

26

助成番号 0026

新しい海洋性細菌を利用した高濃度アンモニア除去システムの開発

助成研究者：菅野 靖史 (東京工業大学 資源化学研究所)
 共同研究者：正田 誠 (東京工業大学 資源化学研究所)
 平井 光代 (東京工業大学 資源化学研究所)

アンモニアは、刺激臭のある有毒な気体である。アンモニアの除去は工場の排ガス処理や、生ゴミから発生するガスの処理などで重要なプロセスのひとつである。従来から微生物処理が試みられているが、既知の微生物(主に独立栄養細菌)は、増殖速度が遅いため、他の微生物が混入すると淘汰されてしまいアンモニア除去ができなくなる。そこで、本研究では、海洋性細菌 *Vibrio alginolyticus* Oiso-1 (以下 Oiso-1 と略す) が高い耐塩性を有していることに着目した。これまでにグルコース、スクロースを炭素源とした培地では塩濃度の高い環境下では陸生の細菌の増殖が阻害され、アンモニア除去が可能であることがわかった。今年度は、アンモニアがどのような物質に変換されているか、また、より低コストの炭素源として産業廃棄物である廃糖蜜を用いてアンモニア除去が可能であるか否かを調べた。まず、通気培養槽を用いて 1000 ppm のアンモニアを 7 日間通気し、培養液中の窒素バランスを調べた。その結果、流入窒素の 94% が培養液に含まれていることが明らかとなった。さらに、菌体には 4.5% しか含まれず、残りは培養上清に存在した。上清のアミノ酸分析によりアラニンが著量に存在することが示唆された。さらに、上清をシリカゲルクロマトグラフィで分取し、薄層クロマトグラフィで検出したところニンヒドリン反応を示す物質が得られた。これを $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ で解析したところ、アラニンの生成が確認された。これにより、本菌のアンモニア除去は硝化反応に依存していないことが示唆された。また、廃糖蜜を炭素源として Fuyolite を担体としたバイオフィルタを用いた場合、流入アンモニア濃度 200 ppm から 1000 ppm の範囲で 80% 以上のアンモニア除去率が得られた。この結果を基に流入アンモニア負荷に対するアンモニア除去能の関係を調べたところ、Oiso-1 のアンモニア完全除去能は 16.5 g-N/kg-dry fuyolite/day、最大除去能は 18.7 g-N/kg-dry fuyolite/day であった。この濃度は、現在知られている独立栄養細菌が除去できる限界濃度の 4.0 倍に相当する。これにより、安価な炭素源を用いて、低濃度から高濃度までの広い範囲でアンモニアの除去が可能であることが明らかとなった。今後は、より大型の装置での研究が必要になると考えられる。

26

助成番号 0026

新しい海洋性細菌を利用した高濃度アンモニア除去システムの開発

助成研究者：菅野 靖史 (東京工業大学 資源化学研究所)

共同研究者：正田 誠 (東京工業大学 資源化学研究所)

平井 光代 (東京工業大学 資源化学研究所)

1. 研究目的

近年、環境問題への関心が社会的に高まっている。そのひとつに悪臭問題がある。この臭気の主成分のひとつはタンパク質を構成するアミノ酸から遊離したアンモニアである。アンモニアの発生源としては、コンポスト工場、肥料工場、水産加工工場等が大きな割合を占めている。これまで、アンモニアの処理法のひとつとして生物処理が試みられている。しかし、従来の生物処理では、独立栄養の硝化菌を使うため、菌体の増殖が遅く、その結果アンモニアの処理負荷量を大幅に増加させることは難しい。同時に、増殖速度の速い雑菌の汚染を受けやすいという欠点を有している。本研究では、これまでに海洋性細菌 *Vibrio alginolyticus* が高濃度のアンモニアを除去できることを明らかにしてきた。さらに、本菌は、高塩濃度下では一般細菌の増殖を阻害し優先的に増殖するという特性から、雑菌の汚染を受けにくいことが明らかとなった。本年度は昨年度までの実験結果をもとにアンモニアがどのような物質に変換されているか、また、炭素源として廃糖蜜を用いた場合のアンモニア除去効率への影響について調べた。

2. 実験方法

2.1 供試微生物

供試微生物として、神奈川県衛生研究所の大澤から提供されたアンモニアを唯一の窒素源として増殖することができる海洋性細菌 *Vibrio alginolyticus* Oiso-1 (以下、Oiso-1 と略す) を用いた。

2.2 生産物の同定

生産物の同定のためにアンモニアを窒素源とし、Fig. 1 に示す通気培養槽でアンモニアを連続通気し、培養液中の生産物を調べた。通気するアンモニア濃度は 1000 ppm、通気流量は 2 vvm とした。基準培地の成分は H₂O 1 リットルに対して、NaCl 30 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.036 g, K₂HPO₄ 15 g, CaCl₂ · 2H₂O 0.0013 g, ZnCl₂ 0.007 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.001 g とし、培養を通じて炭素源として 1 日 2 回、10 g 程度のグルコースを供給した。培養終了後、培養液を遠心し、上清と菌体を分離した。培養液、上清、菌体をそれぞれ元素分析し窒素バランスを調べた。さらに上清を 0.22 μm のメンブレンフィルターでろ過後、アミノ酸分析

計 (日立 L-8500) にてアミノ酸分析を行った。同様にろ過後の上清を水を溶出溶媒として Sephadex G-15 ゲルろ過クロマトグラフィーに供した後、各フラクションをシリカゲル薄層クロマトグラフィ(TLC)に供した。

2.3 廃糖蜜を炭素源としたアンモニア除去

従来のグルコースを炭素源とした培地(1)に代えて、廃糖蜜を炭素源とする培地を作製し、Fig.2 に示すバイオフィルターを用いた通気実験を行った。担体は Fuyolite 7 号 (扶養パーライト製) とし、通気アンモニア濃度、通気流量は適宜変化させた。温度、pH は制御せず雑菌混入防止用のエアフィルター等は装着しなかった。通気実験中の栄養分と水分供給のため 1 日 4 回、各 1 時間ずつ 0.15 ml/min で硫酸アンモニウムを除いた培地を供給した。バイオフィルターに流入するアンモニア濃度と排気されるアンモニア濃度の差を測定することで除かれたアンモニア量を定量した。

3. 実験結果および考察

3.1 生産物の同定

培養開始から 6 日間のアンモニア除去率は 100%であった。7 日目に除去率が 75%に低下したため実験を終了した。培養液、上清、菌体の元素分析から、流入した窒素の 94% が培養液中に含まれることが明らかとなった。さらに、菌体には 4.5%しか含まれず、残りは培養上清に存在した(Table 1)。上清のアミノ酸分析では、アラニン(19.9 g/l)、バリン(2.15 g/l)、グルタミンおよびグルタミン酸(1.68 g/l)、アスパラギンおよびアスパラギン酸(1.29 g/l) が検出された。ゲルろ過後の各フラクションの TLC 解析は、展開溶媒をクロロホルム : メタノール : 水 = 15 : 25 : 4 とし、ニンヒドリン試薬、硫酸を検出試薬として用いた。その結果、ニンヒドリン反応で赤紫色に着色されるスポットが出現した(Fig. 3)。一方、このスポットは硫酸では反応しなかった。これは、アミノ酸分析の結果と矛盾せず発色したサンプルはアミノ酸系の物質であると考えられたので、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ で構造決定したところアラニンであることが確認された(Fig. 4)。これらのことから、本菌はアンモニアの硝化反応は行わず、アミノ酸の生合成にアンモニアを利用していると考えられた。

3.2 廃糖蜜を炭素源としたときのアンモニア除去

117 日間のアンモニア通気実験における流入と流出アンモニア濃度およびアンモニアガスの流入量、アンモニアガスの流入時の空間速度の関係を Fig. 5 に示す。92 日目まで空間速度を 92 h^{-1} から 244 h^{-1} まで増加させて、その間に流入アンモニア濃度を 200 ppm から 1,000 ppm まで変化させた。培養初期に 350 ppm から 800 ppm の負荷を与えたところアンモニア除去率は 100%であった。その後、空間速度を種々変えたところ、92 日目までのアンモニア除去率は 75%以上を維持した。82 日目に流入アンモニア濃度を 400 ppm から 700

ppm まで増加させたところ 92 日目まで 90%以上のアンモニア除去率が得られた。92 日目から流入アンモニアを 550 ppm, 空間速度を 183 h^{-1} に固定し、107 日目に廃糖蜜原液を 15 倍から 30 倍に希釈したところアンモニア除去率は 75%に低下した。これにより、炭素源が不足することでアンモニア除去能が低下することが明らかとなった。炭素源不足によるアンモニア除去率の低下はグルコースでの実験でも裏付けられている(2)。以上の結果をもとに、117 日間の流入および流出アンモニア濃度とアンモニアガスの通気流量からアンモニア負荷と除去能の関係を Fig. 6 に示す。流入したアンモニアを 100%除去できるアンモニア負荷をアンモニア完全除去能とし、95%以上除去できるアンモニア負荷をアンモニア最大除去能としたところ、アンモニア完全除去能は $16.5 \text{ g-N/kg-dry packing material/day}$ となり、最大除去能は $18.7 \text{ g-N/kg-dry packing material/day}$ と見積もられた。この値は、本菌のグルコースを炭素源としたときの値のそれぞれ 89%, 86%であり、最大除去能は現在知られている独立栄養細菌が除去できる限界濃度の 4 倍に相当した。以上のことから、Oiso-1 により、廃糖蜜を炭素源としても高濃度のアンモニアを長期間除去できることが明らかとなった。

4. まとめと今後の課題

これまでの研究で Oiso-1 が高濃度のアンモニアを除去できることが明らかとなった。このアンモニア除去では、硝酸や亜硝酸は生成せず、ニンヒドリン反応に陽性である複数の化合物が生成した。このうちのひとつはアラニンであることが確認された。しかし、大量のアラニンが生合成され菌体外に蓄積される理由は未だ明らかではない。また、炭素源としてグルコースの代わりに廃糖蜜を用いることが可能であることが明らかとなった。この結果から、本菌によるアンモニア除去が低いコストで十分可能であることが示され、廃棄物処理を加味した新しいアンモニア除去システムの構築への道筋が示された。今後は、さらにスケールアップした実験、および生産されるアラニン以外のニンヒドリン反応に陽性である化合物の特定とその二次利用の研究が必要になると考えられる。

謝辞

本研究において、機器分析で技術的な支援をいただいた東京工業大学資源化学研究所中村義之助手ならびに林ゆう子助手に深くお礼申し上げます。最後になりましたが、本研究を遂行する上で、3年間に渡り多大なご支援をいただいたソルトサイエンス研究財団に深くお礼申し上げますとともに、貴財団の益々のご発展をお祈り申し上げます。

参考文献

- (1)菅野靖史ら、平成 11 年度ソルトサイエンス研究財団助成研究報告集 I
- (2)菅野靖史ら、平成 10 年度ソルトサイエンス研究財団助成研究報告集 I

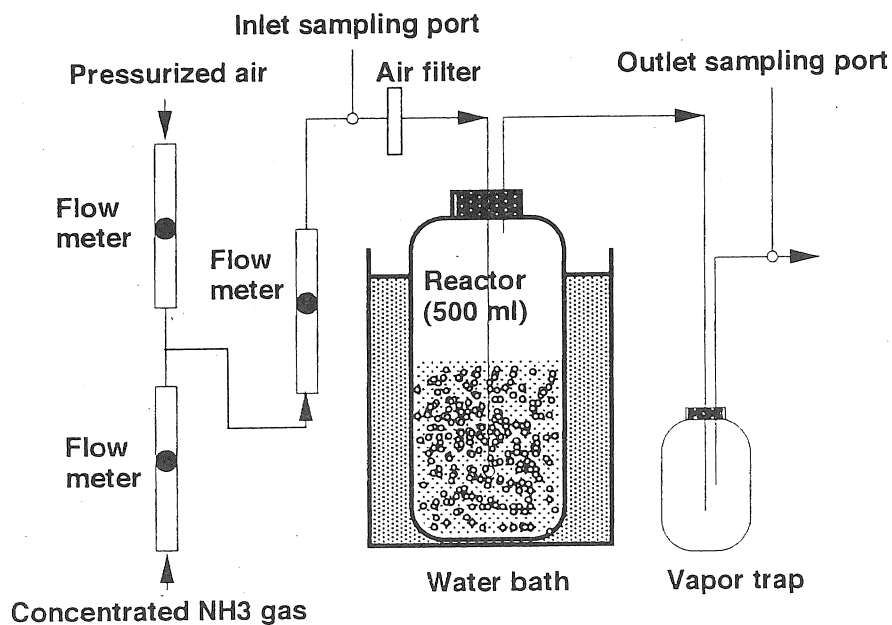


Fig. 1 Schematic diagram of a laboratory scale bubbling deodorization system for NH₃ removal

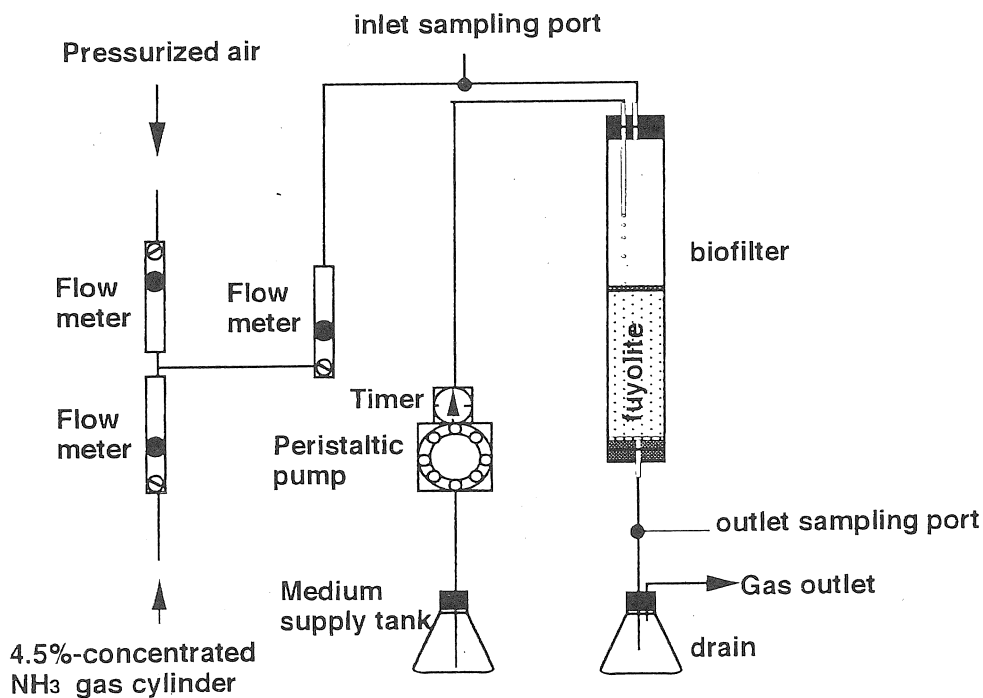


Fig. 2 Schematic diagram of a laboratory-scale fuyolite biofilter (50 mm ϕ x 200 mm L) for NH₃ removal.

Table 1 Nitrogen balance from element analysis when *V. alginolyticus* Oiso-1 was cultivated with ammonia gas (g-nitrogen/L)

Total supply	11.2
Culture broth	10.5
Cell	0.49
Supernatant	9.8
Alanine	3.19
Others	6.81

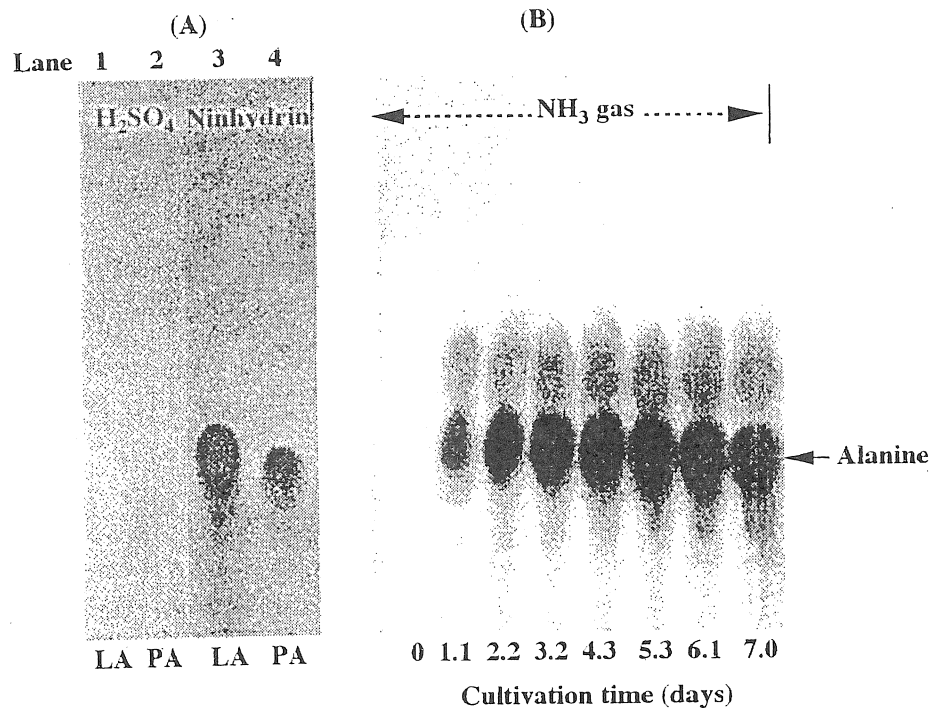


Fig. 3 (A) TLC analysis of authentic alanine and an isolated product from the Oiso-1 culture supernatant. lanes 1 and 3; authentic alanine, lanes 2 and 4; the isolated product from the supernatant. (B) The time courses of products from the Oiso-1 culture supernatant.

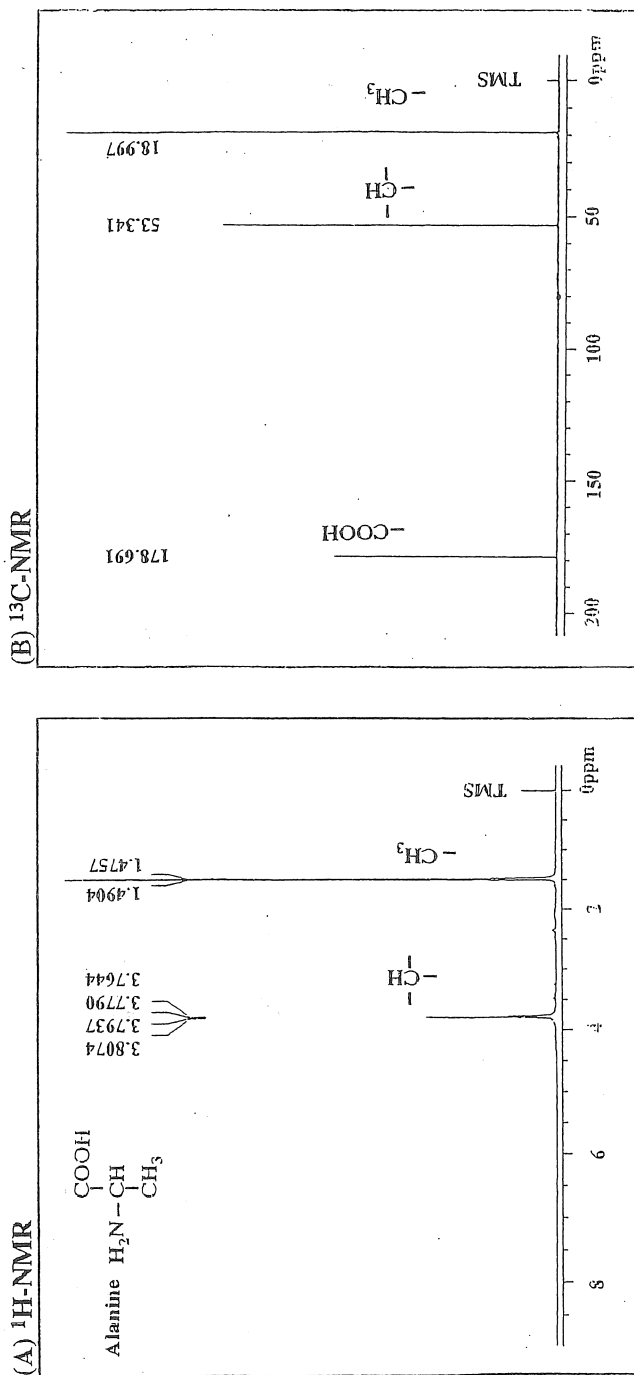


Fig. 4 (A) $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra of the isolated product from the Oiso-1 culture supernatant in D_2O .

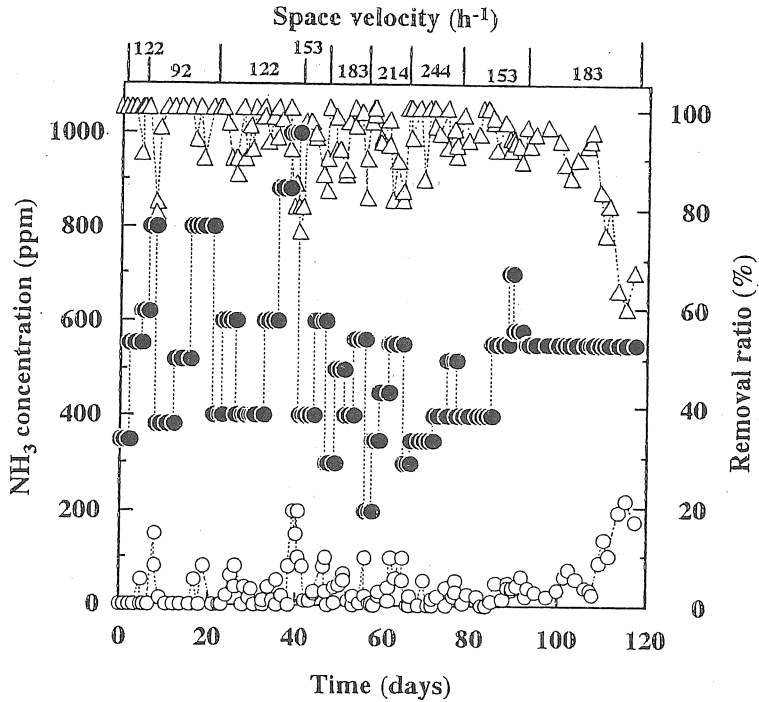


Fig. 5 Time courses of inlet (*closed circular*) and outlet (*open circular*) concentrations of ammonia, removal ratio (*open triangle*) and space velocity in Fuyolite biofilter inoculated with *Vibrio alginolyticus* Oiso-1 supplied with molasses as carbon source.

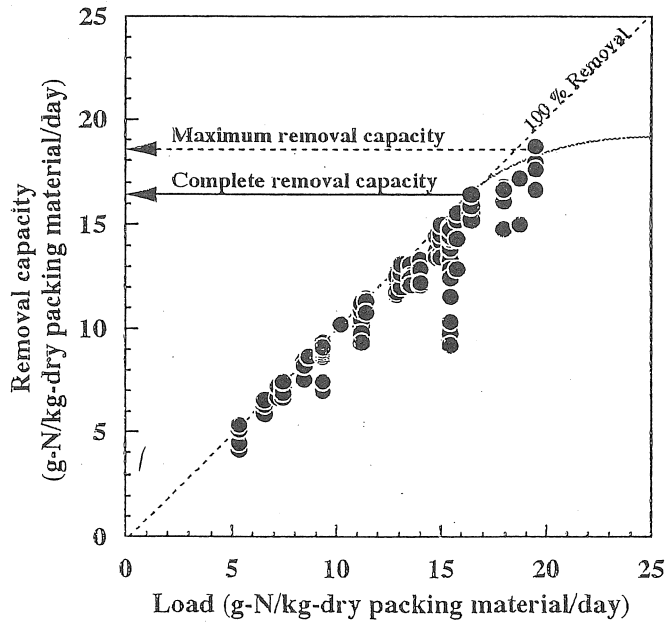


Fig. 6 Relationship between ammonia load and removal capacity in the Fuyolite biofilter inoculated with *Vibrio alginolyticus* Oiso-1 supplied with molasses as carbon source.

Development of a high performance ammonia removal system by using a novel marine bacterium

Yasushi Sugano, Mitsuyo Hirai, and Makoto Shoda

Chemical Resources Laboratory,
Tokyo Institute of Technology

Summary

Ammonia is a toxic and fouling gas. Therefore, ammonia removal from several environments, such as exhaust gas from fertilizer plants or garbage composting plants, is important. So far, several biodeodorization treatments to remove ammonia have been reported. Although autotrophic bacteria have been often used to construct ammonia removal system, it is difficult to prevent the contamination of other organisms as the growth rate is very slow compared with general heterotrophic bacteria. Therefore, in this study, we propose a novel system to remove ammonia using *Vibrio alginolyticus* Oiso-1, which is a heterotrophic and halophilic bacterium. In our previous study, we have already presented that this strain decreased the risk of contamination and increased ammonia removal capacity supplying glucose or sucrose as a carbon source. In this work, we focused two pending queries. One was how ammonia was converted. The other was to estimate the possibility of molasses as a cheap carbon source. When 1000 ppm of ammonia was loaded to a bubbling system with Oiso-1 for 7 days, the 90% of loaded nitrogen was remained in the supernatant of the culture. We identified alanine from the supernatant by the analyses of amino acid composition, Thin Layer Chromatography, $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$. This result reveals that ammonia removal by Oiso-1 does not depend on a general nitrification process but a novel ammonia removal process. When molasses was used as a carbon source and various concentration of ammonia (200-1000 ppm) were loaded to a bio-filter column with Oiso-1, more than 80% of ammonia was removed. The complete and maximum ammonia removal capacities were estimated to be 16.5 and 18.7 g-N/kg-dry-Fuyolite/day, respectively. The maximum removal capacity was four times as much as that of autotrophic bacteria. Therefore, Oiso-1 was clarified as a promising ammonia removal method for practical use. It is further important to evaluate the scaled-up ammonia removal system as a future work.