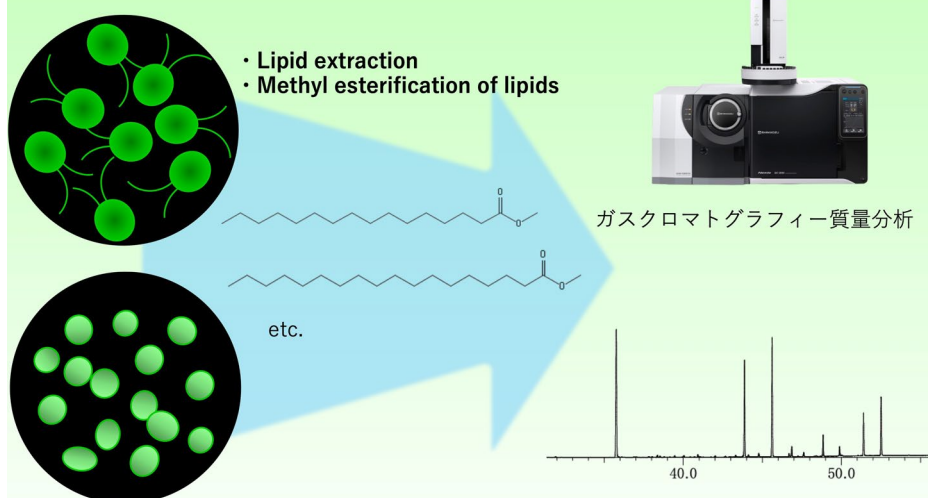


ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS)を用いた 各種微細藻類由来の脂肪酸組成の評価

丸谷飛之^{1*}、吉野晴貴¹、青柳拓也¹、西尾優作¹、長尾優²



■ 要旨

近年、微細藻類を利用したSustainable Aviation Fuel (SAF)の生産に対する関心が急速に高まっています。微細藻類に含まれる脂肪酸がSAF原料となるため、それら脂肪酸に関する分析手法の標準化を推進していく必要があります。本稿では、高分解能かつ高感度で検出が可能なガスクロマトグラフ質量分析計 GCMS-TQTM8040 NXを用いて、微細藻類バイオマス中の脂肪酸に対する分析手法の検証を行なった事例についてご紹介します。

1. はじめに

微細藻類のSAFに関する研究において、標準的な試験・分析の手法や評価基準等が明確に規定されていない状況です。そのため、これまでの微細藻類に関する研究の多くは、その成果を公平に比較・評価することが極めて困難です。例えば、生産性に関する記述形式については、単位体積または単位面積・時間あたりのバイオマス量変化 (g-biomass L⁻¹ d⁻¹, g-biomass m⁻² d⁻¹)、単位体積・時間あたりの細胞数変化 (cell L⁻¹ d⁻¹)、単位時間あたりの吸光度 (Optical Density, OD) 変化 (ΔOD d⁻¹) をはじめとした多種多様な

形式があり、文献毎で用いられる単位の表記方法が異なります¹⁻⁸⁾。また生産性ばかりでなく、微細藻類バイオマスの脂質組成分析についても、条件が文献によって様々であり、それらのうち脂肪酸分析では抽出溶媒の種類や比率、さらには手法そのものが研究グループ毎で全く異なっています (表1)⁹⁻¹⁴⁾。こうした問題は、単純な環境条件に関する指標 (光環境、水温、pH、曝気量、各種ガス濃度等) やその他多くの指標においても同様に見られます。結果、こうした成果報告が、適切に比較・検証されることは稀で、個々の独立した成果報告が体系化されことなく散在している状態です。こうした状況は、試験や分析の標準手法や評価基準が体系化されていないことから生じる問題であり、解決に向けて取り組むべき課題の一つです。特に、微細藻類に含まれる脂肪酸はSAFの原料となるため、SAFのポテンシャルを評価する上で各種藻類種が持つ脂肪酸に関する分析手法の標準化について早急に取り組む必要があります。そこで本研究では、ガスクロマトグラフ質量分析計、GCMS-TQ8040 NXを活用し、微細藻類由来の脂肪酸分析における抽出溶媒の種類や比率、また手法の比較検証を試みました。

2. 実験

・抽出工程を介した脂肪酸のメチルエステル化

本研究では、微細藻類中の脂質のうち脂肪酸メチルに変換できるものを分析しました (図1)。すなわち、微細藻類

¹ 一般社団法人日本微細藻類技術協会

* Corresponding author

² 株式会社島津製作所

の凍結乾燥物 (10 mg)について、各種抽出溶媒 (1 mL)と細胞破碎ビーズ (ジルコニアビーズ、0.1 mm)を加えた後、2,500 rpm・1分、間隔2分の条件を8回繰り返し、細胞破碎を行いました (図1A)。そして、3 mLの抽出溶媒と2.5 mLのTris buffer (50 mM Tris, 1 M NaCl, pH 7)を加え、5分間攪拌しました。遠心分離して抽出溶媒層を回収しました。また残渣中に色が残る場合には、1 mLの抽出溶媒を加えた後、5分間の攪拌を行い、遠心分離して抽出溶媒層の回収を再度行いました。回収したサンプルについては、窒素ガスを吹きつけることで乾燥させました。

上記で調製したサンプルを5% H₂SO₄/MeOH (3 mL)で溶解し70°Cで3時間反応しました (図1B)。そして、超純水 (3 mL)とヘキサン (3 mL)を加えて攪拌した後、遠心分離して上層を回収しました。その後、少量の無水硫酸ナトリウムを加えることで、サンプル中の水を取り除きました。得られたサンプルについて、GCMS-TQ8040 NXを用いて、脂肪酸メチルの組成解析を行いました。

・脂肪酸の*in situ*メチルエステル化

微細藻類の凍結乾燥物 (10 mg)について、1 mLのトルエンと2 mLの0.5 M CH₃ONa/MeOHを加え90°Cで30分間反応しました (図2)。室温に戻るまで静置した後、14% BF₃/MeOH (2 mL)を加えました。そして、90°Cで30分間反応しました。室温に戻るまで静置した後、ヘキサン (3 mL)とNaCl飽和水溶液 (3 mL)を加え90°Cで10分間反応しました。その後、遠心分離して上層を回収しました。少量の無水硫酸ナトリウムを加えることで、サンプル中の水を取り除きました。得られたサンプルについて、GCMS-TQ8040 NXを用いて、脂肪酸メチルの組成解析を行いました。

・GC-MSの分析条件

本研究では、GCMS-TQ8040 NXを用いました (図3A)。分析条件を表2に示しています。さらに、Smart Metabolites Database™ (図3B)を用いて、n-アルカンの保持時間から登録化合物の保持時間を予測し分析メソッドの自動作成を行いました。また、Supelco 37component FAME Mix (シグマアルドリッチ)を用いて、各脂肪酸の含有量を算出しました。すべての値は平均値±SDで示しました。

表 1 過去文献に見られる脂質分析における抽出溶媒の一例

文献	抽出溶媒	藻類種
Guido et al., (2013), <i>Journal of Visualized Experiments</i> ; e50628:1-9.	CHCl ₃ /MeOH (4:5)	<i>Scenedesmus obliquus</i> , <i>Phaeodactylum tricornutum</i>
Halim et al., (2011), <i>Bioresource Technology</i> ;102(1):178-85.	Hexane, hexane /IPA (3:2)	<i>Chlorococcum</i> sp.
Lee et al., (1998), <i>Biotechnology Techniques</i> ;7:553-6.	CHCl ₃ /MeOH (2:1), hexane/IPA (3:2), dichloroethane/MeOH (1:1), dichloroethane/EtOH (1:1), acetone/dichloromethane (1:1)	<i>Botryococcus braunii</i>
Nagle and Lemke, (1990), <i>Applied Biochemistry and Biotechnology</i> ;24:355-61.	1-butanol, hexane/IPA (2:3), MeOH/CHCl₃ (1:1)	<i>Chaetoceros muelleri</i> , <i>Monoraphidium minutum</i>

赤文字: 文献中で抽出効率が高かった条件

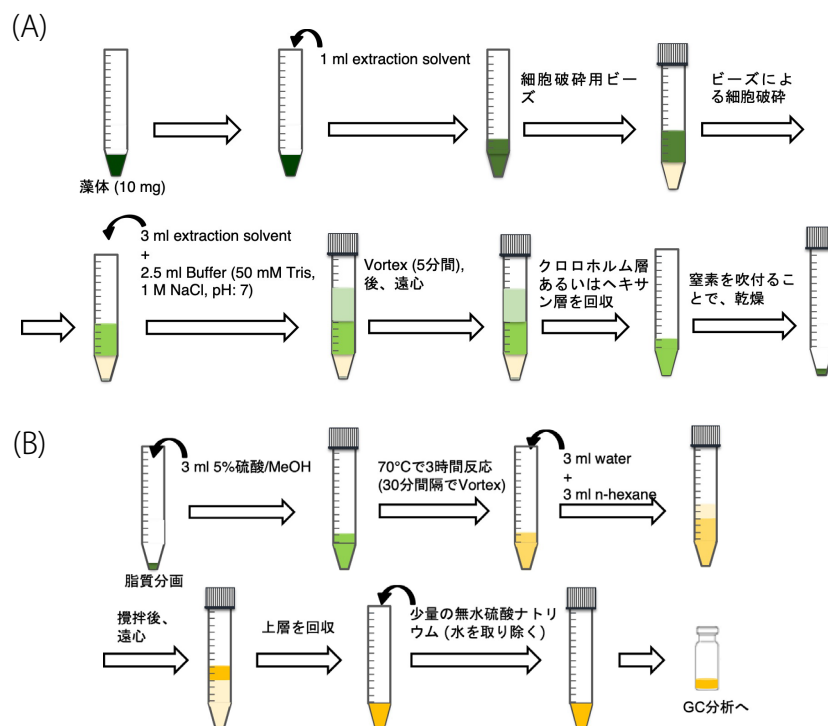


図 1 微細藻類バイオマスにおける脂肪酸の分析手法

- (A) 微細藻類バイオマスからの脂質抽出
(B) 抽出物における脂肪酸のメチルエステル化

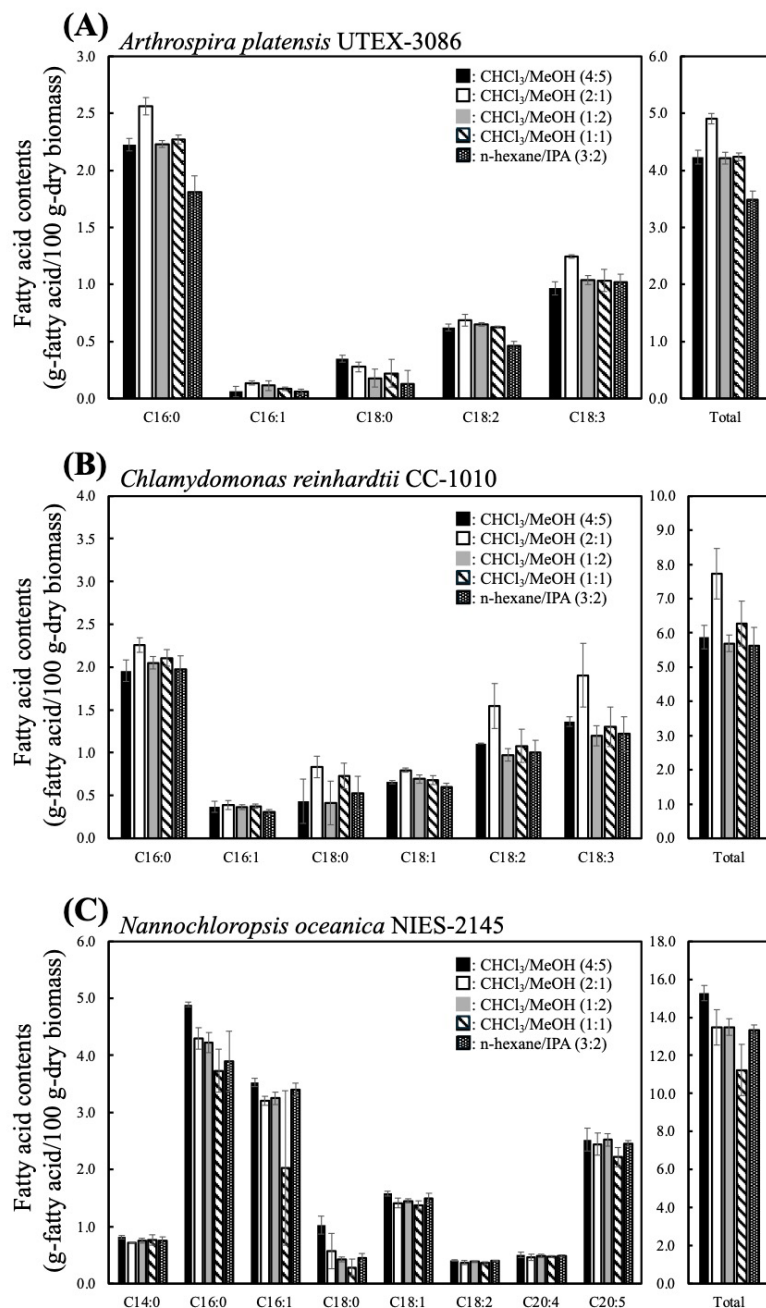


図4 スピルリナ (A)、クラミドモナス (B)、ならびにナンノクロロプシス (C)における各種脂肪酸に対する分析手法の比較検証

3. 結果・考察

微細藻類の脂肪酸分析において、文献毎で用いられる抽出溶媒の種類や比率が異なっており⁹⁻¹⁴⁾、それぞれの条件における微細藻類の脂肪酸組成に対する比較評価について検証されていません。そのため、様々な藻類種において、各文献で抽出効率が高い溶媒の種類や比率を一線上で比較検証する必要があると考えています。そこで本研究では、まずスピルリナ (*Arthrospira platensis* UTEX-3086)、クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii* CC-1010)、ならびにナンノクロロプシス (*Nannochloropsis oceanica* NIES-2145)について、抽出溶媒の種類や比率が脂肪酸組成分析に与える影響を検討しました。その結果、GCMS-TQ8040 NXで得られたクロマトグラムにおいて、どの抽出溶媒でも検出される脂肪酸メチルに違いは認められなかったものの、各種脂肪酸メチルの量について、差異が見られました (図4)。すなわち、スピルリナでは、CHCl₃/MeOH (2:1)による抽出がC16:0やC18:3の含有量を高める傾向が示され、総脂肪酸含有量も他の抽出溶媒に比べて高いことが見出されました (図4A)。

クラミドモナスについても、CHCl₃/MeOH (2:1)の抽出による抽出が他の溶媒に比べて、C18:2やC18:3をはじめとした脂肪酸含有量が高くなる傾向が示されました (図4B)。一方、ナンノクロロプシスでは、CHCl₃/MeOH (4:5)の抽出による抽出がC16:0やC18:0、ならびに総脂肪酸含有量が他の抽出溶媒に比べて高くなる傾向が見出されました (図4C)。これらの結果から、溶媒の種類や比率によって微細藻類に含まれる脂肪酸量が異なる結果が示され、抽出工程によって微細藻類のポテンシャルを見誤る可能性が示唆されました。また最適な条件もそれぞれの藻類で異なることから、各微細藻類種で抽出溶媒の検討を行う必要があると考えられます。

このように、微細藻類中の脂肪酸分析の結果が抽出工程で用いる溶媒の選択で影響を受けることが示されました。近年、抽出工程を挟まずに、微細藻類バイオマスに含まれる脂肪酸のメチルエステル化法 (*in situ*法)に関する研究が盛んに行われています¹⁵⁾。

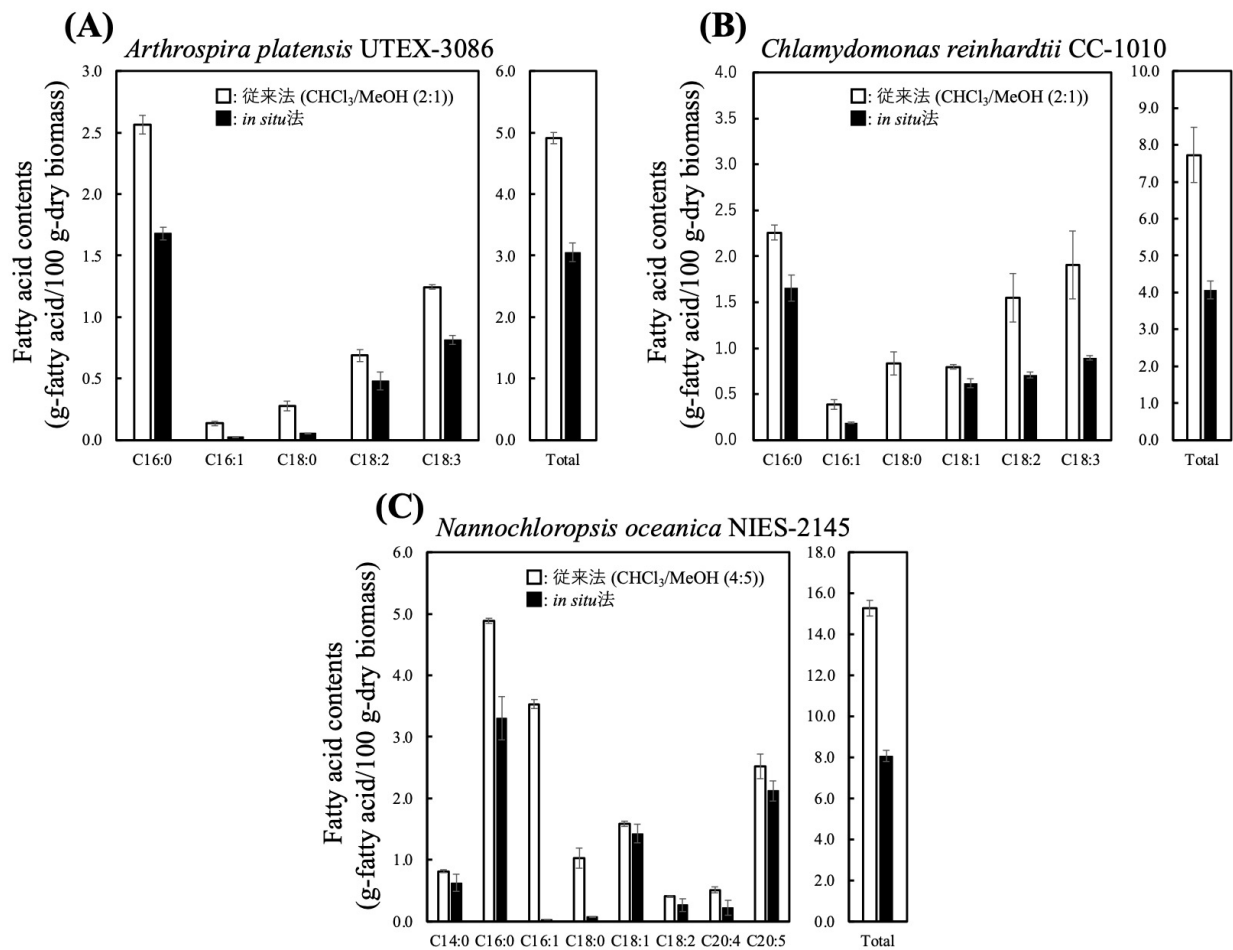


図5 スピルリナ (A)、クラミドモナス (B)、ならびにナンノクロロプシス (C)における各種脂肪酸に対する従来法と*in situ*法の比較

米国の藻類バイオマス機構 (Algae Biomass Organization, ABO)では、微細藻類バイオマスの脂肪酸分析手法として、*in situ*法を推奨していますが¹⁶⁾、抽出工程を介した従来法と*in situ*法における比較検証があまり行われていません。そこで我々は、従来法と*in situ*法の比較検証を行いました。その結果、従来法と*in situ*法で、検出される脂肪酸メチルに違いが認められなかったものの、それらの量に顕著な差異が見られました (図5)。すなわち、*in situ*法では、どの藻類種においても従来法に比べて全体の脂肪酸量が低くなる傾向が示されました。本結果から、*in situ*法は簡便かつ迅速な脂肪酸分析法であるものの、微細藻類バイオマスの脂肪酸を評価する上では更なる検証と改良を重ねる必要があるものと考えられます。

4. まとめ

本アプリケーションノートでは、ガスクロマトグラフ質量分析計 GCMS-TQ8040 NXを用いて、微細藻類における脂肪酸分析手法の比較検証について紹介しました。抽出工程を介した脂肪酸分析法では、溶媒の種類や比率によって微細藻類に含まれる脂肪酸検出量が異なることが示されました。また各微細藻類種で最適な条件が異なるため、抽出工程を介した分析では抽出溶媒の検討が必要となります。これに対し、抽出工程を介さない*in situ*メチルエステル化法では、抽出工程を介したものに比べて、脂肪酸の検出量が低下することが見出され、更なる改良が必要であることが示唆されました。

謝辞

この成果は、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO)の助成事業 (JPNP17005)の委託業務の結果得られたものです。

<参考文献>

1) Abomohra, A. E. F., Wagner, M., El-Sheekh, M., Hanelt, D., Lipid and total fatty acid productivity in photoautotrophic fresh water microalgae: Screening studies towards biodiesel production. *J. Appl. Phycol.* 25, 931–936. 2013.

2) Sun, Z., Wei, H., Zhou, Z. gang, Ashokkumar, M., Liu, J., screening of isochrysis strains and utilization of a two-stage outdoor cultivation strategy for algal biomass and lipid production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 185, 1100–1117. 2018.

3) Nascimento, I.A., Marques, S.S.I., Cabanelas, I.T.D., Pereira, S.A., Druzian, J.I., de Souza, C.O., Vich, D.V., de Carvalho, G.C., Nascimento, M.A., Screening Microalgae Strains for Biodiesel Production: Lipid Productivity and Estimation of Fuel Quality Based on Fatty Acids Profiles as Selective Criteria. *Bioenergy Res.* 6, 1–13. 2013.

4) Rodolfi, L., Zittelli, G.C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M.R., Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 100–112. 2009.

5) Dahlin, L.R., Van Wychen, S., Gerken, H.G., McGowen, J., Pienkos, P.T., Posewitz, M.C., Guarnieri, M.T., Down-selection and outdoor evaluation of novel, halotolerant algal strains for winter cultivation. *Front. Plant Sci.* 871, 1–10. 2018.

6) Jena, J., Nayak, M., Sekhar Panda, H., Pradhan, N., Sarika, C., Ku. Panda, P., V. S. K Rao, B., B. N. Prasad, R., Behari Sukla, L., Microalgae of Odisha Coast as a Potential Source for Biodiesel Production. *World Environ.* 2, 12–17. 2012.

7) Karemore, A., Pal, R., Sen, R., Strategic enhancement of algal biomass and lipid in *Chlorococcum infusum* as bioenergy feedstock. *Algal Res.* 2, 113–121. 2013.

8) Mountourakis, F., Papazi, A., Kotzabasis, K., The microalga *Chlorella vulgaris* as a natural bioenergetic system for effective CO₂ mitigation—new perspectives against global warming. *Symmetry (Basel). Symmetry.* 13. 2021.

9) Breuer, G., Evers, W. A., de Vree, J. H., Kleinegris, D. M., Martens, D. E., Wijffels, R. H., Lamers, P. P., Analysis of fatty acid content and composition in microalgae. *J. Vis. Exp.*, 80, 50628. 2013.

10) Halim, R., Gladman, B., Danquah, M. K., Webley, P. A., Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresour. Technol.*, 102(1), 178–185. 2011.

11) Fajardo, A. R., Cerdan, L. E., Medina, A. R., Fernandez, F. G. A., Moreno, P. A. G., Grima, E. M., Lipid extraction from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 109, 120–126. 2007.

12) Lee, S. J., Yoon, B. D., Oh, H. M., Rapid method for the determination of lipid from the green algae *Botryococcus braunii*. *Biotechnol. Tech.*, 7, 553–556. 1998.

13) Nagle, N., Lemke, P., Production of methyl ester fuel from microalgae. *Applied Biochem. and Biotech.*, 24, 355–361. 1990.

14) Halim, R., Danquah, M. K., Webley, P. A., Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnol. Adv.* 30(3), 709–732. 2012.

15) Lohman, E. J., Gardner, R. D., Halverson, L., Macur, R. E., Peyton, B. M., Gerlach, R., An efficient and scalable extraction and quantification method for algal derived biofuel. *J. Microbiol. Methods*, 94(3), 235–244. 2013.

16) Algae Biomass Organization. 2017. Industrial Algae Measurements, Version 8.0. (L.M. Laurens et. al., 2017).

GCMS-TQ、Smart Metabolites Databaseは、株式会社 島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
<https://www.an.shimadzu.co.jp/>

初版発行：2024年9月

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
本文中に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、各社の商標および登録商標です。
本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原作者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。
掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。