

海産微細藻のCO₂利用による栄養機能強化とそれに伴う 海洋環境保全効果

助成研究者：幡手 英雄 (宮崎大学 農学部)
共同研究者：村田 寿 (宮崎大学 農学部)
鈴木 喜隆 (水産大学校 食品化学科)
濱 洋一郎 (佐賀大学 農学部)

海洋において膨大な資源量がある海産植物プランクトンは、その炭酸 (CO₂) 固定作用により地球温暖化の原因物質である CO₂ の削減に重要な役割を果たしている。また、植物プランクトンは水産動物の餌料生物になることで、海洋生態系の保全にも寄与している。そこで本研究では水産養殖の初期餌料生物として広く利用されている珪藻綱キートセラスグラシリス *Chaetoceros gracilis* を用いて同種の大気中の CO₂ 利用ならびに細胞の栄養成分について検討した。

C. gracilis による大気中の CO₂ 利用は培養器内のヘッドスペースの CO₂ 濃度を測定して評価し、細胞の栄養成分については EPA と DHA を含めた脂肪酸、タンパク質および光合成色素を分析した。*C. gracilis* 細胞は試験した培養期間中、定常期後期でさえも有意量の大気 CO₂ を削減した。このことは微細藻の生細胞において、たとえそれが細胞分裂の停止状態でも、必要な有機化合物の生合成には CO₂ が必要であることを示唆した。*C. gracilis* の増殖速度および栄養分量は培養温度によって異なっており、30℃で培養された *C. gracilis* はすみやかに定常期に達したが、10 および 20℃で培養された細胞に比べて長い期間生残できなかった。分析された *C. gracilis* の全栄養成分は定常期に達した後に蓄積されることがわかった。特に 10 および 20℃で培養された細胞の栄養分量は急激に増大した。しかしながら、30℃の培養温度では細胞が長期間生残できなかったため、蓄積量もそれほど多くはならなかった。これらの結果は、海産植物プランクトンの大気 CO₂ 利用とそれらの栄養成分蓄積量との間に関連のあること、ならびに栄養強化された *C. gracilis* 細胞を調製するには、通常の数増殖期ではなく、定常期の後期に収穫すべきことを示唆した。

30

助成番号0130
海産微細藻のCO₂利用による栄養機能強化とそれに伴う海洋環境保全効果

助成研究者：幡手 英雄（宮崎大学 農学部）

共同研究者：村田 寿（宮崎大学 農学部）

鈴木 喜隆（水産大学校 食品化学科）

濱 洋一郎（佐賀大学 農学部）

1. 研究目的

大気中に含まれる高濃度のCO₂は地球温暖化の原因物質として最近特に問題になっているが、陸上植物と同様に海産微細藻などの植物プランクトンも我々の消費した化石燃料由来の膨大な量のCO₂を有機化合物に変換して効果的に削減している。同時に活発に増殖した植物プランクトンは、その食物連鎖の上位にある動物プランクトンさらに魚介類の餌料生物になり、海洋生物資源の繁栄を支えている。このように植物プランクトンは、地球（海洋）環境の保全や生態系の維持に重要な役割を果たしている。一方、ある種の微細藻は異常増殖して赤潮を引き起こして海洋環境を破壊し、時には水産養殖業に重大な損害を与える。このような状況において、著者らは水産養殖の初期餌料生物である数種の有用微細藻類の栄養成分量や増殖挙動を調べ、珪藻綱キートセラグラシリス *Chaetoceros gracilis* で興味ある現象を観察した¹⁾。

同種は定常期に達した後も長期間死滅せず、そのままの細胞数で生存し続け、しかもその間に細胞内に著量の脂肪酸を蓄積することを明らかにした。この事実は、*C. gracilis* 細胞により多量のCO₂が栄養成分（有機物）へと転化されたことを示唆している。また、細胞に蓄積された脂肪酸には、ヒト生体に対する機能性のみならず、仔稚魚の健全な生育にも不可欠なエイコサペンタエン酸（EPA）やドコサヘキサエン酸（DHA）も多量に含まれていた^{1,2)}。このように *C. gracilis* は培養期間を延長するだけで、栄養価の高い餌料生物になる可能性がある。そこで本研究では *C. gracilis* 細胞の大気中のCO₂利用・削減量を調べ、さらに細胞に蓄積された栄養成分の変動や増殖挙動を検討した。

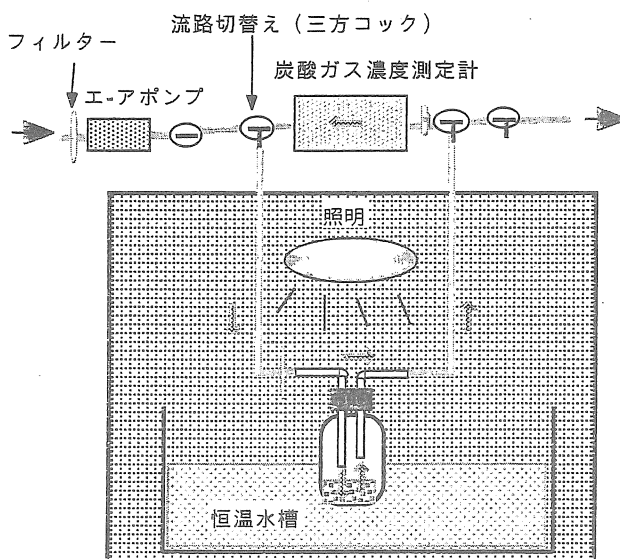
2. 研究方法

2.1 *C. gracilis* の培養

C. gracilis は培養液 PES³⁾ で保存培養されたものであり、実験実施にあたっては細胞の植え継ぎをくりかえして活発な増殖を示す状態の細胞を使用した。*C. gracilis* を 1×10^4 cells/ml になるように培養液に接種し、10-30°Cの恒温室で、午前9:00から午後9:00までの1日12時間照明（光源は白色蛍光灯）の明暗周期で培養した。細胞数は血球計算盤を用いて顕微鏡下で計測した。

2・2 *C. gracilis* 細胞の大気中の CO₂ 利用

C. gracilis 細胞を含む培養液を、下図のような透明な PC 製の培養容器に入れ、20℃で振盪しながら充分に通気し、大気と培養液との間で CO₂ を平衡化させた。その後、三方コックの操作で容器を外気から遮断し、器内ヘッドスペースガス中の CO₂ 濃度の変化を赤外線式炭酸ガス濃度計 CD-602BCO₂ (扶桑理化製品社製) で経時的に測定した。



2・3 *C. gracilis* 細胞に含まれる各種栄養成分の分析

2・3・1 *C. gracilis* 細胞からの脂溶性成分の抽出

C. gracilis 細胞から Bligh-Dyer 法⁴⁾により脂溶性成分を抽出した。すなわち、培養液から遠心分離法 (1,500rpm, 10 min) によって *C. gracilis* 細胞を回収し、それに脂肪酸および光合成色素成分定量用の内部標準物質である *n*-オクタデカン (ジーエルサイエンス社製) と β -アポ-8'-カロテナール (Fluka 社製) を加えた後、メタノールとクロロホルム混液を用いて脂質成分を抽出した。これを脂肪酸および光合成色素の分析に使用した。

2・3・2 ガスクロマトグラフィー (GC) による脂肪酸メチルエステルの分析

抽出された脂質試料中の構成脂肪酸を 5%HC1-メタノールで脂肪酸メチルエステルに変換して GC で分析した¹⁾。分析条件は次のとおりである。

装置：GC14A (島津制作所製)

検出器：FID

カラム：Omegawax 320 (Supelco 社) 30m×0.32mm ID, 0.25 μ m film

キャリアガス：He, 1.6ml/min

温度：カラム, 200°C 注入口, 検出器, 250°C

2・3・3 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による光合成色素の分析

抽出された脂質試料 (光合成色素) を小型のシリカゲルカラムで分離し, ミルポアフィルターで濾過した後, HPLCで分析した。分析条件は次のとおりである。

装置：LC-6A (島津制作所製)

検出器：SPD-6AV (島津制作所製)

カラム：Wakosil-5c18 HG prep, 4.6mm×250mm (D) (和光純薬工業社製)

液相 A：蒸留水：アセトン：メタノール=3：5：2

液相 B：アセトン

流速：1.0ml/min

溶出グラジエント条件：

0→20 min 10→40%B, 20→30 min 40→70%B, 30→40 min 70→100%B, 40→45 min 100→10%B

2・3・4 タンパク質量測定

C. gracilis 細胞のタンパク質量の測定はウシ血清アルブミン (Sigma 社製) を標準タンパク質として Lowry 法^{5,6)}で行った。

3. 結果および考察

3・1 *C. gracilis* の大気中の CO₂ 利用

海洋生態系の基礎生産者である植物プランクトンの体成分 (有機物) の主体は, 海水に溶存する CO₂ の同化産物である。しかし, CO₂ は大気と海水との間を常時移行しており, その動態を実際に海洋で追跡し, さらに植物プランクトンの影響を評価することは極めて困難である。そこで本研究では, 培養容器のヘッドスペースガス中の CO₂ の低減量を測定し, それによって植物プランクトンの大気中の CO₂ 利用の実態解明を試みた。今回の実験は初めての試みであったことから, 対象種を水産養殖において利用頻度が多く, 高い栄養価で, しかも他種に比べて長期間生存可能であることが観察された¹⁾ 珪藻 *C. gracilis* 一種のみについて検討した。

まず, 実験モデル系の設定を試みた。すなわち, *C. gracilis* 細胞を含む培養液を, 透明な円筒状容器に入れ, 蛍光灯の照明下で振盪しながら空気 (CO₂ 濃度 350~450 ppm) を充分に通気させた。その後, 通気をやめ容器を外気から遮断し, 細胞の大気中の CO₂ 利用量を, ヘッドスペース中の CO₂ 濃度の減少程度から測定した。その結果, 培養液 100 mL, 培養液添加後の容器のヘッドスペース容量 1000 mL, 照度 4500 ルックス, 水温 20°Cの実験条件で *C. gracilis* 細胞の CO₂ 利用量が比較的良好に測定できることがわかった。以後の実験では, この条件で *C. gracilis* の CO₂ 利用能を検討した。

Fig. 1 は対数増殖期、定常期初期および定常期後期の *C. gracilis* 細胞培養液を一部分取し、それらの大気中の CO₂ 利用量を検討した結果である。いずれの増殖相の *C. gracilis* でも測定時間の経過とともにヘッドスペース中の残存 CO₂ 濃度の低下傾向が確認された。特に対数増殖期の細胞では測定開始から 120 分間経過後の残存 CO₂ 濃度は、開始時の約 1/4 の 100 ppm まで低下した。今回測定に供試した各増殖相の細胞密度が異なっていたこともあり、増殖相によって CO₂ 利用に差異が認められたが、細胞分裂の停止した定常期後期の細胞においても有意量の CO₂ が利用・削減されることが明らかとなった。このことは同種のような特性をもつ植物プランクトンでは、それが生残しているかぎり大気中の CO₂ 削減に重要な役割をはたしていること、また前報で認められた定常期中の *C. gracilis* 細胞の脂質成分の蓄積¹⁾が大気中の CO₂ 利用によることを示唆した。

CO₂ 吸収量が最も大きいと思われる細胞分裂の活発な対数増殖期にある *C. gracilis* 細胞の 1 日の時刻別の CO₂ 吸収量を測定したところ、照明を消した夜間の CO₂ 利用量は低下したが、消灯後数時間は依然として有意量の CO₂ を消費していることがわかった (図は示していない)。

以上のように *C. gracilis* 細胞は細胞分裂が停止した後も、長期間にわたって CO₂ を利用・削減していることが明らかになった。

3・2 *C. gracilis* の栄養強化

C. gracilis は魚介類の健全な育成に不可欠な EPA や DHA などの不飽和脂肪酸を含んでいることから、エビや貝類などの水産種苗の好適餌料生物⁶⁾として水産養殖場で広く利用されている。餌料用の植物プランクトンは、一般に定常期に達する前後の細胞分裂の活発な増殖相で回収されているが、栄養豊富な細胞を得るための至適回収期や培養条件などについては十分に検討されていない。しかし、前報¹⁾および上記の実験結果などから細胞分裂が停止した後も、植物プランクトンは各種の栄養成分を蓄積していることが予想される。そこで本実験では *C. gracilis* の培養温度を変えて長期間培養し、その間の細胞の脂肪酸、タンパク質および光合成色素の経日的な変動を検討した。なお、光合成色素は植物の同化作用や生残率を明確に示す指標となるだけでなく、β-カロチンや海藻特有のフコキサンチンなどのカロチノイド類には生体内で発生する有害な活性酸素を補足・消去する作用もある。また天然魚に比べて酸化ストレスを受けやすい養殖魚の疾病予防や健全な育成には、それらの飼料に抗酸化成分を添加することが推奨されている。したがって、これら色素類を豊富に含む *C. gracilis* が培養できれば、水産養殖業の発展にも寄与できる。このような観点から本実験では、通常の栄養成分(脂質やタンパク質)に加えて *C. gracilis* の光合成色素成分の分析も行った。

Fig. 2 は 10, 20, 30°C で培養された *C. gracilis* の典型的な増殖曲線を示している。*C. gracilis* は高い培養温度ほど活発に増殖し、短期間で定常期に達したが、その後すみやかに減少期に入った。他方、培養温度が低いと定常期に達するまでにいくぶん多くの日数を要したが、定常期が長

く、その間の細胞数の減少はわずかであった。次に、これらの細胞を適時回収し、細胞に蓄積された脂肪酸、タンパク質および光合成色素の変動を検討した。

C. gracilis 細胞の脂肪酸量の変動を Fig. 3 に示している。EPA と DHA の合計量ならびにそれらを含めた全脂肪酸量の蓄積量は定常期に達する前後（従来の回収期）で最大量ではなく、培養期間の延長にともなって増大した。しかし、30°Cの高い培養温度では 10°Cや 20°Cに比べて蓄積量が少なかった。

Fig. 4 に *C. gracilis* のタンパク質蓄積量の経日変化を培養温度ごとに示している。10°Cの培養ではタンパク質蓄積量は、脂肪酸と同様に（Fig. 3）培養期間の延長とともに増加したが、20 および 30°Cの培養では 30 日目を以降の増加はわずかであった。このようにタンパク質蓄積量は培養温度により差異が認められた。次に *C. gracilis* の光合成色素蓄積量の変動を調べた。HPLC 法によって分離された主要な光合成色素はクロロフィル a、フコキサンチンおよびフコキサンチンの関連色素と思われる未同定色素であり、そのほかに珪藻類特有のクロロフィル c やβ-カロチンなどが確認された（図 5）。これらの光合成色素組成はすべての培養温度で同じであったが、組成比（含有量）は異なっていた。分離された各色素量を算出し、それらを合計した *C. gracilis* の光合成色素合計量の変化を Fig. 6 に示している。高い培養温度の *C. gracilis* の光合成色素はすみやかに最大量に達する傾向が認められ、30°Cの培養では 35 日目を以降急激に色素を消失し、同化作用の低下および生残細胞数が急激に減少していることがわかった。一方、10°Cや 20°Cの培養では徐々に色素成分が増加し、その後も長期間保持されることがわかった。

以上、*C. gracilis* 細胞に含まれる EPA や DHA などの有用な脂肪酸だけでなく、タンパク質および光合成色素も定常期以降に急激に増加する傾向が明らかになった。また細胞数の最大値（定常期に達する前後）と細胞に蓄積された栄養成分量とは必ずしも一致しないことが判明した。さらに 30°Cで培養された細胞の増殖速度は速かったが、定常期に達した後、長期間生存することができなかった。したがって *C. gracilis* 細胞の栄養強化を促すうえでは培養温度および期間が重要であり、同種を水産種苗の餌料生物として使用する際には、従来のように定常期前後で回収するのではなく、10~20°Cの培養温度で定常期のかなり進んだ段階で回収すると栄養豊富な *C. gracilis* 細胞が得られるものと思われる。

4. まとめと今後の課題

海産植物プランクトンは、動物プランクトンや魚介類の餌料生物となることで海洋の生物資源の繁栄を支えており、同時にその旺盛な繁殖力と膨大な資源量から地球温暖化ガス（CO₂）の削減にも多大な貢献をしていると推察される。しかし、このような植物プランクトンの優れた特性を考慮し、相互に関連させた研究例はほとんどなかった。そこで本研究では、植物プランクトンの増殖力や栄養成分のみならず CO₂ 利用能も考慮に入れた研究を、魚介類の初期餌料生物である珪藻綱 *C. gracilis* を用いて実施した。その結果、*C. gracilis* は定常期に達した後も大気中の CO₂ を利用・削減していること、またこの期間に細胞内に多量の栄養成分（脂肪酸、タンパク質、カ

ロチノイド類)が蓄積されることが明らかになった。しかし、残念ながら本研究では、植物プランクトンのCO₂利用モデル系の設定に予想以上の時間を要したために、多様な分布や生活環をもつ各種植物プランクトンのCO₂削除能や栄養分量を評価することはできなかった。

今後の研究では、本研究成果を基に植物プランクトンのCO₂利用量(削除)の正当な評価、さらに海洋に分布する有用種の探索、それらのCO₂利用能や栄養成分の検討などが必要である。これらの基礎データを集積することにより海産植物プランクトンの潜在能力(海洋環境保全、特にCO₂の削減への貢献程度)が把握されるとともに、植物プランクトンを用いた有効な地球温暖化ガス削減対策も提示されるものと期待される。

5. 参考文献

- 1) Hatate, H., M. Ohgai, N. Murase, N. Miyake, and N. Suzuki: *Fisheries Science*, **64**, 578-581 (1998).
- 2) Parrish, C. C. and P. J. Wangersky: *J. Plankton Res.*, **12**, 1011-1021 (1990).
- 3) Provasoli, L.: Cultures and collections of algae, in "Media and Prospects for the Cultivation of New Algae" (ed. by A. Watanabe and A. Hattori), Proc. V. S. Japan Conf. Hakone, Sept. 1966, *Japan. Soc. Plant Physiol.*, 1968, pp. 63-75.
- 4) Bligh, E. G. and W. J. Dyer: *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917 (1959).
- 5) Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, and R. J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 6) Hatate, H., M. Ohgai, N. Murase, and N. Suzuki: *Fisheries Science*, **64**, 168-169 (1998).

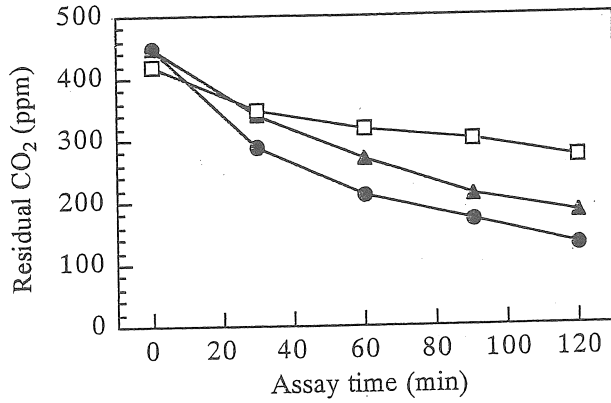


Fig. 1 Reduction of CO₂ in headspace gas of culture bottle by *C. gracilis* harvested at different growth phases.

Exponential growth phase (1.80×10^6 cells/mL): ●, Early stationary growth phase (2.85×10^6 cells/mL): ▲, Late stationary growth phase (2.08×10^6 cells/mL): □

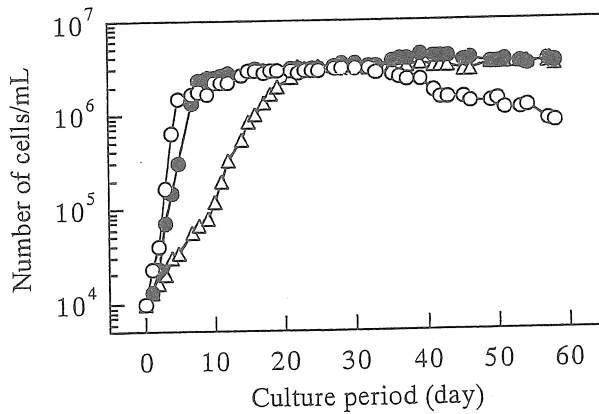


Fig. 2 Growth curves of *C. gracilis*.

Culture temperature: 10°C (Δ), 20°C (●), 30°C (○)

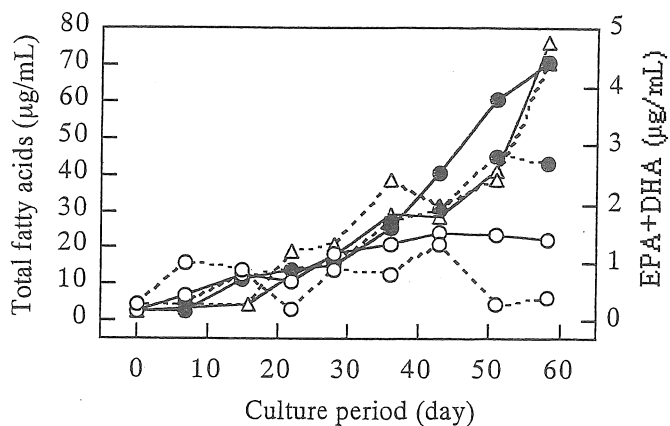


Fig. 3 Change in fatty acid and EPA and DHA contents of *C. gracilis*.

Culture temperature: 10°C (Δ), 20°C (\bullet), 30°C (\circ)

Total fatty acids —, EPA+DHA - - -

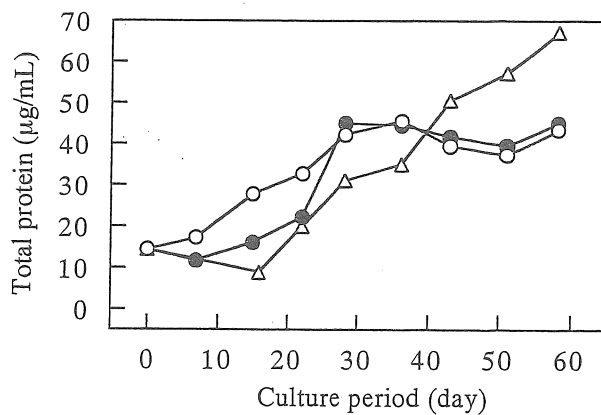


Fig. 4 Change in protein content of *C. gracilis*.

Culture temperature: 10°C (Δ), 20°C (\bullet), 30°C (\circ)

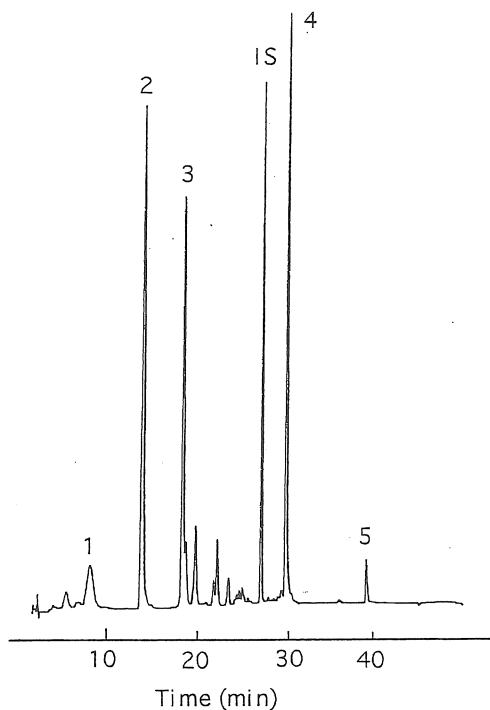


Fig. 5 Separation of photosynthetic pigments of *C. gracilis* by HPLC.

1. chlorophyll c, 2. fucoxanthin, 3. unidentified pigment, 4. chlorophyll a,
5. β -carotene, IS: internal standard (β -apo-8'-carotenal)

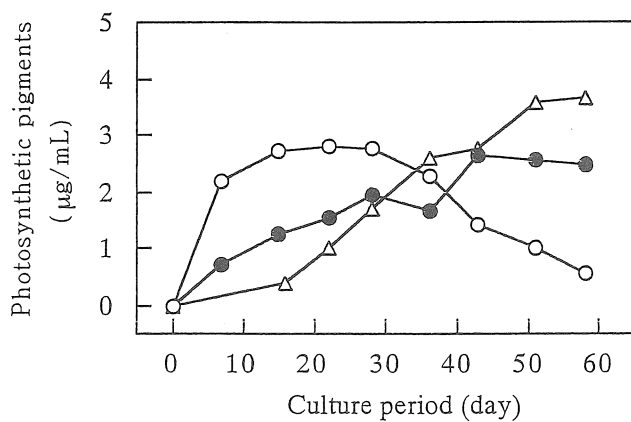


Fig. 6 Change in photosynthetic pigments of *C. gracilis*.
Culture temperature: 10°C (Δ), 20°C (\bullet), 30°C (\circ)

Nutrient Enrichment of Marine Microalgal Cells by Utilizing CO₂ and Their
Prevention of Marine Environment

Hideo Hatate¹, Hisashi Murata¹, Nobutaka Suzuki², and Yoichiro Hama³

¹Faculty of Agriculture, Miyazaki University

²National Fisheries University

³Faculty of Agriculture, Saga University

Summary

Marine phytoplankton play an important role in reduction of atmospheric carbon dioxide (CO₂), a critical factor for global warming, by CO₂ fixation because of their vast resources in the oceans. In addition, they also contribute to the prevention of marine ecosystems as live feeds for various aquatic animals. In this study, we studied marine microalgal CO₂ reduction and its cellular nutrients by using marine diatom *Chaetoceros gracilis*, which is widely used as incipient feed in a culture farm.

Atmospheric CO₂ reduction by *C. gracilis* was estimated by measuring CO₂ concentration in the headspace gases of the culture bottle, and nutritive changes in fatty acids including EPA and DHA, protein, and photosynthetic pigments accumulated in the cells were also investigated. *C. gracilis* reduced significant amount of atmospheric CO₂ during the culture periods examined, even at the late stationary growth phase. This suggests that microalgal living cells require atmospheric CO₂ for biosynthesis of the cellular indispensable organic compounds even though they are cytotatic state. *C. gracilis* showed different growth rates and nutritional levels, depending on the culture temperatures. *C. gracilis* cultured at 30°C reached the stationary growth phase rapidly, while the cells could not survive for long period compared to those cultured at 10 and 20°C. *C. gracilis* were found to accumulate all nutrients tested after reaching the stationary growth phase, and the accumulation levels were significantly and consistently increased in the cells cultured at 10 and 20°C. However, the accumulation was not so large at 30°C, because the cells could not survive longer under this culture condition. These results indicated the relationships between utilization of atmospheric CO₂ by marine phytoplankton and their accumulation of cellular nutrients and that *C. gracilis* should be harvested at the late stationary growth phase but not at the usual exponential growth phase for the preparation of the nutrition-enriched cells.