

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2020

課題番号：18H06023・19K21161

研究課題名（和文）窒素源の違いが微細藻ボトリオコッカスの炭化水素生産性に与える影響

研究課題名（英文）Effect of Different Nitrogen Sources on Hydrocarbon Productivity of the Microalga Botryococcus braunii

研究代表者

長谷川 文生（Hasegawa, Fumio）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・特任研究員

研究者番号：80824698

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、窒素源の違いがボトリオコッカスの増殖に与える影響を評価した。アンモニア態窒素を窒素源とした場合には、pHを適正範囲に維持することで硝酸態窒素を窒素源とした場合と同等の増殖速度、炭化水素生産性を示すことが明らかとなった。尿素を窒素源とした場合には、培地pHの調整が不要であることが確認された。また、気体のアンモニアを二酸化炭素富化空気とともに連続通気することでボトリオコッカスの培養の窒素源として利用できることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ボトリオコッカスの培養の環境負荷の小さい窒素源として、メタン発酵消化液や堆肥製造過程で発生するアンモニアの利用可能性が示された。これらの窒素源はコストやエネルギーを使用して処理をされているため、微細藻類の培養に利用することで処理に必要なコストやエネルギーを節約できる可能性を持つ。また、未利用資源を有効に活用し、資源循環のサイクルを確立できるという点で、持続可能性も高いバイオ燃料生産に貢献できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we evaluated the effect of different nitrogen sources on the growth of Botryococcus braunii. When ammonium was used as the nitrogen source, it was found that the growth rate and hydrocarbon productivity were comparable to those of nitrate by maintaining the pH in the proper range. When urea was used as the nitrogen source, it was confirmed that adjustment of the medium pH was not necessary. It was also confirmed that gaseous ammonia could be used as a nitrogen source for the culture of Botryococcus braunii by continuous aeration with carbon dioxide enriched air.

研究分野：農業環境工学

キーワード：バイオ燃料 微細藻 メタン発酵 堆肥化 資源循環

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

緑藻 *Botryococcus braunii* (以下, *B. braunii*) は, バイオ燃料となる炭化水素を生産する群体系微細藻類として注目されている。バイオ燃料を商業利用するうえでは, 製造コストや投入エネルギー, 二酸化炭素排出量の削減が必要となる。微細藻培養の窒素源としては, 硝酸態窒素 (NO_3^- -N) より安価なアンモニア態窒素 (NH_4^+ -N) を利用することが望ましい。また, アンモニア態窒素はメタン発酵消化液などで供給することも可能であり, より環境負荷の低いバイオ燃料の生産につながる。しかし, *B. braunii* はアンモニア態窒素を含む培地で培養すると増殖阻害を示すことが報告されている。窒素源としてアンモニア態窒素を用いた培地で培養した場合, 培地の pH が低下し, 藻体がダメージを受ける¹⁾。そのため, *B. braunii* の培養には硝酸態窒素が窒素源として用いられている。筆者らは, 難溶性の塩基性の塩である炭酸カルシウムを培地に添加することにより培地の酸性化を抑制することで, アンモニア態窒素を窒素源として *B. braunii* の培養が可能であること, 炭酸カルシウムは水に難溶であるため過剰に添加してもボトリオコッカスの増殖に影響がないことを明らかにした。一般に NO_3^- は NAD(P)H を利用して NH_4^+ に還元された後利用される。したがって, アンモニア態窒素 (NH_4^+) を直接利用することにより NO_3^- の還元を利用されていた NAD(P)H が炭化水素合成などの反応に利用され, 炭化水素の生産性が向上する可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では, 硝酸態窒素, アンモニア態窒素, および, 尿素を窒素源として *B. braunii* の培養し, 窒素源の違いが *B. braunii* の増殖および炭化水素生産性に与える影響を明らかにすることを目的とした。また, 環境負荷の低い窒素源の調査を行い, その窒素源の *B. braunii* 培養への利用可能性を評価することも本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1)(2)の培養試験では, *B. braunii* の B 品種 Showa 株を用いた。

(1)窒素源の異なる培地での *B. braunii* 培養試験

これまでの研究で, 強酸のアンモニウム塩である塩化アンモニウム, 硫酸アンモニウムを添加した場合に起こる培地の酸性化は, 炭酸カルシウムの添加により抑制できることが確認されている。本研究では, 弱酸のアンモニウム塩である炭酸アンモニウムおよび炭酸水素アンモニウム, 中性の物質である尿素を窒素源として培養試験を行った。培地は, A) 改変 Chu13 培地, B) 炭酸アンモニウム培地, C) 炭酸水素アンモニウム培地, D) 尿素培地の 4 種類を調製した。改変 Chu13 培地は *B. braunii* の培養で一般に用いられる培地であり, 硝酸態窒素 (硝酸カリウム KNO_3) を窒素源としている。炭酸アンモニウム培地, 炭酸水素アンモニウム培地, 尿素培地の窒素濃度を, Chu13 改変培地に含まれる硝酸態窒素濃度である 83.2 mg/L とした。その他の栄養塩は, 改変 Chu13 培地と同様に調製した。明暗周期は 12 時間とし, 二酸化炭素富化空気 (二酸化炭素濃度 1%) を供給した。培養開始から 5 日毎に, 各サンプルの乾燥藻体濃度, pH を測定した。

(2)環境負荷の低い窒素源での *B. braunii* 培養試験

メタン発酵消化液を窒素源とした培養試験では, メタン発酵消化液をアンモニア態窒素濃度が 28 mg/L (前述の培地の約 1/3) となるように希釈し, 培地を調製した。それ以外の栄養塩は Chu13 培地と同様に添加した。明暗周期は 12 時間とし, 二酸化炭素富化空気 (二酸化炭素濃度 1%) を供給した。また, 培地の酸性化を抑制する炭酸カルシウム源として牡蠣殻約 10 g を添加した。14 日間培養し藻体濃度を測定した。

気体アンモニアを窒素源とした培養では, アンモニアを添加した二酸化炭素富化空気を連続供給するアンモニア連続通気培養装置を製作し, 培養試験を行った。

4. 研究成果

(1)窒素源の異なる培地での *B. braunii* 培養試験

B. braunii は炭酸アンモニウム培地, 炭酸水素アンモニウム培地でほとんど増殖しなかった。これらの培地では, 培地の pH が 7.5 以上であった。そのため, アンモニウムイオンの一部が遊離アンモニアとなり, *B. braunii* の増殖を阻害したと考えられる。改変 Chu13 培地の pH も 7.5 以上に上昇していたが, 改変 Chu13 培地にはアンモニウムイオンが含まれていないため, 遊離アンモニアの生成がなく増殖阻害は起こらなかったと考えられる。硫酸アンモニウムや塩化アンモニウムを窒素源とした培地では, 培地の酸性化により *B. braunii* の増殖阻害が起こることが知られている。これらのことから, アンモニア態窒素を窒素源として利用する場合には pH を適正範囲に維持することが必要であることが明らかとなった。硫酸アンモニウムを窒素源とし炭酸カルシウムで培地の酸性化を抑制することにより培養した *B. braunii* の炭化水素含有率および炭化水素組成は, 硝酸態窒素を窒素源とした改変 Chu13 培地で培養した場合とほぼ同等であった。炭酸カルシウムを添加して培養した場合の培地の pH は 4 程度まで低下していた。そのた

め、培地中の二酸化炭素濃度の低下し、アンモニア態窒素 (NH_4^+) を直接利用することによる効果が観察できなかったと考えられる。

窒素源として尿素を添加した尿素培地での *B. braunii* の培養の結果を図 1 に示す。尿素培地では、*B. braunii* は改変 Chu13 培地とほぼ同様の増殖を示した。培地の pH の変動はほとんど見られなかった。尿素は、一般に硫酸アンモニウムより安価な肥料であり、培地の pH の調整も不要であることから、*B. braunii* の窒素源として好ましいと考えられる。

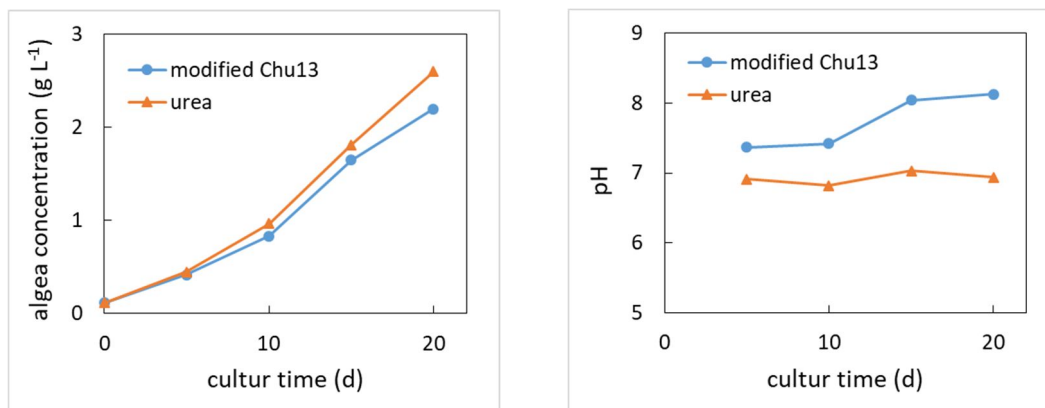


図 1 改変 Chu13 培地、尿素培地での *B. braunii* 培養試験
(左：藻体濃度の経時変化、右：培地 pH)

(2) 環境負荷の低い窒素源の検討

環境負荷の低い窒素源として、メタン発酵消化液、堆肥製造過程で発生する気体アンモニアに着目した。メタン発酵消化液は、一部は液肥として耕地に散布されているが、その多くは廃水として処理されている。メタン発酵消化液を微細藻類の培養に利用することにより、培養工程での環境負荷の低減だけでなく、メタン発酵施設での廃水処理工程で生じる環境負荷も低減されることが考えられる。また、堆肥製造過程で生じる気体アンモニアは、堆肥製造における臭気の原因物質の一つである。また、堆肥製造過程では二酸化炭素も同時に発生するため、堆肥製造設備からの排気を微細藻類の培養槽に通気することで、培養藻類の増殖に必要な炭素源と窒素源を同時に供給できると考えられる。さらに、微細藻類がアンモニアを吸収することで堆肥製造設備からの排気から臭気の原因物質である気体のアンモニアが除去され、排気の臭気を低減させる効果があると解される。そこで、本研究ではメタン発酵消化液と気体アンモニアを窒素源とした培養試験を行い、それらの利用可能性を評価した。

(3) 環境負荷の低い窒素源での *B. braunii* 培養試験

図 2 にメタン発酵消化液を窒素源とした *B. braunii* の培養の培養初日および培養 14 日後の様子を示す。メタン発酵消化液を窒素源とした場合、Chu13 培地と同等の増殖速度を示した。また、牡蠣殻に含まれる炭酸カルシウムにおいても pH 低下抑制の効果が確認された。したがって、炭酸カルシウム源として牡蠣殻などの炭酸カルシウムを含有する安価な資材を利用できると考えられる。さらに、メタン発酵消化液をアンモニア態窒素濃度が 84 mg/L (改変 Chu13 培地の硝酸態窒素濃度 83.2 mg/L と同等の窒素濃度) となるように希釈した培地での培養試験を実施した。この培地では、メタン発酵消化液の希釈倍率が小さくなるため浮遊固形物質濃度が高くなり、光の透過性が低下し、改変 Chu13 培地での増殖速度より増殖速度が低下した。また、未滅菌のメタン発酵消化液を利用した場合には、培地中の微生物が増加することによる光透過性の低下も観察された。そこで、メタン発酵消化液中の浮遊固形物質や微生物の除去方法を検討した。目詰まりが起こりにくく、滅菌処理も容易な方法として、スリット幅が 5 μm 程度の金属製のワイヤースクリーンの利用が有効であると考えられた。今後は、ワイヤースクリーンを介して溶液側から蒸留水側へ移動する各種イオンや浮遊固形物質の挙動を評価し、メタン発酵消化液から効率的に浮遊固形物質や微生物の除去方法を開発する予定である。



図2 メタン発酵消化液を窒素源とした *B. braunii* の培養 上：培養初日 下：培養 14 日
上下ともに左：Chu13 培地，中央，右：メタン発酵消化液添加培養

気体のアンモニアを窒素源とした場合も、Chu13 培地と同等の増殖速度を示した。今後は、堆肥施設から発生する排気の利用に向けた培養技術の確立に向けた研究を進める予定である。

これらの培養試験の結果から、環境負荷の少ない *B. braunii* の培養の窒素源として、メタン発酵消化液と堆肥製造過程で発生する気体のアンモニアが期待できることが明らかとなった。これらの窒素源は、コストやエネルギーを使用して処理をされているため、微細藻類の培養に利用することで処理に必要なコストやエネルギーを節約できる可能性を持つ。また、未利用資源を有効に活用し、資源循環のサイクルを確立できるという点で、持続可能性も高いと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長谷川文生、古橋賢一、海津裕、芋生恵司
2. 発表標題 窒素源の異なる培地での微細藻 <i>Botryococcus braunii</i> の増殖特性
3. 学会等名 第16回バイオマス科学会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本山夏子、古橋賢一、長谷川文生、海津裕、芋生恵司
2. 発表標題 堆肥化過程から生じるアンモニアの微細藻への施肥利用
3. 学会等名 2021年農業施設学会 学生・若手研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長谷川文生、海津裕、芋生恵司
2. 発表標題 メタン発酵消化液を窒素源とする微細藻 <i>Botryococcus braunii</i> の培養
3. 学会等名 2019年 農業食料工学会・農業施設学会・国際農業工学会第6部会 合同国際大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------