

2024年度（第49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 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	横 浜 国 立 大 学 大学院環境情報研究院	助 教	有用微細藻類の培養と増殖能の測定
関 根 睦 実	創 価 大 学 プランクトン工学研究所	研 究 員	有用微細藻類の培養と増殖能の測定
小 松 一 弘	信 州 大 学 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を特定した。また、27種の土壌抽出液を作成し、DOMの性状分析の一環として、土壌抽出液の蛍光腐植物質を定量化するため、Excitation emission matrix-Parallel factor (EEM-PARAFAC) 解析を前倒しで実施した。その結果、4つの蛍光物質が特定され、その抽出量は、土壌の種類にかかわらず、抽出温度の上昇に伴い増加した。さらに、土壌抽出液を再加熱した条件におい

ても増加が確認され、微細藻類の成長促進因子候補に挙げられた。

2024年度は、最終年度の3年目（来年度）に実施予定である10 mL試験管実験からベンチ実験へのスケールアップに向け、60 mL試験管を用いて、微細藻類の培養方法を検討した。大量培養に向け、土壌抽出液の抽出条件ならびに添加量の改変を試みた。同時に、大量培養リアクターの設計・設置を行い、試運転によって改良点を確認した。また、土壌抽出液の微量金属の組成を分析し、EEM-PARAFAC解析結果と合わせてデータ解析中である。

2. 研究の計画

(1) 微細藻類の大量培養条件の最適化

本年度は、微細藻類の大量培養への利用を見据え、昨年の研究条件である10 mL試験管を60 mL試験管に変え、土壌抽出溶媒を海水から、扱いが容易な淡水に変え、そして、土壌抽出液の添加量を半量に減らした際の効果を検証した。また、培養液への連続通気やpH調整による増殖促進効果を検証した。

初年度の研究で難培養性微細藻類の増殖促進効果が特定された土壌（黄色土（国頭村与那覇岳）または赤色土（国頭村奥））と抽出法（105℃または121℃抽出、再加熱0-1時間）によって土壌抽出液を作製した。加熱にはオートクレーブを用いた。抽出液の再加熱は、抽出液をガラス繊維フィルターでろ過した後、オートクレーブを用いてろ液を121℃で再加熱し、抽出成分の低分子化を図った。土壌抽出液の溶媒には超純水または海水を用いた。

土壌抽出液を添加した培地にて、難培養性微細藻類 *Oocystis heteromucosa* を培養し、最大比増殖速度と最大吸光度を測定することで土壌抽出液による増殖促進効果を評価した。*Oocystis* はEPA含量が高く、大量培養が期待される有用微細藻類である。土壌抽出液は溶存有機炭素（DOC）濃度が5 mg/Lまたは10 mg/Lとなるように培地に添加した。培養容器は60 mL試験管とし、培養環境は温度30℃、光強度300 $\mu\text{mol-photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 、12時間毎の明暗周期とした。微細藻類への二酸化炭素供給、培地からの溶存酸素除去、そして光照射効率を上げるための攪拌を目的として、連続的に通気する系列、そして培養過程で変動するpHを毎日調整する系列を設けた。680 nmにおける吸光度を測定した。

(2) 難培養性微細藻類の培養に効果のある画分の推定

土壌抽出液は、抽出液中のDOMと金属が、DOMのキレート作用によって錯体を形成することで、微細藻類の必須微量金属の利用能を高め、微細藻類の増殖を促進する可能性が示唆されている。今年度は27種の土壌抽出液について、各種金属濃度をICPで分析し、その結果を昨年度の分析項目に加えてデータを再解析している。

3. 研究の成果

(1) 微細藻類の大量培養条件の最適化

淡水で抽出した土壌抽出液を、DOCが5 mg/Lとなるように海水培地に添加し、60 mL試験管にて *O. heteromucosa* を培養した。微細藻類を大量培養する際には、培養液への連続的な通気が一般的であるため、この試験でも連続通気システムを導入した。

培養の結果、土壌抽出液無添加の対象区も含め、10 mL試験管で通気なしで実施した過去の実験データと比較し、最大吸光度が3-5倍増加した。これは、培養液の連続通気によって、微細藻類の光利用ならびに気液ガス交換が促進されたためであると考えられた。その上で、黄色土由来抽出液の添加区では、対象区と比較し、最大比増殖速度が最大1.2倍、培養期間における最大吸光度が最大1.4倍に向上した。赤色土では、比増殖速度が1.2倍に向上したものの、最大吸光度は増加せず、例えば、赤色土の105℃の抽出液を添加した条件では最大22%の減少が確認された。微細藻類が成長すると、培地中のCO₂が消費され、培養液のpHが上がる。試験では、連続通気に加え、土壌抽出液の添加によってさらに微細藻類の増殖が促進されたことで、培地中のpHが大きく変化し、最大吸光度の低下を招いた可能性が考えられた。

つづいて、赤色土を121℃で抽出した土壌抽出液を用い、個々のパラメータ（抽出溶媒・抽出液添加量）の変化が微細藻類の増殖促進効果に与える影響を評価した。また、先の実験の結果を受け、pH調整をする系を設けた。比増殖速度は、海水の土壌抽出液を10 mg-DOC/Lで添加した系で最も高い値を示した（図1）。一方で、淡水の土壌抽出液を5 mg-DOC/Lの添

加であっても、その74%の増殖促進効果が示された。培養過程で培養液のpHを調整し、一定に維持した試験では、対象区と比較し、土壌抽出液を添加した条件で、比増殖速度と最大吸光度の両方で、それぞれ1.4倍と1.2倍の増殖促進効果が得られた。同条件で、pHを調整しなかった試験では、土壌抽出液の添加によって比増殖速度が1.2倍向上したものの、最大吸光度に変化はなかった。以上より、難培養性微細藻類の大量培養に向けて、淡水による土壌抽出液の作成、5 mg-DOC/Lの抽出液添加濃度（昨年度の半量）、ならびにpH調整の有効性が確認され、本年度の研究成果をもって、新規微細藻類培養培地とその使用法が確立した。来年度は、本新規培地を用いて難培養性微細藻類の大量培養を実施する。

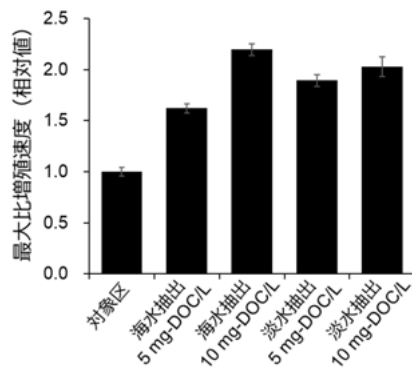


図1. 異なる溶媒の黄色土抽出液（121℃抽出、再加熱なし）を異なる濃度で添加した際の *O. heteromucosa* の最大比増殖速度。

4. 研究の反省・考察

- (1) 昨年度の研究を経て、105℃や 121℃の高温で土壌を抽出することで、溶存有機物の抽出効率が向上し、一定の微細藻類の増殖促進効果も得られることが明らかとなった。25℃で作成した土壌抽出液中の DOC 濃度は 37～56 mg-C/L と低濃度であるため、コストの観点から、培地への土壌抽出液の添加量を少なくするためには 105℃や 121℃での抽出が望まれる。しかし一方で、難培養性微細藻類の中には、25℃で抽出した土壌抽出液で高い増殖促進効果を示した種類もあり、これらの微細藻類については腐食物質などの DOC 以外の増殖促進物質の特定を行う必要があるかもしれない。微細藻類の種類によって増殖促進機序が異なることは十分に考えられることである。
- (2) 微細藻類の種類によって増殖促進機序が異なるという観点は、主成分分析や重回帰分析などの統計解析からも示された。比増殖速度が DOC と正の関係をもつ微細藻類と、全く関係を示さない微細藻類が存在することが明らかとなった。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① A novel stepwise salinity acclimation method to improve the survival of freshwater microalgae *Haematococcus lacustris* in seawater salinity
<http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1007/s00449-024-03092-3>
 Gu, Q., Y. Takayama, N. Natori, M. Hirahara, A.K. Chowdhary and T. Toda.
 Bioprocess and Biosystems Engineering, 48, 43-52.
- ② Astaxanthin induction in *Chromochloris zofingiensis* by transition of nutritional modes.
<https://doi.org/10.1007/s10811-025-03497-x>
 Anupreet Kaur Chowdhary, Masatoshi Kishi, Tatsuki Toda
 Journal of Applied Phycology. (オンライン印刷)

(2) 口頭発表

- ① Effect of biomass phase on astaxanthin production in *Chromochloris zofingiensis* by multiple cultivation steps.
 Chowdhary A.K., 戸田龍樹
 Water and Environment Technology Conference (WET2024) (岡山大学), July 21st-

22nd (口頭発表)

- ② Astaxanthin accumulation by transition of nutritional modes in *Chromochloris zofingiensis*.
Chowdhary, K. A., M. Kishi and T. Toda
1st International Conference on Novel Photorefineries for Resource Recovery, Valladolid, 09-11 2024 September, Spain.
- ③ 海産ハプト藻 *Isochrysis galbana* の屋外培養における 浮遊型フォトバイオリアクターの揺動攪拌によるフコキサンチン生産
藤井正志, 岸波秀美, 佐野華秀, 高山佳樹, 戸松千秋, R. Harun, F.M. Yusoff, 古谷研, 戸田龍樹
2024年日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会(島根大学松江キャンパス), 9月13日~9月16日 (口頭発表)
- ④ 難培養性微細藻類の大量培養に向けた土壌抽出液添加による増殖促進
林 香苗, A. K. Chowdhary, 関根 睦実, 戸田 龍樹
令和6年度日本水産増殖学会第22会大会(沖縄タイムズビル) 11/29-30要旨集p22, 0-43.
- ⑤ 水産養殖産業から排出される有機性汚泥の微細藻類を利用した循環利用プロセスの構築と経済的インセンティブ創出の試み
戸田龍樹
令和6年度日本水産増殖学会第22会大会 (沖縄タイムズビル) 11/29-30要旨集

(3) 出版物

なし