

令和元年6月5日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00585

研究課題名(和文) 下水からのリン・アスタキサンチン同時回収のための微細藻類培養技術の開発

研究課題名(英文) Microalgae cultivation in wastewater for the recovery of phosphorus and astaxanthin

研究代表者

永禮 英明(NAGARE, Hideaki)

岡山大学・環境生命科学研究科・准教授

研究者番号：60359776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：持続可能な食料生産を維持するために、下水中に含まれる肥料成分・リンを回収しながら、なおかつ付加価値物質としてカロテノイドの一種・アスタキサンチンを生産・回収するための藻類培養技術について検討した。藻類にはヘマトコッカス(*Haematococcus pluvialis*)を使用した。ヘマトコッカスは増殖速度が遅く大量培養が難しいことから、オゾンを使い他の雑菌繁殖を防止しヘマトコッカスを大量培養する方法を検討した。ヘマトコッカスは他の微生物に比べ高いオゾン耐性を示した。また、ヘマトコッカス細胞から、細胞内に蓄積したリンとアスタキサンチンを回収する方法について検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界人口が増加し食料と肥料の需要が高まる一方、肥料資源としてのリンの減少が懸念されている。このような状況の下、下水から使用済みのリンを回収し再利用する技術の確立が求められている。既に回収技術はあるものの、経済的な課題から普及が進んでいない。本研究は高付加価値物質であるアスタキサンチンを生産・回収することでリン回収に要する費用を賄えるような技術を開発することを目的としている。この技術が確立されたなら、下水処理場が自発的・積極的にリン回収技術を導入し、それによって持続可能な食料生産に近づけるものと考えている。本研究では基礎技術の確立を目的として実施し、実現の可能性を得た。

研究成果の概要(英文)：To sustain the food production in the growing population and resource depletion, a new wastewater treatment process with microalgae cultivation to recover phosphorus and also a valuable product, astaxanthin in this research. *Haematococcus pluvialis* was used as an algae. *H. pluvialis* showed stronger resistant ability against ozone compared with other microbes including bacteria. The procedure for extracting and recovering phosphorus and astaxanthin from the algal cells was also investigated.

研究分野：環境工学

キーワード：下水 水処理 資源回収 リン 肥料 食料生産

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

食料生産に欠かせない肥料の主要成分、リンの不足が懸念されている。廃水等から使用済みのリンを回収するための技術が世界中で開発され、すでに下水処理場で実用化されているものもある。しかし、回収したリンの市場価格が安く処理に要する費用を賄うことができないため、リン回収設備の新規導入は進んでいない。

### 2. 研究の目的

本研究では、下水中で微細藻類ヘマトコッカス (*Haematococcus pluvialis*) を培養し下水からリンと同時にアスタキサンチン (AX) を生産・回収することで経済的利益を大きくし、これによりリン回収技術の普及を促進しようとするための「リン回収型アスタキサンチン生産フォトバイオリクター」を構築する。*H. pluvialis* の連続培養実現が課題であり、本研究では、(1) *H. pluvialis* の抗酸化性を利用した雑菌繁殖防止技術を確立する、(2) 下水中リンの 80% 以上を回収する方法を開発し、連続処理実験により(3) 下水 1L あたり 10mg 以上の AX を生産することを目標として設定した。

### 3. 研究の方法

人工培地にて培養した *H. pluvialis* (NIES-144, 国立環境研究所から分与) を用い、一連の研究を行った。細胞は NIES-C 培地を用い、温度 20℃, 蛍光灯照射下 (12 h/12 h) で継代培養を行った。実験に際しては増殖した *H. pluvialis* 細胞を採取し、必要な前処理を行った後に実験に供した。AX 生産に際しては、増殖した細胞に 1,400  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  の強度で白色 LED ライトの光を照射した。オゾン処理では洗浄した細胞を 0.05% NaCl 溶液に浮遊したものに対しオゾンガスを添加し、その後に酸素生産速度を測定し、これを活性度とした。

### 4. 研究成果

#### (1) H28 年度

H28 年度は藻類細胞からのリン回収試験を中心に研究を実施した。細胞の破碎条件、破碎細胞からのリン、アスタキサンチンの抽出条件について、特にリンの抽出に注目して検討した。破碎と抽出は、ガラスビーズを用い同時に行い、破碎時の破碎強度、破碎時間、途中の冷却回数を変化させた。破碎強度が強すぎる場合、破碎容器内部の温度が上昇し沸騰するケースもあった。アスタキサンチンの熱による変化を防止するために適切な破碎・抽出条件が必要である。

十分に増殖した細胞に白色 LED の強光を与え、アスタキサンチンの生産を誘導した。*H. pluvialis* は生活の中で 3 つの生活形を示す (Fig. 1)。強光を照射することで細胞内に AX を蓄積し赤色の休眠孢子となる。

AX を蓄積した休眠孢子細胞から AX とリンとを抽出するために、遠心分離による洗浄・濃縮を行った。ただし、この過程で失われるリン量が無視できない量であったため、洗浄に使用する溶液についても検討を行った。その結果、生理食塩水、または河川水を想定した希薄食塩水 (0.05% NaCl 溶液) を使用することでリン損失を抑制できた。次に、休眠孢子がつくる細胞壁を破碎するための破碎強度、破碎時間について検討を行った。破碎強度が強いほど、また破碎時間が長いほどリンの抽出率は高く、破碎強度を 5,000 rpm、破碎時間を 1,200 s と決定した。次に、1,200 s の破碎時間中に何回の冷却を行うかを検討した。2~6 回という条件の中ではリン抽出率に違いは見られなかった。さらに、抽出されたリンの回収方法を検討し、抽出液中リンをリン酸カルシウム沈殿として最大 72% の率で回収できた。最後に、培養細胞の洗浄・濃縮過程から始まる一連の操作におけるリンの収支を把握した。細胞に含有されたリンのうちリン酸カルシウムとして回収されたリンは 17%、抽出されたものの沈殿として回収されないものが 7%、洗浄・濃縮過程での損失 10%、その他、固形物中に残留したものなど 66% であった (Fig. 2)。

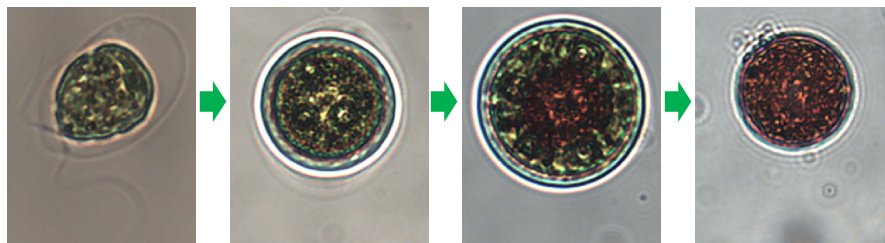


Fig. 1 *H. pluvialis* の生活形変化過程

(左: 遊泳型, 左中: パルマ期, 右中: AX 蓄積途中のパルマ期, 右: AX を蓄積した休眠孢子)

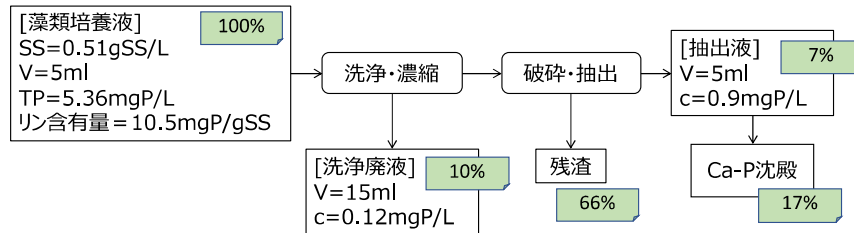


Fig. 2 AX・リン抽出回収過程でのリンの収支

(2) H29 年度

H29 年度には、様々な微生物が混在する中で AX を生産する *H. pluvialis* を継続的に優占培養するための方法、ならびに *H. pluvialis* 細胞からの効率的リン回収方法について検討した。

優占培養に関しては、そもそも AX が抗酸化物質であることから、それを生産する *H. pluvialis* は他の微生物よりも抗酸化性が強いとの推測のもと、微生物細胞に酸化性物質であるオゾンを追加し、細胞活性度の変化を比較した。下水中に多量に存在する細菌では、オゾン添加率を高めるほど細胞の活性が低下し、細胞がオゾンによる損傷を受けていることが示された。*H. pluvialis* に関しては、AX を含まない細胞と含んだ細胞とで実験を行った。AX を含まない場合、細菌に比較し活性度の低下が小さかったものの、無視し得ない程度の損傷を受けていた。一方、AX を含んだ細胞では活性度の変化が小さかった。この結果から、オゾンを追加することによる *H. pluvialis* の優占培養が可能であることが示唆された。

*H. pluvialis* 細胞からのリン回収に関しては、細胞を水とヘキサンの 2 相を含む溶媒中で細胞を破碎し抽出物を回収した。当初、リンは水層から回収できるものと考えていたが、回収量が想定よりも少なかった。そこで、水-有機溶媒間でのリンの分配平衡を、量子化学計算を用いた評価を行った。しかし、この結果からもリンは水層に多く存在するはずとの結果が得られ、また実験でもこのことが確認された (Fig.3)。このことから、*H. pluvialis* では、高等植物とは異なり、細胞中リンは脂質等と結合した疎水性の強い形態として存在すると考えられた。

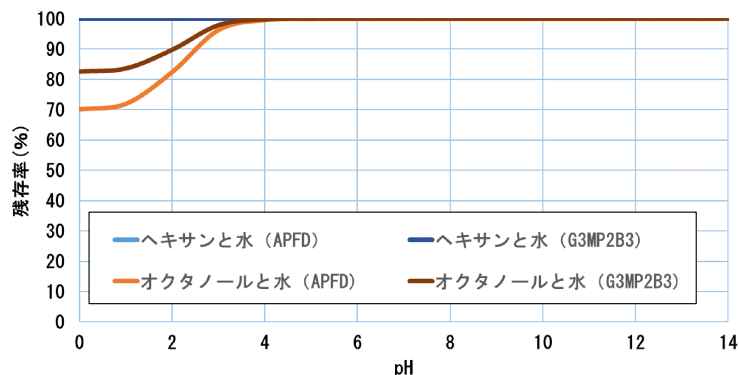


Fig. 3 量子化学計算による水-有機溶媒間でのリン酸 (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) の分配予測結果

(3) H30 年度

H31 年度は雑菌繁殖防止技術と AX 生産について検討を行った。

前年度に、*H. pluvialis* が細菌に比べて強いオゾン耐性を有すること、AX 蓄積の有無によってオゾン耐性が異なることを確認していた。H30 年度には生活形とオゾン耐性との関係について注目し実験を行った (Fig.4)。その結果、AX 蓄積がない細胞でも、遊泳型とパルメラ期の細胞とではオゾン耐性が異なる可能性が示された。追加の実験による確認が必要ではあるが、生活形を適切に制御し、生活形に応じたオゾン転嫁を行うことで雑菌繁殖防止が可能であるとの見通しを得た。

*H. pluvialis* に AX を生産させるためにはストレスを与える必要がある。本研究では強光を照射する方法を選択した。ただし、パルメラ期の細胞に強光を照射した際に AX を生産しない場合があったため、強光と同時に他の条件設定が必要であった。検討の結果、強光の他に無機炭素の添加を行うことで高濃度の AX を生産することが明らかとなった。

以上のことから、下水中での *H. pluvialis* 連続培養と AX 生産に関して実現の目処を得た。

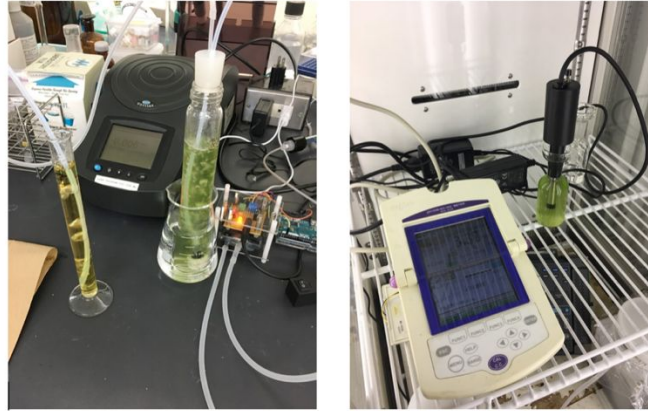


Fig. 4 *H. pluvialis* のオゾン耐性評価実験

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

- 1) 永禮英明, 赤尾聡史, 高部祐剛: 下水からのリン回収を目的とした微細藻類によるアスタキサンチン生産, 第 53 回 日本水環境学会年会, 2019.
- 2) Nagare, H.: Wastewater treatment process with astaxanthin production by microalgae aiming at spontaneous phosphorus recycling, 2nd IWA Resource Recovery Conference, 2017.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者  
なし

(2) 研究協力者  
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。