

機関番号：10103
 研究種目：基盤（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20580361
 研究課題名（和文） 亜臨界水と微生物の段階反応による農水産有機廃棄物脱重金属の分子機構と資源化
 研究課題名（英文） Studies on molecular mechanisms of agricultural or fisheries waste in a sequential sub-critical and microbial treatment for resources.
 研究代表者 菊池 慎太郎
 (KIKUCHI, SHINTARO)
 室蘭工業大学・大学院工学研究科・教授
 研究者番号：70148691

研究成果の概要（和文）：

水産物の非可食部や農産物加工で排出される残渣には有用物質が多量に存在するものの、前者（水産廃棄物）には有害重金属が共存し、あるいは後者（農産廃棄物）中の有用物質の化学構造が強固であるために単一技術による資源化が困難であった。しかし、これらの農水産廃棄物を亜臨界と微生物によって段階的に処理したところ、前者に存在する有害重金属が除去されて飼肥料へ転換することが可能であり、また後者の強固な化学構造の崩壊がもたらされてバイオエタノール生産原料とすることが可能であった。

研究成果の概要（英文）：

Various useful materials are contained in fisheries and agricultural waste. It has been, however, difficult to transform of the waste into resources, because the former one contain toxic heavy-metals bound tightly to heavy-metal-binding proteins or the latter one were constituted of chemically rigid structures caused by inorganic salts, respectively. During a sequential treatment of the waste with sub-critical conditions and microorganisms, toxic metals in fisheries one were released as free-ion forms and rigid structures in agricultural one were destroyed to fermentable mono-saccharides. These results suggested that fisheries and agricultural waste could transform to resources like feed for cattle and ethanol, respectively, by the sequential treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：環境・資源

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：農水産廃棄物，資源転換，亜臨界，微生物

1. 研究開始当初の背景

(1) 環境や資源に関する諸問題が社会的に認識されるようになり、資源やエネルギー再

生に関する科学的研究と技術開発が求められている状況にある。

(2) このような観点から、例えばバイオマ

スからエネルギー源としてのバイオエタノール生産も行われているが、食糧クライシスをはじめとする様々な問題も派生するに至った。

(3) 他方、農水産物の非可食部や、これらの加工に伴って排出される残渣は、農水産有機廃棄物として埋め立て等によって廃棄されている。

(4) 例えばホタテガイ中腸腺などの水産物非可食部には核酸系物質やアミノ酸などが多量に存在するものの、カドミウムをはじめとする有害重金属が多量に含まれ、あるいは馬鈴薯澱粉製造残渣などの農産加工残渣は多糖類を主成分とするものの、それらが無機塩類で強固に架橋されているため詳細な分子構造が不明であり、これらが酵素処理などの従来技術による農水産有機廃棄物の利用を困難としている要因であった。

2. 研究の目的

「1. 研究開始当初の背景」における論旨からすれば、水産廃棄物を創出の容易な亜臨界処理によって農水産廃棄物を処理し、水産廃棄物において重金属を覆うタンパク質皮膜を低分子化して重金属を遊離イオンとして除去し、あるいは多糖類間の無機塩架橋を破壊するならば、以後の微生物処理が容易となり、これら廃棄物の資源転換が期待される。

以上から本研究は亜臨界と微生物の段階的処理による農水産有機廃棄物の資源化と、その分子機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) モデル水産廃棄物として養殖ホタテガイ (*Patinopecten yessoensis*) 非可食部(中腸腺)を、またモデル農産廃棄物として馬鈴薯澱粉製造残渣(固形分及び液分)を用いた。

(2) なお前者(ホタテガイ中腸腺)は高濃度の核酸系物質、タンパク質及びエイコサペンタエン酸などの有用物質を含有するものの、同時にカドミウムなどの有害重金属も含有するため食用としては不相当であり、毎年20万トン以上の組織が廃棄されている。他方、後者(馬鈴薯澱粉製造残渣)の液分には未搾絞の澱粉や単糖類が残存し、また固形分はセルロースを主成分とするものの、セルロース繊維がリン酸等の無機塩類で強固に架橋されているため酵素処理(セルラーゼなど)で単糖化することが困難であり、毎年、40万トン以上の固形分が廃棄されている。

(3) 以上から、モデル水産廃棄物(ホタテガイ中腸腺)を亜臨界処理して有害重金属を遊離イオンとし、次いで硫酸イオン存在下に硫酸塩還元菌で処理した。すなわち、この微生物が生成する硫化水素が遊離重金属と反応して不溶性の硫化重金属を形成し、結果的に水産廃棄物中の重金属は反応系から除去

される。

(4) 他方、後者(馬鈴薯澱粉製造残渣)固形分を上記(3)と同様に亜臨界処理して無機塩類による架橋構造を破壊し、次いでセルラーゼ分泌微生物によって糖化し、さらにビール酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)でエタノール発酵して農産廃棄物をエタノールへ転換した。また前述のように、馬鈴薯澱粉製造液分には微生物の炭素栄養源(糖類)のほか、窒素栄養源(タンパク質、アミノ酸)及び微量元素類が存在することから、液分をセルラーゼ分泌生産微生物、並びに *S. cerevisiae* 発酵時の増殖培地として利用し、バイオエタノールの段階的連続生産を行った。

4. 研究成果

(1) モデル水産廃棄物(ホタテガイ中腸腺)を「3. 研究の方法 (3) 項」に記載のように亜臨界処理したところ、いずれの地域で収穫されたホタテガイにおいても中腸腺においてメタロチオネインなどの重金属結合タンパク質と結合して存在するすべての重金属がイオンとして遊離した(図1)。

(2) 次いで、これらの容液(亜臨界処理した中腸腺懸濁液)に硫酸還元菌(*Desulfovibrio* 属の2株)を接種して培養したところ、いずれの硫酸還元菌も良好に増殖し、また増殖に伴って遊離重金属イオンは硫化物沈殿を形成した(図2)。特にこれら2株中の1株(図2ではB株と表記)を用いた場合、いずれの地域から採取した被検水産廃棄物中のすべての重金属類が硫化金属を形成した。

(3) さらに重金属の硫化物沈殿を遠心分離して除き乾燥した標品の組成を調べたところ、市販飼肥料と同等あるいはそれ以上の有用物質が存在し、モデル水産廃棄物を亜臨界処理と微生物で段階的に処理することによる資源転換が可能であることが明らかとなった(表1)。

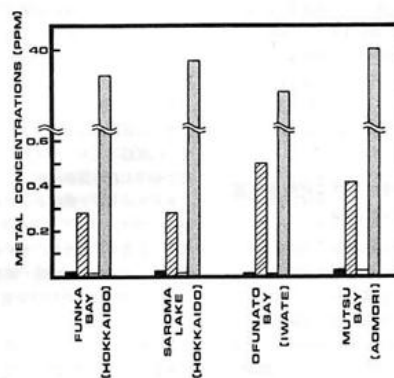


図1 亜臨界処理による重金属の遊離

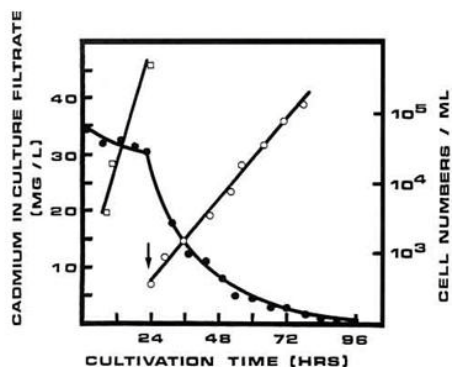


図2 中腸腺の亜臨界処理容液における硫酸還元菌の増殖(□: A株, ○: B株を矢印の時間に接種)とカドミウム濃度の減少(●).

表1 成果物の評価

	粗タンパク質	粗脂質	粗繊維質
	(乾燥標品の重量パーセント)		
除カドミウム中腸腺飼料 (本試験による標品)	77.5	19.6	1.1
魚粉飼料(市販品)	85.2	9.1	0.9
ミートボーンミール(市販品)	61.9	6.4	0.8
オキアミミール(市販品)	50.2	4.8	2.5

(4) 他方, モデル農産廃棄物(馬鈴薯澱粉製造残渣: 液分)を培地として *Bacillus* 属の1菌株(未同定, Biosci. Biotech. Biochem., 56(9) 1434-1438(1992), 及び 57(5) 845-846, いずれも KIKUCHI ら)は良好に増殖し, また増殖に伴ってセルラーゼ分解酵素を分泌した。

(5) またモデル農産廃棄物(馬鈴薯澱粉製造残渣: 固形分)を 220°Cで 10分間亜臨界処理した後に上記(3)で述べたセルラーゼ分泌微生物で処理すると, これら酵素あるいは微生物のみで処理した場合に比較して糖化率は大きく上昇した(図3)。

(6) この結果は, 亜臨界処理によってモデル農産廃棄物の多糖類間の架橋構造が破壊されたことを示唆するものである。

(7) 亜臨界処理したモデル農産廃棄物の固形分と液分を混合し, これにセルラーゼ分泌 *Bacillus* 属微生物と *Saccharomyces cerevisiae* を接種して培養したところ, この細菌は良好に増殖するとともに高活性のセルラーゼを分泌して農産廃棄物(固形分)の多糖類を発酵性糖類(グルコース及びガラクトース)に糖化し, さらに *S. cerevisiae* はこれら発酵性糖類を発酵基質として対糖モル収率に一致するエタノールが生産された(図4)。

(8) 以上の結果はモデル農産廃棄物を亜臨界処理と微生物で段階的に処理することによって, これを段階的に資源へ転換することが可能であることを示す(図4)。

(9) また, 以上の結果は実験室規模(200ML

規模)で得られた成果であるが, 実験規模を実地試験規模に拡大した場合にも同様の成果が報告されている(竹中工務店技術研究所)。

(10) なお馬鈴薯澱粉製造残渣(固形分)の亜臨界処理による架橋構造崩壊の分子科学的詳細は不明である。

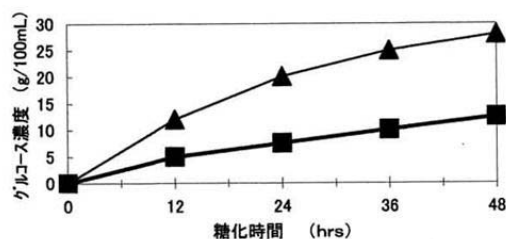


図3 亜臨界処理の効果

縦軸は単糖類(グルコース及びガラクトース)の濃度を示す(g-単糖類/100g-残渣(固形分)). ■: セルラーゼ分泌微生物のみで糖化, ◆: 亜臨界処理後にセルラーゼ分泌微生物で糖化

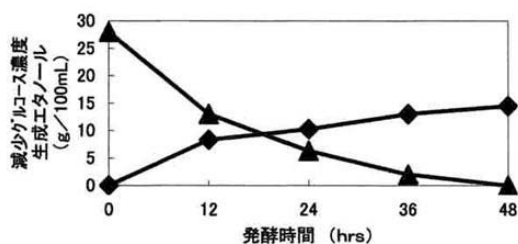


図4 農産廃棄物残渣からのエタノール生産
縦軸は単糖類(グルコース及びガラクトース)の濃度変化(■), あるいは生成エタノール濃度(▲)を示す(いずれも g/L).

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 13 件)

① Young-Choel Chang, Kaori Ikeutsu, Tadashi Toyama, DiBok Choi, Shintaro Kikuchi, Isolation and characterization of tetrachloroethylene and cis-1,2-dichloroethylene dechlorinating propionibacteria, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 査読有, 2011, online ed., 総頁数 11

② Tadashi Toyama, Tetsuya Furukawa, Noritake Maeda, Daisuke Inoue, Kazunari sei, Kazuhiro Mori, Shintaro Kikuchi, Michihiko Ike, Accelerated biodegradation of pyrene and benzo[a]pyrene in *Phragmites australis* rhizosphere by bacteria-root exudates interactions, Water Research, 査

読有, 2011, Vol.45, 1629-1638

③ Young-Choel Chang, Andrew A. Randall, Shintaro Kikuchi, Influence of disinfection on bacterial regrowth in pilot distribution system, Korean Journal of Chemical Engineering, 査読有, 2010, Vol.27, 1860-1863

④ Young C. Chang, Chan-Koo Park, Shintaro Kikuchi, Dechlorination of high concentrations of tetrachloroethylene using a fixed-bed reactor, Journal of Environmental and Health Science 2010, 査読有, 2010 ed., 323-336

⑤ Tadshi Toyama, Naonori Momotani, Yuko Ogata, Daisuke Inoue, Kazunari Sei, Kazuhiro Mori, Shintaro Kikuchi, Isolation and characterization of 4-*tert*-butylphenol-utilizing *Sphingobium fuliginis* from *Phragmites australis* rhizosphere sediment, Applied and Environmental Microbiology, 査読有, 2010, Vol.76, 6733-6740

⑥ 張俗喆、金智殷、北川孝幸、入来院昌彦、菊池慎太郎、乳酸菌による CCA 防汚処理木材中の重金属溶出、環境技術学、査読有、2010、39 巻、605-610

⑦ Tadashi Toyama, Noriko Maeda, Manabu Murashita, Young-Choel Chang, Shintaro Kikuchi, Isolation and characterization of a novel 2-sec-butylphenol-degrading bacterium sp. strain MS-1, Biodegradation (on-line ed.), 査読有, 2010, on-line ed., 総頁数 9

⑧ T.Toyama, K.Sei, N.Yu, H.Kumura, D.Inpue, H.Hang, S.Soda, Y.Chang, S.Kikuchi, M.Fujita, M.Ike, Enrichment of bacteria possessing catechol deoxygenase genes in the rhizosphere of *Spirodela polyrrhiza*, Water Research, 査読有, 2009, Vol.43, 3765-3766

⑨ T.toyama, Y.Sato, D.Inoue, Y.Chang, Shintaro Kikuchi, Biodegradation of bisphenol A and bisphenol F in the rhizosphere sediment of *Phragmites australis*, Journal of Bioscience and Biotechnology, 査読有, 2009, Vol.108, 147-150

⑩ 菊池慎太郎、微生物を利用する石油系燃料油汚染土壌の浄化—特に寒冷地に適用できる技術—、環境資源工学、査読有、2009、56 巻、86-92

⑪ 北山茂一、原宏哉、岩城美朝、長里千賀子、本村泰三、遠山忠、張俗喆、菊池慎太郎、石油系燃料油汚染土壌のバイオレメディエーション、環境技術、査読有、2009、38 巻、276-282

⑫ Y.C.Chang, Shintaro Kikuchi, Noriko

Kawauchi, Takeshi Saito, Kazuhiro Takamizawa, Complete dechlorination of tetrachloroethylene by use of anaerobic *Clostridium bifermentans* DOH-1 and zero-valent iron, Environmental Technology, 査読有, 2008, Vol.29, 381-391
⑬ 張俗喆、遠山忠、A.A.Randall、菊池慎太郎、高見澤一裕、水道管材料が微生物膜形成に及ぼす影響、環境技術、査読有、2008、36 巻、743-746

[学会発表] (計 16 件)

① 小笠原典之、宮越拓郎、湯口実、チャン・ヨンチョル、菊池慎太郎、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸不 1000 回菌の分解特性、第 62 回日本生物工学会大会、2010. 10.27 (宮崎市)

② 高田和紀、福富康平、宮森侑司、チャン・ヨンチョル、菊池慎太郎、活性汚泥から分離したビフェニル分解菌の特性、第 62 回日本生物工学会大会、2010. 10.27 (宮崎市)

③ チャン・ヨンチョル、キム・イジュン、北川孝幸、入来院昌彦、菊池慎太郎、乳酸菌による CCA 防汚木材中の重金属溶出、第 62 回日本生物工学会大会、2010. 10.27 (宮崎市)

④ Young-Cheol Chang, Tadashi Toyama, Shintaro Kikuchi, Isolation and characterization of two tetrachloroethylene-degrading, *cis*-1,2-dichloroethylene-degrading Propionibacteria, 1st forum on studies of the Environmental & Public Health Issues in Asian Mega-cities, 2009.12.4 (韓国ソウル特別市)

⑤ 村下学、小林一崇、遠山忠、張俗喆、菊池慎太郎、新規ノニルフェノール分解菌の分離とその特徴づけ、第 46 回日本水処理生物学会大会、2009.11.2 (大阪市)

⑥ 張俗喆、羽生 大輔、神保 和倫、遠山 忠、菊池 慎太郎、二種の PCE 及び *cis*-DCE 分解菌 Propionibacteria の分離とその特性、日本生物工学会、第 61 回生物工学会大会、2009. 9.23 (名古屋市)

⑦ 遠山忠、井上大介、清和成、張俗喆、菊池慎太郎、池道彦、ヨシの根圏から分離したノニルフェノール分解菌の特徴づけ、第 61 回生物工学会大会、2009.9.23 (名古屋市)

⑧ Yamada, Y, Toyama T., Chang YC and Kikuchi S, Isolation and characterization of 2,4-D herbicide-degrading bacterium, *Cupriavidus oxalatic* Y1, Joint seminar on environmental science and disaster mitigation research, 2009.3.13 (室蘭市)

⑨ Habu D, Kawamorita T, Toyama T, Chang YC, Kikuchi S, Isolation and characterization of a new tetrachloroethylene(PCE)-degrading bacterium, *Propionibacterium* sp. HK1 Joint seminar on environmental science and disaster

mitigation research, 2009.3.13 (室蘭市)

⑩ Manabu Murashita, Noritaka Maeda, Tadashi Toyama, Young-Cheol Chang, Shintaro Kikuchi, Degradation of 2-sec-butylphenol by *Pseudomonas putida* strain MS-1 isolated from rhizosphere of *Phragmites australis*, Joint seminar on environmental science and disaster mitigation research, 2009.3.13 (室蘭市)

⑪ 前田憲孝、遠山忠、チャン・ヨンチョル、菊池慎太郎、ヨシ根圏から分離した 2-sec-ブチルフェノール分解菌の特性、第 45 回日本水処理生物学会、2008.11.12 (秋田市)

⑫ 遠山忠、古川哲也、前田清隆、清和成、池道彦、チャン・ヨンチョル、菊池慎太郎、ヨシ根圏におけるビスフェノール A の分解、第 45 回日本水処理生物学会、2008.11.12 (秋田市)

⑬ 遠山忠、古川哲也、前田清隆、清和成、池道彦、チャン・ヨンチョル、菊池慎太郎、ヨシ根圏におけるピレン及びベンゾ[a]ピレンの分解、第 45 回日本水処理生物学会、2008.11.12 (秋田市)

⑭ 遠山忠、チャン・ヨンチョル、菊池慎太郎、低温下で重質油分解する微生物の分離と特徴、環境技術学会、2008.9.19 (大阪市)

⑮ 遠山忠、井上大介、清和成、チャン・ヨンチョル、池道彦、菊池慎太郎、ヨシ根圏における 4-*n*-ブチルフェノール分解と 4-*tert*-ブチルフェノール分解菌の集積、第 60 回日本生物工学会年次大会、2008.8.7 (仙台市)

⑯ 佐藤雄介、遠山忠、チャン・ヨンチョル、菊池慎太郎、ヨシ根圏からのビスフェノール分解菌の分離とその特性、日本農芸化学会北海道支部・日本生物工学会東日本支部合同学術講演会、2008.7.8 (札幌市)

[図書] (計 1 件)

菊池慎太郎、青江誠一郎編著、はじめての生命科学、三共出版株式会社 2009、101

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊池 慎太郎 (KIKUCHI SHINTARO)
室蘭工業大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：70148691

(2) 研究分担者

該当なし