

301 アスペクト比の小さい Taylor-Couette 渦による光合成微生物の増殖特性

Growth characteristic of the photosynthesis microorganism in the Taylor-Couette Vortex Flow Bioreactor

○正 河合秀樹 (室蘭工大) 学 岡元隆典 (室蘭工大[院]) 学 野村慶太 (室蘭工大[院])

Hideki KAWAI, Muroran Institute of Technology, 27-1, Mizumoto-cho, Muroran City, Hokkaido
Takanori OKAMOTO, Muroran Institute of technology
Keita NOMURA, Muroran Institute of technology

Keywords: Taylor-Couette vortex flow, Photosynthesis, destruction of assessment of cell, Microorganism, Bio Support Polymers, Chlorella Calibration curve

1. はじめに

近年, 人工細胞などによる新しい再生医療が発達して来ており, その根幹である未分化細胞や動物細胞など, せん断に弱い細胞の増殖メカニズムを把握することは, 今後大量生産プロセスを考える上で重要である.

現在のバイオリアクターは固定化法が主であり, 小片の固定化培地も一緒に流動化させて培養増殖させる. 小片の固定化培地を用いることにより, 流れのせん断力から微生物を保護しつつ, 効率的な培養を行う意味でこの方法は画期的である. しかし, 細胞単体を浮遊させて培養する用途には向かない. 今後細胞の浮遊化培養は医療分野を中心に重要になって来るとも思われ, その攪拌法の開発は重要である. 従来から工業的によく使用されるインペラ攪拌や過度通気攪拌は, 局所的な高せん断が発生するため, 細胞が破壊される危険性が高い.

このような背景から, 緩やかな混合攪拌が期待できる Taylor 渦流れ(TVF)を用いた培養実験が従来から用いられている. しかし, その応用例は極めて少なく, メカニズムについてはよく分かっていない. 流体力学的なアプローチが殆どなされない上, 動物細胞を用いた培養は有害ウイルスによるコンタミの危険性も高く, 先進医療技術を持った機関しか扱えない.

一方藻類を中心とした植物細胞は人間への伝染性の危険性がなく安全で, 且つ光合成微生物の中には酸素発生量が植物の数十倍に達するものも見られ, 攪拌法の定性的な把握に加えて実用的なバイオリアクターへの応用価値も高い. また動物細胞と同じく単体で浮遊するものや細胞壁がなくせん断に弱い種類も豊富にあり, TVF などの攪拌法の開発には合理的である. このような意味から光合成微生物を中心にその培養特性を調べることが重要である. ここでは, 光合成微生物における光量と細胞の活性度の関係と, 吸光度計による検量線作成時への影響について主に調べた.

また, 光合成微生物の懸濁液濃度を容易に測定する手法の一つとして吸光度を利用した濃度測定法が考えられるが, この検量線作成において 2 つのパターンが存在することがわかった. 本研究ではこの原因も調査した.

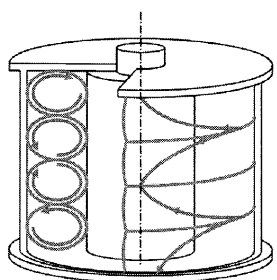


Fig.1 Taylor-Couette Vortex Flow

生物を単体で培養する TVF バイオリアクターの概要を示す. TVF は局所せん断が少なく, 攪拌ムラが少ない装置である. ここではコンパクト設計を想定し, アスペクト比の小さい TVF 発生装置を考案した.

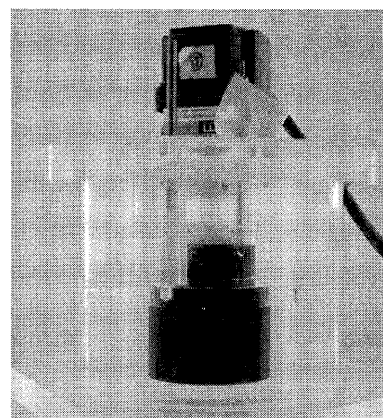


Fig.2 TVF Bioreactor device

Fig.2 は実際の培養実験装置である. 内円筒半径は $R_{in}=15\text{mm}$, 外円筒半径 $R_{out}=40\text{mm}$, 高さ $H=25\text{mm}$ であり, 円筒高さ H と内外円筒の隙間 d の比であるアスペクト比 $\Gamma=H/(R_{out}-R_{in})=1$, 内外円筒の半径比 $\eta=R_{in}/R_{out}=0.375$ である. また, 回転 Reynolds 数は $Re=dR_{in}\Omega/\nu$ (ν : 動粘度, Ω : 角速度, $d=R_{out}-R_{in}$) と定義される.

2. 2 実験方法

光合成微生物には, 球形単体細胞で知られる *Chlorella fusca* var. *vacuolata* IAM C-104 株を用いた. この細胞は細胞壁が硬く, 攪拌によるせん断力の影響を検証する実験には不向きであるが, 過度通気攪拌, TVF 攪拌などの攪拌形態の違いによる細胞の増殖率などを定性的に把握する上で重要と考える. 増殖期については藻体濃度の高い直線増殖期を選択した. 増殖速度の評価には濃度増加量 $Q[\text{g}/(\text{l}\cdot\text{day})]$ を用いた. 濃度増加量 Q とは, 直線増殖期の藻体濃度推移を最小二乗法により直線近似した式の傾きのことである. 懸濁液からのサンプル採取は 24 時間毎に 5 日間行い, その際に *Chlorella* 濃度を吸光度計で測定する. Re 数を 10000, 20000, 30000 と変化させ, Re 数との関係も調査する. なお, TVF 攪拌は装置の構造上, 半密閉状態となるため過度通気攪拌と比較すると, 炭素源の供給に不向きである. そこで, 72[hour]毎に NaHCO_3 を $0.67[\text{g}]$ 添加し, 炭素源の供給を行い, 過度通気攪拌は $480[\text{ml}/\text{min}]$ の室内空気を通気して実験を行った.

分光吸光度計を使用した濃度測定法および, その検量線の作成法について以下記述する. 吸光度 x の培養液の中から濾液量 $Q[\text{l}]$ を取り出し, フィルタに付着させる. アスピレータを用いて濾過した後, 乾燥機でフィルタを

2. 実験条件および実験方法

2. 1 実験装置

Fig.1 に光合成微

乾燥させ、付着した chlorella 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 をグラフにプロットして検量線を作成した。また、そのときのクロレラ懸濁液の様子を光学顕微鏡により観察し、実際の吸光度と実際の Chlorella 細胞の特徴や様子を調査した。培養照度の違いが検量線の傾きに影響する可能性を考慮して、培養状態 A,B を培養照度によって次の様に分けた。

A : $37.8 [\mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}]$ (インキュベータ内)

B : $3.67 \sim 10.1 [\mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}]$ (プレ培養)

さらに被検液は以下の培養期間によって I, II とする。

I : B で 3 週間培養の後 A で 4 日間培養

II : B で 3 週間と 4 日間培養

また、光学顕微鏡を用いた観察では、A の状態で 2 週間培養したものを i, B 状態で 2 週間培養したものを ii として観察を行った。

3. 実験結果および考察

TVF 装置と過度通気攪拌装置を用いたそれぞれの濃度の時間変化を Fig.3 に示した。これより、過度通気攪拌による濃度の時間変化が、TVF 攪拌と比較して大きく、したがって増殖速度が大きい結果が得られた。120 時間後の最終懸濁液濃度も $0.7 \sim 0.8[g/l]$ で TVF の $0.5[g/l]$ 前後と比較して高い。ただし、同じ TVF 攪拌では、Re 数の高い方が、増殖速度は大きい。TVF 攪拌が過度通気攪拌と比べて増殖速度が下がる原因として攪拌速度の増加が考えられる一方で、pH が酸性からアルカリに転じたことも無視できない。過度通気では TVF よりはるかに高い攪拌速度が局所的に生じている可能性を考えると攪拌速度の増加よりも pH 変化に主原因があると思われた。TVF 攪拌では炭素の供給源として NaHCO_3 添加法を採用しているが、 NaHCO_3 は水溶液中で $[\text{OH}^-]$ を放出し、懸濁液の pH をアルカリに変化させる。2 回目添加が行われた 72[hour]以降で懸濁液濃度が減少に転じているところから、塩基化した懸濁液によって Chlorella の細胞が破壊された可能性がある。TVF 攪拌で高 Re ほど増殖速度が大きいという結果に関しては光合成微生物が沈殿せず、受光状態が改善したためと考えられる。

得られた検量線を Fig.4, および Fig.5 に示す。傾きは I が 0.567, II が 0.375 であり、i の被検液では白色化した chlorella がよく見受けられ、一部は赤褐色に変色していた。これは強い光エネルギーによって葉緑素が変異もしくは死滅してしまったと考えられる。それに対し ii の被検液では変色傾向は低く、緑色と認識できるものが多かった。吸光度は特定の緑色スペクトルを検出し、実験条件 I の変色細胞は検出できなかったことから、同吸光度でも傾きが大きくなったと思われる。

4. おわりに

NaHCO_3 による炭素供給源は pH を変化させることから、光合成微生物の増殖を阻害する可能性が示唆された。ただし、炭素の供給法としてこの方法はイオン由来であるため、溶存炭素として溶液中に溶け込む形態をとる可能性がある。過度通気攪拌は、気泡を溶液に注ぎ込むことから気泡を微生物に直接接触させる方法である。増殖速度が溶存炭素の形態によって変化する可能性も考えられるため、過度通気についても窒素あるいはヘリウムによるブランク実験を行う予定である。TVF 攪拌において高 Re 攪拌の効率が相対的に高いことから、攪拌効果は受光状態の改善につながる事が示された。

増殖においては適量の照度があり、過度の照射は却つ

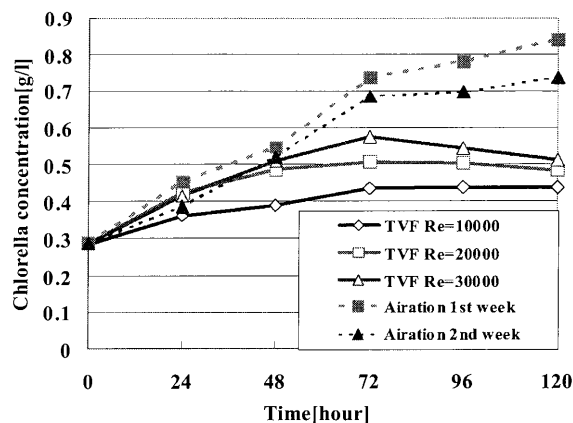


Fig.2 Chlorella Concentration

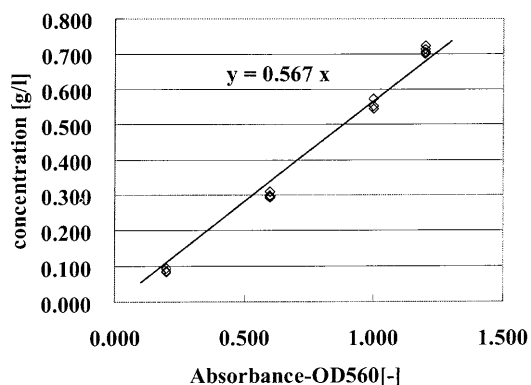


Fig.3 Experimental working curve I

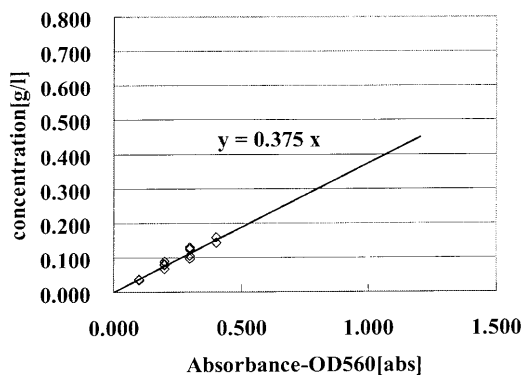


Fig.4 Experimental working curve II

て増殖を阻害する可能性があることが今回の実験で示唆された。環境下で育成され、葉緑素が細胞内において色素変化した可能性がある。

参考文献

- 1) 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) pp545-548
- 2) S.Sumita, H.Kawai and H.Takahashi, Cultivation of the Photosynthesis Microorganism in the Taylor Vortex Flow with a Small Aspect Ratio, Proceedings of 6th World Conference on Experimental Heat Transfer, Fluid Mechanics, and Thermodynamics, 2005, 9-a-2.