排水処理酵母の窒素除去能強化方法についての検討

渡部貴志^{1,2}・家藤治幸³・北本宏子¹

(¹ 独立行政法人農業環境技術研究所, ² 独立行政法人日本学術振興会特別研究員 PD,

³ 独立行政法人酒類総合研究所)

平成 25 年 3 月 4 日受理

Breeding of wastewater treatment yeasts having high nitrogen removal ability

Takashi Watanabe^{1,2}, Haruyuki Iefuji³, Hiroko K. Kitamoto¹

(¹ National Institute for Agro-Environmental Sciences, Kannondai 3-1-3, Tsukuba, Ibaraki 305-8604;

² Research Fellow of the Japan Society for the Promotion of Science;

³ National Research Institute of Brewing, Kagamiyama 3-7-1, Higashihiroshima, Hiroshima 739-0046)

The purpose of this study is to improve the nitrogen removal ability of wastewater treatment methods using yeasts. In the case of *Saccharomyces cerevisiae*, we previously confirmed that a positive selection of methylamine-resistant mutants to obtain *Ure2* mutants was useful for improving the nitrogen removal ability. Therefore, we tried to improve the nitrogen removal abilities of wastewater treatment yeasts in the same manner and *H. anomala* IFO0963-HNA36 was obtained. Strain HNA36 removed 1.2-fold higher amounts of nitrogen from rice *Shochu* distillery wastewater than the wild type strain. We also developed another new breeding method to improve the nitrogen removal ability. A mutant constitutively secreting proteinase, *Pseudozyma antarctica* GB-4(0)-PNR26 was obtained. Strain PNR26 removed 1.14-fold higher amounts of nitrogen from rice *Shochu* distillery wastewater than the wild type strain. These results show that nitrogen removal abilities of wastewater treatment yeasts can be improved without recombinant techniques.

Key words : wastewater treatment yeasts, nitrogen removal, *Shochu* distillery wastewater

緒 言

上昇流嫌気性汚泥床 (UASB) 法は、高濃度有機性排水の活性汚泥法の前処理として広く用いられている¹⁾。UASB 法は、有機物を非常に効率的にメタンへ変換するが²⁾、油やデンプン質を多く含む排水や、固形物を多く含む排水の処理には不向きであり、嫌気処理法であるため、リンや窒素といった閉鎖水域の富栄養化問題の原因物質を除去することが出来ない。一方、酵母を用いた排水処理技術 (酵母処理法) は、上記に挙げたような基質を効率的に処理する酵母を、処理槽内で優占化させて処理を行う、日本発祥の技術である³⁴⁾。

酵母処理法は、長年に渡って洗米排水⁵⁾や焼酎蒸留粕排水^{6,7)}、ウイスキー蒸留廃液⁸⁾などの酒造排水を対象にして研究がなされてきた。また、近年では、欧米や新興国などにおいても酵母処理法の研究が盛んになっており、対象となる排水の種類の幅が広がっている。例えば、*Yarrowia lipolytica* を用いたオリーブ・ミル排水の処理⁹⁾、*Hansenula polymorpha* を用いたホルムアルデヒドとメタノールを含有する化学工場排水の処理¹⁰⁾、*Candida tropicalis* を用いたフェノール含有排水の処理¹¹⁾ などがある。このように、酵母処理法は高濃度有機性排水の炭素源の除去をターゲットとした研究が進められてきた。

これまで我々は、*Saccharomyces cerevisiae* の菌体内にリンを取り込み、輸送する機構（*PHO* 制御機構¹²⁾）の分子生物学的知見に基づいて、排水処理酵母からリンを高蓄積する酵母の育種方法を開発した¹³⁾。また、自己凝集性を示す排水処理酵母 *Hansenula anomala* J224 株¹⁴⁾ からリン高蓄積酵母 PAWA 株を育種し、焼酎蒸留粕排水の実験室レベルの連続処理試験を行った^{15,16)}。その結果、甘藷、麦焼酎粕排水とともに、親株に比べて PAWA 株は 2 倍のリン除去が行えることを確認している。しかしながら、麦焼酎粕排水は溶存態全窒素（DTN）が約 6,000 mg/L と非常に高濃度であるため、酵母処理では約 30% の除去率しか得られなかった^{15,16)}。よって、窒素除去能の高い酵母を用い、より多くの窒素を除去する技術の開発が必要と考えられた。

そこで我々は、リンの場合と同様に *S. cerevisiae* をモデルとして用い、窒素除去能の強化方法を探索するため、網羅的遺伝子発現解析を行い、その過程で候補として挙がってきた *URE2* 遺伝子の破壊によって窒素蓄積量が強化できることを確認した¹⁷⁾。一方、Kamerud らが開発したメチルアミン耐性株の取得法で得られた *and4* 変異株は、*URE2* と allelic であり、アミノ酸蓄積量が増えることが分かっていた^{18,19)}。これらのことから、メチルアミン耐性株の中には、窒素除去能が上昇しているものがあると考え、実際に 1.3 倍増えた変異株を取得することが出来た¹⁷⁾。

本研究では、排水処理能力の高い酵母を用い、*S. cerevisiae* で確認したメチルアミン耐性を選抜指標にした手法、および本研究で新たに考案したプロテアーゼ活性を選抜指標にした手法によって、排水処理酵母の窒素除去能の強化を検討したので報告する。

実験方法

1. 供試酵母及び培養方法

（独）農業環境技術研究所保存株を中心とした 30 株の酵母を用いた。

酵母の前培養には YM 培地（酵母エキス 0.3%, 麦芽エキス 0.3%, ペプトン 0.5%, グルコース 1.0%）を用いた。酵母の窒素除去能の評価には、YG 培地（酵母エキス 1.0%, グルコース 2.0%）を用いた。焼酎粕排水としては、鹿児島県の焼酎工場から排出された米焼酎粕（Table 1）を、7,000 rpm、10 分間遠心分離

Table 1 Composition of Rice *Shochu* distillery wastewater

Parameter	Value
pH	3.81
SS (mg/L)	33,200
DOC (mg/L)	26,800
DTN (mg/L)	3,800
DTP (mg/L)	880

した上清を蒸留水で適宜希釈したものを用いた。

メチルアミン耐性変異株の取得には、スクリーニング培地①¹⁸⁾（YNB w/o アミノ酸類 & 硫酸アンモニウム 0.17%, 5 mM D- アスパラギン, 100mM 塩化メチルアミン, グルコース 2%, 寒天 2%）を用いた。なお、D- アスパラギンと塩化メチルアミンは、それぞれ分けてオートクレーブした後、混合した。

プロテアーゼ恒常活性化変異株の取得には、スクリーニング培地②（YNB w/o アミノ酸類 & 硫酸アンモニウム 0.17%, L- アスパラギン 0.2%, スキムミルク 0.4%, グルコース 2%, 寒天 2%）を用いた。なお、スキムミルクは、分けてオートクレーブした後、混合した。

2. 変異処理方法

試験管に YM 培地を 5mL 加え、酵母を一白金耳接種し、30℃、24 時間振とう培養を行った。この培養液 1mL と滅菌蒸留水 19 mL を混合し、プラスチックシャーレに加えた。マグネティックスターラーで攪拌しながら、UV 灯（15W）から 50cm の距離で、生存率が約 1% となるように 30 ～ 60 秒間、UV 照射した。その後、スクリーニング培地①または②のプレート上に約 500 コロニー生えてくるように処理液を希釈して塗布し、30℃で 2 日間静置培養を行った。

スクリーニング培地①では、メチルアミン耐性を獲得し、大きなコロニーを形成している変異株を選抜し、YM 寒天培地に釣菌した。

スクリーニング培地②では、プロテアーゼを恒常的に分泌し、ハロを形成している変異株を選抜し、YM 寒天培地に釣菌した。

3. 窒素除去能の評価試験

一次選抜試験では、試験管に 5 倍希釈の YG 培地を 5mL 加え、酵母を一白金耳接種し、30℃、24 ～ 48 時間振とう培養を行い、培養液遠心分離上清（10,000

rpm, 1 分間) の溶存態有機炭素 (DOC), 溶存態全窒素 (DTN), 溶存態全リン (DTP) の測定を行った。

二次選抜および最終評価試験では, 菌体接種量を揃えるため, 試験管に YM 培地を 5mL 加え, 酵母を白金耳接種し, 30℃, 24 時間振とうの前培養を行った。本培養では, 100 mL 容の三角フラスコに YG 培地 (二次選抜) あるいは米焼酎粕排水 (最終選抜) を 20 mL 加え, 前培養液を菌体量 (OD_{660}) が 0.1 となるように植菌し, 30℃, 120rpm にて振とう培養を行った。24 時間後に培養液を 1mL 採取し, OD_{660} , DOC, DTN, DTP, pH 等の測定を行った。なお, これらの指標は, Standard methods²⁰⁾ に準拠して測定した。また, 本研究では, 処理前の DTN から処理後の DTN を差し引いた窒素除去量 (rDTN) を, 菌体量 (OD_{660}) で除した値 (rDTN/ OD_{660}) を窒素除去能と定義した。

実験結果

1. メチルアミン耐性を選抜指標にした窒素除去能の強化

まず, *S. cerevisiae* で効果を確認したメチルアミン耐性を選抜指標にした窒素除去能の強化の手法を, 排水処理酵母でも応用できるか確認することにした。なお, 強化する対象の酵母は, *S. cerevisiae* と同じ子囊菌系酵母であり, 排水処理酵母としても研究実績のある *Hansenula anomala* とし, 研究室で保有している 6 株の中で最も窒素除去能が高かった *H. anomala* IFO0963 株を用いることにした。なお, 本酵母はビール工場より単離された株である。

実験方法で述べたように変異誘発処理を行い (生存率約 1%), スクリーニング培地①で生じたコロニーのサイズを判別した。大きなコロニーの出現頻度は, 1 枚の寒天培地 (約 500 株) に対し 1 ~ 2 株であり, 約 3 万株の中から 80 株を釣菌した。まず培地成分の調整しやすい YG 培地での一次, 二次選抜によって, 窒素除去能 (rDTN/ OD_{660}) が親株より 1.3 倍高い HNR54 株が得られた (Fig. 1)。

2. 継代培養による増殖能の強化

先の検討で得られた HNR54 株は, 親株より増殖が悪くなり, 24 時間の菌体増殖量 (OD_{660}) の値も低くなっていた。また, 実際の排水として用いた 4 倍希釈の米焼酎粕排水での排水処理試験を行ったところ, 菌体増殖能が悪くなった影響により, 窒素除去量は期待したほどには増加していなかった (data not shown)。そこで, 継代培養によって増殖能が強化された変異株の取得を試みることにした。

まず, 2 倍希釈の米焼酎粕排水を用い, 試験管で 24 時間毎に新たな米焼酎粕排水に植え継ぐ継代培養を 15 回繰り返した。15 回目の培養液を希釈して 2 倍希釈の米焼酎粕排水寒天培地に塗布し, 大きなコロニーを形成するようになった 52 株を選抜した。2 倍希釈の米焼酎粕排水での一次, 二次選抜試験によって, HNR54 よりも窒素除去量が増加している 16 株を選抜した (Fig. 2)。その中でも HNA36 株は菌体増殖量 (OD_{660}) が親株よりも高く, 最も多くの窒素 (IFO0963 株の 1.2 倍) を除去した (Fig. 2)。

3. 環境中の窒素濃度とプロテアーゼ分泌性の評価

次に, メチルアミン耐性とは別の窒素除去能の強化

Fig. 1 Removal amounts of dissolved total nitrogen (DTN) per cell density (OD_{660}) of *Hansenula anomala* IFO0963 and its mutants in the YG medium.

Fig. 2 Cell growth(OD₆₆₀) and removal amounts of dissolved total nitrogen of *Hansenula anomala* strains from rice *Shochu* distillery wastewater.

方法を検討することにした。環境中の窒素濃度に応答して窒素の取り込みとプロテアーゼの生産が同じシグナル伝達系で制御されている酵母がいれば、プロテアーゼ活性の恒常化を選抜指標にすることで、同時に窒素の取り込み能力が向上し、除去能が上昇した変異株が取得できることが期待される。プロテアーゼ活性の強さは、スキムミルクで白濁させた寒天培地で形成されたクリアゾーン（ハロ）の大きさによって簡易的に判定することが出来る。

まず、*H. anomala* IFO0963 株を含め 15 株の子囊菌系酵母を用いたところ、いずれの株もスキムミルクのみを窒素源として加えた低窒素条件（Low-N）の場合でもハロの形成は認められなかった（data not shown）。一方、供試した担子菌系酵母 15 株のうち、全てが Low-N 条件でハロが形成されたが、その多くがアスパラギンを窒素源として加えた高窒素条件（High-N）でもハロが形成した（data not shown）。

4. プロテアーゼ活性を選抜指標にした窒素除去能の強化

一方、植物葉面から単離してきた担子菌系酵母である *Pseudozyma antarctica*²¹⁾ は、窒素濃度に応答して、ハロの形成（プロテアーゼの分泌・生産）が制御されていることが分かった（Fig. 3）。

YG 培地を用いた予備試験により、保存している 10 株の *P. antarctica* の中で、最も窒素除去能が高かった *P. antarctica* GB-4(0) 株を、強化試験の対象酵母にした。なお、本酵母は、稲初から単離された株である²¹⁾。

実験方法に述べたように変異誘発処理を行い（生存率約 1%）、スクリーニング培地②に塗布したところ、約 3 万株の中からハロを形成するようになった 83 株の変異株を取得した。YG 培地での一次、二次選抜の結果、窒素除去能が親株より高くなっていたものが 15 株あった（data not shown）。そのうち上位 5 株と親株を用いて 2 倍希釈の米焼酎粕排水の処理試験を行ったところ、PNR26 株が最も窒素（親株の 1.14 倍）を除去した（Fig. 4）。

なお、変異処理後にハロを形成していないコロニーをランダムに 20 株選抜したところ、全ての株が窒素除去能は親株とほぼ同等であり（data not shown）、今回のハロの形成を選抜指標とする方法が効果的であることを確認した。

5. 米焼酎粕排水の処理能力の評価

次に、窒素除去能を強化することによる有機物の指標である DOC とリン（DTP）の除去能力に与える影響を調べた。*H. anomala* IFO0963 株、及びその窒素

Fig. 3 Proteinase activity assay of the *P. antarctica* strain.

Fig. 4 Cell growth (OD₆₆₀) and removal amounts of dissolved total nitrogen of *Pseudozyma antarctica* strains from rice *Shochu* distillery wastewater.

除去能強化株である HNR54 株と HNA36 株では、窒素除去能の強化によって DOC 除去量が増加し、DTP 除去量が減少する傾向があった (Table 2)。一方、*P. antarctica* GB-4(0) 株、及びその窒素除去能強化株である PNR26 株では、DOC、DTP 共に除去量に大きな差は認められなかった (Table 2)。よって、窒素除去能強化株の DOC と DTP 除去能についての変異による影響も、評価しておく必要性が認められた。

考 察

排水処理などの開放系では、遺伝子組換え体を用いることが出来ない。そこで本研究では、遺伝子組換え技術を用いない、実用化が可能な酵母の窒素除去能の強化方法の検討を行った。まず、子囊菌系酵母である *H. anomala* では、*S. cerevisiae* と同様にメチルアミン耐性を選抜指標にすることで、窒素除去能を強化することが出来ることが確認できた。本手法は、アンモニアトランスポーターが潰されず、かつアスバラギナ

Table 2 Concentrations of OD₆₆₀, DOC, DTN, and DTP in Rice *Shochu* distillery wastewater treated by yeasts

Strain	OD ₆₆₀	DOC (mg/L)	DTN (mg/L)	DTP (mg/L)
Blank	-	13374 ±	228 1926.9 ±	13.1 435.4 ± 7.6
<i>H. anomala</i>				
IFO0963	22.1 ±	0.3 7521 ±	126 1460.3 ±	0.8 305.2 ± 1.4
HNR54	20.9 ±	0.5 7298 ±	63 1403.2 ±	3.0 331.0 ± 1.5
HNA36	22.4 ±	0.3 7279 ±	78 1350.5 ±	4.1 331.5 ± 6.8
<i>P. antarctica</i>				
GB-4 (0)	24.9 ±	0.2 6906 ±	316 1206.7 ±	5.0 225.6 ± 16.5
PNR26	24.1 ±	0.2 7106 ±	350 1103.5 ±	2.9 223.2 ± 16.4

ーゼが恒常的に発現した変異株の取得を目指しているものである¹⁸⁾。その原理は、アスパラギナーゼが恒常活性化することで、D-アスパラギンからのアンモニウムイオンが遊離されることで、アンモニアトランスポーターから入ってくる生育阻害物質のメチルアミンの取り込みを抑えられ、その結果変異株の増殖が速くなることを利用している¹⁸⁾。よって、D-アスパラギン酸を窒素源として利用できる酵母の場合は、本手法を用いることは難しい。実際に *S. cerevisiae* や *H. anomala* と同じ子囊菌系酵母である *Debaryomyces hansenii* などでも本手法による目的株の取得を試みたが、親株そのものの増殖が速く、比較的大きなコロニーを分離してみても、窒素除去能が強化されていたものは取得できなかった (data not shown)。

従って、メチルアミン耐性とは別の手法でも酵母の窒素除去能を強化できないかと考えた。我々が開発した排水処理酵母のリン蓄積能を強化する方法は、環境中のリン濃度によってリン酸の取り込みとホスファターゼの分泌が同じシグナル伝達系で制御されていることを利用している¹³⁾。すなわち、環境中のリン濃度が高い条件でもホスファターゼが分泌されるようになった変異株の中から、同じくリンの取り込み抑制がなくなり、リンの蓄積量が増加している変異株を選抜するという手法である。そこで窒素の場合も同様に、環境中の窒素濃度に応答してプロテアーゼの分泌を制御している酵母から、恒常的にプロテアーゼを分泌するようになった変異株を取得すると、その中には、窒素除去能も向上しているものがあるのではないかと考えた。そして実際に、担子菌系酵母 *P. antarctica* の窒素除去能を向上させることに成功し、2倍希釈の米焼酎粕排水のDTNが処理前の約1900mgN/Lから処理

後に約800mgN/L除去され、除去率42.7%が得られた (Fig. 4)。また、これまで *P. antarctica* を排水処理酵母として研究した報告例はないが、少なくとも米焼酎粕排水に対しては、高い排水処理能力を有することを確認した (Table 2)。

酵母に取り込まれた窒素はアミノ酸あるいはタンパク質の形で蓄積され、乾燥菌体重量の大部分 (約60%) が粗タンパクで占められている¹⁵⁾。本研究において、メチルアミン耐性、プロテアーゼ活性を指標にする両方法とも、単位菌体量当りの酵母の窒素除去量が約1.2倍にも向上させることができた。排水中には酵母が利用できる炭素源は限られているため、その環境下でより多くの酵母細胞が増殖し、一つ一つの細胞がより多くの窒素を除去・蓄積できるような排水処理酵母を育種できるように、今後は検討していきたい。

最後に、本研究で用いた米焼酎粕を分譲いただきました小正醸造 (株) に深謝いたします。また本研究は、独立行政法人日本学術振興会特別研究員・PD研究奨励金および科学研究費補助金 (特別研究員奨励費 23・10107) により行いました。

要 約

本研究では、酵母処理法の新たな可能性を模索するため、遺伝子組み換え技術を用いない酵母の窒素除去能強化方法の検討、および窒素含量の高い米焼酎粕排水での窒素除去試験を行った。本研究で得られた結果を以下に列挙する。

1) *H. anomala* IFO0963株は *S. cerevisiae* と同様にメチルアミン耐性を指標にした方法で、窒素除去能を強化することが可能であり、得られたHNR54株は窒素蓄積能がIFO0963株の1.3倍となった。

2) 米焼酎粕排水の継代培養によってHNR54株の増殖能を改善することが可能であり、得られたHNA36株は窒素除去能がIFO0963株の1.2倍となった。

3) *P. antarctica* GB-4(0)株は、プロテアーゼ活性を指標にした方法で、窒素除去能が強化され、得られたPNR26株は窒素除去能がGB-4(0)株の1.14倍となった。

参考文献

- 1) L. Seghezoo, G. je Zeeman, H. V. M. Hamelers, and G. Lettinga: *Bioresour. Technol.* **65**, 175-190 (1998)
- 2) M. Yamada, M. Yamaguchi, T. Suzuki, A. Ohashi, and H. Harada: *Water Sci. Technol.* **53**, 27-35 (2006)
- 3) 吉沢 淑：日本農芸化学会誌, **55**, 705-711 (1981)
- 4) 吉沢 淑, 鈴木 修：用水と排水, **28**, 592-599 (1986)
- 5) 斎藤和夫, 蓮尾徹夫, 寺田 周, 市島信之, 前谷竜夫, 蓼沼 誠：醸協, **78**, 959-961 (1983)
- 6) 鈴木修, 佐藤俊一, 家藤治幸, 下飯仁, 蓼沼誠, 吉沢淑：醸協, **86**, 137-141 (1991)
- 7) 秋田修, 鈴木修, 高峰和則, 瀬戸口真治, 岩下雄二郎, 家藤治幸, 小幡孝之：日本生物工学会誌, **73**, 397-404 (1995)
- 8) 山本奈美, 橋本勝誠, 佐藤俊一, 中尾強志, 下飯仁, 斎藤和夫, 蓼沼誠, 吉沢淑：醸協, **81**, 621-625 (1986)
- 9) R. Lancitti, A. Gianotti, D. Baldi, R. Angrisani, G. Suzzi, D. Mastrocola, and M. E. Guerzoni: *Bioresour. Technol.* **96**, 317-322 (2005)
- 10) P. Kaszycki, M. Tyszk, P. Malec, and H. Koloczec: *Biodegradation* **12**, 169-177 (2001)
- 11) Y. Jiang, J. P. Wen, J. Bai, D. Q. Wang, and Z. D. Hu: *Biochem. Eng. J.* **29**, 227-234 (2006)
- 12) Y. Oshima: *Gene Genet. Syst.* **72**, 323-334 (1997)
- 13) T. Watanabe, N. Ozaki, K. Iwashita, T. Fujii, and H. Iefuji: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **80**, 331-338 (2008)
- 14) 佐藤俊一, 前谷龍夫, 山本奈美, 蓮尾徹夫, 斎藤和夫, 蓼沼誠, 吉沢淑：醸協, **81**, 621-625 (1986)
- 15) T. Watanabe, K. Masaki, K. Iwashita, T. Fujii, and H. Iefuji: *Bioresour. Technol.* **100**, 1781-1785 (2009)
- 16) 渡部貴志, 家藤治幸：醸協, **106**, 280-286 (2011)
- 17) T. Watanabe, H. Iefuji, and H. K. Kitamoto: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 917-922 (2013)
- 18) J. Q. Kamerud, and R. J. Roon: *J. Bacteriol.* **165**, 293-296 (1986)
- 19) E. P. S. Bon, E. Carvajal, M. Stanbrough, D. Rowen, and B. Magasanik: *Appl. Biochem. Biotechnol.* **63-65**, 203-212 (1997)
- 20) APHA, AWWA, and WEF: Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th Ed (1998)
- 21) K. H. Kitamoto, Y. Shinozaki, X. Cao, M. Konishi, T. Morita, K. Tago, H. Kajiwar, M. Koitabashi, T. Watanabe, Y. Yamashita, T. Nakajima-Kambe, and S. Tsushima: *AMB express* **1**:44 (2011)