

## 微細藻類からの澱粉粒の回収について\*

田邊幾之助・滑川修吾・佐藤（二階堂）和代・小林武一

大垣昌弘\*\*・辰巳忠次\*\*\*・渡邊篤\*\*\*\*

(応用微生物学研究室)

昭和56年8月10日 受理

## On the Recovery of Starch-Granule from the Microalgal Culture\*

Ikunosuke TANABE, Shûgo NAMEKAWA, Kazuyo (NIKAI DOU) SATO, Takekazu KOBAYASHI,

Masahiro OGAKI\*\*, Chûji TATSUMI\*\*\* and Atsushi WATANABE\*\*\*\*

(Laboratory of Applied Microbiology)

### 緒 言

先に、田邊ら<sup>3)</sup>は廃糖蜜を原料とするアルコール発酵蒸溜廃液のメラノイジン色素による着色を減ずることの出来る微生物を探索中、貯溜中の廃液表面によく生育する微細藻を分離した。このうちの一株 *Chlorella vulgaris* Al-1 が純粋分離の bacteria-free-check 中酵母エキス麦芽エキス培地上に変異株 Al-1y を sector として分離した。ところが、この変異株はぶどう糖培地で従属栄養させるとぶどう糖を利用して増殖し、細胞外に多量の澱粉粒を排出することを発見した<sup>3)</sup>。この藻株 Al-1y をくり返して単細胞分離した藻株 Al-1y-3(11) の細胞外澱粉粒は細胞重量の約30%であり、細胞内澱粉粒量もほぼそれと同量であったので、澱粉粒を全部回収すれば約60%になるものとみられた<sup>3)</sup>。また、その澱粉粒の性質は91~93%がアミロペクチンで、X線回折図はコーンスターチと同じA型に属するものであった<sup>3)</sup>。この澱粉粒を効果的に回収することは微細藻の培養問題と同様に重要な問題であるが、今まで十分な検討をしていなかった。今回はこの点を中心に、とくに、ぶどう糖の藻培養としての回収と藻培養からの澱粉粒の回収を検討したので報告する。

### 材料と方法

#### 1. 澱粉の定量法

ヨード澱粉反応による定量法を採用した。ヨード・ヨードカリ液 (I, 1g; KI, 2g; H<sub>2</sub>O, 300ml) 0.2ml, 0.1N HCl 0.2ml, 試料 0.2ml, H<sub>2</sub>O 6.4ml をよく混合、発色させた後、580nm で比色定量した。標準曲線は 105°C 恒量値を実澱粉量として soluble starch を使用して求めた。標準曲線は  $S(\text{澱粉 } \mu\text{g}) = 0.814T(T: -\log T \times 10^3) - 26.87$  で、測定可能範囲は 0-60 $\mu\text{g}$  であった。藻培養を試料とする時は沸騰水中に10分間つけた後遠沈し、上清を試料として細胞外澱粉を測定した。なお、ブランクとして熱処理をしない培養の上清を同様測定し、差引いた。

#### 2. 細胞外澱粉粒と細胞内澱粉粒の分別定量法

二方法を検討した。すなわち、藻培養を遠沈して2回蒸留水で洗浄したペレットを試料として、①これを20mlの0.5N HClで2時間水解したものを SOMOGYI 法変法<sup>2)</sup>によって全糖を求め、全糖値に0.93をかけて全澱粉量Aとした。次にペレットに dimethyl sulfoxide 5ml を加え攪拌、細胞外澱粉粒をとかした後遠沈し、沈澱部を上と同様処理して全糖量を求め、これから細胞内澱粉量Bを求めた。細胞外澱粉は A-B と計算出来る。次に②①と同じ洗浄細胞を沸騰水中に10分おき3500rpm 15分遠沈し、上清をヨード澱粉反応で定量する。また、参考のため、沈澱の乾燥重量を測定しておく。ブランクとして、熱処理をしない場合の上清と沈

\* この研究は昭和51年度日農化大会(京都女子大学, 京都市, 昭和51年4月4日)で口演した。講演要旨集 p. 421.

\*\* 大阪府立大学総合科学部。

\*\*\* 摂南大学経営工学科。

\*\*\*\* 成城大学理学部。

Table 1. Comparison of the extracellular starch and intracellular starch determinations in the algal culture by the method 1, including the dimethylsulfoxide-treatment, and the method 2, comprising boiling and the iodine-starch-reaction

	reducing sugar mg/ml culture	starch mg/ml culture	dry weight mg/ml culture
Method 1			
total starch	4.7	4.4	
intracellular starch	3.1	2.9	
extracellular starch*		1.5	
Method 2			
supernatant after boiling, determined by the iodine-starch reaction	(2.0)**	1.7 (1.8)**	
supernatant before boiling, determined by the iodine-starch reaction		0.1	
pellet after boiling			4.7
pellet before boiling			6.8
extracellular starch*		1.6	2.1

\* Calculated.

\*\* An amount of starch was calculated from the amount of reducing sugar.

澱を同様に測定した。これらの結果は表1に示したが、①②いずれの方法でも結果には差がないことが確かめられ、以後の実験での細胞外澱粉の定量は②の方法によった。

### 3. $^{14}\text{C}$ ぶどう糖のとり込み

培地は藻類基本培地 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2g;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.8g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.2g;  $\text{NaCl}$ , 0.2g;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 50mg;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 25mg;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.5mg;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.5mg;  $\text{NaWO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.5mg;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 2.86mg;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.222mg;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.79mg;  $\text{KNO}_3$ , 2g; D-glucose, 20g; pure water, 1L; pH 7.2~7.4) を使用した。300ml の三角フラスコに 45ml の培地を入れ、斜面で前培養した藻体 3 loops を 5ml の培地に懸濁して接種した。通常の培養はこの形で培養するが、実験によってはこのまま培養するのを前培養、前培養を集菌して新しい培地に懸濁して主培養とする。さらに  $^{14}\text{C}$ -ぶどう糖を加える場合は  $1\mu\text{Ci/ml}$  の  $^{14}\text{C}$ -ぶどう糖溶液を 1ml 加え振盪培養した。

明条件は三角フラスコ内で 3 klx, 暗条件はフラスコをクッキングフォイルで覆った。

$^{14}\text{C}$ -ぶどう糖は D-[U- $^{14}\text{C}$ ] glucose aqueous solution containing 2% ethanol, sterilized (日本アイソトープ協会) を使用した。測定はガスフローカウンター Aloka-P.C.C. 307 型 (日本無線医理学研究所) を使用した。

### 4. 細胞内澱粉粒の排出促進

培地の starting pH の調製は conc. HCl と滅菌 4N NaOH を使用した。

界面活性剤は CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), LAS (sodium lauryl alcohol sulfate), LBS (sodium lauryl benzene sulfonate) をそれぞれ  $100\mu\text{g/ml}$  の濃度で使用した。

音波破砕は音波発生装置 KMS-100 (久保田製作所) を使用した。

## 結果および考察

### 1. 培地中のぶどう糖のとり込み

培地中のぶどう糖のとり込みが前・主培養の明暗によってどのように影響を受けるか検討した。結果は図1に示すように主培養の明・暗条件にかかわらずぶどう糖は急速に細胞中にとり込まれ、48時間の培養で約  $16\text{mg/ml}$  のぶどう糖が消費され、約  $8.3\text{g/ml}$  の藻体および澱粉が生成し、カウント数から約10%のぶどう糖が培地中に残存する。しかし、こまかくみると前培養のとり込みに対する影響が認められ、前培養が暗条件の場合、主培養でのとり込みが遅れ、明条件ならば早まる。前・主培養とも明条件の場合 (LL) がもっとも早い。この事実は光照射下、定常期手前の細胞にぶどう糖をフィードするとよく取込まれることを期待させる。

ここでとり込まれたぶどう糖の細胞画分への配分がどのようになるか検討した。表2は明・暗培養での各画分中への  $^{14}\text{C}$ -ぶどう糖のカウントの配分をみたもので、消費糖量は SOMOGYI 法変法<sup>2)</sup> で明・暗培養ともほぼ87%であったが、細胞画分の消費糖量に対するカウントはともに約70%であった。これを全糖量と比較すると明条件では消費糖は初糖の82.5%, 暗条件では79.2%, 生成澱粉はそれぞれ消費糖の40.7%, 42.6%, 澱粉粒としての回収は明条件で対消費糖23.9%, 対生成澱粉58.7%, 暗条件ではそれぞれ36.6%, 85.8%と高く、生成澱粉量に差はないが暗条件の方が澱粉粒を排出しやすいことを示す。

### 2. 細胞内澱粉粒の排出促進

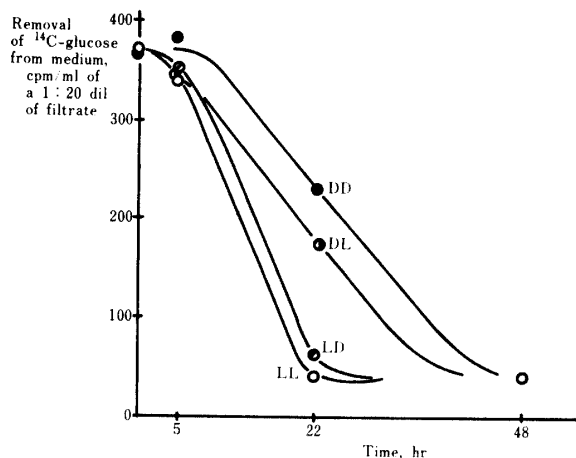


Fig. 1. Incorporation of <sup>14</sup>C-glucose into cell-substances.

Table 3. Production of extracellular starch by *Chlorella vulgaris* Al-1y-3(11).

cultural conditions	total starch mg/ml	extra-cellular starch mg/ml	extra-cellular starch / total starch, %
shaking for 4 days	4.34	1.58	36
shaking for 4 days-stationary for 3 days	5.40	3.25	60
shaking for 4 days-shaking for 3 days	5.15	2.89	56

Table 2. Recovery of the counts of <sup>14</sup>C-glucose in 50ml of 3-day-algal-cultures in light and in darkness

	reducing sugar mg	total counts cpm	specific radioactivity cpm/ $\mu$ mole glucose	dry weight mg
<b>in light culture</b>				
initial	838.5	266,500	57.2	
residual	147.1	35,510	43.5	
consumed	691.4	230,990	60.1	
cell-fraction	281.4	162,500		455.0
cell-recovery	40.7%	70.3%		
starch-granule	165.3	42,410	46.2	
starch-recovery	23.9%	18.4%		
<b>in dark culture</b>				
initial	925.0	247,200	48.1	
residual	192.6	33,110	30.9	
consumed	732.4	214,110	52.6	
cell-fraction	312.3	151,400		413.5
cell-recovery	42.6%	70.7%		
starch-granule	267.8	99,600	66.9	
starch-recovery	36.6%	46.5%		

\* Inoculum size: 1.58mg dr. w. in light, and 6.15mg dr. w. in darkness.  
Cell: a pellet, to which an algal culture was centrifuged down.

通常の培養では窒素源がかなり消費されてくると pH が上昇し、細胞内澱粉粒が細胞外に排出され易くなるものと思われた<sup>3)</sup>。とり込まれたぶどう糖から澱粉が生成し澱粉粒となるが、澱粉粒の回収をよくするため澱粉粒の排出の条件を種々推定して実験条件を設定し検討した。

まず、振盪培養後静置すると自己融解がおきて澱粉粒の排出が促進されると考えられたが、続けて振盪培養した場合と比較した結果、わずかな差が認められるが有意差という程ではなかった(表3)。次には振盪培養後、温度、pH、界面活性剤添加によって澱粉粒の排出が促進されるかどうか検討した。このうち、pH 3.0 で 30°C 2 日間静置した場合に有意差が認められた(表4)。この研究の初期に澱粉粒排出と培養経過の関係の検討で pH の上昇が排出を促進すると判断したが<sup>3)</sup>、高い pH は逆に排出を抑制する効果があるということが明らかになった。以上の結果から自己融解による澱粉粒の排出は全澱粉の 3 分の 1 を大きく上まわることはなさそうであった。結局、よりよい回収のためには細胞の物理的破壊などに期待した方がよさそうであった。

細胞の物理的破壊方法としては音波破碎, 凍結・融解, 浸透圧ショックによる処理を試みた。しかし, これでも明らかに澱粉粒の回収がよいといえるのは音波破碎のみであった。ただ音波破碎も 10kHz で行う場合, 通常の細胞懸濁液ではほとんど破碎されず, 10倍以上に濃縮した, すなわち 50ml の培養を遠沈再懸濁して 5ml の懸濁液としてはじめて音波処理することが出来た。音波処理後澱粉粒画分を得るには水で20倍稀釈し, 3000rpm 10分間の遠沈を行った(表5)。音波破碎の処理時間は懸濁液の状態によっても異なるが, 10

倍濃縮の懸濁液について検討したものが表6である。この結果から処理時間 20~30 分ではほぼ 90% の回収率であった。

### 3. 澱粉粒の回収方法

音波破壊によって cell-free となった澱粉粒を破壊されなかった細胞および破碎残渣などから分けて純度の高い澱粉粒を得る必要がある。このため比重差を利用して分画するため培養を遠沈し, 種々の比重のしょ糖溶液に再懸濁後再び 3500rpm 10分間遠心した(表7)。乾燥重に対する細胞外澱粉粒の比が大きいものほど

Table 4. Facilitation of the discharge of starch-granules from algal cell.

cultural conditions after cultivation on a shaker for 4 days at 30°C.	dr. w. mg/ml	starch mg/ml medium		extra- cellular starch / total starch, %
		total	extracellular	
initial	7.36	5.75	3.01	52.4
stationary, 2 days, 30°C, pH 8.2	7.05	5.15	2.37	46.0
42°C, pH 8.2	6.05	4.72	2.85	60.4
50°C, pH 8.2	6.11	5.79	2.87	49.6
30°C, pH 3.0	6.90	4.76	3.76	79.0
30°C, pH12.0	6.75	4.80	1.93	40.2
stationary, 2 days, 30°C, pH 8.2 with CTAB at 100µg/ml.	6.66	5.24	2.94	56.1
with LAS at 100µg/ml.	6.20	4.60	2.58	56.1
with LBS at 100µg/ml.	7.04	4.99	2.32	46.5

Table 5. Recovery of starch-granules by disruption of the cell of *Chlorella vulgaris*.

treatment of cell-suspension in distilled water	dr. w. mg/ml	starch, mg/ml medium		extra- cellular starch / total starch, %
		total	extracellular	
sonic treatment in an oscillator at 10 kHz for 60 min.	5.23	4.89	5.16	105.5
thawing at 50°C, after frozen at -20°C for 24 hr.	6.97	5.31	2.69	50.7
resuspension in distilled water after suspended in 6% NaCl solution for 1hr.	5.95	4.68	1.11	23.7

Table 6. Sonic treatment

time of sonic treatment, min.	dr. w. mg/ml	starch, mg/ml		extra- cellular starch / total starch, %
		total	extracellular	
0	6.11	4.93	1.55	31
10			3.81	77
20			4.35	88
30			4.57	93
60			3.92	80

澱粉粒がよく濃縮されていることを示している。d=1.30 では乾燥重のほとんどが澱粉で、その約90%が細胞外澱粉粒である点注目出来る。しかし、澱粉粒の精製時には意義ある方法ということが出来るかも知れないが、大量の培養を取扱うには不向きと思える。

澱粉粒を濃縮する方法として先にトルオールを用いる方法を検討した<sup>1)</sup>。今回トルオールを含め種々の溶剤を用いて澱粉粒とそれ以外のものを分別する方法を検討した。まず3.5日振盪培養したものを3日間静置後遠沈で細胞を集め、洗浄した後、ペレットの20倍量の水に再懸濁した。懸濁液を分液漏斗に入れ、これに1/5量の溶剤を加えて抽出の要領で3回分画を行った。溶剤層はそのつど1~2回水で洗う。次に水層を集め遠沈後3部の水に再懸濁、7部の99%アルコールを加え、3500rpm 10分間遠沈し、ペレットを99%アルコールで洗った後硫酸デシケーターで乾燥して澱粉粒分画とした。溶剤中、例えばトルオールは除蛋白を目的とするものであるのでトルオールだけでの澱粉粒の排出促進・濃縮は無理であった(表8)。しかし、トルオールで目立ったことだが細胞が、トルオール層の水とトルオールの界面に吸着されているのが確かめられた

ので(写真1)、溶剤処理は蛋白だけでなく細胞と澱粉粒を分別するのにも有効であると思われる。

以上の結果から *Chlorella vulgaris* Al-1y-3(11) の培養から澱粉粒を調製する方法としては、培養を10倍に濃縮した懸濁液とし、10kHz 20分間音波処理の後、破碎されなかった細胞および細胞残渣をトルオール処理で除き澱粉粒分画を回収し、アルコールで洗浄して澱粉粒を調製するというのが回収率の点でよいと思われる。先のぶどう糖のとり込み実験(表2)で<sup>14</sup>C-ぶ



Photo 1. Unbroken cells on the interface between water and toluol

Table 7. Fractionation of cell-substances by means of centrifugation in increasing concentrations of sucrose solution

density of sucrose solution	dr. w. mg/ml	starch, mg/ml med.			extra-cellular starch / dr. w., %
		total	intracellular*	extracellular**	
1.00	8.63	6.97	1.08	5.89	68.3
1.06	8.58	7.09	1.08	6.01	70.0
1.11	8.77	6.70	1.12	5.58	63.6
1.20	8.12	7.13	1.42	5.71	70.3
1.25	6.50	5.97	1.42	4.55	70.0
1.30	4.01	3.98	0.44	3.54	88.3
1.34	2.64	1.95	0.75	1.20	45.5

\*=total starch, analyzed after a pellet was washed twice with dimethylsulfoxide to remove extracellular starch.  
\*\*=total starch - intracellular starch.

Table 8. Purification of starch-fractions with several solvents.

solvents	dr. w. mg/ml	starch, mg/ml medium			extra-cellular starch / dr. w., %
		total	extracellular	decrease in dr. w., %	
control	6.11	4.93	1.45	—	23.7
toluol	4.89	4.33	1.60	20.0	32.7
xylol	5.04	4.34	1.51	17.5	30.0
butanol	4.21	3.77	1.29	31.1	30.6
ethylacetate	4.78	4.18	1.36	21.8	28.5

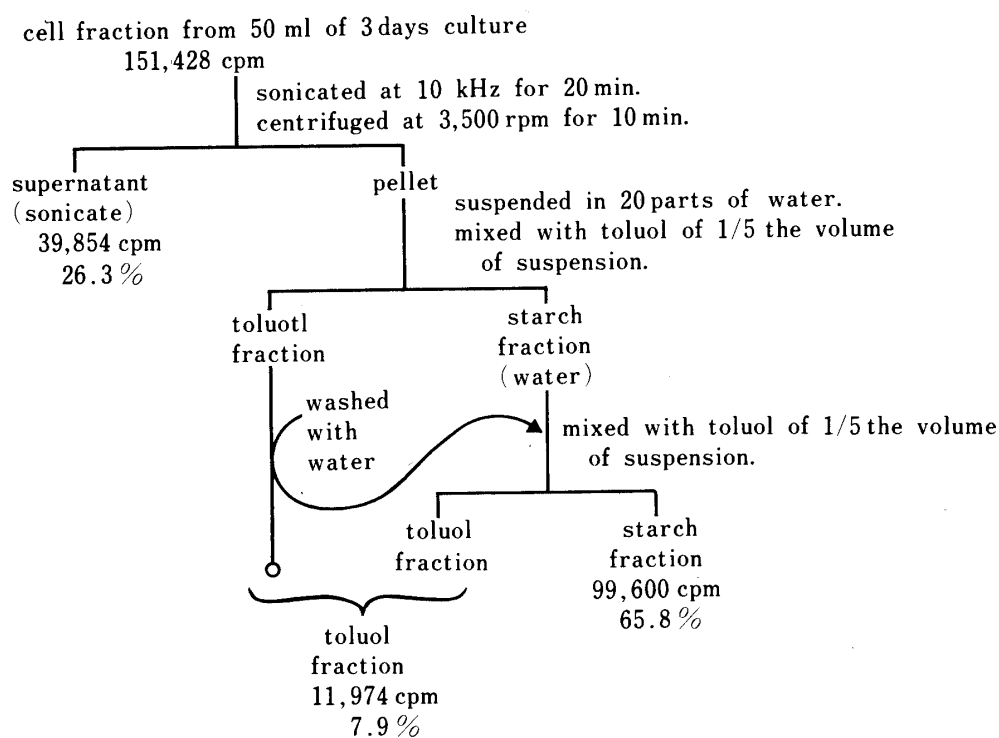
どう糖で暗条件下培養して得た細胞をこの方法で分画し、各画分への  $^{14}\text{C}$  カウントの分布をみたものが図2である。これによると全カウントの65.8%が澱粉粒画分として回収されたことになる。ここで結論として *Chlorella vulgaris* Al-1y-3(11) の略暗条件下  $30^\circ\text{C}$  4日間振盪培養し3日間静置した培養について澱粉粒を調製した結果を表9に示した。澱粉粒としての回収は79.7%で純度は91.4%であったが、さらにスケール

アップした場合澱粉粒の回収・純度にどのような影響が出るか検討を要する問題である。比較のために他の藻株についても同様の処理をして澱粉粒を回収したが、これらの回収率が低く20%以下であった。この点 *Chlorella vulgaris* Al-1y-3(11) が澱粉粒回収という点で非常に取扱い易い藻株であるということがわかったが、これはこの藻株の細胞壁に秘密があるものと思われる(写真2)。

Table 9. Recovery of starch-granules.

strains	dr. w. mg/ml	total mg/ml	starch-granules (recovery, %) mg/ml	purity %
<i>Chlorella vulgaris</i> Al-1y-3 (11)	7.68	5.85	4.66(79.7)	9.41
<i>Chlamydomonas</i> sp. Al-5-2	10.10		0.78	84
<i>Chlamydomonas</i> sp. C-21-1	11.60	5.07	0.65(12.8)	88
C-21-2	11.00	5.53	0.90(16.3)	90
<i>Scenedesmus basilensis</i> C-66-1	9.59		0.18	81
C-66-2	9.74	2.97	0.49(16.5)	87

\* sonic treatment: 10 kHz, 20min.  
purification by toluol.

Fig. 2. Distribution of  $^{14}\text{C}$  in the cell-substances of *Chlorella vulgaris*.

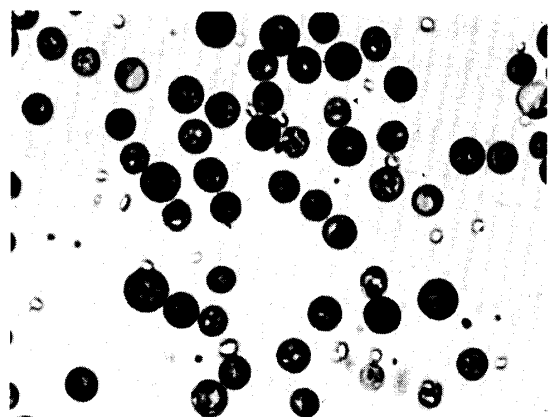


Photo 2 a. *Chlorella vulgaris*, cells and extracellular starch-granules

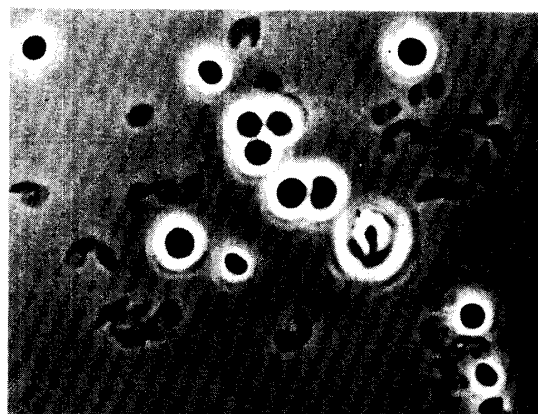


Photo 2 b. *Chlorella vulgaris*, cell-wall debris, caused by cell division, or by starch-granules-discharge

## 要 約

微細藻 *Chlorella vulgaris* Al-1y-3(11) はぶどう糖培地で生育させると細胞外に多量の澱粉粒を排出する。ところが通常の培養条件では細胞外に排出する澱粉粒は生成したものの約半分に過ぎない。今回は、微細藻にぶどう糖から澱粉をつくらせ、澱粉粒を回収する方法について検討した。

まず、細胞へのぶどう糖のとり込み速度は前培養の明・暗条件に影響を受けることが確かめられた。とり込まれたぶどう糖の細胞内分布をみると明・暗条件とも細胞画分の還元糖は対消費糖約40%であったが、澱粉粒としての回収は明条件で対消費糖23.9%、対生成澱粉58.7%、暗条件でそれぞれ36.6%、85.8%と高くなっている。

澱粉粒の回収で自然の排出は普通は対生成澱粉50%を大きくは越えないので、排出促進の方法を検討した。また、排出された澱粉粒を回収するトルオール法の検討も併せて行った。この結果、有効な微細藻の澱

粉粒の回収方法としては、培養を10倍以上に濃縮した懸濁液とし、10 kHz 20~30分の音波破碎し、水で10倍に稀釈した sonicate にその1/5量のトルオールを加えて細胞残渣を除き、くり返した後、水層の澱粉粒を遠沈して集め、アルコールで洗浄・乾燥させて澱粉粒として対生成澱粉の80%を回収することが出来た。とくに、トルオール法は細胞残渣の除去だけでなく、トルオール・水の界面に破碎されなかった細胞を吸着し、これらの除去を容易にすることで有効であった。また、同処理を *Chlamydomonas*, *Scenedesmus* にも適用し、結果を比較した。

## 文 献

- 1) Kobayashi, T., I. Tanabe, and A. Obayashi: On the properties of the starch granules from unicellular green algae, *Agr. Biol. Chem.*, **38**(5), 941-946 (1974)
- 2) 小林達吉・田淵武士: 第三磷酸曹達を用いる半微量糖定量法, *日農化*, **28**(3), 171-174 (1954)
- 3) Tanabe, I., T. Kobayashi, D. F. Dent, S. Meiki, and A. Obayashi: Isolation of heterotrophic microalgae, *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.*, **8**(2), 9-25 (1972)

## Summary

When cultivated on glucose, a microalgal strain, *Chlorella vulgaris* Al-1y-3(11) was found to discharge lots of starch-granules into the culture medium. However, only half a weight of the produced starch-granules was discharged into the culture medium. A more efficient method for obtaining a rich yield of algal starch-granules was investigated.

Incorporation of glucose into an algal cell was found to be influenced by illumination executed on preculture.

The distribution of glucose incorporated in the algal cell was investigated: the amount of the

reducing sugar in the cell fraction reached 40 percent of the consumed sugar, in light as well as in darkness. A yield of starch-granules from the culture in light was 23.9 percent of the consumed sugar and 58.7 percent of the produced starch, and it was 36.6 percent and 85.8 percent in darkness, respectively.

Spontaneous discharging of the starch-granules at more than 50 percent of the produced starch is quite rare. Promotion of the discharge of starch-granules and the recovery of starch-granules were investigated: a ten-strength-concentration of cell suspension from the algal culture was prepared and sonicated at 10 kHz for 20 to 30 min. One fifth toluol was added to the ten-strength-diluted sonicate and the cellular residues of the water-layer like a liquid-against-liquid-extraction were removed, repeatedly. Starch-granules in the water-layer were collected on a centrifuge, washed with alcohol and dried in a desiccator. Starch-granules, amounting to 80 percent of the produced starch, were recovered.

The toluol-treatment was effective not only for the removal of cellular residues of starch-fraction, but also for that of the unbroken cells by absorbing them on the interface between water and toluol.

Other algal strains, *Chlamydomonas* sp. and *Scenedesmus basilensis*, were employed for the starch-granule-preparation by the above method, and their results were compared.