

有用海産微細藻類 *Nannochloropsis* の大量培養法に関する 基礎研究Ⅱ 一屋外培養の試み一

佐々木 洋*¹・平岡 正明*^{1,2}・太田 尚志*¹・真壁 竜介*¹・臼井 利典*¹

On the mass culture of useful marine microalgae *Nannochloropsis*. II -Outdoor culture-

Hiroshi SASAKI*¹, Masaaki HIRAOKA*^{1,2}, Takashi OTA*¹, Ryosuke MAKABE*¹ and Toshinori USUI*¹

*¹: Department of Biological Sciences, Faculty of Science and Engineering,
Ishinomaki Senshu University, Ishinomaki 986-8580

*²: Smabe Japan Co. Ltd., Ishinomaki 986-2527

Abstract

Nannochloropsis sp. is one of the promising marine microalgae which can produce useful lipid material, such as eicosapentaenoic acid (EPA). While this species can be successfully cultured under controlled laboratory conditions, less information how to culture effectively *Nannochloropsis* sp. in outdoors under natural conditions, especially in cold environments was obtained. We tried outdoor culture of *Nannochloropsis* sp. using a 500 L race-way type pool covered with a green house in Ishinomaki in winter to early spring (from 7 January to 12 April). In spite of variable light and temperature conditions (outside temperature of 0.2-12.8 °C), the cell density gradually increased (slow growth rate relative to laboratory cultures) and reached $>10^8$ cells ml^{-1} for about 3 months, which was almost equivalent to the maximum cell density obtained in the laboratory cultures. This study suggests the need of minor improvements of the present outdoor culture method.

1. はじめに

微細藻類を利用した有用成分（健康食品やバイオ燃料）の生産に対する関心が高まっている⁽¹⁾。微細藻類の増殖に必要な要素は、光、CO₂、水とミネラル成分であり、基本的には陸上高等植物の光合成生産と変わらないが、微細藻類は細胞分裂で増殖し、その倍加速度は陸上植物と比べて著しく速いため（例えば面積あたりの生産速度は大豆の100倍）、より効率的な生産が可能である⁽²⁾。また近年、注目を集めているCO₂排出量の削減、環境への負荷低減などの観点から、微細藻類を利用した各種化学製品、液体燃料生産の事業化を目的とした研究が進められている。

有用化学成分を生産するために微細藻類が利用可能であることは疑いがないため、これまで、培養条件（光、水温、CO₂濃度、栄養条件など）を制御することにより様々な微細藻種を用いて大

量培養技術向上のための研究が進められてきた⁽³⁾。ナンノクロロプシス属（*Nannochloropsis* sp.）もやや小型サイズ（直径2~6 μm ）の有用な海産微細藻類の1つであり、不等毛植物門、真正眼点藻綱に属している。この微細藻は、比較的増殖速度が速く、冷涼環境下においても成長することに加えて、細胞内に脂質を豊富に蓄積すると言われている⁽⁴⁾。栄養価値の高い脂質成分が豊富であるため、水産養殖に使用するワムシやアルテミアの餌として用いられてきた経緯がある⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾。

太田ら⁽⁸⁾によって行われた基礎的な室内実験結果によれば、5°C~25°Cの各温度帯における*Nannochloropsis*の成長特性を比較した結果、25°Cにおいては約5日~8日後に細胞密度は約 10^7 cells ml^{-1} に達し、指数増殖期から定常期に移行している。しかし、5°C、10°Cにおいては緩慢な速度で増殖を継続しながら最大細胞密度（約 10^7

*¹石巻専修大学理工学部生物科学科

*²スメーブジャパン株式会社 石巻市十八成浜清崎山 1-21 〒986-2527

cells ml⁻¹) に達するが、>20℃と比較してその倍以上の日数を要している。一方、総細胞容積、つまり細胞のサイズは低温環境下 (<10℃) で増大した。つまり、*Nannochloropsis* は 25℃の環境下では成長速度は速く、比較的早く最大細胞密度に達するが、低温環境下 (<10℃) では相対的増殖速度は低いが、細胞容積が肥大すると考えられる。細胞容積の増大に比例して有用脂質成分も増加しているならば、極めて有望な微細藻であると考えられる。

このような *Nannochloropsis* の増殖特性に関する基礎的知見をもとに、大量培養系を確立することは理論的には可能であるが、そのためには、屋外の培養水槽を用いる方法などがある。しかし屋外培養においては、季節変化による気温の変動の影響を受けるため、年間を通して同じような生産性を維持できない可能性がある。そこで、屋外に大型水槽を設置しそれをビニールハウスで覆い、培養試験を試みた。水温条件の季節的変動に対応してどのような技術的改善が必要であるかを確認することを目的として本実験を行った。

2. 材料および方法

はじめに *Nannochloropsis* sp. の大量培養に使用する株を準備した。実験に使用した株はスメーブジャパン(株)から供与されたものである。*Nannochloropsis* の培養は、25℃、150 μmol m⁻² s⁻¹ の連続照明下で 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) を用いて順応させ、それを約 1 ヶ月間、継代培養して保存株とした。増殖実験の初期密度は 5.5×10⁴ cells ml⁻¹ である。細胞計数のためには、定期的に採集した試料 100 μl をルゴール溶液で固定した。その後、血球計算盤と正立蛍光顕微鏡を用い計数した。

細胞容積は、各温度帯の誘導期、対数増殖期および定常期において 1 ml のサンプルを採取し、中性化ホルマリン (最終濃度 5%) で固定した後、蛍光染色剤 DAPI およびプロフラビンで 10 分間染色した。その後、ポリカーボネイトフィルター上に濾過し、プレパラートを作成した。プレパラートは、正立蛍光顕微鏡 BV 励起下で *Nannochloropsis* の細胞を撮影し、フォトショッ

プ 7.0 を用い細胞サイズを測定した。その後、細胞サイズから細胞容積 (V) を計算した。

$$V = a \times b^2 \times \pi / 6 \quad (2)$$

V は細胞容積 (μm³)、a は長径 (μm)、b は短径 (μm) である。総細胞容積 (TBV : Total biovolume) は、最大細胞密度 ($N_{\max}$: cells ml⁻¹) と細胞容積 (μm³) から求めた。

$$TBV (\mu\text{m}^3 \text{ ml}^{-1}) = N_{\max} \times V \quad (3)$$



Fig. 1. 500 L レースウェイ型水槽による *Nannochloropsis* 培養。培養水中の底部に循環用の海水放出ポンプ、およびマイクロバブルのエアレーション用の放出口を設置してある。

実験に用いた株は、f/2-Si 培地で定常期まで 12 L 容器で前培養した株を用い、500 L の f/2-Si 培地を入れた 2000 L レースウェイ水槽 (Fig 1) で行った。実験期間は 2012 年 1 月 7 日～4 月 12 日の約 3 ヶ月間である。レースウェイ水槽は、冬季の低温環境を考慮し、ビニールハウス (270×480×200cm) の中に設置した。培養液の攪拌は、2 つの異なる水中ポンプ (カミハタ社製 Rio プラスパワー 3100 と同社の Seio6000) を用い循環水流を起こして行った。水槽の中央部には、長軸方向に約 2.5m 長のプラスチック製の板を垂直に設置した。これは海水の一方向循環を容易にするためである。このポンプの定格流量はそれぞれ 48 L min⁻¹ と 90 L min⁻¹ である。エアレーションは、安永エアポンプ LP-120H(S) (定格風量 120 L min⁻¹, 安永エアポンプ(株)製) を用いて行った。バブルを供給するためにいぶきエアストーン (50 φ 丸 #100、キング砥石(株)製) を 6 個用いて水槽底に置いた。

培養期間中の環境パラメータとして外気温、ビ

ニールハウス内温度（室温）、水温、pH および光量子量を測定した。実験の初期密度は、 8.4×10^6 cells ml^{-1} から開始した。サンプリングは、3日から2週間に1回、0.5~100 μl のサンプルを3回採取し、ルゴール溶液で固定した。その後、血球計算盤と正立蛍光顕微鏡を用い計数した。また

乾燥重量を測定するためのサンプルは、50 ml メスシリンダーを用い3本の遠沈管に其々50 ml 採取した後、10000 rpm で10分間遠心分離した。遠心後、上澄みを取り除き、3回蒸留水で洗浄した。乾燥は24時間80℃で行い、その後電子天秤を用い重量を測定した。

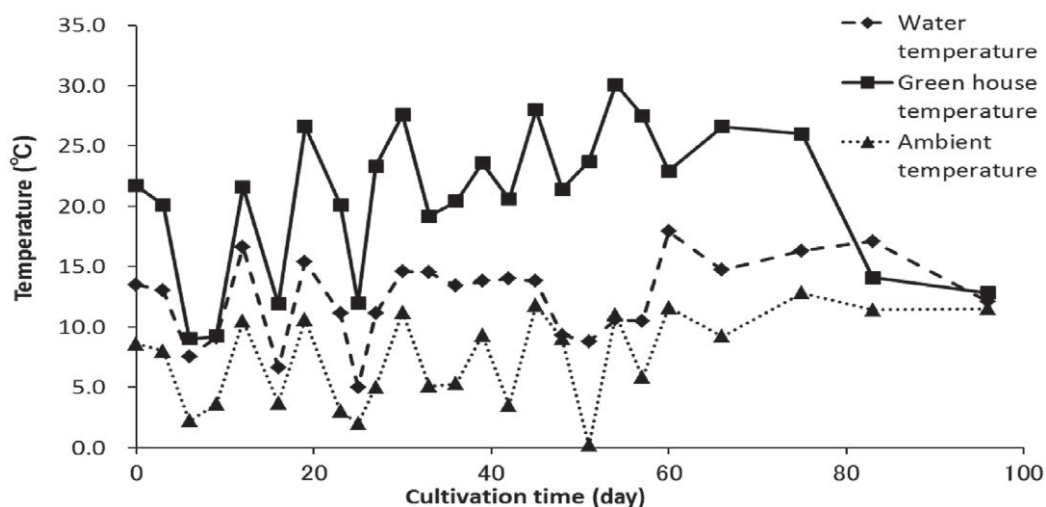


Fig. 2. 2012年1月7日から4月12日における、外気温、ビニールハウス内気温、および培養水槽内の水温の季節的変化。
▲点線が外気温、■実線がビニールハウス内気温、◆破線が水槽内水温。

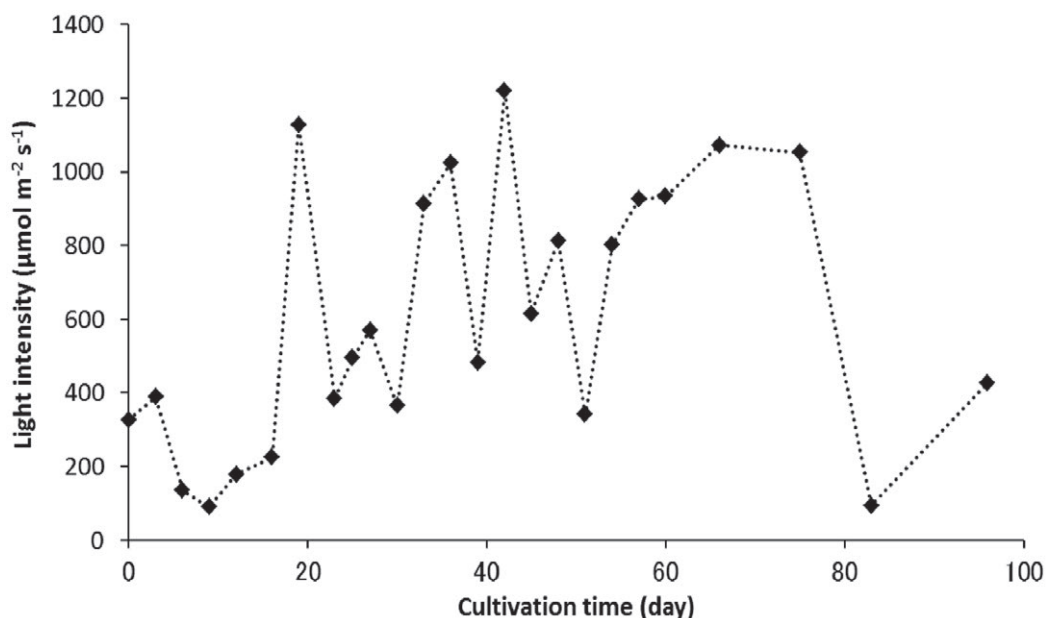


Fig. 3. 培養期間中の光量の季節的変化。

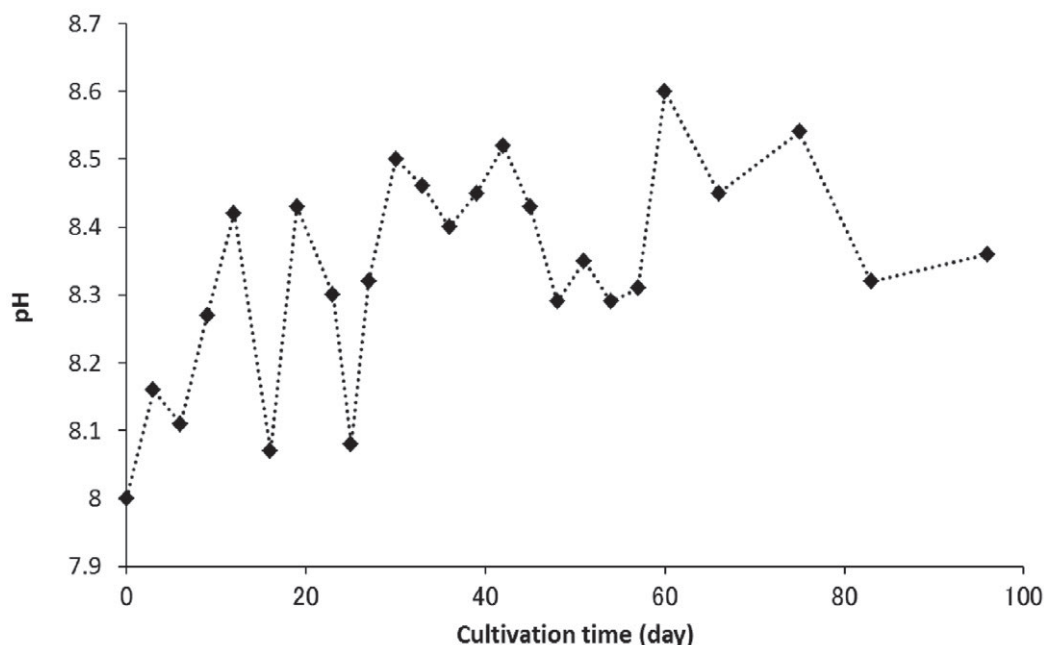


Fig. 4. 培養期間中の pH の季節的变化。

Table 1. 培養期間中の水槽内の平均水温、平均外気温、ビニールハウス内の平均気温、平均光量、平均 pH とそれらの、最大値、最小値、および標準偏差。

	Water temperature (°C)	Temperature inside the green house (°C)	Ambient temperature (outside the green house) (°C)	Light intensity just above water ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	pH in water
Average $\pm$ standard deviation	12.4 $\pm$ 3.4	20.8 $\pm$ 6.1	7.4 $\pm$ 3.8	599.5 $\pm$ 357.6	8.3 $\pm$ 0.2
Maximum value	17.9	30.1	12.8	1220.0	8.6
Minimum value	5.0	9.0	0.2	89.0	8.0

3. 結果

20001 レースウェイ水槽を用いた 500 l の培養実験における、培養期間中の昼間の水温は 5.0～17.9℃で推移し、平均水温は 12.4 $\pm$ 3.4℃であった (Fig. 2、Table 1)。温室内温度は 9.0～30.1℃で推移し、平均温度は 20.8 $\pm$ 6.1℃であった (Fig. 2、Table 1)。外気温は 0.2～12.8℃で推移し、平均気温は 7.4 $\pm$ 3.8℃であった (Fig. 2、Table 1)。明らかに外気温よりも、温室内気温が高く、水温も 5℃を下回することはなかった。

この間の照度（光量子量）は 89～1220 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ と変動し、平均光量子量は 599.5 $\pm$ 357.6 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ であった (Fig. 3、Table 1)。また海水培地の pH は 8.0～8.6 で、平均 pH は 8.3 $\pm$ 0.2 であった (Fig. 4、Table 1)。日光の照射量が低下する時期（積雪があるか、または曇天日）などに温室内及び水槽の水温が低下していた。天然光の強度は 1 月から 4 月にかけて変動はあるものの、増加傾向が認められる。それにほぼ同調して、pH も増加傾向があると思われる。

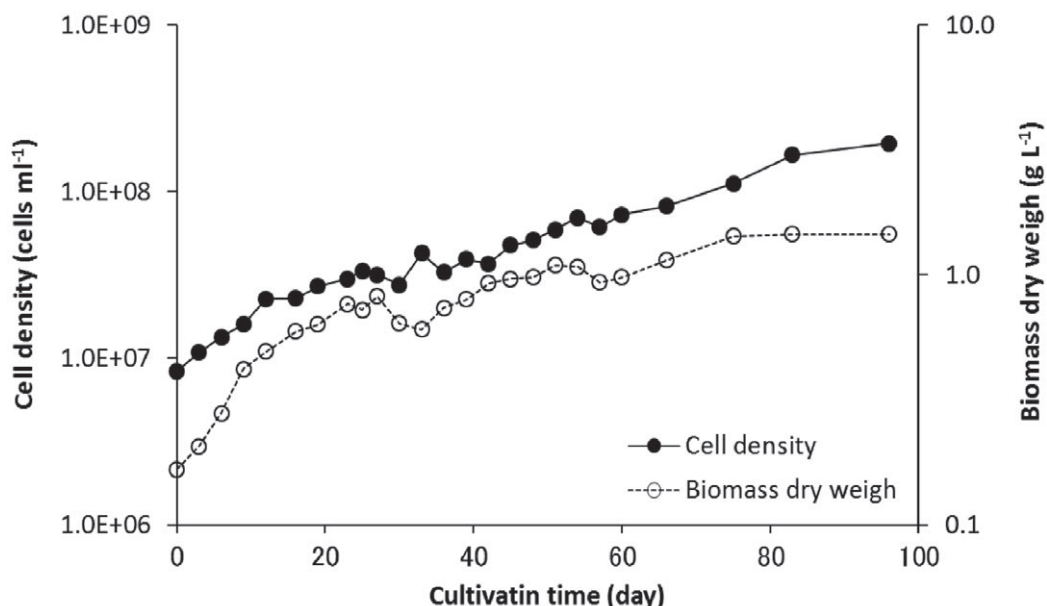


Fig. 5. 培養期間中の *Nannochloropsis* 細胞の密度 (●)、および 1L 中の藻体の乾燥重量 (○) の季節的变化。

Nannochloropsis の細胞密度は、培養開始から数日を経過して 10^7 cells ml⁻¹ を超えるが、その後の成長は遅く、75 日目で 1.1×10^8 cells ml⁻¹ を超えた。培養開始から 96 日目で最高密度の 1.9×10^8 cells ml⁻¹ に達した (Fig. 5)。またその時のバイオマス乾燥重量は、75 日目で 1.433 g l⁻¹、96 日目で 1.460 g l⁻¹ であった (Fig. 5)。

4. 考察

実験室内における小容器内培養においては、光量、水温、エアレーションによる CO₂ 供給およびエアレーションによる培養水の混合などの制御は比較的容易であるため、微細藻類を安定的かつ速い速度で増殖させることが可能である⁽⁸⁾。しかし、培養水の容量を大幅に増大させると、少量培養では予想のできないような培養効率を低下させる要因が現れる。また屋外水槽による培養においては、自然の気候の変化の影響を受けて環境条件も大きく変動するため、培養維持のための対応が必要となる。さらに、天然光を利用するため光量は制御ができない。

エアレーションによる CO₂ 供給は、少量容器培養で効果が確認されたマイクロバブル (< 約 1 mm 直径のバブル) を放出させる方法を用いた。

マイクロバブルは大型のバブル (> 約 1cm 径) よりも同量の空气体積に対してバブル表面積が大きく、水柱内の滞留時間が相対的に短いことに起因して CO₂ の海水への溶出効率が高いと思われる。しかし屋外大型水槽内の培養水の水深が約 20 cm と浅いためバブルが上昇中に海水と接触する時間は長くはない。バブルの放出口を増やし供給量を増加させる以外に手段はないが、現実的には限界があるため、少量容器培養と比較すると CO₂ 供給効率は低下するであろう。

微細藻類の密度の上昇に伴って、光の海水への透過効率は低下する。できるだけ全細胞に平均的に光を供給するためには、効率的に微細藻類を含む海水を混合させる必要がある。レースウェイ水槽においては、水車型の走流装置を使用することが多いが、本研究においては、走流ポンプを使用した。水槽底部に設置したポンプにより海水の吸入と放出を行い、レースウェイに沿って海水を循環させた。水平方向の海水の移動を促しており、エアレーションポンプとの組み合わせで海水の混合効率の上昇を期待したためである。

微細藻の培養に与える影響の大きい要因が水温であるが、基本的には外気温依存であるため制御はできない。しかしビニールハウスに水槽を収納

することにより冬季の水温低下を緩和する効果が期待された。使用したビニールハウスは、家庭菜園などに使用される簡易なタイプである。安価であるが、強風などに晒されるとビニールが破損するなど強度には問題があった。Table 1 に示されたように、冬季の外気温は氷点付近まで低下することがあるが、ビニールハウス内気温、および水温は 5℃ を下回することはほとんどなかった。ビニールハウスの強度の維持が保たれるならば、きわめて有効な保温手段である。しかしながら、ビニールハウス内の気温は、外気温よりも変動が激しく、最高気温は冬期間であるにもかかわらず 30℃ に達した。一方、最低気温は 9℃ にとどまっていた。そのため水槽内の水温は平均 12℃ であり、変動も比較的小さかったことから、明らかに保温効果があると考えられる。培養時の水温維持のみならず、降雨や積雪による淡水の大量添加、秋季の落ち葉の混入、春季から夏季の花粉の混入を防ぐ効果もある。さらに、様々なコンタミネーション生物（微生物、他種の微細藻類の胞子など）の混入防止の効果は期待できると思われる。

ビニールハウス内（半自然条件下）において *Nannochloropsis* の細胞密度は、培養実験開始後徐々に増加しているが、約 3 カ月を要して 8.4×10^6 cells ml⁻¹ から約 10^8 cells ml⁻¹ に達した。増殖速度 (μ) はおよそ 0.03 である。小容器培養においては、最終的に 10^8 cells ml⁻¹ に達しなかったが（太田他、2013）、最高到達密度の約 1/10 の密度から最高密度に達するまでに要する時間を比較してみると、水温 25℃ において約 15 日、水温 5℃ においても約 60 日であった⁽⁸⁾。本培養実験期間中の水槽水温の平均 12℃ に近い 10℃ の結果は約 11 日であった。増殖速度で比較すると、小容器培養においては >20℃ においては >1.0、<10℃ においても >0.2 であるから、その差は顕著である。室内小容器培養と比較するとビニールハウス内の培養における増殖速度は明らかに遅い。一定の環境条件下における室内培養と変動の激しい屋外環境条件の違いを反映していると思われる。

培養期間中に培養海水の蒸発により、水位が徐々に低下する。海水量の減少に伴ない塩分も低下するため、当初の水位、塩分濃度に戻すために

必要な量の淡水を加えた。その淡水には実験開始時に設定した濃度の栄養塩を添加している。

総細胞容積は徐々に増加しており（Fig. 5）、細胞密度の増加傾向と同調しているように思われる。室内培養においては低温環境下において、1 細胞当たりの細胞容積の増加が認められたが屋外培養においてはその傾向は顕著ではない。水温などの変動の激しい環境下においては、細胞サイズの肥大は期待ができない可能性を示唆している。

最後に、屋外水槽を用いて *Nannochloropsis* を培養した場合の生産量の推定を試みた。屋外に設置した水槽内の培養水温は 10℃ 前後を想定した。乾燥重量は細胞密度が 1.5×10^8 cells ml⁻¹ に達し、その細胞容積が $64 \mu\text{m}^3$ cell⁻¹（太田他、2013 を参考）、比重を 1 と仮定して求めた。培養海水 1t 当たりで生産される微細藻の総乾燥重量は約 1.9 kg なる。それら全てを一度で回収した場合の日間生産量は $1.1 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ であるから、年間の生産量は 38.5 kg y^{-1} と見積もられる。しかし、1t の微細藻入りの海水の内、一度の回収分を総量の 10% に減じた場合には、その後、海水と栄養塩を添加してさらに培養を継続することを前提とすると、その日間生産量は $19 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ と増加し、年間当たりの生産量は 121.6 kg y^{-1} と推定される。計算に用いた定数などは屋外培養においては一定ではないことが予想されるため、きわめて正確な推定値とは言いが、大量培養を効率よく継続させるためには、今後どのような時間間隔で回収を繰り返すか、などの配慮が重要になると思われる。

5. 謝辞

本研究は、平成 23 年度、24 年度の石巻専修大学共創研究センタープロジェクト事業に採択された研究課題「有用海産微細藻類を用いた大量培養の効率化に関する研究」への研究助成をもとに実施された。

文献

- (1) Spolaore, P., C. Joannis-Cassan, E. Duran, A. Isambert, (2006), Commercial Applications of Microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101, 87-96.
- (2) Shay, E.G. (1993) Diesel Fuel from Vegetable

- Oils: Status and Opportunities. *Biomass Bioenergy*, 4, 227-242.
- (3) Chisti, Y. (2007) Biodiesel from Microalgae. *Biotech. Adv.*, 25, 294-306.
- (4) Radakovits, R., R.E. Jinkerson, S.I. Fuerstenberg, H. Tae, R.E. Settlage, J.L. Boore, M.C. Posewitz, (2012) Draft Genome Sequence and Genetic Transformation of the Oleaginous Alga *Nannochloropsis gaditana*. *Nature Comm.*, 3, 686.
- (5) Brown, M.R., M. Mular, I. Miller, C. Farmer, C. Trenerry (1999) The Vitamin Content of Microalgae used in Aquaculture. *J. Appl. Phycol.* 11, 247-255.
- (6) Vismara, R., S. Vestri, C. Kusmic, L. Brarsanti, P. Gualtieri (2003) Natural Vitamin Enrichment of *Artemia salina* fed Freshwater and Marine Microalgae. *J. Appl. Phycol.*, 15, 75-80.
- (7) 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.
- (8) 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第 25 号、2014 記載予定。