

## Application Note

No. 43

エネルギー

全有機体炭素計（TOC 計）とフーリエ変換赤外分光光度計（FT-IR）を用いた  
微細藻類の細胞非破壊系での簡便な貯蔵脂質の生産性評価  
ー海洋ハプト藻が合成する長鎖不飽和ケトン（アルケノン）のセミ定量技術の開発ー

Determination of Storage Lipid Contents by Total Organic Carbon (TOC) Analyzer and  
Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FT-IR) in Non-Destructive Microalgal Cells  
ー A New Method for the Semi-Quantitative Analysis of Long-Chain Ketones (Alkenones)  
Produced by Marine Haptophyte Algae ー

埴優<sup>1)</sup>, 白岩善博<sup>1)</sup>

*Emiliania huxleyi* 細胞の SEM 像



Energy

写真は筑波大学 白岩先生よりご提供頂きました。

### 1. はじめに

微細藻類によるバイオ燃料生産に関する期待の高まりを受けて、その技術開発や研究が急速に進展しています。その中で、生産性の向上が大きな課題となっており、培養条件、培養システムの開発・改良によるその燃料物質の生産性の最適化が喫緊の重要課題となっています。そのため、細胞内に蓄積される貯蔵脂質・オイル成分の分析を培養と並行して迅速に定量的に実施する技術開発が期待されています。

筆者らが培養する海洋ハプト藻類の貯蔵脂質が、多くの微細藻類や陸上植物が有するトリアシルグリセロール（TGA）とは異なる物質であることから、その特性を活用してフーリ

エ変換型赤外分光光度計（FT-IR）を用いて定量化する方法の開発に取り組みました。FT-IR は有機化合物の構造の推定、同定および定量に有用性のある分析装置です。藻体（細胞）を非破壊の状態で測定でき、得られる FT-IR スペクトルから炭水化物、タンパク質および脂質のピークを同定し、それらの物質量を相対的に比較するための定量的情報を得る技術が開発されました。

しかし、藻類の蓄積する炭水化物や脂質分子は種により多様性が大きく、個々の細胞や貯蔵物質の多様性に対応する継続的な技術開発が不可欠です。

1) 筑波大学 生命環境系  
\* 責任著者

筆者らは中生代後半に原油生産の起源生物の一つと考えられる海洋ハプト藻類を研究する中で、一部のハプト藻が合成する中性脂質分子である長鎖不飽和ケトン（アルケノンと呼ばれる）がバイオ燃料の有力な候補物質となることを前提に研究を展開しています。そのため、細胞内の蓄積している貯蔵脂質アルケノンを FT-IR スペクトルから同定し、その得られた相対的定量値を基に、全有機体炭素計（TOC 計）で定量した全有機炭素量を分配してアルケノンの定量値を算出する新たな定量方法を確立しました。すなわち、FT-IR と TOC 計を組み合わせる本定量法は、細胞からの抽出操作を伴うガスクロマトグラフィー（GC）分析法とは異なり、細胞

の破壊や抽出操作をすることなく、培養システムで生産される藻類細胞をそのまま特定の細胞内物質の定量に使用できる点が利点です。

以下に筆者らが開発した FT-IR と TOC 計を組み合わせた貯蔵脂質アルケノンのセミ定量法を紹介します。本法では、FT-IR による細胞内構成成分の全ての存在比を正確に解析することが出来ないため、他の定量法との比較において「定量値に近似の値」であることから、「セミ定量」としました。詳細は、本文と図 1 を参照して下さい。

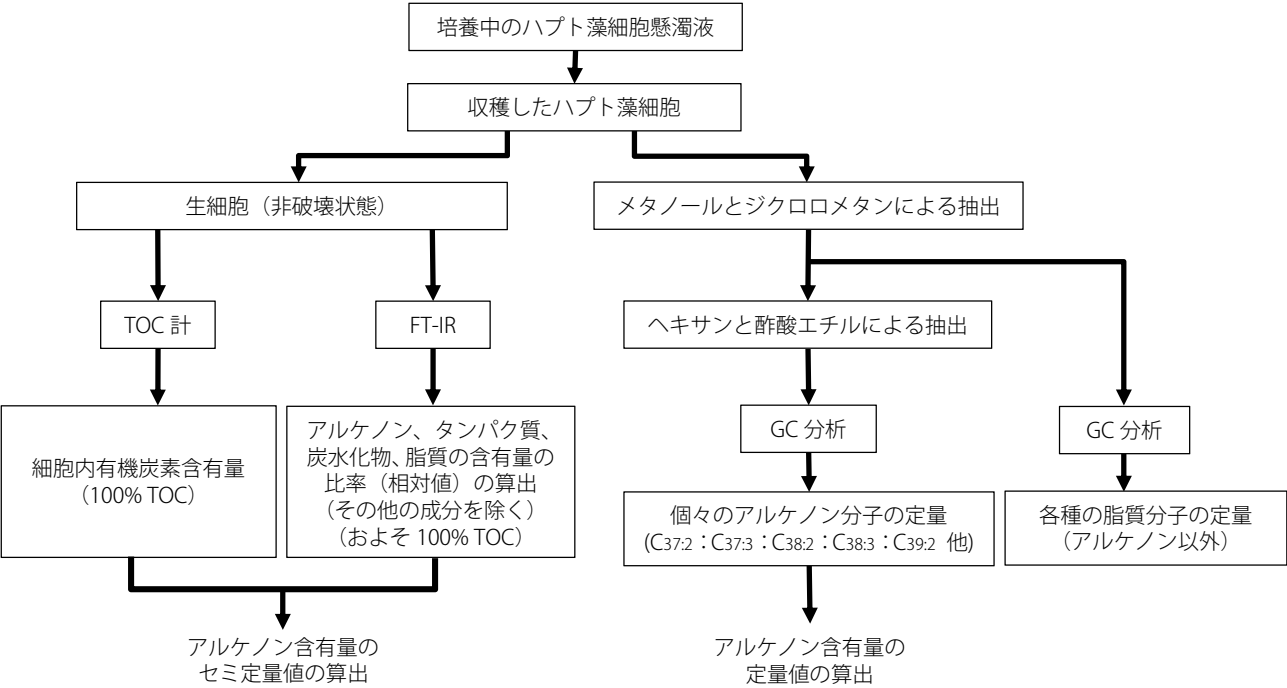


図 1 TOC と FT-IR の併用および GC によるアルケノン含有量のセミ定量・定量プロセスのフローチャート

## 2. アルケノン分子の特徴

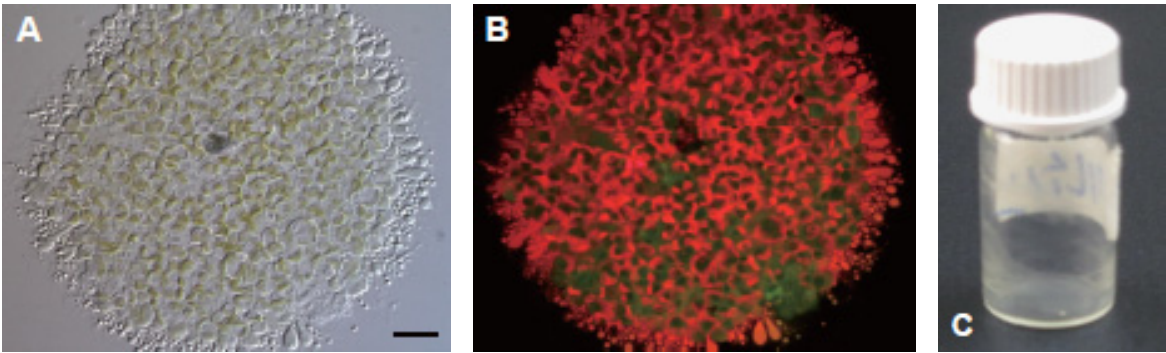
海洋微細藻であるハプト藻類の一部の分類群で合成される貯蔵脂質アルケノンは、炭素数 37~40 の長鎖不飽和ケトンであり、一分子中に 2~4 個のトランス型炭素二重結合と 1 個のケト基を有する中性脂質分子で、多くの誘導体が報告されています (図 2)。これらの分子群は、30 年程前に海底堆積物から初めて見出され、当初はその生産者・生産過程は不明でしたが、海洋ハプト藻類であることが後に見出されました<sup>1)</sup>。そして、優占的に見られる分子種である C37 アルケノン分子のトランス型炭素二重結合数の変化 (C37 アルケノン不飽和度指数:U<sup>k</sup>37 として指標化されている) が、当該藻類種の培養時の温度にほぼ直線的な関係を示し、不飽和度が低温で増加し、高温で減少する相関関係にあることが見出されました<sup>2)</sup>。さらに、この長鎖不飽和ケトンの生産がある種のハプト藻類に限定されていることも分かり、当該生物のバイオマーカーとして活用できることも明らかとなりました。その結果、C37 アルケノン不飽和度指数が海底堆積物を生産した海洋ハプト藻類種が生育していた時代の海洋表面温度 (光合成生物であることから現海洋では生育深度は 10~200 m 程度を垂直移動している) の復元に利用され、有機地球科学分野における重要な古海洋表面温度指標となっています (アルケノンに関する総説として、文献<sup>3)、4)</sup>を参照)。

アルケノンは現時点で 5 種類のアルケノン合成ハプト藻類種により生産されていることが明らかとなっています<sup>3)、4)</sup>。その中の一種である *Emiliania huxleyi* (イソクリシス目) は代表的な藻類種で円石 (ココリス) と呼ばれる炭酸カルシウム構造体を細胞表面に有しています。現世の海洋においても巨大なブルーム (大増殖) を引き起こしており、衛星画像においてエメラルドグリーン of 広範囲な増殖が観測されます。そして、それらが海底へと輸送されることにより大気 CO<sub>2</sub> を海底へと輸送する生物ポンプとしての役割を担っていることが報告され、一例として、その量は 1.1×10<sup>12</sup> CaCO<sub>3</sub> kg/年と推定されています<sup>5)</sup>。また、別の例として、衛星観測により見られた北大西洋での円石藻 *E. huxleyi* のブルームでは、トルコブルー色に海が染まり (平均的な場所では

8.5×10<sup>6</sup> 個/L の細胞数)、ある場所では水深 60 m に渡り細胞数が 3×10<sup>11</sup> 個/L にまで上がり、40 g CaCO<sub>3</sub>/m<sup>2</sup> の生産があったとの報告もあります。そして、そのブルームの規模は 7200 km<sup>2</sup> の範囲であったことから、72 万トンの炭酸カルシウム (石灰) の生産があり、年間生産量はその 10 倍以上に達したと見積もられています<sup>6)、7)</sup>。一方、アメリカ・カナダ中部の陸生塩湖<sup>8)</sup> やアラスカの淡水陸生湖の堆積物においてもアルケノンが発見されており<sup>9)</sup>、それを生産する生物種の同定に関心が集まっています。

筆者らは、アルケノン生産種のうち円石を形成しない *Tisochrysis lutea* (イソクリシス目) 細胞内に形成される脂質体 (中性脂質染色剤のナイルレッドや BODIPY により染色される) を単離しその脂質組成を調べたところ、その組成はアルケノン (74.5 %)、アルケン (1.5 %)、ステロールなどその他の脂質 (24 %) であり、プロテオーム解析結果からその中に V-ATPase サブユニットを主成分とするタンパク質を含む構造体であることを報告しました<sup>10)</sup>。現時点では、三種類のハプト藻類で全ゲノム解析が行われ報告されていますが、アルケノン合成ハプト藻類では円石藻 *E. huxleyi* が唯一です。この種は世界中の海洋に分布していることが知られており、そのような多様な環境に適応できる能力は、真核生物で始めて明らかにされた大きなパンゲノム領域の存在に起因するものと推測されています<sup>11)</sup>。また最近、種・株特異的な *E. huxleyi* ウイルスの感染により貯蔵脂質の代謝系が変化し、貯蔵中性脂質として TGA が合成されるようになったとの報告があり、海洋ハプト藻類の中性脂質合成系の制御機構に関する関心が高まっています<sup>12)</sup>。

以上のような研究情勢の変化から、藻類バイオ燃料・化学原料としてのアルケノンの定量的解析技術の重要性も高まってきており、本稿で紹介する TOC 計と FT-IR の併用による細胞非破壊でのアルケノンのセミ定量法の有用性も今後益々高まってくると考えられます



D	
分子式	構造式
C <sub>37:2</sub> Me	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCC=CCCCCCCC=CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC</chem>
C <sub>37:3</sub> Me	<chem>CCCCCCCC=CCCCCCCC=CCCCCCCC=CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC</chem>
C <sub>38:2</sub> Me	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCC=CCCCCCCC=CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC</chem>
C <sub>38:2</sub> Et	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCC=CCCCCCCC=CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC</chem>
C <sub>38:3</sub> Me	<chem>CCCCCCCC=CCCCCCCC=CCCCCCCC=CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC</chem>
C <sub>38:3</sub> Et	<chem>CCCCCCCC=CCCCCCCC=CCCCCCCC=CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC</chem>
C <sub>39:2</sub> Me	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCC=CCCCCCCC=CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC</chem>
C <sub>39:2</sub> Et	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCC=CCCCCCCC=CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC</chem>
C <sub>39:3</sub> Me	<chem>CCCCCCCC=CCCCCCCC=CCCCCCCC=CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC</chem>
C <sub>39:3</sub> Et	<chem>CCCCCCCC=CCCCCCCC=CCCCCCCC=CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC</chem>

図2 アルケノン生産ハプト藻 *E. huxleyi* NIES-837 細胞の顕微鏡画像とアルケノン  
(A) 細胞の微分干渉顕微鏡画像、(B) ナイルレッドで染色した細胞の蛍光顕微鏡画像  
(C) *E. huxleyi* NIES-837 細胞から抽出・精製した固体のアルケノン  
(D) *E. huxleyi* で合成されるアルケノンの構造 (Marlowe et al. (1984)<sup>25)</sup> と Rontani et al. (2006)<sup>26)</sup> を参考にして作成した)



### 3. 全有機体炭素計（TOC 計）による有機炭素量の定量

試料中の有機炭素量の定量には TOC 計（島津製作所製 TOC-LCPH、図 3）を使用しました。まず培養中に収穫した培養細胞懸濁液の一部を用いて全有機炭素量を決定します（TOC<sub>t</sub> 値）。残りを遠心分離およびフィルター濾過処理を行い、培養液画分（上清）と細胞画分（沈殿部分）に分画し、培養液画分（上清）の有機炭素量を測定します（TOC<sub>s</sub> 値）。そして、細胞画分の全有機体炭素（TOC<sub>c</sub> 値）を、計算式 [TOC<sub>t</sub>-TOC<sub>s</sub>] から求めます。

実験手順としては、いずれの画分においても、リン酸を添加して溶液を酸性化し、まず、混在する溶存無機炭素（DIC; 溶存 CO<sub>2</sub>、HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>、CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>を含む）を CO<sub>2</sub>（気体）として試料から発生させて、その炭素量を測定します。そして、それぞれの試料において、培養液画分（遠心上清）に含まれる溶存無機炭素量（DIC<sub>m</sub> 値）と細胞画分（沈殿部分）に含まれる溶存無機炭素量（DIC<sub>c</sub> 値）を測定します。尚、TOC 計を用いた全有機炭素量（TOC 値）と全無機炭素量（DIC 値）の測定の詳細に関しては、別途資料を参照して下さい<sup>13）、14）</sup>。

本技術開発においては、海洋性アルケノン生産ハプト藻類で、円石藻 *E. huxleyi* に分類される 2 種類の細胞株を用いました。第一の株は細胞表面に円石と呼ばれる炭酸カルシウムの殻を形成する *E. huxleyi* NIES-837 株（野生型）です。第二の株は、円石形成能力を遺伝的に欠損した *E. huxleyi* CCMP 2090 株（CCMP1516 株を長期間培養することで得られた、*E. huxleyi* で唯一の無菌状態の株）を用いました。尚、いずれの株も全ゲノム配列の解読が行われていますが、CCMP 2090 株についてはその全情報が公開されています<sup>11）</sup>。

光合成で固定された炭素の細胞内での動態変化の解析は、カルビン・ベンソン回路の発見に主要な役割を果たした放射性同位体 <sup>14</sup>C を用いた <sup>14</sup>C-トレーサー実験として既に実験手法が確立されています。<sup>14</sup>C-トレーサー実験は、代謝中間産物への炭素フロー（光合成産物合成の流れ）の経時変化を解析するための、<sup>14</sup>C-ラベル代謝化合物の分析に基づいて代謝経路の推定を行うことに極めて有用な方法です。

新規に合成された <sup>14</sup>C-化合物の放射能（放射活性）を測定する方法は、検出感度が極めて高く、光合成代謝産物が極僅かな量しか新規に合成されないような短時間での全炭素固定量の解析、様々な代謝産物の合成パターンや固定された炭素が蓄積される中間および最終代謝産物の同定を行うことに適しています。しかし、β線核種である <sup>14</sup>C の放射能の測定には液体シンチレーションカウンターが必要であることで時間を要する欠点があります。さらに、既に細胞内に存在する非放射性の化合物の存在により、数秒、数分間で新規に合成される化合物量を加えた当該化合物量を当該反応時間の前後で厳密に測定し、新規合成化合物量の量的変化を経時的に解析することは、当該化合物の非放射活性の変化を求める必要があることから、全体の分析に多くの時間を必要とします。

これらの状況は、安定同位体 <sup>13</sup>C を用いた解析でも同様であり、細胞からの抽出、質量分析計での分析、定量をリアルタイム実験と並行に進行させることには時間的な制約から困難であると考えられます。また、放射性同位元素を用いる実験に限定して生じる問題として、アイソトープセクターなど放射線管理区域で管理体制が整った限られた環境の下で行われる必要があり、藻類の培養現場もしくはその隣接場所でリアルタイムに培養をモニタリングする方法として用いることは困難です。

一方、TOC 計を用いた解析は、一定時間培養を行った藻類細胞が有する全炭素量の定量値を非破壊細胞で得ることができる点で優位です。さらに、有機炭素量（TOC）だけでなく、細胞内に蓄積されている溶存無機炭素量（DIC<sub>c</sub>）と培養液中に溶存している溶存無機炭素量（DIC<sub>m</sub>）（併せて、総溶存無機炭素量（DIC<sub>t</sub>））の変化も別々に定量できることは大きな利点です。しかし、短時間の培養で細胞に獲得された炭素固定量の変化が小さいときの正確な定量値の解析や、個々の代謝産物の同定やその変化量の解析に困難が伴います。



島津全有機体炭素計  
TOC-L シリーズ



島津フーリエ変換赤外分光光度計  
IRAffinity-1S

図 3 使用装置

表 1 に、一定時間培養したハプト藻 *E. huxleyi* NIES-837 株と CCMP 2090 株が保持する有機炭素量 (TOC<sub>c</sub>) と溶存無機炭素 (DIC<sub>c</sub>) および培養液中の溶存無機炭素 (DIC<sub>m</sub>) を TOC 計で測定した結果を示します。尚、培養液中に放出された有機炭素量は光独立栄養培養においては検出レベル以下でした。また、培養細胞懸濁液 (細胞と培地の両方を含む) の全有機炭素量 (TOC<sub>t</sub>) は TOC<sub>c</sub> と培養液中に含まれる有機炭素量 (培地成分の Tris 緩衝液の量) の総和です。

細胞が保持する有機炭素の測定はバイオ燃料生産過程におけるバイオマス定量のために不可欠です。NIES-837 株は CCMP 2090 株に比べ単位培養液および細胞当たりの TOC<sub>c</sub> 値が高く、NIES-837 株の高い増殖能力と光合成物質生産能力が反映された結果です。また、細胞当たりの DIC<sub>c</sub> 値が高い (約 10 倍) 理由は、主に NIES-837 株が細胞表面に円石 (炭酸カルシウムの殻) を形成・保持することに起因しています。そのため、TOC 計により円石の生産量評価も可能です。

従来、バイオマス量は、細胞数、遠心処理後の細胞容積 (packed cell volume (PCV))、新鮮細胞重量 (wet weight)、乾燥重量 (dry weight)、クロロフィル量などが用いられて

きました。その中で、TOC 計の特徴の一つとして、細胞が保持する有機炭素量 (TOC<sub>c</sub>) と無機炭素量 (DIC<sub>c</sub>)、そして培養液中の無機炭素量 (DIC<sub>m</sub>) の同時測定が可能となる点が挙げられます。特に、DIC<sub>c</sub> / (TOC<sub>c</sub> + DIC<sub>c</sub>) (%) 値に円石形成の有無に起因する両細胞の特徴が明瞭に示されています。

DIC<sub>m</sub> 値 (培養中の細胞懸濁液中の無機炭素量) を見る限り、通常の空気 (約 400 ppm CO<sub>2</sub> を含む) を連続的に通気しているにもかかわらず、空気平衡状態で達成される DIC<sub>m</sub> 値 (pH 8.2 の海水での計算値) の約 53~60%であり、培養系が CO<sub>2</sub> 律速状態になっている可能性を示唆します。その回避のためには、通気速度の向上、通気 CO<sub>2</sub> の培養液中への溶存効率の向上、通気ガス中の CO<sub>2</sub> 濃度の増大、連続希釈による細胞密度の低減などによる、培養の最適化が必要不可欠です。とくに、微細藻類の培養における CO<sub>2</sub> の供給効率の最適化は高バイオマス生産を達成する重要な要因であることから、TOC 計の有効活用により高効率な藻類バイオマス生産システムの構築が可能です。

表 1 TOC 計による海洋ハプト藻類円石藻 *Emiliania huxleyi* NIES-837 株 (円石形成株) と CCMP 2090 株 (円石形成能欠損株) の培養細胞の有機炭素 (TOC<sub>c</sub>)、無機炭素 (DIC<sub>c</sub>) および培地の無機炭素濃度 (DIC<sub>m</sub>) の測定結果

Strain <sup>a</sup>	NIES-837		CCMP 2090	
	/L	/10 <sup>10</sup> cells	/L	/10 <sup>10</sup> cells
Cell number in the culture (× 10 <sup>10</sup> cells)	1.0	–	1.5	–
DIC of medium (DIC <sub>m</sub> ) <sup>b</sup> (mg)	14.3	–	12.7	–
DIC <sub>m</sub> / (DIC <sub>m</sub> equilibrated with air) (%)	59.6	–	52.9	–
TOC of cells (TOC <sub>c</sub> ) (mg)	139.4	134.0	108.7	71.0
DIC of cells (DIC <sub>c</sub> ) (mg)	7.2	6.9	1.1	0.7
TOC <sub>c</sub> + DIC <sub>c</sub> (mg)	146.6	140.9	109.8	71.7
DIC <sub>c</sub> / (TOC <sub>c</sub> + DIC <sub>c</sub> ) (%)	5.0	5.0	1.0	1.0

<sup>a</sup> 培養条件：白色蛍光灯 (光強度 100 μmol/m<sup>2</sup>/s) により、片面から連続光照射を行い、温度 20 °C に保ち、通常大気を通気速度 100 mL/min の速度で連続的に通気を行い、細胞懸濁液を均一に維持した。人工海水培地 (MA-ESM、pH 8.2) を含む 500 mL 容扁平ガラス培養瓶中で培養した。7~13 日培養後に定常期の細胞を回収した。細胞回収から TOC 計による TOC と DIC 測定までは、遠心分離とフィルター濾過操作を行うため、30 分程度の時間を要した。尚、NIES-837 株は 1 回の実験結果で、CCMP 2090 株は 3 回の実験結果の平均で示した。

<sup>b</sup>： 通常の空気に対して平衡状態を保つ pH8.2 の海水 (藻類細胞不在) が 20 °C で保持する総 DIC 濃度は約 2 mM である。したがって、約 24 mg/L の炭素を保持する。

## 4. フーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR) による微細藻類の貯蔵脂質・長鎖不飽和ケトン (アルケノン) の同定および定量<sup>15)</sup>

### FT-IR の特徴と問題点

FT-IR は、赤外線吸収スペクトルから分子の構造や官能基の情報を得ることで、物質の定性・同定に関する有効な情報を得ることができる分析装置です。試料に赤外線 (中間赤外、4000~400 cm<sup>-1</sup>) を照射することで、物質の分子振動に特有の振動数の赤外線が吸収される原理を応用しています<sup>16)</sup>。上述のように、生体試料を非破壊で解析できる点に他の分析法とは異なる優位性があり、これまで、FT-IR 法を用いて様々な生体試料の解析が行われています。バイオ燃料生産に関する研究と関連して微細藻類の生細胞を用いた研究例も報告されるようになりました<sup>17)、18)、19)</sup>。

しかしながら、単一の物質であっても様々な官能基を有するため、得られるスペクトル波形は多用で、生体試料のように多くの多様な物質が混在する状態では特定の物質を同定し、その量的情報を得ることは容易ではありません。さらに、或る特定の官能基はそれらの様々な物質にも含まれること

から、得られる多様なスペクトルの重なり状態を解析し、それから特定の物質を同定することには大きな困難を伴います。そして、標準試料により作成する検量線を用いた定量分析が困難である場合は、それらの解析結果が与えるのは「相対値」となります。

ただし、生体試料に含まれる有機物に限定すれば、その主成分が炭水化物、タンパク質、脂質、核酸、有機酸、アミノ酸、脂肪酸であることから、その試料に含まれる全有機炭素量、物質組成、それらの物質の相対値を求めることができれば、或る特徴的な官能基を有する特定の物質に限定して考えれば、その大まかな量的情報を「セミ定量値」として得ることが可能です。

本稿では、筆者らが開発した TOC 計と FT-IR 装置を組み合わせることで新たに開発した藻類細胞の有機炭素のセミ定量法<sup>15)</sup>について解説します。

### 海洋ハプト藻類が生産する貯蔵脂質アルケノンの量的情報の解析

藻類においては、乾燥細胞を直接 FT-IR で解析し、得られた FT-IR スペクトルから生物にとって主要な有機化合物である炭水化物、タンパク質および脂質のピークを同定し、それらを定量する技術が開発されました<sup>20)、21)</sup>。この技術は、それぞれの構成成分を抽出し解析するステップの省略、抽出溶媒の不使用、分析時間の短縮が大きな利点です。筆者らは、一定量の乾燥細胞を試料とし、バイオ燃料候補として注目している海洋ハプト藻が合成する中性脂質分子・アルケノン (炭素数 37~39 を主な構成分子とする長鎖不飽和ケトンで 2~4 個のトランス型二重結合と 1 個のケト基を有する分子 (図 2)) の総量を、FT-IR 法を用いてセミ定量的に簡便かつ迅速に行う分析方法の開発を試みました<sup>15)</sup>。

本研究では、FT-IR 装置として島津製作所の IRAffinity-1S を使用しました (図 3)。分解 4 cm<sup>-1</sup>、積算回数 32 回、波数 4000~500 cm<sup>-1</sup> の条件で、セラミックス光源と DLATGS 検出器を用いて測定を行いました。

微細藻類の培養系から収穫後、遠心回収した細胞を 0.5 M ギ酸アンモニウムで洗浄し、再び 0.5 M ギ酸アンモニウム液中に懸濁した 100~200 μL の試料をシリコン製の円形窓板上に置き、80 °C で 3 時間乾燥させ、それを解析用試料 (非破壊細胞の試料) としました。細胞試料を含まない 0.5 M ギ酸アンモニウム溶液 (100~200 μL) のみを円形窓板上に載せて乾燥させ、ブランク・バックグラウンド用試料 (参照) を準備しました。それら 2 つの円形窓板 (試料と参照) を順次クリップホルダーで固定し、FT-IR 装置に装着し透過法で測定しました。

それらについて得られた FT-IR スペクトルについて、試料スペクトルから参照のスペクトルを差し引いて、細胞試料のみの FT-IR スペクトルを求めました。

得られた FT-IR スペクトルを解析し、炭水化物、タンパク質および脂質を含む有機化合物の分析法<sup>20)、21)</sup>と同様の方法をアルケノンの分析に適用しました。得られたスペクトルにおいて、962.5、1057、1655、1737 cm<sup>-1</sup> のピーク面積を、それぞれアルケノン、炭水化物、タンパク質およびアルケノン以外の脂質の量的指標として用いました。解析は FT-IR 制御ソフトウェア IRsolution のプログラムを通常用い、幾つかのピークが重なり合っている吸収帯から個別のピークに分離するためには、オプションプログラム波形分離を用いました。

ここでは、細胞の保持する主要な有機炭素は炭水化物、タンパク質、中性脂質アルケノンおよびアルケノン以外の脂質 (膜脂質など) から構成されると見なすことで、概算的にそれを全有機炭素量 (100 %) と仮定し、各構成成分の全有機炭素量に対する割合 (相対値) を算出しました。そして、別途 TOC 計を用いて測定した試料 (細胞) の全有機炭素量 (TOC 値) を各構成成分の割合に振り分けることで、各構成成分の定量値 (セミ定量値) を算出しました。したがって、ここで求められた値はあくまでも仮定に基づき算出されたものであり、参考値 (セミ定量値) に過ぎないことを明記しなければなりません。

アルケノン生産ハプト藻類株の FT-IR スペクトル解析

アルケノン生産性ハプト藻類 2 株 (*E. huxleyi* NIES-837 と CCMP 2090) とアルケノン非生産性ハプト藻類株 (*Pleurochrysis carterae*) の乾燥細胞 (非破壊・非抽出) を用いた場合の FT-IR スペクトルを図 4 に示しました。これらのスペクトルを解析し、3 種類のハプト藻で共通に見られる炭水化物、タンパク質、脂質 (アルケノンを除いた脂質) などは、FT-IR スペクトルから約 10 種類の特性ピークとして分離できました (表 2)。

その中で、吸収帯 1732~1737 cm<sup>-1</sup> は、脂肪酸エステルと脂肪酸の C=O 対称伸縮振動の吸収であり、その吸光度は *P. carterae* で他の藻類株より極めて高く、本株を特徴付けるものでした (図 4 のピーク e)。*P. carterae* はアルケノン进行貯蔵せず、中性脂質トリアシルグリセロール (TAG) を貯蔵物質にしていますが、他のアルケノン生産性の 2 株は TAG を貯蔵しないという知見に一致します。

一方、アルケノン生産ハプト藻 2 株には、アルケノン非生産株には存在しない特異的なピークが 2 つ存在し、それらは吸収帯 1705.5 cm<sup>-1</sup> と 962.5 cm<sup>-1</sup> の 2 つのピークでした (図 4)。1705.5 cm<sup>-1</sup> はケト基の C=O 伸縮振動の吸収帯です (図 4A、B におけるピーク e と f の間の白矢印)。また、962.5 cm<sup>-1</sup> はトランス型二重結合の C-H 振動の吸収帯です (図 4A、B における黒矢印)。以上から、この 2 つの特性ピークはアルケノン分子を特徴付ける 2 つの吸収帯に起因するものであると判断できます。すなわち、これら 2 吸収帯は FT-IR スペクトル法によるアルケノン分子の検出に有効であることが明らかとなりました。尚、これら 2 つのアルケノン进行特徴付ける吸収帯のうち、962.5 cm<sup>-1</sup> のピークの方が高い吸光度を示したことから、962.5 cm<sup>-1</sup> に注目して更なる解析を行いました。

表 2 アルケノン生産ハプト藻 *E. huxleyi* CCMP 2090 (A)、NIES-837 (B) およびアルケノン非生産ハプト藻 *P. carterae* (C) における FT-IR スペクトルの主要ピーク (Pelusi et al. 2016)

Peak #	Peaks detected in three strains used in this study <sup>a</sup>	Main absorption bands reported for microalgae in the literature <sup>b</sup>		
		Wavenumber (cm <sup>-1</sup> )	Band assignment	Functional groups
a	3287 (C), 3289 (A, B)	3400-3200	νO-H/νN-H	Water, protein
b	2955 (A, B, C)	≈2960	vasCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> methyl group
c	2922 (A, B, C)	≈2930	vasCH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> methylene group
d	2849 (A, B, C)	≈2850	νCH <sub>2</sub> , νCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> and CH <sub>3</sub> methyl & methylene groups
e	1732 (B), 1734 (C), 1737 (A)	≈1745	νC=O	Ester of lipids and fatty acids
f	1655 (A, C), 1651 (B)	≈1655	νC=O	Protein (Amide I)
g	1541 (A, C), 1548 (B)	≈1545	δN-H, νC-N	Protein (Amidell)
h	No major peak detected	≈1455	δasCH <sub>2</sub> , δasCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> and CH <sub>3</sub> methyl and methylene groups
i	1375 (B), 1377 (A), 1379 (C)	≈1390	δsCH <sub>2</sub> , δCH <sub>3</sub> , νC-O	CH <sub>2</sub> and CH <sub>3</sub> of proteins / carboxylic groups
j	1242 (A), 1244 (C), 1249 (B)	≈1240	vasP=O	Phosphodiester of nucleic acids and phospholipids
k	1057 (A, B), 1060 (C), 1163 (C), 1165 (A, B)	1200-900	νC-O-C	Polysaccharides / siloxane
l	Not detected	1075, 950	νSi-O	Siloxane, silicate frustules
m	Not detected	980-940	P-O-P	polyphosphate

ν=symmetric stretching、vas=asymmetrical stretching、δs=symmetric deformation、δas=asymmetrical deformation.

<sup>a</sup>: 図 4 の FT-IR スペクトルから計算

<sup>b</sup>: スペクトル解析における波長帯については文献 (Mayers et al. 2013) <sup>21)</sup> を参照



### 精製アルケノン分子のFT-IR スペクトル解析

アルケノン標品は市販されていないため、第3者が調製した標準品を得ることはできません。しかし、アルケノン生産藻類細胞から、メタノールとジクロロメタンによる脂質粗抽出、シリカゲルカラムを用いたヘキサンと酢酸エチル混合液による溶出の操作を経てアルケノンを抽出・精製する方法は既に確立されています<sup>22)</sup>。そこで、アルケノン精製品を *E. huxleyi* NIES-837 乾燥細胞 (10 g) から抽出し調製しました (図 2C)。このアルケノン精製標品を用いて、その FT-IR スペクトルを測定したところ、極めて高い吸光度を  $962.5\text{ cm}^{-1}$  のピークで検出しました (図 5)。

したがって、以上の結果から、吸収帯  $962.5\text{ cm}^{-1}$  はアルケノン分子に特異的なトランス型二重結合の C-H 振動の吸収であることが確認できました。

さらに、 $962.5\text{ cm}^{-1}$  のピーク以外に、アルケノンの FT-IR スペクトルでは、2912、2845、1705、1460、および  $719\text{ cm}^{-1}$  の特性ピークが観察され、それぞれアルケノン分子に存在する  $\text{CH}_2$  の非対称伸縮振動 (図 4 のピーク c)、 $\text{CH}_2$  と  $\text{CH}_3$  の C-H 対称伸縮振動 (図 4 のピーク g)、ケト基の C=O 伸縮振動、 $\text{CH}_2$  と  $\text{CH}_3$  の C-H 非対称変角振動 (図 4 のピーク h) および C-H 変角振動の吸収と考えられます。

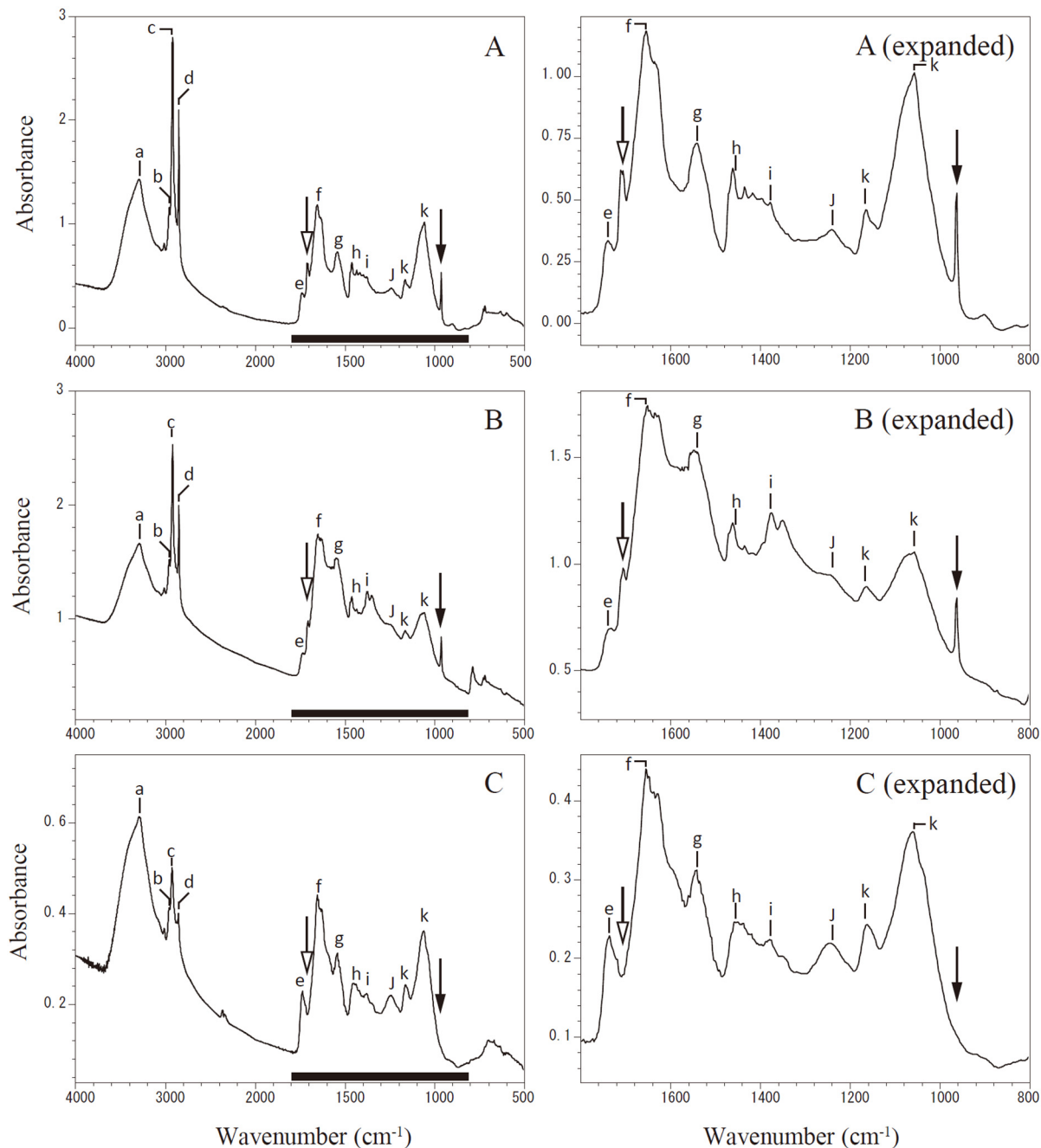


図 4 アルケノン生産ハプト藻 *E. huxleyi* CCMP 2090 (A)、*E. huxleyi* NIES-837 (B) およびアルケノン非生産ハプト藻 *P. carterae* (C) 細胞の FT-IR スペクトル (Pelusi et al. 2016)<sup>15)</sup>

FT-IR スペクトルは  $4000\sim 500\text{ cm}^{-1}$  の波長で測定し (左図、A~C)、 $1800\sim 800\text{ cm}^{-1}$  の波長を拡大した (右図、A (expanded) ~C (expanded))、黒矢印はアルケノンのトランス型二重結合で生じる  $962.5\text{ cm}^{-1}$  のピークを、白矢印はアルケノンのケト基で生じる  $1705.5\text{ cm}^{-1}$  のピークを示している。

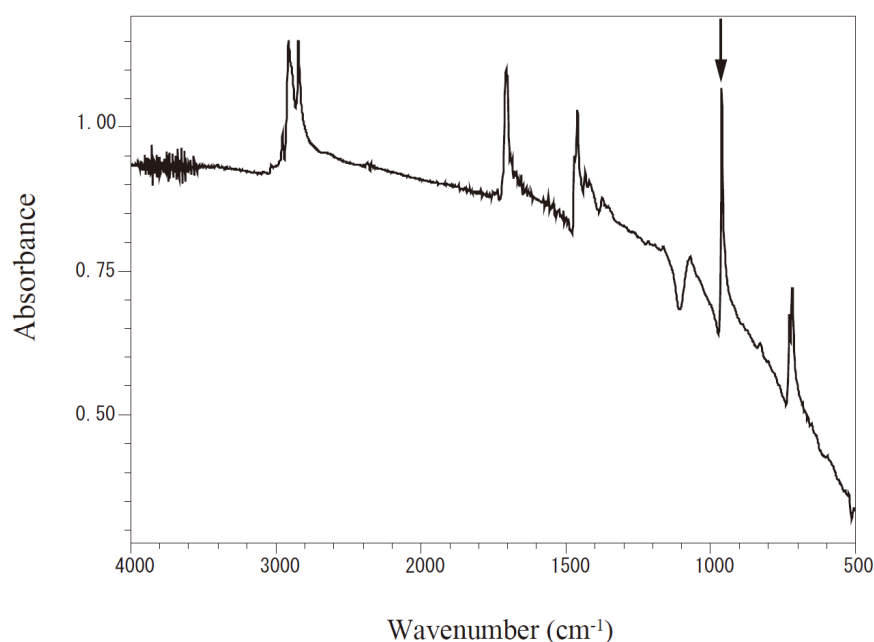


図5 アルケノンのFT-IR スペクトル (Pelusi et al. 2016)

図 2C で示したアルケノンをヘキサンと酢酸エチルの 9 : 1 混合液で溶解後、シリコン製の円形窓板上で 80 °C で 3 時間乾燥後、FT-IR で測定。矢印は図 4 参照

### トランス型二重結合を有する分子の FT-IR スペクトル解析

トランス型二重結合を分子構造にもつトランス-9、12-オクタデカジエン酸メチルエステルを標品として FT-IR 測定を実施しました。波数帯 970~960  $\text{cm}^{-1}$  で 1 つのピークが明瞭に観察されました (図 6A)。一方、シス型二重結合を分子構造にもつリノール酸メチルと三置換二重結合を分子構造にもつスクワレンを FT-IR で測定すると、波数帯 970~960  $\text{cm}^{-1}$  のピークは存在せず、シス型特有の吸収と三置換二重結合特有の吸収がそれぞれ 723.3  $\text{cm}^{-1}$  と 835.2  $\text{cm}^{-1}$  で観察されました (図 6B、C)。

波数帯 970~960  $\text{cm}^{-1}$  のピークは、トランス型二重結合の C-H 振動の吸収であり<sup>16)</sup>、トランス型二重結合を分子構造にもつ油成分 (脂質) のすべての標品は波数帯 970~960  $\text{cm}^{-1}$

のピークを有します<sup>23)</sup>。したがって、アルケノン生産性ハプト藻の FT-IR スペクトルに特徴的な 962.5  $\text{cm}^{-1}$  のピークは、アルケノン分子のトランス型二重結合の C-H 振動の吸収帯であり、FT-IR によるアルケノン分子の検出に利用できると結論できます。さらに、他のアルケノン生産性ハプト藻 *Tisochrysis lutea* (T-iso)、*T. lutea* CCMP 463 および *Chrysotila lamellosa* CCMP 1307 の非破壊細胞の FT-IR スペクトルにおいても、吸収帯 962.5  $\text{cm}^{-1}$  のピークは明らかに観察され

(図 7A~C)、一方で、アルケノン非生産ハプト藻では観察されない (図 4C) ことが明らかに示されました。したがって、以上の結論は明らかに支持されるものと判断しました。

### アルケノン以外の細胞構成成分の FT-IR スペクトル解析

アルケノン生産ハプト藻 *E. huxleyi* CCMP 2090 の培養において、定常増殖期の培養細胞を収穫し、その細胞の FT-IR スペクトルにおける 962.5、1057、1655、1737  $\text{cm}^{-1}$  のピーク面積を基に、アルケノン、炭水化物、タンパク質およびアルケノン以外の脂質の定量的解析を行いました (表 3)。その結果、全有機炭素の約 17.3% がアルケノンに配分されることを確認できました。

一方、放射性同位体  $^{14}\text{C}$  を基質として与えた後、24 時間光合成反応を行わせ、放射能取り込みが定常状態となるまで細胞が合成する炭素化合物 (代謝産物) を放射能標識し、各

光合成産物への  $^{14}\text{C}$ -炭素の動態変化を調べる実験を行いました。その結果、 $^{14}\text{C}$  で標識された全有機炭素の約 17% がアルケノンに配分されることが明らかとなりました<sup>24)</sup>。

以上に示したように、解析法の異なる独立した実験において、奇しくもアルケノンへの炭素配分割合が一致したことから、FT-IR 法を用いて算出したアルケノンへの分配割合を、全有機炭素量に対するアルケノン合成量の割合と解釈することで、おおまかな定量 (セミ定量) 解析が可能になると判断しました。

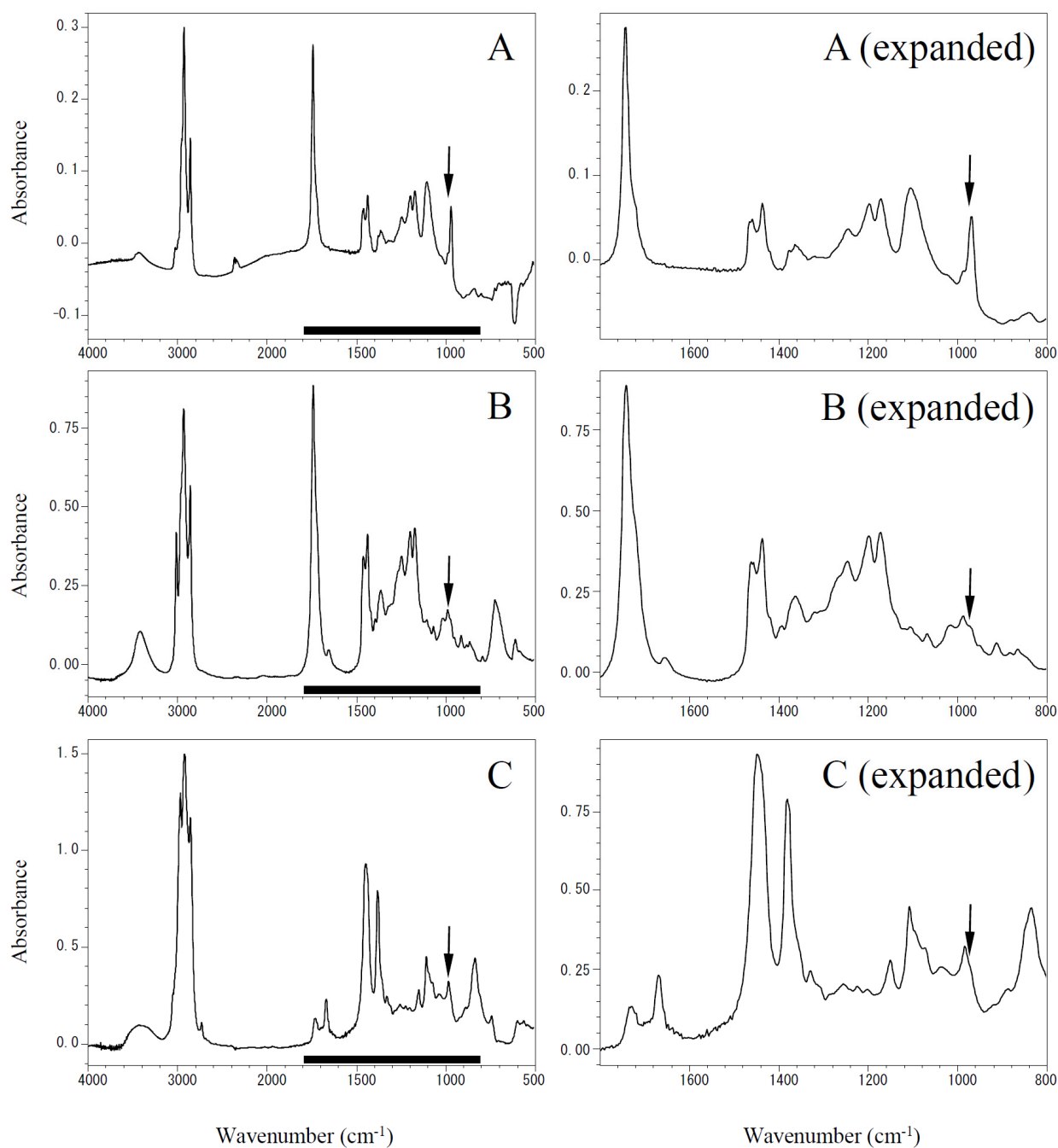


図6 解析に用いた各種標準物質のFT-IR スペクトル  
 (A) トランス-9, 12-オクタデカジエン酸メチルエステル (トランス型二重結合の標準物質)  
 (B) リノール酸メチル (シス型二重結合の標準物質)  
 (C) スクワレン (三置換体二重結合の標準物質) のFT-IR スペクトル  
 (Pelusi et al. 2016)、矢印については図4を参照

表3 *E. huxleyi* CCMP 2090 細胞のFT-IR スペクトルから決定したアルケノンと他の主要な生物を構成する有機炭素化合物の存在比 (Pelusi et al. 2016)

Alkenones (%)	Carbohydrates (%)	Proteins (%)	Lipids except alkenones (%)
17.29 ± 1.29	46.75 ± 5.10	32.42 ± 3.86	3.54 ± 1.76

3回独立した実験を行い、値は平均値 ± 標準偏差で示した。

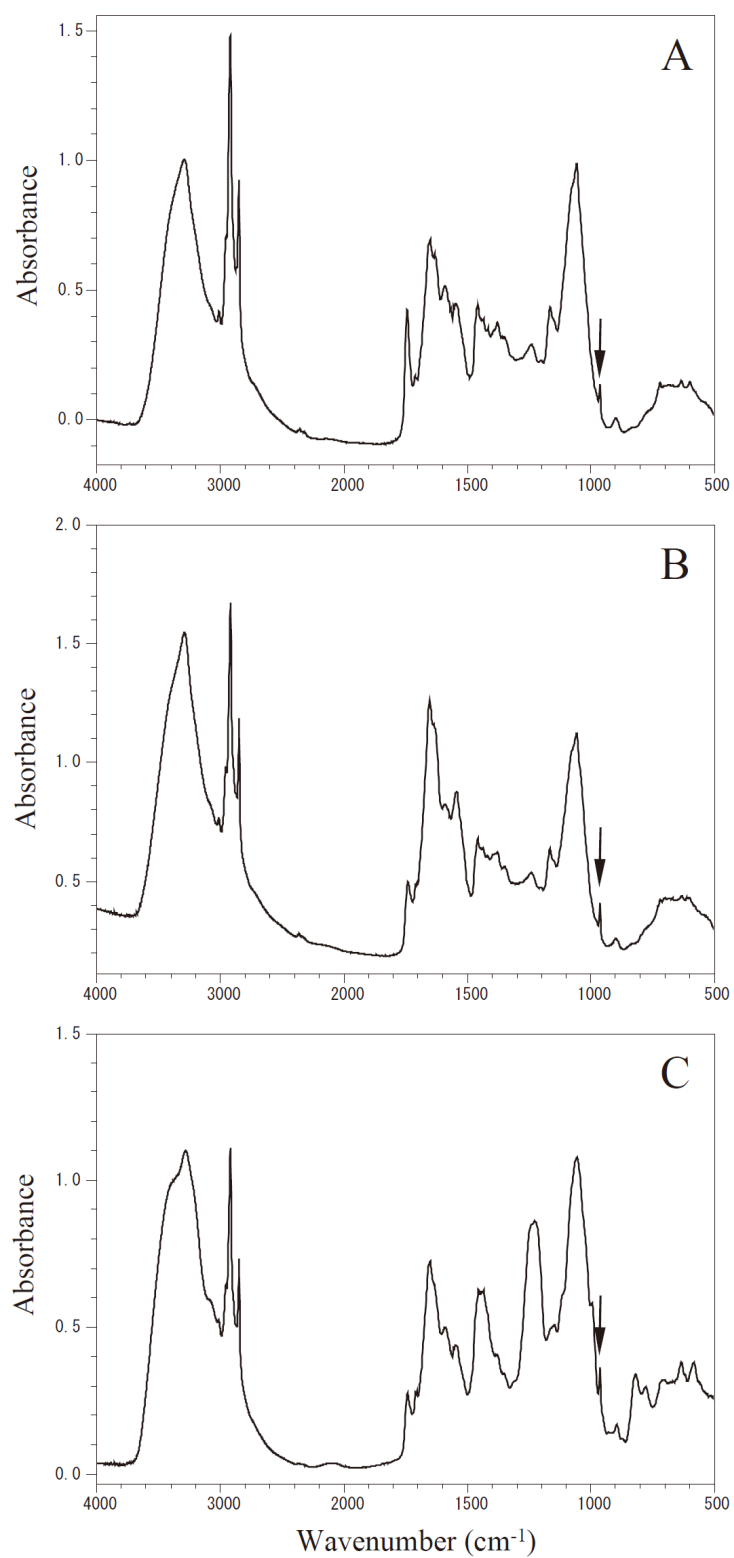


図7 3種類のアルケノン生産ハプト藻の細胞のFT-IR スペクトル (Pelusi et al. 2016)  
(A) *T. lutea* (T-iso)  
(B) *T. lutea* CCMP 463  
(C) *C. lamellosa* CCMP 1307  
矢印については図4を参照



## 5. FT-IR と TOC 計を組み合わせたアルケノンのセミ定量解析

アルケノンの生産性の評価は、藻類細胞全体のバイオマス量とアルケノン量の 2 つの生産能力を指標としてはじめて可能となります。藻類細胞によるアルケノンの生産能力は、FT-IR によるアルケノン量の割合の測定、すなわち全有機炭素量に対するアルケノンへの炭素分配割合によって評価できます。藻類細胞のバイオマス量は細胞の全有機炭素量を TOC 計によって測定することで決定できます。

実際の測定において、アルケノン生産性ハプト藻 *E. huxleyi* CCMP 2090 の定常期の細胞では、全有機炭素は約 108.7 mg/L、全有機炭素のアルケノンへの分配は約 17.3 %でした(表 3、4、5)。したがって、定常期の *E. huxleyi* CCMP 2090 細胞が生産するアルケノンの炭素量は 19.0 mg/L (1 L の培養液で 19 mg) であることが分かります(表 5)。

アルケノン量はガスクロマトグラフィー解析による定量的評価方法が確立していることから、上記の定常期の *E. huxleyi* CCMP 2090 細胞から抽出した精製アルケノンをガスクロマトグラフィーで解析しました。本研究では、キャピラリーカラム CP-SIL 5CB (長さ 50 m、内径 0.25 mm) を装着した島津製作所製 GC-2014 AFSC GC-FID を使用しました。カラムオープン温度は 80 °C、3 分間保持し、15 °C/min で 180 °C まで昇温させ、さらに 10 °C/min で 310 °C まで昇温させた後、20 分間保持しました。ヘリウムガスをキャリアとし、流圧は 109.7 kPa、流速は 2.0 mL/min、気化室と検出器の温度は 320 °C と設定しました。サンプルはスプリットレスモードで 1 µL 注入しました。

定常期の *E. huxleyi* CCMP 2090 細胞では、2 つの二重結合をもつ C37-アルケノンと C38-アルケノン (C37:2 と C38:2) が

最も多く存在しました(表 4)。3 個の二重結合をもつ C37-アルケノンと C38-アルケノン (C37:3 と C38:3) はその次に多く存在し、C39-アルケノンはわずかに存在しました(表 4)。定常期の *E. huxleyi* CCMP 2090 細胞において、細胞当たりのアルケノン合成量は 1.3~1.5 pg/cell、一定の培養液当たりのアルケノン合成量は 13.7~27 mg/L でした(表 4)。また、炭素分子量はアルケノン一分子中当たり 83.5 %占め(表 4)、細胞の保持する全有機炭素量は約 108.7 mg/L でした(表 4、5)。したがって、定常期の *E. huxleyi* CCMP 2090 細胞が生産するアルケノンの炭素量は約 17.8 mg/L であり、全有機炭素の約 16.5 % (12.8~20.5%) がアルケノンに分配されていることが、GC-FID 解析から求められました(表 5)。

以上の結果は、*E. huxleyi* が生産するアルケノンの炭素量について、FT-IR 法と TOC 計を組み合わせた解析法の結果と GC-FID 解析法の結果とが良く一致したことを示すものです。このように、筆者らが開発した FT-IR と TOC 計を組み合わせたアルケノンの定量法は、セミ定量法ながら、GC-FID 解析による定量値と近似しており、「迅速かつ簡便に培養中のアルケノン生産性藻類によるアルケノン生産量を、非破壊細胞を用いてセミ定量することに有用である」ことを実験的に示すことができたものと考えています。この成果は、バイオ燃料生産研究の現場などにおいて、その生産量の最適化や生産効率の向上のための培養条件や培養システムの最適化の開発研究に有用なツールとなると期待されます。今後、アルケノンに限らず、他の細胞構成成分についても、非破壊でのセミ定量化技術が開発される端緒となれば幸いであると考えています。

表 4 GC-FID 解析で決定した *E. huxleyi* CCMP 2090 におけるアルケノン分子種の構成 (Pelusi et al. 2016)

Alkenones	Amounts [mg (L culture) <sup>-1</sup> ] (% of total alkenones)		
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
C37:3Me	3.22 (15.6)	3.58 (23.2)	5.99 (22.0)
C37:2Me	8.59 (41.5)	4.37 (28.4)	7.15 (26.2)
C38:3Et	1.11 (5.4)	1.59 (10.3)	2.89 (10.7)
C38:3Me	0.66 (3.2)	0.87 (5.6)	1.28 (4.6)
C38:2Et+Me	6.51 (31.3)	4.25 (27.3)	8.48 (31.2)
C39:3Et	0.10 (0.5)	0.21 (1.4)	0.38 (1.4)
C39:2Et	0.52 (2.5)	0.60 (3.9)	1.10 (4.0)
Total alkenones <sup>a</sup>	20.71 (100)	15.47 (100)	27.27 (100)
Total alkenone/10 <sup>9</sup> cells (mg)	1.41	1.53	1.33
Alkenone carbon contents (%) <sup>b</sup>	83.52	83.55	83.55
Total alkenone carbons <sup>c</sup> [mg (L culture) <sup>-1</sup> ]	17.30	12.92	22.79
Total organic carbons (TOC) [mg (L culture) <sup>-1</sup> ] <sup>d</sup>	134.9	80.1	111.2
Cell density in algal culture [× 10 <sup>9</sup> cells (L culture) <sup>-1</sup> ]	14.7	10.1	20.5
Total alkenone carbons/TOC (%)	12.82	16.13	20.50
Total alkenone carbons/10 <sup>9</sup> cells (mg)	1.18	1.28	1.11

<sup>a</sup>: それぞれの実験において、種々のアルケノン分子種の合計の値を記載した。

<sup>b</sup>: それぞれの実験において、実験的に決定した各種のアルケノン分子種の分子量の計算値とそれぞれのアルケノン分子種の含有割合 (総炭素量当たりの%) から、総てのアルケノン分子種の合計値に占める炭素の含有量を求めた。

<sup>c</sup>: それぞれの実験において、式 (a × b/100) を用いて総アルケノン分子中に含まれる炭素含有量を計算した。

<sup>d</sup>: この値は TOC 計を用いて計測した。

表5 GC-FIDとFT-IRで定量化した*E. huxleyi*CCMP 2090細胞のアルケノン含有量 (Pelusi et al. 2016)

Analytical method	Total organic carbons (TOC) (mg/L)	Total alkenones (mg/L)	Total alkenone carbons/TOC (%)	Total alkenone carbons (mg/L)
TOC	108.73 ± 27.48 <sup>a</sup>	—	—	—
GC-FID	—	21.15 ± 5.92 <sup>b</sup>	16.48 ± 3.85 <sup>c</sup>	17.67 ± 4.95 <sup>d</sup>
FT-IR	—	—	17.29 ± 1.29 <sup>e</sup>	19.00 ± 6.10 <sup>f</sup>

<sup>a</sup>: 実験的に決定した。値は表4の項目 TOC における Exp. 1-3 の平均値を記載した。  
<sup>b</sup>: 細胞から抽出したアルケノンを GC-FID で分析し、実験的に決定した。値は表4の項目 Total alkenones における Exp. 1-3 の平均値を記載した。  
<sup>c</sup>: 値は表4の項目 Total alkenone carbons/TOC における Exp. 1-3 の平均値を記載し、計算式 (d × 100/a) で求められる。  
<sup>d</sup>: 値は表4の項目 Total alkenone carbons における Exp. 1-3 の平均値を記載し、b から求められる。  
<sup>e</sup>: Alkenone content (%) は FT-IR 分析によって実験的に概算した (表3)。FT-IR 分析で決定した Alkenone content (%) は表4と5における Total alkenone carbons/TOC に相当する。  
<sup>f</sup>: 値は式 (e × a/100) で計算した。

6. 謝辞

本研究は、JST/CREST の研究領域「藻類・水圏微生物の機能解明と制御によるバイオエネルギー創成のための基盤技術の創出」(領域代表：松永是東京農工大学長) における研究課題「海洋ハプト藻類のアルケノン合成経路の解明と基盤技術の開発」(研究代表者：白岩善博、FY2010-16) の支援を受けて実施されました。

参考文献

1) Volkman JK, Eglinton G, Corner EDS, Forsberg TEV (1980) Phytochemistry, 19, 2619–2622, [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)83930-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83930-8).  
2) Volkman JK, Barrett SM, Blackburn SI, Sikes EL (1995) Geochim. Cosmochim. Ac., 59, 513–520, [http://dx.doi.org/10.1016/0016-7037\(95\)00325-T](http://dx.doi.org/10.1016/0016-7037(95)00325-T).  
3) Conte MH, Volkman JK, Eglinton G, The Haptophyte Algae (eds. J.C. Green, B.S.C. Leadbeater), Systematics Association Special Volume No. 51, pp. 351–357 (Chapter 19). Clarendon Press, Oxford, 1994. ISBN-13: 978-0198577720, ISBN-10: 0198577729.  
4) 沢田 健、月刊 海洋 32 (2000) 606–612.  
5) Hay WW, Molecular Processes to Global Impact (eds. HR Thierstein, JR Young), Springer Berlin Heidelberg New York. 2004. ISBN 3-540-21928-5.  
6) Holligan PM, Viollier M, Harbour DS, Camus P, Champagne-Philippe M (1983) Nature (London), 304, 339–342, <http://dx.doi.org/10.1038/304339a0>  
7) Heimdal BR, Marine Phytoplankton—A Guide to Naked Fragellates and Coccolithophorids (ed. CR Thomas), Academic Press, San Diego. 1983. ISBN 0-12-693010-4.  
8) Toney JL, Huang Y, Fritz SC, Baker PA, Grimm E, Nyren P (2010) Geochim. Cosmochim. Acta, 74, 1563–1578, <http://dx.doi.org/10.1016/j.gca.2009.11.021>.  
9) Longo WM, Theroux S, Giblin AE, Zheng Y, Dillon JT, Huang Y (2016) Geochimica et Cosmochimica Acta, 180, 177–196, <http://dx.doi.org/10.1016/j.gca.2016.02.019>.  
10) Shi Q, Araie H, Bakku R, Fukao Y, Rakwal R, Suzuki I, Shiraiwa Y (2015) Proteomics, 15, 4145–4158, <http://dx.doi.org/10.1002/psmic.201500010>.  
11) Read BA, Kegel J, Klute MJ, Kuo A, Lefebvre SC, Maumus F, Mayer C, Miller J, Monier A, Salamov A, Young J, Aguilar M, Claverie J-M, Frickenhaus S, Gonzalez K, Herman EK, Lin Y-C, Napier J, Ogata H, Sarno AF, Shmutz J, Schroeder D, de Vargas C, Verret F, von Dassow P, Valentin K, Van de Peer Y, Wheeler G, Emiliania huxleyi Annotation Consortium† (Allen AE, Bidle K, Borodovsky M, Bowler C, Brownlee C, J. Cock M, Elias M, Gladyshev VN, Groth M, Guda C, Hadaegh A, Iglesias-Rodriguez MD, Jenkins J, Jones BM, Lawson T, Leese F, Lindquist E, Lobanov A, Lomsadze A, Malik S-B, Marsh ME, Mackinder L, Mock T, Mueller-Roeber B, Pagarete A, Parker M, Probert I, Quesneville H, Raines C, Rensing SA, Riaño-Pachón DM, Richier S, Rokitta S, Shiraiwa Y, Soanes DM, van der Giezen M, Wahlund TM, Williams B, Wilson W, Wolfe G & Wurch LL), Dacks JB, Delwiche CF, Dyhrman ST, Glöckner G, John U, Richards T, Worden AZ, Zhang X and Grigoriev IV (2013) Nature, 499, 209–213, <http://dx.doi.org/10.1038/nature12221>. p  
12) Malitsky S, Ziv C, Rosenwasser S, Zheng S, Schatz D, Porat Z, Ben-Dor S, Aharoni A, Vardi A (2016) New Phytol., 210, 88–96, <http://dx.doi.org/10.1111/nph.13852>.  
13) 島津製作所、アプリケーションニュース No. O49 (2014).  
14) 島津製作所、アプリケーションニュース No. O50 (2014).  
15) Pelusi A, Hanawa Y, Araie H, Suzuki I, Giordano M, Shiraiwa Y (2016) Algal Research, 19, 48–56, <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.07.006>.  
16) Smith BC, Infrared spectral interpretation: a systematic approach, first ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1999.  
17) Giordano M, Kansiz M, Heraud P, Beardall J, Wood B, McNaughton D (2001) J. Phycol., 37, 271–279, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1529-8817.2001.037002271.x>.  
18) Giordano M, Ratti S (2013) J. Appl. Phycol., 25, 1431–1434, <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-012-9966-2>.  
19) Giordano M, Palmucci M, Norici A (2015) J. Appl. Phycol., 27, 1401–1413, <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-014-0457-5>.  
20) Palmucci M, Ratti S, Giordano M (2011) J. Phycol., 47, 313–323, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.00963.x>.  
21) Mayers JJ, Flynn KJ, Shields RJ, (2013) Bioresour. Technol., 148, 215–220, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.133>.  
22) Sawada K, Handa N, Shiraiwa Y, Danbara A, Montani S (1996) Org. Geochem., 24, 751–764, [http://dx.doi.org/10.1016/S0146-6380\(96\)00087-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0146-6380(96)00087-3).  
23) Guillen MD, Cabo N (1997) J. Am. Oil Chem. Soc., 74, 1281–1286, <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-997-0058-4>.  
24) Tsuji Y, Yamazaki M, Suzuki I, Shiraiwa Y (2015) Mar. Biotechnol., 17, 428–440, <http://dx.doi.org/10.1007/s10126-015-9632-1>.  
25) Marlowe IT, Brassell SC, Eglinton G, Green JC (1984) Org. Geochem., 6, 135–141, [http://dx.doi.org/10.1016/0146-6380\(84\)90034-2](http://dx.doi.org/10.1016/0146-6380(84)90034-2).  
26) Rontani JF, Prah FG, Volkman JK (2006) J. Phycol., 42, 800–813, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00251.x>.