

令和元年6月22日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00587

研究課題名(和文) 酸性下で増殖するラビリンチュラ類の増殖・脂質生産特性の評価と余剰汚泥資化への応用

研究課題名(英文) Investigation of lipid production characteristics of Labyrinthulea capable of growing under an acidic condition and its application for utilization of excess sludge

研究代表者

中井 智司 (Satoshi, Nakai)

広島大学・工学研究科・教授

研究者番号：80313295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Aurantiochytrium sp. L3W株の脂質及び脂肪酸生成への至適pH、塩分濃度はpH7、30 psuであったが、pH3、塩分濃度3 psuにおいてもDHAといった有用な脂肪酸を生成することを確認した。また、同株を余剰汚泥の資化に応用した結果、同株は未処理の余剰汚泥を資化できないが、加水分解処理をすることによって資化できることが見出された。加水分解物の炭素と窒素の消費からは、窒素源として有用であることを認めた。加水分解物に炭素源としてジャム廃棄物を加えることで、同株の増殖を改善できた。また、加水分解物に酵素処理を行うことで同株の脂質生産を改善できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では下水処理場から発生する余剰汚泥の有効利用のため、DHAといった有用な脂肪酸を生成する微生物 Aurantiochytrium sp. strain L3Wについて、余剰汚泥を利用した培養可能性を敢闘した。その結果、加水分解等の前処理は必要であるが、余剰汚泥を利用した同株の培養、脂肪酸の生成は可能であることを見出した。本成果は、今後の余剰汚泥の利用促進の一助となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The optimal pH and salinity for lipid production by Aurantiochytrium sp. strain L3W were 7 and 30 psu, respectively; however it produced fatty acids such as docosahexaenoic acid (DHA). The strain L3W could grow in the medium prepared by adding the sludge sample seawater as sole carbon and nitrogen sources, while hydrolysis was necessary as pretreatment for utilization as its substrates. Analysis of the consumption of C & N in the hydrolyzed sludge sample (HSS) showed that the HSS may be better as a nitrogen source rather than a carbon source to cultivate the strain L3W. As the additional carbon source to the HSS, the jam liquid waste generated from a jam factory demonstrated good acceleration of the growth of the strain L3W as glucose. Finally, production of the fatty acids including DHA by the strain L3W was confirmed in the HSS medium, while the carbon source addition such as the jam liquid waste greatly enhanced its fatty acids production.

研究分野：環境化学工学

キーワード：ラビリンチュラ類 余剰汚泥 多価不飽和脂肪酸

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

1. 研究開始当初の背景

我が国の排水処理施設から出る余剰汚泥が大部分を占めており、2011年の我が国での下水余剰汚泥の発生量は7600万tである。したがって、余剰汚泥の再資源化が求められており、緑地活動や建築資材への利用などが進められているが、依然として全体の約40%が最終処分場へ埋立処分されている。そこで本研究では従属栄養性微生物であるラビリンチュラ類に着目した。同類にはDHAやスクアレンといった高価値な脂質を蓄積する特徴があり、既存研究では細菌細胞片やビール酵母の加水分解物などの有機性廃棄物を資化できることが報告されているなど注目を集めている。これまで我々は、余剰汚泥を唯一の炭素源として単離し、汚泥を基質として培養できる可能性のある *Aurantiochytrium* sp. L3W 株を見出し、その増殖特性評価を行ってきた。これまでの研究により、この株は既存研究で報告されている株以上の増殖速度を持ち、pH3~9、3~60 psu で増殖できることがわかったが、pH や塩分濃度が同株の脂肪酸生成に対する影響や培養に対する汚泥の影響は評価できていなかった。

2. 研究の目的

本研究ではpHや塩分濃度がL3W株の脂肪酸生産量に与える影響と共に有機性廃棄物である余剰汚泥の資化の可能性を評価した。さらに、資化特性に基づき、その促進方法と共に他の有機性廃棄物との併用の可能性も検討した。

3. 研究の方法

3.1 脂肪酸生成に対する pH 及び塩分濃度の影響

pHの影響評価においては、海水を用いて調整した790 By+培地にpH緩衝液を加え、L3W株を植種し、培養した。塩分濃度の影響評価の際には、希釈した海水を用いて培地を調整した。

3.2 余剰汚泥資化

海水に活性汚泥を入れてL3W株を培養した。後述するように直接用いた培養では増殖は著しくなかったため、水酸化ナトリウムを用いてpH12として活性汚泥の加水分解を行った。処理開始は96時間とした。この加水分解汚泥(HSS)をDN濃度が対照系の790 by+培地と同じとなるように海水に加えたものにL3W株を植種し、培養した。なお、DN濃度を790 by+培地と同じになるようにHSSを添加した場合、DOC濃度はそれよりも低くなった。そこで対照系とDOC濃度を同じにするため、HSSを添加した培地にグルコースも添加した系(HSS/G)も設定した。

3.3 有機性廃棄物の併用

広島県内のジャム工場から排出された廃液を用いた。ジャム製造過程では糖が多く使われていることからL3W株の培養に適していると予想して選択した。ジャム廃棄物は、オートクレーブ滅菌した後、10000 rpmで20分間遠心分離し、メンブレンフィルターを用いて固形分を除去した。これをHSSと共に海水に添加し、培養に供した(HSS/J)。

3.4 加水分解汚泥(HSS)の酵素処理および資化評価

HSSにリゾチーム、プロテアーゼ、パパインを添加し、40℃で2時間酵素処理を行った。リゾチームは汚泥中の微生物細胞壁のペプチドグリカン加水分解、プロテアーゼ、パパインは細胞質中のたんぱく質を加水分解する目的で選択した。そして、3.2で述べたように、滅菌ろ過した海水に酵素処理したHSSをDN濃度が250 mg/Lになるように添加し、L3W株を植種、培養した。

3.5 分析

細胞数がほぼ一定となった段階で培養を終了し、乾燥重量はろ過法、脂質重量はFolch法、DOC及びDN濃度はTOC計、脂肪酸組成分析は脂肪酸メチル化キットを用いて誘導体化し、GC/FIDを用いて行った。

4. 研究成果

4.1 脂肪酸生成に対する pH 及び塩分濃度の影響

pHがL3W株の脂肪酸生成量に与える影響を図1に示す。L3W株はpH3~9という幅広いpHで脂肪酸生成が可能であることが示され、その培養最適pHは7であった。一方、塩分濃度の影響について、塩分濃度が30 psu以下においては、30 psuに近づくほど脂肪酸生成量が大きくなる傾向を示した。また、30 psu以上では脂肪酸生成量は小さくなり、60 psuにおいては極めて少なくなった。

4.2 余剰汚泥資化

余剰汚泥を用いてL3W株を培養した際の増殖挙動を図2に示す。汚泥を直接基質として培養した場合 6.1×10^4 cells/ml までの増殖にとどまった。原因として、汚泥は細菌や微生物であるが、L3W株がその細胞壁を分解できず、基質として利用できていないことが考えられた。そこでアルカリを用いた加水分解を行った。加水分解によりL3W株による汚泥の利用を促すことができ、HSSにグルコースを添加した系では細胞数がさらに改善した。しかし、細胞数自体は対照系の約5%程度にとどまった。この原因として、HSS中の炭素及び窒素はグルコースや酵母エキスよりも使用されにくいことが考えられた。しかしながら、HSSにグルコースを添加すると増殖量が増加したことから、窒素源としては利用しやすい可能性が考えられた。実際に培養前後のDOC、DN濃度から消費DOC、DNを算出したところ、グルコース添加により消

費割合はDOCで54%から74%、DNでは26%から54%と改善した。さらにグルコースを添加することで消費C/N比も18から21に改善し、対照系の消費C/N比18よりも高くなった。これにより、汚泥が加水分解により、炭素源としてよりも窒素源としてL3W株の増殖に寄与したと考えられる。

4.3 有機性廃棄物の併用

この結果を受け、HSSとジャム廃棄物を混合した。図3に示す様に、特にジャム廃棄物を加えた系(HSS/J)では対照系と同等の増殖速度を示し、最大細胞数もグルコースを添加した系よりも多くなった。原因として、グルコースに比べ、ジャム廃棄物に含まれる有機炭素がL3W株の増殖に使用されやすい形態であったためであると考えられる。これより、ジャム廃棄物はグルコースに代わる代替炭素源として有用であることが示された。

4.4 加水分解汚泥(HSS)の酵素処理および資化評価

アルカリ処理のみの場合の汚泥の可溶化率は31%であったが、アルカリ処理後にさらにリゾチーム、プロテアーゼ、パパインをを用いて処理すると、可溶化率はそれぞれ82%、69%、96%に達した。この処理溶液を用いてL3W株の培養を行った結果、酵素処理しなかったHSSでの培養に比べ、細胞数はリゾチーム、プロテアーゼ、パパインでそれぞれ1.1倍、1.5倍、1.6倍となったが、可溶化率ほどの増加は認められなかった。

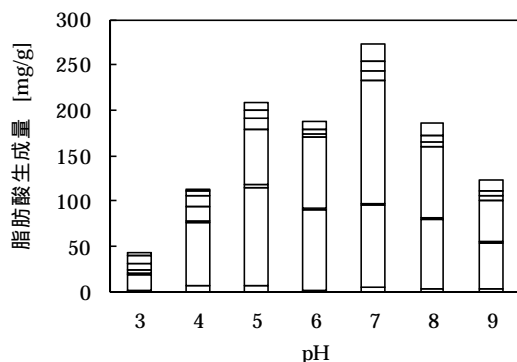


図1 pHによるL3W株の脂肪酸生成への影響

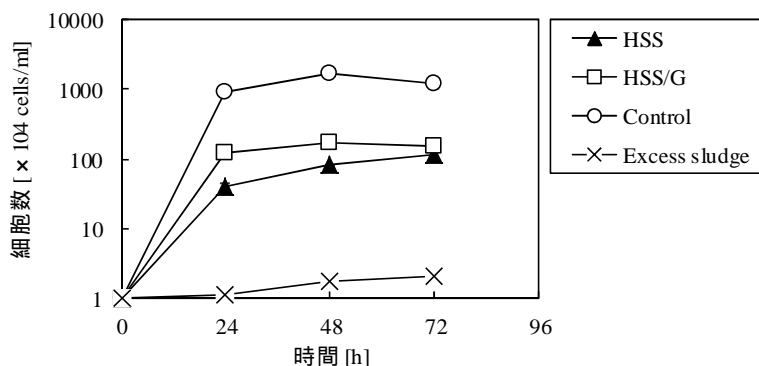


図2 汚泥の加水分解物、同加水分解物とグルコースを基質とした場合のL3W株の増殖

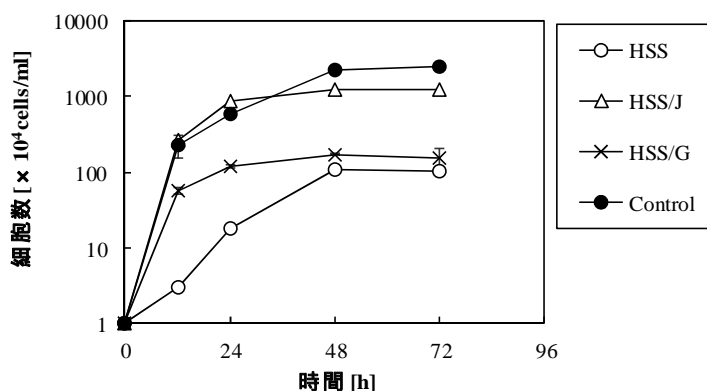


図3 汚泥の加水分解物、同加水分解物とグルコース、同加水分解物とジャム廃棄物を基質とした場合のL3W株の増殖

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Satoshi Nakai, Youhei Soga, Satoshi Sekito, Akira Umehara, Tetsuji Okuda, Masaki Ohno, Wataru Nishijima, Satoshi Asaoka (2018) Historical changes in primary production in the Seto Inland Sea, Japan, after implementing, regulations to control the pollutant loads, Water Policy, 20, 10.2166/wp.2018.093, 査読あり
2. 中井智司(2019) ラビリンチュラ類を用いた食品由来廃棄物からの多価不飽和脂肪酸の生産, 化学工学, 83, 106-108, 査読なし

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Nurlaili HUMAIDAH, Satoshi NAKAI, Wataru NISHIJIMA, Takehiko GOTO (2019) Application of *Aurantiochytrium* sp. L3W for Food-processing Wastewater Treatment in Combination with DHA Production, 第 53 回日本水環境学会年会, 2019 年 3 月, 甲府
2. 前田侑弥、古田愛、Humaidah Nurlaili、中井智司、西嶋涉、飯澤孝司、後藤健彦、大野正貴(2018) *Aurantiochytrium* sp. L3W 株の脂肪酸の生成特性と有機性廃棄物の資化, 化学工学会 第 50 回秋季大会, 2018 年 9 月, 鹿児島
3. Megumi FURUTA, Satoshi NAKAI, Wataru NISHIJIMA, Nurlaili HUMAIDAH, Takehiko GOTO (2018) Cultivation of *Aurantiochytrium* sp. L3W using Organic Waste for Polyunsaturated Fatty Acid Production, Water and Environment Technology Conference 2018, 2018.6, Matsuyama
4. 古田愛、中井智司、後藤健彦、飯澤孝司、西嶋涉、大野正貴 (2018) 有機性廃棄物を用いた DHA 産生 *Aurantiochytrium* sp. の培養, 第 20 回化学工学会学生発表会, 広島
5. Yuya Maeda, Takehiko Goto, Satoshi Nakai, Wataru Nishijima, Masaki Ohn (2017) Cultivation of oil producing *Aurantiochytrium* sp. strain L3W using excess sludge, 7th IWA-ASPIRE Conference 2017, Oct. 2017, Kuala Lumpur
6. 前田侑弥、Das Asmit、後藤健彦、中井智司、西嶋涉 (2017) 余剰汚泥を用いた *Aurantiochytrium* sp. L3W 株の培養, 化学工学会 第 49 回秋季大会, 2017 年 9 月, 名古屋
7. Yuya MAEDA, Das ASMITS, Satoshi NAKAI, Masaki OHNO, Takehiko GOTO, Wataru NISHIJIMA, Tetsuji OKUDA (2016) Isolation of a novel strain *Aurantiochytrium* sp. L3W with the characteristics suitable for cultivation of various wastes, 25th Japan-Korea Joint Symposium on Water Environment, 2016 年 10 月, Kyoto, Japan
8. Das Asmit, 前田侑弥, 中井智司, 西嶋涉, 奥田哲士, 大野正貴, 後藤健彦 (2016) A novel strain, L3W of *Aurantiochytrium* species with the characteristics suitable for cultivation of various wastewater, 化学工学会第 48 回秋季大会, 2016 年 09 月, 徳島

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：ラビリンチュラ類オーランチオキトリウム属に属する微生物、該微生物を用いた脂質生産方法

発明者：中井智司、西嶋涉、奥田哲士、橋本くるみ、大濱正歴

権利者：広島循環型社会推進機構

種類：特許

番号：2016-172450

出願年：2016

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：西嶋 渉
ローマ字氏名：Wataru NISHIJIMA
所属研究機関名：広島大学
部局名：環境安全センター
職名：教授
研究者番号（8桁）：20243602

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

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。