

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—

太田 尚志*1・平岡 正明*2・佐々木 洋*1・原 芳道*2

On the Mass Culture of Useful Marine Microalgae *Nannochloropsis*. I - Growth Characteristics -

Takashi OTA*1, Masaaki HIRAOKA*1,2, Hiroshi SASAKI*1 and Yoshimichi HARA*2

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

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

Abstract

The aim of the present work was to study the effects of temperature on the growth characteristics of the eustigmatophyte, *Nannochloropsis*, in the laboratory batch culture, especially lower temperature than 15°C. In addition, the influences of agitation and aeration on the growth were examined. Growth rate and cell volume of two *Nannochloropsis* species were measured at 5 temperatures between 5 and 25°C. Maximum growth rates ($\mu_{\max}$), calculated as the slope of the regression for the log numbers of cell vs time (d) over the exponential growth phase, exhibited slow but positive growth at 5°C with the rate of 0.19 d⁻¹ and increased linearly with temperature to a maximum rate of 1.3 d⁻¹ at 25°C. Cell volume of *Nannochloropsis* increased between 5 and 15°C and decreased between 20 and 25°C. Consequently, *Nannochloropsis* production as the product of cell volume and $\mu_{\max}$ were calculated to be highest at 15°C. While there found no significant influences of aeration on the $\mu_{\max}$, a greater air flow rate over 200 mL min⁻¹ of air level CO₂ resulted in the high cell yield reaching 3.6 × 10⁸ cells mL⁻¹.

1. はじめに

微細な単細胞性藻類（以下、微細藻類と呼ぶ）は、30 億年以上前に出現して以来、地球環境形成と生命進化および生物多様性に決定的な役割を果たし、今なお水圏食物連鎖の主要基礎生産者として、淡水、海水生態系すべての生命体の営みを支えている生物群である⁽¹⁾。一般に、微細藻類の単位重量当たりの生産量は同じ光合成活動を営む陸上植物を遥かにしのぎ⁽²⁾、さらに、細胞内に有用化学成分を含有する種も少なくない。そのため、微細藻類の産業利用は多岐にわたっている。例えば、栄養価の高い微細藻類は魚介養殖、家畜飼料として直接利用されている他、藻類から抽出された有用成分は、医療・健康分野にも利用されている⁽³⁾。また、近年は、CO₂ 排出量の削減、環境への負荷低減の観点から、脂質含量の高い微

細藻類を利用したバイオマス資源、バイオ燃料生産の事業化にむけての技術開発研究が急速に進展している。

本研究実験対象の *Nannochloropsis* は不等毛植物門、真正眼点藻綱に属する細胞直径 2~6 μm の単細胞藻類である⁽⁴⁾。これまでに 6 種が記載され、そのうち 5 種は温帯域の富栄養な沿岸域、河口域に生息する海産種である。この藻類は中性脂質含量も他の微細藻類に比べて高い上、n-3 系の高度不飽和脂肪酸のひとつであるエイコサペンタエン酸 (EPA) 含量が高く^(5,6)、且つ培養が容易なことから、有用微細藻類として、二枚貝やエビ類幼生の補助餌料、あるいは海産魚種育苗生産の初期餌料として用いられるワムシなどの栄養強化養餌料などに利用されてきた⁽⁷⁾。また、近年では、健康補助食品の原材料やバイオ燃料としての利用

*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

が期待されている。*Nannochloropsis* の増殖適温は 20–25℃とされる^(8,9,10,11)。しかしながら、10℃以下の低温域での増殖特性に関する知見はほとんどない。本研究では、本邦東北地域における冷海水と冷涼気候を利用した屋外大量培養系の確立にむけて、とりわけ 10℃以下の低温域における *Nannochloropsis* の増殖特性について基礎データを収集することを目的とした室内培養実験を行った。また、増殖に及ぼすエアレーション・攪拌についても調べた。なお、増殖特性は、増殖曲線、増殖速度、細胞体積により評価した。

2. 材料および方法

2.1. 実験材料

実験に使用した藻類株の *Nannochloropsis* sp.1 (イスラエル株) および *Nannochloropsis* sp.2 (駿河湾株) はスメーブジャパン(株)から供与された。藻類株の培養には f/2-Si 培地 (自然海水強化型 Guillard f/2 培地のうち Si 成分のみ無添加) を用い、各実験には、25℃、150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の連続照明下で 1 ヶ月程度、前培養したものを使用した。

2.2. 実験 1：異なる温度での増殖実験

f/2-Si 培地で希釈調整した *Nannochloropsis* 培養液を 70 mL 浮遊細胞用フラスコ (Nunc 社製) に 30 mL ずつ分注し、温度恒温勾配器 (TG-180-5L、日本医化器械製作所) 内で静置バッチ培養実験を行った。実験温度は 5, 10, 15, 20, 25℃ の 5 段階とし、光強度 150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の連続照明下において、各実験区の増殖ステージが定常期に達するまで培養を継続した。培養期間中は、細胞密度計測用として、10–25℃区からは毎日、5℃区からは 2 日から 2 週間毎に試料を採取し (20–100 $\mu\text{L} \times 4$ 本)、酸性ルゴール溶液で固定した (最終濃度 1%)。また、細胞体積計測用には、各実験区の誘導期 (実験開始から 1 日目)、対数期 (25℃では 3 日目、20℃、15℃では 5 日目、10℃は 7 日目、5℃では 45 日目)、および定常期 (実験終了時) に 1 mL の試料を採取し、中性化ホルマリン (最終濃度 5%) で固定した。なお、試料採取の際には、試料均一化を図るために培養容器をよく攪拌した。

2.3. 実験 2：エアレーション・攪拌による増殖実験 I

f/2-Si 培地で希釈調整した *Nannochloropsis* 培養液 500 mL を 1 L のガラス製三角フラスコに入れ、攪拌のみ、エアレーションのみ、エアレーション+攪拌、およびエアレーション無し・攪拌無し (コントロール区) の 4 実験区で培養実験を行った。この実験には人工気象器 (LH-240N、日本医化器械製作所) を使用し、実験温度 25℃、光強度 100 μmol の連続照明下で、各実験区の増殖ステージが定常期に達するまで培養を継続した。実験の初期密度は $1.0\text{--}1.5 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ であった。培養期間中は、細胞密度計測用として、各実験区から毎日試料を採取し (20–100 $\mu\text{L} \times 3$ 本)、酸性ルゴール溶液で固定した (最終濃度 1%)。また、この実験では栄養塩濃度の低下による増殖制限の可能性を排除するため、実験開始 3 日目以降は、試料採取後に採取した試料と同量の f/4-Si 培地を添加した。さらに、エアレーション実験区では水分蒸発により培養液量の減少と容器口部に塩結晶の析出が認められたため、減少した海水分をろ過海水で補給した。なお、攪拌には、マグネチックスターラー REXIM デジタルタイプ (RS-4DR、アズワン(株)社) を用い、回転数を 600 rpm で制御した。エアレーションはエアポンプ INNO- β 6000E (定格風量 6 L min^{-1} 、(株)ニッソー社) で行い、通気量は 1.2–1.3 L min^{-1} とした。また、送風チューブの先には高温焼結エアストーンバブルメート (L20 mm, (株) スドー社) を取付けた。

2.4. 実験 3：エアレーション・攪拌による増殖実験 II

上述の実験で、エアレーションによる細胞収量の増加が確認されたため、さらに通気量を変えた実験を行った。追加実験区は通気量を 50、100、200、300 および 500 mL min^{-1} とした 5 区である。なお、通気量の変更にともない、エアポンプを NON-NOISE W300 (定格風量 0.5–2 L min^{-1} 、アテム社) に交換し、さらに攪拌による水滴の跳ね上がりを軽減させるために回転数を 400 rpm に落として実験を行った。それ以外の培養条件、培養期間、試料採取法は、2.3 に準じた。実験の

初期密度は $1.5\text{--}2.4 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ から開始した。

2.5. 細胞密度、細胞体積および増殖速度の見積り

細胞数計数には血球計算盤を用いた。細胞体積の計測は、ホルマリン固定試料を核染色試薬 DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole, Sigma Chemical Co.) および 細胞質染色試薬 proflavine (3,6-diamino-acridine as hemisulfate salt, Sigma Chemical Co.) で 10 分間染色し、孔径 $0.2 \mu\text{m}$ のポリカーボネイトフィルター上に捕集後、イメージンオイルによる封入でプレパラート作成してから行った。デジタルカメラ (Nikon DS-Fi1C-U3) を装着した正立蛍光顕微鏡 (NikonEclips 80i) を用いて蛍光像を撮影し (BV 励起、倍率 1,000 倍)、ランダム抽出した細胞 ($n=50$) について細胞の長径、短径を測定した。細胞体積 (V) は、細胞形態を回転楕円体とみなして、式 $V = ab^2\pi/6$ より求めた。 V は細胞体積 (μm^3)、 a は長径 (μm)、 b は短径 (μm) である。最大増殖速度 μ_{max} は、Guillard (1973)⁽¹²⁾ に従い、対数増殖期における増殖曲線の曲線回帰により求めた。回帰するデータ区間は回帰式の決定係数が最大となる区間とし、データ数は 4 点以上とした。細胞当たりの生産量 (P , $\mu\text{m}^3 \text{ d}^{-1}$) は、式 $P = \mu_{\text{max}} \times V$ より求めた。

3. 結果

3.1. 実験 1：異なる水温条件下での増殖速度と細胞サイズ

図 1 に *Nannochloropsis* sp.1 の増殖曲線を示した。いずれの実験区も実験開始 (初期密度 $5.5 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$) から数日間の誘導期を経て対数増殖期に入り、 $1 \times 10^7 \text{ cells mL}^{-1}$ 前後で増殖速度が低下し始め、細胞密度 $3\text{--}5 \times 10^7 \text{ cells mL}^{-1}$ で定常期に達した。誘導期、対数増殖期の長さはともに 25°C で最も短く、低水温ほど長くなる傾向がみられた。なお、 25°C 以外の実験区では誘導期 2 日目までに細胞密度が実験開始時 (初期密度 $5.5 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$) の 45–70% まで減少した。細胞密度が最大となるまでに要した日数は、 5°C で 94 日、 10°C – 25°C で 17–18 日であり、最終細胞収量は 5、10、15、20 および 25°C でそれぞれ 3.9×10^7 、 3.0×10^7 、 5.2×10^7 、 6.6×10^7 および $5.5 \times 10^7 \text{ cells mL}^{-1}$ に達した。

μ_{max} は、すべての実験区において水温とともに増大し、5、10、15、20、 25°C の順にそれぞれ 0.19、0.48、0.83、1.08、 1.31 d^{-1} と見積もられ (表 1、図 2)、 $5\text{--}25^\circ\text{C}$ の範囲内において、水温と μ_{max} との間には強い正の直線関係が認められた (G ($\mu_{\text{max}} = 0.0568T - 0.0740$, $R^2 = 0.984$))。 *Nannochloropsis* sp.2 については、実験期間を *Nannochloropsis* sp.1 の約半分で終了 (10 日間) したことから、期間中の細胞密度はいずれの実験区も $1 \times 10^7 \text{ cells mL}^{-1}$ に達しなかったが、

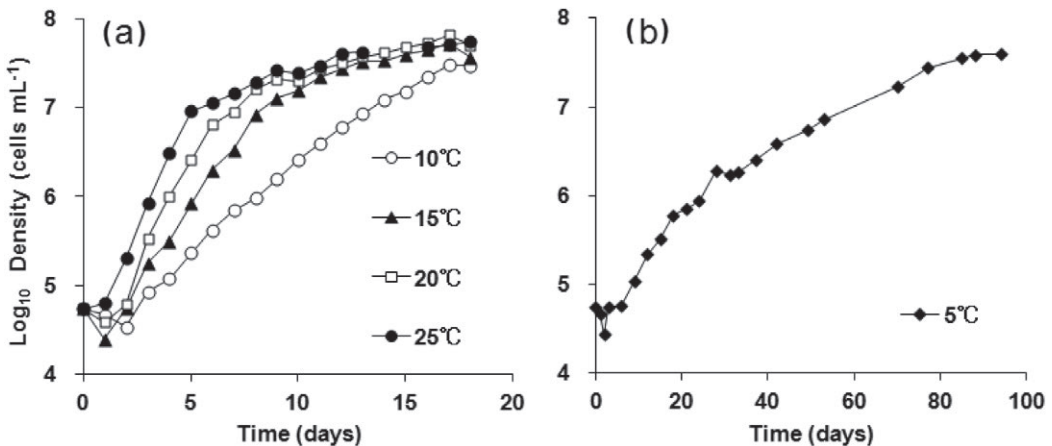


図 1 異なる環境水温下で培養した *Nannochloropsis* sp.1 の増殖曲線。
(a) ●: 25°C , □: 20°C , ▲: 15°C , ○: 10°C , (b) ◆: 5°C .

表 1 異なる水温下における *Nannochloropsis* sp.1 & *N.sp.2* の $\mu_{\max}$ 、倍加時間および各増殖ステージにおける平均細胞体積。

species	Temperature (°C)	specific growth rate (d ⁻¹)		doubling time (d)	Cell volume (μm ³)		
		$\mu_{\max}$	R ²		lag	Exponential	Stationary
<i>Nannochloropsis</i> sp.1	5	0.19	0.993	3.65	32.9 ± 20.0	62.4 ± 43.0	64.5 ± 20.9
	10	0.48	0.996	1.44	42.5 ± 46.6	53.5 ± 41.4	64.0 ± 34.0
	15	0.83	0.995	0.84	39.2 ± 35.0	37.4 ± 20.9	21.0 ± 22.5
	20	1.08	0.985	0.64	34.8 ± 12.6	16.7 ± 5.1	19.5 ± 9.2
	25	1.31	0.999	0.53	22.8 ± 8.1	17.5 ± 5.1	14.8 ± 9.5
<i>Nannochloropsis</i> sp.2	5	0.15	0.999	4.65	-	67.2 ± 50.1	-
	10	0.34	0.942	2.04	-	68.2 ± 55.2	-
	15	0.58	0.978	1.20	-	52.6 ± 43.1	-
	20	0.77	0.909	0.90	-	-	15.6 ± 4.3
	25	1.14	0.980	0.61	-	-	15.3 ± 4.2

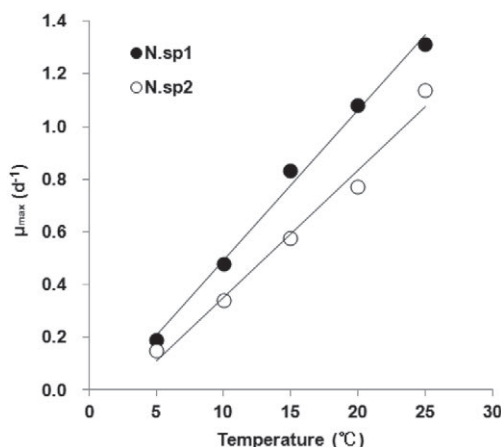


図 2 *Nannochloropsis* の対数増殖期における比増殖速度 ($\mu_{\max}$) と水温の関係。●: *Nannochloropsis* sp.1, ○: *Nannochloropsis* sp.2

Nannochloropsis sp.1 と同様に水温と $\mu_{\max}$ との間には強い正の直線関係が認められた ($\mu_{\max} = 0.0481T - 0.1273$, $R^2 = 0.984$) (図 2)。

Nannochloropsis sp.1 の細胞サイズは、実験開始前（前培養の定常期）と比べて、いずれの実験区でも実験開始 1 日後（誘導期）に著しく増加した（平均 ESD で 1.4~1.6 倍、平均細胞体積では 2.5~4.6 倍、 $p < 0.01$ ）（図 3）。細胞サイズはいずれの増殖ステージ（誘導期、対数期、定常期）でも低温側ほど大きい傾向を示したが、サイズの経時変化パターンは各実験区で異なり、5°C および 10°C では誘導期、対数期、定常期の順に増加傾向を示した一方、15°C、20°C および 25°C では誘導期から定常期に向けて減少する傾向を示

した。*Nannochloropsis* sp.2 の細胞サイズは、実験終了時にのみ計測したが、サイズの変化は、*Nannochloropsis* sp.1 と同様の温度依存性を示し、20°C、25°C 区のサイズは 15°C 以下の区より統計的に有意にサイズが小さかった。

以上で得られた $\mu_{\max}$ および細胞体積をもとに、対数増殖期における生産量を試算した。*Nannochloropsis* sp.2 は温度帯により細胞体積が測定された増殖ステージが異なるため、ここでは *Nannochloropsis* sp.1 の対数増殖期における試算結果のみを図 4 に示す。 $\mu_{\max}$ は温度とともに直線的に増加する一方、細胞容積は低温ほど大きくなるため、生産量は高温域（20~25°C）よりも 15°C、10°C のほうが高い結果となった。

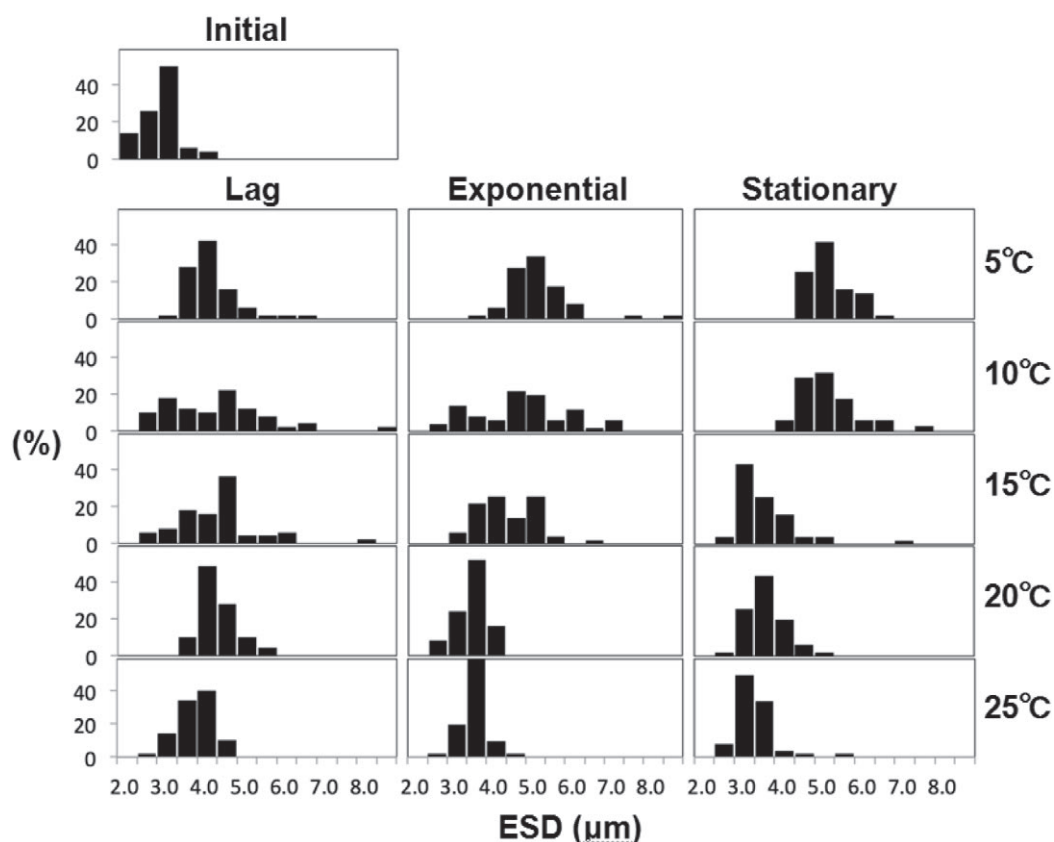


図3 *Nannochloropsis* sp.1の細胞サイズ (ESD, μm^3) の頻度分布. Initial: 実験開始前, Lag: 誘導期, Exponential: 対数増殖期, Stationary: 定常期

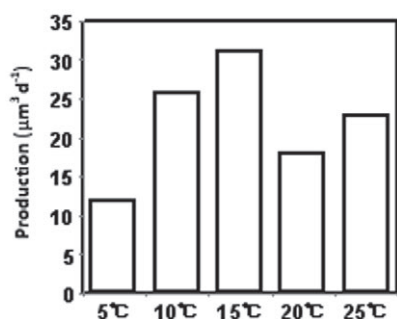


図4 *Nannochloropsis* sp.1 対数増殖期における細胞当たりの生産量 ($\mu\text{m}^3 \text{d}^{-1}$)

3.2. 増殖に及ぼすエアレーション・攪拌の影響 (実験2および3)

実験2では、攪拌のみ(600 rpm)、エアレーションのみ(1300 mL min^{-1})、エアレーション+攪拌の3区とエアレーション無し・攪拌無しのコ

ントロール区での増殖速度および細胞収量を比較した。実験開始(初期密度 $5.5 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$)から4日目までは、*Nannochloropsis* sp.2の細胞密度はいずれの実験区もほぼ同様の増殖を示したが、その後はエアレーション有りとなしの実験区で異なる挙動を示した。すなわち、コントロールおよび攪拌のみの実験区では4日目以降、増殖速度は急激に鈍化して定常期に移行した(最高密度はそれぞれ 7.4×10^6 および $6.8 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$)のに対し、エアレーション区およびエアレーション+攪拌区では6日目まで対数増殖が続き、8-10日目にはそれぞれの実験区で 1.6×10^8 および $1.8 \times 10^8 \text{ cells mL}^{-1}$ に達した(図5)。 μ_{max} は、攪拌区で 0.96 d^{-1} ($R^2=0.983$)、エアレーション区で 1.04 d^{-1} ($R^2=0.994$)、エアレーション+攪拌区で 1.16 d^{-1} ($R^2=0.994$)、コントロール区で 0.93 d^{-1} ($R^2=0.986$) と見積もられた。実験2で通気

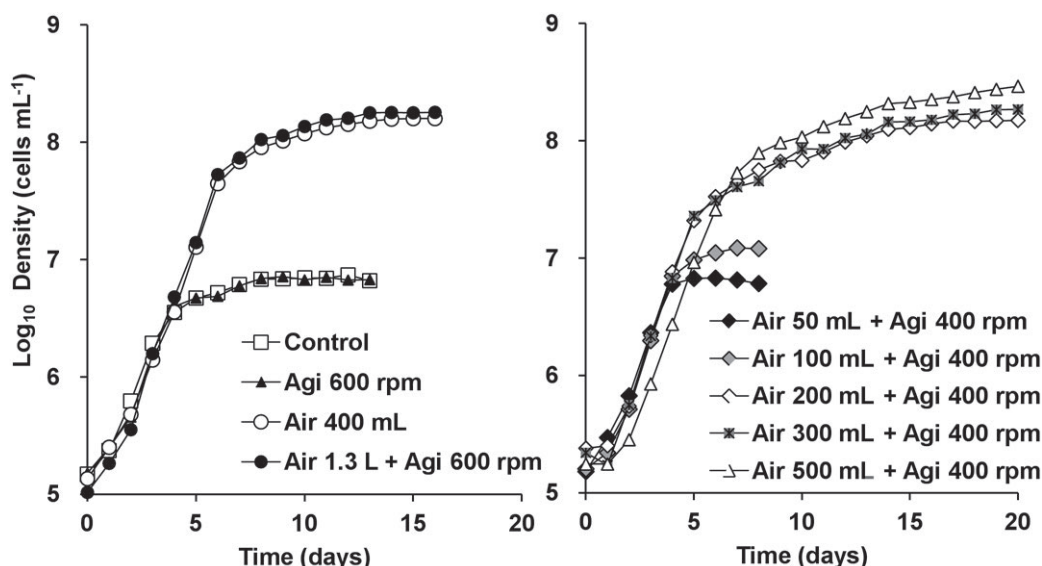


図5 エアレーションおよび攪拌条件下における *Nannochloropsis* sp.2 の増殖曲線。(a) 実験2、(b) 実験3。Control: エアレーション、攪拌ともに無し、Air: エアレーション (大気 mL min⁻¹)、Agi: 攪拌 (回転数 rpm)。

による収量増加の効果が確認されたことから、実験3では、通気量を 50–500 mL min⁻¹ の範囲内で5段階に変えた実験を行った。その結果、 $\mu_{\max}$ はいずれの実験区も実験2のエアレーション区とほぼ同様の値を示した ($\mu_{\max}$ 1.04–1.24 d⁻¹)。また、細胞収量は、200 mL min⁻¹ 以上の実験区で実験開始から10–12日後に 1×10^8 cells mL⁻¹ を越え、300 mL min⁻¹ および 500 mL min⁻¹ では最終細胞収量がそれぞれ 3.4×10^8 、 3.6×10^8 cells mL⁻¹ に達した。

4. 考察

4.1. 増殖速度と水温の関係

実験目的に応じて実験条件や増殖速度の評価方法が異なるため、既往データを比較参考とする場合には注意が必要である。*Nannochloropsis* の増殖速度に関する報告例は比較的多いが、増殖速度と温度の関係については、4例報告があるのみである。そのうち、Sandnes et al. (2005)⁽⁸⁾、Chen et al. (2012)⁽⁹⁾、Wagenen et al. (2012)⁽¹⁰⁾ には、それぞれ実験対象種や温度以外の環境条件に違いはあるものの、共通点が見られる。すなわち、いずれの種も増殖速度は温度上昇とともに増加して25–26℃で最大となり、それ以上の温度では急激に増殖速度が低下し、35℃でゼロ以下となること

が報告されている。本研究でも *Nannochloropsis* sp.1、sp.2 の $\mu_{\max}$ は明瞭な温度依存性を示し、最大値は実験温度範囲内における最高温度の25℃で達成された。本研究では、培養温度が25℃より高い温度領域での実験は行っていないが、既往報告例より、*Nannochloropsis* sp.1、sp.2 の増殖最適温度も25℃付近であることが予想される。なお、上述の既往3報はいずれも比較的高温領域(下限が13.5℃、上限が40℃)における増殖速度と温度の関係を調べたものであるが、13℃以下の温度領域における増殖速度と温度の関係についての報告は過去に例がなく、本研究が初の報告とされる。本研究の結果、*Nannochloropsis* sp.1、sp.2 の増殖速度は培養温度の低下とともに減少したが、5℃という低温下でも増殖可能であることが明らかとなった。このことは、温帯–亜寒帯域の自然環境を利用した微細藻類の大規模培養法の確立を将来目標とする上で、重要な意味を持つ。ただし、5℃での増殖速度は遅く、倍加時間は25℃に比べて約7倍を要した。増殖速度と温度の関係について特筆すべきもう一つの興味深い点は、両株の $\mu_{\max}$ は5℃から25℃の範囲内で、温度に対して直線的に増加したことである(図2)。上述の既往文献では直接言及されていないが、記載されたグラフデータからは、他の

Nannochloropsis 種でも、最適増殖温度以下の領域での増殖速度と温度の関係も本研究同様に直線的であることが読み取れる。外温生物の増殖速度は、適温帯で温度とともに増大し、最適温度以上で急激に減少することが広く知られおり⁽¹³⁾、水温と最大増殖速度の関係はしばしば指数関数式に当てはまりが良いために Q_{10} 則が適用されることが多い⁽¹⁴⁾。これに対して、Montagnes et al. (2003)⁽¹⁵⁾ は、様々な原生生物の最大増殖速度と温度の間の関係を示す既往データについて統計解析した結果、それらの大部分はむしろ直線関係であると結論付けている。本研究の結果はこの主張によって支持される。増殖速度と温度の関係を直線的とみなすか指数関数的とみなすかは、モデル式による増殖速度の予測精度を大きく左右するため、今後、*Nannochloropsis* についての増殖モデル式をたてる場合には、増殖速度と温度の関係を直線的として扱うことがより適切であるといえよう。

4.2. 細胞サイズと温度の関係

Nannochloropsis sp.1 の細胞サイズは、いずれの実験区でも実験開始 24 時間後に増大した (図 3)。実験開始前 (前培養の定常期) と各実験区誘導期の培養環境条件の違いは、温度以外に、栄養塩濃度、無機炭素濃度、老廃物濃度、pH の他、光環境 (藻類密度に依存した光遮蔽効果による) などが挙げられる。本実験では実験前後の環境パラメータ各種を測定していないためにサイズ変化に与える因子を特定することはできなかったが、本研究の結果は、温度以外にも、短期間のサイズ増加 (もしくは回復) をもたらす要因が存在すること示唆している。一方、対数増殖期、定常期における *Nannochloropsis* sp.1、sp.2 のサイズは、ともに低温側で大きく、高温側で小さくなる傾向を示した。原生生物を含む、外温生物の細胞サイズと環境水温が負の相関を示すことは広く知られており⁽¹⁶⁾、本研究の結果もそれと矛盾しない。なお、実験温度範囲内では、水温低下に伴い増殖速度は直線的に減少する一方、細胞サイズは増大した。これにより、生産量は 15℃で最大 ($31.1 \pm 17.3 \mu\text{m}^3 \text{d}^{-1}$) となることが明らかとなった (図 4)。最小値は 5℃で $11.9 \pm 8.2 \mu\text{m}^3 \text{d}^{-1}$ と

試算されたが、15℃との差は 2.6 倍にとどまる。以上は、あくまで細胞体積ベースで試算された結果だが、*Nannochloropsis* は低温領域 (5–15℃) でも増殖最適温度 (25℃) に近いレベルで生産性を維持できる可能性があることを示唆している。今後は、細胞体積以外に、乾燥重量や脂質量での生産量評価が必要となろう。

4.3. 増殖速度および細胞収量に及ぼすエアレーション・攪拌の影響

培養液の攪拌は藻類の増殖に影響を与えうる要因の一つである⁽¹⁷⁾。攪拌操作は、細胞の分布と細胞周囲の物理・化学環境 (例えば、水温、栄養塩、光強度) 状態を均一化させることで増殖に促進的に作用する場合もあれば、細胞にダメージを与え、増殖を制限する場合もある。実験 2 では、連続攪拌区とコントロール実験区 (エアレーション無し、連続攪拌無し) の μ_{max} および最大細胞収量はほぼ同程度の値を示したことから、連続攪拌が *Nannochloropsis* の増殖に与える影響は極めて小さいと判断された。一方、マイクロバブルのエアレーションは攪拌同様の作用を細胞および培養環境にもたらすことに加えて大気成分を溶液中に供給する。大気成分の中で藻類の増殖生理に直接的な影響を与え得るものとしては二酸化炭素と酸素が挙げられる。

本実験では、通気量 200 mL min^{-1} 以上のエアレーションで増殖促進効果 (最大増殖速度を維持しながら対数増殖期間が延長した) が顕著となり、細胞収量は $1 \times 10^8 \text{ cells mL}^{-1}$ を超えた。コントロール区および攪拌のみの区では細胞収量が $1 \times 10^7 \text{ cells mL}^{-1}$ に達しなかったことより、増殖促進効果は、通気成分中の二酸化炭素によるものと解釈される。すなわち、エアレーション無しの場合、藻類の光合成活動に伴う無機炭酸塩濃度の減少に制限されて増殖は低下するが、エアレーション条件下では供給された二酸化炭素の一部が溶存態の無機炭素源となり、藻類の増殖制限を緩和もしくは増殖促進させたと考えられる。なお、このレベルでの二酸化炭素供給では *Nannochloropsis* の増殖速度に対して改善効果は期待できない。

一方、酸素については、供給量が過剰な場合、

藻類の増殖を阻害することが指摘されている^(18,19,20)。Raso et al. (2012)⁽²¹⁾は、*Nannochloropsis* sp.について、光未飽和条件下 ($100 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) で通気酸素飽和度のみを変えた実験 (O_2 飽和度 20~250%) を行った結果、75%以下では比増殖速度に与える影響は確認されず、100%以上で酸素飽和度の増加に伴い増殖速度が直線的に低下することを報告している。本実験では通気量 $0 \sim 1300 \text{ mL min}^{-1}$ の範囲において、通気量によらず μ_{max} はほぼ同様の値を示した。このことから、酸素による増殖阻害効果はなかったと判断された。

5. まとめ

異なる温度下での実験結果、*Nannochloropsis* は、 5°C という低温下でも増殖可能であることが確認された。また、増殖速度は明瞭な温度依存性を示し、温度上昇に伴い直線的に増加する関係を示すことが明らかとなった。一方、細胞サイズは低水温ほど増大した。これにより、対数増殖期における生産量は $10 \sim 15^\circ\text{C}$ で最大となり、 5°C でもその $1/2 \sim 1/3$ 程度の生産が見込まれることが明らかとなった。さらに、大気レベルの二酸化炭素 ($0.04\% \text{ CO}_2$) 供給により、細胞収量が10倍以上に増加させることが可能であることが示された。

Raso et al. (2012)⁽²¹⁾は、*Nannochloropsis* sp. の光合成速度が光強度 $200 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (25°C) で飽和すると報告している。本実験の光強度レベルはそれ以下であったことから、光強度を上げることさらに μ_{max} を高めることは可能かもしれない。今後は、低温域での通気効果、光強度の影響についても知見を蓄積する必要があるだろう。

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) 井上勲 著 (2006) 藻類 30 億年の自然史 —藻類からみる生物進化—。東海大学出版会
- (2) Chisti, Y. (2007) Biodiesel from Microalgae. *Biotech. Adv.*, 2: 294-306.
- (3) Spolaore P, C. Joannis-Cassan, E. Duran, A. Isambert (2006) Commercial applications of Microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101 (6): 201-211.
- (4) Hibberd, D. J., G. F. Leedale (1970) Eustigmatophyceae a new algal class with unique organization of the motile cell. *Nature* 225: 758-760.
- (5) Sukenik, A. (1991) Ecophysiological considerations in the optimization of eicosapentaenoic acid production by *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). *Bioresour. Technol.* 35 (3): 263-269.
- (6) Sukenik, A. (1998) Production of eicosapentaenoic acid by the marine eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. In: Cohen, Z. (ed.), *Chemicals from Microalgae*. Taylor and Francis, London.
- (7) Okauchi, M. (2004) An Assessment of the Beneficial Roles of *Nannochloropsis oculata* in Larval Rearing of Marine Finfish. *Bull. Fish. Res. Agen. Suppl.* 1: 83-90.
- (8) Sandnes, J. M., T. Källqvist, D. Wenner, 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.
- (9) Chen, S. Y., L.Y. Pan, M. J. Hong, A. C. Lee (2012) The effects of temperature on the growth of and ammonia uptake by marine microalgae. *Botanical Studies* 53: 125-133.
- (10) Wagenen, J.V., T.W. Miller, S. Hobbs, P. Hook, B. Crowe, M. Huesemann (2012). Effects of Light and temperature on fatty acid production in *Nannochloropsis salina*. *Energies* 5:731-740.
- (11) Sayegh, F.A.Q., D.J.S. Montagnes (2011) Temperature shifts induce intraspecific variation in microalgal production and biochemical composition. *Bioresour. Technol.* 102: 3007- 3013.
- (12) Guillard, R.R.L. (1973) Division rates. In: Stein (ed), *Handbook of phycological methods*, V. 1, Cambridge University Press, Cambridge. 289-312.
- (13) Atkinson, D., B. J. Ciotti, D. J. S. Montagnes (2003) Protists decrease in size linearly with

temperature: *ca.* 2.5% °C⁻¹. *Biol. Science*.

DOI:10.1098/rspb.2003.2538

(14) Eppley, R. W. (1972) Temperature and phytoplankton growth in the sea. *Fish Bull.* 70: 1063-1085.

(15) Montagnes, D. J. S., S. A. Kimmance, D. Atkinson (2003) Using Q10: Can growth rates increase linearly with temperature? *Aquat. Microb. Ecol.* 32: 307-313.

(16) Atkinson, D., R. M. Sibly (1997) Why are organisms usually bigger in colder environments? Making sense of a life history puzzle. *Trends Ecol. Evol.* **12**, 235-239.

(17) Soeder, C., F. Stengel (1974) Physico-chemical factors affecting metabolism and growth rate, In: W.D.P. Stewart (ed.), *Algal physiology and biochemistry*, Blackwell publ., London, 714-740.

(18) Ogawa T, T. Fujii, S. Aiba (1980) Effect of oxygen on the growth (yield) of *Chlorella vulgaris*. *Arch. Microbiol.* 127: 25-31.

(19) Ohnishi N, S. I. Allakhverdiev, S. Takahashi, S. Higashi, M. Watanabe, Y. Nishiyama, N. Murata (2005) Two-step mechanism of photodamage to photosystem II: step 1 occurs at the oxygen-evolving complex and step 2 occurs at the photochemical reaction center. *Biochem.* 44: 8494-8499.

(20) Vonshak A, G. Torzillo, P. Accolla, L. Tomaselli (1996) Light and oxygen stress in *Spirulina platensis* (cyanobacteria) grown outdoors in tubular reactors. *Physiol. Plant.* 97: 175-179.

(21) Raso, S., B. vanGenugten, M. Vermuë, R. H. Wijffels (2012) Effect of oxygen concentration on the growth of *Nannochloropsis* sp. at low light intensity. *J. Appl. Phycol.* DOI 10.1007/s10811-011-9706-z.