトタイプを設計・構築し、気相メタンから液体メタノールへの直接変換を実施した。メタノールを生産するメタン酸化細菌の変異株を 70 g-DCW/L-support で固定化し、最大メタン消費速度 0.50 m<sup>3</sup>-CH<sub>4</sub>/m<sup>3</sup>-gas phase/h と最大メタノール生成速度 11.2 μmol/h を達成した。加えて、連続一週間以上、菌体内還元力をモニタリングしながらの運用を達成した。このバイオリアクターを用いたメタン/メタノール変換における各グループの成果を以下に列記する。

- 気相バイオリアクターのプロトタイプを設計・構築した。(名大)
- メタン酸化細菌の高濃度固定化法を開発し、気相微生物反応による高速メタン分解を実現した。(名大)
- メタノールデヒドロゲナーゼ(MDH)の発現を制御可能なメタン酸化細菌の変異株を構築した。これにより、MDH の発現抑制によるメタノール生産と、MDH の発現回復による菌体生育のスイッチを達成した。(東工大)
- 細胞内 NADH/NAD<sup>+</sup>比を検出できる蛍光タンパク質プローブをメタン酸化細菌に導入することで、細胞内レドックス状態の変動を可視化することに成功した。(阪大)
- メタン酸化細菌が分泌する電子伝達物質を利用することで、遺伝子操作を用いず液相中で菌体内の還元力をモニタリングするシステムの開発と実測に成功した。(阪大)

(3)今後の展開:

気相バイオリアクターを段階的に実用サイズまでスケールアップする。また、工場の排水処理から発生する低質メタンでの運用が可能かテストする。これらの検証を行った後、改良した気相バイオリアクターを排水処理工程に連結させて実地試験を行う。

## ○Report summary (English)

Principal investigator: Nagoya University Professor Katsutoshi Hori

R & D title: “Methane/Methanol Conversion by an Innovative Bioprocess with Microbial Gas-phase Reaction”

### 1. Purpose of R & D

This study aimed to develop “gas-phase bioprocess for a rapid one-pass conversion of low-quality methane to methanol”. Here, low-quality methane means impure methane that cannot be used for fuel or power generation without preprocessing such as desulfurization. By using methane-oxidizing bacteria, low-quality methane can be converted to methanol without the preprocessing. In Japan, 1 million tons of methane, which has a global warming potential of 25-CO<sub>2</sub>-equivalents, is released into the atmosphere every year. Besides, if we assume that all organic wastes generated in Japan will be treated by methane fermentation, the potential for low-quality methane would exceed 10 million tons, which is equivalent to 1/9th of equivalent of the sum of domestic production and imports of natural gas. When the amounts of atmospheric emission and potential of low-quality methane are added together, we can expect to reduce greenhouse gas emissions by 44.2 million tons of CO<sub>2</sub> equivalent. However, there are a number of bottlenecks in conventional bio-based methane/methanol conversions, for example, slow reaction rate, fragility, unitability, and low mass transfer of gaseous substrate due to their low water-solubility. Here we proposed a new game-changing technology “Microbial gas-phase reaction” and have conducted research in order to overcome these bottlenecks

### 2. Outline of R & D

#### (1) Contents:

A prototype of the bioreactor for microbial gas-phase reaction was designed and constructed. Using this reactor, we performed the direct conversion of gaseous methane to liquid methanol. When the mutant cells capable of producing methanol was immobilized with 70 g-DCW/L-support, the maximum methane consumption rate of 0.50 m<sup>3</sup>-CH<sub>4</sub>/m<sup>3</sup>-gas phase/h and the maximum methanol production rate of 11.2 μmol/h were achieved. In addition, the bioreactor was continuously operated for more than one week while monitoring the intracellular reducing power. The achievements of each group are listed below.

#### (2) Achievements:

- A prototype of the bioreactor for microbial gas-phase reaction was designed and constructed (NU).
- A method to immobilize the large cell amount of methane oxidizing bacteria was developed and the rapid methane degradation by microbial gas-phase reaction was realized. (NU)
- Mutants of methane oxidizing bacteria, which are capable of regulating the expression of methanol dehydrogenase (MDH), were constructed. By regulating the expression of MDH, methanol production and the restore of a reducing power were successfully switched. (TITEC)
- The intracellular NADH/NAD<sup>+</sup> ratio of methane oxidizing bacteria was successfully visualized by a genetically encoded fluorescence probe. (OU)
- A system for real-time monitoring of intracellular redox state of methane oxidizing bacteria was successfully developed using an electron mediator secreted from them. (OU)

#### (3) Future developments:

The bioreactor for microbial gas-phase reaction will be scaled up to a practical size in stages. In addition, we will investigate whether the bioreactor can be used with low-quality methane, which is generated from wastewater treatment at a factory. After these investigations, the modified gas-phase bioreactor will be connected to a wastewater treatment process for an on-site investigation.