2025年度（第50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		

〇研究代表者

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）

〇研究分担者

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	客員教授	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	国　立　環　境　研　究　所 地　域　環　境　保　全　領　域	JSPS特別研究員	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	埼　玉　県　環　境　科　学 国　際　セ　ン　タ　ー	研 究 所 長	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。

(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金属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金属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。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。加えて、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、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。

初年度の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。27種の土壌抽出液を作成し、土壌抽出液中の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、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培養に適した条件を検討した。最終年度の2025年度は、多変量解析による成長促進因子の推定を行い、その推定された因子による増殖促進効果を検証した。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をバブルカラムリアクターで評価した。

2. 研究の計画

(1)増殖促進効果のある成分の推定

本年度は、土壌抽出液の類似性評価および増殖促進に寄与する成分を推定するため、クラスター分析および重回帰分析を行った。分析には、培地に含まれる土壌抽出液由来のUV254値（芳香族性有機物の指標）、栄養塩濃度、および微量金属濃度のデータセットを用いた。微細藻類の増殖指標として、各土壌抽出液添加区における最大比増殖速度および最大吸光度を用いた。クラスター分析と重回帰分析には、それぞれ Primer 7 with PERMANOVA+とRを使用した。

(2)成長促進因子による増殖促進効果の検証

重回帰分析によって推定された成長促進因子による増殖促進効果を検証するため、培養実験を行った。土壌抽出液の添加では、特定成分のみの濃度調整が困難であるため、抽出液由来のDOM（UV254値基準）、栄養塩、および金属を、標準腐植物質（Humic substances: HS）と化学試薬を用いて模擬した。標準腐植物質は、国際腐植学会からフルボ酸とフミン酸を入手し、1:1(v/v)で混合した。基準となる土壌抽出液添加区は、過去の培養実験において最も高い最大比増殖速度の促進効果を示した微細藻類種と土壌抽出液の組み合わせとした（*Oocystis heteromucosa*: 黄色土121℃加熱・5時間再加熱、赤色土121℃加熱・1時間再加熱）。各成分の添加量は、培地中の抽出液由来の各成分濃度と同等となるように調整した。Conway培地のみの対象区(C)、従来の土壌抽出液(Soil extract: SE)添加区(C+SE)、土壌抽出液を標準腐植物質と化学試薬で模擬した区（C+All）、DOMは入れずに栄養塩と金属（Metals: M）を添加した区（C+M）、そして、推定された成長促進因子（マンガン、鉄）を入れずにDOM、栄養塩、その他の金属を添加した区(C+All-Mn, C+All-Fe)を設定した（図1）。培養は、有効容積30 mLの60 mL試験管を用いて、温度30℃、光強度300 µmol photons m^{-2} s^{-1}、12時間毎の明暗周期とした。

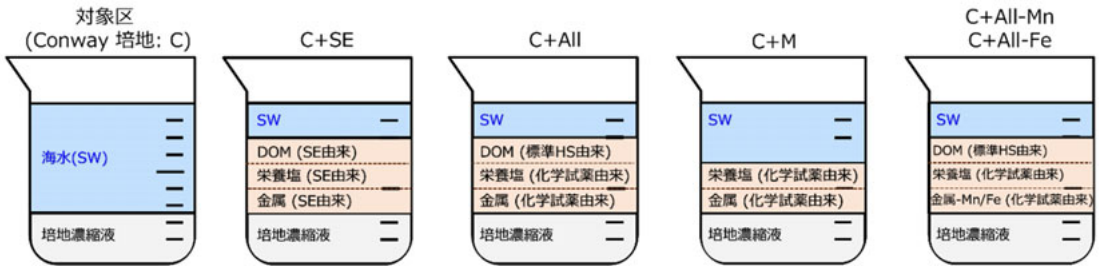


図1. 異なる由来のDOM，栄養塩，金属で構成された培地組成の模式図.

(3)バブルカラムリアクターでのスケールアップ試験

過去の培養実験において最大比増殖速度が最も向上した、*O. heteromucosa* と黄色土由来の抽出液（121℃ 加熱・5 時間再加熱）の組み合わせで、バブルカラムリアクターを用いてスケールアップ試験を行った。対象区には Conway 培地のみを用いて、条件区では土壌抽出液を溶存有機炭素（DOC）濃度が 10 mg/L となるように添加した。有効容積を 1.2 L とし、温度 30℃、光強度 300 µmol photons m^{-2} s^{-1}、連続通気で、12 時間毎の明暗周期とした。培養期間中は、二酸化炭素供給により pH が 8.3 以上とならないよう制御した。

3. 研究の成果

(1) 増殖促進効果のある成分の推定

これまでの研究で使用した 27 種の土壌抽出液の類似性を評価するため、クラスター分析を行った（図 2)。その結果、土壌分類学上では同じ沖縄土壌マージに分類される赤色土および黄色土は異なるグループに分類され、暗赤色土および黄色土の類似性が高いことが示された。土壌抽出液は、A. 25℃ 加熱の暗赤色土と黄色土、B. 高温（105℃、121℃）加熱の暗赤色土と黄色土、C. 121℃ 加熱の赤色土、D. 25℃、105℃ 加熱の赤色土、の 4 つのグループに分類された。赤色土および黄色土は、同じ母材に由来する土壌であり、鉄の含有量が高いことから同じマージに分類されている。しかし、本研究で作成した黄色土由来の土壌抽出液は、鉄以外にもマンガンや窒素含有量が高く、これは暗赤色土由来の抽出液と似た傾向であった。このことから、クラスター分析において黄色土は暗赤色土と類似性が高くなったと考えられる。過去の培養実験において、最大比増殖速度の促進効果が高かった抽出液は、主にグループ B と C に属した。これらのグループに属する抽出液添加条件下では、高温で抽出された微量金属が豊富に溶存していたことに加え、UV254 値も高かったことから、難培養性微細藻類種の増殖促進に寄与した成分は、高温下で抽出された微量金属や芳香族性有機物である可能性が示唆された。

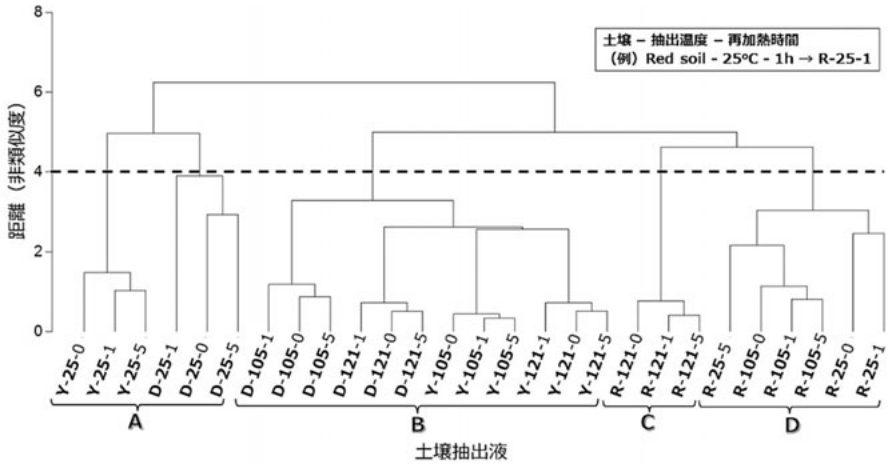


図 2. クラスター分析におけるデンドグラム．R は Red soil（赤色土），Y は Yellow soil（黄色土），D は Dark red soil（暗赤色土）を示す．抽出温度は，25℃，105 ℃，121 ℃，再加熱時間は 0 時間，1 時間，5 時間を示す．グループ A は、距離 4 において 2 つに分かれたが、ANOSIM（Analysis of Similarities）により、グループ間に有意な差が見られなかったため、同じグループとした．

続いて重回帰分析を行うことにより、増殖促進に貢献したと予想される成分を抽出した。*O. heteromucosa* と *O. marssonii* における、最大比増殖速度および最大吸光度の回帰式を求めた。その結果、*O. heteromucosa* と *O. marssonii* の最大比増殖速度の促進には、マンガンや鉄、リンが効果的である可能性が示唆された。これらの成分は、高温で加熱された黄色土および赤色土由来の抽出液添加区で高い濃度であり、そのような抽出液添加区では最大比増殖速度が無添加区と比較して 2 倍近く向上していた。これはクラスター分析の結果と一致しており、マンガンや鉄が比増殖速度の促進に寄与した可能性が高い。

(2) 成長促進因子による増殖促進効果の検証

土壌抽出液添加区（C+SE）が、土壌抽出液を標準腐植物質と化学試薬で模擬した区（C+All）やマンガンあるいは鉄を添加しなかった条件区（C+All-Mn, C+All-Fe）と比較し、最も高い増殖促進効果を示した（図 3）。DOM を添加しない全ての C+M において、土壌抽出液添加区と比較して最大比増殖速度が最大 69%低下したことから、土壌抽出液中の物理化学的に複雑な構造・性状の DOM が比増殖速度の促進に重要な因子であることが明らかとなった。さらに、黄色土または赤色土由来の抽出液模擬区（C+All）から、それぞれマンガンまたは鉄を除いた条件区（C+All-Mn, C+All-Fe）では、増殖促進効果が 16-22%低下したことから、重回帰分析で推定された因子（Mn、Fe）が難培養性微細藻類種の増殖促進効果をもたらしたことが示唆された。以上より、土壌抽出液中の DOM のキレート作用により形成されたマンガンおよび鉄との錯体が、最大比増殖速度を促進したと考えられた。

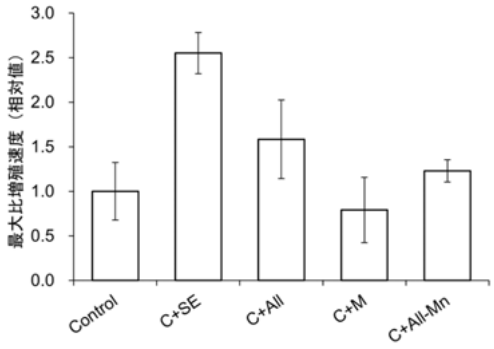


図3. 異なる培地組成における *O. heteromucosa* の最大比増殖速度（相対値）の変化.

(3) バブルカラムリアクターでの試験

大量培養に向けて60 mL試験管からスケールアップしたバブルカラムリアクターを用いて培養した。その結果、土壌抽出液添加区における最大比増殖速度および最大吸光度は、対象区と比較しそれぞれ1.2倍と1.1倍の向上を示した（図4）。60 mL試験管による培養実験では、同様の土壌抽出液を10 mg/Lで添加して無通気で培養したところ、最大比増殖速度は2.6倍向上した。一方、本実験のように連続通気で培養すると、土壌抽出液による増殖促進効果は50%以上低下した。

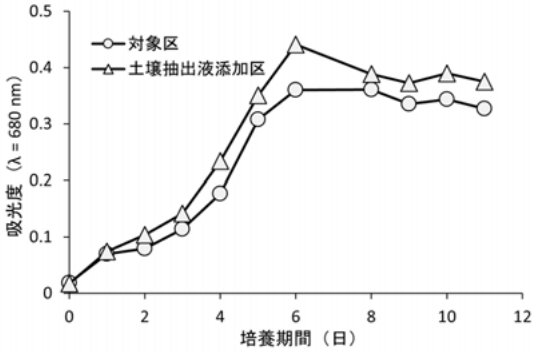


図4. バブルカラムリアクターで培養した際の *O. heteromucosa* の増殖曲線.

4. 研究の反省・考察

(1)重回帰分析により、これまで未解明であった土壌抽出液中の比増殖速度の促進因子を推定した。最大比増殖速度では主に、DOM のキレート作用により形成された微量金属との錯体による効果が認められた。一方、土壌抽出液中の DOM は一般的に腐植物質という難分解性有機物と認識されてきたが、DOM には易分解性有機物も一定量含まれていることから、今後は、易分解性画分の影響評価についても検討する必要がある。

(2)大量培養に向けたバブルカラムリアクターでの試験と試験管での実験の結果に、乖離のあった条件が複数認められた。例えば、試験管培養では土壌抽出液の添加によって最大比増殖速度が 2.6 倍向上したが、バブルカラムリアクターでは 1.2 倍の向上にとどまった。この結果を受けて試験管においてもバブリングを導入した追加試験を実施し、同様の結果を得た。したがって、バブリングによって増殖促進効果が抑制されると考えられた。DOM のエアレーションバブルへの表面吸着の可能性が推察され、土壌抽出液を添加した際の大量培養方法については攪拌方法ならびにリアクターの検討が必要である。

5. 研究発表

(1)学会誌等

① Afifudeen, Aziz, Toda, Takahashi, Effendy, Cha. 2025. Transcriptome-wide analysis of nitrate starvation in *Messastrum gracile*: Impact on nitrogen and carbon metabolism. *J. Appl. Phycol.*, 37(1), 303-321, https://doi.org/10.1007/s10811-024-03389-6.

② Chowdhary, Kishi, Toda. 2025. Cellular characteristics of *Chromochloris zofingiensis* in different nutritional modes. *Bull. Plank. Eco-Eng. Res.*, 5, 51-55.

③ Gu, Chowdhary, Sekine, Toda. 2025. Enhanced astaxanthin accumulation in the microalga *Haematococcus lacustris* in seawater through the combination of salinity, nitrogen starvation and high light. *Plankton and Benthos Res*, 20(4), 293-297, https://doi.org/10.3800/pbr.20.293.

④ Sewunet, Chowdhary, Xia, Sekine, Bhatia, Woldie, Toda. 2025. Optimizing ammonium supply strategies for mitigation of free ammonia inhibition in the mass cultivation of *Limnospira fusiformis*. *Biochem. Eng. J.*, 227, 110018, https://doi.org/10.1016/j.bej.2025.110018.

⑤ Fujii, Takayama, Tomatsu, Sano, Kishinami, Hirahara, Farahin, Harun, Yusoff, Syukri, Furuya, Toda. 2026. Pilot outdoor cultivation of a marine haptophyte *Tisochrysis lutea* using a novel floating photobioreactor driven by electric rotary motor. *Aquacul. Eng.*, 113, 102666, https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2025.102666.

⑥ Workie, Chowdhary, Sekine, Larry, Woldie, Kishi, Toda. 2026. Development of a low-cost real-time monitoring system for biomass concentration and environmental factors in microalgae *Limnospira fusiformis* cultivation. *Biopro. Biosys. Eng.*, 49, 47-57, https://doi.org/10.1007/s00449-025-03237-y.

⑦ Hashim, Komatsu, Sekine, Chowdhary, Yaacob, Toda. 2026. Linking Soil-Derived Dissolved Organic Matter from Malaysian Forests to Phytoplankton Growth: Insights from Fractionation and EEM-PARAFAC Analysis. *J. Appl. Phycol.*, 38, 1019-1036, https://doi.org/10.1007/s10811-026-03793-0.

(2)口頭発表

① Chowdhary, 林, 関根, 竹中, 山口, 戸田.成長の遅い微細藻類における土壌抽出物添加による増殖促進. 2025年日本ベントス学会・日本プランクトン学会 合同大会, 東北大学, 2025年9月9日～12日,

② 林, Chowdhary, 関根, 久保川, 戸田. 難培養性有用微細藻類 *Oocystella heteromucosa* および *Oocystis marina* の培養における土壌抽出液の増殖促進効果. 第60回水環境学会年会, 要旨集 p.312, 中央大学, 2026年3月9日～11日.

ほか国際学会1件（AlgalBBB）、国内学会3件（日本プランクトン学会・日本水環境学会）

(3)出版物

① 地球を救うグリーンテクノロジー
戸田 龍樹, 井田 旬一, 佐藤 伸二朗（編）2025. 第三文明社.