

藍藻の工業的利用に関する研究

—藍藻の連続大量培養と主要栄養塩類の代謝速度—

村上定瞭*・深川勝之*・原田邦彦*
竹内正美*

CONTINUOUS CULTIVATION AND NUTRIENT CONSUMING RATES OF BLUE-GREEN ALGA

Sadaaki MURAKAMI, Masayuki FUKAGAWA
Kunihiko HARADA and Masami TAKEUCHI

Department of Industrial Chemistry, Ube Technical College, Tokiwadai, Ube 755, Japan

Abstract

A blue green alga, *Chroococcus sp.*, was cultivated continuously and the kinetics of metabolism were determined for major nutrients

Bottom mud from a small agricultural pond in Ube city was taken into a cultivation jar and algae were precultivated. Alga, *Chroococcus sp.*, was transferred to a continuous cultivator which is of 13.8 dm³ of the net volume, thermostated at 30°C, and applied light with 8 white spotlights of 200W. The culture medium contained NaHCO₃, NaNO₃, KH₂PO₄, MgSO₄, CaCl₂, FeCl₃ and EDTA. The pH value was kept at 8.0. The alga cell concentration was kept at 3,000 to 4,000 mg/dm³. Under these condition, the alga growth rate was 10.6 g-dry biomass/m²-light applied area/day. The consuming rates for carbonate, nitrate and phosphate ions in light were 3.4×10^{-2} , 5.3×10^{-3} and 5.8×10^{-4} g/g-dry biomass/day and the consuming rate for oxygen in the dark was 2.7×10^{-3} and the excreting rate for phosphate ion was 8.2×10^{-6} .

1. はじめに

光合成生物の工業的利用は、バイオテクノロジーの分野において、最近注目を集めている1つである。これは食料・飼料、医薬品、化学薬品、燃料や肥料などとしての利用が期待されているからで、既に実用化されているものも多い。著者らは、藻類、特に藍藻に着目した。藍藻は、核もなく葉緑体膜もない最も下等な藻類である。

有性生殖は知られず細胞分裂によってのみ増殖する。主要光合成色素は、通常の色素であるクロロフィル α 、 β -カロチンと藍藻に特有のフィコシアニン、フィコエリトリンのフィコビルリン蛋白である。貯蔵物質は藍藻デンプンで、細胞壁はセルロースまたはペプチドグリカンより成る。

この藍藻が、最近特に注目を集めているのは、(1)緑藻などの藻類の物質代謝や貯蔵物質が他の高等植物に類似しているに対して、藍藻については不明な点が多いこと、(2)ビタミンや抗菌性物質などの有用な物質を含むこと、(3)遺伝子工学的に興味があること、(4)増殖率が高いので、

*宇部工業高等専門学校工業化学科

食料・飼料としての価値があること、(5)水の華を形成して湖沼の富栄養化の原因になることなど、多くの理由による。

ところで、実験室規模での小さな容器内での培養法は確立されているが^{1,2,3)}、藍藻を工学的に利用するには、まずこれを大量に培養しなければならない。そこで、本研究では、これを大量にしかも連続的に培養する方法を検討した。つぎに、工業的に利用する際のプロセス設計や湖沼の富栄養化現象の解明等に重要な知見となる速度論的な観点から培養生理を検討した。今回検討した藍藻は宇部市内の農業溜池⁴⁾から採取した*Chroococcus sp.*であり、この藍藻について光照射下におよび暗条件下における主要無機栄養塩である炭酸、窒素やリンなどの代謝速度を調べた。

2. 実験

2.1 予備培養

宇部市の農業養溜め池“小路池”の底泥をFig. 1に示すように、アクリル製円筒容器（直径20cm、高さ50cm）の底に厚さ10cmになるように移し、硝酸ナトリウム(0.5g/dm³) およびリン酸二水素ナトリウム(0.5g/dm³) を含む水道水10dm³を培養液として、底泥が播き上がらないよ

うに細いチューブを用いて注いだ。この容器を30℃に保ったガラス製恒温槽(40×75×45cm)に浸し、底泥が播き上がらないように1rpmの速度で緩速撹拌しながら100Wの白色ランプ2本を用いて光照射した。2～3日すると

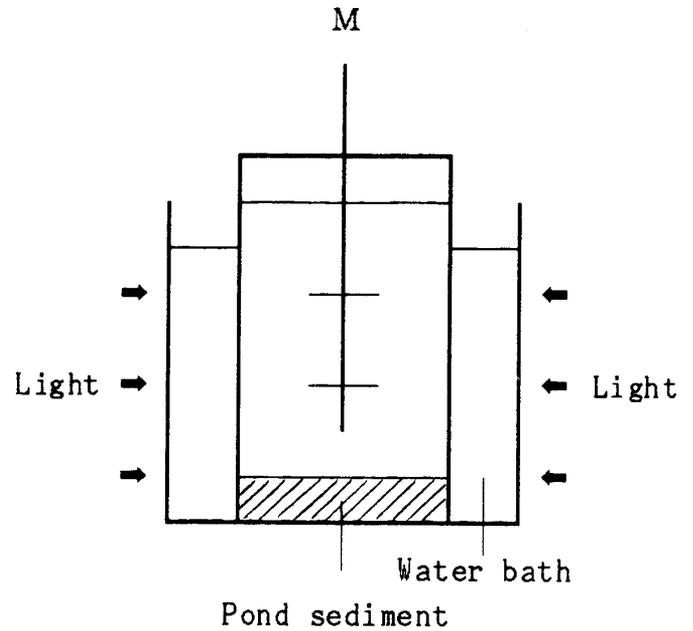


Fig. 1 Pre-cultivation

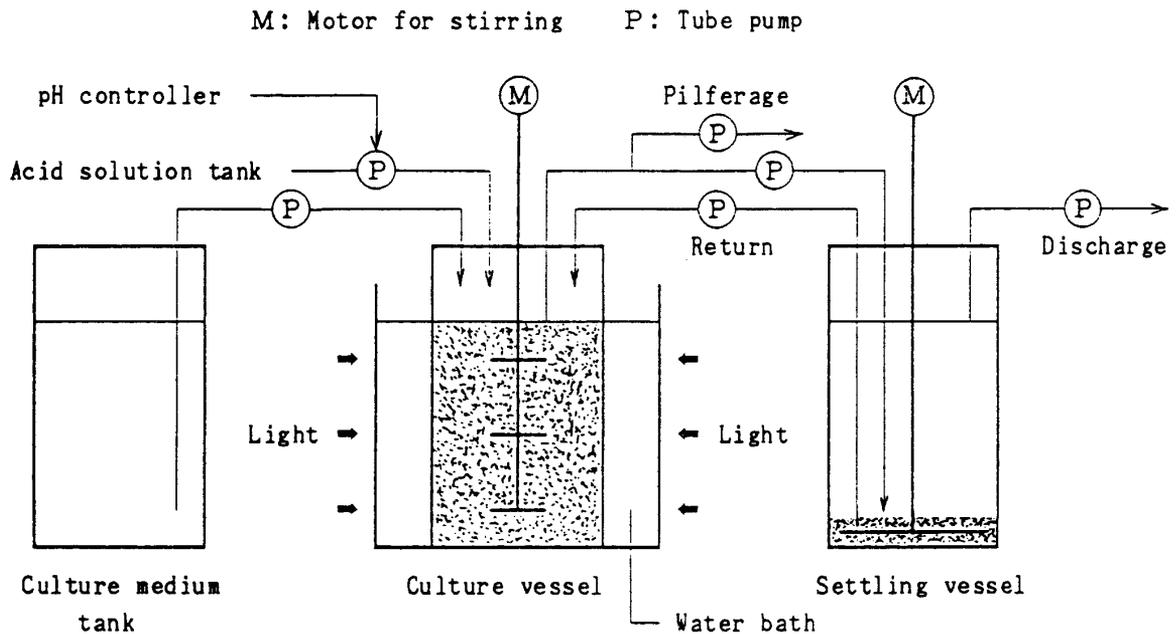


Fig. 2 Continuous cultivator of blue-green alga

藍藻の増殖が活発となり培養液が白濁してくる。10日ぐらいいで、藻濃度がおよそ30mg/dm³となった。この予備培養混合液を連続培養装置に移した。

2.2 連続培養

連続培養装置の概要をFig. 2に示す。培養液保存槽、培養槽および分離層より構成される。培養液や混合液などの液送は、すべてマイクロチューブポンプを用いて行なった。培養槽および分離槽はアクリル製円筒容（直径20cm、高さ50cm）で、培養槽は30℃に保ったガラス製恒温槽（40×75×45cm）に浸した。培養槽の光照射は200Wの白色ランプ4～8本用いて行なった。培養槽内の培養混合液は13.8dm³で被照射面積は2300cm²であった。分離槽は遮光した。培養液を培養槽に送り、培養混合液は分離槽に送られる。分離槽では、沈降法により藍藻と培養液を分離して、濃縮した藍藻は培養槽へ返送し、培養廃液は放流した。所定の藻濃度を保つため、毎日増殖分を抜き取った。培養槽に3枚の攪拌羽根を取り付け、藍藻が沈降しないように、また藍藻の群体が破壊されない程度に混合液を60rpmで攪拌した。分離層にはゴム製の掻き寄せ羽根を取り付け、沈降した藍藻が掻き上がらないように、1rpmで回転した。

藻濃度が100～200mg/dm³以下では、分離槽に沈降した藍藻が自動的に返送されないで、藍藻濃度が高くなるまで、分離槽の底に沈降した藍藻は返送用チューブで集めて培養槽に返送した。培養液の成分は、炭素源として炭酸水素ナトリウム、窒素源として硝酸ナトリウム、リン源としてリン酸二水素カリウムを用いた。その他の成分として、硫酸マグネシウム、塩化カルシウム、塩化第二鉄および沈殿防止剤としてEDTAを加えた。各培養原液の組成をTable 1に示す。これらの原液を所定量とり、水道水を用いて希釈して培養液とした。Table 2に実際の培養液の組成を示す。培養液を2つに分けたのは、反応して沈殿を生じるのを防ぐためである。培養液1および2をそれぞれ3 dm³/dayの流量で与えた。pHはコントローラーを用いて、0.5N硫酸および水酸化ナトリウムを滴下してすべて8.0に設定した。

2.3 藻類の同定

今回培養した藻類は、ほぼ単藻で球形の単細胞が塊状の群体をなす*Chroococcus sp.*で、種まで同定できなかった。これに混じって、極く僅かに糸状の群体をなす*Lyngbya martensiana*が存在した。後者の存在量は確定できなかった。

Table 1 Stoch solutions for culture media

classification	component	concentration (g/dm ³)
	NaHCO ₃	powder
Solution A	NaNO ₃	50.0
Solution B	KH ₂ PO ₄	50.0
Solution C	MgSO ₄ · 7H ₂ O	15.0
	CaCl ₂	5.0
	FeCl ₃ · 6H ₂ O	1.0
	EDTA	2.0

Table 2 Compositions of culture media

classification	component	concentration (g/dm ³)
Medium 1	NaHCO ₃	4.0～6.0
	NaNO ₃	0.25～1.0
	KH ₂ PO ₄	0.02～0.085
Medium 2	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.075
	CaCl ₂	0.025
	FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.005
	EDTA	0.010

たが、1%以下であった。

2.4 培養生理実験

Fig. 2に示す連続培養装置の各ポンプを停止して、この装置の培養槽を利用して、バッチ実験を行った。培養槽内の化学成分の経時変化を測定して、速度論的な観点から培養生理を検討した。所定の初期濃度の培養液に対して、光照射および暗条件下での藍藻の物質代謝による培養液の組成の経時変化を測定した。所定の時間ごとに、試料採取口よりチューブ付き注射器を用いて培養混合液を採取した。採取した試料は、2分して試験管に移し、一方はそのまま、他方は濾過して後に密封して3℃において分析するまで保存した。分析した項目は、溶存酸素、炭素水素イオン、ケルダール窒素、アンモニア、亜硝酸イオン、硝酸イオン、リン酸イオン、総リンである。溶存酸素は隔膜型電極DOメーターを用いて測定した。炭素水素イオンは滴定法によった。亜硝酸イオンおよび硝酸イオンはカドミウム還元法および吸光光度法により分

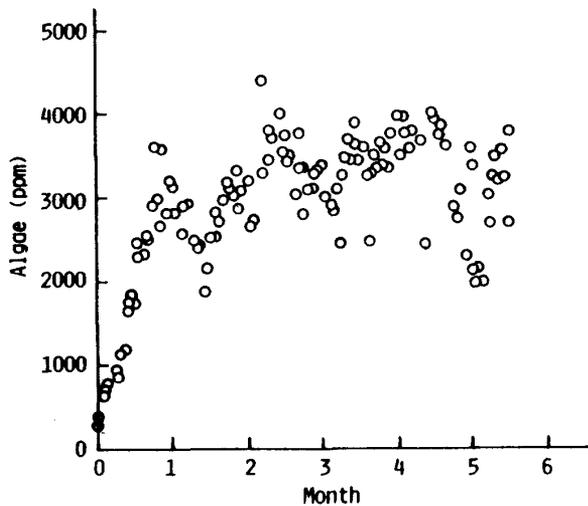


Fig. 3 Alga concentration in the culture vessel.

析した。他の項目は衛生試験法によった。

3. 結果および考察

3.1 予備培養

予備培養液として、(A)硝酸ナトリウム、(B)リン酸二水素カリウム、(C)硝酸ナトリウムおよびリン酸二水素カリウムをそれぞれ添加したものについて検討した。A液については藍藻が発生したが、B液については発生しなかった。これは、リン源については底泥より補給されるが、窒素源については底泥中の脱窒菌の作用により窒素が除去されて、窒素源の補給がないためと思われる。A液とC液を比較すると、C液の方が藍藻の増殖が活発であった。また、他の無機塩類については、添加した場合としない場合との間に特に差異は認められなかった。したがって、予備培養液としてC液を用いた。

3.2 連続培養

連続培養が円滑に行なわれるようになってからの、藻濃度の経日変化をFig. 3に示し、藻濃度を3000~4000mg/dm³に維持するために、抜き取った藍藻の量をFig. 4に示す。なお、光照射には100V、200Vの白色ランプを8本用いた。Fig. 3に見られるように、藻濃度が200mg/dm³から培養して約一ヶ月間は直線的に増殖して3000mg/dm³に達するが、その後藻濃度が少し減少している。連続培養を開始して、および2ヶ月後から抜き取りを開始した。抜き取りを開始してから再び藻濃度が増加し始めた。以後、3000~4000mg/dm³に維持されるように藍藻の増殖分を抜き取った。以上のことから、適当に増殖分を抜き取ら

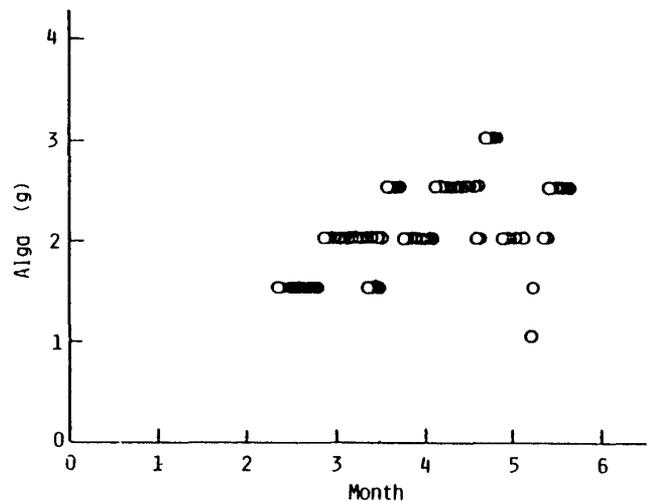


Fig. 4 Pilferage of alga from the cultivator.

ないと藍藻が老化して増殖が停止することを示すものと思われる。事実、1ヶ月から2ヶ月の間は、培養槽内の一部の藍藻が白化した。また、3ヶ月以降において2000mg/dm³まで藻濃度が低下しているのが時々見られるが、これはバッチ実験を行ったためである。

バッチ実験を行っていない、1ヶ月間の連続培養のデータに基づくと、藻濃度の平均値は3652mg/dm³、培養槽内の藍藻の総量は50.4g-dry biomass/day、抜き取り量の平均値は2.54g-dry biomass/dayであった。藍藻の平均日令は18日であった。培養槽の被照射面積に対する増殖率は10.6g-dry biomass/m²/dayであった。

3.3 物質代謝の速度

光照射および暗条件下での主要無機塩類の取り込みおよび放出速度を測定した。培養槽内のpHは8.0、温度は30°Cですべて一定とした。光照射は、200Wの白色ランプを8本用いて行った。

光照射実験

光照射下での培養槽内の各成分の経時変化の例をFig. 5およびFig. 6に示す。Fig. 5は、炭素、窒素およびリンの初期濃度(mg/dm³)をそれぞれ、132、34.2、3.81とした場合で、その相対取り込み速度はほぼ平行となっている。このことから、本条件下での培養液中の炭素、窒素およびリンの相対濃度比は、およそ40:10:1とすればよいことが分かる。

Fig. 6は炭素、窒素およびリンの初期濃度(mg/dm³)を139、1.13、0.95としたときの結果である。窒素源がすべて消費されて取り込みが停止すると、リン源の取り込みも停止している。この事実を確認するための、実験が

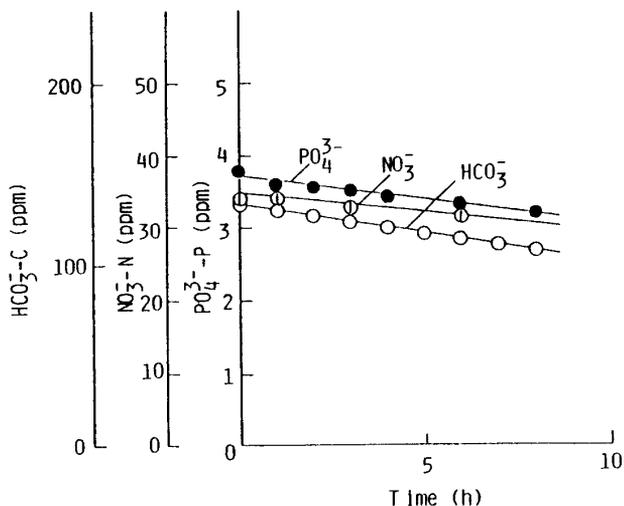


Fig. 5 Changes of principal nutrient concentrations as a function of time in light. Alga : 3570 ppm.

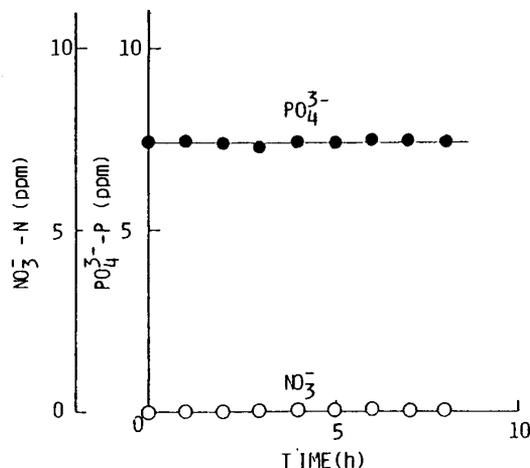


Fig. 7 Changes of principal nutrient concentrations as a function of time in light. Alga : 2785 ppm.

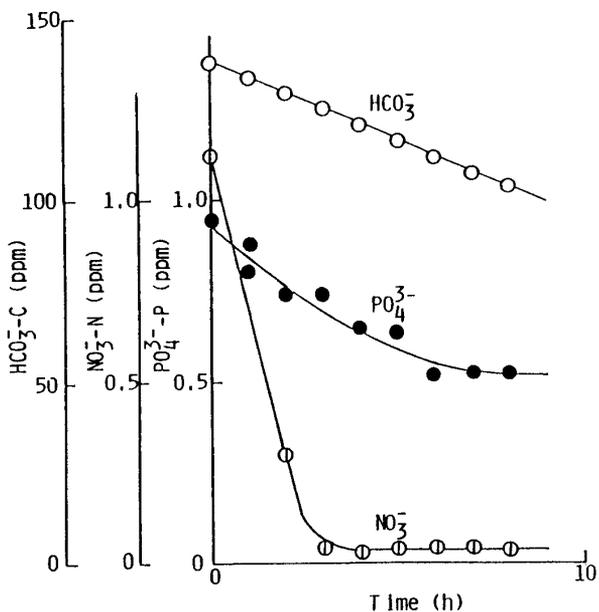


Fig. 6 Changes of principal nutrient concentrations as a function of time in light. Alga : 3049 ppm.

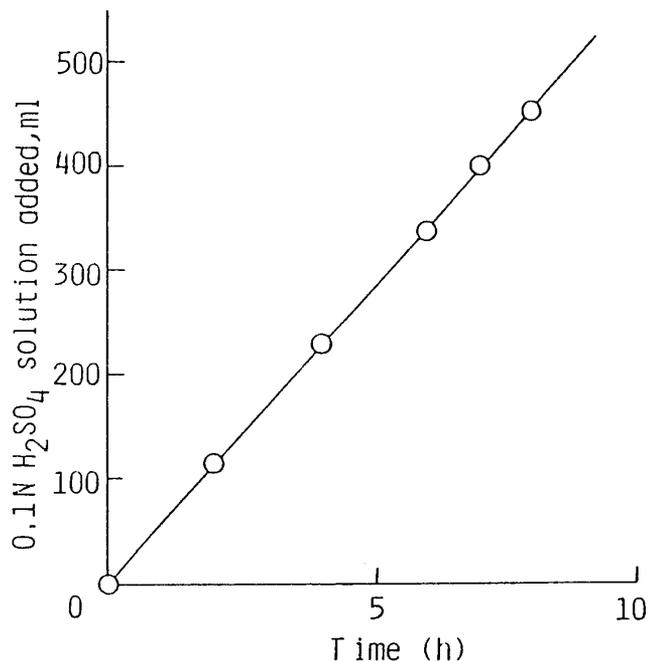
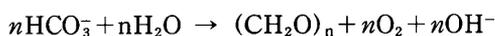


Fig. 8 Acid required to adjust as pH 8.0 by CO₂ uptake in light. Alga : 3575 ppm.

Fig. 7である。培養液中に窒素が全く存在しない場合には、リンが十分存在しても、リンの取り込みが行なわれないことを示している。逆に、リンが存在しない時の窒素の取り込みについての実験を試みたが、リンが不足すると藻類がリンを放出するために、このような実験を行なえなかった。一方、炭素源については、Fig. 6に見られるように窒素源がなくても取り込みが行われ、今回行った実験時間内では光合成に何ら変化は認められない。

炭素イオン、硝酸イオンおよびリン酸イオンの取り込

み速度を測定した結果をFig. 8, Fig. 9, Fig. 10に示す。Fig. 8は実験中pHを8.0に維持するために加えた硝酸の量の経時変化を示す。光照射下では、炭素イオンの取り込みが行なわれ光合成により次のように水素イオンを放出するため培養液のpHが上昇する。



したがって、pHを所定の値に保つために加えた酸の量は、光合成のために取り込まれた炭素水素イオンの量に対応する。この図の傾きより、藍藻の単位量当たりの炭

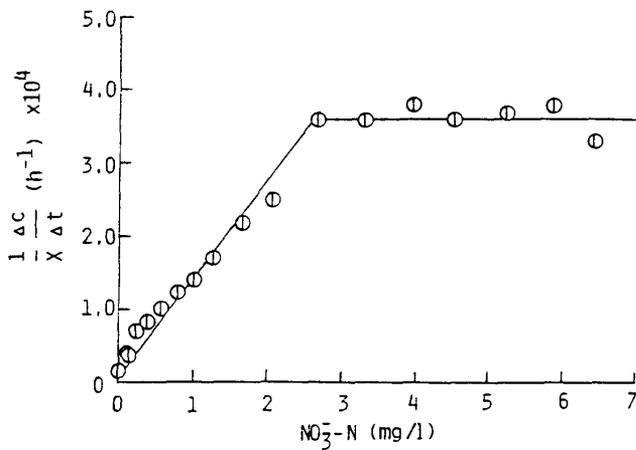


Fig. 9 Concentration dependence of $\text{NO}_3\text{-N}$ uptake rate in light. Alga : 3414 ppm.

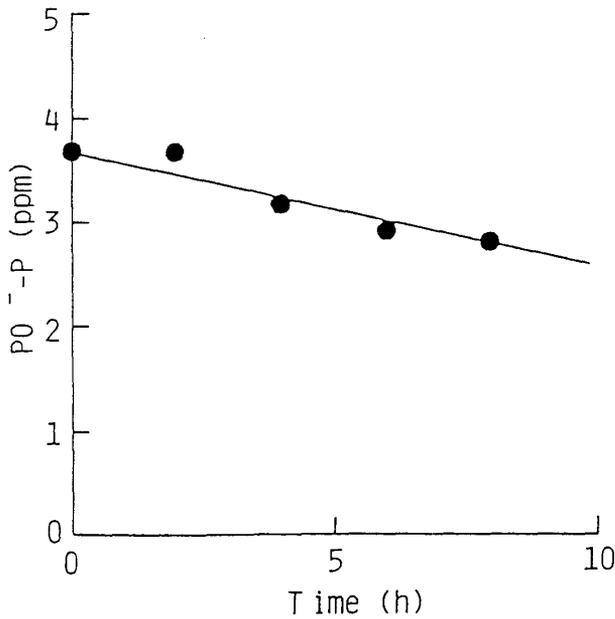


Fig. 10 $\text{PO}_4\text{-P}$ decrease by uptake as a function of time in light. Alga : 3575 ppm.

素の取り込み速度を求めた。このようにして、各実験から得られた取り込み速度をまとめてTable 3に示し、平均値として 3.4×10^{-2} g-C/g-dry biomass/dayが得られた。

Fig. 9は藍藻の硝酸イオンの取り込み速度の濃度依存性を調べたものである。硝酸イオン濃度(窒素換算)が 3 mg/dm^3 までは濃度依存性を示すが、この値以上では取り込み速度が飽和に達している。この図より、取り込み速度を求めた。同様にして他の実験より得られた値をTable 3に示し、平均値として 5.3×10^{-3} g-N/g-dry

Table 3 Intaking rates of principle nutrients by alga in light

	$\text{HCO}_3\text{-C}$	$\text{NO}_3\text{-N}$	$\text{PO}_4\text{-P}$
	3.8×10^{-2}	3.4×10^{-3}	
	3.4×10^{-2}	8.6×10^{-3}	
	3.4×10^{-2}	1.2×10^{-3}	7.2×10^{-4}
	3.1×10^{-2}	3.4×10^{-3}	4.3×10^{-4}
	3.4×10^{-2}	3.1×10^{-3}	5.8×10^{-4}
		8.2×10^{-3}	
Av.	3.4×10^{-2}	5.3×10^{-3}	5.8×10^{-4}

Unit : g/g-dry biomass/day

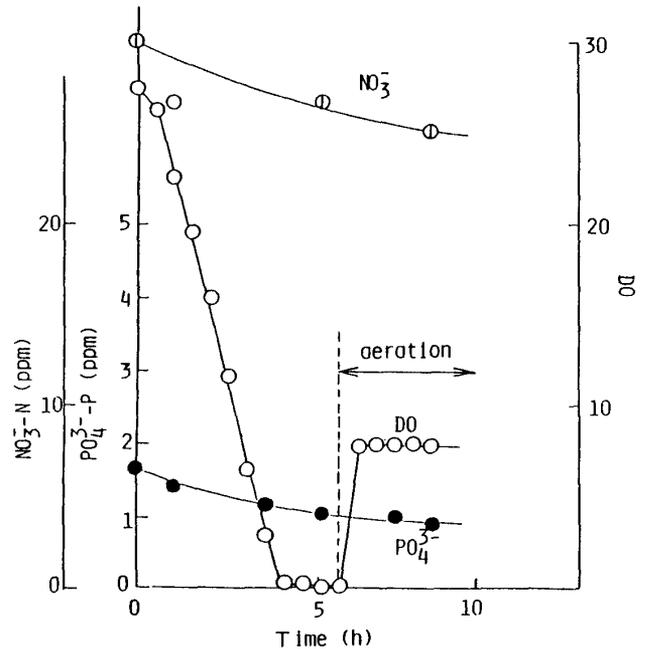


Fig. 11 Changes of principal nutrient concentrations in the dark. Alga : 3610 ppm.

biomass/dayが得られた。

Fig. 10はリンの取り込み速度を測定した結果である。傾きより取り込み速度を求め、Table 3に示すように平均値として 5.8×10^{-4} g-P/g-dry biomass/dayが得られた。

炭素、窒素およびリンの取り込み速度の相対比は59 : 9.1 : 1である。一方、藍藻中の窒素およびリンの含有量の比は9.8 : 1であった。窒素とリンの比率が僅かに異なっているが、これが実験誤差によるものか、他の要因によるものか今後の検討を要する。

暗実験

暗条件下での、藍藻の物質代謝に伴う培養槽内の経時変化を調べた結果の例をFig. 11に示す。溶存酸素DOはバッチ実験開始とともに急激に減少しており、初期濃度27mg/dm³であったものが、4時間後には全て消費されている。これは藍藻の呼吸反応によるものである。5時間後からは曝気を行なって酸素を補給した。一方、この条件下では硝酸イオンが十分あり、硝酸イオン、リン酸イオンともに取り込まれている。暗条件下では、呼吸反応が進行するので、光合成と逆方向に反応が進行しpHが低下する。pHを8.0に保つために加えた水酸化ナトリウムの量をFig. 12に示す。この時のDOの消費速度より、暗条件下での酸素の取り込み速度 2.7×10^{-3} g-O/g-dry biomass/dayがえられた。5時間後から曝気を行なったが、この時は硝酸を消費している。これは過飽和した炭酸ガスが曝気により除去されたからと思われる。

一方、Fig. 13は、硝酸イオンが少量で、バッチ実験開始後、すぐに硝酸イオンが消費された例を示す。この場合には、リン酸イオンを放出している。この放出速度は 8.2×10^{-6} g-P/g-dry biomass/dayであった。これを確認するために、硝酸イオンが存在しない条件で、暗条件下での実験を行なった結果をFig. 14に示す。この条件では、

Table 4 Rate constants in the dark (g/g-dry biomass/day)

O ₂ consuming rate	PO ₄ ³⁻ -P releasing rate
2.7×10^{-3}	8.2×10^{-6}

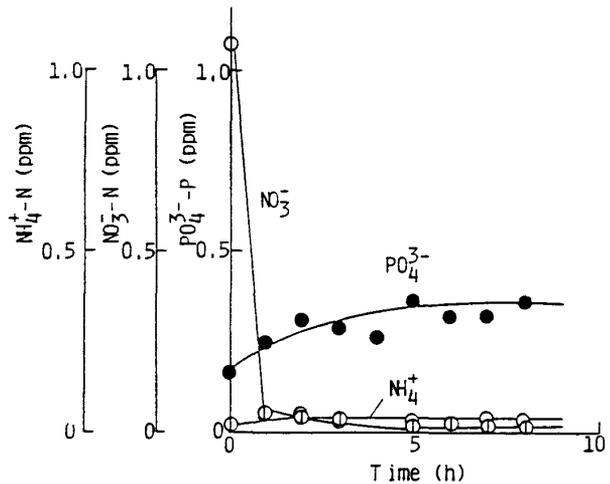


Fig. 13 Changes of principal nutrient concentrations in the dark with aeration. Alga : 3366 ppm.

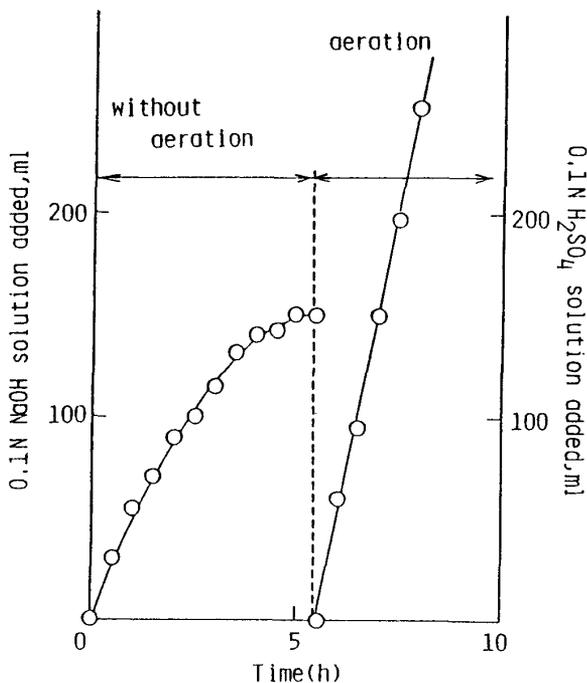


Fig. 12 Base and acid required to adjust pH 8.0 in the dark with and without aeration.

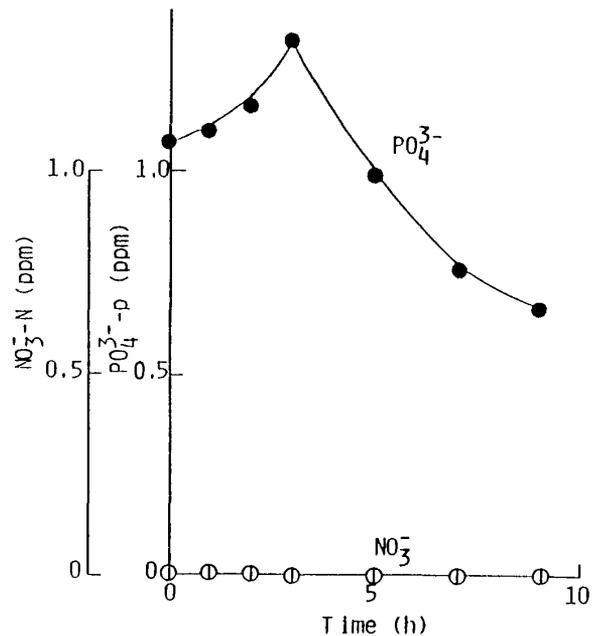


Fig. 14 Changes of principal nutrient concentrations in the dark with aeration. Alga 3576 ppm.

反応開始後3時間まではリン酸イオンが放出され、その後はリンを取り込んでいる。この図に示される挙動から、リンについては2つの因子が関与しているように思われる。以上の結果から、暗条件下での藍藻のリンに関する代謝の挙動は極めて複雑であることが分かった。これらの挙動を明らかにするためには、今後の詳細な検討が必要であろう。

4. まとめ

溜池の底泥を種として得られた塊状の群体をなす藍藻 *Chroococcus* sp. の高濃度連続培養を行った。炭素、窒素およびリン源は、炭酸水素ナトリウム、硝酸ナトリウムおよびリン酸二水素カリウムで与えた。培養液と藍藻は沈降法により分離し、濃縮した藍藻は培養槽に返送した。増殖分は引き抜き藻濃度を3000~4000mg/dm³に維持した。光照射は白色ランプを用い、槽内のpHは8.0に保った。培養槽の被照射表面積0.239m²に対して、200Wの白色ランプ8本を用いた連続光照射下での藍藻の増殖分は10.6 g-dry biomass/m²/dayであった。この時の、炭素、窒素およびリンの取り込み速度 (g/g-dry biomass) は、そ

れぞれ 3.4×10^{-2} , 5.3×10^{-3} , 5.8×10^{-4} であった。また、暗条件下での酸素の取り込み速度は 2.7×10^{-3} , リンの放出速度は 8.2×10^{-6} であった。

参考文献

- 1) Phee, G.: A continuous culture study of phosphate uptake, growth rate and polyphosphate in *Scenedesmus* sp., J. Phycol., **9**, 495-506(1973).
- 2) Chisholm, S. W. and Stross, R. G.: Phosphate uptake kinetics in *Euglena gracilis* (Z) (Euglenophyceae) grown on light/dark cycles. I. Synchronized batch cultures, J. Phycol., **12**, 210-217(1976).
- 3) Okada, M., Sudo R. and Aiba, S.: Phosphorus uptake and growth of blue-green alga, *Micro-cystic aeruginosa*, Biotechnol. Bioeng., **24**, 143-152(1982).
- 4) 村上定瞭, 深川勝之, 石川宗孝, 中西 弘: 池の生物学的浄化システムの開発に関する研究: 京都大学環境衛生工学研究会第7回シンポジウム講演論文集, 295-300(1985).

(昭和62年9月20日受理)