

微細藻類の新規培養相判定技術による
海産魚類仔魚用初期餌料の
高付加価値化に関する研究

(Studies on development of monitoring
technique of the culture phase transition of
microalgae for enriching the initial feed
for marine finfish larvae)

松井 英明

2019

目次

	ページ
第一章 総合背景	
1.1. 海産魚類種苗生産の重要性	1
1.2. 海産魚類仔魚用餌料の高付加価値化.....	1
1.3. ワムシの HUFA 強化剤の歴史.....	2
1.4. ワムシの HUFA 強化剤としての培養微細藻類の意義.....	3
1.5. 培養微細藻類を用いたワムシの HUFA 強化における課題点および博士論文の 目的	4
第二章 分光光度法を用いた <i>Nannochloropsis oculata</i> の培養相の判定技術の確立	
2.1. 背景.....	7
2.2. 材料と方法.....	10
2.2.1. <i>N. oculata</i> の株の用意.....	10
2.2.2. 白色蛍光灯を用いた培養実験の条件	11
2.2.3. LED を用いた培養実験の条件	12
2.2.4. サンプルングとサンプルの保存.....	13
2.2.5. 細胞密度	14

2.2.6.	増殖フェーズの推定.....	14
2.2.7.	培養液中の栄養塩濃度.....	15
2.2.8.	分光光度法.....	16
2.2.9.	脂質の抽出および分画.....	17
2.2.10.	脂肪酸分析.....	18
2.2.11.	クロロフィル <i>a</i> 含量.....	18
2.2.12.	統計解析.....	19
2.3.	結果.....	19
2.3.1.	白色蛍光灯を用いた培養実験.....	19
2.3.1.1.	細胞密度と増殖フェーズ.....	20
2.3.1.2.	培養液中の栄養塩濃度.....	20
2.3.1.3.	吸光スペクトル.....	21
2.3.2.	LED を用いた培養実験.....	22
2.3.2.1.	増殖速度と栄養塩濃度の変化.....	22
2.3.2.2.	栄養塩枯渇下での非極性脂質の蓄積.....	22
2.3.2.3.	Abs ₄₉₀ /Abs ₆₈₀ 、脂肪酸組成、およびクロロフィル <i>a</i> 含量の 時間変化.....	23
2.4.	考察.....	24
2.4.1.	増殖フェーズの決定方法の検討、および培養液中の栄養塩が及ぼ す増殖フェーズへの影響.....	24

2.4.2.	培養液中の栄養塩が及ぼす吸光特性への影響.....	26
2.4.3.	光条件と栄養塩の欠乏が及ぼす脂質含量と脂肪酸含量への影響.....	27
2.4.4.	吸光特性と生化学組成との関係.....	28

第三章 分光光度法を用いた *Nannochloropsis oculata* の培養相の判定技術によるワムシの効果的な EPA の強化

3.1.	背景.....	31
3.2.	材料と方法.....	33
3.2.1.	<i>N. oculata</i> の培養実験.....	33
3.2.2.	分光光度法による微細藻類の培養相のモニタリングとサンプリング	34
3.2.3.	微細藻類の生化学分析.....	35
3.2.4.	透過型電子顕微鏡 (TEM) による藻類細胞内の微細構造の観察.....	36
3.2.5.	ミトコンドリアのラベリングと蛍光観察.....	37
3.2.6.	ワムシの栄養強化実験.....	37
3.2.7.	統計解析.....	39
3.3.	結果.....	39
3.3.1.	<i>N. oculata</i> の増殖速度とタンパク質および脂質の含量.....	40
3.3.2.	<i>N. oculata</i> の総脂質および各脂質クラスに含まれる脂肪酸組成.....	40

3.3.3.	<i>N. oculata</i> の細胞内小器官の形態変化.....	42
3.3.4.	ワムシの個体群増殖および脂肪酸組成.....	43
3.4.	考察.....	43
3.4.1.	培養相の遷移に伴う藻類細胞への脂質および脂肪酸の蓄積.....	43
3.4.2.	微細藻類の膜脂質への PUFA の蓄積.....	45
3.4.3.	ワムシの効果的な栄養強化に向けた微細藻類の培養相推定の重要性	47

第四章 分光光度法を用いた *Isochrysis* sp. タヒチ株の培養相の判定技術の確立および

そのワムシの効果的な DHA 強化への応用

4.1.	背景.....	49
4.2.	材料と方法.....	51
4.2.1.	<i>Isochrysis</i> sp. タヒチ株の用意.....	51
4.2.2.	タヒチ株の培養実験.....	52
4.2.3.	各波長の吸光度.....	53
4.2.4.	栄養塩濃度.....	53
4.2.5.	ワムシの栄養強化実験.....	54
4.2.6.	ワムシの遊泳速度.....	55
4.2.7.	生化学分析.....	56
4.2.8.	統計解析.....	56

4.3.	結果.....	57
4.3.1.	タヒチ株の細胞密度と培養液中の栄養塩濃度の時間変化.....	57
4.3.2.	タヒチ株の脂質含量および DHA 含量の時間変化.....	57
4.3.3.	タヒチ株の吸光特性.....	58
4.3.4.	ワムシの生理活性評価.....	59
4.3.5.	ワムシの HUFA 強化効率.....	60
4.4.	考察.....	61
4.4.1.	増殖フェーズの遷移および培養液中の栄養塩の欠乏が及ぼすタヒチ株の脂質代謝への影響.....	61
4.4.2.	培養液中の栄養塩が及ぼす微細藻類の吸光特性への影響.....	64
4.4.3.	ワムシの生理活性に対するタヒチ株の培養相の影響.....	65
4.4.4.	ワムシの DHA 強化剤としてのタヒチ株の実用性.....	68
第五章 総合考察		
5.1.	水産現場における微細藻類の培養相遷移の評価.....	71
5.2.	ワムシの栄養強化剤としての培養微細藻類の有効性.....	72
5.3.	培養微細藻類を用いたワムシの効率的な栄養強化方法の提案.....	74
	謝辞.....	77

参考文献.....	79
表とグラフ	99

第一章 総合背景

1.1. 海産魚類種苗生産の重要性

魚介類は、世界の動物性タンパク質の主要な供給源である。世界の一人1年あたりの魚介類の消費量は年々増加しており（国際連合食糧農業機関;FAO 2013）、魚介類は食料として世界的に関心が持たれている。その結果、人口増加に伴う将来的な海産魚類の資源量の不足が懸念されている。世界の人口は増加傾向にあり、アジアを中心に世界の魚介類の総消費量も増加している（FAO 2013）。それにもかかわらず、世界の海産魚類の漁獲量は1980年代後半から頭打ちとなっている（FAO 2015）。そのため、天然海域に存在する資源に依存しない海産魚類の完全養殖による生産が必要である。

完全養殖では、親魚の成熟個体から採卵し、卵を孵化させ、仔魚を幼魚、さらに成魚まで飼育し、再び親魚を養成する。魚類の資源量は生活史の中でも仔魚期に、様々な要因によって劇的に減少する（Bailey and Houde 1989）。この低い生残率を高くすることで、海産魚を食料として出荷できる量を底上げできる可能性がある。魚介類の食料を安定的に十分量供給するためには、海産魚類の種苗を養殖により量産することが不可欠である。

1.2. 海産魚類仔魚用餌料の高付加価値化

海産魚類の仔魚期に見られる大量減耗の一要因として、卵黄の吸収が完了する時期に

起きる栄養不足が挙げられている (Laurence et al. 1972; Kohno et al. 1990)。これまで海産仔魚の生残率を高めるために、海産仔魚の餌の栄養素に関する研究が行われてきた。特に、エイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) といった高度不飽和脂肪酸 (HUFA) が持つ餌料価値に関して、多くの研究がなされてきた (Gisbert et al. 2005; Kjorsvik et al. 2009; Wold et al. 2009; Kotani et al. 2017)。HUFA は海産魚類の胚発生および仔魚発達に必須の脂肪酸であり (Fernández-Palacios et al., 1995)、一方で海産魚類の HUFA の生合成能は低い (Watanabe, 1993)。海産仔魚は餌料中の HUFA を強く依存するため、その高い HUFA 要求量に見合った餌料開発が行われている。

現行の海産魚類種苗生産では、その初期餌料に用いられる汽水産ツボワムシ類(以下、ワムシ) の HUFA 含量を高めることが必須である。ワムシは 1960 年代から種苗生産に導入されて以降 (伊藤 1960)、仔魚の口径に適した体サイズや培養の簡易さなどの点から、多くの海産仔魚の餌料として世界的に利用されている。一方、ワムシ自体は EPA や DHA などの HUFA をほとんど含有しない (Watanabe et al. 1978; Kitajima et al. 1979; Ben-Amotz et al. 1987)。そこで、種苗生産現場では、ワムシを海産仔魚に給餌する前に HUFA を高含有する餌料および配合飼料をワムシに給餌しその HUFA 含量を高める、いわゆるワムシの HUFA 強化が従来行われている (Watanabe et al. 1978; Kitajima et al. 1979; Ben-Amotz et al. 1987)。

1.3. ワムシの HUFA 強化剤の歴史

ワムシの HUFA 強化剤の始まりは、HUFA の 1 種である EPA を含有する真正眼点藻 *Nannochloropsis oculata* であった (平田 1964; Maruyama et al., 1986)。*N. oculata* は、古くからワムシの餌料として用いられているパン酵母や緑藻 *Chlorella* では強化できなかったワムシの EPA 含量を高め、マダイなどの海産仔魚の量産に貢献してきた (Watanabe et al., 1983)。*N. oculata* はその培養の簡便性から、分類学的に同定される前から現在に至るまでワムシの EPA 強化剤として利用されている (Maruyama et al., 1986)。また、微細藻類はその分類によっては DHA を含む微細藻類も存在しており (Volkman et al. 1989; Renaud et al. 1999; Patil et al. 2007)、その藻類種を用いたワムシの DHA 強化も検討されてきた (Reitan et al. 1993, 1997; Øie et al. 1995)。現在では、EPA や DHA を有する微細藻類の濃縮液の他に、魚油を加工した配合飼料や魚油由来の DHA を生体濃縮させた酵母菌や *C. vulgaris* が製品化されている (Imada et al., 1979; Hayashi et al. 2001)。これらの製品は簡便性や有効性の点からワムシの HUFA 強化剤として種苗生産現場に広く利用されている (Maruyama et al. 2006; Li and Olsen 2015)。

1.4. ワムシの HUFA 強化剤としての培養微細藻類の意義

上記の一部の HUFA 強化剤に用いられる魚油は、一般的に天然から漁獲された海産魚を材料に加工されている。魚油を配合した製品によるワムシの HUFA 強化は、海産魚の養殖生産量の増加と同時にその天然資源量の減少につながる。海産魚は天然海域において HUFA を、一次生産者である微細藻類から生食食物連鎖により間接的に獲得している

(Adarme-Vega et al. 2012)。一方、*N. oculata* を含む多くの微細藻類は光と無機栄養塩類を供給することで自家培養が可能な独立栄養生物である (Adarme-Vega et al. 2012)。そのため、微細藻類は天然の水産資源を圧迫しないワムシの HUFA 強化、並びに持続的可能な海産魚類の種苗生産を行う上で必須の餌料である。魚油を用いた HUFA 強化剤に頼らずに海産仔魚を量産する方法を種苗生産現場に普及するには、培養微細藻類を用いたワムシの HUFA 強化技術を発展させる必要がある。そこで、微細藻類の培養による HUFA を高含有する細胞の生産方法、並びにその細胞群をワムシに安定供給する技術の開発が求められる。

1.5. 培養微細藻類を用いたワムシの HUFA 強化における課題点および博士論文の目的

N. oculata を含む微細藻類は種苗生産の現場では、培養の維持費用やその簡易性などの観点からバッチ培養方式で生産されている (Muller-Feuga et al., 2009)。バッチ式の培養では、細胞内の生化学組成が、時間経過に伴う環境的制限により細胞の増殖パターンとともに変化する (Okauchi 2015)。特に、培養液中の栄養塩は、様々な培養方法や環境条件に共通して微細藻類の増殖とともに消費され、いずれ枯渇する。総脂質中の HUFA 含有率 (%) は、多くの微細藻類で共通して栄養塩を欠乏させた培地で培養した時に十分量存在する培地に比べて減少する (Reitan et al., 1994)。これは、藻類細胞の収穫時期が HUFA を高含有する細胞を生産する上で重要であることを意味している。しかし、水産現場では、いつ栄養塩が欠乏し、いつ栄養塩の欠乏により藻類細胞中の HUFA 含量が変化する

のかを推定することが難しい (Matsui et al. 2017)。ワムシの EPA 強化に最適な *N. oculata* の細胞群を安定的に収穫するには、その培養相の簡便な評価基準が必要である。

また、微細藻類の培養相の違いが及ぼすワムシの HUFA 強化への影響も不明である。ワムシの脂肪酸組成は、ワムシの餌料に用いる微細藻類種の間でよく比較されているが (Watanabe et al., 1979; Ben-Amotz et al., 1987; Øie et al., 1994)、同一藻類種の中でもその培養に用いる培地中の栄養塩濃度の違いや収穫時期の違いによって変化する可能性がある (Ferreira et al. 2007, 2008)。そのため、微細藻類の培養状態の評価基準を確立した後にワムシの栄養強化実験を行い、餌料に用いる微細藻類の培養状態の選定がワムシの HUFA 強化効率の向上に繋がるか調査する必要がある。

本論文では、微細藻類の培養相の評価方法の確立およびそのワムシの HUFA 強化への応用を目的とする。第一章では、水産現場への導入が可能な分光光度計を用いて、*N. oculata* の培養相の変化を簡便に評価できるか検討した。第二章として、*N. oculata* の培養相と HUFA の蓄積状態の関係を明らかにし、第一章で確立した評価手法を用いてワムシの HUFA 強化効率を向上させることを目指した。

最後に、第三章として、第一章で確立した評価手法を用いた培養相の判別が他種の微細藻類でも可能か検討した。*N. oculata* は HUFA として EPA を含んでいるが DHA は有していない (Maruyama et al., 1986)。DHA は EPA より海産魚類の要求量が高く、DHA 含量が高い餌料中を用いると海産仔魚の飼育成績が向上する (Watanabe 1993; Rainuzzo et al. 1997; Furuita et al. 1999)。そこで、DHA を含有するハプト藻 *Isochrysis* sp. タヒチ株に着目し、その培養相の変化を分光光度計によって評価できるか検討した。さらに、タヒチ株

がワムシに及ぼす給餌効果を、魚油を加工した HUFA 強化剤 (SFC; クロレラ工業、東京、日本) と比較することで、ワムシの栄養強化剤としてのタヒチ株の実用性を評価した。

第二章 分光光度法を用いた *Nannochloropsis oculata* の培養相の判定技術の確立

2.1. 背景

Nannochloropsis oculata のように高度不飽和脂肪酸 (HUFA) を含有する微細藻類は、種苗生産現場では大規模な水槽や池を用いてバッチ式の培養方法により、大量生産されている (Muller-Feuga et al. 2003)。バッチ式培養では、微細藻類の増殖フェーズ間で代謝様式が変化し、その代謝産物含量は培養時間の経過に伴う栄養塩類の欠乏の影響を受ける (Okauchi 2015)。例えば、ハプト藻 *Pavlova lutheri* は葉緑体が対数増殖期から定常期や死滅期にかけて縮小し、タンパク質や総脂質中の高度不飽和脂肪酸 (HUFA) の含量が減少する一方、備蓄エネルギーが液胞や油滴の中に蓄積される (Okauchi 2015)。培地中の栄養塩類、特に窒素源の制限は、微細藻類のタンパク質含量を減少させ (Thomas et al. 1984a)、炭水化物や中性脂質を蓄積させる (Harrison et al. 1990; Fidalgo et al. 1998; Lacour et al. 2012; Li et al. 2014)。そのため、種苗生産現場では、総脂質中の HUFA 含量が高くなる時期に細胞群を収穫するために微細藻類の培養相の変化を推定する必要がある (Creswell 2010; Lee et al. 2013)。現行の推定方法は、藻類細胞の増殖フェーズにのみ依存している。増殖フェーズは細胞計数の結果を基に、誘導期、対数増殖期、定常期、そして死滅期が定義されている (Monod 1949)。一般的に、種苗生産現場では、HUFA 含量が高い対数増殖期に収穫することが望ましいとされている (Creswell 2010)。

ここで増殖フェーズを基準に培養相の変化を評価する際に、2点問題が挙げられる。

1 つ目は代謝産物の量は同じ増殖フェーズの中でも変化することである。タンパク質、炭水化物、脂質、および脂肪酸の含量は、対数増殖期と定常期の間だけでなく、各増殖フェーズ内の初期と後期の間でも変化する (Fernández-Reiriz et al. 1989; Siron et al. 1989; Hodgson et al. 1991; Fidalgo et al. 1998)。Hodgson ら (1991) は、*N. oculata* の脂質クラスや脂肪酸の組成は対数増殖期の前に見られる誘導期の中でも変化することが報告されている。増殖フェーズを培養相の基準にする 2 つ目の問題は、増殖フェーズが遷移する時期が、培養液中の栄養塩濃度や藻類細胞内の代謝産物量の変化時期と常に一致するというわけではないことである。例えば、定常期に収穫したとされる *P. lutheri* のタンパク質含量は、対数増殖期に収穫したとされる細胞群より高かった (Brown et al. 1993)。Brown ら (1993) はこの現象に関して、定常期にも栄養塩が存在していたと報告している。Courtois de Viçose ら (2012) は、対数増殖期に収穫した珪藻 *Nitzshia* sp. の炭水化物含量がタンパク質含量よりも高かったことから、対数増殖期までにその培養液中の栄養塩が制限されていた可能性について言及している。これらの結果より、細胞計数は、微細藻類の培養相の遷移を正確に捉えているわけではなく、代謝産物含量の変化を推定することが難しいと言える。そのため、細胞計数に代わる培養相の評価方法の開発が求められる。

微細藻類の増殖および HUFA を含む生化学組成を評価する方法は、増殖フェーズの他に、分光光度法 (Merzlyak et al. 2007; Solovchenko et al. 2011; Reichardt et al. 2012)、フローサイトメトリー (Hyka et al. 2013)、およびパルス変調クロロフィル蛍光測定法 (PAM 法; White et al. 2011; Malapascua et al. 2014) などが実験レベルで検討されている。しかし、分光光度法を除き、ほとんどの手法では高額の分析機器や操作技術が必要で、種苗生産現

場に導入することが難しい。脂肪酸組成はガスクロマトグラフィーによっても直接測定できるが、機器が高額であるだけでなく脂質の抽出や脂肪酸のメチルエステル化などの多くの作業工程が必要である。一方で、分光光度法は比較的安価な分析機器である分光光度計を用いて行われる測定方法であり、藻類の吸光特性を迅速に、簡便に、かつ非破壊的に測定することができる。(Solovchenko et al. 2011)。吸光スペクトルから評価できる色素組成は培養液中の栄養塩の欠乏により変化することが明らかである (De Madariaga and Join 1992; Latasa 1994; Latasa and Berdalet 1994)。実際に *N. oculata* の培養液の色は、時間経過に伴い緑色から黄色に変化する。そのため、栄養塩の欠乏に伴う HUFA などの代謝産物含量の変化時期は、分光光度法によって簡便に推定できる可能性がある (Forján et al. 2007; Merzlyak et al. 2007)。

また、微細藻類の増殖や代謝は栄養塩だけでなく、同時に光の影響も受ける。最近では HUFA を含む有用代謝産物を効率的に生産させるために、微細藻類の培養用光源として発光ダイオード (LED) が注目されている (Glemser et al. 2016)。LED は、現在広く普及されている蛍光灯よりも消費電力が低く、耐久性が高く、そして培養液の水温上昇を抑えられる点から (Ueno 2003; Yeh and Chung 2009; Carvalho et al. 2011; Atta et al. 2013)、実際に種苗生産現場での微細藻類培養に用いられている例もある (Ueno 2003; Okumura 2008; Ishikawa and Isowa 2012; Okauchi 2013)。LED は短い波長域の光のみを照射するため、LED による特定波長の光や混合波長の光の照射によって微細藻類の増殖や脂質などの生産量を高められることが報告されている (Kim et al. 2013; Teo et al. 2014a, b)。しかし、LED は、太陽光や白色蛍光灯のような長い波長帯の光を照射できる光源と異なる性質の光を放つ

ため、微細藻類の代謝様式も異なる可能性がある (Hultberg et al. 2014)。今後 LED が一般的な微細藻類の培養に用いる光源になることを想定すると、分光光度法を用いた微細藻類の培養相の評価が、様々な光条件下で微細藻類を培養した場合でも正確に行えるのか検討する必要がある。

そこで、第二章ではまず *N. oculata* の白色蛍光灯を用いて培養した時の増殖フェーズ、吸光スペクトル、および培養液中の栄養塩濃度の関係を明らかにした。その後、白色蛍光灯に加えて各色 LED を用いて *N. oculata* を培養し、時間経過に伴う生化学組成の変化時期を分光光度法により推定できるか検討した。本研究では、LED を用いた各波長光が *N. oculata* に及ぼす影響は、青色光と赤色光に焦点を当てて考察した。これは、この2色の光がそれぞれ微細藻類の増殖や脂質および脂肪酸代謝を変化させると多くの研究で明らかになっているからである (You and Barnett 2004; Atta et al. 2013; Kim et al. 2014; Teo et al. 2014a, b; Chen et al. 2015)。

2.2. 材料と方法

2.2.1. *N. oculata* の株の用意

N. oculata の株は、2011年4月に長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科の萩原篤志先生から分与していただいた。その株のカルチャーは鹿児島大学の水産学部で、塩分 23 psu に希釈した海水を高圧滅菌にかけ、KW21 培地 (第一製網株式会社、明石、日本)

の混合栄養塩類を添加した培養液の中で水温 20 度下でバッチ式の培養により維持した。*N. oculata* は常時通気し、白色蛍光灯を用いて $100 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光を 24 時間連続で照射しながら培養した。*N. oculata* は毎週 1 回新しい培地に植え継いだ。

2.2.2. 白色蛍光灯を用いた培養実験の条件

まず、*N. oculata* の増殖フェーズの遷移に伴う吸光スペクトルの変化を明らかにするために、白色蛍光灯を光源に用いた *N. oculata* の培養実験を行った。白色蛍光灯は、色温度が 4100 K の三菱オスラム製 (FL40SW; 神奈川、日本) のものを用いた。光合成有効放射 (PAR、400–700 nm) の波長帯の光量子束密度は、球型光量子センサー (LI-193SA; LI-COR Bio-sciences、ネブラスカ、アメリカ) を取り付けられたライトメーター (LI-250A; LI-COR Biosciences、ネブラスカ、アメリカ) を用いて測定したところ、 $100 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ だった。*N. oculata* は、Guillard の *f* 培地 (Guillard and Ryther 1962) を用いて、水温 20 度、塩分 23 psu、24 時間連続照射の下でバッチ式により 3 回前培養を繰り返した。通気は、シリンジフィルター (Millex; 孔径 $0.22 \mu\text{m}$; Millipore、マサチューセッツ、アメリカ) を通した無菌の空気で行った。このカルチャーは 3 日置きに植え継ぎ、対数増殖期と推定される細胞を本実験に用いた。3 回目の培養後に、*N. oculata* の細胞群を遠心分離によって収穫した (3600 rpm, 20 min)。上澄み液は、本実験で用いる培地中の栄養塩が希釈されるのを防ぐためにできる限り取り除いた。沈殿している細胞群は懸濁後 3 l の三角フラスコ中の 2.7 l の新しい培地に接種した。初期密度は、 $0.1 \times 10^6 \text{ cells ml}^{-1}$ (低密度)、 1.0

$\times 10^6 \text{ cells ml}^{-1}$ (中間密度) および $10 \times 10^6 \text{ cells ml}^{-1}$ (高密度) にそれぞれ設定した。これは、初期密度の違いによる増殖フェーズの時期のずれ吸光スペクトルの変化時期に及ぼす影響を評価するためである。これらの培養液は、前培養と同じ環境条件下で 12 日間維持した。

2.2.3. LED を用いた培養実験の条件

N. oculata の吸光スペクトルの変化と生化学組成の変化の関係を明らかにするために、白色蛍光灯に加えて各色 LED を光源に用いた *N. oculata* の培養実験を行った。白色蛍光灯は前述と同じものを用いた (2.2.2.参照)。LED に関しては、青色 ($\lambda_{\text{max}} 460 \text{ nm}$; FWHM 20 nm)、緑色 ($\lambda_{\text{max}} 530 \text{ nm}$; FWHM 20 nm)、および赤色 ($\lambda_{\text{max}} 630 \text{ nm}$; FWHM 20 nm) の直管型の高輝度 LED (20W; ビームテック、埼玉、日本) を光源に用いた。それぞれの光波長は、分光放射照度計 (CL-500A; Konica-Minolta、東京、日本) を用いて確認した。LED を用いた培養実験では、各色を組み合わせて 3 つの異なる試験区を用意した。白色蛍光灯を用いた試験区と LED を用いた 3 つの試験区における各波長の光量子束密度を Fig. 2.1 に示した。460 nm と 630 nm の光量子束密度の比は、青色試験区では 4.0、青赤色試験では 1.6、および赤色試験区では 0.9 だった。本研究では、緑色光は白色蛍光灯の放射スペクトルに近づけるための補助光源として B と R の試験区に用いた。光量子束密度は、全ての培養実験に共通して約 $100 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ になるように調節した。この光量は、球型光量子センサーを取り付けたライトメーターを用いて測定した。

培養実験を始める前に、*N. oculata* は各光源を用いて3回前培養を行った。*N. oculata* の前培養は2.2.2の実験と同様の条件で培養した。3回目の培養後、対数増殖期と推定される培養液を少量だけ新しい*f*培地に直接加えて培養実験を始めた。初期密度は 1.0×10^6 cells ml⁻¹になるように調節し、各培養液は前培養と同様の条件下で11日間維持した。

2.2.4. サンプリングとサンプルの保存

各カルチャーに含まれる培養液は、細胞密度、栄養塩濃度、吸光スペクトル、および生化学組成を測定するために、できるだけ毎日同時刻にビーカーに収穫した。栄養塩濃度を測定するためのサンプルは培養液をGF/Cガラスフィルター（Whatman、メードストーン、イングランド）を通してろ過し、50ml遠沈管に回収して-20度で保存した。吸光度を測定するためのサンプルは培養液中の細胞を固定せずに用意し、ブランクは培養液をGF/Cガラスフィルターを通してろ過して用意した。脂質および脂肪酸組成を測定するために、50-200ml分の培養液は遠心分離して（3600rpm、10分）細胞群を収穫した。上澄み液を捨てた後、細胞ペレットはバスツールピペットを用いてガラス管に回収した。塩分を取り除くために、細胞は0.5 Mのギ酸アンモニウムを用いて洗った。細胞ペレットは凍結乾燥し、-80度で脂質抽出を行うまで保存した。クロロフィル*a*含量を測定するためのサンプルは、0.2-5ml分の培養液をGF/Fガラスフィルター（Whatman、メードストーン、イングランド）でろ過することで回収した。細胞を含むガラスフィルターは直口型ガラスチューブ（孔径13mm、長さ100mm; Thermo Fisher Scientific、マサチューセ

ッツ、アメリカ) に入れ-80 度で保存した。

2.2.5. 細胞密度

細胞は顕微鏡 (ECLIPSE 55i; Nikon、東京、日本) のもとで 200 倍の倍率で計数した。

細胞密度は、血球計算盤 (深さ 0.1 mm; サンリード硝子株式会社、東京、日本) を用い

て Guillard と Sieracki (2005) の方法に従い推定した。増殖速度 (μ) は Guillard (1973)

の式に当てはめて算出した

$$\mu = \ln(N_1/N_0)/(t_1 - t_0) \text{、}$$

この時の N_0 と N_1 は、それぞれ時間 t_0 と t_1 の細胞密度である。

2.2.6. 増殖フェーズの推定

微細藻類の増殖フェーズの推定は、一般的に増殖速度 (Monod 1949; Fogg and Thake 1965)

や近似曲線 (Zwietering et al. 1990) を基に行われる。各増殖フェーズの期間は、増殖速度

が有意に変化する箇所を特定するために二次元配置分散分析を用いて決定した。対数増

殖期は、微細藻類の増殖曲線が最も高い傾きを示す期間と定義した。定常期はその傾き

が変化しない期間と定義した。誘導期は、対数増殖期の前に確認される期間と定義した。

増殖フェーズは二次元配置分散分析を用いて以下の手順で決定した

1. 各増殖フェーズの開始時期を仮に決定した、

2. 2つの期間の傾きを比較し、有意差が出ない場合は比較対象の期間を拡張した、
3. 2つの期間の傾きの間で有意差が出るまで有意差が出るまで2.を繰り返した、
4. 傾きが有意に変わらない期間をその増殖フェーズとした。

本研究では、上記の手順2.での傾きの比較に関して2種類の方法を検討した(Fig. 2.2)。

タイプ i では予想される増殖フェーズの期間同士を比較し、タイプ ii では連続した時期間で比較した。有意差が検出されなかった場合、タイプ i では増殖フェーズの期間を直接決定できた。タイプ ii では、その増殖フェーズ内での x 日と $(x+1)$ 日の間で傾きを有意差が出るまで比較した (e.g. 期間 a と期間 b を比較し、その後、期間 b と期間 c を比較する。Fig. 2.2 の type ii 参照)。タイプ ii では、増殖フェーズの決定のために最後に比較した期間を統合する必要があるが、タイプ i より有意差が検出しやすい。

2.2.7. 培養液中の栄養塩濃度

培養液中の硝酸態窒素とリン酸の濃度を決定するために、培養液はHach製の試薬(Hach、コロラド、アメリカ)を用いて発色させた。硝酸態窒素測定用の培養液はカドミウム還元法を用いて赤色に発色させ、リン酸測定用の培養液はアスコルビン酸還元法により青色に発色させた (Parsons et al. 1984)。その後、各溶液は1 cm 石英セルに移した後、ポータブル吸光度計 (DR900; Hach、コロラド、アメリカ) を用いてそれぞれ 520 nm および 610 nm の吸光度を測定した。硝酸態窒素とリン酸の濃度を決定するための検量線は、それぞれ硝酸ナトリウム溶液およびリン酸二水素ナトリウム溶液を用いて作成した (Fig.

2. 3)。硝酸態窒素とリン酸は *Guillard-f* 培地の初期栄養塩濃度の 5% を下回った時に枯渇したと定義した (Matsui et al. 2017)。リン制限は、一般的に窒素とリンのモル比 (N/P mol 比) が 16:1 を上回った時に起きるとされている (Redfield 1958)。一方で、*Nannochloropsis* spp. の適した N/P mol 比は 16:1 以上であり、32–64 の間である可能性がある (Mayers et al. 2014)。そのため、培養液中の N/P mol 比が 32–64 の時に増加した後にリン制限は起きると定義した (Mayers et al. 2014)。

2. 2. 8. 分光光度法

サンプルは、細胞密度が日ごと一定になるように、遠心分離による濃縮 (3600 rpm、20 分) もしくはブランクの一部を用いて希釈した。まず、ブランク溶液をプラスチックシャーレ (直径 40 mm) の中に 5 ml 入れ、白色ハロゲンランプから垂直に照射される光を透過させた。透過光の照度 (360–780 nm) は分光放射照度計 (CL-500A; Konica-Minolta、東京、日本) を用いて 10 回暗室内で測定した。次に、プラスチックシャーレ内のブランクとサンプルを交換し、その透過光の照度を同様に測定した。各波長の細胞群による吸光度 (A_λ) は以下の式によって計算した、

$$A_\lambda = -\log_{10}(I/I_0)$$

I と I_0 はそれぞれサンプルとブランクを透過した光照度の値である。分光スペクトルは、各波長の吸光度を色素によって吸収されない 750 nm の吸光度を引くことで補正した値で表した (Sathyendranath et al. 1987; Ciotti et al. 2002)。各波長の吸光度は 5 nm 毎の移動平

均によってばらつきを抑えた (Ciotti et al. 2002)。

2.2.9. 脂質の抽出および分画

細胞中の総脂質を、Bligh と Dyer (1959) の方法を用いて抽出した。凍結乾燥させた細胞が入った 15 ml ガラス製ねじ口試験管にクロロホルム-メタノール-水混合液 (1:2:1.8) を 9.5 ml 加え、細胞を 15°C 以下で 30 分間超音波洗浄機 (ASU-3; アズワン、大阪、日本) により破碎した (Pan et al., 2008)。その後、クロロホルム:メタノール:水比が 2:2:1.8 になるようにクロロホルムと水を 2.5 ml ずつ加えてから溶液を 2 層に遠心分離させた (2000 rpm、5 分間)。総脂質が含まれている下層のクロロホルムを、別の 15 ml ガラス製ねじ口試験管にパスツールピペットを用いて移した後、37°C で窒素ガスを吹き付けながら有機溶媒を飛ばした。その後、真空デシケーター内で吸引しながら試験管中の水分を十分に飛ばした。総脂質の含量は重量測定により推定した。

総脂質を 1 ml (0.2 ml × 5 回) のクロロホルム-メタノール混合溶液(98:2)に溶かしてパスツールピペットを用いて Sep-Pak シリカカートリッジ (Waters Corporation、マサチューセッツ、アメリカ) に移した。非極性脂質 (NL) は、Sep-Pak シリカカートリッジに 30 ml のクロロホルム-メタノール混合溶液 (98:2) を 1 秒あたり約 1 滴の速度で流し落としながらナスフラスコに回収した。その後、極性脂質 (PL) は Sep-Pak シリカカートリッジに 30 ml のメタノールを流し落としながらナスフラスコに回収した。それぞれの脂質が溶けている有機溶媒を、ロータリーエバポレーター (N-1110E; EYELA, Tokyo, Japan)

を用いて 37°C、減圧下で飛ばした。デシケーター内で吸引しながらナスフラスコ中の水分を飛ばした。各脂質を 3 ml (0.5 ml×6 回) のクロロホルム-メタノール混合溶液 (1:1) に溶かして、それぞれ重量測定済みのガラス試験管に移した。それぞれの試験管内の有機溶媒を、総脂質と同様に 37°C で窒素ガスを吹き付けながら飛ばした。NL と PL の含量を重量測定によって推定した。

2.2.10. 脂肪酸分析

NL と PL は、内部標準物質のノナデカン酸 (C19:0) が 1 mg ml^{-1} の濃度で溶けたクロロホルム 0.5 ml、および 5%塩化水素メタノール溶液 (Wako、大阪、日本) 1 ml に溶かした後に、3 時間 80°C で加熱することでメチルエステル化させた。その後、有機溶媒を常温に戻し、1 ml のヘキサンと 5.5 ml の水を加え、2 層に遠心分離させた (2000 rpm、5 分間)。脂肪酸が溶けている上層を、1.5 mL 褐色バイアル瓶に入れ、水素炎イオン化型検出器 (260°C) が装着されたガスクロマトグラフィー (GC-17A; Shimadzu, Kyoto, Japan) に注入し、脂肪酸組成を測定した。キャリアーガスにはヘリウムを用い、キャピラリーカラムには Omegawax capillary GC column (Sperco, 30 m×0.32 mm×0.25 μm) を用いた。

2.2.11. クロロフィル a 含量

クロロフィル a の抽出は、ガラスチューブに N,N-ジメチルホルムアミド (DMF) を 6 ml

加え、4°C の暗所下で半日安置させて行った。クロロフィル *a* 含量は蛍光光度計 (TD-700; Turner Designs、カリフォルニア、アメリカ) を用いて Welschmeyer (1994) の方法に従い定量化した。

2.2.12. 統計解析

増殖速度を試験区間で比較するために、細胞密度の対数値から得られる増殖直線の傾きを試験区間で二限配置分散分析により比較した。二限配置分散分析は、Stat View ver. 5.0 software (Abacus Systems Software、カリフォルニア、アメリカ) を用いて行った。総脂質の蓄積速度も二限配置分散分析により比較した。Abs₄₉₀/Abs₆₈₀ と脂肪酸含量との関係、および Abs₄₉₀/Abs₆₈₀ とクロロフィル *a* 含量との関係は、Sigma-Plot ver. 11.0 software (Systat Software, San Jose, CA, USA) を用いて分析し、Pearson の相関係数により評価した。統計解析での有意水準は 5% に設定した。

2.3. 結果

2.3.1. 白色蛍光灯を用いた培養実験

2.3.1.1. 細胞密度と増殖フェーズ

誘導期は、初期密度や増殖フェーズの決定方法（タイプ i とタイプ ii）に関わらず、対数増殖期前の培養 0 日目から 1 日目までに確認された (Fig. 2.4)。対数増殖期の期間は、初期細胞密度が中間の培養液を除き増殖フェーズの決定方法の間で一致した。対数増殖期は、タイプ ii で決定した時に初期密度が低いほど長くなった。この時の増殖速度は初期細胞密度が低いほど有意に高くなった（低密度、1.03; 中間密度、0.98; 高密度、0.78）。一方、タイプ i で対数増殖期を決定した時に得られた増殖速度は、中間密度と高密度の培養液の間で有意差が確認されなかった。定常期に関しては、タイプ i で期間を決定した時は異なる初期細胞密度の培養液間で近い値を示した。しかし、タイプ ii で期間を決定した時は変動した。タイプ ii では有意差の検出が容易であるために、高密度の培養液では定常期が定まらなかった。定常期の最大細胞密度は、初期密度が低い時は 180×10^6 cells ml⁻¹、中間の時は 184×10^6 cells ml⁻¹、および高い時は 231×10^6 cells ml⁻¹ であった。

2.3.1.2. 培養液中の栄養塩濃度

硝酸態窒素濃度は、初期細胞密度が低い時は培養 5–8 日目の間で、中間の時は培養 2–6 日目の間で、そして高い時は培養 1–4 日目の間で減少した (Fig. 2.5)。硝酸態窒素の枯渇時期は、初期細胞密度が低い順にそれぞれ 8 日目、7 日目、および 6 日目だった。リン酸濃度の減少は培養液の初期細胞密度に関係なく 0 日目から減少した (Fig. 2.6)。リン酸は初期細胞密度が低い順にそれぞれ 6 日目、5 日目、および 3 日目まで減少し枯渇

した。リン酸の枯渇時期は硝酸態窒素の枯渇時期より早く訪れた。培養液中の N/P モル比は、初期細胞密度が低い時と中間の時はそれぞれ、4 日目と 3 日目まで 22-44 の値の間で変動し続け 5 日目と 4 日目からリン制限の基準値である 64 を超えて増加した (Fig. 2.7)。初期細胞密度が高い時は、N/P モル比は培養 0 日目から増加し始め、2 日目にはリン制限の基準値である 64 を超えた。つまり、培養液中のリン酸は初期細胞密度が低い順に 5 日目、4 日目、および 2 日目だった。初期密度が中間の時を除き、タイプ i で決定した対数増殖期は、リン酸制限の直前に終了した。定常期は、リン酸や硝酸態窒素の枯渇後に現れた。

2.3.1.3. 吸光スペクトル

細胞群の吸光度は、初期細胞密度に関わらず培養期間を通して、440 nm、490 nm および 680 nm 付近に比較的大きなピークが確認された (Fig. 2.8)。490 nm と 680 nm の吸光度比 (Abs_{490}/Abs_{680}) は、3 つの培養液に共通して対数増殖期が始まる 1 日目まで増加した (Fig. 2.9)。この時、初期細胞密度が低い時と中間の時は Abs_{490}/Abs_{680} がそれぞれ最大値の 1.29 と 1.25 を示す一方、高密度の時は 11 日目に最大値 1.14 を示した。 Abs_{490}/Abs_{680} は初期細胞密度が低い順にそれぞれ 7 日目、5 日目、および 3 日目で減少した。 Abs_{490}/Abs_{680} の減少期間は、タイプ i で増殖フェーズを決定した場合の対数増殖期より長かった (Fig. 2.4)。 Abs_{490}/Abs_{680} の最小値は、初期細胞密度が低い順に 0.93、0.96、および 0.95 だった。 Abs_{490}/Abs_{680} の減少は、リン酸の枯渇時期の近くで見られなくなった。

その後 Abs_{490}/Abs_{680} は再び増加し、リン酸と硝酸態窒素の枯渇下で定常期を超えて増加し続けた。

2.3.2. LED を用いた培養実験

2.3.2.1. 増殖速度と栄養塩濃度の変化

増殖速度は、細胞密度の対数値から得られた傾きとして試験区間で比較すると、青色試験区と青赤色試験区では対照となる白色蛍光灯に比べて有意に高く、赤色試験区では有意に低かった。青色試験区と青赤色試験区の間には有意差は無かった。

LED を用いた試験区でのリン酸の枯渇時期は、共通して硝酸態窒素の枯渇時期よりも早かった (Fig. 2. 10a)。リン酸と硝酸態窒素の枯渇時期はそれぞれ、青色試験区で5日目と6日目、青赤色試験区で6日目と9日目、および赤色試験区で7日目と11日目だった。各栄養塩の枯渇時期は、青色と赤色の光強度比が高い LED 試験区ほど早く訪れた。培養液中の N/P モル比は、青色試験区と青赤色試験区では3日目から、赤色試験区では4日目から前日に比べて増加しており、リン酸が制限されていた (Fig. 2. 10b)。

2.3.2.2. 栄養塩枯渇下での非極性脂質の蓄積

白色蛍光灯による照明下では、総脂質含量は4日目から増加し始めて培養最終日には

2倍高くなった (Fig. 2. 11)。総脂質含量の増加は青色試験区と青赤色試験区でも確認され、総脂質含量はそれぞれ4日目と7日目から増加し始めた。NLはNLとPLの総量の半分以上占めており、総脂質含量と同様に増加していた。この総脂質とNLの増加は、リン酸と硝酸態窒素またはリン酸のみが枯渇した時に見られた (Fig. 2. 10a)。一方、赤色試験区での総脂質含量は、栄養塩の枯渇時期に関係なく培養期間を通して緩やかに増加しているようだった。相関分析によると、総脂質の蓄積期間において、総脂質含量と培養日数はLEDの赤色試験区 ($p = 0.06$) を除き全ての試験区で有意な正の相関があった (Table 1)。この期間での総脂質の蓄積速度 ($\text{pg cell}^{-1} \text{d}^{-1}$) は、白色蛍光灯試験区に比べて、LEDの青色試験区で有意に高く、赤色試験区で低かった。

2. 3. 2. 3. Abs₄₉₀/Abs₆₈₀、脂肪酸組成、およびクロロフィル *a* 含量の時間変化

培養時間の経過に伴う Abs₄₉₀/Abs₆₈₀、脂肪酸組成、およびクロロフィル *a* 含量の変化を Fig. 2. 12 に示した。白色蛍光灯試験区では、Abs₄₉₀/Abs₆₈₀ は 0-1 日間で増加し、4日目まで減少し、そして再度上昇に転じて培養最終日まで増加した。NL に含まれるパルミチン酸 (C16:0) とエイコサペンタエン酸 (C20:5 ω 3, EPA) の含有率の傾向も、Abs₄₉₀/Abs₆₈₀ の転換期を境に変化した。C16:0 は Abs₄₉₀/Abs₆₈₀ のパターンと同調する一方、EPA は逆のパターン ((減少、上昇、そして減少) を示した。この Abs₄₉₀/Abs₆₈₀ と各脂肪酸含有率の関係は、全ての LED 試験区で共通して確認された。クロロフィル *a* 含量 (fg cell^{-1}) は EPA の時間変動と同様のパターン (減少、上昇、そして減少) を示した。クロ

ロフィル *a* 含量の最大値は LED による青色光と赤色光の強度比が高い順に高い傾向を示した。

Abs₄₉₀/Abs₆₈₀ と各脂肪酸含有率、および Abs₄₉₀/Abs₆₈₀ とクロロフィル *a* 含量の相関分析の結果を Fig. 2. 13 に示した。白色蛍光灯試験区では、Abs₄₉₀/Abs₆₈₀ と C16:0 の間で正の相関が ($r^2 = 0.63$, $p < 0.05$)、Abs₄₉₀/Abs₆₈₀ と EPA の間で負の相関 ($r^2 = 0.69$, $p < 0.05$) が確認された。同様の関係が、LED を用いた青色試験区 (C16:0, $r^2 = 0.79$, $p < 0.05$; C20:5 ω 3, $r^2 = 0.79$, $p < 0.05$) および青赤色試験区 (C16:0, $r^2 = 0.71$, $p < 0.05$; C20:5 ω 3, $r^2 = 0.79$, $p < 0.05$) でも確認された。赤色試験区でも、Abs₄₉₀/Abs₆₈₀ と EPA の間で有意な相関 ($r^2 = 0.45$, $p < 0.05$) があつたが、Abs₄₉₀/Abs₆₈₀ と C16:0 の関係性は確認されなかつた ($r^2 = 0.30$, $p = 0.10$)。Abs₄₉₀/Abs₆₈₀ はクロロフィル *a* 含量とも相関していることが、青色試験区 ($r^2 = 0.69$, $p < 0.05$) と青赤色試験区 ($r^2 = 0.67$, $p < 0.05$) で確認されたが、赤色試験区ではみられなかつた ($r^2 = 0.30$, $p = 0.08$)。

2.4. 考察

2.4.1. 増殖フェーズの決定方法の検討、および培養液中の栄養塩が及ぼす増殖フェーズへの影響

本研究では、*N. oculata* の個体群の増殖フェーズを 2 つの期間での増殖速度を比較する

ことで決定し、対数増殖期と定常期の期間がその決定の仕方（タイプ i と ii）で異なることが示された。*N. oculata* を含む 6 種の油脂産生藻類の増殖速度は、栄養塩が十分に存在する時に比べて欠乏している時に低くなる（Roleda et al. 2013）。緑藻 *Dunaliella tertiolecta* は、細胞密度が初期密度の 1.5 倍まで増加してから定常期に至った（Graziano et al. 1996）。この時のリン酸は枯渇していた（Graziano et al. 1996）。これらの結果は、微細藻類の増殖はバッチ式では培養液中の栄養塩の欠乏により制限されることを示している。栄養塩が制限もしくは枯渇する時期は初期密度が高いほど早く訪れたため、対数増殖期が初期細胞密度の増加に伴い早く終了することは理にかなっている。本研究では、隣り合った 1 日分の期間同士で増殖速度を比較し増殖フェーズを決定した際（タイプ ii）、対数増殖期は初期細胞密度の増加に伴い早く終了した（Fig. 2. 4）。しかし、予想される期間同士で増殖速度を比較し増殖フェーズを決定した際（タイプ i）、その対数増殖期の期間は初期細胞密度が低い時よりも中間の時の方が長かった（Fig. 2. 4）。そのため、増殖曲線から対数増殖期を決定するには、連続した 1 日間同士で増殖速度を比較した方が良いと考える。この手法は増殖速度の有意差の検出力が高すぎたため、初期密度が低い時に定常期の期間が定まらなかった（Fig. 2.4）。そこで、増殖曲線から定常期を決定する際は、予想される期間同士でも増殖速度を比較した方が良いと考える。

硝酸態窒素とリン酸は初期細胞密度に関わらず、定常期に欠乏した（Fig. 2. 5, 6）。特に、対数増殖期はリン酸が制限された時に終了した（Fig. 2.7）。連続培養中の *D. salina* の増殖速度とリン酸の取り込み速度は、培地中のリン酸濃度を低く設定すると減少する（Grant et al. 2013）。この現象は、Michaelis と Menten（1913）と Monod（1949）の結果と

一致し、本研究の結果を支持している。*N. oculata* の増殖速度はリン酸の制限により低下し、その枯渇により増殖しなくなる可能性が考えられる。

2.4.2. 培養液中の栄養塩が及ぼす吸光特性への影響

本研究では、 Abs_{490}/Abs_{680} は主要栄養塩類が十分に存在する時に減少し、欠乏している時に上昇した (Fig. 2. 9)。これらの傾向は異なる初期細胞密度の培養液に共通して確認された。 Abs_{490}/Abs_{680} はカロテノイドとクロロフィル *a* の含量比 (Car/Chl) を反映している (Merzlyak et al. 2007)。対数増殖期の *N. gaditana* の細胞群に含まれるカロテノイドの総量は窒素の制限または枯渇の下で減少する一方、Car/Chl は増加した (Forján et al. 2007)。Latasa と Berdalet (1994)は、ジアトキサンチンを除く全種類のカロテノイドの含量が増殖フェーズの遷移に伴いクロロフィル *a* 含量とともに減少する一方、各カロテノイドとクロロフィル *a* との含量比は増加もしくは一定になることを報告した。これらの結果は、 Abs_{490}/Abs_{680} が栄養塩の欠乏により増加するという本研究の結果を支持している。本研究では、*N. oculata* のバッチ式の培養ではリン酸が先に枯渇し、その後に硝酸態窒素が枯渇した (Fig. 2. 5, 6, 10)。*N. oculata* の Abs_{490}/Abs_{680} はリン酸の枯渇後、硝酸態窒素の枯渇の有無に関係なく増加し続けたため (Fig. 2. 8, 12)、*N. oculata* の Abs_{490}/Abs_{680} の増加に与える硝酸態窒素の影響はリン酸よりも小さいことが考えられる。

また、 Abs_{490}/Abs_{680} は対数増殖期が始まる前の誘導期でも増加した (Fig. 2. 4, 9)。誘導期と定常期は、培養液中の栄養塩濃度は異なるが、細胞が異なる培養環境に順応する点

で共通している。脂質の中でも NL は栄養塩が欠乏している条件もしくは定常期で増加することが有名であるが (Hu et al. 2008; Breuer et al. 2012, Lacour et al. 2012; Li et al. 2014, *N. oculata* の NL が定常期だけでなく誘導期でも増加することが報告されている (Hodgson et al. 1991)。そのため、Abs₄₉₀/Abs₆₈₀ は培養液中の栄養塩の変化を単に反映するだけでなく、藻類細胞群の生存戦略の指標となる可能性が考えられる。

2.4.3. 光条件と栄養塩の欠乏が及ぼす脂質含量と脂肪酸含量への影響

培養液中の栄養塩の欠乏は、脂質、特に NL の代謝様式を変化させる (Lacour et al. 2012)。白色蛍光灯を用いた試験区および LED を用いた青色試験区と青赤色試験区では、総脂質含量は NL とともにリン酸と硝酸態窒素の両方またはリン酸のみの枯渇後に増加した (Fig. 2. 10, 11)。一方、LED の赤色試験区は明確な総脂質と NL の増加が確認されなかったため (Fig. 2. 11, Table 2.1)、栄養塩の欠乏による脂質の蓄積への影響は光条件によって変わることが示唆される。Teo ら (2014a, b) は、リブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (Rubisco) と炭酸脱水酵素が NL の主な成分であるトリアシルグリセロールの蓄積に関与すると述べている。Rubisco はカルビン回路により炭素を固定する役割を担う酵素であり (Andrews and Lorimer 2003)、その活性は 460 nm の青色光の照射によって高くなる (Roscher and Zetsche 1986)。本研究の LED を用いた実験でも、赤色試験区の青色の光量が相対的に低かったために、栄養塩の欠乏の影響を受けた *N. oculata* の総脂質含量と NL 含量がほとんど増加しなかった可能性がある。

また、NL 中の脂肪酸組成に関して、C16:0 の含有率はリン酸や硝酸態窒素の欠乏後増加し、EPA は逆に減少した (Fig. 2. 12)。これは白色蛍光灯および LED を用いた全ての光条件で共通して確認された (Fig. 2. 12)。この 2 種の脂肪酸のパターンは、Hodgson ら (1991) の結果と類似していた。特に、C16:0 のような短鎖飽和脂肪酸含量が増加するのは、細胞の分裂や増殖をしなくなった時に余分なエネルギー源として蓄積されるためである (Hodgson et al. 1991; Meng et al. 2015)。クロロフィル *a* 含量も脂肪酸含有率と同時期に傾向を変化させた。これらのパターンの転換期は、青色試験区ではリン酸と硝酸態窒素の両方枯渇している時に、青赤色試験区ではリン酸のみ枯渇している時に、そして赤色試験区ではまだリン酸が培養液中に存在する時に確認された (Fig. 2. 10)。そのため、微細藻類の栄養塩欠乏に対する感度は光条件によって変化することが示唆され、特に本研究で用いた 630 nm の赤色光は 460 nm の青色光に比べて藻類細胞の代謝機能を狂わせる可能性がある。

2. 4. 4. 吸光特性と生化学組成との関係

Abs₄₉₀/Abs₆₈₀ の傾向はクロロフィル *a* 含量と同時期に変化し、これらの変動パターンは LED の赤色試験区を除き互いに有意な相関があった (Fig. 2. 12, 13)。この結果は、Abs₄₉₀/Abs₆₈₀ の変動にクロロフィル *a* が主に寄与していることを示した。加えて、Abs₄₉₀/Abs₆₈₀ の傾向は白色蛍光灯および LED を用いた全ての試験区に共通して、2 種の脂肪酸含有率と同時期に変化した。これは前述の通り、各波長の吸光度に反映される色

素組成が脂肪酸組成と同様に栄養塩の欠乏の影響を受けるためだと考える。また、微細藻類の細胞内では、栄養塩の欠乏により増殖フェーズが遷移すると、色素を含む葉緑体は収縮し細胞内に油滴が蓄積する (Okauchi 2015)。同時期に見られるこれらの形態学的変化も、*N. oculata* の吸光特性が脂肪酸組成と同時期に変化する現象を支持している。

Abs₄₉₀/Abs₆₈₀、C16:0 含有率、および EPA 含有率は LED を用いた試験区の中でも、青色試験区と青赤色試験区で高い相関が確認された ($p < 0.05$, Fig. 2. 12) これは、青色 LED (460 nm) を主な光源に用いた際に、吸光光度法が微細藻類の脂肪酸組成の変化を推定できることを示唆している。しかし、赤色試験区では Abs₄₉₀/Abs₆₈₀ は C16:0 含有率およびクロロフィル *a* 含量との間でそれぞれ比較的弱い相関を示した (vs C16:0, $p=0.10$; vs クロロフィル *a*, $p=0.08$)。微細藻類のクロロフィル *a* 含量は光強度が低いと高くなるということが、白色蛍光灯を用いて古くから実証されている (Falkowski and Owens 1980; Ley and Mauzerall 1982; Berner et al. 1989)。本研究により、*N. oculata* は青色光 (460 nm) に比べると赤色光 (630 nm) はほとんど吸収されなかった (Fig. 2. 8)。藻類自体の光吸収能を超えて特定波長の光照射を行うと、Richardson ら (1983) が提唱するような“光阻害”が起きるのかもしれない。LED の照明が微細藻類の脂肪酸組成に与える影響はよく報告されているのだが (Das et al. 2011; Teo et al. 2014a, b; Chen et al. 2015; Vadiveloo et al. 2015)、特定波長が脂肪酸組成に与える影響を、その藻類の吸収量を考慮して評価している例は少ない (Kandilian et al. 2013; Vadiveloo et al. 2015)。異なる光スペクトル間で起きる光阻害のメカニズムを明らかにするためには、PAM 法などを用いたさらなる研究が必要である。しかし、LED の赤色試験区では (1) 総脂質の生産性の悪さ (Table 2.1)、(2) 主要

栄養塩の低い利用率 (Fig. 2. 10, 12)、(3) クロロフィル *a* 含量の低下 (Fig. 2. 12)、および (4) 吸光特性と脂肪酸組成、およびクロロフィル *a* 含量との相関の弱さ (Fig. 2. 13) が認められたことから、630 nm の赤色光は *N. oculata* の正常な増殖および代謝を狂わせている可能性がある。そのため、分光光度法を用いた微細藻類の代謝状況を推定するには、630 nm の光強度が高い光源の下でその微細藻類を培養するのは避けた方が良い。

本研究は、栄養塩の欠乏による *N. oculata* の代謝状況の変化を推定する上での分光光度法の有効性、および光源にほとんど左右されることなく代謝状況を推定できるという分光光度法の汎用性が示された (Fig. 2. 12, 13)。微細藻類の分類群ごとで吸光ピークは類似しているため (Santos-Ballardo et al. 2015)、この技術は他の微細藻類種に対しても適用できる可能性がある。

第三章 分光光度法を用いた *Nannochloropsis oculata* の培養相の判定技術によるワムシの効果的な EPA の強化

3.1. 背景

微細藻類は、水産養殖現場では、幼生期の二枚貝や甲殻類、および海産仔魚の初期餌料であるワムシの餌料として用いられる。特に、高度不飽和脂肪酸 (HUFA) を含有する微細藻類は、それらを摂餌した生物に自身のHUFAを供給することができる (Ben-Amotz et al. 1987)。特にHUFAの要求量が高い海産仔魚の養殖では、ワムシを仔魚に給餌する前にワムシのHUFA含量を高める“ワムシの栄養強化”という工程が必要である (Watanabe et al. 1978; Kitajima et al. 1979; Ben-Amotz et al. 1987)。これまでHUFAを含む微細藻類種の選定が行われており (Ben-Amotz et al. 1987; Oie et al. 1994)、真正眼点藻 *Nannochloropsis oculata* は古くからワムシの栄養強化に用いられてきた (Watanabe et al. 1978; Kitajima et al. 1979; Kobayashi et al. 2009)。

現在、ワムシの栄養強化に関して、どのようにしてワムシの極性脂質中 (Polar Lipids、PL) の HUFA 含量を高めるかが着目されている。脂質は極性の有無によって、PL と極性を持たない非極性脂質 (Non-polar Lipids、NL) に分類される。配合飼料や餌料に含まれる PL (特にリン脂質) 中の HUFA は総脂質中あるいは非極性脂質中 (NL) の HUFA に比べて海産仔魚の成長速度、生残率、および器官の発達速度を向上させることが、様々な魚種で報告されている (Gisbert et al. 2005; Kjørsvik et al. 2009; Wold et al. 2009; Kotani et al.

2017)。ワムシの PL 中の HUFA (PL-HUFA) は NL 中の HUFA (NL-HUFA) に比べて強化されにくいいため、ワムシの PL-HUFA を強化するのに有効な方法が検討されてきた (Li and Olsen 2015; Kotani et al. 2017)。ワムシの PL-HUFA 含量は、PL-HUFA が豊富な配合栄養強化剤を用いることで高められることが報告されている (Li et al. 2015)。そのため、微細藻類をワムシの栄養強化に用いる際、海産仔魚の飼育成績をより向上させるには、PL-HUFA 含量が高い細胞群を収穫しワムシに給餌することが求められる。

微細藻類の代謝様式は、第二章で述べたように、培養相の遷移によって変化する。特に、総脂質中の脂肪酸組成と増殖フェーズとの栄養塩との関係はよく報告されており、その HUFA 含有率は対数増殖期から定常期に至る時に減少する (Okauchi et al. 1990; Brown et al. 1996; Fidalgo et al. 1998)。総脂質中の HUFA 含有率は藻類細胞を栄養塩が欠乏している培地で培養しても減少する (Reitan et al. 1997; Huang et al. 2013)。第二章でも、総脂質の大半を占める NL 中の EPA 含有率が同様の傾向を示した (Fig. 12)。Ferreira ら (2008, 2009, 2018) によると、栄養塩が十分に存在する条件で培養した微細藻類は総脂質中の HUFA 含有率が高くなり、さらにその細胞群を給餌したワムシの HUFA 含有率も高くなった。一方で、微細藻類の PL-HUFA 含量と培養液中の栄養塩条件との関係はほとんど明らかにされていない。培養相が動的に変化するバッチ式培養では、いつ細胞群を収穫すれば PL-HUFA 含量が高くなるのかも不明である。さらに、培養相の異なる時期に収穫した藻類細胞がワムシの PL-HUFA 強化に与える影響も分かっていない。培養微細藻類を用いてワムシの PL-HUFA を効率的に強化するには、流動的に変化する培養相を評価できる指標を基に、藻類細胞の収穫時期の差異が微細藻類およびそれを摂餌

したワムシの PL-HUFA 含量に及ぼす影響を評価する必要がある。

分光光度法がバッチ式培養中の微細藻類の培養相の遷移を評価できる可能性については、すでに第二章で述べた。第三章では、 Abs_{490}/Abs_{680} の傾向が異なる時期に収穫した *N. oculata* の PL-HUFA 含量を比較し、それらの細胞群を用いたワムシ *Brachiomus plicatilis* への栄養強化効率を比較した。本研究のゴールは、分光光度法を用いて *N. oculata* の栄養強化剤とした最適収穫時期を推定できるか評価することとした。PL は主に 2 種類の膜を構成する脂質に分類されており、糖脂質は葉緑体膜を、リン脂質はそれ以外の細胞内小器官の膜を形成する (Moreau et al. 1998)。藻類細胞内の細胞内小器官の形状や膜構造は、栄養塩の欠乏に伴う増殖フェーズの遷移によって変化する (Simionato et al. 2013; Okauchi 2015; Gao et al. 2016)。本研究では、細胞内小器官の形態変化と HUFA の蓄積との関係についても考察した。

3.2. 材料と方法

3.2.1. *N. oculata* の培養実験

まず、*N. oculata* の PL-HUFA の含量および膜構造の変化を評価するために、*N. oculata* の培養実験を行った。*N. oculata* の株は、第二章の実験と同じ方法で用意した (セクション 2.2.1 参照)。本実験の前に、*N. oculata* は、水温 20 度、塩分 23 psu の Guillard-*f* 培地

(Guillard and Ryther, 1962) を用いて、白色蛍光灯 (FL40SW; 三菱オスラム、神奈川、日本) により光量 $150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光を 24 時間連続照射し、シリンジフィルター (孔径 $0.22 \mu\text{m}$; Millipore、マサチューセッツ、アメリカ) を通した無菌通気により前培養を行った。光強度は、球型光量子センサー (LI-193SA; LI-COR Bio-sciences、ネブラスカ、アメリカ) を取り付けられたライトメーター (LI-250A; LI-COR Biosciences、ネブラスカ、アメリカ) を用いて測定した。細胞の計数は、Guillard と Sieracki (2005) の方法に従い、血球計算盤 (深さ 0.1 mm ; サンリード株式会社、東京、日本) を用いて毎日行った。増殖速度 (μ , d^{-1}) は以下の式を用いて算出した

$$\mu = \ln(N_1/N_0)/(t_1 - t_0) \text{ ,}$$

この時の N_0 と N_1 は、それぞれ時間 t_0 と t_1 の細胞密度である。3 回前培養を行った後、対数増殖期と推定される細胞群を新しい培地に接種することで本培養を開始した。培養規模は 31 (培養液は 2.7 l) とし、初期細胞密度は $1 \times 10^6 \text{ cells ml}^{-1}$ に設定した。*N. oculata* は前培養と同じ条件で 10 日間培養し、毎日細胞計数を行った。この培養実験は 3 回繰り返した。

3.2.2. 分光光度法による微細藻類の培養相のモニタリングとサンプリング

N. oculata の 490 nm と 680 nm の吸光度は、分光光度計 (PD-303; アペル、埼玉、日本) により毎日測定した。490 nm と 680 nm の吸光度比 ($\text{Abs}_{490}/\text{Abs}_{680}$) を算出し、その傾向をモニタリングした (Fig. 1)。 $\text{Abs}_{490}/\text{Abs}_{680}$ の減少期 (D 期) と上昇期 (I 期) の間で藻

類細胞の生化学組成と細胞内の形態の変化を評価するために、それぞれ3日目と7日目に細胞群を遠心分離（3,600rpm、10分）によって収穫した。脂肪酸組成の時間変化をより詳細に調べるために、細胞の収穫はD期からI期への転換期（4日目）と比較的遅い時期のI期（10日目）にも追加で行った。生化学分析に用いる細胞は、塩分を取り除くために0.5 Mのギ酸アンモニウムを用いて洗った。遠心分離後、その細胞ペレットは凍結乾燥し、-80度で分析をする時まで保存した。

3.2.3. 微細藻類の生化学分析

微細藻類のタンパク質含量は、80度の水酸化ナトリウム（0.1N）の中で1時間タンパク質を加水分解させてから、Lowryら（1951）の方法に従い定量化した。微細藻類の総脂質の抽出および定量化は、第二章の実験で用いた時と同様の方法で行った（セクション2.2.9参照）。脂質のクラス分けは、JuanedaとRocquelin（1985）の方法を改良して行った。総脂質に含まれるNLは、総脂質を添加したSep-Pakシリカカートリッジの中に30 mlのクロロホルム-メタノール混合溶液（98:2）で流し入れることで回収した。次に、極性脂質の中でも糖脂質とリン脂質を分けて回収するために、Sep-Pakシリカカートリッジにそれぞれ30 mlのアセトンとメタノールを順番に流し入れた。総脂質および各脂質の含量は、重量測定により推定した。

脂肪酸の分析は、第二章の実験で用いた時と同様の方法で行った（セクション2.2.10参照）。

3.2.4. 透過型電子顕微鏡 (TEM) による藻類細胞内の微細構造の観察

TEM 観察用の藻類細胞群は、最大 100 ml 分の培養液を遠心分離 (3,600 rpm、10 分) により回収し、50 mM のリン酸緩衝液 (PBS) を用いて 2 回洗浄した。細胞の前固定は、0.25 M のスクロースを追加で溶かした PBS を溶媒とした、2% のグルタルアルデヒドと 2% のパラホルムアルデヒドの混合溶液に 9 時間冷蔵庫内で浸すことで行った。続いて、細胞の後固定は、スクロースを含まない上記の PBS を溶媒とした 2% の四酸化オスミウム溶液に 24 時間冷蔵庫内で浸すことで行った。細胞の脱水は、50%、70%、80%、90%、100%、そして再び 100% のエタノールに順次 10 分間浸して行った。脱水した細胞は、酸化プロピレンに 15 分間 2 回浸透させた後、酸化プロピレン-エポキシ樹脂混合液 (1:1) に 30 分間浸透させた。その後、細胞をシリコン製の鋳型 (14×5×3 mm、応研商事株式会社、東京、日本) をベースにエポキシ樹脂内に包埋した。エポキシ樹脂の重合は、オーブンを用いて温度を 35 度 (8 時間)、45 度 (12 時間)、そして 60 度 (48 時間) に順次上げることで促した。細胞の超薄切片 (80–90 nm) はガラスナイフを設置したウルトラミクロトーム (Leica、ヴェッツラー、ドイツ) を用いて作成し、そこに酢酸鉛溶液により電子染色を施した (Reynolds 1963)。切片の画像は 75 kV に設定した TEM (H-7000; Hitachi、東京、日本) により得て、細胞内の微細構造を観察した。ミトコンドリアの細胞に対する相対的な大きさ (%) は ImageJ 1.x (Schneider et al. 2012) を用いて解析した。

3.2.5. ミトコンドリアのラベリングと蛍光観察

蛍光観察用の藻類細胞群は、最大 15 ml 分の培養液を遠心分離 (3,600 rpm、10 分) により回収し、50 mM のリン酸緩衝液 (PBS) を用いて 3 回洗浄した。細胞は MitoTracker Orange CMTMRos (Invitrogen、カリフォルニア、アメリカ) を $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$ の濃度に調節した PBS に浸して 30 分間暗所下で放置した。MitoTracker による染色後、細胞は PBS で 3 回洗浄し、5%パラホルムアルデヒド溶液で 15 分間浸して細胞を固定した。細胞は PBS で再び洗浄した後、フランティアコートスライドガラス (松浪硝子工業株式会社、大阪、日本) を用いて塗抹標本を作成した。この時、封入剤は ProLong Diamond Antifade Mountant (Invitrogen、カリフォルニア、アメリカ) を用いた。ミトコンドリアの蛍光は、ApoTome.2 を導入したセクションング蛍光顕微鏡 (Zeiss、オーバーコッヘン、ドイツ) により油浸対物レンズ (100 倍) を用いて観察した。細胞内のミトコンドリアの数を検鏡下で数えた。

3.2.6. ワムシの栄養強化実験

L 型ワムシ *B. plicatilis* 複合種 (小浜株) は 2012 年 4 月に有限会社奄美養魚 (鹿児島、日本) から分与していただいた。この株は鹿児島大学水産学部の研究室内で維持した。本実験の前に、ワムシは水温 25 度の下、EPA や DHA を含まない淡水クロレラ *Chlorella vulgaris* (V-12; クロレラ工業株式会社、東京、日本) を毎日 2 回ワムシ 1 個体あたり約

20×10^3 細胞分給餌して前培養した。ワムシの前培養に用いる海水は、GF/F ガラスフィルターによって濾過した後に塩分が 20 psu になるように蒸留水で希釈した。ワムシの培養海水は 3 日に 1 回替えた。ワムシの前培養は、上記の条件下で 1 ヶ月以上続けた。この株は、栄養強化直前のワムシの HUFA 含量が実験結果に及ぼす影響を無視できるように、*C. vulgaris* を餌料として 1 カ月間前培養を行った。

異なる培養相の時期に収穫した *N. oculata* をワムシ個体群に同時に給餌するために、*N. oculata* の培養液は細胞摂取時期をずらして複数用意した。これらの培養液は、初期細胞密度が一定 (1×10^6 cells ml⁻¹) になるように細胞を植え継ぎ、*N. oculata* の培養実験時と同様の条件下で維持した (セクション 3.2.1. 参照)。*N. oculata* が Abs₄₉₀/Abs₆₈₀ を基に D 期 (培養 3 日目) と I 期 (培養 7 日目) に至った時に、各培養液中の細胞群は遠心分離 (3,600 rpm、10 分) によって収穫してワムシの栄養強化実験に用いた。

栄養強化実験直前に、ワムシはプランクトンネット (孔径 63 μ m) で濾して収穫し、洗浄し、そして 500 ml の新鮮な海水を含む 500 ml ビーカーに収容した。本実験では、*C. vulgaris* 給餌区 (対象区)、D 期の *N. oculata* 給餌区、および I 期の *N. oculata* 給餌区を設けて、3 回繰り返した。各藻類細胞はワムシ 1 個体あたり 20×10^3 細胞分給餌し、12 時間後に全試験区のワムシを同時に収穫した。各培養海水から 0.2 ml 分採水し、そこに含まれるワムシをルゴール液によって固定した後、その個体数と携卵数を実体顕微鏡 (SMZ800; Nikon、東京、日本) の下で数えた。残りの培養海水に含まれるワムシは、プランクトンネットに濾して収穫した後、余分な水分をプランクトンネットの裏からキムタオルで拭き取った。ワムシは 50 ml の遠沈管に回収した後、凍結乾燥させ、そして脂

脂肪酸の分析を行うまで-80度で保存した。

ワムシの総脂質は、ビオラモホモジナイザー (VH-10; アズワン、大阪、日本) を用いてクロロホルム-メタノール混合液 (2:1) の中でワムシを破碎しながら抽出した (Folch et al. 1957)。総脂質は、Sep-Pak シリカカートリッジを用いたカラムクロマトグラフィーによって NL と PL に分画した。各脂質はクロロホルム-メタノール混合溶液 (98:2) およびメタノールを用いて回収した。NL と PL に含まれる脂肪酸の分析は、第二章の実験で用いた時と同様の方法で行った (セクション 2.2.10 参照)。

3.2.7. 統計解析

N. oculata の増殖速度と生化学組成は D 期と I 期で student の t 検定によって比較した。PL-HUFA 含量の時間変化は、一元配置分散分析とそれに続く Bonferroni 検定によって解析した。ミトコンドリアの大きさは Mann-Whitney の U 検定によって比較した。ワムシの密度、携卵率、および脂肪酸含量は、一元配置分散分析とそれに続く Fisher の LSD 検定により比較した。ワムシの ArA 含量と EPA 含量は D 期と I 期の *N. oculata* 給餌区間で student の t 検定によって比較した。統計解析での有意水準は 5% に設定した。全ての統計解析は、Sigma-Plot ver 11.0 software (Systat Software、カリフォルニア、アメリカ) を用いて行った。

3.3. 結果

3.3.1. *N. oculata* の増殖速度とタンパク質および脂質の含量

N. oculata の増殖速度は I 期では D 期より有意に低くなった (Table 3.1)。D 期に比べて、I 期のタンパク質含量 ($\text{mg g dry weight}^{-1}$) は低く総脂質含量 ($\text{mg g dry weight}^{-1}$) は高くなった ($p < 0.05$)。NL 含量 ($\text{mg g dry weight}^{-1}$) も I 期に有意に高くなり、総脂質の 74% を占めていた。一方、糖脂質やリン脂質の含量 ($\text{mg g dry weight}^{-1}$) は D 期と I 期の間で変わらなかった ($p > 0.05$)。

3.3.2. *N. oculata* の総脂質および各脂質クラスに含まれる脂肪酸組成

N. oculata の総脂質中の脂肪酸組成によると (Table 3.2)、ミリスチン酸 (C14:0)、パルミチン酸 (C16:0)、パルミトレイン酸 (C16:1 n -7)、ステアリン酸 (C18:0)、オレイン酸およびバクセン酸 (C18:1 n -9+ n -7)、リノール酸 (C18:2 n -6)、および HUFA であるアラキドン酸 (C20:4 n -6, ArA) とエイコサペンタエン酸 (C20:5 n -3, EPA) が検出された。C16:0、C16:1 n -7、および EPA は総脂質を構成する主な脂肪酸であり、その総量は D 期と I 期ではそれぞれ 76.48% および 73.55% 占めていた。C16:0 の含有率 (%) は D 期より I 期で増加した一方、C16:1 n -7 の含有率は一定であった ($p > 0.05$)。C18:1 n -9+ n -7 は D 期では 3.60% しか含まれていなかったが I 期に至ると急激に増加し ($p < 0.05$)、その含有率 (%) は 11.82% になった。反対に、ArA と EPA の含有率 (%) は I 期では D 期より

も有意に低くなった。しかし、ArA と EPA の含量 ($\text{mg g dry weight}^{-1}$) は、D 期と I 期の間で変化しなかった ($p > 0.05$)。C18:0 の検出量は極めて少なかったが ($< 0.5\%$)、その含有率 (%) は D 期と I 期の間で有意差が確認された。

脂肪酸種の各脂質への分布を Table 3.3 にまとめた。NL に含まれる脂肪酸の含有率 (% mol) を D 期と I 期の間で比較すると、I 期の細胞群では C16:0 と C18:1 $n-9+n-7$ が増加し、C18:0、ArA、および EPA が減少した。これらの傾向は、総脂質中でも同様に確認された (Table 3.2)。NL 中の C16:1 $n-7$ の含有率 (% mol) も、総脂質中と同様に D 期と I 期の間で変化しなかった ($p > 0.05$)。結果として、I 期の細胞群では、飽和脂肪酸 (SFA; C14:0、C16:0、および C18:0) の合計値 (% mol) と 1 価不飽和脂肪酸 (MUFA; C16:1 $n-7$ および C18:1 $n-9+n-7$) の合計値 (% mol) が増加し ($p < 0.05$)、多価不飽和脂肪酸 (PUFA; C18:2 $n-6$ 、C18:3 $n-3$ 、C20:4 $n-3$ 、ArA、および EPA) の合計値 (% mol) が減少した ($p < 0.05$)。PUFA と SFA および MUFA の比率 [PUFA/(SFA + MUFA)]は、D 期から I 期に遷移すると増加した ($p < 0.05$)。

PL の脂肪酸に関しては、糖脂質中で検出された脂肪酸の含有率 (% mol) は、C18:2 $n-6$ を除き D 期と I 期の間で変化しなかった ($p > 0.05$)。一方、リン脂質中では、ArA と EPA が D 期から I 期へ遷移すると劇的に増加した ($p < 0.05$)。ArA と EPA の含有率 (% mol) は、D 期ではそれぞれ 4.14% と 7.87% だったのに対し I 期ではそれぞれ 15.26% と 28.21% だった。逆に、C16:0、C16:1 $n-7$ 、C18:1 $n-9+n-7$ 、および C18:2 $n-6$ が減少した ($p < 0.05$)。結果的に、I 期の細胞群では、PUFA の合計値 (% mol) は有意に高くなり、MUFA の合計値 (% mol) は有意に低くなった。PUFA/(SFA+MUFA)は、D 期に比べて I 期で 2

倍以上高い値を示した。また、ArA と EPA の含量 ($\text{mg g dry weight}^{-1}$) の時間変化によると (Fig. 3. 2)、これらの脂肪酸の増加は D 期から I 期への転換期 (培養 4 日目) には確認された ($p < 0.05$)。しかし、I 期の ArA と EPA の含量 ($\text{mg g dry weight}^{-1}$) は、リン脂質含量が有意に低くなった時減少した ($p < 0.05$)。

3. 3. 3. *N. oculata* の細胞内小器官の形態変化

D 期と I 期に見られた代表的な細胞の TEM 画像を Fig. 3.3 に示した。D 期の細胞はミトコンドリア、葉緑体、および核が識別できた (Fig. 3.3a)。ミトコンドリアの内膜構造は明瞭だった。葉緑体のチラコイド膜もはっきり観察された。一方、I 期の細胞はチラコイド膜が不明瞭な葉緑体を含んでおり、油滴が多く確認された (Fig. 3.3b)。多くの I 期の細胞ではミトコンドリアは不明瞭で区別できなかった (Fig. 3.3b)。しかし、一部の細胞では、Fig. 3.3c のようにミトコンドリアが識別できた。ミトコンドリアが細胞内で占める相対面積 (%) は、I 期 (8.9%) の方が D 期 (6.1%) よりも有意に大きかった (Fig. 3.3d)。

ミトコンドリアは蛍光顕微鏡を用いて赤色の蛍光として観察された (Fig. 3.4a)。細胞内のミトコンドリアの数は、D 期の細胞群では最大で 8 つだった (Fig. 3.4b)。ミトコンドリアを 5 つ以上含む細胞は、D 期の細胞群の中の 24% 占めていた。しかし、I 期ではこれらの細胞群は確認されず、代わりに 2 つしか含まない細胞群が全体のほとんどを占めていた (62%)。結果的に、ミトコンドリア保有数の平均値は D 期から I 期へ遷移する

と、3.58 から 2.54 へ有意に減少した。

3.3.4. ワムシの個体群増殖および脂肪酸組成

ワムシの個体密度 (inds ml^{-1}) と携卵率 (eggs ind^{-1}) は、給餌区間でほとんど変化しなかった ($p > 0.05$, Table 3.4)。ワムシの ArA および EPA の含量 ($\text{mg g dry weight}^{-1}$) は両脂質ともに、*C. vulgaris* 給餌区に比べて *N. oculata* の給餌区で有意に高くなった (Fig. 3.5)。ワムシの各脂肪酸含量 ($\text{mg g dry weight}^{-1}$) は、D 期と I 期の *N. oculata* 給餌区間で比較すると NL 中では有意差が認められなかった。一方、PL 中の ArA および EPA の含量 ($\text{mg g dry weight}^{-1}$) は、I 期の細胞群を給餌した方が D 期の細胞群より有意に高くなった。この時のワムシの ArA と EPA の含量はそれぞれ $0.22 \text{ mg g dry weight}^{-1}$ および $0.33 \text{ mg g dry weight}^{-1}$ を示し、D 期の *N. oculata* の給餌区 (ArA, $0.09 \text{ mg g dry weight}^{-1}$; EPA, $0.14 \text{ mg g dry weight}^{-1}$) に比べて2倍以上高くなった。ワムシの ArA と EPA の含量比 (ArA/EPA) は D 期と I 期の *N. oculata* 給餌区間で変化しなかった ($p > 0.05$)。

3.4. 考察

3.4.1. 培養相の遷移に伴う藻類細胞への脂質および脂肪酸の蓄積

第二章で考察したように、培養液中の栄養塩の欠乏は微細藻類の代謝様式を変化させ脂質を蓄積させる主な要因である（セクション 2.4.3 参照）。本研究では、*N. oculata* の培養相が D 期から I 期へ移行すると、細胞の増殖速度が低下し、そのタンパク質含量が減少する一方、総脂質（特に NL）含量が増加した（Table 3.1）。この現象は、微細藻類が培養液中の栄養塩欠乏や増殖フェーズの遷移によって起きる（Okauchi et al. 1990; Brown et al. 1996; Fidalgo et al. 1998; Huang et al. 2013）。脂質の中でも、トリアシルグリセロールなどといった NL は細胞増殖のための備蓄エネルギーとしての役割がある（Shifrin and Chisholm 1981; Greenwell et al. 2010）。I 期の細胞内で確認された葉緑体とミトコンドリアの膜構造の崩壊（Fig. 3.3b）は、増殖速度の低下を裏付けている。NL の蓄積は形態学的にも油滴の形で確認された（Fig. 3.3b）。NL 中の脂肪酸の中でも特に、C16:0 や C18:1n-9 + n-7 が I 期で増加していたことから（Table 3.3）、これらの脂肪酸が細胞増殖にとって都合の悪い状況に陥った時の備蓄エネルギーとして機能している可能性がある。反対に、ArA や EPA の含有率（%）は、D 期に比べて I 期では総脂質中および NL 中で低くなった（Table 3.2,3）。*Nannochloropsis* 属のように油脂生産に特化した微細藻類は栄養塩の欠乏下に晒されると、その総脂質中の EPA や DHA といった PUFA の含有率（%）が減少し、SFA 含有率（%）や MUFA 含有率（%）が増加する（Hodgson et al. 1991; Reitan et al. 1994; Gao et al. 2016）。しかし、この傾向は乾燥重量あたりの脂質含量を単位とすると確認されない（Gao et al. 2016）。本研究でも、ArA や EPA は含量（mg g dry weight⁻¹）ベースでは D 期と I 期の間でほとんど変わらなかった（ $p > 0.05$, Table 3.2）。このことから、*N. oculata* が持つ PUFA 量が培養相の遷移によって見かけ上減ってしまうほど、栄養

塩欠乏下での SFA と MUFA の蓄積速度は高いと考えられる。この脂肪酸の単位にまつわる問題は養殖業者に対して、栄養塩が欠乏しているとされる培養後期の培養細胞をワムシの栄養強化剤として用いてはいけないという誤解を招く可能性がある。

3.4.2. 微細藻類の膜脂質への PUFA の蓄積

培養相の遷移に伴う膜脂質の含量とその脂肪酸組成の変化は、NL とは全く異なっていた。I 期では D 期に比べて、ArA と EPA が主な膜脂質であるリン脂質中に多く占めていた (Table 3.3)。これらの傾向はリン脂質中の PUFA の割合を増加させ、PUFA/(SFA + MUFA) も高い値を示した。さらに、*N. oculata* は D 期から I 期への転換期にはすでに ArA と EPA をリン脂質中に蓄積していた。第二章で考察しているように、培養液中のリン酸は、*N. oculata* の Abs₄₉₀/Abs₆₈₀ が減少傾向から上昇傾向に転ずる時に欠乏する (セクション 2.4.2 参照)。そのため、*N. oculata* はリン酸の欠乏が引き金となってリン脂質に ArA と EPA を蓄積させた可能性がある。

しかし、リン脂質中の ArA と EPA の含量はリン脂質含量とともに、I 期の中でも後期 (培養 10 日目) には減少していた (Fig. 3.2)。同時に見られる膜脂質と EPA の減少は、*Nannochloropsis* を窒素の枯渇に晒した Simionato ら (2013) と Jia ら (2015) の実験結果と類似している。第二章の結果では、*N. oculata* は Guillard-*f* 培地中で培養するとリン酸を先に枯渇させ、後に硝酸態窒素を枯渇させた (Fig. 2.5, 6, 10)。そのため、リン酸の枯渇後に起きる硝酸態窒素の枯渇が、リン脂質中の PUFA 含量を減少させた要因であると

考えられる。また、第二章では、*N. oculata* の Abs₄₉₀/Abs₆₈₀ はリン酸の枯渇後、硝酸態窒素の枯渇の有無に関わらず増加し続けた (Fig. 2. 9, 12)。分光光度法による *N. oculata* の培養相の評価は、PL-HUFA 含量が減少し始める時期というよりも増加し始める時期を特定するのに有効であると考えられる。

膜脂質の量は一定である一方、膜の構造はD期からI期への移行によって劇的に変化した (Fig. 3. 3)。リン脂質で構成されている細胞内小器官は、多くの動物や植物で共通して小胞体とミトコンドリアである (Moreau et al. 1998)。本研究では、ミトコンドリア膜がI期の多くの細胞では不明瞭であった (Fig. 3. 3b)。加えて、I期では識別可能なミトコンドリアの大きさが増加し (Fig. 3. 3c, d)、さらにその数が減少したことから (Fig. 3. 4)、Arimura (2018) が批評するように、ミトコンドリアが生育環境に適応するために融合したと推察される。この時、ミトコンドリアを構成するリン脂質中に ArA と EPA が多く占めるようになった (Table 3.3)。膜脂質を構成する PUFA はその膜表面の流動性および基質の膜透過性を高める役割があり (Van Deenen 1972; Harwood 1988; Sargent et al. 1993)、微細藻類は自身の PUFA 含量および脂肪酸の不飽和度を高めることで、低水温 (Sato et al. 1979; Lynch and Thompson et al. 1982, 1984) および高塩分 (Fontana and Haug 1982; Xu and Beardall 1997) など細胞の増殖にとって不都合な環境に物理的に順応することができる。そのため、*N. oculata* のミトコンドリア膜の崩壊もしくは形態変化が、その膜脂質への ArA と EPA の蓄積に関与したことが示唆される。また、ミトコンドリアは自身が生成した活性酸素 (ROS) の影響を受け損傷する (Møller 2001)。細菌の増殖阻害試験を通して、EPA を含有するリン脂質を含む株が細胞外の過酸化水素に対して抗酸化

作用を示すことが明らかとなっている (Okuyama et al. 2008)。本研究で確認されたリン脂質中への ArA と EPA の蓄積は、*N. oculata* がリン酸の欠乏下で過剰に産生した ROS の存在下で自身の膜構造を安定させるのに寄与している可能性がある。

本研究では、リン脂質への PUFA の生合成経路は明らかではなかった。リン脂質の脂肪酸組成は、脂肪酸の新規合成以外に油滴中の脂肪酸との交換によって変化すると報告されている (Makewicz et al. 1997; Simionato et al. 2013; Jia et al. 2015)。本研究では、培養相が D 期から I 期へ遷移した時、リン脂質では ArA と EPA を含む PUFA の mol%が増加し MUFA の mol%が減少した一方、NL 中では PUFA と MUFA のパターンが逆だった (Table 3.3)。このことから、ArA と EPA が MUFA と引き換えに油滴とリン脂質との間で交換された可能性がある。より詳細にリン脂質への PUFA の蓄積機構を明らかにするためにはさらなる研究が必要である。

3.4.3. ワムシの効果的な栄養強化に向けた微細藻類の培養相推定の重要性

ワムシの栄養強化実験では、過去の研究結果と同様に、ワムシの HUFA (特に EPA) が *N. oculata* の細胞群の給餌によって強化された (Fig. 3.5; Watanabe et al. 1978; Kitajima et al. 1979)。 *C. vulgaris* と比べた時の *N. oculata* の栄養強化剤としての優位性は、 *N. oculata* の培養相間で変わらなかった。しかし、ワムシの PL-ArA と PL-EPA の含量は、D 期よりも I 期に収穫した細胞群の方が高くなった (Fig. 3.5)。これらの栄養強化のパターンは、 *N. oculata* の培養相間でのリン脂質中の脂肪酸組成に由来していた (Table 3.3, Fig. 3.

3)。そのため、栄養強化に用いる培養微細藻類の収穫時期はワムシの PL-HUFA を効果的に強化するのに重要な要因であることが示された。多くの研究では、総脂質中の HUFA 含有率 (%) が高い細胞群をワムシの栄養強化に用いるには、培養液中に栄養塩が十分に存在している対数増殖期の細胞群を収穫するべきであると結論している (Okauchi et al. 1990; Reitan et al. 1994; Ferreira et al. 2009, 2018)。これらの脂肪酸の傾向は、PL を含む各脂質の HUFA 含量が全体的に高くなっている可能性はあるが、本研究ではリン脂質への HUFA の蓄積はリン酸が欠乏している I 期に確認された (Table 3.3; Fig. 3.2)。PL-HUFA は NL-HUFA よりも海産魚類にとって必要な栄養素である (Gisbert et al. 2005; Kjorsvik et al. 2009; Wold et al. 2009; Kotani et al. 2017)。海産仔魚の PL-HUFA の要求量を満たすためにワムシの栄養強化を行うには、培養微細藻類はおそらくリン酸の欠乏時に収穫した方が良い。

以上より、分光光度法を用いた培養相の評価手法は、バッチ式培養中の *N. oculata* の PL-HUFA 含量の推定だけでなく、ワムシの栄養強化効率の向上にも有効であることが明らかとなった。ガスクロマトグラフィーは、微細藻類の脂肪酸組成を直接測定できるが、測定には多くの金、時間および化学薬品が必要であり水産現場への応用は難しい。一方、分光光度法はランニングコストが安く、サンプルを簡便に、迅速に、かつ非破壊的に測定できるため、水産現場へ容易に導入できる。本研究により、微細藻類が PL-HUFA を高含有する最適収穫時期を分光光度法の結果を基に簡便に推定する手法を確立した。PL-HUFA 含量が高い *N. oculata* の細胞群をワムシに給餌するには、*N. oculata* は培養期間の中でも Abs_{490}/Abs_{680} が増加した直後に収穫することが望ましい。

第四章 分光光度法を用いた *Isochrysis* sp.タヒチ株の培養相の判定技術の確立およびそのワムシの効果的な DHA 強化への応用

4.1. 背景

これまで多くの微細藻類種が餌料として魚介類の種苗生産現場へ導入するために検討されてきた。第二章と第三章で取り上げた真正眼点藻 *Nannochloropsis* 属は、緑藻 *Chlorella* 属とともに海産仔魚の初期餌料である海産ツボワムシ類（以下ワムシ）の餌料として古くから種苗生産現場へ導入されている（Watanabe et al. 1983; Maruyama et al. 1986）。ワムシを用いた海産仔魚の飼育時には、ワムシが不足している高度不飽和脂肪酸（HUFA）を強化する必要がある（Watanabe et al. 1978; Kitajima et al. 1979; Ben-Amotz et al. 1987）。第三章の実験で示したように、*N. oculata* や *C. vulgaris* は HUFA としてそれぞれアラキドン酸（ArA）とエイコサペンタエン酸（EPA）の両方、または ArA のみ含有する一方、ドコサヘキサエン酸（DHA）は有していない（Table 3. 1; セクション 3. 3. 2 参照）。ドコサヘキサエン酸は、HUFA の中でも海産仔魚が特に強く要求する栄養素であり、DHA 量が絶対的（i.e. mg g dry weight⁻¹）および相対的（i.e. % of total fatty acids）に高い餌料もしくは配合飼料を用いることで、海産仔魚の飼育成績をより高めることができる（Watanabe 1993; Rainuzzo et al. 1997; Furuita et al. 1999）。微細藻類をワムシの栄養強化剤に用いて海産仔魚の必須脂肪酸の要求量に見合ったワムシを生産するには、その餌料として DHA を含有する藻類種を選定する必要がある。

微細藻類はその分類毎に異なる脂肪酸組成を持っており、種によってHUFAを含む脂肪酸組成が異なる (Volkman et al. 1989; Renaud et al. 1999; Patil et al. 2007)。分類群の中でも、ハプト藻類は、その細胞サイズがワムシや甲殻類の幼生などを含む濾過摂食動物の口径に適しているだけでなく、DHAを比較的多く含有している (Table 4. 1; Volkman et al. 1989; Renaud et al. 1999; Patil et al. 2007)。ハプト藻の中でも *Isochrysis* 属は、ワムシのDHA強化の餌料としての有用性について検討されてきた (Reitan et al. 1993, 1997; Øie et al. 1995)。特に、*Isochrysis* sp.タヒチ株はDHAを含んでいるだけでなくその至適培養温度が幅広いため、実際に二枚貝養殖現場でその幼生期に与える餌料として広く培養されている (Okauchi 1990)。国内では、現行のワムシのDHA強化には魚油をベースとした配合飼料もしくはDHAを生体濃縮させたDHA強化クロレラ (SFC; クロレラ工業、東京、日本; Hayashi et al. 2001) が主流であるが (Maruyama et al. 2006)、上記の研究成果から、タヒチ株の培養細胞もワムシのDHA強化剤として代替的に種苗生産現場に導入できる可能性があると考えられる。

しかし、*Isochrysis* 属も *N. oculata* と同様に培養経過に伴い脂肪酸組成が変化してしまう。対数増殖期から定常期に遷移すると、*I. galbana* の総脂質中のDHAの含有率 (%) は減少する (Fidalgo et al. 1998)。また、Reitanら (1994) はハプト藻類を含む多くの分類群の微細藻類において、培養液中の栄養塩 (特にリン酸塩) の欠乏がHUFA含有率 (%) を低下させることを示した。Ferreiraら (2008) も、栄養塩が十分に存在する条件で培養した微細藻類は総脂質中のHUFA含有率が高くなり、さらにその細胞群を給餌したワムシのHUFA含有率も高くなった。*Isochrysis* sp.タヒチ株をワムシのDHA強化に用いる際に、そ

の強化効率を向上させるには、タヒチ株の培養相の変化を推定する手法が必要である。また、DHAを含むHUFAが海産仔魚に与える餌料効果は、第三章でも議論した通り、非極性脂質（NL）よりも極性脂質（PL）にDHAが取り込まれた形で高くなるが（Gisbert et al. 2005; Kjorsvik et al. 2009; Wold et al. 2009; Kotani et al. 2017）、タヒチ株のPL中のDHA（PL-DHA）含量が高くなる時期および栄養塩の条件は不明である。

第二章および第三章では、*N. oculata*の培養相の変化は分光光度法を応用することで推定できることを提案した。また、微細藻類の分類群間で吸光波長が類似しているため（Santos-Ballardo et al. 2015）、この分光光度法が他の微細藻類種に対しても適用できる可能性がある。そこで、第四章では、まず*Isochrysis* sp.タヒチ株の培養実験を行い、培養期間中の吸光スペクトル、培養液中の栄養塩濃度、および細胞内の脂肪酸組成の関係を調べた。そして、異なる培養相の時期に収穫したタヒチ株の細胞群を用いたワムシへの給餌実験を行った。それらの培養細胞群がワムシの活性およびDHA含量に与える影響をSFCと比較することで、ワムシの栄養強化剤としてのタヒチ株の実用性を評価した。

4.2. 材料と方法

4.2.1. *Isochrysis* sp.タヒチ株の用意

Isochrysis sp.タヒチ株は、2011年4月に長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科の萩原篤志先生から分与していただき、第二章の実験と同じ方法を用いて鹿児島大学の水産

学部で維持した（セクション 2.2.1 参照）。

4.2.2. タヒチ株の培養実験

タヒチ株の培養相の評価手法を確立するために、11 培養フラスコを用いてタヒチ株の培養実験を行った。本実験の前に、タヒチ株は、水温 20 度、塩分 23 psu の Guillard-f 培地 (Guillard and Ryther, 1962) を用いて、白色蛍光灯 (FL40SW; 三菱オスラム、神奈川、日本) により光量 $150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光を 24 時間連続照射し、シリンジフィルター (孔径 $0.22 \mu\text{m}$; Millipore、マサチューセッツ、アメリカ) を通した無菌通気により前培養を行った。光強度は、球型光量子センサー (LI-193SA; LI-COR Bio-sciences、ネブラスカ、アメリカ) を取り付けられたライトメーター (LI-250A; LI-COR Biosciences、ネブラスカ、アメリカ) を用いて測定した。細胞の計数は、Guillard と Sieracki (2005) の方法に従い、血球計算盤 (深さ 0.1 mm ; サンリード株式会社、東京、日本) を用いて毎日行った。上記の条件下で 3 回前培養を行った後、対数増殖期と推定される細胞群を 11 培養フラスコ内の新しい培地 (900 ml) に接種することで本培養を開始した。細胞の接種は、初期細胞密度が $0.1 \times 10^6 \text{ cells ml}^{-1}$ になるように行った。タヒチ株は前培養と同じ条件で 12 日間培養し、その培養液は細胞の計数、および各波長の吸光度と栄養塩濃度の測定のために毎日採集した。生化学分析用の細胞は培養開始後 2 日目から毎日採集した。この培養実験は 3 回繰り返した。培養 2 日目と 3 日目の細胞密度は生化学分析を行うには少なすぎたため、これらの日のサンプルは 3 回分の培養実験で収穫できた細胞を混合させて

1つとした。

4.2.3. 各波長の吸光度

吸光スペクトルを測定するためのサンプルおよびブランクは、採集された培養液から第二章と同じ方法を用いて用意した（セクション2.2.8参照）。タヒチ株の吸光度は、分光放射照度計（CL-500A; Konica-Minolta、東京、日本）を用いて360 nm から780 nm の範囲で測定した。この時の測定方法は、第二章の実験と同様であった（セクション2.2.8参照）。得られたデータを基に、490 nm および680 nm の吸光度比 ($Ab_{S_{490}}/Ab_{S_{680}}$) を算出した。

4.2.4. 栄養塩濃度

栄養塩濃度を測定するためのサンプルは、採集された培養液から第二章と同じ方法を用いて用意し保存した（セクション2.2.7参照）。培養液中の硝酸態窒素とリン酸の濃度は比色法によって決定した。各栄養塩濃度を決定するための培養液の発色方法および測定方法は第二章と同じであった（セクション2.2.7参照）。硝酸態窒素とリン酸はGuillard-*f*培地の初期栄養塩濃度の5%を下回った時に枯渇したと定義した（Matsui et al. 2017）。リン制限は、第二章の実験を受けて（Fig.2.7）、窒素とリンのモル比（N/P mol 比）が急激に増加した時に起きると定義した。

4.2.5. ワムシの栄養強化実験

L型ワムシ *Brachionus plicatilis* 複合種（小浜株）は、長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科の萩原篤志先生から分与していただいた。この株は鹿児島大学水産学部の研究室で、第三章と同じ方法で維持した（セクション3.2.6参照）。この株は、栄養強化直前のワムシのDHA含量が実験結果に及ぼす影響を無視できるように、DHAを含まない淡水クロレラ *Chlorella vulgaris* (V-12; クロレラ工業株式会社、東京、日本) を餌料として1カ月間前培養を行った。

異なる培養相の時期に収穫したタヒチ株をワムシ個体群に同時に給餌するために、タヒチ株の培養液は細胞摂取時期を2日おきにずらして複数用意した。これらの培養液は、初期細胞密度が一定 (0.1×10^6 cells ml⁻¹) になるように細胞を植え継ぎ、培養規模を除き、タヒチ株の培養実験時と同様の条件下で維持した（セクション4.2.2.参照）。タヒチ株は51のGuillard-f培地が入った61ポリカーボネイトボトルを用いて培養した。各培養液中に含まれる細胞の密度と Abs₄₉₀/Abs₆₈₀ は毎日モニタリングした。Abs₄₉₀/Abs₆₈₀ の傾向が異なる3つの培養液（第1減少期、第2減少期、および第2上昇期）を選定し、各細胞群をワムシの給餌実験に用いた。細胞群は、各培養液を遠心分離（3,000 rpm、5分）によって収穫した。

給餌実験直前に、ワムシはプランクトンネット（孔径63 μm）で濾して収穫し、洗浄し、そして500 mlの新鮮な海水を含む500 mlビーカーに収容した。本実験ではワムシ

の活性試験と栄養強化試験の2種類を行った。活性試験では、SFC (対象区)、そして第1減少期、第2減少期、および第2上昇期のタヒチ株の給餌区をそれぞれ設けた。栄養強化試験では、*C. vulgaris*、第1減少期および第2減少期のタヒチ株、およびSFCの給餌区をそれぞれ設けた。各試験は3回繰り返した。各藻類細胞はワムシ1個体あたり 20×10^3 細胞分給餌し、12時間後に全試験区のワムシを同時に収穫した。各培養海水から0.2 ml分採水し、そこに含まれるワムシをルゴール液によって固定した後、その個体数と携卵数を実体顕微鏡 (SMZ800; Nikon、東京、日本) の下で数えた。さらに、各培養海水から1 ml分追加で採水し、その中に含まれるワムシは固定せずに遊泳速度の評価に用いた。脂肪酸分析のために、培養海水に含まれるワムシはプランクトンネットに濾して収穫した後、余分な水分をプランクトンネットの裏からキムタオルで拭き取った。ワムシは50 mlの遠沈管に回収した後、凍結乾燥させ、そして脂肪酸の分析を行うまで -80 度で保存した。

4.2.6. ワムシの遊泳速度

ワムシを含む培養海水は、界線スライドガラス (枠付き; 松浪硝子工業株式会社、大阪、日本) の上に0.2 ml分乗せた。その後、カバーガラスを枠の上に乗せることで、培養海水の深さ (約1.0 mm) を統一した。スライドガラス上にいるワムシは、デジタルマイクロ스코プ (VHX-2000; Keyence、大阪、日本) を用いて観察した。デジタルマイクロ스코プのモニター上でワムシの軌跡を10秒間追跡し、その距離を内蔵のソフトを用

いて解析した。ワムシの遊泳速度 ($\mu\text{m s}^{-1}$) は 10 秒間の移動距離を基に算出し、試験区ごとに 45 個体分計測した。

4.2.7. 生化学分析

タヒチ株の総脂質は、第二章の実験と同じ手順で Bligh と Dyer (1959) の方法に従い抽出した (セクション 2.2.9 参照)。ワムシの総脂質は、第三章の実験と同じ手順で Folch et al. (1957) の方法に従い抽出した (セクション 3.2.6 参照)。タヒチ株およびワムシの総脂質はそれぞれ NL および PL に分画し、各脂質中の脂肪酸組成はガスクロマトグラフィ法に従い測定した。脂質の分画から脂肪酸の分析までの方法は、第二章の実験方法と同様であった (セクション 2.2.9, 10 参照)。

4.2.8. 統計解析

ワムシの携卵率および増殖速度は、一元配置分散分析 (One-way ANOVA)、および Dunnett 検定により SFC 給餌区を対象として比較した。ワムシの遊泳速度は、Kruskal-Wallis 検定、および Steel 検定により SFC 給餌区を対象として比較した。ワムシの脂肪酸の含量および組成は、Steel-dwass 検定もしくは Student の t 検定によって比較した。統計解析での有意水準は 5% に設定した。パラメトリック検定は、Sigma-Plot ver 11.0 software (Systat Software、カリフォルニア、アメリカ) を用いて行った。ノンパラメトリック 検

定は、JMP ver 11.0 software (SAS institute、ノースカロライナ、アメリカ) を用いて解析した。

4.3. 結果

4.3.1. タヒチ株の細胞密度と培養液中の栄養塩濃度の時間変化

タヒチ株の細胞密度は時間経過に伴い高くなり、やがてその増加は緩やかになった (Fig. 4. 1a)。誘導期が培養開始日から1日目までの間にあるように見えたが、増殖曲線の傾きは0-1日間とそれ以降の期間との間に有意差は確認されなかった。増殖曲線の傾きは全ての期間において有意差がなく、誘導期を含む全ての増殖フェーズの期間は傾きの比較では決定されなかった。

培養液中の硝酸態窒素とリン酸の濃度はともに細胞増殖に伴い減少し、それぞれ5日目と9日目に枯渇した (Fig. 4. 1b)。リン酸は硝酸態窒素よりも早い時期に枯渇した。培養液中の硝酸態窒素とリンのモル比 (N/P mol 比) は、3日目までは46-65を示しほとんど変化しない一方、4日目になると約7-10倍の477を示した (Fig. 4. 1b)。そのため、リン酸はN/P mol 比が急激に増加した4日目に制限されていた。

4.3.2. タヒチ株の脂質含量およびDHA含量の時間変化

タヒチ株の総脂質含量 (pg cell^{-1}) は培養7日目まで減少傾向を示した後、9日に急激に増加した (Fig. 4. 2a)。この時期は、リン酸の枯渇後に見られる硝酸態窒素の枯渇時期と一致した。総脂質含量の増加は培養最終日 (12日目) まで続いた。一方、NLとPLの割合 (%) は時間経過とともに複雑な傾向を示した (Fig. 4. 2b)。NLの割合は4日目まで減少した後増加傾向に転じた。この増加は時間経過に伴い緩やかになり、培養10日目にNLは急激に増加する傾向を示した。

DHA量の時間変化は、特にPL中においてサンプル間で大きくばらついていたため、その生データを Fig. 4. 3 に示した。NL中のDHA含有率 (%) は時間経過に伴い増加する傾向を示した (Fig. 4. 3a)。一方、PL中のDHAは培養2日目と3日目には検出されなかったが、4日目から8日かけて検出された。その含有率は、NLと同等もしくはそれ以上であった。しかし、PL中のDHAは、培養9日目以降サンプル間で共通してほとんど検出されなくなった。PL中のDHAの急激な増加と減少は、リン酸の制限および硝酸態窒素の枯渇の下でそれぞれ確認された。これらの各脂質中のDHAの傾向は、含量単位 ($\text{mg g dry weight}^{-1}$) でも確認された。

4. 3. 3. タヒチ株の吸光特性

タヒチ株の吸光ピークは440 nmと680 nmに確認された (Fig. 4. 4)。これは第二章の実験で得られた *N. oculata* の結果と共通していた。*N. oculata* では490 nmも吸光ピークを示したが、タヒチ株ではそのピークが検出されなかった。

N. oculata と同様に、タヒチ株の 490 nm と 680 nm の吸光度比 (Abs_{490}/Abs_{680}) を算出し、その時間変化を示した (Fig. 4.5)。その Abs_{490}/Abs_{680} は、第二章の *N. oculata* の結果と比べて複雑に変動しており (Fig. 2.9)、減少と上昇を交互に示していた (Fig. 4.5)。タヒチ株の Abs_{490}/Abs_{680} はまず、培養開始から 3 日目まで減少傾向を示した。その後、 Abs_{490}/Abs_{680} は上昇に転じて 5 日目まで増加傾向を示した。 Abs_{490}/Abs_{680} は 5 日目に再度減少に転じて 7 日目まで減少した後、再度増加傾向を示した。この傾向の変化を栄養塩の枯渇時期と照らし合わせると、培養開始時から見られる Abs_{490}/Abs_{680} の減少は、リン酸の制限下で上昇に転じていた。そのため、 Abs_{490}/Abs_{680} の減少から上昇への 1 回目の転換期を境に、タヒチ株は PL 中に DHA を含有し始めた (Fig. 4.3)。そして、PL 中の DHA がほとんど検出されなくなる硝酸態窒素の枯渇時期は、第 2 回目の Abs_{490}/Abs_{680} の上昇期の最中に確認された (Fig. 4.5)。

4.3.4. ワムシの生理活性評価

Abs_{490}/Abs_{680} の結果を基に第 1 減少期、第 2 減少期、および第 2 上昇期に至ったタヒチ株の培養細胞群をワムシに給餌した時、その携卵率 ($eggs\ ind^{-1}$)、日間増殖率個体密度 (%)、および遊泳速度 ($\mu m s^{-1}$) は、SFC 給餌区を対象として比較した (Fig. 4.6)。ワムシの携卵率は、SFC を給餌すると $0.21 \pm 0.01\ eggs\ ind^{-1}$ であったのに対し、タヒチ株を給餌するとどの培養相の細胞群でも SFC より比較的高い傾向を示した (第 1 減少期; $0.31 \pm 0.07\ eggs\ ind^{-1}$, 第 2 減少期; $0.39 \pm 0.02\ eggs\ ind^{-1}$, 第 2 上昇期; $0.36 \pm 0.08\ eggs\ ind^{-1}$)。特に、

第2減少期と第2上昇期にそれぞれ至ったタヒチ株を給餌することで、ワムシの携卵率がSFCよりも有意に高くなった。

ワムシの日間増殖率は試験区間で有意差は確認されなかった。しかし、SFCに比べて第1減少期と第2上昇期のタヒチ株はワムシの日間増殖速度を低下させている傾向を示した。一方、第2減少期のタヒチ株を摂餌したワムシの日間増殖速度は、SFCの結果と同等であるように思われた。ワムシの遊泳速度も同様に、第1減少期と第2上昇期のタヒチ株給餌区ではSFC給餌区に比べて低下したが ($p < 0.05$)、第2減少期のタヒチ株では有意差は認められなかった。

4.3.5. ワムシのHUFA強化効率

ワムシの各脂質中に含まれるHUFA含量 ($\text{mg g dry weight}^{-1}$) を、*C. vulgaris*、および第1減少期と第2減少期のタヒチ株をそれぞれ給餌した時の間で比較した (Fig. 4.7)。*C. vulgaris* では検出されなかったEPAとDHAは、タヒチ株の給餌によって強化されていることが確認された。ワムシのDHA含量は、タヒチ株の培養細胞の給餌区の間でも異なり、第2減少期の細胞群の給餌時の方が高かった ($p < 0.05$)。そのDHA含量の増加量は特にPL中で大きく、第1減少期の細胞群給餌時の3.5倍になった (NL中, 1.4倍)。また、PL中のEPA含量も第1減少期の細胞群給餌時の3.8倍になった。ArA含量は、NL中では給餌区間で微かな差しか見られなかったが ($p < 0.05$)、PL中では第1減少期の細胞群の給餌時のみ低い値を示した ($p < 0.05$)。

最後に、第2減少期のタヒチ株を給餌した時のワムシの HUFA 強化の結果を、SFC と比較した (Fig. 4.8)。ワムシの ArA 含量は、脂質の種類に関わらず、給餌区間で変化しなかった ($p > 0.05$)。タヒチ株を摂餌したワムシの EPA 含量は SFC に比べて劇的に低く、NL 中では約3分の1、PL 中では約2分の1であった ($p < 0.05$)。一方、DHA 含量は、NL 中ではタヒチ株を給餌した方が有意に高くなり、PL 中では SFC と同等の値を示した ($p > 0.05$)。タヒチ株を摂餌したワムシの ArA と EPA の含量比 (ArA/EPA) は SFC に比べて劇的に高く、NL 中では約3倍、PL 中では1.7倍であった ($p < 0.05$; Fig. 4.9)。DHA と EPA の含量比 (DHA/EPA) に関しては、特にタヒチ株を摂餌したワムシの NL 中で高く 7.69 を記録し、2.09 を記録した SFC の約3.8倍高い値を示した ($p < 0.05$)。PL 中の DHA/EPA もタヒチ株を給餌すると 1.15 となり、SFC (0.56) の2倍高い値を示した ($p < 0.05$)。

4.4. 考察

4.4.1. 増殖フェーズの遷移および培養液中の栄養塩の欠乏が及ぼすタヒチ株の脂質代謝への影響

第二章および第三章で考察したように、脂質の代謝様式は、微細藻類の増殖フェーズと培養液中の栄養塩の欠乏により変化する (セクション2.4.1,3 およびセクション3.4.1 参照)。本研究の対象藻類種と同属である *I. galbana* は対数増殖期から定常期に遷移す

ると、その総脂質含量およびNL含量が増加することが報告されている (Zhu et al. 1997; Fidalgo et al. 1998)。一方、総脂質中の脂肪酸組成に関しては、DHAを含む多価不飽和脂肪酸が占める割合 (%) が対数増殖期よりも定常期で低くなっていた。本実験でも培養9-10日目から総脂質含量およびNLの割合がともに増加することが確認された (Fig. 4.2)。しかし、本実験で得られたタヒチ株の増殖曲線からは増殖フェーズを決定することができず、増殖フェーズと脂質の蓄積との関係は確認できなかった。また、総脂質中の脂肪酸組成に関しては、DHA含有率 (%) が対数増殖期と定常期の間で見られる変化の傾向が報告例によって異なっていた (Fidalgo et al. 1998; Roleda et al. 2013)。第二章でも議論したように増殖フェーズはその決定方法によって異なってしまうことを考慮すると (セクション2.4.1参照)、タヒチ株の脂質の代謝様式が変化する時期を増殖フェーズからのみ推定するのは正確性に欠けると考えられる。

本研究では、培養液中の硝酸態窒素の枯渇時期とタヒチ株が脂質を蓄積し始める時期が一致していた (Fig. 4.2)。 *I. galbana* の脂質含量は窒素の欠乏下で増加する事がよく報告されている (Lacour et al. 2012; Roleda et al. 2013; Roopnarain et al. 2014a, 2015)。培養液中のリン酸は培養4日目から制限もしくは枯渇していたが、総脂質含量は硝酸態窒素の枯渇時期を迎えるまで減少傾向を示していた (Fig. 4.2)。この結果は、Roopnarain ら (2014a) の *I. galbana* の培養実験の結果と類似している。さらに、Roopnarain ら (2014b) は、 *I. galbana* の培養液中のリン酸の初期濃度は Guillard-f/2 培地の基準値から 25%まで減らしても、その増殖および脂質含量の変化に影響がないことを示した。以上より、タヒチ株の脂質の定量的な増加は、培養液中のリン酸の欠乏よりも硝酸態窒素によるものである

ことが示唆される。このタヒチ株の栄養塩の欠乏に対する応答は、*N. oculata* とは異なっていた。第二章および第三章では、*N. oculata* がその増殖、脂質含量、脂肪酸組成、および各波長の吸光度を変化させたのは、主としてリン酸の枯渇によるものであると考察した。Roleda ら (2013) は、*N. oculata* の細胞内の N/P 比が栄養塩の欠乏の前後でほとんど変化しなかったのに対し、*I. galbana* の N/P 比は栄養塩欠乏下で 5 倍高くなったと報告した (20 度での培養実験結果)。これは、栄養塩の欠乏を境に、*N. oculata* は窒素とリンを同程度要求するのに対し *I. galbana* は窒素に比べてリンの要求量が減少することを意味している。*N. oculata* とタヒチ株の培養液中のリン酸が硝酸態窒素よりも先に枯渇したことから推察されるように (Fig. 2. 5-7, 4. 1)、Guillard の *f* 培地の N/P 比は多くの海産生微細藻類がリン制限に陥りやすいと言われている (Goldman et al. 1979; Sakshaug et al. 1983)。そのため、*N. oculata* は先に欠乏するリン酸の影響を受け硝酸態窒素を利用しにくくなり代謝様式を変化させた一方、タヒチ株は細胞内の N/P 比を変化させることでリン酸が制限されている環境下でも硝酸態窒素を利用できるよう順応した可能性が考えられる。本研究では、NL と PL の相対量や PL 中の DHA 含有率が、硝酸態窒素だけでなくリン酸の欠乏時にも変化していた (Fig. 4. 2, 3)。これらの応答は、細胞が培養液中のリン酸の欠乏に順応するための戦略であると考えられる。タヒチ株が DHA を PL へ蓄積したことは、第三章で考察したように細胞がリン酸の欠乏下で自身の膜構造を安定させるためである事が考えられ (セクション 3.4.2 参照)、上記のリン酸欠乏時における生存戦略を支持していた。

4.4.2. 培養液中の栄養塩が及ぼす微細藻類の吸光特性への影響

タヒチ株の Abs_{490}/Abs_{680} は栄養塩の中でも先に欠乏したリン酸の影響を受けて減少傾向から上昇傾向に転じた (Fig. 4.5)。第二章および第三章で着目していた *N. oculata* の Abs_{490}/Abs_{680} も同様の現象が確認されたことから (Fig. 2.9, 12)、リン酸の欠乏が 490 nm と 680 nm の光の吸収量およびそれらの波長帯の吸光に関与する色素組成に及ぼす影響は藻類種間で共通している可能性が示唆された。栄養塩の欠乏が及ぼす微細藻類の色素組成への影響も、栄養塩源として窒素が着目されている (Forján et al. 2007; Merzlyak et al. 2007; Roopnarain et al. 2014a)。*N. oculata* と *I. galbana* は窒素欠乏下でカロテノイドとクロロフィル *a* の含量比 (Car/Chl 比) を増加させる (Forján et al. 2007; Merzlyak et al. 2007; Roopnarain et al. 2014a)。*N. oculata* のように栄養塩の欠乏に関わらず細胞内の N/P 比が変化しない藻類種は、リン制限時でも培養液中の硝酸態窒素を利用しにくくなるため、*N. oculata* の Abs_{490}/Abs_{680} は窒素の欠乏時と同様に上昇傾向を示したと考えられる。一方、タヒチ株は細胞内の N/P 比をある程度調節できる可能性があるため (Roleda et al. 2013)、培養液中のリン酸が欠乏した後、細胞がリン酸に対する硝酸態窒素の要求量を増やすことでリン酸制限の影響を小さくしたと論理立てられる。この仮説は、タヒチ株の Abs_{490}/Abs_{680} が 1 回目の上昇傾向を示した後に、リン酸と硝酸態窒素が十分存在する培養開始時に確認されたような減少傾向を示したことから支持される (Fig. 4.5)。さらに、その Abs_{490}/Abs_{680} が再度上昇傾向に転じた後に硝酸態窒素が枯渇した (Fig. 4.5)。この現象は前述の通り、細胞内の Car/Chl 比が培養液中の窒素が欠乏したことにより増加

したためであると推察される (Roopnarain et al. 2014a)。

以上より、栄養塩の欠乏に伴うタヒチ株の培養相の遷移は、第二章と第三章で調査した *N. oculata* と同様に細胞内の吸光特性から推定できることが明らかとなった。つまり、 Abs_{490}/Abs_{680} を指標として、タヒチ株の細胞は1回目の減少期ではリンと窒素が十分に存在しており PL-DHA は検出されないが、1回目の上昇期から2回目の減少期にかけてリンが欠乏しており PL-DHA が含有されるようになる。その後、硝酸態窒素が欠乏している2回目の上昇期では再び PL-DHA が検出されなくなる。タヒチ株の培養細胞を用いて海産仔魚の初期餌料であるワムシの PL-DHA を強化するには、タヒチ株が Abs_{490}/Abs_{680} 基準で1回目の上昇期に至ってから2回目の上昇期を迎えるまでに細胞群を収穫しワムシに給餌すると効果的である可能性がある。

4.4.3. ワムシの生理活性に対するタヒチ株の培養相の影響

ワムシが海産仔魚の飼育成績へ与える餌料効果は、ワムシの HUFA 含量だけでなく、ワムシの生理状態によっても変化する (Tomoda et al. 2004, 2005)。ワムシの携卵率、増殖速度、遊泳速度、摂餌速度、および休眠卵の生産性は生理学的性質を表す (Snell et al. 1987; Hagiwara et al. 1988; Janssen et al. 1994; Korstad et al. 1995; Øie and Olsen 1997; Tomoda et al. 2004, 2005)。Tomoda ら (2004, 2005) によると、同じ方法で HUFA を強化したワムシをマダイとヒラメの餌料に用いた際、対数増殖期に収穫し携卵率が高いワムシを給餌した方が定常期に収穫し携卵率が低いワムシよりも各種の仔魚の飼育成績は高くなる。本研

究では、日本国内の主流の栄養強化剤である SFC に代わる栄養強化剤としてタヒチ株の培養細胞を検討するために、タヒチ株の培養相の差異がワムシの活性に与える影響を評価した。結果的に、リン酸が欠乏している Abs₄₉₀/Abs₆₈₀ 第2減少期の細胞群をワムシの餌料に用いれば、タヒチ株はワムシの活性に対して SFC と同等あるいはそれ以上の給餌効果を持つことが明らかとなった (Fig. 4. 6)。

ワムシの携卵率は、SFC に比べてタヒチ株の第2減少期および第2上昇期の培養細胞を給餌した方が有意に高くなった (Fig. 4. 6a)。タヒチ株の培養細胞を摂餌したワムシの携卵率は、その細胞の培養相によって前後したが、SFC を摂餌した時より高くなる傾向が確認された (Fig. 4. 6)。ワムシの携卵率は、異なる栄養塩濃度の培地で培養した藻類細胞群を給餌してもほとんど変化しなかった (Ferreira et al. 2009)。この結果は、本研究で得られた傾向を支持していた。また、ワムシの生存にとって悪影響を与える環境ストレスをかけても、ワムシの携卵率は 24 時間以内であれば減少しないと報告されている (Snell et al. 1987)。これは、対象区であった SFC がワムシの携卵率を減少させていた可能性を否定している。逆に、タヒチ株が SFC よりもワムシの携卵率を高めるのに適した餌料価値を有していたと考えられる。

一方、ワムシの日間増殖率と遊泳速度はともに対象区である SFC の方がタヒチ株よりも高い傾向を示した (Fig. 4. 6b, c)。種苗生産現場では、ワムシの密度が栄養強化の工程中に減少することが度々起こる (北島 1985)。この原因の一つに、ワムシの前培養に用いていた餌料に慣れている状態で、それとは異なる餌料を栄養強化のために用いることが挙げられる (吉松・林 1997)。本研究でワムシの前培養に用いた餌料は対象区と同じ

藻類種である *C. vulgaris* である。吉松と林 (1997) によると、ワムシの前培養に *C. vulgaris* を用いた場合、*C. vulgaris* と併用して異なる栄養強化剤を給餌しても、ワムシは *C. vulgaris* を優先して摂餌する。そのため、ワムシの日間増殖率と遊泳速度が対象区に比べてタヒチ株給餌区で全体的に低下したのは、前培養とは異なる餌料を用いたためである可能性がある。

しかし、タヒチ株の培養相の中でも第2減少期の細胞群は、SFC と同等の活性を有するワムシを生産できた (Fig. 4. 6)。特に、餌料の種類の違いによる影響を受けていると考えられる日間増殖率と遊泳速度も、第2減少期の細胞群と SFC との給餌間で有意差がなかったのは興味深い。Ferreira ら (2018) は、異なる栄養塩の条件下で培養した *N. gaditana* をワムシの栄養強化に用いてもワムシの密度に変化がなかったと報告している一方、別の実験では栄養塩が欠乏している細胞群を給餌した方がワムシの密度は減少していた (Ferreira et al. 2008, 2009)。これは、栄養塩が欠乏している培養相に至った藻類細胞群は栄養塩が十分にある時よりもワムシの増殖を妨げる可能性があることを意味している。本研究ではそれにも関わらず、培養液中にリン酸と硝酸態窒素がともに存在している細胞群 (第1減少期) よりリン酸の欠乏の影響を受けた細胞群 (第2減少期) の方が、ワムシの日間増殖率と遊泳速度は高い傾向を示した (Fig. 4. 6b, c)。第2減少期と同様に栄養塩が欠乏している第2上昇期に収穫した細胞群ではワムシの日間増殖率と遊泳速度の低下を抑えることができなかったことから、第2減少期のみ確認された PL 中の DHA 含量がワムシの活性に寄与していると予測される (Fig. 4. 3)。このタヒチ株の培養相の差異がワムシの活性を変化させる要因に関しては、さらなる研究が必要である。

4.4.4. ワムシの DHA 強化剤としてのタヒチ株の実用性

タヒチ株を用いたワムシの DHA の強化は、栄養塩制限を受けない第 1 減少期の細胞群よりもリン酸が欠乏していた第 2 減少期の細胞群の方がその強化効率は高かった (Fig. 4.7)。特に PL-DHA 含量が第 2 減少期の細胞群の給餌により高くなったことは、その時期の藻類細胞中の PL-DHA 含量が高いことに由来していた (Fig. 4.3)。さらに、この時期の細胞群は、ワムシの活性および HUFA 含量に対して SFC と同等の給餌効果を示したことから (Fig. 4.6, 8)、ワムシの DHA 強化は SFC の代わりにタヒチ株の特定の培養相の細胞を用いて行えることが明らかとなった。DHA 含量が高い餌料は一般的に海産仔魚の飼育成績を高める (Mourente et al. 1993; Takeuchi et al. 1994; Sato and Takeuchi 2009)。一方、DHA 強化剤を過剰投与したワムシ ($11\text{--}15\text{ mg g dry weight}^{-1}$) を用いてマダラ仔魚を飼育すると、仔魚が異常行動を示したり魚体表面に水膨れが生じたりしたという報告もある (Takeuchi et al. 1994)。本研究では、第 2 減少期のタヒチ株を摂餌したワムシの NL と PL に含まれる DHA 含量はそれぞれ $2.82\text{ mg g dry weight}^{-1}$ と $1.32\text{ mg g dry weight}^{-1}$ であり (Fig. 4.7)、これらを合計しても過剰量には当てはまらない ($<5\text{ mg g dry weight}^{-1}$)。そのため、タヒチ株で DHA を強化したワムシは、DHA の過剰症を起こすことなく海産仔魚を飼育できることが期待される。

また、海産仔魚の飼育成績と餌料中の DHA 量の関係は、その DHA の絶対量だけでなく他の脂肪酸とのバランスの観点からも評価する必要がある。本研究では、ワムシの ArA

含量は DHA 含量と同様に給餌区間でほとんど変化はなかったが、EPA 含量は第 2 減少期のタヒチ株を給餌することで SFC 給餌時に比べて劇的に低かった (Fig. 4.8)。その結果、第 2 減少期のタヒチ株を給餌したワムシ中の DHA/EPA および ArA/EPA が数倍に跳ね上がった (Fig. 4.9)。海産仔魚の飼育成績は餌料中の DHA/EPA を高くするほど向上させることができると報告されている (Watanabe 1993; Rainuzzo et al. 1997; Copeman et al. 2002; Park et al. 2006)。逆に、DHA/EPA が低い餌料を用いて仔魚を飼育すると、イシビラメなどの異体類ではその有眼側の体色が白くなる個体の出現率が高くなる (Rainuzzo et al. 1997)。餌料中の DHA/EPA は 1 以下であると、その餌料を摂餌した仔魚の生残率は低くなる (Rainuzzo et al. 1997; Bessonart et al. 1999)。本研究では、SFC とタヒチ株ともにワムシの NL と PL 中の DHA/EPA を 1 以上に高めていた (Fig. 4.9)。同時に、餌料中の DHA/EPA が一定で ArA/EPA が低い餌料を摂餌したヨーロッパヘダイの仔魚は成長率と生残率ともに低下した (Bessonart et al. 1999)。第 2 減少期のタヒチ株を摂餌したワムシの ArA/EPA は SFC 給餌区と比較して有意に高かった (Fig. 4.9)。そのため、タヒチ株によるワムシの DHA 強化は、SFC を用いた現行の方法よりも海産仔魚が要求する HUFA のバランスを満たせることが明らかとなった。

DHA は脳や網膜などの神経細胞の膜成分として局在しているため (Masuda et al. 1999)、餌料に含まれる膜脂質中の DHA/EPA が海産仔魚の飼育成績に影響する可能性がある。Watanabe (1993) は、海産仔魚の膜脂質中の DHA/EPA が適切でないとその仔魚自体の活性が低くなる可能性について言及している。本研究では、タヒチ株の培養期間内で PL 中に DHA を有さない時期が存在しており (Fig. 4.3)、その時期の細胞群を摂餌したワム

シの PL-DHA 含量が他の時期の細胞群より低い値を示した (Fig. 4. 7)。タヒチ株の培養細胞を用いてワムシの DHA 強化を行う際、海産仔魚の膜脂質中の DHA と EPA のバランスを崩さないために、その細胞群の培養相を確認することが望まれる。

餌料に望まれる DHA/EPA のバランスは厳密には魚種ごとで異なっており、特にブリの至適の DHA/EPA は 2 を超える (Watanabe 1993)。タヒチ株を摂餌したワムシの DHA/EPA は NL 中では 7 を超える高い値を示したが、PL 中では 2 以下である (Fig. 4. 9)。今後の課題として、タヒチ株の培養細胞で DHA を強化したワムシを餌料とする際に正常に飼育できる海産魚種を検討する余地がある。

第五章 総合考察

5.1. 水産現場における微細藻類の培養相遷移の評価

微細藻類はトリアシルグリセロール、高度飽和脂肪酸 (HUFA)、 β カロチン、およびタンパク質など、我々ヒトにとって多くの有用物質を生成する (Priyadarshani and Rath 2012)。これらの有用物質に焦点を当てる様々な産業が、微細藻類に目的とする代謝物質を高含有させる条件の探索および技術の開発を行ってきた (Okauchi et al. 1990; Brown et al. 1996; Fidalgo et al. 1998; Merzlyak et al. 2007; Solovchenko et al. 2011; White et al. 2011; Reichardt et al. 2012; Hyka et al. 2013)。しかし、これらの多くは、生物故に生じる物質代謝の時間変化が考慮されていない。水産現場では、時間経過に伴う培養相の遷移を評価するために細胞密度ベースの指標を用いているが、細胞数とその生化学組成との間に相関はなく、指標としての精度も低い (Brown et al. 1993; Courtois de Viçose et al. 2012)。一方で、本研究で分光光度法を駆使して考案された指標は、微細藻類の色素組成の変化を反映するものであり (Merzlyak et al. 2007)、他の脂肪酸組成との有意な相関を示した (Fig. 2.13)。さらに、分光光度法は従来の生化学分析を通した直接的な測定法よりも簡便にかつ迅速に細胞の質的变化を評価できるため、水産現場への導入が容易である。この科学的根拠に基づく手法を水産現場に導入することで、これまで慣習的に評価されてきた微細藻類の培養相がより正確に評価でき、一定の栄養価を持つ細胞群を安定的に収穫できることに繋がると考える。また、水産現場では、海産仔魚の飼育成績を向上させるため

に、海産仔魚の初期餌料であるワムシの栄養価も重要視される。本研究では、海産仔魚の必須栄養素である極性脂質中の HUFA (PL-HUFA) を高含有する藻類細胞群の収穫だけでなく、その細胞を用いたワムシの PL-HUFA 含量の増加まで発展させた (Fig. 3.5, 4.7)。この結果は、この推定手法が、培養微細藻類を用いてワムシの HUFA を強化する上で実用性があることを明示している。加えて、微細藻類の培養相は、その差異によってワムシの PL-HUFA 含量が数倍異なっていたことから (Fig. 3.5, 4.7)、ワムシの HUFA 強化効率を高める上で如何に重要であるかを物語っている。

5.2. ワムシの栄養強化剤としての培養微細藻類の有効性

海産魚類種苗生産の現場で一般的に用いられるワムシの栄養強化剤は、ワムシの HUFA の中でも特に DHA 含量を増加させることに焦点を当てている (Hayashi et al. 2001; Li and Olsen et al. 2015)。これは、HUFA の中でも海産仔魚の DHA の要求量が特に高いためである (Watanabe 1993; Rainuzzo et al. 1997; Furuita et al. 1999)。一方、微細藻類の中には、*Nannochloropsis oculata* のように DHA を含まずに EPA を特異的に高含有する種が存在する (Ben-Amotz et al. 1987; Volkman et al. 1989; Renaud et al. 1999; Patil et al. 2007)。バラマンディは、DHA 強化クロレラ (SFC; クロレラ工業、東京、日本) と *N. oculata* の併用給餌により SFC 単体給餌と比べて、その成長速度およびストレス耐性が高くなった (Thépot et al. 2016)。そのため、EPA しか含まない微細藻類の培養細胞は、

DHA を含有する他の微細藻類種あるいは配合飼料と併用してワムシの HUFA 強化に利用することが望まれる。

一方、DHA を含有する *Isochrysis* sp. タヒチ株は、その培養状態を考慮すれば、種苗生産現場で広く用いられる SFC と同等の DHA 含量および生理活性を示すワムシを生産できた (Fig. 4.6-8)。これらの結果は、海産仔魚の初期餌料の高付加価値化が魚油を用いなくても可能であることを明示している。第四章の実験で対象区として着目した SFC は魚油を加工し微細藻類に生体濃縮させた餌料であるが、魚油を原料とした製品の多くが魚油そのものを乳化させて使用するものである。油ベースの製品は粘性があり、ワムシの培養液の水質を悪化させるだけでなく、ワムシの摂餌速度、遊泳速度、産卵性、および増殖速度を低下させる (Hagiwara et al. 1998; Larsen et al. 2008)。そのため、油ベースの製品をワムシの DHA 強化に用いると、ワムシの培養の崩壊がよく発生する (Foscarini 1988; Dhert et al. 1990)。油ベースの製品によるワムシの生理活性の低下は、ワムシの生産性だけでなく、そのワムシを用いた海産仔魚の飼育成績にも影響することが報告されている (Tomoda et al. 2004, 2005)。ワムシの生理活性を低下させずに PL-HUFA 含量を高めたタヒチ株の培養細胞は、それ単体でも HUFA 強化剤として有効であると考えられる。

現在、魚油を原料としたワムシの HUFA 強化剤の他に、マリンアルファやマリングロス EX (マリンテック、愛知、日本)、および冷蔵ナンノヤンマリン K-1 (クロレラ工業、東京、日本) のように、培養微細藻類を濃縮して商業化している強化剤も存在する。培養細胞の濃縮は、微細藻類を十分量ワムシに給餌するのに適している。上記の多くの製

品が *N. oculata* を濃縮したものである。この *N. oculata* の濃縮技術と分光光度法による培養相の遷移時期の推定手法を組み合わせることで、培養微細藻類を用いたワムシの HUFA 強化がより有効になると考える。

5.3. 培養微細藻類を用いたワムシの効率的な栄養強化方法の提案

本研究は、魚油に依存せずにワムシの HUFA を強化するために培養微細藻類を餌料として用いるという着眼に至った。ワムシの HUFA 含量は、その餌料の種類だけでなくワムシ自身の状態や強化方法によっても変化する (Kotani et al. 2009, 2010; Li et al. 2015)。魚油を一切使用せずにワムシの HUFA を強化するという発想は、本研究の成果だけで認知されるとは考えない。この発想が将来的な魚介類の安定供給を目指す上で重要であることを周知させるために、ここに *N. oculata* とタヒチ株の培養微細藻類を用いたワムシの効率的な HUFA 強化方法について、本研究成果を含めてまとめる。

微細藻類の培養および収穫

・ワムシの餌料となる微細藻類は、培養相の遷移が判別しやすくなるように初期密度を低く設定して (約 $10 \text{ 万 cells mL}^{-1}$) 培養する (Fig. 2.4, 9)。培地に含まれる栄養塩の初期濃度の違いや栄養塩源は微細藻類の HUFA 含量に影響するが、枯渇時に比べれば無視できるレベルである (Fidalgo et al. 1998)。また、培養時の光強度は、藻類の HUFA 含有率が減少するほど高い光量でなければ良い (Renaud et al. 1991; 屋外培養時、 $1200 \mu\text{mol}$

photons $m^{-2} s^{-1}$)。培養コストを抑えるために光源はLED照明を推奨する (Ueno 2003)。

しかし、630 nm の赤色 LED は、分光光度法による微細藻類の培養相の遷移を推定する精度が劣る可能性があるため推奨されない (Fig. 2.13)。

- ・微細藻類の培養期間中、細胞数の計数に加えて、490 nm と 680 nm の吸光度比 (Abs_{490}/Abs_{680}) の測定を毎日行い、その傾向をモニタリングする。
- ・ Abs_{490}/Abs_{680} の傾向が初めて減少から上昇に転じた後、約 2-3 日の間に微細藻類群を収穫する。この細胞群は、PL-HUFA 含量が最大になっている (Fig. 3.2, 4.3)。

ワムシの前培養および収穫時期

・餌料には、*Chlorella vulgaris* の濃縮細胞 (V-12; クロレラ工業、東京、日本) が製品化されているため、ワムシの前培養の簡便化のためにこれを用いる。前培養期間中は、ワムシを毎日計数する。

・HUFA 強化に用いるワムシは対数増殖期の内に収穫する。ワムシは定常期および死滅期よりも対数増殖期の方が、同じ HUFA 強化剤を用いた場合でもワムシの HUFA 含量が高くなる (Kotani et al. 2009)。

ワムシの HUFA 強化

・対数増殖期のワムシに対して、 Abs_{490}/Abs_{680} が上昇期を示した培養微細藻類の細胞群を給餌する。微細藻類の給餌量は残餌が出ることを見越して、12 時間の HUFA 強化時間につきワムシ 1 個体あたり $25000 \text{ cells mL}^{-1}$ に設定する。ワムシの HUFA 強化時間は、効率

的な強化のために最低でも 24 時間以上に設定する (Li et al. 2015; Kotani et al. 2017)。

上記の方法によって、培養微細藻類を用いたワムシの HUFA 強化を効率的に行えることが期待される。魚油を用いた現行の種苗生産技術は、魚から魚を作るという矛盾を孕んでいる。種苗生産技術の改良により完全養殖が可能な魚種が増えつつある昨今、天然資源に依存しない持続可能な種苗生産技術の開発が必要であると考え。3年間をかけて行った本研究の成果が、この水産養殖の新たなステージに向かうための足掛かりとなることを期待する。

謝辞

本研究を行う中で、指導教官および多くの方々のご指導および激励を頂きました。本研究の主旨指導教官である小谷知也教授からは、5年間もの長期にわたり、水産学について門外漢だった私に魚介類の種苗生産について丁寧に指導して頂きました。本研究の発案からその指導、および様々な実験器具の使用を許可して頂きました。科学論文の投稿および海外で開かれた国際学会でも大変お世話になりました。さらに、研究以外でも社会人としてのマナーについてご指導して頂きました。幾度となく貴重なお時間を割いて私の指導に徹して下さった小谷知也教授に、心より深く感謝申し上げます。

副指導教官の前田広人教授には、本研究の指導と実験器具の使用の許可をして頂きました。特に、高価な機械である Water-PAM の使用を許可して頂きました。貴重なお時間を割いて私の指導に徹して下さった前田広人教授に心より感謝申し上げます。

副指導教官の石川学教授には、本研究の指導と実験器具の使用の許可をして頂きました。特に、脂質および脂肪酸の分析に関する助言を頂きました。貴重なお時間を割いて私の指導に徹して下さった石川学教授に心より感謝申し上げます。

博士課程3年の松本萌さんには、同期として共に切磋琢磨してきました。博士課程の厳しい研究生生活を生き残れたのも、彼女の存在無しにはあり得ません。御礼申し上げます。

種苗生産研究室の卒業生および在学生の皆さんには、本研究の補助および発表練習に付き合ってもらいました。御礼申し上げます。

本研究は、笹川科学研究助成（平成 28 年度）および鹿児島連合農学研究科研究助成（平成 29 年度）の補助を受けた。併せて御礼申し上げます。

最後に、鹿児島大学に送り出してくれた父母の松井義博と松井寿美代には、生活面および精神面で支えて頂きました。私が本研究を行うことができたのは、父母のおかげです。

最大の感謝を申し上げます。

参考文献

- Adarme-Vega TC, Lim DKY, Timmins M, Vernen F, Li Y, Schenk PM (2012) Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. *Microb Cell Fact* 11:1–10
- Andrews T, Lorimer GH (2003) Manipulating ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase in the chloroplasts of higher plants. *Arch Biochem Biophys* 414:159–169
- Arimura S (2018) Fission and fusion of plant mitochondria, and genome maintenance. *Plant Physiol* 176:152–161
- Atta M, Idris A, Bukhari A, Wahidin S (2013) Intensity of blue LED light: a potential stimulus for biomass and lipid content in fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresour Technol* 148:373–378
- Bailey KM, Houde ED (1989) Predation on eggs and larvae of marine fishes and the recruitment problem. *Adv Mar Biol* 25:1–83
- Ben-Amotz A, Fishier R, Schneller A (1987) Chemical composition of dietary species of marine unicellular algae and rotifers with emphasis on fatty acids. *Mar Biol* 95:31–36
- Berner T, Dubinsky Z, Wyman K, Falkowski PG (1989) Photoadaptation and the package effect in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae). *J Phycol* 25:70–78
- Bessonart M, Izquierdo MS, Salhi M, Hernandez-Cruz CM, Gonzalez MM, Fernandez-Palacios H (1999) Effect of dietary arachidonic acid levels on growth and survival of gilthead sea bream

- (*Sparus aurata* L.) larvae. *Aquaculture* 179:265–275
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911–917
- Breuer G, Lamers PP, Martens DE, Draaisma RB, Wijffels RH (2012) The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. *Bioresour Technol* 124:217–226
- Brown MR, Garland CD, Jeffery SW, Jameson ID, Leroi JM (1993) The gross and amino acid compositions of batch and semi-continuous cultures of *Isochrysis* sp. (clone TISO), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. *J Appl Phycol* 5:285–296
- Brown MR, Dunstan GA, Norwood SJ, Miller KA (1996) Effects of harvest stage and light on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *J Phycol* 32:64–73
- Carvalho AP, Silva SO, Baptista JM, Malcata FX (2011) Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects. *Appl Microbiol Technol* 89:1275–1288
- Chen C-Y, Chen Y-C, Huang H-C, Ho S-H, Chang J-S (2015) Enhancing the production of eicosapentaenoic acid (EPA) from *Nannochloropsis oceanica* CY2 using innovative photobioreactors with optimal light source arrangements. *Bioresour Technol* 191:407–413
- Ciotti AM, Lewis MR, Cullen JJ (2002) Assessment of the relationships between dominant cell size in natural phytoplankton communities and the spectral shape of the absorption coefficient. *Limnol Oceanogr* 47:404–417
- Copeman LA, Parrish CC, Brown JA, Harel M (2002) Effects of docosahexaenoic, eicosapentaenoic,

- and arachidonic acids on the early growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*): a live food enrichment experiment. *Aquaculture* 210:285–304
- Courtois de Viçose G, Porta A, Viera MP, Fernández-Palacios H, Izquierdo MS (2012) Effects of density on growth rates of four benthic diatoms and variations in biochemical composition associated with growth phase. *J Appl Phycol* 24:1427–1437
- Creswell L (2010) Phytoplankton culture for aquaculture feed. Southern Regional Aquaculture Center.
- Das P, Lei W, Aziz SS, Obbard JP (2011) Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light. *Bioresour Technol* 102:3883–3887
- De Madariaga I, Joint I (1992) A comparative study of phytoplankton physiological indicators. *J Exp Mar Biol Ecol* 158:149–165
- Dhert P, Lavens P, Duray M, Sorgeloos P (1990) Improved larval survival at metamorphosis of Asian seabass (*Lates calcarifer*) using n-3 HUFA-enriched live food. *Aquaculture* 128:315–333
- Falkowski PG, Owens TG (1980) Light-shade adaptation. Two strategies in marine phytoplankton. *Plant Physiol* 66:592–595
- Ferreira M, Maseda A, Fábregas J, Otero A (2008) Enriching rotifers with “premium” microalgae. *Isochrysis aff. galbana* clone T-ISO. *Aquaculture* 279:126–130
- Ferreira M, Coutinho P, Seixas P, Fábregas J, Otero A (2009) Enriching Rotifers with “Premium” Microalgae. *Nannochloropsis gaditana*. *Mar Biotechnol* 11:585–595

- Ferreira M, Cortina-Burgueño Á, Freire I, Otero A (2018) Effect of nutritional status and concentration of *Nannochloropsis gaditana* as enrichment diet for the marine rotifer *Brachionus* sp. *Aquaculture* 491:351–357
- Fernández-Reiriz MJ, Perez-Camacho A, Ferreiro MJ, Blanco J, Planas M, Campos MJ, Labarta U (1989) Biomass production and variation of the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture* 83:17–37
- Fidalgo JP, Cid A, Torres E, Sukenik A, Herrero C (1998) Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. *Aquaculture* 166:105–116
- Fogg GE, Thake B (1965) Cultures of limited volume. In: Fogg GE and Thake B (eds), *Algal cultures and phytoplankton ecology*. The University of Wisconsin Press, Madison, pp. 12–42
- Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biological Chem* 226:497–509
- Forján E, Garbayo I, Casal C, Vilchez C (2007) Enhancement of carotenoid production in *Nannochloropsis* by phosphate and Sulphur limitation. In: Méndez-Vilas A (ed), *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*. Formatex Research Center Press, Extremadura, pp. 356–364
- Foscarini R (1988) Intensive farming procedure for red sea bream (*Pagrus major*) in Japan. *Aquaculture* 72:191–246

- Furuita H, Konishi K, Takeuchi T (1999) Effect of different levels of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in *Artemia* nauplii on growth, survival and salinity tolerance of larvae of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 170:59–69
- Gao B, Yang J, Lei X, Xia S, Li A, Zhang C (2016) Characterization of cell structural change, growth, lipid accumulation, and pigment profile of a novel oleaginous microalga, *Vischeria stellata* (Eustigmatophyceae), cultured with different initial nitrate supplies. *J Appl Phycol* 28:821–830
- Gisbert E, Villeneuve L, Zambonino-Infante JL, Quazuguel P, Cahu CL (2005) Dietary phospholipids are more efficient than neutral lipids for long-chain polyunsaturated fatty acid supply in European sea bass *Dicentrarchus labrax* larval development. *Lipids* 40:609–618
- Glemser M, Heining M, Schmidt J, Becker A, Garbe D, Buchholz R, Brück T (2016) Application of light-emitting diodes (LEDs) in cultivation of phototrophic microalgae: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:1077–1088
- Goldman JC, Mccarthy JJ, Feavey DG (1979) Growth rate influence on the chemical composition of phytoplankton in oceanic waters. *Nature* 279:210–215
- Grant SR, Bienfang PK, Laws EA (2013) Steady-state bioassay approach applied to phosphorus-limited continuous cultures: A growth study of the marine chlorophyte *Dunaliella salina*. *Limnol Oceanogr* 58:314–324
- Graziano LM, Roche JL, Geider RJ (1996) Physiological responses to phosphorus limitation in batch and steady-state cultures of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyta): a unique stress protein as an indicator of phosphate deficiency. *J Phycol* 32:825–838

- Greenwell HC, Laurens LML, Shields RJ, Lovitt RW, Flynn KJ (2010) Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *J R Soc Interface* 7:703–726
- Guillard RRL, Ryther JH (1962) Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can J Microbiol* 8:229–239
- Guillard RRL (1973) Division rates. In: Stein JR (ed), *Handbook of phycological methods: Culture methods and growth measurements*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 289–312
- Guillard RRL, Sieracki MS (2005) Counting cells in cultures with the light microscope. In: Anderson RA (ed), *Algal culturing techniques*. Elsevier Academic Press, New York, pp. 239–252
- Hagiwara A, Hino A, Hirano R (1988) Effects of temperature and chlorinity on resting egg formation in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54:569–575
- Hagiwara A, Yamamiya N, Belem de Araujo A (1998) Effect of water viscosity on the population growth of the rotifer *Brachionus plicatilis* Müller. *Hydrobiologia* 387:489–494
- Harrison PJ, Thompson PA, Calderwood GS (1990) Effects of nutrient and light limitation on the biochemical composition of phytoplankton. *J Appl Phycol* 2:45–56
- Hayashi M, Yukino T, Maruyama I, Kido S, Kitaoka S (2001) Uptake and accumulation of exogenous docosahexaenoic acid by *Chlorella*. *Biosci Biotechnol Biochem* 65:202–204
- 平田 八郎 (1964) 屋島事業場における餌料生物の培養 (その 1). 栽培漁業ニュース No.2, 瀬戸内海栽培漁業協会, 神戸, pp.3–4
- Hodgson PA, Henderson RJ, Sargent JR, Leftley JW (1991) Patterns of variation in the lipid class and fatty acid composition of *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) during batch

- culture. *J Appl Phycol* 3:169–181
- Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, Darzins A (2008) Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal* 54:621–639
- Huang X, Huang Z, Wen W, Yan J (2013) Effects of nitrogen supplementation of the culture medium on the growth, total lipid content and fatty acid profiles of three microalgae (*Tetraselmis subcordiformis*, *Nannochloropsis oculata* and *Pavlova viridis*). *J Appl Phycol* 25:129–137
- Hultberg M, Jönsson HL, Bergstrand K-J, Carlsson AS (2014) Impact of light quality on biomass production and fatty acid content in the microalga *Chlorella vulgaris*. *Bioresour Technol* 159:465–467
- Hyka P, Lickova S, Přibyl P, Melzoch K, Kovar K (2013) Flow cytometry for the development of biotechnological processes with microalgae. *Biotechnol Adv* 31:2–16
- Imada O, Kageyama Y, Watanabe T, Kitajima C, Fujita S, Yone Y (1979) Development of a new yeast as a culture medium for living feeds used in the production of fish seed. *Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries* 45:955–959
- Ishikawa T, Isowa K (2012) Cultivation of microalgae for live food under white light-emitting diodes (LEDs). *J Fish Technol* 4:51–55
- 伊藤 隆 (1960) 輪虫の海水培養と保存について. 三重県立大学水産学部紀要, 3:708–740
- Janssen CR, Ferrando MD, Persoone G (1994) Ecotoxicological studies with the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Ecotoxicol Environ Saf* 28:244–255

- Jia J, Han D, Gerken HG, Li Y, Sommerfeld M, Hu Q, Xu J (2015) Molecular mechanisms for photosynthetic carbon partitioning into storage neutral lipids in *Nannochloropsis oceanica* under nitrogen-depletion conditions. *Algal Res* 7:66–77
- Juaneda P, Rocquelin G (1985) Rapid and convenient separation of phospholipids and non phosphorus lipids from rat heart using silica cartridges. *Lipids* 20:40–41
- Kandilian R, Lee E, Pilon L (2013) Radiation and optical properties of *Nannochloropsis oculata* grown under different irradiances and spectra. *Bioresour Technol* 137:63–73
- Kim T-H, Lee Y, Han S-H, Hwang S-J (2013) The effects of wavelength and wavelength mixing ratios on microalgae growth and nitrogen, phosphorus removal using *Scenedesmus* sp. for wastewater treatment. *Bioresour Technol* 130:75–80
- Kitajima C, Fujita S, Ohwa F, Yone Y, Watanabe T (1979) Improvement of dietary value for red sea bream larvae of rotifers *Brachionus plicatilis* cultured with baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Japanese Soc Sci Fish* 45:469–471
- 北島 力 (1985) 生物餌料. 「養魚飼料—基礎と応用」(米康夫 編) 恒星社厚生, 東京. pp. 75–88
- Kjørsvik E, Olsen C, Wold PA, Hoehne-Reitan K, Cahu CL, Rainuzzo J, Olsen AI, Øie G, Olen Y (2009) Comparison of dietary phospholipids and neutral lipids on skeletal development and fatty acid composition in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture* 294:246–255
- Kobayashi T, Nagase T, Hino A, Takeuchi T (2009) Effect of combination feeding of *Nannochloropsis* and freshwater *Chlorella* on the fatty acid composition of rotifer *Brachionus*

plicatilis in a continuous culture. Fisheries Sci 74:649–656

Kohno H, Duray M, Gallego A, Taki Y (1990) Survival of larval milkfish, *Chanos chanos*, during changeover from endogenous to exogenous energy sources. In: Hirano R, Hanyu I (eds) The second Asian fisheries forum. Asian Fisheries Society, Manila, pp. 437–440

Korstad J, Neyts A, Danielsen T, Overrein I, Olen Y (1995) Use of swimming speed and egg ratio as predictors of the status of rotifer cultures in aquaculture. Hydrobiologia 313:395–398

Kotani T, Genka T, Fushimi H, Hayashi M, Kristof D, Patrich S (2009) Effect of cultivation methods on nutritional enrichment of euryhaline rotifer *Brachionus plicatilis*. Fish Sci 75:975–984

Kotani T, Genka T, Tanabe M, Miyashima A, Fushimi H (2010) Effect of nutritional enrichment method on fatty acid contents of rotifer *Brachionus plicatilis*. J World Aquacul Soc 41 884–892

Kotani T, Haraguchi T, Yamazaki Y Doi T, Matsui H, Yokoyama S, Ishikawa M, Koshio S (2017) Effect of the duration of nutritional enrichment on the fatty acid composition of commonly used rotifers *Brachionus plicatilis* sp. complex and larviculture performance of red sea bream *Pagrus major*. Aquac Sci 65:133–144

Lacour T, Sciandra A, Talec A, Mayzaud P, Bernard O (2012) Diel variations of carbohydrates and neutral lipids in nitrogen-sufficient and nitrogen-starved cyclostat cultures of *Isochrysis* sp. J Phycol 48:966–975

Larsen PS, Madsen CV, Riisgård HU (2008) Effect of temperature and viscosity on swimming velocity of the copepod *Acartia tonsa*, brine shrimp *Artemia salina* and rotifer *Brachionus plicatilis*. Aquat Biol 4:47–54

- Latasa M (1994) Pigment composition of *Heterocapsa* sp. and *Thalassiosira weissflogii* growing in batch cultures under different irradiances. *Sci Mar* 59:25–37
- Latasa M, Berdalet E (1994) Effect of nitrogen or phosphorus starvation on pigment composition of cultured *Heterocapsa* sp. *J Plankton Res* 16:83–94
- Laurence GC (1972) Influence of temperature on energy utilization of embryonic and prolarval tautog, *Tautoga onitis*. *J Fish Res Board Can* 30:435–442
- Lee TH, Chang JS, Wang HY (2013) Current developments in high-throughput analysis for microalgae cellular contents. *Biotechnol J* 8:1301–1314
- Ley AC, Mauzerall DC (1982) Absolute absorption cross-sections for photosystem II and the minimum quantum requirement for photosynthesis in *Chlorella vulgaris*. *Biochim Biophys Acta* 680:95–106
- Li K, Olsen Y (2015) Effect of enrichment time and dietary DHA and non-highly unsaturated fatty acid composition on the efficiency of DHA enrichment in phospholipid of rotifer (*Brachionus* Cayman). *Aquaculture* 446:310–317
- Li S, Xu J, Chen J, Chen J, Zhou C, Yan X (2014) The major lipid changes of some important diet microalgae during the entire growth phase. *Aquaculture* 428:104–110
- Makewicz A, Gribi C, Eichenberger W (1997) Lipids of *Ectocarpus fasciculatus* (Phaeophyceae). Incorporation of [1-14 C]oleate and the role of TAG and MGDG in lipid metabolism. *Plant Cell Physiol* 38:952–960
- Malapascua J, Jerez C, Sergejevová M, Figueroa F, Masojídek J (2014) Photosynthesis monitoring

- to optimize growth of microalgal mass cultures: application of chlorophyll fluorescence techniques. *Aquat Biol* 22:123–140
- Maruyama I, Nakamura T, Matsubayashi T, Ando Y, Naeda T (1986) Identification of the alga known as “marine chlorella” as a member of the Eustigmatophyceae. *Jap J Phycol* 34:319–325
- Maruyama I, Yamamoto S, Hayashi M (2006) Rotifers fed with n-3 highly unsaturated fatty acid-enriched *Chlorella vulgaris* are suitable for the rearing of larval red sea bream *Pagrus major*. *Aquacult Sci* 54:229–230
- Masuda R, Takeuchi T, Tsukamoto K, Sato H, Shimizu K, Imaizumi K (1999) Docosahexaenoic acid into the central nervous system of the yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Brain Behav Evol* 53:173–179
- Matsui H, Okawa R, Anraku K, Kotani T (2017) Application of spectrophotometry to estimate the optimum culture conditions for *Nannochloropsis oculata* as a diet for zooplankton. *Aquacult Sci* 65:209–219
- Mayers JJ, Flynn KJ, Shields RJ (2014) Influence of the N:P supply ratio on biomass productivity and time-resolved changes in elemental and bulk biochemical composition of *Nannochloropsis* sp. *Bioresour Technol* 169:588–595
- Meng Y, Jiang J, Wang H, Cao X, Xue S, Yang Q, Wang W (2015) The characteristics of TAG and EPA accumulation in *Nannochloropsis oceanica* IMET1 under different nitrogen supply regimes. *Bioresour Technol* 179:483–489
- Merzlyak MN, Chivkunova OB, Gorelova OA, Reshetnikova IV, Solovchenko AE,

- KhozinGoldberg I, Cohen Z (2007) Effect of nitrogen starvation on optical properties, and arachidonic acid content of the unicellular green alga *Parietochloris incisa* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *J Phycol* 43:833–843
- Michaelis L, Menten ML (1913) Die kinetic der invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift* 49:333–369
- Møller IM (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52:561–591
- Monod J (1949) The growth rate of bacterial cultures. *A Rev Microbiol* 3:371–394
- Moreau P, Bessoule JJ, Mongrand S, Testet E, Vincent P, Cassagne C (1998) Lipid trafficking in plant cells. *Prog Lipid Res* 37:371–391
- Mourente G, Rodriguez A, Tocher DR, Sargent JR (1993) Effects of dietary docosahexaenoic acid (DHA; 22:6n-3) on lipid and fatty acid compositions and growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae during first feeding. *Aquaculture* 112:79–98
- Muller-Feuga A, Moal J, Kaas R (2003) The microalgae of aquaculture. In: Støttrup JG and Mc Ecoy LA (eds), *Live feeds in marine aquaculture*. Blackwell Press, Oxford, pp. 206–252
- Øie G, Reitan KI, Olsen Y (1994) Comparison of rotifer culture quality with yeast plus oil and algal-based cultivation diets. *Aquacult Int* 2:225–238
- Øie G, Haaland H, Reitan KI, Olsen Y (1995) Short-term effect of algal diets on the protein and lipid content of individual of rotifers. In: Svennevig N, Krogdahl A (eds.), *Quality in aquaculture, communications and abstracts, aquaculture Europe '95*. European Aquaculture Society, Special

Publication No. 23, Gent, Belgium, pp. 37–39

Øie G, Olsen Y (1997) Protein and lipid content of the rotifer *Brachionus plicatilis* during variable growth and feeding condition. *Hydrobiologia* 358:251–258

Okauchi M (1990) Food value of *Isochrysis* aff. *galbana* for the growth of pearl oyster spat. *Nippon Suisan Gakkaishi* 56:1343

Okauchi M, Zhou W-J, Zou W-H, Fukusho K, Kanazawa A (1990) Difference in nutritive value of a microalga *Nannochloropsis oculata* at various growth phases. *Nippon Suisan Gakkaishi* 56:1293–1298

Okauchi M (2013) III-1. Energy conservation culture of microalgae as live feed using an energy-saving illuminator. *Nippon Suisan Gakkaishi* 79:886

Okauchi M (2015) Changes in nutritive value of *Pavlova* sp. collected from different population growth phases in batch style culture assessed from cell ultrastructure. *Algal resources* 8:11–22

Okumura H (2008) Study of the efficient cultivation of marine microalgae on mass algae cultivation system for mariculture breeding. *Sci Rep Hokkaido Fish Exp Stn* 73:9–29

Okuyama H, Orikasa Y, Nishida T (2008) Significance of antioxidative functions of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in marine microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 74:570–574

Park H, Puvanendran V, Kellett A, Parrish C, Brown J (2006) Effect of enriched rotifers on growth, survival, and composition of larval Atlantic cod (*Gadus morhua*). *ICES J Mar Sci* 63:285–295

Parsons TR, Maita Y, Lalli CM (1984) Nutrients. In: Parsons TR, Maita Y, Lalli CM (eds), *A manual*

- of chemical and biological methods for seawater analysis. Pergamon Press, Oxford, pp. 3–36
- Patil V, Källqvist T, Olsen E, Vogt G, Gislerød HR (2007) Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquacult Int* 15:1–9
- Rainuzzo JR, Reitan KI, Olsen Y (1997) The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture* 155:103–118
- Redfield AC (1958) The biological control of chemical factors in the environment. *Am Sci* 46:205–221
- Reichardt TA, Collins AM, Garcia OF, Ruffing AM, Jones HDT, Timlin JA (2012) Spectroradiometric monitoring of *Nannochloropsis salina* growth. *Algal Res* 1:22–31
- Reitan KI, Rainuzzo JR, Olsen Y (1993) Nutritional effects of algal addition in first-feeding of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. *Aquaculture* 118:257–275
- Reitan KI, Rainuzzo JR, Olsen Y (1994) Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. *J Phycol* 30:972–979
- Reitan KI, Rainuzzo JR, Øie G, Olsen Y (1997) A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae. *Aquaculture* 155:207–221
- Renaud SM, Thinh L-V, Parry DL (1999) The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. *Aquaculture* 170:147–159
- Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17:208–212

- Richardson K, Beardall J, Raven JA (1983) Adaptation of unicellular algae to irradiance: an analysis of strategies. *New Phytol* 93:157–191
- Roleda MY, Slocombe SP, Leakey RJG, Day JG, Bell EM, Stanley MS (2013) Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. *Bioresour Technol* 129:439–449
- Roopnarain A, Gray VM, Sym S (2014a) Influence of nitrogen stress on *Isochrysis galbana* strain U4, a candidate for biodiesel production. *Phycol Res* 62:237–249
- Roopnarain A, Gray VM, Sym SD (2014b) Phosphorus limitation and starvation effects on cell growth and lipid accumulation in *Isochrysis galbana* U4 for biodiesel production. *Bioresour Technol* 156:408–411
- Roopnarain A, Sym SD, Gray VM (2015) Time of culture harvest affects lipid productivity of nitrogen-starved *Isochrysis galbana* U4 (Isochrysidales, Haptophyta). *Aquaculture* 438:12–16
- Roscher E, Zetsche K (1986) The effects of light quality and intensity on the synthesis of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and its mRNAs in the green alga *Chlorogonium elongatum*. *Planta* 167:582–586
- Sakshaug E, Andresen K, Myklestad S, Olsen Y (1983) Nutrient status of phytoplankton communities in Norwegian waters (marine, brackish, and fresh) as revealed by their chemical composition. *J Plankton Res* 5: 175–196
- Santos-Ballardo DU, Rossi S, Hernández V, Gómez RV, del Carmen Rendón-Unceta M, Carro-Corrales J, Valdez-Ortiz A (2015) A simple spectrophotometric method for biomass

- measurement of important microalgae species in aquaculture. *Aquaculture* 448:87–92
- Sargent JR, Bell JG, Bell MV, Henderson RJ, Tocher DJ (1993) The metabolism of phospholipids and polyunsaturated fatty acids in fish. In: Lahlou B, Vitiello P (eds), *Aquaculture: Fundamental and applied Research. coastal and estuarine Studies 43*, American Geophysical Union, Washington, DC, pp. 103–124
- Sathyendranath S, Lazzara L, Prieur L (1987) Variations in the spectral values of specific absorption of phytoplankton. *Limnol Oceanogr* 32:403–415
- Sato N, Takeuchi T (2009) Docosahexaenoic acid (DHA) requirement of larval brown sole *Pleuronectes herzensteini*. 75:28–37
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9:671
- Simionato D, Block MA, La Rocca N, Jouhet J, Maréchal E, Finazzi G, Morosinotto T (2013) The response of *Nannochloropsis gaditana* to nitrogen starvation includes de novo biosynthesis of triacylglycerols, a decrease of chloroplast galactolipids, and reorganization of the photosynthetic apparatus. *Eukaryot Cell* 12:665–676
- Siron R, Giusti G, Berland B (1989) Changes in the fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum* and *Dunaliella tertiolecta* during growth and under phosphorus deficiency. *Mar Ecol Prog Ser* 55:95–100
- Snell TW, Childress MJ, Boyer EM, Hoff FH (1987) Assessing the status of rotifer mass cultures. *World Aquacult Soc* 18:270–277

- Solovchenko A, Khozin-Goldberg I, Recht L, Boussiba S (2011) Stress-induced changes in optical properties, pigment and fatty acid content of *Nannochloropsis* sp.: implications for non-destructive assay of total fatty acids. *Mar Biotechnol* 13:527–535
- Sukenik A (1991) Ecophysiological considerations in the optimization of eicosapentaenoic acid production by *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). *Bioresour Technol* 35:263–269
- Sukenik A, Zmora O, Carmeli Y (1993) Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. II. *Nannochloropsis* sp. *Aquaculture* 117:313–326
- Takeuchi T, Feng Z, Yoseda K, Hirokawa J, Watanabe T (1994) Nutritive Value of DHA-Enriched Rotifer for Larval Cod. *Nippon Suisan Gakkaishi* 60:641–652
- Teo CL, Atta M, Bukhari A, Taisir M, Yusuf AM, Idris A (2014a) Enhancing growth and lipid production of marine microalgae for biodiesel production via the use of different LED wavelengths. *Bioresour Technol* 162:38–44
- Teo CL, Idris A, Zain NAM, Taisir M (2014b) Synergistic effect of optimizing light-emitting diode illumination quality and intensity to manipulate composition of fatty acid methyl esters from *Nannochloropsis* sp. *Bioresour Technol* 173:284–290
- Thépot V, Mangott A, Pirozzi I (2016) Rotifers enriched with a mixed algal diet promote survival, growth and development of barramundi larvae, *Lates calcarifer* (Bloch). *Aquac Reports* 3:147–158
- Thomas WH, Seibert DLR, Alden M, Neori A, Eldridge P (1984a) Yields, photosynthetic efficiencies and proximate composition of dense marine microalgal cultures. I. Introduction and

Phaeodactylum tricornutum experiments. Biomass 5:181–209

Thomas WH, Seibert DLR, Alden M, Neori A, Eldridge P (1984b) Yields, photosynthetic efficiencies and proximate composition of dense marine microalgal cultures. II. *Dunaliella primolecta* and *Tetraselmis suecica* experiments. Biomass 5:211–225

Thomas WH, Seibert DLR, Alden M, Neori A, Eldridge P (1984c) Yields, photosynthetic efficiencies and proximate composition of dense marine microalgal cultures. III. *Isochrysis* sp and *Monallantus salina* experiments and comparative conclusions. Biomass 5:299–316

Tomoda T, Koiso M, Kuwada H, Chen J-N, Takeuchi T (2004) Dietary value of marine rotifer *Brachionus plicatilis* in different population growth stages for larval red seabream *Pagrus major*. Nippon Suisan Gakkaishi 70:573–582

Tomoda T, Koiso M, Kuwada H, Chen J-N, Takeuchi T (2005) Dietary value of marine rotifer *Brachionus plicatilis* at different population growth stages for larval Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Nippon Suisan Gakkaishi 71:555–562

Ueno J (2003) Cultivation of microalgae using light-emitting diodes (LED). Aquanet 6:48–52

Vadiveloo A, Moheimani NR, Cosgrove JJ, Bahri PA, Parlevliet D (2015) Effect of different light spectra on the growth and productivity of acclimated *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). Algal Res 8:121–127

Van Deenen LLM (1972) Permeability and topography of membranes. Chem Phys Lipids 8:366–373

Volkman JK, Jeffrey SW, Nichols PD, Rogers GI, Garland CD (1989) Fatty acid and lipid

- composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J Exp Mar Biol Ecol* 128:219–240
- Watanabe T, Kitajima C, Arakawa T, Fukusho K, Fujita S (1978) Nutritional quality of rotifer *Brachionus plicatilis* as a living feed from the viewpoint of essential fatty acids for fish. *Fish Sci* 44:1109–1114
- Watanabe T, Oowa F, Kitajima C, Fujita S, Yone Y (1979) Relationship between the dietary value of rotifers *Brachionus plicatilis* and their content of ω -3 highly unsaturated fatty acids. *Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries* 7:883–889
- Watanabe T, Kitajima C, Fujita S (1983) Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: A review. *Aquaculture* 34:115–143
- Watanabe T (1999) Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish. *World Aquacult Soc* 24:152–161
- Welschmeyer NA (1994) Fluorometric analysis of chlorophyll a in the presence of chlorophyll b and pheopigments. *Limnol Oceanogr* 39:1985–1992
- White S, Anandraj A, Bux F (2011) PAM fluorometry as a tool to assess microalgal nutrient stress and monitor cellular neutral lipids. *Bioresour Technol* 102:1675–1682
- Wold PA, Hoehne-Reitan K, Cahu CL, Infante JZ, Rainuzzo J, Kjorsvik E (2009) Comparison of dietary phospholipids and neutral lipids: effects on gut, liver and pancreas histology in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Aquac Nutr* 15:73–84
- Yeh N, Chung J-P (2009) High-brightness LEDs—Energy efficient lighting sources and their

potential in indoor plant cultivation. *Renew Sustain Energy Rev* 13:2175–2180

吉松 隆夫, 林 雅弘 (1997) 高密度培養ワムシの栄養強化技術 (下) . *養殖*, 34, 119–121

You T, Barnett SM (2004) Effect of light quality on production of extracellular polysaccharides and growth rate of *Porphyridium cruentum*. *Biochem Eng J* 19:251–258

Zhu CJ, Lee YK, Chao TM (1997) Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1. *J Appl Phycol* 9:451–457

Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM, Van't Riet K (1990) Modeling of the bacterial growth curve. *Appl Environ Microbiol* 56:1875–1881

表とグラフ

Table 2. 1 Comparison of linear accumulation rate of total lipids ($\text{pg cell}^{-1} \text{d}^{-1}$) in *Nannochloropsis oculata* cultured under different light regimes

Treatment	Linear regression		TL accumulation rate ($\text{pg cell}^{-1} \text{d}^{-1}$)
	<i>r</i> value	<i>p</i> value	
Control	0.93	0.008	0.15 ^b
Blue	0.95	0.003	0.29 ^a
BR	0.98	0.023	0.21 ^{ab}
Red	0.74	0.057	0.03 ^c

Letters indicate statistically significant differences (two-way ANOVA; $p < 0.05$, $a > b$)

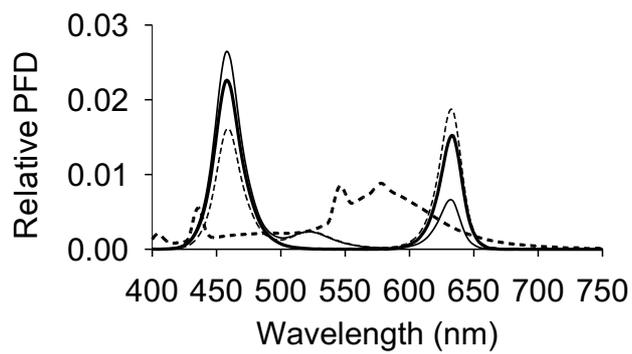


Fig. 2. 1 Distributions of spectral photon flux density (PFD) of each experimental treatment using different combination of 3 kinds of colored LEDs and white fluorescent light. Solid-thin, solid-thick, dashed-thin and dashed-thick lines indicate treatment B, treatment BR, treatment R and white fluorescent light, respectively. Relative PFDs in each wavelength are expressed as the ratio to whole PFDs over 400 nm to 750 nm

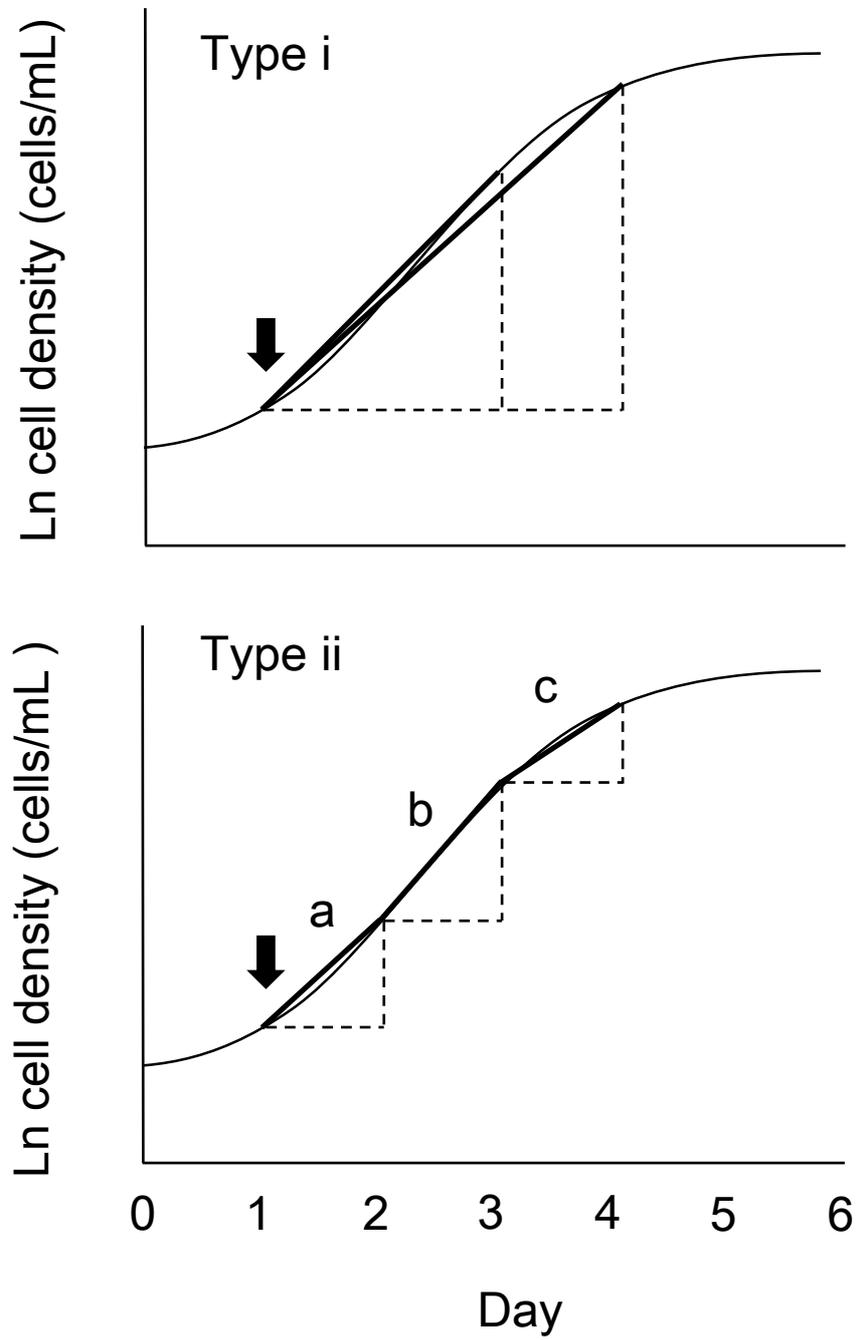


Fig. 2. 2 Diagram of two types of the slope comparison to determine the growth phase when no significant difference was found. Arrow shows the expected beginning point of the growth phase

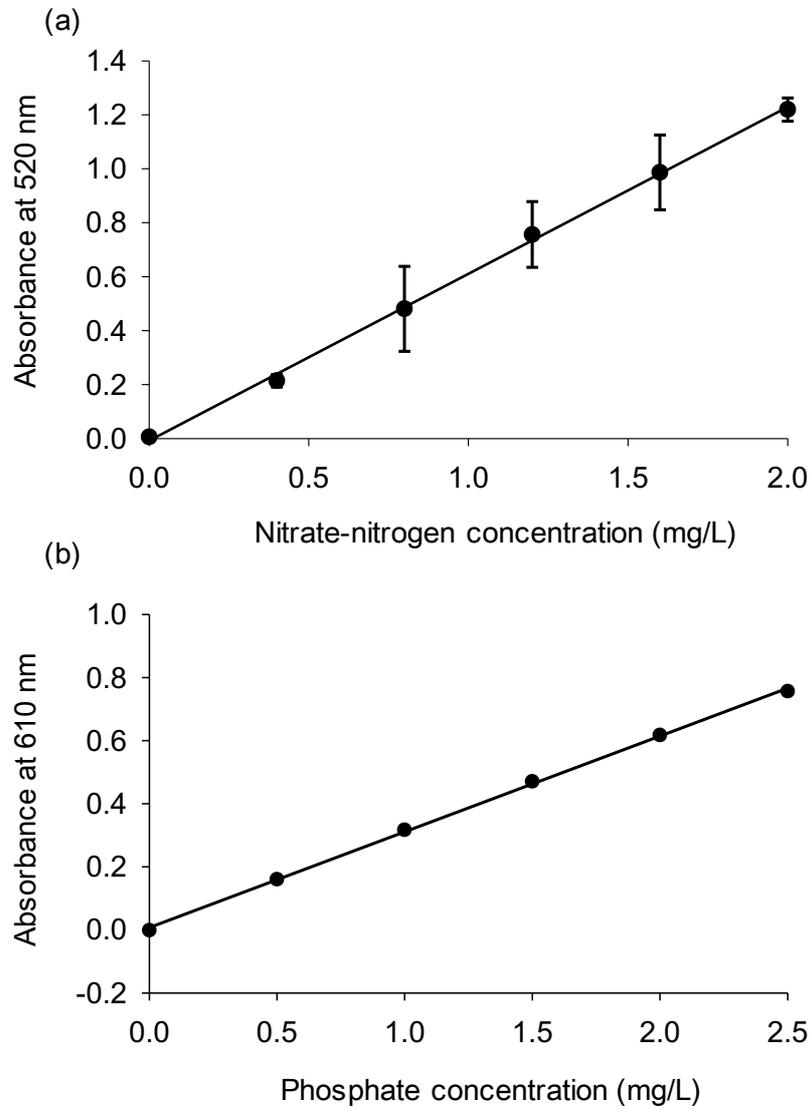


Fig. 2.3 Standard curves for determining concentrations of (a) nitrate-nitrogen and (b) phosphate in growth culture medium from absorption measurement by Hach DR900. Error bar shows the standard deviation ($n = 3$). Absorption values and nutrient concentration showed significant correlation ($n = 6, r = 0.99, p < 0.01$); nitrate-nitrogen $y = 0.62x - 0.01$, phosphate $y = 0.304x - 0.07$

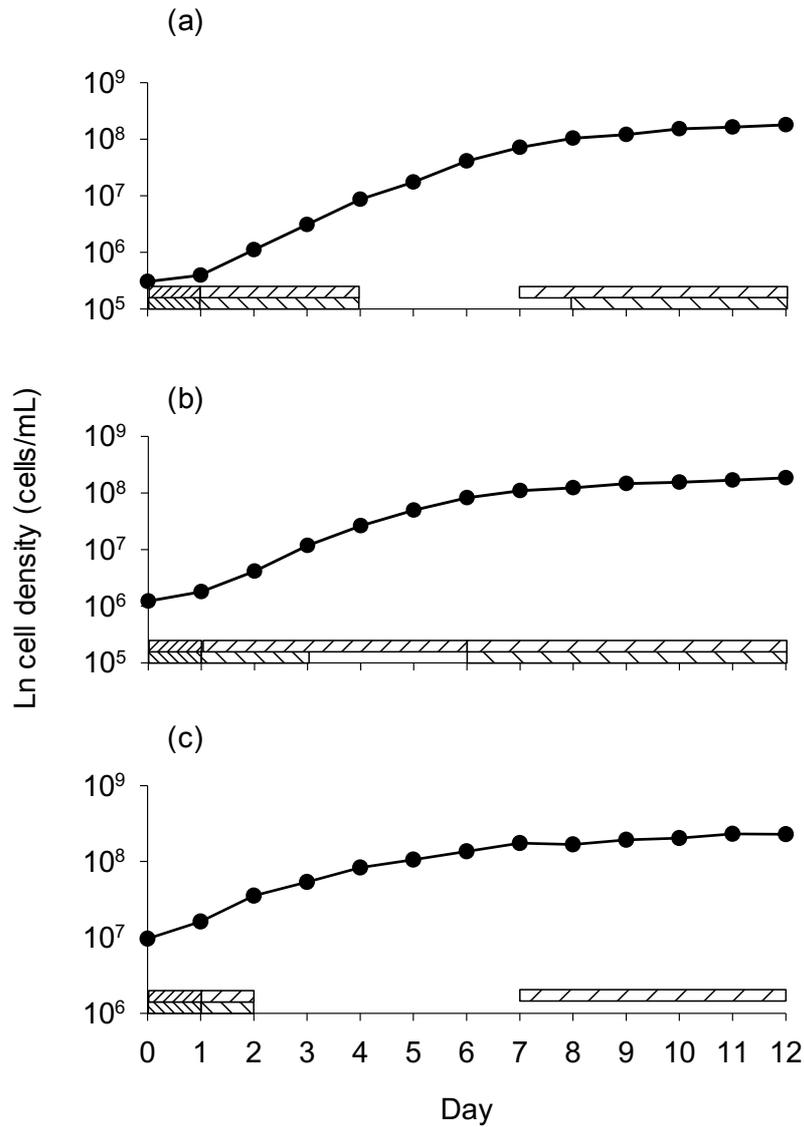


Fig. 2. 4 Growth curves for *Nannochloropsis oculata* incubated in the (a) dilute culture, (b) middle-density culture, and (c) dense culture. Lag, log and stationary phases are presented by finely-, moderately- and coarsely-lined bars, respectively. These bars lined in different direction shows the growth phases determined by growth rate comparison between two periods (diagonally to right) and between neighboring periods (diagonally to left). The stationary phase in the dense culture (c) could not be determined by the growth rate comparison between neighboring periods

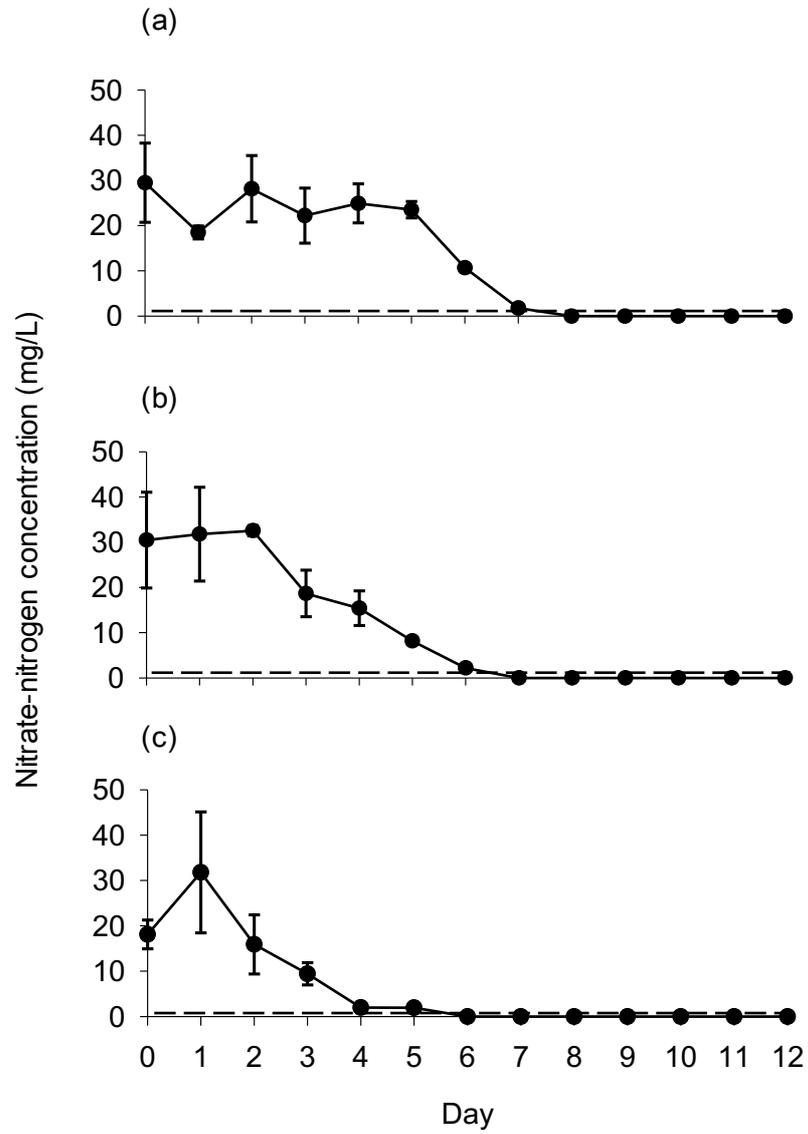


Fig. 2. 5 Nitrate-nitrogen concentrations (mg/L) in growth media from the (a) dilute culture, (b) middle-density culture, and (c) dense culture. Nitrate-nitrogen starvation starts after the concentration drops below dash line

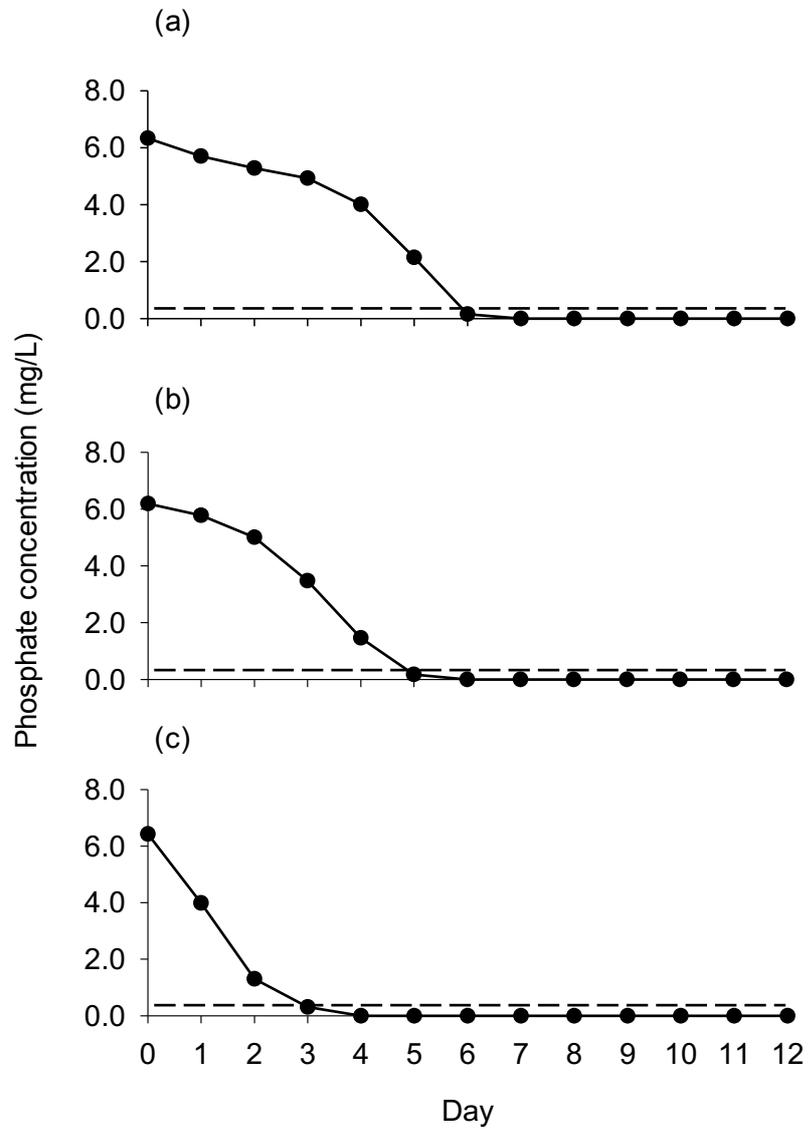


Fig. 2. 6 Phosphate concentrations (mg/L) in growth media from the **(a)** dilute culture, **(b)** middle-density culture, and **(c)** dense culture. Nitrate-nitrogen starvation starts after the concentration drops below dash line

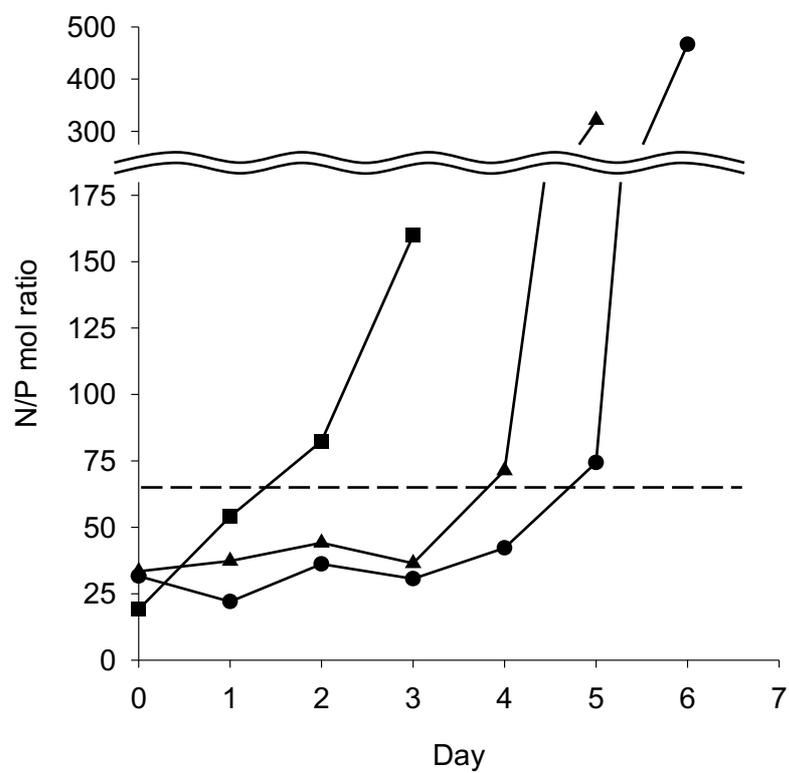


Fig. 2. 7 N/P mol ratio in growth mediums of dilute culture (●), middle-density culture (▲) and dense culture (■). The phosphate limitation starts after the N/P mol ratio exceed over dash line

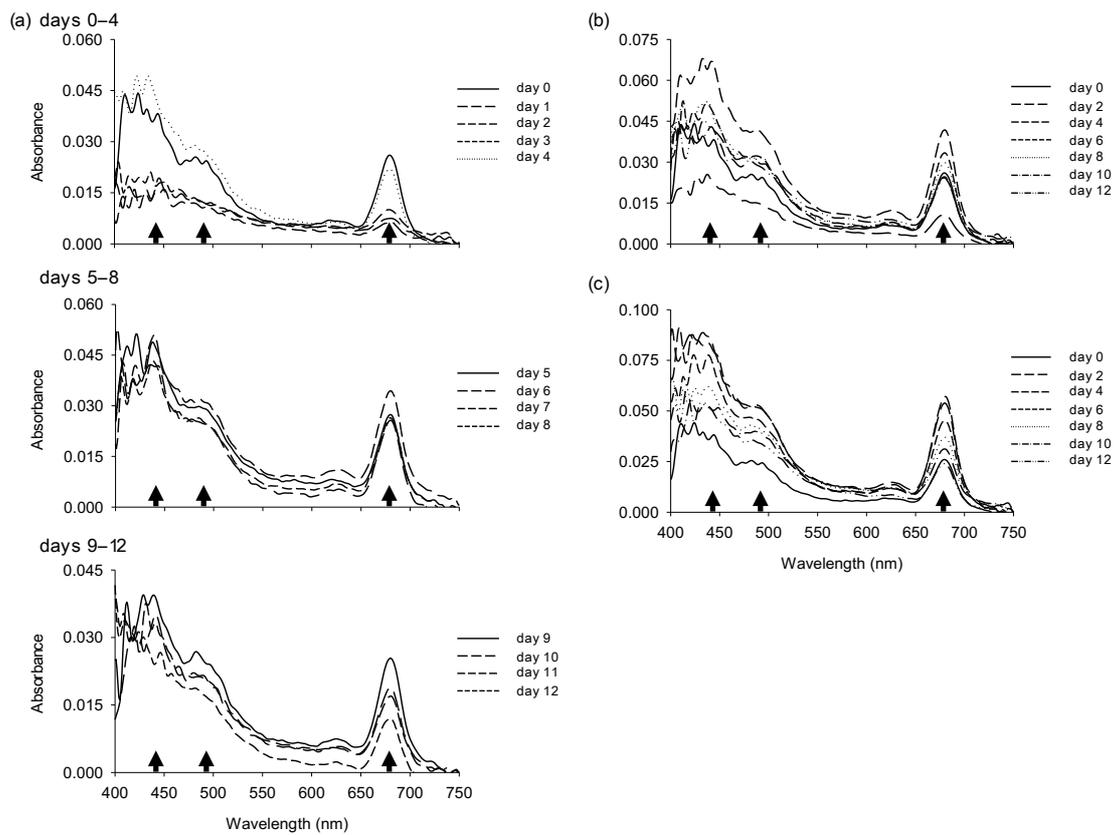


Fig. 2. 8 Absorption spectra in cell suspensions from the (a) dilute culture, (b) middle-density culture, and (c) dense culture. Arrows shows remarkable absorption peaks

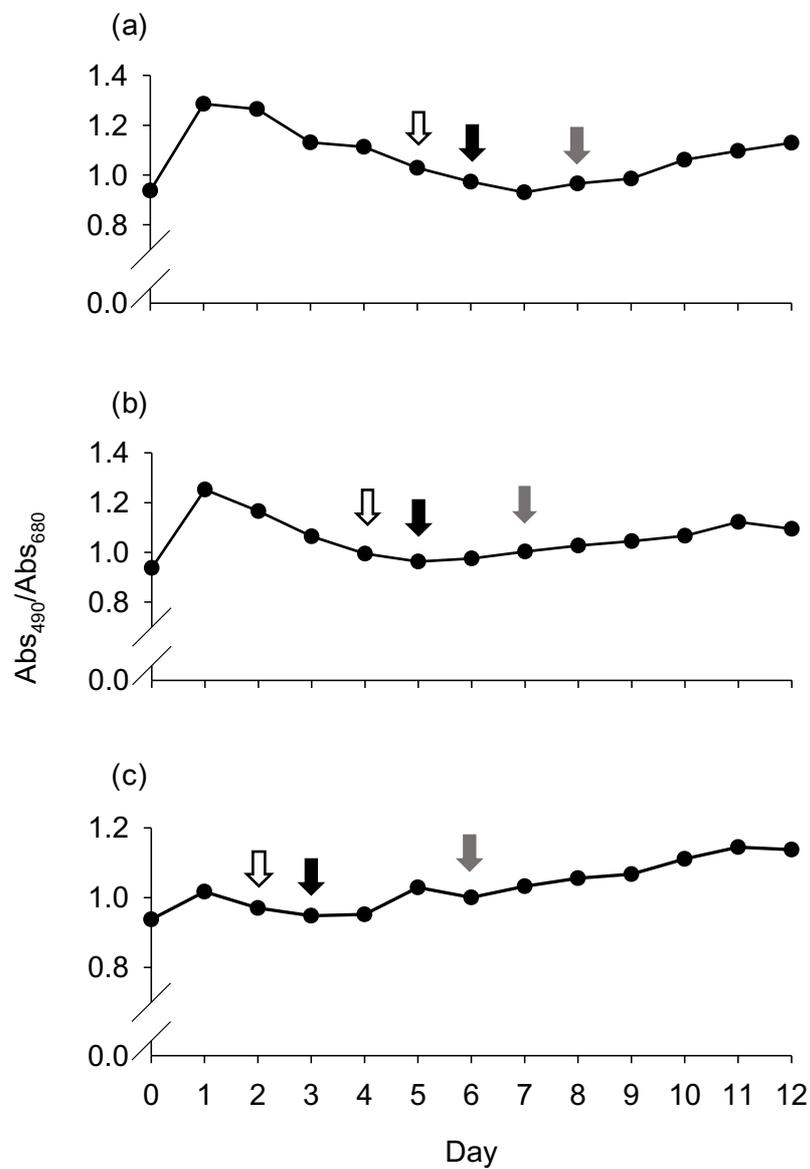


Fig. 2.9 Absorption spectra in cell suspensions from the (a) dilute culture, (b) middle-density culture, and (c) dense culture. Arrows shows relatively larger absorption peaks

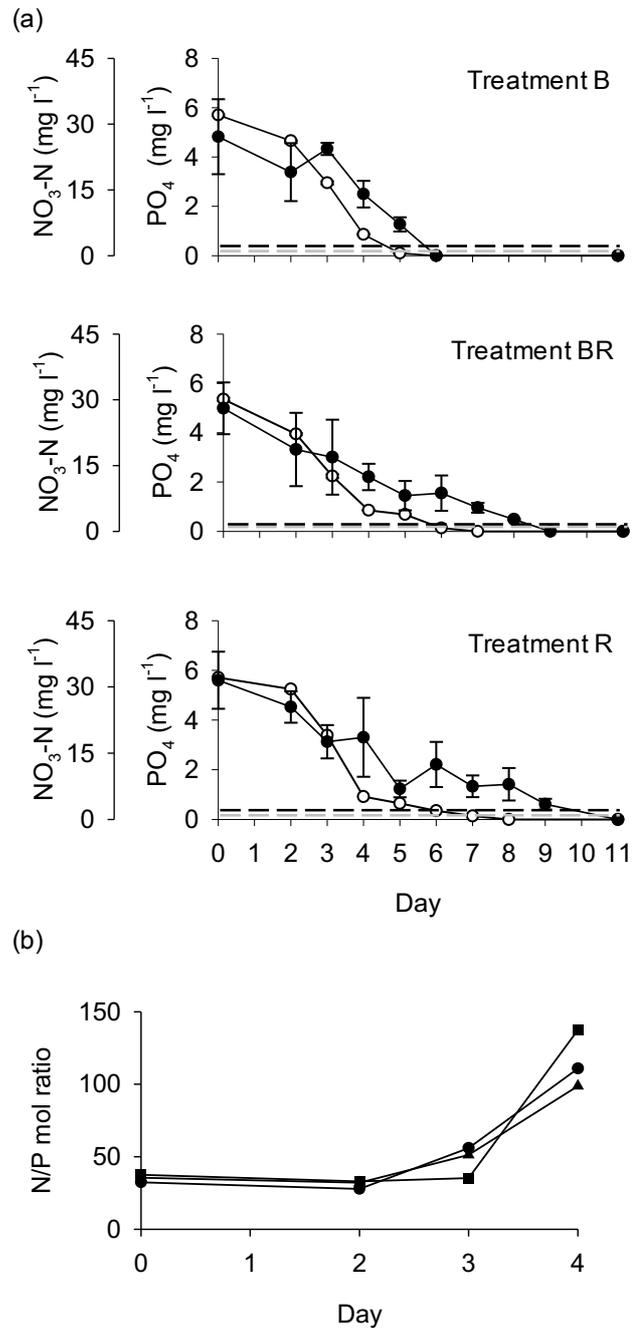


Fig. 2. 10 Time course change of (a) concentrations (mg L⁻¹) of nitrate-nitrogen (closed) and phosphate) and (b) N/P mol ratio under treatment B (circle), BR (triangle) and R (square). Black and grey dashed lines show borderlines to occur nitrate-nitrogen starvation and phosphate starvation, respectively

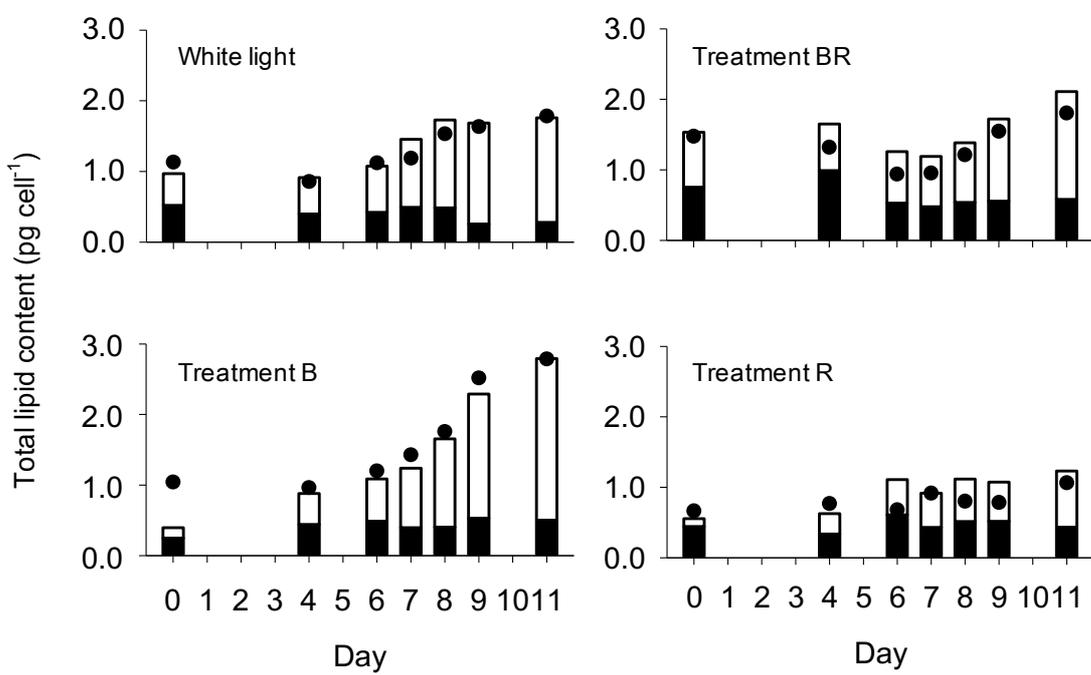


Fig. 2. 11 Change in total lipid (plot), non-polar lipid (white bar), and polar lipid contents (black bar) over time in *Nannochloropsis oculata* cells (pg cell⁻¹) under four light regimes [white light condition, and LED light conditions (B, BR, and R)]

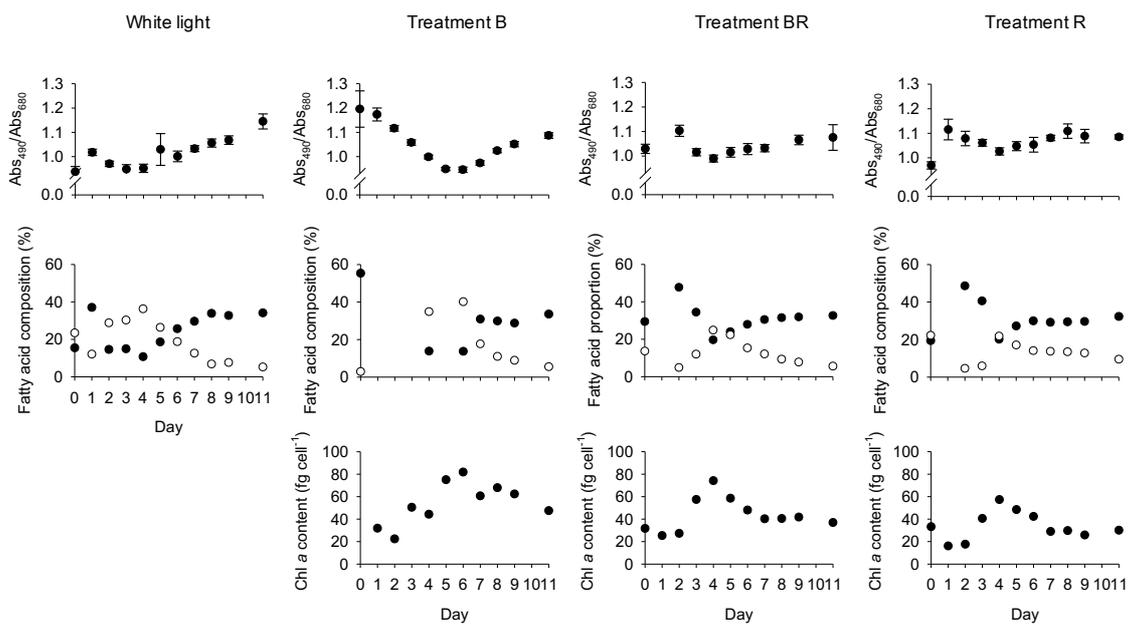


Fig. 2.12 Change in Abs₄₉₀/Abs₆₈₀ ratio, fatty acid composition (%) (closed circle = C16:0; opened circle = C20:5ω3), and chlorophyll *a* content (fg cell⁻¹) over time in *Nannochloropsis oculata* cells under four light regimes [white light condition, and LED light conditions (B, BR, and R)]. White light condition does not include the data about chlorophyll *a*

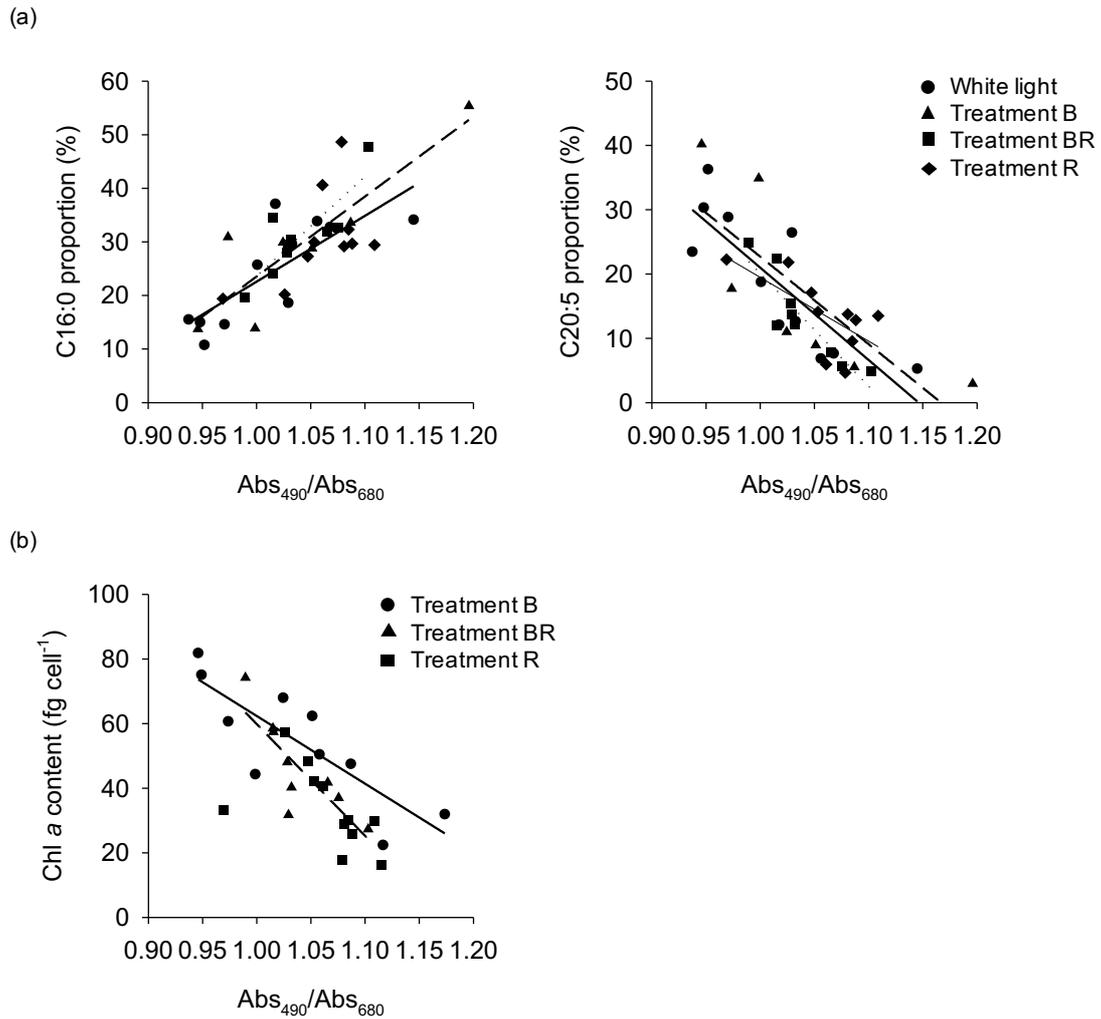


Fig. 2. 13 Correlation between Abs_{490}/Abs_{680} ratio, fatty acid proportion (%) and chlorophyll *a* content ($fg\ cells^{-1}$). A statistically significant correlation was found between Abs_{490}/Abs_{680} ratio and (a) C16:0 proportion (solid line indicates the white light condition; dashed line indicates treatment B; and dotted line indicates treatment BR), (b) C20:5 ω 3 proportion (thick solid line indicates the white light condition; dashed line indicates treatment B; dotted line indicates treatment BR; and fine solid line indicates treatment R), and (c) chlorophyll *a* content (solid line indicates treatment B and dashed line indicates treatment BR)

Table 3. 1 Growth rate and biochemical contents (mg g dry weight⁻¹) of *Nannochloropsis oculata*.

D-phase and I-phase are absorption ratio-decreasing phase (Day 3) and -increasing phase (Day 7), respectively. Values show mean \pm standard deviation ($n = 3$). Different superscripts within the same row indicate significant differences among the algal phases ($p < 0.05$, $a > b$)

	Microalgae	
	D-phase	I-phase
Growth rate (day ⁻¹)	0.849 \pm 0.035 ^a	0.381 \pm 0.089 ^b
Contents (g g dry weight ⁻¹)		
Protein	0.425 \pm 0.026 ^a	0.272 \pm 0.024 ^b
Total lipids	0.200 \pm 0.007 ^b	0.279 \pm 0.010 ^a
NL	0.118 \pm 0.012 ^b	0.207 \pm 0.008 ^a
Glycolipids	0.031 \pm 0.014	0.024 \pm 0.002
Phospholipids	0.082 \pm 0.011	0.063 \pm 0.010

Table 3. 2 Fatty acid profile of total lipids of *Nannochloropsis oculata*. D-phase and I-phase are absorption ratio-decreasing phase (Day 3) and -increasing phase (Day 7), respectively. Values show mean \pm standard deviation ($n = 3$). Different superscripts within the same row indicate significant differences among the algal phases ($p < 0.05$, $a > b$). Hyphen means “not detected”

Fatty acid	Total lipids	
	D-phase	I-phase
Proportion (%)		
C14:0	6.25 \pm 0.23	6.22 \pm 0.46
C16:0	24.34 \pm 1.61 ^b	30.09 \pm 1.36 ^a
C16:1 n -7	29.25 \pm 0.66	28.70 \pm 1.43
C18:0	0.25 \pm 0.05 ^a	0.11 \pm 0.01 ^b
C18:1 n -9+ n -7	3.60 \pm 0.51 ^b	11.82 \pm 1.43 ^a
C18:2 n -6	2.05 \pm 0.16	2.15 \pm 0.12
C18:3 n -3	-	-
C18:4 n -3	-	-
C20:4 n -6	3.25 \pm 0.31 ^a	2.35 \pm 0.18 ^b
C20:4 n -3	-	-
C20:5 n -3	22.89 \pm 2.11 ^a	14.76 \pm 1.78 ^b
C22:0	-	-
C22:5 n -6	-	-
C22:6 n -3	-	-
Content (mg g dry weight ⁻¹)		
C20:4 n -6	4.47 \pm 0.46	5.07 \pm 0.18
C20:5 n -3	31.52 \pm 2.65	31.85 \pm 2.28

Table 3. 3 Molecular distribution of fatty acids in each lipid of *Nannochloropsis oculata*. NL represents non-polar lipids. D-phase and I-phase are absorption ratio-decreasing phase (Day 3) and -increasing phase (Day 7), respectively. Values show mean \pm standard deviation ($n = 3$). Different superscripts within the same row indicate significant differences in each lipid between the algal phases ($p < 0.05$, $a > b$). Hyphen means “not detected”

Fatty acid	NL		Glycolipids		Phospholipids	
	D-phase	I-phase	D-phase	I-phase	D-phase	I-phase
mol (%)						
C14:0	8.23 \pm 0.37 ^a	5.67 \pm 0.11 ^b	11.84 \pm 1.33	9.33 \pm 2.29	5.89 \pm 0.71	5.53 \pm 0.13
C16:0	31.32 \pm 0.71 ^b	36.86 \pm 0.55 ^a	31.72 \pm 6.54	30.40 \pm 6.39	33.40 \pm 4.16 ^a	27.20 \pm 0.97 ^b
C16:1 <i>n</i> -7	37.45 \pm 0.19	36.48 \pm 1.56	28.19 \pm 3.20	30.31 \pm 4.99	30.76 \pm 0.78 ^a	23.87 \pm 0.47 ^b
C18:0	0.56 \pm 0.02 ^a	0.40 \pm 0.03 ^b	-	0.09 \pm 0.16	0.13 \pm 0.11	0.12 \pm 0.06
C18:1 <i>n</i> -9+ <i>n</i> -7	4.30 \pm 0.09 ^b	14.19 \pm 0.76 ^a	2.01 \pm 0.27	2.13 \pm 0.33	6.08 \pm 0.55 ^a	4.30 \pm 0.19 ^b
C18:2 <i>n</i> -6	0.96 \pm 0.06 ^b	1.46 \pm 0.05 ^a	0.34 \pm 0.05 ^b	1.09 \pm 0.26 ^a	4.34 \pm 0.63 ^a	2.91 \pm 0.10 ^b
C18:3 <i>n</i> -3	0.13 \pm 0.00 ^a	0.02 \pm 0.03 ^b	-	-	-	-
C18:4 <i>n</i> -3	-	-	-	-	-	-
C20:4 <i>n</i> -6	1.72 \pm 0.04 ^a	0.77 \pm 0.08 ^b	0.30 \pm 0.28	0.67 \pm 0.24	4.14 \pm 0.73 ^b	7.87 \pm 0.34 ^a
C20:4 <i>n</i> -3	0.10 \pm 0.01	-	-	-	-	-
C20:5 <i>n</i> -3	15.47 \pm 0.45 ^a	6.11 \pm 0.43 ^b	25.59 \pm 8.84	25.97 \pm 8.45	15.26 \pm 3.88 ^b	28.21 \pm 0.85 ^a
C22:0	-	-	-	-	-	-
C22:5 <i>n</i> -6	-	-	-	-	-	-
C22:6 <i>n</i> -3	-	-	-	-	-	-
Σ SFA	34.88 \pm 0.66 ^b	39.16 \pm 0.70 ^a	39.38 \pm 4.43	36.47 \pm 4.71	33.84 \pm 4.08	29.06 \pm 0.94
Σ MUFA	37.20 \pm 0.47 ^b	47.90 \pm 0.64 ^a	27.86 \pm 3.04	30.48 \pm 4.71	32.48 \pm 0.19 ^a	25.60 \pm 0.41 ^b
Σ <i>n</i> -6	2.74 \pm 0.01 ^a	2.32 \pm 0.08 ^b	0.69 \pm 0.32 ^b	1.87 \pm 0.52 ^a	8.43 \pm 1.28 ^b	11.28 \pm 0.35 ^a
Σ <i>n</i> -3	16.43 \pm 0.31 ^a	6.67 \pm 0.30 ^b	27.88 \pm 9.70	28.68 \pm 9.08	15.71 \pm 4.04 ^b	29.97 \pm 0.76 ^a
Σ PUFA	19.17 \pm 0.32 ^a	9.00 \pm 0.27 ^b	28.56 \pm 9.59	30.54 \pm 9.59	24.14 \pm 5.30 ^b	41.25 \pm 1.25 ^a
PUFA/(SFA+MUFA)	0.27 \pm 0.01 ^a	0.10 \pm 0.00 ^b	0.43 \pm 0.17	0.47 \pm 0.19	0.37 \pm 0.10 ^b	0.76 \pm 0.04 ^a

Table 3. 4 Growth characteristics of *Brachionus plicatilis* after feeding dietary microalgae. D-phase and I-phase of *Nannochloropsis oculata* represent for the absorption ratio-decreasing phase and -increasing phase, respectively. Values show mean \pm standard deviation ($n = 3$). Population density, population increment, and egg ratio of rotifer among the dietary microalgae were not different ($p > 0.05$)

	Diet		
	<i>Chlorella</i>	<i>Nannochloropsis</i>	
		D-phase	I-phase
Population density (inds ml ⁻¹)			
Initial	847 \pm 64	847 \pm 64	847 \pm 64
End	993 \pm 29	950 \pm 137	853 \pm 68
Population increment (%)	1.2 \pm 0.1	1.1 \pm 0.2	1.0 \pm 0.1
Egg ratio (eggs ind ⁻¹)	0.27 \pm 0.08	0.27 \pm 0.05	0.24 \pm 0.05

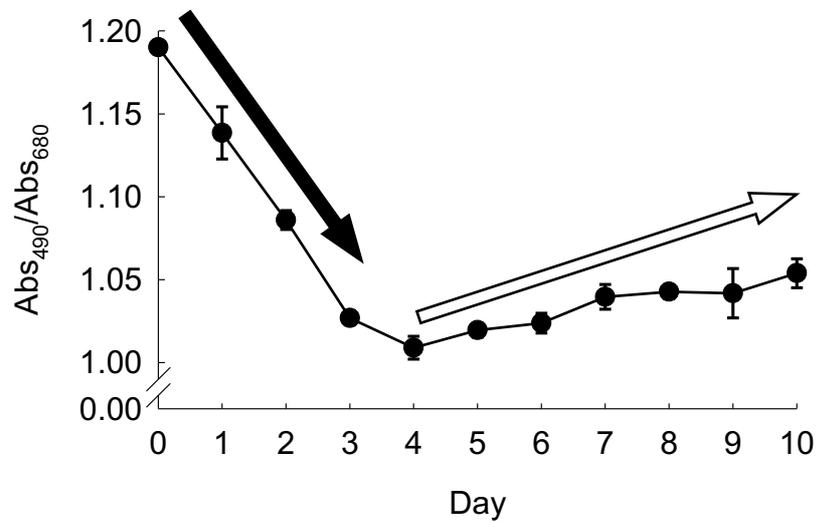


Fig. 3. 1 Time course change in Abs_{490}/Abs_{680} of *Nannochloropsis oculata*. Error bar shows the standard deviation ($n = 3$). Black arrow shows the absorption ratio-decreasing phase (D-phase, Day 0–3) and white arrow shows the absorption ratio-increasing phase (I-phase, Day 4–10). Each period length was determined by extension the period when slope of the absorption ratio did not change ($p > 0.05$). I-phase started from Day 4 due to the minimum value

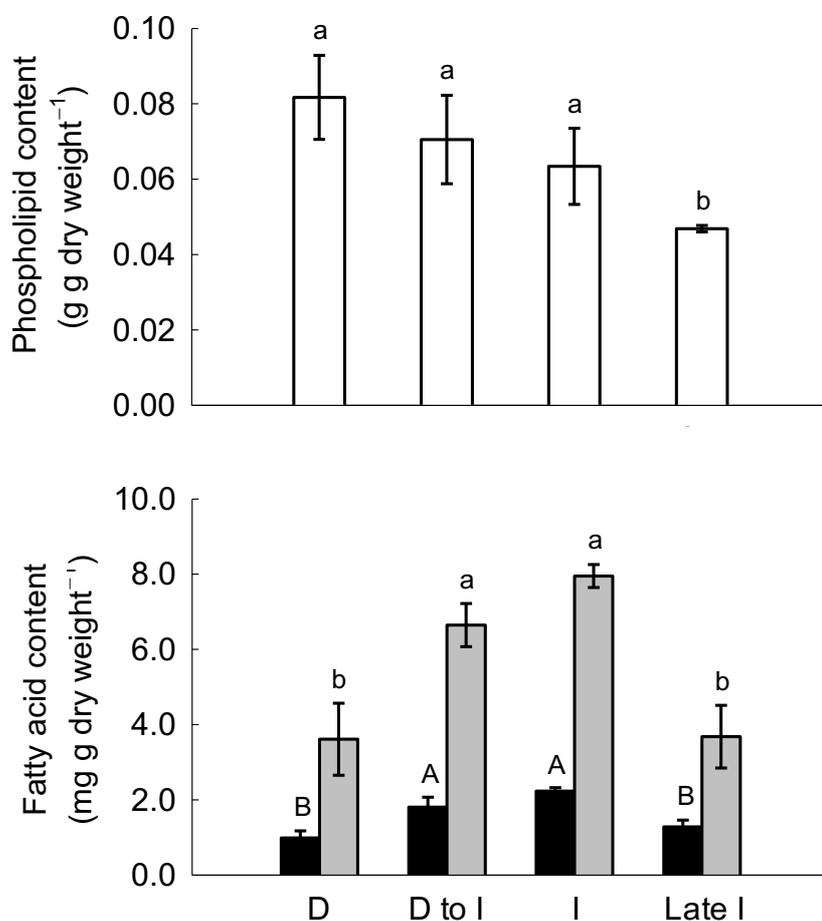


Fig. 3.2 Comparison of the phospholipid content (g g dry weight⁻¹) and the contents of arachidonic acid (black bar) and eicosapentaenoic acid (gray bar) of phospholipids (mg g dry weight⁻¹) of *Nannochloropsis oculata* among the harvest timings. D and I represents absorption ratio-decreasing phase (Day 3) and -increasing phase (Day 7), respectively. “D to I” is turning point from D-phase to I-phase (Day 4), and “Late I” is day 10. Error bar shows the standard deviation ($n = 3$). Alphabet indicates significant different levels of lipids and each fatty acid among the algal phases ($p < 0.05$, A > B, a > b)

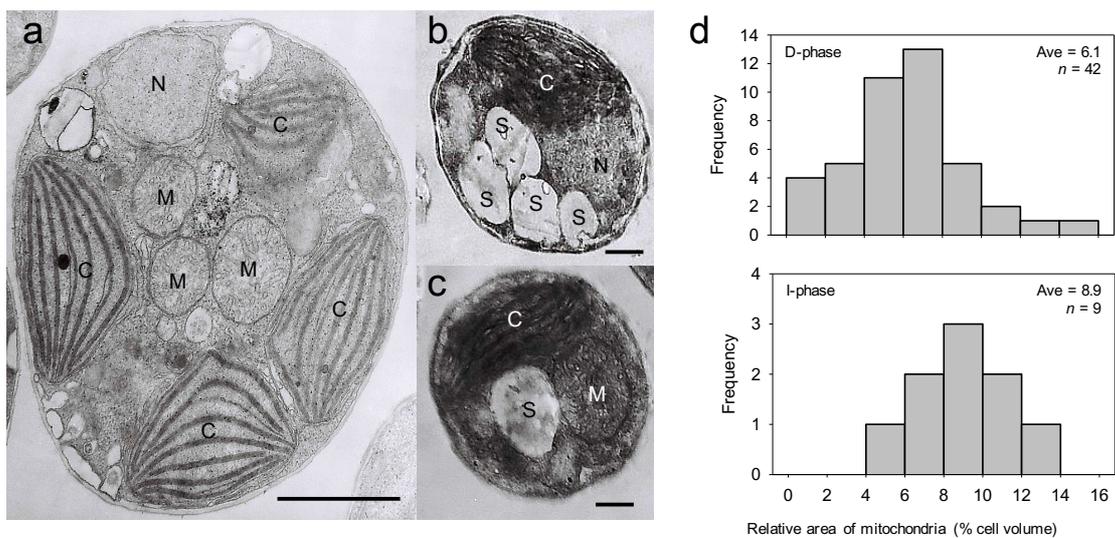
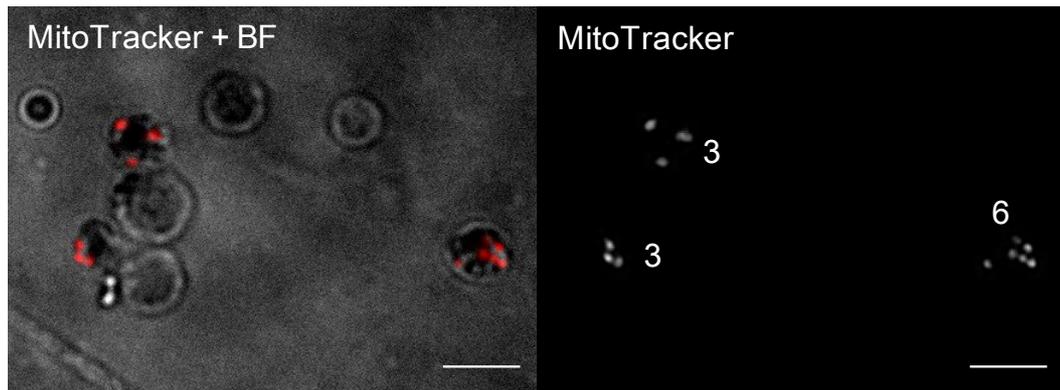


Fig. 3.3 Analysis of intracellular structure of *Nannochloropsis oculata*. **a–c**, Electron micrographs of the cells. **a, b** Representative cell of harvested at absorption ratio-decreasing phase and -increasing phase, respectively. **c** Absorption ratio-increasing phased cell containing visible mitochondria. Each abbreviation represents; M, mitochondria; Chl, chloroplast; N, nucleus; and S, storage globuli. Scale bar = 1 μm (**a**) and 0.5 μm (**b, c**). **d** Histograms of relative area of visible mitochondria to cell volume

a



b

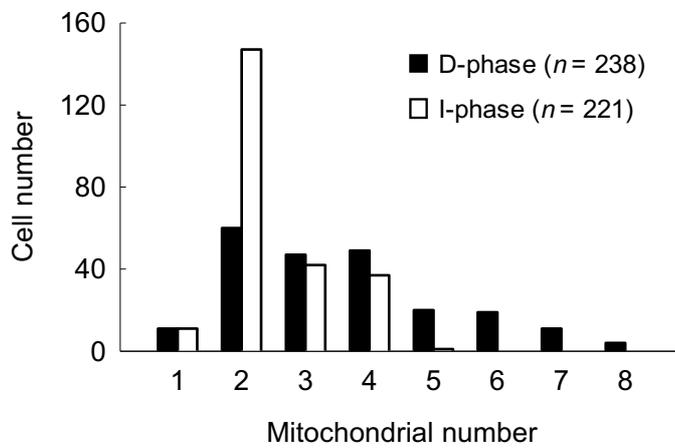


Fig. 3. 4 Mitochondrial number in the cells. **a** Red fluorescence of MitoTracker. BF is bright field.

Scale bar = 5 μ m. **b** Distribution of cells with each number of mitochondria

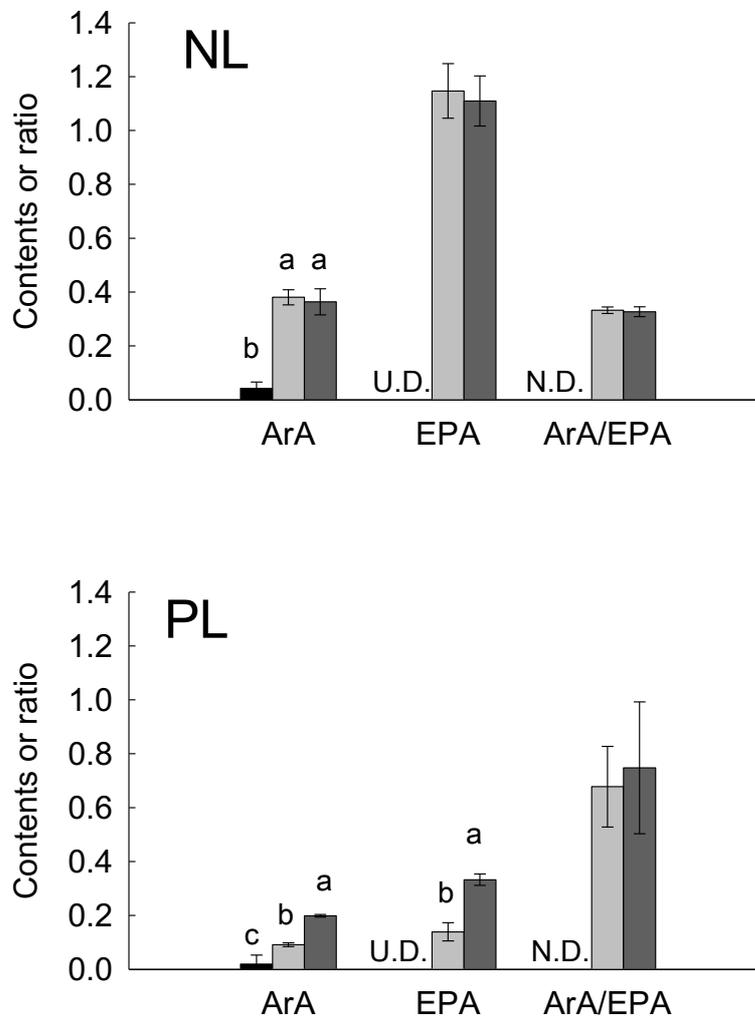


Fig. 3. 5 Comparison of contents of arachidonic acid and eicosapentaenoic acid in non-polar lipids (NL) and polar lipids (PL) of rotifers after feeding microalgae. Different superscripts on top of bars indicate significant differences in each fatty acid content and ArA/EPA value between the feeding treatments ($p < 0.05$, $a > b > c$). U.D. shows “undetected” and N.D. shows “no data” due to lack of EPA data

Table 4. 1 Superiority of Prymnesiophytes on DHA level to the other algal groups. C.CAL., *Chaetoceros calcitrans*; C.GRA, *Chaetoceros gracilis*; SKEL, *Skeletonema costatum*; THAL, *Thalassiosira pseudonana*; T.ISO, *Isochrysis* sp. Tahiti strain; PAV, *Pavlova lutheri*; DUN, *Dunaliella tertiolecta*; NAN, *Nannochloropsis atomus*; TET, *Tetraselmis suecica*; CHRO, *Chroomonas salina*. Superscript indicates the sample number. Cited to Table IV in Volkman et al.

(1989)

	Diatoms					Green algae				Cryptomonad		Prymnesiophytes	
	C.CAL	C.GRA ¹	C.GRA ²	SKEL	THAL	DUN	NAN	TET ¹	TET ²	CHRO ¹	CHRO ²	T.ISO	PAV
<i>Saturates</i>													
C12:0	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.7	0.1	-	-	0.3
C14:0	17.5	8.8	11.6	20.1	14.3	0.2	0.6	0.6	0.9	8.6	8.2	16	11.5
C15:0	0.8	1	1.2	1.2	0.8	-	0.1	0.3	0.3	0.3	0.2	0.5	0.5
C16:0	10.7	23.3	17.8	16.5	11.2	14.7	20.1	20.3	24	15.1	12.9	14.5	21.3
C17:0	0.3	0.3	0.2	0.6	0.1	0.1	-	-	0.3	0.4	0.2	-	0.2
C18:0	0.8	4.1	3.1	0.8	0.7	0.4	1.1	0.9	0.6	0.9	0.7	0.2	1.3
C20:0	-	0.3	0.2	-	0.1	-	0.1	-	-	-	-	0.3	0.3
C22:0	-	0.6	0.6	-	-	-	-	0.2	-	0.1	-	0.6	0.3
C24:0	0.1	0.3	0.8	-	-	-	0.1	-	-	-	-	-	0.2
Sum%	30.2	38.7	35.5	39.2	27.2	15.4	22.1	22.3	26.8	25.5	22.2	32.2	35.9
<i>Monounsaturates</i>													
C16:1n-10	-	-	-	-	-	-	0.5	-	-	0.2	-	-	-
C16:1n-9	-	-	-	-	-	0.1	1.3	0.9	1.2	0.1	0.2	0.3	-
C16:1n-7	30	33.4	26.8	28.6	18	0.1	0.6	0.3	0.3	0.5	0.6	4.2	16.8
C16:1n-5	0.1	0.1	0.2	0.6	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-
C16:1n-13	0.7	1.2	1.6	1.3	0.4	2.7	8.9	1.5	0.8	1.3	1.2	-	-
C18:1n-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.4	-	0.3
C18:1n-9	2.8	3.6	6	1.4	0.5	2	4.9	12	14.5	2.9	2.3	20.1	1.7
C18:1n-7	0.2	1.7	3.9	0.1	0.1	0.3	0.4	0.4	1.1	3.5	3.2	1.3	1.4
C20:1n-9	-	-	-	-	0.2	-	-	1.6	2.6	-	-	0.2	0.2
Sum%	33.8	40	38.5	32	19.5	5.2	16.6	16.7	20.5	8.6	7.9	26.1	20.4
<i>Polyunsaturates</i>													
C16:2n-7	3.5	2.9	2.4	3.3	2.7	-	-	-	-	-	-	0.5	0.2
C16:2n-6	-	-	-	-	-	0.7	4.2	1.1	1.8	-	-	-	-
C16:2n-4	1.6	1.7	0.7	3.5	4.5	-	-	-	-	-	-	0.7	0.2
C16:3n-6	-	-	-	-	-	-	0.9	4.6	6	-	-	-	-
C16:3n-4	8	2.3	2.2	3.7	12.7	-	-	-	-	-	-	1.4	0.4
C16:3n-3	-	-	-	-	-	4.2	14.4	-	0.5	-	-	-	-
C16:4n-3	-	-	-	-	-	21	-	13.7	7.9	-	-	-	-
C16:4n-1	0.3	-	-	2.6	2.3	-	-	-	-	-	-	-	-
C18:2n-9	0.8	2	4.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.4
C18:2n-6	0.8	0.5	0.7	2.2	0.4	4.8	10.3	13.8	13.9	11.6	10.5	2.5	1.5
C18:3n-6	0.4	0.8	1.1	0.3	0.2	2.7	-	0.7	2.7	3	2.6	2.4	0.4
C18:3n-3	-	-	-	0.3	0.1	43.5	21.7	11.1	4.6	11.9	14.2	3.6	1.8
C18:4n-3	0.5	0.2	1.2	2.2	5.3	1	2.7	8.4	4.8	19.8	21.3	17.4	6
C18:5n-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.5	-
C20:4n-6	5.7	0.5	6.2	-	0.3	-	0.5	1.5	2.1	1	0.9	-	-
C20:4n-3	0.2	-	-	-	0.3	-	1.1	0.3	0.1	0.9	1	-	-
C20:5n-3	11.1	4.6	5.7	6	19.3	-	3.2	4.3	5.3	10.9	11.9	0.2	19.7
C20:5n-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.3	1.8	2
C22:6n-3	0.8	0.3	0.4	2	3.9	-	-	-	-	5.7	5.2	8.3	9.4
Sum%	33.7	19.8	24.8	26.1	52.6	77.9	59	59.5	49.7	64.8	67.9	41.3	42
Others	2.3	1.5	1.2	2.7	1.3	1.5	2.3	1.5	3	1.1	2	0.5	1.8
Total	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

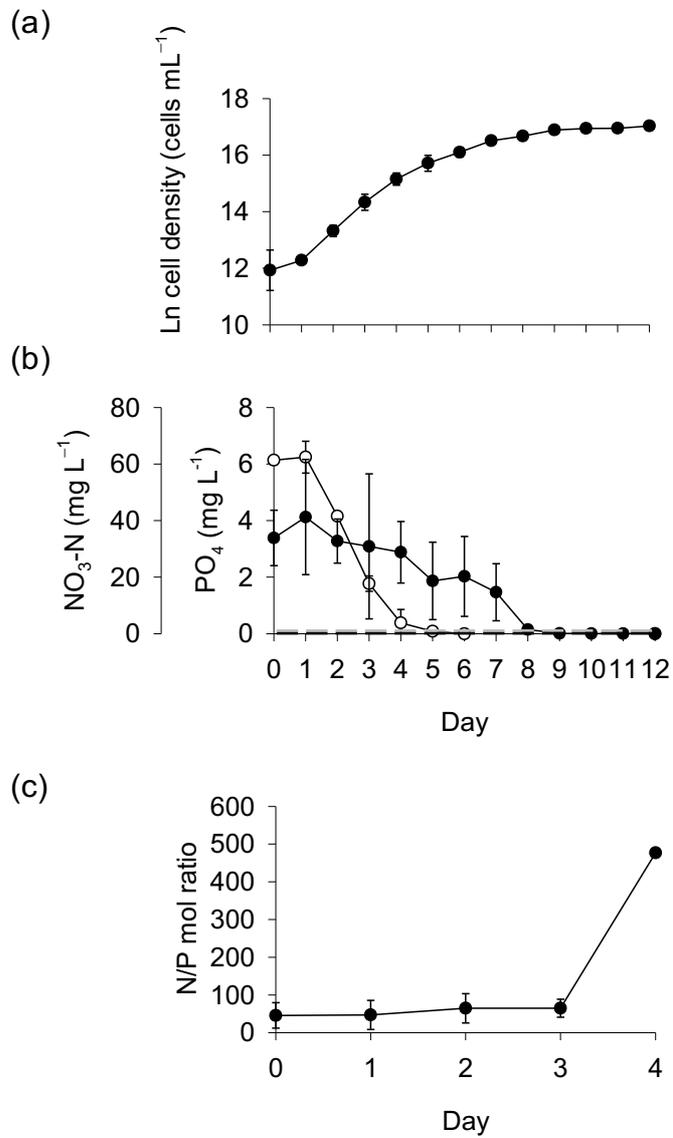


Fig. 4. 1 Growth and nutrient consumption of *Isochrysis* sp. Tahiti strain. **a** Growth curve. **b** Change in concentrations (mg L⁻¹) of nitrate-nitrogen (closed circle) and phosphate (opened circle). Black and gray dashed lines indicate borderlines when nitrate-nitrogen starvation and phosphate starvation occurred, respectively. **c** Change in N/P molar ratio over time. Values show mean ± standard deviation ($n = 3$)

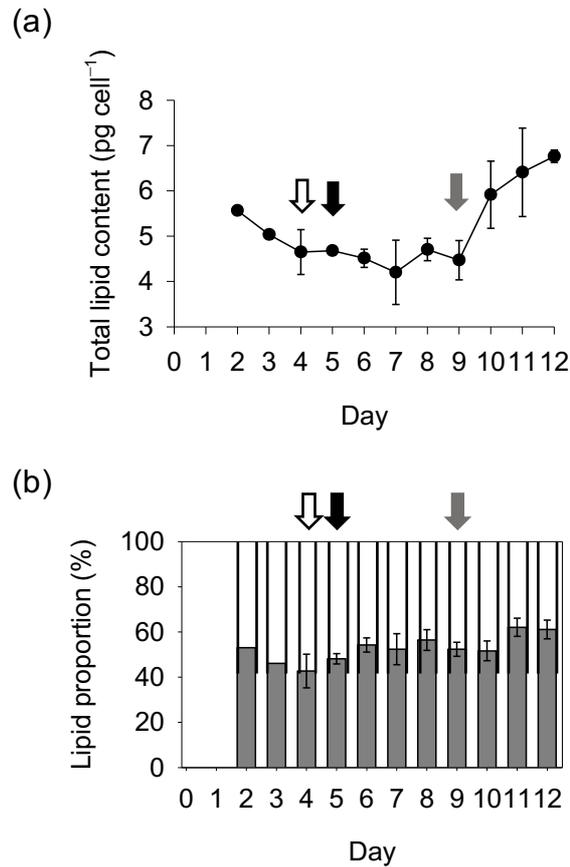


Fig. 4. 2 Time course change in (a) total lipid content (pg cell⁻¹) and (b) non-polar lipids (NL; gray bar) and polar lipids (PL; white bar) proportions (%) of *Isochrysis* sp. Tahiti strain. Values show mean \pm standard deviation ($n = 3$) except for Day 2 and 3 ($n = 1$). Each arrow with white, black and grey colors shows the beginnings of phosphate limitation, phosphate starvation, and nitrate-nitrogen starvation, respectively

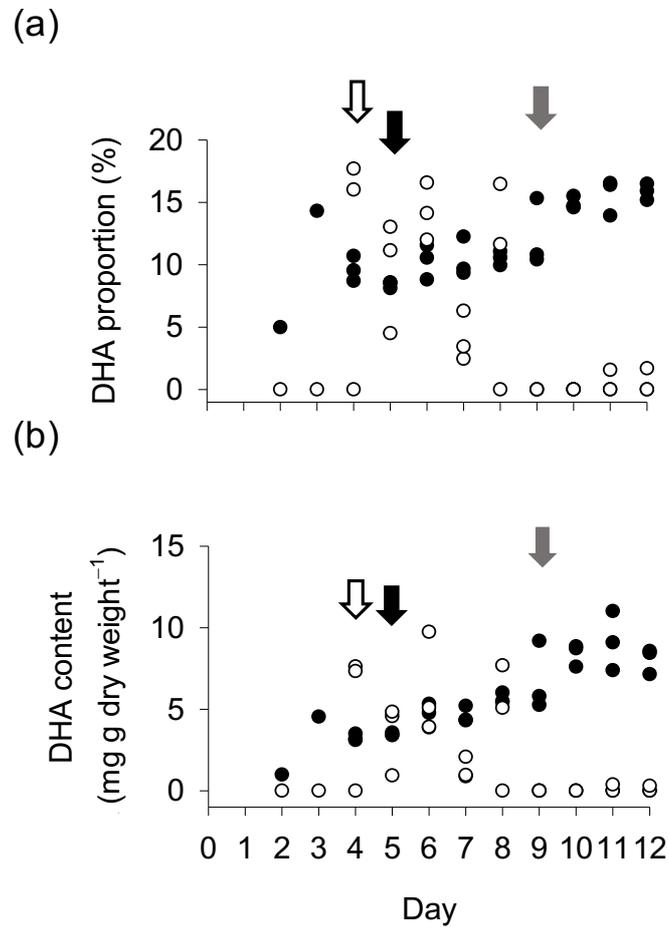


Fig. 4.3 Time variation in (a) proportion and (b) content ($\text{mg g dry weight}^{-1}$) of docosahexaenoic acid (DHA) of *Isochrysis* sp. Tahiti strain. DHA levels in non-polar lipids (NL) and polar lipids (PL) are shown as closed and opened circles, respectively. The variation is expressed as raw data with three sample at each day ($n = 3$) except for Day 2 and 3 ($n = 1$). Each arrow with white, black and grey colors shows the beginnings of phosphate limitation, phosphate starvation, and nitrate-nitrogen starvation, respectively

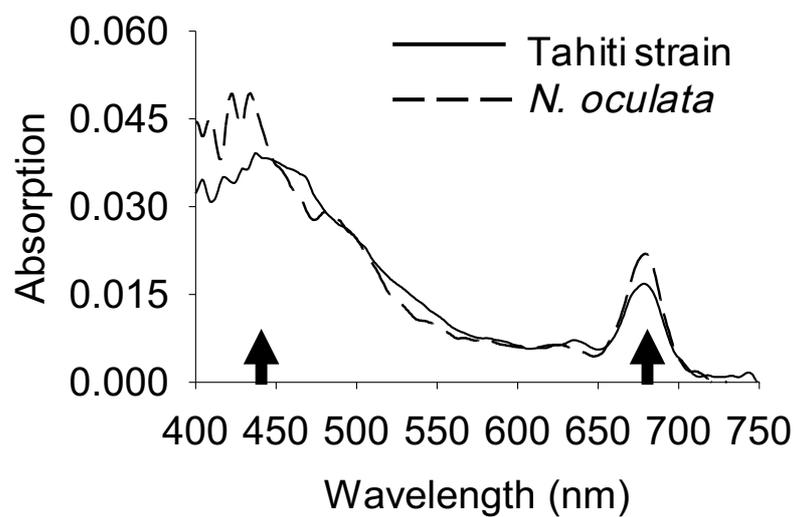


Fig. 4. 4 Comparison of absorption spectra in cell suspensions of *Isochrysis* sp. Tahiti strain with that of *Nannochloropsis oculata*. The spectra of *N. oculata* is referred to data of the middle-density culture at Day 4 (Fig. 2. 8b). Arrows shows relatively larger absorption peaks observed in Tahiti strain

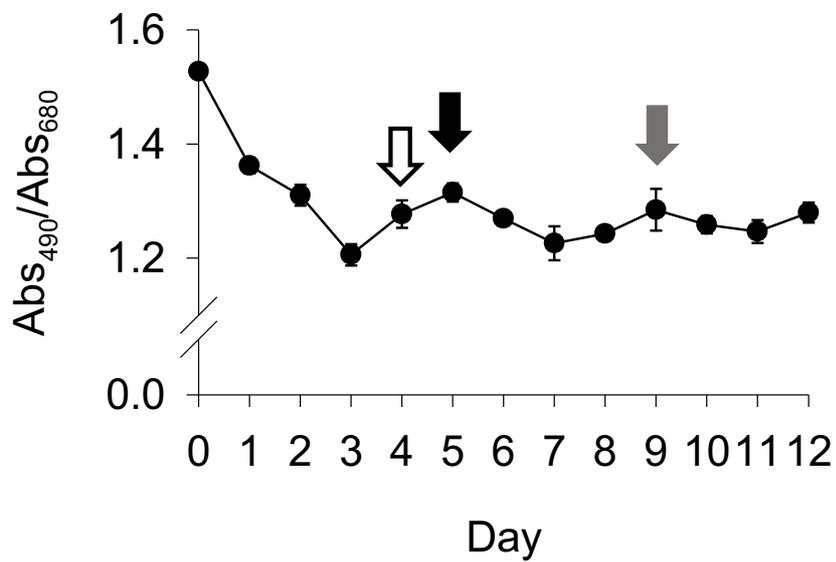


Fig. 4. 5 Change in absorption ratio at 490 nm and 680 nm (Abs_{490}/Abs_{680}) of *Isochrysis* sp. Tahiti strain. Values show mean \pm standard deviation ($n = 3$). Each arrow with white, black and grey colors shows the beginnings of phosphate limitation, phosphate starvation, and nitrate-nitrogen starvation, respectively

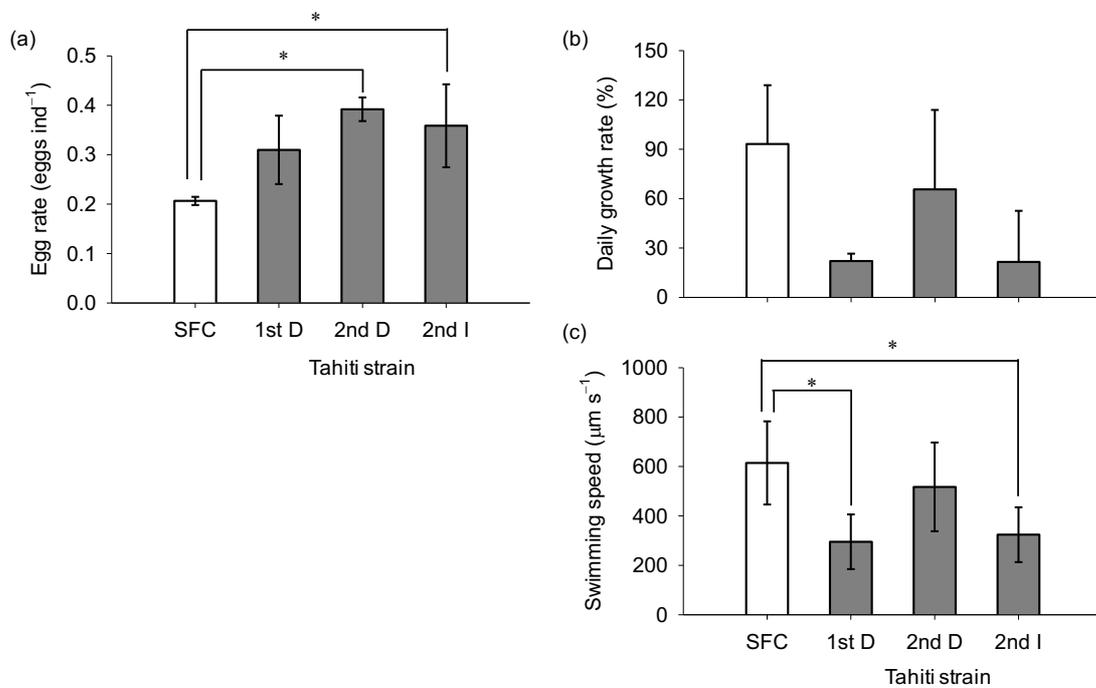


Fig. 4. 6 Comparison of physiological states of rotifers *Brachionus plicatilis* species complex fed with DHA-enriched *Chlorella vulgaris* (SFC) and *Isochrysis* sp. Tahiti strain. **a** Egg rate (egg ind⁻¹), **b** daily growth rate (%), and **c** swimming speed (μm s⁻¹). Cells of Tahiti strain harvested at first decreasing phase (1st D), second decreasing phase (2nd D), and second increasing phase (2nd I) of absorption ratio at 490 nm and 680 nm. Values of egg rate and daily growth rate show mean ± standard deviation (egg rate and daily growth rate, $n = 3$; swimming speed, $n = 38$). Tahiti strain with * indicates significant difference against SFC

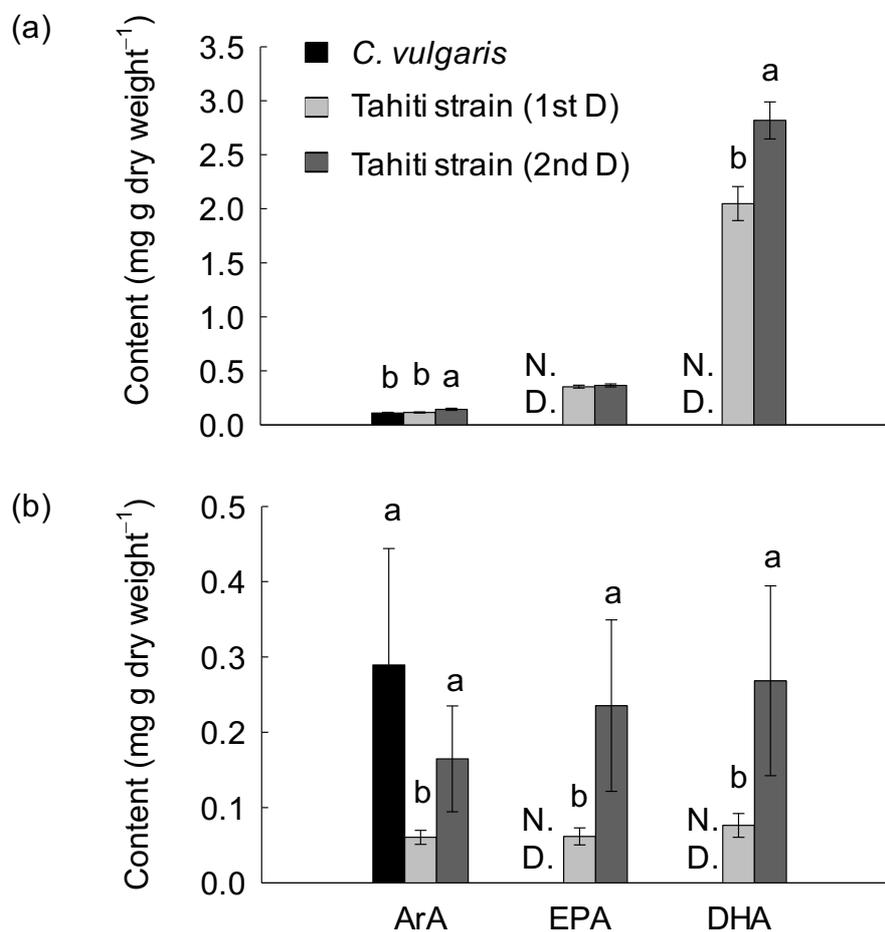


Fig. 4. 7 Evaluation of enrichment effects of *Isochrysis* sp. Tahiti strain on highly unsaturated fatty acid contents (mg g dry weight⁻¹) in (a) non-polar lipids and (b) polar lipids of rotifers *Brachionus plicatilis* species complex. Tahiti strain harvested at first and second decreasing phase of absorption ratio at 490 nm and 680 nm (1st D and 2nd D) was used as the diet. Values show mean \pm standard deviation ($n = 3$). Different superscripts on top of bars indicate significant differences in each fatty acid content between the feeding treatments ($p < 0.05$, $a > b$). N.D. indicates “not detected”

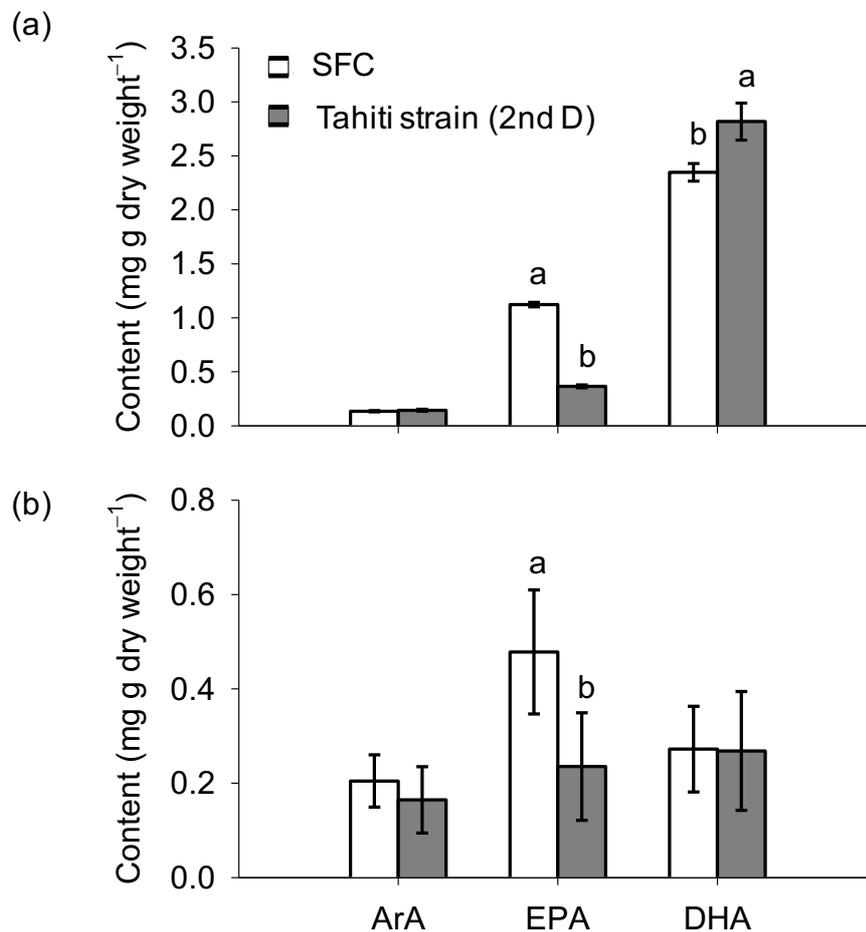


Fig. 4. 8 Comparison of highly unsaturated fatty acid contents (mg g dry weight⁻¹) in (a) non-polar lipids and (b) polar lipids of rotifers *Brachionus plicatilis* species complex between DHA-enriched *Chlorella vulgaris* (SFC) and *Isochrysis* sp. Tahiti strain. Tahiti strain harvested at second decreasing phase of absorption ratio at 490 nm and 680 nm (2nd D) was used as the diet. Values show mean \pm standard deviation ($n = 3$). Different superscripts on top of bars indicate significant differences in each fatty acid content between the feeding treatments ($p < 0.05$, $a > b$)

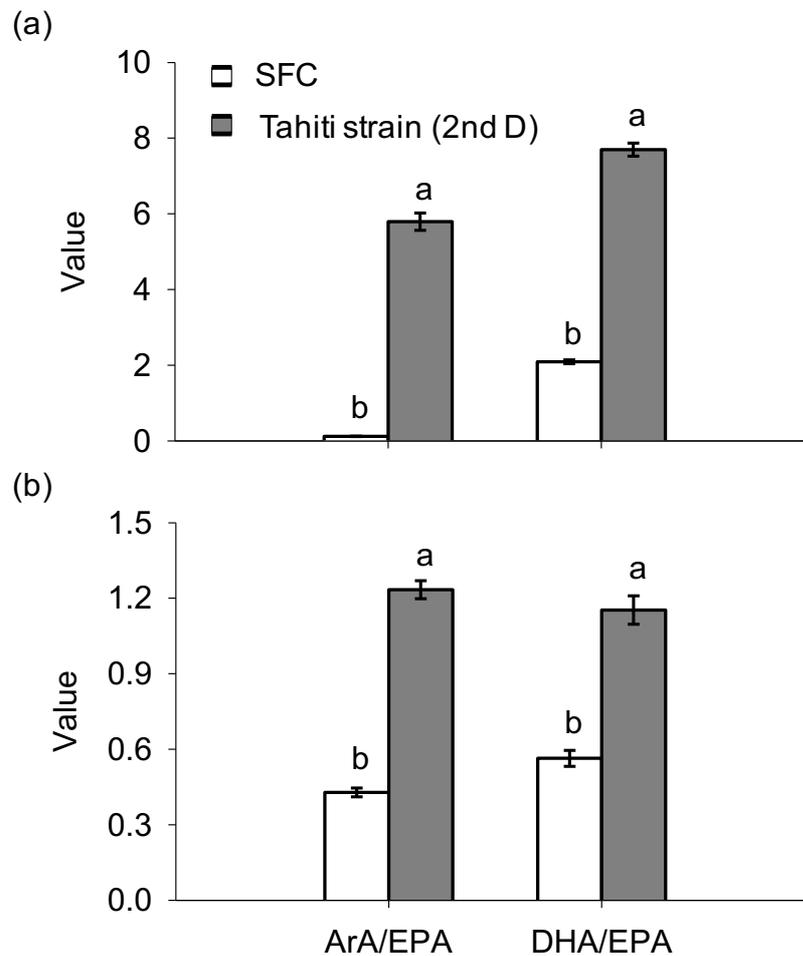


Fig. 4. 9 Evaluation of balance of highly unsaturated fatty acids of rotifers *Brachionus plicatilis* species complex fed with *Isochrysis* sp. Tahiti strain. Ratios of arachidonic acid (ArA) to eicosapentaenoic acid (EPA) (ArA/EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) to EPA (DHA/EPA) in (a) non-polar lipids and (b) polar lipids were compared between rotifers fed DHA-enriched *Chlorella vulgaris* (SFC) and Tahiti strain harvested at second decreasing phase of absorption ratio at 490 nm and 680 nm (2nd D). Values show mean \pm standard deviation ($n = 3$). Different superscripts on top of bars indicate significant differences in each ratio between the feeding treatments ($p < 0.05$, $a > b$)