

## 光合成微生物の限界光量並びに, CO<sub>2</sub> 通気方法による増殖特性の違いについて

その他（別言語等）のタイトル	Illumination limit of photosynthesis microorganism and growth characteristics with different supplying methods of the CO <sub>2</sub>
著者	野村 慶太, 河合 秀樹
雑誌名	寒地技術論文・報告集
巻	26
ページ	180-183
発行年	2010
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10258/1601">http://hdl.handle.net/10258/1601</a>

## 光合成微生物の限界光量並びに，CO<sub>2</sub> 通気方法による増殖特性の違いについて

その他（別言語等）のタイトル	Illumination limit of photosynthesis microorganism and growth characteristics with different supplying methods of the CO <sub>2</sub>
著者	野村 慶太, 河合 秀樹
雑誌名	寒地技術論文・報告集
巻	26
ページ	180-183
発行年	2010
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10258/1601">http://hdl.handle.net/10258/1601</a>

# 光合成微生物の限界光量並びに、 CO<sub>2</sub> 通気方法による増殖特性の違いについて

Illumination limit of photosynthesis microorganism and  
growth characteristics with different supplying methods of the CO<sub>2</sub>

野村慶太, 河合秀樹  
Keita. NOMURA, Hideki. KAWAI

室蘭工業大学大学院工学研究科  
Muroran Institute of Technology Graduate School of Engineering

## 1. 研究背景

酸素発生能力が植物の数十倍あると言われる光合成微生物は、近年油脂を生成する微生物などが抽出されたことから、新たにバイオ燃料への応用も含めて大きな注目を集めている。寒地においても、環境負荷を低減できるバイオディーゼル燃料(BDF)の供給は極めて重要な課題であり、非食料系から燃料使用量の多い寒地において非食料系から抽出することができれば、その経済効果は大きい。例えば、融雪時の熱源や、寒冷地を走るディーゼルエンジン車両の燃料として高い汎用性が見込まれる。よってこれら新たな光合成微生物を含め、その増殖特性を知ることは、将来に向けた BDF の大量生産や温室ガスの低減化に少なからず寄与するものと思われる。また、本報告では光合成微生物にクロレラ藻体を使用しているが、その CO<sub>2</sub> 固定能は約 50[g-CO<sub>2</sub>/m<sup>2</sup>/day]あり、この数値は温帯地方の森林(落葉樹林)の 5[g-CO<sub>2</sub>/m<sup>2</sup>/day]と比較して約 10 倍大きい<sup>(1)</sup>。この数値は、100 万 kW の火力発電所に設置面積 1km<sup>2</sup> のプラントを設置した場合、年間約 18,000 t の CO<sub>2</sub> 固定が可能で、約 4.6%を削減することができる。本報告では、光合成微生物の増殖に必要な炭素源 (CO<sub>2</sub>) の供給方法と、微生物の限界光量について検討する。

## 2. 実験方法

### 2. 1 炭素源の供給方法による藻体濃度実験

光合成微生物にクロレラ藻体 *Chlorella fusca* var. *vacuolata* C-104 株 (応用微生物研究所) を使用し、培養液は MBM (Modified Bristol Medium : 改変ブリトール) 溶液にて調整した。実験の初期 pH は 6.52 である。炭素源 (CO<sub>2</sub>) の供

給法には、通常の空気をバブリングする Aeration 法 (以後過度通気法) と炭酸水素ナトリウム (NaHCO<sub>3</sub>) をイオン化させて培養液に直接添加させる方法 (以後イオン化法) の二種類を用いた。また、CO<sub>2</sub> を供給させない方法 (以後 Blank) を比較検証のために用いた。培養装置は半密閉状態とし、クロレラ藻体 (以後藻体と略) 濃度測定には分光光度計 (OPTIMA 製 SP-300)、溶存 CO<sub>2</sub> 濃度測定には CO<sub>2</sub> メータ (東亜電波工業製 CGP-1)、pH 測定には pH 計 (HANNA instruments 製 PICCOLO) をそれぞれ使い、その時間変化を計測した。ただし、培養時間は NaHCO<sub>3</sub> の添加時から 72 時間である。これより、過度通気法とイオン化法が藻体濃度の増殖特性に与える影響について検討する。NaHCO<sub>3</sub> の添加量は、藻体懸濁液 1.0L に対して 2.0g と 4.0g を試みた。また、イオン化法と Blank の培養液攪拌にはマグネチックスターラーを用いた。なお、藻体は 2 週間プレ培養したものを濃度調整して使用する。プレ培養の条件を Table 1 に、実験条件を Table 2 に示す。

Table 1 Pre-culture condition

Illumination [lx]	2500
Temperature [K]	303
Pre-culture term [day]	14

Table 2 Experiment condition

Illumination [lx]	3500
Temperature [K]	303
Experiment term [day]	3
Initial concentration[g/l]	0.124
Sterilization process	394K, 20min
Microorganism breed Medium	<i>Chlorella fusca</i> var. <i>vacuolata</i> C-104 MBM

2. 2 藻体破壊検証実験

藻体の細胞破壊が起こると、藻体の細胞内物質が培養液中へ漏出するため、藻体を分離した懸濁液の吸収スペクトルを測定することにより細胞破壊の検証は可能である。クロレラ懸濁液を、増殖率が飽和した時点でサンプリングしてマイクロチューブに入れ、遠心分離機 (LMS 製 VS-100) にかける。一回目の遠心分離の後、マイクロチューブから上澄み液を取り出し、再度マイクロチューブを交換して遠心分離を行い、培養液と藻体とを完全に分離させる。これより得られた培養液の吸収スペクトルを測定し、クロレラの細胞内物質であり、670[nm]付近に吸収スペクトルのピークを持つ Chlorophyll-a のピーク高さによって藻体破壊を検証した。なお、本来は Chlorophyll-a の標準試薬から検量線を作成するべきであるが、超音波破碎機によってほぼ100%細胞が破壊されたときの Chlorophyll-a 量を同定することができたので、それを標準とし、吸収スペクトルのピーク高さを比較して評価した。ここでピーク高さは 670[nm]の吸光度 (最大値) から Chlorophyll-a の影響が最も少ない 560[nm]の吸光度を引いたもので定義される。

2. 3 藻体の限界光量実験

藻体の増殖に光量が与える影響を調べるため、照度を変えて増殖量と吸光度の検量線を作成する。吸光度(x)を測定した後、培養液 Q[l]をサンプリングし、フィルタに乗せてアスピレータで水分を除去する。その後フィルタに残存する検体を乾燥機 (120°C) で乾燥させ、藻体の乾燥重量 W[g]と濾液量 Q から濃度 y[g/l]を導出し、x と y の関係をグラフにプロットする。これより吸光度(x)と濃度(y)の線形関係を確認して検量線とした。光量については高光量 3500lx と低光量 500lx を用いた。

3. 実験結果

3. 1 炭素源の供給方法による藻体濃度実験

各炭素源供給法による藻体濃度と溶存CO<sub>2</sub>量の時間変化をそれぞれ Fig.1 及び 2 に示した。また Fig.3 は、そのときの pH 値の時間変化である。Fig.1 より、過度通気法の場合、藻体濃度は培養時間内において常に一定の増殖率で増加するが、イオン化法ではある時間まで一定の増殖率で増加するものの、過度通気法よりも早く飽和化した。イオン化法の Blank は 36 時間後まで増殖を示さないが、その後若干の増殖傾向を示した。Fig.2 より、イオン化法において CO<sub>2</sub> 濃度は、NaHCO<sub>3</sub> の添加直後から急激に増加するが、24 時間程度で減少し、36 時間後には大気圧での CO<sub>2</sub> 飽和大溶解度 0.020V/V%まで下がる。これに比べて過度通気法での CO<sub>2</sub> 濃度は常に飽和溶解度付近で一定に推移した。また、Fig.3 よりイオン化法において懸濁液の pH は NaHCO<sub>3</sub> の添加後、徐々に増加し続け 48 時間で約 11 の強アルカリに推移した。過度通気法においてもアルカリ化するものの、72

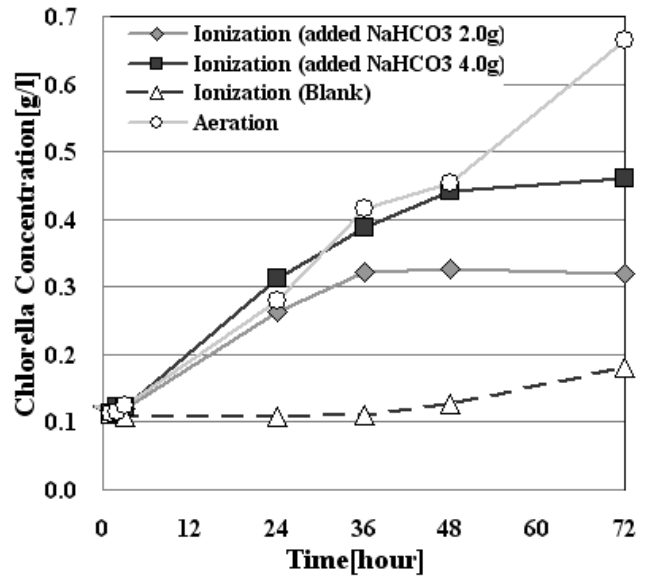


Fig.1 Chlorella concentration curve

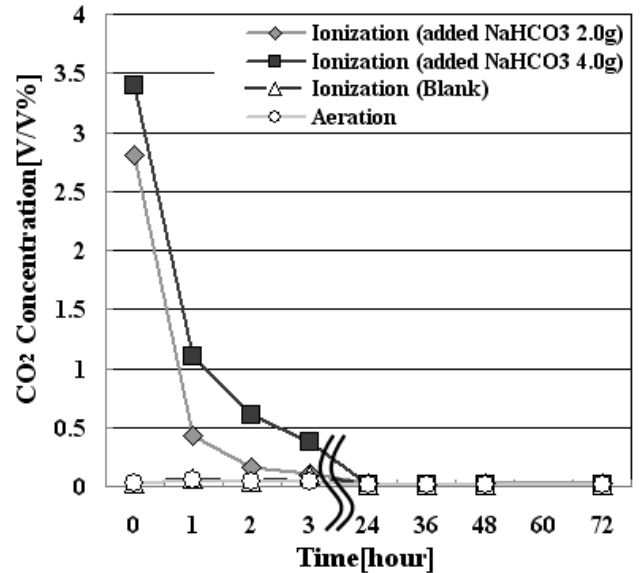


Fig.2 Dissolved CO<sub>2</sub> curve

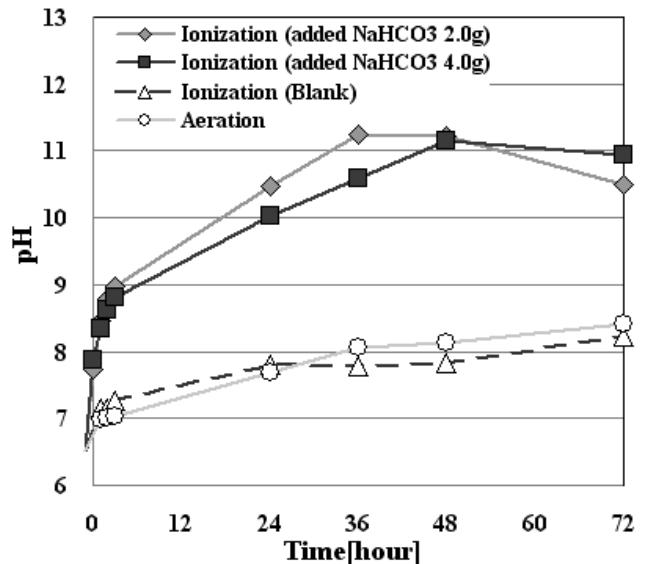


Fig.3 pH curve

時間経過しても pH9 以上になることはなかった. イオン化法において一時的に大量に発生した溶存  $\text{CO}_2$  は大気中に放出されたものとするのが自然である. ただし, 一般に, 溶存  $\text{CO}_2$  は pH が上昇することによって  $\text{HCO}_3^-$  を経て炭酸イオン ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) へと電離することが知られている<sup>(2)</sup>. すなわち, pH が 4 以下であれば溶存  $\text{CO}_2$  の存在比は 100% であるが, 図中培養時間 3 時間後の pH9 近傍ではほぼ 0% に近い.

微細藻類の炭酸同化システムにおいて,  $\text{CO}_2$  は  $\text{HCO}_3^-$  のイオンの形態で葉緑体に取り込まれると言う報告がある<sup>(3)</sup>. この報告に従えば, pH によって炭酸の形態が変化する場合, 溶存  $\text{CO}_2$  のイオン化が増殖率の減少に関係しているとも考えられる. pH が 6.3~10.3 近傍では  $\text{HCO}_3^-$  の存在比が最も高く, その後徐々に低くなり pH13 近傍ではほぼ 0% になる. その一方,  $\text{CO}_3^{2-}$  の存在比は 10.3 以降で最も高くなり, 13 近傍ではほぼ 100% となることから, pH が変化したことにより藻体が最適な形で  $\text{CO}_2$  を取り込めなくなったと考えることもできる.

イオン化法において一定の増殖率で増殖するのは  $\text{NaHCO}_3$  添加量 2.0g 及び 4.0g とともに pH が 11 までであり, そこまでは増殖に十分な  $\text{HCO}_3^-$  が存在していた, あるいは高 pH でも細胞がかろうじて増殖できたのかもしれない. しかし, pH=11 を超えると増殖に必要な  $\text{HCO}_3^-$  が少なくなり, 増殖率が飽和したのではないかと考えられる. もちろん, 高 pH そのものが悪影響を及ぼしている可能性もある. Fig.1 において, イオン化法で  $\text{NaHCO}_3$  の添加量を 2.0g から 4.0g に増加させた場合, 藻体濃度の増殖率が増加する傾向が確認された.

過度通気法の  $\text{CO}_2$  濃度は微量であるものの, イオン化法と同等以上の藻体増殖率を 72 時間まで維持している. pH も 8 近傍で安定している. 薬品による pH 変化がなく, 藻体自身による緩やかな pH 変化のみであり,  $\text{HCO}_3^-$  の溶存量もほとんど変化がないことが推測される.

### 3. 2 藻体破壊検証実験

イオン化法において増殖率が早い時期に定常化する原因として考えられる他の原因として, 高アルカリ化や装置による藻体破壊が考えられるため, その検証を行う. 2. 1 と同様の実験方法で培養し, Fig.4 に示すような増殖特性を示したクロレラ懸濁液について, 藻体増殖率が定常化し, 高アルカリ化している時間 (60 時間後) で藻体破壊実験を行った. なお, 使用した培養方法はイオン化法であり,  $\text{NaHCO}_3$  の添加量は 10 に対して 1.0g である. 懸濁液の初期濃度は 0.202g/l とした. Fig.5 にこれによって得た吸収スペクトルを示す. ほぼ 100% 破碎した方のスペクトルは 670nm のときに 0.343 を示すのに対して, 実験結果の方はほぼ 0.0 であった. よって装置による藻体破壊はみられないといえる.

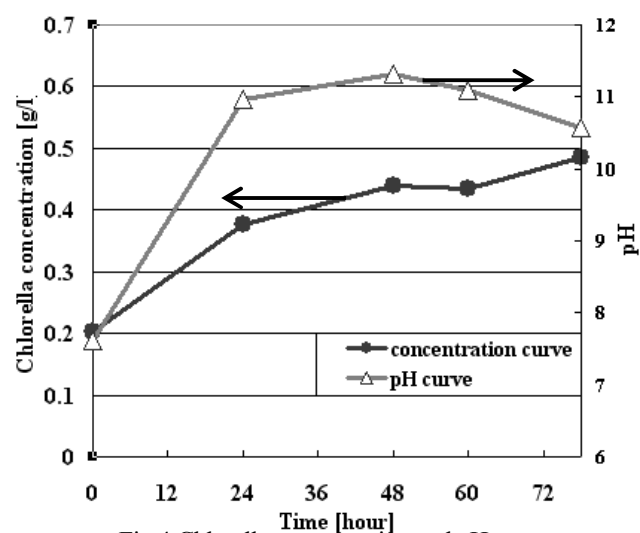


Fig.4 Chlorella concentration and pH curve  
(Ionization added  $\text{NaHCO}_3$  1.0g)

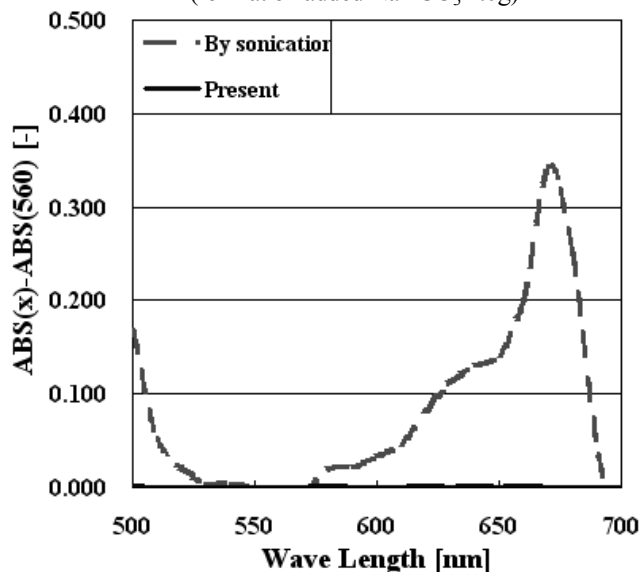


Fig.5 Absorption spectrum of culture

### 3. 3 藻体の限界光量実験

高光量 3500lx で培養した懸濁液を頭記号 “a” とし, 低光量 500lx を “b” と表す. また, それぞれの光量で培養した時間 (日数) をこれら記号の添字として表す. (例えば a25 は高光量 3500lx で 25 日間培養したことを示す.) Fig.6 には, それぞれの培養環境で検量線を引くことで得られた傾きをプロットした. これより, a 条件と b 条件では, それぞれの検量係数が優位に異なることが分かる. また, b21 → a4 では, b 環境下での培養日数が圧倒的に多いにも関わらず, b31 よりも大きな傾きを示している. これより, 光量の違いが懸濁液中の藻体濃度に何らかの影響を与えていることが推測される. そこで, 光学顕微鏡 (OLYMPUS 製 BX51) を用いて懸濁液を観察したところ, Fig.7 に示すように a 条件では藻体の細胞から葉緑素が抜け出し, 白色化しているものが極めて多いことがわかった. 一方 b 条件では, そのような白色化は殆ど観察されなかった. このことは, a 条件下で培養した懸濁液が, 例え b 条件下で培養した懸濁液と分光光度計の値が同じ数値を示しても, 白色化

した藻体ではその分、乾燥重量が重くなり、吸光度に対する重量比（傾き）が大きくなると考えられる。過度の光量では藻体の増殖が却って阻害される可能性が示唆された。

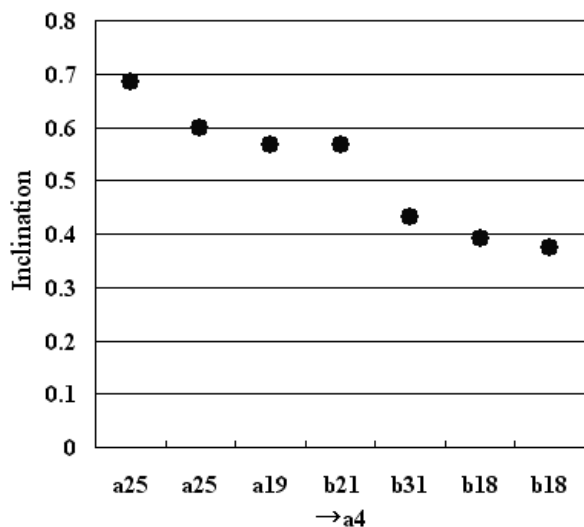
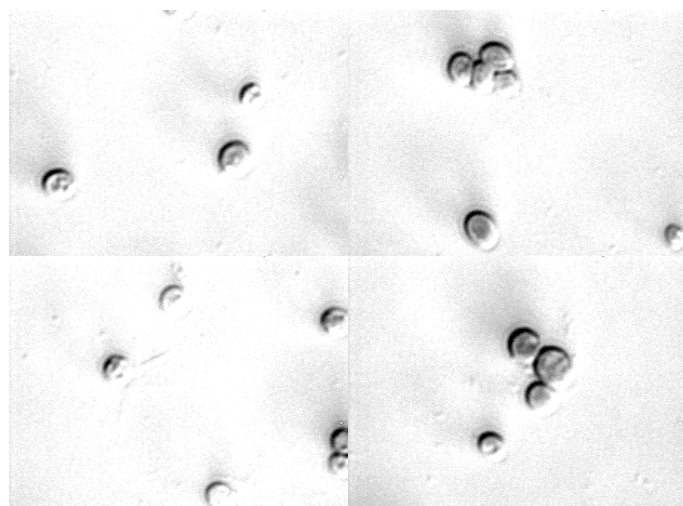


Fig.6 Inclination of Chlorella calibration curve



(a) 3500lx (a-condition) (b) 500lx (b-condition)

Fig.7 Observation of Chlorophyll-a

#### 4. 結言

微細藻類に *Chlorella fusca* C-104 株を用いて CO<sub>2</sub> の通気方法の違い、並びに光量の違いによる増殖特性を調べた結果、以下のことが明らかにされた。

- (1) イオン化法では、NaHCO<sub>3</sub> 量を 2.0g/l、及び 4.0g/l と変化させて培養液中に添加した。その結果、両者における pH の時間的変化はほとんど同じであり、本培養液は NaHCO<sub>3</sub> 量に対する pH の緩衝効果があることが確認された。このような条件下で NaHCO<sub>3</sub> 量を変化させて藻体の増殖量を観察した結果、NaHCO<sub>3</sub> 量を 4.0g/l 添加した方が 2.0g/l に比べて藻体増加量は約 1.3 倍増加した。溶液中の HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> イオン濃度が増加したためと考えられる。しかし、その濃度は pH の変化に影響されると予想され、必ずしも NaHCO<sub>3</sub> の添加量に比例した増殖量が得られる結果にはならなかった。

- (2) CO<sub>2</sub> メーターによる溶存 CO<sub>2</sub> 量は NaHCO<sub>3</sub> 添加量 2.0g/l、4.0g/l とも、添加直後で最大値を示した。しかし、その後急激に減少し、4 時間後には NaHCO<sub>3</sub> の添加量に関わらず、ほぼ大気圧下（常温）の飽和溶存 CO<sub>2</sub> 量と同じに値になった。この間の CO<sub>2</sub> 量の急激な増加が藻体の増殖に寄与する効果も殆ど観察されなかった。またこの時発生した CO<sub>2</sub> 量が全て HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> イオンとして培養液中にトラップされるのであれば、その積算 CO<sub>2</sub> 量は Aeration と比較にならない大 CO<sub>2</sub> 量を確保できるはずで、それに伴う藻体の増殖量が期待されるはずであるが、そのような効果も観察されなかった。
- (3) イオン化法における藻体の増殖曲線は 36~48 時間後で定常化した。また同時刻で培養液の pH が、pH=10~11（高アルカリ）を示した。増殖の手痛い原因として、培養液自体が高アルカリになったことも充分考えられるがそれと同時に、pH=10~11 では HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> イオン濃度が急激に減少し、CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> が増加する。HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> イオンを取り込んで炭酸同化作用を行うクロレラ藻体にとって、その量が pH 変化により急減したことが、増殖停滞を引き起こしたとも考えられる。
- (4) 高アルカリ、並びに攪拌に伴う藻体破壊が懸念されたが、その影響は殆ど観察されなかった。
- (5) 光量 3500lx の環境下で培養すると、500lx の環境下よりも検量線の検量係数は大きくなり、藻体が白色化する傾向にあった。過度の光量を与えることは、藻体の増殖を阻害する恐れがあり、藻体の増殖にも大きな影響を及ぼすことがわかった。

以上より、今のところ、*Chlorella fusca* C-104 株の培養法として、イオン化法よりも単純な Aeration 法が優れていることがわかった。

#### 5. 参考文献

- 1) RITE NOW33 “微生物による CO<sub>2</sub> 固定の可能性を検証一見えてきた再資源化への道筋” p09
- 2) 佐々木 崇・島袋 出・大下 英吉, “アルカリイオン濃度に基づくコンクリートの炭酸化による pH 遷移に関する解析的研究” コンクリート工学年次論文集, Vol.25, No.1, (2003)p691
- 3) 西川信行・平野篤・金子雅人・羽田道夫 “微細藻の培養制御方法” 特開平 6-79, (1994)
- 4) 西澤一俊・千原光雄, “藻類研究法” p477
- 5) 大平勇一・楠木史子・空閑良壽・小幡英二・安藤公二, “藻類培養における最適培養” 化学工学会論文集 (2004)p545-548