OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	光独立栄養条件下における微細藻類の培養と細胞成分の有効利用
Author(s)	平田, 悟史
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3129165
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

光独立栄養条件下における微細藻類の培養と細胞成分の有効利用

平 田　悟 史

大阪大学 大学院 基礎工学研究科
化学系専攻 化学工学分野

1997

【目　次】

緒　論

1.　微細藻類の分類と特徴　1

2.　本研究の背景　4

3.　本研究の概要と意義　11

第1章　微細藻類細胞の増殖に対する培養条件の影響

1.1　緒言　14

1.2　実験

1.2.1　細胞と培養方法　14

1.2.2　分析方法　21

1.2.3　細胞懸濁液の沈降実験　26

1.3　結果と考察

1.3.1　*Chlorella* sp. UK001 の細胞増殖に対する培地成分の影響　27

1.3.2　*Chlorella* sp. UK001 の細胞増殖に対する CO_2, O_2 濃度の影響　31

1.3.3　*Chlorella* sp. UK001 の細胞増殖に対する培養温度の影響　34

1.3.4　*Chlorella* sp. UK001 の細胞成分，生細胞活性および細胞の沈降性に対する培養温度の影響　43

1.4　結言　50

第2章　微細藻類細胞の増殖に対する入射光強度の影響と光強度分布の算出

2.1　緒言　52

2.2　実験

2.2.1　細胞と培養方法　53

2.2.2 分析および測定方法 58
2.2.3 細胞懸濁液中の光透過率の測定方法 58
2.3 結果と考察
2.3.1 *Chlorella* sp. UK001 の比増殖速度と入射光強度の関係 59
2.3.2 *Spirulina platensis* IAM135 の比増殖速度と入射光強度の関係 63
2.3.3 細胞懸濁液中の光強度分布の評価 66
2.4 結言 72

第 3 章 光強度分布を考慮した微細藻類細胞のリアクターによる培養
3.1 緒言 73
3.2 実験
3.2.1 細胞と培養方法 73
3.3 結果と考察
3.3.1 *S. platensis* IAM135 の回分培養における細胞増殖の評価 77
3.3.2 *S. platensis* IAM135 の連続培養における希釈率の決定と細胞増殖の評価 81
3.3.3 *Chlorella* sp. UK001 の連続培養における細胞増殖の評価 89
3.3.4 入射光強度の変化に対応した *S. platensis* IAM135 の連続培養 94
3.4 結言 97

第 4 章 太陽光集光型バイオリアクターによる細胞の増殖と生産
4.1 緒言 99
4.2 実験
4.2.1 細胞と培地 100
4.2.2 レンズ集光型バイオリアクター 100

4.2.3 レンズ集光型バイオリアクターを用いた *Chlorella* sp. UK001 の回分培養 104
4.2.4 ミラー集光型バイオリアクター 106
4.2.5 ミラー集光型バイオリアクターを用いた *Chlorella* sp. UK001 の連続培養 110
4.2.6 測定方法 114
4.3 結果と考察
4.3.1 太陽光の集光・伝送・照射性能 115
4.3.2 レンズ集光型バイオリアクターを用いた *Chlorella* sp. UK001 の回分培養 119
4.3.3 ミラー集光型バイオリアクターを用いた *Chlorella* sp. UK001 の連続培養 122
4.4 結言 128

第 5 章 微細藻類細胞の食糧資源としての有効利用法
5.1 緒言 130
5.2 実験
5.2.1 細胞と培養 130
5.2.2 分析方法 131
5.3 結果と考察
5.3.1 *Chlorella* sp. UK001 の成分組成 134
5.3.2 *Chlorella* sp. UK001 のアミノ酸，ビタミン組成 136
5.4 結言 138

結論 139

記号説明 142

引用文献 147
論文リスト 154
謝辞 157

緒　　論

1. 微細藻類の分類と特徴

微細藻類とは，大きさが数 μm から数 mm の単細胞および多細胞からなる生物で，高等植物と同様に，酸素発生を伴う光合成が可能な微生物の総称である．植物界の系統分類は，光合成色素や同化貯蔵物質の種類，生殖に関わる細胞の形態によって行われるため，微細藻類は，原核生物である藍藻綱，原核緑藻綱，真核生物である紅藻綱，クリプト藻綱，渦鞭毛藻綱，黄金藻綱，珪藻綱，黄緑藻綱，ラフィド藻綱，真正眼点藻綱，ハプト藻綱，ユーグレナ藻綱，プラシノ藻綱，緑藻綱の 14 綱にまたがって存在する(Chihara, 1991)．**Table 1** に，微細藻類の系統分類とその特徴，代表的な種名を示す．

系統分類上，様々な綱に属する微生物の集団である微細藻類は，そのエネルギー獲得形式においても多様性に富んでいる．大部分の微細藻類は，光をエネルギー源，二酸化炭素を炭素源として用い，高エネルギー物質(ATP および NADPH)と有機化合物を合成する，酸素発生型の光合成反応を営む．この反応の一般式を次に示す．

$$CO_2 + H_2O + h\nu \rightarrow [CH_2O] + O_2 + ATP + NADPH \qquad (1)$$

しかし，一部の微細藻類では有機化合物を炭素源として利用することが知られており，また一部の微細藻類は，有機化合物をエネルギー源として利用する．**Fig. 1** に，

Table 1　Systematic classification of microalgae

分類群		光合成色素		同化貯蔵物質	鞭毛の位置と構造	核膜	葉緑体	
門	綱	クロロフィル	カロチン				周囲の膜数	ラメラ構造
原核緑色植物	原核緑藻綱	a,b	β	デンプン	なし	なし	なし	1重チラコイドラメラ
藍色植物	藍藻綱	a	β	藍藻デンプン	なし	なし	なし	1重チラコイドラメラ
紅色植物	紅藻綱	a	α,β	紅藻デンプン	なし	あり	2	1重チラコイドラメラ
クリプト植物	クリプト藻綱	a,c	α,β	クリプトデンプン	側前方 片羽型+両羽型	あり	4	2重チラコイドラメラ
渦鞭毛植物	渦鞭毛藻綱	a,c	β	デンプン	側方-片羽型 側後方-両羽型	あり	3	3重チラコイドラメラ
黄色植物	黄金色藻綱	a,c	β	クリソラミナラン	側方 両羽型+むち型	あり	4	3重チラコイドラメラ、 周縁ラメラ
	珪藻綱	a,c	β	クリソラミナラン	側方1本 両羽型	あり	4	3重チラコイドラメラ、 周縁ラメラ
	黄緑藻綱	a,c	β	不明、油	側前方 両羽型+むち型	あり	4	3重チラコイドラメラ、 周縁ラメラ
	ラフィド藻綱	a,c	β	クリソラミナラン 様物質	側前方 両羽型+むち型	あり	4	3重チラコイドラメラ、 周縁ラメラ
	真正眼点藻綱	a	β	クリソラミナラン 様物質、油	側前方1本 両羽型	あり	4	3重チラコイドラメラ、 周縁ラメラなし
ハプト植物	ハプト藻綱	a,c	α,β	パラミロン様物質	前方むち型2本 ハプト鞭毛1本	あり	4	3重チラコイドラメラ
ユーグレナ植物	ユーグレナ藻綱	a,b	β,γ	パラミロン	前方 片羽型	あり	3	3重チラコイドラメラ
緑色植物	プラシノ藻綱	a,b	α,β	デンプン、 マンニトール	前方または側方 ひも型+うろこ	あり	2	2～多重チラコイド ラメラ
	緑藻綱	a,b	α,β,γ	デンプン	前方等長 むち型	あり	2	2～多重チラコイド ラメラ

Chihara (1991)を改良・修正

Carbon source / Energy source	**Carbon dioxide (Inorganic carbon)**	**Organic compounds**
Light	**Photoautotrophs** Green plants **Most microalgae**	**Photoheterotrophs** Photosynthetic bacteria **A part of microalgae**
Chemical substanses	**Chemoautotrophs** Hydrogen bacteria Sulphur bacteria Nitrate bacteria	**Chemoheterotrophs** Animals Most bacteria **A part of microalgae**

Fig.1 Classification of organisms on the basis of utilization of energy and carbon sources

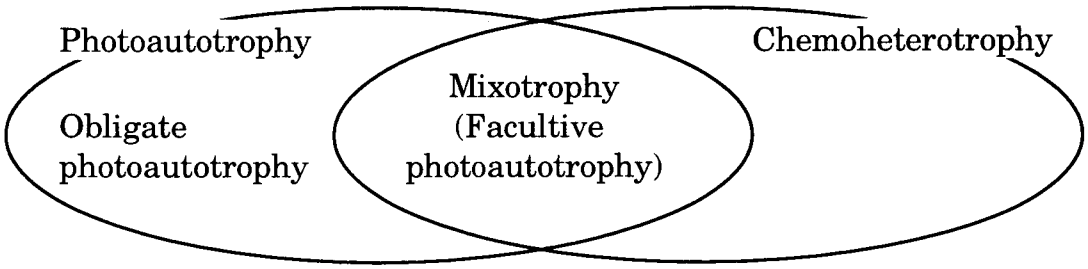


Fig. 2 Nutritional types of organisms

増殖に必要なエネルギー源と炭素源の獲得形式による生物の分類を示す．微細藻類は，光をエネルギー源，二酸化炭素を炭素源とする光独立栄養(Photoautotrophy)，光をエネルギー源，有機化合物を炭素源とする光従属栄養(Photoheterotrophy)，有機化合物をエネルギー源かつ炭素源とする化学従属栄養(Chemoheterotrophy)の 3 種類の栄養形式に分類される．

一方，一部の微細藻類では，二酸化炭素と有機化合物がともに存在する場合，光照射条件の下で光独立栄養と化学従属栄養を同時に行うことが知られており，この栄養形式を混合栄養(Mixotrophy)または通性光独立栄養(Facultative photoautotrophy)と呼ぶ．また，混合栄養以外の光独立栄養を絶対光独立栄養(Obligate photoautotrophy)という．**Fig. 2** に，光独立栄養，化学従属栄養，混合栄養の関係を示す．

2. 本研究の背景

地球上に初めて微細藻類が出現したのは約 25 億年前で，その当時，地球を取り巻く大気は，メタン，水素，アンモニアを含む還元的な組成であったと言われている．酸素発生型の光合成反応を営む微細藻類の出現により，大気中に酸素が放出され蓄積された結果，現在の酸化的な大気組成となったと考えられている(Fujita and Ohki, 1989)．また同時に，二酸化炭素から有機化合物を合成

することによって，微細藻類は地球の生態系の中で1次生産者として重要な役割を果たしてきた(Hattori, 1990).

人間と微細藻類の関わりについては，アフリカやメキシコでラン藻の一種が食用とされ，貴重なタンパク源とされてきたことが知られている(Watanabe, 1981). しかし，これを除けば人間が直接に微細藻類を利用する機会は少なかった. ところが近年，微細藻類のもつ多様な機能や性質が注目され，様々な目的で微細藻類を積極的に利用することが検討され始めた. そして，一部では細胞生産を目的とした大量培養が行われている(Goldman, 1979).

微細藻類を人工的に培養し，利用しようとする試みは，1940年代の液体燃料生産を目的とした研究に始まる. これは，太陽光エネルギーを用いて微細藻類細胞を生産し，細胞に含まれる脂肪分を化石燃料の代替燃料として用いるためのものである. このプロセスは実用化には至らなかったが，乾燥した微細藻類細胞の直接燃焼や，細胞の嫌気発酵によるメタン生産など，微細藻類を用いたエネルギー生産プロセスについては，現在もなお様々な研究が続けられている.

続く1950年代には，食糧危機を背景に *Chlorella* や *Spirulina* 細胞の大量培養によって，従来のタンパク源を代替する食糧生産の可能性が検討された. その後の食糧の需給関係の好転により，食糧としての利用を目的と

した細胞の大量生産は行われなかったが，微細藻類細胞は，家畜，家禽や魚貝類の飼料として広く利用されるほか，付加価値の高い健康食品として実用化が図られている．

環境保全の分野では，好気性微生物を用いた在来型の廃水処理プロセスでは処理されにくい窒素，リンを，微細藻類が細胞内に取り込むこと，および好気性処理において不足となる酸素を微細藻類が生成することから，1960 年代に微細藻類を用いた廃水処理プロセスが検討された．また，最近では微細藻類細胞が重金属を吸着する性質を用い，バイオレメディエーションへの適用も研究されている．この他にも，新たに発見された微細藻類の多様な機能や性質に着目して，様々な利用方法が検討されている．

Fig. 3 に，微細藻類の細胞生産とその利用の概念を示す．また **Table 2** には，現在報告されている微細藻類の利用方法と藻類種の一例を示す．微細藻類の利用方法は，細胞バイオマスや細胞の代謝生成物を得るなどの物質生産による利用と，エネルギーや物質を変換するなどの細胞機能の利用に大別できる．また，用いられる細胞の種類は，細胞内の目的成分の含有量や培養の容易さなどによって決まるが，緑藻の *Chlorella, Scenedesmus, Dunaliella*，ラン藻の *Spirulina, Anabaena* を用いる例が多い．また現在も，細胞が生産する有用物質や特殊な

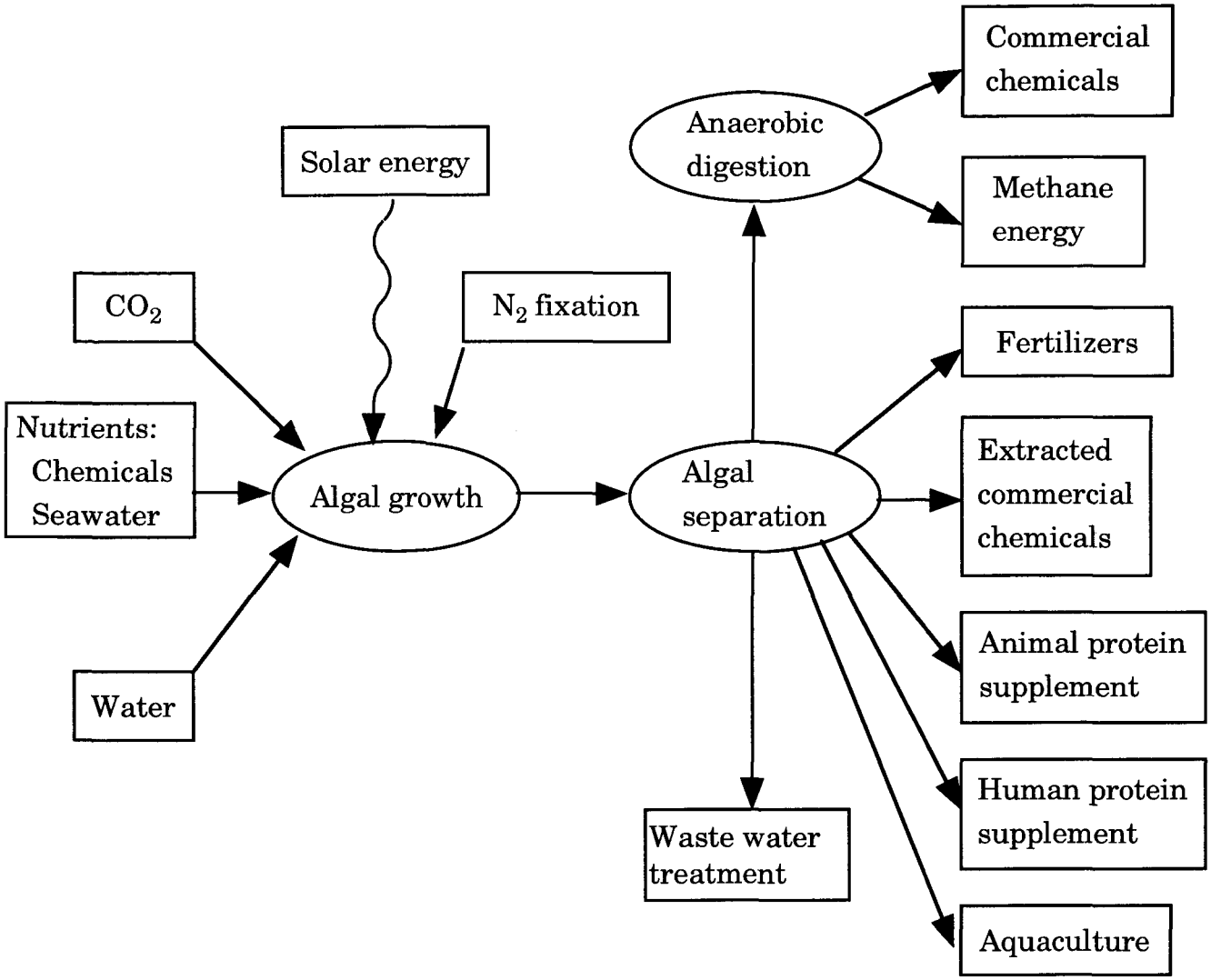


Fig. 3 Possible applications of algal mass cultures (Goldman, 1979)

Table 2 Examples for utilization of microalgal cells and products

	Algal strain	Stage of development*	Workers
1. Use of microalgal products			
Uses of microalgal biomass			
Feeds for poultry, pigs and ruminants	*Chlorella, Scenedesmus*	C	Becker (1988)
Feeds for fish, shrimp and bivalves	*Chlamydomonas, Tetraselmis, Spirulina*	C	Pauw and Persoone (1988)
Feeds for silkworm	*Chlorella*	R	Becker (1988)
Health foods	*Chlorella, Spirulina*	C	Kawaguchi (1986)
Fertilizer	*Anbaena*	C	Metting (1988)
Soil conditioner	*Chlamydomonas*	R	Metting (1988)
Uses of microalgal methabolites			
Isotopic compounds for diagnostics research	Various	C	Benemann (1990)
Natural pigments	*Spirulina, Dunaliella*	C	Meek (1990)
Biodegradable plastics	*Synechococcus*	R	Miyake and Asada (1996)
Viscosifiers	Red algae	R	Benemann (1990)
Plant growth regulators	Blue-green algae	R	Metting (1988)
2. Uses of microalgal functions			
Bioconversion of solar energy to liquid fuel	*Dunaliella*	R	Chen and Chi (1981)
Bioconversion of solar energy to gaseous fuel	*Tetraselmis*	R	Bonalberti and Croatto (1985)
Waste water treatment	Green algae	C	Oswald (1988)
CO_2 fixation	*Nannochloris*	R	Nishikawa *et al.* (1992)
Life-support system	*Chlorella*	R	Matsumoto *et al.* (1988)
Bioremediation	Various	R	Miyamoto (1995)
Heavy metal biosorption	Various	C	Benemann (1990)

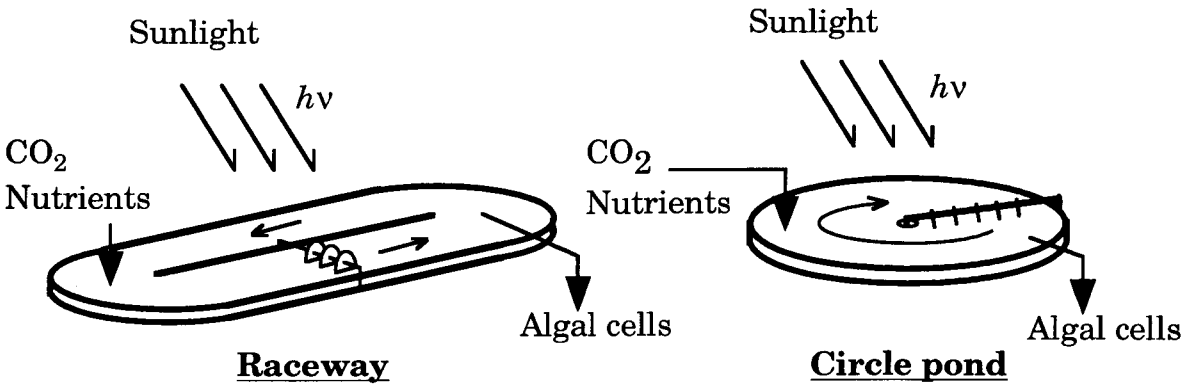
* C : commercialized; R : under research.

機能を指標として，新たな藻類の探索が進められている．

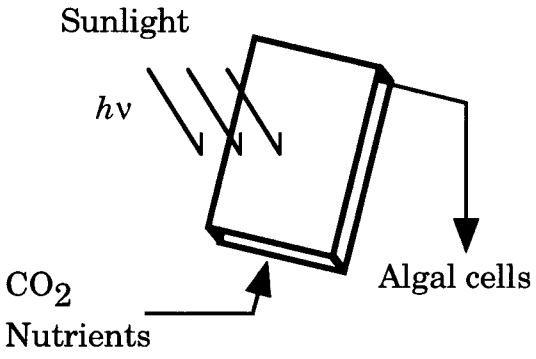
微細藻類細胞を利用するためには，培養による細胞生産が必要であるが，微細藻類細胞の増殖速度は，光を照射しない従属栄養条件よりも，光を照射した光独立栄養条件および光混合栄養条件の方が高い．したがって特殊な二次代謝産物を生産する場合を除いて，培養は光照射条件の下で行われるのが一般的である．また商業的な細胞生産においては，培養に要するコストは重要であり，光源としては太陽光を用いることになる．

Fig. 4 に，太陽光を利用して微細藻類を培養するための種々のバイオリアクターを図示する．オープンポンド型バイオリアクターは培養液の液面で太陽光を受光し，培養液中の細胞に直接照射するもので，培養液の撹拌方法によって，レースウエイ型と円形池型に大別される．この形式のバイオリアクターはすでに実用化され，表面積が 100 m^2 を超える大規模なものが，亜熱帯地方を中心とした世界各地で微細藻類細胞の商業生産に用いられている(Goldman, 1979).

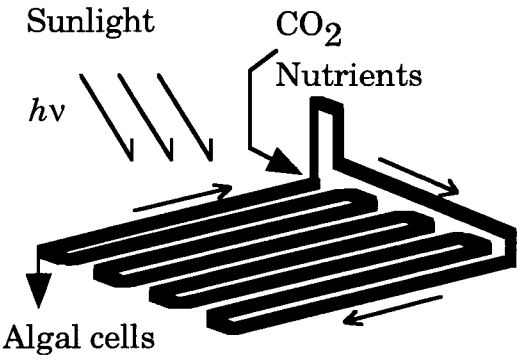
一方，外部環境と培養系を隔離するとともに光照射条件を改善したバイオリアクターが，いくつか提案されている．パネル型バイオリアクター(Tredici *et al.*, 1991)とチューブラー型バイオリアクター(Trozillo *et al.*, 1993)は，光透過性の素材で作られた受光面を用いて太陽光を直接受光するリアクターで，照射面に対する培養



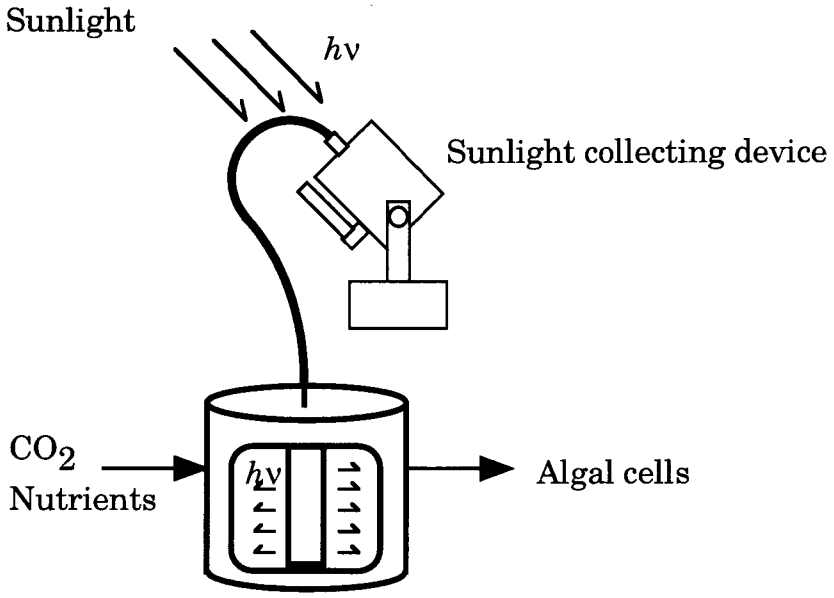
(a) Open-pond type photobioreactor



(b) Vertical alveolar panel photobioreactor



(c) Tubular photobioreactor



(d) Light-collecting type photobioreactor

Fig. 4 Schematic drawings of various photobioreactors using solar radiation

液深さを1～3cm程度として，培養体積あたりに照射される光エネルギー量を増やす工夫がされている．一方，照射光強度をはじめとした培養条件を厳密に制御するために，集光した太陽光を光ファイバーで伝送し，培養槽の内部から細胞に照射する方式の集光型バイオリアクターが提案されている(Mori, 1985; Matsunaga *et al.*, 1991; Adachi *et al.*, 1992; Nishikawa *et al.*, 1992)．この方式では，集光面積と照射面積の比および培養槽内の発光担体の配置を変えることによって培養液中の光強度分布の調節が可能なことや，集光部と培養槽を光ファイバーで結ぶことによって培養槽の設置場所に制約が少ないなどのメリットがある．

3．本研究の概要と意義

本研究では，太陽光をエネルギー源，二酸化炭素を炭素源とする光独立栄養条件下における，微細藻類の効率的な細胞生産プロセスについて検討した．細胞増殖速度と照射光強度の関係，およびバイオリアクター内の光強度分布の評価結果から細胞生産速度を計算し，効率的な培養条件を決定した．また，太陽光集光型バイオリアクターを試作し，その性能を確認するとともに，太陽光を用いた連続培養操作を行った．さらに，生産された細胞の食料，飼料としての有効利用について検討した．

第1章では，本研究で用いた微細藻類細胞，*Chlorella*

sp. UK001について，培地中の栄養塩類濃度，通気ガス中のCO_2濃度，O_2濃度および培養温度が細胞増殖に与える影響を検討し，増殖に適した培養条件を決定した．その結果，改変Closterium培地を用い，10% CO_2，3% O_2，87% N_2の組成のガスを通気し，温度30 °C，pH 5.7で懸濁培養することで，細胞は良好な増殖を示すことがわかった．

第2章では，照射光強度と細胞増殖速度の関係について検討した．第1章で決定した培養条件の下で入射光強度を変えて細胞を培養し，入射光強度と細胞の比増殖速度の関係を実験式として表わした．また，光の透過と吸収に関するLambert-Beerの法則に基づき，細胞懸濁液中での光強度を表わす式を導いた．さらに，*Chlorella* sp. UK001と形態および増殖特性が異なる細胞，*Spirulina platensis* IAM135についても，照射光強度と細胞の比増殖速度の関係を実験式として表わすとともに，*Chlorella*細胞と同様の方法で細胞懸濁液中の光強度分布を評価できることを確かめた．

第3章では，バイオリアクターを用いて微細藻類細胞の回分培養および連続培養を行った．そして，培養液中の光強度分布を考慮して細胞増殖を計算し，計算結果が培養データと一致することを示した．また，この計算方法が*Chlorella* sp. UK001，*S. platensis* IAM135いずれの細胞にも適用できることを確かめた．

第４章では，太陽光を用いた微細藻類の効率的な細胞生産を目的として，集光方法の異なる２種類の集光型バイオリアクターを試作し，光照射性能と細胞増殖特性を調べた．太陽光を光源として微細藻類細胞を培養する場合には，細胞に照射される光強度が時間とともに変化するが，第２章～第４章で得られた結果に基づき入射光強度に対して培地の流入速度を調節することで，安定した連続培養ができることを示した．

さらに第５章では，生産された微細藻類細胞の主要成分，アミノ酸組成，ビタミンの分析より，*Chlorella* sp. UK001 細胞が食料，飼料として有効であることを確かめた．

第1章 微細藻類細胞の増殖に対する培養条件の影響

1.1 緒言

微細藻類細胞の培養を行うためには，まず細胞増殖に適した培養条件を決める必要がある．細胞の増殖速度に影響を与える主な因子として，培地中の栄養塩類濃度，pH，培養温度，照射光強度，通気ガス中の CO_2 濃度，O_2 濃度などが考えられた．このうち細胞に照射される光強度は，培養系内で分布が生じることが予測されたが，その他の因子については大規模な培養系を除いて，培養系内での分布は無視できると考えた．そこで本章では，本研究で用いる微細藻類細胞の最適培養条件を決定するため，照射光強度以外の因子と細胞増殖速度との関係を明らかにした．

一方，種々の培養条件が微細藻類細胞に与える影響としては，細胞増殖の促進，抑制の他に，細胞形態や成分組成の変化も考えられる．そこで，培養条件と細胞形態，成分組成の関係についてもあわせて検討した．

1.2 実験

1.2.1 細胞と培養方法

(1) 細胞

本研究では，淡水由来の単細胞緑藻である *Chlorella* sp. UK001 を用いた．この細胞は，大分県内の温泉より

採取され，単離，無菌化されたもので(Murakami *et al.*, 1995)，(財)地球環境産業技術研究機構が保有する．系統分類上は，緑藻綱(Chlorophyceae) クロロコックム目(Chlorococcales) クロレラ科(Chlorellaceae)に属し，細胞の色素分析，電子顕微鏡を用いた形態観察およびrRNAの遺伝子解析により，*Chlorella sorokiniana* の近縁種であると考えられている．

微細藻類細胞の懸濁培養では，培養容器表面への付着，細胞相互の凝集による沈降，培養液の発泡などがしばしば起こり，安定した培養が難しい．本研究で用いた *Chlorella* sp. UK001 は，通常の培養条件では培養容器表面への付着はほとんどなく，培養液中で良好に分散状態を維持するため，少ない通気撹拌で培養系を完全混合状態に保つことができた．また，ガスを培養液中に通気した場合でも，培養液の発泡もほとんど起こらない．さらに，光独立栄養条件下で高い増殖速度を示すことから，ガスの通気を伴うバイオリアクターを用いた細胞の懸濁培養に適していると考えた．**Fig. 1.1** に，この細胞の光学顕微鏡写真を示す．

細胞の増殖は，個体細胞1個がそのまま1個の単細胞性の生殖器官になり，その中に運動性のない8個の自生胞子(Autospore)を作った．そして，母細胞が破れて放出された自生胞子が発芽し再び個体細胞になる *Chlorella* 属に特徴的な生活環を示した．**Fig. 1.2** に，*Chlorella* 属

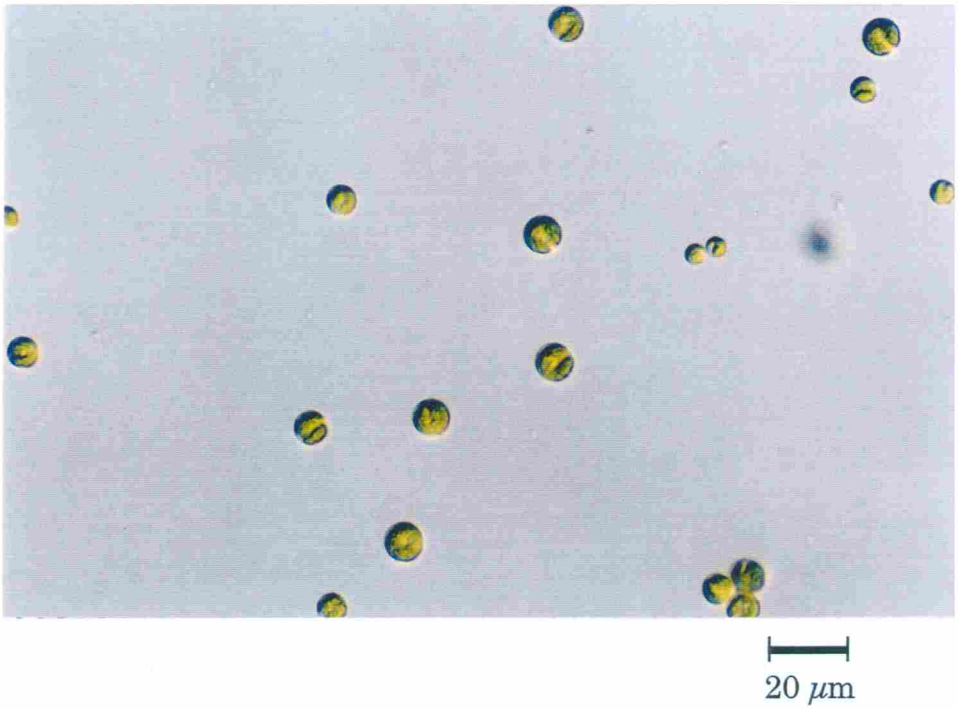
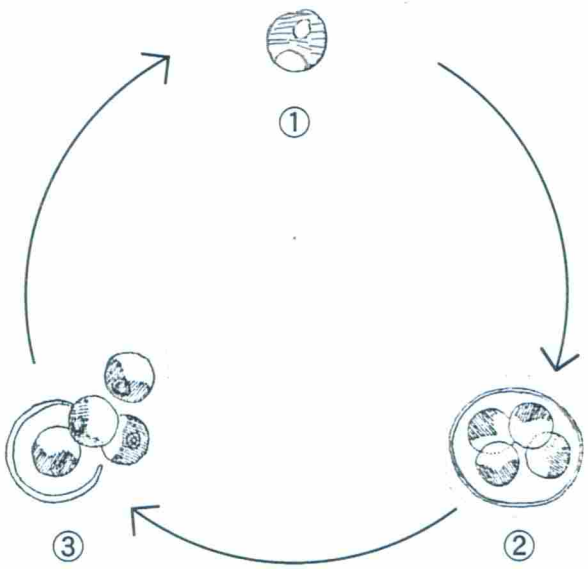


Fig. 1.1 Microscopic photograph of *Chlorella* sp. UK001



① individual cell, ② autospore, ③ release of autoapores

Fig. 1.2 Life cycle of microalga in *Chlorella* sp.
(Modified, Hirose, 1972)

微細藻類の生活環の概念図を示す(Hirose, 1972).

(2) 培地

この細胞の光独立栄養培養には,改変 Closterium 培地(pH 5.7)を用いた. これは, *Chlorella* 属微細藻類細胞の培養によく用いられる Closterium 培地(Ichimura, 1971)中のリン源を,有機化合物であるβ-グリセロリン酸から無機化合物である KH_2PO_4 に置き換えたものである. **Table 1.1** に, 改変 Closteruim 培地の組成を示す. 培地の pH は, 1mol dm^{-3} の HCl または NaOH を用いて所定の値に調整した. なお, 培地はイオン交換した水道水を用いて調製し, オートクレーブで 121 °C で 15 分間滅菌したのち, 培養に用いた.

(3) 培養方法

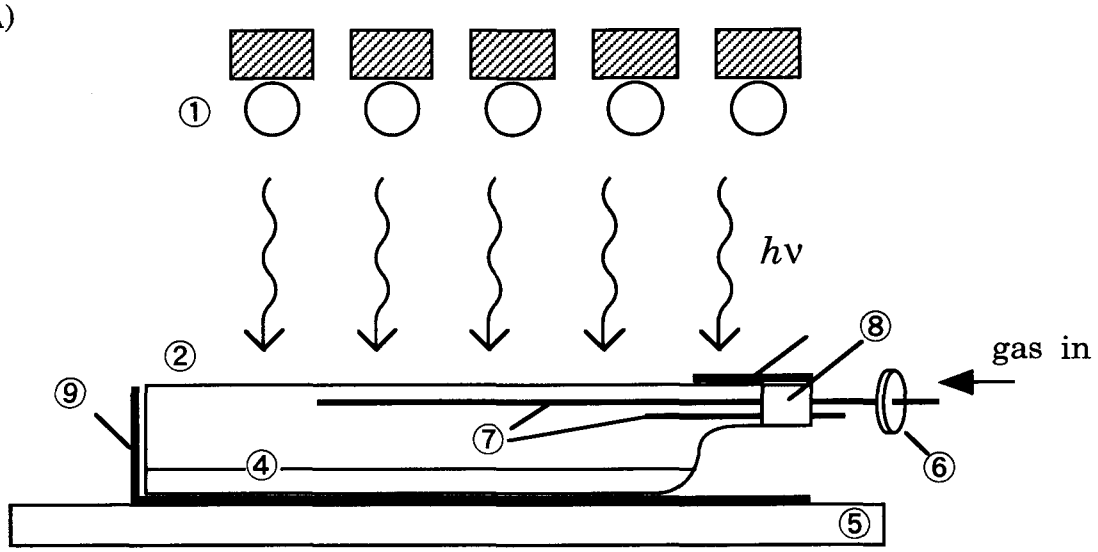
この細胞の増殖に適した培養条件を決定するため, 光独立栄養条件下で回分培養を行った.培養には容量 1 dm^3 のガラス製の Roux フラスコ, または容量 1.8 dm^3 のガラス製の Spinner フラスコを用いた. **Fig. 1.3** に培養装置の概略図を示す.

Roux フラスコを用いた培養では, 改変 Closterium 培地 0.2 dm^3 をロータリーシェイカー上に水平に置いた Roux フラスコに入れ, 50 r.p.m.の速度で撹拌した. このとき培地の深さは約 10 mm であった. 滅菌フィルター

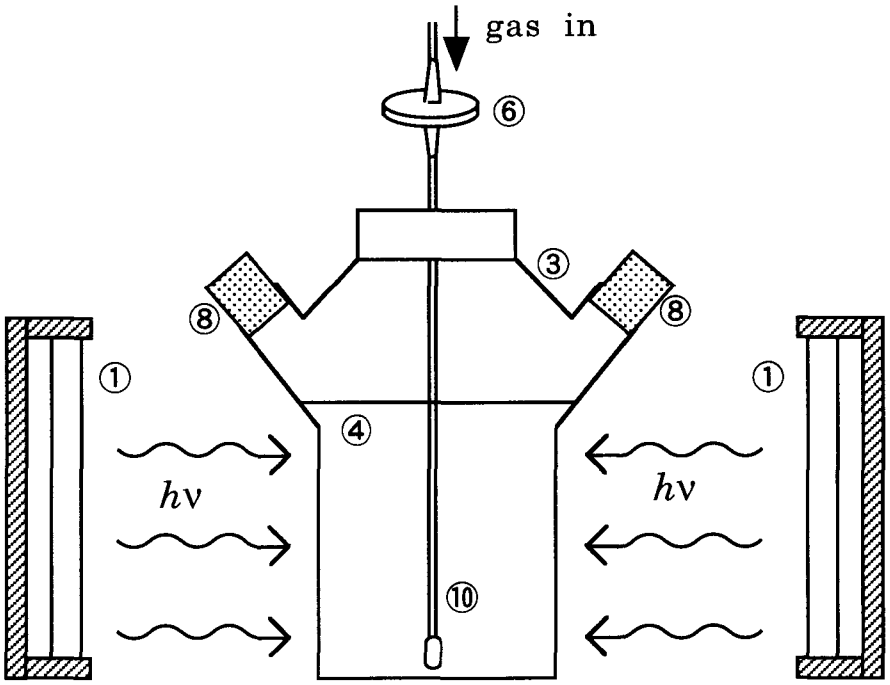
Table 1.1 Composition of modified Closterium medium

$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	150	g
KNO_3	100	g
KH_2PO_4	40	g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	40	g
Vitamine B_{12}	0.0001	g
Biotin	0.0001	g
Thiamine · HCl	0.01	g
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0.588	g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.108	g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.066	g
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.012	g
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.0075	g
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	3.0	g
H_2O	1.0	dm^3

(A)



(B)



① light source ② Roux flask, ③ Spinner flask, ④ medium,
⑤ rotary shaker, ⑥ sterilized filter, ⑦ needle of stainless steel,
⑧ silicon plug, ⑨ black paper, ⑩ sparging tube

Fig. 1.3 Schematic drawings of apparatuses for batch cultures of *Chlorella* sp. UK001
(A) Roux flask, (B) Spinner flask

(孔径:0.2μm, Corning Glass Works 製)を通した CO_2 を含む混合ガスを，0.25 $dm^3\ min^{-1}$ の一定流速で培地表面に通気した．そして，フラスコの上方向から15W白色蛍光灯(FL15SW，松下電器産業製)または500Wキセノンランプ(UXL-500-O，ウシオ電機製)の光を連続照射した．入射光強度は，ランプの種類，数と位置を変えることによって調節した．Rouxフラスコ表面の光照射面積は178 cm^2 であり，照射面以外は光の透過と反射を防ぐために黒色紙で覆った．そして，一定温度に保持されたチャンバー内で回分培養を行った．

Spinnerフラスコを用いた培養は，改変Closterium培地 1.5 dm^3 をSpinnerフラスコ(120 φ mm)に入れ，培地中に挿入した焼結ガラス製通気管より，滅菌フィルターを通した混合ガスを 0.5 $dm^3\ min^{-1}$ の一定流速で送入した．そして，フラスコの周囲から白色蛍光灯(FL40SSW，松下電器産業製)の光を連続照射し，一定温度に保持されたチャンバー内で培養を行った．

細胞の前培養は，改変Closterium培地 0.75 dm^3 を容量 1 dm^3 のガラス製Duranびん(90 φ mm)に入れ，温度30°C，照射光強度25 $W\ m^{-2}$ の下で，混合ガス(CO_2 : O_2 : N_2 = 10 : 3: 87 (体積比))を 0.5 $dm^3\ min^{-1}$ の一定流速で通気して，72～96時間，無菌的に行った．この細胞懸濁液を培地中の初期細胞濃度が 0.01 $kg\ m^{-3}$ となるように添加して，回分培養を開始した．なお，培地中の栄養塩

類濃度の影響を調べる実験では，前培養液からの栄養塩類の持ち込みを防ぐため，細胞懸濁液を無菌的に遠心分離して得た細胞を，一白金耳，新鮮培地に添加して，回分培養を開始した．

1.2.2 分析方法

(1) 細胞増殖量

細胞増殖量は，細胞濃度X，細胞数N_c，細胞ホールドアップε_cのいずれかを用いて表わした．細胞濃度Xの測定では，液量既知の培養液をガラス繊維濾紙(GC-50，東洋濾紙製)に通し，濾紙上に捕捉された細胞をさらに蒸留水で洗浄した．そして，細胞と濾紙を105°Cで約12時間乾燥させ，デシケーター内で放冷後，濾紙の重量を測定した．風袋重量との差から求めた培養液単位体積当たりの乾燥細胞重量濃度を細胞濃度とした．また，場合によっては，培養液の680 nmにおける吸光度ODを分光光度計(UV-160A，島津製作所製)で測定し，あらかじめ求めたXとODとの相関関係からXの値を求めた．培養液単位体積当たりの細胞数は，Thoma血球計算盤を用いて光学顕微鏡下で細胞懸濁液中の細胞数を3回以上計数し，その算術平均を用いた．

細胞ホールドアップε_cは，細胞が球形であると見なして，別に求めた平均細胞径$\overline{d_c}$の値より細胞1個当たりの平

均体積$\overline{V_c}$($=\pi\cdot\left(\overline{d_c}\right)^3/6$)を求め，培養液単位体積当たりの細胞数$N_c$の値を用いて，(1.1)式により求めた．

$$\varepsilon_c = \overline{V_c}\cdot N_c \qquad (1.1)$$

なお，上の式により計算されるε_cの値の相対誤差は，45%以内であった．

細胞の増殖を表わす指標として，細胞濃度Xと培養時間tより次の式で定義される比増殖速度μを用いた．

$$\mu = \frac{1}{X}\cdot\frac{dX}{dt} \qquad (1.2)$$

μの値は，細胞の回分培養における対数増殖期のXの測定結果より求めた．

細胞径の測定は，光学顕微鏡写真上の30個以上の細胞について直径を測定し，その算術平均から平均細胞径$\overline{d_c}$と標準偏差SDを求めた．また，細胞径の分布を調べる実験では，220個の細胞について直径を測定した．

(2) 培地中のイオン濃度，溶存酸素濃度

培地中のNO_3^-, PO_4^{3-}, SO_4^{2-}, Cl^-, Na^+, NH_4^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}の濃度の測定には，イオンクロマトグラフ(IC-10型，島津製作所製)を用いた．無菌的に採取した培養液約1 cm^3をフィルター(細孔径:0.45μm, 13-AI, 倉敷紡績製)で濾過し，濾液を分析試料とした．陰イオンの分析条件は，カラム:Shim-pack IC-A3，移動相:8.0 mmol dm^{-3} p-

ヒドロキシ安息香酸，3.2 mmol dm^{-3} Bis-Tris，流量:1.2 cm^3 min^{-1}，温度:40°C，陽イオンの分析条件は，カラム:Shim-pack IC-C3，移動相:2.5 mmol dm^{-3} しゅう酸，流量:1.0 cm^3 min^{-1}，温度:40°C で，いずれの場合も電気伝導度検出器を用いた．

培地中の溶存酸素濃度は，溶存酸素濃度計(DO-25A，東亜電波工業製)のセンサーを培養液中に固定して測定した．

(3) 細胞成分

細胞の元素組成は，次に示す方法によって分析した．培養液を遠心分離(12,000×g, 4° C, 15 min)することにより回収し蒸留水で洗浄した細胞を温度 50°C で 48 時間以上乾燥し，さらに乳鉢と乳棒で粉砕したものを試料とした．試料約 2 mg を全自動元素組成分析装置(EA1108 型，Fisons 製)を用いて分析し，乾燥細胞重量あたりの炭素，水素，窒素，イオウ，酸素の比率で表わした．また，イオウおよびリンの含量は，同じ試料を全自動イオウ定量分析装置(AP2 型，吉田科学機械製)を用いて測定した．

細胞中の糖質，タンパク質の定量分析には，回収した細胞を蒸留水に再懸濁させたものを試料として用いた．細胞濃度既知の細胞懸濁液 25 cm^3 をフレンチプレス(5501-M 型，大岳製作所製)のセルに入れ，操作圧力 98 MPa の下で細胞を破砕した．糖質の定量分析は，この細

胞破砕液を用いて，フェノール硫酸法(Fukui, 1969)により行った．タンパク量は，上記細胞破砕液を 1 mol dm^{-3} の NaOH 水溶液中，100°C で 5 分間加熱してタンパク質を可溶化した後，Lowry 法(Lowry *et al.*, 1951)に従って分析した．

細胞中のクロロフィル量は，細胞をガラス繊維濾紙(GC-50，東洋濾紙製)上に捕集し，これを蒸留水で洗浄した後，4 °C の 90%メタノールを加え，乳鉢，乳棒で，濾紙とともにペースト状に擦りつぶした．これを室温で遠心分離(2,000 r.p.m., 10 min)し，上清を分液漏斗に移した．エーテルを加えてクロロフィルを抽出した後，エーテル層を水で洗浄した．分光光度計(UV-160A，島津製作所製)を用い 642.5nm および 660nm におけるエーテル層の吸光度 $OD_{642.5}$, OD_{660} を測定し，次の式から分析試料中のクロロフィル a および b の濃度を計算した(Omata and Murata, 1981).

$$\text{Chlorophyll a [mg dm}^{-3}] = 9.93\ OD_{660} - 0.78\ OD_{642.5} \qquad (1.3)$$

$$\text{Chlorophyll b [mg dm}^{-3}] = 17.60\ OD_{642.5} - 2.81\ OD_{660} \qquad (1.4)$$

(4) 細胞の生存率，O_2 発生速度および O_2 消費速度

所定の温度において 96 時間培養した細胞を無菌的に遠心分離(8,000 r.p.m., 4 °C, 20 min)し，洗浄後，新鮮培地に再懸濁したものを試料として用いた．細胞の生存率を求めるため，滅菌水にて適宜希釈した細胞懸濁液 0.5

cm^3をシャーレー中の2%寒天を含む改変 Closterium 培地上に播種した．シャーレの上方向から白色蛍光灯を照射し，培養温度30°C，空気雰囲気下にて5～7日間培養した．このとき，シャーレ表面における入射光強度は30 W m^{-2}とした．播種した細胞懸濁液中の細胞数に対する寒天培地上に生成したコロニー数の比より，細胞の生存率を計算した．

O_2発生速度およびO_2消費速度は，以下の手順で測定した．30°Cの恒温室において，細胞懸濁液0.25 dm^3を容量0.3 dm^3のガラスびんに入れ，ここへ溶存酸素電極(OE-2101，東亜電波工業製)を挿入した．マグネティックスターラーで撹拌しながら，10 vol% CO_2を含むN_2ガスを通気して，細胞懸濁液中の溶存酸素濃度をほぼゼロとした．次にガスの通気を止め，びんの内部に気相が残らないように密封した後，びん表面での入射光強度が26 W m^{-2}となるように，びんの周囲から40W白色蛍光灯(FL40SW，松下電器産業製)を照射した．細胞懸濁液中の溶存酸素濃度の増加を経時的に測定し，細胞のO_2発生速度を求めた．次にびんを遮光し，同様に溶存酸素濃度の減少を経時的に測定し，細胞のO_2消費速度を求めた．

(5) 照射光強度

培養系に照射される光強度は，光合成に有効な400～

700 nm の光を検出する光量子センサー(LI-190SB, LI-COR 製)を用いて測定した．培養装置の光照射面の内側数カ所で光強度を測定し，その平均値を培養実験における入射光強度とした．なお，白色蛍光灯の場合には 1 μE m^{-2} s^{-1} = 0.223 W m^{-2}，キセノンランプの場合には 1 μE m^{-2} s^{-1} = 0.216 W m^{-2} の関係を用いて光量子センサーによる測定値を換算し，光合成有効放射の値として表わした(Kou *et al.*, 1981).

1.2.3 細胞懸濁液の沈降実験

所定温度にて 96 時間培養した細胞を遠心分離(8,000 r.p.m., 4°C, 15 min)によって回収し，これを蒸留水で洗浄後，細胞のホールドアップ ε_c の値が約 0.01 となるように蒸留水に再懸濁したものを用いた．試料 84 cm^3 (液高さ:150 mm)をガラス製試験管(15φ×200 mm)に入れて温度 20°C で静置し，一定時間ごとに白色紙を背景として写真を撮影した．得られた写真をイメージスキャナー(Scan Jet 4c, Hewlett Packard 製)でコンピューターに読み取り，デジタル変換してグレースケールで表わした．試験管に試料を入れた直後で，細胞が完全に懸濁している状態の値を 1，蒸留水を入れたときの値を 0 と数値化し，この値が 0.5 となる垂直方向の位置を細胞懸濁液の見かけの沈降界面とした．沈降距離 L_s は，液高さと見かけの沈降界面の差より求めた．細胞懸濁液の粘度 η_m は，

Ostward粘度計(相互理化学硝子製作所製)を用い，20 °Cにて求めた．また，細胞懸濁液の密度ρ_mは，ピクノメーター(相互理化学硝子製作所製)を用い，20°Cにおける測定結果から求めた．

1.3 結果と考察

1.3.1 *Chlorella* sp. UK001の細胞増殖に対する培地成分の影響

改変Closterium培地を用い，Spinnerフラスコ中で，培養温度T = 30 °C, pH = 5.7, 入射光強度I_0 = 71.4 W m^{-2}の条件の下で，*Chlorella*細胞の回分培養を行った．**Fig. 1.4**に細胞濃度Xの経時変化，**Table 1.2**に培養0時間と123時間における培地中の主なイオン濃度の分析結果を示す．

Xの値は時間とともに増加し，培養時間t = 123 hにおいてX = 0.84 kg m^{-3}となった．Fig. 1.4より，t = 69～97 hがこの回分培養における直線増殖期と考えられ，この間の平均増殖速度は1.3×10^{-2} kg m^{-3} h^{-1}と計算された．t = 123 hでは，培地中のNO_3^-, PO_4^{3-}, SO_4^{2-}, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}の濃度が減少し，このうち，NO_3^-, PO_4^{3-}は培地中の濃度がゼロであった．培地の栄養成分のうち，NO_3^-およびSO_4^{2-}は細胞のタンパク質を合成するための成分，NO_3^-およびPO_4^{3-}は核酸を合成するための成分である．また，Mg^{2+}は光合成色素であるクロロフィルの構成成分

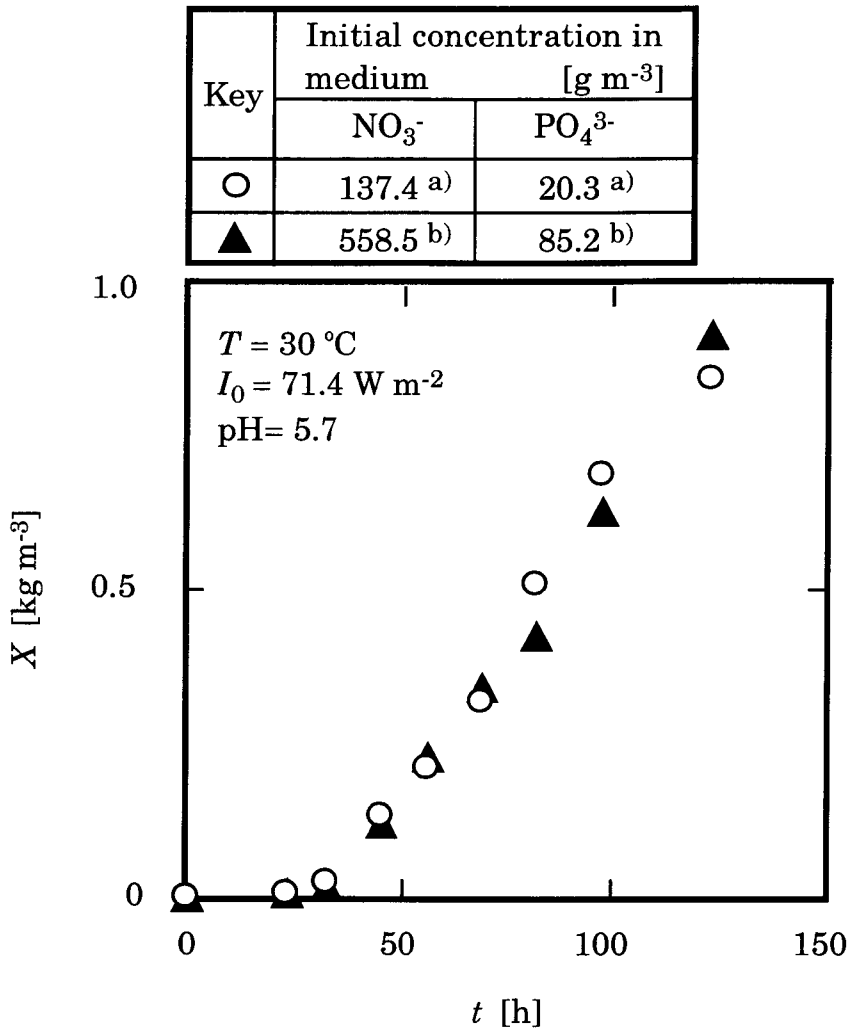


Fig. 1.4 Time courses of cell concentration in batch culture of *Chlorella* sp. UK001

a) Modified Closterium medium,

b) NO_3^- and PO_4^{3-}-enriched medium

Table 1.2 Changes in concentrations of ions in batch culture of *Chlorella* sp. UK001

t [h]	Concentrations of ions [g m^{-3}]								
	NO_3^-	PO_4^{3-}	SO_4^{2-}	Cl^-	Na^+	K^+	NH_4^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}
0	137.4	20.3	15.1	131.3	99.2	47.8	0	2.8	28.4
123	0	0	0.2	137.7	106.1	44.2	0	1.7	25.1

である．この結果から，改変 Closterim 培地中の主な栄養塩類のうち，NO_3^-, PO_4^{3-}濃度が細胞の増殖速度を制限している可能性が考えられた．そこで改変 Closterium 培地中のNO_3^-およびPO_4^{3-}濃度を 4 倍にした培地を調製し，Fig. 1.4 に示した培養と同じ条件の下で，細胞の回分培養を行った．Xの値の経時変化を Fig. 1.4 にあわせて示す．NO_3^-およびPO_4^{3-}濃度を 4 倍にした培地を用いた場合も，改変 Closterium 培地を用いた場合とほぼ同様に増殖した．このことから，Fig. 1.4 に示した細胞濃度範囲である 0～0.8 kg m^{-3}では，改変 Closterium 培地中のNO_3^-, PO_4^{3-}濃度は細胞増殖に対する制限因子となっていないことがわかった．このことから，*Chlorella* sp. UK001 の培養には改変 Closterium 培地を用いることにした．

次に，改変 Closterium 培地の pH が，細胞増殖に与える影響を調べた．Roux フラスコを用い，T = 30 °C，I_0 = 71.4 W m^{-2}の条件の下で，*Chlorella* 細胞の回分培養を行った．**Fig. 1.5** に，培地 pH と細胞の比増殖速度 μ の関係を示す．pH = 5.7 のとき，μ = 0.20 h^{-1}で μ の値は最大となった．pH が 5.7 より低い場合，高い場合とも，μ の値は減少し，pH = 3 および 9 においては，細胞は増殖しなかった．このことから，この細胞の培養は，pH = 5.7 で行うのが適当と考えられた．

微細藻類は，淡水，海水のいずれにも存在し，種によ

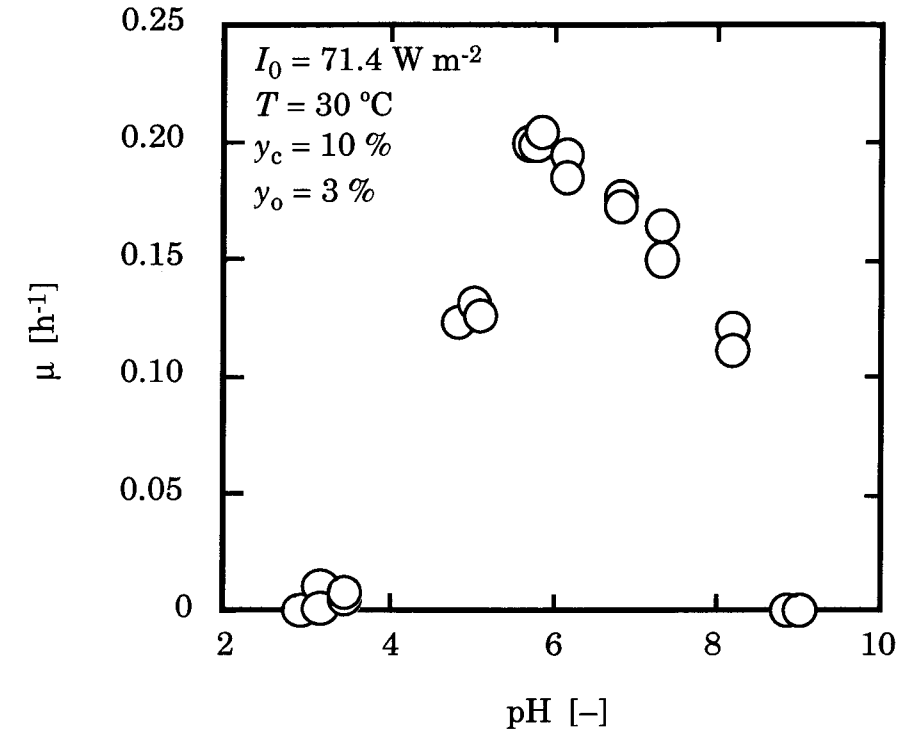


Fig. 1.5 Effect of pH on specific growth rate of *Chlorella* sp. UK001

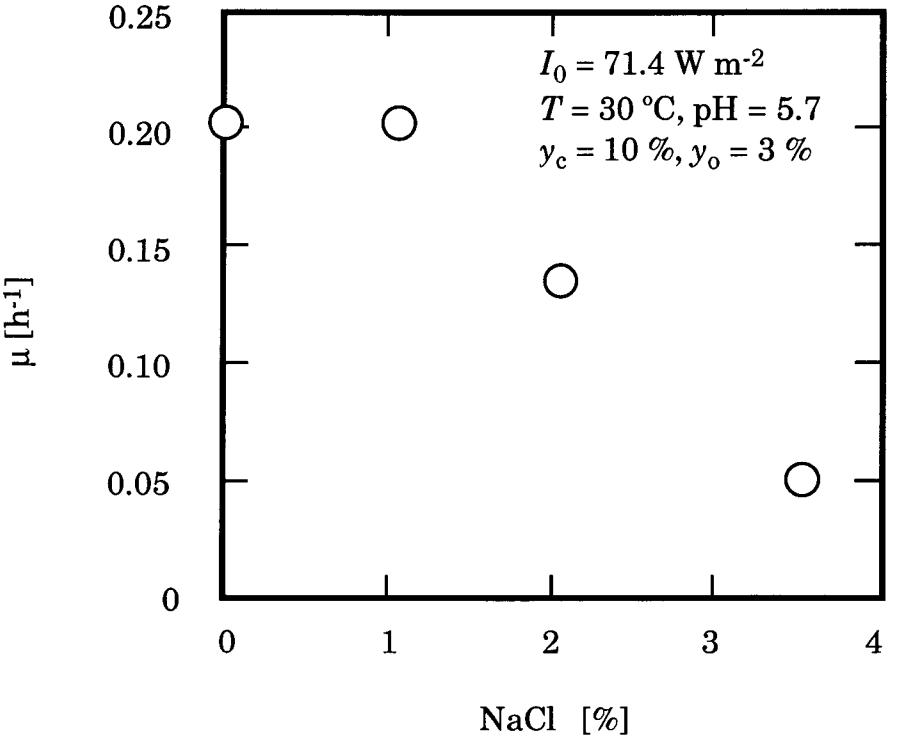


Fig. 1.6 Effect of NaCl concentration on specific growth rate of *Chlorella* sp. UK001

って，細胞増殖に適したNaCl濃度が異なる．そこで，改変Closterium培地にNaClを添加し，$I_0 = 71.4\ W\ m^{-2}$，$T = 30\ °C$，pH = 5.7のとき，培地中のNaCl濃度が細胞増殖に与える影響を検討した．**Fig. 1.6**に，培地中のNaCl濃度と細胞の比増殖速度μとの関係を示す．NaCl濃度が0 %および1 %のときμ = 0.20 h^{-1}であったが，NaCl濃度が2 %以上ではμの値が下がり，3.5 %ではμ = 0.05 h^{-1}となった．この結果より，この細胞は海水中でも増殖可能であるが，NaCl濃度が0～1 %のとき高い増殖速度を示すことがわかった．

1.3.2 *Chlorella* sp. UK001の細胞増殖に対するCO_2，O_2濃度の影響

微細藻類の光独立栄養培養では，炭素源としてCO_2が用いられる．空気中に含まれるCO_2は培地表面から溶解するが，これだけでは細胞増殖に必要な炭素源を供給できないため，微細藻類の光独立栄養培養ではCO_2を含んだガスを通気して行われる．そこで，*Chlorella* sp. UK001の細胞増殖に対する通気ガス中のCO_2濃度の影響を調べた．Rouxフラスコを用い，$I_0 = 71.4\ W\ m^{-2}$，$T = 30\ °C$，pH =5.7の下で細胞の回分培養を行った．培養には，CO_2，O_2，N_2の混合ガスを用い，O_2濃度は，LNG燃焼ボイラーの排ガス中の濃度とほぼ同じ3 %とした．そしてCO_2とN_2の比を変えることで，異なるCO_2濃度の混合ガス

を調製した．また，細胞の増殖は，対数増殖期における比増殖速度μで表わした．

Fig. 1.7 に，通気ガス中の CO_2 濃度 y_c と細胞の比増殖速度μの関係を示す．y_c = 5～10 %のとき，μの値は 0.20 h^{-1} でほぼ一定となった．y_c = 0.03～2 %においては，μの値はやや低下し，μ = 0.15 h^{-1} となった．また，y_c = 0 %のときは，細胞は増殖しなかった．この結果より，この細胞では，通気ガス中の CO_2 濃度が 5～10 %のとき，良好な増殖を示すことがわかった．なお，y_c = 15～30 %のときμの値は低下したが，このとき培地の pH が 5.7 より低くなったことから，μの値の低下が CO_2 濃度の影響によるものか pH の影響によるものかは判断できなかった．

微細藻類細胞の光合成反応では，反応生成物である O_2 が光合成系の key enzyme である Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase を阻害することによって，反応速度を低下させることが知られている(Aiba, 1982)．光独立栄養培養では，光合成反応により細胞増殖に必要なエネルギーを得ているため，培地中の O_2 濃度の増加が細胞増殖を阻害することが予想された．そこで，*Chlorella* sp. UK001 の細胞増殖に対する通気ガス中の O_2 濃度および培地中の溶存 O_2 濃度の影響を調べた．Spinner フラスコを用い，I_0 = 71.4 W m^{-2}，T = 30 °C，pH =5.7 の下で CO_2, O_2, N_2 の混合ガスを培地中の散気管より通気して，細胞の回分培養を行った．混合ガス中の

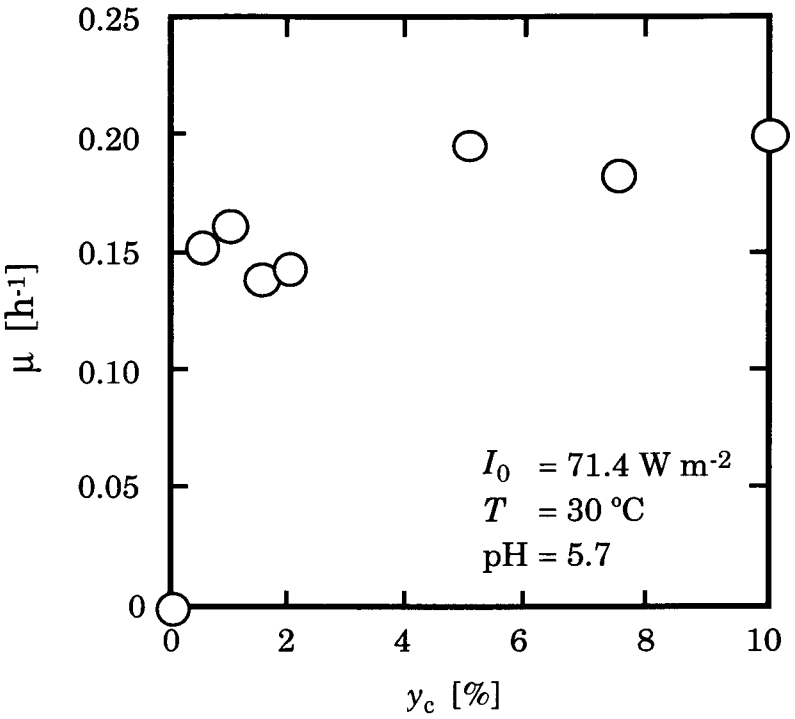


Fig. 1.7 Effect of carbon dioxide concentration in supplying gas on specific growth rate of *Chlorella* sp. UK001

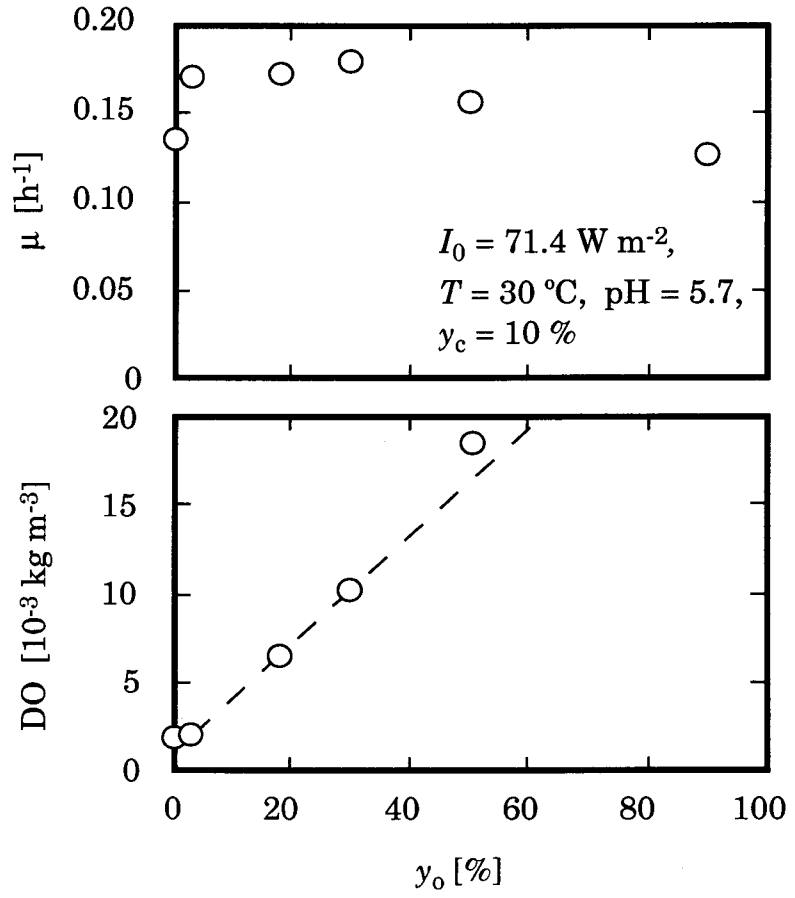


Fig. 1.8 Effect of oxygen concentration in supplying gas on specific growth rate of *Chlorella* sp. UK001

CO_2濃度は，Fig. 1.7 に示した実験の結果，高い比増殖速度が得られた10%とし，O_2とN_2の混合比を変えた．なお，CO_2濃度10%は，LNG燃焼ボイラーの排ガス中のCO_2濃度とほぼ同じである．

Fig. 1.8 に通気ガス中のO_2濃度y_oと細胞の比増殖速度μの関係，およびy_o値に対する培地中の溶存O_2濃度DOの測定値を示す．y_o = 3～30 %のときμは最も高い値を示し，y_o = 0, 50, 90 %においてはμの値はやや下がった．一方，培地中の溶存O_2濃度の測定から，y_o = 50%のとき 20°C の蒸留水における飽和 DO 値である 18 g m^{-3}を超えることがわかった.この結果から,*Chlorella* sp. UK001 細胞の増殖は通気ガス中のO_2濃度に大きく影響されないものの，溶存O_2濃度がゼロの場合および 18 g m^{-3}を超える場合には，細胞増殖がやや抑制されることがわかった．

1.3.3 *Chlorella* sp. UK001の細胞増殖に対する培養温度の影響

改変 Closterium 培地を用いた回分培養で，I_0 = 71.4 W m^{-2}, pH = 5.7, y_c = 10 %, y_o = 3 %のとき，培養温度が*Chlorella* sp. UK001 の増殖に与える影響を調べた．**Fig. 1.9** に，培養温度Tと比増殖速度μの関係を示す．μの値はTの値に依存して変化し，T = 30°C のとき μ = 0.20 h^{-1}となり，最大値が得られた．T= 10 °C では μ = 0.015 h^{-1}

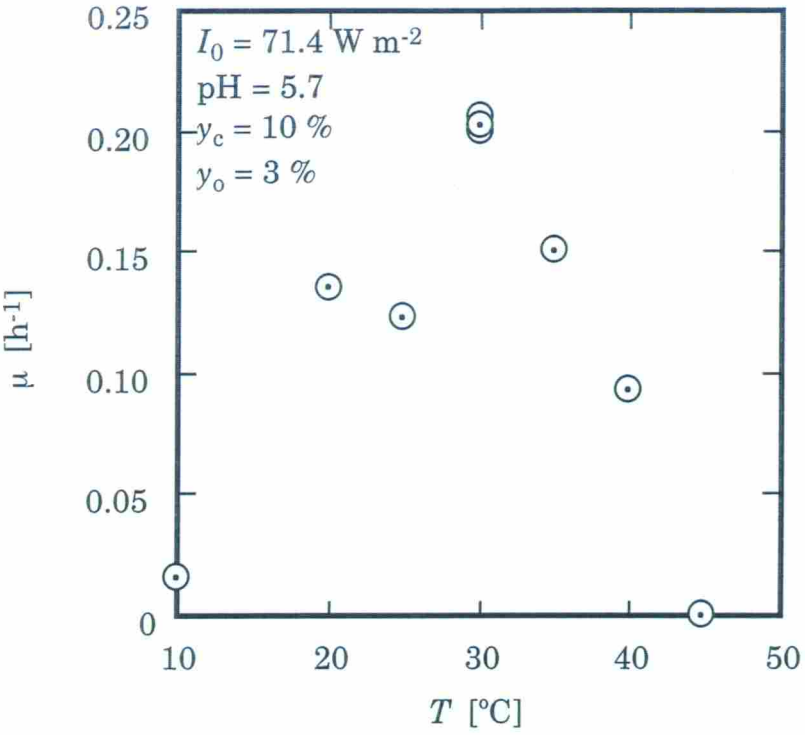


Fig. 1.9 Effect of culture temperature on specific growth rate of *Chlorella* sp. UK001

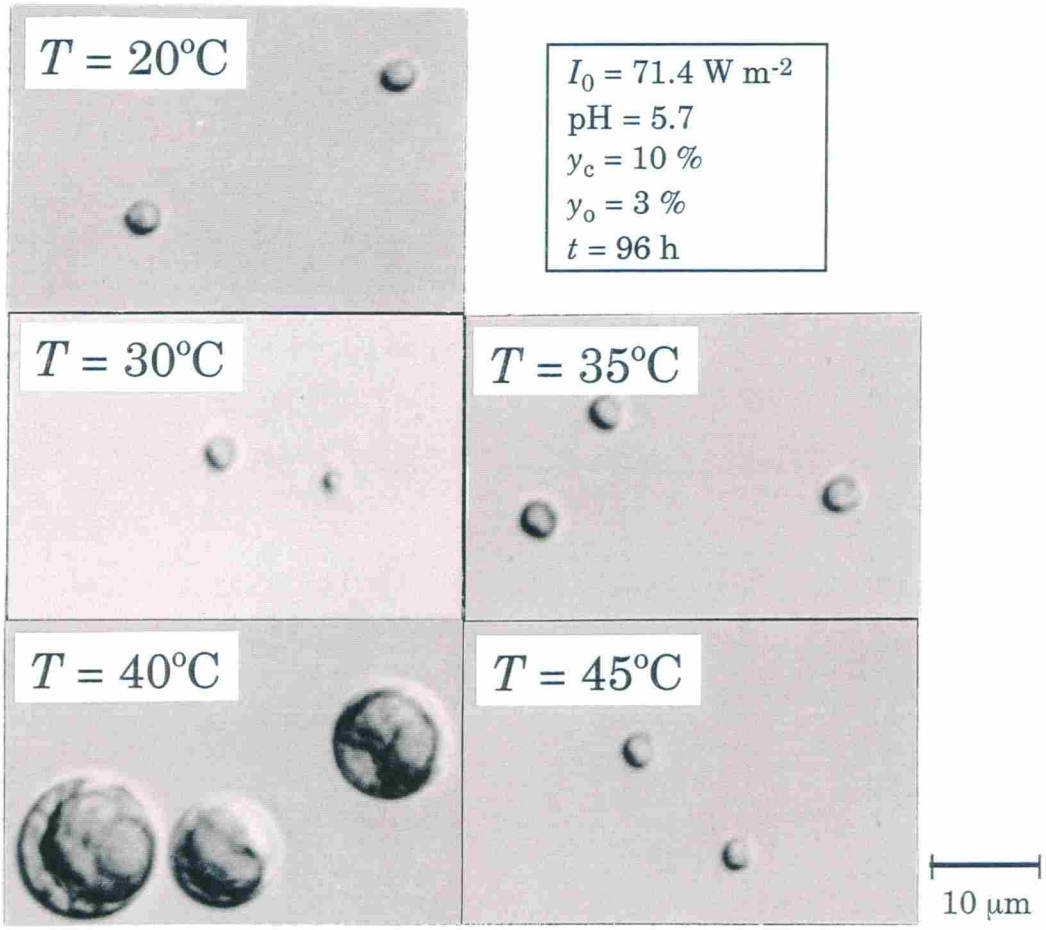


Fig. 1.10 Microscopic photographs of *Chlorella* sp. UK001 cultivated at various temperature

となり，μの値は下がった．一方，T = 40 °C では μ = 0.09 h^{-1} となり，細胞は増殖したが，T = 45 °C のときは細胞増殖は認められなかった．

培養で得られた細胞懸濁液を静置したところ，T = 40 °C で培養された細胞は，他の培養温度で得られた細胞と分散性に違いがあり，細胞が沈降しやすいことがわかった．その原因として，細胞形態が変化していることが考えられたので，種々の温度条件下で培養された細胞について，細胞形態を詳細に検討した．

Fig. 1.10に，T = 20, 30, 35, 40, 45°Cで，それぞれ96時間培養された*Chlorella* sp. UK001細胞の光学顕微鏡写真を示す．T = 40°Cのとき，他の培養温度の場合と比較して細胞径が増大していることがわかった．そこで，それぞれの細胞懸濁液について，培養液当たりの細胞数N_cと平均細胞径$\overline{d_c}$を調べた．**Fig. 1.11**に，培養温度Tと$\overline{d_c}$およびN_cの関係を示す．培養0時間における平均細胞径$\overline{d_c^0}$が2.3 μm (標準偏差SD = 0.36 μm)であったのに対して，T = 40°Cの場合には$\overline{d_c}$ = 11 μm (SD = 1.9 μm)となり，4.8倍に増大した．これに対して，T = 20, 30, 35, 45°Cにおいては，$\overline{d_c}$の値が，ぞれぞれ2.9 μm (SD = 0.38 μm), 2.3 μm (SD = 0.38 μm), 2.3 μm (SD = 0.28 μm), 3.0 μm (SD = 0.49 μm)となり，$\overline{d_c^0}$の値とほとんど変わらなかった．一方，細胞数については，T = 20, 30, 35 °Cに

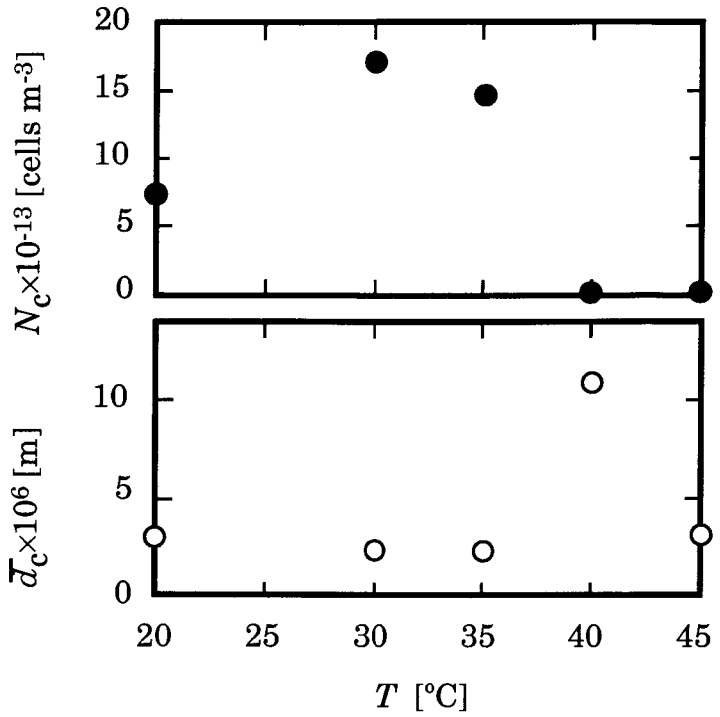


Fig. 1.11 Effect of culture temperature on number and mean diameter of cells obtained in batch cultures of *Chlorella* sp. UK001
I_0 = 21.8 W m^{-2}, $\bar{d}_c^0$ = 2.3 μm (SD = 0.36 μm),
N_c^0 = 2.0×10^{12} cells m^{-3}, t = 96 h

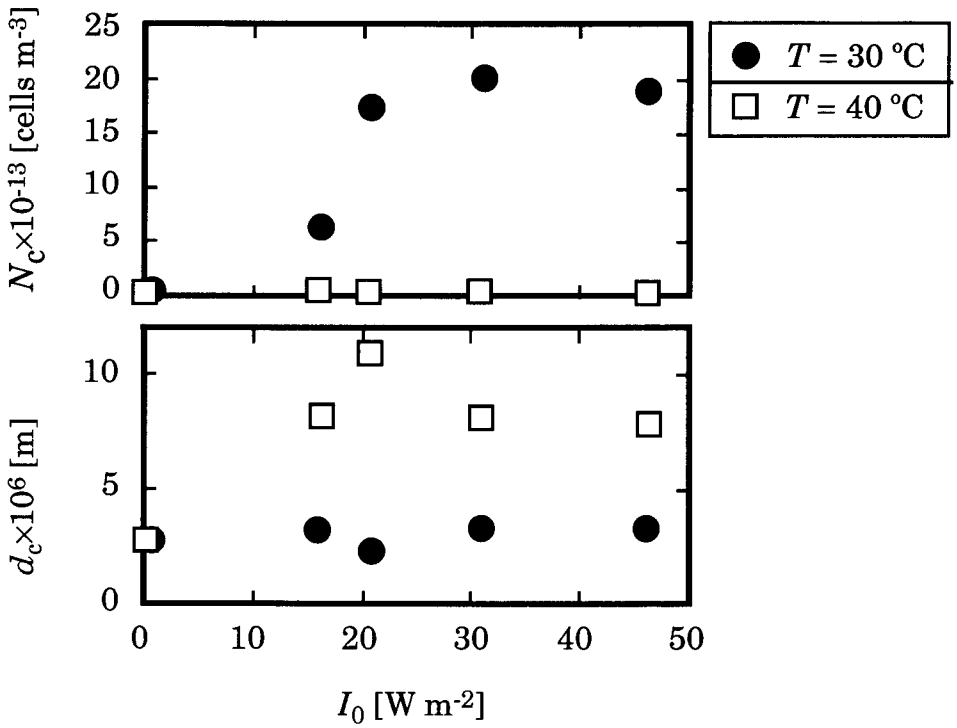


Fig. 1.12 Effect of incident light intensity on number and mean diameter of cells obtained in batch cultures of *Chlorella* sp. UK001
d_c^0 = 2.3 μm (SD = 0.36 μm), N_c^0 = 2.0 ×10^{12} cells m^{-3}, t = 96 h

おいて，N_cの値はそれぞれ7.3×10^{13}, 1.7×10^{14}, 1.5×10^{14} cells m^{-3}と，培養0時間における細胞数($N_c^0 = 2.0\times10^{12}$ cells m^{-3})の36～89倍に増加した．これに対して，$T = 40$, 45°Cの場合は，細胞数の増加はほとんど見られなかった．これらの結果より，培養温度条件が $T = 40$°Cの場合のみ細胞径が変化し，$T = 20$から35°Cの温度範囲では，細胞数は増加するが細胞径は変化しないことがわかった．

$T = 40$°Cにおける細胞径の増大に対する入射光強度の影響を調べるため，$T = 30, 40$ °Cにおいて種々の入射光強度の下で細胞を培養し，細胞数および平均細胞径の変化を調べた．**Fig. 1.12**に，入射光強度I_0と96時間の回分培養で得られた細胞の$\overline{d_c}$，N_cの関係を示す．暗条件下($I_0 = 0$ W m^{-2})においては，培養温度にかかわらず，$\overline{d_c}$，N_cの値とも培養0時間のときの値とほぼ同じであった．$T = 40$°Cにおいては，$I_0 = 16.1$ W m^{-2}のとき$\overline{d_c} = 8.1$ μm (SD = 1.4 μm)，$I_0 = 21.8$ W m^{-2}のとき$\overline{d_c} = 11$ μm (SD = 1.9 μm)，$I_0 = 46.2$ W m^{-2}のとき$\overline{d_c} = 7.8$ μm (SD = 1.0 μm)となり，いずれも$\overline{d_c^0}$の値よりも増大したが，N_cの値はいずれの場合もN_c^0の値とほぼ同じで，細胞数は増加しなかった．一方，$T = 30$°Cにおいては，$I_0 = 16.1$ W m^{-2}のとき$\overline{d_c} = 3.3$ μm (SD = 0.31 μm)，$I_0 = 21.8$ W m^{-2}のとき$\overline{d_c} = 2.3$ μm (SD = 0.38 μm)，$I_0 = 46.2$ W m^{-2}のとき$\overline{d_c}$ =

3.3 μm (SD = 0.29 μm)となり，$\overline{d_c^0}$の値とほぼ同じであったが，N_cの値はI_0の値に依存して増加した．

以上の結果から，*Chlorella* sp. UK001の細胞径の増大は，光照射条件の下，温度40°Cにおいて起こることがわかった．また，細胞径が増大するときには細胞数は増加しなかった．さらに，光照射下で40°Cにて培養し，細胞径が増大した細胞を30°Cに移すと，増大した細胞から自生胞子と思われる小さな細胞が放出されることが顕微鏡観察で確認された．このことから，40°Cにおいては光合成反応による物質生産と細胞内への蓄積が起こるが，細胞からの自生胞子の放出が起こらないため，細胞径が増大すると考えられた．

次に，T = 30°Cおよび40°Cで96時間培養した細胞について，細胞径の分布を検討した．**Fig. 1.13**に，個々の細胞径d_cとその細胞の存在割合P_cの関係を示す．P_cは次式によって定義した．

$$P_c = \frac{n_c}{n_{ct}} \times 100 \qquad (1.3)$$

ここで，n_cはd_cの細胞径をもつ細胞数，n_{ct}は試験した全細胞数である．T = 40°Cの場合，培養96時間において，細胞径が8～15 μmの細胞が存在し，d_c = 10 μmのときP_cの最大値が得られた．これに対しT = 30°Cの場合，培養96時間における細胞径の分布は，培養0時間とほとんど

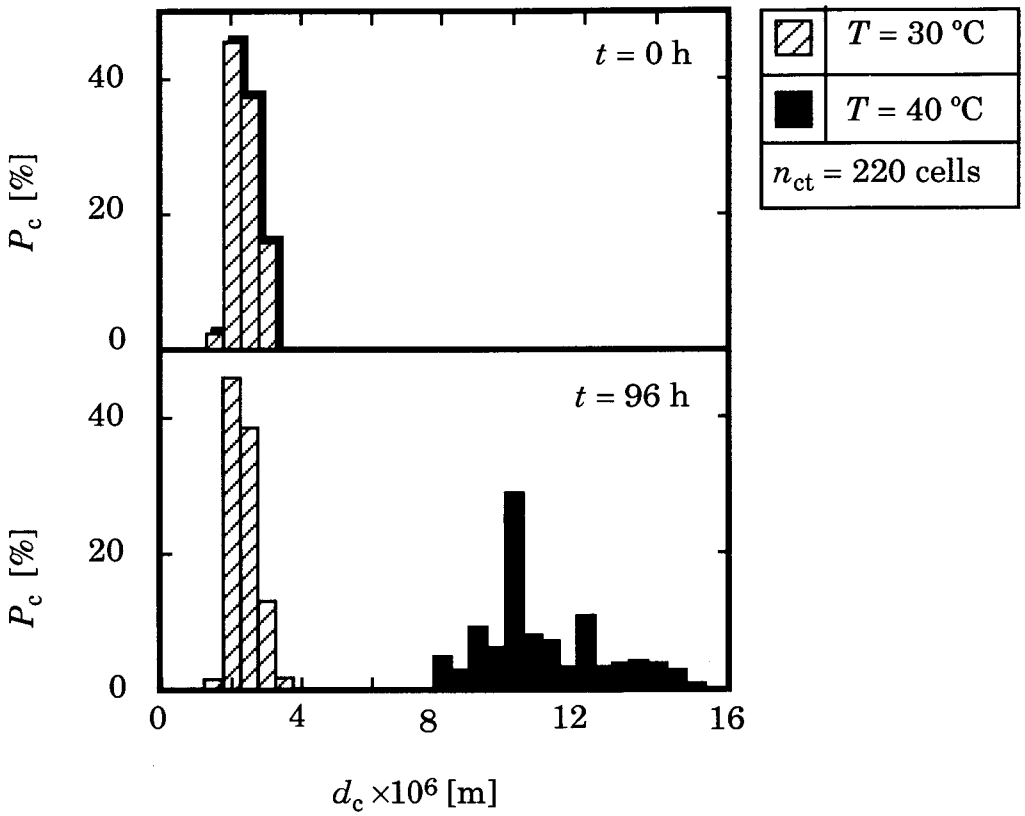


Fig. 1.13 Distributions of diameters of *Chlorella* sp. UK001 cells cultivated at 30 and 40 °C

変わらず，d_cの値1.5～3.5 μmの範囲であった．

次に，T = 30°Cおよび40°C，I_0 = 21.8 W m^{-2}の条件の下で，*Chlorella*細胞を培養したときの細胞増殖量および平均細胞径の経時変化を調べた．**Fig. 1.14**に，乾燥細胞重量濃度X，細胞ホールドアップε_c，細胞数N_c，平均細胞径$\overline{d_c}$と培養時間tの関係を示す．T = 40°Cにおいては，$\overline{d_c}$の値は培養時間とともに増加し，96時間後に$\overline{d_c}$ = 11 μm (SD = 1.9 μm)となったが，N_cの値はほとんど変化しなかった．これに対してT = 30°Cでは，培養期間中$\overline{d_c}$の値は大きく変化しなかったが，N_cの値は時間とともに増加し，96時間ではN_c = 1.7×10^{14} cells m^{-3}となった．細胞ホールドアップε_cは，いずれの温度条件の場合も，培養48時間までほぼ同様に増加したが，それ以後は，T = 40°Cの方がやや上回り，培養96時間ではT = 40°Cにおいてε_c = 0.0015，T = 30°Cにおいてε_c = 0.0012となった．一方，乾燥細胞重量濃度Xによる比較では，培養96時間において，T = 40°CではX = 0.54 kg m^{-3}，T = 30°CではX = 1.1 kg m^{-3}となり，30°Cでの値が40°Cの場合の約2倍となった．

Chlorella 細胞の培養条件と細胞径の関係について，Malis-Arad and McGowan (1982)は，培地の pH を 6.3 から 9.5 にすると，細胞からの自生胞子の放出が抑制さ

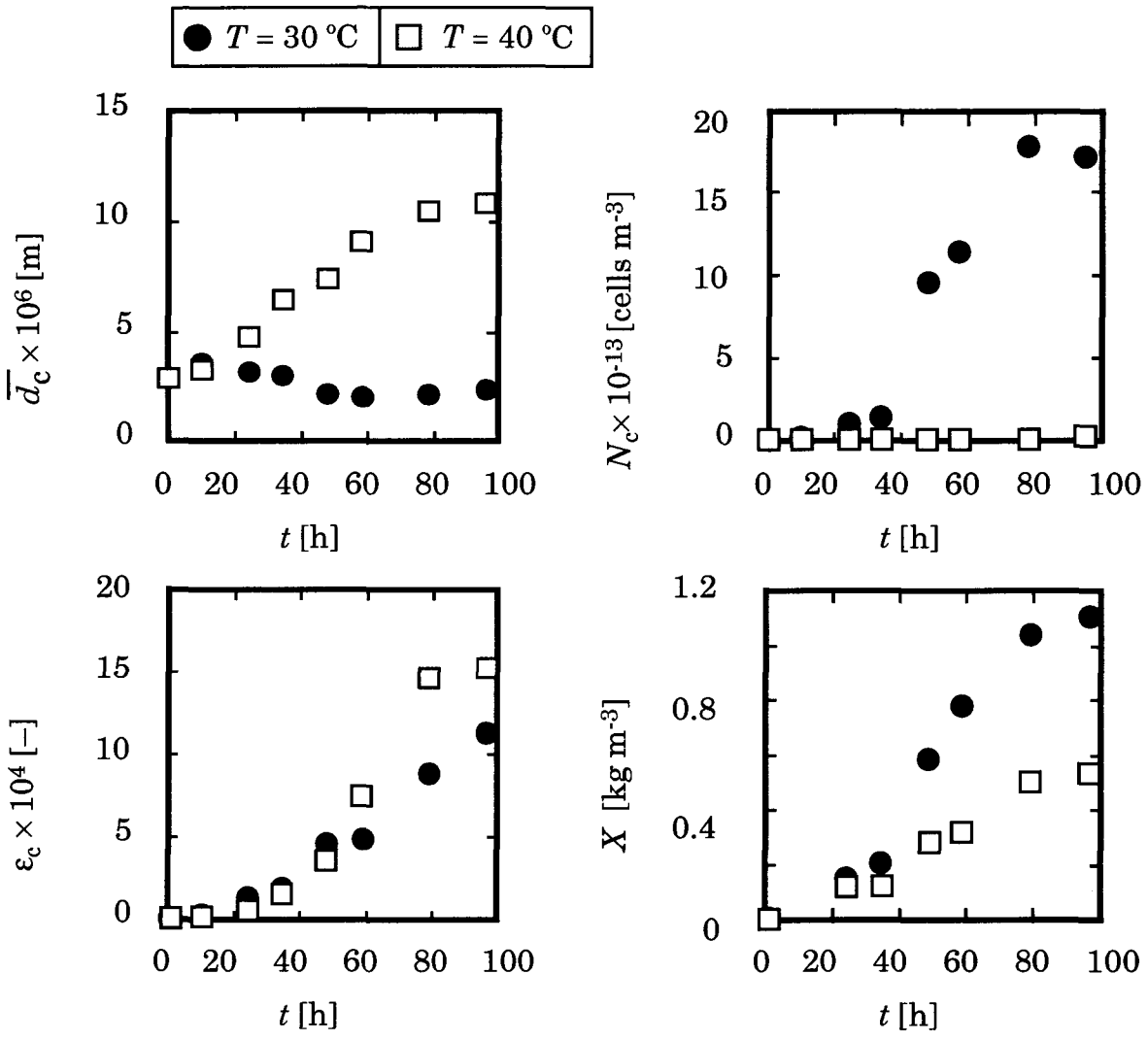


Fig. 1.14 Time courses of cultures of *Chlorella* sp. UK001 cell at 30 and 40 °C
$I_0 = 21.8$ W m^{-2}, $N_c^0 = 2 \times 10^{12}$ cells m^{-3}, $d_c^0 = 2.3$ μm (SD = 0.36 μm),
$\varepsilon_c^0 = 1.3 \times 10^{-5}$, $X^0 = 0.02$ kg m^{-3}, $t = 96$ h

れ，細胞径が増大したことを報告している．また，Lee and Palsson (1996)は，蛍光灯による照射の下で培養した細胞に波長 680nm 付近の赤色光を照射すると，細胞径が 2.4 μm から 1.9 μm へと変化し，この現象が母細胞の分裂および自生胞子の放出と関係のあることを示している．一方，他の微細藻類細胞においては，単細胞緑藻 *Haematococcus* sp.を Fe^{2+}および Mg^{2+}濃度の高い培地に移すと，平均細胞径が 2～3 倍に増加したこと(Kobayashi *et al.*, 1991)や，単細胞ラン藻 *Mycrocystis* sp.では，培地中の NaCl 濃度の増加に伴って細胞径が増大したこと(Hagemann *et al.*, 1989)が報告されている．

1.3.4 *Chlorella* sp. UK001の細胞成分，生細胞活性および細胞の沈降性に対する培養温度の影響

Chlorella sp. UK001の回分培養において，T = 40 °C で培養された細胞は，他の温度で培養された細胞と比較して細胞径が増大することがわかった．そこで，T = 30 °C およびT = 40 °Cで培養された細胞について，培養温度が細胞成分，細胞の生細胞活性，および細胞の沈降性に与える影響について検討した．

まず，T = 20, 30, 40 °C で培養された細胞について，細胞中の炭素，水素，窒素，イオウ，酸素含量を調べた．**Table 1.3**に測定結果を示す．細胞中の炭素含量は，培

Table 1.3 Comparisons of elemental composition in *Chlorella* sp. UK001 cells cultivated at various temperatures (I_0 = 58 W m^{-2})

Elements [% on dry basis]	T [°C]		
	20	30	40
C	50	49	47
H	7.5	7.5	7.2
N	5.0	3.0	4.5
S	N.D.	N.D.	N.D.
O	34	38	40

N.D. : not detected

Table 1.4 Comparison of proteins and sugars in *Chlorella* sp. UK001 cells cultivated at various values of T and I_0

	T [°C]							
	20		30		35		40	
	I_0 [W m^{-2}]							
	15	58	15	58	15	58	15	58
Protein [% on dry basis]	19	19	23	16	15	19	17	19
Sugars [% on dry basis]	50	39	42	36	51	47	49	40

養温度に関係なくほぼ一定で，47～50%の値を示した．また，窒素は3.0～5.0%，水素は7.2～7.5%，酸素は34～40%で，同様に培養温度による差は見られなかった．

Table 1.4に，T = 20, 30, 40 °CおよびI_0 = 15, 58 W m^{-2}で培養された細胞について，タンパク質，糖質の含量を分析した結果を示す．タンパク質の含量は15～23 %で，いずれの条件で培養した場合もほぼ同じであった．糖質の含量は39～51 %の範囲にあり，培養温度による影響はほとんどないと考えられたが，同じ培養温度のときは，I_0 = 58 W m^{-2}のときの方がI_0 = 15 W m^{-2}の場合より低くなる傾向が見られた．

Table 1.5に，T = 30, 40 °Cで培養した細胞中のクロロフィル含量の分析値を示す．T = 30 °Cの場合は乾燥重量当たり6.9%，T = 40 °Cの場合は1.3%で，T = 30 °Cの方が5.3倍高い値を示した．この結果は，T = 30 °Cで培養した細胞懸濁液の色が濃い緑色であったのに対し，T = 40 °Cで培養した細胞懸濁液の色がやや黄緑色に近い色であったことと一致する．

光合成色素であるクロロフィル含量が少ないということは，得られた細胞の一部が死滅していることも考えられた．そこでT = 30, 40 °Cで培養された*Chlorella* sp. UK001の生細胞としての活性を比較するため，細胞生存

Table 1.5 Comparison of chlorophyll contents in *Chlorella* sp. UK001 cells cultivated at 30 °C and 40 °C

	T [°C]	
	30	40
Chlorophyll [% on dry basis]	6.9	1.3

Table 1.6 Comparisons of viability, O_2 generation rate and O_2 consumption rate in *Chlorella* sp. UK001 cells cultivated at 30 and 40 °C

		T [°C]	
		30	40
Cell viability	[%]	100	100
O_2 generation rate under light condition	[mol-O_2 kg^{-1} h^{-1}]	0.24	0.12
O_2 consumption rate under dark condition	[mol-O_2 kg^{-1} h^{-1}]	0.26	0.035

率，光照射条件下でのO_2発生速度，および暗条件下でのO_2消費速度を測定した．96時間の培養で得られた細胞についての測定結果を**Table 1.6**に示す．細胞生存率に関しては，T = 30, 40 °Cで培養されたいずれの細胞についても，ほぼ100 %の値が得られた．また，光照射条件下でのO_2発生速度および暗条件下でのO_2消費速度は，それぞれ，T = 30 °Cの細胞において0.24 mol-O_2 kg^{-1} h^{-1}および0.26 mol-O_2 kg^{-1} h^{-1}，T = 40 °Cの細胞において0.12 mol-O_2 kg^{-1}h^{-1}および0.035 mol-O_2 kg^{-1} h^{-1}であった．このように，T = 40 °Cの細胞では，光照射条件下でのO_2発生速度がT = 30 °Cの細胞より低い値を示したが，この結果はクロロフィル含量の測定結果と一致した．また，T = 40 °Cの細胞においても，生細胞として充分な活性が保持されていることがわかった．

T= 30 °Cおよび40 °Cで96時間培養して得られた細胞について，細胞の沈降性について検討した．**Fig. 1.15**に，これら両細胞の懸濁液について，界面沈降距離L_sと沈降時間t_sの関係を示す．T = 40° Cで培養された細胞の懸濁液は，T = 30 °Cの場合の細胞懸濁液と比較して，速やかに沈降した．L_sとt_sの関係を示すそれぞれの直線の傾きから，界面沈降速度u_sは，T = 40°Cの細胞ではu_s = 7.8×10^{-6} m s^{-1}，T = 30°Cの細胞ではu_s = 6.5×10^{-7}m s^{-1}

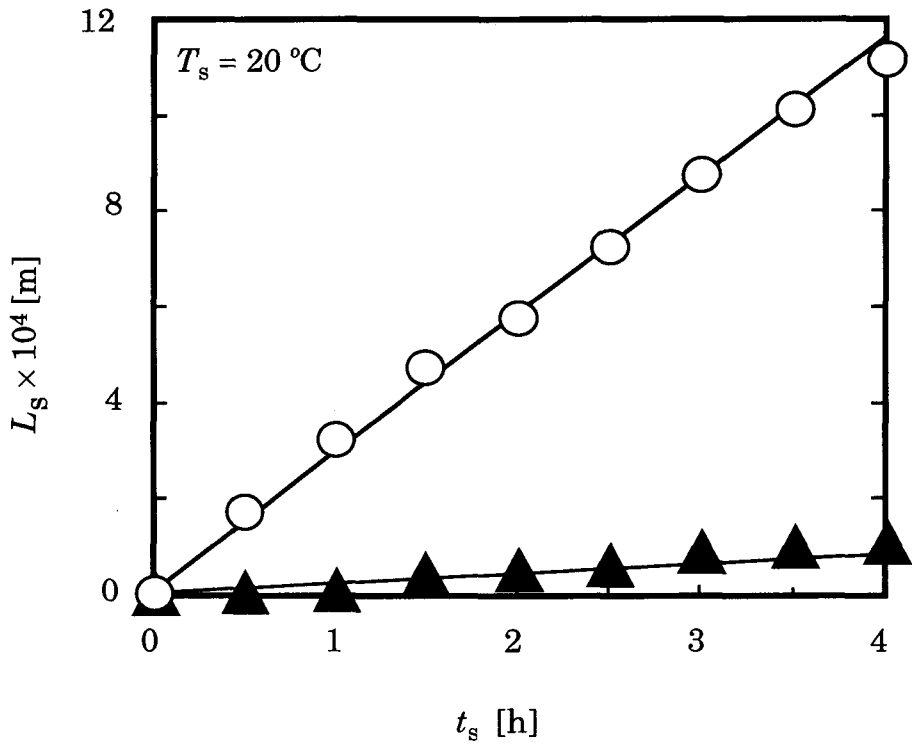


Fig. 1.15 Change in interfacial distance of suspensions of *Chlorella* sp. UK001 cells cultivated for 96 h at 30 and 40 °C during sedimentation experiments

▲: Cells cultivated at 30 °C, $N_c = 1.7 \times 10^{15}$ cells m^{-3}, $\overline{d_c} = 2.3$ μm (SD = 0.38 μm), $\varepsilon_c = 0.010$, $\eta_m = 1.006 \times 10^{-3}$ kg m^{-3}

○: Cells cultivated at 40 °C, $N_c = 1.4 \times 10^{13}$ cells m^{-3}, $\overline{d_c} = 11$ μm (SD = 1.9 μm), $\varepsilon_c = 0.0093$, $\eta_m = 1.100 \times 10^{-3}$ kg m^{-3}

Table 1.7 Values of constants for calculation of the value of d_s

	Cells cultivated at 30 °C	Cells cultivated at 40 °C
u_s [m s^{-1}]	6.5×10^{-7}	7.8×10^{-6}
ε_c [–]	0.010	0.0093
ρ_m [kg m^{-3}]	1.000281×10^3	1.000281×10^3
η_m [kg m^{-1} s^{-1}]	1.006×10^{-3}	1.100×10^{-3}

と求められ，前者の方が後者に比べu_sの値が約12倍大きいことがわかった．

Aiba *et al.*(1968)によれば，細胞懸濁液の界面沈降速度u_sと細胞径d_sは以下のように相関される．界面沈降速度u_sは，細胞群の干渉沈降速度Uと懸濁液中でのホールドアップε_cを用いて次の式で表わされる．

$$u_s = U(1-\varepsilon_c) \tag{1.4}$$

細胞が球として取り扱える場合には，重力場における単一細胞の沈降速度U_pと細胞群の干渉沈降速度Uの関係について次式が採用できる．

$$U = U_p / \left(1+\gamma \cdot \varepsilon_c^{1/3}\right) \tag{1.5}$$

ここで，γはε_cに依存するパラメーターであり，$\varepsilon_c < 0.05$では$\gamma = 0.5$が与えられる．

一方，U_pは，重力加速度g，細胞密度ρ_c，溶媒密度ρ_w，細胞懸濁液粘度η_mを用いて次式で表わすことができる．

$$U_p = g \cdot d_s^2 \cdot (\rho_c - \rho_w)/18\eta_m \tag{1.6}$$

ρ_cは，細胞懸濁液密度ρ_mを用いて次式で与えられる．

$$\rho_c = \{\rho_m - (1-\varepsilon_c)\rho_w\}/\varepsilon_c \tag{1.7}$$

Fig. 1.15 に示した沈降試験のデータから，Eqs. (1.4)～(1.7)に基づきd_sの値を計算した．計算に際して，**Table 1.7** に示す値を用いた．また，$g = 9.8\ \mathrm{m\ s^{-2}}$，$\gamma = 0.5$，$\rho_w = 9.970477\times10^2\ \mathrm{kg\ m^{-3}}$とした．計算の結果，$T = 30\ ^\circ\mathrm{C}$

の細胞では $d_s = 4.0\,\mu m$，$T = 40\,^{\circ}C$ の細胞では $d_s = 13\,\mu m$ の値が得られた．いずれの場合も，顕微鏡下で求めた個々の細胞の平均径である $\overline{d_c}$ の値より大きくなった．顕微鏡観察において，細胞懸濁液を静置したときに細胞の凝集が認められたことから，細胞懸濁液の界面沈降速度から計算した d_s の値は，実測値 $\overline{d_c}$ より大きく見積もられたものと考えられる．以上の結果より，*Chlorella* 細胞を 40°C で培養することによって，沈降速度が高い細胞が得られることがわかった．微細藻類の細胞生産においては，細胞回収プロセスにおける省エネルギー化を図る必要があり，本章で得られた結果は，細胞の効率的な分離操作に対し有用な基礎的知見を与えるものと思われる．

1.4 結言

淡水由来の単細胞緑藻，*Chlorella* sp. UK001 に対する培地成分，CO_2，O_2 濃度，培養温度等の影響について検討し，細胞増殖速度，細胞成分，細胞の沈降性の変化について，以下のことがわかった．

(1) 改変 Closterium 培地を用いた培養で，細胞濃度が 0 ～ 0.8 kg m^{-3} のときには，培地中の栄養塩類濃度が細胞増殖に対する制限因子とならなかった．また，この細胞の比増殖速度は培地の pH が 5.7 のとき最も高く，また培地中の NaCl 濃度が 0～1 %のとき高い値を示した．

(2) 細胞増殖に対する通気ガス組成の影響を検討した結

果，T = 30°C，pH = 5.7 における培養では，CO_2 濃度が 5～10%，O_2 濃度が 3～30%のとき，高い比増殖速度が得られた．このことから，この細胞の培養には，10 % CO_2，3% O_2，87% N_2 の組成の混合ガスを用いることにした．

(3) 細胞増殖に対する培養温度の影響を検討した結果，T = 30°C のとき，比増殖速度の値が最大となった．この温度条件の下で培養された細胞の直径は，2～3 μm であるが，光照射条件下，T = 40 °C で培養すると平均細胞径が 8～15 μm まで増大した．

(4) T = 40 °C で培養した細胞は T = 30 °C で培養した細胞と比べてクロロフィル含量が低く，細胞重量当たりの O_2 発生速度，O_2 消費速度が低かった．細胞の元素組成，タンパク質，糖質含量に対する培養温度による影響は見られなかった．

(5) T =40 °C で培養し細胞径が増大した細胞懸濁液の界面沈降速度は，T =30 °C で培養された細胞懸濁液の約 12 倍となった．

第 2 章　微細藻類細胞の増殖に対する入射光強度の影響と光強度分布の算出

2.1　緒言

光独立栄養条件下での微細藻類細胞の培養では，光が唯一のエネルギー源となる．したがって，細胞の増殖速度は，細胞に照射される光強度に依存することが考えられる．照射光強度と細胞の増殖速度の関係については，すでに数種類の藻種についての報告があるが，その関係は藻種によって大きく異なることがわかっている．一方，培養系に照射された光は細胞によって吸収されるため，培養系内では光照射位置からの距離と細胞濃度に応じて光強度分布が生じる．したがって，細胞の培養条件としての光強度については，入射光強度と培養系内における光強度分布の両方についての検討が必要であると考えた．

本章では，第 1 章で光強度以外の最適培養条件を決定した *Chlorella* sp. UK001 について，照射光強度と細胞の比増殖速度の関係を明らかにするとともに，培養系内の光強度分布を評価する方法の確立を目的として，実験を行った．また，本研究で用いた光強度分布の評価方法の妥当性を確かめるために，*Chlorella* 細胞とは形態および増殖特性の異なる微細藻類細胞を用いて，同様の検討を行った．

2.2 実験

2.2.1 細胞と培養方法

(1) 細胞

本研究では，単細胞緑藻 *Chlorella* sp. UK001 およびこの細胞と形態および増殖特性の異なる多細胞ラン藻，*Spirulina platensis* IAM135 を用いた．*Chlorella* sp. UK001 の由来および特徴は，1.2.1 項で説明した．

Spirulina は，糸状の形態をした多細胞性藻類で，系統分類上は藍藻綱 (Cyanophyceae) ネンジュモ目 (Nostocales) ユレモ科 (Oscillatoriaceae) に属する (Hirose and Yamagishi, 1977)．実験に使用した IAM135 株はアフリカのチャド湖で採取され，単離，無菌化されたもので，東京大学分子細胞生物学研究所細胞・機能高分子総合センター (IAM) より分譲された．**Fig. 2.1** に細胞の光学顕微鏡写真を示す．*Spirulina* は，多細胞性のラン藻としての研究例が多く，細胞の増殖速度も比較的高いことから (Watanabe and Ichimura, 1977)，本研究の目的に適していると考えた．この種は，炭素源として $NaHCO_3$ を含む培地中で，温度 30 °C，緩やかな撹拌条件の下で良好な増殖を示した．

藻体は，細胞が糸状につながった長さ数 mm の糸状体から成り，糸状体は規則正しい螺旋構造をしている．*S. platensis* では，個々の細胞の長さが 2～6 μm，幅が 6～8 μm で，螺旋の間隔は 43～57 μm，幅は 26～36 μm で

Fig. 2.1 Photograph of *S. platensis* IAM135

Table 2.1 Composition of SOT medium for the culture of *S. platensis*

$NaHCO_3$	16.8	g
K_2HPO_4	0.5	g
$NaNO_3$	2.5	g
K_2SO_4	1.0	g
NaCl	1.0	g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.04	g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01	g
$Na_2 \cdot EDTA$	0.08	g
H_3BO_3	0.00286	g
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.00250	g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.000222	g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.000079	g
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.000021	g
H_2O	1.0	dm^3

ある(Richmond, 1988). 細胞内の構造は極めて単純で，核，葉緑体とも分化していない．増殖は細胞の2分裂による糸状体の伸長，または糸状体が小部分に分かれ，それぞれが再び糸状体に成長するという過程を取り，無性生殖である(Hirose, 1972).

(2) 培地

Chlorella sp. UK001の培養には，改変Closterium培地(pH = 5.7)を用いた．組成は1.2.1項のTable 1.1に示した．

S. platensis IAM135の培養には，SOT培地 (Ogawa and Terui, 1970)を用いた．**Table 2.1**にSOT培地の組成を示す．

(3) 培養方法

Chlorella sp. UK001の前培養および光透過率の測定に用いる細胞懸濁液を得るための培養は，改変Closterium培地 0.75 dm^3 を容量 1 dm^3 のガラス製Duranびん(90 ϕ mm)に入れ，温度30°C，照射光強度25 W m^{-2} の下で混合ガス($CO_2 : O_2 : N_2 = 10 : 3 : 87$ (体積比))を0.5 $dm^3 min^{-1}$ の一定流速で通気し，72～96時間無菌的に培養した．この細胞懸濁液をRouxフラスコ中の培地に初期細胞濃度が0.01 kg m^{-3} となるように添加して，回分培養を開始した．細胞懸濁液の濃度の調整は，遠心

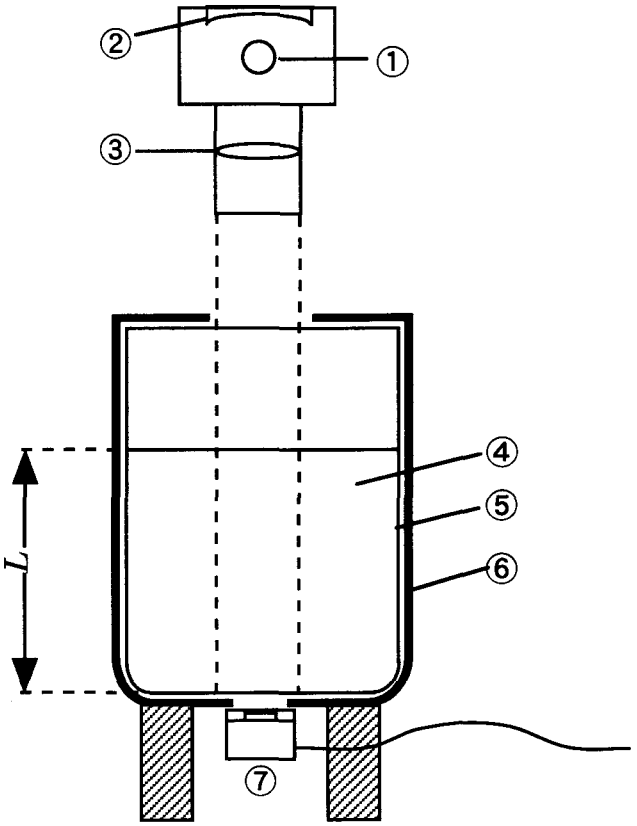
分離による濃縮または新鮮な改変 Closterium 培地による希釈によって行った.

S. platensis IAM135 の前培養および光透過率の測定に用いる細胞懸濁液を得るための培養は，SOT 培地 1.8 dm^3 を容量 2 dm^3 の Spinner フラスコ(120 φ mm)に入れ，温度 30 °C，照射光強度 25 W m^{-2} の下でフラスコ内部の撹拌翼を 50 r.p.m.の一定速度で回転させて，170～240 時間無菌的に培養した．この細胞懸濁液を Roux フラスコ中の培地に初期細胞濃度が 0.01 kg m^{-3} となるように添加して，回分培養を開始した．細胞懸濁液の濃度の調整は，遠心分離による濃縮または新鮮な SOT 培地による希釈により行った.

Chlorella sp. UK001 および *S. platensis* IAM135 の比増殖速度と照射光強度の関係を調べるための回分培養には，容量 1 dm^3 のガラス製の Roux フラスコを用いた．培養装置の概略図を，1.2.1 項の Fig. 1.3 に示した.**Table 2.2** に *Chlorella* sp. UK001 および *S. platensis* IAM135 の培養条件を示す．Roux フラスコに培地を入れ，ロータリーシェイカー上で 50 r.p.m.の速度で撹拌した．滅菌フィルター(孔径 0.2 μm, Corning Glass Works 製)を用いて，CO_2 を含む混合ガスを 0.25 dm^3 min^{-1} の一定流速で培地表面に通気した．そして 15W 白色蛍光灯(FL15SW，松下電器産業製)または 500W キセノンランプ(UXL-500-O，ウシオ電機製)の照射光を，フラスコの上方向から細胞に

Table 2.2 Summary of culture conditions in batch cultures in Roux flask

Algal strain	*Chlorella* sp. UK001	*S. platensis* IAM135
Medium	Modified Closterium medium	SOT medium
pH of medium	5.7	9.0
Culture volume [dm^3]	0.2	0.1
Depth of culture [mm]	11.2	5.6
Composition of supplied gas	10 % CO_2, 3 % O_2 / N_2	1 % CO_2 / Air



① 500 W xenon lamp, ② concavaner mirror, ③ convex lens, ④ cell suspension, ⑤ beaker of glass, ⑥ black paper, ⑦ quantun sensor

Fig. 2.2 Schematic drawing of apparatus to measure transmittance of light in cell suspension

連続照射した．入射光強度は，ランプの種類，数と位置を変えることによって調節した．Rouxフラスコ表面の光照射面積は178 cm^2であり，照射面以外は光線の透過と反射を防ぐために黒色紙で覆った．そして，温度30 °Cのチャンバー内において回分培養を行った．

2.2.2 分析および測定方法

細胞の増殖を表わす指標として，細胞の対数増殖期における細胞濃度Xと培養時間tを用いて，(1.2)式から計算される比増殖速度μを用いた．また細胞濃度Xは，無菌的に採取した培養液の680 nmにおける吸光度ODの値から，あらかじめ作成した相関式を用いて求めた．

照射光強度は，光合成に有効な400～700 nmの波長域の光を検出する光量子センサー(LI-190SB, LI-COR製)を用いて測定した．Rouxフラスコの光照射面の内側15カ所で光強度を測定し，その平均値を入射光強度とした．なお，白色蛍光灯の場合には1 μE m^{-2} s^{-1} = 0.223 W m^{-2}，キセノンランプの場合には1 μE m^{-2} s^{-1} = 0.216 W m^{-2}の関係を用いて光量子センサーの測定値を換算し，光合成有効放射の値として表示した(Kou *et al.*, 1981).

2.2.3 細胞懸濁液中の光透過率の測定方法

種々の濃度の細胞懸濁液を用いた光透過率の測定は，平行光束を照射するキセノンランプ光源装置(UXL-500-

O，ウシオ電機製)を用い，暗室内で行った．測定装置の概略図を **Fig. 2.2** に示す．容積 1 dm^3 の Pyrex ガラス製ビーカーに濃度既知の細胞懸濁液を入れ，ビーカーの真上方向から光を照射した．光合成に有効な 400～700 nm の波長の光を検出する光量子センサー(LI-190SB，LI-COR 製)をビーカーの底に設置し，ビーカーが空のときの光強度を入射光強度 I_0 とした．ビーカーの表面のうち光透過部分以外は黒色紙で覆い，光の透過および反射を防いだ．そして，細胞懸濁液の濃度と液深 L を変えながらビーカーの底における光強度を測定した．

2.3 結果と考察

2.3.1 *Chlorella* sp. UK001 の比増殖速度と入射光強度の関係

第 1 章で得られた結果に基づき，T = 30 °C，pH =5.7，y_c = 10%，y_o = 3%の条件の下で，0～365 W m^{-2} の光を照射して *Chlorella* sp. UK001 の回分培養を行い，対数増殖期の比増殖速度を測定した．**Fig. 2.3** に，入射光強度 I_0 と比増殖速度 μ の関係を示す．I_0 が 1.8 から 71.4 W m^{-2} までは I_0 の値の増加とともに μ の値は増加したが，I_0 が 71.4～130 W m^{-2} においては μ の値は 0.20 h^{-1} でほぼ一定となった．I_0 が 130 W m^{-2} 以上では I_0 の値の増加とともに μ の値はやや減少し，I_0 = 365 W m^{-2} では μ =0.17 h^{-1} となった．一方，I_0 が 0 および 1.8 W m^{-2} のときは，

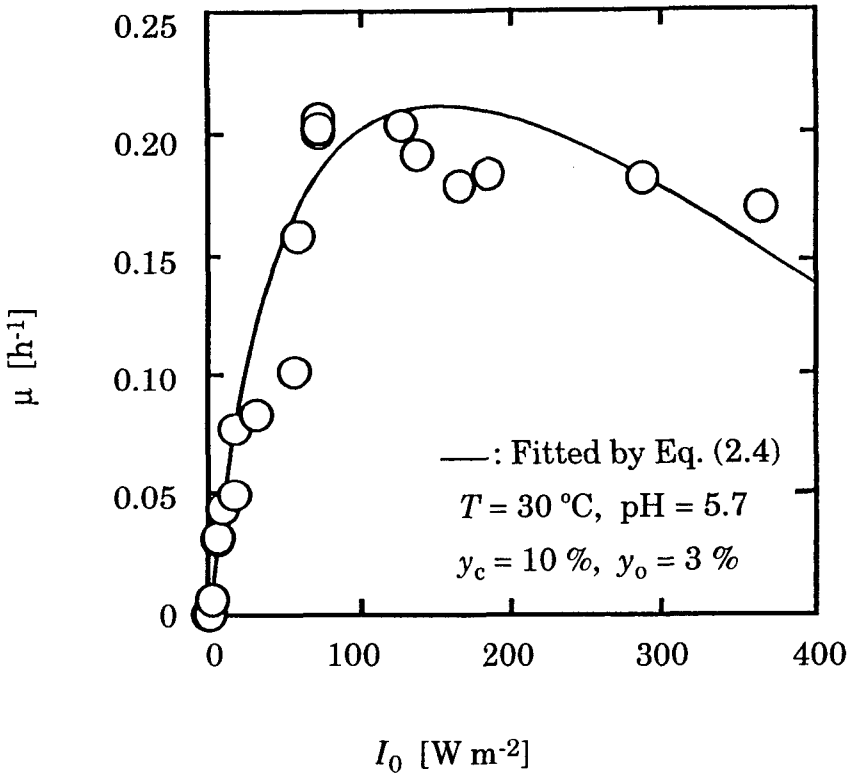


Fig. 2.3 Relationship between incident light intensity and specific growth rate of *Chlorella* sp. UK001

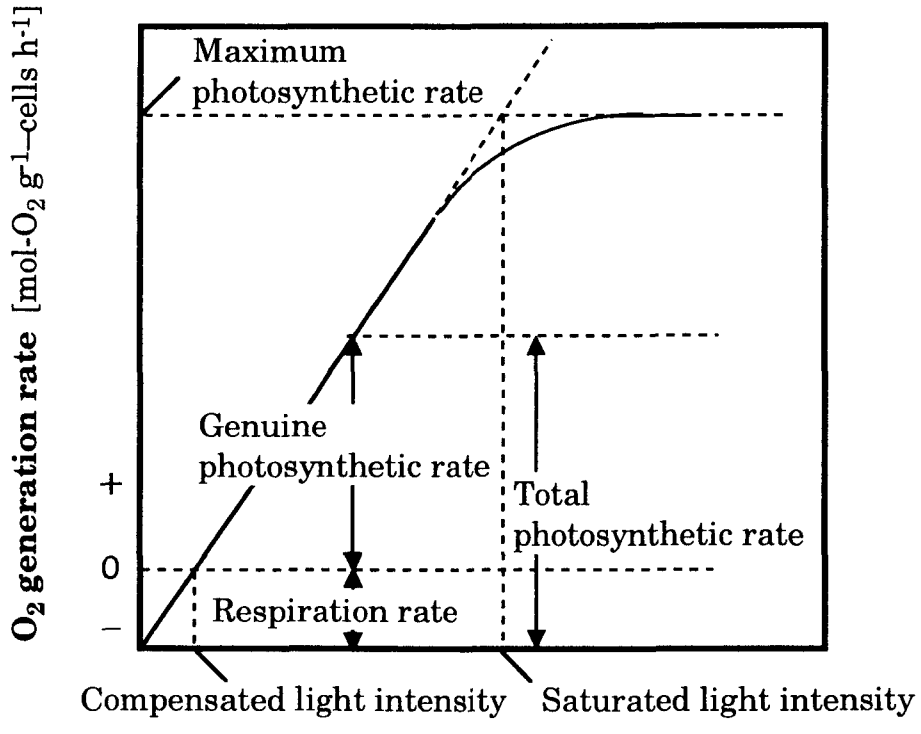


Fig. 2.4 Relationship between light intensity and O_2 generation rate in photosynthesis

細胞の増殖は認められなかった.

高等植物や微細藻類による酸素発生型の光合成反応では,入射光強度と光合成速度(酸素発生速度)について**Fig. 2.4** に示す関係が成り立つことが知られている(Darley, 1982). 光合成反応は, 光エネルギーにより水の分解と同時に ATP と NADPH を生産する明反応と, ATP と NADPH によって CO_2 を固定化し 6 単糖を合成する暗反応に分けられる. 光合成反応では暗反応が律速反応となるため, ある光強度以上では光合成速度はほぼ一定となることが知られている. このときの光強度は, 飽和光強度と呼ばれている. 一方, 光強度が低いときには, 光合成反応による O_2 発生速度と呼吸による O_2 吸収速度が等しくなる場合があり, このときの光強度を補償光強度と呼ぶ. 本実験は光独立栄養条件下で行っているので, 照射光が細胞増殖における唯一のエネルギー源と見なすことができる. したがって, 細胞の増殖速度が光合成速度に比例するので, 入射光強度と細胞の比増殖速度について Fig. 2.4 と同様の関係が成り立つと考えられた. Fig. 2.3 で得られた結果から, この細胞における飽和光強度は約 70 $W m^{-2}$, 補償光強度は約 1.8 $W m^{-2}$ と推定された.

強い照射光強度の下での微細藻類細胞の増殖阻害については, いくつかの藻種について報告されている(Aiba, 1982; Lee *et al*, 1987). これは, 光合成反応の代謝系において, 強い光照射により生成した活性酸素種が細胞内

器官や酵素系を攻撃するためと推定されている(Devlin and Barker, 1971).

Chlorella sp. UK001の比増殖速度μを，Fig. 2.3に示した結果から照射光強度Iの関数として表わした．照射された光は細胞によって吸収されるため，培養液中において光強度分布が生じる．Fig. 2.3に示した実験では，光照射方向における培養液の液深は約10 mmで，対数増殖期における細胞濃度は0.1 kg m^{-3}以下であった．したがって，μの値を得た培養条件では培養液中の光強度分布は無視できるものと考え，培養液中の照射光強度Iは入射光強度I_0に等しいと仮定した．

細胞の比増殖速度μは，Iの関数として次の式で表わされる．

$$\mu + m = f(I) \cdot g(I) \tag{2.1}$$

ここで，$f(I)$は光強度による増殖促進効果に関する関数，$g(I)$は光強度による増殖阻害効果に関する関数，mは実験から求められた定数($I_0 = 0$ W m^{-2}におけるy切片)である．照射光強度が細胞増殖の律速要因であると仮定し，$f(I)$について，次に示すMonod型の式を適用した．

$$f(I) = \mu_{max} / (1 + K_s / I) \tag{2.2}$$

一方，細胞増殖に対する光の増殖阻害を表わすために，Bazua *et al.* (1977)が示した次の式を用いた．

$$g(I) = 1 - I / I_m \tag{2.3}$$

Eqs. (2.1)～(2.3)より，次の式が導かれた(Taya *et al.*,

1995)

$$\mu + m = \frac{\mu_{max}}{(1 + K_s / I)} \cdot (1 - I / I_m) \qquad (0 \le I \le I_m) \qquad (2.4)$$

Fig. 2.3 に示したデータを最小二乗法を用いて Eq. (2.4) にフィッティングさせた結果を Fig. 2.3 に実線で示す．また，フィッティングによって得られた Eq. (2.4)の定数値を **Table 2.3** に示す．

Table 2.3 Values of constants in Eq. (2.4)

		Chlorella sp. UK001	*S. platensis* IAM135
μ_{max}	[h^{-1}]	0.389	0.199
K_s	[W m^{-2}]	56.3	37.6
I_m	[W m^{-2}]	711	150
m	[h^{-1}]	1.19×10^{-2}	8.07×10^{-3}

2.3.2 *Spirulina platensis* IAM135 の比増殖速度と入射光強度の関係

培養温度 T = 30 °C，pH =9.0 の条件の下で，入射光強度 I_0 = 0～158 W m^{-2} の光を照射して *S. platensis* IAM135 の回分培養を行い，対数増殖期における比増殖速度 μ を調べた．**Fig. 2.5** に I_0 と μ の関係を示す．

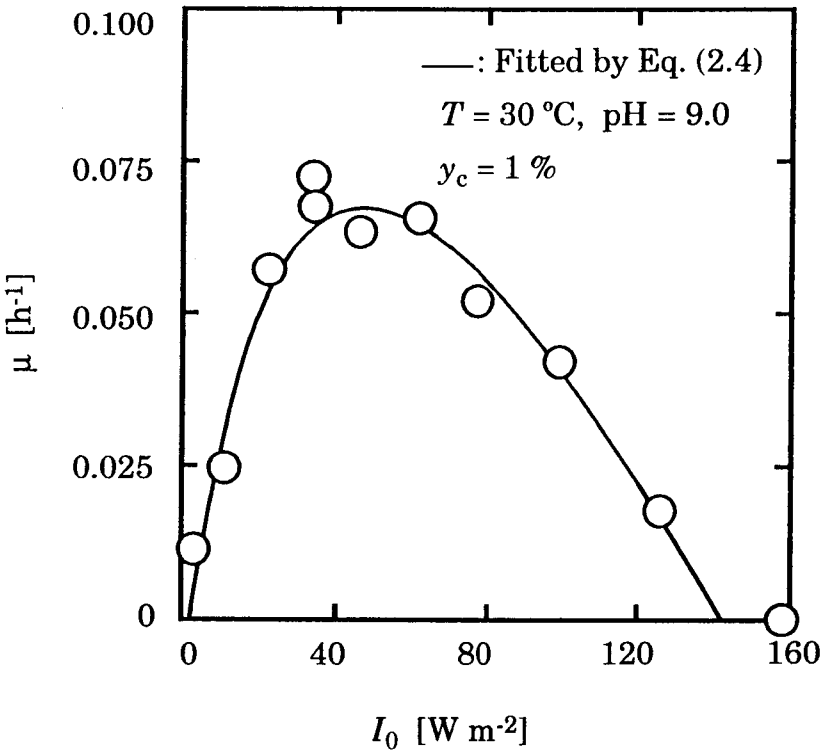


Fig. 2.5 Relationship between incident light intensity and specific growth rate of *S. platensis* IAM135

I_0 = 8～34 W m^{-2}の範囲ではI_0の増加とともにμの値は増加したが，I_0 = 34～158 W m^{-2}ではI_0の増加とともに減少し，I_0= 158 W m^{-2}のときは細胞の増殖は見られなかった．このことから，*S. platensis* IAM135の増殖に最適な光強度は34 W m^{-2}で，入射光強度が0～34 W m^{-2}では光が細胞増殖を促進し，34 W m^{-2}以上では光が細胞増殖を阻害することがわかった．

一方，*Chlorella* sp. UK001では細胞増殖に最適な光強度はI_0= 71.4～130 W m^{-2}で，130 W m^{-2}以上の強い入射光強度の下での増殖阻害の程度も，*S. platensis* IAM135に比べて小さかった．この結果は，それぞれの藻類の細胞構造の違いと関係があると考えた．真核生物である緑藻の*Chlorella* sp. UK001では，光合成反応は膜で包まれた小器官である葉緑体内で行われるため，必要以上の強い光をある程度緩和するための機構を備えていることが考えられた．これに対し，原核生物であるラン藻の*S. platensis*では光合成のための器官が分化しておらず，強い光を緩和できずに細胞の代謝系が阻害されたものと推測した．

S. platensis IAM135の照射光強度と細胞の比増殖速度の関係について，*Chlorella* sp. UK001の場合と同様に式で表わした．光照射方向における培養液の液深は約6 mmで，μの値を測定した対数増殖期における細胞濃度は0.1 kg m^{-3}以下であった．このことから，μの値を得

た培養条件においては培養液中の光強度分布は無視できると考え，照射光強度Iは入射光強度I_0に等しいと仮定した．*Chlorella* sp. UK001 の場合と同様に，照射光強度Iと細胞の比増殖速度μの関係を示すためにEq. (2.4)を用いた．Eq. (2.4)を用いてFig. 2.5に示したデータをフィッティングした結果を同図の実線で示す．また，得られた定数値をTable 2.3に示す．

2.3.3 細胞懸濁液中の光強度分布の評価

(1) *Chlorella* sp. UK001 細胞懸濁液中における光強度分布の評価

培養系における細胞増殖を計算するためには，培養系内の光強度分布を評価する必要がある．種々の濃度の*Chlorella* sp. UK001 の細胞懸濁液を用いて，光の透過距離と光透過率の関係を調べた．**Fig. 2.6** に，光透過距離Lと光透過率$I(L)/I_0$の関係を片対数プロットした結果を示す．与えられた細胞濃度Xに対して，Lと$I(L)/I_0$の間に直線関係が得られたことから，光の透過と吸収に関するLambert-Beerの法則の基づいて，次の式が導かれた．

$$\ln\left(I(L)/I_0\right) = -\alpha \cdot L \qquad (2.5)$$

ここでαは，実験データをEq.(2.5)にフィッティングして得られた直線の傾きであり，これを有効吸収係数と定義した．**Fig. 2.7** に，対数プロットしたXとαの関係をを示す．Xとαの関係式として，次式が得られた．

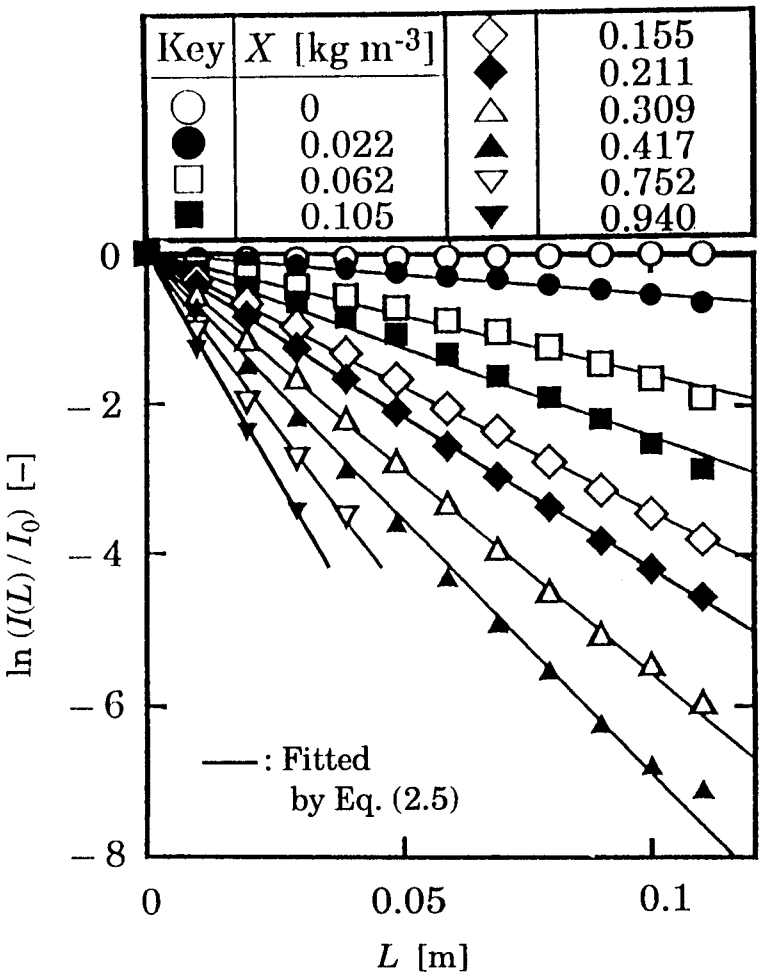


Fig. 2.6 Plots of light transmittance against light path length using suspensions of *Chlorella* sp. UK001

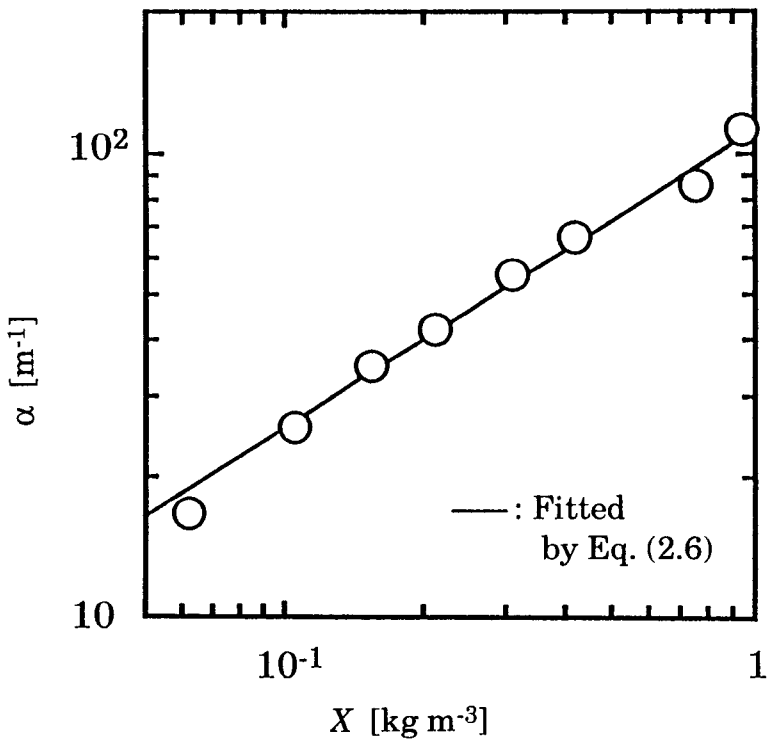


Fig. 2.7 Plot of effective absorption coefficient of light against concentration of *Chlorella* sp. UK001 cells

$$\alpha = 113X^{0.652} \qquad (2.6)$$

Fig. 2.7 に，この式で表わされる直線を示す．

以上の結果より，入射光強度 I_0，細胞濃度 X が与えられたとき，光照射面からの距離 L における光強度 $I(L)$ は，Eqs. (2.5)と(2.6)から計算できることになる．**Fig. 2.8** に，I_0 = 50 W m^{-2}，X = 0.5 および 1.0 kg m^{-3} のときの光強度分布の計算結果と実測値を示す．計算線と実測値がほぼ一致したことから，この方法により細胞懸濁液中の光強度分布が評価できることがわかった．

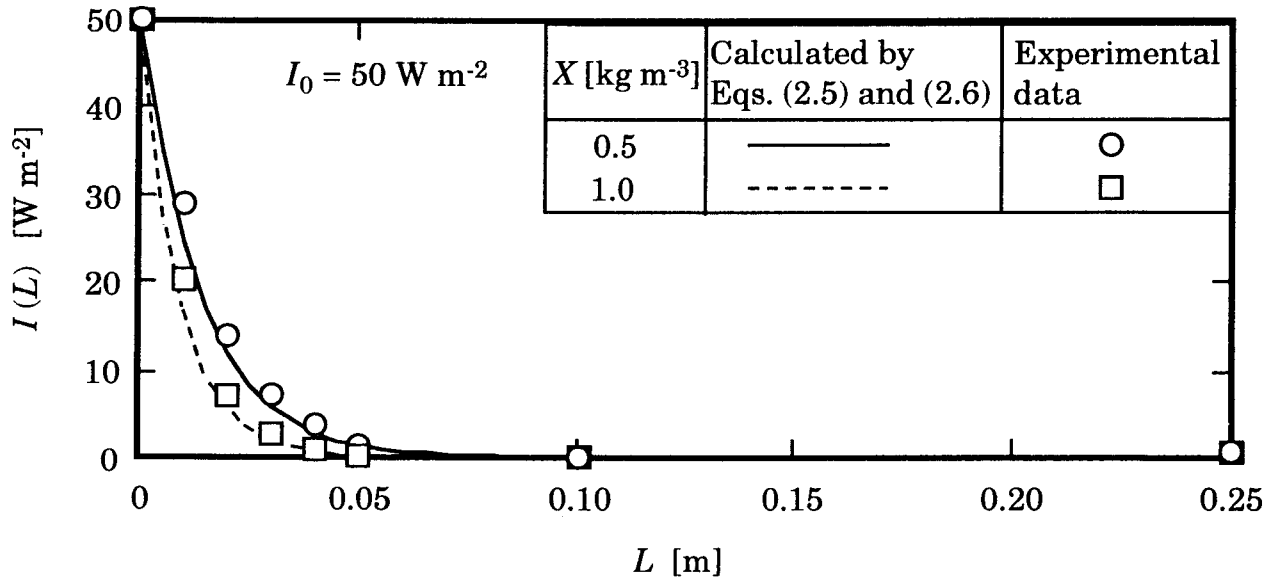


Fig. 2.8 Light intensity in cell suspension of *Chlorella* sp. UK001

(2) *S. platensis* IAM135 細胞懸濁液中における光強度分布の評価

Chlorella sp. UK001 と形態および増殖特性が異なる *S. platensis* IAM135 について，*Chlorella* 細胞と同じ手法で，細胞懸濁液中の光強度分布を評価する式を導いた．**Fig. 2.9** に，種々の濃度の *S. platensis* IAM135 細胞懸濁液を用いて光透過率を測定し，得られた光透過距離 L と光透過率 $I(L)/I_0$ の関係を示す．与えられた細胞濃度 X に対し，L と $I(L)/I_0$ の間に Eq. (2.5)が成り立ち，X に対してαの値が得られた．**Fig. 2.10** に，X とαの両対数プロットを示す．実験式は次式で良好に相関された．

$$\alpha = 125X^{0.92} \qquad (2.7)$$

Fig. 2.10 の直線は Eq. (2.7)を示す．

Fig. 2.11 に，$I_0 = 50\ \mathrm{W\ m^{-2}}$，$X = 0.5$ および $1.0\ \mathrm{kg\ m^{-3}}$ のときの *S. platensis* IAM135 細胞懸濁液中での光強度分布の計算結果と実測値を示す．*Chlorella* 細胞の場合と同様に，計算線と実測値がほぼ一致し，この方法により細胞懸濁液中の光強度分布が評価できることが確かめられた．

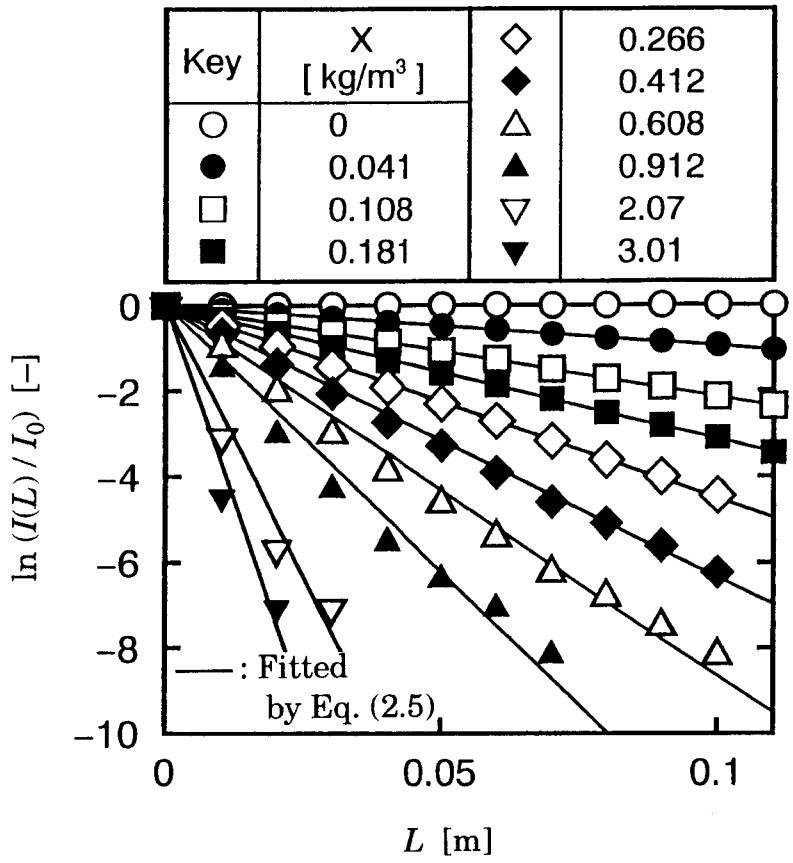


Fig. 2.9 Plots of light transmittance against light path length using suspensions of *Spirulina platensis* IAM135

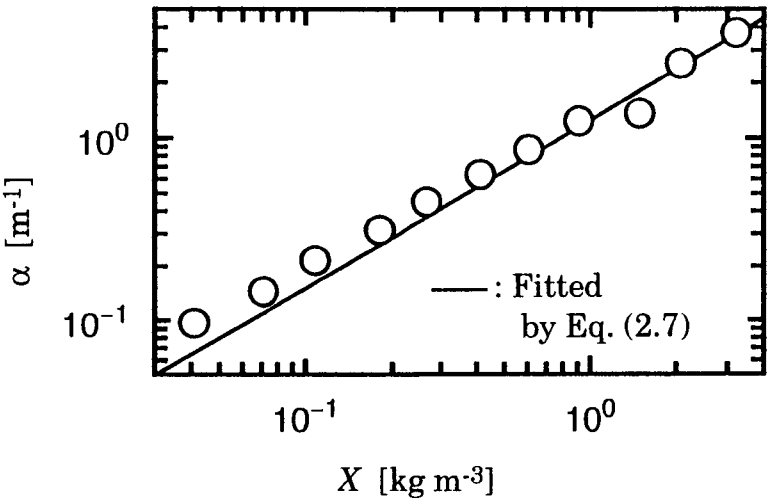


Fig. 2.10 Plot of effective absorption coefficient of light against concentration of *Spirulina platensis* IAM135

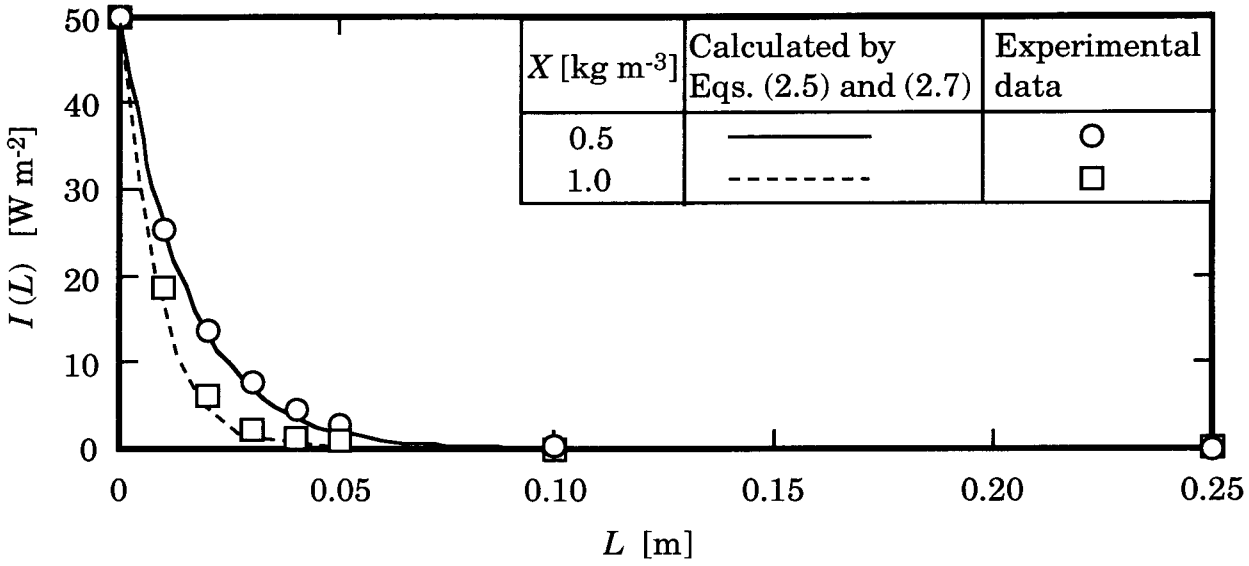


Fig. 2.11 Light intensity in cell suspension of *S. platensis* IAM135

2.4 結言

緑藻 *Chlorella* sp. UK001, ラン藻 *S. platensis* IAM135 の2種類の微細藻類細胞を用い，照射光強度と細胞の比増殖速度の関係および細胞懸濁液中での光強度の評価方法を検討し，以下の結果を得た．

(1) *Chlorella* sp. UK001 では，入射光強度 I_0 が 71.4～130 W m^{-2} において比増殖速度 μ の値は最大値を示したが，I_0 が 130 W m^{-2} 以上では μ の値はやや減少した．また，この細胞の光補償点は I_0 = 1.8 W m^{-2} と推定された．この結果から，照射光強度 I とこの細胞の比増殖速度 μ の関係を示す実験式が得られた．

(2) *S. platensis* IAM135 では，入射光強度 I_0 = 34 W m^{-2} のとき μ は最大値を示した．また I_0 = 34 m^{-2} 以上では細胞増殖は著しく阻害され，I_0= 158 W m^{-2} では細胞の増殖は完全に阻害された．この細胞の光補償点は I_0 = 8 W m^{-2} と推定された．さらに実験結果から，*Chlorella* 細胞と同様，照射光強度 I と細胞の比増殖速度 μ の関係を示す式が得られた．

(3) *Chlorella* sp. UK001, *S. platensis* IAM135 の細胞懸濁液を用いた光透過率の測定より，細胞種ごとに定義される有効吸収係数 α を求めた．そして，入射光強度，細胞濃度，光透過距離の値から Lambert-Beer の法則に基づき，培養液中の光強度が計算された．

第 3 章　光強度分布を考慮した微細藻類細胞のリアクターによる培養

3.1　緒言

リアクターを用いた微細藻類細胞の光独立栄養培養では，細胞はリアクターへの入射光強度に依存して増殖するが，ある形状のリアクターで得られた入射光強度と細胞増殖の関係には普遍性がなく，この関係から異なる形状のリアクターにおける細胞増殖を正確に予測することは困難である．光独立栄養条件下における細胞増殖は，細胞に照射される光強度に依存するので，リアクター内の光強度分布を考慮することにより，種々の形状のリアクターにおける細胞増殖を評価できると考えた．そこで，リアクター内の光強度分布を考慮した細胞増殖の計算手法を提案し，微細藻類の回分培養における細胞濃度変化，連続培養における細胞生産速度を計算した．また，連続培養において定常状態を得るための培養操作条件の決定方法についても検討し，本研究で提案した計算手法の有効性を確認した．

3.2　実験

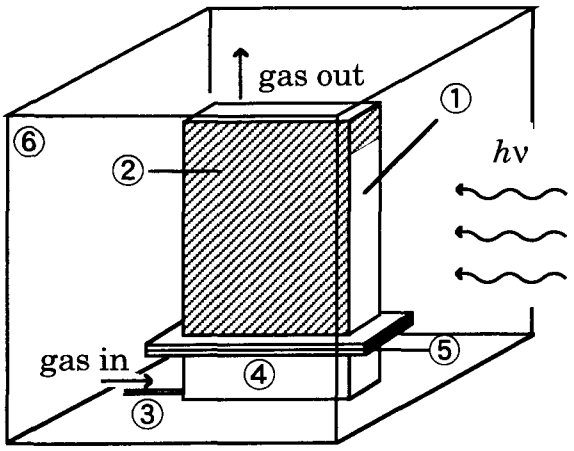
3.2.1　細胞と培養方法

本章では，*Chlorella* sp. UK001 および *S. platensis* IAM135 の 2 種類の微細藻類細胞を用いた．*Chlorella* sp.

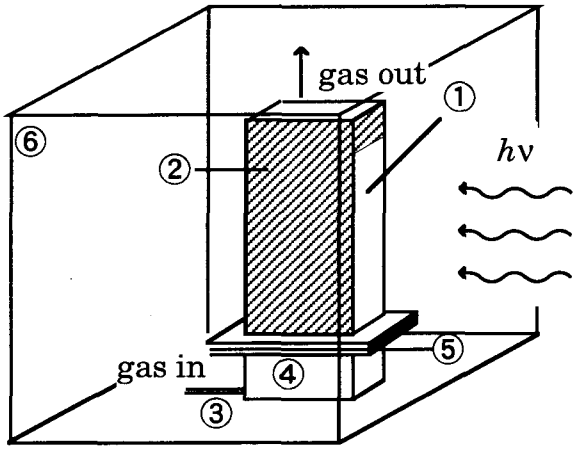
UK001の培養には改変Closterium培地(pH = 5.7)を用い，10% CO_2，3% O_2，87% N_2の組成のガスを培地中に通気した．また，*S. platensis* IAM135の培養にはSOT培地(pH = 9.0)を用い，1 % CO_2を含む空気を培地中に通気した．

Fig. 3.1に微細藻類細胞の回分培養および連続培養に用いた装置の概略図を示すとともに，**Table 3.1**に培養装置の主な仕様を示す．装置A，A'およびBはエアリフト型の角形リアクターであり，光照射面はPyrexガラス製，その他の部分はアクリル樹脂製とした．装置CはPyrexガラス製の扁平フラスコである．いずれの培養装置も，光照射面以外は光の透過を防ぐために黒色紙で覆った．光源として，15W白色蛍光灯(FL15SW，松下電器産業製)，150Wキセノンランプ(UXR-150MA，ウシオ電機製)，500Wキセノンランプ(UXL-500-O，ウシオ電機製)を用い,培養装置の片側一方向から光を連続照射した．入射光強度は，ランプの種類，個数または光源と培養装置との距離を変えることにより調節した．ランプの種類による細胞増殖の違いは見られなかった．また，いずれの培養装置も30 °Cに保持したインキュベートボックスの中に設置した．

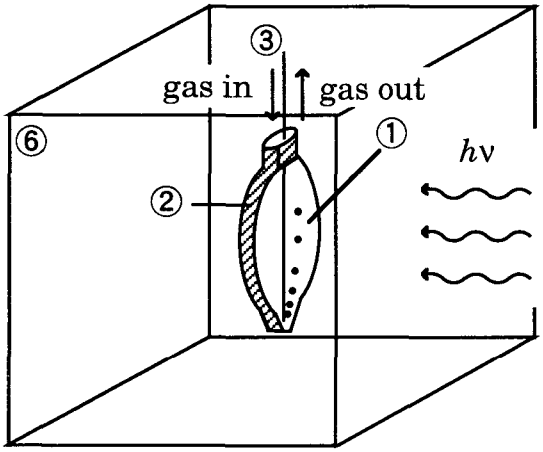
Chlorella sp. UK001の連続培養は，培養装置A'を用いて次の手順で行った．あらかじめオートクレーブで滅菌した培地に，温度30 °C，pH 5.7，入射光強度25 W m^{-2}



Apparatus A and A'



Apparatus B



Apparatus C

① irradiation face, ② black paper,
③ tubing for gas supplying,
④ packing of rasching rings, ⑤ dispersion plate,
⑥ thermostated chamber

Fig. 3.1 Schematic drawing of culture apparatuses for microalgal cells

Table 3.1 Specifications of culture apparatuses for microalgal cells

	Apparatus			
	A	A'	B	C
L_e [m]	0.156	0.156	0.05	0.02
A [m^2]	0.0115	0.0115	0.0115	0.005
V [dm^3]	1.8	2.0	0.58	0.1
Microalgal strains	*S. platensis* IAM135	*Chlorella* sp. UK001	*S. platensis* IAM135	*S. platensis* IAM135

の連続光照射下で 72～96 時間培養して得られた細胞懸濁液を，初期細胞濃度が 0.01 kg m^{-3} となるように添加し，回分培養を開始した．細胞濃度が増加した後，チューブポンプ(MP-3，東京理化製)を用いて新鮮培地を一定流速で培養液に添加すると同時に，培養液の一部をオーバーフローさせることにより連続培養操作を開始した．培養装置内の細胞濃度がほぼ一定となった後，引き続いて 24 時間以上連続培養操作を継続し，データを得た．なお，培養は開放系で行ったが，細胞増殖に影響を与えるような微生物の汚染は認められなかった．

S. platensis IAM135 の回分培養には，培養装置 A を用いた．あらかじめオートクレーブで滅菌した培地に，温度 30 °C，初期 pH 9.0，光強度 25 W m^{-2} の連続光照射下で約 170 時間培養した細胞懸濁液を，初期細胞濃度が 0.05 kg m^{-3} となるように添加し，回分培養を開始した．

S. platensis IAM135 の連続培養は，培養装置 A，B または C を用いて，次の手順で行った．あらかじめオートクレーブで滅菌した SOT 培地に，温度 30 °C，初期 pH 9.0，光強度 25 W m^{-2} の連続光照射下で約 170 時間培養した細胞懸濁液を，初期細胞濃度が 0.05 kg m^{-3} となるように添加し，まず回分培養を行った．細胞濃度が増加した後，高速液体クロマトグラフ用送液ポンプ(LC-6A，島津製作所製)またはチューブポンプ(MP-3，東京理化製)を用いて新鮮培地を一定流速で培養液に供給し，これと同時

に同じ流速でチューブポンプを用いて培養液を回収した．培養液中の細胞濃度が一定となり，培養系が定常状態であると認められた後，引き続いて24時間以上連続操作を継続し，データを得た．なお，培養は開放系で行ったが，微生物の汚染による細胞増殖への影響はなかった．

3.3 結果と考察

3.3.1 *S. platensis* IAM135の回分培養における細胞増殖の評価

光独立栄養条件下での微細藻類細胞の増殖は，細胞に照射される光強度に依存する．また，培養系に照射された光は細胞に吸収されて減衰するため，培養液中で光強度分布が生じる．そこで，一方向から光が照射される培養装置を用いた *S. platensis* IAM135の回分培養における細胞増殖を，培養系内の光強度分布を考慮した計算により評価した．培養系内の光強度分布および細胞増殖の計算を行うにあたり，次の仮定をおいた．(i)光照射面における光強度は均一である．(ii)培養系内では垂直方向の光強度分布は存在しない．(iii)培養液中の気泡や挿入物による光の反射，吸収は無視できる．(iv)細胞は培養液中で完全混合状態にある．

Fig. 3.2に，培養装置Aを用いた *S. platensis* IAM135の回分培養における細胞濃度の経時変化の計算方法について2つの手順を示す．手順IはCamacho-Rubio *et al.*

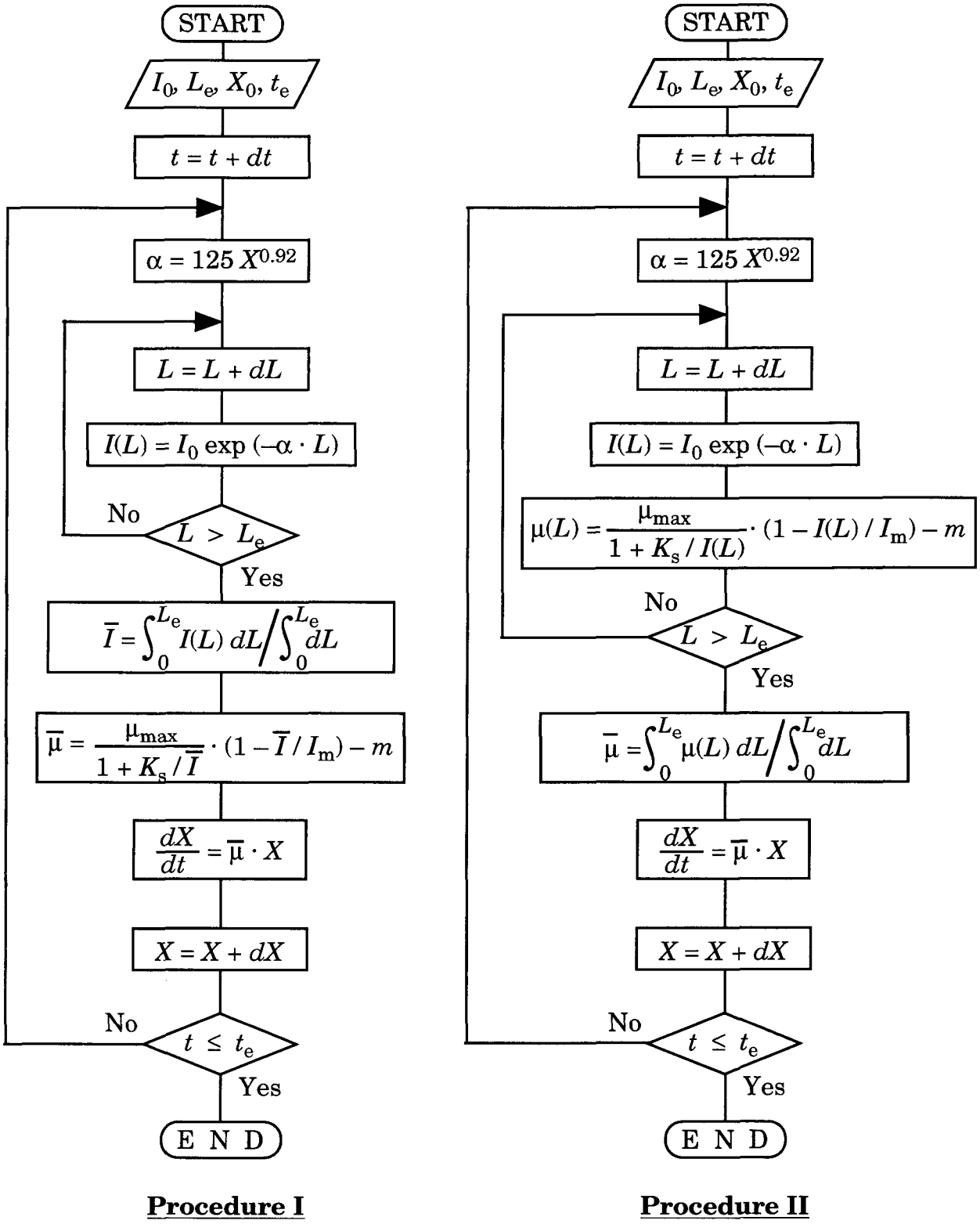


Fig. 3.2 Two methods for calculating growth of *S. platensis* IAM135 in batch culture

(1985)により，フォトバイオリアクター内の微細藻類細胞の増殖を評価するために提案された方法，手順IIは本研究で新たに提案する方法である．いずれの場合も，初期条件として，入射光強度I_0，培養装置の光透過方向の距離L_e，初期細胞濃度X_0，培養終了時間t_eを与えた．手順Iでは，培養系内の光強度分布の計算結果より，まず培養系内の平均光強度$\bar{I}$を求めた．そして培養装置内の細胞の比増殖速度は，光強度$\bar{I}$に対応する比増殖速度であると見なして，Eq. (2.4)とTable 2.3に示した定数値より培養系内の平均比増殖速度$\bar{\mu}$を求めた．この値と細胞濃度Xの値から，回分培養における細胞濃度の経時変化を計算した．**Fig. 3.3(A)**に，I_0 = 50, 150 W m^{-2}, L_e= 0.156 mのとき，手順Iに基づいて計算したXの経時変化を実線または破線で示す．一方，手順IIでは培養系内の光強度分布に対して，Eq. (2.4)とTable 2.3に示した定数値から比増殖速度の値をそれぞれ計算し，これらの平均値を培養系内の平均比増殖速度$\bar{\mu}$とした．そしてこの値と細胞濃度Xの値から，回分培養における細胞濃度の経時変化を計算した．**Fig. 3.3(B)**に，I_0 = 50, 150 W m^{-2}, L_e= 0.156 mのときの手順IIに基づいて計算されたXの経時変化を実線または破線で示す．

上記の2つの計算方法の妥当性を検討するため，培養装置Aを用いて*S. platensis* IAM135の回分培養を行った．Fig. 3.3(A)および(B)に，I_0 = 50または150 W m^{-2},

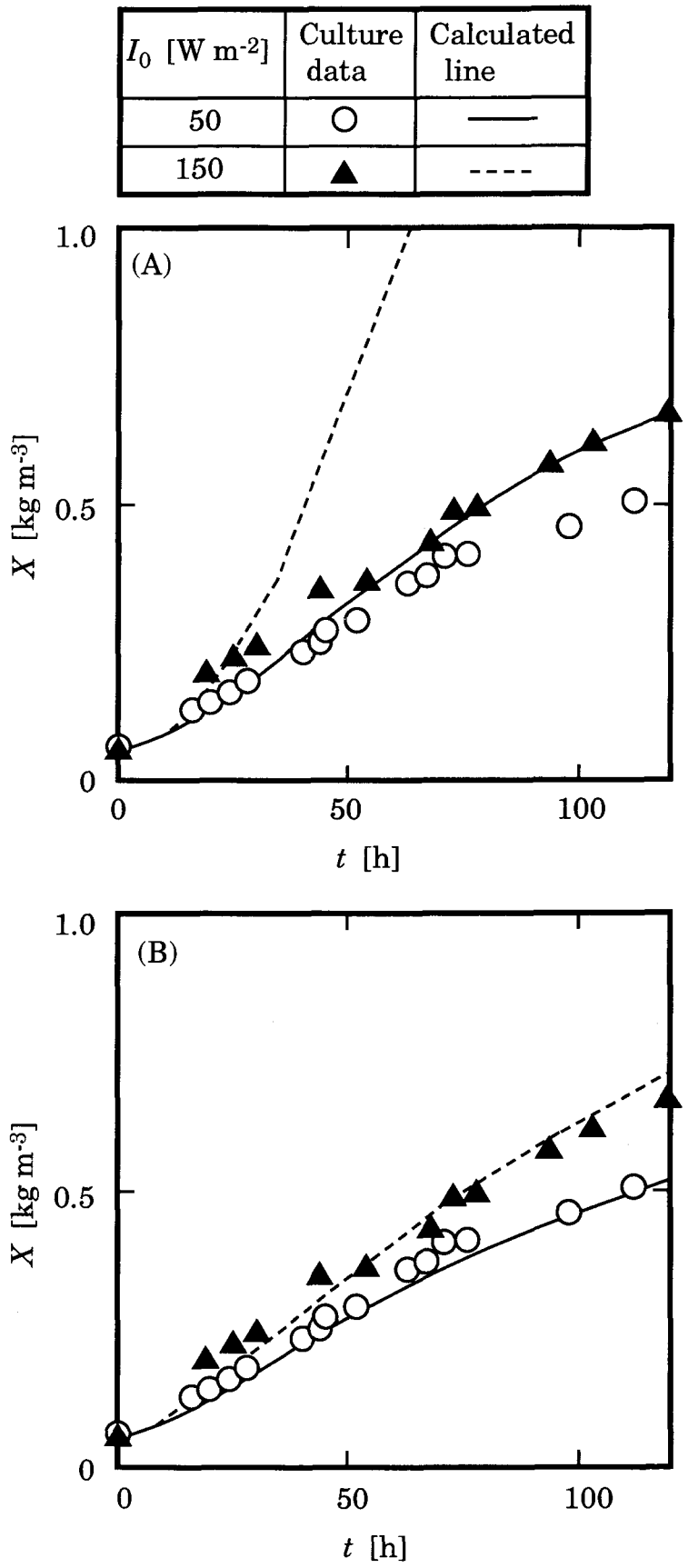


Fig. 3.3 Time courses of cell concentration in batch cultures of *S. platensis* IAM135

(A) Calculated by procedure I, (B) Calculated by procedure II

L_e= 0.156 m での培養実験から得られた細胞濃度の経時変化を示す．いずれの入射光強度の場合も，培養データは手順IIに基づいて計算された計算線とほぼ一致した．これに対し，手順Iによる計算線は培養時間とともに培養結果から大きくはずれ，計算値の方が細胞増殖速度を高く見積もっていることがわかった．特に，I_0 = 150 W m^{-2}のとき，I_0 = 50 W m^{-2}の場合よりも培養データからの偏奇が大きくなっていた．

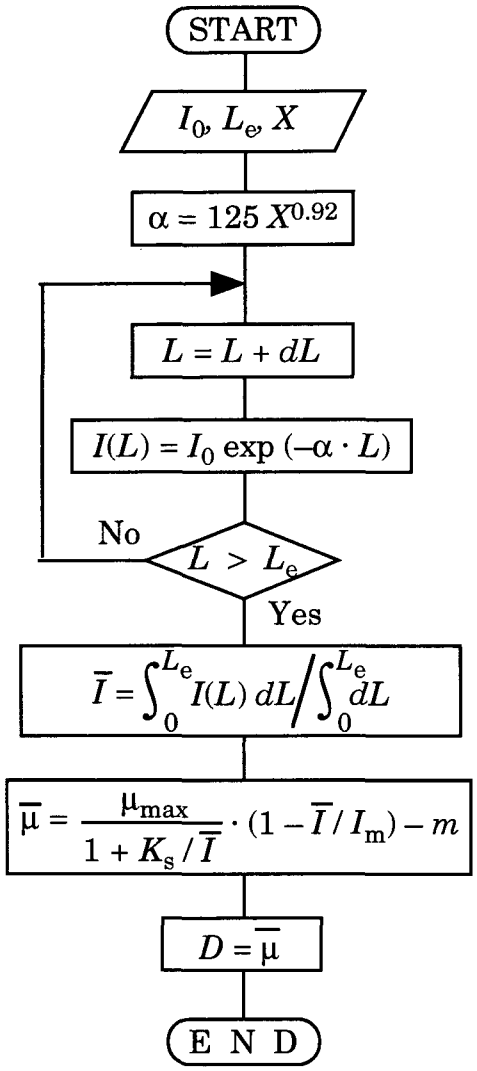
第2章で説明したように，*S. platensis* IAM135では34 W m^{-2}以下の光強度で細胞増殖が促進され，34 W m^{-2}以上の光強度で細胞増殖が阻害される．Camacho-Rubio *et al.*(1985)が提案した手順Iでは光強度の平均値から比増殖速度の平均値を計算するため，光強度による細胞増殖の促進と阻害の要素が比増殖速度の平均値の計算に正確に反映されていない．したがって*S. platensis* IAM135のように光阻害が著しい場合には，細胞増殖の評価方法として適切でないと考えられた．これに対し，培養装置内の光強度分布に対応して比増殖速度を計算し，その平均値から細胞濃度変化を計算する手順IIでは，回分培養における細胞増殖を正確に評価できることがわかった．

3.3.2 *S. platensis* IAM135の連続培養における希釈率の決定と細胞増殖の評価

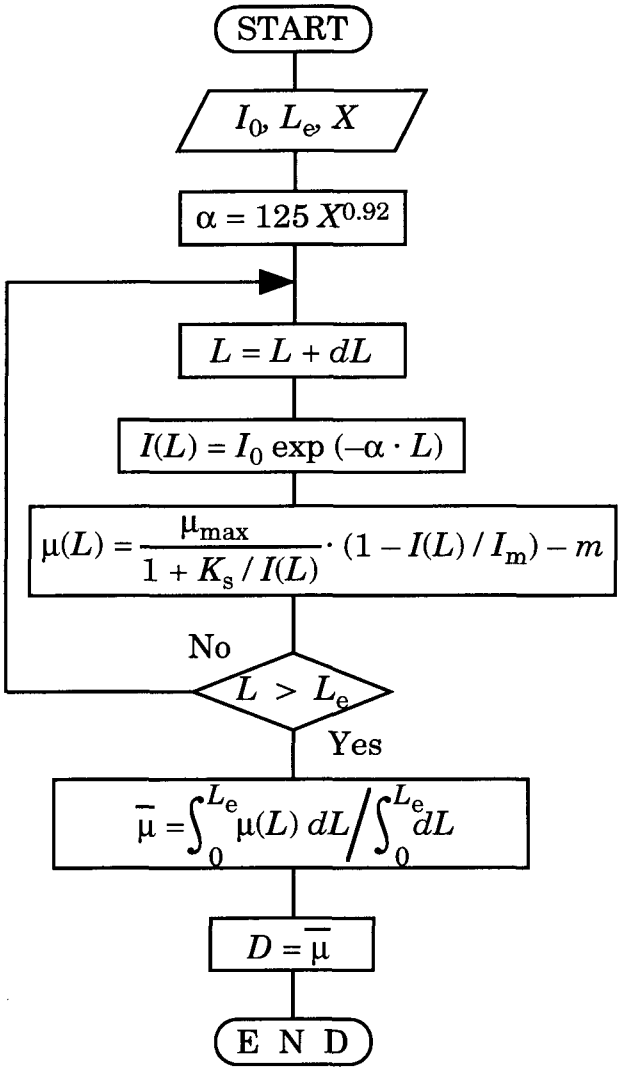
細胞の連続培養では新鮮培地の添加と培養液の回収を

同時に行うが，培養系が定常状態にあるときには細胞濃度が一定に保持される．培養装置内の光強度分布を考慮して，連続培養において細胞濃度を一定に保つための希釈率の決定方法を検討した．計算にあたっては，前項3.3.1で示したものと同様の仮定を採用した．

Fig. 3.4に，一方向から光を照射する培養装置を用いた*S. platensis* IAM135の連続培養において定常状態を得るための，希釈率の2つの計算手順を示す．手順Iは Camacho-Rubio *et al.* (1985)により，バイオリアクター内の微細藻類細胞の増殖を評価するために提案された方法，手順IIは本研究で新たに提案する方法である．いずれの場合も，初期条件として入射光強度I_0，培養装置の光透過方向の距離L_e，細胞濃度Xを与えた．手順Iでは，培養系内の平均光強度$\bar{I}$から培養系内の平均比増殖速度$\bar{\mu}$の値を求めた．連続培養において培養系が定常状態にあるときには，細胞の比増殖速度と希釈率Dは等しいと仮定できる．そこで，連続培養における細胞の比増殖速度の値が培養系内の平均比増殖速度$\bar{\mu}$に等しいと仮定し，希釈率Dの値を計算した．一方，手順IIでは，培養系内の光強度分布に対応した比増殖速度の値をそれぞれ求め，その平均を培養系内の平均比増殖速度$\bar{\mu}$の値とした．そして，手順Iの場合と同様に，連続培養における細胞の比増殖速度の値が培養系内の平均比増殖速度$\bar{\mu}$に等しいと仮定して，希釈率Dの値を決定した．



Procedure I



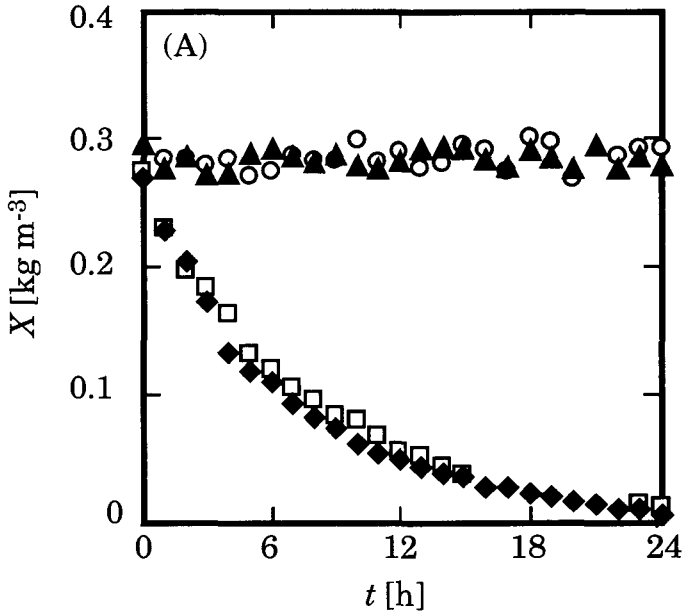
Procedure II

Fig. 3.4 Two methods for calculating dilution rate to keep a stable state in continuous culture of *S. platensis* IAM135

培養装置AおよびCを用い,入射光強度$I_0 = 400\ \mathrm{W\ m^{-2}}$の下で,Fig.3.4に示した方法で決定された希釈率Dに基いて*S. platensis* IAM135の連続培養を行った．培養装置Aでは細胞濃度の設定値X_iを$0.27\ \mathrm{kg\ m^{-3}}$，培養装置Cでは$X_i = 2.4\ \mathrm{kg\ m^{-3}}$とした．**Fig. 3.5**に，24時間の連続操作における細胞濃度Xの経時変化を示す．培養装置A($L_e = 0.156$ m)を用いた場合，手順Iによって決定されたDによる操作では，Xの値は時間とともに減少し，24時間後には細胞の大部分が流出した．一方，手順IIで計算されたDに基づく操作では，Xの値は幾分変動したもののほぼ一定の値を保った．培養装置B($L_e = 0.02$ m)を用いた場合も，手順Iから計算されたDに基づく操作ではXの値は時間とともに減少したが，手順IIで計算されたDによる操作ではXの値はほぼ一定であった．以上の結果より，手順Iに基づいて決定されたDの値で連続操作を行うと細胞がWash outするが，手順IIで計算されたDによる操作では培養系を定常状態に保持し，安定な連続操作ができることがわかった．

そこで，Fig. 3.4の計算手順IIに従って，一方向から光を照射するリアクターを用いた*S. platensis* IAM135の連続培養において，リアクター内を定常状態を保つためのXとDの関係を計算した．**Fig. 3.6**に，$I_0 = 25, 50, 400\ \mathrm{W\ m^{-2}}$のとき，$L_e = 0.02, 0.05, 0.156$ mの3種類の培養装置を用いた連続培養におけるXとDの関係を示す．

	Key	Determination procedure of D	Culture apparatus	L_e [m]	X_i [kg m^{-3}]	I_0 [W m^{-2}]
Run 1	□	Procedure I	A	0.156	0.27	400
Run 2	◆					
Run 3	○	Procedure II				
Run 4	▲					



	Key	Determination procedure of D	Culture apparatus	L_e [m]	X_i [kg m^{-3}]	I_0 [W m^{-2}]
Run 5	□	Procedure I	B	0.02	2.4	400
Run 6	◆					
Run 7	○	Procedure II				
Run 8	▲					

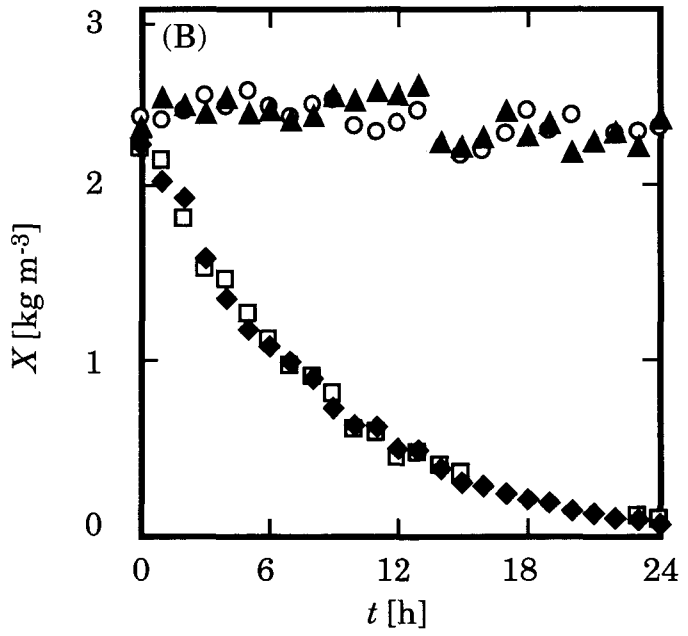


Fig. 3.5 Time courses of cell concentration in continuous cultures of *S. platensis* IAM135 operated at different values of dilution rates

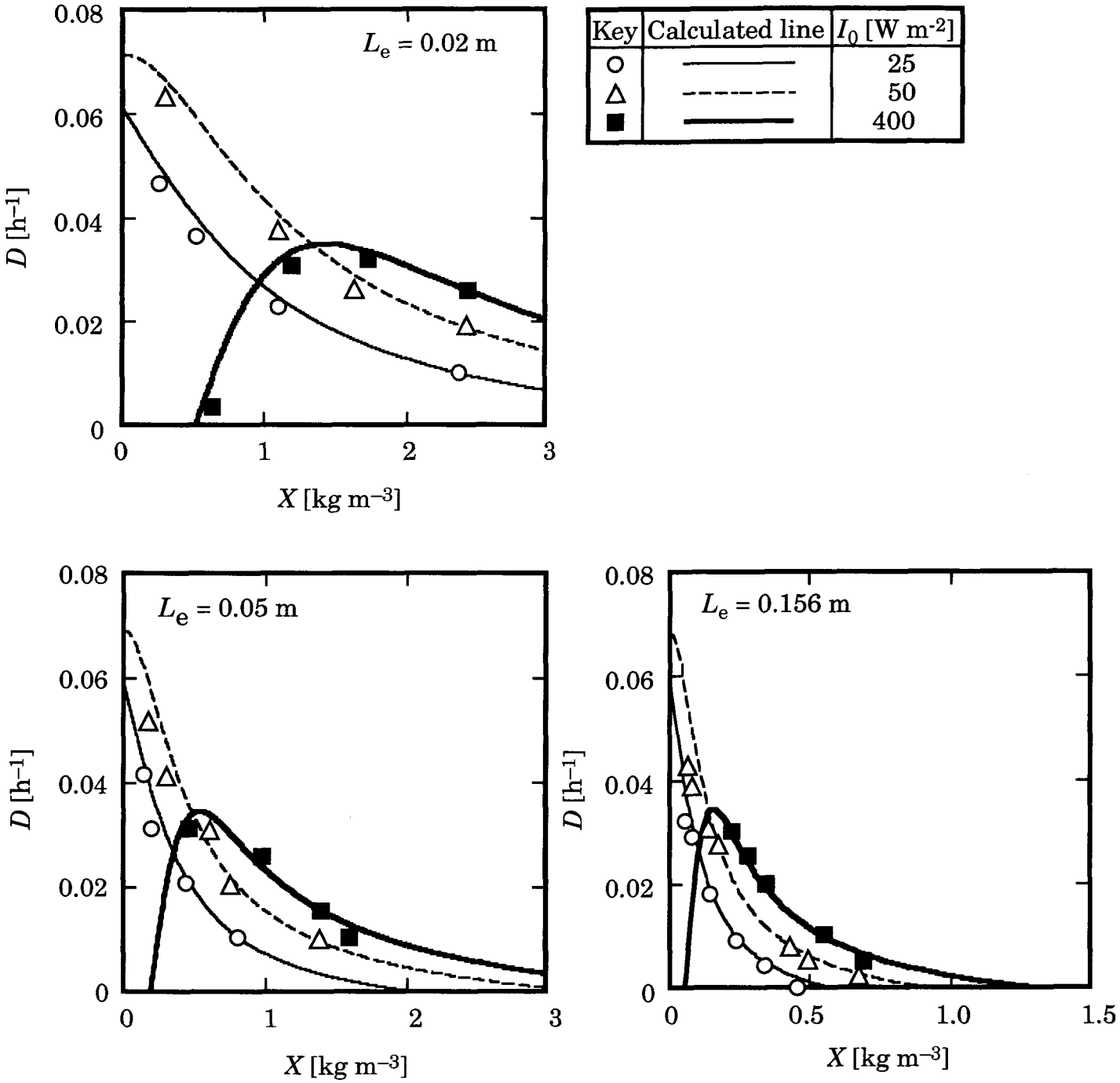


Fig. 3.6 Relationships between X and D in continuous cultures of *S. platensis* IAM135

いずれの条件の場合も，Xの値に対して，定常状態を得るためのDの値が求められたが，I_0 = 400 W m^{-2}の場合は，Xの値が小さいときDの値が存在しない場合があった．これはDの計算結果が負になったためで，照射光強度が強いために細胞の増殖阻害が起こり，細胞の死滅が増殖を上回るためと考えられる．一方，L_e = 0.156 mのときXの値が高くなると，定常状態を得るためのDの値が存在しなかった．これはXの値が高いために光照射面付近で光がほとんど吸収され，細胞増殖に必要な照射光強度が得られない細胞の割合が増えるためと考えられた．

Fig. 3.6に示したXとDの関係に基づいて，*S. platensis* IAM135の連続培養を行うときの細胞濃度とリアクターにおける細胞生産速度の関係を計算した．光透過方向の距離L_eが異なるリアクターでは，培養体積Vと光照射面積Aの比が異なるため，培養体積当たりの細胞生産速度を用いてリアクター相互の細胞生産性を比較することはできない．そこで，細胞生産速度を次式で計算される光照射面積当たりの細胞生産速度P_aで表わした．

$$P_a = P \cdot \frac{V}{A} = P \cdot L_e \qquad (3.1)$$

Fig. 3.7に，L_e = 0.02, 0.05, 0.156 mの3種類の培養装置を用いた場合の*S. platensis* IAM135の連続培養操作におけるXとP_aの計算結果を示す．L_eおよびI_0の値が決まれば，P_aの最大値を与えるXの値が決定できるこ

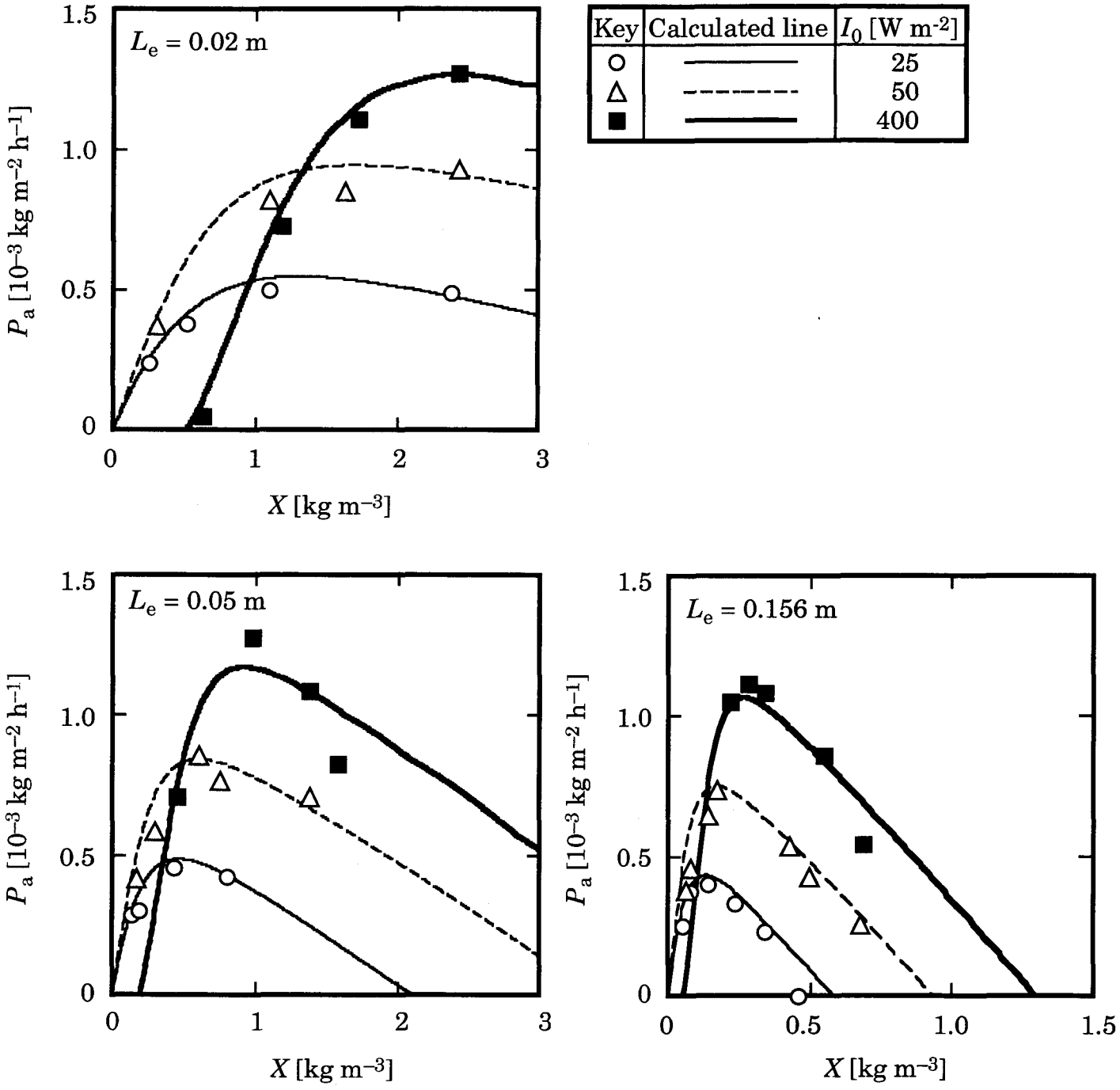


Fig. 3.7 Relationships between X and P_a in continuous cultures of *S. platensis* IAM135

とがわかった．また，L_eの値が同じ場合は，I_0の値が大きくなるほどP_aの値も増大することがわかった．一方，I_0の値が同じ場合は，L_e = 0.02 mのときがP_aの値が最も高く，L_e = 0.05, 0.156 mではやや低くなった．以上の結果より，一方向から光を照射するリアクターを用いた*S. platensis* IAM135の連続培養では，リアクターの入射光強度，光透過方向長さにより細胞生産速度を最大とする細胞濃度，希釈率などの培養操作条件が決まることがわかった．

以上の計算結果の妥当性を確認するため，L_eの値の異なる3種類の培養装置A，B，Cを用い，I_0 = 25,50,400 W m^{-2}の光を連続照射して*S. platensis* IAM135の連続培養を行った．Fig. 3.6にXとDの測定結果を，Fig. 3.7にXとP_aの測定結果をそれぞれ示す．いずれの条件においても，実験データは計算線とほぼ一致した．

3.3.3 *Chlorella* sp. UK001の連続培養における細胞増殖の評価

S. platensis IAM135の細胞増殖を評価するために用いた手法が他の細胞にも適用できることを確かめるため，培養装置A'を用いて入射光強度I_0 =71.4および55.8 W m^{-2}の連続光照射の下で，*Chlorella* sp. UK001の連続培養を行った．**Fig. 3.8(A)**に，希釈率Dと細胞生産速度P (= $D \cdot X$)の関係を示す．I_0 =71.4 W m^{-2}の場合，D = 0.019

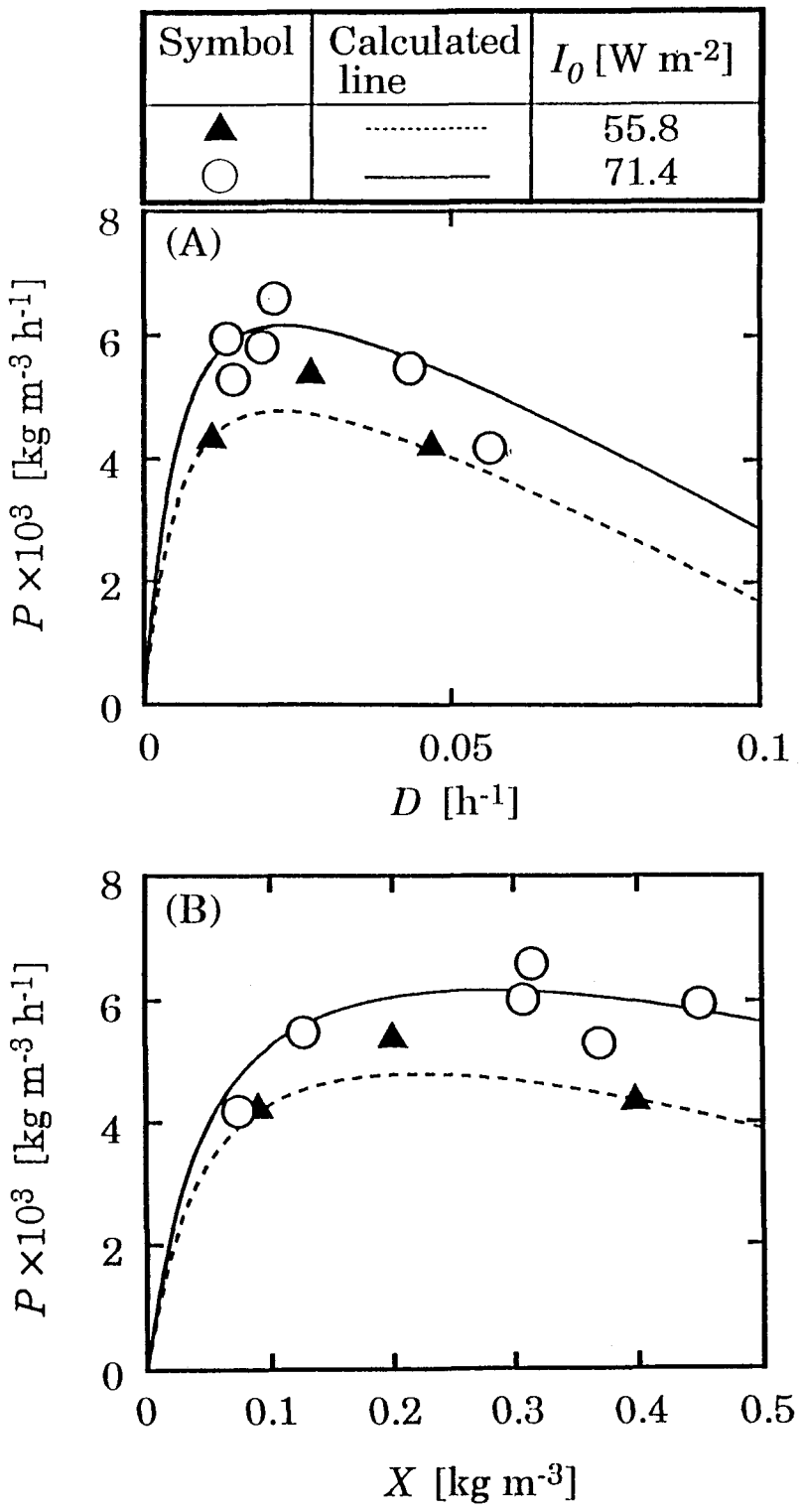


Fig. 3.8 Continuous culture of *Chlorella* sp. UK001 using a culture apparatus A'
(A) Relationship between dilution rate and production rate of cells.
(B) Relationship between cell concentration and production rate of cells.

～0.021 h^{-1}のとき P = 5.8×10^{-3}～6.6×10^{-3} kg m^{-3} h^{-1}となったが，D = 0.043および0.056 h^{-1}のときにはPの値はやや減少した．I_0 =55.8 W m^{-2}の場合，D = 0.011 h^{-1}のとき P = 4.3×10^{-3} kg m^{-3} h^{-1}，D = 0.027 h^{-1}のとき P = 5.4×10^{-3} kg m^{-3} h^{-1}，D = 0.047 h^{-1}のとき P = 4.2×10^{-3} kg m^{-3} h^{-1}となった．

Fig. 3.8 (B)には，Fig. 3.8(A)で示した連続培養における細胞濃度Xと細胞生産速度Pの関係を示す．I_0 =71.4 W m^{-2}の場合，Pの値はXの増加とともに増大し，X = 0.32 kg m^{-3}のときには P = 6.6×10^{-3} kg m^{-3} h^{-1}となった．Xの値が0.32 kg m^{-3}以上のときはPの値はやや減少した．一方，I_0 =55.8 W m^{-2}の場合，X = 0.20 kg m^{-3}のときに P = 5.4×10^{-3} kg m^{-3} h^{-1}となった．これらの結果より，ある入射光強度の下での微細藻類細胞の連続培養では，細胞生産速度の最大値を与える希釈率と細胞濃度が存在することがわかった．

S. platensis IAM135の細胞増殖を評価した手法を用い，Fig. 3.8に示した*Chlorella* sp. UK001の連続培養におけるDとPおよびXとPの関係を計算した．計算手順を**Fig. 3.9**に示す．初期条件として入射光強度I_0，細胞濃度Xおよび培養装置の光照射方向長さL_eを与えた．培養装置A'ではL_e = 0.156 mである．また，この細胞のXとαの関係はEq.(2.6)を，照射光強度と細胞の比増殖速度の関係はEq.(2.4)とTable 2.4の定数値を用いた．そ

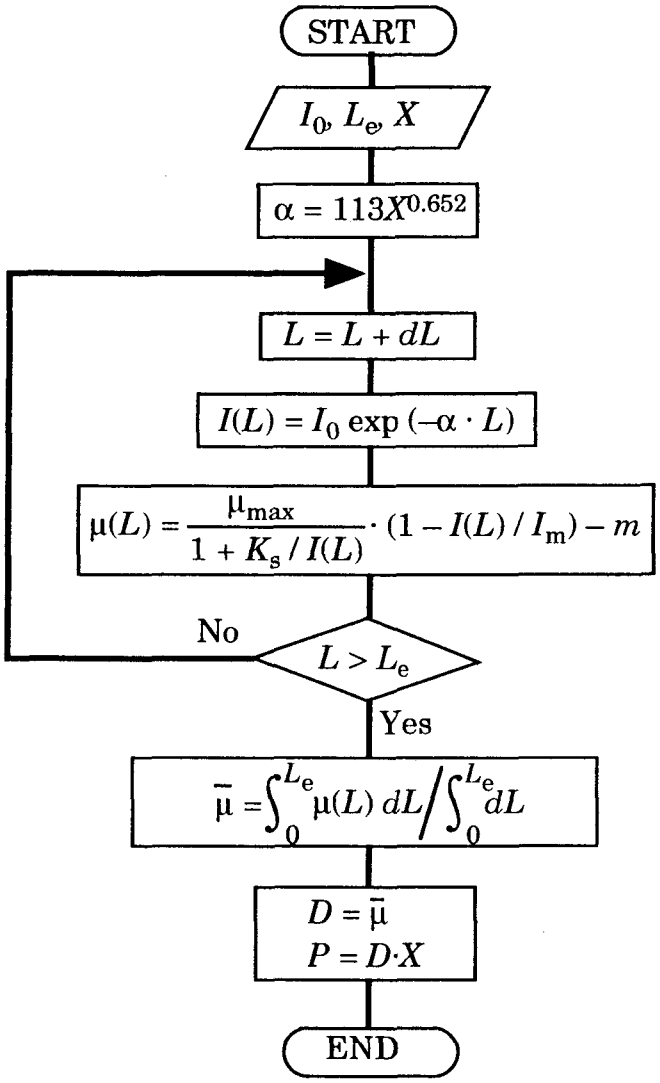


Fig. 3.9 Calculation method of production rate of cells in continuous culture of *Chlorella* sp. UK001

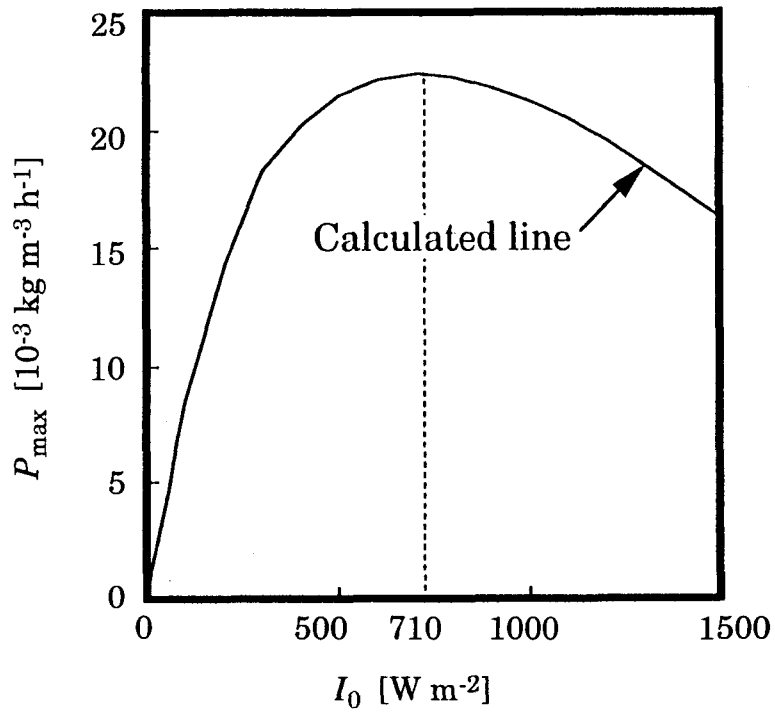


Fig. 3.10 Relationship between incident light intensity and P_{max} in continuous culture of *Chlorella* sp. UK001 using culture apparatus A'

して，培養装置内の光強度分布に対応する比増殖速度の値を求め，その平均を培養装置内の比増殖速度の平均値とする方法により，DとPおよびXとPの関係を計算した．計算結果を Fig. 3.8(A)および(B)に，実線および破線で示すが，いずれの関係においても，計算結果は培養データとほぼ一致した．入射光強度I_0が 55.8 W m^{-2}の場合，D= 0.0218 h^{-1}のときPの最大値 4.8×10^{-3} kg m^{-3} h^{-1}が得られた．また，入射光強度I_0が 71.4 W m^{-2}の場合，D= 0.0220 h^{-1}のときPの最大値 6.2×10^{-3} kg m^{-3} h^{-1}が得られた．細胞生産速度Pと細胞濃度Xの関係の計算結果を Fig. 3.8 (B)に実線および破線で示す．計算結果は培養データと一致し，それぞれの入射光強度においてPの最大値を与えるXの値が存在した．

以上の結果から，リアクターを用いた微細藻類細胞の連続培養においては，Pの最大値は入射光強度I_0の値によって決まり，I_0に値に応じて希釈率Dを調節することにより，リアクターによる細胞生産速度を最大にすることができることがわかった．**Fig. 3.10** に培養装置 A'を用いた *Chlorella* sp. UK001 の連続培養における入射光強度I_0と細胞生産速度の最大値P_{max}の計算結果を示す．この条件では，I_0 = 710 W m^{-2}のときP_{max}の最大値が得られることがわかった．

3.3.4 入射光強度の変化に対応した *S. platensis* IAM135の連続培養

微細藻類の細胞生産を目的とした商業的な培養では，光源として太陽光の利用が考えられるが，この場合は培養系への入射光強度が時間とともに変化する．そこで，入射光強度の変化に対応して希釈率の値を調節することで定常状態を維持することを考え，L_e = 0.02 m および 0.156 m の培養装置を用いて *S. platensis* IAM135 の連続培養を行った．培養実験では I_0 の値を 25～400 Wm^{-2} の範囲で変化させたが，実験期間中の I_0 の平均値は 169 W m^{-2} であった．そこで連続培養における初期細胞濃度として，I_0 = 169 W m^{-2} において P_a の最大値を得るための X の値を採用し，L_e = 0.02m のとき X = 2.3 kg m^{-3}，L_e = 0.156m のとき X = 0.24 kg m^{-3} とした．**Fig. 3.11** に，入射光強度と細胞濃度の経時変化を示す．L_e = 0.02m の培養装置を用いた培養では X の値が幾分変化したものの，ほぼ一定の値を維持した．また L_e = 0.156m の場合には，X は培養期間中一定の値を示した．この結果より，あらかじめ与えられた X の値と入射光強度の値より計算された D の値に基づく連続操作により微細藻類細胞の連続培養において定常状態を維持できることが確かめられた．

Fig. 3.12(A) に，L_e の値が異なる培養装置を用いた *S. platensis* IAM135 の連続培養における入射光強度 I_0 と

	Key	L_e [m]	X_i [kg m^{-3}]
Run1 Run2	● ○	0.02	2.20
Run3 Run4	▲ △	0.156	0.24

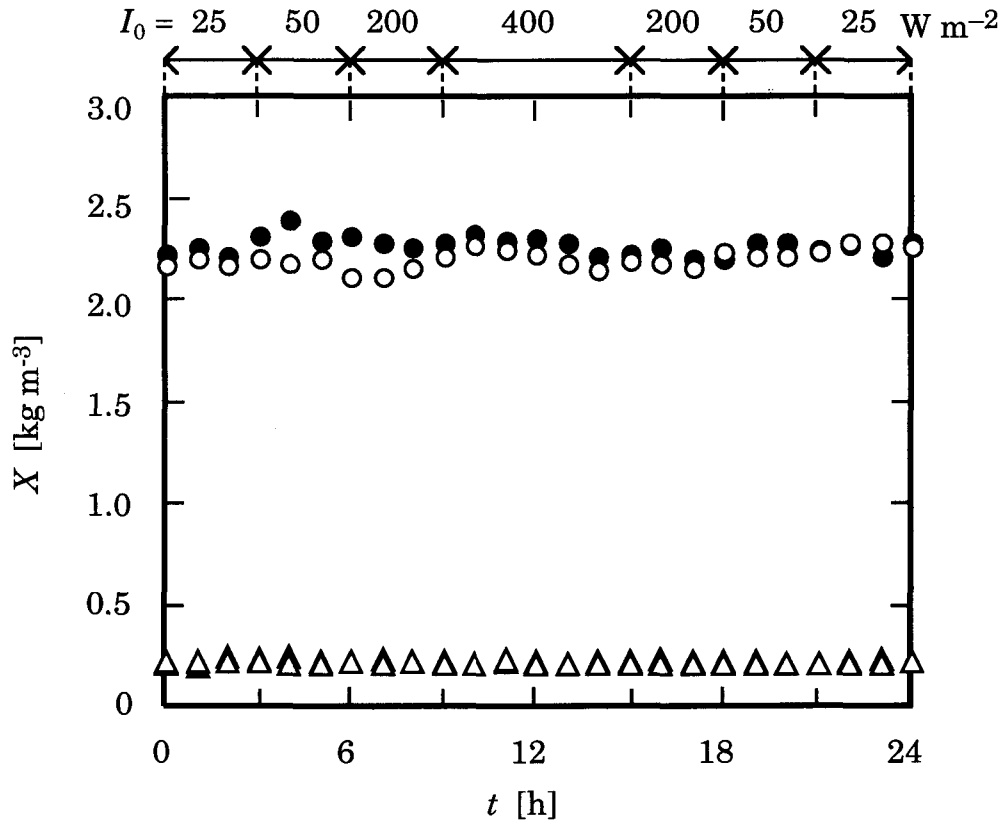


Fig. 3.11 Time courses of cell concentration in continuous cultures of *S. platensis* with change in incident light intensities

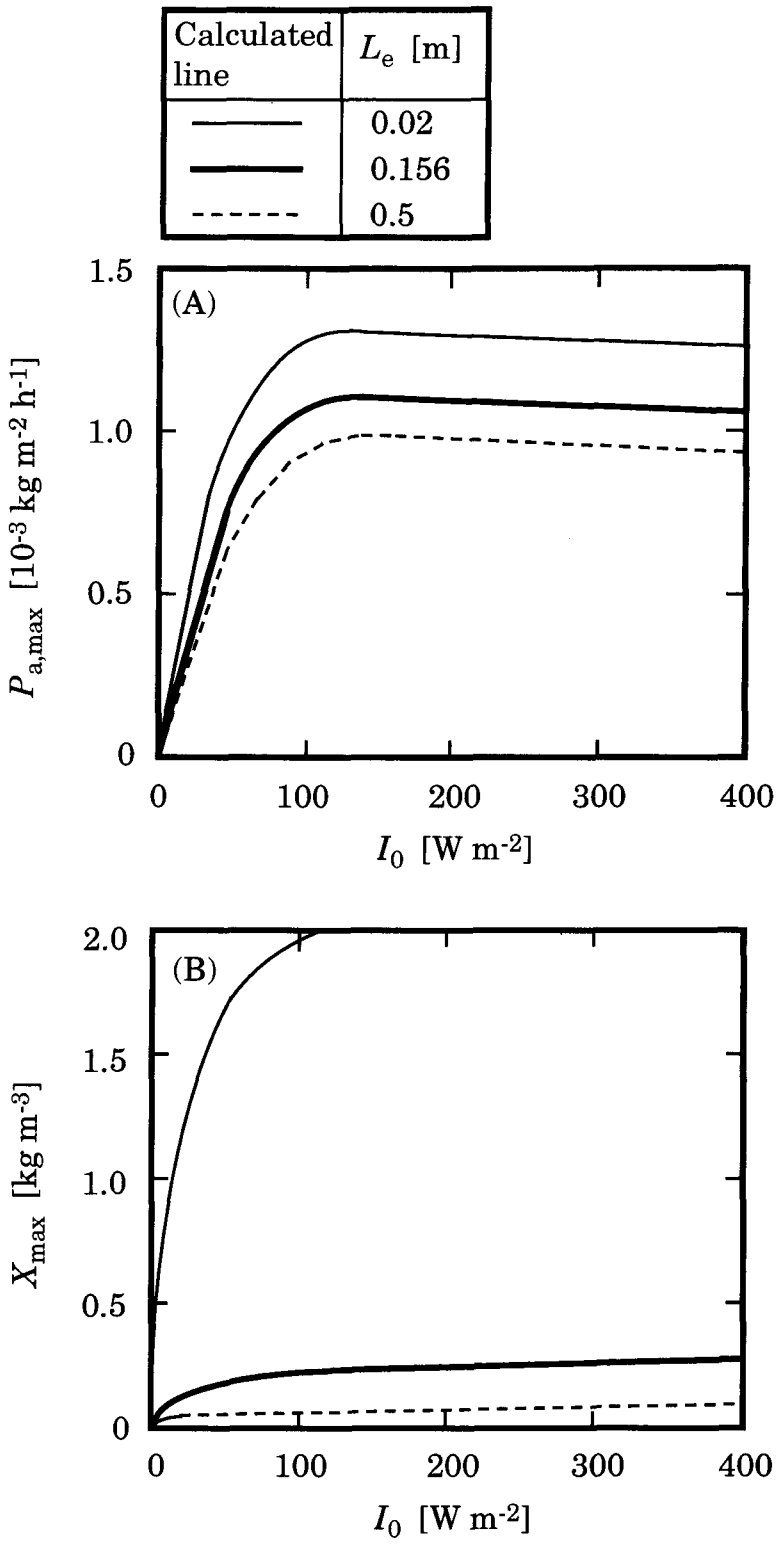


Fig. 3.12 Calculated results in continuous culture of *S. platensis* IAM135 using bioreactors with various L_e values
(A) Relationship between I_0 and $P_{a,max}$
(B) Relationship between I_0 and X_{max}

P_a の最大値 $P_{a,max}$ の関係の計算結果を示す．**Fig. 3.12(B)**には，$P_{a,max}$ を与える X の値 X_{max} と I_0 の関係の計算結果を示す．I_0 と $P_{a,max}$ の関係において，I_0 が 0～120 W m^{-2} のときには I_0 の値の増加とともに $P_{a,max}$ の値が増加したが，I_0 が 120 W m^{-2} 以上では $P_{a,max}$ の値は L_e の値に応じてほぼ一定となった．一方，I_0 と X_{max} の関係では，I_0 の増加とともに X_{max} の値も増加したが，L_e = 0.02, 0.05 m のときは，X_{max} が大きく増加したのに対して，L_e が 0.156 m 以上のときは，X_{max} の増加はわずかであった．

したがって，L_e の値が 0.15 m 以上のリアクターを用いて *S. platensis* IAM135 の連続培養を行う場合，120 W m^{-2} 以上の範囲での入射光強度の変化に対しては，細胞濃度をほとんど変化させなくても $P_{a,max}$ に近い値の細胞生産速度が得られることがわかった．

3.4 結言

Chlorella sp. UK001 および *S. platensis* IAM135 を用いた培養結果より，リアクターによる微細藻類の回分培養および連続培養における細胞増殖について，次の知見を得た．

(1) リアクター内の光強度分布に対応する細胞の比増殖速度計算し，その平均値を求めることで，回分培養における細胞濃度変化，連続培養における希釈率，細胞濃度，

細胞生産速度の関係が計算できた．また，同様の方法により連続培養において定常状態を保つための操作条件が決定された．

(2) (1)の計算手法は，リアクターの形状，細胞の種類に関係なく有効であった．またこの手法を用いることにより，リアクター形状，入射光強度のデータより，リアクターの細胞生産速度を最大にする培養条件を決定できることがわかった．

(3) (1)の計算手法に従い，入射光強度の変化に対応して希釈率の値を調節する連続培養操作を行い，安定した連続培養操作ができることを確かめた．

第 4 章　太陽光集光型バイオリアクターによる細胞の増殖と生産

4.1　緒言

微細藻類細胞の増殖速度は，光を照射する光独立栄養条件，光混合栄養条件の場合の方が従属栄養条件の場合よりも高いので，細胞生産を目的とした微細藻類の培養は光照射条件下で行われる．また，商業的な規模での培養プロセスでは，培養コストの点から光源として太陽光が用いられるのが一般的である．

太陽光を利用して微細藻類を培養するためのバイオリアクターとしては，培養液の液面で太陽光を受光し，培養液中の細胞に直接照射するオープンポンド型バイオリアクターがすでに実用化されているが，以下のような問題点が指摘されている．(1) 設置場所の環境条件が細胞の培養条件に強く影響するために，培養温度が外気温とともに大きく変動したり，水蒸気の蒸発や降雨により培地中の栄養塩類濃度の変化が起こる(Mori, 1985). (2) 他の微生物による培地の汚染が起こりやすく，細胞増殖速度や生産物の品質に大きな影響を与える．(3) 培養液中で，光照射面(水面)からの距離に応じて光強度分布が生じる．その結果，水面付近では強い太陽光の照射によって細胞増殖が阻害を受ける一方で，培養槽の底部では光合成反応に必要な光強度が得られない．(4) 風によって

培養液面が波立つために太陽光が水面で反射され，照射光の30%以上が水面で失われる(Goldman, 1979).

このような問題点に対し，培養系と外部環境を隔離し，培養条件の厳密な制御が可能なバイオリアクターとして，太陽光を集光して光ファイバーで伝送し，培養槽内部から照射する方式の集光型バイオリアクターが検討されている．本章では，光の集光方法の異なる2種類の集光型バイオリアクターを試作し，光照射性能の測定実験，および *Chlorella* sp.UK001の培養実験を行い，集光型バイオリアクターの性能を明らかにした．

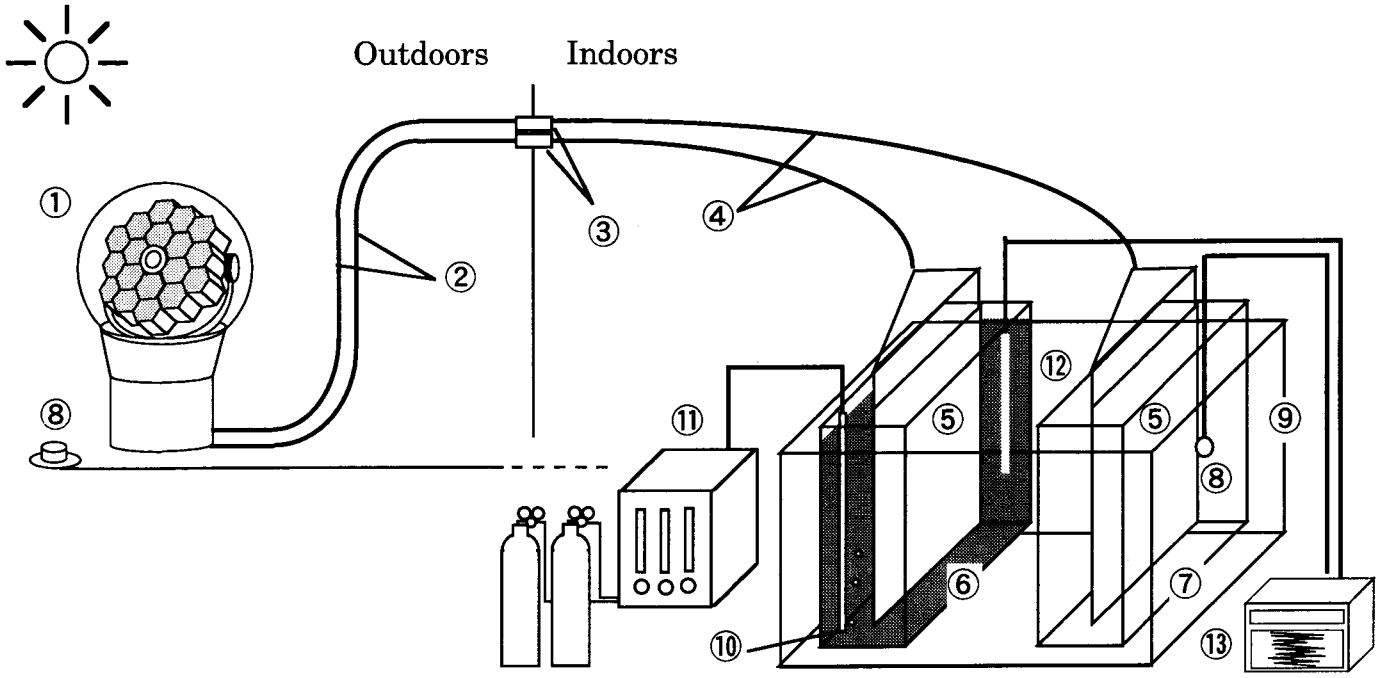
4.2 実験

4.2.1 細胞と培地

本章では,微細藻類細胞として単細胞緑藻の *Chlorella* sp. UK001 を用いた．培養は改変 Closterium 培地(pH 5.7)を用い，温度 30 °C，10% CO_2，3% O_2，87% N_2 の組成の混合ガスを培地中に通気して行った．

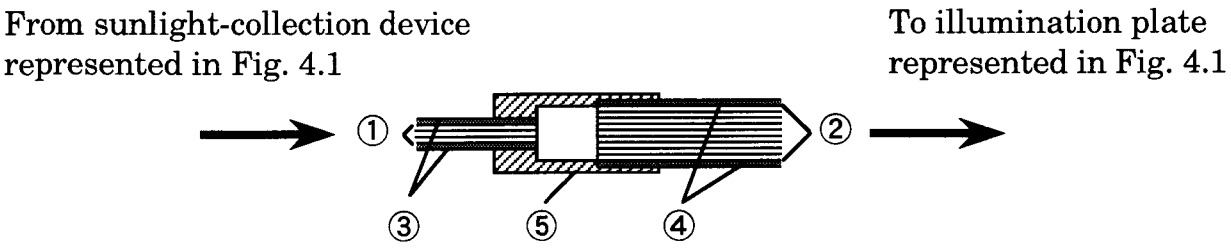
4.2.2 レンズ集光型バイオリアクター

レンズ集光型バイオリアクターは，レンズ型太陽光集光装置，光を伝送するための光ファイバーケーブル，細胞に光を照射するための発光担体および細胞を培養するための角形培養槽から構成された．レンズ集光型バイオリアクターの概略図を **Fig. 4.1** に示す．



① sunlight-collection device with 18 Fresnel lenses, ② 9 quartz optical fibers (3 m), ③ connecting joint, ④ 133 plastic optical fibers (4.5 m), ⑤ illumination plate, ⑥ fermentor for cultivation, ⑦ fermentor for measurement of light intensity, ⑧ quantum sensor, ⑨ thermostatically controlled water bath, ⑩ glass tube for aeration, ⑪ gas mixer, ⑫ pH electrode, ⑬ recorder

Fig. 4.1 Schematic drawings of a photobioreactor equipped with a lens-type sunlight collection device



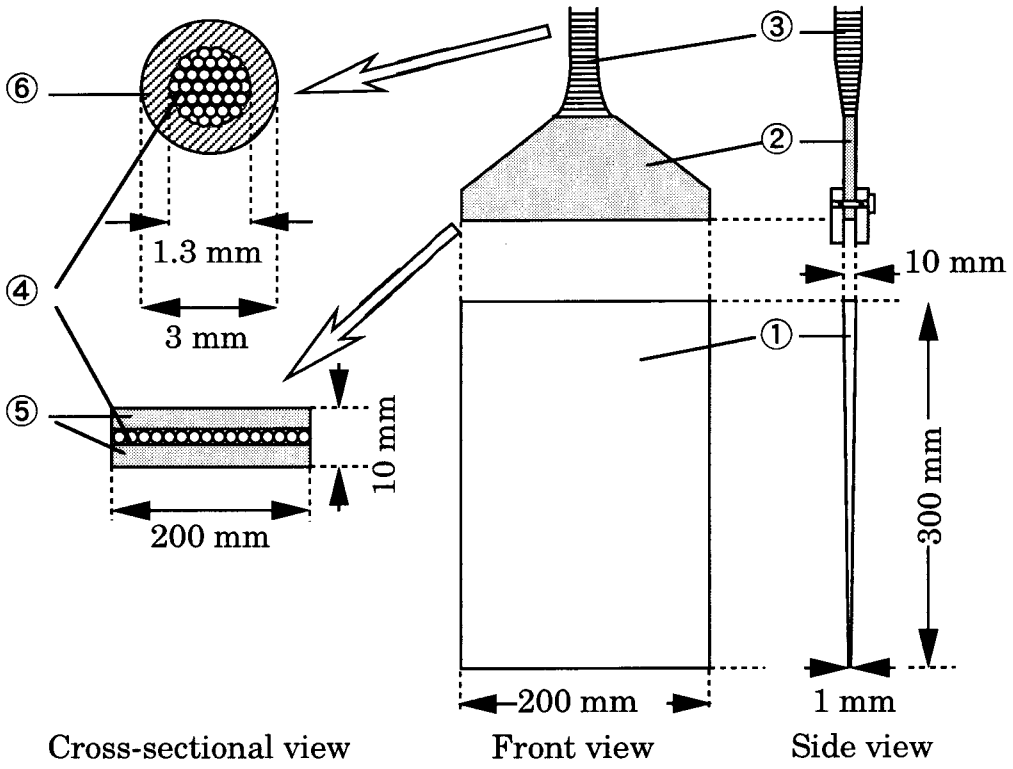
① 9 quartz optical fibers (0.8 mm ϕ, 3 m), ② 133 plastic optical fibers (1.5 mm ϕ, 4.5 m), ③ plastic tube, ④ stainless steel tube, ⑤ joint of plastic

Fig. 4.2 Configuration of connecting joint

太陽光の集光には，Fresnelレンズを備えた市販の太陽光集光装置(XD-50，ラフォーレエンジニアリング製)を用いた．太陽光集光装置を屋外に設置し，センサーと内蔵のプログラムにより，レンズの光軸が常に太陽の方向と一致するように自動制御した．太陽光はFresnelレンズで集光され，集光装置内部の石英ガラス製光ファイバー(直径0.8 mm，長さ3 m)の末端に焦点を結んだ．集光装置1台あたり18個のFresnelレンズで太陽光を集光し，集光された光は18本の光ファイバーで集光装置からジョイントまで伝送された．なお，18本の光ファイバーは9本ずつプラスチック製のチューブに収納され，2本の光ファイバーケーブルとした．

太陽光集光装置から出た2本の光ファイバーケーブルは，プラスチック製ジョイントでそれぞれ2本の光ファイバーケーブルと接続し光を伝送した．ジョイントと発光担体の間は，プラスチック製光ファイバー(直径 1.5 mm，長さ1.8 m) 133本をステンレス製のフレキシブル管に収納した光ファイバーケーブルで連結した．光ファイバーケーブルとプラスチック製ジョイントの概略図を **Fig. 4.2** に示す．

培養槽内で細胞に光を照射するために，Pyrexガラス製の発光担体を用いた．**Fig. 4.3** に，ガラス製発光担体の概略図を示す．この発光担体は，発光担体表面における光強度分布を少なくするため，発光担体表面をスリ加



① illumination plate made of Pyrex glass, ② 133 plastic optical fibers covered with stainless steel plates, ③ 133 plastic optical fibers covered with a stainless steel tube, ④ 133 plastic optical fibers, ⑤ stainless steel plates, ⑥ stainless steel tube

Fig. 4.3 Configuration of illumination plate of glass

工するとともに形状を楔形とした．発光担体の光照射面積は，0.12 m^2であった．実験には発光担体を2枚用い，発光担体1枚と光ファイバーケーブル1本を接続した．そしてアクリル樹脂製の角形培養槽(320×240×46mm) 2台の中央部に発光担体それぞれ1枚ずつ固定し，1台の培養槽を細胞の培養用，他方を照射光強度の測定用とした．なお，培養槽の周囲をアルミホイルで覆い，外部への光の漏れおよび外部からの光の侵入を防いだ．培養槽内部の照射光強度は，発光担体表面から10 mm離れた位置において，光量子センサー(QSL-100, Biospherical Instruments Inc.製)を用いて測定した．

本研究で用いた集光装置，光ファイバーケーブル，発光担体の仕様を**Table 4.1**にまとめる．

4.2.3 レンズ集光型バイオリアクターを用いた *Chlorella* sp. UK001の回分培養

レンズ集光型バイオリアクターを用いて*Chlorella*細胞の回分培養を行った．培養槽に3 dm^3の培地を入れ，細胞への炭素源の供給と培養液の撹拌のために，培養槽の角に設置した直径1.5 mmのガラス管より混合ガスを30 $dm^3\ h^{-1}$の一定流速で通気した．そして，無菌培養した細胞懸濁液を細胞濃度が0.01 kg m^{-3}となるように培地に添加し，培養を開始した．培養実験は兵庫県明石市の川崎重工業(株)明石技術研究所にて，1994年9月13

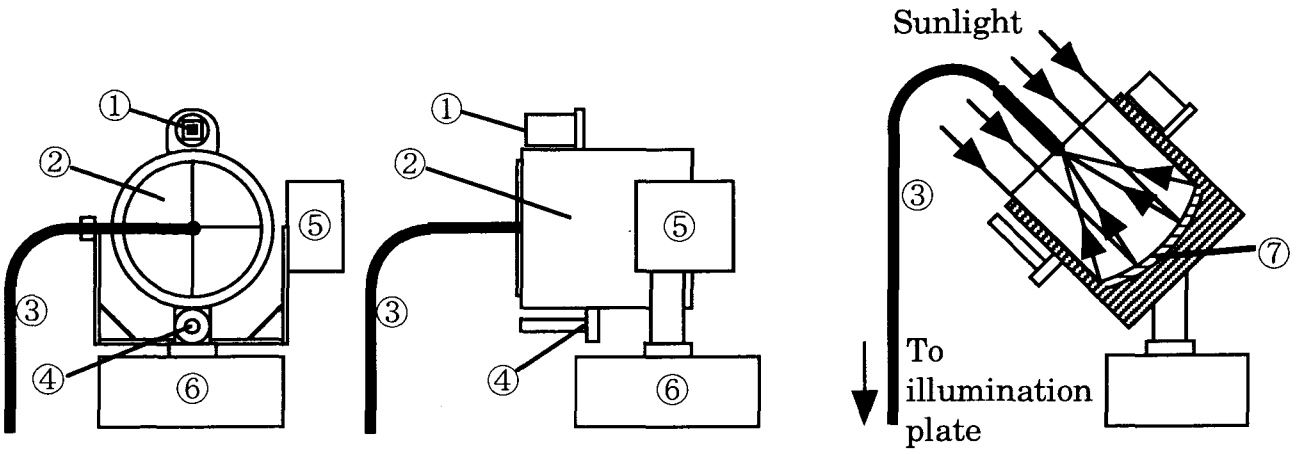
Table 4.1 Specifications of sunlight-collection devices and illumination plates

		Lens-type sunlight collection		Mirror-type sunlight collection
Sunlight-collection device				
Sunlight-collection method		Fresnel lens		Concave mirror
Area for light collection [m^2]		0.0293		0.0707
Optical fiber cable				
Material		Quartz glass	Plastic	Quartz glass
Length	[m]	3	1.8	10
Diameter of fiber	[mm]	0.8	1.5	1.4
Number of fibers	[–]	9	133	19
Illumination plate				
Material		Pyrex glass		Acrylic resin
Irradiation area	[m^2]	0.12		0.156
Length	[m]	0.3		0.6
Volume	[m^3]	0.0006		0.0018
Weight	[kg]	0.78		2.1

日から21日まで行った．この間，他の微生物の汚染による増殖への影響は認められなかった．

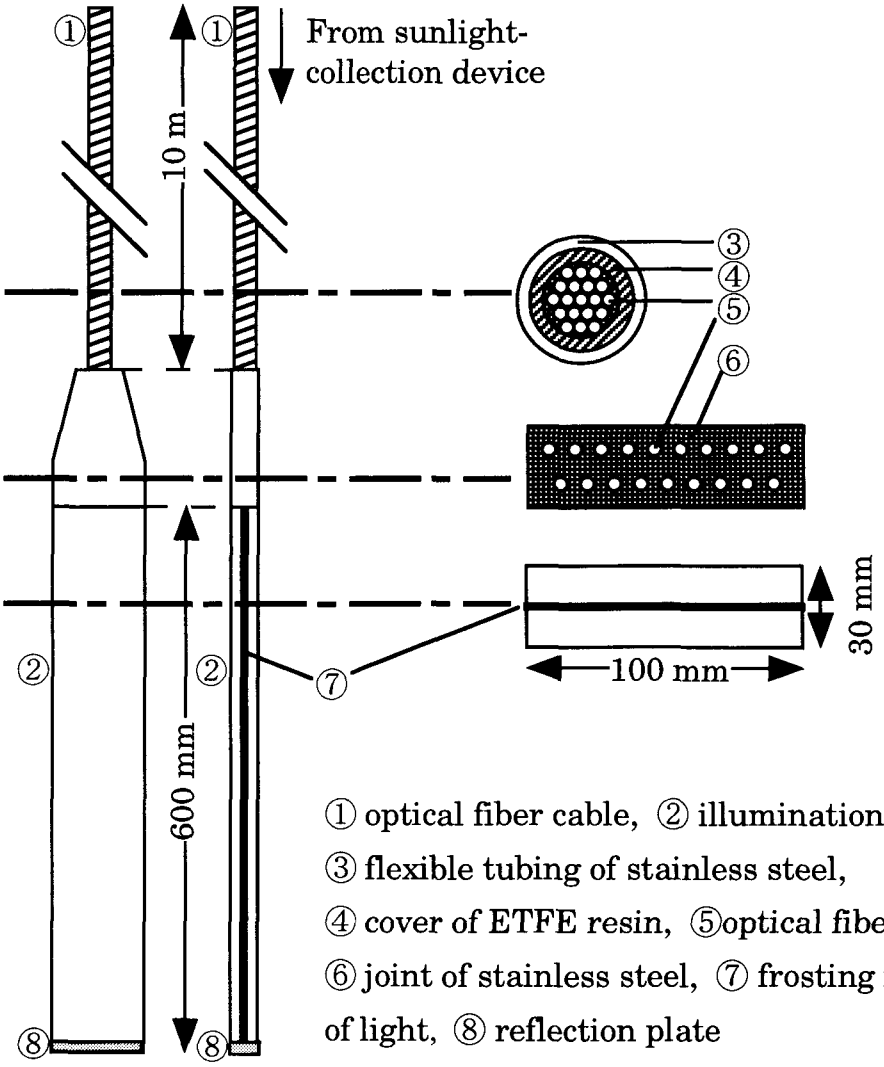
4.2.4　ミラー集光型バイオリアクター

ミラー集光型バイオリアクターは，ミラー型太陽光集光装置，集光装置から培養槽へ光を伝送するための光ファイバーケーブル，細胞に光を照射するためのアクリル樹脂製発光担体およびエアーリフト型培養槽から構成された．**Fig. 4.4**に，ミラー型太陽光集光装置(旭硝子(株)開発品)の概略図を示す．この集光装置は，付属のセンサーと内蔵プログラムを用いて太陽を自動追尾し，集光面と太陽の角度が常に90°となるように制御された．集光面(直径:300 mm)を透過した太陽光は，凹面鏡(直径:300 mm，焦点距離:300 mm)で反射し，集光面の中央に設置した光ファイバーの末端の位置に焦点を結んだ．集光された光は，光ファイバーケーブルによって集光装置から培養槽まで10 mの距離を伝送され，培養槽内部に設置した発光担体の表面から細胞に照射された．**Fig. 4.5**に，光ファイバーケーブルと発光担体の概略図を示す．光ファイバーケーブル(旭硝子(株)開発品)は，光伝送効率の高い高純度石英ガラス製の光ファイバー(直径:1.4 mm，長さ:10 m)を19本を束ね，ETFE(四弗化エチレン・エチレン重合体)樹脂で被覆し，ステンレス製のフレキシブル管に挿入したものである．光ファイバーケーブルの集光装



① sensor for tracking the sun, ② mirror house, ③ optical fiber cable, ④ pyranometer sensor, ⑤ motor for longitudinal moving, ⑥ motor for lateral moving, ⑦ concave mirror

Fig. 4.4 Schematic drawing of mirror-type sunlight collection device



① optical fiber cable, ② illumination plate, ③ flexible tubing of stainless steel, ④ cover of ETFE resin, ⑤optical fibers of quartz, ⑥ joint of stainless steel, ⑦ frosting for reflection of light, ⑧ reflection plate

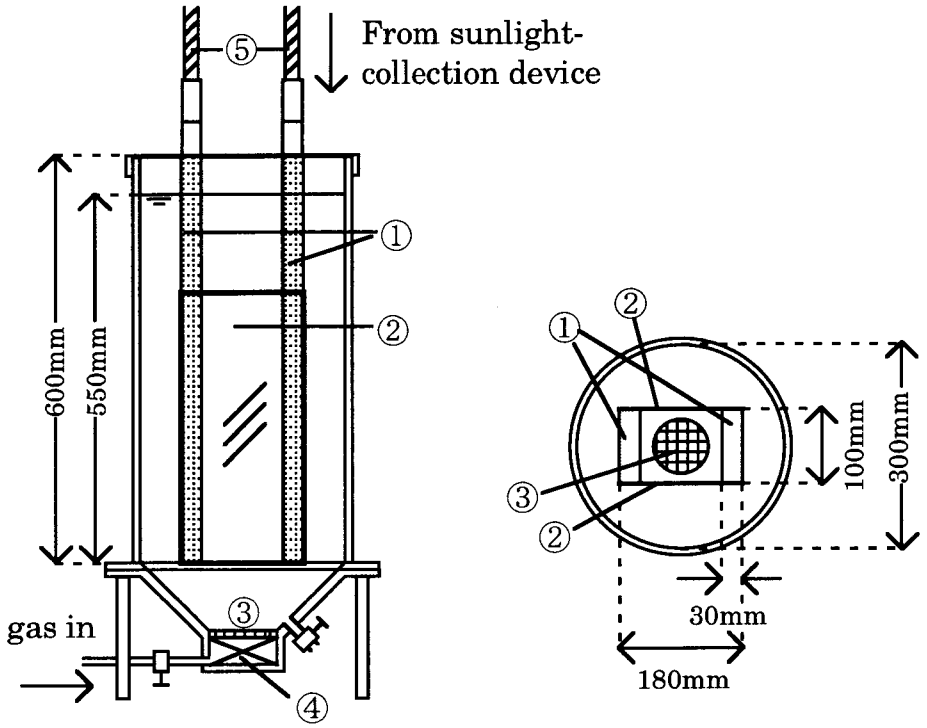
Fig. 4.5 Schematic drawing of optical fiber cable and illumination plate

置側の末端は，19本の光ファイバーを束ね，集光装置の焦点の位置に固定した．他方の発光担体側末端は，19本の光ファイバーを発光担体の光入射面の形状に合わせ，Fig. 4.5に示すように分散配置した．

発光担体(日本板硝子(株)開発品)(幅:100 mm，奥行き:30 mm，高さ:600 mm)は透明アクリル樹脂製で，中央に光を屈折させるための不透明なスリ部分を挟んだ構造である．光入射面(幅:100 mm，奥行き:30 mm)から発光担体に入った光をスリ部分で反射，屈折させることで，発光担体表面から培養槽内に照射した．

太陽光の集光は，実験室の屋根上に設置したミラー型集光装置3台を用いて行った．集光装置1台と発光担体1枚を1本の光ファイバーケーブルで接続した．本研究で用いた集光装置，光ファイバーケーブル，発光担体の仕様をTable 4.1に示す．

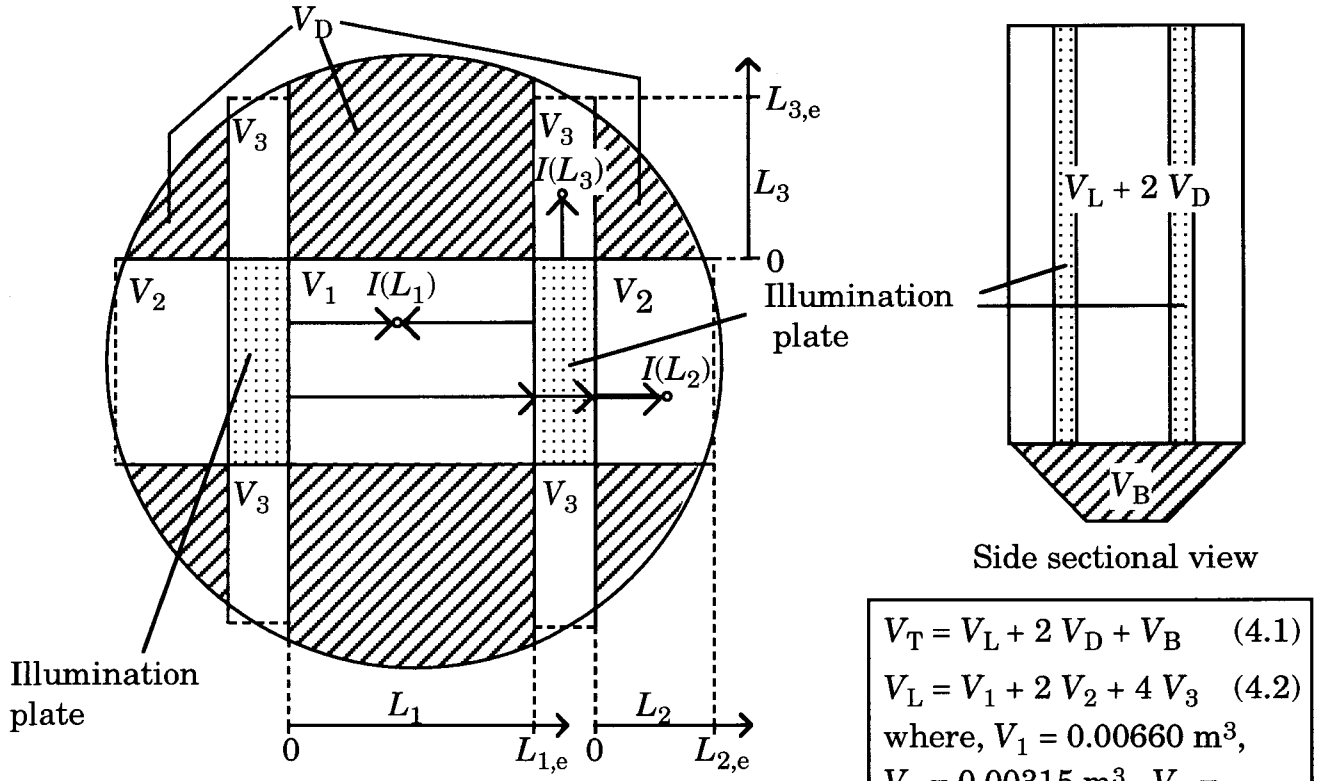
Fig. 4.6にミラー集光型バイオリアクターの培養槽の概略図を示す．培養槽は筒型で，底面のステンレス製スパージャー（細孔径5 μm）よりCO_2を含む混合ガスを通気した．培養槽内にアクリル樹脂製発光担体2枚を設置し，細胞に光を照射した．また，2枚の発光担体と2枚のアクリル板(幅:18 mm，奥行き:2 mm，高さ:400 mm)でドラフトチューブを構成し，培養液の通気撹拌を行った．



Side sectional view　　Cross sectional view

① illumination plate, ② plate of acrylic resin, ③ dispersion plate, ④ packing of rasching ring, ⑤ optical fiber cable

Fig. 4.6 Schematic drawing of air-lift fermentor



Cross sectional view　　Side sectional view

$$V_T = V_L + 2\,V_D + V_B \quad (4.1)$$

$$V_L = V_1 + 2\,V_2 + 4\,V_3 \quad (4.2)$$

where, $V_1 = 0.00660\ m^3$, $V_2 = 0.00315\ m^3$, $V_3 = 0.00131\ m^3$, $V_D = 0.0104\ m^3$ and $V_B = 0.00115\ m^3$.

Fig. 4.7 Geometric illustration for estimation of light distribution in the bioreactor

4.2.5 ミラー集光型バイオリアクターを用いた *Chlorella* sp. UK001の連続培養

ミラー集光型バイオリアクターを用いて,*Chlorella* sp. UK001の連続培養を行った．培地 40 dm^3を培養槽に入れ，混合ガス(CO_2:O_2:N_2=10:3:87(体積比))を 0.12 $m^3 h^{-1}$の一定流速で通気した．室温を調節し培養温度を 30 °Cに保持した．また，培地のpHは培養期間中5.7で一定であった．

30 W m^{-2}の連続光照射の下で前培養した細胞懸濁液を初期細胞濃度が 0.02 kg m^{-3}となるように培地に添加し，30 W m^{-2}の連続光照射の下で約6日間の回分培養を行った．そして，Xの値が 0.3 kg m^{-3}となったところから，新鮮培地の供給と培養液の引き抜きを同時に行う連続培養操作を開始した．チューブポンプ(MP-3型，東京理化製)を用いて新鮮培地を一定速度で培養槽に供給し，培養液をオーバーフローさせることにより，培養槽内の培養液体積を一定に保った．

本実験では，発光担体より照射された光強度と培養槽内の細胞濃度から培養槽内の光強度分布を計算し，光強度に対応した比増殖速度の値から培養槽内における比増殖速度の平均値を求めることで，連続培養操作における新鮮培地の流入速度Rを決定した．**Fig. 4.7**に，培養槽内における光照射部位および各位置における光透過距離と光強度の関係を示す．**Fig. 4.8**には，培養槽内の光強

Determination of average light intensity at the surface of illumination plate $\overline{I_p}$

↓

Calculation of effective absorption coefficient α

$$\alpha = 113\, X^{0.652} \qquad (4.3)$$

where $X = 0.3$ kg m^{-3}.

↓

Calculation of light intensity at a distance of L_i from illumination plate $I(L_i)$ (i = 1, 2, 3)

$$I(L_1) = \overline{I_p} \exp(-\alpha \cdot L_1) + \overline{I_p} \exp\{-\alpha \cdot (L_{1,e} - L_1)\} \quad (0 \le L_1 \le L_{1,e}) \qquad (4.4)$$

$$I(L_2) = \overline{I_p} \{1 + \beta \cdot \exp(-\alpha \cdot L_{1,e})\} \exp(-\alpha \cdot L_2) \quad (0 \le L_2 \le L_{2,e}) \qquad (4.5)$$

$$I(L_3) = \overline{I_p} \exp(-\alpha \cdot L_3) \quad (0 \le L_3 \le L_{3,e}) \qquad (4.6)$$

where $L_{1,e} = 0.120$ m, $L_{2,e} = 0.0572$ m, $L_{3,e} = 0.0796$ m and $\beta = 0.468$.

↓

Calculation of specific growth rate corresponding to $I(L_i)$ (i = 1, 2, 3)

$$\mu(L_i) = \frac{\mu_{max}}{1 + K_s / I(L_i)} (1 - I(L_i) / I_m) - m \qquad (4.7)$$

where $\mu_{max} = 0.389$ h^{-1}, $K_s = 56.3$ W m^{-2}, $I_m = 711$ W m^{-2} and $m = 1.19 \times 10^{-2}$ h^{-1}.

↓

Calculation of $\overline{\mu_i}$ (i = 1, 2, 3) and μ_{av}

$$\overline{\mu_i} = \int_0^{L_{i,e}} \mu(L_i)\, dL_i \Big/ \int_0^{L_{i,e}} dL_i \qquad (4.8)$$

$$\mu_{av} = \frac{\overline{\mu_1} \cdot V_1 + 2\,\overline{\mu_2} \cdot V_2 + 4\,\overline{\mu_3} \cdot V_3}{V_T} \qquad (4.9)$$

where $V_T = 0.040$ m^3.

↓

Determination of R

$$D = \mu_{av} \qquad (4.10)$$

$$R = D \cdot V_T \qquad (4.11)$$

Fig. 4.8 Procedures to determine feed rates of fresh medium in continuous cultures using the bioreactors

度分布に基づく培地流入速度の決定方法を示す．光強度分布の計算にあたって，光照射面における照射光強度は均一であり，照射光は発光担体表面から直角方向に照射される平行光であり，Lambert–Beer の法則に従うものと仮定した．また，アクリル板や気泡による光の反射，吸収は無視できるとした．Fig. 4.7 の側断面図に示すように，培養槽の全体積 V_T を培養槽円筒部で光が照射される部分(体積:V_L)，円筒部で光が照射されない部分(体積:V_D)，培養槽底部の光が照射されない部分(体積:V_B)の3つに区分した．さらに，Fig. 4.7 の横断面図に示すように，培養槽円筒部で光が照射される部分(体積:V_L)を3種類の形状の部分(体積:V_1，V_2，V_3)に分けた．

Fig. 4.8 に示すように，細胞濃度 X と Eq.(4.3)より有効吸収係数 α を求めた．次に，与えられた発光担体表面の平均光強度 $\overline{I_P}$ を用いて，V_1，V_2，V_3 の各部分ごとに，発光担体から距離 L_i の点における光強度 $I(L_i)$を Eqs. (4.4)～(4.6)により計算した．細胞の比増殖速度は光強度に依存するので，Fig. 4.8 の Eq. (4.7)に示した光強度と比増殖速度の関係式および定数値を用いた．定数値は細胞種に固有のものであり，バイオリアクターの形状には依存しないと仮定し，Eq. (4.7)と定数値を用いて光強度 $I(L_i)$に対応する比増殖速度 $\mu(L_i)$を計算した．さらに，Eq. (4.8)を用いて V_1, V_2, V_3 の各部分ごとの $\mu(L_i)$の平均値，$\overline{\mu_1}$，$\overline{\mu_2}$，$\overline{\mu_3}$を求めた．そして，Eq. (4.9)を用いて，

培養槽全体における比増殖速度の平均値μ_{av}を得た．定常状態における連続培養に対してEq. (4.10)を適用し，Eq. (4.11)より培地の流入速度Rの値を決定した．

以上の計算による連続培養操作に基づいて，安定な培養成績が得られることを実験的に確かめるために，人工光源を用いた*Chlorella* sp. UK001の連続培養を行った．ハロゲンランプ光源装置(HL-150,HOYA-SCHOTT製)12台または24台の光を光源装置付属の光ファイバーを通してバイオリアクター内の2枚の発光担体から細胞に照射し，Fig. 4.8で示した方法に従って計算された培地流入速度で新鮮培地を添加して連続操作を行った．

次に，太陽光を用いた*Chlorella* sp. UK001の連続培養を行った．ミラー型集光装置2台で集光した太陽光を培養槽内の2枚の発光担体から細胞に照射した．このとき，発光担体表面における光強度$\overline{I_P}$の値は，別のミラー型集光装置で集光した光を暗室内に設置した発光担体に伝送して，発光担体表面で測定した値を用いた．太陽光を光源とする場合は，$\overline{I_P}$の値が時間とともに変化する．そこで，培養実験に先立ってあらかじめ太陽光を集光し，光照射時の平均的な$\overline{I_P}$の値として30 W m^{-2}を得た．連続培養における細胞生産速度Pは，細胞濃度Xと希釈率Dを用いて次式で表わされる．

$$P = D \cdot X \qquad (4.12)$$

$\overline{I_P}$ = 30 W m^{-2}のとき，Fig. 4.8に示すEqs. (4.3)～

(4.10),(4.12)に基づいて種々のX値に対するPの値を計算したところ，Pの最大値を与える細胞濃度としてX = 0.3 kg m^{-3}が得られた．そこで，太陽光を用いた細胞の連続培養実験では，細胞濃度を0.3 kg m^{-3}に設定した．連続培養時における培地流入速度Rの値については，太陽光を集光したときの10分間の$\overline{I_P}$の平均値からFig. 4.8に示した手順に従って計算し,60分間の操作条件とした．培養実験は兵庫県明石市の川崎重工業(株)明石技術研究所において，1996年8月30日から9月12日の間実施した．

4.2.6 測定方法

照射光の波長分布は，スペクトロラジオメーター(MSR-7000, Optical Science製)で測定した．太陽光の波長分布の測定は，センサーを太陽の方向に固定して行った．また，発光担体より照射された光の場合は，発光担体表面の中央部にセンサーを固定した．いずれの場合も，測定は快晴の日の太陽南中時に行い，最も強い光強度を100とした相対強度で表わした．

太陽直達日射の光強度の測定は，検出波長域が305～2800 nmの放射熱量センサー(PCM-01,プリード製)を用いた．センサー面と太陽の角度が常に90°となるようセンサーの方向を調節し,センサーの先に円筒(直径:30 mm,長さ:200 mm)を付け，散乱光の影響をなくした．そして，

1分ごとに光強度を測定し，30分ごとに平均値を算出した．別に測定した波長分布のデータから測定値に占める光合成有効放射の割合を計算し，その値を太陽直達日射光強度I_dとした．

発光担体表面における照射光強度の測定では，発光担体表面を50mm四方以下の面積に区切り，照射光強度が一定のハロゲンランプ(HL-150，HOYA-SCHOTT 製)12台からの光を照射したときの，発光担体表面における光強度分布を測定した．そして，照射光強度の平均値を示す位置に，検出波長域が400～700nmの光量子センサー(LI-190SB，LI-COR 製)を設置して，1分ごとに光強度の瞬間値を測定するとともに，30分ごとに平均値を計算し$\overline{I_p}$とした．また，照射光強度分布は，光入射面からの距離が同じとなる6箇所で測定した値の平均を求め，測定された最大値を1.0としたときの相対値I_rで示した．照射光強度を測定した発光担体上の位置は，発光担体の長さを1.0としたときの光入射面からの相対距離L_rで示した．

4.3 結果と考察

4.3.1 太陽光の集光・伝送・照射性能

(1) 照射光の波長分布

太陽光には280～3000nmの広い波長域の光が含まれるが，光合成に用いられるのはこのうち400～700nmの

波長の光に限られ，これを光合成有効放射という．これ以外の波長 400 nm 以下の近紫外線および紫外線，波長 700 nm 以上の近赤外線および赤外線は，細胞増殖に対し促進的には作用せず，抑制的に作用する可能性が高い．そこでまず，太陽光を直接照射する場合と，太陽光を集光・伝送したのち細胞に照射する場合の照射光の波長分布の差異を調べるため，太陽光と集光型リアクターの発光担体表面からの照射光の波長分布をそれぞれ測定した．

Fig. 4.9 に，太陽光，レンズ集光型バイオリアクターおよびミラー集光型バイオリアクターの発光担体表面から照射された光について，各波長における相対強度分布を示す．太陽光の場合は，照射光に占める光合成有効放射(400～700 nm)がエネルギー比で約 50%，波長 400 nm 以下の紫外線や近紫外線および波長 700 nm 以上の赤外線や近赤外線がそれぞれ 5%および 45%含まれていた．レンズ集光型バイオリアクターでは，発光担体から照射された光の波長は 390～1000 nm であり，このうち光合成有効放射が 79%を占めた．また，ミラー集光型バイオリアクターでは，発光担体から照射された光の波長は 390～870 nm であり，このうち光合成有効放射がエネルギー比で 87%を占めた．

(2) 集光伝送効率

2 種類の集光型バイオリアクターについて，太陽光を

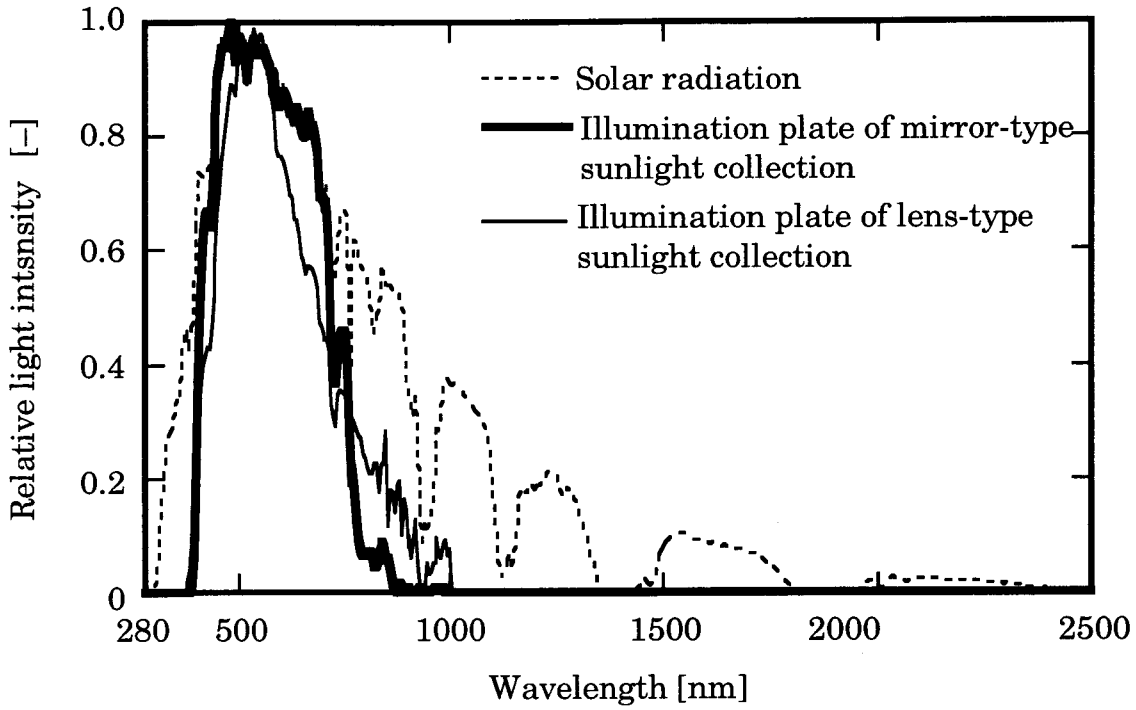


Fig. 4.9 Spectra of light rays radiated from the sun and illumination plate. Each spectrum is indicated as relative light intensities by taking the maximum value equal to 1.0

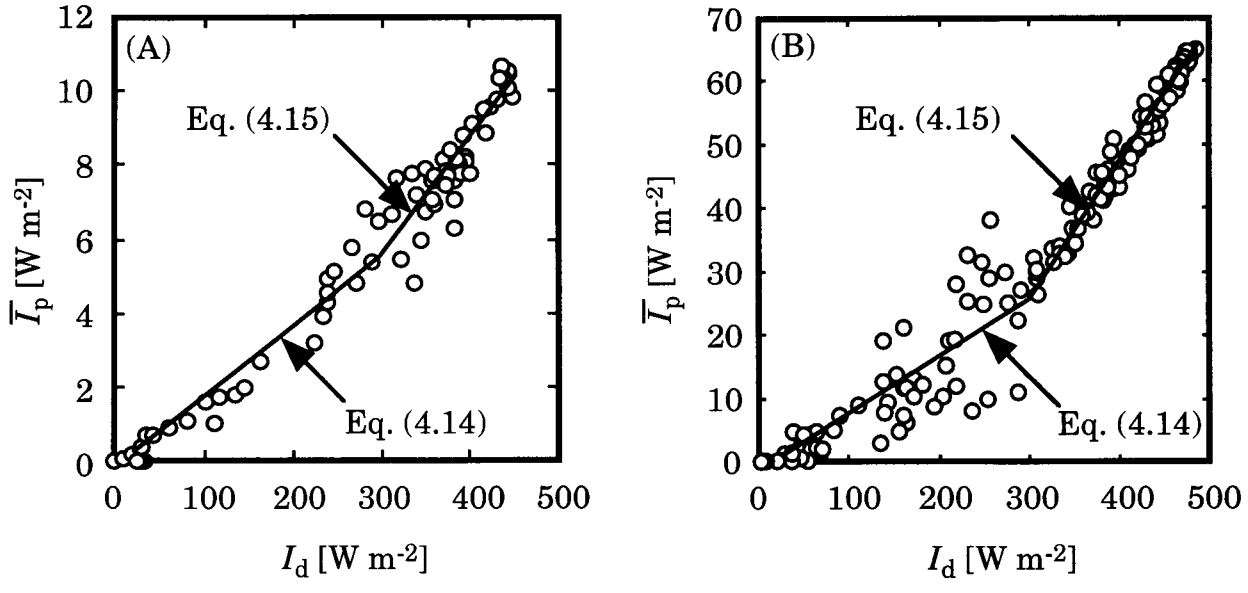


Fig. 4.10 Relationship between light intensity of direct irradiation from the sun and light intensity on surface of illumination plate.
(A) Lens-type sunlight collection, (B) Mirror-type sunlight collection

集光・伝送し，発光担体から照射したときの光合成有効放射の集光伝送効率を調べた．集光装置表面における太陽光強度と発光担体表面の照射光強度の測定結果から，集光装置，光ファイバーケーブル，発光担体で構成される光照射系における集光伝送効率を調べた．集光装置と発光担体の間の集光伝送効率 E_1 を次式で定義した．

$$E_1 = \frac{\overline{I_p} \cdot A_p}{I_d \cdot A_d} \times 100 \qquad (4.13)$$

ここで A_p は発光担体の照射面積，A_d は集光装置の集光面積である．

まず，レンズ集光型バイオリアクターについて，I_d と $\overline{I_P}$ の測定結果を **Fig. 4.10(A)** に示す．I_d と $\overline{I_P}$ の相関関係を直線近似することを考えたが，I_d の値が 300 W m^{-2} 以下の場合と 300 W m^{-2} 以上の場合とで異なる相関関係が認められたので，I_d の値が 0～300 W m^{-2} および 300～500 W m^{-2} の場合の I_d と $\overline{I_P}$ の関係を，次式によって表わした．

$$\overline{I_p} = a_1 I_d \qquad (0 \le I_d \le 300\ \mathrm{W m^{-2}}) \qquad (4.14)$$

$$\overline{I_p} = a_2 I_d + b_2 \qquad (300 \le I_d \le 500\ \mathrm{W m^{-2}}) \qquad (4.15)$$

測定値に対する最小二乗法により，$a_1 = 0.021$，$a_2 = 0.029$，$b_2 = -2.3$ W m^{-2} を得た．ガラス製発光担体では $A_p = 0.12$ m^2，Fresnel レンズ型集光装置では $A_d = 0.0293$ m^2 である．Eqs.(4.13)～(4.15)より，Fresnel レンズ型集光装置とガラス製発光担体の間の集光伝送効率 E_1 を求めたと

ころ，I_dが 300 W m^{-2}以下ではE_l = 8.6 %，I_dが 300 W m^{-2}以上ではE_l = 8.6～9.8 %と計算された．

一方，ミラー集光型バイオリアクターを用いてI_dと$\overline{I_P}$の関係を測定した結果を，**Fig. 4.10(B)**に示す．I_dの値が 0～300 W m^{-2}および 300～500 W m^{-2}の場合のI_dと$\overline{I_P}$の間の関係を，Eqs.(4.14),(4.15)に近似することで，a_1 = 0.09，a_2 = 0.21，b_2 = − 35 W m^{-2}の値を得た．A_p = 0.156 m^2，A_d = 0.0707 m^{2}のミラー集光型バイオリアクターでは Eqs. (4.13)～(4.15)を用いて，I_dが 300 W m^{-2}以下ではE_l = 20 %，I_d が 300 Wm^{-2}以上ではE_l = 20～31 %と計算された．

以上の結果より，今回試作した装置の比較では，ミラー集光型リアクターの方がレンズ集光型リアクターに比べて集光伝送効率が 3～4 倍高いことがわかった．

4.3.2 レンズ集光型バイオリアクターを用いた *Chlorella* sp. UK001 の回分培養

レンズ集光型バイオリアクターを用いて*Chlorella* sp. UK001 の回分培養を行った．**Fig. 4.11** に，細胞濃度Xと発光担体表面の照射光強度$\overline{I_P}$の経時変化を示す．X の値は時間とともに増加し，培養 200 時間では 0.15 kg m^{-3}となり増殖は停止した．培養期間中の平均増殖速度は 16.1 mg dm^{-3} d^{-1}であり，**Table 4.2** に示すように Roux フラスコを用いた回分培養の場合のわずか 4 %であった．

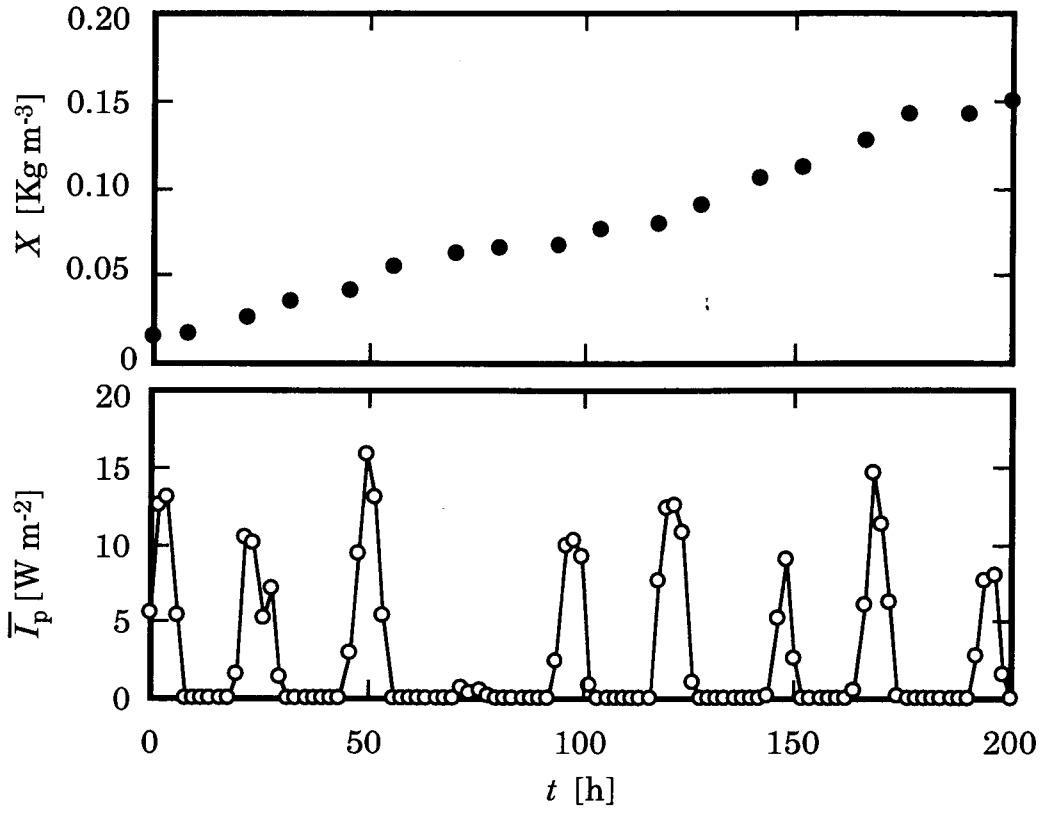


Fig. 4.11 Time course of batch culture of *Chlorella* sp. UK001 using a lens-collection type photobioreactor

Table 4.2 Comparison of culture results of *Chlorella* sp. UK001 in a lens-collection type photobioreactor and Roux flask

	Photobioreactor	Roux flask	Roux flask
Light source	Sunshine	Xenon lamp	Fluorescent lamp
Light intensity [W m^{-2}]	0 - 15.7 [a)]	59.9 [b)]	71.4 [b)]
Irradiance area [m^2]	0.12	0.018	0.018
Culture time [h]	200	45	46
Mean rate of cell growth [mg-dry cells dm^{-3} d^{-1}]	16.1	368	437
Maximum cell concentration [mg-dry cells dm^{-3}]	150	694	842

a) Value inside the fermentor. b) Value at the surface of flask.

Fig. 4.11 に示した培養では，発光担体表面の光強度は 0 ～ 15.7 W m^{-2} の範囲にあり，夜間も含めた平均照射光強度は 2.7 W m^{-2} であった．これに対して Roux フラスコを用いた培養では 22～26 倍の強度の光が連続照射されている．このことから，レンズ集光型バイオリアクターを用いた *Chlorella* sp. UK001 の回分培養では，細胞に照射される光エネルギー量が十分でなかったために増殖速度が低かったものと考えられた．

バイオリアクター内で照射された光エネルギーに対し，光合成反応によって藻体バイオマスとして固定化された化学エネルギーの割合を光合成効率 E_c とし，次の式で定義した．

$$E_c = \frac{100 E_b \cdot \Delta X}{E_r} \qquad (4.16)$$

ここで，ΔX は培養によって生産された細胞の重量，E_r は発光担体より培養液に照射された光エネルギー量の総和である．E_r の値は，次の式から計算される．

$$E_r = A_p \int_0^t \overline{I_p}\, dt \qquad (4.17)$$

ここで，A_p は発光担体の光照射面積，$\overline{I_p}$ は発光担体表面における平均照射光強度，t は培養時間である．E_b = 2.4×10^7 J kg^{-1}，ΔX = 0.402×10^{-3} kg，A_p = 0.12 m^2，t = 7.2×10^5 s であることから，Eqs. (4.16), (4.17)を用いて E_c = 4.3 %と計算された．活発に増殖している状態のイネやダイズにおける光合成効率は 5.0～9.2%であること

から(Shibata, 1981), 微細藻類細胞の培養結果から得られた値としてはかなり高い値であると考えられた.

4.3.3 ミラー集光型バイオリアクターを用いた *Chlorella* sp. UK001 の連続培養

(1) ハロゲンランプを光源として用いた連続培養

発光担体より照射された光強度と培養槽内の細胞濃度に基づいて, 新鮮培地の流入速度を決定する連続培養操作により安定な培養成績が得られることを確かめるために, X_0 = 0.3 kg m^{-3}のとき, $\overline{I_P}$ = 60 および 30 W m^{-2}の照射光強度の下で *Chlorella* sp. UK001 の連続培養を行った. **Fig. 4.12** に Xの値の経時変化を示す. $\overline{I_P}$ = 60 W m^{-2}, X = 0.3 kg m^{-3}のとき計算より求められた培地流入速度は R = 1.03 dm^3 h^{-1}となった. この条件の下で 72 時間の連続操作を行ったところ, 細胞濃度は, X = 0.3 kg m^{-3} (Fig. 4.12 中の破線)付近でほぼ一定に維持された. また, $\overline{I_P}$ = 30 W m^{-2}, X = 0.3 kg m^{-3}の場合について, 計算で求められた R = 0.43 dm^3 h^{-1}を用いて, さらに 72 時間連続操作を行った. その結果, $\overline{I_P}$ = 60 W m^{-2}の場合と同様, 細胞濃度はほぼ一定となった. この結果から, 発光担体から照射される光強度とバイオリアクター内の細胞濃度から計算された培地流入速度に基づく培地供給操作で, 細胞濃度を一定に維持しながら連続培養ができることがわかった.

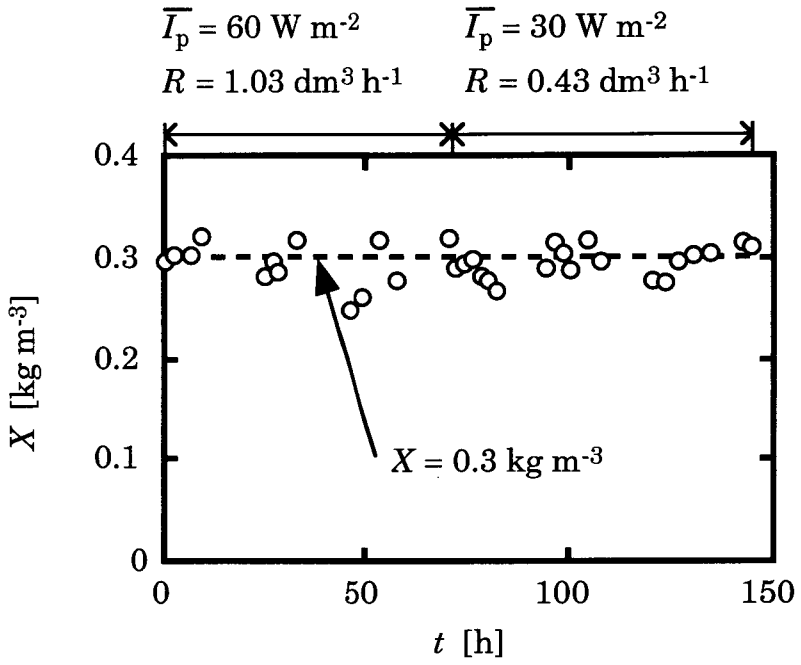


Fig. 4.12 Results of continuous culture of *Chlorella* sp. UK001 in the bioreactor illuminated with halogen lamps

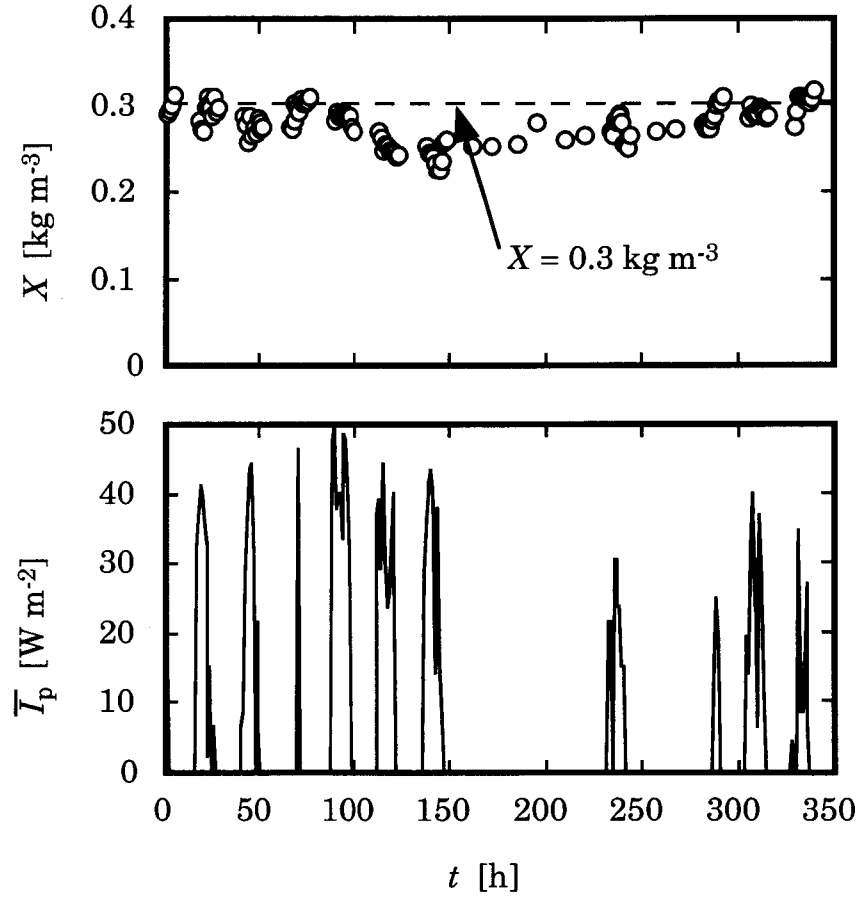


Fig. 4.13 Results of continuous culture of *Chlorella* sp. UK001 in the bioreactor illuminated with sunlight

(2) 集光太陽光を光源として用いた連続培養

ミラー型集光装置で集光した太陽光をリアクター内部に設置した発光担体より細胞に照射して，*Chlorella* sp. UK001の連続培養を行った．**Fig. 4.13** に，細胞濃度 X と発光担体表面の照射光強度 $\overline{I_P}$ の経時変化を示す．$\overline{I_P}$ の値は時間とともに変化したが，実験期間中，リアクター内の細胞濃度を X = 0.3 kg m^{-3} 前後で維持しながら培養を継続することができた．**Table 4.3** にこの連続培養の結果をまとめる．連続培養期間中の1日あたりの細胞生産速度は，最大で 2.2×10^{-3} kg m^{-3} h^{-1}，平均で 0.70×10^{-3} kg m^{-3}h^{-1}であった．リアクターの培養体積と集光装置の集光面積の比から集光面積当たりの細胞生産速度を計算すると，最大値は 0.63×10^{-3} kg m^{-2} h^{-1}，平均値は 0.20×10^{-3} kg m^{-2} h^{-1}となった．Fig. 4.13 に示した培養期間中，発光担体表面の照射光強度は最大で 49.7 Wm^{-2} であり，このとき細胞の比増殖速度の値は 0.022 h^{-1} であった．第2章で示したように，入射光強度が 71 W m^{-2} で光強度分布が無視できる培養条件では，この細胞の比増殖速度の値は 0.20 h^{-1} であった．このことから，集光装置や発光担体の数を増やすなど，バイオリアクターの改良によって，細胞に照射される光強度を増やすとともに，光強度分布を少なくすることによって，細胞生産速度はさらに増加するものと考えられた．

Fig. 4.13 に示した培養において，細胞懸濁液中で吸収

Table 4.3 Summary of continuous culture of *Chlorella* sp. UK001 cells using sunlight

Light collection area [m^2]			0.141
Light irradiation area [m^2]			0.312
Sunlight irradiation for a day			
	Maximum	[MJ m^{-2}]	13.6
	Average	[MJ m^{-2}]	6.6
Culture volume [m^3]			0.040
Production rate of the cells			
	Maximum	[10^{-3} kg m^{-3} h^{-1}]**	2.2
		[10^{-3} kg m^{-2} h^{-1}]*	0.63
	Average	[10^{-3} kg m^{-3} h^{-1}]**	0.70
		[10^{-3} kg m^{-2} h^{-1}]*	0.20

* Production rate per unit area of sunlight collection.

** Production rate per unit volume of culture medium.

された光エネルギーのうち，藻体バイオマスの化学エネルギーに変換された効率を以下の方法で求めた．発光担体から照射された光のうち細胞懸濁液中で吸収された割合θを，Fig. 4.7 に示したそれぞれの照射方向について計算したところ，X = 0.3 kg m^{-3} のとき平均で θ = 0.94 であった．連続培養期間中の平均細胞生産速度 P_{av}，培養体積 V_T，$\overline{I_P}$の平均値 $\bar{I}_{p,av}$，光照射面積 A_p，細胞懸濁液中での光吸収率 θ を用いて，細胞の増殖収率 $Y_{X/J}$ を次式で定義した(Ogawa *et al.*, 1978)．

$$Y_{X/J} = \frac{P_{av} \cdot V_T}{3600 \bar{I}_{p,av} \cdot A_p \cdot \theta} \qquad (4.18)$$

ここで，P_{av} = 0.70×10^{-3} kg m^{-3} h^{-1}，V_T = 0.04 m^3，$\bar{I}_{p,av}$= 6.5 W m^{-2}，A_p = 0.312 m^2，θ = 0.94 である．**Table 4.4** に示すように，太陽光を用いた *Chlorella* sp. UK001 の連続培養では $Y_{X/J}$ = 4.1×10^{-9} kg J^{-1} であった．

一方，光エネルギーから化学エネルギーへの変換効率 Y_c は，細胞の燃焼熱 E_b を用いて次式で定義される(Aiba, 1982)．

$$Y_c = 100\ Y_{X/J} \cdot E_b \qquad (4.19)$$

Chlorella sp. UK001 では，E_b = 2.4×10^7 J kg^{-1} であるので，太陽光を用いた連続培養における Y_c の値は光合成有効放射基準で 9.8 %と計算された．Table 4.4 に，Fig. 4.13 に示した培養およびハロゲンランプを用いた連続培養(Fig. 4.12)から計算された $Y_{X/J}$ および Y_c の値をあわ

Table 4.4 $Y_{X/J}$ and Y_c values of microalgal cells cultivated under various conditions

	Microalgal strain					
	Chlorella sp. UK001			*S. platensis*	*Microcystis aeruginosa*	*Chlorella vulgaris*
Light source	Sunlight	Halogen lamp	Halogen lamp	Halogen lamp	Halogen lamp	Halogen lamp
Incident light intsnsity [W m^{-2}]	0 – 49.7	60	30	2.5	4.5	3.5
X [kg m^{-3}]	0.3	0.3	0.3	0.169	0.0511	0.0048
$Y_{X/J}$ [10^{-9} kg J^{-1}]	4.1	4.9	4.1	4.9	4.5	5.1
Y_c [%]	9.8	11.7	9.8	10.3	9.5	10.7
Workers	This work			Aiba (1982)		

せて示す．ミラー集光型バイオリアクターでは，ハロゲンランプ，太陽光のいずれを光源とした場合も $Y_{X/J}$ = 4.1×10^{-9}～4.9×10^{-9} kg J^{-1}，Y_C = 9.8～11.7%の範囲にあった．Table 4.4に示すように，Aiba (1982)が種々の藻類細胞の培養で報告した $Y_{X/J}$, Y_Cの値と比較したところ，本研究で示した培養による値とほぼ同じであることがわかった．

4.4 結言

集光した太陽光を培養槽の内部から細胞に照射する太陽光集光型バイオリアクターを用いた実験より，以下のことがわかった．

(1) 太陽光のうち，光合成に用いられる波長域の光の割合は約50%であるが，レンズ集光型バイオリアクター，ミラー集光型バイオリアクターの発光担体から照射される光には，それぞれ，79%，87%含まれた．

(2) レンズ集光型バイオリアクターの集光・伝送効率は約9%と低い値であったが，ミラー集光型バイオリアクターでは20～30%の集光・伝送効率を示した．

(3) レンズ集光型バイオリアクターを用い，太陽光を光源として *Chlorella* sp. UK001の回分培養を行った結果，平均細胞増殖速度は6.7×10^{-4} kg m^{-3} h^{-1}と低い値を示したが，光エネルギーから化学エネルギーへの変換効率は4.3%であった．

(4) ミラー集光型バイオリアクターを用い，太陽光を光源として *Chlorella* sp. UK001 の連続培養を行った．入射光強度の変化に応じて培地流入速度を調節する操作によって，細胞濃度をほぼ一定に保持しながら連続培養を行うことができた．このときの平均細胞増殖速度は 7.0×10^{-4} kg m^{-3} h^{-1} となり，光エネルギーから化学エネルギーへの変換効率は 9.8%であった．

第5章 微細藻類細胞の食糧資源としての有効利用法

5.1 緒言

微細藻類細胞の有効利用方法としては，緒論で述べたように様々な方法が検討されている．特に *Chlorella* 属の緑藻については，様々な栄養成分をバランスよく含むことから，オープンポンド型バイオリアクターを用いた商業生産プロセスが確立しており，健康食品として広く市販されている．本章では，光独立栄養培養で生産された *Chlorella* sp. UK001 の細胞を食料および飼料として有効利用するために，細胞中の主要な有用成分について含量を分析した．

5.2 実験

5.2.1 細胞と培養

実験には，単細胞緑藻 *Chlorella* sp. UK001 を用いた．細胞の培養は次の手順で行った．第1章に組成を示した改変 Closterium 培地 0.75 dm^3 を容量 1 dm^3 の Duran びんに入れ，混合ガス(CO_2:O_2:N_2=10:3:87(体積比))を 0.25 $dm^3\ min^{-1}$ の一定流速で通気した．そこへ，2%の寒天を含む改変 Closterium 培地上で継代された細胞を一白金耳添加し，培養装置表面における照射光強度が約 25 W m^{-2} となるように，白色蛍光灯(FL20SSW，松下電器産業製)の光を連続照射して培養を開始した．培養温度 30

°C で 72～96 時間培養を行った後，遠心分離(12,000×g, 4 °C, 15 min)で細胞を回収し，さらに蒸留水で洗浄した細胞を実験に用いた．

5.2.2 分析方法

(1) 細胞の糖質，タンパク質の定量分析

糖質，タンパク質の定量分析は，それぞれ異なる 2 種類の方法を用いて行った．まず，回収した細胞を蒸留水に再懸濁したもの 25 cm^3 をフレンチプレス(5501-M, 大岳製作所製)のセルに入れ，操作圧力 98 MPa の下で細胞を破砕した．この細胞破砕液を用いて，フェノール硫酸法(Fukui, 1969)により糖類の定量分析を行った．また，細胞破砕液を 1 mol dm^{-3} の NaOH 水溶液中，100 °C で 5 分間加熱してタンパク質を可溶化した後，Lowry 法(Lowry *et al.*, 1951)に従ってタンパク質の定量分析を行った．

一方，回収した細胞を温度 50 °C で乾燥し，これを粉砕して得られた細胞乾燥粉末を試料として，ケルダール法により試料中の窒素含量を定量した．細胞のタンパク質の 16%が窒素であると仮定し，窒素含量に係数 6.25 を乗じてタンパク質含量を求めた．また，糖質の含量は，試料の重量からケルダール法で求めたタンパク質，脂質，繊維，灰分の含量を差し引いて計算した．

(2) 脂質，繊維，灰分の定量分析

遠心分離によって回収した細胞を温度50°Cで乾燥し，これを粉砕して得られた細胞乾燥粉末を試料として用いた．脂質は酸分解法で，繊維はヘンネベルグ・ストーマン改良法でそれぞれ定量した．灰分は，あらかじめ秤量した試料をるつぼに入れ，800°Cで加熱して灰化し，残留したものを灰分としてその重量を測定した．

(3) ビタミンの定量分析

細胞中の主要なビタミンについて，遠心分離によって回収した細胞を温度50 °Cで乾燥し，粉砕して得られた細胞乾燥粉末を試料として用い，以下の方法で定量分析を行った．

総カロチンの分析は，試料にアスコルビン酸ナトリウムと水を加えて膨潤させたのち，エタノールで抽出したものに塩化ナトリウムと2-プロパノールを加えてけん化した．これを酢酸エチル・ヘキサンの混液で抽出し，高速液体クロマトグラフィで分析した．ビタミンB_1およびB_2の分析は，試料を塩酸で酸分解し，さらにタカジアスターゼで酵素分解したものを高速液体クロマトグラフィにて分析した．ビタミンB_6は，試料を酸分解したのち，*Saccharomyces cerevisiae* ATCC9080とビタミンB_6定量用培地「ニッスイ」(日水製薬製)を用いた微生物定量法により分析した．ビタミンB_{12}は，試料にKCNを加えて

煮沸したのち，*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC7830 とビタミン B_{12} 定量用培地 USP (Difco Laboratories 製)を用いた微生物定量法により分析した．総アスコルビン酸の分析は，試料にメタリン酸を加えて磨砕抽出したのち，ジクロロフェノール・インドフェノールを加え，高速液体クロマトグラフィで定量した．ナイアシン(Niacin,ニコチン酸類)は，*Lactobacillus plantarum* ATCC8014 とニコチン酸定量用培地「ニッスイ」(日水製薬製)を用いた微生物定量法により分析した．

(4) アミノ酸の定量分析

細胞中の主要なアミノ酸について，遠心分離によって回収した細胞を温度 50 °C で乾燥し，粉砕して得られた細胞乾燥粉末を試料として用い，以下の方法で定量分析を行った．

シスチンおよびメチオニンは，試料に過ギ酸を加え酸化処理を行った後，塩酸で加水分解したものをアミノ酸自動分析計(JLC-200A，日本電子製)で分析した．トリプトファンは，試料に水酸化バリウムを加えて加熱溶解したのち，加水分解したものを高速液体クロマトグラフィ(LC-10AS，島津製作所製)で分析した．その他のアミノ酸は，試料に塩酸を加えて加水分解したものをアミノ酸自動分析計(JLC-300，日本電子製)で分析した．

5.3 結果と考察

5.3.1 *Chlorella* sp. UK001の成分組成

温度30 °Cで培養した*Chlorella* sp. UK001細胞に含まれる主要成分の含量を調べた．**Table 5.1**に結果を示す．フェノール硫酸法およびLowry法を用いた分析では，細胞乾燥重量の42 %がデンプンなどの糖質であり，タンパク質は乾燥重量の22 %であった．この結果は，第1章のTable 1.4で示したタンパク質および糖質含量の値と，ほぼ一致しており，培養温度，照射光強度に関係なくほぼ同じ組成の細胞バイオマスが得られることが，第1章での検討結果より明らかになっている．これに対し，ケルダール法を用いて分析，計算されたタンパク質含量，糖質含量はそれぞれ51 %，21% で，分析方法により大きく異なった．この理由として，窒素含量からタンパク質含量を求めるときに用いた窒素係数の値が，実際の値と異なることが考えられた．一方，この細胞には脂質，繊維，灰分が，それぞれ13 %，1.7 %，6 %ずつ含まれていた．

健康食品として利用するために商業的に培養されている*Chlorella vulgaris*の成分組成の一例を，Table 5.1にあわせて示す．分析方法により成分値が異なるので正確な比較はできないが，本研究で用いた細胞とほぼ同じであると考えられた．

Table 5.1 Gross chemical composition of microalgal cells

Composition [% on dry basis]	Microalgal strain		
	Chlorella sp. UK001		*Chlorella vulgaris*
Sugars	43 [a]	21 [b]	12–17
Proteins	22 [c]	51 [d]	51–58
Lipids	13		14–22
Fibers	1.7		–
Ash	6		–
Workers	This work		Becker (1988)

[a] value of chemical analysis with phenol-sulfulic acid method

[b] calculated value as follows
Sugars = 100 – (Proteins (Kjeldahl method) + Lipids + Fibers +Ash)

[c] value of chemical analysys with Lowry method

[d] calculated value as follows
Proteins = Nitrogen (Kjeldahl method) × 6.25

5.3.2 *Chlorella* sp. UK001のアミノ酸，ビタミン組成

細胞を食料，飼料として利用する場合，細胞中のアミノ酸，ビタミンの組成が重要である．温度30 °Cで培養した*Chlorella* sp. UK001細胞に含まれるアミノ酸およびビタミンの含量を調べた．まず，アミノ酸の分析結果を**Table 5.2**に示す．比較のために，食料および飼料としてすでに実用化されている*C. vulgaris*, *S. platensis*のアミノ酸組成値，および有用なタンパク源である鶏卵のアミノ酸組成値をあわせて示す．*Chlorella* sp. UK001は，人間が体内で合成できないため食品として摂取する必要のあるアミノ酸である必須アミノ酸8種類を含め，分析したすべてのアミノ酸を含んでいた．また，その組成値は，同じ微細藻類である*C. vulgaris*や*S. platensis*と近い値を示した．さらに鶏卵との比較においても，*Chlorella* sp. UK001は，様々な種類のアミノ酸をバランスよく含んでいることがわかった．

Table 5.3に，*Chlorella* sp. UK001中のビタミン含量の分析結果を示すとともに，*C. vulgaris*, *S. platensis*の文献値を示す．本研究で用いた*Chlorella* sp. UK001は，カロチン，ナイアシン(niacin, ニコチン酸類)，ビタミンB群を含むことがわかった．*C. vulgaris*との比較では，ビタミンB_{12}とナイアシンの含量がほぼ同じで，他の成分は含量が少なかった．一方，*S. platensis*との比較では，ビタミンB_2とナイアシンの含量がほぼ同じで，

Table 5.2 Amino acid compositions of various microalgal cells and egg

Amino acid	*Chlorella* sp. UK001	*C. vurgalis*	*S. platensis*	Egg
[%]				
Arginine	5.5	6.9	7.3	6.2
Lysine	4.4	6.4	4.8	7.1
Histidine	2.0	2.0	2.2	2.5
Phenylalanine	5.9	5.5	5.3	5.1
Tyrosine	3.9	2.8	0.3	4.0
Leucine	10.1	9.5	9.8	8.8
Isoleucine	4.2	3.2	6.7	5.4
Methionine	2.5	1.3	2.5	3.2
Valine	6.5	7.0	7.1	6.6
Alanine	9.0	9.4	9.5	5.6
Glycine	6.5	6.3	5.7	3.3
Proline	5.7	5.0	4.2	3.8
Glutamic acid	11.9	13.7	10.3	12.8
Serine	4.4	5.8	5.1	6.7
Threonine	5.1	5.3	6.2	4.5
Aspartic acid	9.3	9.3	11.8	10.4
Tryptophan	2.1	–	5.3	1.5
Cystine	1.2	–	0.9	2.6
Workers	This work	Becker (1988)	Becker (1988)	Kagawa (1990)

Table 5.3 Vitamin contents of various microalgal cells

Vitamin	*Chlorella* sp. UK001	*C. vurgalis*	*S. platensis*
[mg per kg of dry cells]			
Total carotene	81.5	—	—
Vitamin B1	3.1	—	30–40
Vitamin B2	28.9	68	25–35
Vitamin B6	3.1	11	5–7
Vitamin B12	0.18	0.06–0.07	1.2–2.5
Total ascorbic acid	<10	15000	—
Niacin	118	56–243	105
Workers	This work	Borowitzka (1988)	Borowitzka (1988)

他の成分の含量はやや少なかった．ビタミンの含量は，試料の保存および処理方法に大きく影響されるため厳密な議論はできないが，*Chlorella* sp. UK001 はすでに実用化されている微細藻類細胞と同じ程度に，ビタミンを含有するものと考えられた．

以上の結果より，*Chlorella* sp. UK001 は食料，飼料として有効であることが示された．

5.4 結言

光独立栄養条件下で培養した *Chlorella* sp. UK001 細胞を食料，飼料として有効利用することを目的として，この細胞の主要成分の定量分析を行い，次の結果を得た．

(1) 細胞には，糖質が 43 %，タンパク質が 22 %，脂質が 13 %含まれていた．厳密な比較はできないが，健康食品としてすでに大量培養されている *Chlorella* 細胞とほぼ同じ成分組成であった．

(2) この細胞は，必須アミノ酸を含め，分析した 18 種類のアミノ酸をバランスよく含有していた．アミノ酸組成は，すでに健康食品として用いられている微細藻類に近い値を示した．

(3) この細胞には，カロチン，ナイアシン，ビタミン B 群が含まれていた．含有量は，健康食品として用いられている既往の細胞種の成分とほぼ同じと考えられた．

結　　論

光独立栄養条件下での微細藻類細胞の培養では，培地成分，CO_2，O_2 濃度，培養温度，pH などの培養条件に加えて，細胞に照射される光強度が細胞の増殖速度に大きく影響した．照射光強度の増加とともに細胞の比増殖速度は増加したが，強い光強度の下では細胞の比増殖速度が低下する現象が認められた．また，照射光強度と細胞の比増殖速度の関係は，細胞種により異なることもわかった．このことから，光独立栄養条件下において効率的に細胞生産を行うためには，細胞に照射される光強度について検討する必要があると考えた．培養液に照射された光は細胞によって吸収されるため，培養系内で光強度分布が生じる.光の透過と吸収に関する Lambert-Beer 式に基づき，入射光強度，細胞濃度，光透過距離の値から細胞懸濁液中の光強度を評価する式を導いた．この式から計算された光強度は測定値と一致し，また細胞形態および増殖特性の異なる細胞についても適用できた．

細胞に照射される光強度と細胞の比増殖速度の関係，および培養系内の光強度分布の計算結果を用いて，培養系内の光強度分布に対応する比増殖速度を定義することで，培養系内の細胞増殖を評価する方法を示した．細胞の回分培養では，入射光強度，初期細胞濃度，培養系の光透過方向の長さの値から細胞濃度の経時変化を計算で

きた．細胞の連続培養では，入射光強度，細胞濃度，培養系の光透過方向の長さの値から，安定した連続培養を行うための希釈率の値および細胞生産速度の値が計算された．計算結果は，いずれの場合も培養データとほぼ一致した．本研究で示した計算方法を用いることにより，効率的に細胞生産を行うための培養条件を決定することが可能となった．

光独立栄養条件では光をエネルギー源，二酸化炭素を炭素源として用いるが，商業的な細胞生産では光源として太陽光の利用が一般的である．太陽光を利用して微細藻類細胞を培養するためのバイオリアクターとして，太陽光を集光し，培養槽内部から照射する方式の集光型バイオリアクターを開発した．太陽光の集光方式の異なる2種類の集光型バイオリアクターを製作し，集光伝送効率を比較した結果，ミラー集光型バイオリアクターの方が集光伝送効率が高かった．また細胞に光を照射するために用いた発光担体について既往の研究結果と比較したところ，本研究で用いたアクリル樹脂製発光担体は照射光強度の均一性の点で優れていることがわかった．光供給性能の点で優れていたミラー集光型バイオリアクターを用いて，太陽光を光源とした *Chlorella* sp. UK001 の連続培養を行った．太陽光を光源として利用する場合，入射光強度は時間とともに変化するため，入射光強度と細胞濃度，バイオリアクターの光透過方向の距離から計

算された希釈率に基づく連続培養操作をおこなった．14日間の培養で，安定した培養成績を得るとともに高いエネルギー変換効率を示した．

培養実験によって生産された*Chlorella* sp. UK001の細胞バイオマスの成分分析を行った結果，糖質，タンパク質，脂質の含有量はすでに健康食品として実用化されている*Chlorella*細胞とほぼ同等の値であることがわかった．アミノ酸，ビタミンについてもバランスよく含有しており，食料，飼料としての有効性が示された．

記 号 説 明

A	= area of light irradiated surface	[m^2]
A_d	= light collecting area of sunlight collection device	[m^2]
A_p	= irradiation area of illumination plate	[m^2]
a_1	= empirical constant in Eq. (4.14)	[–]
a_2	= empirical constant in Eq. (4.15)	[–]
b_2	= empirical constant in Eq. (4.15)	[W m^{-2}]
D	= dilution rate of medium in continuous culture	[h^{-1}]
DO	= concentration of dissolved oxygen	[kg m^{-3}]
d_c	= diameter of each cell determined by microscopy	[m]
$\overline{d_c}$	= mean diameter of cells determined by microscopy	[m]
d_s	= diameter of cells calculated in sedimentation experiment	[m]
E_b	= calorific value of cells	[J kg^{-1}]
E_c	= efficiency of photosynthetic conversion on radiated light basis	[%]
E_l	= efficiency of light collection, transmission and irradiation	[%]
E_r	= total amount of energy irradiated from illumination plate	[J kg^{-1}]
$f(I)$	= function concerning stimulating effect of light	[h^{-1}]
$g(I)$	= function concerning inhibitory effect of light	[–]
I	= light intensity	[W m^{-2}]
$\bar{I}$	= mean light intensity	[W m^{-2}]
I_0	= incident light intensity	[W m^{-2}]
I_d	= light intensity of direct irradiation of sunlight	[W m^{-2}]

I_m = maximum light intensity [W m^{-2}]

$\overline{I_p}$ = mean light intensity at the surface of illumination plate [W m^{-2}]

$\overline{I}_{p,av}$ = average value of $\overline{I_p}$ in continuous culture [W m^{-2}]

I_r = relative light intensity at the surface of illumination plate [–]

$I(L)$ = light intensity at distance of L [W m^{-2}]

$I(L_i)$ = light intensity at distance of L_i from illumination plate shown in Fig. 4.8 (i = 1, 2, 3) [W m^{-2}]

K_s = saturation constant [W m^{-2}]

L = light path length [m]

L_e = horizontal length of reactor [m]

L_i = light path length from illumination plate shown in Fig. 4.8 (i = 1, 2, 3) [m]

L_r = relative length from entrance of light to illumination plate [–]

L_s = interfacial distance of cell suspension from liquid surface in sedimentation experiment [m]

m = empirical constant in Eq. (1.3) [h^{-1}]

N_c = number of cells in suspension [cell m^{-3}]

n_c = number of cells with d_c [cell]

n_{ct} = total number of cells examined [cell]

OD = optical density of culture [–]

P = cell production rate in continuous culture [kg m^{-3} h^{-1}]

P_a = cell production rate per light irradiation area in continuous culture [kg m^{-2} h^{-1}]

$P_{a,max}$ = the maximum value of P_a [kg m^{-2} h^{-1}]

P_{av} = mean cell production rate in continuous culture [kg m^{-3} h^{-1}]

P_c = percentage of number of cells with d_c to total number of cells examined [%]

P_{max} = the maximum value of P [kg m^{-3} h^{-1}]

R = feed rate of fresh medium in continuous culture [m^3 h^{-1}]

SD = standard deviation of diameter of cells [m]

T = culture temperature [°C]

T_s = temperature in sedimentation experiment [°C]

t = culture time [h]

t_s = sedimentation time [h]

U = sedimentation velocity of cells in herds [m s^{-1}]

U_p = sedimentation velocity of a single cell [m s^{-1}]

u_s = interfacial sedimentation velocity of cell suspension [m s^{-1}]

V = culture volume of bioreactor [m^3]

V_B = culture volume of dark part at lower position of bioreactor shown in Fig. 4.8 [m^3]

$\overline{V_c}$ = mean volume of cells [m^3 cell^{-1}]

V_D = culture volume of dark part at upper position of bioreactor shown in Fig. 4.8 [m^3]

V_i = culture volume of part irradiated by illumination plate at upper position of bioreactor shown in Fig. 4.8 (i = 1, 2, 3) [m^3]

V_L = culture volume of irradiated part at upper position of bioreactor shown in Fig. 4.8 [m^3]

V_T = total volume of culture in bioreactor [m^3]

X = cell concentration on dry weight basis [kg m^{-3}]

X_i = indicated value of X [kg m^{-3}]

X_{max} = maximum value of X [kg m^{-3}]

ΔX = total amount of cells produced [kg]

Y_c = efficiency of conversion from light energy to chemical energy of cells [%]

$Y_{X/J}$ = cell yield based on absorbed light energy [kg J^{-1}]

y_c = concentration of CO_2 in gas mixture [%]

y_o = concentration of O_2 in gas mixture [%]

α = effective absorption coefficient [m^{-1}]

β = transmission ratio of light through illumination plate in Eq. (4.5) [–]

ε_c = hold-up of cells in suspension [–]

γ = parameter in Eq. (1.5) [–]

μ = specific growth rate of cells [h^{-1}]

$\mu(L_i)$ = specific growth rate of cells corresponding to $I(L_i)$ given by Eq. (4.7) (i = 1, 2, 3) [h^{-1}]

$\bar{\mu}$ = mean specific growth rate of cells in bioreactor [h^{-1}]

$\overline{\mu_i}$ = mean specific growth rate of cells given by Eq. (4.8) (i = 1, 2, 3) [h^{-1}]

μ_{av} = average value of $\overline{\mu_i}$ in bioreactor given by Eq. (4.9) [h^{-1}]

μ_{max} = maximum value of specific growth rate of cells [h^{-1}]

η_m = viscosity of cell suspension [kg m^{-1} s^{-1}]

θ = ratio of light energy absorbed by cell suspension in bioreactor [–]

ρ_c = density of cells [kg m^{-3}]

ρ_m = density of cell suspension [kg m^{-3}]

ρ_w = density of water [kg m^{-3}]

<superscript>

0 = value at culture time $t = 0$

F = value at the end of culture

引 用 文 献

Adachi, T., I. Umeda and A. Miya; "The Preliminary Study of Microalgae Culturing System, Manufacturing of Prototype Bioreactor Using Internal Lighting Mechanism for Microalgae Culturing," *Ebara Jiho*, **157**, 58–66 (1992)

Aiba, S., A. E. Humphrey and N. F. Millis; Biochemical Engineering, vol. 2, p.289–328, University of Tokyo Press, Tokyo, Japan (1968)

Aiba, S.; "Growth Kinetics of Photosynthetic Microorganism," *Adv. Biochem. Eng.*, **23**, 85–156 (1982)

Bazua, C. D. and C. D. Wilke; "Ethanol Effects on the Kinetics of a Continuous Fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*," *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **7**, 105–118 (1977)

Becker, E. W.; "Micro-algae for Human and Animal Consumption," Micro-algal Biotechnology, p.222–256, Cambridge University Press, Cambridge, England (1988)

Benemann, J. R.; "Microalgae Products and Production: An Overview," *J. Ind. Microbial. Suppl.*, **5**, 247–256, (1990)

Bonalberti, E. and U. Croatto; "Use of Algal Systems as a Source of Fuel and Chemicals," *Energy Biomass*, 158–162 (1985)

Borowizka, M. A.; 'Vitamins and Fine Chemicals from Micro-algae," Micro-algal Biotechnology, p.153–196, Cambridge University Press, Cambridge, England (1988)

Camacho-Rubio, F., A. Padial-Vico and M. E. Martinez-Sancho;

"The Effect of the Mean Intensity of Light on the Cultivation of *Chlorella pyrenoidosa*," *Int. Chem. Eng.*, **25**, 283-288 (1985)

Chen, B. J. and C. H. Chi; "Process Development and Evaluation for Algal Glycerol Production," *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 1267–1287 (1981)

Chihara, M.; Genealogy and Evolution of Plants and Bacteria, 2nd ed., p.9–14, Housou-daigaku Kyoiku-shinkoukai, Tokyo, Japan (1991)

Darley, W. M.; Algal Biology: A Physiological Approach, Basic Microbiology, vol. 9, p.24–61, Baifukan, Tokyo, Japan (1987)

Devlin, R. M. and A. V. Barker; *Photosynthesis*, p.256–260, Van Nostrand Reinhold Co., New York, USA (1971)

Fujita, Y. and K. Ohki; Cyanobacteria, p.1–18, Tokyo Univ. Press, Tokyo, Japan (1989)

Fukui, S.; Methods of Quantitative Analysis of Reduced Sugars, p.45–47, Gakkai Syuppan Center, Tokyo, Japan (1969)

Goldmann, J. C.; "Outdoor Algal Mass Cultures, I. Applications," *Water Research*, **13**, 1–19 (1979)

Hagemann, M., N. Erdmann and E. Wittenburg; "Studies Concerning Enzyme Activities in Salt-loaded Cells of the Cyanobacterium *Mycrocystis firma*," *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **184**, 87–94 (1989)

Hattori, T.; Primer to Ecology of Microorganism, 2nd ed., p.103–124, Tokyo Univ. Press, Tokyo, Japan (1990)

Hirose, H. and T. Yamagishi; Illustrations of the Japanese Fresh-water Algae, p.50–103, Uchida Rokakuho Publishing, Tokyo, Japan (1977)

Hirose, H.; General Phycology, p.44–88, Uchida Rokakuho Publishing, Tokyo, Japan (1972)

Ichimura, T.; "Sexual Cell Division and Conjugation-Papilla Formation in Sexual Reproduction of *Closterium strigosum*," *Proceedings of the Seventh International Seaweed Symposium*, 208–214 (1971)

Kagawa, A.; Standard Table of Food Composition in Japan, 4th ed. p.223, Jyoshi-eiyo-daigaku Syuppan-bu, Tokyo, Japan (1990)

Kawaguchi, K.; "Microalgal Utilization as Usual Foods: History and Current Stages of *Chlorella* and *Spirulina*," *Shokuhin to Kaihatsu*, **21**, 37–41 (1986)

Kobayashi, M., T. Kakizono and S. Nagai; "Astaxanthin Production by a Green Alga, *Haematococcus pluvialis* Accompanied with Morphological Changes in Acetate Media," *J. Ferment. Bioeng.*, **71**, 335–339 (1991)

Kou, S., M. Imai and Y. Murata; Methods in Photosynthesis Research, p.501–502, Kyoritsu Publishing, Tokyo, Japan (1981)

Lee, H. Y., L. E. Erickson and S. S. Yang; "Kinetics and Bioenergetics of Light-Limited Photoautotrophic Growth of *Spirulina platensis*," Biotechnol. Bioeng., **29**, 832–843 (1987)

Lee, C. G. and B. Ø. Palsson; "Photoacclimation of *Chlorella*

vulgaris to Red Light from Light-Emitting Diodes Leads to Autospore Release Following Each Cellular Division," *Biotechnol. Prog.*, **12**, 249–256 (1996)

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall; "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent," *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275 (1951)

Malis-Arad, S. and R. E. McGowan; "Alkalinity-induced Aggregation in *Chlorella vulgaris* II. Changes in the Cell Wall during the Cell Cycle," *Plant Cell Physiol.*, **23**, 11–17 (1982)

Matsumoto, K., H. Teranishi, H. Yamamoto and H. Ohya; "Mass Transfer of CO_2 and O_2 Gas in *Chlorella* Suspension through Hydrophobic Microporous Hollow Fiber Membrane," *Membrane*, **13**, 177–183 (1988)

Matsunaga, T., H. Takeyama, H. Sudo, N. Oyama, S. Ariura, H. Takano, M. Hirano, J. G. Burgess, K. Sode and N. Nakayama; "Glutamate Production from CO_2 by Marine Cyanobacterium *Synechococcus* sp. Using a Novel Biosolar Reactor Employing Light-diffusing Optical Fibers," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **28/29**, 157–167 (1991)

Meek, S. D.; "Opportunities and Applications of Biotechnology in Food Industry," *Food Australia*, **42**, 12–13 (1990)

Metting, B.; "Micro-algae in Agriculture," Micro-algal Biotechnology, p.288–304, Cambridge University Press, Cambridge, England (1988)

Miyake M. and Y. Asada.; "Studies on Poly-β-hydroxybutyrate

Accumulation by Cyanobacteria (Part 1)," *Proceedings of Annual Meeting '96 of the Society for Fermentation and Bioengineering, Japan*, p.331 (1996)

Miyamoto, K.; "The Use of Microalgae in Bioremediation," *Bioscience and Industry*, **53**, 1029–1035 (1995)

Mori, K.; "Photoautotrophic Bioreactor Using Visible Solar Rays Condensed by Fresnel Lenses and Transmitted through Optical Fibers," *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, No.15, 331–345 (1985)

Murakami, M., Y. Takimoto, F. Yamada, A. Mishima and N. Yamaguchi; "Isolation of Microalgae from Lake and Marsh and Estimation of CO_2 Fixation Rates of Isolated Microalgae," *Research Report 1994, Project of Biological CO_2 Fixation and Utilization of RITE*, 153–187, NEDO, Tokyo (1995)

Nishikawa, N., K. Hon-nami, A. Hirano, Y. Ikuta, Y. Fukuda, M. Negoro, M. Kaneko and M. Hada; "Reduction of Carbon Dioxide Emission from Flue Gas with Microalgae Cultivation," *Energy Conver. Mgmt.*, **33**, 553–560 (1992)

Ogawa, T. and G. Terui; "Studies on the Growth of *Spirulina platensis* (I). On the Pure Culture of *Spirulina platensis*," *J. Ferment. Technol.*, **48**, 361–367 (1970)

Ogawa, T., T. Fujii and S. Aiba; "Growth Yield of Microalgae: Reassessment of Ykcal," *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 1493–1500 (1978)

Omata, T and N. Murata; Methods in Photosynthesis Research, p. 295–297, Kyoritsu Syuppan, Tokyo, Japan (1981)

Oswald, W. J.; "Micro-algae and Waste Water Treatment," Micro-algal Biotechnology, p.305–328, Cambridge University Press, Cambridge, England (1988)

Pauw N. D. and D. Persoone; "Micro-algae for Aquaculture," Micro-algal Biotechnology, p.197–221, Cambridge University Press, Cambridge, England (1988)

Richmond, A.; "*Spirulina*," Micro-algal Biotechnology, p.85–121, Cambridge University Press, Cambridge, England (1988)

Shibata, K; "Biomass Resources and Energy," Production and Conversion of Biomass, vol. 1, p.3–25, Gakkai Shuppan Center, Tokyo, Japan (1981)

Taya, M., M. Miyaoka, Y. Toyo-oka, M. Kino-oka, S. Tone, and K. Ono; "Growth Characteristics of Liverwort Cells, *Marchantia paleacea var. diptera*, in Photoautotrophic Suspension Culture," *J. Ferment. Bioeng.*, **80**, 580–585 (1995)

Tredici, M. R., P. Carolozzi, G. C. Zittelli and R. Materassi; "A Vertical Alveolar Panel (VAP) for Outdoor Mass Cultivation of Microalgae and Cyanobacteria," *Bioresource Technol.*, **38**, 153–159 (1991)

Trozillo, G., P. Carlozzi, B. Pushparaj, E. Montani and R. Materassi; "A Two-Plane Tubular Photobioreactor for Outdoor Culture of *Spirulina*," *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 891–898 (1993)

Watanabe, M and T. Ichimura; "Fresh- and Salt-water Forms of *Spirulina platensis* in Axenic Culture," *Jpn. J. Phycol.*,

25, 177–181 (1977)

Watanabe, A.; "Research of Blue-green Algae," in *Production and Conversion of Biomass*, vol. 1, p.3–25, Gakkai Shuppan Center, Tokyo, Japan (1981)

論文リスト

Papers:

1. Carbon Dioxide Fixation in Batch Culture of *Chlorella* sp. Using a Photobioreactor with a Sunlight-Collection Device

   Hirata, S., M. Hayashitani, M. Taya and S. Tone

   J. Ferment. Bioeng., **84**, 470–475 (1996)

2. Characterization of *Chlorella* Cell Culture in Batch and Continuous Operations Under a Photoautotrophic Condition

   Hirata, S., M. Taya and S. Tone

   J. Chem. Eng. Japan, **29**, 953–959 (1996)

3. Effect of Temperature on Change in Cell Diameter of *Chlorella* sp. UK001 in Photoautotrophic Culture

   Hirata, S., M. Taya and S. Tone

   Kagakukogaku Ronbunsyu, **23**, 200–207 (1997)

4. Growth Estimation of *Spirulina platensis* by Considering Light Distribution in Photoautotrophic Batch Culture

   Hirata, S., J. Hata, M. Taya and S. Tone

   J. Chem. Eng. Japan, **30**, 355–359 (1997)

5. Development of a Bioreactor Equipped with Sunlight-Collection Device for Photoautotrophic Culture of Microalgal Cells

   Hirata, S., M. Taya, S. Tone and M. Hayashitani

   Kagakukogaku Ronbunsyu, **23**, No. 3, in press (1997)

6. Photoautotrophic Cultures of *Spirulina platensis* in continuous operation with change in light intensity

   Hirata, S., M. Taya and S. Tone

   Biotechnol. Bioeng., in preparation (1997)

Proceeding:

Continuous Production of Algal Cells Irradiated at Various Light Intensities

Hirata, S., M. Taya and S. Tone

Preprints of the 4th Asia-Pacific Biochem. Eng. Conf., Peking, China, to appear (1997)

Books:

1. Research and Development of Carbon Dioxide Fixation Using Microalgae

   Hirata, S., H. Minakami and M. Hayashitani

   Symp. Ser. of Chem. Eng. **38**, Countermeasure Technology and Basic Research for Carbon Dioxide, p.48–53, The Society of Chemical Engineers, Japan, Tokyo, Japan (1993)

2. Effect of Culture Temperature on Increase in Diameter of *Chlorella* Cells

Hirata, S., M. Taya and S. Tone

Symp. Ser. of Chem. Eng. **57**, Horizon of Biochemical Engineering, p.76–80, The Society of Chemical Engineers, Japan, Tokyo, Japan (1997)

謝　　辞

本論文をまとめるにあたって，数多くの方々のお世話になりました．

まず，大阪大学大学院基礎工学研究科の博士後期課程に在籍した２年３カ月の間，研究を直接ご指導下さるとともに叱咤激励して下さいました，大阪大学大学院基礎工学研究科化学系専攻化学工学分野の東稔節治教授，田谷正仁教授に心より感謝致します．

本論文を完成させるにあたり，大阪大学大学院基礎工学研究科の駒沢勲教授，平田雄志教授より有益なご助言を頂きました．また，木村尚史教授，上山惟一教授，新田友茂教授，久保井亮一教授をはじめ多くの先生方に，研究コロキウムなどの機会を通じ適切なるアドバイスを頂きました．心からお礼申し上げます．

本論文は，大阪大学大学院基礎工学研究科東稔研究室の教職員，学生のみなさんのご支援，ご協力のもとに完成させることができました．とりわけ，正脇輝之助教授には研究全般について，紀ノ岡正博助手には実験方法についてご助言を頂きました．また細胞増殖の計算にあたっては，大学院生の秦純一氏の支援を受けました．感謝致します．

著者は，川崎重工業株式会社に在籍のまま大阪大学大学院に入学しましたが，この間，同社の多くの方々のご

支援を頂きました．まず，この研究テーマでの学位取得を勧めて下さり，東稔先生，田谷先生を紹介して下さった，技術総括本部開発室長の伊東速水理事には，一方ならぬお世話になりました．また2年3カ月にわたる国内留学を許可して下さいました，明石技術研究所長の荻原亮太郎技監に感謝いたします．さらに留学期間中，著者のために多大な配慮をして下さると同時に，折にふれて励まして下さった明石技術研究所 化学・環境研究部長の林谷正雄氏に心よりお礼申し上げます．

本研究の一部は，新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)の委託事業「細菌・藻類等利用二酸化炭素固定化・有効利用技術研究開発」の一環として行われたものです．本研究で用いたミラー型太陽光集光装置および光ファイバーは旭硝子(株)により，アクリル樹脂製発光担体は日本板硝子(株)により，上記委託事業の一環としてそれぞれ開発されたものです．研究内容を公表するにあたっては，（財）地球環境産業技術研究機構 CO_2固定化等プロジェクト室技術部長の池ノ内昌弘氏に，ご理解とご協力を賜りました．お礼申し上げます．

最後にこの数年間，夫として，父親としての義務を全く果たさなかったことに対して，文句一つ言わなかった家族に対し，感謝の意を表します．