

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 30 年 8 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12262

研究課題名（和文）グルタチオンを副産物とする海洋深層水を用いた藻油生産システムの構築

研究課題名（英文）Algal oil production system using deep ocean water: Glutathione extraction as by-product

研究代表者

倉橋 みどり（KURAHASHI, Midori）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・特任准教授

研究者番号：00724907

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、「プラス経済収支の藻油生産システムの構築」である。微細藻類 *Dunaliella* を農業的に培養し、海洋深層水に豊富に含まれる窒素やリンなどを肥料分として利用することで、生産コストの低減化をはかった。同時に、油脂以外の副産物として、高付加価値品であるグルタチオンに注目し、コストの低減化と同時に収益増大の可能性について検討を行った。また、海洋深層水と微細藻類を農業的に培養する場所として、ペルーの沙漠海岸付近を第一候補に選定し、現地調査を行った。

研究成果の概要（英文）：The objective of this research is "to build an algal oil production system with positive economical balance". We proposed to reduce the production cost by cultivating the microalgae *Dunaliella* as agriculture using the nitrogen and phosphorous present in abundance in deep ocean water as fertilizer. Also, as a by-product other than fats and oils, we focused on the extraction of glutathione, which is a high value-added product, and evaluated the possibility of increasing profit as well as reducing costs. In addition, the desert coast of Peru was selected as the first candidate for a place to cultivate microalgae as agriculture and use deep ocean water as fertilizer. Field survey was also successfully conducted.

研究分野：バイオマス

キーワード：低炭素社会 微細藻類 海洋深層水 沙漠 グルタチオン SDGs 二酸化炭素

1. 研究開始当初の背景

そもそも藻類バイオマスに期待する開発研究のうねりは、いずれも欧米からのものを受けてであり、今回で3度目である。3度目の今回は、世界各地で気候問題が顕在化していることに端を発していると考えられる。ここ数年の気候温暖化は、気候狂暴化と言っても過言ではない。一方、世界各地で起こる気候異変に対する各国政府の取り組みの甘さが、市民レベルの苛立ちを喚起するほどになってきており、世界各地で大がかりなデモまで巻き起こっている。先進国は、二酸化炭素削減に向け、本気で取り組まなければならない時期にさしかかっている、というのが実情である。

2. 研究の目的

再生可能エネルギーは、いずれもエネルギー密度が非常に低く、微細藻類による燃料油生産を計画する場合も、広大な培養面積と大量の水が必要となる。私たちは、この重大な2つの問題を解決するグランドデザインを描くことに成功している。

微細藻類燃料油生産にたちはだかるもうひとつの大きな壁がコストである。私たちは、「プラス経済収支の藻油生産システムの構築」を目指す。微細藻類 *Dunaliella* を農業的に培養し、海洋深層水に豊富に含まれる窒素やリンなどを肥料分として利用することで、生産コストの低減化をはかった。同時に、油脂以外の副産物として、高付加価値品であるグルタチオンに注目し、コストの低減化と同時に収益増大の可能性について検証した。グルタチオンは、グルタミン酸、システイン、グリシンが連なったペプチドで、日本では現在のところ精製されたグルタチオンは、医薬品として扱われている。強い抗酸化作用や解毒作用を示し、パーキンソン病治療に非常に有効であるとされ、その他にも慢性肝疾患、隔膜損傷、放射線・抗がん剤による白血球減少などにも使われている。

3. 研究の方法

Dunaliella を選択した理由の一つは *Dunaliella salina* は、高塩分濃度で生育可能であり、コストのかからないコンタミネーション対策が成り立つことである。そこで、*Dunaliella salina* CS-744/01 DSPL01 の培養における最適塩分濃度について、塩分濃度がそれぞれ異なる f/2 培地を作成して、生育状態を調べた。増殖測定は、Thali Image-Based Cytometer を用いて、細胞数の変化で計測した。

農業的な培養を行う場合、肥料コストの占める割合が高くなる。そのコストを抑制するために、海洋深層水を培養に使うアイデアである。但し、海洋深層水中の肥料成分(栄養塩)濃度は、人工肥料を添加する場合と比較すると、非常に薄いため、そもそも海洋深層

水のみで、培養が可能かどうかの確認を行った。具体的には、塩分濃度が 10% になるまで濃縮した表層水と深層水、および塩分濃度 10% の f/2 培地で *D. salina* の増殖を比較した。
ESW : 濃縮した表層水
EDSW : 濃縮した深層水
f/2 培地 : 塩分濃度 10% の f/2 培地

肥料分(窒素、リンなど)濃度を上げるために、10% 以上(8.9%, 13.3%, 17.8%, 22.2%, 26.7%)に濃縮した海洋深層水で *Dunaliella* の培養を行い、生育状態を観察した。

一般的に、微細藻類の培養は、水深 20cm 程度の培養槽が用いられている。しかし、バイオマスを回収するコストは、培養液量に大きく関係する。すなわち、培養水深は浅い方が理想的である。そこで、20cm 以浅の培養液水深が、*Dunaliella* 増殖量に与える影響について調べた。

N3 水深 4.3cm (培養液量 780mL)

N4 水深 1.6cm (培養液量 280mL)

バッチ培養を前提とした培養で、理想的な栄養塩濃度(N, P 濃度)を基礎データとして求めた。

N/P 固定して、P 量変えた場合の比増殖速度を調べた。

P:N=1:2

PC3 n2 P:6mg/L

PC3 n3 P:7mg/L

Dunaliella に、発酵系有機肥料を与えたときの影響を調べた。

NP : N, P のみ添加

NP+RuBisC : N, P に加え、RuBisC を 0.1mL 添加

理論的には、バッチ培養に比較して連続培養の方が、効率的な培養であることは自明であるが、実際にそれが可能かどうか。まずは、f/2 培地で培養し、増殖が止まったと考えられる時点で、培養液に栄養塩(N, P)を添加してみた。

f/2 : f/2 培地で 30 日間培養

N : f/2 培地で 30 日間培養した後、N を添加した

N, P : f/2 培地で 30 日間培養した後、N と P を添加した

今回は、オープン培養条件における実際の培養を想定し、連続培養が可能かどうかの 60 日間の試験を行った。

<実験条件>

水銀灯 24L 水槽の下、上方開放で静置培養を行った。

130g/L NaCl 人工海水に N : 18mg/L, P : 6mg/L を添加。

およそ 24h ごとに適当量を回収。N, P を適宜添加し、塩分濃度を適宜調整した人工海水

を補水。

True Cell Density：回収直前の細胞密度を蒸発による濃縮率で割ったもの

理論値 Cell Density：人工海水を補水した後の細胞密度

Salinity1：回収直前の塩分濃度

Salinity2：補水後の塩分濃度

実際の生産にあたって、重量という指標は、試算するうえでなくてはならない。一般的な藻類では、遠心分離などの方法で収穫したバイオマスを、蒸留水で洗浄し夾雑物を除いたものを対象として重量測定を行う。しかし、細胞壁をもたない *Dunaliella* は、浸透圧の急激な変化に耐えることができず、塩分濃度の培養を行い、生育状態を観察した。

グルタチオンは、一部の生物を除いて、ほぼすべての生物の細胞内に存在している。生物における役割は、細胞内還元、生体異物の解毒、薬剤耐性、老化防止など多岐にわたるが、産業上は、医薬品、健康食品さらには第二のグリーンレボリューションを起こす可能性のある物質として注目されている。広く薄く存在する物質なので、グルタチオンのみを目的に生物生産することは、経済種子を考えた場合に可能性が低い。そこで、今回のプロジェクトのように、バイプロダクトとして考えると可能性が高まる。本研究では、そもそも *Dunaliella* にどの程度のグルタチオンが含有されているかを明らかにした。グルタチオン量の直接の測定は極めて困難であるため、ルシフェリン発光量測定により間接的にグルタチオン濃度を計測する手法を採用した。フラスコ培養8日目の細胞を遠心機で濃縮して試料を作成し、Total グルタチオンを3サンプル、GSSGを3サンプル測定して、有効数字3桁で表示。

Dunaliella の成長時期により、グルタチオン含有量が変化していくかどうかを調べた。

バイオマスを効率的に回収するには、培養液の凝集濃縮の過程が必要である。ここでは、電気分解により細胞を凝集させる方法を試みた。

AI電極板20×70×4.5mm、電極板距離5mm

ピーカーにサンプル（200ml）と電極を入れ、一定の電源にて電気分解を行った。電解時間1分経過毎に目視にて経過観察し、分離状況を確認した。

1.8V / 3A, 3V / 5A, 1.8V / 2.5A

1.6V / 2A, 1.9V / 2A, 1.6V / 1.5A

電気分解による凝集濃縮実験をスケールアップして行った。

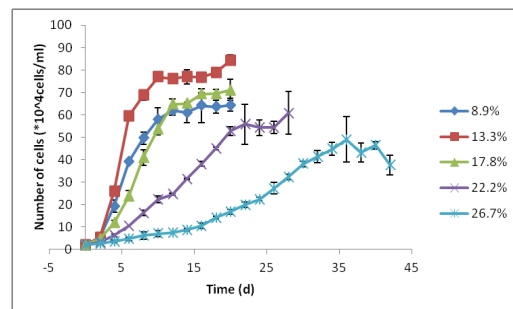
- 50L アルテミア水槽
- ドナリエラ培養液50L（ $2.0 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ 程度）
- 5V×5A、5 分間通電→5 分間静置 ×6 回

- 通電中は水槽内を攪拌
- 凝集した細胞を顕微鏡で観察
- 時間経過と水槽の様子を撮影、終了時に溶液を回収

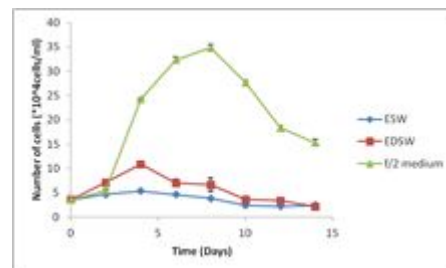
海洋深層水と微細藻類を農業的に培養する場所として、ペルーの沙漠海岸付近を第一候補に選定し、現地調査を行った。

4. 研究成果

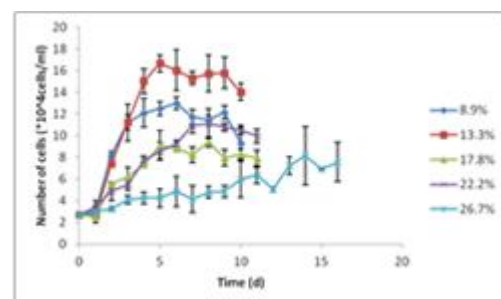
- 最適な塩分濃度は 13%程度であることがわかった。
- 塩分濃度が 20%を超えたあたりから、*D. salina* の増殖速度は遅くなった。



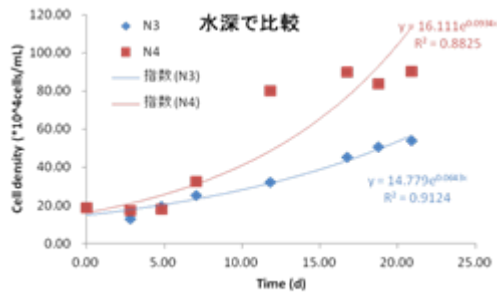
- 深層水は表層水と比較して、最大細胞密度が2倍程度上回った。
- f/2 培地と比較すると、その最大細胞密度は1/3程度であった。



- 塩分濃度 13.3%まで濃縮した深層水でも、最大細胞密度はおよそ $1.7 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ であった。
- 深層水の濃縮によって栄養塩の濃度が上がることも、塩分濃度の方が *D. salina* の増殖に与える影響は大きいことが考えられた。

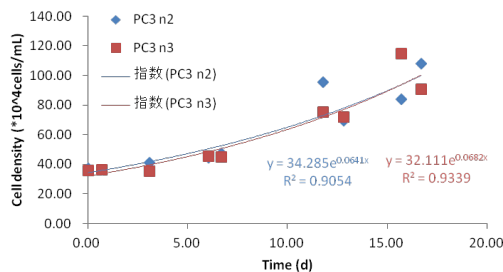


1.6cm (280mL)の方が、4.3cm (780mL)よりも比増殖速度が早かった。

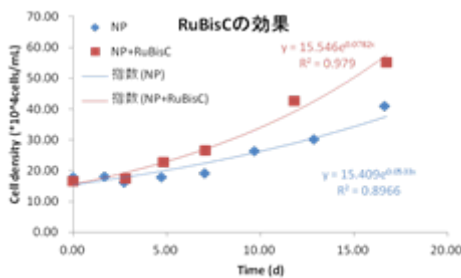


- P の供給濃度が 6mg/L と 7mg/L の場合でその増殖速度は変わらなかった。
- 供給する P 濃度は最大で 6mg/L あたりが適しており、それ以上の濃度を供給しても増殖速度は速くならない。
- 先行研究 (島村ら 2008) から、6mg/L 以上の濃度で P を供給しても増殖が速くなるわけではないことが示されている。

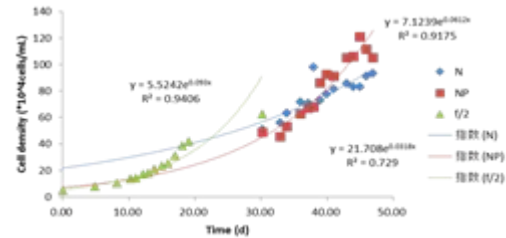
栄養塩濃度の増殖速度への影響



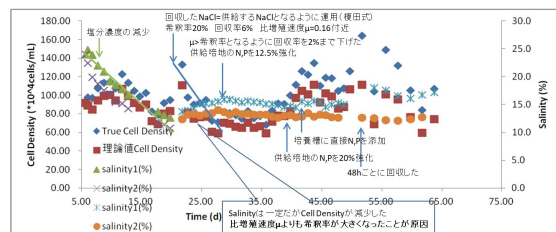
- N, P などの無機肥料のみと比較し、発酵系の有機肥料を加えた方が *D. salina* の増殖は速くなった。



- f/2 培地で培養し、増殖の止まった培養液に栄養塩を添加することで、再び細胞密度が増殖し、最終的には 1.2×10^6 cells/mL まで増殖した。つまり、f/2 培地で培養した際、 $2.0 \sim 3.0 \times 10^5$ cells/mL で頭打ちとなっていたのは N や P などの栄養塩が不足したことが原因であった。
- N のみを添加するよりも、N と P を添加した方が良好な増殖を示した。



- 蒸発する環境の中でも、半連続培養を行うことができた。
- 半連続培養を行うにあたり、注意しなければならない点は、「比増殖速度 $\mu >$ 希釈率 $D = \text{蒸発率 } E + \text{回収率 } H$ 」となることと、「回収した培養液中の NaCl の量 = 供給する培地中の NaCl の量」となることの両方の条件を満たすように運用する点である。
- *D. salina* を培養する環境により、比増殖速度 μ と蒸発率 E が決まる。比増殖速度 μ と蒸発率 E が決まれば回収率 H の目途がたつようになる。



細胞当たりの *Dunaliella* の重量

Cell サイズ平均 9 μm : 0.26ng/cell
Cell サイズ平均 12 μm : 0.38ng/cell

グルタチオン量を検量線により算出

Total 6.42 [μM] (標準偏差 0.44)

GSSG 0.232 [μM] (標準偏差 0.024)

GSH = Total - 2 $\times$ GSSG = 5.96 [μM]

GSH/GSSG 比 = 25.7

濃縮試料の細胞密度 8.77×10^6 [cell/mL]

を用いて計算すると、

GSH = 679 [$\mu\text{M} / 10^{12}$ cells]

GSSG = 26.5 [$\mu\text{M} / 10^{12}$ cells]

Dunaliella では、対数増殖期に、Glutathione 含有量が高くなることがわかった。

この試験の培養液量では、電流、電圧が高い場合には、全体的に濁ってしまい、分離が進まなかった。1.5~2A 程度の電流値で電解したときに早く、きれいに分離が進んだ。

1.6V / 1.5A

< 電解前 >

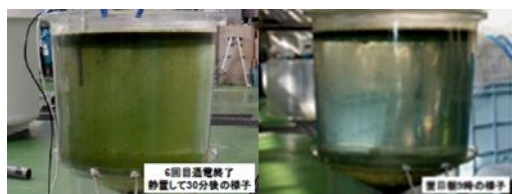


< 4 分経過後 >



5V × 5A、5分間の通電を複数回繰り返すことにより、破壊することなく細胞を凝集させることが可能であった。凝集した細胞は表層に集まり、その後、水底に沈下したが、翌日には再度水面に浮上した。再浮上した理由として、気泡が見られたことから光合成により発生した酸素が考えられる。

予備試験 ビーカー（200cc）では、5V × 2A、5 分程度 × 1 回で分離。



この間、3度ペルーに渡航した。在ペルー日本大使館、ペルー海洋研究所（IMARPE）を訪問し、日系ペルー商工会議所、カジェタノ・エレディア大学で講演を行い、このプロジェクトを紹介、賛同を得ることができた。ペルー北部海岸沿いのピウラ市、中部海岸沿いのパラカス市の気候調査を行い、気温、湿度、照度などのデータを得た。ラテンアメリカ藻類学会より、招待講演の依頼があったため、3度目のペルー訪問をすることとなった。ラテンアメリカ藻類学会の重鎮たちや学生さんとの交流により、このプロジェクトの意義と可能性が高められた。



5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 1 件）

1. ラテンアメリカ藻類学会招待講演

KURAHASHI Midori

The 6th Latin American Congress of Biotechnology Algal “Biomass Shore

Project - Aiming for a sustainable society built on microalgae- ”

〔図書〕（計 1 件）

KURAHASHI Midori

Solar to Chemical Energy Conversion, Springer(2016). 第 9 章 (Solar Energy Storage Using Algae)

〔その他〕

➢ ホームページ：

<http://biomass.html.xdomain.jp/>

➢ 日経エコロジー/2016.01

「藻類からバイオ燃料、大量培養が確立した藻を採用」

➢ 東京大学広報誌「淡青」/2017.03

微細藻類を軸に持続可能社会を目指す「バイオマス・ショア」構想

➢ ペルー新聞 PeruShimpo/2017.03

Biologos de Japony Peru presentan Proyecto de cultivo de algas

➢ 日経テクノロジーオンライン/2017.08

「エコで低コストで無題がない」、バイオマス・ショア構想

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉橋 みどり (KURAHASHI MIDORI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任准教授

研究者番号：00724907

(2) 研究分担者

一橋 和義 (ICHIHASHI KAZUYOSHI)

東京大学・大学院医学部付属病院・特任研究員

研究者番号：40425111

(3) 研究分担者

矢久保 允也 (YAKUBO MASAYA)

東京大学・生物生産工学研究センター・特任研究員

研究者番号：10724750

(4) 研究協力者

榎田 和彦 (ENOKIDA KAZUHIKO)

東京大学・生物生産工学研究センター・特任研究員

(5) 研究協力者

森田 泰彦 (MORITA YASUHIKO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・技術補佐員

(6) 連携研究者

中村 永介 (NAKAMURA EISUKE)

静岡県水産技術研究所深層水科・主任研究員

研究者番号：80829911