

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25289294

研究課題名(和文) 多様な未利用資源からリンを分離回収し産業利用するためのバイオプロセス技術の開発

研究課題名(英文) Development of bioprocess for recovering phosphorus from a variety of secondary resources for recycling

研究代表者

大竹 久夫 (Ohtake, Hisao)

早稲田大学・総合研究機構・客員上級研究員

研究者番号：10127483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：リン酸カルシウムを含む未利用リン資源である製鋼スラグや、農耕地に蓄積した不活性なリン酸鉄やリン酸アルミニウムを溶解する微生物を自然界から単離することに成功した。単離した溶解微生物が細胞外に生産するグルコン酸などの有機酸が、これらの不活性のリン酸金属塩を溶解しリンを放出することがわかった。また国内に豊富にあるカルシウムやケイ酸から合成した非晶質ケイ酸カルシウムを用いることで、画期的にシンプルなリン回収方法を開発することに成功した。

研究成果の概要(英文)：To recycle phosphate (Pi) that is immobilized in steelmaking slag and farm soils, bacterial strains capable of mobilizing Pi salts with calcium, iron or aluminum, were isolated from steelmaking slag and soil samples. Organic acids, including gluconic acid, citric acid, and acetic acid, which were extracellularly released from the isolated strains, were responsible for releasing phosphate from insoluble Pi salts. A simple, new technology for phosphate recovery was developed using amorphous calcium silicate hydrates which were chemically synthesized using unlimitedly available inexpensive materials such as calcium and silicates. The technologies developed in this study could potentially be used for recycling Pi immobilized in steelmaking slag and farm soils.

研究分野：生物化学工学

キーワード：リン資源 リン溶解菌 非晶質ケイ酸カルシウム リンリサイクル

1. 研究開始当初の背景

リンがなければ、食料はもとより再生可能資源と言われるバイオマスもバイオ燃料も生産できない。言うまでもなく、バイオ産業もまた、リンに絶対的に依存している。人間が使うリンのほとんどは、有限の天然資源であるリン鉱石から得られている。しかし、地球規模でリン鉱石は、品質の良いものから枯渇を始めており、リン資源の持続的な利用と管理の問題は、人類の新たな地球的課題となりつつある。わが国は、世界第8位のリン消費大国でありながら、リン鉱石を産出せず総てのリン資源を海外に依存している。しかし、国民はまだ事の重大さに気が付いておらず、国の施策も EU 諸国に較べ立ち遅れている。

2. 研究の目的

人類が持続的かつ安定的にリン資源を利用するには、人間活動にともなうリンの流れを閉鎖循環系に変換する必要がある。本研究の目的は、枯渇する天然リン鉱石への依存度を減らすために、国内の多様な未利用資源からリンを分離回収し農業や工業に再利用するための、新しいバイオプロセス技術の開発に挑むことである。

3. 研究の方法

未利用資源からリンを分離できる微生物株の取得と溶解機構の解明

リン酸カルシウムを含む未利用リン資源である製鋼スラグや、農耕地に蓄積したリン酸鉄やリン酸アルミニウムを溶解する微生物の単離を行った。リン酸カルシウムの溶解微生物の候補株については、粉碎した製鋼スラグを生理食塩水に懸濁させ、その上澄みをヒドロキシアパタイト ($[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]_3 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2$: HAP) を単一リン源とする MOPS 寒天培地に塗布し 30 で終夜培養することで取得した。リン酸鉄、リン酸アルミニウムの溶解微生物の候補株は、土壌サンプルを生理食塩水に懸濁させ、その上澄みを CAS-Fe または CAS-Al を含む寒天培地に塗布し、黄色のハローを形成する微生物を単離することで取得した。本培地は金属キレーターである Chrome Azurol S (CAS) と鉄やアルミニウムとの青色の金属錯体を含み、鉄やアルミニウムが微生物の作用により遊離することで、遊離 CAS の黄色へと変色する培地である。

得られた候補株を HAP、 FePO_4 、 AlPO_4 を単一リン源とする MOPS 液体培地に植菌し 30 で 24 時間培養を行い、培養上清の遊離リン酸濃度の高い株を選抜した。選抜した株の同定は 16 S rRNA 遺伝子解析によって行った。難溶性リン酸塩の溶解に起因する物質は HPLC により同定した。また通気条件や基質の種類など、難溶性リン酸塩の溶解を最大化する培養条件の検討を行った。

未利用資源から溶出させたリンの回収方

法の開発

珪質頁岩を NaOH 溶液に添加し、60 で 10 分間加熱することで、ケイ酸を抽出した。抽出したケイ酸溶液に $\text{Ca}(\text{OH})_2$ を添加し、60 で 3 時間加熱することで得られた固形物をろ過・乾燥することで非晶質ケイ酸カルシウム水和物 (A-CSHs) を得た。A-CSHs の構造解析は熱重量示差熱分析 (TG-DTA)、粉末 X 線回折法 (P-XRD)、 ^{29}Si 核磁気共鳴法 (^{29}Si NMR) を用いて行った。A-CSHs を用いたリン回収は A-CSHs を 392 mg/L の KH_2PO_4 、1.89 g/L の NH_4Cl 、3.36 g/L の NaHCO_3 を含む溶液 (リン酸モデル液) に Ca/P モル比が 3.0 となるように添加し、室温で 20 分間反応することで行った。リンを吸着した A-CSHs (A-CSHs-P) の回収は、リン回収反応後に攪拌を停止し、10 分間自然沈降を行い A-CSHs-P を反応器下部に沈降させ、反応液の上部 90% をサイフォンにより除去し、A-CSHs-P を含む下部 10% を吸引することで行った。

4. 研究成果

製鋼スラグからリンを分離できる微生物株の取得と溶解機構の解明

製鋼スラグからゲノム抽出を行い T-RFLP 法を用いて微生物群衆構造解析を行った結果、数十種のピークが検出され、様々な属の微生物が存在することが示唆された。更に次世代シーケンサー解析を行い、これらの主要な属として *Arthrobacter*、*Bacillus*、*Enterobacter*、そして *Pseudomonas* 属が生息していることが明らかとなった。製鋼スラグは低栄養かつ高 pH の環境であるが、菌叢解析によって明らかとなったスラグ菌は、このような環境に適応可能な微生物であると考えられる。

そこでスラグ菌はスラグ中の HAP を溶解しリン酸を利用できる可能性が高いと考え、製鋼スラグよりリン酸カルシウム溶解微生物のスクリーニングを行った。単離した約 1,500 株から選抜した結果、sl-29 株が最も高い溶解活性を示した。sl-29 株は 3.33 mM の HAP を単一リン源とする培地で約 5 mM のリン酸を培養上清に溶出した。16 S rRNA 遺伝子解析の結果、sl-29 株は *Enterobacter cloacae* と最も高い相同性を示した。

次に sl-29 株の HAP の溶解メカニズム解明のために有機酸解析を行った結果、酢酸、乳酸、ギ酸、そしてピルビン酸が検出された。これらの有機酸は嫌気条件下で生産されることから、好気条件下で培養を行った結果、有機酸生産量の低下とリン酸溶出量の減少が確認された。以上の結果から、有機酸が溶解に寄与していることが明らかとなった。最後に sl-29 株が製鋼スラグよりリン酸を溶出できるかを確認するために 50 g/L の製鋼スラグを単一リン源とする培地で培養を行ったところ、6 μM のリン酸を培養上清に溶出し、製鋼スラグ中のリンの溶解が可能であっ

た。

土壌中のリン酸鉄、リン酸アルミニウムからリンを分離できる微生物株の取得と溶解機構の解明

HAP が有機酸によって溶解可能であることから、リン酸鉄、リン酸アルミニウムも同様に酸で溶解可能であるか検討を行った。その結果、HAP が酸の種類によらず pH 依存的に溶解したのに対して FePO_4 や AlPO_4 は無機酸や乳酸、酢酸、ギ酸などの有機酸にはほとんど溶解しなかった。一方、クエン酸やリンゴ酸、マロン酸などのキレート効果を有する多価の有機酸には溶解することがわかった。

そこで鉄やアルミニウムのキレートを産生する微生物は FePO_4 や AlPO_4 を効率的に溶解できると考え、大学構内の土壌より CAS-Fe や CAS-Al を含む寒天培地上でハローを形成する微生物を単離したところ、それぞれ数十種の微生物を単離することができた。単離した微生物を FePO_4 または AlPO_4 を単一リン源とする MOPS 培地で培養し、培養上清中のリン酸濃度を測定したところ、 FePO_4 については 26 株中 23 株、 AlPO_4 については 29 株中 14 株についてリン酸の溶出が確認でき、本スクリーニング法の有効性が示された。これらの株の内、 FePO_4 については Soil-Fe-20 株が最も高い溶解活性を示し、2 mM の FePO_4 から約 600 μM のリン酸を溶出した。 AlPO_4 については Soil-Al-2 株が、2 mM の AlPO_4 から約 850 μM のリン酸を溶出したものの、継代培養により溶解活性の低下が見られた。一方で Soil-Al-13 株は、2 mM の AlPO_4 から安定して約 600 μM のリン酸を溶出できたことから、以後の実験には本株を用いることとした。16 S rRNA 遺伝子解析の結果、Soil-Fe-20 株は *Enterobacter aerogenes* と、Soil-Al-13 株は *Acinetobacter calcoaceticus* と最も高い相同性を示した。

次に Soil-Fe-20 株および Soil-Al-13 株の FePO_4 や AlPO_4 の溶解メカニズム解明のために有機酸解析を結果、Soil-Fe-20 株はグルコン酸 (11 mM) と 2-ケトグルコン酸 (26 mM) を、Soil-Al-13 株はグルコン酸 (35 mM) を生産していることがわかった。これらの酸により両株の難溶性リン酸塩の溶解を説明できるかを検証するために、Soil-Fe-20 株が生産する酸と同濃度のグルコン酸、2-ケトグルコン酸を FePO_4 と単一リン源とする MOPS 培地に添加し、30 で 24 時間攪拌を行ったところ、550 μM のリン酸が遊離し、Soil-Fe-20 株による FePO_4 と同等の溶解を示した。また AlPO_4 についても Soil-Al-13 株を用いて同様の実験を行ったところ、同様の結果が得られたことから、これらの微生物はグルコン酸や 2-ケトグルコン酸などキレート効果を有する有機酸を生産することで FePO_4 や AlPO_4 を溶解していることが示唆された。

最後に Soil-Fe-20 株および Soil-Al-13 株の難溶性リン酸塩の溶解を最大化する培養条件の検討を行った。Soil-Fe-20 株については有機酸の生産が遊離の Fe 濃度や P 濃度には影響を受けず、酸素濃度に影響を受けることが明らかとなった。そこで好気条件で FePO_4 の溶解実験を行った結果、2 mM の FePO_4 より約 1 mM のリン酸を溶出させることに成功した。また Soil-Al-13 株についてはグルコースを生育に用いずグルコン酸の生産のみ使用することが明らかとなり、キシロースなどのペントースを増殖のための炭素源として利用することが示された。そこで炭素源にグルコースとキシロースの両方を用いて AlPO_4 の溶解実験を行ったところ、グルコースのみを用いた時と比較して菌体量の有意な増加が見られ、グルコン酸生産速度の向上が見られた。その結果 2 mM の AlPO_4 より約 1 mM のリン酸を溶出させることに成功した。

未利用資源から溶出させたリンの回収方法の開発

種々の機器分析により A-CSHs の構造解析を行った。TG-DTA による分析の結果、A-CSHs は $\text{Ca}(\text{OH})_2$ や CaCO_3 に由来する吸熱ピークを示さず、これらの化合物を含まないことが示された。また P-XRD による解析においても $\text{Ca}(\text{OH})_2$ や CaCO_3 のピークを示さず、非晶質ケイ酸カルシウムの回折ピークのみを示した。更に ^{29}Si NMR による解析の結果から、A-CSHs 中のケイ酸鎖の平均鎖長は 3.5 であること、これらが Ca を介して架橋した構造を有することが明らかとなった。

続いて A-CSHs を用いたリン酸モデル液からのリン回収試験を行ったところ、A-CSHs は反応わずか 20 分で 82% のリンを吸着した。その後、10 分間の自然沈降により 78% のリンが A-CSHs と共に沈降し、高い沈降性を示した。沈降した A-CSHs-P をろ過、乾燥した後、コマツナを用いたポット試験に供したところ、市販のリン酸肥料と同等の性能が得られ、肥料として再利用できることが明らかとなった。

総括

以上のように、リン酸カルシウムを含む未利用リン資源である製鋼スラグや、農耕地に蓄積したリン酸鉄やリン酸アルミニウムを溶解する微生物を単離し、難溶性リンを効率的に溶解する技術の開発に成功した。また A-CSHs を用いることで溶液中のリン酸をわずか 20 分の反応と 10 分の自然沈降、ろ過により回収できるという画期的にシンプルなリン回収方法の開発に成功し、回収物を肥料として再利用できることも示した。本研究で開発した未利用資源からのリンの分離技術と、溶液からのリン回収技術を組み合わせることで未利用リン資源の肥料としての利用が可能となり、枯渇する天然リン鉱石への依存度を減らすことが可能になると考えられ

る。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

K. Okano, Y. Yamamoto, H. Takano, T. Aketo, K. Honda, and H. Ohtake, A simple technology for phosphorus recovery using acid-treated concrete sludge. *Sep. Purif. Technol.*, (査読あり) 165, (2016) 173-178. 10.1016/j.seppur.2016.03.054

H. Ohtake, and K. Okano, Development and implementation of technologies for recycling phosphorus in secondary resources in Japan. *Glob. Environ. Res.*, (査読あり) 19, (2015) 49-65. http://www.airies.or.jp/journal_GlobalEnvironmentalResearch.html

P. J. A. Withers, J. J. Elser, J. Hilton, H. Ohtake, W. J. Schipper, and K. C. van Dijk, Greeting the global phosphorus cycle: how green chemistry can help achieve planetary P sustainability. *Green Chem.*, (査読あり) 17, (2015) 2087-2099. 10.1039/c4gc02445a

K. Okano, S. Miyamaru, A. Kitao, H. Takano, T. Aketo, M. Toda, K. Honda, and H. Ohtake, Amorphous calcium silicate hydrates and their possible mechanism for recovering phosphate from wastewater. *Sep. Purif. Technol.*, (査読あり) 144, (2015) 63-69. 10.1016/j.seppur.2015.01.043

岡野憲司、國貞眞司、高野博幸、戸田雅也、大竹久夫、非晶質ケイ酸カルシウム水和物(リントル)を用いた革新的リン回収技術。ファインケミカル誌、(査読なし) 42, (2013) 24-29.

K. Okano, M. Uemoto, J. Kagami, K. Miura, T. Aketo, M. Toda, K. Honda, and H. Ohtake, Novel technique for phosphorus recovery from aqueous solutions using amorphous calcium silicate hydrates (A-CSHs). *Water Res.*, (査読あり) 47, (2013) 2251-2259. 10.1016/j.watres.2013.01.052

[学会発表](計7件)

山栗瑞希、矢野淳士、岡野憲司、本田孝祐、大竹久夫、*Enterobacter*属細菌におけるリン酸欠乏誘導性のリン酸鉄溶解機構の解明、日本農芸化学会2016年度大会、2016.3.29、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌)

岡野憲司、リン回収材としての非晶質ケイ酸カルシウムの可能性、第18回早稲田大学リンアトラス研究所セミナー、2016.2.9、早稲田大学(東京)

岡野憲司、山栗瑞希、清原みなみ、本田孝祐、大竹久夫、微生物による難溶性リン酸塩溶解機構の解明(1)リン酸カルシウム、

日本農芸化学会 2015 年度大会、2015.3.28、岡山大学(岡山県・岡山)

矢野敦士、岡野憲司、本田孝祐、大竹久夫、微生物による難溶性リン酸塩溶解機構の解明(2)リン酸鉄、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015.3.28、岡山大学(岡山県・岡山)

清原みなみ、岡野憲司、本田孝祐、大竹久夫、微生物による難溶性リン酸塩溶解機構の解明(3)リン酸アルミニウム、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015.3.28、岡山大学(岡山県・岡山)

大竹久夫、岡野憲司、國貞眞司、高野博幸、増田登司男、Innovatively simple, low-cost technology for P recovery using amorphous calcium silicate hydrates, 2nd European Sustainable Phosphorus Conference, 2015.3.5-6、Berlin (Germany)

大竹久夫、Development and implementation of technologies for recycling phosphorus in secondary resources in Japan, ScienceCampus P research Rostock, 2015.3.3、Rostock (Germany)

[図書](計 件)

[産業財産権]
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

大竹久夫 (OHTAKE HISAO)

早稲田大学・総合研究機構・客員上級研究員
研究者番号：10127483

(2)研究分担者

岡野憲司 (OKANO KENJI)

大阪大学・工学研究科・助教

研究者番号：40623335