

Application News

No. A482

光吸収分析
Spectrophotometric Analysis

島津 UV 微細藻類分析システムを用いた ナンノクロロプシスの簡便な濃度測定

Simple Quantitative Measurement for Nannochloropsis Micro Algae in Water Using Shimadzu UV Micro Algae Analysis System

化石燃料による地球温暖化が問題視される中、近年、微細藻類から燃料を取り出す研究が盛んに行われています。微細藻類は、通年での収穫が可能で、単位面積当たりの収量が高いというメリットを持つ反面、開発工程で多くの課題もあります。現在、実用化に向け、品種改良、培養、収穫、油分抽出などの各段階で様々な研究が行われています。

微細藻類を研究する上で、日々成長していく藻類の成長度合（濃度）の測定は重要です。現在、この濃度測定には、ろ紙で濾過して乾燥させた試料の重量を測定する乾燥重量法が用いられています。しかし、乾燥重量法は時間がかかるためより簡単に早く測定できる方法が求められています。今回、微細藻類の濃度を分光光度計を用いて簡便に測定できる島津 UV 微細藻類分析システムを開発しました。使い捨てのスクリー管瓶（またはディスポーザブルセル）を使用することで、1 試料の測定時間が約 1 分という迅速な測定を実現しています。本ニュースでは、上記システムを用いた微細藻類ナンノクロロプシスの測定例をご紹介します。

M. Sugioka

■ 試料 - 微細藻類ナンノクロロプシス -

Sample - Micro Algae Nannochloropsis -

微細藻類ナンノクロロプシス（株式会社ヒガシマル製、100 億 cell/mL）を順次純水で希釈し、0 から 100 % まで 12 濃度の試料を調製しました。試料の外観を Fig. 1 に示します。これら試料を二つに分け、それぞれを検量モデル作成用標準試料、検量モデル検証用試料として使用しました。それらを Table 1, Table 2 に示します。



Fig. 1 微細藻類ナンノクロロプシス
Measurement Samples of Micro Algae Nannochloropsis

Table 1 標準試料
Standard Samples

標準試料	濃度 (%)
①	100
②	90
③	80
⑤	60
⑥	50
⑦	40
⑨	20
⑩	10
⑫	0 (純水)

Table 2 検証用試料
Validation Samples

検証用試料	濃度 (%)
④	70
⑧	30
⑪	5

■ 測定装置

Measurement Instrument

島津 UV 微細藻類分析システムは紫外可視分光光度計 UV-2600 と藻類分析用積分球付属装置を組み合わせたシステムです。本システムを用いて試料の反射率測定を行いました。使い捨てのスクリー管瓶に入れた試料を積分球に設置して全光線反射率を測定しました。積分球を装着した UV-2600 を Fig. 2 に示します。この測定では使い捨てのスクリー管瓶を使うので洗浄等の面倒な操作が不要となり、また洗浄不良によるキャリーオーバーやコンタミネーションも考慮する必要がなくなります。



Fig. 2 積分球を装着した UV-2600
UV-2600 Mounting Integrating Sphere Attachment

測定結果

Measurement Results

Table 1 と Table 2 の試料 12 点の反射率を測定しました。スクリー管瓶を取り換え同じ試料を 2 回ずつ測定しました (12 点 × 2 = 計 24 データ)。その結果を Fig. 3 に、測定条件を Table 3 に示します。濃度が高いものほど反射率が高く、濃度が低いものほど反射率が低い結果となり、濃度と相関のある反射スペクトルが得られました。これは、微細藻類の細胞数が増えるほど液表面付近で光が反射する割合が増えるためです。

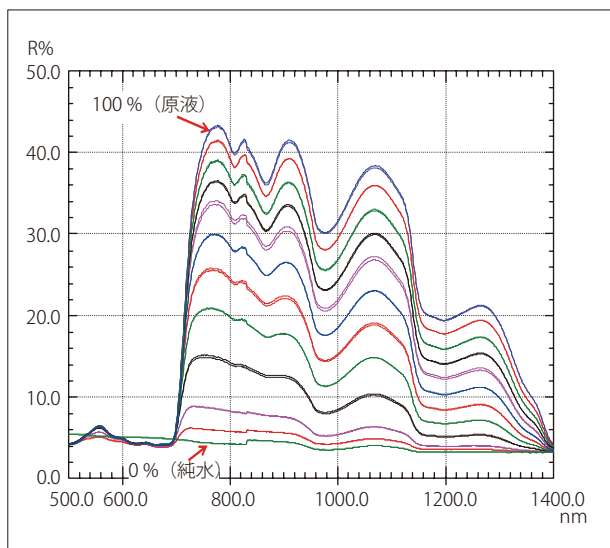


Fig. 3 測定スペクトル
Reflection Spectra of Micro Algae in Disposable Bottles

Table 3 測定条件
Analytical Conditions

使用装置	: 紫外可視分光光度計UV-2600 藻類分析用積分球付属装置
測定波長範囲	: 500 nm ~ 1400 nm
スキャンスピード	: 中速
サンプリングピッチ	: 1.0 nm
測光値	: 反射率
スリット幅	: 5 nm

定量結果

Results of Quantitative Analysis

反射スペクトルを用いて微細藻類の定量を試みました。今回、単回帰法と多変量解析の重回帰法の二つの方法で定量を行い、その定量精度を比較しました。Table 1 の試料を標準試料としてそれぞれの検量モデルの回帰式を得ました。重回帰法に関しては、その回帰式を Fig. 4 のように標準ソフトウェア UVProbe のフォトメトリック測定メソッド画面に入力します。このように設定することで、試料を測定する毎に回帰式から計算される予測値がソフトウェア上に算出されていきます。

Table 2 の検証用試料の測定を行い、その濃度を算出した結果を Table 4 に示します。結果を比較すると、単回帰法よりも重回帰法の方が良好な結果となっていることがわかります。このように回帰式を標準ソフトウェア UVProbe に入力するだけで未知試料を簡便に測定することができます。

なお、重回帰法での回帰式は Microsoft 社製表計算ソフトウェア Excel[®] 1) の「回帰分析」機能を用いて求めました。Table 4 の RMSEP は、Fig. 5 で定義される値で、予測値と真値との平均的な差を表す指標です。RMSEP が小さいほど、予測精度が良いと言えます。単回帰法に関しては、UVProbe ソフトウェアの標準の検量機能を用い定量を行いました。

注記：単回帰法では 910 nm の一波長データを使用して計算しました。重回帰法では 870 nm, 910 nm, 980nm, 1070 nm の四波長データを使用しました。

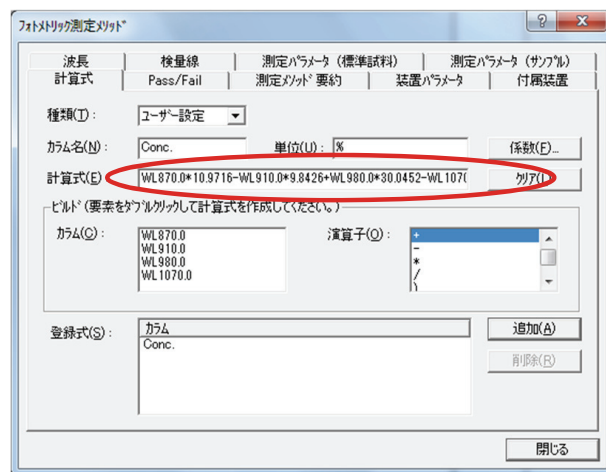


Fig. 4 UVProbe ソフトウェアのフォトメトリック測定メソッド画面
Photometric Method in UVProbe Software

Table 4 検証用試料に対する各検量モデルの予測結果
Prediction Results of Concentration Calculated by Each
Calibration Model for Validation Samples

検証用試料	真の濃度 (%)	単回帰法の 予測結果 (%)	重回帰法の 予測結果 (%)
④-1	70	72.9	69.2
④-2	70	73.4	69.1
⑧-1	30	32.4	28.3
⑧-2	30	32.3	30.0
⑪-1	5	1.4	5.3
⑪-2	5	1.5	5.4
RMSEP		3.1	0.87

* RMSEP: Root Mean Square Error of Prediction

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y'_i - y_i)^2}{N}}$$

y'_i は予測値, y_i は実際値, N は評価用試料数。

Fig. 5 RMSEP の定義式
Defined Formula for RMSEP

■ 吸収スペクトル測定 (透過法) Absorption Spectra (Transmission Measurement)

微細藻類の濃度が低い場合は反射率が低くなり、正確な定量を行うことが困難となります。その対策として積分球を用いた透過測定を検討しました。この測定では、積分球を用いることで直線透過光と拡散透過光を含む全光線透過光の吸収スペクトルを測定することができます。

Table 1, Table 2 の試料を一様に 20 倍希釈したものを測定用試料としました。測定には使い捨てのディスポーザブルセルを用いました。ディスポーザブルセル (光路長 10 mm) に入れた試料を積分球にセットした状態を Fig. 6 に示します。同一試料に対して 2 回ずつ測定を行いました (12 点 × 2 = 計 24 データ)。

測定結果を Fig. 7 に、測定条件を Table 5 に示します。Fig. 7 における吸光度 0 ~ 2 の範囲の波長領域に着目し、その付近の拡大図を Fig. 8 に示します。濃度が高いものほど吸光度が高く、濃度が低いものほど吸光度が低い結果となり、濃度と相関のある吸収スペクトルが得られました。なお、透過法では反射法で使用した藻類分析用積分球付属装置は不要であり、標準タイプの積分球付属装置で測定可能です。

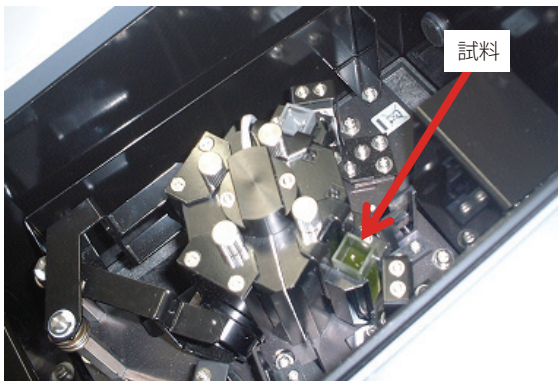


Fig. 6 積分球に設置されたディスポーザブルセル
Disposable Cell Set in Integrating Sphere Attachment

Table 5 測定条件
Analytical Conditions

使用装置	: 紫外可視分光光度計UV-2600 積分球付属装置ISR-2600Plus
測定波長範囲	: 300 nm ~ 800 nm
スキャンスピード	: 中速
サンプリングピッチ	: 1.0 nm
測光値	: 透過率
スリット幅	: 5 nm

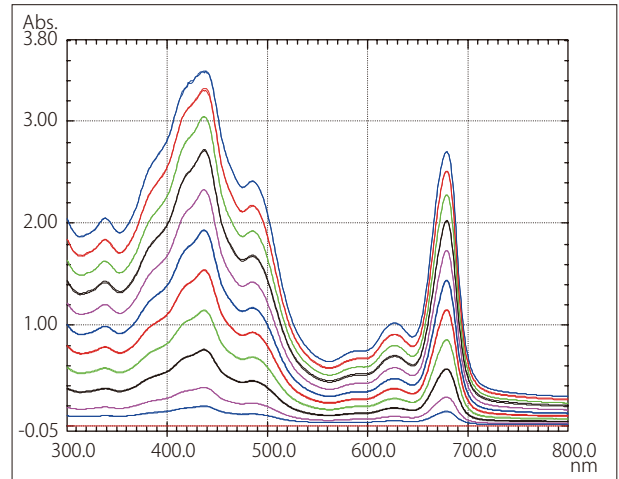


Fig. 7 吸収スペクトル
Absorption Spectra

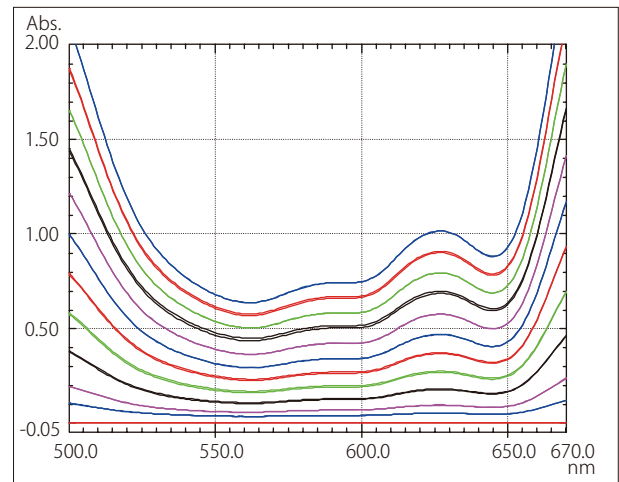


Fig. 8 Fig. 7 の拡大図
Expanded Spectra of Fig. 7

■ 定量結果 (透過法)

Results of Quantitative Analysis (Transmission Measurement)

吸収スペクトルを用いて微細藻類の定量を試みました。反射の場合と同様に、単回帰法と重回帰法の二手法で定量を行い、定量精度を比較しました。その結果を Table 6 に示します。結果を比較すると、重回帰法で良好な結果となっています。今回は反射測定で使用した全試料を一様に 20 倍希釈していますので、Table 6 の“真の濃度 (%)”は Table 2 の検証用試料の 1/20 の値になっています。

注記: 単回帰法では 625 nm の一波長データを使用して計算しました。
重回帰法では 580 nm, 625 nm, 660 nm の三波長データを使用しました。

Table 6 検証用試料に対する各検量モデルの予測結果
Prediction Results of Concentration calculated by Each
Calibration Model for Validation Samples

検証用試料	真の濃度 (%)	単回帰法の 予測結果 (%)	重回帰法の 予測結果 (%)
④-1	3.5	3.52	3.52
④-2	3.5	3.47	3.50
⑧-1	1.5	1.42	1.50
⑧-2	1.5	1.45	1.51
⑪-1	0.25	0.35	0.25
⑪-2	0.25	0.36	0.25
RMSEP		0.073	0.009

■他装置も含めた評価法

Investigation for Micro Algae Including Other Analytical Instruments

微細藻類の研究では、紫外可視（近赤外）分光光度計（UV）以外でも様々な分析装置が使用されます。それらを研究目的別にまとめてみました。

①培養プロセス管理

現在、微細藻類の細胞量（濃度）のモニタリングには主に乾燥重量法が用いられていますが、濾過や乾燥に手間と時間がかかります。このため、簡便な方法として全有機炭素計（TOC）やUVが使われるようになりました。また、TOCは培養液や微細藻類の生理状態の研究にも用いられます。

微細藻類が生成した油脂等の有機物の定性にはガスクロマトグラフ質量分析計（GCMS）や液体クロマトグラフ質量分析計（LCMS）の質量分析計が必要となります。定量には液体クロマトグラフ（LC）やガスクロマトグラフ（GC）等が用いられます。また簡便な定量や定性にはUV（近赤外含む）、フーリエ変換赤外分光光度計（FTIR）、蛍光分光光度計（RF）等が用いられます。

目的	装置
微細藻類、生成有機物のモニタリング	TOC, UV
微細藻類の生理状態研究	TOC
生成有機物の定性	GCMS, LCMS
生成有機物の定量	GC, LC, GCMS, LCMS
生成有機物の簡易定量・簡易定性	UV, FTIR, RF

②精製・改質

微細藻類が生成した有機物を燃料として使うためには、精製と低分子化などの改質が必要です。不純物の除去や改質後のキャラクタリゼーションに GCMS や LCMS が有用です。

目的	装置
精製、改質後の有機物の定性、定量	GCMS, LCMS

③メタボロミクス

微細藻類が有用な有機物を産生する際の仕組みの解明や生産量の増大を図るため、代謝生成物の分析であるプロファイル解析やフラックス解析が進められています。その研究には GCMS や LCMS が必要となります。

目的	装置
メタボロミクス	GCMS, LCMS

④生成有機物の収穫

細胞の大きさや硬さは、微細藻類の収穫のしやすさに関係します。その評価に粒度分布計（SALD）、走査型プローブ顕微鏡（SPM）等も検討されはじめています。

目的	装置
細胞表面硬さ	SPM
細胞粒度分布	SALD

■まとめ

Conclusion

微細藻類の濃度を簡便に測定する手法を開発しました。

本手法では、試料濃度が高い場合は反射法で、濃度が低い場合は透過法で測定を行います。反射法ではスクリー管瓶を用い、透過法ではディスポーザブルセルを用います。微細藻類ナンノクロロプシスを用いて定量実験を行ったところ、反射法、透過法とも良好な結果が得られました。本手法を用いれば、簡便かつ迅速に微細藻類の濃度を測ることが可能となります。

また微細藻類研究では、細胞量モニタリングの他に、培養プロセス管理、精製・改質、メタボロミクス研究、収穫法など様々な測定・研究を行う必要があります。それらには UV, TOC, FTIR, GCMS, LCMS など様々な装置が有効となります。

1) Excel は Microsoft 社の商標または登録商標です。