

称号及び氏名 博士（緑地環境科学） **Nguyen Tran Thien Khanh**

学位授与の日付 平成27年3月31日

論文名 **Culture of Microalgae with Digestate from Methane Fermentation**

（メタン発酵消化液を用いた微細藻類の培養）

論文審査委員 主査 北宅 善昭
副査 堀野 治彦
副査 山田 宏之
副査 渋谷 俊夫

論文要旨

Microalgae have been used as sources of human food, animal feed, and pharmaceutical products, because of their marked ability to convert CO₂ to biomass and their unique capacity to transform photosynthates to other useful compounds. Microalgae have also recently been used as a fuel source.

Microalgal cell growth rates are affected by combinations of environmental parameters such as light intensity, temperature, pH, and nutrients in culture solutions.

Methane fermentation with organic residues and wastes is one of the most attractive renewable energy production technologies for reducing greenhouse gas emissions and for reducing the load of organic wastes. The resultant digestate contains nutrients for

plants and can be utilized as valuable fertilizer, particularly due to its high nitrogen concentration.

The goal of this study was to establish a microalgal culture system combining digestate from an anaerobic methane fermentation system. The objectives of this fundamental study were to investigate the effects of environmental conditions on the growth of microalgae cultured with digestate from methane fermentation, and to assess the light environment in culture solution with different concentrations of digestate and microalgal densities.

1) In order to clarify problems that needed to be solved for establishing a microalgal culture system with digestate, growth performance of mixtures of microalgal cells, including *Euglena gracilis*, *Chlorella vulgaris*, and *Dunaliella tertiolecta*, cultured in containers containing digestate at 5, 10, 15, 20, and 50% dilutions, was investigated. The volume of the solution was 1 L and the depth was 30 mm. Continuous illumination was provided at a photosynthetic photon flux density (PPFD) of $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at the solution surface at 30°C . Sample algal cells were collected daily from different depths, namely 0-5 mm (the surface layer), 10-15 mm (the middle layer), and 25-30 mm (the bottom layer), for counting cell number. The specific growth rate (μ) of each species at each depth was calculated as the cellular multiplication rate from the increment in cell number with time. In all layer, the μ of each species was highest in 5% digestate solution and the μ of all the microalgal species in total was 0.035 h^{-1} . Maximum microalgal cell density was 30×10^5 (cells ml^{-1}) for *D. tertiolecta*.

2) In order to determine suitable conditions for the culture of microalgae, three microalgal species were cultured in drops of solution containing diluted digestate at different combinations of digestate concentration, temperature, pH, and PPFD. The volume of each drop was 3 μl . Drops of solution were retained on the inner surface of a translucent plastic vessel. The number of cells was monitored daily and specific growth rates (μ) were calculated.

D. tertiolecta was cultured in solutions containing digestate at concentrations ranging between 5 and 100% and at four temperatures, 20, 25, 30 or 35°C. The PPFD was 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ with continuous illumination. The highest μ value, 0.05 h^{-1} , was obtained at 30°C in 50% digestate. This result for *D. tertiolecta* and previous reports for *E. gracilis* and *C. vulgaris* demonstrate that these microalgal species can be cultured at a high growth rate with diluted digestate at 30°C.

In order to determine the optimum combination of concentrations of digestate and pH levels for culturing the microalgae, *E. gracilis*, *C. vulgaris* and *D. tertiolecta* were cultured in drops of solution containing 5-100% digestate at pH 3.4, 6.8, or 8.7. The pH of the digestate solution was adjusted with 10% HCl solution. The PPFD was 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ with continuous illumination at 30°C. In this study, only *E. gracilis* survived in response to different digestate concentrations at pH 3.4. At the exact same conditions, the other two microalgal did not grow. The highest μ of *E. gracilis* (0.05 h^{-1}) was obtained at pH 3.4 in 20-25% digestate. This result demonstrates that *E. gracilis* can be produced at a high growth rate with diluted digestate adjusted to a low pH.

In order to ascertain the suitable combinations of digestate concentration and PPFD for microalgal culture, *E. gracilis*, *C. vulgaris* and *D. tertiolecta* were cultured with digestate at 5-100%, and at PPFDs between 75 and 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ with continuous

illumination at 30°C. The maximum μ values were 0.047 h⁻¹ in 10% digestate for *E. gracilis*, 0.065 h⁻¹ in 20% digestate for *C. vulgaris*, and 0.052 h⁻¹ in 50% digestate for *D. tertiolecta*. This result demonstrates that all three species could be cultured at high growth rates with diluted digestate under relatively low PPFD.

3) The light intensity decreases logarithmically in the solution according to Lambert-Beer's law that is given by equation $P_2 = P_1 \exp(-\beta(Z_2-Z_1))$. Absorption coefficient (β) = $(\ln(P_1) - \ln(P_2)) / (Z_2 - Z_1)$, where P_1 and P_2 are photosynthetic photon flux densities (PPFDs) at depth Z_1 and Z_2 , respectively, in the culture solution. The light absorption coefficients of culture solutions with different digestate concentrations and different microalgal densities were measured by a spectrophotometer in the wavelength range of photosynthetic active radiation (400-700 nm). A linear regression was obtained between the absorption coefficient (cm⁻¹) and digestate concentration (%) expressed as $\beta_{\text{digestate}} = 0.0546 \times \text{"digestate concentration"} + 0.005$. A linear regression was also obtained between the absorption coefficient and the microalgal density (cells ml⁻¹) expressed as $\beta_{\text{microalgae}} = 0.0655 \times \text{"microalgal density"} + 0.0402$. The light intensity in the culture solution with different digestate concentrations and microalgae densities is given by: $P_2 = P_1 \exp(-(\beta_{\text{digestate}} + \beta_{\text{microalgae}})(Z_2 - Z_1))$. In the preliminary experiment, a microalgal species, *D. tertiolecta*, showed the highest specific growth rate at a cell density of 30×10^5 cells ml⁻¹. In the result of the simulation conducted with this microalgal density, more than 10% of light was transmitted at the depths shallower than 15 mm, using 20% diluted digestate.

Conclusion

In this research, it was confirmed that digestate from methane fermentation was a useful nutrient for the culture of green microalgae (*E. gracilis*, *C. vulgaris*, *D. tertiolecta*), which can survive in high concentrations of ammonia in a solution of this diluted digestate. To establish a culture system that can accommodate this digestate solution, the depth of the solution must be designed to maintain high light penetration. A culture system consisting of a thin layer of solution under natural light is proposed. This system contains digestate diluted to 10-20% as the basal culture solution. The depth of the solution can be controlled to maintain optimal PPFD penetration, depending on solar radiation.

審査結果の要旨

近年、廃棄物バイオマスを資源として有効利用するためのメタン発酵処理が推進されつつある。メタン発酵における副産物としての消化液の多くは利用されず、廃水としてエネルギーやコストを要する処理を経て放流される。メタン発酵消化液（以下、消化液）は、肥料成分を多く含むことから、植物栽培用液肥としての利用が試みられているが、その利用量はまだ少ない。なぜなら、消化液原液に含まれる窒素成分のほとんどが $\text{NH}_4^+\text{-N}$ （濃度 $1 \sim 2 \text{ g L}^{-1}$ ）で高等植物にとって有害となる濃度を大きく超えているためである。他方、一部の微細藻は高濃度 NH_4^+ に耐性を持ち、培養液中の $\text{NH}_4^+\text{-N}$ を積極的に吸収する。

本研究の最終目標はメタン発酵システムと微細藻培養システムを組み合わせた物質循環型の廃棄物処理システムを構築することである。本研究ではその基礎研究として、飼料、食料、医薬品として利用でき、さらには燃料にもなる 3 種の微細藻類 (*Euglena*, *Chlorella*, および *Dunaliella*) を供試し、微細藻類の増殖に適した消化液濃度を中心に、光強度、温度、pH などの培養条件の検討を行った。

1. 消化液を微細藻培養で処理するためのシステムを確立するうえで解決しなければならない課題を明らかにするため、*Euglena*, *Chlorella* および *Dunaliella* を 5~50% に希釈した消化液を培養液として混合培養し、各種の各条件での増殖速度を比較した。容積 1 L、深さ 30 mm の培養槽を用い、光合成有効光量子束密度 (PPFD) $300 \mu\text{mol m}^2 \text{ s}^{-1}$ の連続照明下、温度 30°C で培養した。毎日一定量採取した培養液中の細胞数を計測し、その時間変化から比増殖速度（相対増殖率）を求めた。その結果、全微細藻種において消化液希釈濃度 5% での比増殖速度が最大となり、各微細藻種の平均は 0.035 h^{-1} であった。また培養開始 5 日後の微細藻細

胞密度は 30×10^5 (cells mL⁻¹) であった。消化液希釈濃度 5%以下での比増殖速度の低下は、細胞増殖に必要な栄養塩が不足することに起因し、消化液希釈濃度5%以上での比増殖速度の低下は、褐色を呈する希釈消化液の低い光透過性が細胞増殖に必要な光強度の不足を引き起こすことに起因すると推察された。

2. 微細藻類の増殖に適した条件を探索するために、上記3種の微細藻を消化液濃度、光強度、温度、pHの様々な組み合わせ条件下で培養し、各培養条件で比増殖速度を比較した。実験は水滴培養法を用いて行った。この方法では、容積約3 μLの水滴培養液内で微細藻を培養し、1水滴を1反復として複数水準の環境因子の組み合わせ条件下で、多反復の培養実験を同時に行うことができる。また最大深1 mmの培養液水滴中の光の減衰は無視できるので、精度よく比増殖速度を求めることができる。各条件での培養では、2日間の順化の後、4日間の対数増殖期において水滴内の細胞総数を毎日計数して、その時間変化から比増殖速度を求めた。その結果、*Euglena*、*Chlorella*および *Dunaliella*について、最適な消化液希釈濃度は、それぞれ10%、50%および20%であり、最大比増殖速度は、それぞれ0.047 h⁻¹、0.065 h⁻¹および0.052 h⁻¹であった。PPFDの最適値は、全ての種で約150 μmol m² s⁻¹となった。また温度の最適値は、全ての種で約30°Cであった。pHの最適値については、全ての種で7~8の範囲であったが、*Euglena*については、pH3.4の酸性培養液でも高い増殖速度を示した。これらのことから、微細藻は光強度が適正であれば、濃度10~50%の希釈消化液培養液 (pH7~8) で増殖させられることが明らかとなった。

3. 消化液希釈濃度および微細藻細胞密度の異なる培養液を供試し、透過光の波長別スペクトル分布を計測し、光合成有効放射域(波長400-700 nm)の光透過率から吸光係数(cm⁻¹)を算定した。その結果から、濃度の異なる消化液希釈培養液の光吸収係数は、 $\beta_{\text{digestate}} = 0.0546 \times \text{「希釈濃度(%)」} + 0.005$ で表され、微細藻細胞密度の異なる培養液の光吸収係数は、 $\beta_{\text{microalgae}} = 0.0655 \times \text{「細胞密度(cells mL}^{-1}\text{)」} + 0.0025$ で表すことができた。これらの吸光係数を用いて、深さZ₁、Z₂におけるPPFD値 P₁、P₂の関係を、 $P_2 = P_1 \exp(-(\beta_{\text{digestate}} + \beta_{\text{microalgae}})(Z_2 - Z_1))$ で表し、消化液希釈濃度および微細藻細胞密度の異なる培養液内の光環境を評価した。その結果、消化液希釈濃度20%、微細藻細胞密度 30×10^5 cells mL⁻¹の条件で、10%以上の光透過率を得るためには、培養液を15 mmより浅くする必要のあることが明らかとなった。

以上、多くの培養実験から、適切な希釈濃度のメタン発酵消化液は微細藻類の培養液として適していることを実証し、高密度培養を効率的に行うためには特に光環境調節が重要であることを明らかにした。さらに数値実験の結果も加えて、最適光環境条件を得るための希釈消化液を用いた微細藻培養システムを提案した。これら一連の研究成果は、地域資源循環システムの構築に寄与するとともに、緑地環境科学の発展に大きく貢献する。よって、最終試験の結果とあわせて、博士(緑地環境科学)の学位を授与することを適当と認める。