

# メタン発酵消化液を用いたユーグレナ藻の 培養可能性調査

-ユーグレナを用いた循環型社会の形成に向けて-

○小山 智己<sup>1,2</sup>, 富田 勝<sup>2,3</sup> (指導教員: 伊藤 卓朗<sup>2</sup>, 黒田 裕樹<sup>2,3</sup>)

1. 慶應義塾大学環境情報学部 4年 (2017年3月卒業予定)
2. 慶應義塾大学先端生命科学研究所
3. 慶應義塾大学環境情報学部

キーワード: ユーグレナ, メタン発酵消化液, 培養, 循環型社会

## 1. 研究概要

*Euglena gracilis* (ユーグレナ)は食糧・燃料生産能力の高さから、新たな有用物質生産者として注目を集めている。また、メタン発酵時にバイオガスの副産物として生成される消化液には廃棄物由来の窒素、リンが高濃度に濃縮されている。ユーグレナは光合成による炭素固定及び培地中の窒素、リンを固定して増殖するため、本研究では消化液を改良したユーグレナの培養方法を開発した。本研究が産業応用されることにより、環境浄化、環境負荷の少ないエネルギー生産、食料自給率の向上など様々な社会問題へのアプローチが可能になる。

## 2. 序論

### 2.1 研究背景

#### 2.1.1 メタン発酵と消化液

メタン発酵は微生物を用いて有機廃棄物からバイオガスを得る技術である<sup>[1]</sup>。ここで得られたバイオガスは発電などに応用可能であることから近年注目を集めている。また、2016年9月に閣議決定されたバイオマス活用推進基本計画においてもバイオガスの利用推進が説かれており、メタン発酵技術の更なる普及が期待されている。メタン発酵の際、バイオガスの副産物として消化液が生成される。消化液中には廃棄物由来の窒素・リンが高濃度に濃縮されており、再生可能エネルギーが発達しているドイツでは農業用肥料として再利用されている。しかしながら、日本国内では散布可能な時期・面積が限られており、肥料として使用しきれない場合は浄化処理が施されている<sup>[2]</sup>。

#### 2.1.2 ユーグレナ藻

*Euglena gracilis*(ユーグレナ)は進化的に特異であり、動物・植物双方の特徴を有するユニークな生物である。そして、動物・植物双方の栄養素を兼ね備えており、摂取した際の消化率が高いことから、食糧としての評価も高い<sup>[3]</sup>。また、ユーグレナは、好気条件下ではパラミロンと呼ばれる多糖を蓄積可能であり、嫌気条件下ではパラミロンを分解し特徴的な脂質であるワックスエステルを蓄積することが知られている<sup>[4]</sup>。ワックスエステルはジェット燃料に変換でき、これを燃焼した際に生じる二酸化炭素はユーグレナが大気から光合成によって炭素固定したものであるため、カーボンニュートラルな社会の形成に寄与すると考えられる。ユーグレナなどの藻類の増殖には独立栄養、従属栄養条件によって固定される炭素源の他、水、肥料成分が主に必要である。これらの条件が揃えば1年中収穫可能である。

### 2.2 研究目的

メタン発酵技術は廃棄物からエネルギーを得ることができ、二酸化炭素排出量削減にも貢献できる手段である。しかしながら消化液の処理に課題が残る。ユーグレナは食糧・バイオ燃料生産者として有望であり、培地中の窒素・リンを用いて増殖することから消化液中の窒素・リンを利用することができる。よって本研究では消化液を用いたユーグレナの効率的な野外培養系の確立を最終目標とする。その第一段階として、研究室内におけるユーグレナの増

殖特性の理解を目的とする。

### 3. 対象と手法

#### 3.1 対象株

対象株は培養株保存機関である国立環境研究所から分譲された *Euglena gracilis* NIES-48 を用いた。

#### 3.2 メタン発酵消化液での培養可能性調査

##### 3.2.1 原液のメタン発酵消化液を用いた培養

メタン発酵消化液(pH9.0)は株式会社アミタから分譲されたものを用いた。消化液の窒素、リンの濃度を表1に示す。

表1 消化液中の窒素、リン濃度(mg/L)

	Total N	NH <sub>4</sub> -N	Total P
濃度(mg/L)	2100	1400	190

##### 3.2.2 消化液を超純水で希釈した培地

消化液の原液と、消化液を超純水で3倍、10倍、30倍、100倍希釈したものを、オートクレーブ滅菌後 pH 6.0 に調整して用いた。

##### 3.2.3 pH 条件を調整した培地

消化液を超純水で10倍希釈し、オートクレーブ滅菌後 pH を 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 に調整して用いた。

##### 3.2.4 AF-6 培地

AF-6 培地は先行研究<sup>[5][6]</sup>の組成に従って作成した。

#### 3.3 培養環境

培養は明期 14 時間、暗期 10 時間、25°C、光量子束密度 250 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> の人工気象器内で7日間静置培養を行った。50 mL の培養フラスコに 30 mL の培地を投入し、初期細胞濃度が 5.0×10<sup>3</sup> cells/mL になるように植え継いだ。

#### 3.4 分析方法

増殖は、CDA-1000(Sysmex, 日本)を用いて毎日細胞数、平均粒子径を測定した。また、これらの結果から 1 mL 中に含まれる総細胞体積を算出した。

### 4. 結果・議論

#### 4.1 原液の消化液を用いた培養

ユーグレナを原液の消化液で 7 日間培養したが、増殖を示さなかった (図 1)。

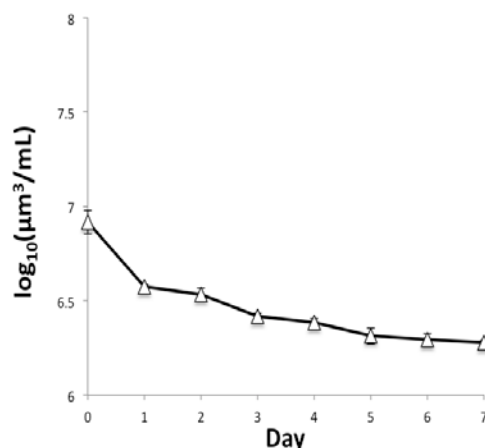


図1 原液の消化液で培養時におけるユーグレナの増殖曲線

この理由として、①消化液の着色が挙げられる。光合成色素であるクロロフィルは 400~500 nm, 600~700 nm の波長の光を吸収する。藻類の培養に用いられる AF-6 培地の OD<sub>400-500</sub>, OD<sub>600-700</sub> が 0 に近い値を示したのに対し、消化液の OD<sub>400-500</sub>, OD<sub>600-700</sub> はそれぞれ 0.289~0.631, 0.128~0.184 であった。よって消化液の着色により光合成が阻害された②ユーグレナの至適 pH 条件は弱酸性条件である<sup>[7]</sup>ことから pH9.0 の条件はユーグレナの増殖や代謝に悪影響を与えた ③細胞サイズが縮小(表 2)したことから栄養塩の濃度が濃すぎたため浸透圧調節が円滑に行われなかったことなどが考えられる。

表2 原液の消化液で培養時におけるユーグレナの平均粒子径

	平均粒子径(μm)
Day 0	13.9±0.19
Day 1	11.14±0.13
Day 2	10.15±0.14
Day 3	9.39±0.1
Day 4	8.95±0.15
Day 5	8.6±0.1
Day 6	8.41±0.1
Day 7	8.2±0.07

#### 4.2 至適栄養塩濃度の検討

ユーグレナを原液の消化液、10~100 倍希釈した消化液で培養した結果を図 2 に示す。7 日間培養の結果、消化液を 10 倍希釈した培地でもっとも良好な増殖が確認された(図 2, 表 3)。これは原液、3 倍希釈の消化液では 4.1 で挙げたように①光合成活性の低下②浸透圧調節などが律速になったと考えられる。30 倍希釈、100 倍希釈した消化液では上記のような問題点が解決されたこと

考えられる。しかしながら栄養塩の濃度が薄いため 5 日目までに栄養塩を完全に消費しまいそれ以降増殖が低下してしまったと考えられる。10 倍希釈では律速条件が最も少なく、良好な増殖を示したと考えられる。

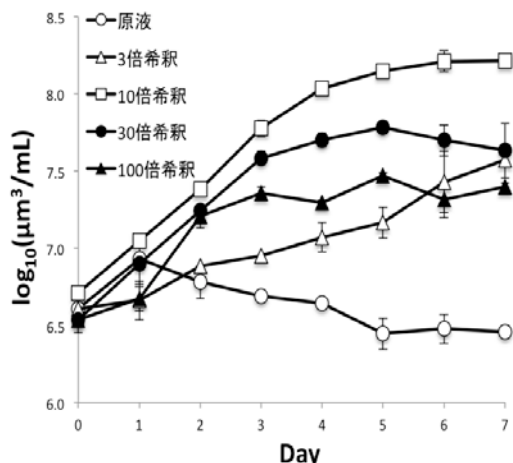


図2 原液, 3 倍希釈, 10 倍希釈, 30 倍希釈, 100 倍希釈した消化液で培養時におけるユーグレナの増殖曲線 (pH は 1N HCl で 6.0 に調整したものを用いた)

表3 原液, 3 倍希釈, 10 倍希釈, 30 倍希釈, 100 倍希釈で培養時におけるユーグレナの最大細胞数(cells/mL), 最大体積(μm³/mL), 最大増加量(μm³/mL/day)

	最大細胞数 (cells/mL)	最大体積 (μm³/mL)	最大増加量 (μm³/mL/day)
原液	5.88×10 <sup>3</sup> ± 4.33×10 <sup>2</sup>	8.52×10 <sup>6</sup> ± 5.66×10 <sup>5</sup>	4.41×10 <sup>6</sup> ± 1.05×10 <sup>5</sup>
3 倍希釈	1.65×10 <sup>4</sup> ± 1.41×10 <sup>3</sup>	3.74×10 <sup>7</sup> ± 2.76×10 <sup>6</sup>	1.2×10 <sup>7</sup> ± 2.76×10 <sup>6</sup>
10 倍希釈	1.37×10 <sup>5</sup> ± 1.25×10 <sup>4</sup>	1.64×10 <sup>8</sup> ± 1.52×10 <sup>7</sup>	4.85×10 <sup>7</sup> ± 2.26×10 <sup>6</sup>
30 倍希釈	5.32×10 <sup>4</sup> ± 5.98×10 <sup>3</sup>	6.05×10 <sup>7</sup> ± 5.65×10 <sup>6</sup>	2.11×10 <sup>7</sup> ± 1.97×10 <sup>6</sup>
100 倍希釈	2.39×10 <sup>4</sup> ± 1.84×10 <sup>3</sup>	2.94×10 <sup>7</sup> ± 1.5×10 <sup>6</sup>	1.15×10 <sup>7</sup> ± 1.08×10 <sup>6</sup>

### 4.3 至適 pH 条件の検討

消化液の pH を 4.0~9.0 に調整した培地でユーグレナを培養した結果を図 3 に示す。7 日間培養の結果、ユーグレナは pH を 4.0, 5.0, 6.0 に調整した消化液で良好な増殖を示した。先行研究でもユーグレナは弱酸性条件下が至適条件である<sup>[7]</sup>ことや、ユーグレナの培養に用いられる Cramer-Myers 培地や AF-6 培地, HUT 培地などの pH も 5.5, 6.4 であることから今回行った実験は、先行研究と一致するものであり、弱酸性条件下の中でも pH6.0 の消化液で最も良好な増殖が確認された。

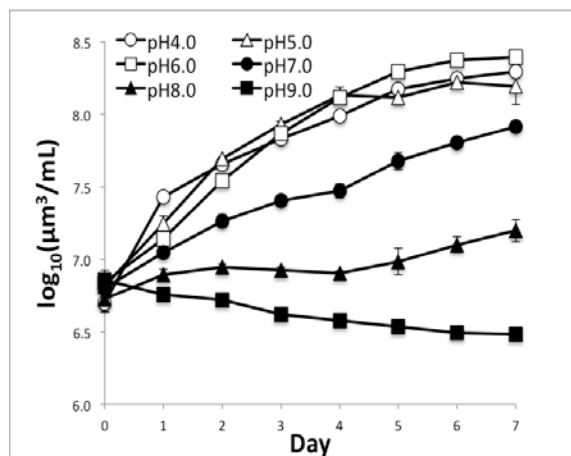


図3 pH を 4.0~9.0 に調整した消化液で培養時におけるユーグレナの増殖曲線(消化液の希釈倍率は 10 倍とし, pH の調整は 1NHCl を用いて行った)

表4 pH4.0~9.0 間で培養時におけるユーグレナの最大細胞数 (cells/mL), 最大体積(μm³/mL), 最大増加量(μm³/mL/day)

	最大細胞数 (cells/mL)	最大体積 (μm³/mL)	最大増加量 (μm³/mL/day)
pH 4.0	1.94×10 <sup>5</sup> ± 9.61×10 <sup>3</sup>	1.97×10 <sup>8</sup> ± 1.61×10 <sup>7</sup>	5.11×10 <sup>7</sup> ± 2.83×10 <sup>6</sup>
pH 5.0	1.48×10 <sup>5</sup> ± 1.88×10 <sup>3</sup>	1.65×10 <sup>8</sup> ± 2.33×10 <sup>7</sup>	5.12×10 <sup>7</sup> ± 2.16×10 <sup>6</sup>
pH 6.0	1.99×10 <sup>5</sup> ± 1.08×10 <sup>3</sup>	2.46×10 <sup>8</sup> ± 1.38×10 <sup>7</sup>	6.57×10 <sup>7</sup> ± 4.96×10 <sup>6</sup>
pH 7.0	7.56×10 <sup>4</sup> ± 5.62×10 <sup>3</sup>	8.26×10 <sup>7</sup> ± 6.45×10 <sup>7</sup>	1.81×10 <sup>7</sup> ± 8.29×10 <sup>6</sup>
pH 8.0	1.63×10 <sup>3</sup> ± 1.89×10 <sup>3</sup>	1.58×10 <sup>7</sup> ± 2.88×10 <sup>6</sup>	2.86×10 <sup>6</sup> ± 6.18×10 <sup>5</sup>
pH 9.0	7.6×10 <sup>3</sup> ± 7.0×10 <sup>2</sup>	5.68×10 <sup>6</sup> ± 7.75×10 <sup>5</sup>	増加なし

### 4.4 改良した消化液と AF-6 培地で培養時における増殖比較

ユーグレナを改良したメタン発酵消化液と AF-6 培地で培養した結果を図 4 に示す。

7 日間培養の結果、改良した消化液でユーグレナを培養することにより、AF-6 培地で培養時と同等の増殖を示すことが示唆された。消化液, AF-6 培地で培養時における増加量はともに 4 日目で最大になることが確認された(表 5)。消化液中の主な窒素源はアンモニア態窒素であり、AF-6 培地中の主な窒素源は硝酸態窒素である。両者間で増殖に差が見られなかったことから窒素源の違いが増殖に与える影響は少ないことが示唆された。

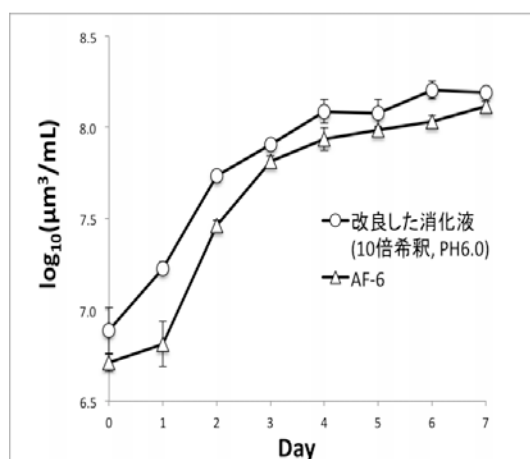


図4 改良した消化液(10倍希釈, pH6.0)とAF-6培地で培養時におけるユーグレナの増殖曲線

表5 改良した消化液(10倍希釈, pH6.0), AF-6培地で培養時におけるユーグレナの最大細胞数(cells/mL), 最大体積( $\mu\text{m}^3/\text{mL}$ ), 最大増加量( $\mu\text{m}^3/\text{mL}/\text{day}$ )

	最大細胞数 (cells/mL)	最大体積 ( $\mu\text{m}^3/\text{mL}$ )	最大増加量 ( $\mu\text{m}^3/\text{mL}/\text{day}$ )
改良した消化液	$1.19 \times 10^5 \pm 1.13 \times 10^4$	$1.6 \times 10^8 \pm 1.74 \times 10^7$	$4.23 \times 10^7 \pm 1.71 \times 10^6$
AF-6培地	$1.17 \times 10^5 \pm 6.93 \times 10^3$	$1.3 \times 10^8 \pm 8.94 \times 10^7$	$3.63 \times 10^7 \pm 5.09 \times 10^6$

## 5. 結論

本研究では、メタン発酵消化液を用いたユーグレナの培養可能性を調査した。その結果、原液の消化液をそのままユーグレナの培養に用いても増殖を示さないことが確認された。その後、微生物の培養に重要な要因である培地の栄養塩濃度とpHを改良したところ、消化液を超純水で10倍希釈し、pHを6.0に調整することでユーグレナの増殖が向上した。また、改良した消化液を用いてユーグレナを培養するとAF-6培地と同等の増殖を示した。

## 6. 実用化に向けた課題・展望

物質生産を行う上で、低コストで生産性の高い技術の開発は不可欠である。ユーグレナなどの微細藻類を培養する方法として屋内培養と屋外培養がある。屋内培養は環境条件が一定であるため生産性を一定に保つことができるが、環境要因を制御するコストが膨大である。一方屋外培養は環境要因を制御するコストを省くことができることから低コスト培養が可能になるが、他微生物のコンタミネーションなどにより生産性を一定に保つことが困難である。低コストで生産性を高めるためには屋外培養での生産性の

向上が不可欠である。ユーグレナは40%CO<sub>2</sub>を培地に通した極限環境でも生育可能である<sup>[8]</sup>。このような特徴やさらなる生理学的特性の理解を進めることで屋外での生産性向上が可能になると考える。

## 謝辞

本研究を進める上で、慶應義塾大学先端生命科学研究所の伊藤卓朗氏には研究の進捗状況を見ていただき様々なアドバイスをいただきました。また、オイル産生微細藻類グループの方々にはグループミーティングなどを通じて盛んな議論、アドバイスをいただきました。ここに感謝申し上げます。最後に、このような研究環境、機会を与えてくださった富田勝教授に深く感謝申し上げます。

## 引用文献

- [1] 李 玉友. (2005) メタン発酵技術の概要とその応用展望. *JEFMA*. 53:4-18
- [2] 中川悦光. (2003) ふん尿とエネルギー利用による循環型社会を目指して. *システム農学*. 19: 9-20
- [3] 細谷圭助, 北岡正三郎. (1977). *Euglena gracilis* タンパク質の人工消化実験およびネズミ飼育試験による栄養価の決定. *日本農芸化学会誌*, 51(8), 483-488.
- [4] Inui, H., Miyatake, K., Nakano, Y., & Kitaoka, S. (1982). Wax ester fermentation in *Euglena gracilis*. *FEBS Letters*, 150(1), 89-93.
- [5] Kato S. (1982). Laboratory culture and morphology of *Colacium vesiculosum* Ehrb. (Euglenophyceae). *J. Phycol.*, 30, 63-67
- [6] Andersen R A. egges, J. A. Harrison, P. J. & Watanabe, M. M. (2005). Recipes for freshwater and sea water media. *Algal culturing techniques*. 429-538.
- [7] Shin, H. S., Chae, S. R., Park, B. S., & Hwang, E. J. (2000). Estimation of operating factors for the continuous carbon dioxide fixation by *Euglena gracilis* Z. *Proceedings of the Water Environment Federation*, 2000(9), 291-310.
- [8] Y. Nakano, K. Miyatake, H. Okuno, K. Hamazaki, S. Takenaka, N. Honami, M. Kiyota, I. Aiga, J. Kondo.(1996). Growth of photosynthetic algae *Euglena* in high CO<sub>2</sub> conditions and its photosynthetic characteristics. In *International Symposium on Plant Production in Closed Ecosystems* 440 (pp. 49-54).