

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K04676

研究課題名(和文) バイオフィームにおける界面性状の最適化による高効率ガス吸収機構の構築

研究課題名(英文) Development of highly efficient gas absorption mechanisms in biofilm by optimizing interfacial properties

研究代表者

樋口 能士 (HIGUCHI, Takashi)

立命館大学・理工学部・教授

研究者番号：60288628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、揮発性有機化合物(VOC)を生物処理することを想定し、微生物により生じる体外分泌物がトルエンガス除去能力に与える影響を観察した。体外分泌物のタンパク質の内特定の分子量分画が液膜中に存在することで、高いトルエンガス除去速度が得られた。

研究の過程で、トルエン分解菌単離株のトルエンガス資化能力が著しく低下したため、有機培地で培養したトルエン分解混合菌で実験を継続した。その結果、液膜中での体外分泌物の糖・タンパク質濃度にトルエンガス除去速度に対する最適濃度範囲が存在する状況、また、トルエン分解菌以外に由来するバイオサーファクタントの存在でもトルエンガス除去速度が向上する状況が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ガス状揮発性有機化合物(VOC)の生物処理は、持続可能なガス処理方法の1つとされる一方、処理速度が緩慢で長期安定運転が困難な点などの解決が求められている。本研究では、実際の生物処理装置で気相と微生物相の間に存在する液膜中の微生物由来体外分泌物がVOCガス除去に及ぼす影響を観察しているが、その傾向を理解して液膜中の体外分泌物組成を最適化することで、とりわけトルエンのような溶解性の低いガス状物質の除去速度を安定的に向上させることを目指している。また、体外分泌物を利用した微生物による微量ガス成分の能動的摂取という機構の発見は、微生物生態学における重要な知見となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The Influence of extracellular secretions of microorganisms on removal capacity of gaseous toluene in the biological treatment of volatile organic compounds (VOCs) was observed in this study.

Higher removal capacity of gaseous toluene was obtained with the existence of a specific molecular weight fractionation of extracellular secretion protein in the liquid layer.

Since the capacity of toluene gas utilization by the strain of toluene-degrading bacteria was largely decreased, further experiments were conducted using a toluene-degrading bacterial flora cultivated with organic liquid media. Results showed that the following situations were observed: there were a certain optimal range of concentrations of bacteria-originated saccharide and protein for gaseous toluene removal in the liquid layer, and toluene removal capacity was increased by a biosurfactant unrelated to the toluene-degrading bacteria.

研究分野：環境工学

キーワード：生物脱臭装置 トルエン 体外分泌物 液膜 糖 タンパク質 バイオサーファクタント

1. 研究開始当初の背景

生物脱臭法は、水処理施設等からバイオマス腐敗起因で排出される悪臭物質（硫化水素、アンモニア、メルカプタン、等）の処理方法としてその有用性が広く認められており、現在の我が国においてもその分野の発生源対策として主力の手法となっている。一方、溶剤や燃料の揮発等で発生する様々なガス状の揮発性有機化合物（VOC）には、水への溶解性が低い物質や生物分解性に乏しい物質などがあり、一般に生物脱臭法の適用は困難である。しかし、ガス流の維持以外に大きなエネルギー消費がない、比較的二次汚染が少ないなどの優位性から、ガス状 VOC の処理への生物脱臭法の適用が期待されており、これまで約 20 年間、国内外で積極的に研究開発が行われ、一部は実用化されている。

2. 研究の目的

微生物は自らの生息環境維持のために、体外酵素や細胞外高分子（EPS；Extracellular Polymeric Substances）を細胞外に分泌しているが、これら成分は気相-微生物相間に存在する液膜の物性変化を引き起こすために、ガス状物質の物質移動抵抗の変化をもたらすと考えられる。そこで本研究では、気相-微生物相間の界面性状に着目し、特に、微生物が自ら構築する界面性状の中で、ガス状物質取込みを促進あるいは阻害する機構の存在を観察する。最終的には、液膜性状を微生物が積極的に構築して基質であるガス状物質を摂取している可能性、すなわち微生物による「界面性状の能動的改変」が行われている可能性についても考察する。

3. 研究の方法

(1) 体外分泌物のタンパク質の分子量分画と分画成分がトルエンガス除去に及ぼす影響

限外ろ過を用いて体外分泌物中のタンパク質を分子量で分画し、その各成分が、代表的な VOC 化合物であるトルエンのガス除去能力に対して及ぼす影響を観察した。実験では、トルエン分解菌である *Pseudomonas putida* の独自単離株（NB-K4 株）を異なる培地条件で培養し、その過程での体外分泌物の生成を分画別に観察した。また、この分泌物の各分画を NB-K4 株の生物膜上に液膜として散布し、トルエンガスの除去特性を比較した。分画は、分子量 300K(K=1000)以上、3K-300K、3K 以下の 3 サイズに分画した。

(2) トルエンガスに有機基質を加えた条件でのトルエン分解混合菌の培養条件の確立

研究遂行途中で *Pseudomonas putida* NB-K4 株がトルエンガスを唯一の有機基質とする条件で液体培養できなくなったことを受けて、生物脱臭装置からトルエン分解混合菌を採取し、トルエンガスに加えて液体培地に有機基質を与えた諸条件で菌叢を培養し、体外分泌物の分泌特性とトルエンガス除去特性を条件間で比較した。

(3) トルエン分解混合菌の体外分泌物と市販のバイオサーファクタントがトルエンガス除去に及ぼす影響の観察

トルエン分解混合菌由来体外分泌物と市販の生物由来界面活性物質（バイオサーファクタント）の双方を、液膜に存在する溶解濃度を広範囲に設定し、トルエンガス除去試験を行った。混合菌由来体外分泌物は糖濃度とタンパク質濃度を測定後に培養液で希釈して濃度調整して液膜として用い、市販のバイオサーファクタントには枯草菌由来環状ペプチドであるサーファクチンナトリウムを使用した。

(4) 実験条件等

微生物の培養

三角フラスコに図-1 に示すような付属品類を設置し、内部に液体培地を入れた。 *Pseudomonas putida* NB-K4 株の培養には、液体培地に窒素、リン、各種金属塩を含む無機塩培地を用いた。トルエン分解混合菌の培養では、無機塩培地とグルコース等を含む有機培地とを、設定した比率で混合して使用した。

トルエンガス除去実験

テフロン容器の底部に、培養した微生物（NB-K4 株、トルエン分解混合菌）をメンブランフィルターで濾過して表面に微生物層を形成した試料を、微生物層を上面にして設置し、その上に糖、タンパク質の濃度を計測し必要に応じて希釈して濃度調整した培養後の体外分泌物、あるいは市販のバイオサーファクタント溶液を散布して液膜を形成し、密閉してトルエンガスを封入し、容器内の濃度減衰を

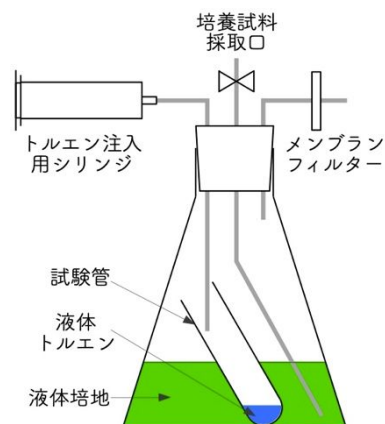


図-1 培養容器の概念図

観察した。実験手順の概念を図-2に示す。

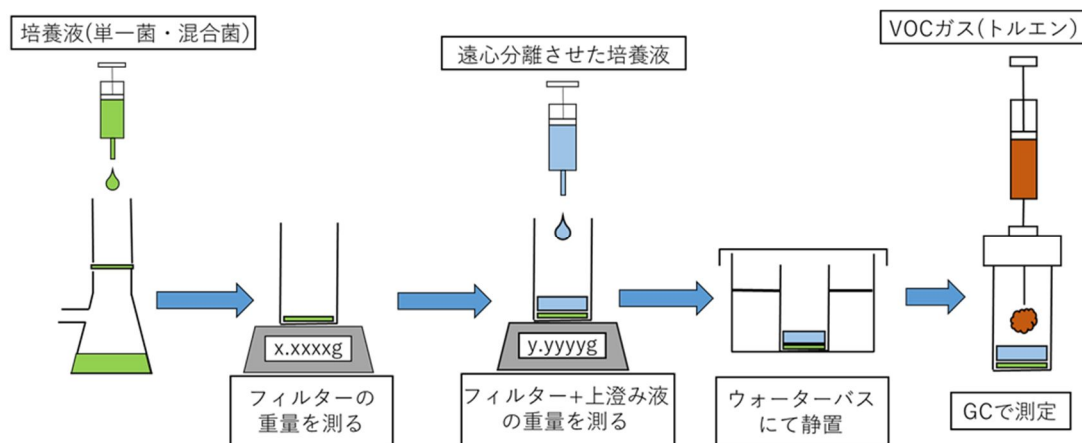


図-2 トルエンガス除去試験の手順の概要

トルエンガス、糖、タンパク質の分析

トルエンガス濃度は FID 検出機付きガスクロマトグラフ装置にて計測した。体外分泌物を含むが培養後上澄み液中の糖濃度およびタンパク質濃度は、それぞれフェノール硫酸法、Lowry 法にて測定し、いずれも分光光度計で発色後試料の濃度測定を行った。

タンパク質の分子量分画

体外分泌物のタンパク質の分子量分画には限外ろ過システムを利用し、使用する膜を変えてろ過することで分画を得た。

4. 研究成果

(1) 体外分泌物のタンパク質の分子量分画と分画成分がトルエンガス除去に及ぼす影響

NB-K4 株の培養過程における各分画のタンパク質の生成については、無機塩培地成分の濃度よりもトルエンガスの暴露条件に大きく影響を受け、総じて各分画 (300K(K=1000)以上、3K-300K, 3K) は比較的均等に生成した。既往の研究では、糖濃度が低くタンパク質濃度が高い条件でトルエンガス除去が高くなる傾向が指摘されたが、本研究では、タンパク質成分の分画毎に、トルエンガス除去に与える影響がそれぞれ異なる可能性が示唆された。例えば本実験の範囲内では、3K 以下の分画を生物膜上の液膜に散布すると、糖濃度によらず高いトルエンガス除去能力を示した。

(2) トルエンガスに有機基質を加えた条件でのトルエン分解混合菌の培養条件の確立

今回用いた混合菌は、無機塩培地条件では、トルエンガス暴露条件であっても極めて増殖速度が遅かった。この混合菌を用いて、異なる有機基質濃度を設定したトルエンガス暴露条件下での培養を行なったところ、有機基質濃度の増加に応じて、培養液中に分泌された糖濃度、タンパク質濃度の増加が見られたが、増加の程度はタンパク質の方で顕著であった。また、これら複数の糖/タンパク質組成の液膜表面を有する生物膜でトルエンガス除去速度を比較した結果、糖濃度が高い条件で速度が低い傾向が見られた点では既往の結果と整合したが、糖、タンパク質濃度が全体的に高い場合も低い場合も、トルエンガス吸収速度は低減する傾向が認められた。

(3) トルエン分解混合菌の体外分泌物と市販のバイオサーファクタントがトルエンガス除去に及ぼす影響の観察

市販のバイオサーファクタントについては液膜中濃度の上昇とともにトルエンガス除去速度が向上する傾向であった反面、トルエン分解菌由来体外分泌物では既往の成果と同様、トルエンガス除去速度に対する液膜中の至適濃度が存在した。これまでの実験でも、トルエンガス除去に対するタンパク質の液膜中濃度には至適条件が存在することが示唆されてきたが、この実験においても、トルエン分解菌の体外分泌物はトルエンガス除去に正負両方の影響を及ぼし、液膜中における至適濃度の存在が改めて示唆された。

(4) 研究成果のまとめと課題

本研究では、揮発性有機化合物 (VOC) を生物処理することを想定し、微生物により生じる体外分泌物がトルエンガス除去能力に与える影響を観察した。

体外分泌物のタンパク質の内特定の分子量分画が液膜中に存在することで、高いトルエンガス除去速度が得られた。

研究の過程で、トルエン分解菌の単離株のトルエンガス資化能力が著しく低下したため、有機培地で培養したトルエン分解混合菌で実験を継続した。その結果、液膜中で混合菌由来分泌物の糖・タンパク質濃度にトルエンガス除去速度に対する至適濃度範囲が存在する状況、また、トルエン分解菌以外に由来するバイオフィリアクタントの存在でもトルエンガス除去速度が向上する状況が観察された。

本研究の計画段階では、体外分泌物による「ぬれ性状」などの液相の物性変化や、液膜におけるガスの物質移動特性の計測等を実施する予定であったが、単離株の活性低下に伴う微生物の培養方法の変更により、実験内容を変更した。したがって研究成果も、トルエンガス除去に有利なタンパク質の分子量分画の選定や、トルエン分解菌以外のバイオフィリアクタントによるトルエンガス除去速度向上効果など、限られた成果であった。しかしこれらの成果はいずれも、ガス状の VOC 成分の生物処理において、微生物の体外分泌物による物性変化（生物学的分解効果ではなく）がガス除去効果に影響を及ぼしていることを強く示唆するものであった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Mansooria Ahmad Masoud, Higuchi Takashi	4. 巻 5
2. 論文標題 Estimating the formation and thickness of a liquid layer on the surface of a packing material in biofiltration and their effects on gaseous toluene removal	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Biochemical Engineering	6. 最初と最後の頁 34 ~ 41
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2174/2212711906666181120125211	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高森晴登, 樋口能士
2. 発表標題 硝酸を用いた生物脱臭装置の菌体制御
3. 学会等名 第32回におい・かおり環境学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (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
---------	---------