

9826 膜面液体培養法を用いた海洋植物プランクトン *Oscillatoria* 属の培養と特性解明

助成研究者：中西 一弘 (岡山大学 工学部)

共同研究者：崎山 高明 (岡山大学 工学部)

今村 維克 (岡山大学 工学部)

海産微細藍藻の一つである *Oscillatoria* 属 (以前は *Trichodesmium* 属と呼ばれていた) は、浮遊性の海洋植物プランクトンの一つであり、鎖状に連結した細長い糸状あるいは糸束状で増殖する。多くの植物プランクトンが硝酸、亜硝酸、アンモニアなどの窒素化合物しか利用できないのに対して、*Oscillatoria* 属は好気条件下で分子状の窒素を固定する能力がある点から高い関心が寄せられている。また、*Oscillatoria* 属の中には熱帯外洋域において赤潮を形成するものも知られている。しかしながら、このような *Oscillatoria* 属の詳細な特性・機能に関しては殆ど明らかにされていない。一方、申請者らは最近、菌糸状微生物のカビの潜在機能を発揮できる新規な培養方法を考案し (*Biotechnol. Technique*, 8, 242-254, 1994)、膜面液体培養法 (Membrane-Surface Liquid Culture; MSLC) と名付けた。MSLC は液体培地表面に多孔性膜を設置し、その空気に接した膜表面上でカビを静置培養する方法である。カビは液体培地から膜を通して栄養物を吸収し、生成物は逆に培地中に分泌される。申請者らは MSLC を用いて、カビによる酵素や有機酸の生産を試みたが、いずれの場合も生成速度、生成量の顕著な増加がみられただけではなく、カタボライトリプレッションが緩和されることを示した。本研究では、これらの知見に基づいて、MSLC を *Oscillatoria* 属の培養に適用した。MSLC で培養することにより、菌体は二酸化炭素を直接空気中から吸収することが可能であるとともに、既往の培養でみられる水中での光の減衰は無視できるという利点加わる。本研究では、先ず MSLC において最も重要な多孔性膜を選択するために、膜内拡散係数の測定を行った。膜内拡散係数は膜の種類と膜孔径に依存するが、孔径が $0.2\mu\text{m}$ 前後の多孔性膜の拡散係数は水溶液中での値の $1/10$ 程度であり、増殖速度の程度を考慮に入れると膜内物質移動抵抗の影響は無視できることが明らかにされた。これらの多孔性膜を用いた MSLC と液体培養により *Oscillatoria* の培養を試みている。

9 8 2 6 膜面液体培養法を用いた海洋植物プランクトン *Oscillatoria* 属の培養と特性解明

助成研究者：中西 一弘 (岡山大学 工学部)
共同研究者：崎山 高明 (岡山大学 工学部)
今村 維克 (岡山大学 工学部)

海産微細藍藻の一つである *Oscillatoria* 属 (以前は *Trichodesmium* 属と呼ばれていた) は、浮遊性の海洋植物プランクトンの一つであり、鎖状に連結した細長い糸状あるいは糸束状で増殖する。多くの植物プランクトンが硝酸、亜硝酸、アンモニアなどの窒素化合物しか利用できないのに対して、*Oscillatoria* 属は好気条件下で分子状の窒素を固定する能力がある点から高い関心が寄せられている。また、*Oscillatoria* 属の中には熱帯外洋域において赤潮を形成するものも知られている。しかしながら、このような *Oscillatoria* 属の詳細な特性・機能に関しては殆ど明らかにされていない。一方、申請者らは最近、菌糸状微生物のカビの潜在機能を発揮できる新規な培養方法を考案し (*Biotechnol. Technique*, 8, 242-254, 1994)、膜面液体培養法 (Membrane-Surface Liquid Culture; MSLC) と名付けた。MSLC は液体培地表面に多孔性膜を設置し、その空気に接した膜表面上でカビを静置培養する方法である。カビは液体培地から膜を通して栄養物を吸収し、生成物は逆に培地中に分泌される。申請者らは MSLC を用いて、カビによる酵素や有機酸の生産を試みたが、いずれの場合も生成速度、生成量の顕著な増加がみられただけでなく、カタボライトリプレッションが緩和されることを示した。本研究では、これらの知見に基づいて、MSLC を *Oscillatoria* 属の培養に適用することを着想した。MSLC で培養することにより、菌体は二酸化炭素を直接空気中から吸収することが可能であるとともに、既往の培養でみられる水中での光の減衰は無視できるという利点加わる。本研究では、先ず MSLC において最も重要な多孔性膜を選択するために、膜内拡散係数の測定を行った。膜内拡散係数は膜の種類と膜孔径に依存するが、孔径が $0.2\mu\text{m}$ 前後の多孔性膜内におけるグルコースの拡散係数は水溶液中での値の $1/2 \sim 1/3$ 程度であり、増殖速度の程度を考慮に入れると膜内物質移動抵抗の影響は無視できることが明らかにされた。これらの多孔性膜を用いた MSLC と液体培養により *Oscillatoria*、*Nostoc*、*Anabena* などのラン藻類の培養を試みた。

1. はじめに

本研究で取り扱う海産微細藍藻の *Oscillatoria* 属や *Nostoc* 属などの特徴としては、1) 浮遊性で水面近傍や固体基質に付着して生息・増殖すること、2) 細長い糸状あるいは糸束の形態をとること、3) 好気条件下で空中窒素を固定する能力があること、4) 色素・酵素阻害剤などの生理活性物質を菌体外に分泌することなどが挙げられる。一方、培養上の問題点としては、1) 攪拌や通気（炭酸ガス）により細胞の形状が変化するだけではなく、その変化が物質生産に影響を及ぼすこと、2) 水中での光の吸収により光強度が減衰すること、3) 水中への窒素の溶解度が低いことなどが指摘される。これらの点を考慮すると、現在主として用いられている振盪フラスコ培養法では *Oscillatoria* 属本来の特性・機能を利用することは困難ではないかと考えられる。未利用生物資源である海産微細藍藻の機能を有効に活用するためには特性を活かすことのできる新規な培養法の開発が必要である。

申請者らは最近液体培地表面上に設置した多孔性膜面上で、菌糸状微生物であるカビや放線菌を静置培養するという膜面液体培養法を新規に開発し、その機能の解明を行っている（1-6）。膜面液体培養法の原理は極めてシンプルである。図1に示すように液体培地の表面上に多孔性膜を設置し、その上でカビを増殖させる。本研究ではカビの代わりにラン藻を増殖させる。多孔性膜面上のカビは膜を通して液体培地中から栄養物を摂取し、酸素を直接空気から取り込む。代謝産物は膜を分子拡散で透過し液体培地中に蓄積する。菌糸は膜孔内に侵入しないので、培養中、培地は清澄な状態に維持される。すなわち、本方法は培地組成や pH を自由に調節可能な液体培養法と空気に接した固体表面上で静置培養を行う固体培養法の特性を併せもつ。これまでの研究結果から、膜面液体培養法は振盪フラスコ培養法と比較して代謝産物生成速度の増加、異化代謝産物抑制の緩和や自己消化に対する安定性の大幅な増加がみられることから、カビの潜在機能を発揮できる培養法として認識されつつある（7）。

本研究では *Oscillatoria* 属などのラン藻の培養への膜面液体培養法の適用性を検討した。

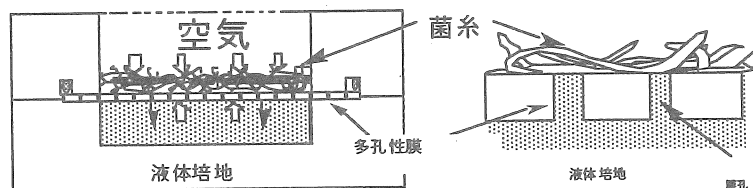


図1 膜面液体培養法の原理（左図）と拡大図（右図）

2. 材料と実験方法

1) 使用菌株

使用菌株としては、1) *Oscillatoria* sp. ATCC29215 (泥海水由来のラン藻)、2) *Nostoc spongiaeforme* TISTR8169 (淡水性ラン藻)、3) *Nostoc commune* NIES-24、及び4) *Anabaena variabilis* NIES-23 のラン藻類を使用した。2) ~ 4) の菌株は大阪大学薬学部宮本和久教授から供与頂いた。

2) 培地

培地としては、1) Media #616BG-11(ATCC) と2) Modified No.18 for blue-green algae を使用した。*Oscillatoria* sp. ATCC29215 (泥海水由来のラン藻) は上記の1) の培地を用い、他のラン藻については2) の培地を用いた。それぞれの培地組成を下記に示す。いずれの場合も培地終 pH は 7.1 に調整した。また、必要に応じて酵母エキス(Yeast extract) を添加した。また、寒天培地として使用する場合には、終濃度が 1.2% となるように寒天を添加した。

表 1 使用した培地

1) Media #616BG-11(ATCC)		2) Modified No.18 for blue-green algae	
NaNO ₃	1.50 g	NaCl	70 mg
K ₂ HPO ₄	0.04 g	K ₂ HPO ₄	120 mg
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.075 g	MgSO ₄ 7H ₂ O	380 mg
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.036 g	CaCl ₂ 2H ₂ O	106 mg
Citric acid	6.0 mg	Fe ₂ (SO ₄) ₂ nH ₂ O	10 mg
Ferric ammonium citrate	6.0 mg	EDTA2Na	70 mg
EDTA	1.0 mg	NaNO ₃ (N-source)	1.50 g
Na ₂ CO ₃	0.02 g	H ₃ BO ₃	3 mg
Yeast extract (vitaminB12)	10.0 mg	MnSO ₄ H ₂ O	2 mg
H ₃ BO ₃	2.86 mg	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	8 mg
MnCl ₂ 4H ₂ O	1.81 mg	ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.3 mg
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.222 mg	CuSO ₄ 5H ₂ O	0.08 mg
Na ₂ MoO ₄ 2 H ₂ O	0.039 mg	CoCl ₂ 6H ₂ O	0.037 mg
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.079 mg	Agar (if needed)	12.0 g
Co(NO ₃) ₂ 6H ₂ O	0.049 mg	Distilled water	1.0 l
Agar (if needed)	12.0 g		
Distilled water	1.0 l		

3) 培養方法

培養方法としては、1) プラスティックシャーレを用いた静置培養、2) プラスティックシャーレを用いた膜面液体培養、及び3) 寒天スラント培養の3種類を行った。いずれの場合も恒温恒湿インキュベータ (ダバイエスベック製 BNR-110M) 内にシャーレを設置し、その上面から 500 - 3000 Lux の強度の白色光を照射した。温度は 25 - 30 °C、相対湿度 99%以上、インキュベータ内の炭酸ガス濃度は 0.1 - 1.0% にコントロールした。プラスチックシャーレは内径 9 cm のものを用い、培地液量は 25ml とした。図 2 にプラスチックシャーレを用いた静置培養及び膜面液体培養の概略図を示す。膜面液体培養にて使用する多孔性膜としては、本実験で検討した多孔性膜は、①SE20 膜 (富士写真フィルム)、及び日本ジェネンティック社製の②Biodyne A、③Biodyne B (0.2 μm)、④Biodyne B (0.4 μm)、⑤Biodyne C、⑥Lowprodyne LP の 6 種類である。SE20 膜は、口称孔径 0.2 mm のポリスルホン製の多孔性膜であり、表面が親水処理されている。Biodyne A、Biodyne B、Biodyne C、及び Lowprodyne LP はいずれもナイロン製であり、それぞれ膜表面が、 $(\text{NH}_3^+ \text{COO}^-)$ 、 $(\text{N}^+ \text{R}_3)$ 、 (COO^-) 、及び (OH) 基で修飾されている。スラント上で増殖した菌を少量の生理食塩水で懸濁し、懸濁液約 0.5 ml を植菌することにより培養を開始した。いずれの場合も静置培養を行った。

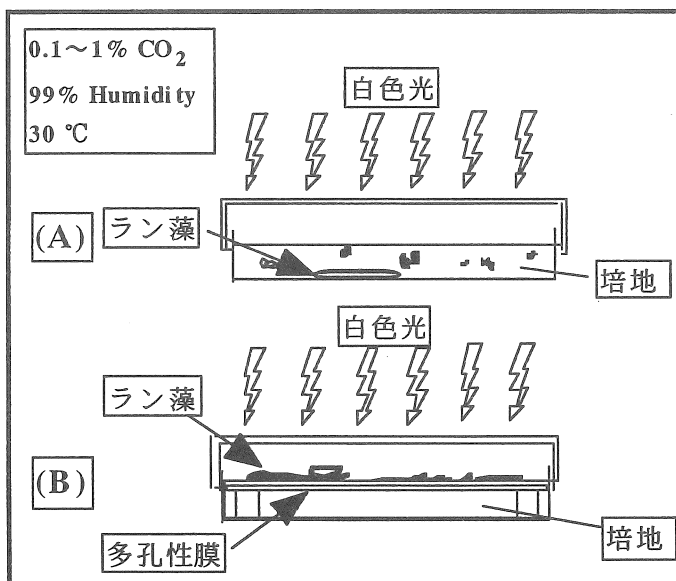


図 2 恒温恒湿インキュベーターと培養装置の概略図

4) 膜内拡散係数の測定

膜面液体培養法における多孔性膜内の基質の透過に対する拡散抵抗の影響を評価するために、モデル物質のグルコースの膜内拡散係数を図3に示す装置を用いて測定した。装置はポリカーボネイト製で、上部と下部にそれぞれ空洞を有し、中央に多孔性膜を設置する。下部空洞には純水を、上部には1%グルコース溶液で満たした。上部の溶液をマグネチックスタラーにより緩やかに攪拌を行った。さらに、下部はペリスターポンプを用いて流速2.5 ml/minで循環させた。三角フラスコから試料溶液を経時的に100 μ l サンプリングし、グルコース濃度をグルコスタット法により定量した。上下の空洞中の液は、十分に混合されているので、多孔性膜近傍の液境膜の物質移動に及ぼす影響は無視できるものと考えられる。

膜内物質移動係数、 $k_m (=D/\delta)$ を用いると、擬定常条件下では上部空洞溶液中の溶質濃度は(1)式で表わされる。

$$\ln(1 - \alpha C / C_0) = -(\alpha D_m A_m / V_2 \delta) t \quad (1)$$

ここで、 $\alpha =$ (上部溶液体積/下部溶液体積)、 $C_0 =$ 溶質初期濃度 (上部溶液)、 $C =$ 任意時間における溶質濃度 (下部溶液)、 $D_m =$ 膜内拡散係数、 $A_m =$ 膜面積、 $V_2 =$ 下部溶液体積、 $\delta =$ 膜の厚さ、 $t =$ 時間

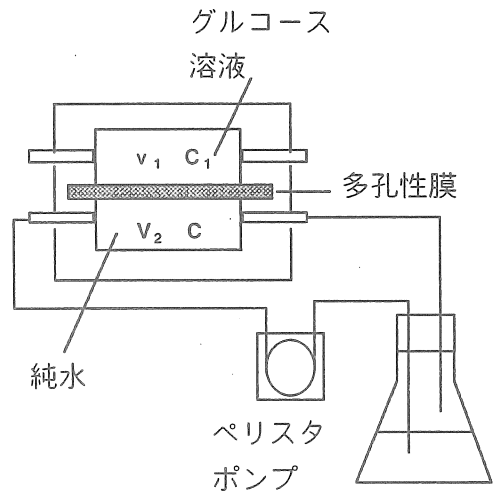


図3 多孔性膜内拡散係数測定装置

実験結果から得られる $\ln(1 - \alpha C / C_0)$ を時間 t に対してプロットし、直線の勾配と(2)式を用いて D_m を算出した。

$$\text{勾配} = -(\alpha D_m \cdot A_m / V_2 \delta) \quad (2)$$

4. 実験結果

1) 膜内拡散係数

表2に各種膜に対する拡散係数を示す。いずれの膜内のグルコースの拡散係数も $1.0 - 3.0 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ の範囲であり、水溶液中の分子拡散係数の $1/2 \sim 1/3$ の程度であった。表2中の η は膜内物質移動抵抗が無視できる場合の増殖速度に対する実際の増殖速度の割り合いを示す。すなわち、 η の値が小さいほど膜内物質移動抵抗の影響が大きく、菌体が付着増殖する膜表面の基質濃度が培地中の濃度よりも低下する。本研究では膜が存在しない状態での増殖速度の測定を行っていないので、正確な評価は困難であるが、以前に検討した糸状菌 *Aspergillus oryzae* の結果(6)を用いて η を算

出したところ表2に示す様に1.0に近い値を示した。すなわち、本培養系においては膜内物質移動抵抗の影響は無視することができることが示唆された。

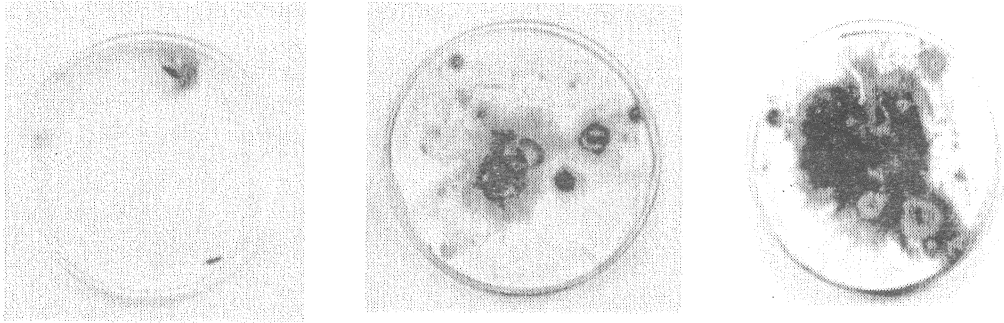
表2 グルコースの種々の多孔性膜内拡散係数

多孔性膜	拡散係数 (cm ² /s)	η (-)
SE 20	2.7×10^{-6}	0.99
Biodyne A	2.5×10^{-6}	0.98
Biodyne B (0.2 μ m)	1.1×10^{-6}	0.98
Biodyne B (0.4 μ m)	3.3×10^{-6}	0.99
Biodyne C	1.9×10^{-6}	0.98
Lowprodyne LP	1.2×10^{-6}	0.98

(温度：25°C)

2) 培養の結果

使用菌株としては、1) *Oscillatoria* sp. ATCC29215、2) *Nostoc spongiaeforme* TISTR8169、3) *Nostoc commune* NIES-24、及び4) *Anabaena variabilis* NIES-23のラン藻を用いた。プラスチックシャーレ内の液体静置培養とプラスチックシャーレを用いた膜面液体培養の2つの方法（実験方法参照）により培養を行った。当初の目的である *Oscillatoria* sp. ATCC29215 については、液体静置培養及び膜面液体培養のいずれの場合においても増殖がみられず、7～10日後に死滅した。種々の培養条件下において（炭酸ガス濃度；0.1 - 1.0%、温度；25 - 30°C、光強度；500 - 3000 Lux）、種々の膜を用いて検討したが改善はみられなかった。また、ATCCから送られてきた保存菌株と同様に寒天培地上で静置培養を行ったが、増殖は認められなかった。この理由に関しては明らかではないが、本 *Oscillatoria* sp. の培養に必要な不可欠な微量成分の欠乏や培養条件が不適切であることだけではなく、培養初発の植菌量が少ないことなどが考えられる。すなわち、植菌量が少ないために増殖誘導物質の不足や本来密集状態ではさほど強くない光の強度が強すぎるものが考えられるが、本研究では明らかにすることはできなかった。一方、*Nostoc spongiaeforme* TISTR8169、*Nostoc commune* NIES-24、及び *Anabaena variabilis* NIES-23 は、炭酸ガス濃度 1.0%、培養温度 30°C、光強度 2500 Lux の条件で、いずれの培養方法でも顕著な増殖が認められた。また、N源非存在下においても増殖が認められた。膜の種類に関しては、特に差は認められなかった。図4 (a)、(b)には *Nostoc spongiaeforme* を膜面液体培養法 (Biodyne B を使用) により培養を行った際の培養4日後と7日後の膜表面上の菌体の様子を示す。なお、培養初期には直径数 2～3 mm の塊状のラン藻を植菌した。図4 (c)には比較のために液体静置培養の結果も示す。定性的ではあるが、膜面液体培養法の方が菌体量が多く、菌体の広がり状態も良好であることがわかる。



(a)

(b)

(c)

図4 *Nostoc spongiaeforme* の培養 (菌体増殖の様子)

(a) 液体静置培養 (培養5日目)、(b) 膜面液体培養 (培養4日目)

(c) 膜面液体培養 (培養7日目)

培養条件：炭酸ガス濃度 1.0%、培養温度 30°C、光強度 2500 Lux

培地 (Modified No.18)、多孔性膜; BiodyneB

5. 最後に

本研究では筆者らが糸状菌の培養に開発した膜面液体培養法をラン藻の培養に適用した。当初期待したような研究成果を挙げることはできなかったが、数種類のラン藻が多孔性膜を介して液体培地を摂取しながら多孔性膜面上で増殖することを初めて確認した。

(参考文献)

- 1) Yasuhara, A. *et al.*: Biotechnol. Technique, 8, 249-254 (1994).
- 2) Ogawa, A. *et al.*: J. Ferment. Bioeng., 80, 35-40 (1995).
- 3) Ogawa, A. *et al.*: J. Ferment. Bioeng., 80, 41-45 (1995).
- 4) Wakisaka, Y. *et al.*: Proc. 5th World Congress of Chemical Engineering, 2, 271-276 (1996).
- 5) 中西一弘, バイオサイエンスとインダストリー, 56, 27-29 (1998).
- 6) Wakisaka, Y. *et al.*: J. Ferment. Bioeng., 85, 484-494 (1998).
- 7) Nakanishi, K. *et al.*: Encyclopedia of Bioprocess Technology, pp. 1706-1713 (1999).

Membrane-surface liquid culture of marine blue-green algae

Kazuhiro Nakanishi, Takaharu Sakiyama, and Koreyoshi Imamura

Department of Bioscience and Biotechnology

Faculty of Engineering, Okayama University

Summary

For aerobes like molds, membrane-surface liquid culture, abbreviated MSLC, has been shown to give excellent results of fermentation in comparison with ordinary liquid cultures. This is because the MSLC allows organisms to grow on a porous membrane set on the surface of a liquid medium so that they can keep contact with air. In this study, the MSLC was applied to cultivate blue-green algae such as *Oscillatoria*, *Nostoc*, and *Anabaena*, aiming at enhancing their ability to fix nitrogen. It is known that the selection of the porous membrane is a point for successful cultivation by the MSLC. To study the effect of mass transfer through the membrane on the growth rate of the blue-green algae, diffusion coefficients for glucose in several membranes of different materials and pore sizes were measured. When the pore size of membrane was around 0.2 μm , the diffusion coefficient for glucose in the membrane was at least one third of that for glucose in aqueous solution. Thus the effect of mass transfer through the porous membranes was considered to be negligible. Most of the blue-green algae tested were found to be well cultivated by the MSLC irrespective of the type of membrane used. Furthermore, the MSLC was shown to give better cultivation of the blue-green algae than a static liquid culture.