

令和 5 年 6 月 25 日現在

機関番号：12101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K12832

研究課題名(和文) 微細藻類を用いた廃糖蜜蒸留廃水中の天然色素処理機構の解明

研究課題名(英文) Analysis on decolorization of molasses distillery wastewater treatment using microalgae

研究代表者

野口 愛 (Noguchi, Mana)

茨城大学・農学部・研究員

研究者番号：30724207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：畜産廃水処理施設・食品工場等の排水や酸性温泉水より採取した環境水より、計82試料において微細藻類の増殖を認め、そのうち16試料は無希釈の消化脱離液中で増殖可能であった。既に分離培養されている微細藻類株を用い、模擬廃糖蜜蒸留廃水を用いた培養試験も行った。10倍希釈した模擬廃水において微細藻類によるTOC、CODの除去が可能となり、*Parachlorella kessleri*における除去率が最も高かった。着色除去率は最高で11.2%であった。この結果より、微細藻類が都市下水処理水だけでなく廃糖蜜蒸留廃水の処理に利用できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バイオエタノールの排水処理において排水基準を満たすためには嫌氣的処理と何らかの二次処理を組み合わせる必要があるが、とくに後段の処理を導入することでエネルギー・コストが高まる。本研究で獲得した複数の新たな高有機物負荷・低pHに耐性のある微細藻類を利用することで、将来的には生物処理で最もエネルギー・コストのかかる曝気を省略または削減できる可能性を示している。今後獲得した微細藻類に対しより詳しい解析を進めていくことでバイオエタノール廃水のより効率的な排水処理プロセスの実現が期待される。

研究成果の概要(英文)：From samples collected from environmental water (e.g. discharge water from food processing plant, acidic hot spring), microalgae growth were observed in 82 samples. Within those samples, microalgae in 16 samples showed the tolerance to the digestive supernatant from a domestic wastewater treatment plant in Ishikawa prefecture. Three isolated microalgae (*Chlorella vulgaris*, *Chlorella emersonii*, *Parachlorella kessleri*) were incubated in 10-times diluted simulated distillery wastewater (pH adjusted). Within three strains, *Parachlorella kessleri* showed the highest TOC and COD removal rate. In the second test, *Chlorella vulgaris*, *Parachlorella kessleri*, and *Chlamydomonas eustigma* were incubated in 10-times diluted simulated distillery wastewater (pH 3.0). Colorant (evaluated by Abs260) were 0.2-11.2%. The findings of this study showed the possibility of the microalgae application to the molasses distillery wastewater treatment.

研究分野：環境微生物工学

キーワード：好酸性微細藻類 高有機物負荷耐性 微細藻類バイオマス 廃糖蜜蒸留廃液 排水処理

## 1. 研究開始当初の背景

バイオエタノール生産の際に大量に排出される廃棄物(蒸留廃液)は有機物負荷量が非常に高く、加えて高濃度の窒素、リン、カリウム等の栄養塩や黒褐色の天然色素(メラノイジン、ポリフェノール等)が含まれている。廃糖蜜蒸留廃水は多くの場合嫌気性処理(特に上向流嫌気性汚泥床法、UASB)を施されるが、処理水質は不十分であり、特に天然色素はほとんど除去されないため二次処理が必要とされる。その処理には細菌や藻類を組み合わせた生物処理を適用した報告がされているが、生物処理の多くの場合は曝気が必要なため処理エネルギー・コストが高くなりやすい。一方、微細藻類は光合成で増殖することができるためエネルギー効率の点で有利であり、処理に用いた微細藻類はバイオマスとしても利用が可能である。しかしながら、廃糖蜜蒸留廃水中の成分が微細藻類に与える影響は十分に評価されていない。また、廃糖蜜蒸留廃水は pH が低く(およそ 3~4)、処理の上で pH 調整も労力となっている。微細藻類の中には酸性条件を好む種もいるが、多くは温泉地など有機物負荷が高くない箇所に生息しており、増殖速度が十分でない。

## 2. 研究の目的

本研究では、廃糖蜜蒸留廃水中(高有機物負荷・低 pH)で増殖可能な微細藻類の獲得と、廃糖蜜蒸留廃液中で微細藻類が耐性を示す機構の解明を行う。獲得した微細藻類の有有用性評価も併せて行うこととする。

## 3. 研究の方法

### (1) 廃糖蜜蒸留廃水中で培養可能な微細藻類の獲得

**環境試料からの微細藻類の分離・確立:** 環境試料(水、底質など)より微細藻類の分離を行った。藻類以外の微生物汚染を除外するため、微細藻類用培地(MBM 培地、M-Allen 培地等)を用いた。

**消化脱離液を用いた微細藻類の選抜:** 獲得した微細藻類を、無希釈、2 倍希釈、5 倍希釈、10 倍希釈した滅菌消化脱離液を培地として、有機物負荷に耐性のある微細藻類の選抜を行った。

**分離した微細藻類種の同定:** 得られた微細藻類種の同定はリボソームの小サブユニットの 18S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づき行った。

**分離した微細藻類の共存微生物の同定:** 採取した微細藻類試料中に含まれる微生物をアンプリコンシーケンス解析により同定した。

### (2) 微細藻類を用いた廃糖蜜蒸留廃水の処理

十分なバイオマス量が得られた微細藻類に対し、300 mL バッチスケールでの廃糖蜜蒸留廃水を用いた排水処理試験を行った。また、比較として、都市下水処理への有効性が報告されている(Noguchi *et al.* 2017; 2021) *Chlorella vulgaris* (NIES-2170)、*Chlorella emersonii* (NIES-2151)、*Parachlorella kessleri* (NIES-2159) の 3 株に加え、好酸性藻類である *Chlamydomonas eustigma* (NIES-2499) の 4 株(NIES コレクション)を用いた試験も行った。廃糖蜜蒸留廃水は、サトウキビ生産国であり実際に廃水の処理が問題となっているミャンマーのものを参考として調整した模擬廃糖蜜蒸留廃水とした。色素除去効果は、紫外可視分光法を用いて評価した。予備試験にて模擬廃水と各微細藻類懸濁液の紫外吸光スペクトルを測定し、模擬廃水中の着色を 260 nm の吸光度を用いて評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 廃糖蜜蒸留廃水中で培養可能な微細藻類の獲得

廃糖蜜蒸留廃水の水質でも増殖可能な藻類の獲得を目的とするため、畜産廃水処理施設・食品工場等の排水や酸性温泉水より環境水を獲得し、計 82 試料より微細藻類の増殖を認めた、そのうち無希釈の消化脱離液中で増殖可能であった 16 試料が選抜された。

また、酸性温泉より集積した 3 つの試料より計 136 株の微細藻類を単離し、18S rRNA 遺伝子 V4 領域配列により同定を行った。解析した 57 株すべて(環境試料 TH05、TH06 由来)が好酸性の微細藻類である *Chlamydomonas eustigma* NIES-2499 株と最も相同性が高かった。これらの株は重金属汚染されている酸性河川から報告されたものとも近縁であり(Amaral-Zettler *et al.* 2011)、バイオエタノール廃水処理のみならず重金属を含む廃液処理にも応用できる可能性が示された。また、一部の株をより長い配列(1,116-1,119 bp)により同定したところ、TH05 と TH06 から分離された clone TH05-26 と clone TH06-60 は *Chlamydomonas acidophila* CCAP 11/133 株により近縁であった。一方、TH01 から分離された clone TH01-10 は *Chloroidium angustoeilipsoideum* CCAP 211/108 株に近縁であり、他の 2 試料から分離された株とは系統的な位置が異なった。そのため、clone TH05-26 や clone TH06-60 とは異なる廃水処理特性を示す可能性が示された。

同様に酸性温泉より集積した 10 試料中の共存微生物を 16S および 18S rRNA 遺伝子を標的としたアンプリコンシーケンス解析を行った。18S rRNA 遺伝子の解析の結果、10 試料中 5 試料で

Cyanidiales, 3 試料中で Chrysophyceae, 2 試料中で Chlorophyceae, そして 1 試料中で Trebouxiophyceae と Galderia に属す OTU が検出された(重複あり). 10 試料中 7 試料では配列の 80%以上が 1 つの OTU で占められていた. 16S rRNA 遺伝子の解析の結果, 9 試料でシアノバクテリアの共存が認められたが, TH01 でのみシアノバクテリアが検出されず特異的な微生物試料であることが示された.

## (2) 微細藻類を用いた廃糖蜜蒸留廃水の処理

既に分離培養されている微細藻類株を用い, 模擬廃水を用いた培養試験も行った. 調製した模擬廃水の pH を 3-8 に調製し, 各藻類株 (*C. vulgaris*, *C. emersonii*, *P. kessleri*) を 10 mL スケールにて培養した. *C. vulgaris* が最も増殖が高く, 中性付近の条件で増殖が最も高かった. *C. emersonii* はいずれの pH においても他の 2 株より増殖が低かった. *P. kessleri* は pH4-5 の条件で増殖が可能であり, 中性条件よりも短時間で増殖した. *C. vulgaris* では pH7, *P. kessleri* では pH4 の条件において, 300 mL にスケールアップして模擬廃水中で培養を行った. 無希釈の廃水中でも藻類の増殖が見られたが, TOC, COD, TN の除去には効果的ではなかった. 模擬廃水を 5 倍希釈した条件でも同様の結果となったが, 模擬廃水を 10 倍希釈すると TOC, COD の除去が可能となり, *P. kessleri* の方が除去率が高い傾向となった. *P. kessleri* の方が除去率が高く, TOC で *P. kessleri* 36% > *C. vulgaris* 10%, COD *P. kessleri* 37% > *C. vulgaris* 14%, TN *P. kessleri* 6% > *C. vulgaris* 5% を示した.

また, pH3 に調製した模擬廃水を蒸留水で 10 倍に希釈したもの (pH 2.98) を培地として *C. vulgaris*, *P. kessleri*, *C. eustigma* を用いた 300 mL スケールでのバッチ試験を行った. 微細藻類の細胞数をカウントしたところ 3 株とも 2-5 日目にピークを迎えたが, 株間の有意差はなかった. また, *P. kessleri* と *C. eustigma* に関しては培養後期に細胞の大きさ(最長部)が最大で 50-70% 増加していた. これは, 微細藻類が増殖よりも細胞内多糖の蓄積を優先させたことが考えられる. この結果は過去の知見と同傾向であり (Noguchi *et al.* 2021), 微細藻類が都市下水処理水だけでなく廃糖蜜蒸留廃水の処理に利用できる可能性を示した. 培養期間中の着色除去率は *C. vulgaris*, *P. kessleri*, *C. eustigma* でそれぞれ 0.6-9.7%, 0.2-7.5%, 0.2-11.2% であり, 微細藻類間の有意差は認められなかった.

## (3) 総括

本研究では微細藻類の獲得に想定よりも長期間を要し, 天然色素の除去機構の解明までは至らなかったが, 新たに 16 の高有機物負荷耐性のある微細藻類試料を獲得できた. 獲得した複数の新たな高有機物負荷・低 pH に耐性のある微細藻類を利用することで, 将来的には生物処理で最もエネルギー・コストのかかる曝気を省略または削減できる可能性を示している. また, すでに確立された株を用いた模擬廃糖蜜蒸留廃水処理試験を行い, 有機物や色素が除去可能であることを示した. 今後微細藻類に対しより詳しい解析を進めていくことでバイオエタノール廃水のより効率的な排水処理プロセスの実現が期待される.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mana Noguchi, Ryo Aizawa, Daisuke Nakazawa, Yoshiki Hakumura, Yasuhiro Furuhashi, Sen Yang, Kazuaki Ninomiya, Kenji Takahashi, Ryo Honda	4. 巻 169
2. 論文標題 Application of real treated wastewater to starch production by microalgae: potential effect of nutrients and microbial contamination	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical Engineering Journal	6. 最初と最後の頁 107973
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bej.2021.107973	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 M. Noguchi, Y. Furuhashi, A.N.N. Htet, R. Honda
2. 発表標題 Treatment of synthetic distillery wastewater using acidophilic microalgae strains
3. 学会等名 8th IWA Microbial Ecology and Water Engineering Specialist Conference（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野口 愛, 古橋 康弘, Htet April N. N., 本多 了
2. 発表標題 微細藻類を用いたバイオエタノール廃水処理の検討
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 M. Noguchi, R. Aizawa, D. Nakazawa, Y. Hakumura, Y. Furuhashi, S. Yang, K. Ninomiya, K. Takahashi, R. Honda
2. 発表標題 Regulation of microbial contamination under starch production by microalgae using domestic treated wastewater
3. 学会等名 Wastewater, Water, and Resource Recovery Conference 2022（国際学会）
4. 発表年 2022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
研究協力者	本多 了 (Honda Ryo) (40422456)	金沢大学・地球社会基盤学系・教授  (13301)	
研究協力者	古橋 康弘 (Furuhashi Yasuhiro) (60912748)	公益財団法人かずさDNA研究所・特任研究員  (82508)	

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
---------	---------