

近赤外分光法による微細藻類培養時の収量予測に関する基礎的研究

中野和弘^{1*}・大橋慎太郎¹・神 香純²・宮下 渉¹

(平成24年8月9日受付)

要 約

脱化石燃料社会に向けて、新エネルギーの普及は喫緊の課題である。石油が原料である航空機燃料もバイオ燃料化することが求められるようになった。微細藻類は、ヤトロファ、カメリナ、パームなどの植物油より生産性が高いこと、生産地域を選ばないこと等から、微細藻類の航空機用バイオ燃料化に関する技術開発に大きな期待が寄せられている。そこで本研究では、微細藻類の効率的増殖技術を確立するための基礎的研究として、微細藻類培養時の収量の迅速測定方法について検討した。供試藻類はユーグレナとし、トーマ血球計算盤、自動細胞カウンタ、近赤外分光分析装置を用いた。その結果、近赤外分光法で作成された重回帰式から、藻類個体数と乾燥重量を非破壊的に精度良く計測できること等が分かった。また、藻類収量には藻類培養時の明暗周期が大きく影響していることも示唆された。

新大農研報, 65(1):93-97, 2012

キーワード：近赤外分光法、増殖速度、藻類個体数、微細藻類、ユーグレナ

1. はじめに

脱化石燃料社会に向けて、新エネルギーの普及は喫緊の課題である。石油が原料である航空機燃料もバイオ燃料化することが求められるようになった。現在、Jatropaha, Camellia, Palmなどの植物油に加え、生産性の高さ、ならびに地域を選ばない微細藻類を視野に入れ、再生可能航空機燃料利用協会(Sustainable Aviation Fuel Users Group, SAFUG, <http://www.safug.org>)は、バイオ燃料に関する技術開発に大きな期待を寄せている。

航空会社のうち11社はバイオ燃料を50%搭載した試験飛行を完了し、2012年までに3社が試験飛行を予定している(<http://www.enviro.aero/Biofues.aspx/>)。わが国の航空業界の航空機燃料の年間消費量は1,200万KLといわれ、そのうち首都圏からは120万KLが羽田空港、成田空港で使われている。2015年までにそのうちの5%(6万KL)を、また2020年までに10%の12万KLをバイオ燃料にすることが課せられている。

微細藻類は基本的な培養技術が確立されつつあり、極めて近い将来、大量生産が可能になると考えられる。しかし、藻類の違いや培養条件により増殖速度は異なる。それを例示した研究(Satoh, et al., 2010)では、シュードコリスチス・エリプソイディア(開放系培養)、クロロコッカム・リトレール(油質を含まない、閉鎖系培養)、ボトリオコッカス・ブラウニー(開放系培養)の増殖速度を比較した。P.エリプソイディアの最大成長率は3.46g/ℓ・dayで、これらは他の2つの微細藻類よりも速い。この文献において、P.エリプソイディアに注目している主な理由は、バイオディーゼル生産に必要なトリグリセリドがオレイン酸やパルミチン酸で構成されており、P.エリプソイディアにおいてオレイン酸・パルミチン酸がよく増加し、なおかつ増殖が速いためであると述べられている。しかし、P.エリプソイディアの炭化水素含量は、十分な窒素がある状態で0.77%(d.w.=dry weight)、窒素が不足した状態で9.1%

(d.w.)と述べられているため、窒素飢餓の状態が不可欠ということになり、培養条件の制御が難しくなる。

一方、農産物の内部成分を非破壊的に評価する技術として近赤外分光分析法があり、種々の研究(例えば、王ら, 2011; 滝沢ら, 2012)が報告されている。

そこで本研究では、微細藻類の効率的な大量培養技術を確立するための基礎的研究として、近赤外分光分析による藻類個体数および藻類乾燥重量の迅速測定方法について検討した。

2. 材料および方法

1) 供試した微細藻類

本研究では、独立行政法人 国立環境研究所 微生物系統保存施設(以下、NIES)から分譲されたユーグレナ・グラシリス(*Euglena gracilis* Klebs, 以下、ユーグレナ)を用いた(図1)。



図1 ユーグレナ・グラシリス

¹ 新潟大学大学院自然科学研究科

² 新潟大学農学部

* 代表著者: knakano@agr.niigata-u.ac.jp

表1 HUT 培地の組成

ポリペプトン Polypeptone	60 mg
酵母エキス Yeast extract	40 mg
酢酸ナトリウム Sodium acetate	40 mg
クエン酸カリウム Potassium citrate	4 mg
硫酸マグネシウム七水和物 MgSO ₄ · 7H ₂ O	2.5 mg
リン酸二水素カリウム KH ₂ PO ₄	2 mg
チアミン塩酸塩 Thiamine HCl	0.04 mg
ビタミンB12 Vitamin B12	0.05 μg
蒸留水	100 ml

これは、ユーグレナ綱ユーグレナ目ユーグレナ属に分類され、最大サイズは42 μmである。生殖は二分裂による無性生殖で、豊富なアミノ酸を含んでおり、人間が体内で合成できない必須アミノ酸を産生する。そのため、サプリメントやクッキーなどの機能性食品の原料に利用されている。脂質含有量が20～30%であることから、藻油産生藻類として各方面から研究がすすめられている。

2) 培地

NIESでは、ユーグレナの最適培地としてHUT培地を指定している。本研究でも、この培地を用いて培養した。組成を表1に示す。本研究では液体培地とし、pHは6.4に調整した。

3) 培養条件

培養温度は20℃とし、光源は光強度10,000Luxの人工太陽光（セリック株式会社）、明暗周期は1日の明期時間L：暗期時間D = 12hr：12hrとした。

4) 実験装置

Thoma（トーマ）血球計算盤：通常は、赤血球・白血球・髄液中の細胞をはじめ、精子・酵母・細菌類などの絶対数の多い細胞等の算定に使用する。スライドガラス上の計算室内（容積0.1 μl）にある細胞数を計測し計算した。1試料につき3回測定を行い、その平均値を1試料のデータとする。以下に、計測の手順を示す。

- 1) 攪拌振動機を用いてよく混和し、細胞分布を均一にする。
- 2) 藻体培養液を20 μl採取し、計算室内に入れカバーガラスを載せる。
- 3) 顕微鏡のステージに載せ、計算室全体が映った画像データを取得する。
- 4) 取得した画像から、計算室内の藻の個体数を計測する。

自動細胞カウンタ：Nexcelom Bioscience社製（Cellometer Auto T4 Plus、以下T4）を用い、専用セルチャンバーを

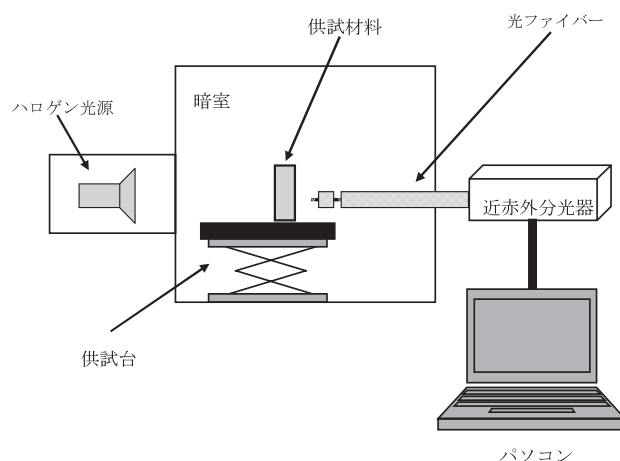


図2 近赤外分光分析装置の概要

cellometer 本体へ差し込み、得られる画像データを専用ソフトウェア（Cellometer Vision）で処理することで細胞数を自動的にカウントした。このソフトウェアでは、細胞数、最大径、最小径、コントラスト、細胞塊の境界度合等の数値を設定することができ、取得した画像データを処理することで、設定条件に適合した藻類個体数を自動計測する。

近赤外分光分析装置：ハロゲン光源、分光器、暗室およびパソコンから構成される。ハロゲン光を供試材料の片側から照射するように光源を設置し、もう一方の側面には供試材料からの透過光を受光するため分光器に接続された受光用の光ファイバーを設置した（図2）。以下に手順を示す。なお、本研究で用いた光源波長には可視光も含まれており、厳密には可視・近赤外分光分析であるが、従来からの用語として単に近赤外分光分析ということにした。

- 1) 光源の電源を入れて1時間程度放置し、光源を安定させる。
- 2) 攪拌振動機によりよく混和して、細胞分布を均一にする。
- 3) スペクトル測定のための以下の準備を行う。
 - ① ダークスペクトルを取得する。
 - ② リファレンススペクトルを取得する。供試藻類を設置せず、光源と受光ファイバーの間に超純水の入った石英標準セルを置き、オーバーブライghtしない程度の最大光源下でリファレンススペクトルを取得する。
- 4) 藻の培養液4mlを石英標準セルに入れる。
- 5) スペクトルデータを取得する。今回は光照射1.5msecで10回計測した結果の平均値を測定値とした。

5) 重回帰式の評価

重回帰式の評価については、重回帰式作成時では自由度調整済決定係数 (\hat{R}^2) と説明変数を考慮したSEC (Standard Error of Calibration) により評価を行った（涌井ら、2002）。また、重回帰式による予測値の評価ではSEP (Standard Error of Prediction) およびBiasにより評価を行った。 \hat{R}^2 は、実測値の変動を表し、SECは重回帰式作成時の誤差を表す。この値が小さいほど良いモデルが得られたといえる。SEPは、重回帰式評価時の誤差を表す。Biasは、実測値と予測値の偏差を表す。

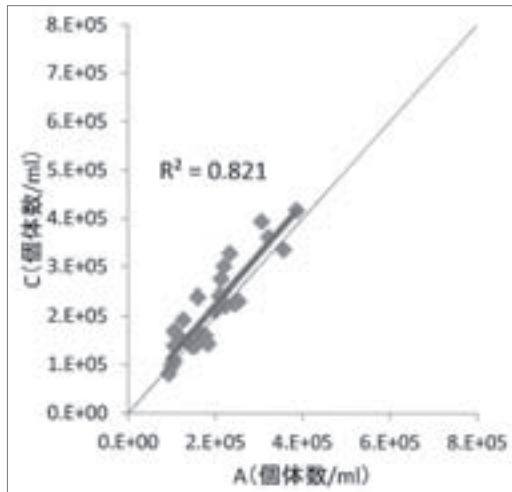


図3 各計測法による個体数の比較

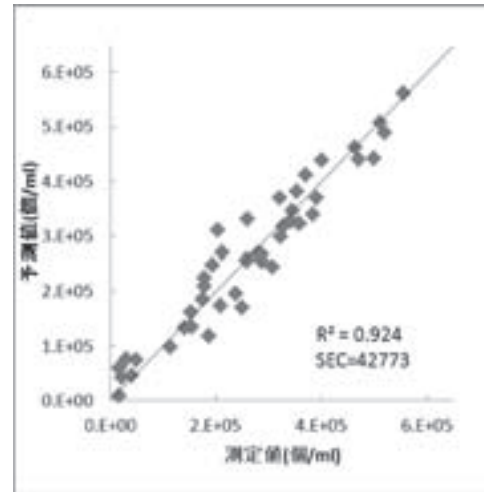


図4 藻類個体数の実測値と近赤外分光法による予測値の比較

6) 藻類の乾燥重量測定

以下の手順により、測定した。

- 1) 濾過機器にグラスファイバーフィルターをセットし、ファンネル内に超純水を注水する。
- 2) 超純水を通したフィルターをアルミホイルで包み、85℃で4時間乾燥させる。乾燥後、デシケーター内で放冷し、秤量する。
- 3) 濾過機器に乾燥グラフファイバーフィルター (Millipore社、APFF04700、フィルター孔径0.7μm、直径47mm)をセットし、ファンネル内に藻類培養液を注入する。濾過後、アルミホイルに包んだフィルターを100℃で4時間乾燥させる。
- 4) 乾燥後、デシケーター内で放冷し、秤量する。
- 5) 超純水を濾過し乾燥した後のフィルターの重量と培養液を濾過し乾燥した後のフィルターの重量の差を、藻の乾燥重量とした。

3. 結果および考察

1) トーマ血球計算盤と自動細胞カウンタの比較

図3に、トーマ血球計算盤(A)と自動細胞カウンタ(C)の比較を示す。同図において両者の測定結果がほぼ一致していることから、迅速に計測できる自動細胞カウンタでの計測結果を藻類の個体数とすることで問題ないと考えられる。

2) 近赤外分光分析法による藻類個体数の計測

ユーグレナ懸濁原液と、超純水で2倍および3倍に希釈した液の3種類を用意し近赤外分光法によるスペクトル特性を測定した。その結果、676nmにおける吸光度にピークが見られた。ユーグレナが持つクロロフィルaは約680nmの光を吸収することからも、この波長676nmは濃度との相関が高いと考えられる。そこで、676nmにおけるスペクトルを用いて、藻類個体数を予測する重回帰分析を行った。

図4に、近赤外分光法による藻類個体数の予測値と実測値(自動細胞カウンタ T4による計測)の比較を示す。同図において、両者の藻類個体数はほぼ一致していることから、近赤外分光法により藻類個体数を非破壊的に精度良く予測できることが分か

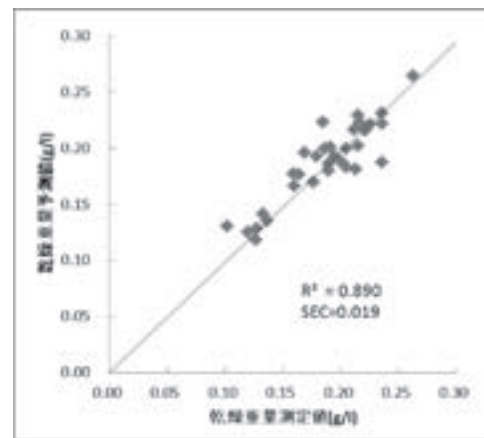


図5 藻類乾燥重量の実測値と近赤外分光法による予測値の比較

る。このことは、培養液中の藻類個体数を連続的に計測できることを示しており、今後の連続大量培養での藻類個体数管理に活用できるといえる。

また、同じ組成の培地を使い、培養時の明暗周期および培養温度を変化させた時の藻類個体数の違いを検討した(図は省略)。培養温度を25℃、培養時明暗周期(1日の明期L:暗期D)をL:D=16hr:8hrとした場合は、同20℃、L:D=12hr:12hrよりも約2倍の藻類個体数が得られた。一方で、培養温度を20℃から10℃へ変化させた場合でも藻類個体数はほとんど変わらなかったことから、藻類収量には藻類培養時の明暗周期が大きく影響しているものと考えられる。

3) 近赤外分光分析法による藻類乾燥重量の推定

測定によって得られた近赤外スペクトルの吸光度二次微分データから無作為に33データを重回帰式作成用として、17データを重回帰式評価用として分け、乾燥重量の推定を行った。重回帰式は、説明変数1波長~6波長について6通りを作成した。

本研究においてSEP値が最小となった重回帰式は、676nmを第一波長に選択した3波長変数による式であった。図5に、

藻類の乾燥重量の実測値（横軸）と近赤外分光法による予測値（縦軸）の比較を示す。

同図において、両者の値はほぼ一致していることから、近赤外分光法により培養液からの藻類の乾燥重量を非破壊的に精度良く予測できることが分かる。この方法は、今後の大量培養時の最終重量予測に応用できるものと期待される。

謝 辞

本研究は、新潟県受託研究「新潟県における微細藻類による炭化水素生産の可能性に関する調査研究」、新潟市受託研究「積雪寒冷地域における微細藻類からの B D F 生産技術体系の開発」、佐々木環境技術振興財団、内田エネルギー科学振興財団、科学研究費助成事業（挑戦的萌芽研究）「寡少日射・寒冷地域における藻油産生微細藻類の周年培養システムの開発」（課題番号 24658209）からの支援により実施、検討されてきた。また、（株）筑波バイオテック研究所（つくば市）には、本研究の実施に関して種々ご指導をいただいた。ここに記して、深く感謝申し上げます。

引用文献

- Akira Satoh, Misako Kato, Katsuyuki Yamato, Mizuki Ishibashi, Hiroshi Sekiguchi, Norihide Kurano and Shigetoh Miyachi. 2010. Characterization of the Lipid Accumulation in a New Microalgal Species, *Pseudochoricystis ellipsoidea* (Trebouxiophyceae). *Journal of the Japan Institute of Energy*, 89: 909-913.
- Jian Wang, Kazuhiro Nakano, Shintaroh Ohashi. 2011. Nondestructive evaluation of jujube quality by visible and near-infrared spectroscopy. *Food Science and Technology*. 44: 1119-1125.
- 再生可能航空機燃料利用協会 (Sustainable Aviation Fuel Users Group, SAFUG). 2012. <http://www.safug.org>.
- 滝沢憲一・中野和弘・大橋慎太郎・知野秀次・松本辰也・山澤康秀・児島清秀. 2012. 可視・近赤外分光法によるセイヨウナシ 'ル・レクチェ' の渋味果評価の可能性. *新大農研報* ., 64: 179-186.
- 涌井良平・涌井貞美. 2002. 図解でわかる回帰分析. Pp.67-80. 日本実業出版社, 東京.

Fundamental Study on the Yield Prediction during Cultivating of Microalgae by Using Near-infrared Spectroscopy

Kazuhiro NAKANO^{1*}, Shintaroh OHASHI¹, Kasumi JIN² and Wataru MIYASHITA¹

(Received August 9, 2012)

Summary

Alternative kinds of energy for petroleum-dependent society are considered to be imminent in these years. As for the aircraft fuel which is usually produced from petroleum oil, introducing of biofuel to aircraft is really desired. Because microalgae have higher productivity than vegetable oil such as Jatropha, Camellia or Palm oil and have an adaptive flexibility to production site, biofuel for aircraft produced from microalgae is greatly expected to establish the advanced conversion technology of biofuel.

In this study, the nondestructive rapid determination of population and dry weight of microalgae are discussed to establish the fundamental technique for efficient growth of microalgae. *Euglena* was used for experimental material. Thoma counting chamber, automatic cell counter and Near-infrared spectrometer were used for evaluate the yield of microalgae. As the results, the population and the dry weight of microalgae growing in cultures can be evaluated nondestructively with high accuracy by using multiple regression equation prepared from near-infrared spectroscopy. Light and dark cycle during cultivation is also considered to be effective on the yield of microalgae.

Bull.Facul.Agric.Niigata Univ., 65(1):93-97, 2012

Key words : *Euglena*, Growth rate, Microalgae, Near-infrared spectroscopy, Number of population of microalgae

¹ Graduate School of Science and Technology, Niigata University

² Faculty of Agriculture, Niigata University

* Corresponding author : knakano@agr.niigata-u.ac.jp