

2023年度（第48回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	創 価 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	難培養性微細藻類の成長促進物質の特定と新規成長培地の研究開発	研 究 分 野	農 学
キ ー ワ ー ド	①土壌抽出液 ②有価物生産 ③分子量分布 ④有機物画分 ⑤大量培養		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
戸 田 龍 樹	創 価 大 学 創 理 工 学 部 / プランクトン工学研究所	教 授	研究代表者・総括（実験計画の策定と評価、ならびに新規微細藻類培地の開発）

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
古 谷 研	創 価 大 学 プランクトン工学研究所	教 授	実験計画の策定と有用微細藻類の増殖能・有価物生産能の評価
高 山 佳 樹	創 価 大 学 プランクトン工学研究所	助 教	有用微細藻類の培養と増殖能の測定
清 水 昭 夫	創 価 大 学 創 理 工 学 部	教 授	溶存有機物の分子量・構造特性の推定
関 根 睦 実	創 価 大 学 創 理 工 学 部	助 教	有用微細藻類の培養と増殖能の測定
小 松 一 弘	信 州 大 学 信 工 学 部	教 授	溶存有機物の分子量・化学特性の推定
今 井 章 雄	国 立 環 境 研 究 所	フ ェ ロ ー	実験計画の策定と溶存有機物の化学特性の推定

難培養性微細藻類の成長促進物質の特定と 新規成長培地の研究開発

1. 研究の目的

(1) 微細藻類の大量培養における新規培地開発の必要性

微細藻類は、医薬品や化粧品の原料となる様々な高付加価値物質を有していることから、大量培養の試みが世界各地で行われている。ところが残念なことに、これまでに大量培養され産業利用に至っている微細藻類は、自然界に生息する数十万種もの多様な藻類の中でも、わずか30種（株）程度にすぎない。微細藻類の大量培養には、有価物生産に有用な微細藻類種や各種の最適培養条件の探索が不可欠である。培養条件の最適化は、長年の研究課題であり、中でも増殖のための栄養源となる「培地」の開発が不可欠である。現在の微細藻類の大量培養において主流となっている「人工培地」には、微細藻類の増殖に最低限必要な無機栄養塩やビタミンなどの栄養素が含まれ、世界の藻類生産量のほぼ100%を占めるスピルリナやクロレラの大量培養に使用されている。これらの培地では、未だに多くの微細藻類種の大量培養が困難であり、難培養な微細藻類種に最適な培地の開発が重要な課題となっている。

(2) 土壌抽出液による微細藻類の増殖促進効果

難培養な微細藻類の増殖促進には、必須栄養素だけでなく通常の人工培地に含まれない微量元素や有機物などの微量栄養素の供給が重要であると推察される。元来、降雨による土壌からの浸出水が沿岸域に流れると、赤潮（微細藻類の大増殖）が誘発されることが経験的に知られていることから、ESM培地の添加成分には「土壌抽出液」が含まれている。ラボスケールの藻類培養に土壌抽出液を利用する試みは未だ限定的であるが、微細藻類の増殖が促進されるという知見は1950年代から断片的に報告されている。土壌抽出液は溶存有機物（DOM: Dissolved organic matter）を豊富に含有し、そのキレート作用により形成される金属錯体が微細藻類の必須微量元素の利用能を高める効果や成長ホルモンに類似した作用が報告されている。このことから、土壌抽出液に含まれるDOMは、微細藻類の増殖に深く関与している物質であると考えられ、土壌抽出液の添加は、微細藻類の増殖促進に極めて高い可能性を秘めている。DOMはヒューミン、フミン酸、フルボ酸と呼ばれる物理化学的特性の異なる腐植物質を含有し、個々の腐植物質は藻類の増殖への異なる影響が報告されている。土壌抽出液由来の腐植物質画分とその分子量に着目し、藻類の増殖促進作用との関連性を調べることは、土壌抽出液による増殖促進効果の解明につながる。本研究は難航している微細藻類の大量培養にブレイクスルーをもたらす萌芽性がある。加えて、微細藻類の大量培養を目指す上で、培養環境の制御や微細藻類株の有価物生産性を高めることも重要である。土壌抽出液の添加により微細藻類種の有価物生産性を高めることができれば、土壌抽出液の微細藻類培養への有用性が高まり、新たな有用物質回収システムの構築が期待できる。

(3) 本研究の目的

本研究では、①土壌抽出液中の成長因子である有機物特性を分析し、②その添加が微細藻類の増殖と有価物生産に与える影響を明らかにするとともに、③難培養な微細藻類種の増殖促進のための新規培地の研究開発を行う。土壌抽出液の添加条件下における微細藻類の有価物生産性は、未だフラスコやマイクロプレートによる簡易的な手法での評価に限られている。そこで最終年度には、大量培養への応用に不可欠な長期連続運転下における影響を評価する。初年度にあたる2023年度は、難培養性微細藻類株の増殖に効果的な土壌、溶存有機物抽出法を特定した。

2. 研究の計画

(1) 土壌抽出液の作成

土壌には、沖縄県国頭郡の森林表層部から採取された赤色土（国頭村奥）、暗赤色土（国頭村謝敷）、および黄色土（国頭村与那覇岳付近）を使用した。それぞれ、60℃で乾燥し、

ゴムハンマーで粉碎した後、篩を用い粒径1.0 mm以下に揃えた。土壌成分の抽出には、純水または、微細藻類の培地を使用する海水を用いた。メディウム瓶に土壌と純水（または海水）を1:4の重量比になるように入れ、25℃、105℃、および121℃の3温度条件で1時間抽出した。加熱にはオートクレーブを用いた。溶液を室温まで冷ました後、ガラス繊維フィルター（Whatman GF/F）を用いて上清を濾過した。3種の土壌、3段階の抽出温度による9種のろ液の低分子化を図るため、オートクレーブを用いて121℃で、0、1、および5時間再加熱し、合計27条件の土壌抽出液を作成した。

作成した土壌抽出液は以下の例のように3つのアルファベットおよび数字でラベルした。

（例）R-25-0

ここで、Rは土壌タイプを示し、赤色土をR、暗赤色土をD、黄色土をYとした。25は初めの1時間の抽出温度を示し、続く0はろ液の121℃での再加熱時間を示す。

土壌抽出液の測定項目は、溶存有機炭素(DOC)濃度、溶存態窒素(DTN)濃度、溶存無機栄養塩濃度(NO_3^- -N、 NO_2^- -N、 NH_4^+ -N、 PO_4^{3-} -P)、254 nmにおける吸光度(UVA254)とした。また、土壌中の蛍光腐植物質を定量化するため、Excitation emission matrix-Parallel factor (EEM-PARAFAC) 解析を実施した。

(2) 土壌抽出液の添加による微細藻類の増殖促進効果の評価

上記の抽出法により得られた土壌抽出液を添加した培地にて、難培養性株を含む微細藻類5種(*Isochrysis galbana*、*Oocystis marssonii*、*Oocystis heteromucosa*、*Dunaleilla* sp.、*Chlorogonium* sp.)を培養した。*I. galbana*は、ハプト藻に属し、DHAや抗酸化作用の高いフコキサンチンを蓄積する。本種は難培養性ではないが、他の難培養性種との比較系列として培養した。難培養性の微細藻類には、緑藻の*Oocystis* 2種、*Dunaliella*、*Chlorogonium*を使用した。*Oocystis*はEPAを、*Dunaliella*は抗酸化作用のある β -カロテンを蓄積する。*Chlorogonium*は、アルテミア幼生の生存率を上げるための優れた餌料として報告されている¹⁾。培地は、*Dunaleilla* sp. にはKW-21、*Chlorogonium* sp. にはC培地、その他の種にはConway培地を用いた。土壌抽出液は、DOC濃度が10 mg-C/Lとなるように培地に添加した。培養容器は10 mL試験管を使用し、温度30℃、光強度300 $\mu\text{mol-photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 、明暗周期は12時間とした。680 nmにおける吸光度を測定し、各条件における微細藻類の比増殖速度および最大吸光度を比較・評価した。

[引用文献] 1) Nishida et al., *Aquaculture*, 566: 739227, 2023.

3. 研究の成果

(1) 土壌抽出液の作成

① 高温抽出によるDOM溶出の促進

抽出温度25℃、105℃、121℃のそれぞれにおいて、土壌抽出液のDOC濃度は、37~56 mg-C/L、89~121 mg-C/L、127~243 mg-C/Lの範囲、DTN濃度は、3~6 mg-N/L、7~15 mg-N/L、11~25 mg-N/Lの範囲の値となった。DOCおよびDTN濃度は、いずれの土壌種についても、抽出温度の上昇に伴い増加する傾向を示した。再加熱による濃度の変化は見られなかった。無機態窒素について、 NO_3^- は、検出限界以下であった。 NO_2^- および NH_4^+ はそれぞれ0.004~0.048 mg-N/Lおよび1.04~6.15 mg-N/Lの範囲の値となった。 NO_2^- および NH_4^+ から計算される溶存無機窒素(DIN)は1~6 mg-N/Lであるのに対し、DTNとDINの差分にあたる溶存有機態窒素(DON)は最大で22 mg-N/Lであり、高温抽出条件で特に高い値を示した。25℃抽出では昇温にエネルギーがかからないものの、DOMの抽出効率が低い。一方で、105℃および121℃の高温抽出では同量の土壌から高濃度でDOMを抽出することができ、土壌消費量と、抽出液の培地への添加量を約4分の1に抑えることができる。多量の培地を消費する微細藻類の大量培養においては、高温抽出で利便性が高い。

② 抽出液の蛍光腐食物質の特定と効果的な抽出条件の解明

芳香族化合物や不飽和二重結合は紫外外部波長260 nm付近で吸収を示すため、UVA254は芳香族である腐食物質含量の指標となっている。UVA254/DOC比によって、DOC中のフミン質を簡易的に評価することができる。土壌抽出液中のUVA254は、抽出温度25℃、105℃、121℃のそれぞれにおいて、300~576 mAbs/cm、1038~1818 mAbs/cm、1566~3420 mAbs/cmの範囲の値となり、抽出温度の上昇に伴い増加する傾向を示した。UVA254/DOCは5~17 mAbs $\cdot$ cm⁻¹ $\cdot$ mg-C⁻¹ $\cdot$ Lの範囲の値を示した。赤色土、暗赤色土では、抽出温度の上昇に伴

い増加する傾向を示し、黄色土では、低温であってもUVA254/DOCは高く、抽出温度に伴う変化はほとんど見られなかった。

EEM-PARAFAC解析の結果、土壤抽出液に含まれる蛍光腐植物質は4種類 (Component 1~4) あることを確認した。Component 1は低分子かつ芳香族が比較的少ない腐植物質様成分、Component 2は海洋性の植物プランクトン生成物、Component 3は高分子の腐植物質様成分、Component 4はフルボ酸様成分であることが示唆された¹⁻⁶⁾。25℃で抽出した土壤抽出液には、フルボ酸様成分であるComponent 4は検出されず、抽出温度105℃以上で確認できた。土壤の種類にかかわらず、抽出温度の上昇に伴い、4つの蛍光物質の抽出量が増加した。さらに、土壤抽出液を再加熱した条件においても蛍光物質濃度の増加が確認された。特に、低分子の腐植物質様成分Component 1は再加熱によって7~52%増加した。DOC濃度は再加熱によって変化しなかったことから (3. 成果(1)①参照)、再加熱は抽出液中のDOCを変性させ、低分子の腐食物質含量を増加させる効果をもつと考えられた。以上より、土壤の高温抽出・再加熱処理によって特に低分子の腐食物質を効率的に抽出できることが明らかとなった。

(2) 土壤抽出液の添加による高い増殖促進効果を5種の微細藻類種で確認 (図1)

I. galbana, *O. marssonii*, *O. heteromucosa*, *Dunaleilla* sp., *Chlorogonium* sp. の5種について、上述した27条件の土壤抽出液を添加して培養し、比増殖速度と最大吸光度を測定することで土壤抽出液による増殖促進効果を評価した。土壤抽出液の添加により、微細藻類の比増殖速度が向上する場合、最大吸光度が向上する場合、また、比増殖速度及び最大吸光度の両方が向上する場合が見られた。例えば、難培養性の*O. heteromucosa*では、比増殖速度は、黄色土 (Y-121-5) の条件で、対象区の3.1倍高い値となった。同様に、難培養性の*Chlorogonium* sp. では、暗赤色土 (D-121-0) の条件で、対象区の3.9倍高い比増殖速度をもたらした。同時に、本種において、同じ暗赤色土の条件で対象区の3.6倍高い最大吸光度が得られた。易培養性の*I. galbana* においても、暗赤色土 (D-105-0およびD-105-5) の条件で、対象区の1.5倍高い比増殖速度が得られ、黄色土 (Y-105-5) の条件で、対象区の1.9倍高い最大吸光度が得られた。さらに、*O. marssonii*の培養においては、赤色土を121℃で抽出した条件で、対象区における6日間のラグフェーズを、3日間に短縮させることができた。

以上のように、比増殖速度や最大吸光度を顕著に向上させる、微細藻類種および土壤抽出液の複数の組み合わせが見つかり、特に、難培養性の微細藻類の比増殖速度を最大4倍程度、最大吸光度を最大3~4倍程度向上させることができた。難培養性藻類のラグフェーズ・培養期間の短縮効果も確認され、難培養性微細藻類の新規培地の開発に道筋が見えた。

[引用文献] 1) Coble et al., *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 45(10-11): 2195-2223, 1998. 2) Stedmon et al., *Marine Chemistry*, 82(3-4): 239-254, 2003. 3) 小松ら. *水環境学会誌*, 31, 261-267, 2008. 4) 眞家. *日本土壤肥科学雑誌*, 80: 419-426, 2009. 5) Aiken et al., *Cambridge Environmental Chemistry Series*, 35-74, 2014. 6) Jaffe et al., *ACS Symposium Series*, 1160: 27-73, 2014.

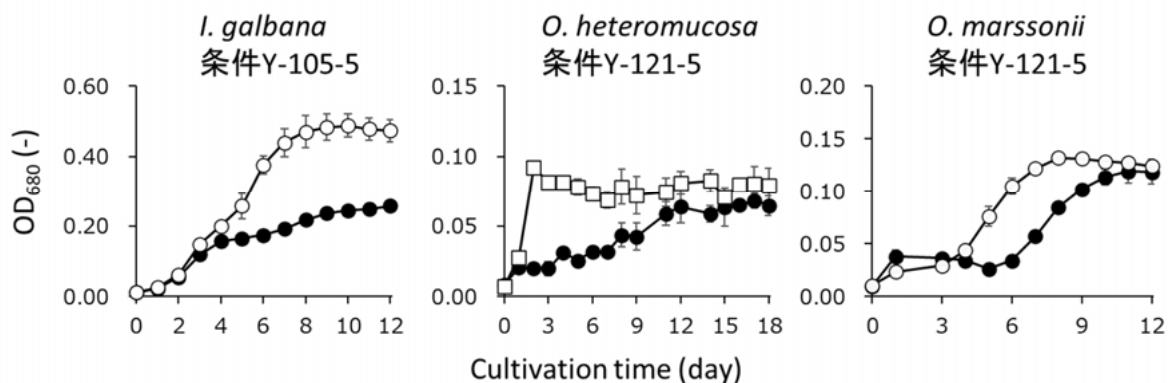


図1. 土壤抽出液による増殖促進効果を示す*I. galbana*, *O. marssonii*, *O. heteromucosa*の代表的な増殖曲線。黒丸は土壤抽出液を添加しない対象区、白丸は添加した実験区。

4. 研究の反省・考察

- (1) 土壌中の腐植物質による微細藻類の増殖の影響を評価するため、EEM-PARAFAC 解析によって分離された 4 つの蛍光物質と、各藻類の比増殖速度および最大吸光度の増加率との関係性を検討したが、予想に反し、効果的な蛍光物質を特定することはできなかった。このため蛍光腐食物質以外のパラメータが増殖に寄与している可能性がでてきた。次年度に実施する土壌抽出液の微量金属含量の測定、固体¹³C-NMR 法による炭素特性（官能基構造）の分析、および創価大学所有のマトリックス支援レーザー脱離イオン化法と（MARDI）と飛行時間型質量分析法（TOFMS）による土壌抽出液の溶存有機物の分子量分布の定量的結果をパラメータに加えることによって微細藻類の成長因子の特定が期待される。
- (2) 研究の当初計画では、土壌成分を純水で抽出する予定であったが、25℃で作成した土壌抽出液中の DOC 濃度は 37~56 mg-C/L と低濃度であったため、海水培地に必要量の淡水土壌抽出液を混合すると培地の塩分が下がるという問題があった。そこで、海水培地に添加する際には純水の代わりに海水で抽出した土壌抽出液を使用した。今年度の研究によって、炭素や窒素の抽出効率と、105℃や 121℃の抽出液でも高い微細藻類の増殖促進効果が得られることが明らかとなった。新規培地の作製には高温での抽出が有利である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Effects of various soil extract fraction types on the growth of marine microalgae, Emi F. Hashim, Kazuhiro Komatsu, Akio Imai, Hidemi Onouchi, Wan Muhammad Ikram Wan Mohd Zamri, Nor Suhaila Yaacob, Masahiro Ohtake, Mutsumi Sekine, Tatsuki Toda. *Journal of Sustainability Science and Management*, 18(7), 167–185, 2023.

(2) 口頭発表

- ① 小島咲、関根睦実、大竹正弘、戸田龍樹. 標準フルボ酸の添加が微細藻類 *Isochrysis galbana* の増殖に与える影響. 日本水環境学会. 2023年3月. 愛媛. (ポスター)
- ② Saki Kojima, Mutsumi Sekine, Masahiro Ohtake and Tatsuki Toda. Growth-promoting Effects of Soil Extracts on Valuable Microalgae. The 6th International Postgraduate Conference on Biotechnology (IPCB). 2023年8月. National University of Singapore.
- ③ 小島咲、関根睦実、大竹正弘、小松一弘、片山智代、Fatimah Md. Yusoff、戸田龍樹. 土壌抽出液添加による有用微細藻類の増殖促進. 日本腐植物質学会. 2023年11月. 東京. (ポスター)

(3) 出版物

なし