

淡水産微細藻群集の増殖と脂質生産に及ぼす温度の影響

野坂 裕一¹・角谷 秀平²・石川 由紀¹・太田 尚志³・佐々木 洋³

Effect of Temperature on Growth and Lipid Productivity of Naturally-Occurring Freshwater Microalgae

Yuichi NOSAKA¹, Syuhei KAKUYA², Yuki ISHIKAWA¹, Takashi OTA³ and Hiroshi SASAKI³

¹Research Center for Creative Partnerships, Ishinomaki Senshu University, 1 Shinmito, Minamisakai, Ishinomaki, 986-8580

²Department of Biological Engineering, Faculty of Science and Engineering, Ishinomaki Senshu University, 1 Shinmito, Minamisakai, Ishinomaki 986-8580

³Department of Biological Sciences, Faculty of Science and Engineering, Ishinomaki Senshu University, 1 Shinmito, Minamisakai, Ishinomaki 986-8580

Abstract

We studied the effect of water-temperature on growth characteristics and lipid productivity of naturally occurring freshwater microalgae. Specific growth rates (μ) of five mixed microalgal communities varied with the temperature from 0.17 to 1.94 d^{-1} during the exponential growth phase in batch cultures. Higher specific growth rate ($>1.50 \text{d}^{-1}$) was found on incubation temperatures between 25°C and 35°C, and dominated by green algae, *Desmodesmus* spp. and unknown species with spherical cells. High lipid productivity communities were also dominated by green algae, *Desmodesmus* spp. (8.7–10.2 $\text{pg cell}^{-1} \text{d}^{-1}$) and *Scenedesmus* spp. (4.0–6.2 $\text{pg cell}^{-1} \text{d}^{-1}$). Some of these highly productive communities grew under high temperature conditions of 35–40°C. It was suggested that *Desmodesmus* spp. and *Scenedesmus* spp. grown in this study were thermotolerant green algae and can be useful for mass production of bioenergy sources under high temperature periods.

1. 背景

微細藻類は直接目で見ることの出来ない微小な単細胞生物である。これらは陸上の高等植物のわずか1%以下の生物量にも関わらず⁽¹⁾、全球における基礎生産量は陸上植物のそれとほぼ同程度である⁽²⁾。この様な微細藻類の高い生産性に着目し、有用成分を蓄積する微細藻の大量培養が様々な企業・研究機関において行われている。例えば、不等毛植物門、真正眼点藻綱に属する *Nannochloropsis* は、脂質含有率が他の藻類より相対的に高い上、健康維持に有効なエイコサペンタエンサン (EPA) を多く含むため、大量培養が試みられている^(3, 4)。また、バイオ燃料の原料には、陸上植物を用いるよりも微細藻類を用いた方がより単位面積当たりの収量が高いことから⁽⁵⁾、微細藻類を利用する研究が世界中で続けられてい

る (e.g., 6, 7, 8)。

この様なバイオ燃料の原料として有望な微細藻類は、野外の開放池などで大量培養されることが多いため、増殖速度が高く、脂質生産速度が高い特性に加えて、増殖可能な温度範囲が広いことが重要であると考えられる。特に夏季の高温期においては多くの有望種の増殖速度は低下する⁽⁹⁾。一方、緑藻綱に属する淡水産の *Desmodesmus* 属 (イカダモ) には、高温環境下においても増殖可能な種が存在することが知られているが、この様な微細藻の増殖速度や脂質生産能に関する知見は未だ限られている。Nagappan et al. (2016)⁽¹⁰⁾ が行った培養実験では、*Desmodesmus* sp. MCC34 の比増殖速度 (μ) はやや低いが (0.26 d^{-1})、脂質含有率は比較的高い (20%-DW) ことが示されている。また、Ho et al. (2014)⁽¹¹⁾ に

¹石巻専修大学共創研究センター

²石巻専修大学理工学部生物生産工学科 平成27年度卒業生

³石巻専修大学理工学部生物科学科

よると、*Desmodesmus* sp. F2 の脂質生産力 ($263 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) は、*Nannochloropsis oculata* ($170 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$)⁽¹²⁾、*Chlorella vulgaris* ESP-31 ($144 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$)⁽¹³⁾、*Scenedesmus obliquus* ($140 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$)⁽¹⁴⁾、*Chlamydomonas* sp. TAI-2 ($34 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$)⁽¹⁵⁾ よりも高いことが示されている。

次世代エネルギーの一つであるバイオ燃料の生成を目的とした淡水産微細藻類の培養試験は、最近盛んに行われている (e.g., 16, 17, 18, 10)。その中でも、*Desmodesmus* 属や *Scenedesmus* 属に属する微細藻類が最近特に注目されているが、これらの微細藻は全球的に分布し、種によっても脂質生産能が大きく異なるため、これまでの報告例よりも高い高温耐性、増殖速度、脂質生産速度を有する種が存在する可能性は少なくない。

本研究では、微細藻類由来のバイオ燃料生産に有望な微細藻を選択することを目的として、天然環境から採取した淡水性微細藻類を培養し、温度耐性、増殖特性、脂質生産速度などを測定した。

2. 材料および方法

2.1. 微細藻類の採取と培養

天然微細藻類の採取は、宮城県石巻市大瓜上大塚の水田 (2015 年 5 月)、石巻専修大学敷地内の溜池 (6 月)、茨城県東海村の私邸の小型水槽 (7 月) にて行われた。試料水の採取後、動物プランクトン等からの捕食の影響を避けるために、顕微鏡下において優占種と思われる微細藻を数種取り出し、オートクレーブで滅菌した f 培地⁽¹⁹⁾ に植え継いだ。なお、f 培地は石巻専修大学敷地内の溜池水を GF/F フィルター (Whatman、粒子保持能 $0.7 \mu\text{m}$) で濾過した濾水をベースに作成した。数種の微細藻が混合した微細藻群集は、前培養試験開始まで 25°C のインキュベーター内に保存された。

前培養試験は、5、15、25、35、 40°C の 5 つの温度段階に設定したインキュベーター (日本医科器械製作所、TG-180-5L) を使用して行った。微細藻群集は、f 培地を入れた容量 40 mL の培養フラスコ (Thermo、169900) 5 本に植え継ぎ、それぞれ、5 段階の温度に設定したインキュベーター内で光強度 (光合成有効放射、PAR) 約 $100 \mu\text{mol}$

$\text{photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ の連続照射下で対数増殖期を維持しながら培養された。

本培養実験は、前培養実験において正の細胞増殖能を示した実験区のみで実施し、1 つの実験区当たり容量 250 mL の培養フラスコ (Falcon、353136) を 3 本使用して行なった。それぞれの温度で前培養した微細藻群集は、実験開始時の細胞密度が約 $1 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ となるように f 培地を入れた培養フラスコへと植え継ぎ、培養実験を開始させた。なお、この f 培地の水温は予め各実験区の温度に調整した。培養期間中、細胞計数試料は、毎日、または 2 日に 1 回採取した。培養実験は、基本的に定常期の開始から 3-6 日目で終了とし、培養終了時において、乾燥重量と脂質重量の測定を行った。

2.2. 細胞計数

細胞計数は、顕微鏡 (Nikon、ECLIPSE 50i) 下で行われた。培養試料を良く攪拌した後、 $250 \mu\text{L}$ をマイクロチューブに取り分け、ルゴール溶液を $50 \mu\text{L}$ 添加し、試料を固定した (最終濃度 1%)。固定試料 $10 \mu\text{L}$ を血球計算板に移し、倍率 200-400 倍にて計数を行った。比増殖速度 (μ 、 d^{-1}) は式 (1) から求めた⁽²⁰⁾。

$$\mu = \frac{(\ln N_t - \ln N_0)}{(t_t - t_0)} \quad (1)$$

ここで、 N_0 と N_t は、それぞれ、培養区間開始時の細胞密度と t 時間経過後の細胞密度 (cells mL^{-1})、 t_0 と t_t は、それぞれ、培養開始時と t 時間経過後の時間 (d) である。対数増殖期間の比増殖速度 (μ_{\log}) は (1) 式で得られた各試料採取区間の比増殖速度を平均して求めた。

2.3. 対数増殖期末期における微細藻群集の優占種の同定

対数増殖期に優占した微細藻を把握するため、対数増殖期の末期において、検鏡による優占種 (属) の同定を行った。培養試料は中性緩衝ホルマリンで固定された (最終濃度 1%、v:v)。固定後の試料 1 mL を枠付きスライドガラス (Matsunami、S109502) に移し、デジタルカメラ (Nikon、DS-Filc) を装備した顕微鏡 (Nikon、ECLIPSE 80i) を使用して、細胞の撮影を行った。

撮影した写真は、画像解析ソフトウェア (ImageJ64, ver.1.48) にて細胞の直径や幅等を測定し、同定を行う際の情報とした。本研究において、同定は水野 (1990)⁽²¹⁾ に従って行った。なお、2000 年以降、*Scenedesmus* 属の一部は *Desmodesmus* 属として扱われているため⁽²²⁾、群体 (もしくは単細胞) の両端細胞から針状突起が伸びている細胞を *Desmodesmus* 属、突起が無い群体 (細胞) を *Scenedesmus* 属とした。

2.4. 乾燥重量と脂質重量測定

液体試料 100 mL を遠心分離し (13,000 rpm, 15 min)、藻類を濃縮した。濃縮後の藻類試料を予め秤量されたマイクロチューブに移し、60°C で 24 時間以上乾燥させた。乾燥試料 (マイクロチューブも含む) の重量を電子天秤 (OHAUS, PA214CJP) にて測定し、マイクロチューブの重量を減ずることで微細藻類の乾燥重量を求めた。

脂質重量測定は Bligh and Dyer (1959)⁽²³⁾ に従って行った。乾燥試料の全量をガラス製のフタ付き試験管に移し、クロロホルム:メタノール:純水 (1:2:0.8, v:v:v) の混合溶液を試験管内に 4 mL 加え、脂質の抽出を行った。抽出後、GF/P フィルター (Kiriya glass、粒子保持能 0.8 μm) を用いて固液分離を行った。濾液にクロロホルムと純水を添加し、クロロホルム:メタノール:純水の比が 1:1:0.9 (v:v:v) とした後、良く攪拌した。これを遠心分離 (6,000 rpm, 3 min) にかけて、クロロホルム層 (下層) を予め秤量されたガラスバイアルに回収した。陰圧乾燥機 (60°C、大気圧 -0.09 MPa、Fine, FVM-303D) にてガラスバイアル中のクロロホルムを完全に揮発除去した後、脂質 (ガラスバイアルも含む) の重量を電子天秤にて測定した。脂質重量は、予め秤量されたガラスバイアルの重量を減ずることにより求めた。本研究において、微細藻群集の脂質含有率 (LC_{DW} , %) は、式 (2) と定義した。

$$LC_{DW} = \frac{L}{DW} \times 100 \quad (2)$$

ここで、 L は脂質重量 (mg)、 DW は乾燥重量 (mg) である。

本研究において、微細藻類の乾燥物収量は 1 L 当たりの乾燥重量とし、脂質収量は乾燥物収量に

式 (2) によって見積もられた LC_{DW} (%) を乗ずることにより求めた。また、培養期間内の平均脂質生産力 ($\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) は、以下の式 (3) で求めた。

$$\text{Oil productivity} = \frac{(\Delta DW)}{(\Delta t)} \times LC_{DW} \quad (3)$$

ここで、 Δt は培養開始時から終了時までの培養期間 (d)、 ΔDW は培養開始時から終了時までの乾燥物収量の変化量 (mg L^{-1}) である。本研究において、実験開始時における乾燥物収量 (DW_0 , mg L^{-1}) は、実験終了時の乾燥物収量と細胞密度の関係から式 (4) と仮定した。

$$DW_0 = \frac{(DW_t)}{(N_t)} \times N_0 \quad (4)$$

ここで、 DW_t と N_t は、それぞれ、実験終了時の乾燥物収量 (mg L^{-1}) と細胞密度 (cells L^{-1})、 N_0 は培養開始時の細胞密度 (cells L^{-1}) である。

2.5. 培養期間内における 1 細胞当たりの平均脂質生産速度

培養期間内における 1 細胞当たりの平均脂質生産速度 ($\text{pg cell}^{-1} \text{d}^{-1}$) は Fukao et al. (2012)⁽²⁴⁾ の式を基に、式 (5) より見積もられた。

$$\text{Cellular oil productivity} = \mu_{t0} \times \frac{(\Delta DW)}{(\Delta N)} \times LC_{DW} \quad (5)$$

ここで、 μ_{t0} は培養終了時と開始時の細胞密度を用いて式 (1) より求めた培養期間内の平均比増殖速度、 ΔN は培養開始時と終了時における細胞密度の差 (cells L^{-1}) である。

3. 結果と考察

本研究で培養試験に使用した微細藻群集 1-5 はそれぞれ増殖可能な温度が異なった (表 1)。群集 1 と 2 は 5-35°C で増殖したが、群集 3 は 5°C での増殖は見られず、15-35°C で増殖した。群集 4 は 25°C と 35°C でのみ増殖した。群集 5 は 15-40°C の温度帯で増殖し、高温に対する耐性が本研究中で最も高かった。

3.1. 対数増殖期における比増殖速度

全ての微細藻群集の増殖曲線と対数増殖期間の比増殖速度 (μ_{\log}) を、それぞれ、図 1 と図 2 に示

淡水産微細藻群集の増殖と脂質生産に及ぼす温度の影響

表 1. 微細藻群集 (1-5) の採集場所と時期、本培養実験の実施温度。各温度帯での本培養実験実施の有無は、それぞれ “○” と “×” で示し、これらは前培養実験における細胞増殖能の正負に基づいて決定した。

Community number of microalgae	Derivation	Sampling term	Cultivation temperature (°C)				
			5	15	25	35	40
1	Water in a wet rice paddy, Ouri, Ishinomaki	May, 2015	○	○	○	○	×
2			○	○	○	○	×
3	Reservoir water in the University Campus, Ishinomaki	June, 2015	×	○	○	○	×
4			×	×	○	○	×
5	Stored water in a small tank, Private house, Tokai, Ibaraki	July, 2015	×	○	○	○	○

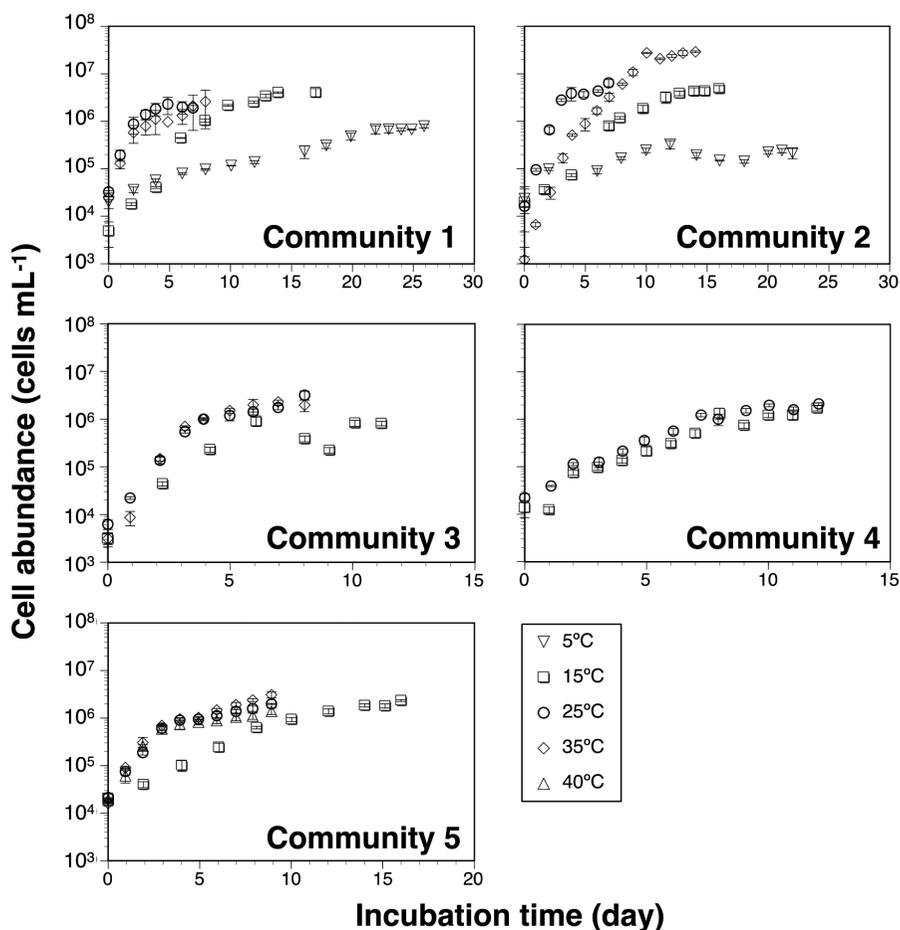


図 1. 全ての培養実験区における増殖曲線。

した。全ての培養実験区において、微細藻類の細胞が対数的に増殖する対数増殖期と、その後殆ど正味の増殖が見られない定常期があった。実験終

了時まで細胞数の顕著な減少が見られなかったことから、本培養実験は定常期を維持したまま終了したと考えられた。

群集1の5°Cにおける対数増殖期(0-22日目まで)の比増殖速度は、全ての実験区を通して最も低く(平均±標準偏差 = $0.17 \pm 0.01 \text{ d}^{-1}$)、その結果として、培養期間が最も長くなった。群集1の比増殖速度は、25°C ($1.61 \pm 0.17 \text{ d}^{-1}$) に向かって高くなり、35°C ($1.54 \pm 0.16 \text{ d}^{-1}$) においても25°Cと同程度の比増殖速度を維持した。群集1と同様に、群集2の5°Cにおける比増殖速度は、5°Cから25°Cにかけて $0.21 \pm 0.07 \text{ d}^{-1}$ から $1.71 \pm 0.11 \text{ d}^{-1}$ に大きく増加したが、35°Cでは $1.02 \pm 0.02 \text{ d}^{-1}$ に低下した。5°Cの試験区では、対数増殖期(0-12日目まで)の終了後、数日間に渡り細胞密度の減少が見られ、18日目から20日にかけて若干増加した。20-22日目までの細胞数の変化が殆ど見られなかったことから、22日目を実験終了日とした。また、35°Cの対数増殖期は、0-4日と4-10日目までの2段に分けることが出来たが、本研究ではこれらをまとめて、0-10日目までを対数増殖期として扱った。群集3の比増殖速度は15°Cの $0.92 \pm 0.09 \text{ d}^{-1}$ から35°Cの $1.94 \pm 0.11 \text{ d}^{-1}$ にかけて、培養温度と共に増加した。この35°Cで得られた比増殖速度は、本研究中で最も高い値であった。15°Cでは、群集2の5°Cと同様に、対数増殖期終了後(6日目以降)、細胞密度の変動が見られた。群集4の比増殖速度は25°Cと35°Cで大きな違いは無く、それぞれ、 $0.64 \pm 0.08 \text{ d}^{-1}$ と $0.57 \pm 0.04 \text{ d}^{-1}$ であった。群集5の比増殖速度は15°Cにおいて $0.42 \pm 0.01 \text{ d}^{-1}$ であり、25°Cでは $1.10 \pm 0.04 \text{ d}^{-1}$ に上昇した。25-40°Cにおける比増殖速度に大きな違いはみられなかったが(平均 $1.21 \pm 0.08 \text{ d}^{-1}$)、本群集は唯一、40°Cの高温においても比較的高い比増殖速度を維持出来ることが明らかとなった。

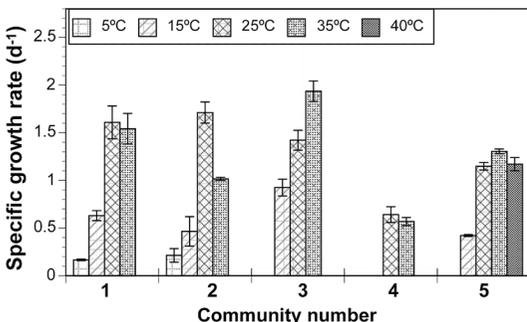


図2. 対数増殖期における比増殖速度 (μ_{\log})。

上記で示した通り、本研究で得られた全ての培養実験区における比増殖速度は、0.17-1.94 d^{-1} の範囲にあり、群集や温度によって異なっていた(図2)。群集1-3において、特に、比増殖速度の培養温度に対する依存性は顕著である(図2)。淡水産藻類の脂質生産を目的とした研究は、*Botryococcus braunii* などの脂質含有率が高い種で行われて来たが⁽⁵⁾、増殖速度がより高く、脂質含有率も比較的高い *Desmodesmus* 属や *Scenedesmus* 属を用いた研究も最近注目が集まっている(e.g. 16, 17, 18)。しかしながら、これらの微細藻類における比増殖速度の報告は未だ限られている。Nagappan et al. (2016)⁽¹⁰⁾ は、 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $67 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ の培養条件下において、*Desmodesmus* sp. MCC34 の比増殖速度が 0.26 d^{-1} であったことを報告した。また、Toledo-Carvantes et al. (2013)⁽¹⁷⁾ は、 30°C 、 $55-134 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ の培養条件下において、*S. obtuseusculus* の比増殖速度が $0.18-0.38 \text{ d}^{-1}$ であったことを報告した。これらの比増殖速度は、本研究で得られた微細藻群集の同温度帯のそれらと比較して低かったが、光の照射時間や強度、培地の種類、培養時の細胞密度などの培養条件が大きく異なるため、単純な比較は出来ない。そこで、比増殖速度と脂質蓄積能が比較的高く、バイオ燃料の有望な原料の1つとして多くの研究が行われている *Nannochloropsis* 属との比較を行った。Sandes et al. (2005)⁽²⁵⁾ は、光強度と培養温度を変化させた際の *N. oceanica* の比増殖速度の結果を報告した。光強度 $80 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ における $14.5-35.7^\circ\text{C}$ の時の比増殖速度は、培養温度の上昇とともに直線的に増加したが(0.6 d^{-1} から 1.6 d^{-1})、 25.6°C と 29°C にかけては大きな違いは無く、 29°C 以上では急激に低下した。また、太田他 (2014)⁽⁹⁾ は Sandes et al. (2005)⁽²⁵⁾ よりも低温帯 ($5-25^\circ\text{C}$) における *Nannochloropsis* sp. 1, sp. 2 の比増殖速度を報告した。太田他 (2014)⁽⁹⁾ が実験を行った光強度 $150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ における比増殖速度は、 5°C から 25°C にかけて 0.15 d^{-1} から 1.31 d^{-1} へと培養温度の上昇と共に直線的に増加した。これらの結果は、本研究で得られた微細藻群集の比増殖速度が *Nannochloropsis* 属の比増殖速度に匹

淡水産微細藻群集の増殖と脂質生産に及ぼす温度の影響

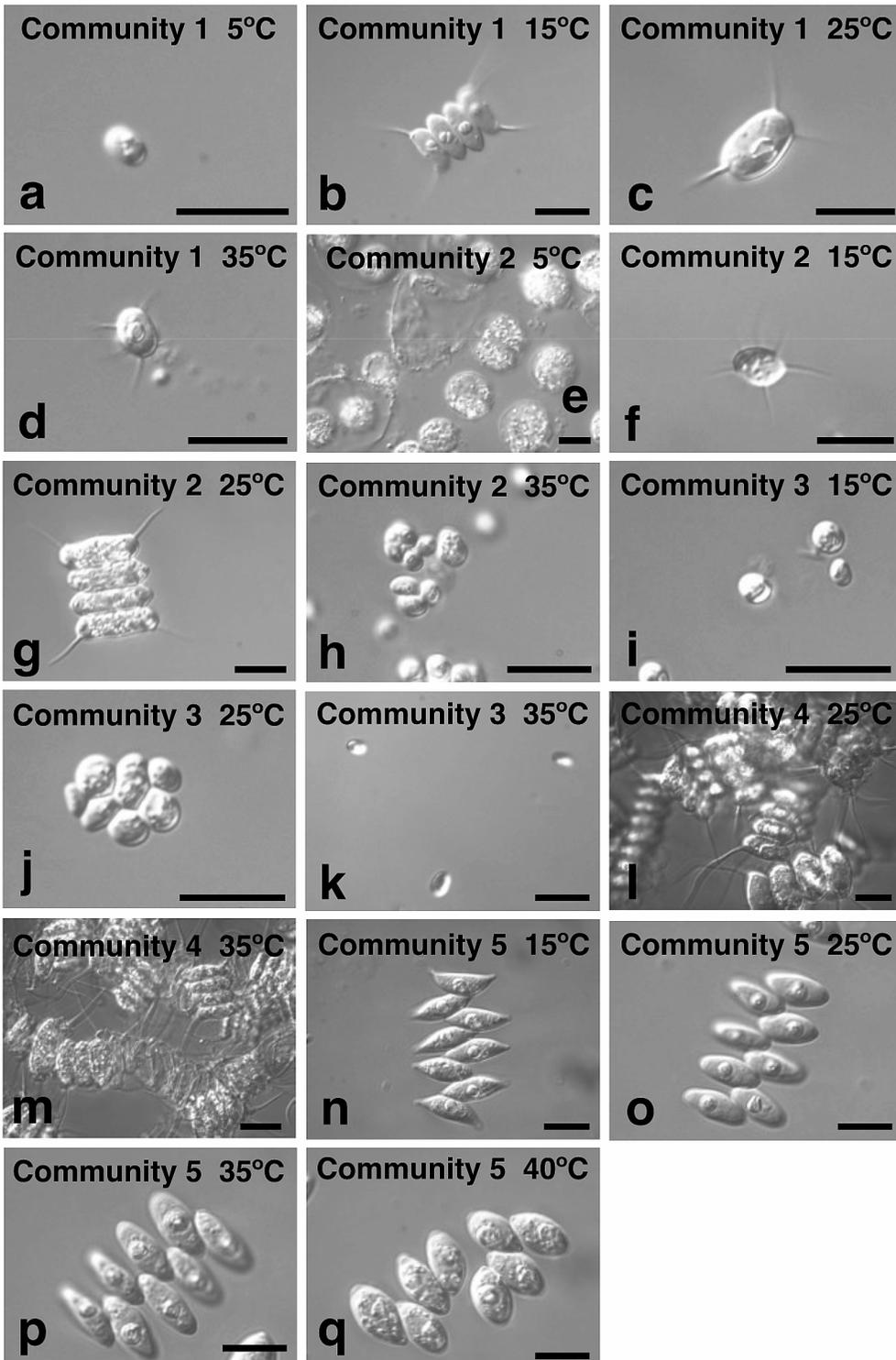


図3. 対数増殖期末期において優占した微細藻。写真右下のスケールは全て 10 μm 。

敵することを示している。

3.2. 対数増殖期末期における優占微細藻類

本研究の対数増殖期末期に優占した微細藻類の写真を図3に示した。群集1の対数増殖期末期に優占した微細藻は、15-35°Cにおいては *Desmodesmus* spp. であった (図3b-d)。一方、5°Cでは *Desmodesmus* 属とは異なる楕円形の微細藻が優占した (図3a)。この微細藻は、長径4.0 μm 、短径2.6 μm と比較的小型であり、緑藻類であると考えられたが、属名の特定には至らなかった。群集2では15°Cと25°Cにおいて *Desmodesmus* spp. が優占した。形状と細胞の大きさから15°Cでは *D. abundance* に、25°Cでは *D. quadricauda* に近似する種が優占していた (図3f, g)。5°Cでは、比較的大きい球状の細胞 (直径15.1 μm) が優占し、これらは、透明な膜の中に数個体が収容された、もしくは単体で膜の外に存在した (図3e)。形状と細胞の大きさから、*Asterococcus* 属または、*Sphaerocystis* 属に属する微細藻であると考えられた。一方、35°Cでは、群集1の5°Cに出現した微細藻と酷似した楕円形の微細藻が優占したが、それ以外に目立った形態的特徴は無いため、属名の特定には至らなかった (長径3.8 μm 、短径2.6 μm 、図3h)。群集3の全ての温度帯 (15-35°C) においても、群集1の5°Cと群集2の35°Cで出現した楕円形の細胞が優占した (図3i-k)。この楕円形の細胞は、15-35°Cの全ての温度帯で長径と短径が殆ど変わらなかった (長径3.0-3.8 μm 、短径2.8-3.1 μm)。群集4では、25°Cと35°C共に *Desmodesmus* spp. が優占した (図3l, m)。群集5では、全ての温度帯 (15-40°C) において *Scenedesmus* spp. が優占した。15°Cでは *S. dimorphus* と思われる細胞が優占し (図3n)、25-40°Cでは *S. bijuga* var. *alternans* と思われる細胞が優占した (図3o-q)。

先行研究⁽¹⁶⁾によれば、28°Cで培養された *Desmodesmus* spp. (F1, F2, F5, F18株)を45°Cの高温下で培養し、このうち2株の24時間生存率が8割以上であったことを報告した。さらにPan et al. (2011)⁽¹⁶⁾は、これらの2株の脂質含有率が乾燥重量に対して50%を超えることを報告した。*Desmodesmus* 属の中には高温耐性を有

し、かつ脂質蓄積能が高い種が含まれることを示している。

3.3. 微細藻類の乾燥物収量、脂質含有率、脂質収量と培養期間内の平均脂質生産速度

微細藻類の乾燥物収量は、全ての実験区で28-358 mg L^{-1} の範囲にあった (図4a左軸)。群集1の乾燥物収量は、15°Cを除く5、25、35°Cにおいて43-80 mg L^{-1} (平均 $60 \pm 19 \text{ mg L}^{-1}$)であったが、15°Cでは $213 \pm 8 \text{ mg L}^{-1}$ と高かった。群集2では5°Cと25°Cにおいて比較的低い乾燥物収量が見られたが (それぞれ、 $28 \pm 11 \text{ mg L}^{-1}$ と $72 \pm 6 \text{ mg L}^{-1}$)、15°Cと35°Cの収量は相対的に高かった (それぞれ、 $231 \pm 10 \text{ mg L}^{-1}$ と $285 \pm 13 \text{ mg L}^{-1}$)。群集3の乾燥物収量は、15-35°Cの全ての温度帯で平均的に低かった ($48 \pm 12 \text{ mg L}^{-1}$)。一方、群集4は乾燥物収量が高く、25°Cと35°Cで、それぞれ、 $358 \pm 62 \text{ mg L}^{-1}$ と $204 \pm 10 \text{ mg L}^{-1}$ であった。この25°Cの乾燥物収量は、全ての実験区を通して最も高かった。群集5の乾燥物収量は、15-40°Cの温度帯において137-208 mg L^{-1} の範囲にあり、どの温度帯でも比較的高く安定していた。

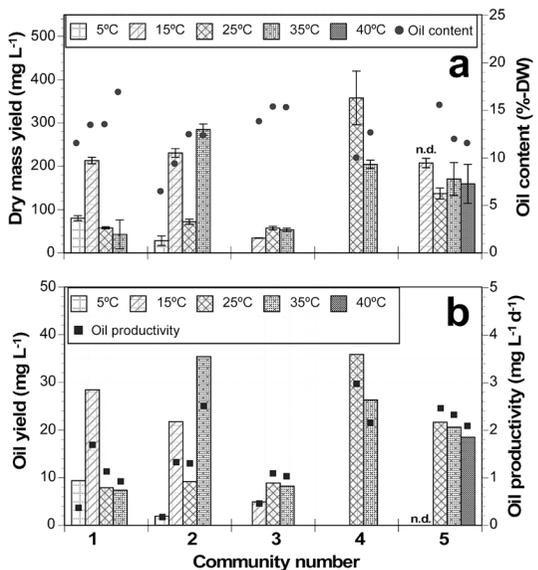


図4. 各微細藻群集、各培養温度における乾燥物収量 (a 左軸)、脂質含有率 (a 右軸)、脂質収量 (b 左軸)、脂質生産速度 (b 右軸)。

脂質含有率は全ての実験区を通して、6.6-16.9% -DW の範囲にあった (図 4a 右軸)。この値は *Desmodesmus* 属で報告されている 5-64% -DW^(11, 18, 26) や、*Nannochloropsis* 属で報告されている脂質含有率 12-68% -DW^(5, 26) の範囲内、もしくはそれに近似した。群集 1 の脂質含有率は 11.5-16.9% -DW であり、培養温度と共に増加する傾向が見られた。群集 2 においても脂質含有率は培養温度と共に増加する傾向が見られた (6.6-12.6% -DW)。群集 3 は 15-35°C において大きな変化は無く、13.9-15.3% -DW の範囲にあった。群集 4 の脂質含有率は 25°C と 35°C で、それぞれ、10.0% -DW と 12.8% -DW であった。群集 5 の 15°C は脂質試料を紛失してしまったため、値が無い (図 4 では “n.d.” と記載した)。25-40°C における脂質含有率は、11.5-15.7% -DW の範囲にあり、培養温度の上昇と共に減少した。培養温度の違いに伴う脂質含有率の変化は、*Spirulina maxima*、*Chlorella vulgaris*、*D. quadricauda* 等の淡水産微細藻類においても報告されている^(27, 28)。

脂質量は、乾燥物収量の値を強く反映し、2-36 mg L⁻¹ の値をとった (図 4b 左軸)。群集 1 は 15°C で 28 mg L⁻¹ と高かったが、その他の温度帯では 7-9 mg L⁻¹ と相対的に低かった。群集 2 では 15°C と 35°C において比較的高い脂質量があったが (それぞれ、22 mg L⁻¹ と 35 mg L⁻¹)、その他の温度帯は低かった (< 10 mg L⁻¹)。群集 3 の脂質量は全体的に低く、5-9 mg L⁻¹ であった。一方、群集 4 の脂質量は高く、25°C と 35°C で、それぞれ、36 mg L⁻¹ と 26 mg L⁻¹ であった。群集 5 の脂質量も平均的に高く、18-22 mg L⁻¹ の値をとった。

群集 1 の脂質生産速度 (図 4b 左軸) は、5°C において低かったが (0.4 mg L⁻¹ d⁻¹)、*Desmodesmus* spp. (図 3b-c) が優占した 15-35°C では平均的により高い値となった (1.2 ± 0.4 mg L⁻¹ d⁻¹)。群集 1 と同様に、群集 2 の脂質生産速度は 5°C で低い値となったが (0.1 mg L⁻¹ d⁻¹)、*Desmodesmus* spp. (図 3f, g) が優占した 15°C と 25°C では増加し (それぞれ、1.4 mg L⁻¹ d⁻¹ と 1.3 mg L⁻¹ d⁻¹)、楕円形の小型細胞 (図 3h) が優占した 35°C においては 2.5 mg L⁻¹ d⁻¹ とより高い

値となった。群集 3 の 15°C における脂質生産速度は 0.4 mg L⁻¹ d⁻¹ と低かったが、楕円形の小型細胞 (図 3i, j) が優占した 25°C と 35°C ではより高くなった (それぞれ、1.1 mg L⁻¹ d⁻¹ と 1.0 mg L⁻¹ d⁻¹)。本研究中で最も高い脂質生産速度は *Desmodesmus* spp. (図 3l) が優占した群集 4 の 25°C で得られ (3.0 mg L⁻¹ d⁻¹)、同様に、群集 4 の 35°C の脂質生産速度も比較的高く 2.2 mg L⁻¹ d⁻¹ であった。*Scenedesmus* spp. (図 3o-q) 群集 5 の脂質生産速度は、平均的に高く、25-40°C の温度帯で 2.3 ± 0.2 mg L⁻¹ d⁻¹ であった。

近年報告された淡水性・海水性微細藻類における脂質生産速度は、6 mg L⁻¹ d⁻¹ (*Scenedesmus* sp. ME02 株)⁽²⁹⁾ から 263 mg L⁻¹ d⁻¹ (*Desmodesmus* sp. F2)⁽¹¹⁾ と大きく異なり、高い脂質生産速度は *Nannochloropsis oculata* (170 mg L⁻¹ d⁻¹)⁽¹²⁾ や *Chlorella vulgaris* ESP-31 (144 mg L⁻¹ d⁻¹)⁽¹³⁾ でも報告されている。これらの高い脂質生産速度が報告されている微細藻と比較して、本研究で得られた微細藻類の脂質生産速度は、100 倍程度低かった。この原因として、脂質生産速度の算出方法の違いが挙げられる。本研究における脂質生産速度は培養開始から終了時までの平均値として評価したが、先行研究の多くは、生物量が最大に達した際の最大脂質生産速度としての評価であった。本研究における実験終了時の生物量 (乾燥物収量) は 28-358 mg L⁻¹ であったが、先行研究⁽¹¹⁾ では最大 3,300 mg L⁻¹ にも及び、約 10 倍生物量が高かった。これらの違いは、本研究と先行研究との間で脂質生産速度の比較が困難であることを示している。そこで、微細藻の脂質生産能をより詳細に評価するために、培養開始から終了時までの 1 細胞当たりの平均脂質生産速度を見積もった。

3.4. 1 細胞当たりの脂質生産速度の評価

1 細胞当たりの脂質生産速度は、式 (5) より見積もられた。培養開始時と終了時の細胞密度から見積もられた平均比増殖速度 (μ_{10}) は (3.1 項で示した対数増殖期の比増殖速度 (μ_{10g}) とは異なる)、全ての実験区を通して、培養温度の上昇と共に有意に増加した (Spearman's rank sum test, $\rho = 0.59$, $p < 0.05$, $n = 17$)。また、全ての群集にお

いて平均比増殖速度は、0.09–0.87 d⁻¹の範囲にあった(表2)。各培養温度帯における培養開始時から終了時までの乾燥物収量の変化量(ΔDW)は、群集1と2において大きく変動した。群集3の乾燥物収量の変化量は、平均的に低く、一方、群集4では高かった。群集5では、136–206 mg L⁻¹の比較的高く安定した値をとった(表2)。培養開始時から終了時における細胞密度の差(ΔN)は、楕円形の小型細胞(図3h)が優占した群集2の35°Cにおいて顕著に高かったが、群集1と2の5°Cの実験区、群集3の15°Cの実験区では、 $< 1 \times 10^9$ cells L⁻¹の比較的低い値となった(表2)。

表2. 各微細藻群集、各培養温度における培養開始時から終了時までの平均比増殖速度(μ_0)、乾燥物収量の変化量(ΔDW)、細胞密度の差(ΔN)、1細胞当たりの脂質生産速度。

Community number and temperature	μ_0 (d ⁻¹)	ΔDW (mg L ⁻¹)	ΔN ($\times 10^9$ cells L ⁻¹)	Cellular oil productivity (pg cell ⁻¹ d ⁻¹)
Community 1				
5°C	0.14 ± 0.01	78 ± 6	0.77 ± 0.07	1.7 ± 0.2
15°C	0.40 ± 0.02	213 ± 8	4.13 ± 0.79	2.8 ± 0.6
25°C	0.59 ± 0.02	57 ± 2	1.88 ± 0.24	2.4 ± 0.4
35°C	0.55 ± 0.15	42 ± 33	2.58 ± 1.90	1.5 ± 0.5
Community 2				
5°C	0.09 ± 0.04	107 ± 21	0.19 ± 0.07	3.5 ± 1.1
15°C	0.36 ± 0.06	230 ± 9	4.87 ± 0.73	1.6 ± 0.4
25°C	0.87 ± 0.06	72 ± 6	6.46 ± 1.15	1.2 ± 0.1
35°C	0.72 ± 0.01	285 ± 13	29.2 ± 1.4	0.9 ± 0.1
Community 3				
15°C	0.50 ± 0.02	34 ± 0.3	0.81 ± 0.09	3.0 ± 0.4
25°C	0.78 ± 0.02	57 ± 4	3.18 ± 0.67	2.2 ± 0.3
35°C	0.80 ± 0.06	53 ± 4	1.96 ± 0.54	3.4 ± 0.9
Community 4				
25°C	0.40 ± 0.02	355 ± 62	1.70 ± 0.22	8.7 ± 2.8
35°C	0.38 ± 0.02	438 ± 72	2.09 ± 0.15	10.2 ± 1.8
Community 5				
15°C	0.30 ± 0.01	206 ± 11	2.32 ± 0.11	n.d.
25°C	0.51 ± 0.02	136 ± 13	1.97 ± 0.04	5.5 ± 0.7
35°C	0.59 ± 0.01	170 ± 38	3.07 ± 0.46	4.0 ± 1.1
40°C	0.48 ± 0.02	157 ± 45	1.38 ± 0.22	6.2 ± 1.1

n.d. no data

これらの値から見積もられた1細胞当たりの脂質生産速度は、群集1–3において、0.9–3.5 pg cell⁻¹ d⁻¹と比較的低かったが、*Desmodesmus* spp. (図3l, m)が優占した群集4と*Scenedesmus* spp. (図3n–q)が優占した群集5では4.0–10.2 pg cell⁻¹ d⁻¹の範囲にあり、より高いことが明らかとなった(表2)。また、群集4では1細胞当たりの脂質生産速度が特に高いことが明らかとなった(8.7と10.2 pg cell⁻¹ d⁻¹)。従って、脂質生産を目的とした場合、群集4が最も優れていることが

判明した。しかしながら、群集4は増殖可能温度が25–35°Cと本研究中で最も狭い。よって、群集4は、室内培養、もしくは、比較的温暖で気温変化が少ない地域における野外培養に適していると考えられた。群集4の次に脂質生産速度が高かった群集5は、15–40°Cまでの広い温度範囲で増殖可能な群集であったことから、比較的温暖な地域における野外培養に適していると考えられた。群集1と2は5–35°Cにおいて増殖可能であるが、脂質生産力は相対的に低かった。これらの群集は、比較的低温な地域における野外培養に適していると考えられた。しかしながら、温度が上昇するに従って脂質生産力が低下するため、気温が25°C以上になった場合には、群集1や2の代わりに、群集4や5を培養することにより脂質生産性が向上すると考えられた。群集3は15–35°Cの温度帯で生育可能であったが、同じ温度帯で生育可能な群集5の方がより脂質生産性に優れているため、脂質生産を目的とした培養には適さないことが示唆された。

本研究では、異なる時期に採取した天然の微細藻類を用いて室内培養実験を行い、それらの藻類の増殖特性と脂質生産力の評価を行った。増殖能は、温度と共に上昇する傾向があり、特に培養可能な温度帯が広い群集(1–3)にこの傾向が顕著に現れた。脂質生産速度は、*Desmodesmus* spp. または、*Scenedesmus* spp. が優占した群集(4と5)で高いことが明らかとなり、これらの藻類は35°Cや40°Cにおいても高い脂質生産能を維持した。また、本研究で得られた微細藻類の培養可能温度は、5°Cから40°Cの広い範囲であったため、これらの微細藻類を使い分けることによって年間を通じた脂質生産が可能となるだろう。今後、特に脂質生産速度が高かった*Desmodesmus* spp. と*Scenedesmus* spp. を単離し、より詳細に脂質生産能を評価することが必要である。

4. 謝辞

本研究は東北復興次世代エネルギー開発プロジェクト(NET)による研究支援の元で実施された。

5. 文献

- (1) Falkowski, P. G. (2002): The ocean's invisible forest. *Sci. Am.*, 287, 54-61.
- (2) Field, C. B., M. J. Behrenfeld, J. T. Randerson, P. G. Falkowski (1998): Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science*, 171, 237-240.
- (3) 佐々木洋, 平岡正明, 太田尚志, 真壁竜介, 白井利典 (2014): 有用海産微細藻類 *Nannochloropsis* の大量培養法に関する基礎研究Ⅱ—野外培養の試み—. 石巻専修大学 研究紀要、25、11-17. Abstract in English.
- (4) 真壁竜介, 白井利典, 竹谷聡, 野坂裕一, 太田尚志, 佐々木洋 (2015): 有用海産微細藻類 *Nannochloropsis* の大量培養法に関する基礎研究Ⅲ: 突然変異誘導法による低温および高温耐性株作製の試み. 石巻専修大学 研究紀要、26、161-167. Abstract in English.
- (5) Chisti, Y. (2007): Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.*, 25, 294-306.
- (6) Lourinho, G., and P. Brito (2015): Advanced biodiesel production technologies: novel developments. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, 14, 287-316.
- (7) Park, J.-Y., M. S. Park, Y.-C. Lee, and J.-W. Yang (2015): Advances in direct transesterification of algal oils from wet biomass. *Bioresour. Technol.*, 184, 267 - 275.
- (8) Mubarak, M., A. Shaija, and T. V. Suchithra (2015): A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production. *Algal Res.*, 7, 117-123.
- (9) 太田尚志, 平岡正明, 佐々木洋, 原芳道 (2014): 有用海産微細藻類 *Nannochloropsis* の大量培養法に関する基礎研究Ⅰ—増殖特性の把握にむけて—. 石巻専修大学 研究紀要、25、1-9. Abstract in English.
- (10) Nagappan, S., and S. K. Verma (2016): Growth model for raceway pond cultivation of *Desmodesmus* sp. MCC34 isolated from a local water body. *Eng. Life Sci.*, 16, 45-52.
- (11) Ho, S.-H., J.-S. Chang, Y.-Y. Lai, and C.-N. N. Chen (2014): Achieving high lipid productivity of a thermotolerant microalga *Desmodesmus* sp. F2 by optimizing environmental factors and nutrient conditions. *Bioresour. Technol.*, 156, 108-116.
- (12) Su, C.H., L.-J. Chien, J. Gomes, Y.-S. Lin, Y.-K. Yu, J.-S. Liou, and R.-J. Syu (2011): Factors affecting lipid accumulation by *Nannochloropsis oculata* in a two-stage cultivation process. *J. Appl. Phycol.*, 23, 903-908.
- (13) Yeh, K. L., and J. S. Chang (2012): Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Bioresour. Technol.*, 105, 120-127.
- (14) Kaewkannetra, O., P. Enmak, and T. Y. Chiu (2012): The effect of CO₂ and salinity on the cultivation of *Scenedesmus obliquus* for biodiesel production. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 17, 591-597.
- (15) Wu, L. F., P. C. Chen, A. P. Huang, and C. M. Lee (2012): The feasibility of biodiesel production by microalgae using industrial wastewater. *Bioresour. Technol.*, 113, 14-18.
- (16) Pan, Y.-Y., S.-T. Wang, L.-T. Chuang, Y.-W. Chang, and C.-N. N. Chen (2011): Isolation of thermo-tolerant and high lipid content green microalgae: Oil accumulation is predominantly controlled by photosystem efficiency during stress treatments in *Desmodesmus*. *Bioresour. Technol.*, 102, 10510-10517.
- (17) Toledo-Cervantes, A., M. Morales, E. Novelo, and S. Revah (2013): Carbon dioxide fixation and lipid storage by *Scenedesmus obtusiusculus*. *Bioresour. Technol.*, 130, 652-658.
- (18) Rios, L. F., B. C. Klein, L. F. Luz Jr., R. Maciel Filho, and M. R. Maciel (2015): Nitrogen starvation for lipid accumulation in the microalga species *Desmodesmus* sp.. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 175, 469-476.
- (19) Guillard, R. R. L., and J. H. Ryther (1962): Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula conferacea* Cleve., *Can. J. Microbiol.*, 8, 229-239.
- (20) Guillard, R. R. L. (1973): Division rates. In Stein, J. R. (Ed.) *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge University Press, Cambridge, pp.289-312.
- (21) 水野壽彦 (1990): 日本淡水プランクトン図鑑 (改訂9刷). セブン印刷株式会社、日本、pp.353.
- (22) Hedgewald, E. (2000): New combinations in the genus *Desmodesmus* (Chlorophyceae, Scenedesmeaceae). *Arch. Hydrobiol. Suppl., Algal. Stud.*, 131,

1-18.

(23) Bligh, E. G., and W. J. Dyer (1959): A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911-917.

(24) Fukao, T., K. Kimoto, and Y. Kotani (2012): Effect of temperature on cell growth and production of transparent exopolymer particles by the diatom *Coscinodiscus granii* isolated from marine mucilage. *A. Appl. Phycol.*, 24, 181-186.

(25) Sandes, J. M., T. Källqvist, D. Wenner, and H. R. Gislerød (2005): Combined influence of light and temperature on growth rates of *Nannochloropsis oceanica*: linking cellular responses to large-scale biomass production. *J. Appl. Phycol.*, 17, 515-525.

(26) Liu, J., Z. Sun, and H. Gerken (Eds.) (2016): *Recent Advances in Microalgal Biotechnology, Microalgae as the Feedstock for Biodiesel Production*. OMICS

Group eBooks, USA, 18pp.

(27) Paoletti, C., M. Vicenzini, and F. Bocci (1980): Composizione biochimica generale delle biomasse di *Spirulina platensis* e *Spirulina maxima*. In Materassi R (Ed), *Prospective della Ricerche*, Florence: Accademia dei Georgofili, Florence, Italy, pp.111-125.

(28) Bohnenberger, J., and L. O. Crossetti (2014): Influence of temperature and nutrient content on lipid production in freshwater microalgae cultures. *An. Acad. Bras. Cienc.*, 86, 1239-1248.

(29) Onay, M., C. Sonmez, H. A. Oktem, and M. Yucel (2016): Evaluation of various extraction techniques for efficient lipid recovery from thermo-resistant microalgae, *Hindakia*, *Scenedesmus* and *Micractinium* species. *American Journal of Analytical Chemistry*, 7, 141-150.

