

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：32690

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K20452

研究課題名（和文）窒素含有廃水を無希釈で用いた微細藻類生産—細胞内pH上昇によるNH₃耐性の向上—研究課題名（英文）Microalgae cultivation using nitrogen containing wastewater without dilution -Improvement of NH₃ tolerance by increasing intracellular pH-

研究代表者

関根 睦実（Sekine, Mutsumi）

創価大学・理工学部・助教

研究者番号：60910388

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：窒素含有廃水を用いた微細藻類生産では、NH₃による微細藻類の阻害を緩和するため廃水の希釈が不可欠であり、水の消費が問題視されている。既往研究で、細胞内のpHが高い微細藻類はNH₃耐性が高いことが示唆されている。そこで、微細藻類の細胞内pHの上昇と、それによるNH₃耐性の向上を試みた。微細藻類6種の細胞内pHとNH₃耐性を測定した結果、藍藻について、細胞内pHとNH₃耐性（EC₅₀）に正の相関関係が示され、既往研究の仮説を裏付ける結果が得られた。Chlorellaについて、重炭酸塩の添加で細胞内pHを0.64上昇させることに成功した一方で、予想に反し、NH₃耐性は下がる結果となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

藍藻について細胞内pHとNH₃耐性（EC₅₀）に正の相関関係が得られ、これまで種によって傾向が異なり特徴付けが困難であったNH₃に対する微細藻類の耐性を各種の細胞内pHにより一般化できる可能性が示された。細胞内pHおよびNH₃耐性は培養環境によって変動しにくい種固有のパラメータであることが明らかとなった。この知見は、今後、微細藻類の窒素利用特性の調査に貢献する。副次的に得られた成果である2種の微細藻類の高NO₂-耐性の発見によって、研究の大目的であったNH₄⁺含有廃水を無希釈で用いた微細藻類生産の道筋をつけることができた。

研究成果の概要（英文）：In microalgae production using nitrogen-containing wastewater, dilution of the wastewater is essential to mitigate microalgae inhibition by NH₃, raising the issue of water consumption. Previous study has suggested that microalgae with higher intracellular pH are more tolerant of NH₃. Therefore, this study attempted to increase the intracellular pH of microalgae and thereby increase their NH₃ tolerance. The results of determining intracellular pH and NH₃ tolerance of six microalgae species showed a positive correlation between intracellular pH and NH₃ tolerance (EC₅₀) for cyanobacteria, supporting the hypothesis of previous study. For Chlorella, the addition of bicarbonate successfully increased the intracellular pH by 0.64, while, contrary to expectations, NH₃ tolerance was lowered.

研究分野：微細藻類生産

キーワード：微細藻類 細胞内pH アンモニウム廃水 遊離アンモニア 阻害

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アンモニウム (NH_4^+) 含有廃水を用いた微細藻類生産は、廃水中の栄養塩の除去と有価物生産を同時に達成可能であり、研究開発が進められている。しかし、pH に依存して NH_4^+ と共存する遊離アンモニア (NH_3) が光合成活性を強く阻害する(図 1)。その強度は、僅か数 mM で 50%以上の活性低下を引き起こすほどである。そのため、例えば NH_4^+ 500~3000 mg-N L⁻¹ 程度のメタン発酵廃水(消化液)では、3~50 倍もの希釈が必要であり、多量の水の消費が問題視されている。既往研究¹にて、細胞内の pH が高い微細藻類は NH_3 耐性が高いことが示唆されている。そこで本申請研究では、廃水は無希釈で用いた微細藻類生産の達成を目指し、微細藻類の培養環境を調整して微細藻類の細胞内 pH の上昇と NH_3 耐性の向上を試みた。

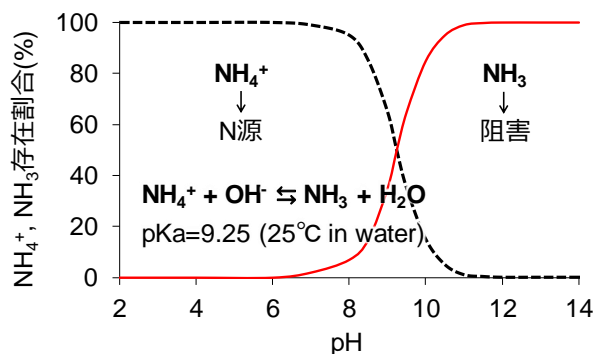


図 1. 異なる pH における NH_4^+ と NH_3 の存在割合と微細藻類への影響。

2. 研究の目的

本申請研究では、 NH_4^+ 含有廃水は無希釈で用いた微細藻類生産のため、微細藻類を塩分、無機炭素濃度を高くした培地で培養し、細胞内 pH を高くすることで、種の NH_3 耐性を向上することを目指した。詳細には、下記 2 つの目的を設け研究を実施した。

(1) 各種微細藻類の細胞内 pH と遊離アンモニア耐性の関係性の有無を明らかにする

既往研究¹では、*Spirulina platensis* LB1475/a、および *Anabaena* sp. を異なる NH_3 濃度下で培養し、*S. platensis* LB1475/a の高い NH_3 耐性を明らかにした。また、*S. platensis* LB1475/a の細胞内 pH が同じ藍藻の *Anacystis nidulans*、*Agmenellum quadruplicatum* よりも高いことを示し、*S. platensis* LB1475/a の高い NH_3 耐性の要因が高い細胞内 pH にあると考察した。同既往研究では、 NH_3 耐性と細胞内 pH を比較した藍藻種が異なること、種数が 2-3 種と限られていたことを受け、6 種の微細藻類について、 NH_3 耐性と細胞内 pH を比較して関係性を調べた。また、同 6 種について、異なる硝酸 (NO_3^-) 濃度における増殖特性も評価した。

(2) 微細藻類の培養条件が細胞内 pH および遊離アンモニア耐性に与える影響を明らかにする

微細藻類の細胞内 pH は、塩分^{2,3}や溶存無機炭酸 (Dissolved inorganic carbon: DIC) 濃度⁴の増加で上昇するとの報告がある。また、培養 pH によっても影響を受け、変化する可能性が考えられる。培養条件によって細胞内 pH を上げることができれば、 NH_3 耐性を向上できる可能性があるため、pH・塩分・DIC 濃度が微細藻類の細胞内 pH と NH_3 耐性に与える影響を評価することとした。

3. 研究の方法

(1) 各種微細藻類の細胞内 pH と遊離アンモニア耐性の関係性評価

微細藻類種は、緑藻の *Chlorella sorokiniana*、藍藻の *Synechococcus leopoliensis*、*Anabaena cylindrica*、*Arthrospira platensis*、*Arthrospira fusiformis* とした。

細胞内 pH の測定は、対数増殖期の各種細胞を、蛍光指示薬 BCECF-AM (同仁化学研究所) で染色し、蛍光分光光度計で測定した。

NH_3 耐性の評価では、10 mL 試験管を用い、有効容積 4 mL にて、各種を表 1 の至適培地、pH、光強度、温度環境、および異なる NH_3 濃度下で培養した。異なる NO_3^- 濃度における増殖特性も評価した。窒素濃度は、 NO_3^- の試験で 1.6~150 mM、 NH_3 の試験で 0~7.5 mM とした。 NH_3 の試験では、窒素律速とならない様に NO_3^- を補填した。波長 750 nm における吸光度の経時変化から、比増殖速度を算出した。 NH_3 については、全種で明確な阻害が見られたため、式 1 により増殖を 50% 阻害する NH_3 濃度 (50% effective concentration: EC_{50}) を算出した。

$$\mu_R = \min + (\max - \min) / [1 + ([\text{NH}_3] / \text{EC}_{50})^{-M}] \quad (\text{式 1})$$

ここで、 μ_R は NH_3 濃度 0 mM における比増殖速度を 1 とした比増殖速度の相対値、min および max は相対比増殖速度の最小・最大値、M は曲線形状を決めるパラメータを示す。

表 1. 各種微細藻類の培養条件

種	培地	pH	光強度 ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	温度 (°C)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	C 培地	8.0	300	25
<i>Synechococcus leopoliensis</i>	C 培地	9.0	50	35
<i>Anabaena cylindrica</i>	C 培地	8.5	50	30
<i>Arthrospira platensis</i>	SOT 培地	10.0	150	35
<i>Arthrospira fusiformis</i>	SOT 培地	10.0	150	35

(2) 微細藻類の培養条件が細胞内 pH および遊離アンモニア耐性に与える影響の評価

研究(1)において最も高い NH_3 耐性を示し、かつ培養環境の変動にも比較的強いとされる *C. sorokiniana* を対象種とした。60 mL 試験管を用い、有効容積 30 mL で、異なる pH (7~9)、塩分 (NaCl 0, 100 mM; 培地塩分 0.04, 0.71%)、DIC 濃度 (0, 100 mM) で培養した。塩分および DIC の補填には、NaCl および NaHCO_3 をそれぞれ使用した。塩分、DIC 濃度を変えた試験については、細胞を 2 回継代培養し、培養環境に馴らした。光強度、温度は至適条件とし、エアープンプで連続曝気した。細胞内 pH は対数増殖期に測定した。DIC 濃度の変化によって細胞内 pH の変化が見られたため、*A. platensis* でも同様に試験を行い、他種における細胞内 pH の変化の有無を確認した。

C. sorokiniana について、DIC 濃度 10 mM および 50 mM における NH_3 耐性を研究(1)と同様に評価した。

4. 研究成果

(1) 各種微細藻類の細胞内 pH と遊離アンモニア耐性の関係性評価

測定された各種微細藻類の細胞内 pH を表 2 に示す。細胞内 pH は *C. sorokiniana* で最も高く、続いて *A. fusiformis*、*S. leopoliensis*、*A. platensis*、*A. cylindrica* の順で高い値を示した。なお、培地の pH と細胞内 pH との間に関係性は見られなかった。既往研究において細胞内 pH は、*Synechococcus* で $7.1 \sim 7.7^{5-7}$ 、*Anabaena* で $7.3 \sim 8.0^{3,8}$ 、*A. platensis* で 7.5^1 の値が報告されている。*Synechococcus* および *A. platensis* で本研究の値と 0.5 以上異なることから、細胞内 pH は属レベルでは決まらず、種、株、または培養条件によって異なる細胞内 pH を示すと考えられる。

異なる $\text{NO}_3^- \cdot \text{NH}_3$ 濃度における各種の比増殖速度を測定した結果、 NO_3^- は、100 mM 以上の高濃度であっても種に関わらず 65% 以上の比増殖速度を維持した。 NH_3 濃度については、*C. sorokiniana* を除く全藍藻種で、僅か 5 mM 以下で比増殖速度が 50% 以上低下した。特に *A. cylindrica* で強い阻害が見られた。*C. sorokiniana* については、5.3 mM で 42% の阻害にとどまった。一般に、 NO_3^- は微細藻類に無害とされる。一方で、 NH_3 で微細藻類の強い阻害が報告されており、本実験の結果と一致する。

藍藻 4 種の細胞内 pH と NH_3 耐性の指標である EC_{50} の関係を図 2 に示した。既往研究における *A. platensis* LB1475/a の細胞内 pH および EC_{50} 値を加えることで、 $p < 0.05$ 、 $R^2 0.84$ の正の相関関係が示された。阻害機構については、細胞内に入った NH_3 がチラコイド膜内の H^+ と結合し、ATP 合成に必要なプロトン濃度勾配を解消してしまうことが主な原因であると考えられている⁹。そのため、 NH_3 が H^+ と結合しにくい、細胞内 pH が高い微細藻類種ほど NH_3 耐性が高いと考えられていた¹。本研究で示された藍藻の細胞内 pH と EC_{50} の相関関係は、細胞内 pH によって NH_3 耐性が決定づけられている可能性を支持するものである。なお、*C. sorokiniana* は、細胞内 pH が 7.78 ± 0.06 であり、 EC_{50} は 5.3 mM より高いため、藍藻と同じ回帰直線には乗らなかった。緑藻では、細胞壁の存在など、藍藻と異なる機構によって、同じ細胞内 pH であっても藍藻より高い NH_3 耐性をもつ可能性がある。

表 2. 各種微細藻類の細胞内 pH. (Sekine et al., 2023. *Biocatal Agric Biotechnol.* 47, 102562 改変)

種	細胞内 pH	(参考)培地 pH
<i>Chlorella sorokiniana</i>	7.78 ± 0.06	8.0
<i>Synechococcus leopoliensis</i>	8.24 ± 0.06	9.0
<i>Anabaena cylindrica</i>	7.28 ± 0.16	8.5
<i>Arthrospira platensis</i>	8.00 ± 0.19	10.0
<i>Arthrospira fusiformis</i>	8.44 ± 0.10	10.0

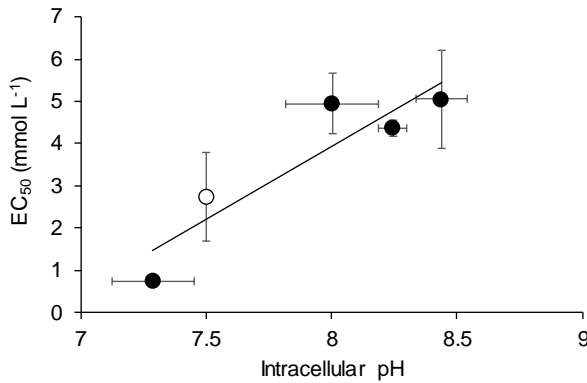


図2. 藍藻5種における細胞内pHと50%阻害するNH₃濃度(50% effective concentration: EC₅₀)の関係. 黒丸は本研究の結果、白丸は既往研究¹における *Arthrospira platensis* LB1475/aの結果を示す. 回帰直線は、細胞内pHとEC₅₀の線形相関を示す(R²=0.84; p<0.05). (Sekine et al., 2023. *Biocatal Agric Biotechnol.* 47, 102562)

(2) 微細藻類の培養条件が細胞内pHおよび遊離アンモニア耐性に与える影響の評価

研究(1)において最も高いNH₃耐性を示し、かつ培養環境の変動にも比較的強いとされる *C. sorokiniana*を異なるpH(7~9)、塩分(NaCl 0, 100 mM; 培地塩分0.04, 0.75%)、DIC濃度(0, 100 mM)で培養し、細胞内pHを測定した(図3)。その結果、塩分を0.04%から0.75%、DIC濃度を0 mMから100 mMに上げることによって、細胞内pHがそれぞれ0.30または0.64増加することが確認された。*C. sorokiniana*の比増殖速度は、塩分を0.04%から0.75%、DIC濃度を0 mMから100 mMに上げることによって、それぞれ11%および3%低下する。以上より、細胞内pHの上昇と増殖速度の減少の程度を鑑みると、*C. sorokiniana*の細胞内pHの上昇にはDIC濃度の調整が適切であると考えられた。

他種におけるDIC濃度の増加による細胞内pHの上昇の有無を確認するため、*A. platensis*についても異なるDIC濃度で培養した細胞のpH測定を試みた(図4)。その結果、DIC濃度の増加に伴う細胞内pHの明確な上昇傾向は見られなかった。細胞内pHに変化を与える環境パラメータや、その変化の程度は、微細藻類種によって異なる可能性が高い。

*C. sorokiniana*を細胞内pHを変化可能なDIC濃度2条件(10 mM、50 mM)で培養し、NH₃耐性を比較した(図5-a)。先の実験において、100 mMのDIC濃度で僅かに比増殖速度の低下が認められたことを鑑み、本実験は阻害を回避するため半量である50 mMと10 mMで試験した。その結果、予想に反し、DIC濃度の高い条件で低いNH₃耐性が示され、DICとNH₃と添加が合わさることで阻害が増幅されることが明らかになった。NaHCO₃の添加が微細藻類培養に与える影響の1つに、培養液のpH上昇が挙げられる。これは、微細藻類の培養過程で微細藻類による吸収、または大気中への揮散によってCO₂が減少することで生じる現象であり、DIC添加量の多い系列でpHの変化は顕著である。実際に本研究においても、培養24時間後の培養液のpHは、NH₃濃度0 mM(培養初期値)の条件を除き、DIC濃度50 mMで10 mMの系列よりも高いpHを示した(図5-b)。NH₄⁺の酸解離定数pKaは9.25であり、pHの増加に伴いNH₃濃度が増加する。そのため、DIC濃度50 mMの系列では、培養期間において培養液のpHが増加しNH₃濃度が増加したことが、NH₃阻害の増幅の一因である可能性がある。以上より、DIC濃度の調整による細胞内pHの上昇とNH₃耐性の向上は達成できないことが明らかになった。

培養条件の調整による細胞内pHの上昇ならびにNH₃耐性の向上の試みは、予想に反する結果となった。そこで、窒素含有廃水(無希釈)を用いた微細藻類生産を目指すという当初の大目的に立ち返り、追加試験として、NH₄⁺を酸化し亜硝酸(NO₂⁻)とした無希釈廃水による微細藻類生産の可能性を検討した。まず、先のNH₃耐性の評価(研究(1))と同様に、微細藻類5種(*C. sorokiniana*, *S. leopoliensis*, *A. cylindrica*, *A. platensis*, *Limnospira fusiformis*)について、回分培養によってNO₂⁻(0~100 mM)耐性を評価した。その結果、NO₂⁻は、種によって阻害の程度が大きく異なった。*S. leopoliensis*, *A. cylindrica*, *A. platensis*では、50 mMで比増殖速度は半減したが、*C. sorokiniana*およびでは、100 mMであっても78%以上の比増殖速度を維持する結果となった。100 mMの窒素濃度は例えばNH₄⁺を高濃度で含有するメタン発酵廃水(消化液)の窒素濃度に相当する。NH₄⁺含有廃水による微細藻類の培養では、廃水を希釈するほか、NH₄⁺を微細藻類に無害なNO₃⁻に硝化処理したものを培地に使用するという方法もある¹⁰。後者の手段を取る場合には廃水の硝化反応に要する曝気にかかるエネルギー・費用がボトルネックであったが、NH₄⁺の硝化反応をNO₂⁻までの部分硝化に留め、微細藻類培養の培地に使用することにより、曝気にかかるエネルギー・費用を抑えたまま無希釈での微細藻類生産が可能となる。本追加試験で示された100 mMでの高い微細藻類の増殖速度の維持は、その実現可能性を示唆するものである。そこで、NH₄⁺の部分硝化処理を想定し、*L. fusiformis*を60 mMのNO₂⁻を含む人工廃水で連続培養した。その結果、154±15 mg-乾燥重量/L/dの生産速度で28日間の安定した*L. fusiformis*の生産に成功し、無希釈の高濃度窒素含有人工廃水による微細藻類生産の道筋をつけた。

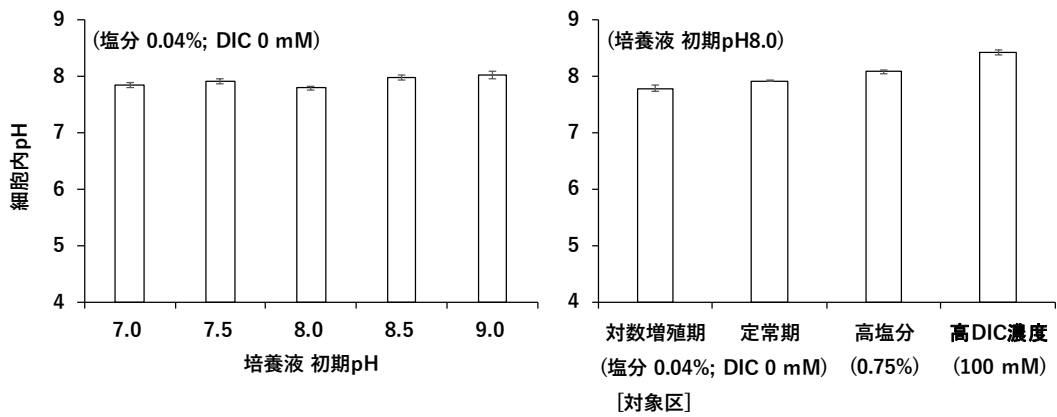


図 3. 異なる培養液初期 pH, 塩分, 溶存無機炭素(DIC)濃度で培養した *Chlorella sorokiniana* の細胞内 pH. エラーバーは分析の標準偏差を示す.

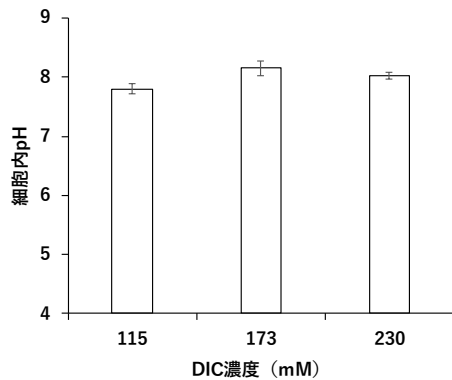


図 4. 異なる溶存無機炭素 (DIC) 濃度で培養した *Arthrospira platensis* の細胞内 pH. エラーバーは分析の標準偏差を示す.

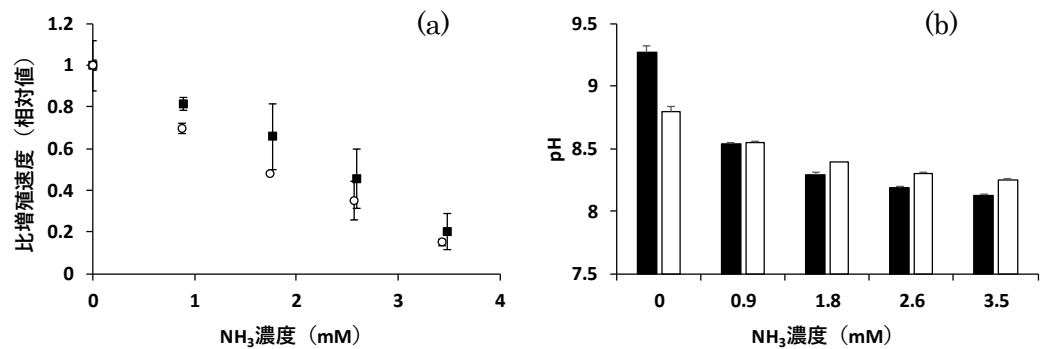


図 5. 異なる溶存無機炭素 (DIC) 濃度および NH₃ 濃度で培養した *Chlorella sorokiniana* の比増殖速度 (相対値) (a) および培養 24 時間後の培養液の pH (b). 黒の塗りつぶし、および白の塗りつぶしは、それぞれ DIC 濃度 10 mM および 50 mM の培養データを示す. エラーバーは 3 回繰り返した実験の標準偏差を示す.

<引用文献>

1. Belkin & Boussiba, 1991. *Plant Cell Physiol.* 32, 953-958.
2. Nitschmann & Packer, 1996. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 40, 1201-1209.
3. Giraldez-Ruiz et al., 1997. *New Phytol.* 137, 599-605.
4. Dixon & Kell, 1989. *J. Appl. Bacteriol.* 67, 109-136.
5. Gibson, 1981. *Arch. Microbiol.* 130, 175-179.
6. Kallas & Castenholz, 1982. *J. Bacteriol.* 149, 229-236.
7. Nitschmann & Packer, 1996. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 40, 1201-1209.
8. Blanco-Rivero et al., 2005. *Microbiology* 151, 1671-1682
9. Drath et al., 2008. *Plant Physiol.* 147, 206-215
10. Sekine et al., 2020. *Water Sci. Technol.* 82(6), 1070-1080.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sekine Mutsumi, Yoshida Akari, Kishi Masatoshi, Furuya Ken, Toda Tatsuki	4. 巻 47
2. 論文標題 Free ammonia tolerance of cyanobacteria depends on intracellular pH	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biocatalysis and Agricultural Biotechnology	6. 最初と最後の頁 102562 ~ 102562
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bcab.2022.102562	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mutsumi Sekine, Akari Yoshida, Masatoshi Kishi, Tatsuki Toda
2. 発表標題 High NH3 tolerance of Arthrospira platensis and its relation to intracellular pH
3. 学会等名 13th IWA Specialist Conference on Wastewater Ponds and Algal Technologies (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関