

アナリティカルレポート[†]

生長段階での微細藻類バイオマス量の間接的測定法の評価

山口 航平^{*1}, 奥村 真子¹, 三木 理¹

1 緒 言

微細藻類とは細胞径が数 μm のあらゆる水圏に生息する単細胞生物である。微細藻類は体内に多量の脂質やタンパク質を蓄えることが知られており、その利用が検討されている。中でも *Chlorella* や *Nannochloropsis* に代表される微細藻類はその増殖特性の良さなどから、古くから稚仔魚の飼料となるワムシの餌として利用されている¹⁾。また近年では微細藻類が持つ光合成色素であるクロロフィルやカロテノイド等の健康機能が注目され、健康食品としての研究や販売も盛んに行われている。さらには体内に石油に近い成分の脂質を蓄えることから、次世代バイオマス燃料源としても期待され、多くの研究者や企業により研究・開発が進められている²⁾。

このように、微細藻類は数々の分野での利用が期待されており、研究段階や実用段階においてバイオマス量の把握は必要不可欠である。バイオマス量は単位体積当たりの細胞密度や乾燥重量といった指標で評価するのが一般的である。細胞密度は血球計算盤やバクテリアカウンターを用いて求められてきた。血球計算盤やバクテリアカウンターは同一の目盛りが刻まれた計算室を持ち、計算室の細胞数をカウントすることで細胞密度を求めることができる。乾燥重量は、培養液をろ過することにより捕集された微細藻類を高温で乾燥させることでその質量を求める方法である。これらの測定方法はバイオマス量を正確に測定できる一方で、多くの作業過程を必要とすることから、多大な時間を要し、また個人差が大きくなるという欠点がある。そのため、手早く簡単に、かつ正確にバイオマス量を把握できる間接的な手法の開発が行われてきた。

この代表的な方法として吸光度法や蛍光強度法が挙げられる。吸光度法や蛍光強度法は微細藻類中に含まれるクロロフィル *a* に起因する吸光度や蛍光強度を利用してバイオマス量を測定する方法である^{3,4)}。しかし、微細藻類は一般的に、順応期、対数増殖期、定常期、死滅期といった生長

段階を経て増殖するが、その間クロロフィル量に変化することが報告されている⁶⁾。また Ramenshprabu らはクロロフィルと乾燥重量には相関性がなく、クロロフィル量ではバイオマス量を推定することができないことを示唆している⁷⁾。

また微細粒子数を直接カウントできる手法も開発されている。例えば、画像から微細藻類を識別し測定する手法や電気抵抗を利用した手法などがある⁵⁾。その代表としてコールターカウンターがある。コールターカウンターはアパチャーチューブの先端から溶液を吸引しその間に通過した懸濁物質による電気抵抗から細胞数をカウントする機械である。

このように微細藻類を間接的に評価する様々な方法が存在するが、バイオマスの研究においてどの間接的手法が最も適しているかを報告した事例は少ない。そのため、改めて様々な生長段階を通じてクロロフィルを利用した間接的な手法や細胞粒子をカウントする様々な手法でバイオマス量の評価が可能であるかを確かめる必要がある。

そこで本研究では、微細藻類バイオマスの代表的な評価パラメーターである細胞密度、乾燥重量の二つに対し、吸光度法、蛍光強度法、コールターカウンターの三つの間接的手法が生長段階に関係なく正確にバイオマス量を測定できるか議論した。

2 実 験

2・1 対象藻類及び培養方法

本実験では対象藻類として自然界から単離された *Chlorella* sp. を用いた。培地には栄養塩強化培地 (トリスヒドロキシメチルアミノメタン: 97.8 mg L^{-1} , 塩化アンモニウム: 191 mg L^{-1} , グリセロリン酸二ナトリウム五水和物: 29.6 mg L^{-1} , エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物: 8.12 mg L^{-1} , 硫酸アンモニウム鉄(II)六水和物: 3.43 mg L^{-1} , ホウ酸: 5.58 mg L^{-1} , 塩化鉄(III)六水和物: 0.24 mg L^{-1} , 硫酸マンガン(II)四水和物: 0.802 mg L^{-1} , 硫酸コバルト(II)七水和物: 0.0235 mg L^{-1} , 硫酸亜鉛七水和物: 0.108 mg L^{-1} , ビタミン B₁₂: $1.96 \mu\text{g L}^{-1}$, チアミン塩酸塩: $19.6 \mu\text{g L}^{-1}$, ビオチン: 1.96 mg L^{-1}) を用いた。*Chlorella* sp. の密度がおおよそ $3.0 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ になるよう

[†] 若手研究者の初論文特集

^{*} E-mail: kohei_y@stu.kanazawa-u.ac.jp

¹ 金沢大学大学院自然科学研究科機械科学専攻: 920-1192 石川県金沢市角間町

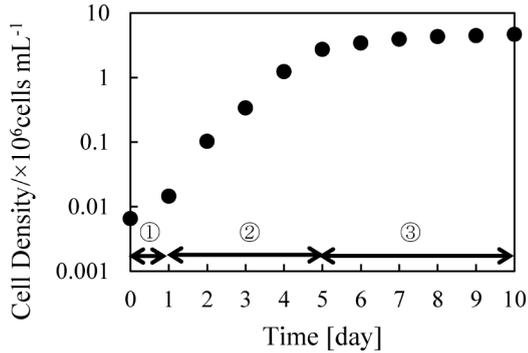


Fig. 1 Growth curve of *Chlorella* sp.

① lag phase, ② log phase, ③ stationary phase.

に調整し、1 Lのショットビン中でバッチ培養を行った。培養ビンには人工気象器 (SLC-25A, 三菱電機エンジニアリング) 内に入れ、室温 30 °C に保った。また光源に白色 LED (SLED-F30D, 日本グローバル照明) を用い、光強度を $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ とし、プログラムタイマーにより明暗周期を明: 12 h; 暗: 12 h で設定した。なお培地や培養ビンなどの器具はオートクレーブ滅菌を施し無菌状態を保った。

2.2 実験操作

Chlorella sp. の生長曲線を Fig. 1 に示す。培地に *Chlorella* sp. を添加した日を 0 日目として、Fig. 1 から 0 ~ 1 日目を順応期、1 ~ 5 日目を対数増殖期、5 ~ 10 日目を定常期と判断した。したがって対数増殖期の *Chlorella* sp. を 3, 4, 5 日目の培養液から、定常期の *Chlorella* sp. を 9, 10 日目の培養液から採取した。また各間接的手法が *Chlorella* sp. の濃度の測定への影響を調査するため、3 ~ 5 日目に対しては等倍、10, 100 倍に希釈したサンプルをそれぞれ二つずつ用意した。9, 10 日目のものに対しては等倍、10, 50, 100, 500, 1000 倍に希釈したものをサンプルとして用意した。合計 30 個のサンプルに対して各測定方法により測定を行った。

2.3 測定方法

2.3.1 細胞密度測定 細胞密度の測定はバクテリアカウンター (サンリード硝子, バクテリアカウンター) を使用した。バクテリアカウンターの計算室上にサンプルを少量落とし、ニュートンリングが見えるようにカバーガラスをセットした。その計算室の大ブロック上に存在する細胞数を顕微鏡により目視して直接計測した。大ブロックの計測を 4 回行い、その平均を測定値とした。

2.3.2 乾燥重量測定 乾燥重量は JIS K 0102 14.1⁸⁾ に従い、培養液中に含まれる SS 量として求め、具体的には 47 mm の GF/B ガラス繊維ろ紙でサンプル中の *Chlorella* sp. を捕集し、ろ過したサンプルと同量の蒸留水で洗い流し

た。105 °C のオーブンでそのろ紙を乾燥し、捕集した *Chlorella* sp. の質量を測定した。ろ過するサンプル量は *Chlorella* sp. の濃度により 30 ~ 1900 mL とした。

2.3.3 吸光度測定 吸光度の測定には分光光度計 (U2910 型分光光度計, 日立ハイテクサイエンス) を使用した。測定波長はクロロフィルによる濁度を最も感度良く測定できる 680 nm を用いた。測定前にセルを 3 回共洗いし、測定を行った。各サンプルに対し 3 回測定し、その平均値を算出した。

2.3.4 蛍光強度測定 蛍光強度の測定には分光光度計 (F-2500 型分光光度計, 日立ハイテクサイエンス) を使用した。測定波長はクロロフィル *a* の蛍光と考えられる EX/EM = 430 nm/680 nm を用いた。測定前にセルを 3 回共洗いし、測定を行った。また蛍光強度が 70 以上の条件では、測定値に藻類の懸濁による影響を及ぼすことから、任意の倍率に希釈して測定した。なお希釈による測定値への影響が無いことはあらかじめ確認されている。各サンプルに対し 3 回測定を行い、その平均値を算出した。

2.3.5 コールターカウンター ベックマン・コールター製のコールターカウンター Z 2 を用いて測定を行った。孔径 50 μm のアパチャーチューブを使用し、測定細胞径は 3 ~ 9 μm に設定した。また測定にはサンプルをアイソトン[®] で 20 倍希釈した溶液を用いた。測定は各サンプルに対し 5 回行い、その最大値と最小値をカットした三つの値の平均を測定値として採用した。

3 結果と考察

3.1 細胞密度と各測定手法の比較

バクテリアカウンターで測定した細胞密度と各間接的測定手法の関係を Fig. 2 ~ 4 に示す。分光光度計を用いた測定では低濃度のサンプルで測定できないものが四つ存在した。

さらにそれぞれの関係に対し、回帰分析を行った。その結果、決定係数の値は吸光度との関係式では 0.9505、蛍光強度では 0.9605、コールターカウンターとは 0.9907 となり、非常に高い相関性が認められた。またクロロフィルの増加による測定精度の違いは認められなかった。しかし、いずれの測定手法も低濃度帯の測定結果で相関性が低下していることが明らかになった。これはバクテリアカウンターによる細胞密度計測の際に、観測視野内にほとんど細胞が確認できなかったため、希釈倍率通りの細胞密度が計測できなかったと考えられる。またコールターカウンターにより数えた細胞密度と直接数えた細胞密度の関係式は傾きが 0.6064 となったが、これは *Chlorella* sp. の一部がコローニーを作っているため、それが一つの大きな塊としてまとめてカウントされたことが原因であると考えられる。

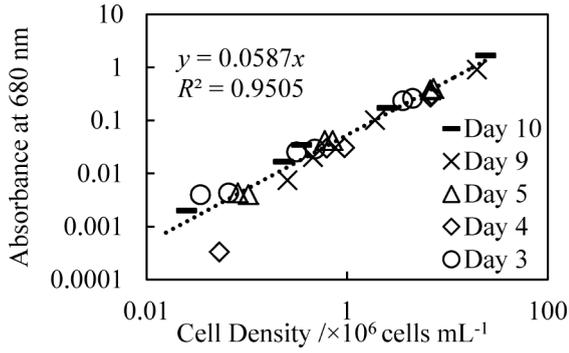


Fig. 2 Relationship between cell density and absorbance
data point: 26

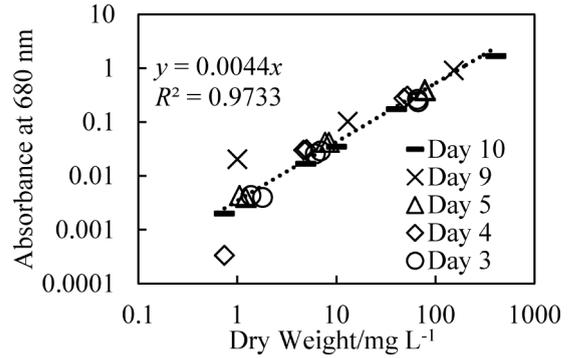


Fig. 5 Relationship between dry weight and absorbance
data point: 25

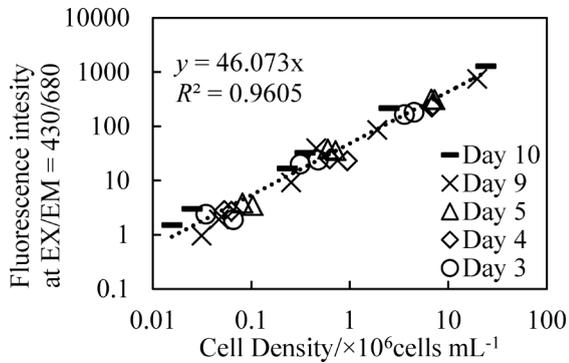


Fig. 3 Relationship between cell density and fluorescence intensity
data point: 30

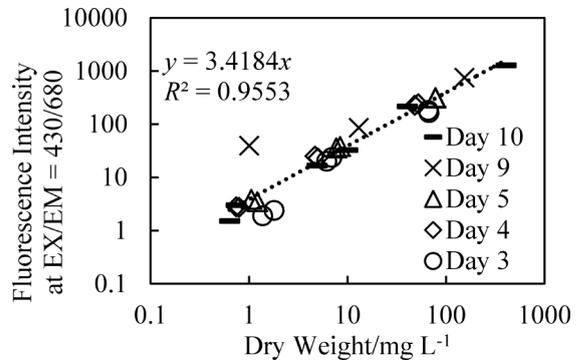


Fig. 6 Relationship between dry weight and fluorescence intensity
data point: 27

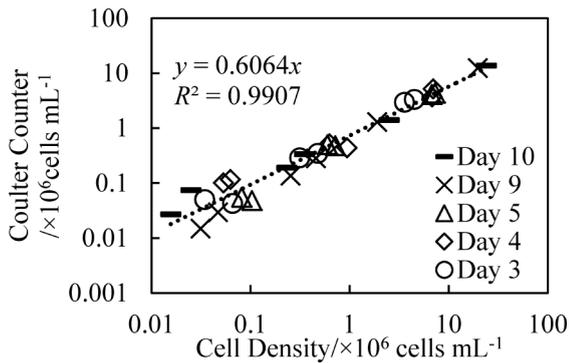


Fig. 4 Relationship between cell density and coulter counter
data point: 30

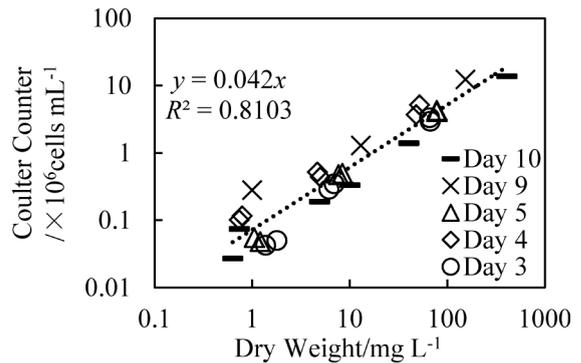


Fig. 7 Relationship between dry weight and coulter counter
data point: 27

3・2 乾燥重量と各測定手法の比較

乾燥重量と各間接的測定手法の関係を Fig. 5～7に示す。乾燥重量測定については捕集できた *Chlorella* sp. が極微量であったため、質量を測定できなかったサンプルが三つ存在した。

それぞれの関係に対し回帰分析を行った結果、決定係数の値は吸光度との関係式では0.9733、蛍光強度では0.9553、コーンターカウンターでは0.8103と高い直線性を示した。乾燥重量に対しても、生長段階による測定値への影響は見られなかった。また、低濃度帯では *Chlorella* sp. の

捕集量が少ないため相関性が低下する可能性がある。

4 ま と め

本研究では、生長段階による藻類中のクロロフィル含有量の変化が間接的手法を用いて藻類バイオマス量を測定する際の精度に影響を与えるのではないかと考え、いくつかの生長段階における *Chlorella* sp. を用意し、間接的手法の測定精度について議論した。その結果、何れの間接的手法も細胞密度と乾燥重量に対して決定係数が 0.8 を超えるなど生物を対象としたものとしては、非常に高い相関を示した。また生長段階の違いによる測定精度への影響は見られなかった。本研究から既存の間接的手法はクロロフィル含有量に変化している可能性のある条件でも精度を保って測定できることが明らかになった。これらのことから、クロロフィル量を利用してバイオマス量を高精度に測定できると考えられる。

文 献

- 1) 国内正典：日本水産学会，**68**, 625 (2002).
- 2) 小俣達男，藤田祐一，前田真一：光合成研究，**20**, 65 (2010).
- 3) 唐木沢秀之：新潟県水産海洋研究所研究報告，**1**, 23 (2002).
- 4) 中野和弘，大橋慎太郎，神 香純，宮下 渉：新潟大学農学部研究報告書，**65**, 93 (2012).
- 5) 鷺見育亮，太田 誠，藪木 登，尾保手茂樹，松田喜貴，副井 裕：電子情報通信会，**99**, 23 (1999).
- 6) P. Biller, A. B. Ross, S. C. Skill, A. Lea-Langton, B. Balasundaram, C. Hall, R. Riley, C. A. Llewellyn : *Algae Research*, **1**, 70 (2012).
- 7) Rameshprabu Ramaraj, David D-W. Tsai, Paris Honglay Chen : *Chiang Mai J. Sci.*, **40**, 547 (2013).
- 8) JIS K 0102 14.1, 工業排水試験法 (2013).

Evaluation of Indirect Measuring Methods for Microalgae Biomass at the Growth Stages

Kohei YAMAGUCHI^{*1}, Chikako OKUMURA¹ and Osamu MIKI¹

* E-mail : kohei_y@stu.kanazawa-u.ac.jp

¹ Division of Mechanical Science and Engineering, Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University, Kakuma-machi, Kanazawa-shi, Ishikawa 920-1192

(Received March 15, 2016; Accepted August 3, 2016)

The quantity of microalgae biomass has been evaluated mainly based on the cell density and dry weight. However, these direct measurement methods requires much time and effort. Therefore, indirect methods have been developed for rapid and easier measurements. Major examples are methods that take chlorophyll to account, such as an absorbance measuring method and a fluorescence intensity method. Since there was a report that the chlorophyll content changes at various microalgae growth stages, the accuracy of the measurement through various growth stages must be confirmed. Therefore, in this study, we examined the compatibility and accuracy of three indirect measurement methods: absorbance measuring method, fluorescence intensity method, and Coulter Counter method at each growth stage of microalgae. As a results, each indirect methods showed a high correction coefficient to both the cell density and the dry weight; no influence was observed regarding the growth stage and the measurement accuracy. However, each indirect method had their own characteristics. By considering the microalgae characteristic and the growth environment, a more accurate measurement can be made.

Keywords: microalgae; cell density; dry weight; absorbance; fluorescence; coulter counter.