

# 藻類による CO<sub>2</sub> 高効率固定にむけた CO<sub>2</sub> マイクロバブルの利用

## Utilization of CO<sub>2</sub> Micro Bubbles for High-efficiency CO<sub>2</sub> Fixation by Cyanobacteria

仲本 準<sup>1\*</sup>、藤田 健作<sup>1</sup>、張 凱<sup>2</sup>  
Hitoshi Nakamoto<sup>1</sup>, Kensaku Fujita<sup>1</sup>, Kai Zhang<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 埼玉大学 大学院理工学研究科

Graduate School of Science and Engineering, Saitama University

<sup>2</sup> ヤマハ発動機株式会社

コーポレート R & D 統括部 ライフサイエンス事業推進部

Life Science Business Div., R&D Operations, Yamaha Motor CO., LTD

### Abstract

Cyanobacteria are photosynthetic eubacteria. Some cyanobacteria are used as a food source and as nutritional supplements. For commercial uses of cyanobacteria, it is important to find an efficient way to grow them. In the present study, we examined various factors that affect the efficiency of carbon dioxide fixation by cyanobacteria. A novel method to supply inorganic carbon source, that is, the supply of micro-bubbled carbon dioxide, is described.

**Key Words:** Carbon dioxide, Carbon fixation, Cyanobacterium, Micro bubble, Nano bubble, Photosynthesis

### 1. 序論

シアノバクテリアは、ラン（藍）藻あるいは藍色細菌ともよばれる光合成を営む細菌である [1]。シアノバクテリアの中にはアオコとして水面に集積し、毒素を産生し被害を起こすものが存在する [2]。しかし、他方では、窒素固定をするシアノバクテリアを用いて水田の肥沃化が試みられている [1]。シアノバクテリアの中には、二酸化炭素の固定のみならず、大気中の分子状窒素をアンモニアに還元する能力をもつものが存在するのである [1]。さらに、「スピルリナ」の名前で知られているシアノバクテリアは食品・サプリメントとして利用されている。シアノバクテリアから有用物質を分離して利用する試みも行なわれていて、フィコシアニンなどは天然色素として食品の着色等に利用されている。上記の有害毒素についても、その使い方によっては生理活性物質や薬としての利用価値をもつものがあるかもしれない。本研究では、シアノバクテリアあるいは藻類による有用物質生産を念頭におき、CO<sub>2</sub> のバイ

オマスへの利用効率 70%以上を最終目標にして、CO<sub>2</sub> 濃度、光強度、光質、培養液の pH 等の培養条件の詳細な検討を行なった。なお、このような研究成果の利用は単に有用物質生産分野にとどまらないと考えている。地球温暖化の原因は、CO<sub>2</sub> やメタンなどの温室効果ガス放出の劇的な増加であると考えられているが、地球の CO<sub>2</sub> 変動に影響を与える重要な因子の一つは、陸上植物や海洋の藻類の光合成による CO<sub>2</sub> 固定である。海洋の光合成バイオマスといえば海草などを思いうかべるかもしれないが、0.5 から 0.7 $\mu$ m の小さなシアノバクテリアが、低（貧）栄養下の海洋においては光合成バイオマスの約半分を占めている [3]。従って、これら光合成生物の CO<sub>2</sub> 固定効率を左右する因子の研究は地球環境保全という観点からも重要である。

CO<sub>2</sub> のバイオマスへの利用効率を改善するために、本研究では微小気泡化した CO<sub>2</sub> の利用を考えた。微小気泡、即ちマイクロバブルやナノバブルの定義は研究者によって異なっているが、前者はバブル発生時に 50 $\mu$ m 以下の直径を有する気泡、後者は数百 nm 以下の直径を有する気泡であると定義されている [4, 5]。これらの微小気泡は、水

\*〒338-8570 さいたま市桜区下大久保 255

電話：048-858-3403 FAX：048-858-3384

Email：nakamoto@mail.saitama-u.ac.jp

中での上昇速度の遅延、水中での長い滞留時間、帯電作用、界面（表面）吸着特性、気泡間相互作用、優れた超音波散乱特性、自己加圧効果、優れた溶解性、バブリング後の水の物性変化などの特性を有する[4]。これらの特性に注目してマイクロバブルの化学工業への応用に関する研究開発が行われている。例えば、マイクロバブルの界面吸着特性を利用して、油滴、カーボン微粒子、酸化鉄微粒子などの分離技術の開発が行なわれている[5]。これらの吸着は、疎水効果や静電気力を介して起こる。バブルに吸着した油や微粒子は「自然に」浮上するために、遠心分離などの特別な操作を必要とせず、分離可能である。排水中の微粒子を除去するために用いられる界面活性剤・凝集剤などを低減することで、環境への負の影響を緩和しコストも削減できると期待されている。最近では、これらの微小気泡の生理活性効果も注目され、魚介類の養殖や池・海水の浄化などへの利用も試みられている。産業技術総合研究所とREO研究所は、電解質イオンを含む水の中でマイクロバブルを圧壊させることでオゾンや酸素ナノバブルの製造と安定化に成功したと報告している。これらのナノバブルの殺菌効果に注目して、防腐剤の代わりに酸素ナノバブルを使用して蒲鉾の製造などが行なわれているようである。バブルは「消滅」し、たとえ残存しても酸素であることから安全性は高く食品製造への応用に期待が寄せられているのではないかと想像される。マイクロバブルやナノバブルには生物に対する活性効果があるといわれているが、バブルの直接的な効果なのかどうかという吟味や、さらにその作用機構等に関する解析は行なわれていないようである。我々は、シアノバクテリアの生育、生存率、細胞における光合成色素蓄積量、細胞湿重量、及び細胞総タンパク質蓄積量に対する酸素ナノバブル水、オゾンナノバブル水、及び対照水の影響を調べた。酸素ナノバブル水は、他のナノバブル水と比較するとシアノバクテリアの細胞湿重量、光合成色素蓄積量、あるいは細胞総タンパク質蓄積量において若干の促進効果を示した[6]。

微小気泡作成法の主なものとして、加圧溶解法、流れのせん断力または衝撃波で気泡を微細化する方法、キャビテーションを利用する方法などがある。本研究では、加圧溶解方式を採用したオーラテック社製OM4-GP-040を用いて微細気泡を作成した。バブル生成装置購入にあたっては、可能な限り実際に装置を見て、使用実績等も考慮しながら製品の価格・性能等を比較した。上記の会社は

大学との共同開発等も行なっていて小型の生成装置を販売しているが、調査した他の装置ではバブル生成のために大量の水を必要とし、さらに研究成果の秘密保持契約を結ばない限り購入できない等の制限があり、機種選定には時間を要した。

## 2. 結果と考察

実験材料として、比較的増殖の早い好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* を用いた。このシアノバクテリアは日本の温泉で単離されたもので、ゲノムの全塩基配列も既に決定されている。

最適培養条件を検討するために、通気中のCO<sub>2</sub>濃度、光強度、光の波長、培養液のpH等を変化させ、培養液の730nmにおける見かけの吸光度（菌体濁度）の経時変化を測定し、生育速度を評価した。

その結果、光強度を50μE/m<sup>2</sup>/sとした場合、0.4%のCO<sub>2</sub>を含む空気（流速は0.1ℓ/min）を通気したときに最大生育速度に達した。飽和CO<sub>2</sub>条件下では、約150μE/m<sup>2</sup>/sの光強度において最大の生育速度を示した。培養液のpHを6.8から8.8に変化させても生育速度への影響は観察されなかった。なお、晴れた日の屋外における光強度は1,500から2,000μE/m<sup>2</sup>/sであり、シアノバクテリアの培養には「弱光」で十分である。

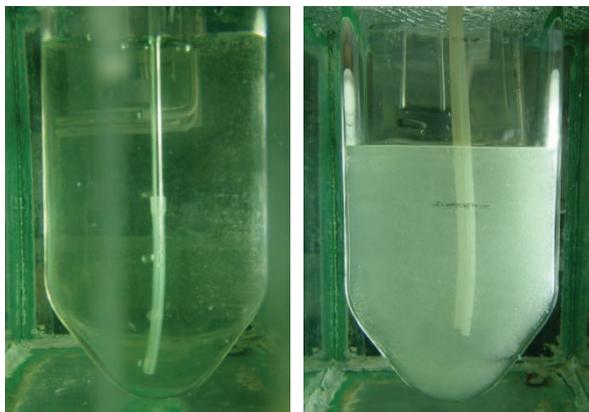
pH 8.2もしくは8.8の培養液を用いて、150μE/m<sup>2</sup>/sの光強度下で培養し、*T. elongatus*のCO<sub>2</sub>固定効率を測定した。CO<sub>2</sub>固定効率は次のようにして求めた。まず、*T. elongatus*の乾燥菌体の元素分析結果から、炭素の占める割合（質量百分率）を求めた。次に、ある培養期間における（乾燥）菌体増加量を測定し、元素分析の結果に基づき、炭素の増加量を算出した。この値を通気したCO<sub>2</sub>量（炭素供給量）で割ってCO<sub>2</sub>固定効率（mol/mol）を決定した。5%CO<sub>2</sub>を通気して培養した*T. elongatus*の炭素含有率の平均値は47.9%だった。CO<sub>2</sub>固定効率は、培地のpHが8.2のとき、0.037%CO<sub>2</sub>の通気で21.4%、0.5%CO<sub>2</sub>では1.64%となった。培養液のpHを8.8にすると、0.037%CO<sub>2</sub>の通気で43.6%、0.5%CO<sub>2</sub>で1.77%に固定効率が増大した。

培養液のpHの上昇によりCO<sub>2</sub>固定効率が改善された理由として、CO<sub>2</sub>の水に対する溶解度の変化が考えられた。これを確認するために種々のpHに調整した緩衝液に溶解したCO<sub>2</sub>ガスの体積を測定したところ、溶解度はpH 7.0のとき1.16、pH 8.0のとき6.94、pH 8.8のときには13.0となった。このことから培養液のpHが塩基性に傾くことにより、通気CO<sub>2</sub>が培養液に溶解する割合

が大きくなり、上述の固定効率の増大をもたらしたものと推察された。

次に、マイクロバブル化した CO<sub>2</sub> を培養液に通気し、*T. elongatus* の培養を行った (Fig.1)。白濁の様子から CO<sub>2</sub> マイクロバブルが生成したものと考えたが、顕微鏡観察や光散乱法などによって粒子や粒子径の観察・測定を今後行う必要がある。余談になるがこの研究を始める前に、CO<sub>2</sub> の微小気泡作成は不可能であろうと周囲から忠告を受け不安にさせられた。酸素等に比較して CO<sub>2</sub> の溶解度ははるかに高いということがその理由かもしれない。なお、白濁偽装問題で有名になった白骨温泉が、本来白濁しているのは、CO<sub>2</sub> などの微小気泡が原因であると聞いている。

マイクロバブル化した CO<sub>2</sub> を培養液に通気した結果、培養液の 730 nm における見かけの吸光度はむしろ減少した。マイクロバブルが直接 *T. elongatus* に悪影響を与えた可能性も考えられるが、培養液をこの装置に通すだけでも生育阻害が観察されたことから、我々はマイクロバブル生成システムに問題があると考えている。今回使用したマイクロバブル発生装置は、培養液 (1ℓ) の三分の一程度を装置内に取り込み、これに CO<sub>2</sub> を加圧溶解させた後に CO<sub>2</sub> を再気化 (マイクロバブル化) する。マイクロバブルの水中での滞留時間が数十秒から数分であることを考慮して、今回の実験では、培養液を培養瓶と装置の間で循環させた。従って、細胞は圧力変化のみならず、光強度 (装置内は暗所) や温度等の変化にも曝される。細胞を含まない (細胞を除いた) 培養液のみにおけるマイクロバブル生成法も考えたが、問題を解決するには至らなかった。



**Fig. 1.** 培養液中に通気を行っている様子を示す。左図に示す実験では、通常の培養で行なっているように、5%CO<sub>2</sub> を平型培養瓶中の培養液に通気している。幾つかの「ミリバブル」が見えている。右図の実験では、CO<sub>2</sub> マイクロバブルを送り込んでい。マイクロバブルが液中に拡散し液が白濁している。

### 3. 今後の計画

CO<sub>2</sub> のバイオマスへの利用効率 70%以上を最終目標にしたが、これをヤマハ発動機株式会社との共同研究期間内 (一年間) で達成するのは困難であることを実感した。我々は、上記のシアノバクテリアを培養する際に 5%CO<sub>2</sub> を通気しているが、数百分の一の CO<sub>2</sub> しか利用されていないことも明らかになった。

今後は、上記のマイクロバブル生成装置の改良を含めてその利用法について検討したい。また、マイクロバブル発生装置内に入らない大きな集合体を形成するシアノバクテリアの使用や、CO<sub>2</sub> の取り込みや CO<sub>2</sub> 固定能を増大させた変異株の構築などを検討したい。

さらに、溶液組成等を検討して安定な CO<sub>2</sub> マイクロ (ナノ) バブルを作成し、これをシアノバクテリアに供給して CO<sub>2</sub> 利用効率を評価したい。なお、ガス微細化等の理由でフリーラジカルが発生し、細胞がダメージを受け、CO<sub>2</sub> 利用効率が低下することも考えられる。この点に関しては、CO<sub>2</sub> バブル供給による生存率の減少や熱ショックタンパク質などのストレスタンパク質の発現量から、細胞のダメージを定量化し評価した後に、ストレスタンパク質を大量発現し CO<sub>2</sub> バブルによるダメージに対する耐性を増強した (変異株) 細胞を構築し CO<sub>2</sub> のバイオマスへの利用効率の向上をはかりたいと考えている。

### 参考文献

- [1] 藤田善彦、大城香：“ラン藻という生きもの”、東京大学出版会、1989.
- [2] 彼谷邦光：“有毒シアノバクテリア”、裳華房、2001.
- [3] Z.I. Johnson, E.R. Zinser, A. Coe, N.P. McNulty, E.M. Woodward, and S.W. Chisholm: “Niche partitioning among *Prochlorococcus* ecotypes along ocean-scale environmental gradients”, *Science*, 311(5768), pp.1737-1740 (2006).
- [4] 芹澤昭示：“マイクロバブル生成装置の性能評価と利用時の留意点”、NTS セミナー「マイクロバブル生成装置の性能評価と化学工業プロセス設計への適用」テキスト、pp.1-30 (2007).
- [5] 寺坂宏一：“マイクロバブル生成装置の性能評価と利用時の留意点”、NTS セミナー「マイクロバブル生成装置の性能評価と化学工業プロセス設計への適用」テキスト、pp.32-54 (2007).
- [6] Kollimalai Sakthivel, 仲本準, 大森正之：“シアノバクテリアの生育に及ぼすナノバブル水の添加効果”、NEDO ナノバブル研究会 (東京)、2006