特集2・有機性廃棄物の可溶化技術とその応用

媒体攪拌ミル破碎による有機性汚泥の可溶化と
再利用技術

松本 幹治*・ケイ 新会**

1. はじめに

日本では、1997年の下水余剰汚泥排出量は186万トン乾燥重量にのぼっている¹⁾。これまでの余剰汚泥の処分は主に焼却、埋め立てや海洋還元によって行われてきた。しかし、最終処分場の確保の困難さや厳しい環境規制の実施によって、従来の汚泥処理ができなくなりつつある。そのためそれに代替できる新しい有機性汚泥処理技術の開発が社会的に強く求められている。これに応えるアプローチのひとつとして、有機性汚泥のリサイクルを目指した再資源化技術の構築が有望である。1993年度と1997年度の余剰汚泥の処理状況を乾燥重量ベースで比較すると、汚泥の焼却・埋め立て処分比率が70%から54%に低下し、農地還元や建設資材としての再利用率が23%から45%に増加したが、下水汚泥の再利用率がまだ低いものとなっている^{1,2)}。この理由として、汚泥から再生したコンポストや再生レンガなどの建材を受け入れる社会的容量がまだ低いことや、それ以外の汚泥の再資源化技術が乏しいことが挙げられる。従って、新たな有機性汚泥処理法として、汚泥からより付加価値の高い物質への高度な変換技術の開発や、複数の技術を組み合わせるシステムの構築が重要となる。

最近、余剰汚泥の有効利用と並行して、メタン発酵法以外に余剰汚泥の減容化技術が各社で開発されている。これは余剰汚泥構成微生物細胞を何らかの方法で破壊（可溶化）して、下水と一緒に活性汚泥曝気槽に再び戻して微生物に分解させることにより余剰汚泥を減少させる技術である。このような余剰汚泥の発生量低減技術は各企業が競って開発しているが、物理的・機械的方法として媒体攪拌ミルある

いは超音波処理法、化学的方法として酸・アルカリ分解あるいはオゾン酸化法、および生物学的方法としてメタン発酵、長時間曝気あるいは好熱細菌利用法がある。しかしながら、これらの技術は下水汚泥の減量化を図るものであり、汚泥の有効利用を目指したものになっていない。また、可溶化した余剰汚泥は生分解が困難な細胞壁を多く含み、そのまま下水処理槽に戻す場合、難分解性成分が次第に蓄積することが懸念されている。従って、単に減容化するだけでなく、余剰汚泥などの有機性汚泥をバイオマス資源とみなし、これらから直接酵素のような付加価値の高い生体物質を取り出すか、または化学的/生物学的プロセスを利用して有用物質に変換して再利用する技術の開発が必要と考えられる。本稿では余剰汚泥のミル破碎による有機性余剰汚泥の可溶化特性、汚泥破碎により放出された細胞質酵素の探索、とりわけプロテアーゼの特性と再利用可能な方向、細胞破碎後のメタン発酵特性および細胞破片のアルカリ分解とその分解液による酵素生産菌の培養について紹介する³⁾。

2. 媒体攪拌ミルによる有機性汚泥の可溶化⁴⁾

生物細胞の機械的破碎法として代表的なものに媒体攪拌ミル法、超音波法および加圧（高圧）液体剪断法（ホモジナイザー）があるが⁵⁾、大量処理に適しているのは媒体攪拌ミルである。媒体攪拌ミルによる純粋培養の細胞破碎に関する研究報告は多数あるので、その破碎機構や操作条件の影響などの評価は文献を参考にしてもらいたい⁶⁻⁸⁾。

余剰汚泥の可溶化に用いた連続式のビーズミル破碎装置（Dyno Mill KDL type, WAB社製）を図-1に示す。実際の余剰汚泥可溶化では、濃度10,000～14,000 mg MLSS/Lの余剰汚泥をポンプによって連続的にミル破碎チャンバーに供給して汚泥の破碎

*横浜国立大学工学部 Kanji MATSUMOTO

**中国清華大学化工系 Kei SHINKAI

図-1 余剰汚泥可溶化に用いる連続式ダイノミル破碎装置図

図-2 余剰汚泥破碎過程での可溶化率(可溶性TOCと全TOCの比)の典型的变化曲線

キーは実験データで、実線は計算値を示す

を行う。細胞のミル破碎は破碎機内で運動しているビーズ間の衝突によって行われるため、余剰汚泥の可溶化に及ぼす破碎条件として、ビーズの充填率、ビーズ直径、回転円盤の回転速度、余剰汚泥濃度、滞留時間が挙げられ、それらについて検討した。汚泥の破碎チャンバー内での滞留時間を3分間にし、所定量(1.5L)の汚泥について破碎回数を変えることによって汚泥の可溶化効果を調べた。

図-2は実験室培養汚泥のミル破碎(ビーズ充填率60%, ビーズ径0.5mm, 回転円盤回転速度3200rpm)における可溶化率の典型的な変化曲線を示す。可溶化率は汚泥の全炭素に対する破碎によって放出されてくる可溶性TOCの割合で評価した。破碎により汚泥細胞内の物質が放出されてくるが、細胞壁が可溶化できないため破片として残る。そのため、可溶化率が1より小さくなる。図-2に

示すように、余剰汚泥の可溶化率は、破碎開始後急激に増加し、およそ3回の破碎で最大値に達した。

余剰汚泥の連続式ミル破碎による可溶化過程を以下のように解析した。余剰汚泥の破碎が一次反応過程に従うと仮定すると、 i 回目の破碎における可溶化率 C に関する物質収支は式(1)と式(2)で表せる。

$$r_s = k(C_m - C) \quad (1)$$

$$(dC/dt)_i = DC_0 - DC + k(C_m - C) \quad (2)$$

$$(0 \leq t \leq (V_F/V_C)\tau)$$

$$\text{初期条件: } C = C_0 \text{ at } t = 0$$

ここで、 r_s は余剰汚泥の破碎速度 [$\text{mg S-TOC}/(\text{min} \cdot \text{mg TC})$], C_0 は破碎チャンバー入り口の可溶化率 [$\text{mg S-TOC}/\text{mg TC}$], C_m は汚泥の最大可溶化率 [$\text{mg S-TOC}/\text{mg TC}$], D は希釈率 [min^{-1}] (破碎機での汚泥の滞留時間(τ)の逆数), k は可溶化速度定数 [min^{-1}], t は i 回目での破碎時間 [min], V_F は余剰汚泥供給タンク容積 [ml], V_C は破碎チャンバー内の溶液体積 [ml]。式(2)を実際の実験結果にフィッティングすることによって、破碎速度定数が得られる。計算結果の一例は図-2の実線で示し、実際の結果によく一致した。このことから、余剰汚泥の可溶化速度式(2)を実際のプロセス設計に応用することが可能である。

余剰汚泥の可溶化はミル破碎機内のビーズ同士の衝突によって進行するため、速度定数 k とビーズ同士の衝突頻度 f との関係を図-3に示す。ビーズ同士の衝突頻度は式(3)で計算できる⁹⁾。

$$f = [(18) \sqrt{2/\pi}] [u_p(1 - \epsilon)^2 \alpha^2 / d_b^4] \quad (3)$$

ここで、 u_p は回転円盤の周速度 [m/s], ϵ は充填ビーズの空隙率 [-], α はビーズ充填率 [-], d_b はビーズ直径 [mm]である。

ビーズ径0.5mmの場合、図-3の直線Ⅲの勾配が

図-3 余剰汚泥の可溶化速度定数(k)とビーズ衝突頻度(f)との関係

1であることから、余剰汚泥の可溶化速度定数はビーズ間衝突頻度に比例していることが分かる。また、図から実際の余剰汚泥と実験室培養汚泥の可溶化はほぼ同様な傾向を示している。これらの結果は報告された純粋培養細胞の破碎結果と一致している。このことから、さまざまな微生物の凝集体である活性汚泥のミル破碎による可溶化は凝集体のまま構成細胞が破壊されることによると推測された。

図-3はミル破碎による汚泥可溶化プロセスのスケールアップのための基礎になる。

3. 可溶化有機物汚泥中の有用酵素とその回収

ミル破碎で得られる余剰汚泥の可溶化液を用いて、生体構成高分子の低分子化酵素を中心としてその活性を比較検討した。実験では、食品工場廃水と都市下水処理場から採取した実余剰汚泥および実験室で培養した活性汚泥をそれぞれ用い、可溶化した余剰汚泥混合液を4℃で10,000rpm、15min遠心分離した上澄み液を酵素活性測定に供した。プロテアーゼ、アミラーゼ、グルコシダーゼ、グルカナーゼ、リパーゼおよび脱水素酵素の各酵素活性は、基質としてそれぞれカゼイン、可溶性澱粉、p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside、CM-セルロース、p-nitrophenyl palmitate、2,3,5-triphenyltetrazolium chlorideを使用して測定した。酵素活性の温度依存性を調べるために、異なる温度条件下で酵素反応を行った。

表1は実験室培養汚泥および都市下水処理汚泥を破碎した液から得られた諸酵素の最大活性とそのときの温度をまとめたものである。同じ汚泥でも、それぞれの酵素が異なる最大活性と最適温度を示した。また、同じ酵素についても、汚泥種類によって

表1 実験室培養汚泥(A)と都市下水処理汚泥I(B)の破碎物の最大酵素活性の比較
(A) 実験室培養汚泥

酵 素 名	最大酵素活性*		最大活性の温度 (℃)
	U/gMLSS	U/mgProtein	
プロテアーゼ	3450 $\pm$ 124	116.1 $\pm$ 4.2	75
アミラーゼ	111.0 $\pm$ 5.0	3.7 $\pm$ 0.2	75
グルコシダーゼ	59.5 $\pm$ 2.9	2.0 $\pm$ 0.1	20
リパーゼ ($\times 10^2$)	8.8 $\pm$ 1.4	0.29 $\pm$ 0.05	40
脱水素酵素 ($\times 10^3$)	36.6 $\pm$ 3.8 ^a	0.93 $\pm$ 0.09 ^b	40

(B) 都市下水処理汚泥I

酵 素 名	最大酵素活性*		最大活性の温度 (℃)
	U/gMLSS	U/mgProtein	
プロテアーゼ	2210 $\pm$ 308	75.8 $\pm$ 10.5	50
グルコシダーゼ ($\times 10^3$)	1.12 $\pm$ 0.02	38.3 $\pm$ 0.6	60
グルカナーゼ ($\times 10^3$)	1.18 $\pm$ 0.07	40.6 $\pm$ 2.3	40
リパーゼ ($\times 10^3$)	1.17 $\pm$ 1.70	6.7 $\pm$ 10.5	20

*活性の表し方: 平均値 $\pm$ 標準偏差 ($n=3$)

^amg Triphenylformazan/gMLSSで表した

^bmg Triphenylformazan/mg Proteinで表した

図-4 各種汚泥由来のプロテアーゼの温度依存性

異なる活性と最適温度を示した。しかし、いずれの汚泥でもプロテアーゼの活性が最も高かった。実験室培養汚泥では、破碎前の脱水素酵素活性は破碎後の値の10倍位であった。このことは、ミル破碎期間中、プロテアーゼによる他の酵素分解が起きている可能性を示唆している。詳細について現在検討中である。余剰汚泥破碎液のプロテアーゼ活性が高いため、これをモデル酵素として、その温度依存性、回収および再利用方法について検討した。

図-4に5種類の異なる汚泥中のプロテアーゼ活性の温度依存性を示す。汚泥の種類によって酵素の温度依存性が異なった。都市下水汚泥Iとチーズ廃水汚泥では温度の上昇に伴い酵素活性が上昇したが、ある温度からは活性が再び低下した。実験室培養汚泥と乳業汚泥は75℃まで酵素の失活が見られなかった。この相違は汚泥の種類によって微生物相が異なるためと推測された。図-4に最大酵素活性が現れる温度までのプロテアーゼ活性を20℃のもので割った相対活性と温度の関係を示した。可溶性

した汚泥から得られたプロテアーゼの相対活性と温度との関係はアレニウスプロットによく従ったが、汚泥の種類によって二つのパターンに分かれる傾向を示した。培養汚泥、都市下水汚泥Iおよび都市下水汚泥IIは同じ傾きを、多少バラツキがあったが乳業汚泥とチーズ汚泥が同じ傾きを示した。

余剰汚泥破碎液からのプロテアーゼ回収を硫酸塩析法によって検討した。余剰汚泥破碎液の上清液(1L)に4倍の4℃の冷却リン酸バッファーを加え、よく混合した。スターラーで攪拌しながら硫酸を70%(w/v)まで徐々に添加し、完全に溶解させた。この混合液を4℃で一晩放置した後、10,000rpm、15分の遠心条件で沈殿物と上清液を分離した。上清液を捨て、沈殿物を100mlの50mMリン酸バッファーに溶かした。それぞれの回収ステップおよび硫酸沈殿物の-20℃における保存期間でのタンパク質濃度とプロテアーゼ活性の変化を表2にまとめる。元の破碎液と回収酵素液のデータから、タンパク質とプロテアーゼ活性の回収率はそれぞれ63.8%と69.2%であった。この結果から、従来の簡易な硫酸沈殿法によっても活性のあるプロテアーゼが回収できることを示唆している。回収酵素溶液をそのまま-20℃で保存すると、1ヶ月間の保存ではプロテアーゼ活性が減少したが、その後安定になった。現在、より効率的なUF膜処理による放出酵素の回収法について検討中である。

4. 回収プロテアーゼの応用例

余剰汚泥から得られる酵素の応用の一つとして、環境保全への利用が考えられる。下水中の可溶性有機物の多くはタンパク質などの高分子であり、処理プロセスにおいてそれらの高分子の加水分解が律速になっていることが知られている¹⁰⁾。したがって、下水中の高分子の加水分解を促進することが廃水の生物処理プロセスの効率化にもつながると考えられ

表2 酵素の精製過程と-20℃での期間中におけるタンパク質濃度とプロテアーゼ活性の変化

	体積 ℓ	タンパク質濃度 mg/ml	プロテアーゼ活性	
			U/ml	U/mgProtein
汚泥破碎物の上澄み*	5	0.141 ± 0.001 (n=3)	0.588 ± 0.059 (n=3)	4.177 ± 0.447 (n=3)
リン酸バッファに 溶解した精製酵素 (A)	0.5	0.900 ± 0.005 (n=3)	4.074	4.527
-20℃で (A) 1ヵ月保存		0.869	2.541	2.924
-20℃で (A) 3ヵ月保存		0.784	2.562	3.268

*都市下水処理場から採取した余剰汚泥IIを用いた

表3 余剰汚泥から回収したプロテアーゼによる市販ミルクとスキムミルクの分解実験条件

	Run1	Run2	Run3
ミルク希釈液 (市販のミルクの15倍希釈液)	30 ml	30 ml	×
酵素溶液	30 ml	×	30 ml
純水	×	30 ml	30 ml

*市販ミルクの組成 (w/v) : タンパク質3.7%, 脂質1.5%, 炭水化物5.9%, Na0.05%, Ca0.22%

ている。そのため、水処理用の分解補助剤としていろいろな微生物あるいは酵素製剤が市販されている。そこで、余剰汚泥から回収したプロテアーゼによるミルク中のタンパク質分解特性を検討することにした(表3)。

実験室培養汚泥と都市下水処理汚泥Ⅰの破碎液の遠心分離液をそれぞれ市販のミルクを純水で15倍希釈したミルク希釈液と体積比で1:1混合して(タンパク質濃度が約0.12% (w/v)), プロテアーゼによるミルクのタンパク質の低分子化過程を生成したチロシン濃度変化によって検討した。図-5には汚泥由来のプロテアーゼによるミルクタンパク質の分解過程を示す。対照実験Ⅱはミルクのみのものである。対照実験Ⅲは破碎した汚泥の遠心分離液のみのものである。対照実験ではいずれもチロシン濃度の変化はなかったが、二種類の汚泥由来の酵素はいずれも反応時間の経過に伴いミルク中のタンパク質を分解し、チロシンを生成した。この結果から、タンパク質の分解によるチロシンの生成量が103 μ g/mg-タンパク質であり、ミルクに含まれたカゼインが全部分解されて生じてくるチロシン(40 μ g/mg-カゼイン)よりもはるかに高い。このことは、余剰汚泥由

来のプロテアーゼがいくつかのタンパク質分解酵素の混合物になっている可能性があり、ミルク中のカゼイン以外のタンパク質も分解できることを示唆した。また、図に示さなかったが、表2に示した3ヶ月保存後の回収プロテアーゼ溶液も同様なミルクタンパク質分解を示した。これらの結果から余剰汚泥由来のプロテアーゼは廃水中のタンパク質の低分子化促進に応用できることが示唆された。

5. 細胞破碎処理のメタン発酵特性に及ぼす効果

汚泥を媒体攪拌ミルにより破碎することによりメタン発酵(嫌気性消化発酵)効率が增加することは既に報告されている¹¹⁾。我々が行った回分メタン発酵の結果を図-6に示す。メタン発酵に用いた汚泥は3200rpmで45min破碎したもので、含水率は94%である。メタン発酵は容量1Lのバイアル瓶に種汚泥300mlと可溶化処理汚泥を負荷4.5gVS/Lになるように投入し、55℃で行った。嫌気状態を保つために、バイアル瓶気相部はCO₂(20%)/N₂(80%)の混合ガスで置換した。発生ガス量は投入直後から測定したものである。図-6の結果から破碎工程のガス発生速度は未破碎のものに比較して大きく、ガス発生量も増加しているのがわかる。

6. 細胞破片の可溶化と可溶化液による有用酵素の生産

余剰汚泥をミル破碎すると可溶化物と細胞破片が得られる。細胞破片は難分解性で自然に微生物分解しない。そこで遠心分離により分離した細胞破片の

図-5 ミルク人工下水のプロテアーゼによる分解。

RunI, ミルク下水と汚泥破碎液の遠心上澄みの混合液; RunII, 汚泥破碎液の遠心上澄み

図-6 破砕処理汚泥のメタン発酵

アルカリ処理による可溶化を試みた。細胞破片のアルカリ処理と培地の調整法を図-7に示した。細胞破片を0.5MNaOHあるいは2MNa₂CO₃により50℃, 24h処理した。その結果, NaOH処理液のみ可溶化が認められた。そこでNaOH処理した細胞破片培地(K₂HPO₄0.02g/L添加, pH10)を用いて*Bacillus sp.*JCM9139を培養し, 24hごとにサンプリングして, pH, 濁度, TOC, 酵素活性(プロテアーゼ, グルカナーゼ), タンパク質濃度を測定した。その結果, NaOH処理した培地ではTOCが減少して, 濁度(OD₆₆₀)が増加し, 菌の増殖が認められた。また図-8に示すようにグルカナーゼは生産されないが, この菌は増殖後期になるとプロテアーゼを生産することがわかった。

7. おわりに

本稿では媒体攪拌ミル破砕による有機性汚泥の可溶化と再資源化技術の開発研究について述べた。可溶化汚泥を固液分離することにより, 上清液から有用酵素を回収し, 残留液はメタン発酵によりバイオガスを回収する。一方, 細胞破片はアルカリ分解し, その分解液に不足栄養素を添加することにより培地とし, 有用酵素等を生産できる可能性が示された。すなわち, 余剰汚泥の総合的利用が可能であることが示された。本システムでの唯一の問題は可溶化のための機械的エネルギー消費量が多いことである。化学的破砕作用と併用する, あるいは部分破砕によるエネルギーの低減を図ることにより消費エネルギーが低減できる可能性もあるが, このシステムを実現させるためには, 省エネ型破砕方法の開発, 破砕汚泥の更なる総合的利用方法と効率的な有用物質の分離法の開発が必要であろう。(本研究を行うに

図-7 細胞破片培地作成の手順

図-8 プロテアーゼ活性の経時変化

当りご支援いただいた(財)廃棄物研究財団と三菱重工業(株)に対し感謝いたします。)

参考文献

- 1) 森田弘昭: 環境技術, 29, 334-341 (2000)
- 2) 渡部春樹: 下水道協会誌, 33, No.396, 334-341 (2000)
- 3) ケイ新会, 鄭 振浩, 松本幹治: バイオサイエンスとインダストリー, 59, 185-186 (2001)
- 4) J.Jung, X.-H.Xing, K.Matsumoto: Biochemical Engineering J., 8, 1-7 (2001)
- 5) 松本幹治: 粉体工学会誌, 25, 303-309 (1988)
- 6) H.Schütte&M.-R.Kul.: Separation Processes in Biotechnology (Ed.by J.A.Asenjo.), Marcel Dekker Inc. pp.107-142 (1990)
- 7) 松本幹治, 吉川ユミ, 田辺 誠: 生物工学会誌, 72, 161-166 (1994)
- 8) P.J.A.Middelberg: Biotechnology Advances, 13, 491-551 (1995)
- 9) A.V.Melendres, H.Honda, N.Shiragami, H.Unno: Bioseparation, 2, 231-236 (1991)
- 10) Y.Ubakata: Wat.Sci.Tech., 40, 61-68 (1999)
- 11) 内山直明, 中川輝雄, 矢島 聡, 上山貞夫: 第26回下水道研究発表会講演集, pp.565-567 (1989)