

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

真壁 竜介^{*1}、臼井 利典^{*1}、竹谷 聡^{*2}、野坂 裕一^{*1}、太田 尚志^{*3}、佐々木 洋^{*3}

Study on the mass culture of useful marine microalgae *Nannochloropsis* sp. III: Development of highly tolerant strains grown under low and high temperature conditions using mutagenesis technique

Ryosuke MAKABE^{*1}, Toshinori USUI^{*1}, So TAKEYA^{*2}, Yuichi NOSAKA^{*1}, Takashi OTA^{*3}
and Hiroshi SASAKI^{*3}

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

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

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

Abstract

Genus *Nannochloropsis* is one of the promising microalgae for producing useful organic substances because of the relatively high growth rates and highly accumulated capacity of lipids. The growth rate, however, generally decreases under high ($>30^{\circ}\text{C}$) and low temperature ($<10^{\circ}\text{C}$) conditions. To improve the growth rate lowering under extreme conditions, we developed highly tolerant strains using random mutagenesis technique. We successfully isolated 60 and 20 mutants of *N. salina* in cold water (10°C) and in warm water (32.5°C), respectively. The present experiments showed that the growth rates of 7 isolated and highly tolerant strains under cold and warm conditions were comparable or markedly higher than wild strains.

1. 背景

近年、次世代エネルギーとなる液体バイオ燃料や、健康食品となる不飽和脂肪酸等の有用脂質を細胞内に多く蓄積する微細藻類の研究が様々な種類を用いて進められている^(1, 2, 3)。中でも真眼点藻類の *Nannochloropsis* 属はその増殖が比較的速い上、脂質の蓄積能も高く、脂質成分の中でもEPAを大量に蓄積することなどから、有望な微細藻類の一つとして大量培養の試みがなされてきた^(4, 5, 6, 7)。水産養殖の現場では魚類の餌であるシオミズツボワムシの栄養強化を目的とした餌料としてすでに利用されている^(8, 9, 10)。

これまでの知見によれば、ナンノクロロプシス

は増殖に最適な水温が 25°C 付近であるが、 15°C においても比増殖速度 (μ) が $0.5\text{--}0.6\text{ day}^{-1}$ と比較的速い増殖速度を示す。一方で 30°C を超える高温では急激に増殖速度が低下することが知られている^(11, 12)。また、太田ら(2014)⁽¹³⁾によれば、 5°C および 10°C での増殖速度は極めて遅いため、季節的に気温差の大きい（おおよそ $0^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$ ）石巻地域において *Nannochloropsis* を培養する場合、夏期の高温および冬期の低温による増殖速度の低下は避けられない。

夏季の高温、および冬期の低温による増殖制限を緩和するために二つの対策が考えられる。一つは人為的に温度を適温に保つ方法であるが、これ

^{*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25年度卒

^{*3}石巻専修大学理工学部生物科学科

はコスト面において問題がある。もう一つは低温や高温の環境下で活発に増殖する株を作製する方法である。後者を短期間で実現するためには遺伝子の組み替えによる方法が効率的であるが、食品としての生産を目的とする場合には国内法の使用制限がある。そのため、遺伝子組み替えよりも製法の効率は落ちるが、突然変異を誘導して高機能株を作製する方法がよく用いられる。*Nannochloropsis* 属においてもメタンスルホン酸エチル (EMS) を用いた突然変異誘導法により高脂質蓄積株が得られている^(14, 15)。本研究においては3種の *Nannochloropsis* 野生株に突然変異を誘導し、スクリーニングを行うことで低温下及び高温下において高い増殖能を有する高機能株の作製を目的とした。

2. 材料および方法

2.1. *Nannochloropsis* 株の準備

使用する株は *Nannochloropsis salina* (NBRC 102719), *N. granulata* (NBRC 102713) および *N. oceanica* (NBRC 102738) である。いずれの株も Guillard f/2 培地から Si を除いた f/2-Si 自然海水強化培地 (以降、f/2-Si 培地と称する) に抗生物質 (カルベニシリン、ストレプトマイシン) を加えて継代培養していたものを使用した。培養実験前には、3株共に 25℃、白色光の連続照射下 ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で継代培養しながら順化させた。いずれの実験においても対数増殖期に達した細胞の株を使用した。

2.2. メタンスルホン酸エチル (EMS) を用いた突然変異の誘導

突然変異の誘導にはメタンスルホン酸エチル (EMS) を使用した。はじめに EMS のナンノクロロプシス 3 種に対する有効濃度 (細胞の約 50% が死亡する濃度) を以下の方法で検討した。その際、死細胞の同定は SYTOX Green 染色⁽¹⁶⁾ によって行った。ナンノクロロプシスに対する同染色試薬の有効性は、65℃、1 時間の熱処理で死滅させた全細胞が染まること、および対数増殖期の株を直接染色した際にはほとんど染まらなかったことで確認された。0.7M EMS を f/2-Si 培地で希釈し、0.05、0.1、0.5、0.7M の濃度段階とし

た。対数増殖期のナンノクロロプシスを遠心濃縮して上澄みを捨て、回収した細胞に各濃度の EMS を $1.0 \times 10^8 \text{ cells ml}^{-1}$ となるように加えて遮光し 25℃ で 1 時間処理した。この処理中において 20 分おきに攪拌した。1 時間後、10% チオ硫酸ナトリウムで 3 回洗浄し、その後 f/2-Si 培地に移し 24 時間遮光して 25℃ で培養した。培養後、SYTOX Green ($1 \mu\text{M}$) で染色を行い、死細胞および生細胞を計数して死亡率を計算した。結果から 0.5M を有効濃度として突然変異誘導を行うこととした (Fig. 1)。

2.3. 突然変異株のスクリーニングと単離

突然変異誘導後、24 時間暗条件で培養した株を f/2-Si で希釈し、液体培地および寒天培地に移して異なる温度、光条件下で以下の培養実験を行った。

実験 1: *Nannochloropsis* 3 種全てについて、光条件一定のもと ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の連続照射下)、低温区を 5℃ 高温区を 35℃ コントロール区を 25℃ として培養を行った。

実験 2: *N. salina* および *N. granulata* の 2 種を用い、低温区を 10℃、高温区を 32.5℃ とし、 $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の連続照射下で培養を行った。

実験 3: *N. salina* および *N. granulata* の 2 種を用い、実験 2 と同様の光条件下で、25℃ から 1 日経過する毎に 2.5℃ 温度を上げ、最終的に 32.5℃ まで徐々に温度を上昇させたのち、同温度で培養を継続した。

上記実験において増殖が認められたもののうち、寒天培地からは増殖したコロニーを直接単離した。また、液体培地で増殖したものは定常期に達したところで継代し、これを 3 回以上繰り返して高機能クローンの存在比を高めた。その後、対数増殖期に適宜希釈して寒天に塗布し、それぞれの培養温度において増殖したコロニーを単離した。単離した株は寒天培養時と同様の温度で継代培養し、その後の選抜試験に供した。

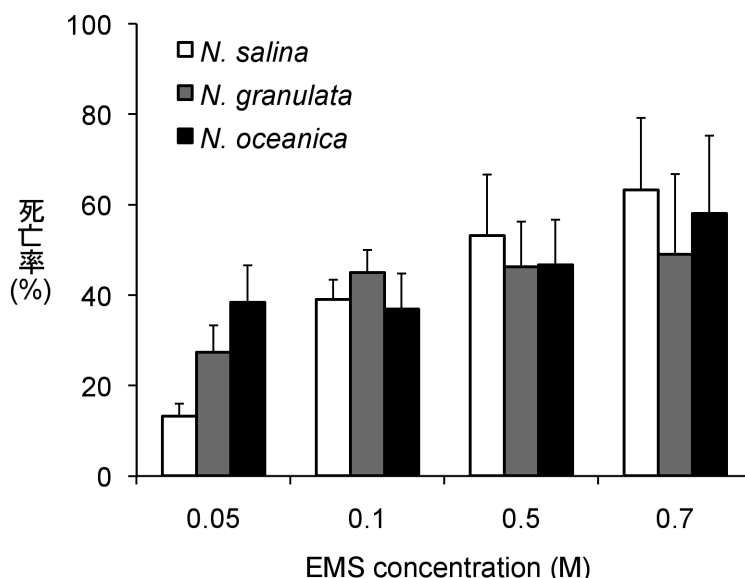


Fig. 1. メタンスルホン酸エチル (EMS) の濃度による *Nannochloropsis* 3 種の死亡率。死細胞の判定は SYTOX green による染色で行った。エラーバーは標準偏差を示す。

2. 4. 高機能株の選抜

高温 (32.5℃) および低温 (10℃) 条件下で得られた突然変異単離株のうちより高機能な株を選抜するためにバッチ培養実験を実施した。培地は f/2-Si とし、光条件は白色 LED を用いて $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ とした。実験は浮遊細胞培養用フラスコを用いて、数回に分けて行った。また、コントロールとして野生株区を実験毎に 1 本加えた。実験前に低温実験では 2 回の継代によって野生株を含む供試株を培養条件に慣らしたが、高温条件では野生株の増殖が遅く、実験に必要な密度まで増殖させることが出来ないことから、25℃で前培養を実施した。1-2 日に 1 回それぞれのボトルをよく攪拌したのち $100 \mu\text{l}$ のサンプリングを 2 回行い、酸性ルゴール (最終濃度 4%) で固定し、血球計算板を用いて細胞密度を決定した。得られた細胞密度を用いて、各サンプリング間の比増殖速度 (μ , day^{-1}) を以下の式により算出した：

$$\mu = \frac{\ln(N_t/N_0)}{(t-t_0)}$$

ここで、 N_t 、 N_0 はそれぞれサンプリング日時 t 、0 (day) における細胞密度 (cells ml^{-1}) である。各突然変異株は対数増殖期の比増殖速度、最大比増殖速度、培養開始から $1.0 \times 10^7 \text{ cells ml}^{-1}$ に達

するまでの平均比増殖速度および最高到達密度を基準として、野生株との比較をした。この際の対数増殖期は横軸に時間、縦軸に細胞密度を対数でプロットし、回帰式の相関が最も高くなる期間と定義した。

3. 結果

3. 1. EMS 有効濃度とスクリーニング条件の選択

3 種とも EMS 濃度が高いほど、24 時間後の死亡率が高くなる傾向が認められた (Fig. 1)。3 種に対する EMS の有効濃度 (死亡率 50%) は *N. salina* で 0.1-0.5M、*N. granulata* で 0.1-0.7M、*N. oceanica* で 0.5-0.7M となったことから、突然変異誘導には 3 種とも 0.5M の EMS を使用した。

実験 1：低温区 (5℃)、高温区 (35℃) ではいずれの種も寒天培地、液体培地ともに増殖は確認されなかった。一方、コントロール区ではいずれの培地においても *N. salina* および *N. granulata* で野生株よりは遅いものの増殖が認められた。

実験 2：10℃に設定した低温区のうち、液体培地のみで *N. salina* および *N. granulata* の増殖が認められた。一方、高温区では全ての実験区において増殖が認められなかった。

実験 3：液体培地および寒天培地のいずれにおいても *N. salina* のみで増殖が認められた。

以上の実験を通して、低温区では実験 2 で増殖したものを寒天培地に塗布して培養し、最初に出現した小さなコロニー (LMS-1~10)、それよりも早い時間に大きくなったコロニー (LMS-11~30)、さらに大きくなったコロニー (LMS-31~40)、2 回目の EMS 処理で得られたコロニー (LMS-41~60) など、異なるコロニーを採取して計 60 株を確立した。また、高温区では実験 3 において EMS 処理後に直接寒天に塗布して得られた 8 株 (HMS-1~8) および液体培養後に寒天培地で単離して得られた 12 株 (HMS-9~20) の計 20 株を確立した。

3.2. 得られた突然変異株の増殖速度

低温条件下における野生株の比増殖速度は対数増殖期の平均で $0.400 \pm 0.100 \text{ day}^{-1}$ 、最大で $0.611 \pm 0.085 \text{ day}^{-1}$ 、培養開始から細胞密度が $1.0 \times 10^7 \text{ cells ml}^{-1}$ に達する時間までの平均で $0.338 \pm 0.076 \text{ day}^{-1}$ であり、細胞の最大到達密度は $0.8-2.1 \times 10^7 \text{ cells ml}^{-1}$ であった (Table 1)。これら 4 つの比較項目に関して低温株の増殖特性は上述し

た単離のタイミングによって大きく異なっていた。特にはじめに単離した LMS1-10 は細胞密度の増減が激しく、安定した増殖を示さなかったため、対数増殖期を定義できたものは LMS-4、LMS-6、LMS-10 の 3 株のみであった。一方、残りの 50 株は全てにおいて明瞭な対数増殖期が認められた。このうち 4 つの比較項目の全てにおいて野生株を上回った株は 7 つあり、うち 6 株が同じタイミングで単離されたグループであった (Table 1)。得られた 60 株のうち、対数増殖期および細胞密度が $1.0 \times 10^7 \text{ cells ml}^{-1}$ に達するまでの平均の比増殖速度について上位 10 株のうち 9 株がこのグループに含まれた。

高温条件下における野生株の比増殖速度は対数増殖期の平均で $0.070 \pm 0.002 \text{ day}^{-1}$ 、最大で $0.317 \pm 0.071 \text{ day}^{-1}$ 、培養期間中の平均で $0.049 \pm 0.005 \text{ day}^{-1}$ であり、最大到達密度は $0.07-0.11 \times 10^7 \text{ cells ml}^{-1}$ であった (Table 2)。得られた単離株のうちすべての比較項目で野生株を上回った株は 7 つであった。このうち HMS-8 は対数増殖期における比増殖速度が最も高く、 0.293 day^{-1} と野生株の 4 倍以上であった。7 株中、最も有望と思われるのは HMS-20 で、その比増殖速度は対数増殖期の平均で 0.231 day^{-1} と HMS-8 に次いで

Table 1. 低温スクリーニングで得られた *Nannochloropsis salina* 高増殖能突然変異株の増殖特性

Strain	μ (in logarithmic phase)	R^2	Max. density ($\times 10^7 \text{ cells ml}^{-1}$)	$\mu \text{ MAX}$	Average μ (from t_0 to the time when cell density reach 1.0×10^7)
LMS-13	0.418	0.98	2.01	0.716	0.370
LMS-17	0.461	0.97	1.53	0.875	0.375
LMS-19	0.410	0.97	1.83	0.817	0.394
LMS-20	0.542	0.98	1.54	0.727	0.414
LMS-28	0.481	0.97	1.83	0.790	0.391
LMS-30	0.549	0.99	1.40	0.735	0.417
LMS-33	0.406	0.91	1.44	0.752	0.392
Wild strain	0.400	0.99	1.32	0.611	0.338
SD	0.100	<0.01	0.54	0.085	0.076

Table 2. 高温スクリーニングで得られた *Nannochloropsis salina* 高増殖能突然変異株の増殖特性

Strain	μ (in logarithmic phase)	R^2	Max. density ($\times 10^7$ cells ml^{-1})	μ MAX	Average μ (from t_0 to the time when cell density reach 1.0×10^7)
HMS-7	0.131	0.93	0.44	0.485	0.122
HMS-8	0.293	0.99	0.46	0.393	0.188
HMS-11	0.182	0.99	0.41	0.563	0.200
HMS-14	0.166	0.98	0.68	0.479	0.206
HMS-18	0.198	0.99	1.39	0.500	0.264
HMS-19	0.162	0.97	1.20	0.498	0.214
HMS-20	0.231	1.00	1.68	0.569	0.293
Wild strain	0.070	0.90	0.16	0.309	0.072
SD	0.002	0.07	0.15	0.060	0.046

高く、最大で 0.569 day^{-1} 、細胞密度が 1.0×10^7 cells ml^{-1} に達するまでの平均で 0.293 day^{-1} 、最大到達密度は 1.68×10^7 cells ml^{-1} と、残り 3 つの比較項目で 7 株中最も高い値となった (Table 2)。

4. 考察

4.1. 得られた突然変異株の増殖能

本研究によって確立された高機能株のうち、低温区で得られた LMS-20 および LMS-30 は 10°C における野生株よりその増殖速度が 20% 以上高い。特に対数増殖期の比増殖速度は 0.54、0.55 と比較的高く、これは細胞が 3 日で 10 倍に増える分裂速度に相当する。高温区で得られた株の増殖速度は野生株の約 4 倍に相当した。また、高温条件では同一条件のバッチ培養においても定常期に達したときの密度がやや低い ($< 2.0 \times 10^6$ cells m^{-3}) 傾向があったが HMS-20 は最高到達密度が約 10 倍に向上した。このことは、HMS-20 が高温ストレスに比較的強い耐性を有することを示していると思われる。一方、その比増殖速度は 0.3 以下であり、約 3 日で 2 倍になる程度であった。 $> 30^\circ\text{C}$ の盛夏期においても耐える可能性を持つが、安定的な生産が実現可能というレベルではな

い。上述のように、本実験を通して得られた株のうちいくつかは、野生株のそれと比べてその増殖能に大きな改善が認められた。しかし、本実験は小規模のバッチ培養でその増殖能を評価しているため、大規模に培養を行う場合に想定される培養環境とは様々な違いがあると思われる。例えば、より高密度にするための継続的栄養塩添加法の開発や制御が難しい環境の日周変化や季節的変動への対処などである。実際に得られた株をより大規模な培養系を用いて、年間を通して安定な増殖能の維持が望まれる。

4.2. EMS を用いた突然変異誘導法と温度ストレス環境下でのスクリーニング法

本研究では、様々な試行錯誤を繰り返しつつ、徐々に手法を改善しながら行った。以下にその過程で見いだした特筆すべき観察結果について考察する。例えば *N. oceanica* の 24 時間後の死亡率は他の 2 種のそれと有意差がなかったものの、温度ストレスが無いと思われる 25°C で培養しても、増殖は認められなかった。しかし他の 2 種では増殖が確認された。これは *N. oceanica* が EMS に対して弱く、本実験で設定した最低濃度の 0.05M の EMS でさえも、ほぼ全ての細胞が致死的なダ

メージを受けていたためと考えられる。24 時間後の死亡率で有効濃度を判断したことが、十分ではなかった可能性もあるが、従来の EMS を用いた濃度 (0.07 M)⁽¹⁵⁾ よりも低濃度 (0.05M) で死滅してしまうことから、非常に扱い難い種であると考えたため、本研究における突然変異株作製には *N. salina* および *N. granulata* を用いることが妥当であると判断した。

低温スクリーニングにおいて、はじめは 5℃で液体および寒天培養を両方を試したが、増殖は認められなかった。この原因は EMS のダメージから十分に回復していない細胞に 5℃という強い低温のストレスが追加されたためと考えた。そこでストレスを緩和するため、スクリーニングの条件を 10℃とすることで液体培養ではほぼすべての株において増殖が認められた。一方で 10℃であっても寒天培地においてはコロニーの形成が認められなかった。そのため、EMS と温度に加えて、寒天培地上では液体培養よりも強光によるストレスを受ける可能性が考えられた。そこで、複数のストレスが同時に働くことを避けるため、10℃の液体培地で継代培養することによって、EMS のダメージを低減し、かつ低温下での増殖能力が高い細胞の優占度を高めたのちに寒天培地で単離するという手法を採用した。この方法により実験に供した 2 種とも突然変異株を多数獲得することが出来た。しかし、後述する通りに高温環境下におけるスクリーニングでは *N. granulata* の突然変異株は全く得られなかったことから、それ以後の実験は *N. salina* に絞って行うことにした。

高温株のスクリーニングでは、はじめに行った 35℃における液体および寒天培地条件では増殖が起らなかった。32.5℃で試行した結果も同様であったため、この原因は低温実験の結果と同様に温度ストレスに有ると考えられた。そこで、最大限に温度ストレスを緩和するため、24 時間後の株を 25、27.5、30、32.5℃と 1 日毎に 2.5℃上昇させ、細胞をスクリーニングする手法をとった。この手法では、低温条件下とは異なり寒天培地でもコロニーを目視で確認出来るほど、明確な増殖を示した。ある種の植物プランクトンでは光合成速度が飽和する照度が水温の低下とともに低下す

ることが知られている⁽¹⁷⁾。そのため低温下では比較的低照度であっても光化学系Ⅱの過励起が生じ、強光阻害をもたらすと考えられている⁽¹⁷⁾。*Nannochloropsis* においても同様の光合成速度が飽和する照度の低下は認められており⁽¹¹⁾、そのため同じ光条件下での寒天培養の結果に差が生じたものと推察される。

4.3. 今後の課題

本実験において得られた有望な突然変異株を使用することで冬期、および夏季においても野生株を用いた場合より安定的かつ効率的な藻類生産ができると思われる。今後は得られた高機能株の 5℃および 35℃における増殖特性を把握しつつ、最終生産物となる中性脂質等の生産力がより高い株を選抜することが必要となる。一方で、今回得られた突然変異株の増殖能は培養条件による違いはあるものの、野生株の最適水温と考えられる 25℃のそれよりも低かった。例えば低温区で得られた株の 10℃における増殖速度は、これまで報告例が示す 15℃における増殖速度に相当するものであった^(11, 12, 13, 18)。高等植物のいくつかではコールドショックプロテインやヒートショックプロテインなどのように、温度ストレス下で成長に影響するタンパク質をコードする遺伝子が同定されている。これらを増幅し遺伝子に組み込むことで、低温条件でも至適温度に匹敵する成長を促すことが可能である⁽¹⁹⁾。EMS によってもたらされた様々な変異の中で増殖にマイナスに働くものが起きている可能性があり、そのため組み替えほどの効果を得られないことも考えられる。確立したスクリーニング手法を改良させると共に、実験回数を増やすことも重要であろう。

5. 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) による研究支援を受けて実施された。

6. 文献

- (1) Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. (2006) Commercial Applications of Microalgae. *J Biosci Bioeng*, 101: 87-96.

- (2) Chisti, Y., (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25: 294-306.
- (3) Schenk, P.M., Thomas-Hall, S.R., Stephens, E., Marx, U.C., Mussgnug, J.H., Posten, C., Kruse, O., Hankamer, B. (2008) Second generation biofuels: High-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenerg Res*, 1: 20-43.
- (4) Fang, X., Wei, C., Zhao-Ling, C., Fan, O. (2004) Effects of organic carbon sources on cell growth and eicosapentaenoic acid content of *Nannochloropsis* sp. *J Appl Phycol*, 16: 499-503.
- (5) Patil, C., Källqvist, T., Olsen, E., Cogt, G., Gislerød, H.R. (2007) Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquacult Int*, 15: 1-9.
- (6) Hoffmann, M., Marxen, K., Schulz, R., Canselow, K.H. (2010) TFA and EPA productivities of *Nannochloropsis salina* influenced by temperature and nitrate stimuli in turbidostatic controlled experiments. *Mar Drugs*, 8: 2526-2545.
- (7) Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S. (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew Sust Energ Rev*, 14: 217-232.
- (8) Brown, M.R., Mular, M., Miller, I., Farmer, C., Trenerry, C. (1999). The vitamin content of microalgae used in aquaculture. *J. Appl. Phycol.* 11: 247-255.
- (9) Vismara, R., Vestri, S., Kusmic, C., Brarsanti, L., Gualtieri, P., (2003). Natural vitamin E enrichment of *Artemia salina* fed freshwater and marine microalgae. *J. Appl. Phycol.*, 15: 75-80.
- (10) Okauchi, M. (2004). An assessment of the beneficial roles of *Nannochloropsis oculata* in larval rearing of marine finfish. *Bull. Fish. Res. Agen. Supplement*, 1: 83-90.
- (11) Sandnes, J.M., Källqvist, T., Wenner, D., Gislerød, H.R. (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.
- (12) Wagenen, J.C., Miller, T.W., Hobbs, S., Hook, P., Crowe, B., Huesemann, M. (2012) Effects of light and temperature on fatty acid production in *Nannochloropsis salina*. *Energies*, 5: 731-740.
- (13) 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、石巻専修大学研究紀要、25: 11-17.
- (14) Doan, T.T.Y., Obbard J.P. (2012) Enhanced intracellular lipid in *Nannochloropsis* sp. via random mutagenesis and flow cytometric cell sorting. *Algal Res*, 1: 17-21.
- (15) Perin, G., Segalla, A., Basso, S., Simionato, D., Meneghesso, A., Sforza, E., Bertucco, A., Morosinotto, T. (2014) Biotechnological optimization of light use efficiency in *Nannochloropsis* cultures for biodiesel production. *Chemical Engineering Transactions*, 37: 763-768.
- (16) Veldhuis MJW, Cucci TL, Sieracki ME (1997) Cellular DNA content of marine phytoplankton using two new fluorochromes: taxonomic and ecological implications. *J Phycol* 33:527-541
- (17) Falkowski, P.G., Raven, J.A. (2007) *Aquatic Photosynthesis*, 2nd ed. Princeton University Press, Princeton, NJ, 484 pp.
- (18) Chen, S.-Y., Pan, L.-Y., Hong, M.-J., Lee, A.-C. (2012) The effects of temperature on the growth of and ammonia uptake by marine microalgae. *Botanical Studies*, 53: 125-133.
- (19) Zhu, B., Xiong, A.S., Jin, X.F., Meng, X.R., Yao, Q.H.. (2010) Over-expression of ThpI from *Choristoneura fumiferana* enhances tolerance to cold in *Arabidopsis*. *Mol Biol Rep.* Feb 37: 961-966.

