

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：32613

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K00668

研究課題名(和文) 消化汚泥を基質とした水素発酵に関するバイオテクノロジー基盤研究

研究課題名(英文) Hydrogen-rich biogas production from digested sludge

研究代表者

藤井 克彦 (Fujii, Katsuhiko)

工学院大学・先進工学部・教授

研究者番号：30333660

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：下水処理で発生する余剰汚泥は我が国の主要な産業廃棄物である。余剰汚泥の減容手段として嫌気消化法が普及しているが、それでも減容率は30%程度であり、残り70%は消化汚泥)として残存する。研究代表者は、この消化汚泥を分解できる糸状菌6株を土壌から初めて見出した。そこで糸状菌の加水分解酵素を従来の嫌気消化菌叢に与えることでバイオガスの増産をねらったが、ガス生産量は促進されなかった。そこで本研究では、新たに消化汚泥を基質として水素を発酵生産できる菌叢を探索し、これを消化汚泥分解菌ならびに微細藻類と併用することで消化汚泥から水素メインのバイオガスを発酵生産するためのバイオテクノロジー基盤研究を行った

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究当初は、研究者が以前より保有していた汚泥分解糸状菌の酵素と嫌気消化菌の併用で水素ガスを生産できると期待していたが、実際には期待した通りの成果は得られなかった。これは、前者が好気性微生物、後者が嫌気性微生物であり、両者の共培養が困難だったことが大きな原因である。他方、これを踏まえ、消化汚泥の分解からバイオガス生産までを一度に行える嫌気菌叢を探索し、消化汚泥と水のみでの培養液からバイオガスを生産する菌叢を得た。このような菌叢の研究報告例はこれまでになく、本研究で菌叢の特徴が解明された点は学術的意義が大きい。また、培養液も低廉で済むことから、安価な汚泥資源化技術の開発へと貢献できると期待される。

研究成果の概要(英文)：Sewage sludge is one of major industrial wastes produced in many nations. Anaerobic digestion is employed to convert sludge to biogas, but reduction rate is still ~30%, and large quantity of digestion residue, called digested sludge, is yielded. In this study, we developed anaerobic bacterial flora which can degrade digested sludge and produce biogas, and employed them with hydrolases from digested-sludge-assimilating fungi and microalgae to produce hydrogen-rich biogas from digested sludge.

研究分野：応用微生物学

キーワード：消化汚泥

## 1. 研究開始当初の背景

下水処理で発生する余剰汚泥は我が国の主要な産業廃棄物である。余剰汚泥の減容手段として嫌気消化法が普及しているが、それでも減容率は30%程度であり、残り70%は『これ以上は生分解が進みにくい残渣(消化汚泥)』として残存する。最近になって研究代表者は、この消化汚泥を分解できる糸状菌6株を土壌から初めて見出した。そこでこれら菌株が生産する加水分解酵素を従来のガス発酵菌叢に与えることでバイオガスの増産をねらったが、ガス生産量は促進されなかった。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、消化汚泥分解菌、酸・水素生産菌、微細藻類の三者を併用することで消化汚泥から水素メインのバイオガスを発酵生産するためのバイオテクノロジー基盤研究を行った。

## 3. 研究の方法

微生物の培養には、100 mgの消化汚泥乾燥粉末と純水10 mLを混合しオートクレーブしたものを培養液として用いた。また、嫌気菌叢は培養液を入れた瓶の気相を窒素置換した。微細藻類の培養液にはBold Basal 無機塩培地を用いた。菌叢の微生物種推定には、PCR-DGGE法を用いた。バイオガスの定量にはガスクロマトグラフ TCD 計を用いた。カラムにはSHINCARBON-ST、キャリアガスはアルゴン、ガス流量は40 mL/min、気化室とカラム温度は120°C、TCD 検出器温度は260°Cに設定し、分析を行った。

## 4. 研究成果

2017年度は、「凝集剤耐性を持つ消化汚泥分解菌変異株の開発」および「汚泥分解酵素と併用可能な水素生産菌叢の開発」について検討した。汚泥に混入する凝集剤が汚泥分解菌の生育を阻害することを解決するために高濃度の凝集剤存在下で長期間の培養を行ったが、凝集剤耐性を獲得した変異株を得ることはできなかった。他方、汚泥の処理法の検討を進める過程で、酸・アルカリ等を使用しなくても、十分量の水洗により汚泥に混入する凝集剤はある程度は減じることが可能であるとわかり、これを用いた場合は、分解菌は酸・アルカリ処理をした汚泥の時と同様の生育を示し、汚泥分解酵素の活性も高まった。これは多量の水洗は必要とするものの、毒劇物を使わなくても凝集剤を除去できることを意味しており、将来の実用化を目指す上で有用な処理法を見出すことができた。他方、消化汚泥から直接水素を発酵する嫌気菌叢の探索を行ったところ、3つの菌叢を得ることができた。

2018年度は、前年度に見出した「汚泥分解酵素と併用可能な水素生産菌叢」の性状について検討した。得られた3つの菌叢は消化汚泥から直接水素を発酵することができたが微量であった。これらの菌叢メンバーをDGGEで分析したところ、従前から糖等を基質とした水素発酵で知られるClostridium属ではなく、これまで研究対象となっていなかったFonticella属、Gracillibacter属、Romboutsia属、さらには好熱菌のThermoanaerobacter属や加水分解酵素で知られるBacillus属が含まれた多様な微生物生態系から構成される菌叢であることがわかった(図1)。培養上清の酵素活性を測定したところ、キチナーゼとケラチナーゼが主な酵素活性であり、弱いながらもヘミセルラーゼ活性が検出された。他方、セルラーゼ活性は認められなかった(図2)。

2019年度は、一般土壌、河川土壌、草食動物糞等、微生物探索源を拡大し、バイオガス生産量が高い消化汚泥分解微生物を得られるよう研究を行った。その結果、河川土壌や羊新鮮糞を含む数種類のサンプルで、消化汚泥を分解するとともに、メタンまたは水素を生産できる菌叢を得ることができた。河川土壌からは消化汚泥1gあたり20 mLのメタン、河川底泥からは14 mLのメタン、羊糞からは3 mLの水素を生産する菌叢が得られた。いずれの菌叢も、これ以上発酵に用いられない消化汚泥を唯一の基質として生育し、メタンや水素といったバイオガスを生産することが興味深い点である。分解酵素活性を検討したところ、セルラーゼ、キチナーゼ、プロテアーゼ活性が検出され、消化汚泥の主成分である微生物細胞壁残渣を栄養源として生育、バイオガス生産をしている可能性が示唆された。

2020年度は菌叢を構成する微生物メンバーの解析を行った(図3)。その結果、菌叢にはClostridium属やEnterobacter属のように従来から知られている酸・水素生成菌に加えて、Pseudomonas属やAcinetobacter属等の好気細菌と子のう菌系糸状菌および原生生物が存在しており、培養液中の溶存酸素の除去や硝酸塩呼吸による速やかな酸化還元電位の低下に寄与していることが示唆された。また、メタン生成古細菌についても複数の属が見られたが、その中にはMethanobacterium属やMethanosarcina属等の既知の属種に加えて、系統不明の一群が含まれることが示唆された。また、80°Cで集積培養することで、耐熱性をもった消化汚泥分解・水素生産菌叢を得ることができたが、水素生産量が微量であった。酵素活性と

しては、セルラーゼ、キチナーゼ、プロテアーゼが検出された (図 4)

2021 年度は、消化汚泥分解・水素生産菌叢の培養容器をスケールアップし、気相中の水素分圧を下げて発酵試験を行ったところ、水素生産量が大きく改善された。電導素材である活性炭の添加により水素生産が改善されるかも検討したが、活性炭粒子表面に微生物が吸着・堆積し、期待したほどの水素生産量は見られなかった。他方、生産されたガスは生物由来であることから、水素以外に二酸化炭素を含有しており、これを除去する必要がある。そこで、研究室保有の高濃度二酸化炭素馴化藻類を用い、バイオガスの二酸化炭素を除去できるか試験した。消化汚泥分解・水素生産菌叢の培養瓶と馴化藻類の培養瓶をシリコンチューブでつなぎ、前者で生産された水素を含むバイオガスが後者の気相に移り、藻類によって二酸化炭素が固定化されると期待した。しかし実際に試験したところ、二酸化炭素の低減には至らなかった。解決策として、二酸化炭素はアルカリ性で水によく溶けるので、アルカリ性の培養液にて二酸化炭素を炭酸塩として吸収させ、これを微細藻類に固定化させる方法が良いのではと考察した。そこで今後は、アルカリ性 pH で良好に生育する藻類を探索し、その藻類培養液にバイオガスを通気し、二酸化炭素の除去が可能かを検討していく計画である。

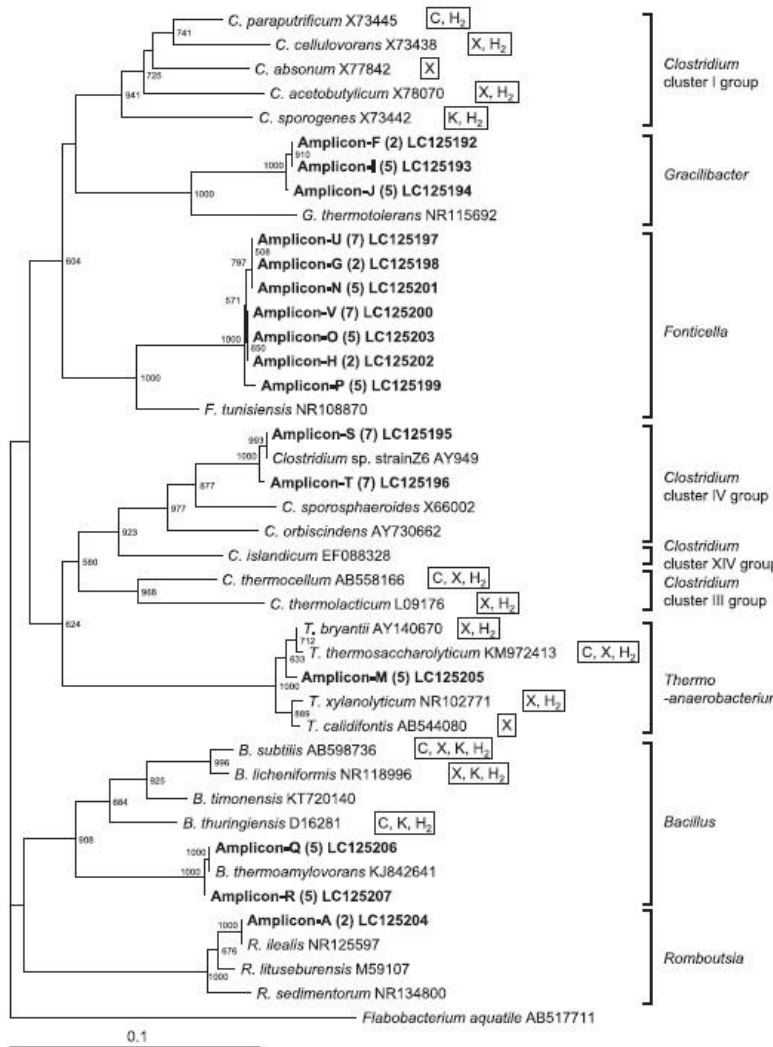


図 1 新たに見つかった水素生産菌叢の微生物相系統解析

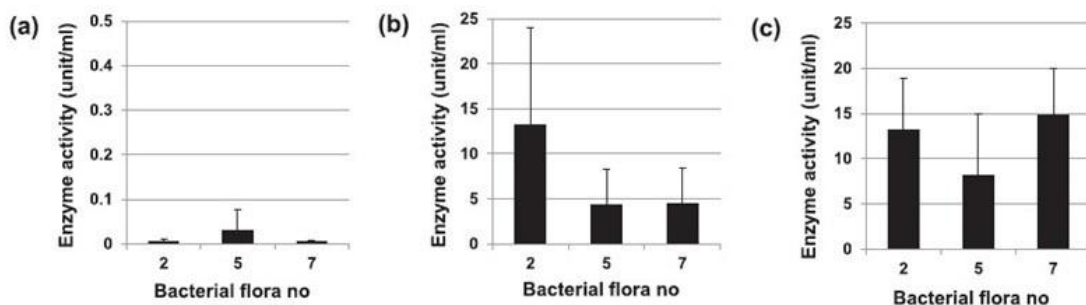


図 2 菌叢の酵素活性。(a)キチナーゼ、(b)セルラーゼ、(c)ケラチナーゼ活性

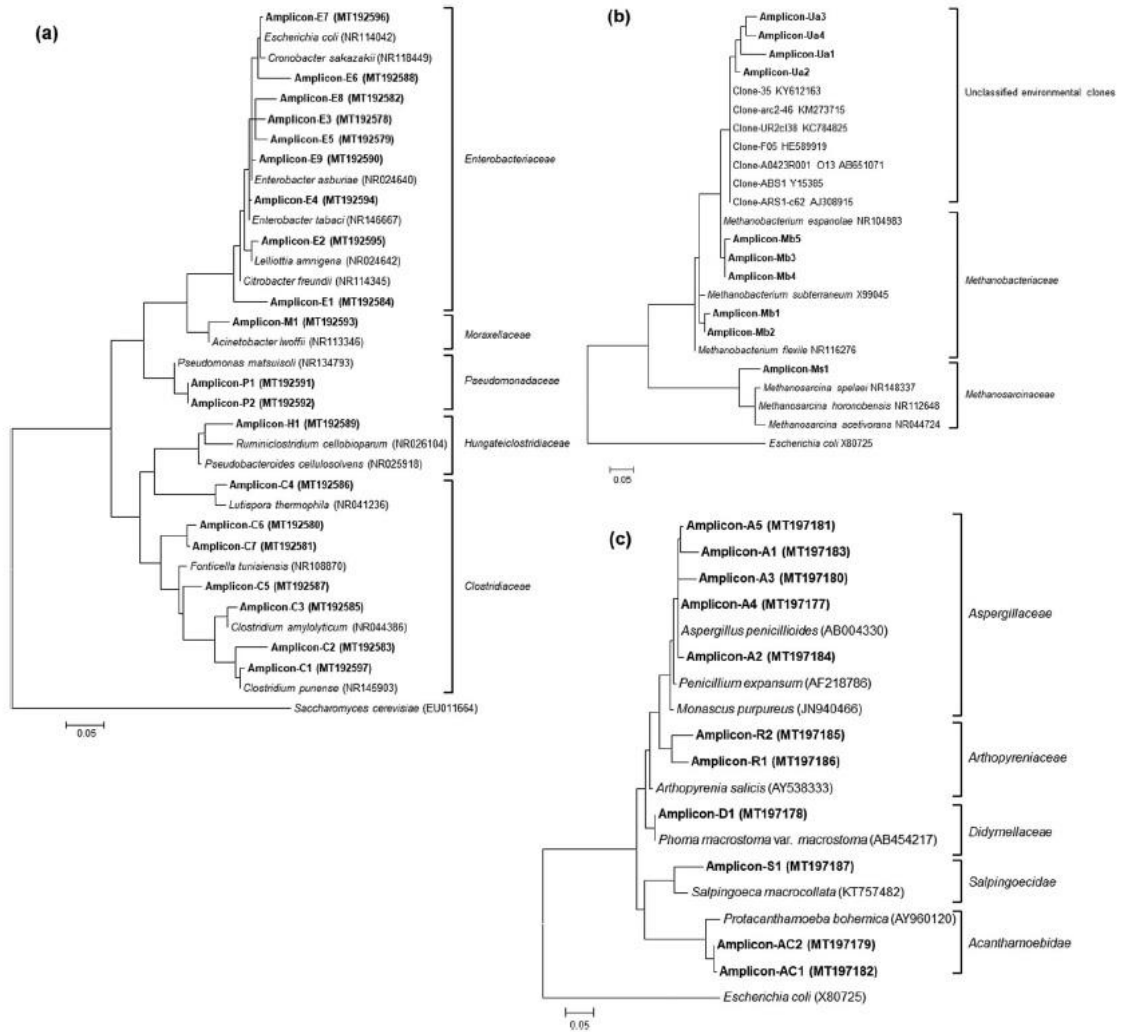


図3 消化汚泥・水素生産菌叢の微生物相系統解析

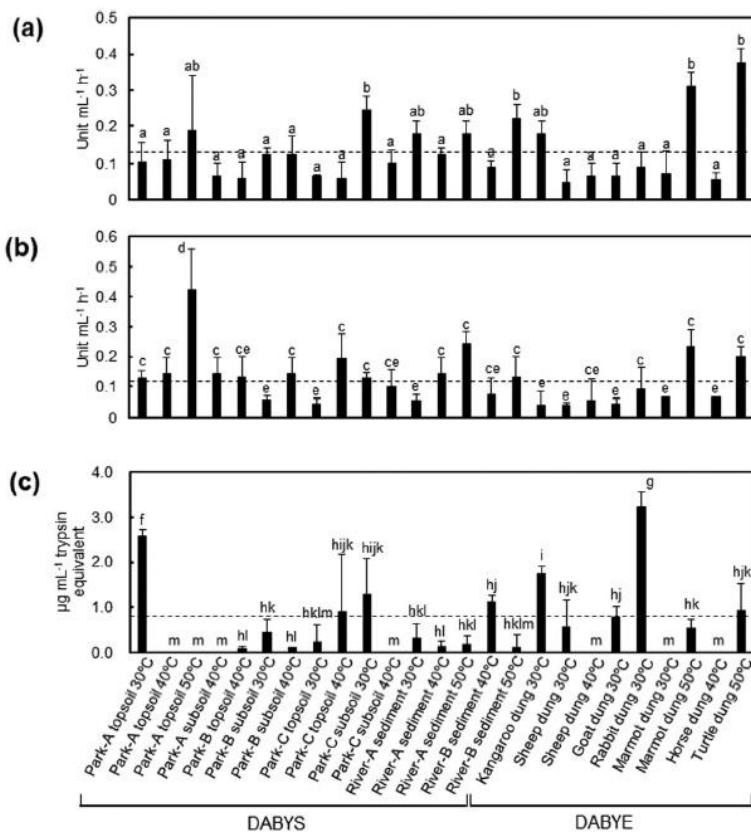


図4 菌叢の酵素活性。(a) セルラーゼ、(b) キチナーゼ、(c) ケラチナーゼ活性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Kon Ayaka, Omata Shunsuke, Hayakawa Yuhei, Aburai Nobuhiro, Fujii Katsuhiko | 4. 巻<br>43              |
| 2. 論文標題<br>Microflora communities which can convert digested sludge to biogas         | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>Environmental Technology  | 6. 最初と最後の頁<br>2391-2403 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1080/09593330.2021.1880489                              | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-               |

|   |                   |
|---|-------------------|
| 1. 著者名<br>Kouzuma S, Fujii K  | 4. 巻<br>82        |
| 2. 論文標題<br>Biochemical characteristics of cellulose and a green alga degradation by <i>Gilvimirinus japonicas</i> 12-2T, and its application potential for seaweed saccharification | 5. 発行年<br>2018年   |
| 3. 雑誌名<br>Bioscience, Biotechnology and Biochemistry  | 6. 最初と最後の頁<br>1-7 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし   | 査読の有無<br>有        |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-         |

|  |                     |
|--|---------------------|
| 1. 著者名<br>Kuribayashi, K., Kobayashi, Y., Yokoyama, K., and Fujii, K.  | 4. 巻<br>120         |
| 2. 論文標題<br>Digested sludge-degrading and hydrogen-producing bacterial floras and their potential for biohydrogen production. | 5. 発行年<br>2017年     |
| 3. 雑誌名<br>International Biodeterioration & Biodegradation  | 6. 最初と最後の頁<br>58-65 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし  | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-           |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>近綾 香、油井 信弘、藤井 克彦            |
| 2. 発表標題<br>消化汚泥からバイオガスを生産できる微生物菌叢の生態解明 |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2020年大会              |
| 4. 発表年<br>2020年                        |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>藤井克彦                             |
| 2. 発表標題<br>消化汚泥を基質とした水素発酵に関する バイオテクノロジー基盤研究 |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2019年度大会                  |
| 4. 発表年<br>2019年                             |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>藤井 克彦                         |
| 2. 発表標題<br>消化汚泥を基質とした水素発酵に関するバイオテクノロジー研究 |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2018年度大会               |
| 4. 発表年<br>2018年                          |

|                                |
|--------------------------------|
| 1. 発表者名<br>早川 雄平、藤井 克彦         |
| 2. 発表標題<br>消化汚泥から水素を生産できる菌叢の開発 |
| 3. 学会等名<br>第32回廃棄物資源循環学会研究発表会  |
| 4. 発表年<br>2021年                |

〔図書〕 計1件

|                           |                 |
|---------------------------|-----------------|
| 1. 著者名<br>渡辺一哉            | 4. 発行年<br>2021年 |
| 2. 出版社<br>シーエムシー出版        | 5. 総ページ数<br>245 |
| 3. 書名<br>微生物を用いた発電および水素生産 |                 |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  |                           |                       |    |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

|         |         |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|