

令和元年6月11日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00654

研究課題名(和文) 焼却灰循環利用型バイオ燃料生産技術の開発

研究課題名(英文) Development of biofuel production technology by recycling of incineration ash

研究代表者

横井 春比古 (YOKOI, Haruhiko)

宮崎大学・工学部・教授

研究者番号：00253815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、鶏糞焼却灰を原料に用いて、クロレラを培養するための培地に焼却灰を利用する方法を開発した。

また、焼却灰培地に添加する窒素源と有機性炭素源のクロレラの脂質生産に及ぼす影響について検討を行い、脂質生産に最適な焼却灰培地の組成を明らかにした。

さらに、脂質を抽出した後のクロレラの藻体残渣を水素発酵の培地成分として利用し、藻体残渣を用いて水素を生産するための最適な培地条件及び発酵条件を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、有効利用が求められている焼却灰を原料に用いて、微細藻類のクロレラを培養できる焼却灰培地を開発し、焼却灰培地でクロレラを培養して脂質(油分)を生産すると共に、脂質抽出後の藻体残渣を水素発酵菌の培地成分に用いて水素を生産する方法を開発した。

これまでに鶏糞焼却灰をクロレラ等の微細藻類の培地に利用し、さらに培養で得られた藻体を用いて脂質と水素を生産する研究報告例はない。本研究での基礎的な研究成果を基にさらに研究開発を進めることにより、廃棄物の焼却灰を循環利用して再生可能なバイオマスエネルギーへ再資源化する新規なバイオ燃料生産技術の実現が可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)： In this study, we developed a method for utilizing incineration ash as a medium for cultivating *Chlorella*, using chicken manure incineration ash as a raw material.

We studied the effects of nitrogen source and organic carbon source added to the incineration ash medium on lipid production by *Chlorella*; the composition of the incineration ash medium optimum for lipid production was also analyzed.

Furthermore, we used the algal body residue of *Chlorella* after lipid extraction as a medium component of hydrogen fermentation. The optimal medium and fermentation conditions for hydrogen production using the algal residue were also identified.

研究分野：環境生物学

キーワード：焼却灰 培地 バイオ燃料 水素 脂質

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

地球環境問題やエネルギー不足への対策として、再生可能エネルギーの一つであるバイオマスエネルギーが期待されている。バイオマスエネルギーの生産において、近年、クロレラ等の微細藻類を培養して光合成反応により CO<sub>2</sub> を固定化し、培養で得られた藻体から脂質（油分）を抽出して生産する技術が注目されている<sup>1)</sup>。

クロレラの一つである *Chlorella vulgaris* は、食品、飼料、環境及び農業等の分野で利用され、培養条件により細胞内に脂質を多く蓄積することから、脂質生産においても重要な微細藻類である<sup>2)</sup>。*C. vulgaris* を用いて脂質を実用的に生産するためには、いくつか課題がある。通常、*C. vulgaris* の培養は、N、P、K、Na、Mg、Ca、S 等の各種元素及び Fe、Mn、Zn、Cu、Mo 等の微量金属の無機栄養塩を溶かした液体培地に CO<sub>2</sub> を含有するガスを通気しながら光照射下で行われる。液体培地の調製には多種類の薬品類が必要でコスト高の要因となるため、脂質生産において安価な原料を用いる培地の開発が重要である。また、脂質生産コストの低減を図る上で、脂質を抽出した後の藻体残渣の有効利用も望まれる。

一方、各種産業廃棄物やゴミの焼却処分場及び火力発電所等では多量の焼却灰が発生する。焼却灰は、セメント原料、建材、路盤材及び土壌改良剤等に利用されているが、多くは埋立て処分されており、焼却灰の新しい有効利用法の検討が進められている<sup>3)</sup>。

ここで、焼却灰には各種元素が無機酸化物の状態が存在し、これらの無機物を原料に用いて微細藻類の培地を調製できれば安価に培地を供給でき、低コストで微細藻類の培養とバイオ燃料等の有用物質の生産が行えると思われる。本研究者はこれまでに、塩酸-硫酸-硝酸の混合酸に焼却灰を溶解した溶液に FeCl<sub>3</sub> 等の鉄塩を添加して調製した焼却灰培地は、*C. vulgaris* の培養に適することを見出している<sup>4)</sup>。しかし、焼却灰にはもともと鉄が酸化鉄として含まれているため、鉄塩を添加しなくても *C. vulgaris* を培養できる焼却灰培地の開発が必要である。

また、光照射下で CO<sub>2</sub> を通気しながら焼却灰培地で *C. vulgaris* を培養する場合、培地に有機性炭素源を添加すると生育と脂質生産が向上し、培地中の窒素源や有機性炭素源の組成を最適化すると効率的に脂質を生産できると推測される。

さらに、焼却灰培地で培養した *C. vulgaris* の藻体から脂質を抽出した後の藻体残渣には、タンパク質、糖類及び各種金属等が含まれていると思われる。これらの成分を脂質以外の他のバイオマスエネルギーを生産する微生物の培地に利用できれば、経済的なバイオ燃料生産が行えると期待される。

### 2. 研究の目的

本研究では、焼却灰を原料に用いて微細藻類クロレラの *C. vulgaris* を培養できる焼却灰培地を開発し、焼却灰培地での培養で得られる *C. vulgaris* の藻体から脂質を抽出して生産すると共に、脂質抽出後の藻体残渣を原料に用いて微生物で水素を生産する新規なバイオ燃料生産技術の開発を目的として3年間で研究を行った。

初年度は、これまでに開発してきた焼却灰培地の調製法とは異なり、鉄塩を添加しなくても *C. vulgaris* を良好に培養できる新規な鉄無添加焼却灰培地の調製法を開発することを目的とした。

2年目は、鉄無添加焼却灰培地に添加する窒素源と有機性炭素源について検討し、鉄無添加焼却灰培地で *C. vulgaris* の藻体と脂質を生産する上での最適な培地条件を明らかにすることを目的とした。

最終年度は、鉄無添加焼却灰培地での培養で得られた *C. vulgaris* の藻体から脂質を抽出した後の藻体残渣を培地の原料に用いて、水素発酵菌で水素を生産する方法を開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 焼却灰溶解液の調製

本研究の実験では、焼却灰として、宮崎県内の鶏糞焼却施設から入手した鶏糞焼却灰を使用した。0.1mol/L の塩酸に焼却灰を添加して室温下で攪拌しながら溶解させ、さらに焼却灰懸濁液の pH の経時変化を測定した。焼却灰の溶解後、焼却灰懸濁液を遠心分離して得られる上澄み液を焼却灰溶解液として用いた。

焼却灰溶解液に含まれる各種元素の測定は、高周波プラズマ発光分光分析装置（島津製作所；ICPS-8100）を用いて行った。

#### (2) 鉄無添加焼却灰培地でのクロレラの培養

鉄無添加焼却灰培地でのクロレラの培養には、研究室で保有する *C. vulgaris* MKJ-34 を使用した。蒸留水で10倍に希釈した焼却灰溶解液に窒素源と有機性炭素源を添加して鉄無添加焼却灰培地を調製した。300mL 三角フラスコに280mL の鉄無添加焼却灰培地と *C. vulgaris* の前培養液20mL を添加し、光強度 100 μmol/m<sup>2</sup>・s、12時間明-12時間暗の蛍光灯照射下で、5%の CO<sub>2</sub> を含有する空気を 150mL/min の流量で通気しながら 30°C で培養を行った。比較対象として、微細藻類の培養に用いられる MBM 培地 (KNO<sub>3</sub> 250mg/L、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 75mg/L、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 75mg/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 175mg/L、NaCl 25mg/L、CaCl<sub>2</sub>・2H<sub>2</sub>O 10mg/L、NaHCO<sub>3</sub> 500mg/L、FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 2mg/L、H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2.86mg/L、MnSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 2.5mg/L、ZnSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.222mg/L、CuSO<sub>4</sub>・5H<sub>2</sub>O 0.079mg/L、Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 0.021mg/L；pH6.0) でも同様な方法で *C. vulgaris* の通気培養を行った。

培養開始後、24時間おきに培養液の濁度を測定して *C. vulgaris* の生育経過を調べた。また、培養終了後、培養液を遠心分離して得られる藻体を凍結乾燥し、重量を測定して乾燥藻体重量を求めた。

凍結乾燥した藻体を乳鉢で粉碎後、クロロホルム-メタノール混液 (2:1, v/v) を用いて、室温下で攪拌しながら脂質を抽出した。抽出後、遠心分離して得られる上澄み液中の溶媒をエバポレーターで除去し、残存する脂質の重量を測定して細胞内の脂質含有量を求めた。また、遠心分離後の沈殿物を凍結乾燥して脂質抽出後の藻体残渣を得た。

脂質抽出前後の藻体の C、H 及び N の含有率は元素分析装置 (Perkin Elmer ; Series II CHNS/O Analyzer 2400)、デンプン含有量は F-キットスターチ (J. K. インターナショナル) で測定した。

### (3) クロレラの藻体残渣を利用する水素生産

脂質抽出後の *C. vulgaris* の藻体残渣 5g/L、グルコース 2g/L、還元剤の L-システイン塩酸塩 1g/L 及び酸素指示薬のレザズリン 0.001g/L を培地成分として含有する培地 10mL と水素発酵菌 *Clostridium beijerinckii* NBRC103909 の前培養 0.2mL を試験管に入れ、ガスホルダーに接続した。気相部をアルゴンガスで置換後、スターラーで攪拌しながら 37°C の嫌気条件下で水素発酵を行った。発生したガスをガスホルダーに捕集して計量するとともに、培養終了後に発生ガス中の水素濃度をガスクロマトグラフ (島津製作所 ; GC-8AIT) で分析した。

## 4. 研究成果

### (1) 鉄無添加焼却灰培地の調製法

鉄塩を添加する必要のない焼却灰培地の調製法を明らかにするために、焼却灰を溶解する酸に塩酸を用いて、鉄分を含有する焼却灰溶解液の調製条件について検討を行った。0.1mol/L の塩酸 50mL に 0.2g から 0.7g の焼却灰を添加して溶解させ、遠心分離後の焼却灰溶解液中の各種元素の濃度を測定した。K、Mg 及び Na は焼却灰の添加量が多いほど焼却灰溶解液中の濃度が高くなるのに対し、Ca は添加量が 0.3g の時に焼却灰溶解液中の濃度が最も高く、それ以外の添加量では濃度は余り変わらなかった。Al、Cu、Fe 及び P は焼却灰の添加量が多いほど焼却灰溶解液中の濃度は低くなり、Al、Cu 及び P では 0.4g 以上、Fe では 0.3g 以上の焼却灰を添加すると、焼却灰溶解液中にはほとんど含まれていなかった。焼却灰溶解液の pH を測定すると、焼却灰の溶解と共に pH 値が上昇し、0.2g の焼却灰を添加した後の溶解液の pH は約 1.8 であり、0.3g 以上の添加量では pH は 3.8 以上の値であった。焼却灰の添加量が多いと塩酸に溶解した Fe が pH 値の上昇と共に不溶性の化合物を形成するため、焼却灰溶解液中に Fe がほとんど存在しなくなると推測された。

従って、溶解液中の Fe や P 等の濃度の観点から、鉄分を含有する焼却灰溶解液の調製には、0.1mol/L の塩酸 50mL に 0.2g の焼却灰を添加する条件が好ましいことが分かった。

次に、鉄分を含有する焼却灰溶解液を *C. vulgaris* の培地に利用できるか検討した。10 倍に希釈した焼却灰溶解液に、窒素源として  $\text{KNO}_3$  を 250mg/L となるように添加して鉄無添加焼却灰培地 (pH6.0) を調製した。鉄無添加焼却灰培地と微細藻類の培養に用いられる MBM 培地 (pH6.0) を用いて *C. vulgaris* の通気培養を行い、両培地での生育度を比較した。その結果、両培地において *C. vulgaris* はほぼ同じ培養経過を示し、図 1 に示すように、培養終了後の鉄無添加焼却灰培地の藻体量と生育速度は、MBM 培地と比べて同等以上の値であった。また、細胞内の脂質含有率は、MBM 培地で約 23%、鉄無添加焼却灰培地で約 25% であり、鉄無添加焼却灰培地においても MBM 培地と同様に脂質を生成できることが分かった。

以上のことから、新規に開発した鉄無添加焼却灰培地は、*C. vulgaris* の培養と脂質の生産に利用できることが明らかとなった。

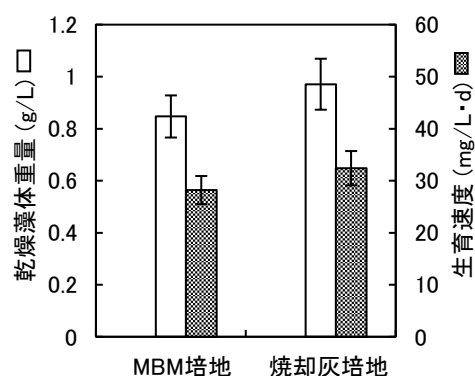


図 1 MBM 培地と鉄無添加焼却灰培地における *C. vulgaris* の生育特性

### (2) 鉄無添加焼却灰培地での脂質生産

焼却灰を塩酸に溶解して得られる焼却灰溶解液中には窒素がほとんど含まれていないため、鉄無添加焼却灰培地の調製には窒素源の添加が不可欠である。そこで、まず、鉄無添加焼却灰培地に添加する最適な窒素源について検討した。窒素源として  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{KNO}_3$  または尿素を 250mg/L の濃度となるように添加した鉄無添加焼却灰培地を用いて、*C. vulgaris* の通気培養を行った。その結果、 $\text{KNO}_3$  と尿素において良好に生育するが、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  と  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ではほとんど生育しなかった。また、藻体内の脂質含有率は尿素よりも  $\text{KNO}_3$  の方が高いことから、鉄無添加焼却灰培地での脂質生産には窒素源として  $\text{KNO}_3$  が適することが分かった。

さらに、鉄無添加焼却灰培地中の  $\text{KNO}_3$  の濃度の影響について検討したところ、 $\text{KNO}_3$  の添加濃

度が高いほど *C. vulgaris* の生育量は増加するが、脂質含有率は低下する傾向を示した。培養液当たりの脂質生産量は  $\text{KNO}_3$  の濃度が 500mg/L の時に最大値を示し、MBM 培地に比べて 1.5 倍以上の脂質生産量が得られた (図 2)。

次に、有機性炭素源としてグルコース、グリセリンまたは酢酸、窒素源として  $\text{KNO}_3$  を添加した鉄無添加焼却灰培地を用いて *C. vulgaris* の通気培養を行い、生育及び脂質生産に及ぼす影響について検討した。鉄無添加焼却灰培地にグルコースまたはグリセリンを添加すると、無添加の場合に比べて *C. vulgaris* の藻体量、脂質生産量及び脂質生産速度が増加した。特にグルコースを添加すると、生育速度と脂質生産速度が大幅に増大することが分かった。

さらに、*C. vulgaris* の脂質生産において、鉄無添加焼却灰培地に添加するグルコースと  $\text{KNO}_3$  の濃度の影響について検討した。グルコースと  $\text{KNO}_3$  の添加濃度が高いと藻体量は増加するが、グルコース濃度と  $\text{KNO}_3$  濃度が高いほど細胞内の脂質含有率はわずかに低下する傾向を示した。*C. vulgaris* の脂質生産における最適なグルコースと  $\text{KNO}_3$  の濃度を検討したところ、図 2 に示すように、10g/L のグルコースと 1g/L の  $\text{KNO}_3$  を添加した鉄無添加焼却灰培地において、最大の脂質生産量と脂質生産速度を得られることが明らかとなった。

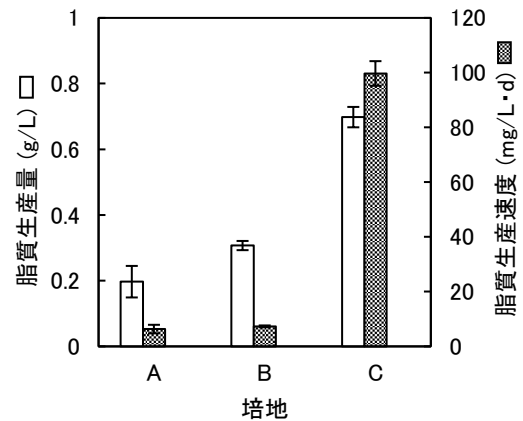


図 2 鉄無添加焼却灰培地における *C. vulgaris* の脂質生産特性

- A: MBM 培地
- B: 焼却灰培地( $\text{KNO}_3$  500mg/L)
- C: 焼却灰培地(グルコース 10g/L+ $\text{KNO}_3$  1g/L)

### (3) クロレラの藻体残渣を利用する水素生産

鉄無添加焼却灰培地で培養した *C. vulgaris* から脂質を抽出した後の藻体残渣には、細胞内のタンパク質、デンプン等の糖類及び各種の微量元素等が残存すると推測される。これらの成分を水素発酵菌の培地に利用できれば、藻体残渣を水素生産に有効活用できると思われる。

そこで、10g/L のグルコースと 1g/L の  $\text{KNO}_3$  を添加した脂質生産に最適な鉄無添加焼却灰培地を用いて *C. vulgaris* を培養し、まず、得られたクロレラ藻体の脂質抽出前後の C、H 及び N の元素分析を行った。脂質抽出前の藻体の C、H 及び N の含有率は各々 45.6%、7.8%及び 3.7%であり、脂質抽出後の藻体の C、H 及び N の含有率は各々 41.0%、6.9%及び 4.1%であった。脂質の抽出により C と H が減って相対的に N の含有率が増加し、脂質抽出後の藻体残渣にはタンパク質等の成分が残っていると推測された。また、脂質抽出前及び脂質抽出後のクロレラ藻体内には、デンプンが各々 25.1%及び 31.3%含まれていた。

次に、脂質抽出後の藻体残渣を培地成分に用いて、*C. beijerinckii* による水素発酵を行った。その結果、図 3 に示すように、還元剤の L-システイン塩酸塩と酸素指示薬のレザズリン以外に脂質抽出後の藻体残渣だけを 5g/L 添加した培地 (pH7.0) で水素発酵を行うと水素を生成し、藻体残渣だけでも水素を生産できることが分かった。水素が生成するのは、藻体残渣に含まれるタンパク質やデンプン等の各種の成分が *C. beijerinckii* の生育と水素生成に寄与するためと推測された。また、藻体残渣以外に 2g/L のグルコースを添加した培地 (pH7.0) では水素の生産量が増え、さらに 10 倍に希釈した焼却灰溶解液も添加した培地 (pH7.0) では水素生産量がわずかに増加した。しかし、*C. beijerinckii* の基本培地 (グルコース 2g/L、ハイポリペプトン 10g/L、酵母エキス 0.5g/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g/L、L-システイン塩酸塩 1g/L、レザズリン 0.001g/L; pH6.5) を用いた水素発酵での水素生産量と比べると約半分の生産量であった。

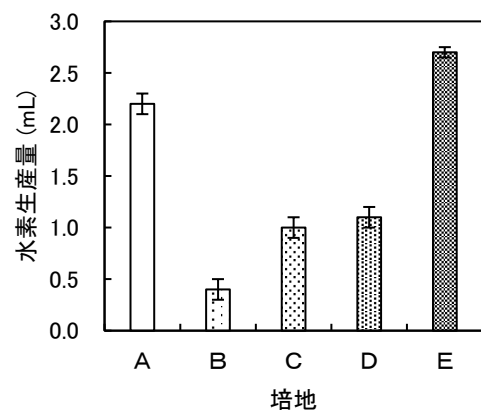


図 3 脂質抽出後の藻体残渣を添加した培地における *C. beijerinckii* の水素生産

- A: 基本培地(pH6.5)
- B: 藻体残渣のみ(pH7.0)
- C: 藻体残渣+グルコース(pH7.0)
- D: 藻体残渣+グルコース+焼却灰溶解液(pH7.0)
- E: 藻体残渣+グルコース+焼却灰溶解液(pH8.75)

そこで水素発酵の条件について検討したところ、5g/L の藻体残渣、2g/L のグルコース及び焼却灰溶解液を添加した培地の pH を 8.75 にして水素発酵を行うと、基本培地よりも多くの水素生産量を得られることが分かった (図 3)。また、水素生産に最適な培養温度は 37°C であった。さらに、水素発酵の培地に添加する焼却灰溶解液は、培地中の濃度が 20 倍希釈以上となる条件が水素生産に適することが分かった。

従って、鉄無添加焼却灰培地での培養で得られた *C. vulgaris* の藻体から脂質を抽出した後

の残渣は *C. beijerinckii* の水素発酵の培地成分として利用でき、藻体残渣にグルコースと焼却灰溶解液を添加し、さらに培地 pH 及び培養温度の条件を適正に設定すると、良好に水素を生産できることが明らかとなった。

以上のように、鶏糞焼却灰を原料とする焼却灰培地でクロレラの *C. vulgaris* を培養して脂質を生産し、さらに脂質を抽出した後の藻体残渣を水素発酵菌の *C. beijerinckii* の水素生産のための培地成分に活用して、脂質と水素を生産できることを明らかにした。これまでに鶏糞焼却灰を有効利用して脂質と水素のバイオ燃料を生産する研究例は見当たらない。今後、他の焼却灰についても研究を進めることにより、廃棄物の焼却灰を循環利用して油分と水素を生産する新規なバイオ燃料生産技術の実用化が図れると期待される。

#### <引用文献>

- ① Mallick N.、Bagchi S.K.、Koley S.、Singh A.K.、Progress and challenges in microalgal biodiesel production.、Front. Microbiol.、Vol.7、2016、1-11
- ② Safi C.、Zebib B.、Merah O.、Pontalier P.-Y.、Vaca-Garcia C.、Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review.、Renew. Sustain. Energy Rev.、Vol.35、2014、265-278
- ③ Yao Z.T.、Ji X.S.、Sarker P.K.、Tang J.H.、Ge L.Q.、Xia M.S.、Xi Y.Q.、A comprehensive review on the applications of coal fly ash.、Earth-Sci. Rev.、Vol.141、2015、105-121
- ④ 渡邊 光、松枝幸代、廣瀬 遵、横井春比古、焼却灰の *Chlorella vulgaris* 培養用培地への利用、第 19 回 日本生物工学会九州支部大分大会講演要旨集、p.39、2012

#### 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 3 件)

- ① 山田健介、宮武宗利、廣瀬 遵、横井春比古、*Chlorella vulgaris* の藻体を培地成分に用いる水素生産、第 25 回 日本生物工学会九州支部鹿児島大会、2018
- ② 米田涼一、山田健介、坂西智一、宮武宗利、廣瀬 遵、横井春比古、*Chlorella vulgaris* による焼却灰培地での脂質生産、第 54 回化学関連支部合同九州大会、2017
- ③ 坂西智一、山田健介、廣瀬 遵、横井春比古、焼却灰を活用する *Chlorella vulgaris* 培養用培地の開発、第 23 回 日本生物工学会九州支部飯塚大会、2016

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。