

クロレラ培養槽内の 細胞外代謝有機酸に関する研究

岩手大学工学部土木工学科 ○小松佳幸 大村達夫 相沢治郎
海田輝之 大沼正郎

1. はじめに

藻類は増殖あるいは自己溶解の間に水環境中に多種多様の代謝生産物を放出することが知られている。この代謝生産物は、共存生物や自己の増殖に対して多大な影響を与えられているとされており、水域生態系をコントロールする重要な因子の1つであると考えられている¹⁾。一般に、藻類による種々な放出代謝生産物は、それらの分子量の大ききの順に、炭水化物、タンパク質そして有機酸に大きく分類される。

そこで本研究においては、緑藻類の *Chlorella vulgaris* を実験室内において回分培養を行ない、培養液中有機酸の挙動を明らかにする為、ゲルクロマトグラム、TOC（総炭素量）などの指標との関連性について検討を行なった。

2. 実験装置および方法

2.1 藻類培養装置および培養条件

藻類の培養には、Fig-1に示すような容量 9.6(l)のガラス製の混合培養槽が用いられた。また、光源として側面から白色蛍光灯（4000lx）を照射し12時間明暗培養が行なわれた。培養温度は、恒温槽によって25℃に保たれた。使用された培地はTable-1に示されるようにChu培地が使用された。そして、藻類の増殖に対してCO₂が制限にならないようにするためと混合を保障するために培養液は、無菌空気ではっ気された。

2.2 分析装置および分析条件

（藻類生物量）----クロロフィル-aが藻類量の指標として使用された。

（ゲルろ過）-----ゲルカラムは内径25mm、高さ90cmで、ゲルは Sephadex G-15 が使用された。展開流量は60(ml/hr)で1(fraction)を10(ml)とし50 (fraction)分画を行ないそれぞれのろ液の吸光度（E₂₂₀, E₂₆₀）を測定しゲルクロマトグラムが描かれた²⁾。ここでカラムに添加される試料は、培養液の50倍濃縮液10(ml)とした。

（TOC）-----TOCはゲル分画されたfractionごとに測定された。

（不揮発性有機酸）-培養液を0.45μmガラスフィルターでろ過した後、減圧乾固しエステル化³⁾の前処理を経てガスクロマトグラフィーで定量された。

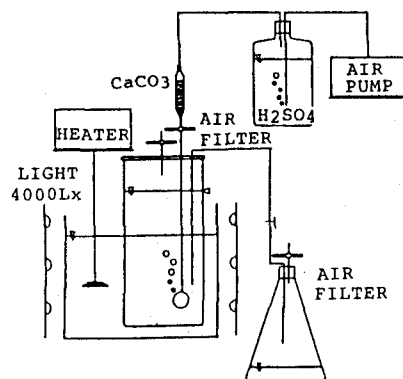


Fig-1 藻類培養装置

Table-1 Chu培地組成

Ca(NO ₃) ₂	0.04g
KH ₂ PO ₄	0.02g
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.025g
Na ₂ CO ₃	0.02g
Na ₂ SiO ₃ ・9H ₂ O	0.025g
FeCl ₃	0.0008g
P IV金属混液	1.0ml
蒸留水	1000ml pH7.5
P IV金属混液	
FeCl ₃ ・6H ₂ O	0.196g
MnCl ₂ ・4H ₂ O	0.036g
ZnCl ₂	0.0105g
CoCl ₂ ・6H ₂ O	0.004g
NaMoO ₄ ・2H ₂ O	0.0025g
Na ₂ EDTA	1.0g
蒸留水	1000ml

3. 結果および考察

3.1 Chlorella vul.の増殖過程

Fig-2の中にChlorella vul.の増殖状態が示されている。Chlorella vulは、植種後5日目から対数増殖しクロロフィル-aと細胞数の間には良い相関（r=0.99）が見られた。しかし、12日後にクロロフィル-

aの明らかな減少が見られたにもかかわらず細胞数は一定となり、細胞内のクロロフィル含量の低下が明らかになった。すなわち、12日目以降 *Chlorella vul.*の自己分解過程が進んでいるものと推定される。したがって、細胞数とクロロフィル-aの相関が良い12日目までを増殖期、それ以降を減衰期とし特に13~20日目までを減衰期前期、それ以降を後期として以降の考察を行なう事にする。

3.2 不揮発性有機酸およびTOCについて

本研究の実験結果から、藻類から放出される主要な不揮発性有機酸として、ビルビン酸、乳酸、グリコール酸、しゅう酸およびフマル酸を取り上げた。そして、これらの不揮発性有機酸の総量を総有機酸量とみなした。

Fig-2に*Chlorella vul.*の培養液中の総有機酸量(炭素量に換算)が示されている。これらの結果を見ると、総有機酸量は減衰期に著しい増加が観察された。したがって、有機酸は増殖期においてはそれ程放出されないものと考えられる。しかしTable-2の総有機酸に占めるそれぞれの有機酸の割合を見ると、増殖期においてはグリコール酸が全体の87.5%を占め、増殖期におけるグリコール酸の放出は無視できないものと考えられる。

また*Chlorella vul.*の場合、減衰期後期におけるしゅう酸の増加が著しく、ほぼグリコール酸濃度と同じになった。したがって、他の有機酸に較べてグリコール酸およびしゅう酸が*Chlorella vul.*による重要な放出有機酸と考えられる。

Fig-2に培養液中のTOCの値が同時に示されている。TOCは有機酸と同様に経過日数に従い増加を示している。*Chlorella vul.*の培地のTOCは0.29 mg/lとほとんど有機炭素が含まれていないので、これらのTOCは全部が*Chlorella vul.*によって放出されるものとみなされる。

Table-3に、*Chlorella vul.*の総有機酸量(炭素量に換算)がTOCに占める割合を示している。これによ

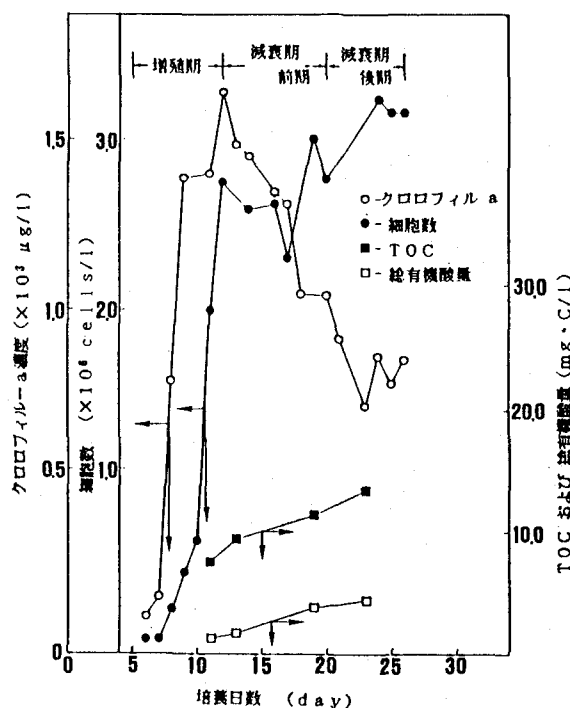


Fig-2 *Chlorella* の増殖状態

Table-2 各有機酸の放出量と総有機酸に占める割合

経時日数	増殖期	減衰期前期		減衰期後期
	11 day	13 day	19 day	23 day
ビルビン酸	0.41 (11.1%)	-	-	0.30 (2.1%)
乳酸	0.03 (0.8)	-	0.01 (0.1)	-
グリコール酸	3.21 (87.5)	4.10 (75.5)	7.10 (58.1)	6.82 (48.8)
しゅう酸	0.05 (1.3)	1.33 (24.5)	5.10 (41.8)	6.10 (43.7)
フマル酸	0.01 (0.3)	-	-	0.75 (5.4)
合計	3.71 ^{mg/l}	5.43 ^{mg/l}	12.21 ^{mg/l}	13.97 ^{mg/l}

Table-3 総有機酸がTOCに占める割合

経時日数	増殖期	減衰期前期		減衰期後期
	11 day	13 day	19 day	23 day
総有機酸量(mg.C/l)	1.22	1.67	3.65	4.26
TOC (mg.C/l)	7.46	9.52	11.27	13.10
有機酸占有率 (%)	16.40	17.50	32.40	32.50

ると *Chlorella vul.* の場合、増殖期と減衰期前期においてはその占有率は17%程度であるが、減衰期後期は32%程度となり、TOCのうちの主要な有機物質となることがわかった。

3.3 ゲルクロマトグラムによる放出代謝有機物の検討

Chlorella vul. の培養液をゲルろ過によって分画した結果の一例（減衰期後期）をFig-3に示した。これを見てわかるように、3つのピークが生じ代謝物の成分は3つの画群に分画された。そして、それぞれのピークの画群をⅠ、ⅡおよびⅢとして、以降の考察を行なうことにする。

ゲルクロマトグラムはフランクシオンナンバーが大きくなるにつれ分画された物質の分子量が小さくなるので、この事より画群の分子量の大きさは画群Ⅰ>画群Ⅱ>画群Ⅲとなる。

そこで、画群Ⅰ、Ⅱ、Ⅲに含まれるTOCが全体のTOCに占める割合をTable-4に示した。それぞれの画群は最初に述べたように、画群Ⅰが主に炭水化物、画群Ⅱが主にタンパク質、そして画群Ⅲが主に有機酸と考えられることから推測すると⁴⁾、各成分ともほぼ同じ割合で放出されることを示して

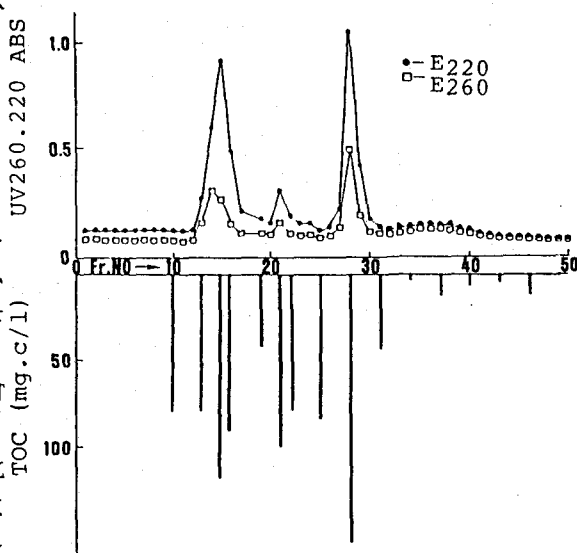


Fig-3 ゲルクロマトグラムとTOC (ex.29day)

Table-4 各画群TOCが全TOCに占める割合

経時日数	11 day	13 day	19 day	23 day
画群Ⅰ	35.9 (%)	24.9 (%)	28.2 (%)	29.3 (%)
画群Ⅱ	28.3	25.3	19.3	21.1
画群Ⅲ	26.8	25.5	42.2	37.8

いる。また、画群Ⅲは前節のTOCに占める総有機酸量から比較すると、総有機酸量は画群Ⅲにおいておおむね60~86%の値を占めることになり、画群Ⅲは藻類に

よる有機酸の放出量を表す指標と考えることが出来るものと考えられる。

4. 結論

- 1) 培養液中の総有機酸およびTOCは増殖期から減衰期にかけて増加した。
- 2) *Chlorella vul.* の放出有機酸のうち主要なものはグリコール酸とシゅう酸であり、特に増殖期においてはグリコール酸のみが放出された。
- 3) 藻類培養液は、ゲル分画によると3つの画群に分れ画群Ⅲは有機酸の指標となり得ることがわかった。おわりに 本実験に用いた*Chlorella vulgaris*を供与して頂いた国立公害研究所、並びに研究に多大なる協力を賜りました高弥建設の広野吉幸氏、安藤建設の吉田勝司氏、本学生の石崎正志、桜田準也両氏に深謝致します。

参考文献

- 1) 坂本 充：生態遷移Ⅱ，共立出版，東京（1978）
- 2) 芦谷和芳：液体クロマトグラフィー使用の実際，水質汚濁研究 Vol.11 No2(1988)
- 3) 山下市二，田村太郎，吉川誠次，鈴木重治：有機酸のガスクロマトグラフィーの為のブチルエステル化 JAPAN ANALYST Vol.22(1973)
- 4) TAKEO HAMA, NOBUHIKO HANDA：Pattern of organic matter production by natural phytoplankton population in a eutrophic lake 1,2, Arch. Hydrobiol 109:227-243 (1987)