建設技術研究開発費補助金総合研究報告書

- 1. 課題番号 第2号
- 2. 研究課題名 電力・バイオプラスチック生産型下水汚泥処理システムの開発
- 3. 研究期間 平成19年度~平成21年度

4. 代表者及び研究代表者、分担研究者

代表者	岡部 聡	北海道大学大学院工学研究科·教授
研究代表者	岡部 聡	北海道大学大学院工学研究科·教授
分担研究者	伊藤 竜生	北海道大学大学院工学研究科·助教

 5. 補助金交付総額

3,900,000 円

研究・技術開発の目的

バイオ燃料電池の開発

第1章

序論

1.1 研究背景

現在まで廃水に含まれる有機成分からのエネルギー回収手法として、嫌気性硝化によるメタ ン・水素への転換、汚泥の脱水・乾燥による固形燃料化が検討されてきた。しかし、いずれの方 法でも残渣処理に問題があり、メタンや固形燃料を燃焼し電気を取り出す場合、熱エネルギーの うち20~40%しか電気エネルギーとして回収できなかった。そこで廃水中の有機成分から電気エネ ルギーを直接回収する装置として、バイオ燃料電池 (Microbial fuel cells; MFC)が注目を集め るようになってきた。MFCとは微生物の触媒反応により有機成分の持つ化学エネルギーを電気エ ネルギーに直接変換する装置である^{1),2)}。MFCは廃水処理と発電を同時に行い、余剰汚泥生産 量を減少させ、高いエネルギー回収率を持つ。一方、電気産生量が非常に小さいという欠点を持 ち、実用可能な発電システムになるには1万倍から100万倍の効率化が必要とされてきた。しかし、 近年技術改良が進み、その発電効率と発電力が飛躍的に伸びており、MFCの実用化の可能性 が見えてきた。現在までの技術的な発展は材料となる電極の改良、イオン交換膜の改良、そして 装置形状の改良によってもたらされたものである。一方で電気を産生する微生物触媒に関しての 研究は比較的遅れてきた。最近になり、電気を産生する微生物群集の中から微生物を単離し、 発電性が調査され、発電性微生物種の存在が報告されてきている。

1.2 MFCの概要

MFCの発電原理を図 1.1に示す。



図 1.1 MFCの発電原理

Anode(負極)は嫌気条件下で基質、微生物、人工基質を入れた槽、Cathode(正極)は好気 条件下の槽である。負極 と正極の間は隔膜(陽イオン交換膜)で仕切られ、外部回路で繋げら れる。 負極槽において電極へと電子伝達をする微生物の触媒反応により、有機物から電子が 回収され、同時に水素イオンが生成される。回収された電子は負極から外部回路を通して正極 に、また水素イオンは隔膜を透過して正極槽へ移動し、それらが正極で酸素と反応し、電子を受 け取り、この過程で電力が生じる。各電極での代表的な反応を以下に示す。

負極

 $C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 4H_2 + 2CO_2 + 2CH_3COOH(1)$

正極

 $O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O(2)$

従来のMFCでは微生物から電極へ電子を伝達するため、外来的に電子伝達剤(メディエータ) が添加される必要があると考えられてきた。しかし、それらの物質は微生物の細胞膜に浸透する ためいずれも有害であり、廃水処理にメディエータを添加したMFCを適用することは非現実的で あると考えられてきた。しかし近年海底底泥や水田低泥、廃水処理で用いられた汚泥中に、メデ ィエータの添加が不要な微生物の存在が確認されてきた。近年、微生物自体が内在的なメディ エータを持つ可能性が示唆され、負極での微生物の電子伝達メカニズムは次の3つの機構から なると考えられている^{3),4)}。

(i)負極に付着した微生物の細胞壁に存在するマトリックスを介した直接電子伝達 電極へ付着した微生物の電子伝達系に存在する酵素による電子の電極への直接伝達であり、 この機構が電子伝達の主要な過程と考えられている。この機構では電極表面積によって伝達の 影響を受ける。 (ii)微生物が分泌したメディエータによる電子伝達

電子が電子伝達系の酸化還元酵素から酸化体メディエータへ伝達された後、電極表面へ移動 した還元体メディエータから電極へ伝達する機構である。メディエータは酸化体に戻り、繰り返し 微生物細胞内での電子の受け取りと電極表面での伝達を行う。電極に付着する必要がないた め、電極表面積の影響を受けない。しかし、連続運転を行う場合、分泌されたメディエータが装置 から流出していくため、下水処理系でMFCを適用する際、本機構は合理的ではないと考えられる。 メディエータを分泌する微生物には、Shewanella putrefaciens、Pseudomonas aeruginosaが挙げ られる。

(iii)微生物から伸びた伝導性ナノワイヤーによる電子伝達

微生物から伸びた細長い紐状フィラメントはナノワイヤーと呼ばれ負極槽での電子伝達に関与していると考えられている^{5),6),7)}。ナノワイヤーはscanning electron micrograph(SEM)で観測され、 Shewanella oneidenis MR-1では伝導性のケーブル状フィラメントであるナノワイヤーの束が見られる。ここでナノワイヤーは微生物間、微生物と電極間両方で繋がっていることが確認される。 Shewanelle oneidenis MR-1をscanning tunneling microscopy (STM)で観測するとフィラメントの 電気伝導性が発見される。微生物群集の中ではShewanella,Geobacterの両種がナノワイヤーを 持つことが確認され、両種共に電気化学的活性が報告されており、ナノワイヤーによる電子伝達 が示唆される。

1.3 MFCの長所、短所

長所

- ・MFCを下水処理施設に適用した場合、廃水処理と発電を同時に行う。
- ・廃水中の有機成分を利用する事から余剰汚泥生成量を減少させ、汚泥洗浄コストを削減する。既往の研究によるとMFCの余剰汚泥生成量は0.07~0.22 g biomass COD/g substrate COD であり、従来の標準活性汚泥法での約0.4 g biomass COD/g substrate COD と比較しても低い値を示した⁸⁾。余剰汚泥発生量の減少は余剰汚泥処理コストの削減に繋がる。日本の産業廃棄物の中で、余剰汚泥は約1億9316万トン(全体の47.7%)と最も排出量が多く、その処分コストは膨大であるため、余剰汚泥処理コストの削減は大きな価値を持つ。
- ・基質から直接エネルギー生産を行う。MFCは基質のエネルギーを直接電気エネルギーに転換しているためエネルギー転換効率が高い。容易に生分解を受ける基質を用いた場合、MFCでのエネルギー効率は50%以上である^{9),10)}。その他の機関エネルギー効率は水蒸気タービン:40%、ディーゼル機関:30%、ガソリン機関:25%、太陽電池:15%であり¹¹⁾、これらと比較しMFCは効率的な発電を行っていると考えられる。
- ・室温で運転が可能。

・生産されるガスが微生物の呼吸による二酸化炭素であり、処理を必要としない。

短所

- ・現在このシステムによって得られるエネルギーは内部抵抗により強く制限を受け、実用可能 な電力密度は得られていない。
- ・負極における微生物群集の知見の不足。
- ・実廃水を利用した場合、発生する電力が低い。MFCを家畜廃水、精肉処理工場廃水など 様々な廃水から利用を試みたところ、いずれも廃水中の有機成分から電力回収が可能で

あったが、多様な有機物の混合物である廃水を利用した場合、純物質を利用した場合と比べ、最大電力密度が劣ることが確認されている。

1.4 MFCの電気エネルギー回収に影響を及ぼす要因

MFCの電気エネルギー回収に影響を及ぼす要因として装置的要因、生物学的要因があげられる。

装置的要因

(1) 電極

電極には炭素素材が多く用いられ、固形状の graphite plates、rods、granules、繊維状の graphite felt、cloth、paper などがある。繊維状素材を用いると正味の表面積が大きくなり、負 極では微生物が付着する部分が、正極では酸素が反応する面積が広くなり発電性能の向上 が確認されている。他の優れた電極として白金も研究でよく用いられている。白金を正極に用 いることで発電性能は向上するが、高価であるため他素材に含有させて使用される。白金最 低必要量が検討された結果、白金含有量は正電極表面積あたり、0.1 mg/cm² にまで削減で きることが確認されている。白金以外の安価な触媒としてコバルト素材を利用した正極の性能 も研究され白金に近い性能が得られている。また、Fe(町)や Mn(IV)を含む改質炭素電極も作 成され、いずれも発電性能が向上することが確認されている。負極と正極の間隔は内部抵抗 に影響を及ぼすことが確認され、間隔が近い方が内部抵抗の低下に繋がり最大電力を増加 させる。しかし近づけすぎると短絡が生じ、正極からの酸素の流入により負極の微生物へ悪影 響をもたらすといった可能性も考えられている。

(2) 隔膜

多くの研究で陽イオン交換膜 (Proton Exchange Membrane; PEM)として、Nafionが用いられ ている。また、Ultrex CMI-7000もMFCに適した膜であり、コスト面ではNafionよりも優れている。 ー方、コスト低減を目指し、陶土から作られた磁器を隔膜として用いている報告もある。 隔膜は酸素の負極槽への流入を防ぐために必要であり、水素イオンを特異的に透過させる。 膜面積を大きくすることで透過する水素イオン量が増え、内部抵抗を減少させることに繋がる が、正極から負極への酸素の透過が増え、酸素が負極で電極のかわりに電子受容体として働 き、発電効率の低下に繋がると考えられる。よって最適な膜面積については今後も研究が必 要である。

(3) リアクター構造

MFCではこれまで二槽型リアクターが広く用いられてきた。二槽型では、正極が溶液に存在す るため、爆気等によって酸素を供給し、H⁺を消費する必要があり、酸素の溶液への溶解が反 応律速となる場合もある。しかし、爆気量を過剰に増加させると、酸素が隔膜を透過して負極 槽へ移動し、発電性能を低下させることが確認されている。一方、フェリシアン化カリウムの添 加によって、正極でH⁺の消費を加速させ、白金を含む炭素素材の正極よりも発電性能を向上 できるという例も報告された。一槽型リアクターには、正極が空気と直接接触する形式と、装置 から膜を除き、ガラスウール、ガラス玉を用いた形式がある。正極が空気と直接接触する形式 は酸素が電極と直接反応するため、運転時に爆気を行う必要がなく、運転コストの低下に繋 がる。さらに、酸素の水への溶解が反応律速にならないという利点も有している。また、内部抵 抗が低いことから二槽型リアクターよりも発電性能が向上することが確認されている。 生物学的要因

(1) 負極槽中の電子受容体

負極槽中に電子受容体が存在すると、微生物は電極ではなく電子受容体に電子を伝達する ため発電性能が低下することが確認されている。これは電子受容体が負極槽中で還元され、 電極への電子伝達を阻害しているためだと考えられる。下水中に含まれるNO²⁻、NO³⁻等の物 質が電子受容体として作用することで発電効率を下げる可能性が考えられる。

(2) 基質

基質は酢酸、グルコース、システイン、エタノール等の純物質、及び家庭廃水に含まれる有機 混合物が用いられる。これらの物質は全て生物分解性であれば電力が得られると考えられて いる。しかし有機混合物を用いた場合、純物質を用いた時に比べ電力密度が低い値しか得ら れていない。これは有機混合物中に前述の電子受容体が含まれており電極への電子伝達を 阻害しているためだと考えられる。また、基質によって負極に集積される微生物群集に差が生 じることが分かっており、MFCによる電力回収に利用できる基質にも差異が生じることがわかっ ている。

1.5 研究目的

現在MFCに使用されている微生物のほとんどが複合微生物群集であり、電気の産生に関し どの微生物種が関与しているかは解明されていなかった¹²⁾。しかし、最近になり電気産生微生 物群集から微生物を単離し調査することで、様々な電気産生微生物の存在が報告されてきた (表1.1)^{13),14),15),16),17)}。

Genus	Strain	Source*	Taxonomy (phylum/class)	Terminal electron mediator	redox shuttle	Power generation ^c
Ochrobactrium anthropi	YZ-1	с	Alphaproteobacteria	?	?	89 mW/m ²
Rhodopseudomonas palustris	DX-1	с	Alphaproteobacteria	?	?	1170 mW/m ²
Rhodoferax ferrireducens	T118	I	Betaproteobacteria	?	?	74 mA/m^2
Geobacter sulfurreducens	PCA	I	Deltaproteobacteria	c-type cytochrome	nanowire	3147 mA/m ²
Geobacter metallireducens	GS-15	I	Deltaproteobacteria	?	?	0.67 mA
Desulfobulbus propionicus	DSM2032	I	Deltaproteobacteria	?	?	28 mA/m^2
Desulfuromonas acetoxidans	т	I	Deltaproteobacteria	?	?	14 mW/m ²
Geopsychrobacter electrodiphilu	s A 1	с	Deltaproteobacteria	?	?	8.89 mA/cm ²
Pseudomonas aeruginosa	KRP1	с	Deltaproteobacteria	?	pyocyanin	23.3 mW/m ²
Enterococcus sp. ^b	KRA3	с	Firmicutes	?	(pyocyanin) ^b	28.4 mW/m ²
Aeromonas hydrophila	PA3	С	Gammaproteobacteria	c-type cytochrome	?	0.2 mA
Shewanella oneidensis	MR-1	I	Gammaproteobacteria	c-type cytochrome	nanowire/riboflavir	138 mA/m ²
Shewanella oneidensis	DSP-10	I	Gammaproteobacteria	?	?	100 mA/m ²
Shewanella sp.	MR-4	I	Gammaproteobacteria	? .	riboflavin	150 mA/m ²
Klebsiella oxytoca	GEB-1	с	Gammaproteobacteria	?	?	0.19 mA
evolved Escherichia coli ^d	K12	1	Gammaproteobacteria	?	hydroquinon	1300 mW/m ²
Pseudomonas sp.	CMR12a	I	Gammaproteobacteria	?	phenazine	9 µA
Brevibacillus sp. ^b	PTH1	с	Firmicutes	?	(phenazine) ^b	10 µA
Geothrix fermentans	т	I	Acidobacteria	?	self-produced	97 mA/m ²
Clostridium butyricum	EG3	с	Firmicutes	?	?	0.22 mA
Synechocystis sp.	PCC6803	I	Cyanobacteria	?	nanowire	N/A

表1.1 現在までに報告されている電気産生微生物

脚注) a. I: 既知の単離された鉄還元菌をMFCに適用C: MFCから単離された微生物株

- b. 他の微生物の放出するエレクトロンシャトルを使って電気産生する
- c. 論文から引用した電力産生値(電流mA、電力密度mA/m²、電力密度mW/m²)
- d. 大腸菌にシャトル産生遺伝子を導入



図1.2 現在までに報告された電気産生微生物の分子系統樹

現在報告されている電気産生微生物のほとんどはProteobacteria門に属しているが、 Firmicutes、Acidobacteria、Cyanobacteria門等に属する微生物も知られている。本研究では これらの研究と同様に、微生物群集から微生物を単離し、電気産生能力を調査することを目 的とした。

第1章 序論

1.1 食品廃棄物処理の現状と課題

2000年6月7日に「食品循環資源の再生利用等の促進に関する法律」(通称「食品リサイクル 法」)が公布され、2001年5月1日に施行された。この法律の趣旨は「食品の売れ残りや食べ残 しにより、又は食品の製造過程において大量に発生している食品廃棄物について、発生抑制 と減量化により最終的に処分される量を減少させるとともに、飼料や肥料等の原材料として再 生利用するため、食品関係事業者(製造、流通、外食等)による食品循環資源の再生利用等 を促進する。」というものである。食品廃棄物は食品製造業(食料品製造業、清涼飲料製造業 など)から発生する場合は産業廃棄物、食品卸売業(飲食料品卸売業など)、食品小売業(飲 食料品小売業など)、外食産業(一般飲食店、ホテルなど)及び一般家庭から発生する場合は 一般廃棄物に分類される。

農林水産省大臣官房統計部による2007年食品循環資源の再生利用等実態調査結果の概 要によると食品産業(食品製造業、食品卸売業、食品小売業、外食産業)における2006年度 の食品廃棄物等の年間発生量は1135万2千トンで前年度と比べ1万トン減少し、食品循環資 源の再生利用率は食品産業全体では59%で、前年度並であったと報告されている。食品廃 棄物等の年間発生量1135万2モトンを業種別の割合でみると、食品製造業が494万7モトン で年間発生量全体の44%を占め、外食産業が304万2千トンで27%、食品小売業が262万トン で23%、食品卸売業が74万3千トンで7%を占めている。食品循環資源の再生利用率を業種 別でみると、食品製造業が86%で最も高く、食品卸売業が68%、食品小売業が40%、外食産 業が31%となっている。食品リサイクル法で規定している用途 (肥料化、飼料化、メタン化及び 油脂・油脂製品化)に限定してみると、食品循環資源の再生利用率は食品産業全体で48% であった。業種別でみると、食品製造業が76%で最も高く、食品卸売業が59%、食品小売業 が29%、外食産業が16%と最も低かった。食品循環資源の再生利用の方法別仕向割合にお いては「委託による再生利用」が食品産業全体で92%を占めている。また再生利用の用途別 仕向量割合は、食品産業全体では「肥料化」の39%が最も高く、次いで「飼料化」の37%、「油 脂及び油脂製品化」が5%、「メタン化」が1%であった。食品循環資源として再生利用に取り組 んでいる事業所は、食品産業全体で38%となっており、業種別にみると食品製造業が58%で 最も高く、食品小売業が39%、外食産業が37%、食品卸売業が29%であった。再生利用を推 進するに当たっての課題としては、食品産業全体では「食品廃棄物等の保管場所の確保や 臭気対策」、「再生利用に要するコストの低減」、「異物の除去等分別の徹底」がそれぞれ 33%、28%、27%と高かった。

食品循環資源として再生利用に取り組んでいる事業者が食品産業全体で38%と少ないの は、再生利用に要するコストが高く、再生利用業者、再生利用施設、再生利用製品の利用 先等の確保が難しいためだと考えられる。この問題を解決するためには新規再生利用製品 に関する技術開発が必要である。

1.2 生分解性プラスチック

生分解性プラスチックは、一般的には「通常の使用状況下では一般のプラスチックと同様に 使用でき、使用後は自然界に生息する微生物などの働きにより分解し、最終的には二酸化炭 素(炭酸ガス)と水に変換され、自然に還るプラスチック」と定義される¹⁾。定義からもわかるよう に、汎用のプラスチックが意図せず環境中に排出された場合、永久的に残ることで引き起こさ れる生態系などへの種々の悪影響への対応として、「生分解」という機能を付与した環境配慮 型の素材である。また、分別排出・分別収集された場合には、生ゴミと一緒に堆肥化処理を可 能とする機能を有しており、さらには今後困難が予想される廃棄物処理場の確保の面からも、 ある所定の期間が経過すれば自然環境下で減容下が進行するなど、多くの新しいコンセプト を考慮に入れて開発されたプラスチック素材である。

この新しいプラスチックの設計思想のスタートは、天然の高分子の模倣である。ある種の微 生物は必要以上の炭素源を取り入れると、酵素の働きにより、これをポリエステル類に変えて、 栄養源として体内に貯蔵する。このポリエステルはその生産の由来からもわかるように、生体 適合性と生分解性を兼ね備えた高分子化合物である。最初の生分解性プラスチックの工業化 の試みは、このポリエステル類から始まった。

前述のように、生分解性プラスチックは、地球規模で大きな課題になっている循環型社会 構築を目指すための、多くの利点となる機能を具備した素材であるが、広く実用に供されるた めには、汎用のプラスチックに劣らない性質・性能・加工性などを兼ね備えることが必要である。 幸いプラスチック製品の性能改良は、長年の技術革新の努力により大きく進歩しており、その 技術成果を新しい素材である生分解性プラスチックに適応することにより、近年、広い用途分 野で商品化、実用化が拡大している。

生分解性プラスチックは、その製造方法で分類すると、①微生物がその体内に酵素の働き で蓄積するポリエステル系高分子、②植物や動物が作る天然高分子、③化学合成により作ら れる合成高分子、など多くの種類があるが²⁾、現在は製造コスト、汎用的な実用性の観点より、 ③の化学合成系の生分解性プラスチックが市場では注目されており、多くの分野で事業化の 動きが広がっている。①の微生物産生系の生分解性プラスチックとしては、糖などを原料として 微生物(バクテリアやカビ、藻類など)の体内に蓄積させるポリヒドロキシアルカン酸(PHA)と総 称される脂肪族ポリエステル系がある。②の天然物系としては、澱粉やセルロース、あるいは キトサンのような植物系を利用したものと、動物系生物資源(バイオマス)を利用したものがあり、 多くの場合、他の生分解性プラスチックと混ぜて使用される。③の化学合成系はモノマーと呼 ばれる化学物質を重合させるものであり、モノマーの種類・組み合わせ・分子量の調整など、 自由に設計できるため、多種多様な生分解性プラスチックが登場している。硬質系生分解性 プラスチックとしてはポリ乳酸(PLA)が注目されており、トウモロコシのような再生可能資源穀 物から抽出した澱粉をグルコースに変換し、さらに乳酸発酵して合成した乳酸をモノマーとして 用いる。軟質系生分解性プラスチックとしてはポリカプロラクトン(PCL)、ポリブチレンサクシネ ート(PBS)系統、ポリグリコール酸、ポリビニルアルコールなどが存在する。

バイオテクノロジーとの連携による新しい高分子材料の開拓という大きな方向の中で、地球 上の自然な物質循環に調和した社会を作り上げていくことは、人間社会における重要な義務 であるという認識が多くの人々に受け入れられている中、こうした要求に応えうる循環型社会 適合素材としての生分解性プラスチックの開発が、今まさに進んでいる。プラスチックの使用に おいて、重要な関心事であるリサイクルの問題についても、汎用のプラスチックと同様なカスケ ード型のリユースの実証が進められているほかに、ポリエステル系で解重合が起こりやすいと いう特徴をうまく生かした各種のケミカルリサイクルの提言もなされている。

1.3 ポリヒドロキシアルカン酸(PHA)

食品廃棄物は生分解性が高く栄養成分を含むため、微生物を用いた資源化が可能である。 その代表的な方法として肥料化、堆肥化が挙げられるが、本研究では生分解性プラスチックと しての資源化に注目した。

微生物が合成する生分解性プラスチックは一般にポリヒドロキシアルカン酸(PHA)と呼ばれる。 PHAは、数多くの微生物が細胞内に蓄積するエネルギー貯蔵物質である。窒素源や無機塩 類などを欠乏させて微生物の増殖を制限した場合にPHAの蓄積が促進される。基本的なPHA の構造を図1-1に示す。PHAはヒドロキシアルカン酸(HA)をモノマーユニットとする高重合ポリ マーであり、現在では90種類以上のモノマーユニットが同定されている³⁾。多くは(R)-3-ヒドロキ シアルカン酸(3HA)から成るが、その側鎖に直鎖、枝分かれ、飽和、不飽和構造を保持し、芳 香環を含むものもある。このポリエステルは熱可塑性を持ち、好気、嫌気いずれの条件でも分 解するという優れた生分解性を示す。また、再生可能な資源である糖や植物油から発酵法に より生産できるため、持続可能な生分解性プラスチック材料として注目されている。炭素源化 合物や培養条件を変えることで現在150種近くの化学構造の異なるPHAが微生物により合成 されている⁴⁾。



図1-1 ポリ3-ヒドロキシアルカン酸の基本的な構造

もっとも典型的なポリエステルは炭素数4(RがCH₃)の3-ヒドロキシ酪酸(3HB)をモノマーと するポリヒドロキシ酪酸(PHB)である。PHBは、水素細菌、窒素固定菌、光合成細菌など100 種類以上の原核生物によって、糖、有機酸、炭酸ガスなどの炭素源から合成される(図1-2)。 微生物は、炭素源を細胞膜より取り込み、さまざまな代謝系を経由してアセチル-CoAを作る。 一般に、アセチル-CoAはトリカルボン酸(TCA)回路に取り込まれ、微生物が生きていくための 必要なエネルギーを得るために使われるが、過剰に存在すると、3つの酵素の作用によりPHB へと変換される。まず、過剰に生じたアセチル-CoAはβ-ケトチオラーゼによりアセトアセチル-CoAに変換され、次いで、アセトアセチル-CoAレダクターゼによってD-(-)-3-ヒドロキシブチリ ル-CoAに還元される。最後に、PHAシンターゼによりD-(-)-3-ヒドロキシブチリル-CoAが重合 されPHBが合成される。飢餓状態でおきるPHBの分解の経路は合成とは逆方向で、ポリエステ ルはデポリメラーゼの働きにより、オリゴマー、モノマーへと分解される⁵⁾。モノマーの3HBは、ア セト酢酸を経てアセトアセチルCoAを生じ、エネルギー源として代謝される。自然界においては、 PHBが加水分解を受けることはほとんどない。分解微生物が、加水分解酵素を菌体外に分泌 し、ポリエステルを水溶性のモノマーまで分解する。この段階では、ポリマーの分子量がほとん ど変化しないことから、ポリマー表面で起きていることになる。その後微生物は水溶性の成分を 体内に取り込み、栄養源としてエネルギーに変換している。このような働きを持つ微生物として Alcaligenes faecalis、Psedomnas lemoigneiなど50種以上が報告されている。これらの微生物 は、海水、湖水、土中どこからでも発見され、自然環境中に広く分布していると思われる。分解 酵素が単離精製され、性質も調べられている。これらの酵素は多くの場合、結合部位、作用部 位とこれをつなぐ連結部からなっていることが明らかになっている。



図1-2 微生物体内におけるPHA合成経路

PHBは約170℃に融点をもち、5℃にガラス転移点をもつ熱可塑性プラスチックであり、引張 り強度、ヤング率などの機械的性質は汎用プラスチックのポリプロピレン(PP)に匹敵するかそ れを上回る。しかし破壊伸びはわずかに6%と低く、融点より少し高い温度で熱分解ため成形 加工が困難である。このようなPHBの物性上の欠点は、高分子量化、共重合体化、異種高分 子材料との複合化などの方法により改善可能である。第2成分モノマーを導入する共重合体 化において、微生物の種類や用いる炭素源を変えることでさまざまな分子構造を持つ共重合 ポリエステルが見い出されている。共重合体の種類や組成を変化させることにより、結晶性の 硬いプラスチックから弾性に富むゴム状まで、多様な物性を示すことが報告されている。現在、 代表的な共重合ポリエステルとして、3-ヒドロキシ吉草酸を導入したP(3HB-co-3HV)、3-ヒド ロキシヘキサン酸を導入したP(3HB-co-3HH)、4-ヒドロキシ酪酸を導入したP(3HB-co-4HB) などがある。また化学合成系ポリマーおよび天然物系ポリマーの中にPHBとブレンドすることで より優れた物性および生分解性を生じる場合があるので、PHBはブレンド剤としても有望である。 現在、中国、ブラジルの会社では年産1000トン規模のプラントを稼動させており、国内では三 菱ガス化学(株)が天然ガス由来のメタノールを炭素源とした"ビオグリーン"を開発している。ま たアメリカのテレス社はオハイオ州に年産50.000トンのプラントを建設し、2008年末にはプラント を稼動させ、Mirel[™]の商品名で販売する予定である⁶。

1.4 食品廃棄物からのPHA生産

現在、PHAを生産するには主に2種類の方法がある。1つは活性汚泥のような混合微生物培養液からPHAを生産する方法である。この方法では、活性汚泥中のPHA生産菌密度が低いためPHA生産量は少なく、コストに見合った量のPHAを回収することができない。もう1つの方

法は食物由来の純粋な基質(グルコースなど)を原料としPHA生産細菌(Cupriavidus necator など)にPHAを生産させ回収する方法である。この方法では、微生物細胞体積当たりのPHA含 有率は非常に高いものの、原料コストが高い。

原料に食品廃棄物を用いることでコスト削減が可能である。また、食料との競合という問題も 解決できる。さらに食品廃棄物の減量化にも貢献でき、食品廃棄物からのPHA生産が実用化 されたらCO2発生量の削減、石油資源の節約にもつながる。食品廃棄物から食品廃棄物から PHAを生産する過程は2段階に分かれる。まず、食品廃棄物を発酵させ有機酸を生成し、次 にその有機酸をPHA生産菌の基質としてPHAを生産する。食品廃棄物の発酵液をPHA生産 菌の基質とするには、発酵液から懸濁物質を除去する必要があるが、一般には蒸留やイオン 交換などで懸濁物質を除去して有機酸を回収しており、これら発酵液の純化プロセスには多 大なコストが費やされ、PHAの普及を妨げる要因となっている。また食品廃棄物を原料として PHAを生産することを試みている既往の研究のほとんどが、毎回新規に培養した純菌を用い てPHAのワンバッチ生産を行っている。以上述べたように、懸濁物質除去および有機酸回収コ ストとワンバッチ生産のためにPHA生産コストは高くなる。そこで懸濁物質除去および有機酸 回収に膜を導入することが考えられる。膜により懸濁物質を除去し、有機酸濃度を高められる。 また、実用化を考えればワンバッチ生産ではなく連続的に、すなわち、PHAを蓄積した細菌を 繰り返し用いてPHAを生産することが望ましい。

そこで本研究では、食品廃棄物発酵液を0.45 µmのメンブレンフィルターでろ過して有機酸を 回収し、それを基質として*C. necator*を用いて連続的にPHBを生産することを試みた。はじめに 食品廃棄物を嫌気性酸発酵させ有機酸生成を行った。並列して人工酸発酵液を用いてPHB の生産を試みた。最後に実際に食品廃棄物の嫌気性酸発酵で生成した有機酸を用いてPHB の生産を行った。

7. 研究・技術開発の内容と成果

バイオ燃料電池の開発

第2章 実験概要

2.1 微生物の単離

グルコース10 mMもしくは酢酸20 mMを有機炭素源として運転しているMFCの負極槽からバ イオフィルムを採取した。これを10 mMのグルコースもしくは酢酸20 mMを電子供与体とする人 工基質を含むチューブへ移した(表2.1)。この内容物を希釈し(10倍~10⁷倍)、10 mMのグル コースもしくは酢酸20 mMを電子供与体とする人工基質を含むプレートで30℃嫌気的に培養し た。コロニーが形成されたプレートから微生物を単離し、単離された微生物を30℃嫌気性条件 下で、LB培地上で培養した(表2.2)。

表 2.1 人工基質の組成、及び濃度

約 武	濃度	
が立り火	(mg/L)	
$(NH_4)_2SO_4$	26.43	
NaCl	11.69	
K₂HPO₄	9752	
KH₂PO₄	3270	
$CaCl_2$	55.49	
MgCl ₂ •	122.2	
6H ₂ O	123.2	
主 つつ ID 住地の 組 式 下が		

表 2.2 LB培地の組成、及び濃度

組成	濃度(%)
trptone	1.0
yeastextract	0.5
NaCl	1.0
Agar	1 5
(solid)	1.3

2.2. 単離された微生物株による回分式実験

2.2.1 実験装置

実験装置として以下の装置を用いた。



図2.1 実験装置概略

単離された微生物株の発電性を評価するため回分式実験を行った。負極槽及び正極槽の容 積は1 Lとした。負極槽に単離された微生物株、人工基質、電子供与体としてグルコース10 mM、 電子受容体としてクエン酸酸化鉄20 mM、ミネラル、ビタミンを20 µl/Lずつ入れ、正極槽には電 子受容体としてシアン化鉄を20 mM、50 mM PBSを入れた(表 2.1,4,5)。電極素材は負極槽では 炭素、正極槽では80%白金含有炭素を用いた。電極表面積は負電極では60cm²、正電極では 30cm²とした。陽イオン交換膜としてNafion 117を用いた。

約 다	濃度
	(mg/mL)
FeCl ₂ •4H ₂ O	20
$ZnCl_2$	0.5
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	5
$(NH_4)_6Mo_9O_{24}$ · $4H_2O$	0.5
CoCl ₂ •6H ₂ O	1.5
NiCl ₂ •6H ₂ O	1
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0.3
H_3BO_3	0.5

表	2.4	ミネラルの組成、	及び濃度	表
---	-----	----------	------	---

§ 2.5ビタミンの組成、及び濃度

名古	濃度
祖风	(mg/L)
ビオチン	2
葉酸	2
ピリドキシン	10
リボフラビン	5
チアミン	5
ニコチン酸	5
パントテン酸	5
ビタミン B ₁₂	0.1
p-アミノ安息香酸	5
リポ酸	5

人工基質は121℃でオートクレーブ滅菌をした。その際、凝集を防ぐためにグルコースとCaCl₂、 MgCl₂・6H₂Oはそれぞれ別に滅菌をした。また、ミネラル、及びビタミンはろ過滅菌を施した。

2.2.2 運転温度

運転は室温(20~25℃)で行った。

2.2.3 電流値の測定

MFCの回路をデータ収集ユニット(Agilent Technologies, Inc)に接続し、1時間毎に電流値を 測定した。

2.2.4 グルコース、酢酸濃度の測定

採取した負極 槽水をグルコース濃度測定用に50倍希釈、また、酢酸濃度測定用に10倍希釈 した後、0.45 μmPTFE膜(ADVANTEC; DISMIC-13HP)でろ過した。

グルコース濃度、及び酢酸濃度の測定にはそれぞれHPLC(Dionex; DX-500, CarboPac PA1)、 イオンクロマトグラフィー(Dionex; DX-100, IonPac ICE-AS1)を用いた。HPLCの移動相として 18 mM NaOH水溶液を使用した。また、カラム内の温度は30℃に設定し、移動相は流速1.0 mL/minでカラムに通水した。また、イオンクロマトグラフィーの移動相として1.0 mMオクタスルホ ン酸水溶液を使用し、流速1.0 mL/minでカラムに通水した。

2.2.5 微生物濃度の測定

微生物濃度の測定に分光光度計(SmartSpec[™] Plus)を用い、600 nmにおける吸光度を測定 した。

2.3 16S rRNA遺伝子に基づく系統解析

LB培地で培養した微生物株を採取し、16S rRNA遺伝子に基づく系統解析を以下の手順で行った。

1. DNA抽出

- 50µLのultra pure water をPCRチューブに入れ、爪楊枝で採取した濃い目のコロニーサンプ ルを溶かす。
- ② このチューブの凍結、融解を三回繰り返す。
- ③ 1 µL/LのプロテナーゼK溶液を加えて、サーマルサイクラーを用いて65℃ 20分、95℃ 5分の 加熱処理を施す。
- 2. PCR
- ① 1サンプルにつき

 $\times 10$ PCR Buffer(Ex Taq) 2.5 μ L

Mix dNTP 0.5 µL

primer (25 µM, 27F; 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 0.5 µL

primer (25 µM, 1492r; 5'-GTTACCTTGTTACGACTT-3') 0.5 µL

Takara Ex Taq 0.1 µL

サンプル 1 μL

及びultra pure waterを全量が25 µLになるように加えた。

- ② DNA合成サイクルは以下のように行った。
 - ステップ1. 95℃ 4分間
 - ステップ2. DNAの熱変性(denature) 94℃ 1分間
 - ステップ3. プライマーとのアニーリング(annealing) 55℃ 1分間
 - ステップ4. プライマーからのDNA鎖の伸長(extension) 72℃ 1分間
 - ステップ5. 72℃ 10分間
 - ステップ2.~4.を25サイクル行い、電気泳動をPCR反応を調べるまで4℃で保存した。

3. 電気泳動

- ① 1×TAE Buffer 40 mLにアガロースを0.6 g加え、加熱し沸騰させる。
- ② 泳動装置にゲルを流し込み固化する。
- ③ 泳動装置に1×TAE Bufferを注ぐ。

- ④ ウェルにサンプル、及び6×Loading Bufferを各2.5 µLずつを混和したもの、またマーカーを2.5 µL注ぐ。
- ⑤ 約18分間電気泳動する。
- ⑥ UVを照射して目的のバンドを確認する。
- 4. PCR産物の精製
- PCR産物の精製にはQIAquick[®] PCR Purification Kit(QIAGEN)を用いた。
- ① PCR産物に5倍容量のBuffer PB1を入れ混和する。
- ② 2 mLのコレクションチューブにQIAquickスピンカラムをセットする。
- ③ DNAを結合させるために、サンプルをQIAquickカラムに加え、10,000×gで60秒間遠心分離 する。
- ④ ろ過液を捨て、洗浄のために0.75 mLのBuffer PEをQIAquickカラムに加え、10,000×gで60 秒間遠心分離する。
- ⑤ ろ過液を捨て、10,000×gで60秒間遠心分離する。
- ⑥ 新しい1.5 mLチューブにQIAquickカラムをセットし、DNAの溶出を行うために、50 μLの Buffer EBをQIAquickメンブレン表面の中央に添加し、10,000×gで60秒間遠心分離する。
- 5. シークエンシングPCRと精製

シークエンシングPCRに先立ち、添加するサンプル量を決定するためにHoefer DyNA Quant 200 (Amersham)を用いてプラスミドDNA濃度を測定し、濃度に応じて添加量を2~5 µLに調整した。

- ① 1サンプルにつき
 - $\times 5$ Buffer 3 μL
 - Bigdye $2 \mu L$

primer (3.2 pmol, 27F; 5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3') 0.5 µL

サンプル 2~5 μL

及びultra pure waterを全量が20 μLになるように加えた。

② DNA合成サイクルは以下のように行った。

ステップ1. 95℃ 4分間

ステップ2. DNAの熱変性(denature) 96℃ 10秒間

ステップ3. プライマーとのアニーリング(annealing) 50℃ 5秒間

ステップ4. プライマーからのDNA鎖の伸長(extension) 60℃ 4分間

ステップ5. 60℃ 10分間

ステップ2.~4.を25サイクル行い、4℃で保存した。

- ③ あらかじめ用意しておいたCentri-Sepスピンカラムの中央にPCR産物を全量入れる。
- ④ 750×gで2分間遠心分離する。
- ⑤ DNAプチvacで水分が無くなるまで40分間ドライアップする。
- 6. シークエンス

塩基配列はシークエンサー(Applied Biosystems; ABI Prism 3100 Genetic Analyzer)を用いて決定した。

- ① 15 µLのHi Di Formamide(HDF)をサンプルチューブに入れ、軽く混和する。
- ② 95℃で2分間加熱する。
- ③ フローズンラックで10分程冷却する。
- ④ 96-wellプレートに移し、シークエンサーにセットする。

得られた塩基配列はBLASTを用いて相同性を比較した。

2.4 Cyclic Voltammetry(CV)

微生物の電気化学的活性度を調べるために回分式実験終了後、CV(GAMRY,G 750 Potentiostat)を行った。測定前に、窒素ガスを20分間充填し嫌気状態を維持した。測定条件 は掃引速度を30 mV/s、開始電位、折り返し電位をそれぞれ-600 mV、600mVに設定した。

2.5 微生物の形態学的特徴

単離された株をニュートリエント寒天培地で培養し、認識キット(API 20 E、API 50 CH、 BioMerieux)で調査した。

- Scanning Electron Microscope (SEM)
 回分式実験終了後、負電極表面に付着していたバイオフィルムを採取し、SEMを以下の手順で行った。
- MFCから採取したバイオフィルムが付着した電極を2%グルタルアルデヒドを含む0.1 M PBに 2時間つける。
- ② サンプルを10分間洗浄し、その後1時間0.1 M PBに浸ける。
- ③ 1%の酸化オスミウムを含む0.1 M PBに2時間浸け、その後洗浄する。
- ④ サンプルをエタノールで脱水化させ、(エタノールは50、70、80、90、95、100、100%のエタノー ルを15分ごとに使用する。)酢酸イソアミルに保存する。
- ⑤ サンプルを炭酸水を使用したcritical point dryerによって乾燥し、白金とパラジウムで2時間 コーティングする。
- ⑥ サンプルをSEM(model S-4000; Hitachi)で3.5 kvで観察する。

第3章

結果と考察

3.1 16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析

微生物群集から30株を単離し、その内6株において得られた配列からBlastを用いて相同性を 比較した(表3.1)。単離された株のサンプル名は数字+アルファベットで表され、Aが酢酸を主 炭素源としたMFCから単離された株、Gがグルコースを主炭素源としたMFCから単離された株 を表す。このうちStrain 1GはDelftia acidovoransと90%の相同性を示したことから、新規微生 物種の可能性が考えられた。

株	種	綱	相同性(%)
6A	Klebsiella oxytoca AM160650	Gammaproteobacteria	91
25A	Comamonas testosteroni EU887829	Betaproteobacteria	99
14G	Stenotrophomonas maltophilia EU239195	Gammaproteobacteria	99
17G	Raoultella ornithinolytica EF474096	Gammaproteobacteria	98
13A	Ochrobactrum anthropi FJ374126	Alphaproteobacteria	96
1G	Delftia acidovorans EF526507	Betaproteobacteria	90

表3.1単離された微生物株による相同性の比較

3.2 単離された微生物株による回分式実験

単離された株の中から回分式実験を行い、特に発電性を示したStrain 1Gにおいて発電性を 解析した。発電性を評価するため、すでに発電性の確認されているAeromonas sp.と99%の相 同性を持つStrain ISO 2-3を用いて対照実験を行った。また発電性の見られなかった株として、 Strain 3Gとも発電性を比較した(図3.1,2,3)。



図3.1 Strain 3Gにおける回分式実験結果



図3.2 Strain 1Gにおける回分式実験結果



図3.3 Strain ISO 2-3 における回分式実験結果

3株共にグルコースの減少、酢酸の増加から微生物の増殖が見られた。その内Strain 1G、 Strain ISO 2-3において電流が発生したことから、グルコースが消費され酢酸が生じる反応から微 生物が電子を回収し、電流が発生したと考えられる(式-1)。Strain 1Gにおいては運転開始15時 間経過後に最大電流100 mA/m²を示し、145時間の総電子発生量は1.1×10⁷ C/m²を示した。 Strain ISO 2-3 においては運転開始直後に最大電流83 mA/m²を示し、145時間の総電子発生 量は6.0×10⁷ C/m²を示した。Strain 1Gは発電性の確認されている*Aeromonas sp.*と99%の相同 性を持つStrain ISO 2-3と比較し、18%程度の電子を発生させたので電気化学的に活性だと考え られる。

3.3 Cyclic Voltammetry

Strain 1G、Strain ISO 2-3を用いてCyclic Voltammetryを行った。以下にその結果を示す(図 3.4,5)。



図 3.4 Strain 1Gの電気化学的な活性度の評価



図 3.5 Strain ISO 2-3の電気化学的な活性度の評価

Strain 1Gでは0.3Vで酸化のピーク、-0.2Vで還元のピークを示し、Strain ISO 2-3では0.2Vで酸化のピークを示した。CVでのピーク値の存在は、その電位での電子の受け渡しを示し、酸化還元反応の挙動を表す。同様の実験を溶媒、上澄み液で行ったところ、ピーク値が観測されなかったことから、微生物の細胞壁のマトリックスを介した電極への直接電子伝達が示唆された。また、酸化還元のピークの中間点が0.05Vを示したことから、0.07V付近に酸化還元電位を持つシトクロムbが関与している可能性が考えられた^{18),19)}。

3.4 微生物の形態学的特徴

Strain 1Gにおける形態学的特徴を認識キットを用いて調査した(表 3.1)。

Characteristic	Strain 1G
Glucose	+
Citrate	+
Starch	-
H_2S	-
Indole	-
VP	-
Urease	+
ONPG	+
Glycerol	+
L-Arabinose	+
D-Adonitol	+
D-galactose	+
Fructose	+
N-Acetylglucosami	т
ne	Ŧ
D-Maltose	+
D-Lactose	+
D-Melibiose	+
Sucrose	+
D-Raffinose	+
Glycogen	-
D-Turanose	+
Gluconate	+
Esculin	+

表3.1 Strain 1Gの形態学的特徴

Strain 1Gはグルコース、グルコン酸塩、スクロース、クエン酸塩、o-ニトロフェニル・ β -D-ガラクト ピラノシド、グリセロール、L-アラビノース、D-マルトース、エスクリン等を利用できることが明らかと なった。発電性微生物種*Geobactor. Sulfurreducens*が単糖を、*Rhodoferax ferrireducens*がグリ セロールを利用できないことから、Strain 1Gの基質の活用能力の多様性が、様々な化学構成を 持つ廃水の利用の可能性に繋がると考えられる^{20),21),22)。}

3.5 Scanning Electron Microscope (SEM)

Strain 1Gのリアクターの負電極表面に付着していたバイオフィルムを採取し、SEMを用いて 観察した。以下に結果を示す。



図3.6 Strain 1Gによる電極付近の電子顕微鏡写真

Strain 1GをSEMを用いて観察した。その結果、Strain 1Gは電極に付着する形で存在した。このことから、Strain 1Gによる微生物の細胞壁のマトリックスを介した電極への直接電子伝達が

示唆された。

第4章

結論と総括

本研究では、MFCにおいて電気産生微生物群集から微生物を単離し、16S rRNA 遺伝子に 基づく系統解析を用いて相同性を比較し、機能解析を行った。その結果、本研究で得られた 結論を以下に示す。

- ・16S rRNA遺伝子に基づく系統解析より、Strain 1GはDelftia acidovoransと90%の相同性を 持つ
- ・Strain 1Gはグルコース10 mMを有機炭素源として電流を発生させ、最大電流100 mA/m²、 145時間で総電子量1.1×10⁷ C/m² を発生させた
- Cyclic VoltammetryによりStrain 1Gの細胞が0.3V、-0.2Vで酸化還元反応の挙動を示し、シトクロムbが関与している可能性が考えられた
- ・SEMからStrain 1Gが電極表面に付着する形で存在

以上のことから、この株による細胞壁に存在するバイオマス由来の酸化還元物質による電極 への直接電子伝達が示唆された。

参考文献

- Bullen RA., Arnot TC., Lakeman JB., Walsh FC., 2006. Biofuel cells and their development. Biosens Bioelectron 21, 2015-2045
- Davis F., Higson SPT., 2007. Biofuel cells-Recent advances and applications. Biosens Bioelectron 22, 1224-1235
- 3) Bruce E. Logan and John M. Regan 2006. Electricity producing bacterial communities in microbial fuel cells.TRENDS in Micribiology.14, 512-518
- 4) Gorvy, Y.A., Yanina, S., McLean, J.S., Rosso, K.M., Moyles D, Dohnalkova A, Beveridge TJ, Chang IS, Kim BH, Kim KS, Culley DE, Reed SB, Romine MF, Saffarini DA, Hill EA, Shi L, Elias DA, Kennedy DW, Pinchuk G, Watanabe K, Ishii S, Logan B, Nealson KH, Fredrickson JK 2006. Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella* oneidensis strain MR-1 and other microorganisms. Pro Nat Acad Sci USA 103, 11358-11363
- 5) Yuri A. Gorby et.al 2006. Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms . PNAS. 103, 11358-11363
- 6) Reguera G., McCarty KD., Mehta T., Nicoll JS., Tuominen MT., Lovely DR., 2005 Extracellular electron transfer via microbial nanowires, Nature 435, 1098-1101
- 7) Gorvy, Y.A., Yanina, S., McLean, J.S., Rosso, K.M., Moyles D, Dohnalkova A, Beveridge TJ, Chang IS, Kim BH, Kim KS, Culley DE, Reed SB, Romine MF, Saffarini DA, Hill EA,

Shi L, Elias DA, Kennedy DW, Pinchuk G, Watanabe K, Ishii S, Logan B, Nealson KH, Fredrickson JK 2006, Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Pro Nat Acad Sci* USA 103:11358-11363

- Rabaey, K.; Verstraete, W. 2005. Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. Trends Biotechnol. 23, 291-298
- Rabaey, K.; Lissens, G.; Siciliano, S. D.; Verstraete, W. 2003. A microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency. Biotechnol. Lett. 25, 1531-1535
- Liu, H.; Logan, B. E. 2004. Electricity generation using an air-cathode single chanber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane. Environ. Sci. Technol. 38, 4040-4046
- 11) 大堺利行,加納健司,桑畑進.2000.ベーシック電気化学,化学同人出版,p53
- 12) Kim, J.R., B.Min and B.E. Logan. 2005. Evaluation of procedures to acclimate a microbial fuel cell for electricity production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 68, 23-30
- 13) Bond B.R., Lovely, D.R. 2003. Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Appl. Environ, Microbiol.* 69, 1548-1555
- 14) Holmes, DE, Bond D.R., Lovely DR, 2004 Electron transfer by *Desulfobulbus propionicus* to Fe (Ⅲ) and graphite electodes. Appl. Environ. Microbiol. 70, 1234-1237
- 15) Kim, H.J., Park, H.S., Hyun, M.S., Chang, I.S., Kim, M., Kim, B.H., 2002, A mediator less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium *Shewanella putrefaciens*. *Enzyme Microb. Technol.* 30, 145-152
- 16) Park, H.S., Kim, B.H., Kim, H.S., Kim, G.T., Chang, I.S., Park, Y.K., Chang, H.I., 2001. A novel electrochemically active and Fe(II)-reducing bacterium phylogenetically related to *Clostridium bytyricum* isolated from a microbial fuel cell. *Anaerobe*, 7, 297-306
- 17) Holmes, DE, Nicoll J.S., Bond D.R., Lovely DR, 2004. Potential role of a novel psychrotolerant member of the family *Geobacteraceae*, *Geopsychrobacter electrodiphilus* gen. nov., sp. nov., in electricity production by a marine sediment fuel cell. Appl. Environ. Microbiol. 70, 6023-6030
- Myers, C.R., Myers, J.M., 1992. Localization of cytochromes to the outer membrane of anaerobically grown Shewanella putrefaciens MR-1. J. Bacteriol. 174, 3429-3438.
- 19) Shi, L., T.C. Squier, J.M. Zachara and J.K. Fredrickson. 2007. Respiration of metal (hydr) oxides by *Shewanalla* and *Geobacter*: a key role for multihaem c-type cytochromes. Mol. Microbiol. 65,12-20
- 20) Bond B.R., Lovely, D.R. 2003. Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Appl. Environ, Microbiol.* 69, 1548-1555
- 21) Chaudhuri, S.K., D.R., Lovely 2003. Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nat. Biotechnol.* 21, 1229-1232
- 22) Lovely, D.R., 2006. Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. Nature 4, 497-508

第2章 生ゴミの嫌気性酸発酵

2.1 実験方法

異性化糖製造工程廃水を処理する上昇流嫌気性汚泥床(Upflow Anaerobic Sludge Blanket:UASB)で採取したグラニュール汚泥と食品廃棄物(工学部食堂で発生した生ゴミをミ キサーで破砕したもの)を混合し、水を加えて酸発酵リアクター(2 L三角フラスコ)に投入した。 1日1回、有機酸(Volatile Fatty Acid:VFA)濃度、pH、酸化還元電位(Oxidation Reduction Potential:ORP)、全化学的酸素要求量(Total Chemical Oxygen Demand:T-COD)、溶解性 化学的酸素要求量(Dissolved Chemical Oxygen Demand:D-COD)を測定した。酸発酵リア クターは高温槽に入れ38℃に保った。1週間に1度発酵生ゴミを約1.5 L回収し、残存した発酵 生ゴミ0.5 Lに新たに生ゴミを投入し、水を加えて2 Lにした。これを繰り返し行った。

1日に1回発酵生ゴミを回収後、希釈(250~500倍)し、口径0.45 μmの混合セルロースエステ ル製のメンブレンフィルター(ADVANTEC、DISMIC-25_{AS})でろ過した。そのろ液をバイアルに 移した後、-30℃の冷凍庫で保存した。VFA測定時に冷凍保存してあったろ液を解凍し、口径 0.2 μmのPTFE製メンブレンフィルター(ADVANTEC、DISMIC-13_{HP})でろ過した後、VFA濃度 を高速液体クロマトグラフ(島津製作所、島津高速液体クロマトグラフ有機酸分析システム)に より測定した。測定項目は乳酸、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、n-酪酸、i-酪酸とした。なお、VFA 標準液は前述の各VFA濃度が10 g-C/Lのものを調整し使用した。pHはpHメーター(堀場製作 所、D-51)を用いて測定した。ORPはORPメーター(東亜DKK、RM-20P)を用いて測定した。 CODは回収した発酵生ゴミを異なる2つ又は3つの倍率で希釈(100~1000倍)し、T-COD測定 の場合は希釈後に携帯用多項目迅速水質分析計(HACH社、DR/2400)を用いて測定した。 D-COD測定の場合は希釈後さらに口径0.45 μmの混合セルロースエステル製のメンブレンフィ ルター(ADVANTEC、DISMIC-25_{AS})でろ過した後に携帯用多項目迅速水質分析計(HACH 社、DR/2400)を用いて測定した。

2.2 結果と考察

図2-1に酸発酵リアクター内に投入した生ゴミの負荷を示した.運転開始時点の生ゴミ負荷は 100 g/Lとした.2~5回目の生ゴミ負荷は約150 g/Lとし,6回目以降は250~300 g/Lに負荷を 上げた.図2-2に酸発酵リアクター内のCODの経時変化を示した.D-CODが急激に低下してい るのは発酵生ゴミを引き抜いたためである.点線は発酵生ゴミの引き抜き時点を示している. 500時間まではT-COD、D-CODを測定し、500時間以降はD-CODのみを測定した。T-CODは 340時間まで27000~36000 mg/Lであったが、340時間に新たな生ゴミを投入後、460時間後に はT-CODは43000 mg/L にまで上昇した。D-CODは500時間までは10000~25000 mg/Lであ ったが、500時間以降増加し25000~55000 mg/Lに達した。発酵生ゴミを引き抜き新たな生ゴミ を投入した翌日には、引き抜き前の値と同じかそれ以上の値になった。これは有機物が溶解 性成分にまで分解されたためだと考えられる。図2-3に酸発酵リアクター内のORPの経時変化 を示した.点線は発酵生ゴミの引き抜き時点を示している.340時間まではORPが-300~ -200mVであった.390~890時間の間はORPの値がプラスであり、0~200mVであった.890時 間以降は発酵生ゴミを引き抜き、新たな生ゴミを投入するとORPは上昇し、その後-300mV以 下まで低下していく傾向が見られた.図2-4に酸発酵リアクター内のpHの経時変化を示した. 点線は発酵生ゴミの引き抜き時点を示している.720時間まではpHを調整しなかったためpHが 3.5まで低下した.720時間以降、1日に1回NaOH溶液を用いてpH調整を行った.pH調整値を 5、5.5、6、6.5と段階的に上げ、生成するVFAの組成変化を測定した。発酵生ゴミを引き抜き、 新たに生ゴミを投入した翌日にはpHが約4まで低下する傾向が見られた.生ゴミ投入から3日 後にはpHは低下しなくなった。また、ORPの値がプラスであった期間はpH調整を行わずにpH が3.5~5と低く推移していた期間と一致していることが分かった。









図 2 - 4 pHの経時変化

図2-5に酸発酵リアクター内のVFA濃度の経時変化を示した.VFA濃度が急激に低下してい るのは発酵生ゴミを引き抜いたためである. 点線は発酵生ゴミの引き抜き時点を示している. 運 転初期である500時間までは生産されたVFAの約50%が酢酸であり, 濃度は約2200 mg-C/Lであ った. 530時間以降は乳酸が全VFAの約70%を占め, 濃度は3600~14000 mg-C/Lであった. 1200時間以降は酢酸およびプロピオン酸の生成量が増加し, 濃度はそれぞれ1500~5000 mg-C/Lおよび1500~6300 mg-C/Lであった. また, 1500時間以降にn-酪酸の生成量が増加し 2000時間には濃度が約4900 mg-C/Lに達した. ギ酸濃度は運転期間中130 mg-C/L 以下と低 かった。2000時間にわたって乳酸が最も多く生成し, 濃度は平均で8000 mg-C/Lであった. また、 運転期間中にi-酪酸は検出されなかった。以上の結果から、酸発酵リアクター内のpHを調整す ると生成するVFAの組成が変化することが明らかとなった。pHを6~6.5に調整すると酢酸、プロピ オン酸およびn-酪酸濃度が増加した。乳酸はpHによらず1番多く生成した。



2.3 まとめ

本実験では以下のことが明らかになった。生ゴミの嫌気性酸発酵においてリアクター内のpHを 調整すると生成するVFAの組成が変化した。pHを6~6.5に調整すると酢酸、プロピオン酸およ びn-酪酸濃度が増加した。リアクター内のpHによらず乳酸が1番多く生成し、濃度は平均で 7500 mg-C/Lであった。

3.1 実験方法

C. necatorの高濃度溶液を作成するため、凍結保存状態のC. necator(ATCC 1769)を Nutrient Broth溶液に植種して室温で4日間振とう培養した。この培養液200 mLをオートクレー ブで滅菌済みのPHB生産リアクター(1 L有栓メスシリンダー)内に投入し、蒸留水を加えて700 mLとした。PHB生産リアクターと人工酸発酵液を入れた保存ビンをチューブで接続しポンプ(ア トー、SJ-1211)を用いて人工酸発酵液を150 mL/dayで連続投入し、PHB生産を行った。人工 酸発酵液の組成を表3-1に、microelement solutionの組成を表3-2に示した。人工酸発酵液中 のVFA濃度は実際の酸発酵液のVFA濃度を考慮し、乳酸7200 mg-C/L、酢酸1200 mg-C/L、 プロピオン酸1800 mg-C/Lとなるように調製した。1日に1回培養液を550 mL引き抜きPHBを回 収し、残り300 mLの培養液に蒸留水400 mLを加え希釈した。また保存ビンに人工酸発酵液 150 mLを新たに入れた。これを繰り返し行った。なおPHB生産リアクターはエアポンプ(テクノ高 槻、C-5BN)を用いて曝気した。

成分	濃度
CH ₃ COONa	44.8 g/L
CH ₃ CH ₂ COONa	4.1 g/L
CH ₃ CH(OH)COONa	4.8 g/L
$(NH_4)_2SO_4$	1.0 g/L
K ₂ HPO ₄	5.8 g/L
KH ₂ PO ₄	3.7 g/L
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.8 g/L
microelement solution	1 mL/L

表3-1 人工酸発酵液中のmineral solution の成分とその濃度

表 3_2	microelement solution	の成分とその濃度
12 3-2	interoclement solution	の成力とての最度

成分	濃度(1M HCl溶液1 L中)
FeSO ₄ •7H ₂ O	2.78 g/L
MnCl ₂ •4H ₂ O	1.98 g/L
CoCl ₂ •7H ₂ O	2.95 g/L
CaCl ₂ •2H ₂ O	1.67 g/L
CuCl ₂ •2H ₂ O	0.17 g/L
ZnSO ₄ •7H ₂ O	0.29 g/L

引き抜いた培養液中のVFA濃度、pH、乾燥菌体重量(Dry Cell Weight: DCW)濃度、PHB 濃度を測定した。引き抜いた培養液を遠心分離機(HITACHI、18PR-52)を用いて15000 rpm で5分間遠心分離し、懸濁物質を回収した。また、遠心分離後の上澄み液は0.45 µmのフィル ターでろ過し冷凍保存した。このろ液を解凍し、VFA測定時に0.2 µmのフィルターでろ過後、測 定を行った。懸濁物質の入ったバイアル内に重量濃度0.85%のNaCl溶液を加え、激しく撹拌し 洗浄した後、ナス型フラスコに懸濁物質を移し凍結乾燥機(東京理科器械、FDU-2100)を用 いて約2日間凍結乾燥させた。凍結乾燥後、乾燥重量を測定した。これを乾燥菌体重量 (DCW)とした。凍結乾燥後の懸濁物質約20 mgをスクリューキャップ付き試験管に入れ、これ に3%(v/v)の硫酸および1 mg/mLの安息香酸を含む酸性メタノール溶液2 mLを添加し、さらに クロロホルム2 mLを加えよく撹拌した。この溶液を100℃で4時間加熱後、室温まで冷却し、1 mLの超純水を加えて10分間激しく撹拌した。撹拌後、分離したクロロホルム内のメチル化した PHBを含む溶液1 µLをガスクロマトグラフ(島津製作所、GC14-B)で定量した。検量線は1、2、 4 mg/mLに調整したPHB溶液を用い作成した。

3.2 結果と考察

図3-1にPHB生産リアクター内に人工酸発酵液を連続投入した場合のDCW濃度および PHB濃度の経時変化を示した。DCW濃度およびPHB濃度が急激に低下しているのは培養液 を引き抜き、残った培養液を水で希釈したためである。 点線は培養液の引き抜き時点を示して いる.なおPHBは菌体構成成分なのでPHB濃度がDCW濃度を超えることはない。DCW濃度、 PHB濃度ともに46時間で最大となり、それぞれ800 mg/L、630 mg/Lであった。46時間以降 PHB濃度は急激に低下し160時間以降は10 mg/L以下にまで低下した。一方DCW濃度は46 時間以降、培養液引き抜き後も濃度が増加し、24時間後の濃度は700 mg/Lであった。図3-2 にPHB生産リアクター内のPHB含有率の経時変化を示した。PHB含有率は46時間に最大で 79%に達した。その後PHB含有率は急激に低下し640時間にはわずか1%であった。これは46 時間以降、DCW濃度は維持されたがPHB濃度が減少したためである。図3-3にPHB生産リア クター内のpHの経時変化を示した。pHは7.5~10であった。C. necatorの増殖のための最適pH は7.5であるため⁷⁾、pHは高かったと考えられる。図3-4にPHB生産リアクター内のVFA濃度の 経時変化を示した。VFA濃度が急激に低下しているのは培養液を引き抜いたためである。点 線は培養液の引き抜き時点を示している.投入したVFAはPHB生産リアクター内で完全には 消費されず残存した。120~140時間、620~690時間において乳酸が多く残存し、残存濃度は 最高で1550 mg-C/Lであった。280~480時間の間、各VFAは比較的よく消費された。24~140 時間、540~690時間において酢酸が多く残存し、残存濃度は最高で310 mg-C/Lであった。プ ロピオン酸は690時間にわたって一定濃度残存しており、残存濃度は平均で200 mg-C/Lであ った。









図3-5にVFA消費量(mg-C)、DCW生成量、PHB生成量の累積値を示した。PHB収率(PHB 生成量/VFA消費量)は46時間に最大で39%であった。46時間以降、VFAは消費されたがPHB は生産されなかった。640時間のPHB収率は3%であった。消費されたVFAのうち菌体にならなか った炭素は二酸化炭素や代謝産物に変換されたことになる。図3-6にPHBが多く生成した46時間 までの各VFA累積負荷量と消費量を示した。乳酸は投入量の46%にあたる970 mg-Cが消費さ

れた。酢酸消費量は23 mg-C、プロピオン酸消費量は130 mg-Cであり、それぞれ投入量の7%、 25%と乳酸よりも消費された割合が低かった。図3-7に46~190時間までの各VFA累積負荷量と 消費量を示した。乳酸消費量は2270 mg-C酢酸消費量は370 mg-C、プロピオン酸消費量は500 mg-Cであり、それぞれ投入量の52%、53%、46%が消費された。このことからPHBがより多く生成 した期間は乳酸が多く消費され、PHB生産能が低下した期間には乳酸だけでなく酢酸、プロピオ ン酸の消費量が増加したことが分かった。一般に他のVFAに比べ乳酸はPHB生産には使用され にくいといわれるが、本実験では乳酸が多く消費された。これは乳酸濃度が他のVFAに比べが高 かったためだと考えられる。46時間以降、PHB生産速度が低下した原因としてはPHB生産リアク ター内のpHが高かったこと、C/N比が低下した可能性があり、C. necatorの代謝経路がPHB生産 には適さないものに変化したことが考えられる。またコンタミネーションにより非PHA生産細菌が増 加したことなどが考えられる。







3.3 まとめ

本実験では以下のことが明らかになった。乳酸、酢酸、プロピオン酸を含む人工酸発酵液 を基質としてC. necatorを用いてPHBを連続的に生産できた。DCW濃度、PHB濃度およびPHB 含有率は46時間で最大となり、それぞれ800 mg/L、630 mg/L、79%であった。PHB収率は46 時間に最大で39%であった。しかしながら46時間以降、PHB生産速度は急激に低下した。

第4章 ろ過発酵液を基質としたPHBの連続生産

4.1 実験方法

実験方法は第3章で記したものと同様である。本実験では人工酸発酵液でなく発酵生ゴミ をろ過したろ過発酵液を基質とし、培養液引き抜き後にPHB生産リアクター内のpHをHCl溶液 で7.5に調整した。酸発酵リアクターにおいて2020時間経過後の酸発酵液を回収し、ふるいに かけ、最終的に0.45 µmのメンブレンフィルター(OMNIPORE、JHWP04700)を用いて吸引ろ過 した。発酵生ゴミ1.5 Lからろ過発酵液700 mLが得られた。このろ過発酵液を3倍に希釈し、 PHB生産に用いた。表4-1にろ過発酵液中のVFA組成を示す。人工酸発酵液には加えなかっ たn-酪酸が存在していた。引き抜いた培養中のVFA濃度、pH、DCW濃度、PHB濃度に加え、 D-CODも測定した。

成分	濃度
乳酸	2400 mg-C/L
酢酸	600 mg-C/L
プロピオン酸	440 mg-C/L
n-酪酸	1630 mg-C/L

表4-1 ろ過発酵液中のVFA組成

4.2 結果と考察

図4-1にPHB生産リアクター内にろ過発酵液を連続投入した場合のDCW濃度およびPHB 濃度の経時変化を示した。DCW濃度およびPHB濃度が急激に低下しているのは培養液を引 き抜き、残った培養液を水で希釈したためである. 点線は培養液の引き抜き時点を示している. DCW濃度およびPHB濃度ともに43時間に最大となり、それぞれ1400 mg/L、1200 mg/Lであっ た。90時間以降、PHB生産速度は4 mg/L/hと低下したが、260時間にわたってPHBが生産され た。このことから食品廃棄物の発酵ろ液を用いてPHBを生産可能なことが明らかとなった。260 時間のPHB濃度は170 mg/Lであった。DCW濃度は人工酸発酵液を用いたときと同様に90時 間以降も増加し、24時間後の濃度の650 mg/Lであった。図4-2にPHB含有率の経時変化を示 した。PHB含有率は43時間に最大で87%にまで達した。これは人工酸発酵液を用いた場合よ りも高い値であった。67時間以降、PHB含有率は低下した。260時間のPHB含有率は28%であ った。図4-3にPHB生産リアクター内のPHの経時変化を示した。人工基質を用いた際にはpHが *C. necator*の増殖のための最適pHである7.5よりも高かったため、本実験では培養液引き抜き 後にpHを7.5に調整した。pH調整を行ったが、翌日にはpHは8~9まで上昇していた。これはリ アクター内のVFAが消費されたためと考えられる。図4-4にPHB生産リアクター内のD-CODの

経時変化を示した。90時間までは2200~3500 mg/Lを推移したが、90時間以降は950~2000 mg/Lにまで低下した。











図4-5にPHB生産リアクター内のVFA濃度の経時変化を示した。VFA濃度が急激に低下 しているのは培養液を引き抜いたためである. 点線は培養液の引き抜き時点を示している。 ろ過発酵液の濃度が人工酸発酵液よりも希薄であったため、VFAの残存濃度は人工酸発 酵液を用いたときよりも低かった。乳酸およびn-酪酸は1回目の引き抜き時である19時間に は残存していなかった。各VFAは67時間に最も多く残存していたことが分かる。91時間以降、 乳酸、酢酸、プロピオン酸はほとんど消費されており、残存濃度が低かった。一方n-酪酸は 91時間以降も高濃度残存し、残存濃度は平均で140 mg-C/Lであった。図4-6にVFA消費量 (mg-C)、DCW生成量、PHB生成量の累積値を示した。PHB収率は43時間に最大で64%で あった。これは人工酸発酵液を用いた場合よりも高い値であった。260時間の収率は22%で あった。図4-7にPHBが多く生成した43時間までの各VFA累積負荷量と消費量を示した。乳 酸、酢酸、プロピオン酸およびn-酪酸の消費量はそれぞれ700 mg-C、100 mg-C、78 mg-C および420 mg-Cであり、それぞれ投入量の98%、58%、59%、86%が消費された。乳酸およ びn-酪酸の消費割合が高かった。図4-8に44~260時間までの各VFA累積負荷量と消費量 を示した。乳酸、酢酸、プロピオン酸およびn-酪酸の消費量はそれぞれ2400 mg-C、480 mg-C、370 mg-Cおよび1100 mg-Cであり、それぞれ投入量の94%、77%、80%、67%が消 費された。酢酸およびプロピオン酸は0~43時間の期間よりも消費割合が増加し、n-酪酸は 減少した。乳酸は変わらず消費割合が高かった。このことからPHBが多く生成した期間は乳 酸およびn-酪酸が多く消費されたことが分かった。PHB生産能が低下した期間には酢酸お よびプロピオン酸の消費量が増加し、n-酪酸の消費量が減少したことが分かった。本実験で は人工基質を用いた場合よりもPHBが生産された。これはPHB生産リアクター内のpHを調 整したこと、VFA負荷を低くしたことなどが考えられる。しかし90時間以降、PHB生産速度は 低下し、人工基質を用いた場合と同様の傾向が見られた。この原因としてはC/N比が低下し た可能性があり、C. necatorの代謝経路がPHB生産には適さないものに変化したと考えられ る。またコンタミネーションにより非PHA生産細菌が増加したことも考えられる。なお嫌気性 酸発酵を考慮すると、本実験では生ゴミおよそ300gからPHBが約3.4g生成した。





図 4-6 VFA消費量,DCW生成量およびPHB生成量の累積値



図 4 - 7 4 3 時間までの各VFAの負荷量および消費量



図 4-8 4 3 時間から 2 6 0 時間までの各VFAの負荷量および消費量

本実験では以下のことが明らかになった。生ゴミを酸発酵させた発酵液を0.45 µmのフィルタ ーでろ過し、それを基質として*C. necator*を用いてPHBを連続的に生産できた。90時間以降 PHB生産速度は低下したが、260時間にわたってPHBが生産された。また人工基質を用いた 場合よりもPHBが多く生成した。DCW濃度、PHB濃度およびPHB含有率は43時間で最大とな り、それぞれ1400 mg/L、1200mg/L、87%であった。PHB収率は43時間に最大で64%であった。 260時間のPHB収率は22%であった。

第5章 結論

本実験では以下のことが明らかになった。生ゴミの嫌気性酸発酵においてリアクター内の pHを調整すると生成するVFAの組成が変化した。pHを6~6.5に調整すると酢酸、プロピオ ン酸およびn-酪酸濃度が増加した。リアクター内のpHによらず乳酸が最も多く生成し、濃度 は平均で7500 mg-C/Lであった。

乳酸、酢酸、プロピオン酸を含む人工酸発酵液を基質として*C. necator*を用いてPHBを連続的に生産できた。DCW濃度、PHB濃度およびPHB含有率は46時間で最大となり、それぞれ800 mg/L、630 mg/L、79%であった。しかしながら46時間以降、PHB生産速度は急激に低下した。

生ゴミを酸発酵させた発酵液を0.45 μmのフィルターでろ過し、それを基質として*C*. *necator*を用いてPHBを連続的に生産できた。260時間にわたってPHBが生成した。また人工 基質を用いた場合よりもPHBが多く生成した。DCW濃度、PHB濃度およびPHB含有率は43 時間で最大となり、それぞれ1400 mg/L、1200mg/L、87%であった。しかしながら90時間以降 PHB生産速度は低下した。生ゴミ300 gからPHBが3.4 g生産された。

参考文献

- 1) 生分解性プラスチック研究会:入門生分解性プラスチック技術、p. 5~6,36~38 (2006)、オ ーム社
- 2) 生分解性プラスチック研究会:今日からモノ知りシリーズ トコトンやさしい 生分解性プラス チックの本、p. 22~25 (2004)、日刊工業新聞社
- 3) 井上義夫: グリーンプラスチック最新技術、p. 71~81 (2002)、シーエムシー出版
- 4) シーエムシー出版編集部:生分解性ケミカルスの開発、p.3~5(2003)、シーエムシー出版
- 5) 白石信夫、谷吉樹、工藤謙一、福田和彦:実用化進む生分解性プラスチック、p. 190~ 198 (2000)、工業調査会
- 6) 日本バイオプラスチック協会:バイオプラスチック材料のすべて、p. 41~43 (2008)、日刊工業新聞社
- Guocheng Du, Jian Yu: Green Technology for Conversion of Food Scraps to Biodegradable Thermoplastic Polyhydroxyalkanoates. Environ. Sci. Technol., 2003-36, 5511-5516

8. 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名(雑誌のときは	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
雑誌名、巻号数、論文名)			
Biotechnology and Bioengineering	2009年12月1		Kyungmi, C. and
Vol. 104(5), Pp.901-910.	B		Okabe, S
Characterization of electrochemical			
activity of a strain ISO2-3			
phylogenetically related to			
Aeromonas sp. isolated from a			
glucose-fed microbial fuel cell.			
Applied and Microbiology and	2009年7月		Kyungmi, C. and
Biotechnology Vol. 83, Pp.			Okabe, S.
965-977.			
Continuous power generation and			
microbial community structure of			
the anode biofilms in a three-stage			
microbial fuel cell system.			
Bioresource Technology (in press)	2010年3月23 一		Kyungmi, C. Fujiki,
Effect of formation of biofilms and	H		I., and Okabe, S.
chemical scale on the cathode			
electrode on the performance of a			
continuous two-chamber microbiai			
fuel cell			
第11回日本水環境学会シンポジウ	2008年9月17	日本水理培学会	Chung K
「Direct nower generation and	2008年9月17 日 ~ 18日	口本小煤烧于云	Kumano K and
microbial community structure of	н тон		Okabe S
the anode biofilms in continuous			onuoo, 5.
three-stage two-chambered			
microbial fuel cells]			
第42回日本水環境学会年会講演	2008年3月19	日本水環境学会	Chung, K.,
集「Performance and bacterial	日~21日		Kumano, K., and
community structure of continuous			Okabe, S.
two-chamber microbial fuel cells]			

The proceeding of the 44th	2007年11月16	日本土木学会	Kyungmi Chung,
Environmental Engineering Forum.	H		Keiichi Kumano,
Direct power generation from			Satoshi Okabe
wastewater using continuous			
microbial fuel cells]			
第42回日本水環境学会年会講演	2008年3月20	日本水環境学会	Kyungmi Chung,
集「Performance and bacterial	B		Keiichi Kumano,
community structure of continuous			Satoshi Okabe
two-chamber microbial fuel cells]			
The 4th IWA Leading-Edge			
Conference and Exhibition on Water	2007年9月4日	International Water	Chung, K., and
and Wastewater Technologies.		Association	Okabe, S.
FEffects of sizes and types of			
electrode on electricity generation			
and microbial community structure			
of anode biofilms in continuous			
MFCs」			
 第44回環境工学研究フォーラム講	2007年11月16	日本土木学会	 佐藤 久、坂井田
演集「有機性廃棄物からのポリヒド	B		健司、岡部 聡、伊
ロキシアルカン酸の生産」			藤竜生、渡辺義
			公
 環境バイオテクノロジー学会2008	2008年6月25	環境 バイオテクノロ	│ │佐藤久、坂井田健
年度大会講演集「有機性廃棄物か	B	ジー学会	司、岡部聡、伊藤
らのポリヒドロキシアルカン酸の生		• _•	竜生、渡辺義公。
 第45回環境工学研究フォーラム講	2008年11月29	日本土木学会	 羽深 昭、坂井田
演集「有機性廃棄物からのポリヒド	в		健司、佐藤 久、深
ロキシアルカン酸の生産」			澤達矢,高橋正
			□ 一 一 一 二 一 二 一 二 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一
			部聡。
 第43回日本水環境学会年会講演	2009年3月16	日本水環境学会	 羽深 昭、佐藤
集「有機性廃棄物からのポリヒドロ			久、高橋正宏、伊
キシアルカン酸の生産			藤竜生、岡部聡。
	1	1	

9. 研究成果による知的財産権の出願·取得状況

知的財産権の内容	知的財産権の 種類、番号	出願年月日	取得年月日	権利者名
なし				

10. 成果の実用化の見通し

実施期間(3年間)で、論文3編、学会発表9件の成果発表を行った。

現在のところ、有機性廃棄物を燃料源としたバイオ燃料電池の電力出力はわずか数10mW/m² 程度であり、電池材料(陰極、陽極、プロトン交換膜)が極めて高価であるため、実用化には至って いない。しかしながら、近年の酵素を用いたバイオ燃料電池や、糖やアルコールを燃料源としたバイ オ燃料電池に関する研究では、現在までの5年間に電池材料の開発が急速に進み、電力出力は 100倍以上に向上した。これらの材料を廃棄物を燃料源としたバイオ燃料電池に適用することで、 電力生産コストを100分の1以下に抑えることが可能となる。近年の材料・ナノテクノロジー分野の研 究は極めて活発であり、今後数年の内にさらに高効率の材料が開発されると考えられる。バイオ燃 料電池の研究は電気化学、材料化学、微生物工学などに関する深い知識が要求される学際的研 究である。本研究では、他の分野に比べて未知の部分が多い微生物工学に関する研究を行ない、 電気化学的に活性の高い細菌を同定し育種した後にバイオ燃料電池に適用することにより、さらに 発電効率を高める。

バイオプラスチックの普及を妨げている主要因は生産コストの高さにある。これは原材料費の高さ と精製に要するエネルギー消費量に起因している。本研究では、原材料を従来用いられているトウ モロコシなどの農産物から廃棄物である下水汚泥に、精製方法を蒸留やイオン交換から省エネル ギー的な膜分離技術に変更する。これにより、PHA生産コストは大幅に削減でき、生産されたバイ オプラスチックの価格を既存の石油由来のプラスチックと同程度まで低下できる。

今後は、開発されたバイオ燃料電池およびバイオプラスチック生産リアクターをもとに、パイロット スケールのシステムを製作する。これを札幌市のA下水処理場内に設置し、下水汚泥を処理すると ともに発電およびバイオプラスチック生産を試みる。ここから得られた結果を事業化の足掛かりとす る。有用微生物を探索し、この使用に関する特許を取得する予定である。さらに、開発したシステム を他の有機性廃棄物(食品廃棄物や畜産廃棄物)の処理に適用する。

上記の各要素技術の開発に加え、未利用バイオマスからのエネルギー・資源回収という社会的 要請の高まりにより、今後5年程度の間に電力・バイオプラスチック生産型処理システムは実用化さ れるものと考えられる。

11. その他

特になし