

新しい蛋白質資源としての藍藻

大阪大学工学部 醸酵工学科 小川 隆平

1. はじめに

地球上の全人口は現在およそ36億であるが、毎年フランスあるいはイタリアの全人口とほぼ同じ数だけ増加しており、21世紀初頭には60億を越すという予測がなされており、増加の内容は開発途上国に極端にかたよっている。我々はなかなか容易でない時代に生きているわけだがこの人口増加に必然的につきまとう問題として食糧問題があげられる。F. A. O. の予測では、1980年以後は絶対量の不足による食糧事情の深刻化が憂慮されている。この対策として、植物蛋白質の有効利用、微生物蛋白質の開発、海洋の利用などが提起されている。とりわけ蛋白質資源としての微生物体の重要性については、近時ますます関心が深まりつつあるが、その一つに光合成を利用した藻類による藻体生産があげられる。すなわち、いろいろな藻類を細菌のいない液体培養液が入っている大きなタンクのなかで培養して、食糧としたらどうであろうかという考えである。単緑藻クロレラはこの考えに沿って精力的に研究された時代があった^{1),2)}。ところがクロレラは強靱な細胞膜のために消化性がきわめて悪く、食品としての実用上一つの欠点となっており、飼料としてもこれが問題になっている場合がある。そのような時、北アフリカの原住民が藍藻 (blue-green algae) を太古より食品として使用してきているのを聞いたフランスの I.F.P. (Institut Français du Pétrole) がその藻に目をつけ、開発し始めた。

それが *Spirulina platensis* が世にでるきっかけであった³⁻⁵⁾。

本稿では single-cell protein にとって一般

的に要求される諸点を述べたあと、フランスでの *S. platensis* の研究状況を述べ、さらに私達が行なった光合成培養の動力学に関する 2, 3 の問題点を取扱ってみたい。

2. Single-Cell Protein とは、

Single-cell protein (以下SCPと略す) の定義は、単細胞もしくは簡単な構造の多細胞の生物の菌体蛋白をさす。すなわち、細菌、酵母、カビ、藻類、プロトゾアなどに由来するものをいう⁶⁾。

さて、最近日本をはじめ世界各国で、石油系原料、すなわちノルマル・パラフィンあるいは燈・軽油溜分を醸酵原料とする酵母の生産や、天然ガス、安価な低級アルコール (とくにメタノール) などを醸酵原料とする細菌の生産、光合成微生物の利用、また長期的な見通しの上立った水素利用菌による炭酸同化培養など、SCPの生産に関する研究が活発に行なわれ、実用化の段階に進みつつあるものもある。ところがこれらすべてのSCPの実用化には安全性、栄養価、経済性などを十分考慮せねばなら

第1表 Single-cell protein に要求される諸性質

- | | |
|----|---------------------------|
| 1. | 培地に毒性物質を含まず、菌自身に毒性がないこと。 |
| 2. | 簡単な液体培地上で増殖が速く、収量が高いこと。 |
| 3. | 必須アミノ酸を多く持ち、蛋白の含有量が大なること。 |
| 4. | 消化性が良いこと。 |
| 5. | 味が良いこと。 |
| 6. | 雑菌汚染に強いこと。 |
| 7. | 分離が容易なこと。 |
| 8. | 培養装置が簡単で、運転経費が安価なこと。 |

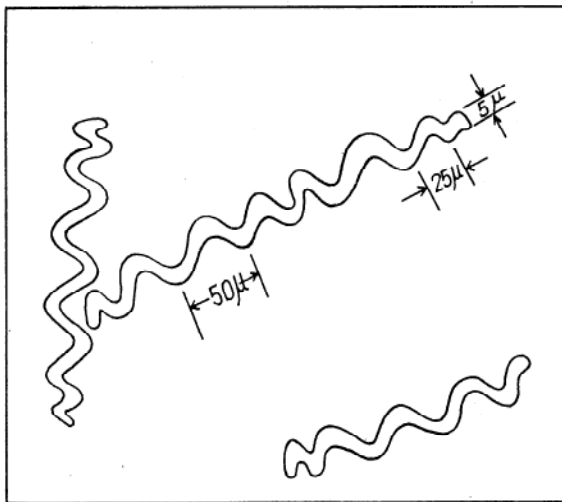
ない。第一表には、SCPに要求される諸性質をまとめてみた。この中で特に安全性に関しては、広い範囲のかつ適切に計画された毒性試験を長期間にわたって実施する必要がある。のちに述べる *S. platensis* の諸性質を第1表に掲げた諸点で比較すると、この藍藻が将来の蛋白質資源として有望視されていることがよくわかっていただけたと思う。

3. *Spirulina platensis* について

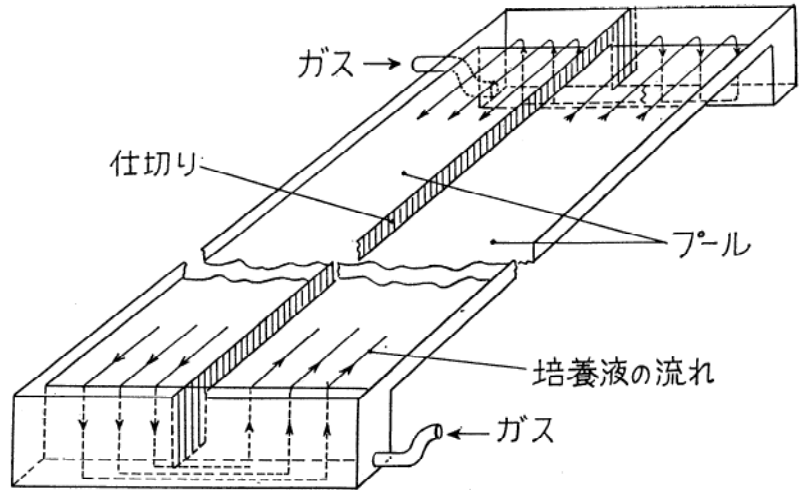
フランスのI.F.P.(Institut Français du Pétrole)では、燃焼ガスとして大量に放出される炭酸ガスの利用に目をつけ、食糧生産の一つの形態として光合成を考えていた。1962年、このI.F.P.はアフリカ、チャド共和国の人々が太古から、ある種の藻類を収穫し、食品としていることを知り、これを研究室で分離したところ、藍藻(blue-green algae)の一種、*Spirulina platensis*であることを知った。

この藻は第1図のようなコイル状の構造からなり、長さは200~500 μ で、数個のspiralからなる多細胞で、多量の炭酸イオンを含む高塩性で、かつ高いpHのところで棲息していることを見出した⁷⁾。

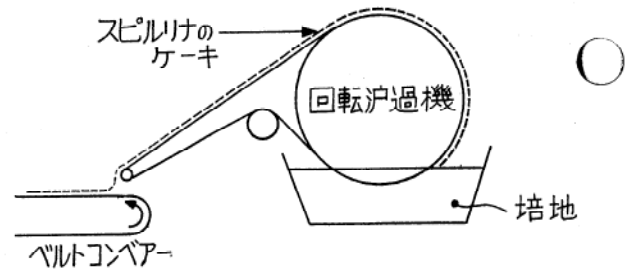
I.F.P.では、この種の藻類のおもしろさを考えて、合成培地でいかに生育するかを実験し始



第1図 *Spirulina platensis* の形態

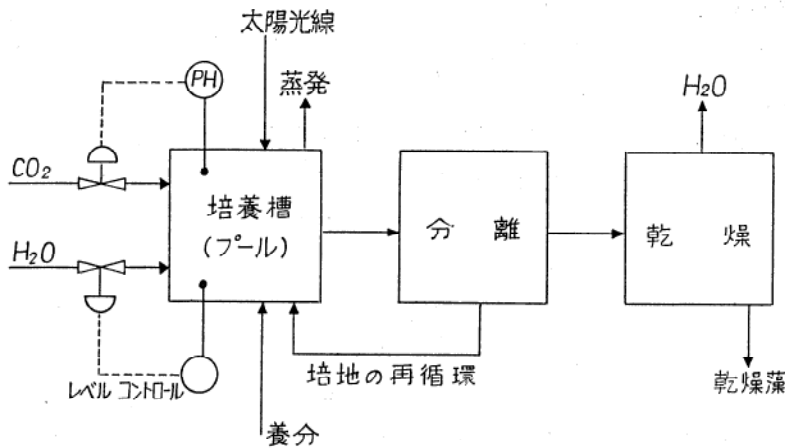


第2図 南フランスでの屋外培養装置



第3図 培養後の藻の回収装置

めた。合成培地を組むことに成功したのち、屋外での大規模な培養技術を開発し、南フランスで実際に培養を実施した。その装置を第2図に示す。すなわち、縦、横が20×5mで、深さが7cmのプールで、両端に約1.10mの深さの溝があり、2つの区画に分れ、両区画は底で相通じている。燃焼ガスをその一つの溝に注入することにより、循環の効果とpHを適度に制御している。藻は培養後、回転濾過機により培地から分離される。このケーキをベルト・コンベアー上にひろげ、乾燥させる。(第3図参照)全体のflow sheetは第4図に示されている。この装置で平均1日に、1m²当り12gの乾燥物を生産できる。この収量はもし温度が30°Cで、より晴天が多い地方でなら、14g/m²となると計算している。とにかく適当な条件下で年間300日培養するなら、3.6~4.2kg/m²の収量が得られると推定している。この収量は他の植物性食品と比較して高い値であることが第2表からわかる。



第4図 培養から回収までの flow sheet

第2表 スピルリナと他の植物性食品との年間収量の比較 (kg/m²)

植物性食品	年間収量
小麦	0.36 (フランス)
ジャガイモ	0.91~1.11 (ヨーロッパ)
米	0.18 (アジア)
	0.64 (ヨーロッパ)
スピルリナ	3.6 ~4.2 (フランス)

第3表 スピルリナの成分

項目	測定値 (%)
蛋白質	70
脂質	2
炭水化物	10
灰分	8

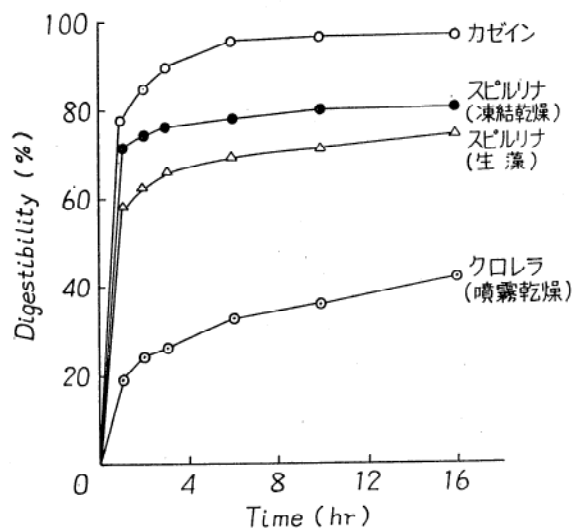
第4表 必須アミノ酸の組成 (g/100g proteins)

必須アミノ酸	I. F. P. <i>Spirulina</i>	F. A. O. 標準値
イソロイシン	6.03	4.2
ロイシン	8.02	4.8
リジン	4.59	4.2
フェニールアラニン	4.97	2.8
チロシン	3.95	2.8
全含硫アミノ酸	1.80	4.2
メチオニン	1.37	2.2
スレオニン	4.56	2.8
トリプトファン	1.40	1.4
バリン	6.49	4.2

ここで、*S. platensis* の特色をまとめてみると、まず第一にアフリカの一部の人々により、太古より食品とされてきている点より考えて、安全性 (先にも述べたように、SCPにどってもっとも重要な因子である) はほぼ保障されていること、第2に藻体の成分分析値 (第3表) は、他の微生物とくらべ、蛋白含有量が大変高いことがあげられる。さらに必須アミノ酸の分析結果 (第4表) もまず満足できる値である。この藻では含硫アミノ酸が制限アミノ酸とな

っている。さらに消化性が非常にすぐれている。第5図にはペプシン人工消化率の経時変化を示した⁹⁾。*S. platensis* では、生菌でさえ、約80%の消化率 (16時間目) を示し、噴霧乾燥したクロレラより、約2倍の値を示している。また、細胞の回収が容易 (フロックを形成しやすい) であり、炭酸の保留量の高いアルカリ培地で培養を行なうので、炭酸ガスの供給が定量かつ容易に行なわれること、雑菌汚染 (contamination) をほとんど考慮しなくても良いこと、などがあげられる。

ところが、この藻を実際に取扱ったところ、他の微生物とくらべ増殖速度が低いこと (最大比増殖速度 $\mu_{max} = 2.2 \text{ day}^{-1}$ で、この値はクロレラの約 $\frac{1}{2} \sim \frac{1}{3}$)、最終藻体量が非常に低いこ



第5図 ペプシンによる消化性試験

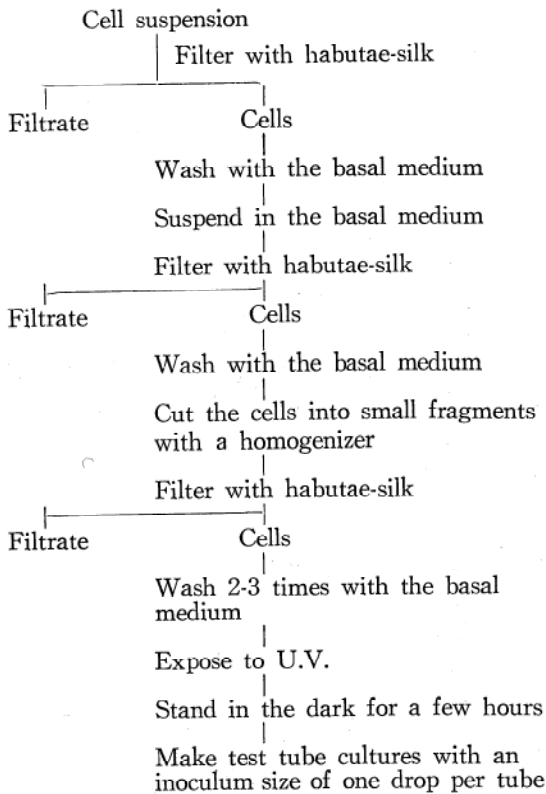
と(1バッチで1.3g/l)と将来の蛋白質資源として考えるとき、大きな欠点を持っていることが判明した。そこでこの藻の増殖過程を生理学的、および培養工学面から研究を行ない、藻体生産を上昇させるにはいかにしたら良いかという問題を考えてみる。

4. 培養工学的検討

4-1. 純粋培養

培養をより良く把握するためには、まず雑菌を取り除き、純粋培養で行なうのが微生物学上第一の出発点である。しかるに*S. platensis*ではこの雑菌を取り除くことに誰も成功していなかった。藍藻の純粋分離の困難さは多くの研究者により指摘されてきている^{9),10)}。これが原因となって、藍藻の生化学、培養工学的研究は大変遅れをとっていて、R.Y. Stanier は、この分野の研究を natural history から biology へとはまだ進んでいないと表現している¹¹⁾。私共は最終的に第6図のステップをふんで、純化された単一の*S. platensis* を取ることに成功した¹²⁾。

このようにして得られた純粋 *S. platensis* は、もとの不純な *S. platensis* の培養と一見大差が



第6図 *S. platensis* の純化法

なかったが、場合により、純粋培養でなくては成功しない培養方式もある。以下の実験は純粋培養に関するものである。

4-2. 独立栄養条件下での培養の動力学

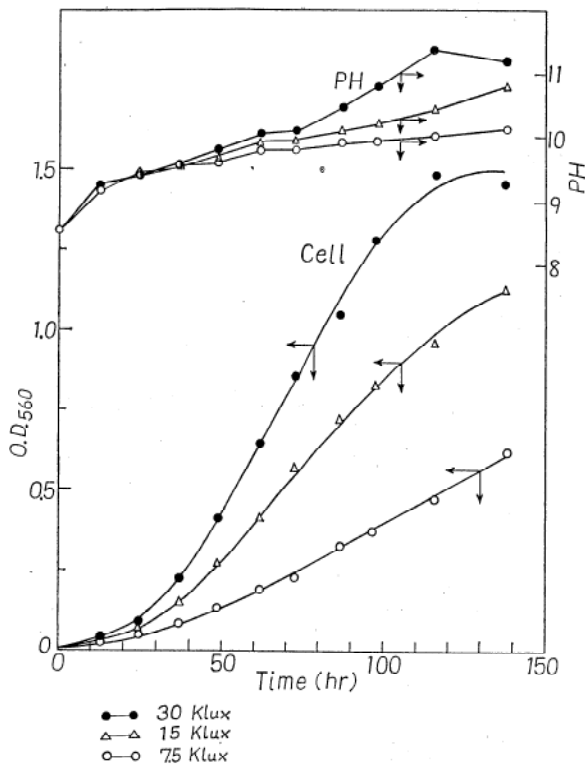
微細藻類の多くは、独立栄養性 (autotroph) で、炭酸ガスを唯一の炭素源とし、光のエネルギーを使って、その生活を維持している。したがって、まず独立栄養条件下での増殖の動力学について解析してみる。

さて、微藻類液内培養の動力学については、クロレラについての田宮ら¹³⁾の先駆的な研究、ついで Myers の研究¹⁴⁾があり、近年、発育速度を mean light intensity の関数として簡易化して取扱う Rabe, Benoit¹⁵⁾ の提案があり、一方これを吸収光量に比例するものとして定式化した Ragonese, Williams¹⁶⁾ の報告もある。Oswald¹⁷⁾らは、連続培養における藻体生産を動力学的に取扱い、種々の動力学モデルを考察している。最近、Myers¹⁸⁾により、*S. platensis* を使い、開放系ではあるが、大量連続培養が試みられている。以上の中で、J. Myers¹⁹⁾は、光の増殖への影響の多面性を考えて、増殖の数式化を放棄している。

私共は、*S. platensis* を用い、クロレラについての既往の研究と比較しながら、動力学的検討を加えた^{20),21)}。以下特記しない限り、前記著者らの場合と同様、光量が律速する反応系を問題としている。

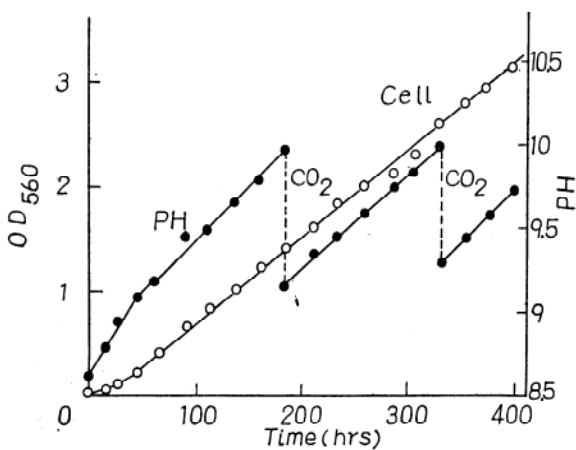
第5表 基本培地組成

NaHCO ₃	16.8 g/l	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.04 g/l ()
K ₂ HPO ₄	0.5	EeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01
NaNO ₃	2.5	E. D. T. A.	0.08
K ₂ SO ₄	1.0	A ₅ soln.	1ml/l
NaCl	1.0	B ₆ soln.	1ml/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2		
		A ₅ soln. B ₆ soln.	
H ₃ BO ₃	2.85 g/l	NH ₄ VO ₃	230×10 ⁻⁴ g/l
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.81	K ₂ Cr ₂ (SO ₄) ₄ ·24H ₂ O	960 "
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.22	NiSO ₄ ·7H ₂ O	478.5 "
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.08	Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	179.4 "
MoO ₃	0.015	Ti ₂ (SO ₄) ₃	400 "
		Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	440 "

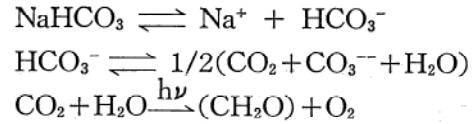


第7図 *S. platensis* の典型的な増殖経時変化

まず、*S. platensis* の培地組成を第5表に示した。この培地を使っての典型的な増殖の経時変化を第7図に示した。増殖が対数増殖期から、直線増殖期へと進行するにつれて、pHは最初の8.5から11.5付近まで上昇し続ける。これは第5表の培地組成からも明らかなように NaHCO_3 を唯一の炭素源としているためである。すなわち、



第8図 PH 制御による *S. platensis* の生産



の反応が培地中で起こっているのである。いま、外部より消費された分の炭酸ガスを供給すると、培養期間中、重曹イオンが一定に保たれ、pHが制御でき、直線増殖期間を延長させられる。(第8図) このようにアルカリ側で培養し得ることは、炭酸ガスの損失が最小にとどめられ、弱酸性培地で培養するクロレラに比べて有利である。

さて、細胞濃度の薄い対数増殖期の光量依存性は単純で、比増殖速度(μ)と投射光量(I_0)の間には Monod 式が成立する。

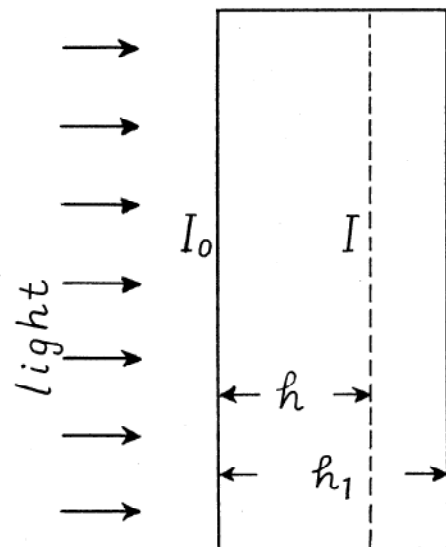
$$\mu = \mu_m \left(\frac{I_0}{I_0 + K_L} \right) = \frac{1}{\Delta t} \ln \frac{X}{X_0} \dots (1)$$

ただし μ_m は飽和光量に対応する μ 値である (day^{-1})。 I_0 は投射光量 (klux)、 K_L は飽和定数 (klux)、 $\Delta t = t - t_0$ 、 X_0 は測定のはじめ (t_0) における細胞濃度。

S. platensis では 35°C で、 $\mu_m = 2.2(\text{day}^{-1})$ 、 $K_L = 10(\text{klux})$ である。

つぎに直線増殖期の成立にかんしてはすでに一定式化が試みられているが、私共はつぎのような方式が最も簡明であろうと考えている。

細胞濃度が均一、液層の厚さも均一な培養



第9図 培養器の模式図

に、一方の側面に直角に I_0 が与えられ (第9図), 透過中の光量の減少は Beer の法則によるものとする。

$$I = I_0 \cdot \exp. (-aXh) \dots\dots\dots(2)$$

ただし I は照射側面よりの厚さ h (cm) における光の強さ (klux), a は藻懸垂液の吸光係数 ($\text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot l$), X は細胞濃度 (g/l) である。

培養液層の厚さを h_1 (cm) とし, 厚さ 0 から h_1 の間の光の分布に対応して μ が決定されるものとする。

(1)式に対応して h のところに位置する藻細胞については,

$$\mu(h) = \frac{\mu_m \cdot I_0 \exp. (-aXh)}{I_0 \cdot \exp. (-aXh) + K_L} \dots\dots\dots(3)$$

0 から h_1 の間の μ 分布が (3) 式によって求めることができるが, この間の μ の平均値を $\bar{\mu}$ とすれば,

$$\bar{\mu} = \frac{1}{h_1} \int_0^{h_1} \mu(h) dh \dots\dots\dots(4)$$

これを解いて整理すれば,

$$\bar{\mu} = \frac{\mu_m}{aXh_1} \ln \frac{K_L + I_0}{K_L + I_0 \cdot \exp. (-aXh_1)} \dots\dots\dots(5)$$

しかし直線増殖期では K_L (*S. platensis* では 35°C で 10Klux) に対し h_1 における光量は全く無視されるほど小である。したがって,

$$\bar{\mu} = \frac{\mu_m}{aXh_1} \ln \left(\frac{I_0}{K_L} + 1 \right) \dots\dots\dots(6)$$

この時期 (直線増殖期) では, 一定の投射光量のもとに増殖速度 dX/dt が一定であることが容易に理解できる。すなわち

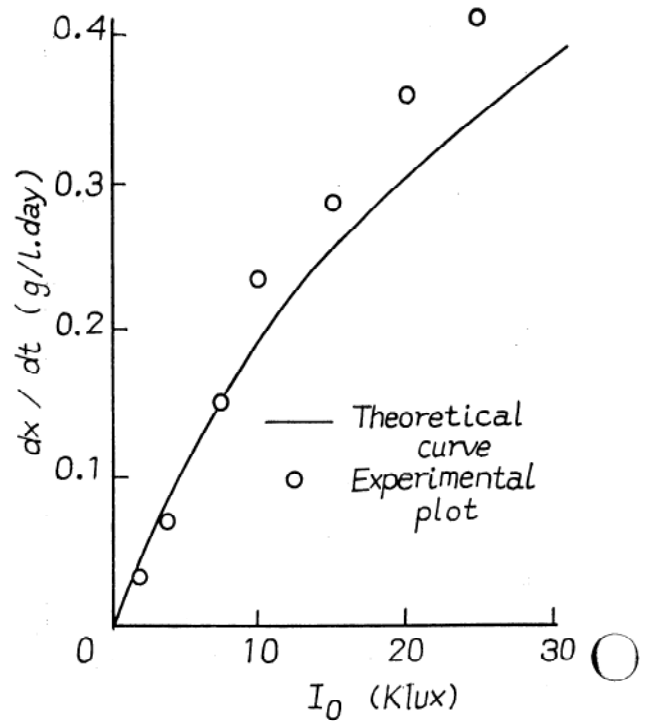
$$\bar{\mu}X = \frac{dX}{dt} = \phi(I_0) \dots\dots\dots(7)$$

ただし

$$\phi(I_0) = \frac{\mu_m}{aXh_1} \ln \left(\frac{I_0}{K_L} + 1 \right) \dots\dots\dots(8)$$

(7), (8)式は, 田宮¹³⁾らがクロレラ培養についての実験結果から求めたものと実質的に同じであり, ただ導き方が異なっている。

上式による計算値と実験値とを対比させたものが第10図である。(7), (8)式の適合性は充分と



第10図 直線増殖期における増殖速度の実験値と理論曲線の比較

は考えられないが, 実用にたえるものと思われる。

ところで, (8)式から K_L を求めると,

$$K_L = \frac{I_0}{\exp. \left(\frac{ah_1}{\mu_m} \cdot \frac{dX}{dt} \right) - 1} \dots\dots\dots(9)$$

となり, これに実験値をあてはめて K_L を求めると, I_0 によってかなりの変動があり (第6表), I_0 が大なるほど K_L が小となっている。この傾向は田宮らのデータから計算したクロレラの結果でも失われていない。(第6表参照) ()

第6表 実験値から(9)式により算出された K_L 値

a) <i>S. platensis</i>		b) <i>Chlorella</i> *	
I_0	K_L	I_0	K_L
2	18.0	0.8	4.95
4	16.4	2	3.65
7.5	11.0	5	3.35
10	8.2	10	2.84
15	9.2	25	1.96
20	8.5	50	1.51
25	6.2		

*田宮らのデータ¹³⁾による

この解析は大変困難であるので、一応考えられる事柄を列挙するにとどめる。

1) 直線増殖期では、細胞は光の強い前面に出たり、光の弱い後面に回ったりして常に強度の違う光を受けているが、このような状態で細胞は瞬間的にその光の強さでの μ を示すかどうか。

2) 高頻度の光量パルスのもたらす不測の生理的な影響はどの程度あるか。

3) 多色光では透過中の光量に伴う光組成の変化があり、投射光量の強弱により、Emerson効果が変化する可能性。

4) 投射光量の強弱により、光をキャッチする色素の絶対量ならびに組成が変化しないかどうか。

5) 呼吸は光の強弱により変動するが、これが増殖にいかに関与するか。

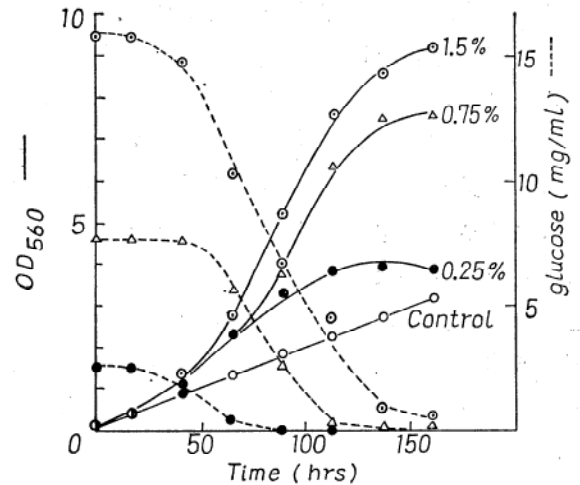
6) 散乱光の影響はどの程度あるか。

以上の中で、著者のデータでは(4)の可能性が最も大きいとの結論を得ているが²¹⁾、詳細は省略した。

以上の動力的取扱いにおいて、Monod型式の光量依存性が確かめられた以上、mean light intensity の提案は、動力学の基本としては採用し難く、また Ragonese らの示式も直線増殖期の動力学には役立たない。また、光合成培養の培養器は、(7)、(8)式から考えて、厚さができるだけ薄い器を使うこと、いいかえれば、単位体積当りの表面積をできるだけ大きいもので行なうことが効率がよく、また使用する藻体は光に対する親和性 ($1/K_L$) の高いものがよいことになる。

5. 藻体生産

藻が自然の条件下で増殖している場を考えると、ある程度有機物が存在している場合が多い。すなわち炭素源がいつも、完全に酸化された炭酸ガスでなくても光化学的に発生した同化力を消費して直ちに細胞構成成分になってもよい。藻体に種々の魅力的な面をもちあわせている *S. platensis* もこのような角度から大量の藻



第11図 Mixotrophic culture (グルコース添加) の典型的な増殖曲線とグルコースの減少曲線

体生産を行なうことができないかということがつきに当然考えられよう。

そこで有機化合物と共に培養を行なう mixotrophic culture を試みた。この藻はいわゆる増殖に光を絶対的に要求する obligate photoautotroph で、クロレラのように heterotrophic culture (光のエネルギーを使わず、エネルギー源は有機化合物のみの培養) はできないが、mixotrophic culture は可能である。一例としてグルコース添加による経時変化を第11図に示す。最終藻体量は 1.5% グルコース添加のときで、11.2 g/l の細胞収量を得た。

Mixotrophic culture はこのように大量の細胞をとるのに適当な方法であるが、今後の問題は有機物の選択であろう。できるだけ安価な有機物、たとえば酢酸や非炭水化物系化合物の中から適当なものを選ばねばならない。またこのような培養を行なうことにより、独立栄養条件下では考えられないような副産物 (by-product) を生むかもしれないという期待もある。今回は省略したが、その増殖の動力学も研究材料になる。

6. おわりに

将来の蛋白質資源として有望視されている藍藻の一種、*S. platensis* を例にあげ、Single Cell Protein に要求されている諸点、ならびに光合

成培養の2, 3の問題点を考えてみた。

光合成の生化学は Warburg²²⁾ 以来活発に進められており、今や生化学の最高峰の一つにまで発展したが、ここにのべた動力学的研究の歴史は比較的新しく、私共の現在行なっている仕事は初歩的な段階と考えてよいであろう。今後は生化学領域の知識をさらに導入して、葉緑体という工場内で、光のエネルギーを使って炭酸ガスを固定する光合成という名の化学産業を培養工学の基礎の一つとして大いに発展させたい。

参考文献

- 1) Burlew, John S.: "Algal Culture from Laboratory to Pilot Plant" Carnegie Institution of Washington Publication 600, (1953).
- 2) Casey, R.P. and J.A. Lubitz: Food Technol. **17**, 1388(1963).
- 3) Leonard, J.: Presented at the Spirulina Conference, Södergarn, Sweden, June (1967).
- 4) Clement, G., Giddey, C., Menzi, R.: J. Sci. Food Agr., **18**, 497 (1967).
- 5) Clement, G., Durand-Chastel, Henny, M. V.: "International Symposium on new sources of proteins for Human Consumption" Amsterdam, (1968).
- 6) 齊藤 健: 化学と生物 **9**, 200 (1971).
- 7) A report from the Institut Français du Pétrole, Réf. 14 237A, March (1967).
- 8) Terui, G., Ogawa, T.: Proceedings of the Third Conference of the Global Impact of Applied Microbiology (Bombay) (1969).
- 9) Bunt, J. S.: Nature, **192**, 1274 (1961).
- 10) 田宮 博, 渡辺 篤編: 藻類実験法: 南江堂 (1965).
- 11) Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M. and Cohen-Bazine, G.: Bac. Rev., **35**, 171 (1971).
- 12) Ogawa, T., Terui, G.: J. Ferment. Technol. **48**, 361 (1970).
- 13) Tamiya, H., Hase, E., Shibata, K., Mitsuya, A. Iwamura, T. Nihei, T.: "Algal Culture from Laboratory to Pilot Plant," p. 204 Carnegie Institute of Washington Publication 600 (1953).
- 14) Myers, J.: Ibid., p. 37 (1953).
- 15) Rabe, A. E., Benoit, R. J.: Biotechnol. Bioeng., **4**, 377 (1962).
- 16) Ragonese, F. P. Williams, J. A.: Ibid. **10**, 83 (1968).
- 17) Shelef, G., Oswald, W. J., Golueke, C. G.: Proceedings of 4th Symposium on Continuous Culture of Microorganisms, p. 601 (Plague) (1968).
- 18) Meyer, Colette, Rebeller, Michel: Institut Français du Pétrole, des Carburants et Lubrifiants Fr. 1594564 (1970).
- 19) Myers, J.: J. Ferment. Technol., **44**, 344 (1966).
- 20) Ogawa, T., Kozasa, Y. Terui, G.: Ibid, **50**, 143 (1972).
- 21) Ogawa, T., Terui, G.: Proceedings of 4th International Fermentation Technology, (1972) (in press).
- 22) Warburg, O., Biochem. Z., **100**, 230 (1919).