

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年3月17日(17.03.2022)



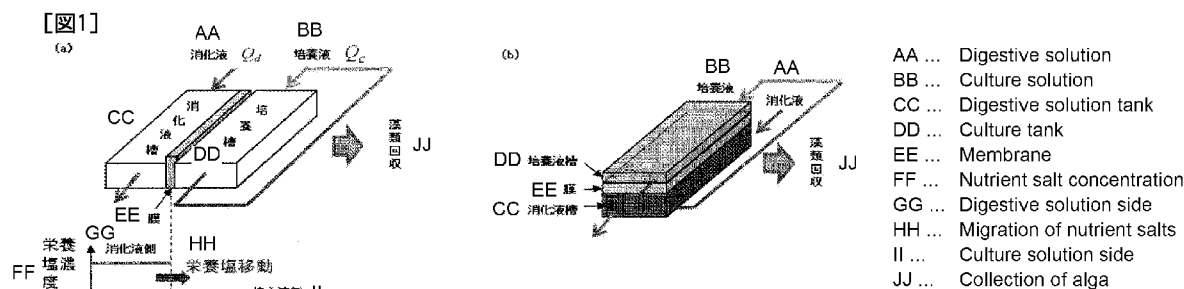
(10) 国際公開番号

WO 2022/054932 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 1/12 (2006.01) B01D 61/24 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01) B01D 69/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2021/033429
- (22) 国際出願日: 2021年9月10日(10.09.2021)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2020-153276 2020年9月11日(11.09.2020) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人北海道大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 Hokkaido (JP).
- (72) 発明者: 佐藤 昌宏(SATO, Masahiro); 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 中島 拓海(NAKASHIMA, Takumi); 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 石井 一英(ISHII, Kazuei); 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 落合 知(OCHIAI, Satoru); 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP).
- (74) 代理人: 山尾 憲人, 外(YAMAO, Norihito et al.); 〒5300017 大阪府大阪市北区角田町8番1号梅田阪急ビルオフィスタワー 青山特許事務所 Osaka (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ,

(54) Title: METHOD OF CULTURING ALGA AND ALGA CULTURE SYSTEM

(54) 発明の名称: 藻類の培養方法および藻類培養システム



(57) Abstract: The present invention provides a method of culturing an alga and an alga culture system that enable practical realization of low-cost and space-saving production of biofuels and bioenergy. According to the present invention, an alga is cultured by using a reaction tank, said reaction tank being provided with a digestive solution tank holding a digestive solution containing high-concentration nutrient salts, a membrane having a pore size of 0.45 μm or less and a culture tank holding a culture solution and the alga, maintaining the difference in the nutrient salt concentration between the digestion solution tank and the culture tank by allowing the alga in the culture tank to consume the nutrient salts, and supplying the nutrient salts contained in the digestion solution to the culture solution through the membrane by means of concentration diffusion.

(57) 要約: 本発明は、高濃度栄養塩類を含有する消化液を含む消化液槽、孔径0.45 μm 以下の膜ならびに培養液および藻類を含む培養槽を備えた反応槽を用いて、培養槽中の藻類が栄養塩類を消費することで、消化液槽および培養槽の栄養塩類の濃度差を維持し、濃度拡散により消化液に含まれる栄養塩類を膜を介して培養液に供給して、藻類を培養することによって、低コストかつ省スペースでバイオ燃料やバイオエネルギーの生産を実用化し得る、藻類の培養方法および藻類培養システムを提供する。

BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則4. 17に規定する申立て:

- 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則4. 17(v))

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))

明 細 書

発明の名称：藻類の培養方法および藻類培養システム

技術分野

[0001] 本発明は、藻類の培養方法および藻類培養システムに関する。

背景技術

[0002] 微細藻類（例えば、土着微細藻類）などの藻類を培養し、培養した藻類を原料としてバイオ燃料やバイオエネルギーを産生させる様々な研究が行われており、藻類を用いてのバイオ燃料やバイオエネルギーの生産を実用化し、商業的規模で行うには、大量の藻類を培養・回収する必要がある。しかしながら、大量の藻類を培養・回収するには高いコストがかかり、その中でも藻類の培養に必要な栄養塩類の回収におけるコストが高いコストの原因の一つであると考えられている。そのため、回収された栄養塩類、例えば、家畜ふん尿および家畜ふん尿をメタン発酵した後の発酵残渣中の栄養塩類は、経済合理性が重視され、多くの場合藻類の培養への供給ではなく農地散布に利用されてきた。

[0003] 高濃度栄養塩類含有排水から栄養塩類を回収する方法として、ヒドロキシアパタイト（HAP）法、リン酸マグネシウムアンモニウム（MAP）法、アンモニアトリッピング法が知られている（非特許文献1～3）。HAP法およびMAP法は、高濃度栄養塩類含有排水としての下水汚泥またはし尿中のリンを回収する方法である。これらの方法では、リンおよび窒素分を沈殿物（固形物）として回収できるが、排水処理の工程で利用されることが多く、排水中の濁度成分の除去などの前処理を行うことが必要であった。アンモニアトリッピング法は、排水に含まれる高濃度にアンモニア性窒素をアンモニアガスとして液相から気相へ追い出し、ガス中のアンモニアを回収する方法である。この方法もまた、排水処理の工程で利用されることが多く、回収されたアンモニアも触媒分解にて処理されていた。

[0004] 近年、膜を利用し排水中の栄養塩類を回収する方法の開発が試みられてい

る。これらの方法では、膜としてMF膜（精密ろ過膜）、UF膜（限外ろ過膜）、NF膜（ナノろ過膜）を使用し、圧力を駆動力とした拡散により栄養塩類が回収できる。これらの膜処理方法は、省スペースで比較的低コストで利用できることから、家畜ふん尿およびそのメタン発酵残渣において利用されていた（非特許文献4）。しかしながら、水頭差による静圧をかけると膜表面に目詰まり（ファウリング）が発生し、栄養塩類の移動が遅くなるなどの問題があり、継続的に使用することができなかった。

さらに、膜を利用する方法として、膜分離、電気透析、蒸留のプロセスを組み合わせ、栄養塩類を回収する方法も知られている（非特許文献5）。しかしながら、このような方法は、複数のプロセスを経なければならないため、コストが高くなることが課題であった。目詰まりの可能性が低く、比較的効率的に排水中の栄養塩類を回収する方法として、塩水炭水化に用いられるRO膜（逆浸透膜）の原理を逆応用であるFO膜（正浸透膜）の利用が知られているが、浸透圧を利用するには回収側の塩類濃度を高く（水酸化ナトリウム3.5M）設定する必要がある、回収された窒素成分の利用用途が限定されるとの課題であった。

[0005] これまでの栄養塩類の回収方法では種々の問題があることから、藻類の培養・回収に十分に利用できなかった。そのため、藻類の培養において、低コストで有用な栄養塩類の供給する方法が強く求められている。膜を利用する方法として、孔径0.45 μm 以下の膜を利用し、消化液と培養液の栄養塩類の濃度差を駆動力として拡散により分離された栄養塩類を培養液に供給して、藻類を培養する方法は報告されていない。

先行技術文献

非特許文献

- [0006] 非特許文献1：萩野隆生、平島剛：下水汚泥からのリン回収プロセスの開発，環境資源工学，52:172-182，2005
- 非特許文献2：白毛宏和：MAP法によるリン回収資源化システム，Journal of Environmental Biotechnology，Vol. 4，No. 2，109-115，2005

非特許文献3：高橋潤一：バイオガスプラント発酵消化液のアンモニアストリッピングによる未利用資源の飼料化，グリーンテクノ情報，Vol.3，No.33. 5-10，2007

非特許文献4：Mehta, C. M., Khunjar, W. O., Nguyen, V., Tait, S., & Bastone, D. J. (2015, February 16). Technologies to recover nutrients from waste streams: A critical review. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, Vol. 45, pp. 385-427

非特許文献5：矢部光保：メタン発酵消化液からの肥料成分の分離濃縮回収，アグリバイオ，Vol. 3，No. 4，370-374，2019

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、膜を利用した、新たな栄養塩類の供給・回収方法を提供すると共に、連続的に藻類を培養することで、低コストかつ省スペースでバイオ燃料やバイオエネルギーの生産を実用化し得る、高濃度栄養塩類含有消化液から栄養塩類を藻類の培養に適した供給速度で培養液中に供給し、低コストで大量に藻類を培養する方法およびそのための藻類培養システムを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、反応槽中の消化液槽と培養槽の間に孔径0.45 μm の膜を設置することにより、膜の目詰まりを防ぎ、さらに、消化液槽および培養槽の液量を同量に保ち続けることで、消化液中の高濃度栄養塩類が消化液槽と培養槽の栄養塩類の濃度差を利用した拡散によって膜を通じて培養槽に供給され、藻類が供給された栄養塩類を消費するサイクルを繰り返すことによって、連続的に藻類を培養できることを見出した。本発明は、これらの知見に基づき完成されたものである。

[0009] すなわち、本発明は、以下の態様を提供するものである。

[項1] 高濃度栄養塩類を含有する消化液を含む消化液槽、孔径0.45

μm 以下の膜ならびに培養液および藻類を含む培養槽を備えた反応槽を用いた藻類の培養方法であって、

消化液槽と培養槽における栄養塩類の濃度差を利用した拡散により消化液に含まれる栄養塩類を膜を介して培養液に供給する工程を含む、藻類の培養方法。

[項 2] 栄養塩類の供給速度が、 $177 \sim 188 \text{ g-N/m}^2/\text{d}$ である、項 1 に記載の方法。

[項 3] 該膜が、 0.0193 m^2 以上の面積を有する、項 1 または項 2 に記載の方法。

[項 4] 藻類の培養速度が、 $49 \sim 234 \text{ g/m}^3/\text{d}$ である、項 1 ～項 3 のいずれか一項に記載の方法。

[項 5] 消化液槽および培養槽がさらにポンプを備え、該ポンプにより各液を同一槽内で循環させ、消化液および培養液の液量を同じに保つ工程をさらに含む、項 1 ～項 4 のいずれか一項に記載の方法。

[項 6] 培養槽に CO_2 を供給する工程をさらに含む、項 1 ～項 5 のいずれかに記載の方法。

[項 7] 培養槽にリン酸イオン (PO_4^{3-}) を供給する工程をさらに含む、項 1 ～項 6 のいずれかに記載の方法。

[項 8] 該消化液が、メタン発酵消化液である、項 1 ～項 7 のいずれかに記載の方法。

[項 9] 該培養液が、カルキ抜き水道水、地下水、または河川・湖沼水である、項 1 ～項 8 のいずれかに記載の方法。

[項 10] 該藻類が、微細藻類である、項 1 ～項 9 のいずれかに記載の方法。

[項 11] 該膜が、精密ろ過膜 (MF 膜) である、項 1 ～項 10 のいずれかに記載の方法。

[項 12] 該栄養塩類が、アンモニア態窒素、硝酸態窒素、リン酸態リン、オルトケイ酸、カリウム、カルシウム、マグネシウムおよび硫黄からなる

群から選択される少なくとも１種を含む、項１～項１１のいずれかに記載の方法。

〔項１３〕 消化液槽、孔径 $0.45\mu\text{m}$ 以下の膜および培養槽を備えた藻類培養システムであって、該消化液槽が高濃度栄養塩類を含有する消化液を含み、該培養槽が培養液および藻類を含み、該膜が消化液槽と培養槽の間に仕切りとして設置されることを特徴とする、藻類培養システム。

〔項１４〕 培養槽中の藻類が栄養塩類を消費することによって、消化液槽および培養槽の濃度差を維持し、濃度拡散により消化液に含まれる栄養塩類を培養液に供給することを特徴とする、項１３に記載の藻類培養システム。

〔項１５〕 該消化液槽、該膜および該培養槽の順で横一列に設置する、項１３または項１４に記載の藻類培養システム。

〔項１６〕 該消化液槽、該膜および該培養槽の順で縦一列に設置する、項１３または項１４に記載の藻類培養システム。

〔項１７〕 高濃度栄養塩類を含有する消化液を含む消化液槽、孔径 $0.45\mu\text{m}$ 以下の膜ならびに培養液および藻類を含む培養槽を備えた反応槽を用いた栄養塩類の供給方法であって、

培養槽中の藻類が栄養塩類を消費することで、消化液槽および培養槽の栄養塩類の濃度差を維持し、濃度拡散により消化液に含まれる栄養塩類を膜を介して培養液に供給することを特徴とする、栄養塩類の供給方法。

発明の効果

〔0010〕 本発明によれば、消化液から栄養塩類を藻類の培養に適した供給速度かつ必要な量で供給できる。また、濁度成分の除去などの前処理を必要とせずに、栄養塩類を供給することができることから、低コストでの藻類の培養を実現することができる。

さらに、本発明によれば、大量に藻類を培養することも可能となり、商業的規模でのバイオ燃料やバイオエネルギーの生産の実用化が期待できる。

図面の簡単な説明

〔0011〕 〔図１〕本発明に係る藻類培養システムの一例を示す概略構成図である。（a）

は、横型であり、(b)は、縦型である。 Q_d は、消化液槽への流入量を示し、 Q_c は、培養槽への流入量を示す。

[図2] 20倍希釈消化液、50倍希釈消化液、100倍希釈消化液およびCSi培地から調製された各培養液の蛍光強度の経時的变化を示す。

[図3] 混合ガス(CO_2 ガス)添加または大気添加による土着微細藻類の培養の実験装置の概略図である。混合ガス(CO_2 ガス)添加による培養の実験装置は、 CO_2 ガスと空気を混合し、 CO_2 ガス濃度を約10%に調整した気体を含むアルミニウムガスバッグ(400mL)がチューブおよびチューブ継ぎ手で接続されている、希釈消化液(100mL)および微細藻類液(20mL)を含むブチルゴムアルミシール栓のバイアル瓶(容積228mL)に、大気添加による培養の実験装置は、希釈消化液(100mL)および微細藻類液(20mL)を含む通気性シリコン栓をしたバイアル瓶(容積228mL)である。

[図4] 消化液中の濁度成分と栄養塩類を分離させる実験装置の概略図である。Hは、液量(水位)を表し、 $\Phi 40$ は口径40mmを表す。

[図5] 図4に示される実験装置を用いて得られた培養液の光の透過率(%)の経時的变化を示す。○は実験1回目における培養液の光の透過率の経時的变化を示し、●は実験2回目における培養液の光の透過率の経時的变化を示す。透過率34.9%のラインは、実施例1に示される、微細藻類の培養に最適とされる50倍希釈消化液の光の透過率を示す。

[図6] 消化液槽および培養槽中のアンモニウムイオン(NH_4^+)(g)の経時的变化を示す。◇は実験1回目における消化液槽中のアンモニウムイオン(NH_4^+)の経時的变化を示し、◆は実験2回目における消化液槽中のアンモニウムイオン(NH_4^+)の経時的变化を示し、△は実験1回目における培養槽中のアンモニウムイオン(NH_4^+)の経時的变化を示し、▲は実験2回目における培養槽中のアンモニウムイオン(NH_4^+)の経時的变化を示す。

[図7] 消化液槽および培養槽中のカリウムイオン(K^+)(g)の経時的变化を示す。◇は実験1回目における消化液槽中のカリウムイオン(K^+)の経時

的变化を示し、◆は実験 2 回目における消化液槽中のカリウムイオン (K^+) の経時的変化を示し、△は実験 1 回目における培養槽中のカリウムイオン (K^+) の経時的変化を示し、▲は実験 2 回目における培養槽中のカリウムイオン (K^+) の経時的変化を示す。

[図8]消化液槽から培養槽への単位時間単位面積当たりの移動量（分離フラックス）および培養槽から消化液槽への水の移動に伴う NH_4^+ 移動量（移動フラックス）を示す。

[図9]1 日目から 28 日目の培養槽内の微細藻類の量を示す。なお、8～10 日目の濃度は測定していない。培養期間内の、○は、蒸留水を投入した日、△は、消化液を入れ替えた日、□は、栄養塩を添加した日を示す。

[図10]1 日目から 28 日目の消化液・培養液中の PO_4^{3-} 量を示す。なお、8 および 9 日目の PO_4^{3-} 量は測定していない。グラフ内の、■は、消化液中の PO_4^{3-} 量、□は、培養液中の PO_4^{3-} 量を示し、そして、培養期間内の、○は、蒸留水を投入した日、△は、消化液を入れ替えた日、□は、栄養塩を添加した日を示す。

[図11]1 日目から 28 日目の消化液・培養液中の NH_4^+ 量を示す。なお、8 および 9 日目の NH_4^+ 量は測定していない。グラフ内の、■は、消化液中の NH_4^+ 量、□は、培養液中の NH_4^+ 量を示し、そして、培養期間内の、○は、蒸留水を投入した日、△は、消化液を入れ替えた日、□は、栄養塩を添加した日を示す。

発明を実施するための形態

[0012] 以下に、本発明について詳細に説明する。

[0013] 本発明は、高濃度栄養塩類を含有する消化液を含む消化液槽、孔径 0.45 μm 以下の膜ならびに培養液および藻類を含む培養槽を備えた反応槽を用いた藻類の培養方法を提供するものである。

[0014] 本発明の藻類の培養方法は、培養槽中の藻類が栄養塩類を消費することによって生じる消化液槽と培養槽における栄養塩類の濃度差を利用した拡散により消化液に含まれる栄養塩類を膜を介して培養液に供給することを特徴と

する。

[0015] 本発明において、「藻類」とは、酸素発生型光合成を行う生物のうち、主に地上に生息するコケ植物、シダ植物、種子植物を除いたものをいう。本発明の藻類は、ミドリムシなどの生合成をする微細生物であってもよい。藻類は、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

[0016] 本発明の藻類は、好ましくは、微細藻類（例えば、土着微細藻類）である。ここで、微細藻類とは、人の肉眼では、その個々の存在が認識できないような微小な藻類を意味する。微細藻類は原核生物および真核生物のいずれであってもよい。

[0017] 微細藻類としては、例えば、緑藻類（Chlorophyta）、灰色藻類（Glaucophyta）、紅色藻類（Rhodophyta）、クララクニオン藻類（Chlorarachniophyta）、ユーグレナ類（Euglenophyta）、クリプト藻類（Cryptophyta）、褐藻類（Phaeophyta）、ハプト藻類（Haptophyta）、不等毛藻類（Heterokontophyta）、渦鞭毛藻類（Dinophyta）、クロメラ藻類（Chromerida）、藍藻類（Cyanobacteria）等のいずれかに帰属する微細藻類が挙げられる。微細藻類は帰属分類群が未確定であってもよく、分子系統学的にこれらの分類群に含まれるか、または近縁関係にあることが示されていればよい。

[0018] 本発明の培養方法では、藻類は1種類を単独でまたは2種類以上を組み合わせ用いることができる。他の生物と共生関係にある場合は、その生物とともに用いてもよい。

[0019] 微細藻類を入手する方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、自然界より採取する方法、市販品を用いる方法、保存機関や寄託機関から入手する方法などが挙げられる。

[0020] 本発明の藻類の培養方法において培養された藻類は、培養液から遠心分離、凝集剤による沈降分離、膜分離などの通常用いられる方法により回収することができる。また、培養液の液面上に形成されたバイオフィルムを堆積さ

あせて回収することもできる。

[0021] 本発明において、「消化液」とは、家畜排泄物、食品加工残渣、廃食用油、生ごみ、下水汚泥、し尿、浄化槽汚泥などを原料として、バイオマスプラント（ＢＧＰ）で発酵処理された後に得られた残渣をいう。本発明の消化液は、例えば、メタン発酵消化液である。また、本発明の消化液は、原料の大量確保が容易であることから、家畜排泄物（例えば、牛ふん）由来のものが好ましい。

[0022] 本発明において、「栄養塩類」とは、藻類（例えば、微細藻類）の栄養として必要な塩類をいう。例えば、栄養塩類として、アンモニア態窒素、硝酸態窒素、亜硝酸態窒素、有機態窒素などの窒素、リン酸態リン、有機態リンなどのリン、オルトケイ酸などのケイ素、カリウム、カルシウム、マグネシウム、硫黄などが挙げられる。

本発明において、栄養塩類は、藻類が増殖するための栄養源として利用することができる。

[0023] 本発明において、「培養液」とは、光の透過率が高い溶液をいう。例えば、培養液として、カルキ抜き水道水、地下水、河川・湖沼水などが挙げられる。本発明の培養液は、光の透過率が34.9%以上であることが望ましい。例えば、本発明の培養液は、蒸留水を用い、北海道大学構内の池の底層水を初期の土着微細藻類として植種した。

本発明の培養液は、例えば、消化液槽から栄養塩類が供給され、その供給された栄養塩類を土着微細藻類が消費し培養されるサイクルを繰り返すことによって、低濃度の栄養塩類が維持される。

[0024] 本発明において、「膜（フィルター）」とは、消化液槽と培養槽の間の仕切りとして使用するものである。本発明の膜は、例えば、精密ろ過膜（ＭＦ膜）、限外ろ過膜（ＵＦ膜）、ナノろ過膜（ＮＦ膜）などが挙げられる。本発明の膜は、孔径0.45 μm 以下のものが好ましい。膜の孔径が0.45 μm を超えると、消化液中の濁度成分も培養液中に移動するため、培養液の光の透過率が低下し、藻類の生合成を阻害する。また、本発明の膜は、槽の

容積 1 m^3 当たり、 0.0193 m^2 以上の面積であり、好ましくは 0.0256 m^2 以上の面積である。

[0025] 本発明において、「濁度成分」とは、液に濁りを与える物質であり、粒径が $0.45 \mu\text{m}$ を超えるものをいう。本発明の濁度成分は、例えば、粒子状の有機性物質、プランクトンおよびその他微生物、浮遊物質などが挙げられる。

[0026] 本発明の藻類の培養方法は、 $177 \sim 188 \text{ g-N/m}^2/\text{d}$ の供給速度で栄養塩類を供給することができる。

[0027] 本発明の藻類の培養方法は、 $49 \sim 234 \text{ g/m}^3/\text{d}$ の培養速度（増殖速度）で藻類を培養することができる。本発明において、その培養速度は、 $49 \sim 73 \text{ g/m}^3/\text{d}$ 、 $49 \sim 78 \text{ g/m}^3/\text{d}$ 、 $49 \sim 93 \text{ g/m}^3/\text{d}$ 、 $49 \sim 126 \text{ g/m}^3/\text{d}$ 、 $73 \sim 93 \text{ g/m}^3/\text{d}$ 、 $73 \sim 126 \text{ g/m}^3/\text{d}$ 、 $73 \sim 234 \text{ g/m}^3/\text{d}$ 、 $78 \sim 93 \text{ g/m}^3/\text{d}$ 、 $78 \sim 126 \text{ g/m}^3/\text{d}$ 、 $78 \sim 234 \text{ g/m}^3/\text{d}$ 、 $93 \sim 126 \text{ g/m}^3/\text{d}$ 、 $93 \sim 234 \text{ g/m}^3/\text{d}$ または $126 \sim 234 \text{ g/m}^3/\text{d}$ であってもよい。

本発明の藻類の培養方法は、消化液中の窒素供給の量に応じて培養槽にリン源、好ましくはリン酸イオン (PO_4^{3-}) を適当な割合で供給することにより、藻類の培養速度を上げることができる。例えば、消化液中の窒素供給量：培養槽のリン酸イオン供給量の割合は、7：1である。

[0028] 本発明の藻類の培養方法は、攪拌装置、好ましくはポンプにより消化液槽および培養槽内にそれぞれ消化液および培養液を循環させて、消化液および培養液の液量を同じ水位に保ち、消化液槽および培養槽内の栄養塩類の濃度差を維持することができる。

[0029] 本発明の藻類の培養方法は、培養槽に炭酸源、好ましくは CO_2 を供給することにより、藻類の培養を増強することができる。

[0030] 本発明の藻類の培養方法は、消化液中の窒素供給の量に応じて培養槽にリン源、好ましくはリン酸イオン (PO_4^{3-}) を適当な割合で供給することにより、藻類の培養を増強することができる。例えば、消化液中の窒素供給量：

培養槽のリン酸イオン供給量の割合は、7 : 1である。例えば、本発明の藻類の培養方法において、培養槽に 1.05 mol/m^3 濃度でリン酸イオンを供給することにより藻類の培養速度が上がり、藻類の培養が增強される。

[0031] 本発明における「藻類培養システム」は、消化液槽と、膜（フィルター）と、培養槽とを備えるものである。消化液槽は、高濃度塩類を含有する消化液を含み、培養槽は、培養液および藻類を含む。消化液槽および培養槽は、攪拌装置、温度制御装置、pH調節装置、濁度測定装置、光制御装置、 CO_2 などの特定気体濃度測定装置などの1以上の装置を有していてもよい。膜は、消化液槽と培養槽の間に設置され、その孔径は、 $0.45 \mu\text{m}$ 以下が好ましい。

[0032] 本発明における藻類培養システムは、図1（a）および（b）に示されるように、消化液槽、膜および培養槽の順に横一列に設置されたものであってもよく、また、縦一列に設置されたものであってもよい。

[0033] 本発明における藻類培養システムは、例えば、口径40mmの塩化ビニル製の透明パイプをフランジでパッキンと $0.45 \mu\text{m}$ のフィルター挟み、接続させ、フィルターを隔てた消化液槽および培養槽それぞれに消化液、蒸留水を600mLずつ入れた、水位を同じにして、内部を攪拌するため、ポンプにより槽の下部から上部に液を 400 mL/min で循環させて使用することができる。

[0034] 本発明における藻類培養システムは、培養槽中の藻類が栄養塩類を消費することによって、消化液槽および培養槽の濃度差を維持し、濃度拡散により消化液に含まれる栄養塩類を培養液に供給することができる。

[0035] 本発明における藻類培養システムは、藻類の培養に適した供給速度で栄養塩類を培養槽に供給でき、低コストを実現できる。

[0036] 本発明における藻類培養システムは、濁度成分を多量に含む高濃度栄養塩類含有消化液を用いても濁度成分の移動を最小限に抑制することができる。

[0037] 図1に示される本発明の藻類培養システムにおける、消化液槽の栄養塩類の濃度変化は、式（1）により計算することができる。

[数1]

$$V_d \frac{dC_{sd}}{dt} = Q_d(C_{sd}^{in} - C_{sd}) - FA_f \cdots (1)$$

[0038] 図1に示される本発明の藻類培養システムにおける、培養槽の栄養塩類の濃度変化は、式(2)により計算することができる。

[数2]

$$V_c \frac{dC_{sc}}{dt} = FA_f - r_x Y_{xs} V_c \cdots (2)$$

[0039] 図1に示される本発明の藻類培養システムにおける、培養槽の藻類濃度の濃度変化は、式(3)により計算することができる。

[数3]

$$V_c \frac{dC_x}{dt} = r_x V_c - C_x Q_c \cdots (3)$$

[0040] 図1に示される本発明の藻類培養システムにおける、栄養塩類分離フラックス(消化液槽から培養槽への単位時間単位面積当たりの栄養塩類の移動量)は、式(4)により計算することができる。

[数4]

$$F = k(C_{sd} - C_{sc}) \cdots (4)$$

[0041] 上記式中において、Vは槽の容積(V_dは消化液槽の容積、V_cは培養槽の容積)、C_sは栄養塩類濃度(C_{sd}は消化液槽中の栄養塩類濃度、C_{cd}は培養槽中の栄養塩類濃度)、C_xは藻類濃度、Qは槽への流量(Q_dは消化液槽への流量、Q_cは培養槽への流量)、r_xは微細藻類の増殖速度、Y_{xs}は微細藻類当りの栄養塩消費量、Fは栄養塩類分離フラックス、A_fはフィルター面積、kは膜の移動速度係数を意味する。

[0042] 各濃度の定常状態を仮定し、定常状態において、藻類の増殖速度および藻類当りの栄養塩類消費量は一定であるとした場合、消化液槽の栄養塩類濃度は、式(5)により計算することができる。

[数5]

$$C_{sd} = C_{sd}^{in} - \frac{r_x Y_{xs} V_c}{Q_d} \cdots (5)$$

[0043] 各濃度の定常状態を仮定し、定常状態において、藻類の増殖速度および藻類当たりの栄養塩類消費量は一定であるとした場合、培養槽の栄養塩類濃度は、式（６）により計算することができる。

[数6]

$$C_{sc} = C_{sd}^{in} - \frac{r_x Y_{xs} V_c}{Q_d} - \frac{r_x Y_{xs} V_c}{k A_f} \dots (6)$$

[0044] 各濃度の定常状態を仮定し、定常状態において、藻類の増殖速度および藻類当たりの栄養塩類消費量は一定であるとした場合、藻類の濃度は、式（７）により計算することができる。

[数7]

$$C_x = \frac{r_x V_c}{Q_c} \dots (7)$$

[0045] 本発明は、高濃度栄養塩類を含有する消化液を含む消化液槽、孔径 0.45 μm 以下の膜ならびに培養液および藻類を含む培養槽を備えた反応槽を用いた栄養塩類の供給方法であって、培養槽中の藻類が栄養塩類を消費することで、消化液槽および培養槽の栄養塩類の濃度差を維持し、濃度拡散により消化液に含まれる栄養塩類を膜を介して培養液に供給することを特徴とする、栄養塩類の供給方法を提供するものである。

実施例

[0046] 以下に実施例を示すが、これらは本発明をより良く理解するためのものであり、本発明の範囲を限定するものではない。

[0047] 実施例 1：藻類培養に有用な消化液の検討

50 mL の培地（牛ふんメタン発酵消化液および標準培地（C S i））に 10 mL の環境水（北海道大学の構内にある池の底層より採取）を添加して、培養液を調製した。また、牛ふんメタン発酵消化液は、遠心分離して、蒸留水で 20 倍、50 倍および 100 倍に希釈して、20 倍希釈消化液、50 倍希釈消化液および 100 倍希釈消化液を調製した。調製した各培養液を 4 mL 採取し、励起波長 436 nm および蛍光波長 684 nm の蛍光分光光度計（FP-6600，日本分光）を用いて、12 日間蛍光強度を測定した。

さらに、各希釈消化液について、光の透過率を測定した。なお、光の波長は $784\text{ }\mu\text{m}$ とし、 1 cm の石英セルに蒸留水を入れた状態の透過率を 100% とした。

[0048] 各培養液の蛍光強度の経時的变化を図2に示す。50倍希釈消化液および100倍希釈消化液では、C S i 培地と同様に、蛍光強度が増加する傾向が見られ、20倍希釈消化液では、蛍光強度が増加する日数は他の消化液およびC S i 培地よりも遅れたが、蛍光強度の増加は同様であった。

[0049] 各希釈消化液の透過率を表1に示す。

[表1]

	光透過率 (%)
20倍希釈消化液	4.7
50倍希釈消化液	34.9
100倍希釈消化液	55.9

[0050] かかる結果によれば、光の透過率が 34.9% 以上である消化液であれば微細藻類の培養が可能であることが示唆された。また、蛍光強度が最も高い50倍希釈消化液が微細藻類の培養に最適であると考えられる。

[0051] 実施例2：光の透過を阻害する要因の検討

消化液を、孔径 $1\text{ }\mu\text{m}$ または $0.45\text{ }\mu\text{m}$ のメンブレンフィルターを用いてろ過し、消化液原液および各フィルターにてろ過したろ液の光の透過率を、分光光度計（U-1800，日立ハイテクサイエンス）を用いて測定した。さらに、粒状活性炭を 1 g または 0.25 g を 50 mL の消化液に添加し、 200 rpm で 0.5 時間以上振とうした後、前記と同様の方法でろ過し、ろ液の光の透過率を測定した。なお、光の波長は $684\text{ }\mu\text{m}$ とし、 1 cm の石英セルに蒸留水を入れた状態の透過率を 100% とした。

[0052] 消化液原液およびろ液の光の透過率を表2に示す。

[表2]

フィルター孔径		1 μ m	0.45 μ m
	消化液原液	ろ液	ろ液
原液	0	0	40.6
粒状活性炭添加(1g/50mL)	—	0	80.0
粒状活性炭添加(0.25g/50mL)	—	0	78.4

[0053] 上記結果に示されるように、消化液原液の光の透過率はゼロであり、1 μ m フィルターのろ液では、活性炭の量によらず、光の透過率は変化しなかった。一方、0.45 μ m フィルターのろ液では、活性炭を添加することにより、消化液原液に比べて光の透過率は大きく改善された。これにより、粒状活性炭に着色成分（0.45 μ m 以下）が吸着していることを示唆された。また、1 μ m フィルターのろ液では光の透過率が改善されなかったことから、着色成分が除去されたとしても1 μ m 以下の粒子が存在すると、光の透過率は改善しないことを示された。

この結果、消化液中では着色成分よりも粒子径の大きい濁度成分が光の透過を阻害するものであり、藻類の培養において、濁度成分と栄養塩類を分離することが必要であることが示された。また、また、濁度成分および栄養塩類の分離には孔径0.45 μ m 以下のフィルターを利用することが有用であることも示された。

[0054] 実施例3：土着微細藻類の培養における混合ガス（CO₂ガス）添加による効果

牛ふんのバイオマスプラント（BGP）から採取した消化液を遠心分離し、蒸留水で50倍に希釈して波長684 nm光の透過率を28%とし、リン源としてKH₂PO₄を60 mg/Lになるように添加して、希釈消化液を調製した。微細藻類液は、北海道大学構内大野池の底部から採取した環境水中の土着微細藻類を、希釈消化液で10日間程度あらかじめ培養したものを用いた。希釈消化液（100 mL）および微細藻類液（20 mL）をブチルゴムアルミシール栓のバイアル瓶（容積228 mL）に加えたのち、CO₂ガスと空気を混合し、CO₂ガス濃度を約10%に調整した気体を400 mL加え

たアルミニウムガスバッグ（ＧＬサイエンス）を、チューブおよびチューブ継ぎ手を用いて接続したバイアル瓶（図３の左図）を用いて、ＣＯ₂ガス添加による土着微細藻類の培養効果を検討した。対照として、希釈消化液（１００ｍＬ）および微細藻類液（２０ｍＬ）を加えた通気性シリコンで栓をしたバイアル瓶（図３の右図）を用いて、大気添加による土着微細藻類の培養効果を検討した。各バイアル瓶を、表３の培養条件にて３日間培養を行った。

[表3]

土着微細藻類の培養条件

	大気培養	ＣＯ ₂ ガス培養
培養液との接触ガス	大気	混合ガス (ＣＯ ₂ ガス濃度：12.32%)
リン源の培養液中濃度 [mol/m^3] (KH_2PO_4 添加)	0.232	
光量子束密度 [$\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$] (培養液面上)	207	
培養液深さ [cm]	6.35	
液面面積 [cm^2]	18.9	
培養温度 [°C]	23	
培地の光の透過率 [%]	28.1	
初期の土着微細藻類濃度 [mg/L]	0.07	
初期の NH_4^+ 濃度 [$\text{mg}-\text{NH}_4/\text{L}$]	45.6	

[0055] 大気培養およびＣＯ₂培養の結果を表４に示す。

[表4]

	大気培養	CO ₂ ガス培養
培養後の土着微細藻類濃度 [mg/L]	176	250
平均増殖速度 [$\text{g}/\text{m}^3/\text{d}$]	49	73
増殖微細藻類当たりの NH_4 消費量 [g/g]	0.074	0.062

[0056] 表４に示されるように、混合ガスによるＣＯ₂ガス培養での土着微細藻類濃度は、大気培養での土着微細藻類濃度に比べて、より高いものであった。これは、大気からのＣＯ₂ガス供給よりも混合ガスによるＣＯ₂ガス供給が多いことが考えられる。

したがって、ＣＯ₂ガスを供給することにより、藻類の培養が活性化されることが示唆された。

[0057] 実施例4：消化液中の濁度成分と栄養塩類の分離試験

図4に示される実験装置を用いて、培養液の光の透過率ならびに消化液および培養液のアンモニウムイオン (NH_4^+) およびカリウムイオン (K^+) 濃度を測定して、濁度成分と栄養塩類が分離されているかを確認した。具体的には、口径40mmの塩化ビニル製の透明パイプをフランジでパッキンと0.45 μm の精密ろ過 (MF) 膜を挟み、接続し、膜を隔てて、消化液槽と培養槽とし、それぞれに消化液と蒸留水を600mLずつ加え、水位を同じにした。内部を攪拌するため、ポンプにより槽の下部から上部に液を400mL/minで循環させた。経時的に、水位Hを計測し、各槽から5mLずつ液を採取し、蛍光波長684nmの蛍光分光光度計を用いて培養液の光の透過率を測定し ($n=2$)、また、両液のアンモニウムイオンおよびカリウムイオン濃度を測定した ($n=2$)。かかる試験期間は7日間である。

[0058] 培養液の光の透過率の経時的变化を図5に示す。時間の経過とともに、光の透過率は低下したが、その変化は徐々に緩やかになった。これは、0.45 μm 未満の着色成分が膜を透過し、濃度差が小さくなるにつれ移動速度が小さくなったと考えられる。

培養液の光の透過率は、実施例1に示される、微細藻類の培養に最適と考える50倍希釈消化液の光の透過率 (34.9%) より高い値であることから、藻類の培養の阻害となる濁度成分の移動が最小限に抑制できたことが示された。

[0059] 消化液槽および培養槽のアンモニウムイオンおよびカリウムイオン濃度の時間変化を、それぞれ図6および図7に示す。 NH_4^+ および K^+ イオンともに、時間とともに培養液側の濃度が増加し、経過時間と共に濃度の上昇は緩やかになった。逆に、消化液側の濃度は減少した。この結果、消化液槽から培養槽に栄養塩類が供給されていることが示された。

[0060] 消化液槽から培養槽への単位時間単位面積当たりの移動量 (分離フラックス) および培養槽から消化液槽への水の移動に伴う NH_4^+ 移動量 (移動フラックス) を図8に示す。分離フラックスを両槽の濃度差と培養槽の濃度変化

から算出して、濃度差による移動を観察した。移動フラックスは、両槽の水頭差から水分移動量を求めて、培養槽の濃度を乗じて算出した。水頭は、経時的に培養槽側が高くなる傾向にあり、3～4 cmに達することを確認した。これは、消化液側の溶質濃度が培養液側より濃いことにより、両槽に浸透圧差が生じ、水が消化液側へ移動したものと考えられる。

図8に示すように、移動フラックスは、培養液側への分離フラックスよりも十分小さかったので、培養槽側への分離フラックスは両槽の濃度差による拡散移動が支配的であると考えられる。また、多少のばらつきはあるものの、濃度差と分離フラックスの間には直線的な関係が見られ、分離フラックスが濃度差に依存していると認められる。直線近似すると、傾きは0.087 m/d、相関係数は0.908であった。

[0061] 実施例5：微細藻類の大量培養の検討

図1に示される藻類培養システムにおいて、単位体積を一つのユニットとし、槽の容積を1 m³とし、表5に示される消化液の発生にかかるパラメータとして、乳牛100頭規模から得られた消化液を用いた場合の微細藻類の増殖速度を予測した。ふん尿発生量および消化液の含水率は、それぞれ、新エネルギー財団：バイオマス技術ハンドブック、p.240（2008）、オーム社およびHeinz Schulz, Barbara Eder：バイオガス実用技術p.135（2002）に記載のパラメータを使用した。また、消化液のNH₄濃度のパラメータはイオンクロマトグラフィー分析装置（DIONEX DX-120、Thermo Fisher Scientific K.K.）を用いて得られた実験値を使用した。

[表5]

ふん尿発生量	58.9 kg/day/頭
消化液発生率	1 kg-消化液/kg-ふん尿
消化液の含水率	93.24 %
消化液の密度	1000 kg/m ³
消化液のNH ₄ 濃度	2500 g/m ³

[0062] 乳牛100頭規模のバイオガスプラント（発酵槽；BGP）では、1日当りの5.5 m³の消化液が発生することが予測され、その1%を使用すると、消化液槽への流入量（Q_d）は、0.055 m³/dとなる。次いで、表4に示される、大気培養およびCO₂ガス培養における平均増殖速度および微細藻類当たりのNH₄消費量を用いて下式：

[数8]

$$C_{sd} = C_{sd}^{in} - \frac{r_x Y_{xs} V_c}{Q_d} \dots (5)$$

に基づき計算すると、定常時における消化液槽のNH₄濃度は、2434または2418 g/m³となり、高濃度に維持されることが示された。このことから、ユニット当たりの消化液の利用率を高くすると、Q_dが大きくなり、より高濃度の栄養塩類が維持されると予測することができる。

さらに、大気培養およびCO₂ガス培養における培養後の微細藻類濃度を用いて下式：

[数9]

$$C_x = \frac{r_x V_c}{Q_c} \dots (7)$$

に基づいて計算すると、流量はそれぞれ0.28および0.29となり、培養溶液である1 m³を超えないことが示された。バッチ培養試験では、初期の微細藻類量当たり1.55 gのNH₄量が存在し、増殖したことを考えると、少なくとも初期藻類当たりのNH₄量が確保されていれば、律速にならず、定常的な培養が可能であると予測することができる。

これらの算出された結果によれば、定常的な培養において、表4に示される微細藻類濃度の場合に初期と同じ微細藻類当たりのNH₄量にするには、NH₄濃度は272または387 g/m³となる。この定常濃度を培養槽において達成するためには、膜の面積は、下式：

[数10]

$$C_{sc} = C_{sd}^{in} - \frac{r_x Y_{xs} V_c}{Q_d} - \frac{r_x Y_{xs} V_c}{k A_f} \dots (6)$$

に基づいて計算すると、 0.0193 または 0.0256 m^2 となる。膜の移動速度係数は、 0.087 m/s （図5の近似直線の傾き）とした。

[0063] 上記の結果より、微細藻類が増殖できる培養槽濃度を維持し、かつ、両槽の濃度差を定常的に維持することで、微細藻類の培養速度を 49 または $73 \text{ g/m}^3/\text{d}$ を実現できる。ただし、 1 m^3 のユニット当たり、膜面積は 0.0193 または 0.0256 m^2 以上必要となり、また、 NH_4 の分離速度は 188 または $177 \text{ g/m}^2/\text{d}$ である。膜面積が大きい場合ほど、分離速度は小さくなる。

したがって、本発明の藻類培養システムおよび藻類の培養方法では、一般的な藻類の培養速度を達成しつつ、栄養塩類の供給速度を実現できることから、連続的な藻類の培養が可能となり、藻類の大量培養・回収を可能にする。

[0064] 実施例6：微細藻類の培養における栄養塩類の影響

本実験では、藻類培養システムとして、消化液槽、孔径 $0.45 \mu\text{m}$ の精密ろ過膜および 10 L のタライ（培養槽）を備えた装置を用いて、栄養塩類および微細藻類の濃度を測定・解析し、微細藻類の培養における栄養塩類の影響を検討した。

具体的には、以下の手順に従って、培養槽内の微細藻類の濃度ならびに消化液・培養液中の NH_4^+ および PO_4^{3-} の濃度を測定した。本実験では、微細藻類として土着微細藻類を用いた。

（1）培養液（培地）の調製

消化液槽に牛ふんメタン消化液 113 mL を充填し、タライ（培養槽）に 5000 mL の蒸留水を加えて、その培養槽内に消化液槽および膜を含む装置を静置した。次いで、培養槽において、温度を 26°C にし、攪拌機（NZ-1200、東京理化工械）を用いて 190 rpm で5日間攪拌して、培養液を調製した。

なお、培養槽全体を電子天秤の上に静置して蒸留水の蒸発量を測定し、液量を 5000 mL になるように不定期に蒸留水を追加した。

(2) 培養槽内の微細藻類濃度および消化液・培養液中のイオン (NH_4^+ および PO_4^{3-}) 濃度の測定

(1) で調製された培養液に前培養してあった微細藻類を植種した。植種した培養液を、表6の培養条件下で、攪拌機 (NZ-1200、東京理化工機) を用いて250~300 rpmで28日間培養した。培養後24時間ごとに消化液槽から1 mL、培養槽から10 mLの液をサンプリングし、培養槽内の微細藻類濃度および消化液・培養液中の PO_4^{3-} 濃度を測定した。

また、消化液・培養液中の NH_4^+ 濃度を測定して、消化液中の栄養塩類を利用して微細藻類が培養されているかについて検討した。微細藻類濃度は、0.45 μm の精密ろ過膜を用いて培養液中の微細藻類を回収し、105℃で24時間乾燥後、計量した重量から算出し、 PO_4^{3-} および NH_4^+ 濃度は、イオンクロマトグラフィー (DIONEX DX-120、Thermo Fisher Scientific K.K) またはイオンクロマトグラフ (IC-2010、株式会社東京科研) を用いて測定した。

なお、3、6、10、12、14、17、21および25日目に蒸留水の追加、8および21日目に装置内の消化液の入替え、そして、14日目に H_3PO_4 の添加を行った。

[表6]

培養条件	
培養液量 [mL]	3700-5000
培養液深さ [mm]	55-75
光条件 [$\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$]	200-240 (蛍光灯 24時間明)
培養温度 [°C]	26
栄養塩 (KH_2PO_4) 添加 [g]	0.715
初期の微細藻類濃度 [g/L]	0.06
初期の K^+ 濃度 [mg-K ⁺ /L]	41
初期の PO_4^{3-} 濃度 [mg- PO_4^{3-} /L]	100 (1.05 mol/m ³)

[0065] 1日目から28日目の培養槽内の微細藻類の量を図9に示す。なお、8~10日目の濃度は測定していない。

微細藻類植種後9日目あたりまでは微細藻類増殖が見られなかったが、10日目あたりから培養液が緑色になり目視でも微細藻類増殖が確認できた。

12日目に培養液を1L（微細藻類量：0.16g分）回収し、それ以降微細藻類量が徐々に減少し、目視でも培養液の色が薄くなるのが確認できた。

28日目の微細藻類量の測定後に膜分離装置を分解したところ、装置のフランジの隙間に微細藻類が入り込み、微細藻類が増殖していた。装置内部に入り込んでいた微細藻類をブラシで培養液中に落としその量を計算すると0.5gであった。

[0066] 1日目から28日目の消化液・培養液中の PO_4^{3-} 量を、表7および図10に示す。なお、8および9日目の PO_4^{3-} 量は測定していない。

[表7]

培養日数（日）	消化液 PO_4^{3-} （mg）	培養液 PO_4^{3-} （mg）
1	5.79	547.63
2	5.41	544.24
3	2.59	523.93
4	2.73	494.33
5	3.20	464.58
6	—	440.74
7	—	429.69
10	5.10	389.06
11	7.55	344.55
12	5.00	333.97
13	5.31	224.83
14	5.42	212.34
15	5.60	431.02
16	5.59	170.10
17	5.62	190.04
18	5.63	214.98
19	5.80	360.54
20	5.91	350.47
21	4.36	347.51
22	5.24	311.86
23	24.20	269.46
24	7.36	304.84
25	5.07	271.45
26	5.25	269.75
27	5.30	238.57
28	5.46	231.82

[0067] 表7に示されているように、消化液には PO_4^{3-} はほとんど含まれていない

。そのため、培養液中の PO_4^{3-} は添加した KH_2PO_4 由来のものであり、 PO_4^{3-} については消化液と培養液間の移動はほとんど行われていないことが示された。また、培養液中においてほぼ一定速度で PO_4^{3-} が消費されていることから、 PO_4^{3-} を利用して微細藻類を培養できていることが示された。

[0068] さらに、一定期間ごと（1～6日目、10～14日目、15～19日目および19～28日目）の微細藻類の増殖速度を算出した。算出された微細藻類の増殖速度は、 $78 \sim 234 \text{ g} / \text{m}^3 / \text{d}$ であり、大気培養および CO_2 ガス培養の増殖速度に比べて大きい値を示した。なお、各期間の微細藻類の増殖速度は、（初日の培養液中 PO_4^{3-} 量(mg)－最終日の培養液中 PO_4^{3-} 量(mg)） $\times$ 微細藻類のリン酸消費量（ 0.044 mg ）/液量(L)/日数(day)により算出した。例えば、1～6日目の微細藻類の増殖速度は、（1日目の培養液中 PO_4^{3-} 量(547.63 mg)－6日目の培養液中 PO_4^{3-} 量(440.74 mg)) $\times$ 微細藻類のリン酸消費量（ 0.044 mg ）/液量(3.8648 L)/日数(5 day) = 125.71 mg/L/day ($\text{g/m}^3/\text{day}$)となる。

[0069] この結果より、培養液に高濃度のリン酸イオンを供給することにより、藻類の培養が活性化されることが示唆された。

[0070] 1日目から28日目の消化液・培養液中の NH_4^+ 量を、表8および図11に示す。なお、8および9日目の NH_4^+ 量は測定していない。

[表8]

培養日数 (日)	消化液 NH_4^+ (mg)	培養液 NH_4^+ (mg)
1	51.21	125.58
2	55.24	90.40
3	48.13	86.37
4	41.38	54.33
5	32.68	37.09
6	30.01	23.89
7	26.11	ND
10	197.80	ND
11	195.90	ND
12	180.25	ND
13	166.85	ND
14	150.78	29.2
15	123.98	ND
16	102.04	28.05
17	100.22	34.78
18	82.62	15.02
19	72.09	18.33
20	66.62	5.73
21	194.77	9.76
22	218.23	0.11
23	192.02	32.10
24	192.31	35.08
25	164.99	26.41
26	153.37	55.82
27	143.02	51.58
28	129.09	51.94

[0071] 微細藻類植種後 7 日目までは消化液・培養液ともに NH_4^+ 量の減少が認められ、 NH_4^+ が膜を介して消化液から培養液に移動していること、そして、微細藻類によって培養液中で NH_4^+ が消費されていることが示唆された。

8 日目に消化液を入れ替えた後、10 日目から 13 日目にかけて NH_4^+ の全体量は減っているものの、培養液中において NH_4^+ は確認できなかった。これは、増殖した微細藻類によって NH_4^+ の消費量が供給量を上回ったためと考えられる。また、13 日目以降、培養液中において NH_4^+ が確認できるようになったが、これは培養液中の微細藻類増殖速度減少によって微細藻類による NH_4^+ の消費が抑えられ、 NH_4^+ の供給量が消費量を上回ったためと

考えられる。

産業上の利用可能性

[0072] 本発明によれば、消化液から栄養塩類を藻類の培養に適した供給速度かつ必要な量で供給できる。また、本発明は、濁度成分の除去などの前処理を必要とせずに、栄養塩類を供給することができることから、低コストでの藻類の培養・回収を実現することができる。

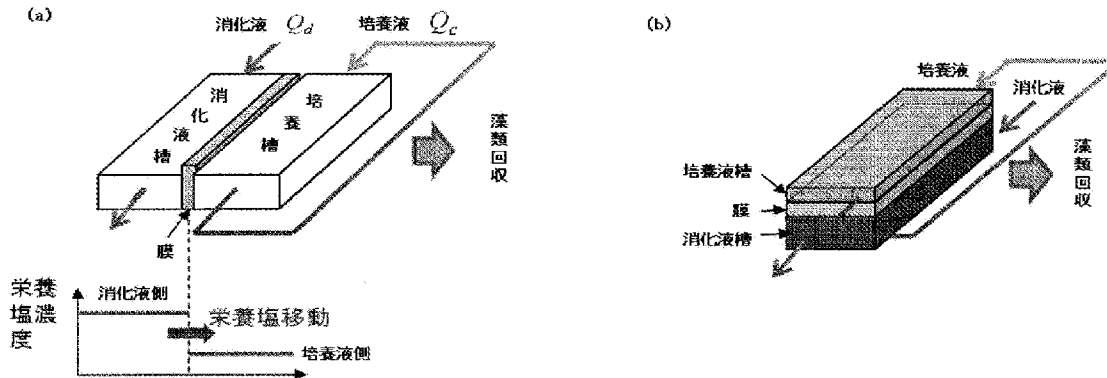
さらに、大量に藻類を培養することも可能となり、商業的規模でのバイオ燃料やバイオエネルギーの生産の実用化が期待できる。

請求の範囲

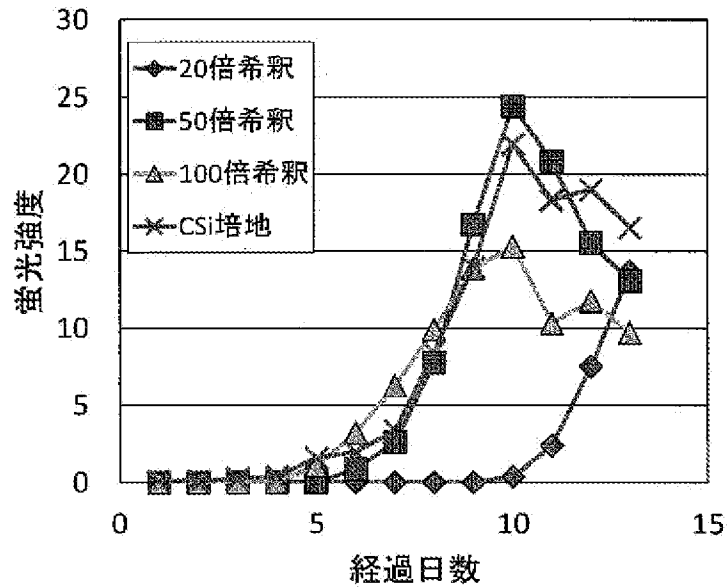
- [請求項1] 高濃度栄養塩類を含有する消化液を含む消化液槽、孔径 $0.45\mu\text{m}$ 以下の膜ならびに培養液および藻類を含む培養槽を備えた反応槽を用いた藻類の培養方法であって、
- 消化液槽と藻類培養槽における栄養塩類の濃度差を利用した拡散により消化液に含まれる栄養塩類を膜を介して培養液に供給する工程を含む、藻類の培養方法。
- [請求項2] 栄養塩類の供給速度が、 $177\sim 188\text{ g-N/m}^2/\text{d}$ である、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 該膜が、 0.0193 m^2 以上の面積を有する、請求項1または2に記載の方法。
- [請求項4] 藻類の培養速度が、 $49\sim 234\text{ g/m}^3/\text{d}$ である、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項5] 消化液槽および藻類培養槽がさらにポンプを備え、該ポンプにより各液を同一槽内で循環させ、消化液および培養液の液量を同じに保つ工程をさらに含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項6] 培養槽に CO_2 を供給する工程をさらに含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項7] 培養槽にリン酸イオン (PO_4^{3-}) を供給する工程をさらに含む、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項8] 該消化液が、メタン発酵消化液である、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項9] 該培養液が、カルキ抜き水道水、地下水、または河川・湖沼水である、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項10] 該藻類が、微細藻類である、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項11] 該膜が、精密ろ過膜 (MF膜) である、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

- [請求項12] 該栄養塩類が、アンモニア態窒素、硝酸態窒素、リン酸態リン、オルトケイ酸、カリウム、カルシウム、マグネシウムおよび硫黄からなる群から選択される少なくとも1種を含む、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項13] 消化液槽、孔径0.45 μ m以下の膜および培養槽を備えた藻類培養システムであって、該消化液槽が高濃度栄養塩類を含有する消化液を含み、該培養槽が培養液および藻類を含み、該膜が消化液槽と培養槽の間に仕切りとして設置されることを特徴とする、藻類培養システム。
- [請求項14] 培養槽中の藻類が栄養塩類を消費することによって、消化液槽および培養槽の濃度差を維持し、濃度拡散により消化液に含まれる栄養塩類を培養液に供給することを特徴とする、請求項13に記載の藻類培養システム。
- [請求項15] 該消化液槽、該膜および該培養槽の順で横一列に設置する、請求項13または14に記載の藻類培養システム。
- [請求項16] 該消化液槽、該膜および該培養槽の順で縦一列に設置する、請求項13または14に記載の藻類培養システム。
- [請求項17] 高濃度栄養塩類を含有する消化液を含む消化液槽、孔径0.45 μ m以下の膜ならびに培養液および藻類を含む培養槽を備えた反応槽を用いた栄養塩類の供給方法であって、
培養槽中の藻類が栄養塩類を消費することで、消化液槽および培養槽の栄養塩類の濃度差を維持し、濃度拡散により消化液に含まれる栄養塩類を膜を介して培養液に供給することを特徴とする、栄養塩類の供給方法。

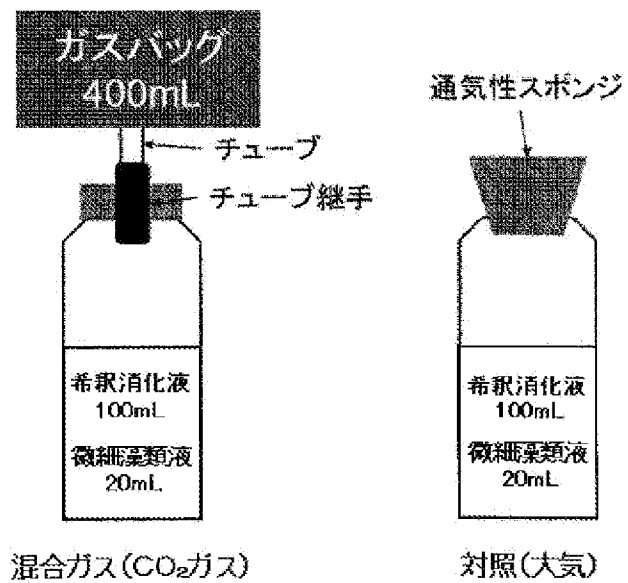
[図1]



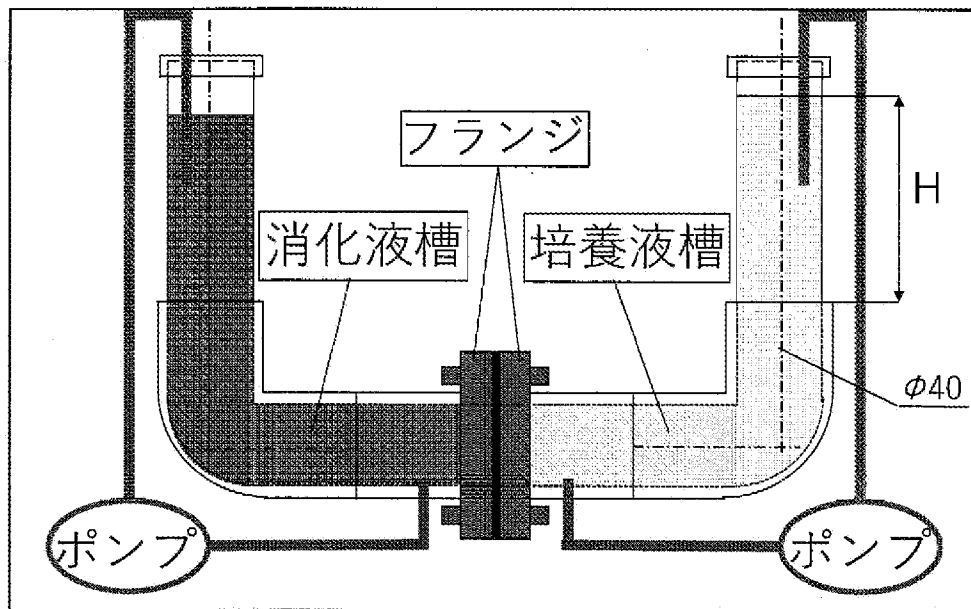
[図2]



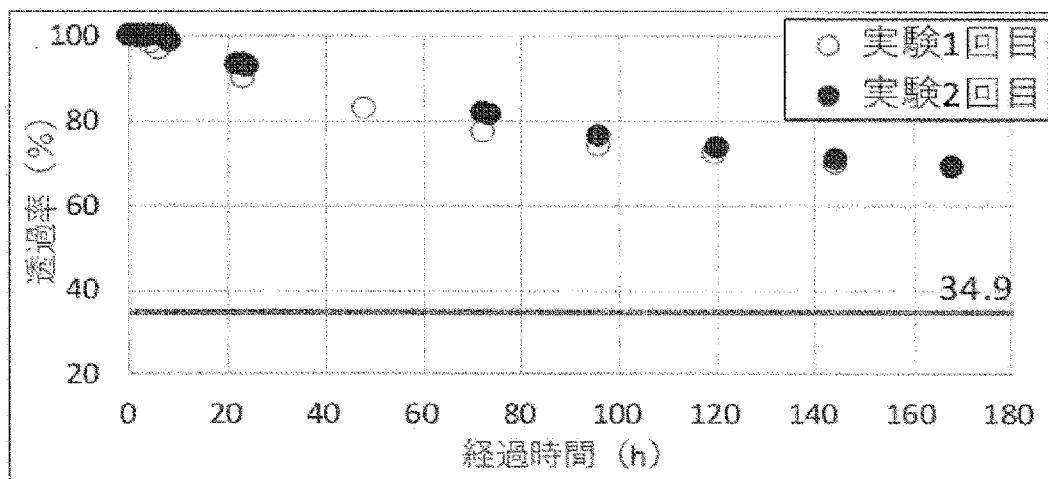
[図3]



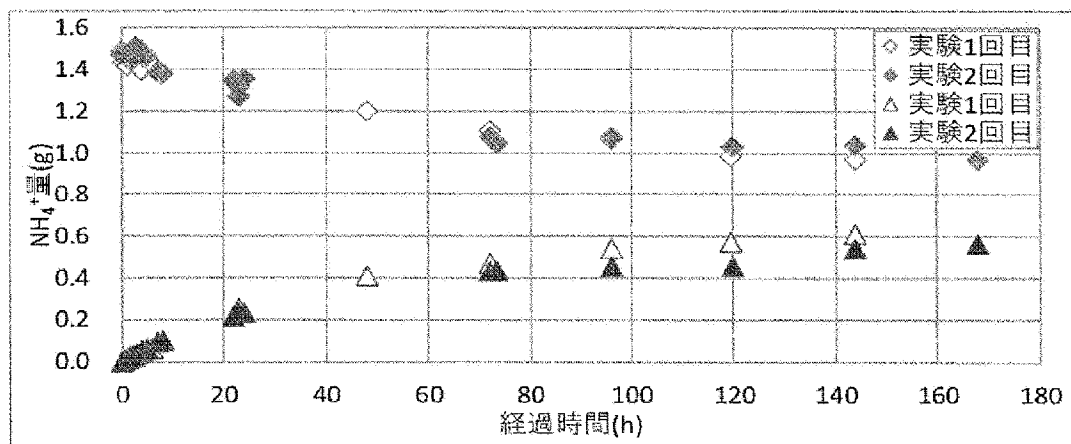
[図4]



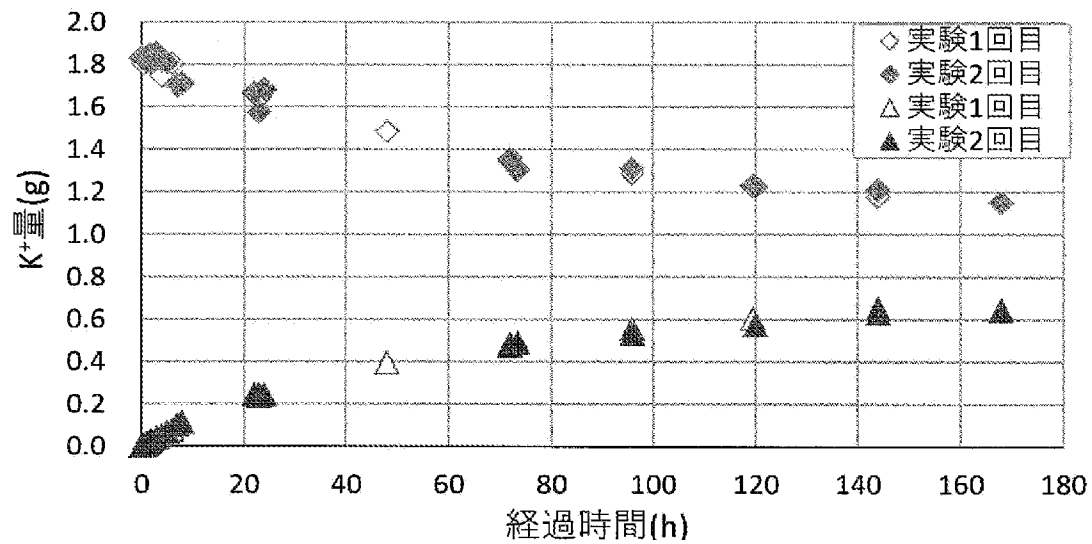
[図5]



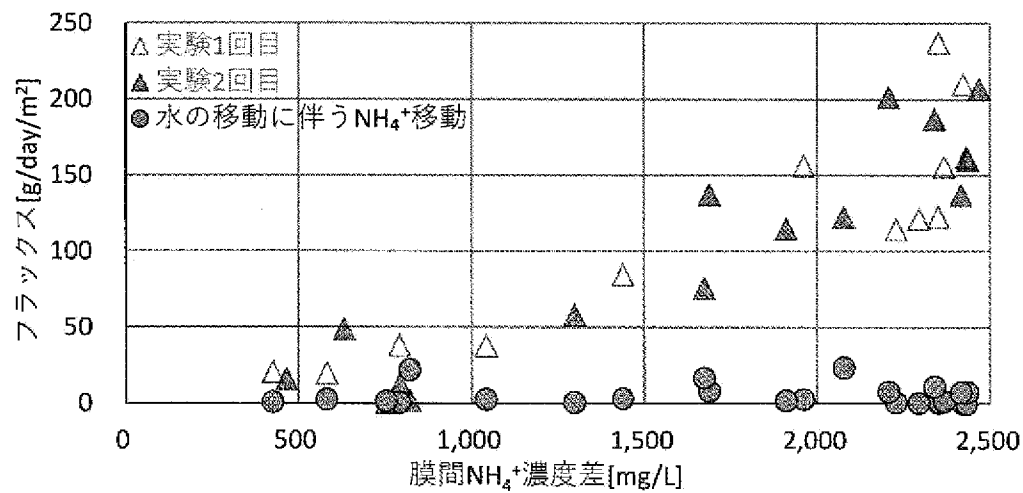
[図6]



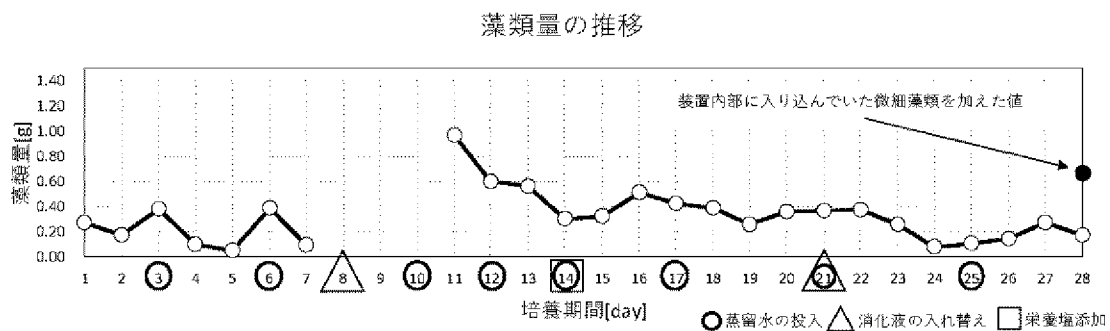
[図7]



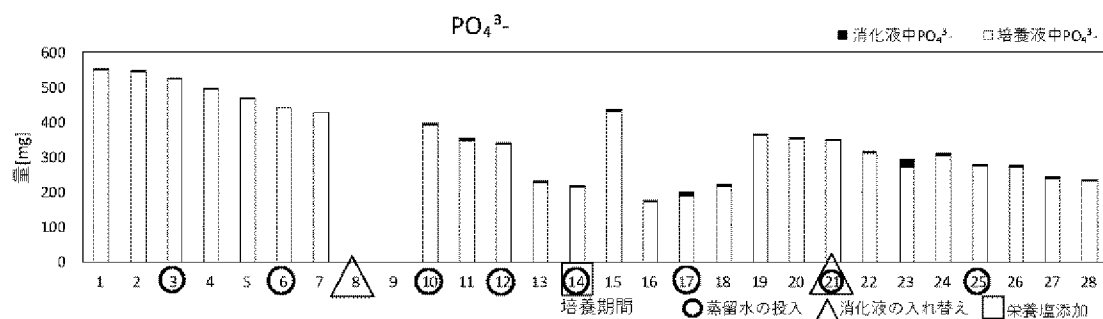
[図8]



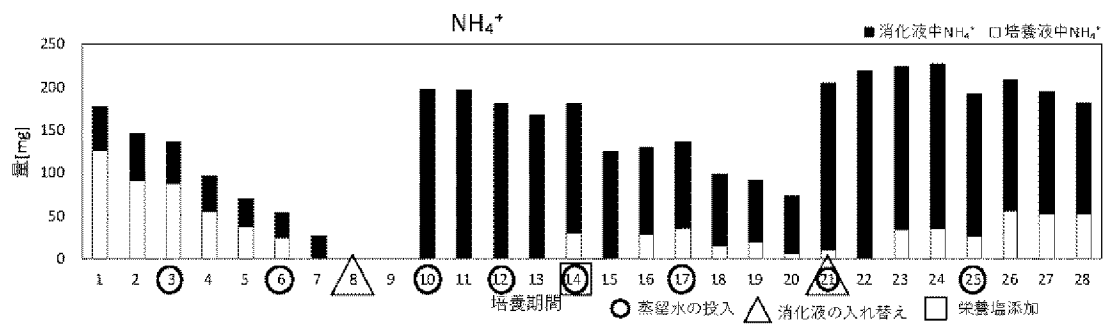
[図9]



[図10]



[図11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/033429

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/12(2006.01)i; **C12M 1/00**(2006.01)i; **B01D 61/24**(2006.01)n; **B01D 69/00**(2006.01)n
FI: C12N1/12 A; C12M1/00 E; B01D69/00; B01D61/24

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N1/12; C12M1/00; B01D61/24; B01D69/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2021
Registered utility model specifications of Japan 1996-2021
Published registered utility model applications of Japan 1994-2021

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LIU, Xin et al., 硝化処理および膜濾過を併用した嫌気発酵消化液による微細藻類培養, 第52回 日本水環境学会年会講演集, P-H03, 09 March 2018, p. 593 entire text, non-official translation (Microalgae cultivation by anaerobic fermentation digestion liquid with nitrification processing and membrane filtration. Lectures of the 52nd Japan Society on Water Environment.)	1-17
A	JP 2007-330215 A (ELECTRIC POWER DEV CO LTD) 27 December 2007 (2007-12-27) entire text	1-17
A	US 2016/0075981 A1 (INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE) 17 March 2016 (2016-03-17) entire text	1-17
A	US 2013/0052719 A1 (INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE) 28 February 2013 (2013-02-28) entire text	1-17
A	CN 106219871 A (UNIV CHONGQING) 14 December 2016 (2016-12-14) entire text	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

08 October 2021

Date of mailing of the international search report

19 October 2021

Name and mailing address of the ISA/JP

**Japan Patent Office (ISA/JP)
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Japan**

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/033429

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	中島拓海 ほか, 土着微細藻類培養のための精密ろ過膜を用いた牛ふんメタン発酵消化液の色成分と栄養塩の分離に関する研究, 第31回廃棄物資源循環学会研究発表会 講演原稿2020 [online], C5-8P, 21 August 2020, pp. 215-216, [retrieval date 06 October 2021], Internet:<URL:https://jsmcwm.or.jp/taikai2020/proceedings/> entire text, (NAKASHIMA, Takumi et al. Study on separation of Color Substance and Nutrients in Digestate from cow manure using a Microfiltration membrane for Cultivation of natural Microalgae.), non-official translation (Lecture manuscript 2020 of the 31st Annual Conference of Japan Society of Material Cycles and Waste Management [online])	1-17
P, X	中島拓海 ほか, 土着微細藻類培養のための精密ろ過膜を用いた牛ふんメタン発酵消化液の色成分と栄養塩の分離に関する研究, 第48回環境システム研究論文発表会講演集, 17 October 2020, pp. 23-27 entire text, (NAKASHIMA, Takumi et al. Study on separation of Color Substance and Nutrients in Digestate from cow manure using a Microfiltration membrane for Cultivation of natural Microalgae.), non-official translation (Proceedings of 48th Annual Meeting of Environmental Systems Research)	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2021/033429

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2007-330215	A	27 December 2007	(Family: none)	
US	2016/0075981	A1	17 March 2016	WO 2014/163426	A1
				EP 2982742	A1
				KR 10-2014-0121130	A
				CN 105209593	A
US	2013/0052719	A1	28 February 2013	WO 2011/102693	A2
				KR 10-2011-0096243	A
				KR 10-2012-0014387	A
				KR 10-2012-0014401	A
CN	106219871	A	14 December 2016	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 1/12(2006.01)i; C12M 1/00(2006.01)i; B01D 61/24(2006.01)n; B01D 69/00(2006.01)n FI: C12N1/12 A; C12M1/00 E; B01D69/00; B01D61/24										
B. 調査を行った分野										
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12N1/12; C12M1/00; B01D61/24; B01D69/00										
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2021年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2021年	日本国実用新案登録公報	1996-2021年	日本国登録実用新案公報	1994-2021年
日本国実用新案公報	1922-1996年									
日本国公開実用新案公報	1971-2021年									
日本国実用新案登録公報	1996-2021年									
日本国登録実用新案公報	1994-2021年									
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)										
C. 関連すると認められる文献										
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号								
A	LIU, Xin et al., 硝化处理および膜濾過を併用した嫌気発酵消化液による微細藻類培養, 第52回 日本水環境学会年会講演集, P-H03, 2018.03.09, p.593 全文	1-17								
A	JP 2007-330215 A (電源開発株式会社) 27.12.2007 (2007-12-27) 全文	1-17								
A	US 2016/0075981 A1 (INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE) 17.03.2016 (2016-03-17) 全文	1-17								
A	US 2013/0052719 A1 (INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE) 28.02.2013 (2013-02-28) 全文	1-17								
A	CN 106219871 A (UNIV CHONGQING) 14.12.2016 (2016-12-14) 全文	1-17								
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。										
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献										
国際調査を完了した日 08.10.2021		国際調査報告の発送日 19.10.2021								
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 山▲崎▼ 真奈 4N 7884 電話番号 03-3581-1101 内線 3488								

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	中島拓海 ほか，土着微細藻類培養のための精密ろ過膜を用いた牛ふんメタン発酵消化液の色成分と栄養塩の分離に関する研究，第31回廃棄物資源循環学会研究発表会講演原稿2020 [online]，C5-8P，2020.08.21，pp.215-216，[検索日 2021.10.06]，インターネット：<URL:https://jsmcwm.or.jp/taikai2020/proceedings/> 全文	1-17
P, X	中島拓海 ほか，土着微細藻類培養のための精密ろ過膜を用いた牛ふんメタン発酵消化液の色成分と栄養塩の分離に関する研究，第48回環境システム研究論文発表会講演集，2020.10.17，pp.23-27 全文	1-17

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2021/033429

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2007-330215	A	27.12.2007	(ファミリーなし)	
US	2016/0075981	A1	17.03.2016	WO 2014/163426	A1
				EP 2982742	A1
				KR 10-2014-0121130	A
				CN 105209593	A
US	2013/0052719	A1	28.02.2013	WO 2011/102693	A2
				KR 10-2011-0096243	A
				KR 10-2012-0014387	A
				KR 10-2012-0014401	A
CN	106219871	A	14.12.2016	(ファミリーなし)	