

令和元年6月12日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18178

研究課題名(和文) 栄養塩欠乏による油脂生産能向上を利用した下水処理水での高品質微細藻類培養

研究課題名(英文) High quality microalgae cultivation with treated effluent based on lipid accumulation under nutrient depletion and exhaustion

研究代表者

高部 祐剛 (TAKABE, Yugo)

鳥取大学・工学研究科・助教

研究者番号：70625798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：実下水処理水を用いて土着藻類を培養し、栄養塩濃度変化(特に窒素濃度変化)に対する土着藻類中有機物組成の時間的推移の解明を行った。窒素濃度の減少に対して、土着藻類において炭水化物および脂質がそれぞれ第一次および第二次の炭素/エネルギー貯蔵物質として蓄積されることが分かった。窒素濃度が上昇した際脂質が分解されるが、窒素濃度上昇から脂質分解が生じるまでの時間は、培養液中窒素の残存状況により異なっていた。栄養塩を枯渇させることで高油脂含有土着藻類の培養が可能となる一方で、水理学的滞留時間制御等により培養液内栄養塩濃度の上昇を避けることが、高油脂含有率を保つ上で重要であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人口減少等に伴う厳しい経営環境、また、将来の資源枯渇の懸念および地球温暖化防止を背景に、下水道施設では「排除・処理」から「活用・再生」への変換が求められている。そういった中で、下水中の栄養塩を活用した微細藻類培養・エネルギー化技術が、下水処理場のエネルギー供給拠点化実現に向けた中核技術として期待されている。本研究では、実下水処理水を用いた高油脂含有土着藻類培養を達成する上で重要となる培養システムにおける操作因子・管理項目の提案がなされ、現場への微細藻類培養・エネルギー化技術の導入を後押しするものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Indigenous microalgae were cultivated using an actual treated effluent, and the temporal responses of cellular organic components to the variations in nitrogen concentration were investigated. Carbohydrate and lipid were accumulated as primary and secondary carbon and/or energy source, respectively, in indigenous microalgae against nitrogen depletion and exhaustion. Lipid reduction was observed after nitrogen replenishment; meanwhile, the time between the nitrogen replenishment and start of lipid reduction was varied according to the nitrogen concentrations in culture before the replenishment. Cultivation under nitrogen exhaustion was an attractive strategy for achieving higher lipid content. Meanwhile, to obtain indigenous microalgae with stable and high total lipid content, it is crucial to prevent increase in nitrogen concentrations in the reactor under the nitrogen exhaustion condition by measures such as controlling the hydraulic retention time.

研究分野：環境工学

キーワード：土着藻類 下水処理場 栄養塩 有機物組成

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

### 1. 研究開始当初の背景

人口減少等に伴う厳しい経営環境、また、将来の資源枯渇の懸念および地球温暖化防止を背景に、下水道施設では「排除・処理」から「活用・再生」への変換が求められている。そういった中で、下水中の栄養塩（窒素、リン等）を活用した微細藻類培養・エネルギー化技術が、下水処理場のエネルギー供給拠点化実現に向けた中核技術として期待されている。

微細藻類は、種によってエネルギー含有量が異なるため、エネルギー価の高い特定の微細藻類を下水処理水で培養する試みがなされているが、下水処理水を用いた特定種の培養においては、下種処理水から自然に増殖する土着藻類が優占してしまうことが大きな障壁である。滅菌処理を下水処理水に施した上での特定種の培養が試みられているが、コストがかかる滅菌操作を組み込んだフルスケールの藻類培養システムの現場への導入は現実的ではない。そこで、本研究では、自然に増殖する土着藻類に着目する。

近年、人工培地を用いた特定微細藻類培養において、栄養塩欠乏下で微細藻類の油脂生産能が向上する特性を利用して、高品質な微細藻類を生産するアプローチが広く採用されている一方で、下水処理水を利用した微細藻類培養、特に土着藻類培養に関して、本手法の有用性を検討した研究は少ない。栄養塩濃度が時々刻々と変化する下水処理水を用いて高品質な土着藻類を安定的に培養するには、栄養塩濃度変化に対する土着藻類中の有機物組成の応答の解明が重要となる。

### 2. 研究の目的

本研究では、実下水処理水を用いて土着藻類を培養し、栄養塩濃度変化（特に窒素濃度変化）に対する土着藻類中の有機物組成の時間的推移を定量的に把握する。その上で、高油脂含有の土着藻類培養を実施する上で重要となる、培養システムでの操作因子・管理項目を提案することを目的とした。

### 3. 研究の方法

実下水処理水は、鳥取県内の A 下水処理場において採取した。室温 30℃ の部屋に設置した 30 L 容の培養装置を用いて、土着藻類の回分培養を行った。光量子束密度 160  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  の蛍光灯 12 本を培養装置の側面に設置し、明/暗条件は 12/12 時間とした。炭素源の供給および培養液での pH の維持を目的として、培養液での pH8.0 を指標として、CO<sub>2</sub> ガスを間欠添加した。

実験 1 では培養を 11 日間行い、1 日 1 回、明条件下で試料を採取した。実験 2-1 では培養を 9 日間行い、培養 4 日目に NH<sub>4</sub>Cl (137.5 mg) および NaNO<sub>3</sub> (582.8 mg) を培養液に添加し、無機態窒素 (IN: inorganic nitrogen) 濃度を上昇させた。1 日 1 回の明条件下での試料採取に加えて、培養 4、5 日目に、6 時間間隔での試料採取を行った。実験 2-2 では培養を 14 日間行い、培養 9 日目に実験 2-1 と同量の IN を培養液に添加した。1 日 1 回の明条件下での試料採取に加えて、培養 9、10 日目に、6 時間間隔での試料採取を行った。

測定項目は、懸濁物質 (SS: suspended solids)、クロロフィル a、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>、ならびに、土着藻類における炭水化物、脂質、炭素、水素、窒素含有率である。また、顕微鏡観察により、土着藻類の構成を把握した。

### 4. 研究成果

表 1 に培養に用いた下水処理水の水質を示す。IN は主として NH<sub>4</sub><sup>+</sup> および NO<sub>3</sub><sup>-</sup> で構成されていた。

実験 1 における各測定項目の時間的推移を図 1 に示す。SS は培養 3 日目から 8 日目にかけて増加し、0.276 g/L に達した。その後、SS の増加は緩やかとなった。

IN は培養 3 日目から 7 日にかけて減少し、7 日目以降は検出下限値以下となった。このことから、IN の枯渇が土着藻類の増殖を抑制したことが分かった。また、クロロフィル a/SS は培養 7 日目から 11 日目にかけて 3.67 mg-Chl. a/L から 0.637 mg-Chl. a/L に減少し、IN 枯渇下で土着藻類は光合成活性を失っていった。PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> の減少も確認された一方で、培養 11 日目においても 5.19 mg-P/L と豊富に存在した。土着藻類は、主として緑藻のミクラクティニウム科、セネデスムス科および科の同定ができなかった緑藻で構成されていた。

炭水化物含有率は、培養 5 日目から 6 日目にかけて一旦上昇した後減少した一方で、脂質含有率は培養 5 日目から 7 日目にかけて 9.40% から 12.7% に増加し、その後変化は確認されなかった。炭素含有率および水素含有率は、脂質含有率と同様の変化を示した一方で、タンパク質含有率の指標となる窒素含有率は培養 5 日目から 10 日目にかけて減少した。このことから、IN の減少・枯渇に対して土着藻類内で炭水化物および脂質が蓄積される一方でタンパク質は分解されること、また、IN の減少・枯渇が進行すると蓄積された炭水化物は分解される一方で蓄積された脂質は分解されないことが明らかとなった。窒素が不足した環境下で、微細藻類において電子伝達系からの電子リークに伴う活性酸素が発生することが知られており、IN の減少・枯渇に対する炭水化物・脂質の蓄積は、土着藻類での活性酸素生成の抑制に寄与している可能性

表1 下水処理水の水質 (平均±標準偏差, n=5)

SS (g/L)	クロロフィルa (mg-Chl.a/L)	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg-P/L)
0.001 ± 0.001	<0.01	8.01 ± 0.82
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg-N/L)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg-N/L)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg-N/L)
2.42 ± 2.35	0.79 ± 1.17	6.75 ± 1.56

が考えられた。また、INが枯渇した条件下に土着藻類を長期間曝しても、脂質のさらなる蓄積は見込めないことが示された。

実験2-1および実験2-2での各測定項目の時間的推移をそれぞれ図2および図3に示す。実験2-1において、培養4日目にINを添加した後、培養7日目までINが減少し、7日目以降検出下限値以下となった。実験2-2においては、INを添加した培養9日目以降、SSが再び増加し、土着藻類の再増殖が確認された。また、クロロフィルa/SSもIN添加後一時的に増加し、土着藻類が光合成活性を取り戻した。添加したINは6時間後には検出下限値以下となった。実験1と同様に、実験2-1および実験2-2ともに、土着藻類は、主として緑藻のミクラクティニウム科、セネデスムス科および科の同定ができなかった緑藻で構成されていた。

実験2-1においては、脂質が培養3日目から5日目にかけて8.33%から13.8%まで上昇した一方で、その後培養8日目(7.39%)まで脂質が減少した。窒素含有率は培養3日目から4日目にかけて6.50%から5.46%まで減少した一方で、4日目から5日目(5.78%)まで上昇し、その後再び減少した。実験2-2においては、IN添加後速やかに脂質が減少した(9日目:10.8%、10日目:9.09%)。また、窒素含有率は培養7日目から9日目にかけて3.90%から2.66%まで減少した一方で、9日目から10日目(4.23%)まで上昇し、その後再び減少した。以上のことから、IN濃度上昇から脂質分解が生じるまでの時間は、IN濃度が上昇する前の培養液中窒素の残存状況により異なっていた。実験2-1および実験2-2において、IN添加後速やかに窒素含有率が上昇したことから、土着藻類増殖に必要なタンパク質が合成されたと考えられる。実験1の結果も踏まえると、INが培地中に残存している状態でIN濃度が上昇した場合、タンパク質合成の炭素/エネルギー源として炭水化物が優先的に利用された一方で、INが枯渇している状態でIN濃度が上昇した場合、タンパク質合成の炭素/エネルギー源として脂質が利用されたものと判断された。

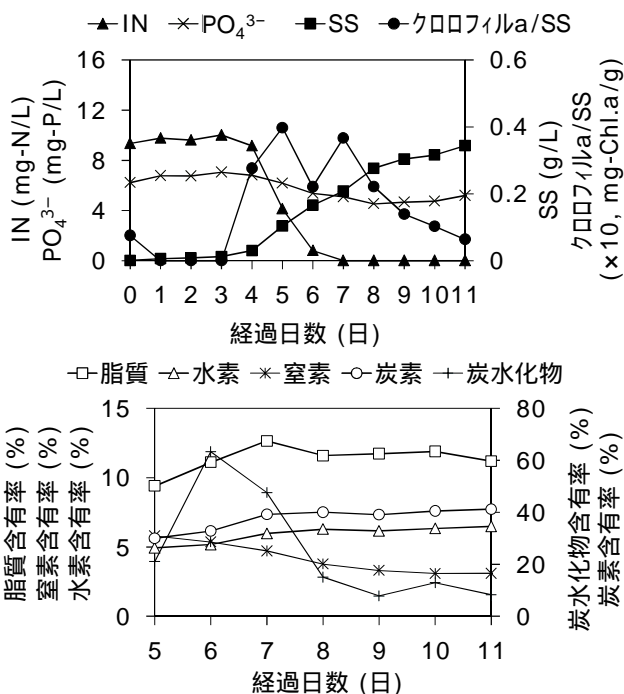


図1 実験1での各測定項目の時間的推移

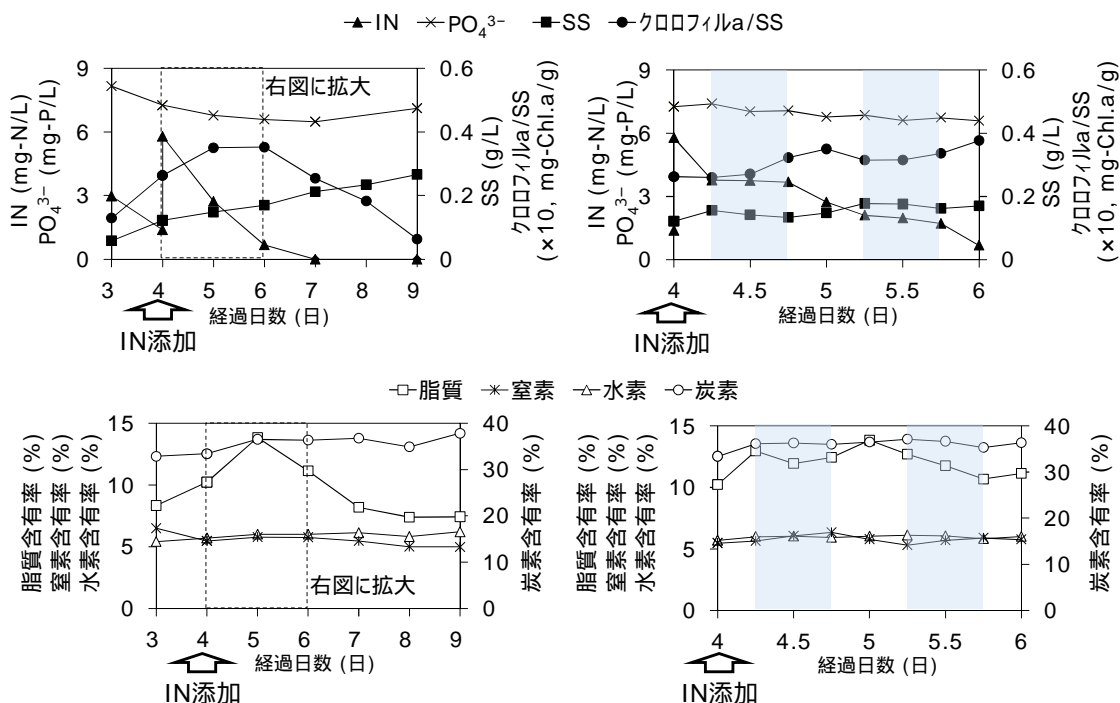


図2 実験2-1での各測定項目の時間的推移 (色無: 明条件、色有: 暗条件)

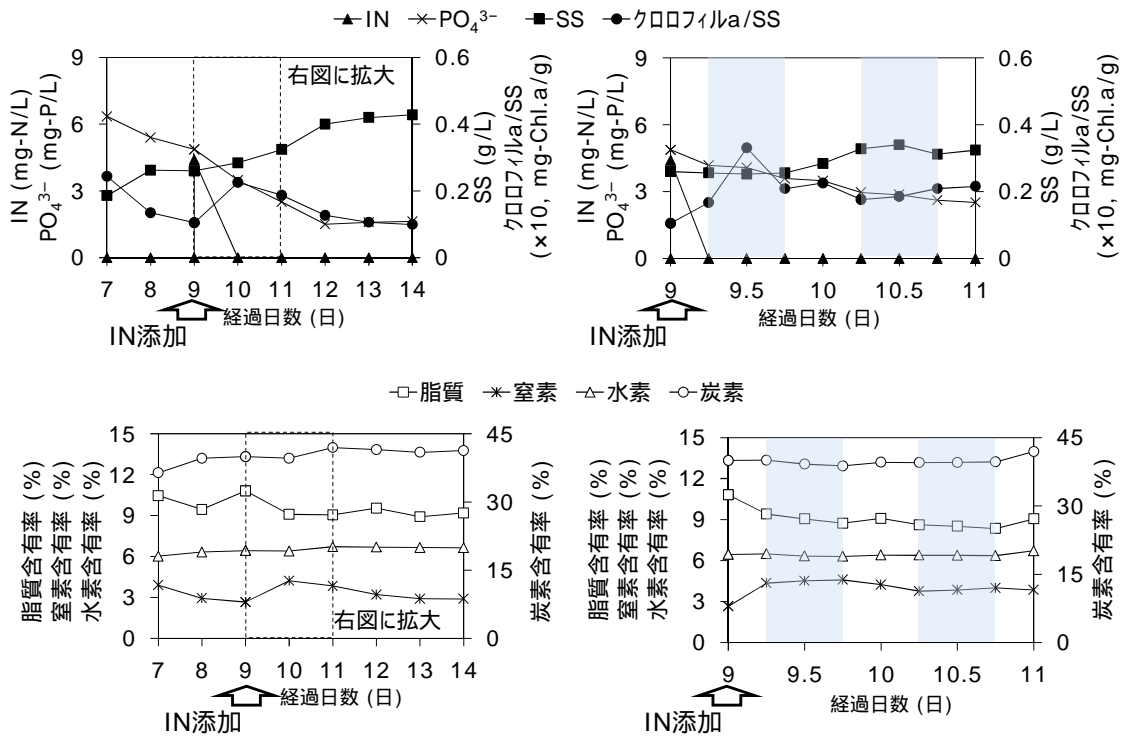


図3 実験2-2での各測定項目の時間的推移 (色無：明条件、色有：暗条件)

以上の結果から、窒素濃度の減少に対して、土着藻類において炭水化物および脂質がそれぞれ第一次および第二次の炭素/エネルギー貯蔵物質として蓄積されることが分かった。また、窒素濃度が上昇した際脂質が分解されるが、窒素濃度上昇から脂質分解が生じるまでの時間は、窒素濃度が上昇する前の培養液中窒素の残存状況により異なっていた。栄養塩を枯渇させることで高油脂含有土着藻類の培養が可能となる一方で、水理学的滞留時間制御等により培養液内栄養塩濃度の上昇を避けることが、高油脂含有率を保つ上で重要であることが示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Hironori Okazaki, Yugo Takabe, Takanori Masuda, Yoshiko Hoshikawa: Biochemical response of indigenous microalgal consortia to variations in nitrogen concentration of treated effluent, *Bioresource Technology*, 査読有, Vol.280, pp.118-126, 2019, DOI: 10.1016/j.biortech.2019.02.014

高部祐剛: 下水を用いた微細藻類培養・バイオ燃料への変換、*水環境学会誌*、査読無、Vol.40、pp.319-324、2017

〔学会発表〕(計6件)

上村拓海、高部祐剛、岡崎広典、増田貴則、星川淑子: 窒素濃度変化が土着藻類での有機物の蓄積・分解に与える影響、第53回日本水環境学会年会、2019年、【年会学生ポスター発表賞(ライオン賞)受賞】

高部祐剛、岡崎広典、増田貴則、星川淑子: 下水処理水中栄養塩濃度変化が土着藻類での脂質蓄積・分解に与える影響、*日本生物工学会西日本支部第4回講演会*、2018年

Yugo Takabe, Hironori Okazaki, Takanori Masuda, Yoshiko Hoshikawa: Temporal changes of total lipid content in indigenous microalgae under abundant and scarce nutrient conditions, *IWA World Water Congress & Exhibition 2018*, 2018

Hironori Okazaki, Yugo Takabe, Takanori Masuda, Yoshiko Hoshikawa: Influence of nutrient concentrations in treated effluent on lipid content in indigenous microalgae, *WET2018*, 2018

岡崎広典、高部祐剛、増田貴則、星川淑子: 下水処理水を用いた微細藻類培養における栄養塩濃度変化が脂質蓄積に及ぼす影響、*土木学会中国支部第70回研究発表会*、2018年

岡崎広典、高部祐剛、増田貴則、星川淑子: 下水処理水中栄養塩濃度変化に対する土着藻類中脂質蓄積の応答の解明、第52回日本水環境学会年会、2018年

## 6. 研究組織

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。