

〈研究発表〉

紫外蛍光法による微細藻類中グリーンオイルの測定

浦田 美由貴¹⁾, 大日方 智¹⁾, 西村 恭彦²⁾¹⁾ 東亜ディーケーケー(株)

(〒350-1388 埼玉県狭山市北入曽 613 E-mail: miyu-urata@toadkk.co.jp)

²⁾ 電源開発(株)

(〒808-0111 福岡県北九州市若松区柳崎町 1)

概要

オイルを蓄積する特徴を持つ微細藻類の培養過程において、紫外蛍光法を用いた無試薬、迅速なグリーンオイル蓄積量のモニタリング方法を報告する。

キーワード：グリーンオイル、微細藻類、紫外蛍光法、培養、モニタリング

原稿受付 2020.6.24

EICA: 25(2・3) 62-64

1. グリーンオイルとは

微細藻類から得られるバイオ燃料、原料用オイルをグリーンオイルと呼ぶ。グリーンオイルは生産過程で光合成により CO₂ を取り込んで生産されるので、カーボンニュートラルといわれる。環境負荷の小さいグリーンオイルは次世代の燃料として世界各国でも研究が進められており、低コストで安定的にグリーンオイル生産を行う生産技術が求められている。

1.1 オイル生産性藻類

本報告で用いるのは電源開発・若松研究所で発見した、高オイル産生海洋性珪藻類 *Fistulifera solaris* JPCC DA 0580 株 (ソラリス株) と、*Mayamaea* sp. JPCC CTDA0820 (ルナリス株) である (Photo. 1)。また適用温度範囲はソラリス株が 15~45℃, ルナリス株は 4~25℃ であり季節に合わせて培養する株を選択することで 1 年を通してグリーンオイルを生産することが可能である。

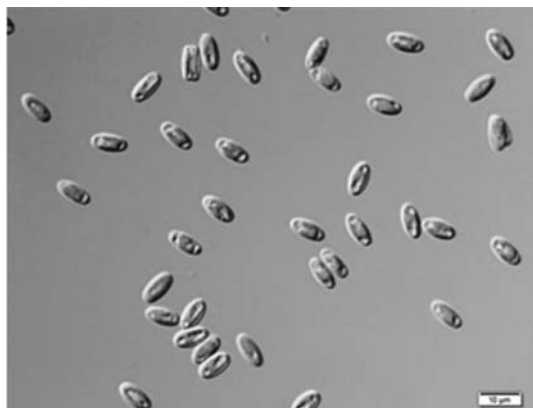


Photo. 1 Photograph of *Mayamaea* sp. JPCC CTDA0820 (LUNARIS)

2. 紫外蛍光法によるグリーンオイルの測定

2.1 紫外蛍光法

紫外蛍光法は有機物を紫外線で励起して得られる蛍光を測定するものである。励起する紫外線波長と得られる蛍光波長との間に関係性を持つ有機物があることから、測定対象成分の特定と濃度測定を行うことができる。

藻類が蓄積するオイルは、ヘキサン抽出による重量法や、染色した試料の蛍光顕微鏡による観察、微小流量フローセルによる可視光波長の蛍光測定法、等でもできるが、紫外蛍光法にて複数の波長を用いることで、蛍光プローブ等が不要なシンプルな測定システムで成分と濃度の測定が可能となる。

2.2 グリーンオイルの測定

藻類はクロロフィルやアミノ酸に由来する蛍光を発光することが知られており、珪藻類であるソラリス株/ルナリス株も同様の特性を持つ。ルナリス株から抽出したオイルは緑色を呈しているが (ソラリス株も同様)、生産するオイルは脂肪酸のパルミチン酸、パルミトレイン酸が主成分で白色であることから、抽出の過程で脂溶性のクロロフィルが溶解したものである。抽出したオイルの EEM (Fig. 1) から EX230nmEM330nm, EX280nmEM330nm, EX430nmEM670nm 付近にピークを確認した。またルナリス株有のオイル蓄積の有無による EEM を Fig. 2, Fig. 3 に示した。EX230nmEM330nm の蛍光ピーク強度がオイル濃度に対応している。EX430nmEM670nm 付近の発光はクロロフィルによるものである。EEM の測定は日立ハイテクサイエンス F-7000 型にて行った。

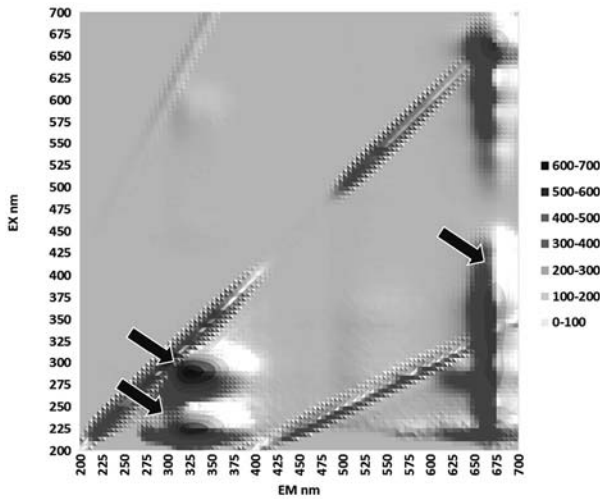


Fig. 1 Fluorescence profile of green oil extract from marine diatom

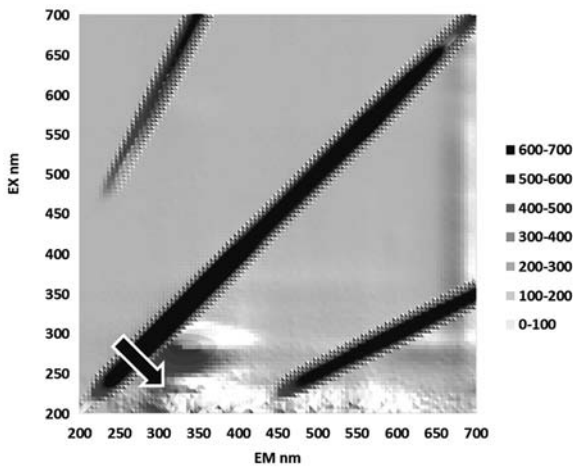


Fig. 2 Fluorescence profile of Solaris

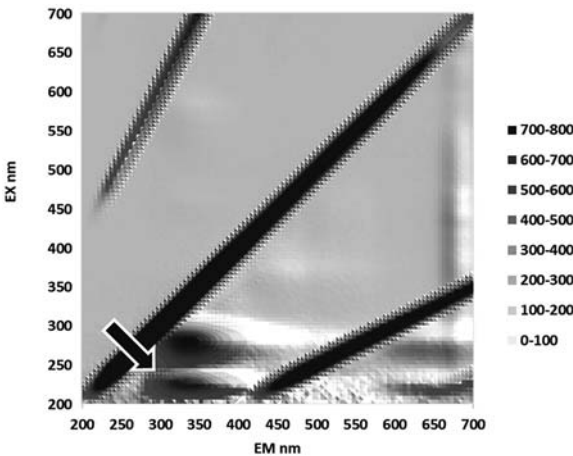


Fig. 3 Fluorescence profile of Solaris with green oil

3. 培養珪藻類の測定

実際の培養試料にて、蛍光は F-7000 型、吸光度は U-3900 型 (ともに日立ハイテクサイエンス)、細胞数の指標として DNA 量を Qubit® dsDNA HS アッセイキット (Thermofisher) にて測定した。

3.1 培養の良否判定

グリーンオイルの生産においては、①培養したソラリス株/ルナリス株のオイル蓄積量が最大値に達したこと、②培養した藻体数が想定どおりに増加したこと、③雑菌の影響がないこと、等を評価してオイルの採集時期を迅速に判定することがポイントである。例えばソラリス株は最大で自重の約 60% までオイルを蓄積することができるので、培養の最終目標は藻体数と藻体数に対するオイル蓄積量である。ただし、培養にかかる時間が長くなると、費用が増大するばかりか、雑菌や他の生物が発生しやすくなって悪影響を与えるため、適切な期間で培養を終える必要がある。特に大規模培養においては藻体数の増加とオイルの増加を的確にとらえることができると、生産コストの低減につながるため、培養に負荷をかけずに簡易な方法でリアルタイム監視ができることが求められる。

3.2 培養試料の測定

ソラリス株/ルナリス株は培養の過程において、初期は藻体数を増加し、後期には藻体数を維持したまま藻体中のオイル蓄積量を増やすという特徴を持つ。例えばオイル蓄積有無の蛍光特性の違いから、EX230nmEM330nm の蛍光強度を測定することでオイル蓄積量の変化がとらえられるが、これだけでは培養試料中のオイル総量がわかるだけで、培養の良否を判定するための藻体数の変化や個々の藻体中のオイル蓄積量は判定できない。そこで Fig. 2, Fig. 3 でオイルとクロロフィルの他に EX280nmEM330nm にも蛍光ピークがあることに注目した。この波長の蛍光はアミノ酸に由来するものが多く、培養中の藻体数の変化に追従していることから (Fig. 4)、先のオイル由来の蛍光強度とあわせて測定することによって、藻体数の変化と、オイルの蓄積量の双方をモニタリングすることが可能になる。

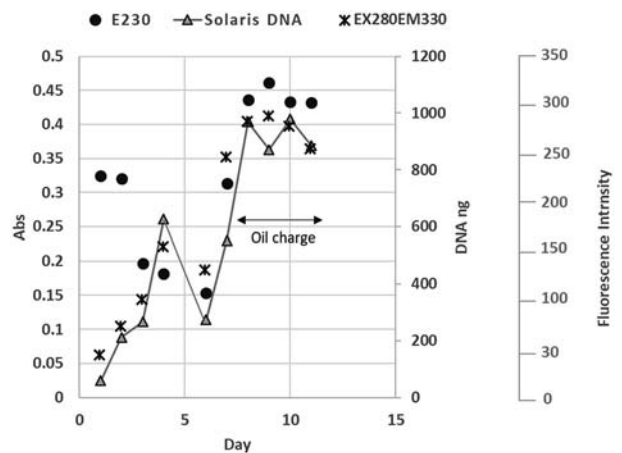


Fig. 4 Change of the parameter in a culture process

3.3 妨害成分

培養試料の蛍光強度を測定するにあたって、もっとも影響の大きい要素が光の吸収である。特に励起波長、蛍光波長付近に吸収があると正しい測定値が得られなくなる。夏季はソラリス株、冬季はルナリス株を培養した。培養条件は気温の他はほぼ同一であったが、唯一、オイル生産培養に入る前のプレ培養の培養液が異なった。培養液は230 nmに窒素由来する大きな吸収があり、この波長はオイル測定時の励起波長でもあることから、培養液の違いによる吸収特性の変化は蛍光測定において大きな影響を与えた。Fig. 4に培養過程の230 nmの吸収特性の変化を示す。藻体増殖期にこの吸収は高い値を示し、培養の進捗とともに低下し、オイル蓄積期に移行すると再び高くなる。増殖期には培養液の窒素濃度変化をとらえているが、培養の進捗とともに窒素が消費され、オイル蓄積期に移行すると藻体濃度の変化による吸収をとらえている。つまり増殖期とオイル蓄積期への移行ポイントでは大きな変化を示すため、藻体生産量の指標としてのEX280 nmEM330nmの蛍光強度とともに、230 nmの吸光度を測定し培養の進捗を判定するパラメータの一つとして利用できることがわかった。

3.4 結果

Fig. 4より230 nmの吸光度が大きく変化したときにオイル蓄積期に移行していることを確認した。そこで230 nmの吸光度が最小のポイントを窒素消費が完了したオイル蓄積期への移行ポイントであるとし、その前後で藻体増殖期とオイル蓄積期に分けてEX230nmEM330nmの蛍光強度からオイルの検量線を作成した。上記検量線から得たオイル濃度は、実採取量とよく一致した(Fig. 5)。

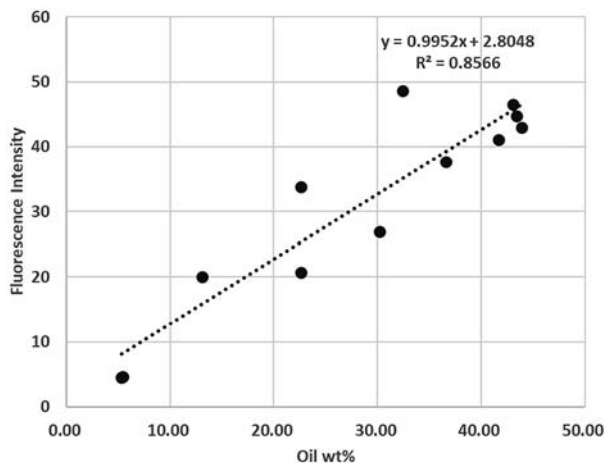


Fig. 5 Relationship of fluorescence intensity and oil content in the cell (Solaris)

4. 今後の課題

グリーンオイルを効率的に生産するには、培養の制御と効率化が欠かせない。しかし生き物相手の測定はパラメータが多岐にわたり非常に難しい。特にルナリス株、ソラリス株は年間を通した屋外培養であることから、天候の影響も受ける。そのため各々の計測機の精度、維持管理も重要な要素ではあるが、培養全体を俯瞰した総合的な判断が必須である。今後さらに測定データの種類やn数を増やし、精度を向上させる必要がある。

参考文献

- 1) 松本光史, 田中剛: 微細藻類を用いたバイオ原料・燃料用オイル生産技術開発への挑戦, 環境バイオテクノロジー学会誌, Vol. 12, No. 1, 9-14, (2012)