

メタン発酵消化液の栄養塩を透析により供給するハプト藻の培養法に関する研究

坂寄 裕紀 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 鈴木 石根 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

微細藻類を用いたバイオ燃料等の有用物質生産は持続可能な社会を作るうえで有用な技術の一つである。微細藻類は光合成によって炭素源を得ることができるため、カーボンニュートラルな燃料の作出が可能である。また、陸上植物と比較すると単位面積当たりの油脂生産量が高いことも微細藻類を使用するメリットとしてあげられる^[1]。 *Tisochrysis lutea* を含む一部のハプト藻は長鎖不飽和炭化水素のアルケノンを生産し蓄積する。アルケノンの分子構造は原油成分と類似し、大量に生産することでガソリンやジェット燃料を代替する燃料としての利用が期待されている。

微細藻類による物質生産では生育や回収など様々な生産工程にかかるコストが課題となっている^[2]。一方でバイオマス系廃棄物処理に利用されているメタン発酵では、窒素やリンなどの栄養塩を多量に含む残渣(消化液)が発生する。この消化液はそのまま放流すると富栄養化を引き起こし環境汚染の原因となるため、廃水処理を施す必要がある。この消化液に含まれる栄養塩を微細藻類の培養に利用できれば培養と廃水処理にかかるコストを同時に削減することが可能であると考えられる。

その一方で消化液中にはメタン発酵に関わる微生物が多数存在しており、また光の透過を妨げる黒色で浮遊性の微細粒子(suspended solid, SS)も多量に含まれているため、直接微細藻類の培養に添加すると微細藻類の生育に影響を及ぼす。私は消化液中の栄養塩のみを低コストで藻類の培養液に供給するため、半透膜による透析を用いることにした。そこで腎疾患の患者に使用される人工透析器を用いてこれらの生育阻害因子の混入なく、消化液中に含まれる栄養塩を選択的に透過・供給することができることを検証するため、*T. lutea* による培養実験を行った。

また、消化液中のオルトリン酸/アンモニア比はハプト藻培養用の Marine-art ESM 培地よりもかなり低い。そこで私は SS を含む消化液を酸で処理することにより利用可能なオルトリン酸濃度を上昇させることが可能か確かめた。

【材料・方法】

微細藻類の培養

生物材料として *Tisochrysis lutea* (UTEX LB 2307 *Isochrysis aff. galbana*) を使用した。*T. lutea* は培養実験に使用する前に窒素源をアンモニアに変更した Marine-art ESM 培地(-Na₂SeO₃、-ビタミン B₇) で 25°C、100 μmol photons m⁻² s⁻¹、1% (v/v) CO₂ を含む空気を通気する条件で 3 日間培養し、人工海水で一回洗浄してから植え継ぎを行った。消化液は食品廃棄物のメタン発酵によって得られたものを使用した。

消化液中の浮遊物質 (SS) からのリン酸の溶出

消化液 300 μL に 0~12 M 塩酸を 26 μL 加えて攪拌し、15 分間静置した。その後加えた塩酸と同濃度の水酸化ナトリウム水溶液を 26 μL 加えて攪拌し、さらに 15 分静置した後、17700 x g、10 °C で 5 分間遠心し上清を得た。その上清を遠心して SS を取

り除く操作をさらに 2 回繰り返した。得られた上清を 20 倍に希釈し、モリブデンブルー法によりリン酸濃度を測定した。

人工透析器による栄養塩の分離

海水で希釈した消化液 300 mL を透析器の血液側の回路に、オートクレーブ済みの人工海水 300 mL を透析液側の回路に 60 分間環流して透析を行い、栄養塩を人工海水側に分離した。得られた人工海水を希釈して *T. lutea* 細胞を 1×10⁶ cells mL⁻¹ の濃度で植え継ぎ、25°C、100 μmol photons m⁻² s⁻¹、1% (v/v) CO₂ を含む空気を通気する条件で 7 日間培養した。培養中は 1 日ごとに細胞濃度、リン酸濃度、アンモニア濃度を測定した。また透析中に人工海水側から微量にサンプリングし、透析時間ごとにリン酸濃度をモリブデンブルー法によって測定した。

【結果・考察】

消化液中の浮遊物質 (SS) からのリン酸の溶出

SS を含む場合のリン酸濃度の測定値は上清のみの時よりも高かった。定量に用いたモリブデンブルー法は酸性条件で発色させるためリン酸化合物が遊離し検出される^[3]。そこで消化液を酸・塩基によって処理したところ、検出されるリン酸濃度は高くなり、塩酸が高濃度なほどその増加量は大きかった (図)。しかし今回の条件では SS 中に含まれるリン酸の約 7% しか溶出できなかった。今後塩酸量や反応させる温度、時間等の条件を変えてより効率の良い抽出方法を検討する必要がある。またこの処理による窒素濃度変化の有無の確認や培養実験も行う予定である

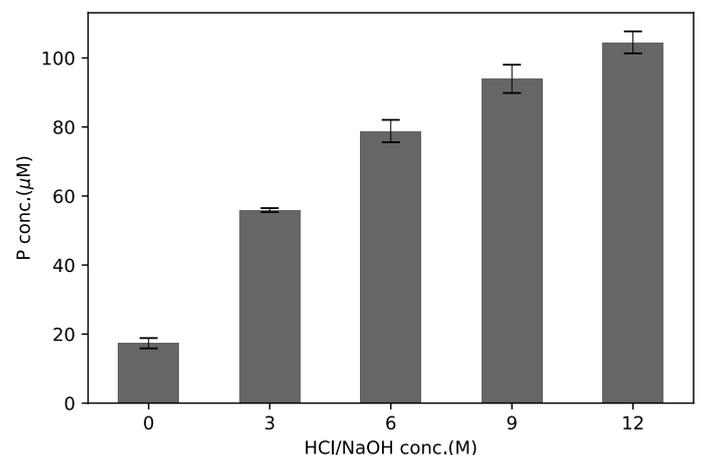


図 HCl/NaOH 濃度と溶出されるリン酸濃度の関係

人工透析器による栄養塩の分離

現在実験準備を進めている。詳細は発表会にて報告する。

【参考文献】

- [1] Chisti Y, *Biotechnol. Adv.* (2007), **25**, 294-306
- [2] Srivastava RK et al., *Environ. Chem. Lett.* (2020), **18**, 1049-1072
- [3] Nagul EA et al. *Anal. Chim. Acta* (2015), **800**, 60-82