

海産微細藻テトラセルミスのグルコースを炭素源とする  
従属栄養培養

阪本憲司<sup>1</sup>・沖増英治<sup>1</sup>・松本正樹<sup>2</sup>・雨村明倫<sup>1</sup>

福山大学内海生物資源研究所<sup>1</sup>・太陽化学(株)総合研究所<sup>2</sup>

Heterotrophic Growth of Marine Microalgae Tetraselmis  
Strains with Glucose as Carbon Source.

Kenji Sakamoto<sup>1</sup>, Eiji Okimasu<sup>1</sup>, Masaki Matsumoto<sup>2</sup>  
and Akinori Amemura<sup>1</sup>

(Research Institute of Marine Bioresources, Fukuyama  
University, Ohama-cho, Innoshima, Hiroshima 722-21,  
Japan<sup>1</sup>; Central Research Laboratories, Taiyo Kagaku  
Co., Ltd., Takara-machi, Yokkaichi, Mie 551, Japan<sup>2</sup>)  
Report Res. Inst. Marine Bioresources, Fukuyama  
Univ., No. 2, 47-55 (1992).

Six strains of Tetraselmis including T. tetrathele,  
T. chui, T. alacris, T. gracilis, T. suecica Spain and  
T. suecica Brasil were cultured in sea water (salinity  
27‰) supplemented with 80 mg of ammonium sulfate, 16 mg  
of calcium perphosphate and 4 mg of Clewat 32 per l with  
or without 100 mM glucose under 14 hr illumination (3,000  
lux)/day. All the strains except T. alacris grew well in  
the medium with glucose. Especially, the growth of T.  
tetrathele and T. chui was greatly enhanced by addition  
of glucose, showing the rates of 0.94 and 0.93 doublings

(dbl)/day, respectively, in their logarithmic phase. When cultured in the dark, their growth rates were ranged between 0.45 and 0.50 dbl/day in the presence of glucose. They showed no growth in the medium without glucose.

The maximum cellular density ( $2.8 \times 10^6$  cells/ml) and growth rate (1.30 dbl/day) of *T. chui* were obtained with 10 mM glucose. For growing this organism, ammonium sulfate was better nitrogen source than sodium nitrate and the maximum growth occurred at a concentration of 0.6 mM ammonium sulfate in the presence of 10 mM glucose. The addition of glucose was effective to considerably reduce illumination time to obtain the maximum growth.

近年、わが国では、魚類の種苗生産の初期餌料に用いられているシオミズツボウムシ *Brachionus plicatilis* の培養用餌料として、テトラセルミス *Tetraselmis tetraathele* がナンノクロロプシス *Nannochloropsis oculata* と共に用いられるようになってきた。*T. tetraathele* は従来より東南アジアでシオミズツボウムシの培養用餌料として用いられているプラシノ藻綱 *Prasinophyceae* に属する微細藻類で、耐高温性や増殖率に優れているために、わが国では特に梅雨期から夏期にかけてナンノクロロプシスに代わるシオミズツボウムシの餌料として有効であると考えられている。この新しい微細藻類の培養特性と餌料価値については、岡内・福所<sup>1,2)</sup>、Okauchi and Hirano<sup>3)</sup>、福所ら<sup>4,5)</sup>、岡内<sup>6)</sup>、福所<sup>7)</sup>によって詳細に研究されている。一方、欧米では、近縁種の *Tetraselmis suecica* が二枚貝類幼性用餌料として用いられており<sup>8,9)</sup>、その大量培養法が検討されている<sup>10-14)</sup>。

大量に供給される魚介類の種苗生産のための餌料用微細藻類は、専ら太陽光に依存する独立栄養条件での屋外培養で行われている。しかしこの方法は生産率、品質あるいは費用の点で問題があり、これらの欠点を解決するために有機炭素源を利用して増殖する従属栄養培養法が望まれている。タンパク質含

量が高いために、食糧資源として注目されている緑藻クロレラ *Chlorella regularis* はグルコース、酢酸を炭素源として暗所でも高い増殖率を示すことから、この性質を利用して増殖する従属栄養培養法による工業的培養法が開発された<sup>15)</sup>。またミドリムシであるユーグレナ *Euglena gracilis* もグルコース、リンゴ酸を含む従属栄養培地で暗所で良好に増殖することが報告されている<sup>16)</sup>。

本研究では、魚介類の初期餌料として有用なテトラセルミスの効率的な無菌および大量培養を行うにあたり、まず従属栄養培養条件の検討を行った。

実験に用いた6種のテトラセルミス *T. tetrathele*, *T. chui*, *T. alacris*, *T. gracilis*, *T. suecica* Spain, *T. suecica* Brasil は西海区水産研究所(長崎)の岡内正典博士より分譲を受けた。これらの細胞株を海水 1 l に  $\text{NaNO}_3$  1.25 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  59  $\mu\text{M}$ , 寒天 15 g を含む Schreiber 寒天培地上で単一コロニー分離をくりかえすことにより、混入している細菌を取り除いた。

従属栄養試験には、蒸留水を加えて塩濃度を 27% に調整した海水 1 l に硫安 80 mg, 過リン酸石灰 16 mg, クレワット 32 (帝国化学産業) 4 mg を加え、120°C で 20 分間熱殺菌した培地を基本培地として用いた。グルコース(関東化学)は別殺菌した後、基本培地に加えた。海水はメムコア超精密濾過装置(三井造船)によって中空糸濾過したものを用いた。培養は多孔性のシリコン栓を施した 500 ml の坂口フラスコに 200 ml の培地を入れ、照度 3,000 lux (通常 14 時間/日)、温度 25°C、往復振とう数 115 rpm で行った。培養の初期細胞密度は  $5 \times 10^4$  cells/ml とした。

実験期間中は経時的に培養液を採取し、pH を測定した後、細胞を 1% (w/v) ホルマリンで固定した。その後遠心分離 (3,000 rpm, 15 min) により細胞を集め、採取容量の 10 分の 1 の海水に懸濁してトーマ血球計算盤で細胞数を計測した。細胞の増殖率は対数期(通常、培養 2 日目から 5 日目の間)における 1 日当りの平均分裂回数 (k) で示した。k は通常テトラセルミスが 2 分裂により増殖することから、次式により計算した<sup>17)</sup>。

$$\begin{aligned} k &= [1 - (t_2 - t_1)] \cdot [\log_2(N_2/N_1)] \\ &= [3.322 / (t_2 - t_1)] \cdot [\log(N_2/N_1)] \end{aligned}$$

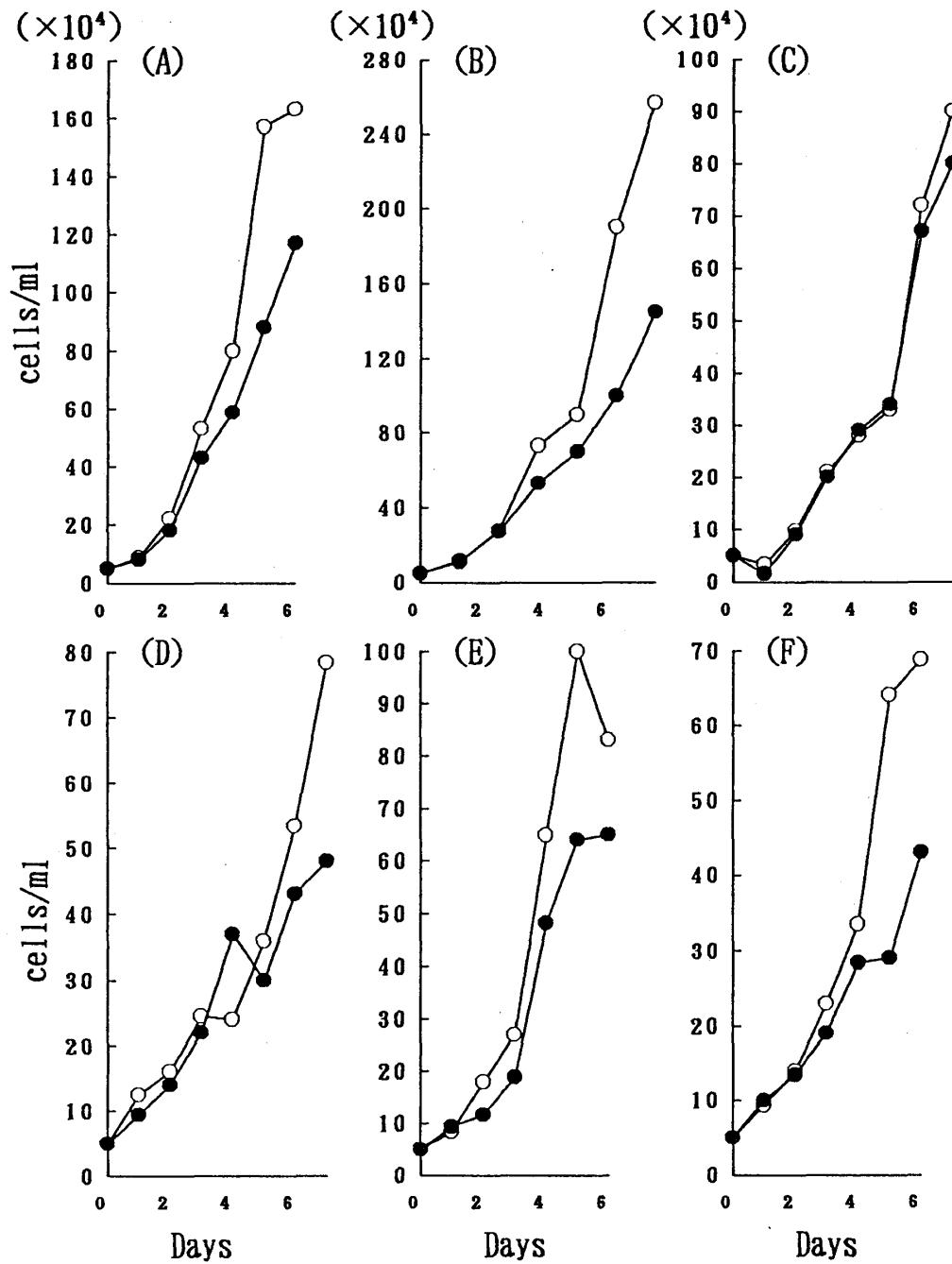


Fig. 1. Growth of various *Tetraselmis* strains in medium with (○) or without (●) 100mM (18g/l) glucose. A, *T. tetrathele*; B, *T. chui*; C, *T. alacris*; D, *T. suecica* Brasil; E, *T. suecica* Spain; F, *T. gracilis*.

ここで  $N_1$  は  $t_1$  日目の細胞密度,  $N_2$  は  $t_2$  日目の細胞密度である。

グルコースを含まない培地と 100 mM (18 g/l) のグルコースを含む培地で 6種のテトラセルミス培養した時の細胞増殖の結果を Fig. 1に示す。 *T. alacris*を除き, いずれの株もグルコース添加により対数期の増殖率は増加した。これらの中で特に増殖率の増加が著しかった *T. tetrathele* (0.76→0.94) と *T. chui* (0.63→0.93) を選んで以下の実験を行った。

*T. tetrathele* と *T. chui* を暗所で培養すると, Fig. 2に示すように, グルコースを含まぬ培地では 12日間ほとんど増殖は見られなかったが, 100 mMのグルコースを含む培地では可成の増殖が見られた。このように, これらの両株がグルコースを従属栄養的に利用していることは明かである。しかし暗所での増殖率は *T. tetrathele* が 0.45, *T. chui* が 0.50と低く, 光を 1日当り 14時間照射した場合の約 1/2であった。また暗所培養では細胞もやや白っぽくなり, クロロフィル等の色素の生産が十分でないと思われた。従ってテトラセルミスの培養は光照射を併用した混合栄養培養が望ましいと思われる。

さらに *T. chui* について, グルコース濃度を 10, 50, 100, 150または 200 mM として培養したところ, 10 mMの時に最大増殖率 (1.30) が得られ, 50 - 200 mM ではやや低下 (0.87 - 0.95) した (Fig. 3)。培養の経過に伴って培地の pH が 6付近まで低下したが, グルコース濃度の増加に応じて pHの低下が早まった。pHの増殖への影響については今後の研究課題としたい。なお培地中のグルコース (Somogyi 法で還元力を測定) は 10 mMの場合でも 7日目にまだ 50%も残存していた。

次に, グルコース 10 mM (1.8 g/l) を含む培地を用い, 硫酸濃度を 0, 0.15, 0.3, 0.6, 0.9 または 1.2 mM として *T. chui* を培養したところ, 0.6 mM (80 mg/l) の時に最大増殖率 1.20を示し, 最終 pHは 5.5であった (Fig. 4)。0.9 mM (120 mg/l) 以上の硫酸濃度では培地の pHが著しく低下した (pH 4.0)。窒素源を 1.2mM の硝酸ソーダ (0.6 mMの硫酸と同じ窒素含量) に変えた場合, pHは培養 7日目でも 8付近に保たれたが増殖はむしろ硫酸の場合より劣った。

光照射の時間を 14時間/日から 10時間/日に変えて *T. chui* を培養した場合, グルコースを含まない培地では増殖率が 0.72か

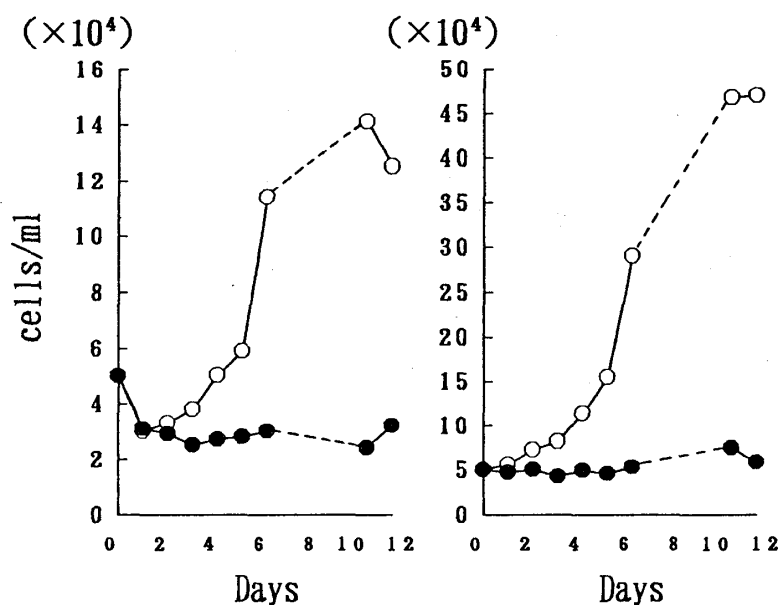


Fig. 2. Growth of *T. tetrathele* (A) and *T. chui* (B) in medium with (○) or without (●) 100mM glucose in the dark.

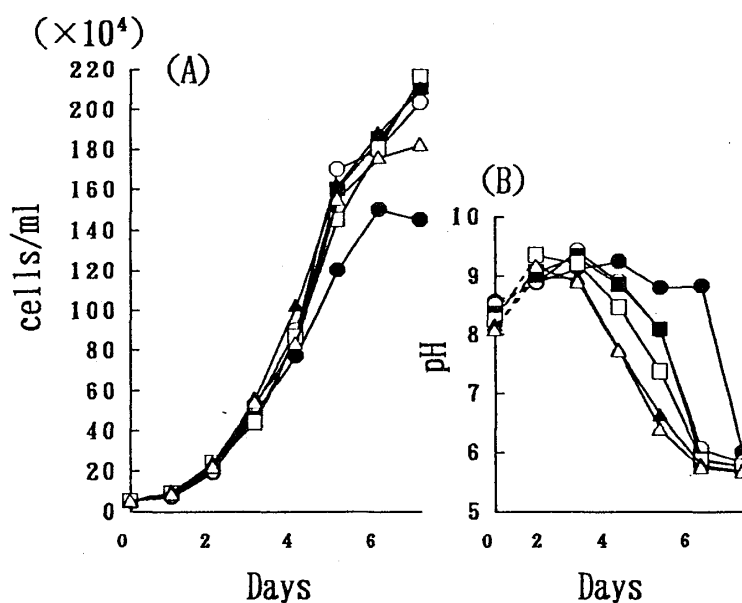


Fig. 3. Growth of *T. chui* in medium with various concentrations of glucose(A) and changes in pH(B) of the culture medium. Glucose concentrations, mM (g/l); ●, none; ○, 10(1.8); ■, 50(9.0); □, 100(18); ▲, 150(27); △, 200(36).

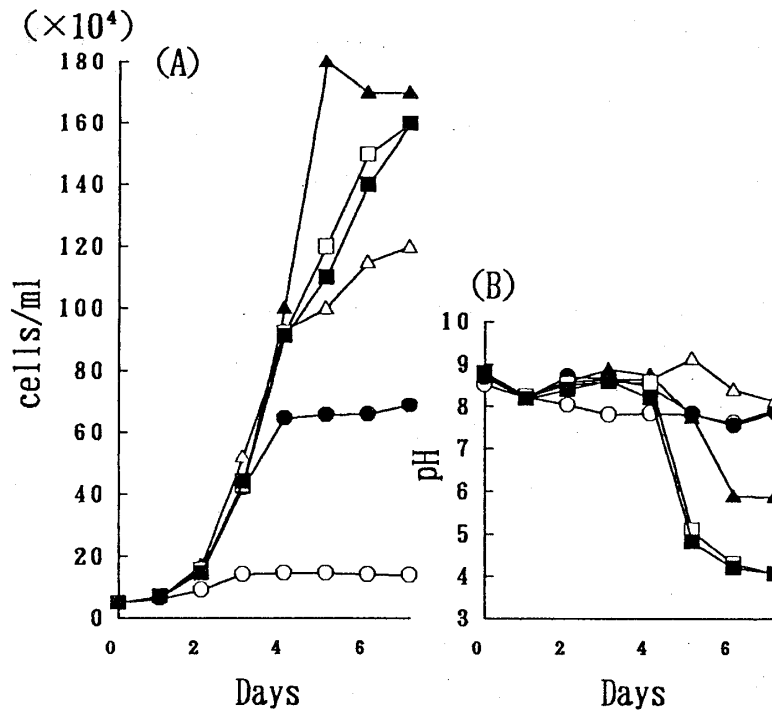


Fig. 4. Growth of *T. chui* in glucose medium with various concentrations of ammonium sulfate (A) and changes in pH (B) of the culture medium. Ammonium sulfate concentrations, mM(mg/l); ○, none; ●, 0.15(20); △, 0.3(40); ▲, 0.6(80); □, 0.9(120); ■, 1.2(160).

ら 0.60に減少したが，グルコース 10 mMを含む培地では減少は見られず (1.03→1.20)，グルコース添加培養によって照射に要する経費の削減が期待できた。しかし，照射時間を 5時間/日に下げると増殖率は 0.58に低下した。

以上の結果から，テトラセルミスの培養においてグルコースを培地に添加することにより細胞の増殖速度を高め，より高い細胞密度を得ることが可能となった。しかし，グルコースのみを炭素源とする従属栄養では生育は不十分で，大量培養には光合成を併用する混合栄養培養が不可欠と考えられる。また，グルコース添加により光の照射時間を減らすことができるが，細菌による汚染が新たな問題となる。一方，*T. tetrathele*, *T. chui*いずれも 10 mMのグルコース培地で培養すると，細胞当りの脂肪酸含量が高まり，海産魚類が必須とするエイコサペンタ

エン酸の含量の比率も増加する結果も得られた（未発表）。テトラセルミスはエイコサペンタエン酸の含量が低いために餌料価値がナンノクロプシスに劣るとされているが、この問題は従属栄養培養を行うことによって解決することが出来るかも知れない。

本研究におきまして、6種のテトラセルミスを御供与の上、貴重な御助言を賜りました西海区水産研究所の岡内正典博士に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 岡内正典・福所邦彦：養殖研報，No.5，1-11（1984）。
- 2) 岡内正典・福所邦彦：養殖研報，No.5，13-18（1984）。
- 3) M. Okauchi and Y. Hirano: Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture, No.9, 29-33（1986）。
- 4) 福所邦彦・岡内正典・田中秀樹・Wahyuni P.：養殖研報，No.7，29-36（1985）。
- 5) 福所邦彦・岡内正典・田中秀樹・Kraisingdecha P.・Wahyuni S. I.・渡辺 武：養殖研報，No.8，5-13（1985）。
- 6) 岡内正典：栽培技研，14，85--110（1985）。
- 7) 福所邦彦：養殖，21，1-6（1984）。
- 8) C. J. Langdon and M. J. Waldock: J. Mar. Biol. Ass. U. K. , 61, 431-448（1981）。
- 9) I. Laing and C. G. Verdugo: Aquaculture, 92, 207-218（1991）。
- 10) I. Laing and E. Jones: Aquaculture Engineering, 7, 89-96（1988）。
- 11) V. Weiss, Z. Gromet-Elhanan and M. Halmann: Water Res., 19, 185-190（1985）。
- 12) J. Fabregas, C. Herrero, B. Cabezas and J. Abalde: Aquaculture, 49, 231-244（1985）。
- 13) F. Camacho, E. Molina, M. E. Martinez, S. Sanchez and F. Garcia: Aquaculture, 90, 75-84（1990）。



- 14) E. A. Laws and J. L. Berning: Biotechnol. Bioeng., **37**, 936-947 (1991).
- 15) H. Endo and M. Shirota: Fermentation Technology Today (ed. G. Terui), 533-541, Soc. Ferment. Technol. Japan, Osaka (1972).
- 16) 佐藤 守・吉中禮二・黒島良介・森本晴之・松岡良知・柳川和司・池内靜徳: 水産増殖, **32**, 83,-87 (1984).