



Title	Wolffia arrhizaを用いた資源生産型植生浄化システムの構築に向けたバイオマス生産ポテンシャルの検討
Author(s)	高井, 雄一郎
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/67155">https://doi.org/10.18910/67155</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

# 博士学位論文

*Wolffia arrhiza* を用いた資源生産型植生浄化システムの  
構築に向けたバイオマス生産ポテンシャルの検討

高 井 雄 一 郎

2017年7月

大阪大学大学院工学研究科



## 目次

諸論	1
第1章 <i>Wolffia arrhiza</i> の葉状体の増殖と休眠芽形成に及ぼす 環境要因の影響	7
第1節 緒言	
第2節 材料および方法	
第3節 結果	
第4節 考察	
第5節 要約	
第2章 モデルシミュレーションによる <i>Wolffia arrhiza</i> を用いた資源生産型 水質浄化システムの評価	21
第1節 緒言	
第2節 材料および方法	
第3節 結果	
第4節 考察	
第5節 要約	
第3章 <i>Wolffia arrhiza</i> のバイオマスを基質としたエタノール生産	33
第1節 緒言	
第2節 材料および方法	
第3節 結果	
第4節 考察	
第5節 要約	
総括ならびに結論	45
引用文献	47
謝辞	51
本論文に関する報文	53



## 緒論

### 第1節 水域の富栄養化と植生浄化法

閉鎖性水域における富栄養化は、人間活動に由来する窒素やリン等の栄養塩類が水環境に過剰に放出されることによって生じる問題であり、Smith と Schindler は、富栄養化が及ぼす悪影響を Table 0-1 のようにまとめ、経済的な損失をともしう国際的な問題であることを指摘している<sup>1)</sup>。

我が国においても琵琶湖（南湖）<sup>2)</sup>や、霞ヶ浦<sup>3)</sup>では、現在でも窒素およびリン濃度が環境基準値を超過しており、アオコやカビ臭等の発生が続いている。

富栄養化の問題を改善するためには、生活排水や農業排水に含まれる栄養塩類を除去し、閉鎖性水域への栄養塩の流入負荷を抑制することが重要である。しかし、現在の排水処理技術の主流であり、有機物除去を主な目的として開発された 2 次処理技術である標準活性汚泥法では、窒素やリンを効率的に処理することができないため、その除去効率を向上させるうえでは、A2O（Anaerobic / Anoxic / Oxidic）法に代表される嫌気槽と好気槽を組み合わせで構成された 3 次処理プロセスの適用が必要とされる<sup>4)</sup>。しかし、このような 3 次処理プロセスは高コスト、かつ高エネルギー消費であるという問題を抱えており、必ずしも十分に普及するには至っていない。

Table. 0-1 富栄養化が水環境に及ぼす悪影響

- 
- |  |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"><li>・ 植物プランクトンおよび高等植物の増殖</li><li>・ 植物プランクトンを捕食とする動物プランクトンの増加</li><li>・ HABs（Harmful Algal Blooms）引き起こす毒性または不可食藻類種への変遷</li><li>・ 底性・着生藻類バイオマスの増加</li><li>・ 高等植物種の生物相の変化</li><li>・ サンゴ礁への損害とサンゴ礁海域の生物群の減少</li><li>・ 魚類の多量死</li><li>・ 漁獲量の減少</li><li>・ 生物多様性の減少</li><li>・ 河川や湖沼、港湾における透明度の減少</li><li>・ 異味・異臭といった飲料水としての問題</li><li>・ 溶存酸素の欠乏</li><li>・ 景観の悪化</li></ul> |
|--|
-

一方、このような3次処理の欠点を持たず、2次処理水や富栄養化された環境水からの栄養塩類の除去技術のひとつとして、自然の水質浄化原理（自浄作用）を生かした植生浄化法についても多くの実証試験が実施されている<sup>5)</sup>。植生浄化法は、植物を配した浄化施設に河川水等を導き、植物による吸収の他に、浄化施設内での沈殿・ろ過、土壌への吸着、土壌微生物等による分解の機能により流入水中の生物学的酸素要求量（Biochemical Oxygen Demand、BOD）、浮遊物質（Suspended Solids、SS）、窒素、リン等を除去する技術である。本技術は、栄養塩類除去技術としての高い経済性を有するばかりでなく、日常的な運転・維持管理を必要としないうえ、施設自体が生物の生息・生育の場となることから環境教育の場としての活用が期待できるという副次的メリットを持つ<sup>5)</sup>。一方で、植生浄化法による窒素・リン等の除去を維持するためには、窒素・リン等を吸収した植物体の収穫・有効利用に関しての配慮が必要とされている<sup>6)</sup>。

本研究では、窒素・リン等を吸収した植物体をバイオマスとして活用することで、資源生産を兼ねた植生浄化法を確立することを目的としており、利用する植物としてウキクサ亜科植物のひとつである *Wolffia arrhiza*（ミジンコウキクサ）を選定して、種々の検討を行った。この緒論においては以下に、植生浄化に用いた植物体の利活用について既往の報告を概観し、本研究においてウキクサ亜科、特に *W. arrhiza* に焦点を当てた検討を行うこととなった背景を示した。また、*W. arrhiza* を用いたバイオマス生産を兼ねた植生浄化法を確立するために重要な課題を明示したうえで、本論文の構成を示した。

Table 0-2 植生浄化法に用いる植物の生活型による分類

生活型	植物名
陸上植物 (22 種)	アリッサム、イタリアングラス、インパチェンス、オークサキビ、オーチャードグラス、オオムギ、キンセンカ、クロタラリア、ケナフ、コムギ、サツマイモ、サトイモ、ストック、セリ、ソルガム、ハトムギ、ハナナ、ベニバナ、マリーゴールド、ミディートマト、ミント、ユリオプス・デージー
抽水植物 (12 種)	アヤメ、イグサ、イネ、オランダガラシ、ガマ、パックブン、ハナショウブ、パピルス、ヒメガマ、マコモ、ヨシ
浮遊植物 (7 種)	アオウキクサ、アカウキクサ、ウォルヒア、ウキクサ、コウキクサ、ボタンウキクサ、ホテイアオイ
沈水植物 (4 種)	オオカナダモ、コカナダモ、サンショウモ、フサモ
浮葉植物 (2 種)	ハス、ヒシ

水質浄化に利用可能な植物データベースより引用<sup>6)</sup>

## 第2節 植生浄化法に用いられる植物体の利活用

藤田らは、植生浄化法に用いる植物のデータベースを作成しており<sup>6)</sup>、Table 0-2 に示すような 46 種の植物の栄養塩類の除去速度や余剰植物体の利用方法についてまとめている。ここでは、Table 0-3 に植物体のバイオマスとしての利活用方法について、代表的なものをまとめた。なお、Table 0-2 の植物うち、植生浄化法での適用が必ずしも適当ではない陸上植物については、特に Table 0-3 には記載していないが、これまでの研究事例では主に食用・観賞用としての利活用が報告されている。

Table 0-3 植生浄化法に用いた植物体のバイオマスとしての利活用方法

	植物名	窒素除去 速度 <sup>a</sup> (g-N/m <sup>2</sup> /d)	リン除去速 度 <sup>a</sup> (g-P/m <sup>2</sup> /d)	利活用事例	備考
抽水植物	<i>Phragmites australis</i> (ヨシ)	0.28	0.028	すだれ、製紙 <sup>6)</sup> エタノール <sup>22)</sup>	総グルカン 40% 総キシラン 30%
	<i>Arundo donax</i> (ダンチク)	0.18	0.08	メタン <sup>10)</sup> エタノール <sup>18)</sup>	総グルカン 36% 総キシラン 30%
	<i>Ipomoea aquatica</i> (パックブン)	0.51	0.062	食用 <sup>6)</sup>	
	<i>Zizania latifolia</i> (マコモ)	0.54	0.1	食用 <sup>6)</sup>	
	<i>Pistia stratiotes</i> (ボタンウキクサ)	0.89	0.15	飼料 <sup>21)</sup> エタノール <sup>23)</sup> コンポスト <sup>7, 8, 9)</sup>	総グルカン 20%
浮遊植物	<i>Eichhornia crassipes</i> (ホテイアオイ)	0.95	0.17	メタン <sup>7, 16, 17)</sup> 熱分解 <sup>19)</sup> エタノール <sup>23)</sup>	総グルカン 17%
	<i>Spirodela polyrrhiza</i> (ウキクサ)	0.35	0.12	飼料 <sup>11, 12)</sup> エタノール <sup>26)</sup>	デンプン 31%
	<i>Lemna minor</i> (コウキクサ)	0.4	0.084	飼料 <sup>13, 14, 15)</sup> 熱分解 <sup>20)</sup> エタノール <sup>27)</sup>	デンプン 36%
	<i>Wolffia arrhiza</i> (ミジンコウキクサ)	0.13	0.038	エタノール 本研究	デンプン 葉状体 12% 休眠芽 44%
沈水植物	<i>Egeria densa</i> (オオカナダモ)	0.34	0.18	メタン <sup>17)</sup>	総グルカン 20%
浮葉植物	<i>Nelumbo nucifera</i> (ハス)	0.36	0.08	観賞用・食用 <sup>6)</sup>	

a: 水質浄化に利用可能な植物データベースより引用<sup>6)</sup>



Table 0-3 において、食用や飼料は、市場価値の高いバイオマスの利用法として有望ではあるが、重金属や化学物質等を含み得る排水や汚染水に植生浄化法を適用した場合には、植物がこれら有害物質を蓄積する可能性があるため、安全性という面での課題があることには注意しなければならず、植物体利用の用途としては一般的であるとはいえない。

一方、2000 年代に入ってバイオマスエタノール等、バイオ燃料の需要の急速な増加<sup>25)</sup>を背景に、植生浄化法に用いたバイオマスをエタノール生産の基質として利用することも研究されるようになってきている<sup>22, 23)</sup>。ウキクサ亜科の植物は、好適な環境下では葉状体 (vegetative frond) という形態で旺盛に増殖することに加えて、貧栄養、低温、短日等の増殖に不適な環境下ではデンプンを多く含む休眠芽 (turion) を形成すし、水底に沈む (Fig. 0-1) という特徴をもっており<sup>28)</sup>、そのバイオマスをエタノールの基質とする研究に近年注目が集まってきている<sup>26, 27)</sup>。セルロースを主体としたバイオマスを基質としてエタノールを生産する際には、強固な細胞壁を分解・糖化するための物理・化学的な前処理や細胞壁分解酵素に関連する高い技術力が必要とされるが<sup>24)</sup>、ウキクサ亜科植物のバイオマスは、デンプン含量が高いことに加えて、糖化の妨げとなるリグニンの含量が極めて低く容易に糖化できることから、経済的なアドバンテージを持つものと考えられている。ウキクサ亜科植物には、*Spirodela* spp. (ウキクサ属)、*Lemna* spp. (アオウキクサ属)、*Wolffia* spp. (ミジンコウキクサ属) 等が属するが、本研究では、特にデンプン含量の高い休眠芽を生産すること<sup>29)</sup>が知られている *Wolffia* spp. に属する *W. arrhiza* を用いて、資源生産型水質浄化システムの構築を目指すこととした。

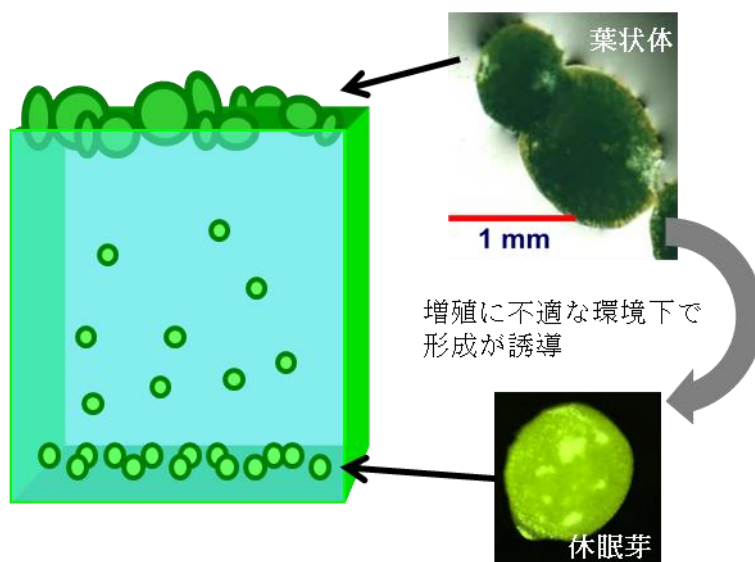


Fig. 0-1 *W. arrhiza* の葉状体と休眠芽

### 第3節 *W. arrhiza* を用いた資源生産型水質浄化システム構築のために検討が必要な課題

ウキクサ亜科の1種である *W. arrhiza* を用いた資源生産型水質浄化システムについては、Fujita らにより水質浄化能力に関する一連の研究が報告されている<sup>29)</sup>が、資源生産システムとしてのポテンシャルを評価するためには、さらに検討しておくべき以下のような課題がある。

- デンプン含量の高い休眠芽形成条件の検討： 先に述べたようにウキクサ亜科の植物の特徴であるデンプンを多く含む休眠芽 (turion) をエタノール生産の基質とすることができれば、セルロースが主な糖類である他の水生植物を基質とする場合に比べて前処理と酵素にかかるコストを大幅に削減できるものと考えられる。ウキクサ亜科の植物のデンプン蓄積を試みた報告は、塩化ナトリウムを加えた培地で栽培することで、*S. polyrrhiza* のデンプン含有率を最大 31%にまで高めたという報告<sup>26)</sup>と、スクロースの添加により、*L. minor* のデンプン含有率を最大 36%にまで高めたという報告<sup>27)</sup>がある。また、同じウキクサ亜科の *W. arrhiza* について、Fujita ら<sup>29)</sup>は、人工排水を用いた栽培における休眠芽誘導には、栄養欠乏と初期の植物体密度が有効であることを明らかにし、このとき休眠芽には最大 44%までデンプンが蓄積されることを報告している。しかし、ウキクサ亜科植物を用いた植生浄化法において、付加価値の高いバイオマスを生産するシステムを構築するためには、休眠芽を効率的に形成する条件をより詳細に検討しておく必要がある。
- 休眠芽からのエタノール生産方法の検討： 植生浄化法においてウキクサ亜科植物を適用し、休眠芽のようにデンプン含量の高いバイオマスを生産できるようになれば、それを基質に実際にエタノールを生産できる方法の確立が求められる。2010 年代に入り、ウキクサ亜科植物のバイオマスを基質としてエタノール生産を試みた事例がいくつか報告されている。*S. polyrrhiza* では、 $\alpha$ -アミラーゼ、プルラナーゼおよびアミログルコシダーゼを用いた糖化後に *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 24859 を用いて 94.7%の発酵効率を達成している<sup>26)</sup>。また、*L. minor* では、 $\alpha$ -アミラーゼ、アミログルコシダーゼおよびセルラーゼを併用した糖化後に自己凝集性の酵母を用いることで 94.9%の発酵効率を達成している<sup>27)</sup>。一方で、本研究でとりあげる *W. arrhiza* については、資源価値の高い休眠芽も含めて、エタノール生産に関する具体的な検討は行われていない。従って、*W. arrhiza* からエタノールを生産するための、前処理法、糖化酵素の種類、モード・条件等についての検討を行っておく必要がある。

## 第4節 本論文の目的と構成

本研究では、*W. arrhiza* を用いて水質浄化とバイオマス生産を両立する co-benefit システム (Fig.0-1) の構築を目的としている。このシステムでは、栄養塩を多く含む排水等に対して、旺盛に生長する *W. arrhiza* の葉状体により栄養塩除去を行い、生長した葉状体を収穫してデンプン生産槽で休眠芽へ誘導することで、生産されたバイオマス中のデンプン含量を高め、例えばエタノール等の生産基質に有効活用することを想定している。この目的に向け、本論文では、第4節で述べた課題に関する一連の検討を行うこととする。

まず、第1章では、*W. arrhiza* の休眠芽形成に各種環境要因が及ぼす影響を明らかにし、休眠芽の形成を人為的に誘導する環境要因について詳細に検討した。次に、第2章では、*W. arrhiza* を用いた植生浄化法における栄養塩類を含む排水の連続除去プロセスを、葉状体と休眠芽という2種類の形態を考慮した数学モデルで表現した。また、構築したモデルを用い、複数の収穫パターンを想定して資源生産のシミュレーションを行った。最後に第3章では、水質浄化により得られた *W. arrhiza* のバイオマスを基質としたエタノール生産の条件を実験的に検討し、葉状体および休眠芽の両者からのエタノール生産ポテンシャルを評価した。

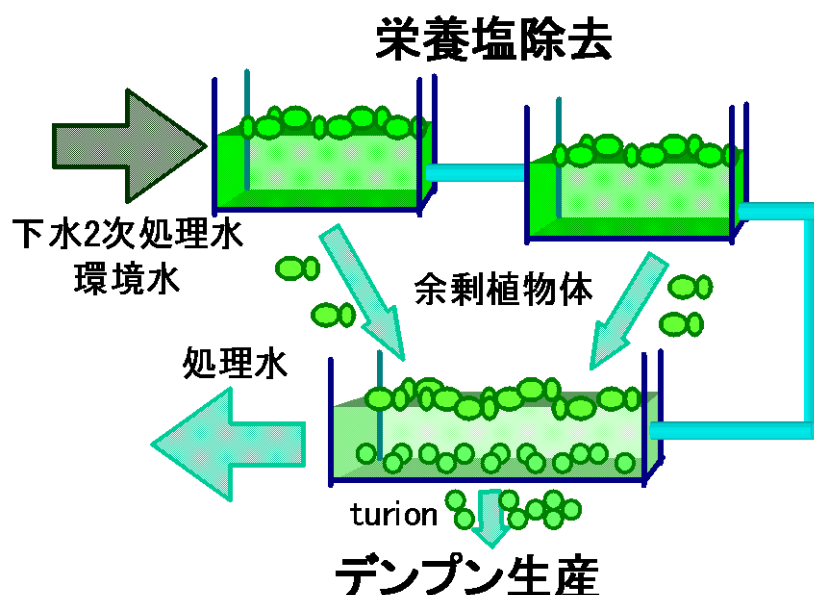


Fig. 0-2 *W. arrhiza* を用いた栄養塩除去とデンプン生産

# 第 1 章 *Wolffia arrhiza* の葉状体の増殖と休眠芽の形成に及ぼす環境要因の影響

## 第 1 節 緒言

本研究ではウキクサ亜科の植物 *W. arrhiza* を用いて、旺盛に増殖する葉状体による吸収を通じて排水中または環境水中の栄養塩類を除去し、増殖した葉状体をデンプン含有量の高い休眠芽へ転換することで、水質浄化とバイオマス生産を兼ね備えた co-benefit システムを構築することを目標としている。このシステムにおいては、バイオマス全体の生産量を最大化するとともに、資源価値の高いデンプンの含量を高めることが望まれるため、休眠芽を効率的に誘導する必要がある。従って、種々の環境要因が *W. arrhiza* の休眠芽形成に及ぼす影響を検討し、人為的に操作が可能な因子によって休眠芽形成を誘導する条件を明らかにすることが望まれる。これまでに、*Spirodela* spp. や *Lemna* spp. といったウキクサ亜科の植物については、低水温、短日条件、または、窒素欠乏下で休眠芽を形成することが知られている<sup>28)</sup>。また、休眠芽の形成には言及していないものの、栄養塩類の欠乏やスクロースの添加により植物体中のデンプンの蓄積が促進されることが示されている<sup>26, 27)</sup>。*Spirodela* spp. については、植物ホルモンの 1 種のアブシジン酸が休眠芽の形成を促進することも明らかとなっている<sup>30)</sup>。一方、*W. arrhiza* の休眠芽の形成については試験管内での栽培で（2 日毎に培地を交換）、栄養塩濃度の低下、高い葉状体の初期密度、高い照度および長い照光時間が休眠芽の形成を促進することが示されている<sup>29)</sup>ものの、未だ十分な検討が行われていない。

本章では、デンプン含量が高いバイオマスを本システムにおいて生産するために休眠芽形成に影響を及ぼす各種環境要因を明らかにすることを目的として、*W. arrhiza* を屋外のガラス温室内で連続的に栽培する系において、温度、光、栄養塩濃度が葉状体の増殖と休眠芽の形成に及ぼす影響を調査した。また、試験管規模の試験により、休眠芽を誘導する窒素濃度やリン濃度の閾値を明らかにした。

## 第 2 節 材料および方法

### 1. 供試植物および培地

本章では、スイス連邦工科大学チューリッヒ校の E. Landolt 教授より提供していただいた *W. arrhiza* を用いた。試験に用いる葉状体は、Hutner 培地<sup>31)</sup> ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$  400 mg/l、Ethylene diamine tetra acetic acid 500 mg/l、KOH 200 mg/l、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$  200 mg/l、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  354 mg/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  500 mg/l、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  17.9 mg/l、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  65.9 mg/l、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  3.95

mg/l、 $\text{H}_3\text{BO}_3$  14.2 mg/l、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  25.2 mg/l、 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.2 mg/l、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  24.9 mg/l) を3倍に希釈したものを用いて、人工気象器内（室温 20 °C、照度 2000 lux（蛍光灯）、照光時間 16 時間/日）で継代栽培し維持した。なお、Hutner 培地（原液）の全窒素濃度および全リン濃度は、それぞれ 112 mg-N/l および 71 mg-P/l であり、pH は希釈後に 7.0 に調整した。

## 2. 栽培条件

### (1) 照光時間の影響の検討（温室内実験）

*W. arrhiza* の葉状体の増殖と休眠芽の形成に照光時間が及ぼす影響を検討するために、ガラス温室内にポリプロピレン製の栽培槽（30 cm × 30 cm × 9.0 cm）を設置し、*W. arrhiza* を栽培した。栽培槽（有効水深 2.6 cm；液量 2.4 l）に、葉状体を湿重量 20 g となるよう植種し（0 日目）、5 倍希釈の Hutner 培地（全窒素 22.4 mg-N/l、全リン 14.2 mg-P/l）を、水理学的滞留時間（HRT）1 日で連続的に流入させて栽培を行った。水温は 20 °C に調節し、照光時間は、温室内に設置したハロゲンランプ（照度 5000 lux 以上）で 8 時間/日、12 時間/日、16 時間/日に調節した。この栽培試験において、適宜、水面に浮遊しているものを葉状体、栽培槽底部に沈降しているものを休眠芽として定期的に 0.5 mm メッシュの篩で回収し、水道水で洗浄後、水分をよく切ってから湿重量を測定した。植物体は湿重量の測定後、速やかに栽培槽に戻した。

### (2) 水温の影響の検討（温室内実験）

*W. arrhiza* の葉状体の増殖と休眠芽の形成に水温が及ぼす影響を検討するために、照光時間の影響の検討と同様の方式で、ガラス温室内で栽培試験を行った。水温は 10 °C、20 °C、30 °C に設定し、20 倍希釈の Hutner 培地（全窒素 5.6 mg-N/l、全リン 3.6 mg-P/l）を HRT 1 日で、栽培槽に連続的に流入させて連続栽培を行った。照光時間は、16 時間/日に調節し（ハロゲンランプ等の殺菌施設：照度 5000 lux 以上）、バイオマスの湿重量を葉状体と休眠芽に分けて定期的に測定した。

### (3) 培地内の栄養塩類濃度の影響の検討（温室内実験）

*W. arrhiza* の葉状体の増殖と休眠芽の形成に栄養塩類濃度が及ぼす影響を検討するため、Hutner 培地の希釈倍率を変えて、水温の影響の検討と同様の方式でガラス温室内にて *W. arrhiza* の栽培試験を行った。5 倍希釈の Hutner 培地（全窒素 22.4 mg-N/l、全リン 14.2 mg-P/l）、10 倍希釈の Hutner 培地（全窒素 11.2 mg-N/l、全リン 7.1 mg-P/l）、20 倍希釈の Hutner 培地（全窒素 5.6 mg-N/l、全リン 3.6 mg-P/l）を HRT 1 日で連続流入させて栽培を行い、バイオマスの湿重量を葉状体と休眠芽に分けて定期的に測定した。ここで、水温は 20 °C、照光時間は 16 時間/日（照度 5000 lux 以上）となるように調節した。

#### (4) 培地内の栄養塩類濃度の影響の検討（試験管サイズ実験）

栄養塩類濃度が葉状体の増殖と休眠芽の形成に及ぼす影響を詳細に検討するため、窒素またはリン酸濃度を種々変化させて調製した改変 Hutner 培地を用いて、試験管サイズでの *W. arrhiza* の栽培試験を行った。30 個の葉状体を直径 14 mm のガラス試験管内の 10 ml の培地に植え、2 日毎に培地の全量を新鮮なものに交換する連続回分栽培を人工気象器（庫内温度 20 °C、照光時間 16 時間/日、照度 6900 lux 蛍光灯）で行って、定期的に葉状体と休眠芽の個数を計測した。

ここで、全窒素濃度の影響を検討する試験では、栄養塩類濃度を調節するために無機窒素源（ $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ）を除いた 5 倍希釈の Hutner 培地に、全窒素濃度を 0.1、1.5、1.0、5.0 mg-N/l（硝酸態窒素/アンモニア態窒素=1.27）となるように、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$  と  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  の混合溶液を加えたものを用いて栽培を行った。また、窒素源の種類の影響を検討する試験では、窒素源を除いた 5 倍希釈の Hutner 培地に全窒素濃度が 1.0 mg-N/l となるように、アンモニア態窒素（ $\text{NH}_4\text{Cl}$ ）または硝酸態窒素（ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ）を添加したものを用いた。他方、全リン濃度の影響を検討する試験では、リン源（ $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ）を除いた 5 倍希釈の Hutner 培地に  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  を全リン濃度が 0.01、0.05、0.1、3.6 mg-P/l となるように加えたものを用いた。なお、これらの改変培地には、改変前の Hutner 培地の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度と等しくなるように、 $\text{CaCl}_2$ （220.3 mg/l）を補った。

### 3. 葉状体の比増殖速度と休眠芽の比形成速度の算出

葉状体の湿重量（または個数）の対数を縦軸に、経過日数を横軸にグラフを作成し、データが直線性を示す区間の傾きを比増殖速度として算出した。また、休眠芽の湿重量（または個数）の対数を縦軸に、経過日数を横軸にグラフを作成し、データが直線性を示す区間の傾きを比形成速度として算出した。

### 4. 流入水および流出水の全窒素濃度およびリン酸濃度の測定

流入水および流出水の栄養塩濃度は工業用水試験方法に従って、全窒素濃度はアルカリ性ペルオキシ 2 硫酸カリウム分解法（JIS K 0101.39.2.）を用いて測定した。全リン濃度は、試料をペルオキシ 2 硫酸カリウム分解に供した後に、リン酸態リンをモリブデン酸青（アスコルビン酸）吸光光度法（JIS K 0101.43.1.1）を用いて測定して求めた。

## 第3節 結果

### 1. 照光時間の影響

5 倍希釈の Hutner 培地（全窒素 22.4 mg-N/l、全リン 14.0 mg-P/l）を用いて、平均水温 20 °C のガラス温室内で照光時間を 8、12、16 時間/日に設定し、*W. arrhiza* の栽培における葉状体

の増殖と休眠芽の形成を観察した結果を Fig. 1-1 および Table 1-1 に示した。照光時間を短くするほど葉状体の比増殖速度は低下する傾向を示し、照光時間 8 時間/日では 16 時間/日のおよそ 60% になった。また、25 日後の葉状体の湿重量もおよそ 30% に減少した。一方、いずれの照光時間においても、明確な休眠芽の形成は観察されなかった。

Fujita ら<sup>29)</sup>は、*W. arrhiza* の栽培において、照度を高く、照光時間を長くするほど葉状体の増殖量が多いことを報告しており、ここでの結果も同様の傾向を示したものといえる。一方で、ウキクサ亜科の植物は、日照時間が短くなる冬に休眠芽を形成するとされているが<sup>13)</sup>、ここでは栄養塩類濃度の比較的高い条件での栽培において、照光時間を 8 時間まで短くしても休眠芽は形成されなかった。このことから、日照時間が減少しても、栄養条件が良好であれば、休眠芽は必ずしも形成されないものと推測された。

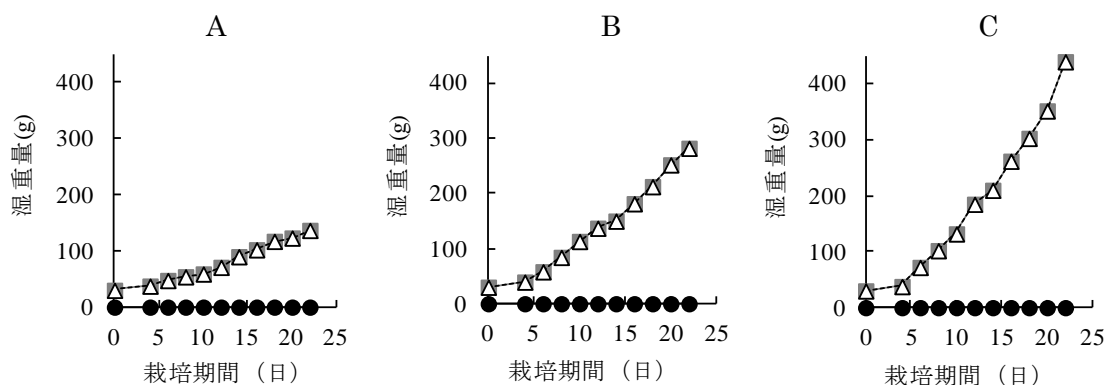


Fig. 1-1 *W. arrhiza* の葉状体の増殖と休眠芽の形成に及ぼす照光時間の影響  
(全窒素 22.4 mg-N/l、全リン 14.0 mg-P/l の溶液を用いて HRT1 日で連続栽培、水温 20 °C)  
■：全植物体合計，△：葉状体の湿重量，●：休眠芽の湿重量  
A：照光時間 8 時間/日、B：照光時間 12 時間/日、C：照光時間 16 時間/日

Table 1-1 *W. arrhiza* の連続栽培試験における比増殖速度と休眠芽の比形成速度

Hutner 培地 希釈率	照光時間 (時間/日)	水温 (°C)	重量 測定日 (日 目)	葉状体 湿重量 (g)	休眠芽 湿重量 (g)	葉状体の 比増殖 速度(d <sup>-1</sup> )	休眠芽の比 形成速度 (d <sup>-1</sup> )
1/5	<b>8</b>	20	25	137	0	$1.1 \times 10^{-1}$	-
	<b>12</b>			282	0	$1.6 \times 10^{-1}$	-
	<b>16</b>			440	0	$1.9 \times 10^{-1}$	-
1/20	16	<b>10</b>	25	23	6.4	$5.8 \times 10^{-2}$	$1.5 \times 10^{-1}$
		<b>20</b>		111	40.7	$1.1 \times 10^{-1}$	$3.9 \times 10^{-1}$
		<b>30</b>		113	41.4	$8.8 \times 10^{-2}$	$3.6 \times 10^{-1}$
<b>1/5</b>	16	20	28	344	0	$1.6 \times 10^{-1}$	-
<b>1/10</b>				190	104	$8.6 \times 10^{-2}$	$3.6 \times 10^{-1}$
<b>1/20</b>				89	111	$7.3 \times 10^{-2}$	$3.8 \times 10^{-1}$



## 2. 水温の影響

20 倍希釈の Hutner 培地（全窒素 5.6 mg-N/l、全リン 3.6 mg-P/l）を用いて、照光時間を 16 時間に設定した温室内で、水温を 10 °C、20 °C、30 °C に設定し、葉状体の増殖と休眠芽の形成を観察した結果を Fig. 1-2 および Table 1-1 に示した。試験期間中、葉状体が一部枯死したことから、重量が減少する場合があった。また、休眠芽の重量が減少することがあったが、これは、休眠芽の一部が発芽し、葉状体へと戻ったためと考えられた。本実験においては、いずれの水温でも休眠芽の形成が観察された。25 日後の葉状体と休眠芽とを合計した湿重量は、水温 20 °C、30 °C でそれぞれ、152 g、154 g でほぼ同等であったのに対して、水温 10 °C では、栽培開始から 10 日目以降、葉状体がほとんど増殖しなかった結果、30 gにとどまり、水温 20 °C の形成量の約 20% であった。休眠芽の形成量も、水温 20 °C、30 °C ではそれぞれ、湿重量で 40.7 g および 41.4 g で同等であったのに対し、水温 10 °C では 6.4 g となり、水温 20 °C での形成量のおよそ 15% にとどまった。また、休眠芽が形成され始めた日は、いずれの水温においても栽培 8 日目であり、顕著な差は認められなかった。

なおここで、*Lemna* sp. では 22 °C～28 °C の範囲では、高温で生長が促進される傾向にあることが報告されており<sup>32)</sup>、本実験では *W. arrhiza* についても水温が高くなるほどバイオマスの生産量が高くなることが確認された。

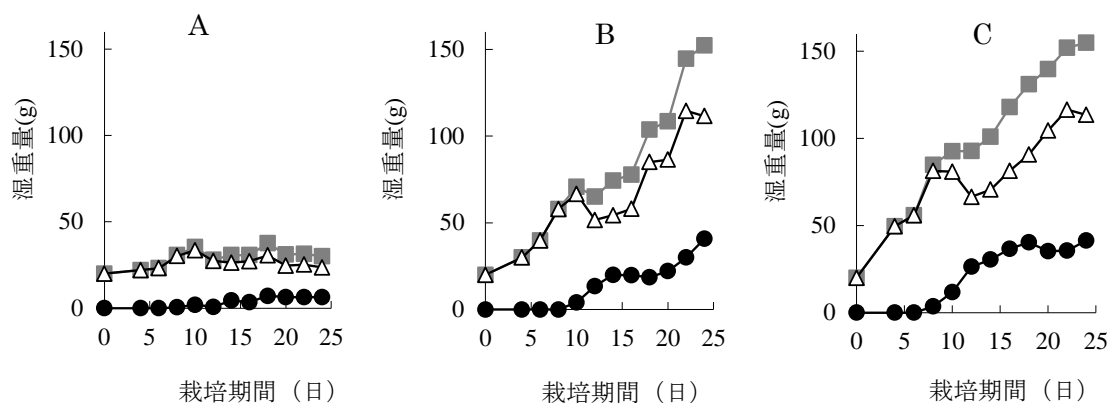


Fig. 1-2 *W. arrhiza* の葉状体の増殖と休眠芽の形成に及ぼす水温の影響

（全窒素 5.6 mg-N/l、全リン 3.6 mg-P/l の溶液を用いて HRT 1 日で連続栽培，照光時間 16 時間/日）

■：全植物体合計，△：葉状体の湿重量，●：休眠芽の湿重量

A：水温 10 °C、B：水温 20 °C、C：水温 30 °C

### 3. 栄養塩濃度の影響 (温室内実験)

照光時間 16 時間/日に設定した温室内で、水温 20 °C の条件で、希釈倍率を 5、10、20 倍に変化させた Hutner 培地を連続的に流入させて、*W. arrhiza* 葉状体の増殖と休眠芽の形成を観察した結果を Fig. 1-3 および Table 1-1 に示した。葉状体の比増殖速度は、希釈倍率 5、10、20 倍それぞれで、 $1.6 \times 10^{-1}$ 、 $8.6 \times 10^{-2}$ 、 $7.3 \times 10^{-2} \text{ d}^{-1}$  であり、培養液の栄養塩濃度が高くなるほど成長が早くなる傾向が確認された。また、希釈倍率 5 倍では休眠芽形成は確認されなかったが、希釈倍率 10、20 倍ではそれぞれ、栽培 16、21 日目から確認され、栄養塩濃度が低くなるに従って休眠芽形成の開始が早まる傾向が認められた。ここで休眠芽の比形成速度は、希釈倍率 10、20 倍それぞれで、 $3.6 \times 10^{-1}$ 、 $3.8 \times 10^{-1} \text{ d}^{-1}$  であり、両者に大きな差はなかった。

本試験期間において栽培液中の全窒素濃度、全リン濃度を測定した結果を Fig. 1-4 に示す。5 日後までに流出水中の全窒素濃度は、希釈倍率 5、10、20 倍でそれぞれ 10、3.7、2.3 mg-N/l にまで低下した後、ほぼ一定値に保たれた。また、流出水中の全リン濃度は、希釈倍率 5、10、20 倍でそれぞれ 3.8、1.7、0.42 mg-P/l にまで低下していた。

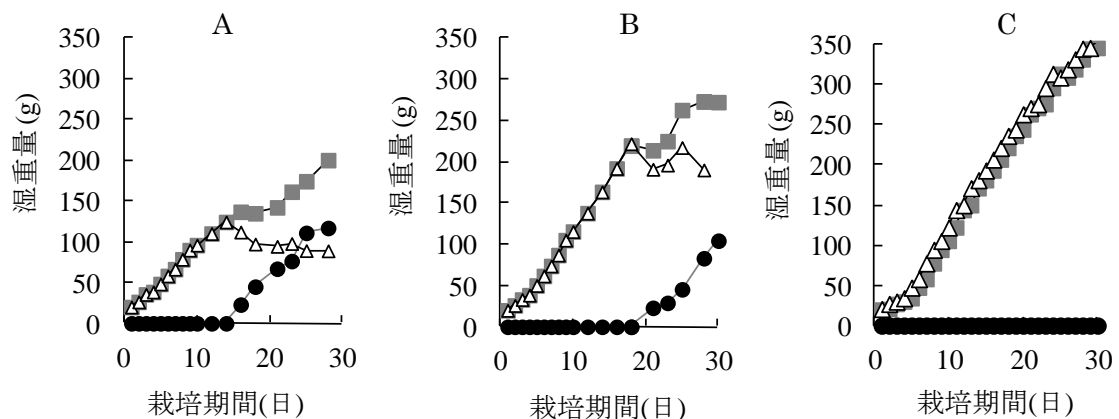


Fig. 1-3 *W. arrhiza* の葉状体の増殖と休眠芽の形成に及ぼす栄養塩濃度の影響

(温室内実験水理学的滞留時間 1 日で連続栽培，照光時間 16 時間/日，水温 20 °C)

■：全植物体合計、△：葉状体の湿重量、●：休眠芽の湿重量

流入させた Hutner 培地の希釈率 A: 20 倍 (全窒素 5.6 mg-N/l, 全リン 3.6 mg-P/l),

B: 10 倍 (全窒素 11.2 mg-N/l, 全リン 7.1 mg-P/l), C: 5 倍 (全窒素 22.4 mg-N/l,

全リン 14.2 mg-P/l)

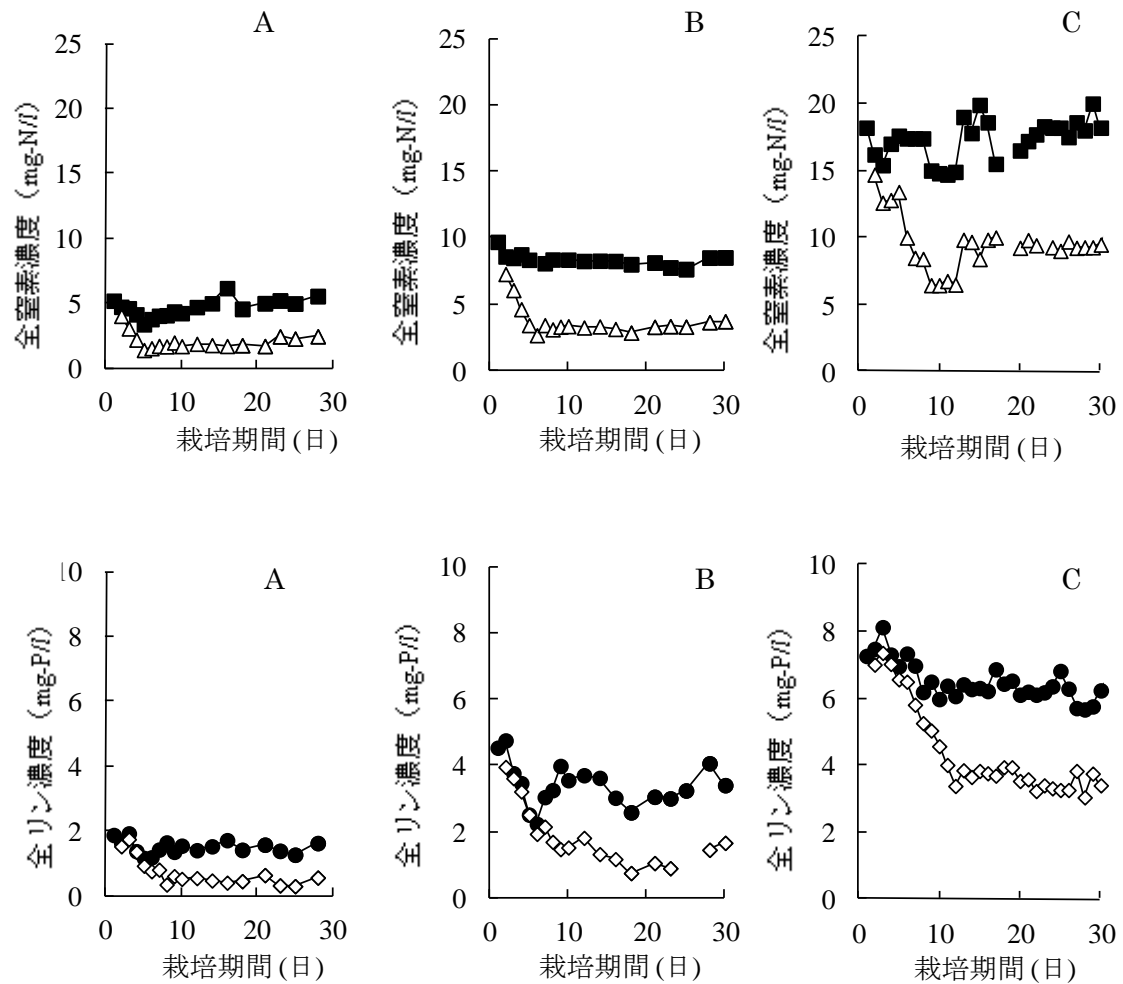


Fig. 1-4 *W. arrhiza* の栽培中における流入水中または流出水中の全窒素濃度および全リン濃度の変化  
(水理学的滞留時間 1 日で連続栽培、照光時間 16 時間/日、水温 20 °C)  
 ■：流入窒素濃度、△：流出窒素濃度、●：流入リン濃度、◇：流出リン濃度  
 流入させた Hutner 培地の希釈率 A:20 倍 (全窒素 5.7 mg-N/l、全リン 2.2 mg-P/l)、  
 B:10 倍 (全窒素 8.2 mg-N/l、全リン 3.7 mg-P/l)、C: 5 倍 (全窒素 17.4 mg-N/l、  
 全リン 6.5 mg-P/l)

#### 4. 培地中の初期窒素濃度の影響 (試験管サイズ実験)

培地中の栄養塩類の濃度が、休眠芽の形成に多大な影響を及ぼすと推測されたことから、初期窒素濃度が休眠芽の形成に及ぼす影響を試験管内での連続回分栽培試験により詳細に検討した (Fig. 1-5)。初期窒素濃度を 5.0 mg/l とした場合、11 日が経過しても休眠芽は形成されなかったが、初期窒素濃度を 1.0、0.5、0.1 mg-N/l と低濃度とした場合には休眠芽が形成された。また、その形成開始は、それぞれ栽培 9、7、5 日目となり、初期窒素濃度が低くなるに従って早まる傾向が認められた。また、11 日後の休眠芽の形成量は、初期窒素濃度 1.0、0.5、0.1 mg-N/l とした場合にそれぞれ 30、38、45 個と増加する傾向が認められたが、一方、葉状体の個数は、窒素濃度の低下に伴って、初期窒素濃度が 5.0 mg-N/l の場合に比べて、それぞれ 37%、46%、58%に減少した。

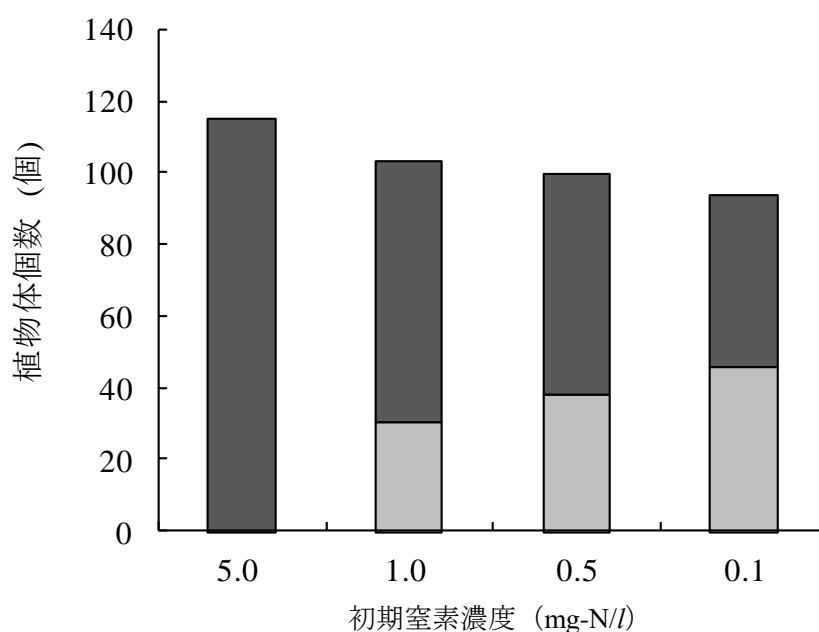


Fig. 1-5 *W. arrhiza* の葉状体の増殖と休眠芽の形成に及ぼす初期窒素濃度の影響  
(試験管サイズ実験、培養液を 2 日毎に交換する連続回分培養、  
照光時間 16 時間/日、水温 20 °C、培養開始から 11 日目の葉状体と休眠芽の個数)  
■ : 葉状体の個体数、□ : 休眠芽の個体数

## 5. 培地中の窒素形態の影響 (試験管サイズ実験)

アンモニア態窒素と硝酸態窒素をそれぞれ単独の窒素源として用い(1 mg-N/l)、*W. arrhiza* を栽培した結果を Fig. 1-6 に示す。葉状体の増殖に顕著な差は認められず、*W. arrhiza* はアンモニア態窒素、硝酸態窒素の両方を利用できることが示された。また、培地中の全窒素の減少量の平均値はアンモニア態窒素のみの栽培、硝酸態窒素のみの栽培でそれぞれ、0.076、0.081 mg-N/l とほとんど差がなかった。一方、休眠芽は、いずれの窒素源でも栽培開始から10日目に形成され始めたが、21日目の個数は、アンモニア態窒素のみで栽培したほうが約30%多くなった。

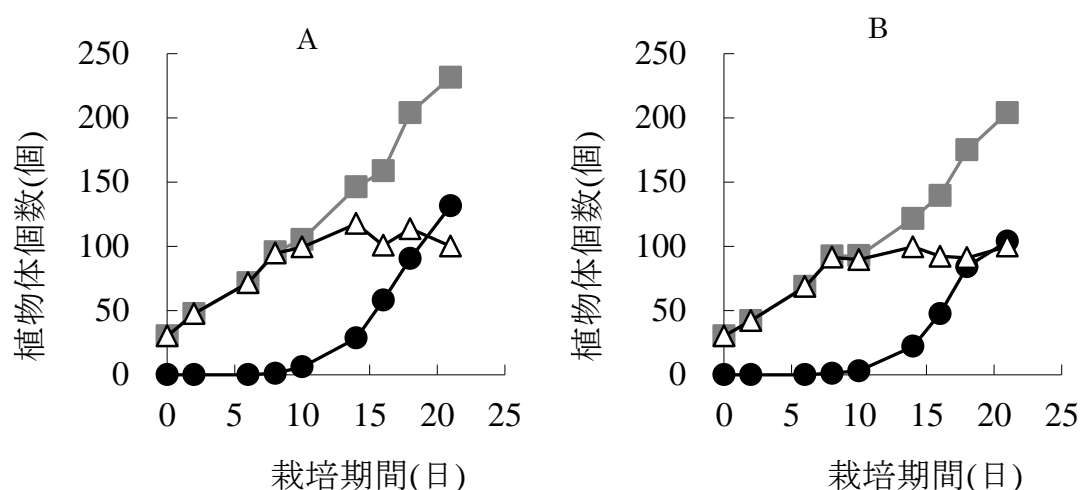


Fig. 1-6 *W. arrhiza* の葉状体の生長と休眠芽の形成に及ぼす窒素形態の影響  
(試験管サイズ実験、培養液を2日毎に交換する連続回分栽培、  
照光時間16時間/日、水温20℃、全リン3.6 mg-P/l)  
■：全植物体合計、△：葉状体の湿重量、●：休眠芽の湿重量  
A：アンモニア態窒素のみ、B：硝酸態窒素のみ (いずれも1.0 mg-N/l)

## 6. 培地中の初期リン濃度の影響 (試験管サイズ実験)

培地中の初期リン濃度が休眠芽の形成に及ぼす影響を検討した結果を Fig. 1-7 に示す。なお、ここで窒素濃度は 5.6 mg-N/l に固定している。初期リン濃度を高く設定した 3.6、0.5 mg-P/l では、休眠芽の形成は認められず、1 週間後の葉状体の個数は、初期リン濃度 3.6 mg-P/l の場合に比べて 0.5 mg-P/l でやや低くなった (11%減少)。一方、初期リン濃度を低く設定した 0.1、0.05、0.01 mg-P/l では、1 週間後にそれぞれ 22、50、45 個の休眠芽が形成された。また、これらの系では、葉状体の個数は初期リン濃度 3.6 mg-P/l に比べて少なくなり 0.1 mg-P/l では 70%程度であったが、それ以下の濃度では 80%程度の著しい減少が認められ、増殖の律速となったことが示唆された。

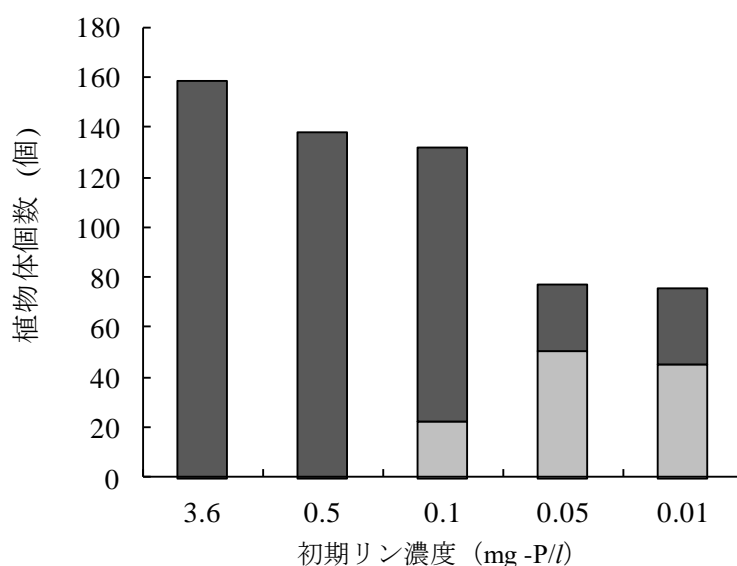


Fig. 1-7 *W. arrhiza* の葉状体の増殖と休眠芽の形成に及ぼす初期リン濃度の影響  
(試験管サイズ実験、培養液を 2 日毎に交換する連続回分培養、  
照光時間 16 時間/日、水温 20 °C、全窒素濃度 5.6 mg-N/l、  
培養開始から 7 日目の葉状体と休眠芽の個数)  
■: 葉状体の個体数, □: 休眠芽の個体数

## 第4節 考察

本章では、*W. arrhiza* の増殖と休眠芽形成に及ぼす種々の環境要因の影響を調査した。培地中の栄養塩濃度が比較的高い条件では、照光時間を 16 時間/日から 8 時間/日に短くしても休眠芽が形成されなかったこと、また、培地中の栄養塩濃度が比較的低い条件では、30 °C という増殖に最適な水温下においても休眠芽の形成が認められたことから、休眠芽の形成に対しては、一般的な誘導条件といわれる低温や短日条件は必ずしも必要ではなく、水相の栄養塩濃度あるいは栄養塩の負荷が重要な影響因子であることが明らかとなった。すなわち、多くの条件下において、栄養塩濃度が低下すると休眠芽形成が誘導されることが認められた。

栄養塩のうち窒素については、本検討の範囲では初期濃度を 1.0 mg-N/l 以下とすることが誘導条件のひとつであると考えられた。また、窒素源としてアンモニア態窒素と硝酸態窒素を用い *W. arrhiza* の成長を比較した場合には、葉状体の増殖に顕著な差は認められなかった。同じウキクサ亜科植物でも *L. minor*<sup>33)</sup>や *Lanodoltia punctata*<sup>34)</sup>の増殖においては、アンモニア態窒素が優先して吸収されることが報告されているが、本研究では、培地中の全窒素の減少量はアンモニア態窒素のみの栽培、硝酸態窒素のみの栽培でそれぞれ、0.076、0.081 mg-N/l と有意な差がなかったことから、*W. arrhiza* による両態窒素の利用性については大きな違いはないものと思われる。一方、休眠芽の形成は、硝酸態窒素のみで栽培した試験でアンモニア態窒素のみの試験に比べて 30%少なくなった。植物の細胞内では硝酸態窒素は、光合成で得られたエネルギーによりアンモニア態窒素へ還元されることが知られている<sup>35)</sup>。*W. arrhiza* については、アンモニア態窒素を用いた場合に比べて、硝酸性窒素を用いた場合には休眠芽の形成が少なかったことから、硝酸態窒素の還元に必要なエネルギーと、休眠芽形成におけるデンプン合成に必要なエネルギーが競合した可能性が考えられた。

一方、休眠芽形成を誘導する初期リン濃度は 0.1 mg-P/l 以下であり、休眠芽を誘導する初期リン濃度の閾値は、かなり低いレベルであることが明らかとなった。排水処理系や汚染水の水質浄化を行う系では、リン濃度をこのような低濃度に保つことは必ずしも容易ではないため、休眠芽形成を誘導するうえでは、窒素制限の状態にする方が現実的であると考えられた。

Table 1-1 に、温室内での一連の連続栽培試験（照光時間、水温、Hutner 培地の希釈倍率の影響の検討）で求めた *W. arrhiza* の比増殖速度と休眠芽の比形成速度を一括して示している。照光時間の影響を検討した試験では、栄養塩類の濃度が高かったためか、葉状体の増殖が旺盛で、比増殖速度は  $1.5 \times 10^{-1} \sim 1.9 \times 10^{-1} \text{ d}^{-1}$  と算出されたが、休眠芽の形成は認められなかった。水温の影響を検討した試験では、栄養塩類の濃度が低かったためか、比増殖速度は  $5.8 \times 10^{-2} \sim 1.1 \times 10^{-1} \text{ d}^{-1}$  と低く算出されたが、休眠芽の形成が観察され、比形成速度は  $1.4 \times 10^{-1} \sim 3.9 \times 10^{-1} \text{ d}^{-1}$  となった。別途、行った試験管を用いた連続回分栽培試験（窒素濃度、窒素源、リン濃度の影響）における *W. arrhiza* の比増殖速度と休眠芽の比形成速度を

Table 1-2 にまとめている。Table 1-1 に示した結果と同様に、比増殖速度が低い条件において、休眠芽が形成される傾向が確認された。

以上より得られた *W. arrhiza* 葉状体の比増殖速度と休眠芽の比形成速度との関係を Fig. 1-8 に示した。ここで、比増殖速度は、照度、照光時間、水温、窒素濃度、リン酸濃度などの様々な環境要因の影響を複合的には反映しているものといえる。図示した通り、葉状体の比増殖速度が  $1.2 \times 10^{-1} \text{ d}^{-1}$  未満の条件では、葉状体の比増殖速度が高いほど、休眠芽の比形成速度も増加する傾向にあった。一方、葉状体の比増殖速度が  $1.2 \times 10^{-1} \text{ d}^{-1}$  以上の条件では、休眠芽は形成されなかったことが明確に示されている。休眠芽は、増殖に適していない条件で形成されると考えられているが、ここでは、休眠芽形成が、比増殖速度がある閾値より低くなる好適とは言えない条件下でのみで行われることを明らかにすることができた。この閾値を目安に *W. arrhiza* の比増殖速度を制御することができれば、ある程度の窒素・リンの吸収速度とバイオマス増殖速度を維持しつつ、デンプンの生産速度を最大化できる可能性がある。光や水温によって比増殖速度を制御することも考えられるが、これらの要因を排水・污水处理系で人為的に操作することは困難であるため、流入水の希釈や流入負荷の制御、あるいは処理水循環などによって、処理槽＝栽培槽内の全窒素濃度または全リン濃度を閾値以下に制限することが現実的な操作因子となり得るものと考えられた。

Table 1-2 *W. arrhiza* の連続回分栽培における比増殖速度と休眠芽の比形成速度

初期窒素濃度 (mg-N/l)	初期リン濃度 (mg-P/l)	$\text{NO}_3^-$ / $\text{NH}_4^+$	個数 測定日 (日 目)	葉状体 個数 (個)	休眠芽 個数 (個)	葉状体の 比増殖 速度( $\text{d}^{-1}$ )	休眠芽の 比形成 速度( $\text{d}^{-1}$ )
<b>0.1</b>				48	45	$9.2 \times 10^{-2}$	$2.4 \times 10^{-1}$
<b>0.5</b>				62	38	$1.1 \times 10^{-1}$	$3.6 \times 10^{-1}$
<b>1</b>	3.6	1.27	21	73	30	$1.2 \times 10^{-1}$	$3.9 \times 10^{-1}$
<b>5</b>				115	0	$1.4 \times 10^{-1}$	-
1	3.6	$\text{NO}_3^-$ のみ	21	100	104	$8.0 \times 10^{-2}$	$2.1 \times 10^{-1}$
		$\text{NH}_4^+$ のみ		100	132	$9.0 \times 10^{-2}$	$2.2 \times 10^{-1}$
5.6	<b>0.01</b>			30	45	$2.5 \times 10^{-2}$	$3.3 \times 10^{-1}$
	<b>0.05</b>			27	50	$2.8 \times 10^{-2}$	$3.4 \times 10^{-1}$
	<b>0.1</b>	1.27	7	110	22	$1.1 \times 10^{-1}$	$2.7 \times 10^{-1}$
	<b>0.5</b>			138	0	$1.2 \times 10^{-1}$	-
	<b>3.6</b>			158	0	$1.3 \times 10^{-1}$	-



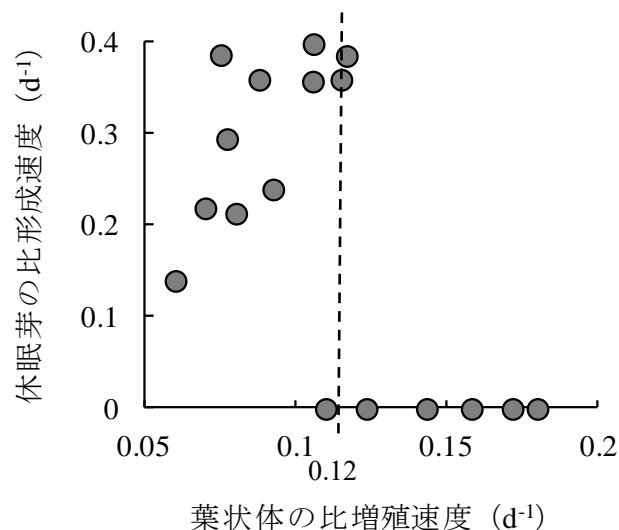


Fig. 1-8 *W. arrhiza* の葉状体の比増殖速度と休眠芽の比形成速度との関係

## 第5節 要約

本章では、*W. arrhiza* を用いた効率的な水質浄化とデンプン生産のシステムを構築するための基礎的な情報を得るために、葉状体の増殖と休眠芽の形成に及ぼす種々の環境要因の影響を調査した。葉状体の増殖速度は、照光時間を長く、水温を 20 °C と 30 °C の間に制御することで高くなることが示された。また、高栄養濃度下では照光時間の短縮は休眠芽の形成は誘導しなかったが、比較的栄養濃度が低い条件では 10~30 °C の広範な温度条件で休眠芽が形成された。また、初期窒素濃度を 1.0 mg/l 以下、または、初期リン濃度を 0.1 mg/l 以下の低濃度とすることで休眠芽が形成されることが示され、休眠芽形成を誘導する最も効果的な操作因子が栄養塩類濃度であることが明らかとなった。また、葉状体の比増殖速度が  $1.2 \times 10^{-1} \text{ d}^{-1}$  未満の条件では、葉状体の比増殖速度が高いほど、休眠芽の比形成速度も増加する傾向があり、一方、葉状体の比増殖速度が  $1.2 \times 10^{-1} \text{ d}^{-1}$  以上の条件では、休眠芽は形成されないことが明らかとなった。従って、この閾値を目安に、栄養塩類濃度を低く保つなどして、*W. arrhiza* の比増殖速度を制御することができれば、植生浄化系において良好なデンプン生産が行えるものと考えられた。

## 第2章 モデルシミュレーションによる *Wolffia arrhiza* を用いた 資源生産型水質浄化システムの評価

### 第1節 緒言

第1章では、*W. arrhiza* の休眠芽形成に及ぼす各種環境要因の影響を検討し、人為的に休眠芽を誘導し、回収するバイオマスのデンプン含量を高めるうえでは、葉状体の比増殖速度が制御因子となり得ることを示した。本章では、この制御因子を用いて *W. arrhiza* を用いた水質浄化と資源生産システムを最適化するための基礎として、植生浄化プロセスにおける水質浄化や *W. arrhiza* のバイオマスの増殖を表現する数学モデルの構築を試みた。

ウキクサ亜科植物の増殖や栄養塩吸収のモデル化に関してはこれまでに、*L. gibba* のアンモニア、リン酸および有機物の除去速度に関する数学モデルを構築した報告<sup>36, 37)</sup>、温度、照光時間および栄養塩濃度が比増殖速度に及ぼす影響をモデル化した報告<sup>38)</sup>、水中および植物中の窒素の動態をモデル化した報告<sup>39)</sup>がある。また、*S. punctata* の比増殖速度を Monod 式で表現し、植物体中の窒素含量との相関関係を数学モデル化した例がある<sup>40)</sup>。しかし、これらの報告では、休眠芽の形成を数学モデル化しておらず、本研究の目的を満たすものではない。ここでは、*W. arrhiza* の生長を葉状体の増殖および休眠芽の形成に分けて表現するとともに、それに伴う栄養塩類の除去性能を表現する数学モデルを構築し、温室内で2次処理水を模した培養液を用いて行った長期栽培の実験結果を再現した。また、このモデルを用い、葉状体の比増殖速度を制御因子として変化させるシミュレーションを行い、バイオマスとして主に葉状体、あるいは休眠芽を回収する場合の資源生産能力を試算した。

### 第2節 材料および方法

#### 1. *W. arrhiza* の栽培試験

本章における *W. arrhiza* の栽培試験は、第1章 第2節と同様に実施した。ガラス温室内にポリプロピレン製の栽培槽（実容量：2.97 l、栽培面積：30 cm × 30 cm）を設置し、水温を 26～34 °C の範囲に、また、照度を太陽光と水銀ランプの合計で 7500 lx（照光時間：16 時間/日）になるように調節し、栽培試験を実施した（Fig. 2-1）。流入水中の窒素濃度およびリン濃度が水処理性能に及ぼす影響を検討するため、培養液として段階的に希釈した Hutner 培地（組成は第1章 第2節 第1項に記載。）を用いた。最も栄養塩濃度の高い培養液を基準とし（Run 1）、その2分の1の濃度（Run 2）、その4分の1の濃度（Run 3）となるように水道水にて段階的に希釈した培養液を連続的に栽培槽に流入させ、経時的に栄養塩類濃度を測定して水質浄化性能を調べた。流入量は 1.0～1.4 l/d となるように調節した。各 Run

試験開始時に 220 g-wet/m<sup>2</sup> となるように葉状体を植種とし、経時的に葉状体と休眠芽の湿重量を測定して、バイオマス生産性を調べた。また、試験期間終了後には、すべての葉状体と休眠芽を収穫し、100~105 °C で一定重量となるまで乾燥させ、乾燥重量を測定した。

## 2. 水質およびバイオマス成分の分析

栽培槽への流入水および流出水（処理水）試料は孔径 1.0 μm のフィルターでろ過後に JIS K 0102 に従って、アンモニア態窒素をインドフェノール青吸光光度法（JIS K 0102 42.2）、硝酸態窒素を還元蒸留- インドフェノール青吸光光度法（JIS K 0102 43.2）、溶存性全窒素をアルカリ性ペルオキシ 2 硫酸カリウム分解法（JIS K 0102 45.2）、リン酸をモリブデン青吸光光度法（JIS K 0102 46.1）にてそれぞれ分析した。また、有機態窒素濃度は、溶存性全窒素濃度からアンモニア態窒素濃度と硝酸態窒素濃度とを差し引いて計算した。植物体中の窒素およびリン含有量は、ケルダール法により分解して測定した。すなわち、試料 100 mg をケルダールフラスコに取り、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を 2.7 g、CuSO<sub>4</sub> を 0.3 g、98% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 8 ml、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2.5 ml を加えて室温で 10 分静置し、さらに H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2.5 ml を加えたのち、420 °C で約 2 時間分解した。分解した試料を希釈・蒸留後、0.01 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を用いた滴定により窒素含量を測定し、また、モリブデン青吸光光度法（JIS K 0102 46.1）を用いてリン含量を分析した。デンプン含量は、乾燥試料 100 mg に dimethyl sulfoxide 20 ml と 8 M HCl 5 ml を加えて 60 °C で 30 分緩やかに振とうさせ、生成したグルコースを F-kit starch（R-Biopharm AG、ドイツ）を用いて定量して求めた。

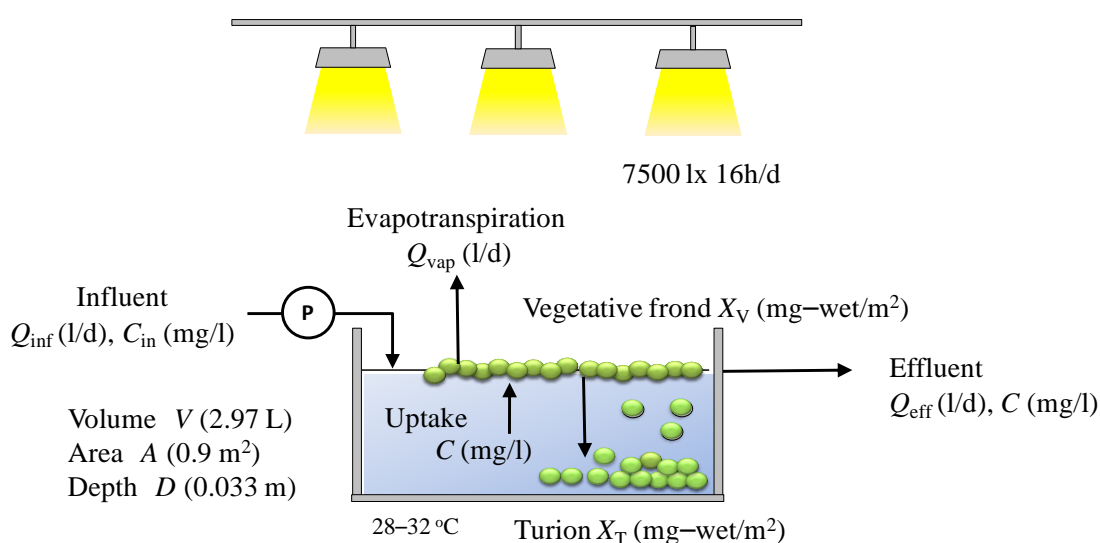


Fig. 2-1 *W. arrhiza* を用いた水質浄化と資源生産システムの流入・流出水、バイオマスの収支と各種環境条件

### 3. 数学モデルの構築とシミュレーション

モデル化した *W. arrhiza* の栽培システムについては、栽培槽内の濃度変化を単純化するために槽内は完全混合と仮定しているが、バイオマス増殖、窒素およびリンの流入、流出の全体像は Fig. 2-1 に示すようになる。ここで、栽培槽中の水量の変化は次の式 1 で表される。

$$\frac{dV}{dt} = Q_{\text{inf}} - Q_{\text{vap}} - Q_{\text{eff}} \quad (\text{式 1})$$

ここに、 $V$ ：栽培槽中の総水量（2.97 l で固定）、 $t$ ：時間（d）、 $Q_{\text{inf}}$ ：流入速度（l/d）、 $Q_{\text{eff}}$ ：流出速度（l/d）、 $Q_{\text{vap}}$ ：蒸散速度（l/d）である。ここで、栽培槽中の総水量（ $V$ ）を一定と見なすと、式 1 から、蒸散速度は流入速度から流出速度を減じた値となる。

Fig. 2-1 のバイオマス量、各種窒素濃度およびリン酸濃度の時間変化は以下のとおりの収支式で表される。

$$\frac{dX_V}{dt} = R_1 - R_2 - R_3 \quad (\text{式 2})$$

$$\frac{dX_T}{dt} = R_3 \quad (\text{式 3})$$

$$\frac{dS_{\text{orgN}}}{dt} = -R_4 + \frac{Q_{\text{inf}}S_{\text{Org-Nin}} - Q_{\text{eff}}S_{\text{Org-N}}}{V} \quad (\text{式 4})$$

$$\frac{dS_{\text{NH4}}}{dt} = -\frac{R_1 - R_2}{DY_N} + \frac{Q_{\text{inf}}S_{\text{NH4in}} - Q_{\text{eff}}S_{\text{NH4}}}{V} \quad (\text{式 5})$$

$$\frac{dS_{\text{NO3}}}{dt} = -\frac{R_1}{DY_N} + \frac{Q_{\text{inf}}S_{\text{NO3in}} - Q_{\text{eff}}S_{\text{NO3}}}{V} \quad (\text{式 6})$$

$$\frac{dS_{\text{PO4}}}{dt} = -\frac{R_1 - R_2}{DY_P} + \frac{Q_{\text{inf}}S_{\text{PO4in}} - Q_{\text{eff}}S_{\text{PO4}}}{V} \quad (\text{式 7})$$

ここに、 $X_V$ ：葉状体バイオマス（g-wet/m<sup>2</sup>）、 $X_T$ ：休眠芽バイオマス（g-wet /m<sup>2</sup>）、 $S_{\text{Org-N}}$ ：有機態窒素濃度（mg-N/l）、 $S_{\text{NO3}}$ ：硝酸態窒素濃度（mg-N/l）、 $S_{\text{NH4}}$ ：アンモニア態窒素濃度（mg-N/l）、 $S_{\text{PO4}}$ ：リン酸濃度（mg-P/l）。 $D$ ：水深（0.033 m）、 $Y_N$ ：単位窒素あたりの葉状体の収量（mg-wet/mg-N）、 $Y_P$ ：単位リンあたりの葉状体の収量（mg-wet/mg-P）、 $R_1$ ：葉状体の増殖速度、 $R_2$ ：枯死速度、 $R_3$ ：休眠芽の形成速度、 $R_4$ ：有機態窒素の沈降速度である。なお、槽内への固形性リンの堆積は計算に入れなかった。また、葉状体の枯死によりアンモニア態窒素とリン酸が放出されると仮定し、休眠芽による窒素とリンの吸収、休眠芽の枯死および藻類の影響は無視できるものと仮定した。窒素収支において、栽培槽中の pH は Run 1 から Run 3 のいずれも 6.9～7.9 であったため、水中のアンモニア態窒素は、アンモニアストリッピングにより大気中に失われることはほとんどないと考えられ、また、滞留時間を 2～3 日と短く設定したため、脱窒による硝酸態窒素の減少もほとんどないと考えられたことから、これらの影響は無視できるものとした。

*W. arrhiza* バイオマスの増減にかかる  $R_1 \sim R_4$  は下式 8～10 で表した。植物の成長は一般的

に光や温度、窒素濃度、リン濃度等の環境要因に影響される。本章の栽培は、ウキクサ亜科の植物に適した一定の範囲の光と温度に保った条件下で行われ、流入水中のリン酸濃度も *W. arrhiza* が十分増殖できる範囲に設定されていた。そのため、比増殖速度を栽培槽中の窒素濃度の Monod 式で表現し、休眠芽の形成は比増殖速度が閾値  $\mu_t$  以下となると誘導されると仮定した。

$$R_1 = \mu X_V = \bar{\mu}_{\max} \frac{(S_{\text{NO}_3} + S_{\text{NH}_4})}{K_N + (S_{\text{NO}_3} + S_{\text{NH}_4})} X_V \quad (\text{式 } 8)$$

$$R_2 = b X_V \quad (\text{式 } 9)$$

$$R_3 = \begin{cases} 0 & (\mu > \mu_t) \\ k_t X_V & (\mu < \mu_t) \end{cases} \quad (\text{式 } 10)$$

$$R_4 = k_{\text{sed}} \quad (\text{式 } 11)$$

ここに、 $\mu$ ：葉状体の比増殖速度 ( $\text{d}^{-1}$ )、 $\bar{\mu}_{\max}$ ：本章における光、温度、リン濃度の一定範囲における最大比増殖速度 ( $\text{d}^{-1}$ )、 $b$ ：比枯死速度 ( $\text{d}^{-1}$ )、 $K_N$ ：飽和定数 ( $\text{mg-N/l}$ )、 $k_t$ ：休眠芽の比形成速度 ( $\text{d}^{-1}$ )、 $k_{\text{sed}}$ ：有機態窒素の比沈降速度 ( $\text{d}^{-1}$ ) である。

上記の式により構成された微分方程式について、4 次の Runge-Kutta 法により近似解を求め、栽培試験で得られた測定結果を再現するように、最小二乗法により関数の各パラメータを決定した。計算には、シミュレーションソフトウェア Berkeley Madonna™ (Robert I. Macey and George F. Oster, <https://www.berkeleymadonna.com/>) を用いた。

構築した数学モデルを用いて、バイオマスとして主に葉状体、あるいは休眠芽を回収する場合の資源生産能力を比較するシミュレーションを行った。一日当たりの流入量  $Q_{\text{inf}} = 1.2 \text{ l/d}$ 、一日当たりの流出量  $Q_{\text{out}} = 0.78 \text{ l/d}$  とし、人工排水の濃度を Run 2 と同じ濃度とした条件のもとで、栽培槽中の硝酸態窒素濃度とアンモニア態窒素濃度の合計が  $0.5 \text{ mg-N/l}$  以下に減少した日に葉状体の半分を収穫するパターン (A)、 $0.18 \text{ mg-N/l}$  以下に減少した日に葉状体の半分を収穫するパターン (C)、および葉状体を収穫しないパターン (B) をシミュレーションし、水質浄化とバイオマス生産の能力を試算した。

### 第3節 結果

#### 1. *W. arrhiza* の栽培試験における栄養塩類の除去とバイオマスの生産

*L. minor* は、 $5 \sim 35 \text{ }^{\circ}\text{C}$  で増殖可能で  $20 \sim 31 \text{ }^{\circ}\text{C}$  が最も適しているとの報告<sup>38)</sup>があるため、本研究でも、試験栽培中の水温を  $28 \sim 32 \text{ }^{\circ}\text{C}$  となるように設定し、測定値は  $26 \sim 34 \text{ }^{\circ}\text{C}$  の範囲を維持していた。栽培槽への流入量および流出量の実績を Fig. 2-2 に示した。

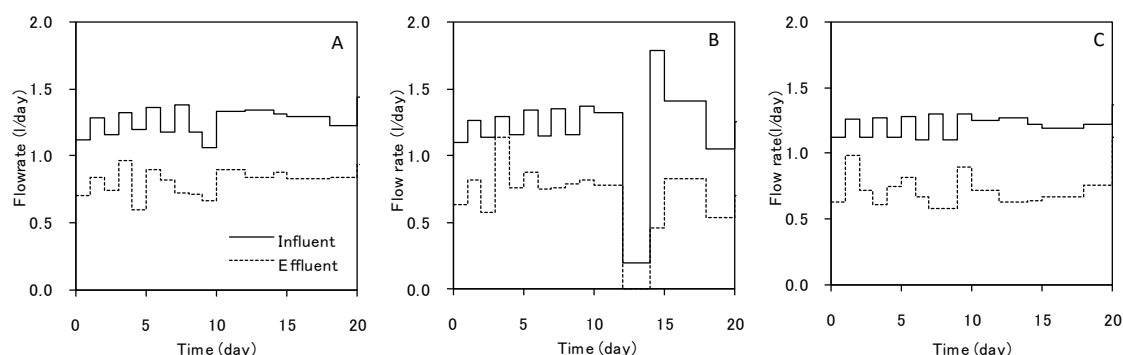


Fig. 2-2 各栽培槽への流入水量と流出水量の変動 (Run 1 (A)、Run 2 (B)、Run 3 (C))

流入量は1.0～1.4 l/d となるように調節したが、ポンプの故障のため Run 2 の12日目から14日目は0.2 l/d しか流入していなかった。試験期間中の蒸散速度の平均値は1.0 l/d であった。

Fig. 2-3 に、栽培試験の Run 1～3 における *W. arrhiza* のバイオマス増殖および栽培槽での窒素濃度およびリン濃度の経時変化を示した。槽内での有機態窒素濃度は、試験開始から数日は流入濃度に比べて高かったが、その後、Run 1 においては少しずつ低下した。ここで、栽培槽中の有機窒素濃度が初期にわずかに増加した要因としては、*W. arrhiza* が有機態窒素を直接資化できないこと、および、Fig. 2-2 より求めた蒸散速度の平均値が1.0 l/d であったことから培養液の蒸散により栽培槽で濃縮された可能性が考えられた。また、その後の Run 1 における有機態窒素の減少は、主に沈殿と有機物の分解によるものと推測される。また、Run 1～3 のいずれにおいても、葉状体の増殖に従って、アンモニア態窒素濃度はすみやかに減少し、硝酸態窒素もやや遅れて低下して5日以内に0.5 mg-N/l 以下となった。硝酸態窒素に比べてアンモニア態窒素濃度が先に減少したことは、第1章の結果や、浮遊性の水生植物は窒素源として硝酸態窒素よりもアンモニア態窒素を優先的に吸収することを示した既報<sup>41)</sup>とよく一致する。

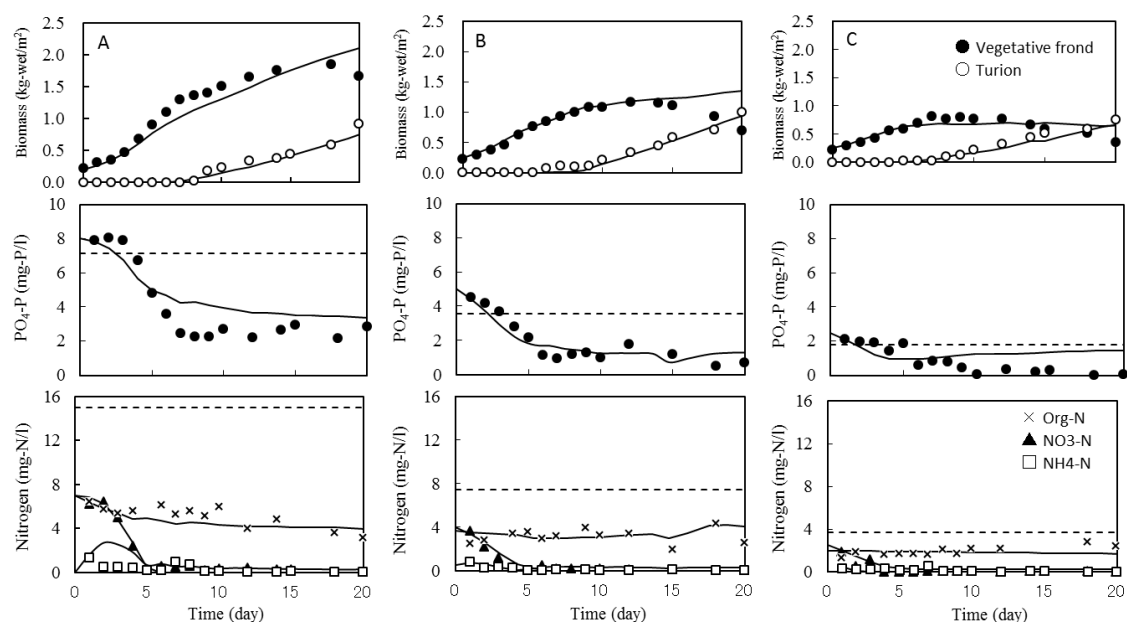


Fig. 2-3 *W. arrhiza* による栄養塩除去およびバイオマスの増殖

各実測試験における実験データを各プロットに示し、数学モデルによる試算結果を線で示した。Run 1 は A、Run 2 は B、Run 3 は C に示した。バイオマスの増殖を上段に、栽培槽内のリン濃度の変化を中段に、栽培槽内の窒素濃度の変化を下段に示す。Run 1、Run 2、Run 3 における流入水中のリン濃度および全窒素濃度（Table 2-1）をそれぞれの図に破線で示した。

Table 2-1 Run 1～3 における流入水中の栄養塩の濃度

	Run 1	Run 2	Run 3
T-N (mg-N/l)	15.0	7.5	3.7
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg-N/l)	3.5	1.8	0.9
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg-N/l)	7.7	3.9	1.9
Org-N (mg-N/l)	3.8	1.9	0.9
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -P (mg-P/l)	7.1	3.6	1.8

一方、流出水中のリン濃度は Run 1、Run 2 および Run 3 それぞれで、2~3、1~2 および 0.5~1 mg-P/l 程度と完全に除去されることはなく、流入濃度が高いほど流出濃度が高い傾向にあった。ここで、Run 1、Run 2 および Run 3 それぞれで、10 日目から 20 日目までの平均窒素除去速度は 0.18、0.08 および 0.03 mg-N/m<sup>2</sup>/d、平均リン除去速度は 0.079、0.042 および 0.023 mg-P/m<sup>2</sup>/d と算出され、流入濃度が高いほど除去速度も高い傾向にあった。

葉状体の増殖量は、20 日間の試験期間の前半において、後半に比べて高い傾向にあり、Run 1 では 3~9 日目で 160 g-wet/m<sup>2</sup>/d、Run 2 では 1~8 日目で 110 g-wet/m<sup>2</sup>/d、Run 3 では、2~7 日目で 86 g-wet/m<sup>2</sup>/d となった。すなわち、栄養塩濃度が高いほど増殖量も多い傾向にあった。一方、休眠芽の形成は Run 1、Run 2 および Run 3 それぞれで、9 日目、7 日目、5 日目から始まり、流入栄養塩濃度が低いほど早く形成される傾向が確認された。休眠芽の一日当たりの形成量の平均値は Run 1、Run 2 および Run 3 それぞれで 64 g-wet/m<sup>2</sup>/d、63 g-wet/m<sup>2</sup>/d、55 g-wet/m<sup>2</sup>/d であり、Run 1、Run 2 と比較して栄養塩流入量の少ない Run 3 では低かった。また、休眠芽の水分含有率はいずれの Run でも 96~97%であったことから、後述の資源生産能の評価には、中間の水分含有率 96.5%を用い、デンプン含量は分析値をもとに葉状体と休眠芽でそれぞれ 130 mg/g-dry biomass と 430 mg/g-dry biomass を用いた。

藻類由来の chlorophyll *a* 濃度は、Run 1、Run 2、Run 3 それぞれで 0.59、0.96、0.99 mg/l であり、Run 2、Run 3 と比較して Run 1 では低く、槽内に葉状体が多い場合は藻類があまり繁殖しなかった。

## 2. *W. arrhiza* を用いた資源生産を兼ねた水質浄化システムのモデル設計

Run 1~3 で得られたデータを前節の 3 (数学モデルの構築とシミュレーション) で構築したモデルに適用し、その挙動を再現できるパラメータを求めたところ、Table 2-2 に示す一連の値が得られた。ただし、ここで枯死速度定数は、*L. minor* で報告されている値 (0.05~0.09 d<sup>-1</sup><sup>38)</sup>) に近い 0.05 d<sup>-1</sup> とし、最小二乗法により他のパラメータ ( $\bar{\mu}_{\max}$ 、 $\mu_t$ 、 $k_t$ 、 $Y_N$ 、 $Y_P$  等) を決定した。葉状体の比増殖速度 (0.35~0.38 d<sup>-1</sup>)、休眠芽の形成の閾値となる比増殖速度 ( $\mu_t$ ) は、0.085~0.12 d<sup>-1</sup> と計算された。得られたパラメータを用いてモデル計算により再現した *W. arrhiza* の栽培試験のシミュレーション結果は Fig. 2-3 に重ねて示している。図示した通り、試験後半における葉状体の挙動については、特に Run 2 と 3 では再現されていない部分があるものの、全体として栽培槽における栄養塩濃度とバイオマス生産の傾向は良好に再現されているものといえる。



Table 2-2 数学モデルにおける各パラメータ

		Run 1	Run 2	Run 3	Average
$\bar{\mu}_{\max}$	d <sup>-1</sup>	0.38	0.35	0.35	0.36
$K_N$	mg/l	0.5	0.5	0.5	0.5
$B$	d <sup>-1</sup>	0.05	0.05	0.05	0.05
$\mu_t$	d <sup>-1</sup>	0.12	0.11	0.085	0.105
$k_T$	d <sup>-1</sup>	0.065	0.065	0.085	0.071
$Y_N$	mg-wet/mg-N	1000	2200	3300	2170
$Y_P$	mg-wet/mg-P	2000	2500	3500	2670
$k_{sed}$	mg/l/d	0.50	0.75	0.015	0.42

### 3. モデルシミュレーションによるバイオマス収穫パターンの評価

第1章の結果から、*W. arrhiza* を用いた植生浄化システムにおいてバイオマスを収穫するうえでは、葉状体の比増殖速度を制御することで、タンパク質含量の多い葉状体を中心に収穫するか、デンプン含有量の多い休眠芽を中心に収穫するかを選択することが可能であると考えられた。そこで、本項では、得られた数学モデルを用いて、葉状体の収穫パターンを変化させたシミュレーションを行い、葉状体および休眠芽のバイオマス生産能力と水質浄化能力を推算した (Fig. 2-4)。

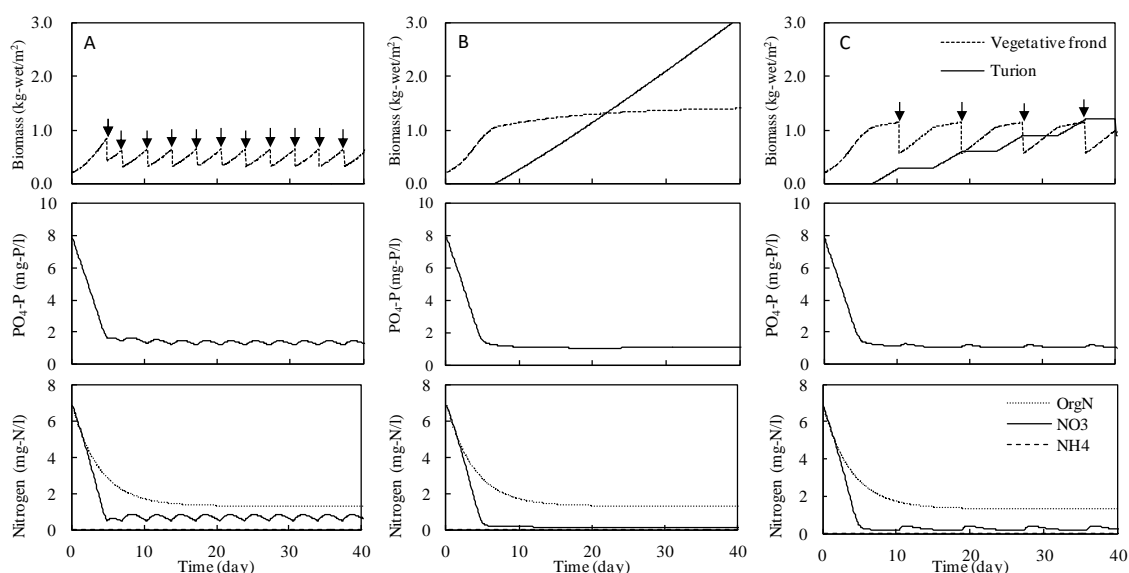


Fig. 2-4 構築した数学モデルを用いたシミュレーション結果

矢印は葉状体を収穫した曜日。葉状体は破線、休眠芽は実線で示した。

A : 葉状体を主な収穫物としたパターン

B : 休眠芽を主な収穫物としたパターン

C : A と C の中間としたパターン

バイオマスの増殖は上段、リン濃度の変化は中段、窒素濃度の変化は下段に示す。

Fig. 2-4A では、栽培槽中の無機窒素濃度が  $0.5 \text{ mg/l}$  まで低くなったときに培養槽中の葉状体の 50%を収穫することで、葉状体の比増殖速度を $\mu_t$ 以上に保ち、葉状体を中心に収穫する条件を再現した。この条件でのシミュレーション結果では、Run 2 と同じ流入培養液の栄養塩濃度とした場合、休眠芽の形成は生じず、40 日間の栽培期間にバイオマスとして葉状体を 11 回収穫し、 $3.7 \text{ kg-wet/m}^2$ が収穫できると試算された。一方、栽培期間中に葉状体を全く収穫しない場合には (Fig. 2-4B)、無機窒素濃度の低下にともなって葉状体の比増殖度が $\mu_t$ 以下となることで、休眠芽の形成が誘導され、40 日間で  $3.1 \text{ kg-wet/m}^2$ の休眠芽が収穫できると試算された。また、栽培槽中の無機窒素濃度が  $0.18 \text{ mg/l}$  まで低くなったときに培養槽中の葉状体の 50%を収穫する条件では、40 日間の栽培期間中に葉状体が  $1.2 \text{ kg-wet/m}^2$  (4 回の合計)、休眠芽が  $2.3 \text{ kg-wet/m}^2$  収穫できると試算された (Fig. 2-4C)。ただし、休眠芽は栽培期間中には収穫せず、栽培終了時に槽底に堆積したものを収穫することとしている。

## 第4節 考察

本章では、温室内で2次処理水を模した培養液の希釈率を変えて *W. arrhiza* を栽培した結果、流入水の栄養塩濃度が高いほど、葉状体の比増殖速度が高く、窒素除去速度およびリン除去速度も高くなる傾向が確認された。ここで、流出水のリン濃度は *W. arrhiza* の増殖に十分以上の濃度で維持されていたこと、水温や光量等の環境条件は *W. arrhiza* の良好な増殖を担保する領域で調節したこと、本章の条件では、*W. arrhiza* の増殖は無機窒素濃度に依存するものとして構築した数学モデルの仮定は満たされていたものといえる。なお、構築したモデルから推算された葉状体の比増殖速度 ( $0.35\sim0.38\text{ d}^{-1}$ ) は、既報で報告されている *L. minor* の比増殖速度 ( $0.40\sim0.47\text{ d}^{-1}$ )<sup>36,37)</sup>より少し小さかった。また、流入水の栄養塩濃度を段階的に希釈した Run 1~3 のいずれにおいても、無機窒素濃度が一定の濃度以下に低下し、葉状体の比増殖速度が低下すると、休眠芽の形成が誘導された。このことは、休眠芽の比形成速度も無機窒素濃度に依存し、葉状体の比増殖速度を閾値とするという仮定を支持している。なお、Table 2-2 のパラメータを用いると、休眠芽を形成する無機窒素濃度の閾値は  $0.16\sim0.23\text{ mg-N/l}$  と試算され、休眠芽の形成誘導に必要な窒素濃度条件を  $0.5\text{ mg-N/l}$  以下とした第1章の結果と合致していた。また、ここで休眠芽の形成が誘導される比増殖速度 ( $\mu$ ) は  $0.085\sim0.12\text{ d}^{-1}$  と算出され、第1章でみられた、葉状体の比増殖速度が  $1.2\times10^{-1}\text{ d}^{-1}$  以上の条件では休眠芽は形成されないという現象を裏付けるものとなった。

Table2-2 に示す通り、実験結果のモデル近似により得られた窒素  $1\text{ mg}$  あたりのバイオマス収率  $Y_{N(\text{MODEL})}$  は、Run 1~3 でそれぞれ異なり  $1000\sim3300\text{ mg-wet/mg-N}$  の大きい幅を持って推算された。既報では、 $1\text{ mg-dry}$  の葉状体の増殖に必要な窒素量は  $0.05\sim0.08\text{ mg}$  と報告されており<sup>42)</sup>、この逆数である収率は  $710\sim1500\text{ mg-wet/mg-N}$  と、ここでの推算値と近い値となっていることから、これらはある程度妥当な値であると考えられる。また、窒素およびリン含有量は供給される培養液の窒素およびリン濃度に依存してある程度変化することが他のウキクサ亜科の植物で報告されており<sup>40)</sup>、Run ごとに推定値に幅があったことも頷ける。ただし、本章のバイオマス生産ポテンシャルに関するシミュレーションの際には、 $Y_{N(\text{MODEL})}$  および  $Y_{P(\text{MODEL})}$  の値は Run 1~3 で得られた推定値の平均値を用いて単純化している。

なお、本章では、主に *W. arrhiza* のバイオマス生産（窒素とリン除去能力）に対する流入する窒素濃度の影響のみを数学モデルにより解析したことになるが、ウキクサ亜科植物の増殖量は、栽培槽中の葉状体の密度や水温、日射量にも大きく影響されることが知られている<sup>43)</sup>ため、これらを変数としてモデルに導入することができれば、より最適なシステム設計が可能になるモデルが構築できるものと考えられた。

Fig. 2-4 に示したとおり構築した数学モデルを用いて、タンパク質含量の多い葉状体を中心に収穫するパターン (A)、デンプン含有量の多い休眠芽を中心に収穫するパターン (B) および (A) と (B) の中間のパターン (C) をシミュレートし、算出された各収穫パターン

ンにおけるバイオマス収穫量を Table 2-3 および Table 2-4 に示す。なお、ここでは、温度や日照条件の季節変動を考慮せず、ここで設定した一定条件で年間を通して栽培されたと仮定した試算を行っている。

葉状体を中心に収穫したパターン（A）では、40 日間で  $0.13 \text{ kg-dry/m}^2$  の葉状体を収穫でき、タンパク質の年間生産能力は  $3.6 \text{ t/ha/year}$  と試算された。USDA の報告では、大豆の単位面積当たりの収穫量は約  $3.6 \text{ t/ha/year}$  とされており<sup>44)</sup>、一般的な大豆のタンパク質含有率である 34%を適用すると、タンパク質の生産能力は  $1.2 \text{ t/ha/year}$  と計算される。従って、*W. arrhiza* の葉状体は高タンパク質含量で飼料等に利用される大豆を上回るタンパク質生産能力を有すると評価された。本研究では、植物体へ有害物質等の取込みという課題を踏まえて、飼料としての *W. arrhiza* のバイオマス利用は想定していないが、有害物質が含まれていない排水の処理に植生浄化を適用するのであれば、葉状体の利用は飼料として十分なポテンシャルを持つものと評価できる。一方、休眠芽を中心に収穫したパターン（B）では、40 日間で  $0.11 \text{ kg-dry/m}^2$  の休眠芽が収穫でき、デンプン含量が本研究における分析値（ $430 \text{ mg/g-dry biomass}$ ）と同等と仮定するとデンプンの年間生産能力は  $4.3 \text{ t/ha/year}$  と試算された。USDA の報告では、トウモロコシの単位面積当たりの収穫量は約  $11.4 \text{ t/ha/year}$  とされており<sup>44)</sup>、一般的なトウモロコシのデンプン含有率である 70%を適用すると、デンプンの年間生産能力は  $8.0 \text{ t/ha/year}$  と計算される。従って、休眠芽のデンプン含量や温度、日照条件の季節変動を考慮しない条件での試算ではあるものの、*W. arrhiza* の栽培系の生産能力はトウモロコシのデンプンの年間生産能力の約半分に匹敵すると評価され、*W. arrhiza* が既存のエタノール生産作物の代替になり得る可能性が示された。さらに、A と B の中間のパターン（C）では、タンパク質の年間生産能力は  $2.1 \text{ t/ha/year}$ 、デンプンの年間生産能力は  $3.5 \text{ t/ha/year}$  と試算され、ある程度以上のレベルでタンパク質およびデンプンの両方を収穫できることが確認された。

Table 2-3 収穫パターンを変えたシミュレーション結果から計算されたバイオマス収量

	パターン A <sup>a</sup>	パターン B <sup>a</sup>	パターン C <sup>a</sup>
葉状体 <sup>b</sup> (kg-dry/m <sup>2</sup> )	0.13	0.00	0.04
休眠芽 <sup>b</sup> (kg-dry/m <sup>2</sup> )	0.00	0.11	0.08

a (A) 無機窒素濃度が 0.5 mg-N/l 以下に減少した日に葉状体の半分を収穫するパターン、(B) 葉状体を収穫しないパターン、(C) 0.18mg-N/l 以下に減少した日に葉状体の半分を収穫するパターン。

b 葉状体、休眠芽ともに含水率 96.5% (乾物率 3.5%) と仮定してシミュレーション期間 (40 日) の増殖量および形成量を計算した。

Table 2-4 シミュレーション結果をもとにした面積当たりの年間資源生産能力の試算結果

	パターン A <sup>a</sup>	パターン B <sup>a</sup>	パターン C <sup>a</sup>
タンパク質 <sup>b</sup> (t/ha/year)	3.6	1.3	2.1
デンプン <sup>c</sup> (t/ha/year)	1.1	4.3	3.5

a (A) 無機窒素濃度が 0.5 mg-N/l 以下に減少した日に葉状体の半分を収穫するパターン、(B) 葉状体を収穫しないパターン、(C) 0.18mg-N/l 以下に減少した日に葉状体の半分を収穫するパターン。

b タンパク質含有量は Chaiprapat らの報告<sup>40)</sup>を参考に葉状体と休眠芽でそれぞれ 300 mg/g-dry biomass と 90 mg/g-dry biomass として計算した。

c デンプン含有量は分析値をもとに、葉状体と休眠芽でそれぞれ 130 mg/g-dry biomass と 430 mg/g-dry biomass として計算した。

## 第5節 要約

本章では、*W. arrhiza* の水質浄化と資源生産システムの設計・管理を最適化する条件や戦略を見出すために有効な、植生浄化プロセスにおける水質浄化やバイオマスの増殖を表現する数学モデルの構築を試みた。葉状体の増殖および休眠芽の形成を無機窒素濃度 Monod 式で表現し、また、第 1 章の結果から休眠芽の形成は葉状体の比増殖速度が特定の閾値以下となった場合に誘導されるものとして、数学モデルを構築した。

別途、流入水の栄養塩濃度を変化させた *W. arrhiza* の連続栽培試験を行い、4 次の Runge-Kutta 法により、試験結果を再現するようにモデルの各パラメータを決定した。決定されたパラメータを用いたモデルシミュレーションにより、異なる流入水の栄養塩濃度条件で行った実験結果はそれぞれ良好に再現され、モデルの妥当性を確認することができた。

構築した数学モデルを用いて、異なるバイオマス収穫パターンでのシミュレーションを行った結果、葉状体を中心に収穫した場合にはタンパク質の年間生産能力は 3.6 t/ha/year となることが試算された。一方、休眠芽を中心に収穫した場合には、デンプンの年間生産能力は 4.3 t/ha/year と試算され、*W. arrhiza* は既存の資源系作物と同等以上のバイオマス生産性を有することが確認された。



## 第3章 *Wolffia arrhiza* のバイオマスを基質としたエタノール生産

### 第1節 緒言

第1章では、*W. arrhiza* の休眠芽形成に及ぼす各種環境要因の影響を検討し、葉状体の比増殖速度を制御することで、人為的に休眠芽を誘導し、回収するバイオマスのデンプン含量、すなわち資源価値を高め得る可能性を示した。また、第2章では、*W. arrhiza* 長期栽培実験のデータから、植生浄化プロセスにおける水質浄化やバイオマスの増殖を表現する数学モデルを構築し、バイオマスとして主に葉状体、あるいは休眠芽を回収する場合の資源生産能力を試算することができた。

本章では、植生浄化法で用いた *W. arrhiza* のバイオマスの利活用技術として、休眠芽に多く含まれるデンプン含量からの生産が容易であり、かつ、排水処理によって取り込まれる可能性のある有害物質の問題も生じないという利点を持つエタノール生産を試みた。

ウキクサ亜科の植物を基質としたエタノール生産は、*S. polyrrhiza*<sup>26, 45)</sup>、*L. minor*<sup>27)</sup>で報告されているが、本研究で用いている *W. arrhiza* に関しては報告されておらず、ここでの検討が初めての実証となる。また、先の研究では、葉状体と休眠芽を区別せずにエタノール生産の基質としているが、ここではバイオマスとしての組成や性状の異なるそれぞれについて検討を行った。前処理には、*E. crassipes* や *P. stratiotes* の糖化の前処理として有効であると報告<sup>23)</sup>されている A/O 処理を適用し、セルラーゼ、あるいはアミラーゼを用いて糖化した。また、発酵モードとしては、従来の酵素による糖化過程とエタノール発酵を別々の槽で行う方法 (separate hydrolysis and fermentation : 以下、SHF) と同時糖化発酵 (simultaneous saccharification and fermentation : 以下、SSF) を比較した。

### 第2節 材料および方法

#### 1. *W. arrhiza* の栽培と前処理

*W. arrhiza* の葉状体の栽培は、大阪大学に設置した温室内で実施した。温室内の日中の平均気温は 30 °C で、栽培液 (0.1%v/v ハイポネックス 6-10-5 (株式会社ハイポネックスジャパン、大阪)) 約 200 l を入れた幅 60 cm、奥行 80 cm、深さ 50 cm のポリプロピレン製容器に (水深約 40 cm) に対して、葉状体を約 300 g 植種し、3 週間栽培した。葉状体の一部を収穫し、別の容器に準備した 0.001%v/v ハイポネックス 6-10-5 の栽培液で栽培し、休眠芽を形成させた。

収穫した葉状体および休眠芽を水道水で洗浄し、60 °C で 48 時間以上乾燥させた後に、

0.8 mm メッシュに Oster 製ブレンダー（ジャーデン・コンシューマー・ソリューションズ・ジャパン合同会社、東京）を用いて粉碎した。葉状体および休眠芽の粉末試料に対して、次のとおり A/O 処理を実施し、エタノール生産のための前処理とした。試料 200 g に 10 倍量の 1%(w/v) NaOH を加え室温で 12 時間浸漬させた後、31%(w/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を終濃度 1% となるように加え、さらに室温で 12 時間反応させた。A/O 処理を施した試料は 38  $\mu$ m 孔径のふるいで回収し、水道水で十分に中和洗浄した後、60  $^{\circ}$ C で 48 時間以上乾燥させて粉末にし、エタノール発酵用の試料とした。

## 2. 酵母とその培養条件

エタノール発酵用の酵母として、*S. cerevisiae* NBRC2346 を用いた。継代用の培地は pH 6.2 に調整した固形 YM medium (peptone 5.0 g/l, yeast extract 3.0 g/l, malt extract 3.0 g/l, glucose 20 g/l) とした<sup>23)</sup>。固形 YM medium 上で 24 時間培養したコロニーを 100 ml の液体 YM medium (pH 6.2) に接種して、28  $^{\circ}$ C で 24 時間振とう培養 (120 rpm) した菌体を発酵試験の植種菌体として用いた。

## 3. SHF によるエタノール発酵

A/O 処理後の粉末試料 25 g に対して、滅菌した 0.1 M NaPO<sub>4</sub> Buffer (pH 5.0) 250 ml に 20 filter paper units (FPU) /g-substrate のセルラーゼ Sumitime C (新日本化学工業株式会社、愛知) を溶解した酵素液を加えて、45  $^{\circ}$ C、120 rpm で 96 時間振とうし、酵素糖化した。糖化後に 21000 g で 10 分間遠心分離し、上澄みに 2.0 g/l の yeast extract、0.2 g/l の (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.02 g/l の MgSO<sub>4</sub> を加えて pH 5.0 に調整し、エタノール発酵用の糖化済み試料とした。80 ml の糖化済み試料をゴム栓とサンプリング用の針を装着した 125 ml 容量の Erlenmeyer フラスコに移し、酵素反応の停止も兼ねて、オートクレーブを用いて滅菌した。滅菌後の糖化済み試料に 4 ml の *S. cerevisiae* NBRC2346 菌体液を接種して、30  $^{\circ}$ C、120rpm で 96 時間振とうし、エタノール発酵させた。試験は少なくとも 2 連で行った。

## 4. SSF によるエタノール発酵

20 FPU/g-substrate の Sumitime C、または、アミラーゼ混合物 (47.2 mg/g-substrate of  $\alpha$ -amylase (Sigma-Aldrich Corp.、アメリカ合衆国) と 0.625 mg/g-substrate amyloglucosidase (Sigma-Aldrich Corp.、アメリカ合衆国)) を含む 80 ml の基本培地 (yeast extract 2.0 g/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2 g/l, MgSO<sub>4</sub> 0.02 g/l (0.1M リン酸緩衝液で pH 5.0 に調整)) に、A/O 処理後の粉末試料 8 g とともに 4 ml の前培養菌体を接種して、30  $^{\circ}$ C、120 rpm で 60 時間振とうした。試験は少なくとも 2 連で実施した。

## 5. 加水分解およびエタノール発酵における生成物の分析

糖化前後の試料および試験期間中に定期的にサンプリングした試料中の糖類、エタノー



ル、および副生成物を分析した。エタノール、糖類、その他の生成物の定量は HPLC (LC-10AT、(株) 島津製作所、京都) を用いて次の条件で行った。分析条件は、分析用カラム Aminex HPX-87H 300 mm × 7.8 mm (Bio-Rad Laboratories Inc.、アメリカ合衆国) に、5 mM 硫酸の移動相を流量 0.6 ml/分<sup>23)</sup>として供給し、示差屈折率検出器 (RID-10A、(株) 島津製作所、京都) により対象物質を検出した。この分析条件において、マンノースとキシロースとガラクトース (以下 Man/Xyl/Gal と略する。) の 3 種類は分離できなかったため、3 種の糖の保持時間を含むピークの面積全体をキシロース濃度に換算して定量した。

*W. arrhiza* の葉状体または休眠芽に含まれる糖類の組成は、乾燥粉碎した葉状体または休眠芽 200 mg を 72% の硫酸 2 ml 中で 30 °C、1 時間浸透し、得られた加水分解物を 56 ml の蒸留水で希釈した後、HPLC で定量することで求めた<sup>46)</sup>。また、デンプン含量は、乾燥試料 100 mg に dimethyl sulfoxide 20 ml と 8 M HCl 5 ml を加えて 60 °C で 30 分緩やかに振とうさせ、生成したグルコースを F-kit starch (R-Biopharm AG、ドイツ) を用いて定量して求めた。

## 6. エタノール発酵効率およびエタノール収率の算定

①グルコース総量、②デンプン量および③SHF における酵素糖化後のグルコース量に対するエタノール発酵効率は、①酸加水分解試料の分析で得られたグルコース含量、②デンプン含量および③SHF における酵素糖化後のグルコース量に 0.511 を乗じて算定した理論上のエタノールの生成量に対する、各試験において得られたエタノール生産量の測定値の百分率で定義し、算出した (式 1-①、②、③)。

$$\text{式 1-①: } FE1 = 100 \times (EP / GC \times 0.511)$$

$$\text{式 1-②: } FE2 = 100 \times (EP / AC \times 0.511)$$

$$\text{式 1-③: } FE3 = 100 \times (EP / SG \times 0.511)$$

ここに *FE*: エタノール発酵効率 (%), *EP*: 各試験において得られたエタノール生産量、*GC*: 酸加水分解試料の分析で得られたグルコース含量、*AC*: バイオマスに含まれるデンプン含量、*SG*: SHF における酵素糖化後のグルコース量である。

また、エタノール収率は、各試験におけるエタノール生産量を基質とした *W. arrhiza* バイオマスの乾燥重量で除して求めた。

## 第3節 結果

### 1. 葉状体および休眠芽の糖組成

*W. arrhiza* の葉状体および休眠芽の糖組成の分析結果を Table 3-1 に示した。酸加水分解後の葉状体および休眠芽に含まれるグルコース含量はそれぞれ、0.40 g/g-biomass および 0.62 g/g-biomass、デンプン含量はそれぞれ、0.13 g/g-biomass および 0.43 g/g-biomass であった。他方、Man/Xyl/Gal（合算として算出した含量）は 0.01 g/g-biomass 以下であった。酸加水分解後の試料に含まれるキシロースが極めて少なかったことから、葉状体および休眠芽に含まれるヘミセルロース含量は無視できる量であると仮定し、酸加水分解後の試料のグルコース含量からデンプン含量を除いた値からセルロース含量を推定した結果、葉状体および休眠芽それぞれで、0.27 g/g-biomass および 0.19 g/g-biomass となった。

Table 3-1 *W. arrhiza*の糖組成 (g/g biomass)

	葉状体	休眠芽
グルコース <sup>a</sup>	0.40	0.62
デンプン	0.13	0.43
マンノースとキシロースとガラクトースの合算値	0.01	0.00
アラビノース	0.00	0.00

a: 酸加水分解で得られたグルコースの値  
(セルロース、ヘミセルロース、デンプンを含む)

## 2. 葉状体からのエタノール生産

セルラーゼを用いて A/O 処理後の *W. arrhiza* 葉状体のバイオマスを糖化させたところ、96 時間後にグルコース濃度は 23.9 g/l (0.24 g/g-biomass) となった。この糖化済み試料を基質とした SHF におけるエタノール濃度の経時変化を Fig. 3-1 に示す。発酵開始から 18 時間後で、100 g の葉状体由来の糖化済み試料から 13.4 g のエタノールが生産された。このとき、酵素糖化後のグルコース量に対する発酵効率  $FE_3$  は 94%であった。また、*W. arrhiza* に含まれるグルコース総量に対する発酵効率  $FE_1$  は 56%であった。

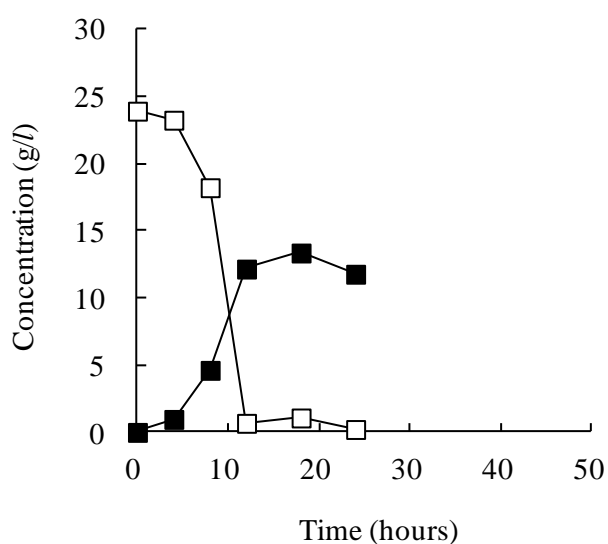


Fig. 3-1 セルラーゼを用いた SHF による *W. arrhiza* の葉状体を基質としたエタノール生産 (□: グルコース濃度、■: エタノール濃度)

他方、葉状体の A/O 処理後の粉末試料を基質とした SSF におけるエタノール濃度の経時変化を Fig. 3-2 に示す。糖化酵素としてセルラーゼを用いた試験 (Fig. 3-2A) では、発酵開始から 36 時間後に A/O 処理後の葉状体の試料 100 g から 16.3 g のエタノールが生産され、*W. arrhiza* に含まれるグルコース総量に対する発酵効率 *FE1* は 80%と算定された。一方、糖化酵素としてアミラーゼ混合物を用いた試験 (Fig. 3-2B) では、発酵開始から 12 時間後に A/O 処理後の葉状体試料 100 g から 7.4 g のエタノールが生産され、葉状体のデンプン含量に対する発酵効率 *FE2* は 112%と算定された。一方、*W. arrhiza* に含まれるグルコース総量に対する発酵効率 *FE1* は 36%と算定された。

SSF におけるエタノールの収率はセルラーゼを用いた試験およびアミラーゼ混合物を用いた試験でそれぞれ 0.16 g-ethanol/g-biomass および 0.07 g-ethanol/g-biomass と算出された。

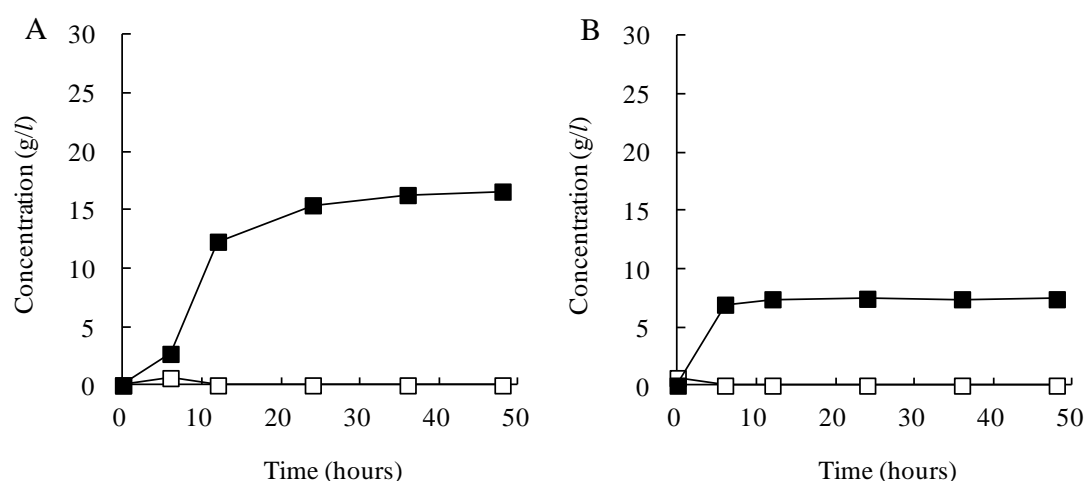


Fig. 3-2 SSF による *W. arrhiza* の葉状体を基質としたエタノール生産  
(□: グルコース濃度、■: エタノール濃度)  
A: セルラーゼを用いた試験、B: アミラーゼを用いた試験

### 3. 休眠芽からのエタノール生産

セルラーゼを用いて A/O 処理後の *W. arrhiza* の休眠芽のバイオマスを糖化させたところ、96 時間後のグルコース濃度は 38.8 g/l (0.39 g/g-biomass) となった。この糖化済み試料を基質とした SHF におけるエタノール濃度の経時変化を Fig. 3-3 に示す。発酵開始から 18 時間後に休眠芽の糖化済み試料 100 g から 22.7 g のエタノールが生産され、酵素糖化後のグルコース量に対する発酵効率  $FE_3$  は 114%、*W. arrhiza* に含まれるグルコース総量に対する発酵効率  $FE_1$  は 72%であった。

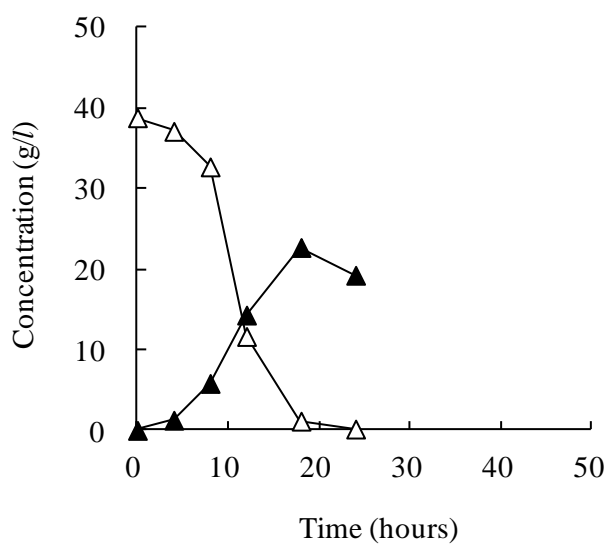


Fig. 3-3 セルラーゼを用いた SHF による *W. arrhiza* の休眠芽を基質としたエタノール生産  
(□：グルコース濃度、▲：エタノール濃度)

他方、休眠芽の A/O 処理後の粉末試料を基質とした SSF におけるエタノール濃度の経時変化を Fig. 3-4 に示す。糖化酵素としてセルラーゼを用いた試験 (Fig. 3-4A) では、発酵開始から 48 時間後に休眠芽の A/O 処理後の試料 100 g から 27.5 g のエタノールが生産され、*W. arrhiza* に含まれるグルコース総量に対する発酵効率 *FE1* は 87%と算定された。一方、糖化酵素としてアミラーゼ混合物を用いた試験 (Fig. 3-4B) では、発酵開始から 24 時間後に A/O 処理後のの休眠芽の試料 100 g から 25.1 g のエタノールが生産され、休眠芽のデンプン含量に対する発酵効率 *FE2* は 114%、*W. arrhiza* に含まれるグルコース総量に対する発酵効率 *FE1* は 79%と算定された。なおこの試験では、発酵開始から 6 時間後にわずかにグルコースの蓄積が認められた。

SSF におけるエタノールの収率はセルラーゼを用いた試験およびアミラーゼ混合物を用いた試験でそれぞれ 0.28 g-ethanol/g-biomass および 0.25 g-ethanol/g-biomass と算出され大きな差は認められなかった。

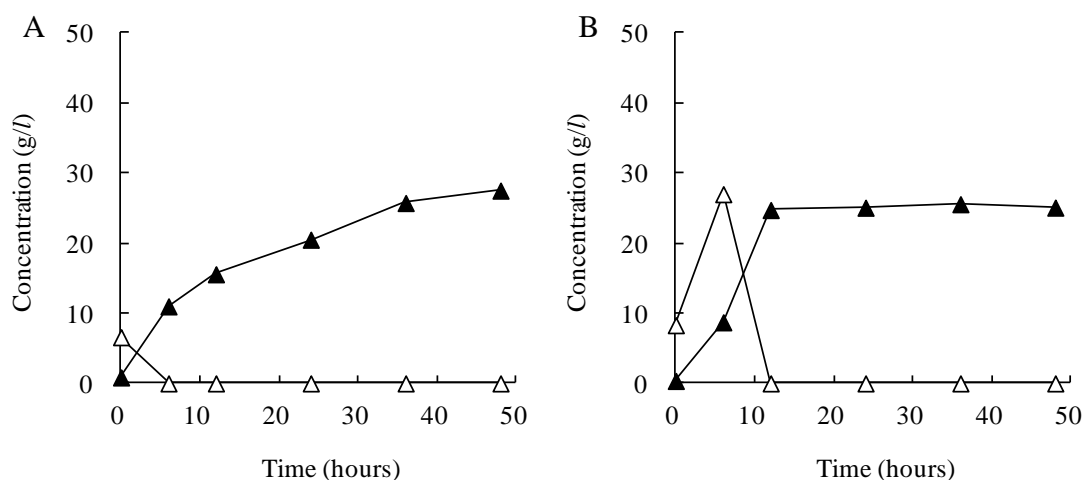


Fig. 3-4 SSF による *W. arrhiza* の休眠芽を基質としたエタノール生産  
 (□ : グルコース、▲ : エタノール)  
 A : セルラーゼを用いた場合、B : アミラーゼを用いた場合

## 第4節 考察

Table 3-2 に植生浄化法で用いる主要な水生植物のセルロースおよびデンプンの含量をまとめた。酸加水分解によって得られたグルコース量を他の水生植物と比較すると、*W. arrhiza* の葉状体においては、*E. crassipes* や *P. stratiotes* の約 1.7 倍以上、*A. donax* や *P. australis* と同等であった。休眠芽においては、*A. donax* や *P. australis* の約 1.6 倍以上であったことから、エタノール生産の基質として十分なグルコースを含有することが示された。さらに、デンプン含量は、*L. minor* (0.10 g/g-biomass) と比較して、葉状体および休眠芽それぞれで、1.3 倍 (0.13 g/g-biomass) および 4.3 倍 (0.43 g/g-biomass) であり、*S. polyrrhiza* (0.46 g/g-biomass) と同等であったことから、デンプン系のエタノール生産の基質として有望であることが確認された。このようにグルコースを多く含む *W. arrhiza* バイオマスから、エタノールが効率的に生産できることを実証するため、葉状体もしくは休眠芽を用いて SHF および SSF の両モードでの糖化－発酵試験を行った。その結果、葉状体および休眠芽ともに、SHF よりも SSF で高いエタノール収率を得られた。SHF では、グルコースやセロビオース等の加水分解生成物が酵素反応を阻害した可能性があることに対して、SSF ではグルコースを連続的に消費することによりこのフィードバック阻害を抑制できることが知られており<sup>47)</sup>、本研究でもこの阻害緩和の効果が表れたものといえる。また、休眠芽のバイオマスを基質としてセルラーゼを用いてバイオマスをエタノールへ転換する工程に要する時間を比較したところ、SSF ではエタノール発酵の完了に 48 時間 (平均のエタノール生産速度 : 0.57 g/hour) 必要であったが、SHF では 18 時間 (平均のエタノール生産速度 : 1.25 g/hour) で完了した。一方で、SHF では糖化に 96 時間、合計 114 時間が必要であったのに対し、酵素糖化とエタノール発酵を同時に行う SSF では、合計で 48 時間と短かったことから、生産性および経済性において SSF が優れていることが示されたものといえる。なお、*W. arrhiza* の休眠芽に含まれるセルロース量が 0.19 g/g-biomass と推定されたにもかかわらず、セルラーゼを用いて休眠芽を糖化した試験で (SHF)、このセルロース量の約 2 倍のグルコース量 (0.39 g/g-biomass) が得られたが、この理由としては、本研究で用いたセルラーゼがデンプンの一部に対しても加水分解活性を有していた可能性が考えられる。

SHF では、葉状体のバイオマスを基質とした場合、酵素糖化後のグルコース量に対する発酵効率 *FE3* は 94% であり、本章で用いた酵母により、酵素糖化で得られたグルコースが十分にエタノールへ変換できていることが確認された。また、休眠芽のバイオマスを基質とした場合には、*FE3* は 114% となり、酵素糖化により遊離されたグルコースの量を超えるエタノール生産が行われていたことを示唆する結果が得られた。これは、エタノール発酵が十分に効率的に行われたうえ、酵素糖化後の試料に残存していた多糖類から発酵工程中に新たにグルコースが遊離されたものと解釈すれば理解できる。

糖化酵素としてアミラーゼを用いた SSF において、葉状体を基質とした試験では、バイオマスが当初含んでいたデンプン量に対して算出した発酵効率 *FE2* は 112% となり、また、

休眠芽を基質とした試験では、バイオマスが当初含んでいたデンプン量に対して算出した発酵効率 *FE2* は 114% であった。これらは、アミラーゼによってエタノール発酵が十分に効率的に行われたうえ、アミラーゼにより得られるデンプン由来のグルコース以外に、前処理によって加水分解されたセルロースやヘミセルロース等の一部が、グルコース等の遊離糖に変換され、発酵基質となっていた可能性を示唆している。

Table 3-2 水生植物のセルロース含量、デンプン含量とSSFを用いた場合のエタノール収率

	セルロース (g/g)	デンプン (g/g)	収率 (g/g)	糖化酵素	発酵微生物	引用文献
<i>E. crassipes</i>	0.17	0.06	0.16	Sumitime™ C	<i>Escherichia coli</i> KO11	23)
<i>P. stratiotes</i>	0.20	0.04	0.17			
<i>A. donax</i>	0.36 <sup>a</sup>		0.18	Accellerase™ 1000	<i>Scheffersomyces</i> ( <i>Pichia</i> ) <i>stipitis</i> CBS 6054	18)
<i>P. australis</i>	0.39 <sup>a</sup>		0.21	Celluclast™ 1.5 L	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 24858	22)
<i>S. polyrrhiza</i>	NA	0.46	0.26	$\alpha$ -amylase, pullanase and glucoamylase	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 24859	26)
<i>L. minor</i>	0.23	0.10	0.09	$\alpha$ -amylase, $\alpha$ -amylgluco sidase, cellulase	self-flocculating yeast strain SPSC01	27)
<i>W. arrhiza</i>	葉状体	0.40 <sup>a</sup>	0.16	Sumitime™ C		
	休眠芽	0.62 <sup>a</sup>	0.28			
<i>W. arrhiza</i>	葉状体	0.27 <sup>b</sup>	0.07	Amylase and amyloglucosid ase	<i>S. cerevisiae</i> NBRC 2346	本研究
	休眠芽	0.19 <sup>b</sup>	0.43			

a: 酸加水分解で得られたグルコース

b: 酸加水分解で得られたグルコース含量からデンプン含量を差し引いて算定した数値



Table 3-2 には、植生浄化法で用いられた主要な水生植物からのエタノール生産の収率を付記し、本研究での *W. arrhiza* からのエタノール生産試行の結果と比較している。

セルロースを糖質の主成分とする葉状体を SSF の基質として用いた場合においても、A/O 処理とセルラーゼによる糖化を適用することで、*E. crassipes* や *P. stratiotes*、*A. donax* と同等のエタノール収率が得られたことから、*W. arrhiza* 葉状体のバイオマスは、リグノセルロース系の植物と同等のポテンシャルを持つものと考えられた。また、A/O 処理後の休眠芽を基質とした SSF において、アミラーゼを用いた試験で得られたエタノール収率（0.25 g/g-biomass）は、セルラーゼを用いた試験のエタノール収率（0.28 g/g-biomass）と同等であったことから、セルラーゼよりも経済的に優れるアミラーゼを糖化酵素として用いたエタノール生産が可能であることが確認された。この試験におけるエタノール収率は、*E. crassipes* や *P. stratiotes*、*A. donax*、*L. minor* より高く、*S. polyrrhiza* と同等の収率であったことから、休眠芽のバイオマスは、エタノール生産基質として高いポテンシャルを有することが確認できた。

## 第 5 節 要約

本章では、*W. arrhiza* の葉状体および休眠芽のセルロースおよびデンプン含量を調べ、*W. arrhiza* バイオマスがエタノール生産の基質として有望であることを確認するとともに、実際に SHF および SSF モードによる糖化—発酵試験を行い、エタノールが生産できることを実証した。*W. arrhiza* の葉状体および休眠芽に含まれるグルコース含量はそれぞれ、0.40 g/g-biomass および 0.62 g/g-biomass、デンプン含量はそれぞれ、0.13 g/g-biomass および 0.43 g/g-biomass であり、植生浄化に利用されてきた *E. crassipes* や *P. stratiotes*、*A. donax*、*P. australis* と同等以上であることが示された。特に、休眠芽においては、極めて高いデンプン含量を有し、エタノール生産の基質として有望であることが確認された。これら *W. arrhiza* バイオマスを A/O 処理し、SHF および SSF モードによるエタノール生産を試行したところ、SSF で高い収率が得られた。デンプンよりもセルロースを糖質の主体とする葉状体においても、糖化酵素としてセルラーゼを用いることで、SSF において、*P. australis* よりはやや低いものの、*E. crassipes* や *P. stratiotes* と同等のエタノール収率を得ることができた。また、デンプン含量の高い休眠芽を基質として用いた SSF では、セルラーゼよりも経済性に優れるアミラーゼを用いて、*L. minor* の 2 倍以上、*S. polyrrhiza* と同等のエタノール収率が得られることが示された。これらより、*W. arrhiza* バイオマス、特に休眠芽はエタノール生産の基質として高いポテンシャルを有することが実証できた。

## 総括並びに結論

本論文では、*W. arrhiza* を用いて水質浄化とバイオマス生産を両立する co-benefit システム（緒論 Fig. 0-1）の構築を目的としており、付加価値の高いバイオマスとして、デンプン含量の高い休眠芽が収穫できることを最大の特徴としている。この特徴を活かすためには、*W. arrhiza* の増殖を制御して効率よく休眠芽の形成を誘導すること、および収穫されたバイオマスを基質として効率よくエタノールを生産することが必要である。そこで、本論文では、本システムにおいて休眠芽を効率よく形成させるための条件の検討、水質浄化とバイオマス生産の能力を最適化するための数学モデルの構築、および *W. arrhiza* バイオマスのエタノール発酵条件の検討を、第 1 章から第 3 章において行い、その結果をとりまとめた。以下に各章における検討の結果を総括する。

第 1 章では、*W. arrhiza* の休眠芽の形成に及ぼす各種環境要因の影響を検討し、栽培槽中の栄養塩濃度の低下が重要な誘導因子であることを明らかにした。また、ここで、栄養塩濃度、光条件、温度の各種環境要因の影響の全ての検討結果をとりまとめ、葉状体の比増殖速度と休眠芽の比形成速度の関係を調べたところ、葉状体の比増殖速度が  $1.2 \times 10^{-1} \text{ d}^{-1}$  以下になると、休眠芽の形成が誘導されることも明らかとなった。このことから、この閾値を目安として、例えば、滞留時間の設定や処理水循環により植生浄化システムの栽培槽内の窒素濃度をある程度の低いレベルに維持することで、*W. arrhiza* の増殖速度を制御し、休眠芽の形成を人為的に誘導できる可能性を示した。

第 2 章では、*W. arrhiza* を用いた植生浄化システムにおける葉状体の比増殖速度が休眠芽形成の制御因子となることに着目し、水質浄化やバイオマス生産（葉状体及び休眠芽）の動態を表現する数学モデルを構築した。すなわち、このモデルにおいては、窒素濃度を制限因子とした Monod 式で葉状体の比増殖速度および休眠芽の比形成速度を表現し、葉状体の比増殖速度がある閾値以下に低下すると休眠芽の形成が誘導されると仮定した。構築したモデルのパラメータを、*W. arrhiza* を用いた植生浄化システムでの模擬排水の連続処理実験のデータを再現するように決定し、これを用いたシミュレーションにより、バイオマス生産のポテンシャルを評価した。異なるバイオマス収穫パターンでのシミュレーションを行った結果、*W. arrhiza* の葉状体を中心に収穫した場合のタンパク質の年間生産能力、休眠芽を中心に収穫した場合のデンプンの年間生産能力はともに、トウモロコシ、小麦等の既存の資源系作物と同等以上の生産性を有するものと試算され、植生浄化法におけるバイオマス生産のメリットは非常に大きなものとなり得ることが確認された。

さらに、第 3 章では、植生浄化システムに用いた *W. arrhiza* の葉状体及び休眠芽のバイオマスについて、糖化－発酵によるエタノール生産の基質としてのポテンシャルを実験的に評価した。セルロースを糖質の主成分とする葉状体を基質とした場合においても、糖化

酵素としてセルラーゼを用いることで、100%に近いエタノール発酵効率を得ることができた。また、デンプン含量の高い休眠芽を基質とした場合には、セルラーゼより経済性に優れるアミラーゼを用いた場合の収率が、セルラーゼを用いた場合の収率と大きい差がなかったことから、特に休眠芽はエタノール生産の基質として高いポテンシャルを有することが実証できた。

以上で総括したとおり、本論文では、*W. arrhiza* を用いた植生浄化システムにおいて、デンプン含量が高く資源価値の高い休眠芽の形成を効率よく誘導できることが示され、また、休眠芽は安価な糖化—発酵プロセスによって効率的にエタノールへと変換できることが示された。したがって、本システムは、水質浄化と付加価値の高いバイオマス生産の両立を実現するうえで高いポテンシャルを有することが実証できたものと結論できる。今後は、Table 4-1 に挙げる課題を検討することで、本システムのバイオマス生産が最適化され、実用化が促進されるものと期待される。

Table 4-1 本システムの最適化に向けて残された課題

1. 休眠芽形成の効率化	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 光強度、温度、植物体密度等、栄養塩濃度以外の制御因子の詳細な検討とそれに基づいた数学モデルの改良によるシステム設計・運転支援ツールの整備</li> <li>・ 水質浄化槽と資源生産槽で構成する 2 槽式システム等、より休眠芽生産性の高いシステムの提案</li> <li>・ 糖類や植物ホルモン等、休眠芽形成を促進する物質の添加効果の検討</li> </ul>
2. バイオマス利用の高度化	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ A/O 処理よりも簡便で安価なバイオマス前処理法の検討</li> <li>・ エタノールに加え、バイオプラスチックの原料として利用可能な乳酸やコハク酸等より付加価値の高い産物への転換技術の確立</li> <li>・ バイオマス加工残さや廃液に含まれる窒素やリン等の有効利用</li> </ul>

## 引用文献

- 1) Smith V. H. and Schindler D. W.: Eutrophication\_science: where do we go from here?, *Trends Ecol Evol*, **24**(4), 201-7 (2009)
- 2) 滋賀県 平成 28 年度環境白書 ([http://www.byq.or.jp/kankyo/k\\_04.html](http://www.byq.or.jp/kankyo/k_04.html))
- 3) 茨城県霞ヶ浦環境科学センター 10 周年記念研究成果集 (平成 28 年 3 月)
- 4) 佐藤 弘泰: 栄養塩除去技術, *水環境ハンドブック* (日本水環境学会編), 朝倉書店, 241-245 (2006)
- 5) 河川財団, 植生浄化施設計画の技術資料 (2007 年版)
- 6) 藤田 正憲, 森本 和花, 河野 宏樹, Silvana PERDOMO, 森 一博, 池 道彦, 山口 克人, 惣田 訓: 水質浄化に利用可能な植物データベースの構築, *環境科学会誌*, **14**, 1-13 (2001)
- 7) Gunnarsson C. C. and Petersen C. M.: Water hyacinths as a resource in agriculture and energy production: a literature review, *Waste Manag*, **27**(1), 117-29 (2007)
- 8) Widajanto D. W., Honmura T. and Miyauchi N.: Possible Utilization of Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms), an Aquatic Weed, as Green Manure in Vegetables Cropping Systems, *Jpn J Trop Agr*, **47**(1), 27-33 (2003)
- 9) Sahu A. K., Sahoo S. K. and Giri S. S.: Efficacy of water hyacinth compost in nursery ponds for larval rearing of Indian major carp, *Labeo rohita*, *Bioresour Technol*, **85**(3), 309-11 (2002)
- 10) Ragaglini G., Dragoni F., Simone M. and Bonari E.: Suitability of giant reed (*Arundo donax* L.) for anaerobic digestion: effect of harvest time and frequency on the biomethane yield potential, *Bioresour Technol*, **152**, 107-15 (2014)
- 11) Saber A. E-S., Fatma A. E-G., Fayza A. N. and Huub J. G.: Nitrogen recovery in an integrated system for wastewater treatment and tilapia production, *The Environmentalist*, **27**(2), 287-302 (2007)
- 12) Bairagia A., Sarkar G. K., Senb S. K. and Raya A. K.: Duckweed (*Lemna polyrrhiza*) leaf meal as a source of feedstuff in formulated diets for rohu (*Labeo rohita* Ham.) fingerlings after fermentation with a fish intestinal bacterium, *Bioresour Technol*, **85**(1), 17-24 (2002)
- 13) Iqbal S.: Duckweed Aquaculture -Potentials, Possibilities and Limitations for Combined Wastewater Treatment and Animal Feed Production in Developing Countries-, *SANDEC Report*, **6/99**, Swiss Federal Institute for Environmental Science & Technology (1999)
- 14) Shazia I., Sumera A., Ifikhar A., Tassawar K., Atiya A. and Mukhtar N.: Use of Duckweed Growing on Sewage Water as Poultry Feed, *Int J Scient Res Public*, **5**(1), 1-8 (2015)
- 15) Cheng J. J. and Stomp A. M.: Growing Duckweed to Recover Nutrients from Wastewaters and for Production of Fuel Ethanol and Animal Feed (Review), *Clean*, **37** (1), 17-26 (2009)
- 16) Wang Z. and Calderon M. M.: Environmental and economic analysis of application of water hyacinth for eutrophic water treatment coupled with biogas production. *J Environ Manage*, **15**(110), 246-253 (2012)

- 17) Verma V. K., Singh Y. P. and Rai J. P.: Biogas production from plant biomass used for phytoremediation of industrial wastes, *Bioresour Technol*, **98**(8), 1664-1669 (2007)
- 18) Scordia D., Cosentino S., Lee J. W. and Jeffries T. W.: Dilute oxalic acid pretreatment for biorefining giant reed (*Arundo donax* L.), *Biomass Bioenergy*, **35**, 3018-3024 (2011)
- 19) Yuan S., Chen X. L., Li W. F., Liu H. F. and Wang F. C.: Nitrogen conversion under rapid pyrolysis of two types of aquatic biomass and corresponding blends with coal, *Bioresour Technol*, **102**(21), 10124-10130 (2011)
- 20) Muradov N., Taha M., Miranda A. F., Kadali K., Gujar A., Rochfort S., Stevenson T., Ball A. S. and Mouradov A.: Dual application of duckweed and azolla plants for wastewater treatment and renewable fuels and petrochemicals production, *Biotechnol Biofuels*, **28**, 30-33 (2014)
- 21) Ray A. K. and Das I.: Evaluation of dried aquatic weed, *Pistia stratiotes* meal as feedstuff in pelleted fed for rohu, *Labeo rohita* fingerlings, *J appl aquac*, **5**, 35-44 (1996)
- 22) Li H., Kim N. J., Jiang M., Kang J. W. and Chang H. N.: Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic residues pretreated with phosphoric acid-acetone for bioethanol production, *Bioresour Technol*, **100**(13), 3245-3251 (2009)
- 23) Mishima D., Kuniki M., Sei K., Soda S., Ike M. and Fujita M.: Ethanol production from candidate energy crops: water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and water lettuce (*Pistia stratiotes* L.), *Bioresour Technol*, **99**(7), 2495-2500 (2008)
- 24) Wyman C. E.: BIOMASS ETHANOL: Technical Progress, Opportunities, and Commercial Challenges, *Annu Rev Energy Environ*, **24**, 189-226 (1999)
- 25) Food and Agriculture Organization of the United Nations: Bioenergy policy markets and trade and food security, *Technical Background document from the expert consultation held on 18 to 20 february 2008 ROME*, <http://www.fao.org/foodclimate/expert/em5/en/>
- 26) Xu J., Cui W., Cheng J. J. and Stomp A. M.: Production of high-starch duckweed and its conversion to bioethanol, *Biosyst. Eng*, **110**, 67-72 (2011).
- 27) Ge X., Zhang N., Phillips G. C. and Xu J.: Growing *Lemna minor* in agricultural wastewater and converting the duckweed biomass to ethanol, *Bioresour Technol*, **124**, 485-488 (2012)
- 28) Landolt E.: Biosystematic Investigations in the Family of Duckweeds (*Lemnaceae*), *The family of Lemnaceae*, Vol. 1, Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes der ETH, Stiftung Rubel, Zurich, Swiss (1986)
- 29) Fujita M., Mori K. and Kadera T.: Nutrient removal and starch production through cultivation of *Wolffia arrhiza*, *J Biosci Bioeng*, **87**(2), 194-198 (1999)
- 30) Smart C. C., Fleming A. J., Chaloupkova K. and Hanke D. E.: The physiological role of abscisic acid in eliciting turion morphogenesis, *Plant Physiol*, **108**, 623-632 (1995)
- 31) Hillman W. S.: Experimental control of flowering in *Lemna*. IV. Inhibition of photoperiodic sensitivity by copper, *Am. J. Bot.* **49**, 892-897 (1962)
- 32) 石原 悟, 佃 美和, 清野 義人: アオウキクサ類を供試生物としたウキクサ生長阻害試験の試験条件, *環境毒性学会誌*, **13**(2), 131-139 (2010)
- 33) Cedergreen N. and Madsen T. V.: Nitrogen uptake by the floating macrophyte *Lemna minor*, *New Phytologist*, **155**, 282-292 (2002)

- 34) Fang Y. Y., Babourina O., Rengel Z., Yang X. E. and Pu P. M.: Ammonium and nitrate uptake by the floating plant *Lanodoltia punctata*, *Ann Bot*, **99**, 365-370 (2007)
- 35) 三宅 博: 植物の窒素代謝, *植物生理学—分子から個体へ—*, 三共出版, 55-56 (2003)
- 36) Boniardi N., Vatta G., Rota R., Nano G. and Carra S.: Removal of water pollutants by *Lemna gibba*, *Chem Eng J and Biochem Eng J*, **54**, B41-B48 (1994)
- 37) Vatta G., Rota R., Boniardi N. and Nano G.: Dynamic modeling of waste-water treatment plants based on *Lemna gibba*, *Chem Eng J and Biochem Eng J*, **57**, B37-B48 (1995)
- 38) Lasfar S., Monette F., Millette L. and Azzouz A.: Intrinsic growth rate: A new approach to evaluate the effects of temperature, photoperiod and phosphorus–nitrogen concentrations on duckweed growth under controlled eutrophication, *Wat Res*, **41**, 2333-2340 (2007)
- 39) Peng J. F., Wang B. Z., Song Y. H. and Yuan P.: Modeling N transformation and removal in duckweed pond: model development and calibration, *Ecol Model*, **206**, 147-152 (2007)
- 40) Chaiprapat S., Cheng J. J., Classen J. J. and Liehr S. K.: Role of internal nutrient storage in duckweed growth for swine wastewater treatment, *Trans ASAE*, **48**, 2247-2258 (2005)
- 41) Beppu T. and Takimoto A.: Further studies on the flowering of *Lemna paucicostata* in Japan, *J Plant Res*, **94**, 69-76 (1981)
- 42) Wolek J.: Experimental investigations on competition and alleopathy between *Spirodela polyrhiza* (L.) Scheld. and *Wolffia arrhiza* (L.) Wimm, *Fragm Flor Geobot*, **25**, 281-350 (1979)
- 43) Edwards P., Hassan M. S., Chao C. H. and Pacharaprakiti C.: Cultivation of duckweeds in septage-loaded earthen ponds, *Bioresour Technol*, **40**, 109-117 (1992)
- 44) US Dep. Agric.: *Crop Production 2016 Summary*, National Agricultural Statistics Service, Washington DC, US Dep. Agric, (2017)
- 45) Cheng J. J. and Stomp A. M.: Growing high-starch duckweed for the production of fuel ethanol, *Clean*, **37**, 17-26 (2009)
- 46) Puls J., Poutanen K., Korner H. U. and Viikari L.: Biotechnical utilization of wood carbohydrates after steaming pretreatment, *Appl Microbiol Biotechnol*, **22**, 416-423 (1985)
- 47) Xiao Z., Zhang X., Greff D. J. and Saddler J.N.: Effects of sugar inhibition on cellulases and  $\beta$ -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates, *Appl Biochem Biotechnol*, **115**, 1115-1126 (2004)



## 謝辞

本研究の遂行と論文作成にあたり、研究の基礎から論文の完成にいたるまで終始御指導を賜りました、大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻 教授 池 道彦 先生に深く感謝の意を表します。

本論文を査読頂き、貴重な御助言を賜りました、大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻 教授 近藤 明 先生、准教授 井上 大介 先生に深く感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、多大なる御指導と御助言を賜りました立命館大学理工学部環境システム工学科 教授 惣田 訓 先生に深く感謝の意を表します。

本研究に関して、貴重な御指導と御助言を賜りました山梨大学大学院 医学工学総合研究部 社会システム工学系 准教授 森 一博 先生に深く感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、終始御指導、御援助を賜りました富山県立大学工学部環境・社会基盤工学科 准教授 立田 真文 先生、大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻 助教 黒田 真史 先生、大阪大学大学院工学研究科技術部 技術職員 山岡 ゆり子 氏に心から御礼申し上げます。

本研究に関して着想から研究の基礎に至るまで御指導いただきました大阪大学 名誉教授 藤田 正憲 先生に感謝いたします。

本研究で用いた *Wolffia arrhiza* 株を提供して頂いたスイス連邦工科大学 教授 Elias Landolt 先生に感謝いたします。

共同研究者として御尽力賜りました大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻 河野 宏樹氏、三嶋 大介氏、川畑 祐介氏、齋藤 映美氏、國木 政徳氏、大智 健史氏、Jusakulvijit Piradee 氏、山梨大学大学院 医学工学総合研究部 社会システム工学系 河合 健太郎氏に、心より感謝いたします。

末尾になりましたが、研究活動において直接間接のご協力をいただきました大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻 生物圏環境工学領域の諸兄姉に心より感謝いたします。





## 本論文に関する報文

### 投稿論文

1. 高井雄一郎, 惣田訓, 森一博, 川畑祐介, 河合健太郎, 池道彦 (2012) ミジンコウキクサの増殖と休眠芽の形成に及ぼす環境要因. *用水と廃水*, **54(8)**, 613-621.
2. Soda S., Kawahata Y., Takai Y., Mishima D., Fujita M., and Ike M. (2013) Kinetics of nutrient removal and biomass production by duckweed *Wolffia arrhiza* in continuous-flow mesocosms. *Ecological Engineering*, **57**, 210-215.
3. Takai Y., Mishima D., Kuniki M., Sei S., Soda S., and Ike M. (2014) Ethanol production from vegetative fronds and turions of duckweed *Wolffia arrhiza*. *Japanese Journal Water Treatment Biology*, **50(4)**, 133-140.
4. 高井雄一郎, 河野宏樹, 立田真文, 惣田訓, 池道彦 (2015) ミジンコウキクサ *Wolffia arrhiza* の生長と休眠芽の形成に及ぼす有機物添加の影響. *日本水処理生物学会誌*, **51(2)**, 29-35.
5. Soda S., Ohchi T., Piradee J., Takai Y., and Ike M. (2015) Duckweed biomass as a renewable biorefinery feedstock: Ethanol and succinate production from *Wolffia globosa*. *Biomass and Bioenergy*, **81**, 364-368.

### 総説

1. 惣田訓, 高井雄一郎, 池道彦 (2016) ウキクサによる水質浄化と資源生産. *環境浄化技術*, **15(2)**, 65-70.

### 国際会議等発表

1. Takai Y., Soda S., Mori K., Kawahata Y., Fujita M., and Ike M. (2011) Environmental effects on growth and turion formation of duckweed *Wolffia arrhiza*. Proceedings of the 4<sup>th</sup> IWA-ASPIRE Conference & Exhibition, /iwa/pdf/sr119H00108DIS.pdf
2. Takai Y., Mishima D., Kuniki M., Sei S., Soda S., and Ike M. (2011) The possibility of *Wolffia arrhiza* as a resource for ethanol production. Proceedings of ECO-MATES 2011, vol. 1, pp. 59-60.
3. Soda S., Ohchi T., Piradee J., Takai Y., and Ike, M. (2014) Duckweed biomass as a renewable biorefinery feedstock: Ethanol and succinate production from *Wolffia globosa*. IWA 9<sup>th</sup> International Symposium on Waste Management Problems in Agro-industries. Proceedings Volume I, pp. 127-134.
4. Soda S., Takai Y., Kohno H., Tateda M., and Ike M. (2015) Effects of external organic compounds on growth and turion formation of rootless duckweed *Wolffia arrhiza*. Program&Abstracts of The Third International Conference on Duckweed Research and Applications, pp. 49.