

光の波長変換を利用したクロレラの増殖に関する研究

Research on Proliferating Cells of Chlorella using Wavelength Shifting Material

安倍 由 晴 *¹
Yoshiharu ABE

油 谷 健 吾 *¹
Kengo ABURAYA

西 方 伸 吾 *¹
Shingo NISHIKATA

平 田 陽 一 *²
Youichi HIRATA

谷 内 利 明 *³
Toshiaki YACHI

谷 辰 夫 *³
Tatsuo TANI

Abstract

The purpose of this study is improvement of efficiency of photosynthesis by changing spectrum of incident light. The wavelength shifting material that doped fluorescence dyes (Lumogen F RED-300) to polymethyl methacrylate (PMMA) thin board was used in order to change spectrum of incident light. The characteristics of the material show that the absorption spectrum is from 400nm to 620nm and fluorescence spectrum is from 600nm to 740nm with 620 maximum values.

We have designed and developed the experimental photo-bioreactor with the wavelength shifting material board, wavelength-shifting container, in order to change the spectrum of incident light. Alga chlorella (*Chlorella ellipsodea* C-87) has been applied to the container.

It is found that proliferating of chlorella increases with intensity of incident light till about $300 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. The growth speed of chlorella proliferated about 40% with the wavelength-shifting container comparing with the container without wavelength shifting material under same experimental conditions.

キーワード：波長変換素子，蛍光染料，増殖，光合成，クロレラ，太陽光エネルギー

Key Words : Wavelength Sifting Materials, Fluorescence dye, Proliferating Cells, Photosynthesis, Chlorella, Solar Energy

1. はじめに

近年，太陽光発電や風力発電、燃料電池発電などの新しいエネルギーの技術開発が進みその進展に目を見張るものがある。しかし，これらの技術はいずれも広義には直接発電によるエネルギー変換の方法である。

一方，植物の光合成によって太陽エネルギーをバイオマスエネルギーとして固定し利用することも重要である。筆者らはバイオマスエネルギーの生産性向上を目的とした基礎研究を行っている。この研究は蛍光染料の持つ波長変換特性を適用して，太陽光のスペクトル分布を改質して植物に照射し，光合成促進を図ることを目指したものである。この技術が確立されればバイオマスエネルギーの生産性向上が図られると共に地球環境問題に関係して，大気中に排出されている CO_2 を吸収・固定し栄養価の高い物質の生産を行う有効な方法(光バイオリクター)

の一つとしても期待できる。

本論文では，光バイオリクターなどをより有効に運用するためにまず昼白色蛍光灯による光源，培養反応容器，微細藻類クロレラ(*Chlorella ellipsodea* C-87)，青色帯と赤色帯のカラーフィルタを用いて照度の変化や青色帯と赤色帯の光量割合に対するクロレラの増殖特性を把握した。次いで，カラーフィルタに代えて蛍光染料(Lumogen F RED-300 BASF 社製)をポリメチルメタアクリレートに添加した波長変換素子を装着して培養実験を行いクロレラの生長について考察した。これらの実験の結果，筆者らが提案する蛍光染料による波長変換素子はクロレ

*¹ 東京理科大学大学院工学研究科

*² 諏訪東京理科大学 講師 (長野県茅野市豊平 5000-1)

*³ 東京理科大学大学院 教授 (東京都新宿区神楽坂 1-3)
(原稿受付：2003年5月8日)

ラの増殖速度を大幅に増大することが確認された。これらのことより、波長変換素子はバイオマスエネルギー生産や光バイオリアクターに有効であることが想定できる。

2. 培養実験装置と評価法

2.1 培養実験装置

筆者等が用いた培養実験装置は次のようである。この装置の光源は昼白色の蛍光灯(東芝製 FL-10EDN 10W 12 本並列使用)であり、有効照射面積は約 1600cm²(40cm×40cm)で分光測光計(Photo Research 社製 PR-650)で測定した分光特性は Fig1 に示すとおりである。

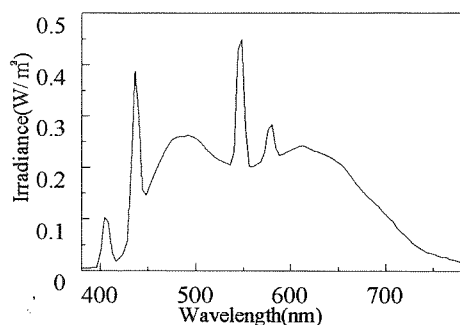


Fig.1 Spectrum of FL10-EDN.

なお、光源は1日(24時間)を周期として、照射時間を16時間、休止時間を8時間(明暗周期を16hr/8hr)一定とした。

縦 55cm×横 30cm×高さ 15cm の恒温水槽にアクリル製の培養容器(縦 18cm×横 9cm×高さ 5cm)を装着して、その中にクロレラ(*Chlorella ellipsoidea* C-87)を水に混ぜた水溶液 100ml を培養液とした。なお培養期間中の環境を一定にするために恒温槽(IUCHI 社製 OG-100)を用いて培養容器の温度を 25℃一定にした。

光合成に寄与する青色帯(380-580nm)、赤色帯(580-780nm)の光量を調整するため青色、赤色のカラーフィルタ(東京舞台照明社製)を用いた。また、光源のスペクトルを改質するための波長変換素子は蛍光染料(Lumogen F RED-300 BASF 社製)をポリメチルメタアクリレート(PMMA, 屈折率 1.49)に添加した濃度が 0.02% のボードである。この素子の大きさは縦 10cm×横 10cm×厚み 2mm である。この素子の波長に対する吸収、蛍光特性を Fig2 に示す。

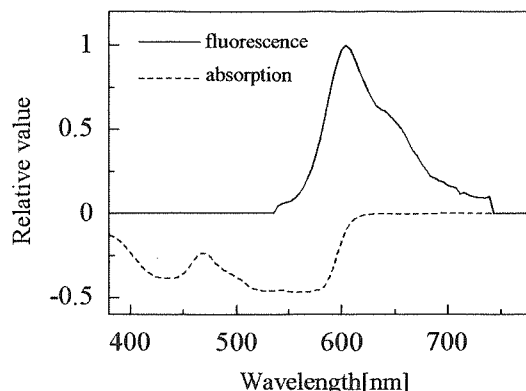


Fig.2 The fluorescence and absorption characteristics of Lumogen F RED-300.

図の横軸は波長であり、縦軸は吸収・蛍光の相対値である。Fig2 の点線の負特性は吸収特性であり、約 600nm 以下の波長を吸収している。また、実線の正特性は蛍光特性であり 620nm にピークを有する 600~740nm の波長帯で蛍光していることがわかる。なお、この波長変換素子の表面での反射率は 4% であった。

2.2 照射光の質の定義

照射光の強さの指標として、 $PPFD[\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}]$ を用いた⁽¹⁾。 $PPFD$ とは(1)式で定義され、単位時間単位面積に入射する光量子数をアボガドロ数で除したものを、400~700nm の波長域で積分した値である。この $PPFD$ は、植物の生育における光環境を表す指標としてよく用いられる。

$$PPFD = \int_{400}^{700} \{E_{\lambda} / (h\nu_{\lambda})\} / N_a d\lambda \dots (1)$$

E_{λ} : 波長 λ における放射照度 [W/m^2] h : プランク定数
 ν : 周波数 [Hz] N_a : アボガドロ数

本実験では、分光測色計(PR-650: Photo Research 社製)によるスペクトル分布の測定値と、電子照度計(LX-1332: CUSTOM 製)による照度の測定値より放射照度 E_{λ} を求め、(1)式より $PPFD$ を計算した。

光の質に関しては、 R/B 比の指標を用いて評価を行なった。Fig3 に示されるように植物には赤色光と青色光を多く吸収する特性がある。 R/B 比とは青色帯(380-580nm)に対する赤色帯(580-780nm)の光量子束密度の比であり、この比率が植物の生育に大きく関与すると考えられ、(2)式で定義する。なお、本研究で光源に用いている蛍光灯のスペクトルは、この R/B 比はおよそ 1 である。

$$R/B \text{ 比} = \frac{\int_{580}^{780} \{E_{\lambda} / (h\nu_{\lambda})\} / N_a d\lambda}{\int_{380}^{580} \{E_{\lambda} / (h\nu_{\lambda})\} / N_a d\lambda} \dots (2)$$

2.3 植物の光合成

地球上に生息する多くの植物は、太陽の光を体内で利用可能

なエネルギーに変換することで増殖している。この理想的とも言えるエネルギー変換システムである光合成において、吸収して、光合成に作用する光には波長に選択性がある。植物によりこのスペクトルは異なるが、吸収する可視領域の中でも一般的に赤色帯と青色帯の光をよく吸収し、緑色帯の光の利用効率は低い。特に赤色帯の光の重要性は広く知られており、赤色帯と青色帯の光の比率が 10:1 の時に最も光合成効率が良いという報告がある^②。本研究でもこの赤色帯と青色帯の比率に着目し、赤色帯の光の有効性について測定と考察を加えている。

光合成の作用スペクトルの標準化は、世界各国の国内規格としても検討されているが、現在のところ国家規格として制定、公布されているのはドイツ規格(DIN 5031-1975)がある^③。Fig.3 にその作用スペクトルをクロロフィルの吸収スペクトルとともに示す。図の横軸は光の波長であり、縦軸は吸収度(相対値)と光合成作用値(相対値)である。

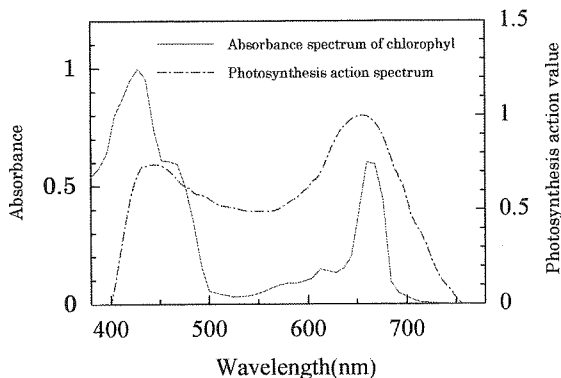


Fig.3 Photosynthesis action value and absorbance spectrum of chlorophyll.

2.4 測定装置と評価

培養環境を定量的に把握するため必要な光源(昼白色蛍光灯)のスペクトル分布や照度は先に述べた分光測光計(Photo Research 社製 PR-650)、及び分光測色計(LX-1332 COSTOM 社製)を用いて求めた。

また、クロレラの増殖測定には、トーマの血球計算板を使用し、システム生物顕微鏡(BX-51:OLYMPUS 製)を用いた吸光度 OD_{760} 測定により行っている。すなわち、藻体数の測定は、培養液を少量採取し、上記の生物顕微鏡で数回に分けて個体数を計数し、その平均値を各培養液の 1ml 中の藻体数とした。このとき、藻体数の計数は単純に個体数のみとし、クロレラの個々の大きさは考慮しない事とした。

一方、吸光度の測定においては、藻体数の測定で採取したサンプルを利用し、上記分光光度計により光合成色素に関与しない特定の波長(本実験では 760nm)の透過率 T を測定し(3)式より吸光度 OD_{760} を求めた^④。

$$OD_{760} = \log(1/T) \cdots (3)$$

また、吸光度は予め作成した検量線を利用し、藻体数に変換し

た。本実験における藻体数は(4)式であらわされるものとした。

$$\text{藻体数 (cells/ml)} = (9.00 \times 10^6) \times OD_{760} \cdots (4)$$

これらの 2 つの測定方法で得た藻体数を平均して、増殖速度の評価を行なった。生長速度の評価は相対増殖速度 Kg を利用した。この Kg は一定期間内にどれだけ個体数が増えたのかを評価するもので、以下の式で求めた。

$$Kg = \frac{1}{t_2 - t_1} \log \frac{N_2}{N_1} \cdots (5)$$

t: 日数, N: 藻体数など
添字の 1, 2 はそれぞれ測定の開始日と終了日を示す

3. 実験結果と考察

3.1 クロレラの増殖特性

a) 光強度特性(RB比一定)

クロレラの光の強度に対する増殖特性を取得するため、吸収型固定式フィルタを用いて入射光量を 100%より 70%, 40%に変化させて培養を行った。これらをそれぞれ SampleA, SampleB, SampleC とし、その増殖の推移を Fig.4 に示す。図の横軸は測定日数(日)であり、(4)式で示される縦軸は藻体数である。図より、光量を減少させることにより藻体数も減少する傾向にあることが分かる。また、このときの各光環境における 14 日間の Kg を計算した。SampleA を基準にして相対値を Table1 に示す。

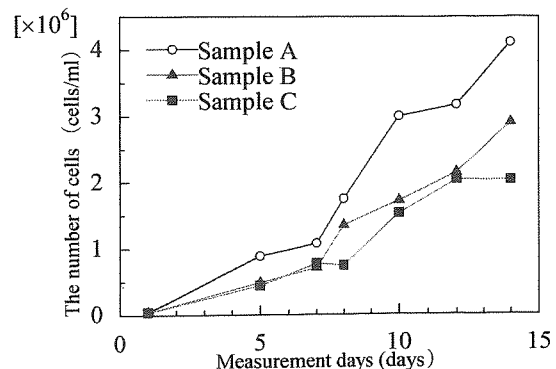


Fig.4 The growth curve when changing PPFD.

Table 1 Kg ratio against PPFD.

*[$\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$]		
	PPFD*	Kg ratio
A	239.39	1.00
B	183.77	0.94
C	103.37	0.80

b) 光の質に伴う特性(*PPFD*一定)

本論文では光の質の指標を *R/B* 比で表し, *R/B* 比の変化に対するクロレラの増殖特性を求めた. 筆者らは赤色と青色のカラーフィルタ (東京舞台照明社製) を用いて, 2 枚のカラーフィルタの面積比を変えることで照射光を Fig.5 に示すように 4 段階に制御して培養を行った(このときの *PPFD* は 40). この実験の測定結果は Fig.6 の通りである. また, 測定期間 17 日の *Kg* を計算して Table2 に示す. この時の基準値は Sample A である.

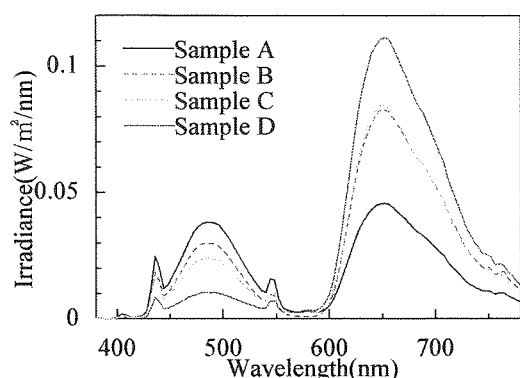
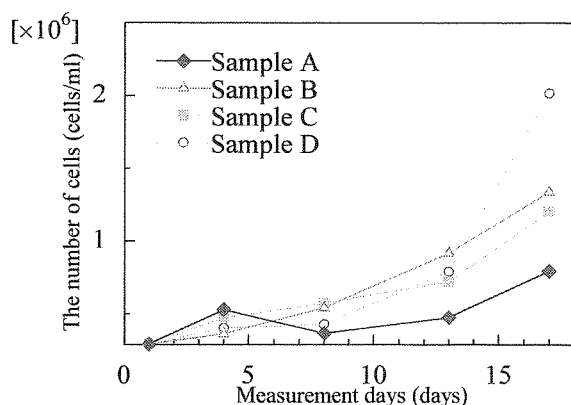

 Fig.5 Irradiation light spectrum when changing *R/B* ratio.

 Fig.6 The growth curve when changing *R/B* ratio.

 Table 2 *Kg* ratio against *R/B* ratio. (*PPFD* = 40)

	<i>R/B</i>	<i>Kg</i> ratio
A	1.0	1.00
B	3.6	1.42
C	4.2	1.52
D	10.9	1.94

以上のような培養実験を *PPFD* と *R/B* 比を変化させて繰り返し行い⁽⁵⁾, *PPFD* と *R/B* 比に対する *Kg* を取得して整理した結果をグラフ化して Fig.7 に示す.

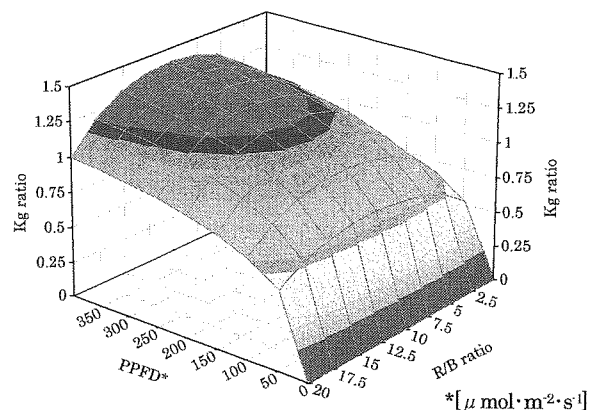

 Fig.7 *Kg* ratio curved surface against *PPFD*-*R/B* ratio.

Fig.7 から, クロレラの増殖は, 光の強度に比例するが, *PPFD* = 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ を超えると, 飽和し始めることが分かる. この値は, 照度に換算するとおおよそ 20000lx 程度である. このことは, 冬季でもうす曇り程度の光量があれば, クロレラの光合成は充分飽和すると考えられる. また, *R/B* 比は 10 付近が好ましい培養条件であると推定できる.

3.2 波長変換素子の適用による特性

a) 波長変換素子を用いた培養容器

波長変換素子で入射光を直接波長変換する手段では, 素子の透過率により *PPFD* は減少する. そこで, 波長変換素子の持つ特徴をより活かすために一度培養液を透過した光を再度利用した. 培養液を透過した光源の光は, 藻類の濃度によって差はあるが, 下部に配置されている波長変換素子によって波長変換され再度培養液に吸収される. Fig.8 は培養容器の概略図である. この培養容器の大きさは縦 18cm×横 9cm×高さ 5cm である.

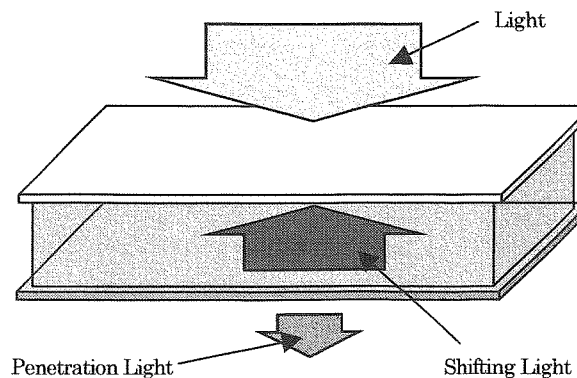


Fig.8 Wavelength shifting containers.

b) 光環境

クロレラの培養実験は、Fig.8 に示す波長変換素子を用いた培養容器と波長変換素子を用いない同じ寸法の透明アクリル製の容器とを同一の光環境の下で 2 台配置して行った。Fig.9 は入射光のスペクトル分布であり、波長変換素子を用いた培養容器に入射するスペクトルは、波長変換素子の出力解析プログラムである光量解析法⁶⁾を用いて求めている。ただし、図中のスペクトル分布は懸濁液濃度が 0%(測定開始時)のときの分布であり、この濃度が増せば赤色域のスペクトルが減少するが、ここでは考慮していない。このときの光環境を表す PPFD と R/B 比を Table4 に示す。

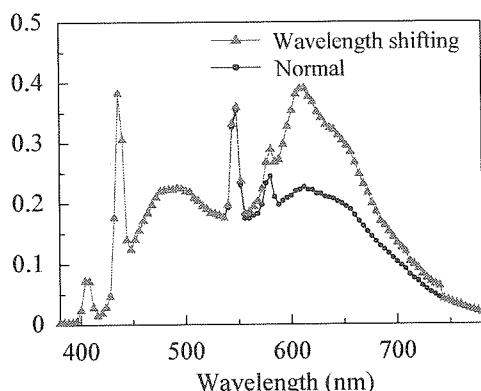


Fig.9 Irradiation light spectrum of each containers.

Table 4 PPFD or R/B ratio against each containers.

 $[\mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}]$

	PPFD*	R/B
Wavelength Shifting	362.1	1.49
Normal	330.1	1.04

c) 結果と考察

各培養容器でのクロレラの増殖の推移を Fig.10 に示す。横軸は測定日数であり、縦軸は(4)式で示される藻体数である。波長変換素子を装着した場合としない場合の比較では、測定を開始してから 20 日の間は両者に大きな違いが認められなかった。しかし、20 日を過ぎる頃から両者の藻体数に差が生じ、30 日以降差が顕著になった。これは Table4 に見られるように、波長変換素子を装着した場合の PPFD、R/B 比は装着しない場合のそれらに比べいずれも大きく、波長変換素子の装着はクロレラの増殖に効果的であることが分かった。また、それぞれの光環境における測定期間 35 日の Kg を Table5 に示す。

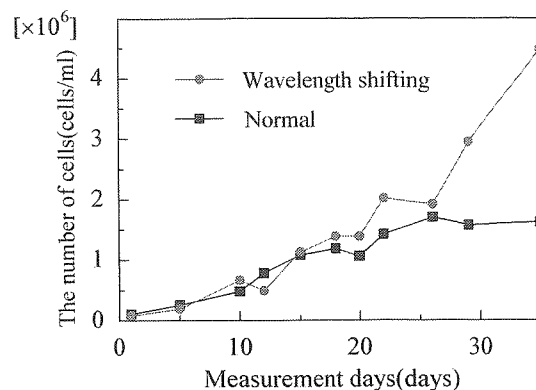


Fig.10 The growth curve in each containers.

Table 5 Kg ratio against each containers.

	Kg ratio
Wavelength shifting	1.39
Normal	1.00

これらの結果から、経過を経て培養液の濃度が濃くなると、波長変換素子を用いた培養容器の効果が現れていることが分かる。これは、上部から照射している光と裏側からの蛍光とが重ねられることで藻類固体同士の影の影響を補うことができることによると考えられる。この間の効果の説明図を Fig.11 に示す。

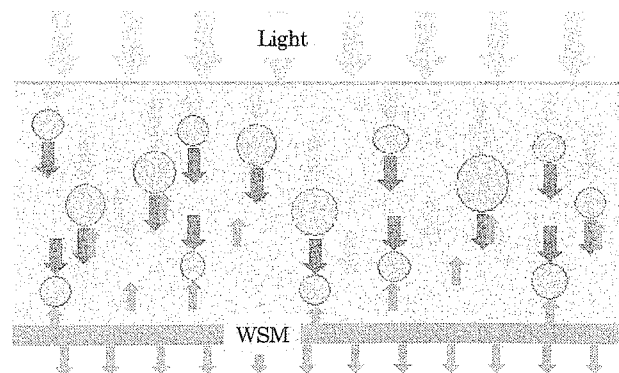


Fig.11 Concept of our wavelength shifting container.

この図は、上部から照射している光の裏側に波長変換素子 (WSM) を設置することにより各クロレラが光を均一に、しかも光合成に有効な光を吸収することが出来ることを示している。

4. まとめ

本論文では、微細藻類クロレラの二酸化炭素固定能力に注目し、光の波長変換素子によって光合成効率を上げることを目的として実験を行った。結果以下のことが分かった。

- 1) 微細藻類クロレラの増殖特性を取得する培養実験を行った結果、 $PPFD=300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 程度まではクロレラが増殖し、 R/B 比が10のときに最も増殖が進むことが分かった。
- 2) 波長変換素子を用い入射光スペクトルの改質が可能な新しい光合成反応容器を提案した。この容器を用いることにより、培養液を透過した光を改質し再照射することで増殖速度を約40%促進することができた。
- 3) 他の植物においてもその作用スペクトルに整合した波長変換を行えば、生長を促進できる可能性がある。

今後の展開としては、実験結果の信頼性を確かめるためにも、本実験容器での実験を繰り返してデータの精度を向上させる必要がある。一例として $PPFD$ と R/B 比がそれぞれどの程度クロレラ増殖に寄与しているかを明らかにすることである。また、培養に当たっては何らかの攪拌手段は必要であり、容器の内部・外部の汚れ対策も必要である。さらに、本研究では、長方形の波長変換容器を作成してその効果を検討したが、この透過光の再利用という概念は他の形でも充分応用できるものであり、さらに効率的な波長変換を利用した培養容器(チューブラー型リアクターなど)の構築も期待できる。

参考文献

- (1) 社団法人照明学会編：光バイオインダストリー，オーム社(1992)
- (2) 森・高辻：LED と LD 光がサラダナ生育に及ぼす影響，植物工場学会誌 11(1)：46-49(1999)
- (3) 河本康太郎：照明ランプの将来展望 日本植物工場学会誌 第2巻 第1号：15-24(1990.12)
- (4) 西澤・千原：藻類研究法，共立出版(1979.12)
- (5) 西方・谷：波長変換素子を用いた太陽光利用効率向上に関する研究，東京理科大学大学院工学研究科 2001 年度修士論文(2002.3)
- (6) 鈴木・稲田・谷：波長変換素子の光量解析法，太陽エネルギー学会 VOL.26 NO.4 (2000)