藻類の培養における発光ダイオードおよび半導体レーザーの利用

岡澤 敦司

大阪府立大学大学院 生命環境研究科 (〒599-8531 大阪府堺市中区学園町1-1)

Utilization of Light-Emitting Diodes and Laser for Algal Cultivation

Atsushi OKAZAWA

Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8531

(Received July 29, 2016)

Microalgae are drawing keen attention as alternative sources of sustainable energy or functional materials. Photobioreactors are suitable for the production of high-value-added materials by microalgae because those systems can minimize such uncertain factors as weather fluctuations that negatively affect production. On the other hand, the utilization of artificial light sources in the photobioreactors increase cost. Recently, light-emitting diodes (LEDs) and laser diodes (LDs) are expected to be effective light sources for plant production in closed systems: "plant factories". Even though LEDs and LDs can be adopted for photobioreactors, relatively few studies have compared the effects of LED or LD irradiation on the growth and productivity of microalgae with plants. This review summarizes the recent trials of the utilization of LEDs or LDs for algal culture.

Key Words: Cyanobacteria, Green algae, Laser diode, Light-emitting diodes, Photosynthetic bacteria

1. はじめに

石油に代わる再生可能エネルギー源、あるいは、機能性食素材など有用物質の生産者として藻類が注目を集めている。改めて述べるまでもないが、藻類は太陽光をエネルギー源として大気中のCO₂を固定し、脂質、炭水化物あるいはタンパク質といった有用資源へと変換する。いわゆる高等植物でも同様のことは可能だが、一般的に藻類の方が増殖が速いため、単位面積・単位時間あたりの収量に利があるとされている¹⁾。藻類を培養する場合、コスト面からは太陽光を利用する開放系で行うことが推奨される。燃料など安価で大量に必要なとされる資源の生産にはこの方法が用いられるが、このような開放系での培養においては、外部からの雑菌の持込みや天候不順による生産量のばらつきが問題となる。一方、医薬品や機能性化学品といったような高付加価値物質の生産において、量より質が問われる場合には、完全閉鎖系のフォトバイオリアクターが用いられる。この場合、原理的には環境制御による高効率生産を持続的に行うことが可能であるが、太陽光を利用できるという藻類による物質生産の最大の利点は犠牲になる。この品質とコストのトレードオフの関係は、植物による物質生産を工場と植物工場で行う場合の比較においても同様である。

本特集の他の原稿で解説されているように、コストを可能な限り削減したうえで、高品質な商品を生産することを目的として、植物工場での発光ダイオード(La-

ser-Emitting Diode: LED)や半導体レーザー(Laser Diode: LD)の利用の試みが数多くなされている。一方、微細藻類の培養におけるLEDやLD利用の試みは未だ限定的である²⁾。本稿では、LEDあるいはLDを用いた藻類の培養に関する研究の状況を概説し、今後の展望を考察する。

2. 微細藻類の種類と色素

2.1 藍藻(cyanobacteria)

英語でbacteria(細菌)と表されることからわかるように、藍藻は核をはじめとする明確な細胞内小器官をもたない原核生物である。進化的に植物の葉緑体の起源となった生物と考えられており、植物と同じようにクロロフィルをもつ。しかし、クロロフィル分子種の組成が高等植物とは異なっているため、青色光の利用効率は悪いとされている。一方、藍藻に特徴的な色素としてフィコビリンを有しているため、緑色光の利用効率が良いと考えられている²⁾。代表的な藍藻に後述するスピルリナがある。

2.2 緑藻(green algae)

緑藻はいわゆる高等(陸上)植物と同じ真核生物であり、葉緑体をもっている。したがって、その光合成では赤色光と青色光の利用効率が良いと考えられる²⁾。代表的な緑藻に後述するクラミドモナスやクロレラがある。

以下では、藍藻と緑藻の生育および物質生産へのLED

およびLDの適用例を中心に紹介し、その他の藻類や分野の研究事例もとりあげる。

3. 藍藻の培養へのLEDの利用

藍藻類の一種であるスピリリナはタンパク質を多く含む栄養補助食品として販売されている。Chenらは、白色(380-760 nm)、赤色(620-645 nm)、黄色(587-595 nm)、緑色(515-540 nm)および青色(460-475 nm)のLED光を750-3000 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ で照射した場合のスピリリナ(*Spirulina platensis*)中の色素(クロロフィル a およびフィコシアニン)含量を調べた。スピリリナの生育は赤色LEDを用いた場合が最も良好であったが、色素含量については青色LEDを3000 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ で照射した場合が最も高くなった。ただし、この場合はスピリリナの増殖速度の著しい低下がみられたことから、物質生産性という観点からは赤色LEDを利用するべきであると結論づけられた³⁾。前述のように藍藻では、緑色光の利用効率が高等植物よりも高いと考えられており、本研究で確かに緑色光による生育は青色光よりも良いことが示された。しかし、その場合でもその生育速度は赤色光と比較した場合、1/3程度であった³⁾。

藍藻についてはLED利用の研究例がほとんどなく、現時点では上記の結果がスピリリナ特有のものなのか藍藻一般に当てはまるのかは定かでない。今後、混合光の利用や他の藍藻を用いた研究の展開が期待される。

4. 緑藻の培養へのLED・LDの利用

藍藻と比較して緑藻ではLEDを利用した実験例が多く存在する。LDを用いた数少ない研究事例として、Kuwaharaらは緑藻のモデル生物であるクラミドモナス(*Chlamydomonas reinhardtii*)の生育に対する赤色LD(650 nmおよび682 nm)および青色固体レーザー(473 nm)光照射の影響を調べた。出力を1 mWとして、レーザーによる培養を行ったところ、650 nm、682 nmいずれの場合も473 nmと同時に照射することによって生育速度が促進された。その速度はコントロールとした白色の冷陰極放電ランプ照射の場合の2倍以上であった⁴⁾。

同様の混色の効果は緑藻のドナリエラ(*Dunaliella salina*)においても確認されている。その生育および β -カロテン含量に対して、赤色(660 nm)および青色(470 nm)のLED光を3:1で混合した場合に最も高い促進効果が得られた⁵⁾。また、カロテノイド含量に対する青色LED(470 nm)の正の効果はヘマトコッカス(*Haematococcus pluvialis*, アスタキサンチンの生産菌として実用化されている)においても確認されており⁶⁾、緑藻に共通の効果である可能性も考えられる。

AbiusiらはビタミンEを高生産することで知られている海洋性微細藻類テトラセルミス(*Tetraselmis suecia*)について、その生育や成分に与える波長の影響を調べた。その結果、白色および赤色(640 nm)のLEDを用いた場合に最も生育が良く、青色(460 nm)および緑色(520 nm)

のLEDを用いた場合には生育速度が半分以下にまで低下した。また、赤色LEDでは細胞が小さくなり、クロロフィル量が減少することが明らかになった。一方、青色LEDではクロロフィル量が増加した。さらに、赤色LEDで生育した場合、機能性の脂肪酸として知られるエイコサペンタエン酸(EPA)量が増加することが明らかになった。最終的に、クロロフィル量の低下や細胞が小さくなるものの、バイオマスとエイコサペンタエン酸の増加という点から赤色LEDの利用が有効であると結論づけられた⁷⁾。

同様に脂質を高生産させる目的で、Attaらはクロレラ(*Chlorella vulgaris*)の培養への青色LED(波長未記載)の利用を検討した。その結果、200 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ で12 h明期/12 h暗期で培養した場合で最も生育が良く、脂質含量も高くなることが示された。また、この際の生育速度は白色蛍光灯よりも大きかった⁸⁾。また、*Nannochloropsis* spp.においても青色(470-475 nm)LED光の照射がEPAをはじめとする脂質の高効率生産に有効であることも示されている⁹⁾。一方、酵母との共培養時の油脂の蓄積における波長の効果についても検討が行われ、この場合には青色および緑色(550 nm)LEDよりも、赤色(680 nm)LEDの方が生育および油脂生産能の促進効果が高いことが示されている^{10,11)}。油脂生産能の高い緑藻であるボツリオコッカス(*Botryococcus braunii*)では、脂質生産能に光質の差による影響は見られず、生育速度も勘案した炭化水素の生産という観点から赤色LED(660 nm)が最も適していることが示された¹²⁾。

以上より、生育や脂質の含量に対する各波長の効果は研究事例毎で異なっており、現状では緑藻に普遍的な応答の有無についてははっきりとしたことはいえない。赤青混合は生育促進をもたらすことが期待できるが、これについても一般化にはより多くの研究結果が必要である。

少し変わった事例として、クロレラを用いたメタンガス生産に対するLED光の効果の検証例がある。青色(460 nm)黄色(590 nm)および白色(380-760 nm)LED光と比較して赤色(660 nm)LED光を1200-1600 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ で照射した場合に最も効率良くメタン生産を行えることが示された¹³⁾。

5. その他の藻類等の培養へのLEDの利用

微細藻類だけではなく、現在、水産資源として広く利用されている大型海洋藻類に対してもLED等の人工照明による生産性増大が期待できる。高田氏は、水産上有用な緑藻であるスジアオノリ(*Ulva prolifera*)の成長や光合成に対する異なる波長のLED光照射の影響を解析した。LED光源として赤色(635 nm)、緑色(523 nm)、青色(470 nm)および白色(470 nm + 560 nm)が用いられた。その結果、スジアオノリの成長と光合成が青色LED光で促進され、緑色LED光では抑制されることが明らかとなった。この結果はスジアオノリの吸収スペクトルからも説明でき、青色LEDと赤色LEDを併用することでさらなる成長促進効果が期待された¹⁴⁾。この結果は、微細藻

類の緑藻で得られている結果と概ね一致する。

同研究グループは褐藻コンブ目のアラメ (*Eisenia bicyclis*) に対してもスジアオノリと同様の生育試験を実施している。その結果、緑藻のスジアオノリの場合と同様に青色LED光が有効であることが示された。一方、赤色LED光でのアラメの成長は遅く、これは、緑藻と褐藻の吸収スペクトルの違いに起因すると予測された¹⁵⁾。すなわち、これらの研究で用いられた赤色LEDの発光スペクトルが610-650 nmであり、スジアオノリはこの波長域にもある程度吸収が見られたものの、アラメでは、この波長域の吸収が小さいことが明らかとなった。一方、アラメは緑色光域(490-560 nm)にもフコキサンチン由来の吸収帯があり、これに対応して緑色光による成長が確認された¹⁵⁾。

以上の結果より、海藻の生産には青色LEDが有効である可能性が示され、赤色LEDと緑色LEDの利用については育てる海藻の種類によって使い分けが必要であると考えられる。

水産分野において微細藻類は、アコヤガイやカキなどの餌料として利用されている。石川氏と磯和氏はこの餌料用微細藻類の培養を白色LEDで行うことを試みた。微細藻類としてハプト藻類の*Pavlova lutheri*および珪藻類の*Chaetoceros neogracile*を用いたところ、従来法である白色蛍光灯で培養した場合と差がないことが示された。この際、LEDの使用によって消費電力は50%にまで削減され、培養液の温度上昇を抑えられることも利点として挙げられた¹⁶⁾。

藻類とは異なるものの光合成を行う微生物として光合成細菌が知られている。光合成細菌にもやはり有用物質を生産するものがあり、これらを用いた物質生産系の構築も試みられている。Bertingらは、嫌気性の紅色光合成細菌である*Rhodobacter capsulatus*の培養を、通信分野等で広く利用されている850 nmの垂直共振器面発光レーザー (Vertical Cavity Surface Emitting Laser: VCSEL) を用いて試験的に行った。その結果、生育速度や色素成分は一般的に培養に用いられる白熱電球を使った場合と変わらず、消費電を30%低減できることが示された¹⁷⁾。850 nmは赤外線であり、高等植物や藻類が利用できない光であるという点も興味深い。

6. 環境分野におけるLEDの利用

藻類は水中の有害物の評価にも用いられる (ISO 8692 : 2012, ISO 10253 : 2006, ISO 14442 : 2006)。この際、有害物は藻類の生育阻害試験によって定量的に評価される。このような水質試験においては、多検体を同時に測定できるシステムの構築が重要である。MichelとEisentraegerは、イカダモ (*Desmodesmus subspicatus*) を白色LED光照射下、96穴のマイクロプレート上で200 μ Lという微小スケールで培養し、得られた結果が従来法と遜色ないことを示した¹⁸⁾。

また、藻類は海水への酸素供給と適切な栄養塩濃度の維持などを目的とする水質浄化にも用いられている。た

だし、この効果は夜間には得られず、逆に枯死した藻類の代謝・分解に由来する酸素消費と過剰な栄養塩の流出が問題となる。山中氏らは尼崎運河の実証実験水路に水中型白色LED照明を設置し、その水質改善効果を検証した。その結果、ある程度の効果が得られたが、藻類の光合成に連続光障害が生じることも確認された。今後、照射方法を検討することで、より高い水質改善効果が得られると期待される¹⁹⁾。なお、本試験においては使われているLEDが白色のみであるため、他の波長での効果を検討するとさらに興味深い結果が得られると思われる。

そのような事例もあり、Kimらは排水中の窒素およびリンを除去する目的で、イカダモに白色 (400-560 nm)、赤色 (670 nm)、緑色 (525 nm) および青色 (450 nm) LEDを照射し、それらの元素の除去能に与える影響を調べた。強度を100 μ mol/(m²s) に揃え、種々の条件を検討したところ、赤：青が7：3の場合に排水からの窒素の除去率が最大となり、5：5でリンの除去率が最大となることが明らかとなった²⁰⁾。排水からの窒素やリンの除去は、藻類がこれらの元素を代謝吸収していることを意味する。端的に述べると、窒素の代謝吸収はタンパク質の合成を、リンの代謝吸収は高エネルギー化合物の合成を意味する。これらの代謝が異なる光条件で活性化されることは生理学見地から興味深い現象といえる。

7. おわりに

ここまで藻類の培養におけるLEDおよびLDの利用に関する研究成果について概観してきた。冒頭に記載したように、現状ではそれほど多くの研究事例があるわけではなく、それぞれの研究も単発的に行われている。例えば、一口に赤色といっても、実際には610-680 nmでさまざまな波長の光が用いられており、この範囲でのどの波長が最も効果的かを調べたような研究事例はほとんどないといつてよい。同様に一口に微細藻類といっても非常に多様な種があり、目的とする物質にあわせて生物種を選択しなければならない状況である。今後も、ここで例に挙げたような個別研究の蓄積が進むことは予想に難くないが、藍藻であればスピリリナ、緑藻であればクラミドモナスといった実験モデル生物種を用いて、数十nm刻みの波長に対する応答を網羅的に解析するといったような体系的な研究も行う必要があると考えられる。そのような研究は従来大型の分光器を用いて行われてきたが、複数の波長を照射するような実験系の構築には、費用がかかり装置も複雑になる。こういった研究にLEDやLDを利用することで、比較的簡便な実験系の構築が可能であると考えられる。今後、それらの研究の結果から、こういった現象が各藻類に共通で、どのような物質生産において個別研究が必要というような情報が整備されると考えられる。将来的には、藻類の各波長の光に対する応答をきちんと理解した上で、効率の良い物質生産系がLEDあるいはLDの利用によって確立されることを期待したい。

参考文献

- 1) A. Doshi, S. Pascoe, L. Coglan, and T. J. Rainey: *Renew. Sust. Energ. Rev.* **64** (2016) 329.
- 2) P. S. C. Schulze, L. A. Barreira, H. G. C. Pereira, J. A. Perales, and J. C. S. Varela: *Trends Biotechnol.* **32** (2014) 422.
- 3) H.-B. Chen, J.-Y. Wu, C.-F. Wang, C.-C. Fu, C.-J. Shieh, C.-I. Chen, C.-Y. Wang, and Y.-C. Liu: *Biochem. Eng. J.* **53** (2010) 52.
- 4) S. S. Kuwahara, J. L. Cuello, G. Myhre, and S. Pau: *Opt. Lasers Eng.* **49** (2011) 434.
- 5) W. Fu, Ó. Guðmundsson, G. Paglia, G. Herjólfsson, Ó. S. Andrsson, B. . Plsson, and S. Brynjlfsson: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97** (2013) 2395.
- 6) T. Katsuda, A. Lababpour, K. Shimahara, and S. Katoh: *Enzyme Microb. Technol.* **35** (2004) 81.
- 7) F. Abiusi, G. Sampietro, G. Marturano, N. Biondi, L. Rodolfi, M. D'Ottavio, and M. R. Tredici: *Biotechnol. Bioeng.* **111** (2014) 956.
- 8) M. Atta, A. Idris, A. Bukhari, and S. Wahidin: *Biores. Technol.* **148** (2013) 373.
- 9) C.-Y. Chen, Y.-C. Chen, H.-C. Huang, C.-C. Huang, W.-L. Lee, and J.-S. Chang: *Biores. Technol.* **147** (2013) 160.
- 10) C.-H. Shu, C.-C. Tsai, W.-H. Liao, K.-Y. Chen, and H.-C. Huang: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **87** (2012) 601.
- 11) P. Das, W. Lei, S. S. Aziz, and J. P. Obbard: *Biores. Technol.* **102** (2011) 3883.
- 12) M. Baba, F. Kikuta, I. Suzuki, M. M. Watanabe, and Y. Shiraiwa: *Biores. Technol.* **109** (2012) 266.
- 13) Y. Zhao, J. Wang, H. Zhang, C. Yan, and Y. Zhang: *Biores. Technol.* **136** (2013) 461.
- 14) 高田 順司, 村瀬 昇, 阿部 真比古, 野田 幹雄, 須田 有輔: *水産増殖* **59** (2011) 101.
- 15) 村瀬 昇, 阿部 真比古, 野田 幹雄, 須田 有輔: *水産大学研究報告* **62** (2014) 147.
- 16) 石川 卓, 磯和 潔: *水産技術* **4** (2012) 51.
- 17) K. Bergling, T. J. Hurse, U. Kappler, and A. D. Rakić: *Biotechnol. Bioeng.* **94** (2006) 337.
- 18) K. Michel and A. Eisentraeger: *Environ. Toxicol.* **19** (2004) 609.
- 19) 山中 亮一, 上月 康則, 桶川 博教, 沢田 晃聖, 前田 麻里, 沓掛 安宏, 平井 住夫, 一色 圭佑: *土木学会論文集 B2(海岸工学)* **68** (2012) I 1166.
- 20) T.-H. Kim, Y. Lee, S.-H. Han, and S.-J. Hwang: *Biores. Technol.* **130** (2013) 75.