

回分培養および異なる再生率での半連続培養で得られた *Nannochloropsis oculata* の栄養価

阪本憲司*^{1,2}, 河内広行*², 沖増英治*^{1,2}, 雨村明倫*^{1,2}

The Nutritive Value of *Nannochloropsis oculata* Cultured Batchwise or Semicontinuously with Different Renewal Rates

Kenji Sakamoto*^{1,2}, Hiroyuki Kouch*², Eiji Okimasu*^{1,2}, and Akinori Amemura*^{1,2}

Rep. Res. Inst. Mar. Biores., Fukuyama Univ., (9), 15-23 (1998)

The chemical composition (protein, carbohydrate, lipid, and fatty acids) of the marine microalga *Nannochloropsis oculata* was studied in batch culture at five growth phases (logarithmic, late-logarithmic, transient, early-stationary, and stationary phases) and in semicontinuous culture with four rates of three-day renewal of the culture medium in the range 10-30%.

In batch mode, protein and carbohydrate contents of the cells were high from the late-logarithmic to the transient phases and from the transient to the early stationary phases, respectively. On the other hand, content of lipid did not change significantly with growth phase. The content of fatty acids, especially that of eicosapentaenoic acid (EPA) which is considered to be essential in many marine animal diets for growth and survival rates, increased at the late-logarithmic phase and decreased at the later stages. Thus, the nutritive value of the late-logarithmic-phase culture was evaluated highly because of its high levels of protein, gross fatty acids and EPA.

In semicontinuous mode, 30% renewal rate gave a high level of protein content of the cells, the level decreasing with a decrease of renewal rate, whereas maximum levels of carbohydrate, lipid, and fatty acids were obtained with 10% renewal rate, although EPA content is the highest with 30% renewal rate. Growth in culture with 30% renewal rate was maintained at the late-logarithmic phase and the maximum production of cells with

*¹海洋生物工学科 (Department of Marine Biotechnology, Fukuyama University, Fukuyama 729-0292).

*²内海生物資源研究所 (Research Institute of Marine Bioresources, Fukuyama University, Innoshima 722-2101).

a high nutritive value was found to be obtained when the cells were cultured and harvested under this condition.

Key words: *Nannochloropsis oculata*, semicontinuous culture, cell composition, nutritive value, renewal rate, eicosapentaenoic acid

種苗生産の現場では、餌料生物としての微細藻類の大量培養が回分式あるいは半連続式で行われている。回分培養の場合、増殖が対数期中期・後期あるいは静止期に達した時に全培養物を収穫して餌料として供されている。半連続培養は、増殖が対数期中期あるいは後期に達した時に培養物の一部を収穫し、新しい培地を等量補充する培養方式である。この場合、培養は数週間あるいは数カ月間培続けられるが、収穫する培養液の量比、収穫する時間間隔によって増殖相が変化する。回分培養においては対数増殖期と静止期において細胞成分が異なることが種々の餌料微細藻類について報告されており¹⁻⁵⁾、栄養価の高い細胞を適切な時期に収穫する事の重要性が指摘されている。しかし、半連続培養の場合、植え継ぎ条件（再生率）によって細胞成分がどのように変化するとといった研究はほとんど行われていない^{6,7)}。

本研究では、魚介類の種苗生産の初期餌料に用いられている *Nannochloropsis oculata* をまず回分式で培養し、各増殖相での細胞成分を調べ、ついで半連続培養を行い、再生率を変えることにより細胞成分がどのように変化するかを調べ、どの再生率で得られた細胞が餌料としての栄養価に優れているかについて考察を行った。

実験方法

供試株 広島県水産試験場から分与を受け、5年間当研究所で継代培養した *Nannochloropsis oculata* 株を使用した。

培養方法 藻類の培養には、蒸留水を加えて塩濃度を 28 ppt に調整した海水 1 l に硫安（和光純薬）65 mg, 尿素（ナカライテスク）6.4 mg, 過燐酸石灰（全農）9.6 mg, クレワット 32（帝国化学産業）4.0 mg を加え（pH 8.5）、120℃で 20 min 熱殺菌した培地を用いた。

回分培養には 8 l の培地を含む 10 l のポリカーボネート製の培養瓶を用い、温度 20℃、通気量 8 l/min、照射時間 明 14 h / 暗 10 h、照度 4,000 lx で培養を行った。接種細胞密度は 1×10^6 cells/ml とした。

半連続培養には 250 ml の培地を含む 500 ml の坂口フラスコを用い、回分培養と同じ温度、照射時間、照度、接種細胞密度の下で、100 rpm の往復振とうにより通気を行い、培養を行った。培養が対数増殖期後期に達した時、それぞれのフラスコから培養液を 10, 15, 20, 30% 抜き取り、同じ容量の新しい培地を補充する方式（再生率 10, 15, 20, 30%）で半連続培養を開始した。培養液の抜き取り、培地の補充は 2 日おき、照射の開始時に行った。

細胞密度および細胞重量の測定 培養液の一部を採取し、適宜希釈後トーマ血球計算盤を用いて光学顕微鏡下で細胞数を計測し、細胞密度（cells/ml または OD_{680 nm}）を求めた。また、培養液を遠心分離

N. oculata の半連続培養における細胞成分の変化

(3,000 rpm) し、得られた細胞を水洗し、凍結乾燥後その重量を測定し、培養液 1 ml 当りに生産される細胞の乾燥重量 (mg) として示した。

増殖率の測定 細胞の増殖率 (K , doubling / day) は、本種が二分裂によって増殖することから、次式によって求めた (ただし、 N_1 および N_2 は t_1 および t_2 日目の細胞密度を表す)。

$$N_2 = N_1 \cdot 2^{K(t_2 - t_1)}$$

$$K = [3.322 / (t_2 - t_1)] \cdot \log(N_2 / N_1)$$

細胞成分の分析 凍結乾燥した細胞を水に懸濁後超音波破碎 (Tomy UD-201) したものを測定試料とし、蛋白質は Bradford の方法⁹⁾、炭水化物はフェノール硫酸法¹⁰⁾により定量した。脂質は、凍結乾燥細胞試料を直接クロロホルム-メタノール (1:2, v/v) で抽出した後、Bligh and Dyer の方法¹¹⁾により定量した。脂肪酸の定量は、脂質を水酸化ナトリウム [0.3 M / 90%(v/v)メタノール] でケン化した後、塩酸-メタノール [5%(v/v) / メタノール] でメチル化し、そのメチルエステルを FID、フューズドキャピラリーカラム (30 m × 0.25 mm DB-15; J & W Scientific) を装着したガスクロマトグラフ (Hitachi G-3000) で分析することにより行った。

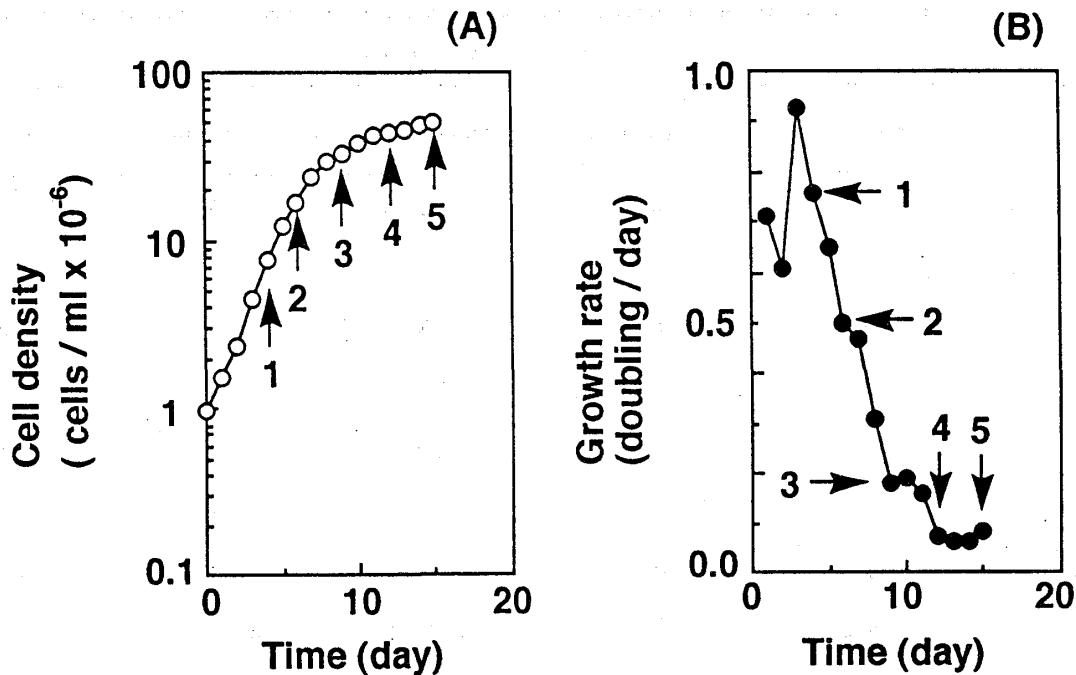


Fig. 1. Cell density (A) and growth rate (B) of *N. oculata* in batch culture.

Cells in a 10 l tank were harvested at the following growth phases.

Growth phase: 1, logarithmic; 2, late logarithmic; 3, transient; 4, early stationary; 5, stationary.

Table 1. Biochemical composition of *N. oculata* cells harvested at the various growth phases

Component (%)*	Growth phase				
	Logarithmic	Late logarithmic	Transient	Early stationary	Stationary
Protein	23.3	29.4	30.1	11.4	12.2
Carbohydrate	7.3	6.9	16.3	12.8	11.6
Lipid	18.1	16.4	17.4	14.2	15.1
Fatty acid	3.5	6.4	2.8	1.9	1.9

*Expressed as % of dry cell weight.

Table 2. Fatty acid composition of *N. oculata* cells harvested at the various growth phases

Fatty acid (%)* ¹	Growth phase				
	Logarithmic	Late logarithmic	Transient	Early stationary	Stationary
14:0	5.5	6.1	5.1	4.5	4.4
15:0	Tr* ²	1.4	0.8	Tr	2.1
16:0	18.9	18.9	12.8	24.1	29.4
16:1 n-7	23.5	23.6	17.5	16.9	22.0
18:0	Tr	0.9	Tr	5.6	Tr
18:1 n-9	1.7	2.1	4.6	9.8	15.5
18:3 n-3	1.8	0.9	2.3	2.0	1.0
20:5 n-3	47.2	43.5	48.0	35.9	22.1
20:5 n-3* ³	1.7	2.8	1.4	1.4	1.5

*¹ Expressed as % of total fatty acids.

*² Tr: Trace amount (< 0.1).

*³ Expressed as % of dry cell weight.

N. oculata の半連続培養における細胞成分の変化

定量は同一サンプルについて3回行い、その平均値を求めた。また、バリエーション分析 (ANOVA) によりデータの統計処理を行った。

結果および考察

回分培養における増殖と各増殖相における細胞成分 *N. oculata* の半連続培養を行うにあたり、まず、

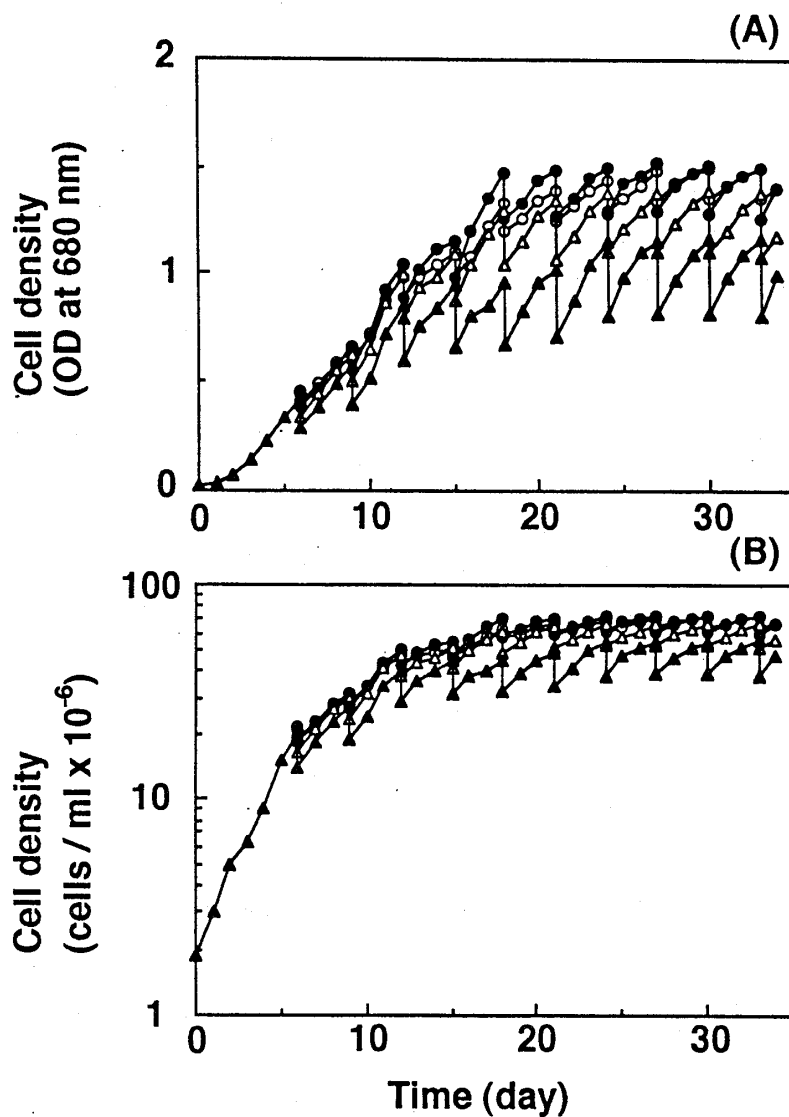


Fig. 2. Growth of *N. oculata* in semicontinuous culture with different renewal rates.

Cell density: (A), OD_{680 nm}; (B), cells / ml.

Renewal rate: ○, 10%; ●, 15%; △, 20%; ▲, 30%.

回分培養における増殖特性と増殖過程における細胞成分の変化を調べた。増殖曲線と増殖率を Fig. 1 に示す。*N. oculata* は対数増殖期には 0.6~0.9 doubling / day の増殖率で分裂し、12 日目に静止期（細胞密度 5.1×10^7 cells / ml）に達した。対数増殖期, 対数増殖期後期, 対数増殖期から静止期への移行期, 静止期前期, 静止期にそれぞれ細胞を採取し、細胞の蛋白質, 炭水化物, 脂質, 脂肪酸の含量および脂肪酸組成を分析した。その結果を Table 1 と 2 に示す。細胞の蛋白質含量は対数増殖期後期から移行期 (29.4~30.1% / cell dry wt), 炭水化物含量は移行期から静止期前期 (12.8~16.3% / cell dry wt) に高く、一方、脂質含量は全増殖過程でそれほど変化がない (14.2~18.1% / cell dry wt) ことがわかった。静止期に入ると蛋白質含量の著しい低下が見られる。脂肪酸含量については、対数増殖期後期が特に高く (6.4% / cell dry wt), また、魚介類の初期餌料として特に有用な成分であるエイコサペンタエン酸の含量も対数増殖期後期が最大 (2.8% / cell dry wt) となり、移行期以降には減少した (1.4~1.5% / cell dry wt)。エイコサペンタエン酸⁹⁾の全脂肪酸中の含量は対数増殖期から移行期にかけてほとんど変化しないが (43.5~48.0% / total fatty acids), 脂肪酸の細胞あたりの含量が対数増殖期後期に高くなったために、同脂肪酸の細胞あたりの含量が増えた結果による。しかし、静止期には脂肪酸中の含量 (22.1% / total fatty acids) も細胞中の含量 (1.5% / cell dry wt) も共に減少した。一方、パルミチン酸 (16:0), オレイン酸 (18:1n-9) の脂肪酸中の含量は静止期に入り逆に増加した。

これらの結果を総合すると、*N. oculata* は増殖率が 0.5 doubling / day に低下する対数増殖期後期に蛋白質, 脂質, および脂肪酸とりわけエイコサペンタエン酸の含量が高く、餌料生物として栄養的に優れていると思われる。炭水化物含量はこの時期は低く移行期以降に高くなるが、ワムシの炭水化物含量は蛋白質や脂質と違って餌料生物である *N. oculata* の炭水化物含量の影響を受けにくいので、対数増殖期後期の細胞を餌料として用いることに特に問題はないと思われる。

N. oculata の回分培養各増殖相における細胞の栄養価については、すでに岡内ら²⁾が二つの株（養殖研株と中国株）について検討しており（水温 25℃, 塩分濃度 30 ppt, 照度 3~4 klx), 静止期に入ると EPA と蛋白質の含量が対数増殖期に比べて著しく減少し、また、パルミチン酸とオレイン酸の組成比は逆に増加するという結果は、われわれの結果と一致している。本研究で明らかになったように対数期でも後期の細胞が特に栄養価に優れているようである。

半連続培養における細胞成分の変化 半連続培養開始後 12 日目で、いずれの再生率での培養もほぼ定常状態に達した (Fig. 2)。再生率 10, 15, 20, 30% における定常状態時の増殖率はそれぞれ 0.06, 0.09, 0.12, 0.18 doubling / day であり、両者間に比例関係が見られた。また、再生前細胞密度はそれぞれ 7.1, 7.1, 6.5, 5.5×10^7 cells / ml となり、再生率が増加すると減少する傾向が見られた。しかし、収穫される細胞量は 178, 266, 325, 413 $\times 10^7$ cells / renewal と再生率増加と共に著しく増加した。培養液の pH はいずれも 7.7~7.9 に安定した。

半連続培養開始後 27 日目に収穫した細胞の成分分析の結果を Table 3, 4 に示した。細胞重量当たりの蛋白質含量は再生率が高くなると共に増加し、炭水化物, 脂質および脂肪酸含量は逆にやや減少した。一方、EPA の脂肪酸, 脂質, 細胞当たりの含量はいずれも 30% の時が最大で、再生率が下がるに従って減少した。脂肪酸中のオレイン酸比は再生率が低くなると増加し、パルミチン酸比は再生率 20% の時が最大であった。増殖率から判断すると、再生率 10, 15, 20, 30% で得られた細胞は回分培養の静止期, 静

N. oculata の半連続培養における細胞成分の変化**Table 3.** Biochemical composition of *N. oculata* cells in semicontinuous culture with different renewal rates

Component (%) [*]	Renewal rate			
	10%	15%	20%	30%
Protein	29.6	29.8	32.0	33.6
Carbohydrate	15.8	14.4	12.3	11.0
Lipid	15.1	14.9	14.3	12.3
Fatty acid	3.7	3.2	3.3	3.1

^{*}Expressed as % of dry cell weight.

Table 4. Fatty acid composition of *N. oculata* cells in semicontinuous culture with different renewal rates

Fatty acid (%) ^{*1}	Renewal rate			
	10%	15%	20%	30%
14:0	4.7	2.7	3.3	3.5
15:0	3.0	0.6	Tr ^{*2}	Tr
16:0	22.3	17.9	23.4	13.2
16:1 n-7	22.9	25.0	24.3	23.0
18:0	4.7	1.2	Tr	1.6
18:1 n-9	13.2	10.8	8.6	7.8
18:3 n-3	2.6	1.1	Tr	1.3
20:5 n-3	20.8	32.8	36.4	41.8
20:5 n-3 ^{*3}	1.9	2.7	2.9	3.3

^{*1} Expressed as % of total fatty acids.

^{*2} Tr: Trace amount (< 0.1).

^{*3} Expressed as % of dry cell weight.

静止期前期, 移行期, 対数増殖期後期の細胞に相当し, 回分培養におけると同様再生率 30% (対数増殖期後期に相当) で得られる細胞は蛋白質, EPA 含量が特に高く, 餌量としての栄養価が優れていると思われる。また, 収穫量も多く, この条件で培養を続けると連続的に栄養価の高い均質な細胞を多量に得ることが期待できる。

微細藻類の再生率を変えた半連続培養については Otero *et al.*⁶⁾ が *Phaeodactylum tricornutum* について, Otero and Fabregas⁷⁾ が *Tetraselmis suecica* について報告している。*T. suecica* においては, 再生率を上げると蛋白質含量が増加するが, 炭水化物含量は逆に減少し, 脂質はほとんど変化しないと述べられており, *N. oculata* における結果と類似している。また, いずれの藻類においても不飽和脂肪酸の含量は再生率の上昇と共に増加が見られる。これは, 再生率を上げると栄養基質の利用率が上昇し, 代謝が活発になるため, 飽和度の高い脂肪酸よりなる貯蔵中性脂肪が, 不飽和度の高い脂肪酸よりなる膜性脂質に置き換わるためであると説明されている。

文 献

- 1) M. J. Fernandez-Reiriz, A. Perez-Camacho, M. J. Ferreiro, J. Blanco, M. Planas, M. J. Campos, and U. Labarta: Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture*, **83**, 17-37 (1989).
- 2) 岡内正典, 周 文堅, 郎 婉虹, 福所邦彦, 金沢昭夫: 異なる増殖相におけるナンノクロロプシス *Nannochloropsis oculata* の栄養価の相違. 日水誌, **56**, 1293-1298 (1990).
- 3) M. R. Brown, C. D. Garland, S. W. Jeffrey, I. D. Jameson, and J. M. Leroi: The gross and amino acid compositions of batch and semi-continuous culture of *Isochrysis* sp. (clone T.ISO), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. *J. Appl. Phycol.*, **5**, 285-296 (1993).
- 4) G. A. Dunstan, J. K. Volkman, S. M. Barrett, and C. D. Garland: Changes in the lipid composition and maximisation of the polyunsaturated fatty acid content of the three microalgae grown in mass culture. *J. Appl. Phycol.*, **5**, 71-83 (1993).
- 5) S. O. Lourenco, U. L. Marquez, J. Mancini-Filho, E. Barbarino, and E. Aidar: Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis* I. Comparison of two culture media. *Aquaculture*, **148**, 153-168 (1997).
- 6) A. Otero, B. O. Arredondo, M. Patino, T. Lamela, and J. Fabregas: Production of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in semicontinuous cultures of marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Mar. Biotechnol.*, **3**, 82-85 (1995).
- 7) A. Otero and J. Fabregas: Changes in the nutrient composition of *Tetraselmis suecica* cultured semicontinuously with different nutrient concentrations and renewal rates. *Aquaculture*, **159**, 111-123 (1997).
- 8) T. Watanabe, C. Kitajima, and S. Fujita: Nutritional values of live food organisms used in Japan

N. oculata の半連続培養における細胞成分の変化

for mass propagation of fish: a review. *Aquaculture*, **34**, 115–143 (1983).

- 9) M. Bradford: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantitation of dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
- 10) M. Dubois, K. A. Gilles, J. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350–356 (1956).
- 11) E. G. Bligh and W. J. Dyer: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J. Biochem.*, **37**, 911-917 (1959).