

# 水産種苗生産過程での餌料用海産性微細藻類の 培養効率化に関する研究

奥村 裕弥\*

Study of the effeciental cultivation of marine microalge on mass algae cultivation system for mariculture breeding

Hiroya OKUMURA\*

In Mariculture, micro-alga is necessary to use breeding for shellfish. It is difficult to cultivate mass volume chamber under artificial luminair in marine-micro-algae. A lot of type cultivation systems were made to mass production of foods for men or another. Popularly a kind of alga *Chlorella* was produced in fresh water under Sun light. We made a mass production system for micro-algae using artificial luminair. It was possible to controll at water temperature, air flow and light intensity in luminair, and have a 200L chamber (*artemia* hatching jar) in this system.

In first section, we described component of mass algae cultivation system and light environment of chamber fulled sea water or cultured sea water. Air condition was exminated *Pavlova lutheri* (Droop) Green culture in several inflow conditions and babble size conditions, it was basically factor in cultivation. Optic value was found then. Espeally, According to change inflow of air, maximum cell density was changed. It indicated mixture of the chamber relate to a factor of cultivation condition.

In second section, we described to response maximum cell density to light intensity condition, and to appear special characteristic of chamber in algae cultivation. In high light intensity irradiation, it was not occurred light inhabitation at low cell density. Maximum cell density was as higher as light intensity irradiation. It suggested higher maximum cell density was necessary to irradiate higher light intensity. But cell growth ratio was not changed in each light intensity conditions. It would saturate photosynthesis in each light intensity conditions. Then it suggested cell growth ratio was not related to light intensity condition.

In third section, we simulated light environment in the chamber to reduce to light intensity at luminair during cultiured period and optimized to the PPF (Photosynthesis Photon Flux Density) in luminair according to increace cell density. Using light absorbtion ratio of micro-alga in several cell densities, shape of chamber and light intensity of luminair, we surposed suitable cell density of effeciental production with chamber. It was contributed to cut off the cultivation costs.

In fourth section, we tried to culture *P.lutheri* under variable light intensity condition, light intensity condition in luminair was changed with cell density and cultivation period. It was possible to reduce cultivation costs of light for changing light intensity with cell density or cultivation period, and to suggest significance methods of cost reduction on mass algae cultivation system. And it proved to be estimation of light environment in the chamber.

In fifth section, we examined to culture micro-alga under 4 kinds of flourescent lamps (red, blue, green and white) to investigate effeciental luminair in mass algae cultivation system. Cell growth ratio was change each examinations using each lamps pairs, fastest cell growth ratio was obtained the examination in red and blue lamp pair. It was possible to reduce the cultivation priod and achieve more effeciental mass algae cultivation. We suggested more avarable guideline to produce is using additive of carbon dioxide through inflow of air.

キーワード：人工光，大量培養，培養効率化，微細藻類

Key word: artfical luminair, mass production, effeciental cultivation, micro-algae

---

報文番号 A416 (2008年2月20日受理)

\*北海道立函館水産試験場 (Hokkiado Hakodate Experiment Station, Yunokawa, Hakodate, Hokkaido, 042-0932, Japan)  
学位論文を改編

## はじめに

1977年アメリカの経済水域の設定に端を発した200海里設定、漁獲に伴う負担金の発生により、遠洋漁業の漁獲量の減少、漁獲努力量（漁船数）が減少した<sup>1)</sup>。そのため、遠らの撤退を余儀なくされ、遠洋漁業めぐる国際環境が急洋漁業から沿岸や沖合漁業への転換が図られ、漁獲努力速に悪化した。また、資源管理制度による漁獲割当量の増大による乱獲や生息環境の悪化による漁業資源の減少が生じ、沿岸域での漁業資源の保全と増大を図ることが問題となった。このため、沿岸の漁業資源の管理の推進による漁場の高度利用や資源の継続的な利用が大きな課題となっている。その中で沿岸資源の安定を目指した栽培漁業への取り組みが進められている<sup>2)</sup>。栽培漁業は、種苗（魚貝類の稚仔）の生産・放流を基本としており、放流用もしくは養殖用として大量に人工種苗を必要とする。近年では対象魚種と種苗生産数が拡大し<sup>3)</sup>、マグロ類などの高度回遊魚種の種苗生産も試みられている<sup>4)</sup>。

近年資源の減少が著しい二枚貝の人工種苗を大量生産するには、餌料として大量の微細藻類が必要である。餌料用微細藻類としては、生産対象種や施設の規模に応じて、珪藻類、ハプト藻類や鞭毛藻類などが用いられている<sup>5-7)</sup>。通常、これら微細藻類は小型容器での人工光源（蛍光ランプやHID（高輝度発光形）ランプ）を用いた集約的な培養法と大型容器で太陽光を主に用いて粗放的な培養法により生産される<sup>8)</sup>。小型容器を用いた培養では高密度な餌料生産が可能であるが、餌料の大量生産を図るうえで、培養容器の増加を伴い施設規模ならびに作業量の増大を招く。また、粗放的な大型容器を用いた培養では安定的で効率的な培養が困難である<sup>9-11)</sup>。

現在、海外を含めて藻類として工業化による生産が行われている種は淡水産藻類である *Spirulina*, *Dunaliella*, *Chlorella*, *Cyanobacteria*, *Euglena*, *Skeletonema* などわずかであり<sup>12-14)</sup>、フリーズドライや濃縮餌料<sup>15)</sup>として一部販売が開始されている種もあるが、水産種苗生産施設で用いられている海産性微細藻類 *Chaetoceros gracilis*, *C. calcitrans*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri* 等は工業的な培養が困難である<sup>16)</sup>。そのため、光放射環境、水温環境、培養基質、攪拌、ガス交換などの様々な要因の関与について試験検討が行われ、これら要因を考慮した大量培養の試みが行われているが<sup>17)</sup>、最適な環境条件下での安定・効率的な大量培養の確立までには至っていない。

海外では、現在まで、小規模な実験室レベルの試作器から、大量培養を目指したツインチューブの培養器まで

様々な培養システムが考案され、試作されている<sup>18-22)</sup>。これらの研究には、培養特性の把握による効率化を目指して、培養するチューブの径と太陽光の関係とその生産性<sup>23)</sup>、培養槽の光放射環境のシミュレーション<sup>24)</sup>、攪拌による培養の効率化<sup>25)</sup> などがある。現在、透明なチューブで連続培養を行うフォトバイオリクター<sup>26)</sup> やビニールバックによる培養が実用化されている。

日本では大量培養法として屋外で太陽光を利用した粗放的な培養法が一般的に広く行われている。また、屋内での人工光を利用した集約的な培養に関する研究では大滝ら<sup>27,28)</sup>、高島・児玉<sup>29)</sup>、酒井ら<sup>30)</sup>、岡内・福所<sup>31)</sup>、高越ら<sup>32)</sup>、林・瀬古の *P. lutheri* を用いたPPFDに対する細胞密度の変化について<sup>33)</sup>、*P. lutheri* と *C. calcitrans* を用いてPPFDに伴う細胞密度の変化と炭酸ガスの添加効果<sup>34)</sup>、効率を重視した連続培養について<sup>35)</sup>、*P. lutheri* を用いたPPFDと細胞密度や培養時の細胞容積の変化について<sup>36)</sup>の報告がある。一般的な培養法として財団法人カキ研究所による培養マニュアル、東北海区水産研究所が中心となった餌料培養マニュアルなどが刊行され<sup>37,38)</sup>、北海道立栽培漁業総合センターでは有用な藻類の探索が行われた<sup>39)</sup>。また、近年、J.B.Ogbonnaらによって、大量培養システムでの培養水の攪拌による効率化、光照射環境の観点からの効率的な培養法、培養槽設計での培養効率の検討が行われた<sup>40,41,42,43)</sup>。新しい光源として、赤色と青色のLED（発光ダイオード）を用いた培養試験や<sup>44,45)</sup>、新たな培養に関する要素として深層水を用いた培養や、バクテリア等の海洋細菌が及ぼす藻類増殖への影響に関する報告もなされている<sup>46,47,48)</sup>。

筆者の用いた海産性微細藻類である *P. lutheri* は餌料藻類の中でも視神経の発達に欠くことの出来ない高度不飽和脂肪酸であるDHA、EPAを多量に含み、栄養的にも優れた餌料価値の高い藻類であることが知られている<sup>49,50,51)</sup>。本論文では、これまで工業的な大量培養が難しいこの種について、大量培養技術の確立を目指し、200ℓ大型培養試験器を用いて、効率的な光源の照射方法、培養光合成有効光量子束密度の最適化、段調光を用いた培養法、最適な光源の分光分布について検討し、好適な培養諸条件を明らかとした。この結果、人工光源を用いた餌料生産での生産コストの削減、効率的・安定的な生産を可能とした。現在、本研究で得られた知見をベースとした工業的手法による餌料培養システムが厚岸町立カキ種苗センターで稼働している。

## 第1章 培養装置と光環境と通気条件の検討

## 目的

本章では、培養装置の特徴とその基本性能を明らかにする。また培養試験の基礎条件として通気条件の検討を行った。

## 培養装置の特徴

### 概略

培養装置の概略図をFig.1-1に示す。照明装置と培養槽の間は光透過性素材により形成され、培養槽外周には冷却用槽を配置し、光透過性素材による培養タンクと培養タンク外部に培養タンク外周を囲むように配置されて無影状態で培養タンクを照射する照明装置からなることを特徴とする。これは、効率よく培養を行い、照明装置の

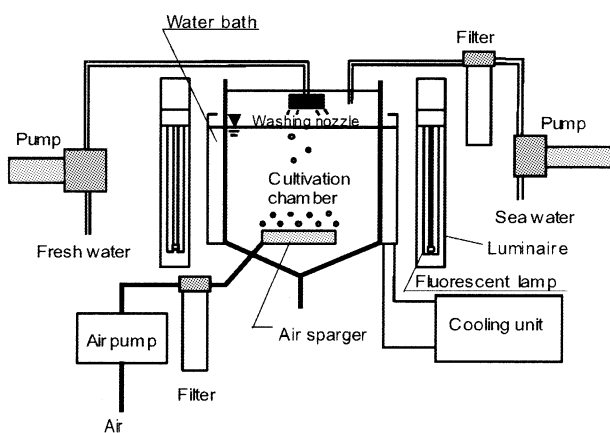


Fig.1-1 Schematic diagram of culture system using irradiate cylindrical chamber (*Artemia* hatching jar)

保守管理を容易な装置を目指したものである。培養光源を培養槽内部から、培養槽の外部に配置することによって、光源の発する熱量の伝搬を抑制し、水温管理を容易にする。

### 装置詳細

培養装置は有底の略円筒状で光透過性樹脂からなる内径700mmの200L培養タンク（アルテミアハッチングジャー：SBF-200，アース社製）と培養槽の中心から同心円状に9台の照明器具を配置した。培養タンクは底部に配水管を連結し、収穫時の培養液の排出と洗浄液の排出を容易にした。タンク内への通気は散気管による空気通気を基本とし、0.1 $\mu$ mのフィルターで濾過した空気が必要に応じて流量調節した炭酸ガスをタイマー制御により空気に混気することが出来るようになっている。通気用のポンプは、ポンプのオイルの混入を防ぐため、オイルレスプロアーとした。散気管は公称20 $\mu$ m, 40 $\mu$ m, 150 $\mu$ m, 300 $\mu$ mの4種類とした。

培養水用として、海水供給用ポンプを備え、4種類のフィルターを有して培養に適した海水を供給できるように配慮した。培養時には10 $\mu$ m, 1 $\mu$ m, 0.1 $\mu$ m, 0.05 $\mu$ mのフィルターで濾過した海水を用いた。

培養終了時には、水道水もしくは多段式ポンプによる次亜塩素酸ナトリウム添加水での殺菌洗浄が行えるように配慮した。

各照明器具は55W片口金型3波長域発光型蛍光灯ランプ（EX-N, 55Wコンパクト型蛍光灯ランプ）を4灯セットした蛍光灯器具からなり、器具による相互反射およびメンテナンス性を考慮した構造となっている。照明器具は本体が270mm, 奥行き200mm, 高さ570mmの直方体状の箱体からなり、背面にはランプ交換用の開口部があり、ランプ交換時以外は蓋で閉塞されるようになっている。前面の培養タンク側の面には照明光を照射するための開口部を設け、光透過性のアクリルパネルを介して培養タンクを照射するようになっている。

また、照明器具内にインバーター点灯器具を備え、各ランプを点灯させるインバーター点灯装置は商用交流電源を直流変換部で変換された直流を高周波に変換して高周波電力によりランプを点灯させるインバーター部とインバーター部のスイッチング素子を制御する制御部からなる。これらのインバーター制御は定格電圧点灯を100%とすると、その60%まで無段階による制御が可能である。これ以外には、照明器具自体の点灯数を2台、3台、4台と培養槽を中心とした対称に点灯させて照明器具数を制御する調光も可能なように配慮されている。

## 材料および方法

### 1. 光環境の把握

供試藻類は*P.luther*とし、ポリカーボネイト製の100L水槽で15 $^{\circ}$ C, 120 $\mu$ mol $\cdot$ m $^{-2}$  $\cdot$ s $^{-1}$ の条件で $1.0 \times 10^7$  cells $\cdot$ ml $^{-1}$ 以上の細胞密度まで培養した株を培養槽内の光合成有効光量子束密度分布の測定に用いた。

培養槽内に何も満たしていない状態、海水を満たした状態、海水に培養溶液を添加した状態、細胞密度 $1.0 \times 10^7$  cells $\cdot$ ml $^{-1}$ の培養溶液を満たした状態の計4状態での光合成有効光量子束密度（PPFD）を測定した。測定位置は培養槽壁面から水平方向に5cm, 鉛直方向に10cmの格子状に培養槽の中心を通る断面とした。測定には平面型光量子センサー（LI-190+LI250, LiCor社製）と球面型光量子センサー（LI-193+LI250, LiCor社製）を用いた。通気による影響を把握するため、海水を満たした状態で20 $\mu$ m, 40 $\mu$ m, 150 $\mu$ m, 300 $\mu$ mの気孔径の散気管から20L $\cdot$ min $^{-1}$ の通気した状態での培養槽内のPPFDも測定した。

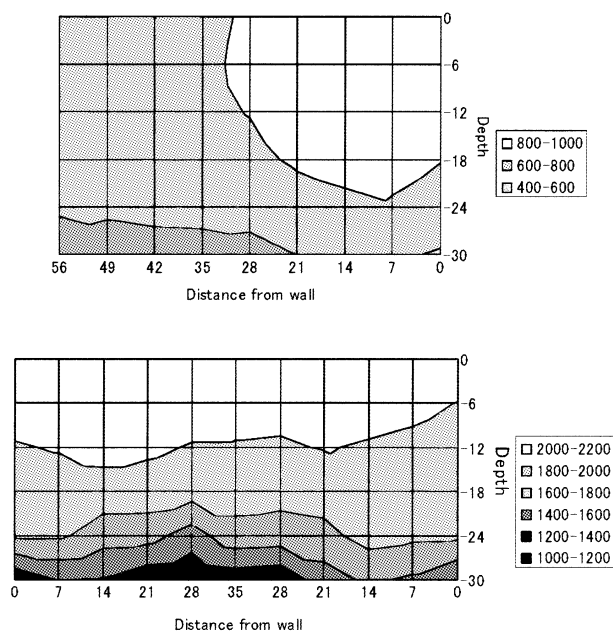


Fig.1-2 Sectional distribution of PPFd in seawater under full light intensity in 200L chamber. a) is plane type PPFd sensor, b) is sphere type PPFd sensor.

## 2. 通気条件の検討

供用藻類は*P.lutheri*とし、3L平底フラスコでの予備培養株を、初期接種密度 $5.0\sim 6.0\times 10^5\text{ cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ の範囲で植え継いだ。培養溶液は、たから培養液（第一製網社製）を $1\text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$ の割合で滅菌濾過海水に添加して作成した。培養時水温は $14\sim 17^\circ\text{C}$ とし、培養時のPPFDは $1900\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ の一定で24時間連続点灯とした（100%PPFD）。最適な通気量を求めるため、散気管の気孔径を $40\ \mu\text{m}$ 一定として $10\cdot 20\cdot 30\cdot 40\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ の4種の通気量での培養を行った。次に、最適な気孔径を求めるため、通気量を $30\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ 一定とし、気孔径 $20\cdot 40\cdot 150\cdot 300\ \mu\text{m}$ の4種の散気管で培養を行った。

## 結果および考察

### 1. 光環境の把握

100%PPFDとして海水を満たし無通気状態での培養槽内のPPFD分布をFig.1-2に、細胞密度 $1.0\cdot 10^7\text{ cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ の*P.lutheri*培養水をタンクに満たしたときのPPFD分布をFig.1-3に示す。

Fig.1-2aに示したのが、平面型光量子センサーで測定した単一の照明装置を点灯した状態での光子照度分布である。 $800\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ を上回る領域が培養槽のほぼ中心まで広がり、水深24cm以浅で値が高く、24cm以深の水槽台座に遮蔽された培養槽基部では低い値となった。照

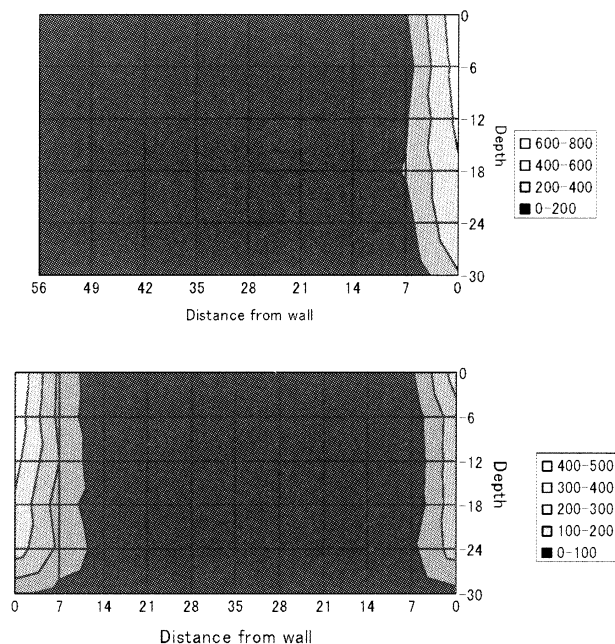


Fig.1-3 Sectional distribution of PPFd in seawater containing *P. lutheri* at a density of  $1.0\cdot 10^7\text{ cells}\cdot\text{ml}^{-1}$  under full light intensity in 200L chamber. a) is plane type PPFd sensor, b) is sphere type PPFd sensor.

明器具を定格電圧で全点灯した状態の球状光量子センサーでのPPFD分布をFig.1-2bに示した。平面センサーと光源から直接照射される24cm以浅では平面センサーの $900\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ の2倍である $1800\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ となり、培養槽基部でも $1200\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ を上回った。培養槽全体の平均PPFDは平面センサーで $761\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、球面センサーで $1897\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  ( $1.2\times 10^5\text{ lx}$ )となった。

球面光量センサーの高い値は培養槽に付帯したウォーターバスによって効率的に光が集められたこと、水面での反射によって光子が散逸しなかったことによる。

*P.lutheri*の細胞密度 $1.0\times 10^6\text{ cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ の海水を培養槽に満たし、全ての照明器具を点灯した時の培養槽内の平面センサーで測定したPPFD分布をFig.1-3aに示した。培養槽に入射した光は培養水に吸収され、培養槽側面から7cmの位置で $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ を下回った。培養槽中心35cmでは、 $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 以下となり、光が透過しない空間が生じた。Fig.1-3bに示した球状センサーでの測定結果も平面センサーとほぼ等しい結果であり、培養槽側面から7cmの位置で平面センサーでの測定値とほぼ等しい $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ であった。これは、培養槽内では藻体の吸光により光が急激に減衰し、向かい合う光源の相互作用が無くなり、個々の光源からの照射を反映するようになることを示している。

空気中と海中と培養液を添加した状態での培養槽内のPPFDの空間平均値は、空の状態が $1134\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、

海水を満たした状態が $1897 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、培養液添加状態で $1880 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ である。これは培養液を添加した状態での、PPFDの減衰は海水を満たしたときの5%未満となっており、海水を満たしたときの培養槽のPPFD分布との差は見られなかった。一方、空気中では、海水中に比べて最大値でも $1271 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ であり、培養槽内の平均PPFDも海水を満たした状態の60%であった。

一般に海水中に入射した光は指数的に減衰し、赤色域と青色域が吸収される<sup>52)</sup>。培養槽内では、藻体による吸収によって急激にPPFDが低下する。細胞密度とPPFDによっては、培養槽内に光の届かない空間を生じさせると考えられる。培養槽の内部からの照明と外部から照明では、光エネルギーの有効利用から内部照明の高効率を指摘しており、また内部照明型のシアノバクテリアの培養装置では効率的な培養が可能としている<sup>42, 53)</sup>。しかし、光源の内部設置は、熱源を培養槽内に設置することとなり、水温管理を難しくさせ、設置できる光源数にも限りがある。温度管理の点と培養システムのメンテナンス管理の容易な点から光源の外部配置が有利である。

## 2. 通気条件の把握

各通気量での増殖曲線の変化をFig.1-4に示す。各通気量での最高密度は、通気量 $10\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ で5日目に $1.5\times 10^6$  cells  $\cdot\text{ml}^{-1}$ 、通気量 $20\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ で14日目に $2.0\times 10^7$  cells  $\cdot\text{ml}^{-1}$ 、通気量 $30\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ で14日目に $2.2\times 10^7$  cells  $\cdot\text{ml}^{-1}$ 、通気量 $40\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ で15日目に $1.0\times 10^7$  cells  $\cdot\text{ml}^{-1}$ であった。散気管の気孔径を変化させた増殖曲線をFig.1-5に示す。各気孔径での最高密度は、気孔径 $20\mu\text{m}$ で13日目に $1.8\times 10^7$  cells  $\cdot\text{ml}^{-1}$ 、気孔径 $40\mu\text{m}$ で14日目に $2.2\times 10^7$  cells  $\cdot\text{ml}^{-1}$ 、気孔径 $150\mu\text{m}$ で12日目に $2.0\times 10^7$  cells  $\cdot\text{ml}^{-1}$ 、気孔径 $300\mu\text{m}$ で14日目に $1.4\times 10^7$  cells  $\cdot\text{ml}^{-1}$ であった。

各通気量での最高密度は通気量が $10$ から $20\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ と増加するに従って増加したが、 $40\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ では減少した。これは $20\sim 30\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 付近に通気量の最適値が存在することを示している。各気孔径での最高密度は気孔径 $40\mu\text{m}$ と $150\mu\text{m}$ で $2.0\times 10^7$  cells  $\cdot\text{ml}^{-1}$ を上回ったことから、 $40\sim 150\mu\text{m}$ の気孔径付近に最適値が存在する可能性がある。培養条件の中で通気には気体の溶解と気泡の上昇に伴う連行によって生じる培養槽の攪拌の2要因が含まれる。培養槽の攪拌は培養を行う上で大変重要であるが、その評価が難しい。通気による攪拌によって、パルス効果が現れ、培養効率を増加させる可能性も報告されており、スターラーを用いて攪拌による効率化も報告されている。<sup>40, 53, 54)</sup> 本研究では、攪拌の指標となる通気量変化による最高密度の変化が気体溶解の指標となる気孔径の最

高密度の変化より大きかったことから、通気条件は攪拌による影響が大きいと考えられる。

## 第2章 光量子束密度と細胞密度の関係

### 目的

この章では一般的に用いられている太陽光に代わり、人工光を積極的に取り入れ、効率的な培養を行うため、PPFDと細胞密度について試験を行い、効率的な培養法について検討を行った。

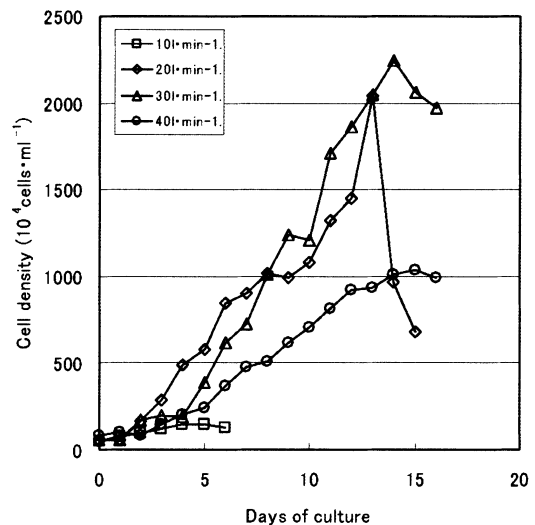


Fig.1-4 Effects of aeration and growth rate on *P. lutheri* cultured in 200L chamber receiving irradiation of full light intensity at  $15^{\circ}\text{C}$ .  $\square$ : 10-liter per min.,  $\diamond$ : 20-liter per min.,  $\triangle$ : 30-liter per min.,  $\circ$ : 40-liter per min.

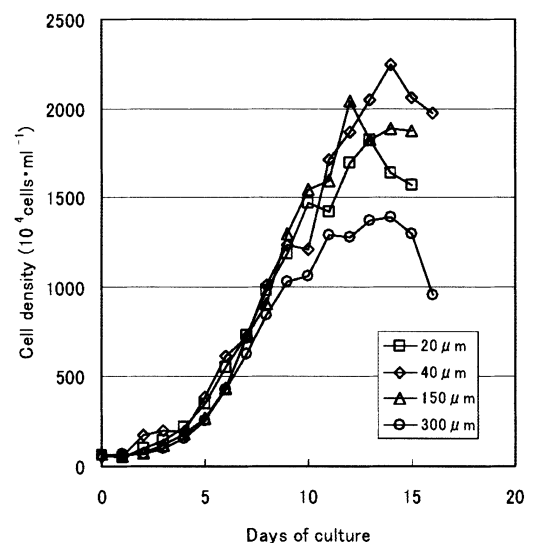


Fig.1-5 Effects of bubble size of sparger and growth rate on *P. lutheri* cultured in 200L chamber receiving irradiation of full light intensity at  $15^{\circ}\text{C}$  and aeration of  $30\text{-liter}\cdot\text{min}^{-1}$ .  $\square$ :  $20\mu\text{m}$ ,  $\diamond$ :  $40\mu\text{m}$ ,  $\triangle$ :  $150\mu\text{m}$ ,  $\circ$ :  $300\mu\text{m}$

## 材料および方法

供試藻類は *P. lutheri* とし、試作した200L大型培養器（以下大型培養器）を用いて培養を行った。PPFDと細胞密度の関係を求めるため、光源のPPFDを100%（全灯定格点灯時）、60%、30%、10%の4段階に設定して培養試験を行った。

海水を次亜塩素酸ナトリウム（有効塩素濃度 50ppm）で殺菌し、培養溶液は「たから培養液」（第一製網社製）を  $1\text{ml} \cdot \text{L}^{-1}$  の割合で添加して作成した。3L平底フラスコで予備培養した株を接種密度  $5.0 \sim 7.0 \cdot 10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$  で接種した。ブローアーから  $0.1\mu\text{m}$  のフィルターでろ過した空気を気孔径  $40\mu\text{m}$  の散気管から通気量  $30\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$  で培養槽内に通気し、水温は13から15℃とした。

PPFDは55Wコンパクト型蛍光灯を定格電力で点灯した状態を100%PPFDとして、60%PPFDはインバーター制御により調光した。また30%、10%のPPFDの設定はインバーター制御と点灯するランプの削減を組み合わせで行った。30%PPFDは各照明器具の点灯ランプを2本とし、合計18本の蛍光灯をインバーター制御により60%に減光することにより設定した。10%PPFDは点灯ランプを2本とした3台の照明器具を等間隔に配置し、さらに60%に減光することで設定した。細胞密度の測定はトーマ血球計算盤（エルマ社製）を用いて、pHの測定は水素イオン濃度計（MH-11P, 東亜電波製）を用いて1日1回行った。試験終了は培養期間中に細胞密度の増加がみられないもしくは減少した時点とした。

## 結果

Fig.2-1に各PPFD下での培養結果を示す。10%PPFDでは、誘導期の後に密度が増加し、7日目に  $4.5 \cdot 10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$  まで増加し、15日目に  $6.0 \cdot 10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$  となった。培養中の水温は14℃台で推移し、pHも8.2~8.3の間で大きな変化なく推移した。

30%PPFDでは、培養開始から10%と同様に誘導期の後に7日目に  $5.0 \cdot 10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$  を上回る  $7.7 \cdot 10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$  となり、10日目に  $8.6 \cdot 10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$  の密度となった。培養期間中のpHは、3日目までは8.2付近で定常状態となり、密度増加が大きい4日目から9日目までは8.5付近で推移した。最高値は9日目の8.7であった。9日目以降は密度増加の停止と共に8.2付近まで低下した。

60%PPFDでも、10%、30%PPFD時と同様に、7日目に  $5.0 \cdot 10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$  を上回り、8日目に  $1.0 \cdot 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$  に達した。11日目に  $1.6 \cdot 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$  の密度に達した。培養中の水温は13℃付近で推移し、pHは2日目までは8.2

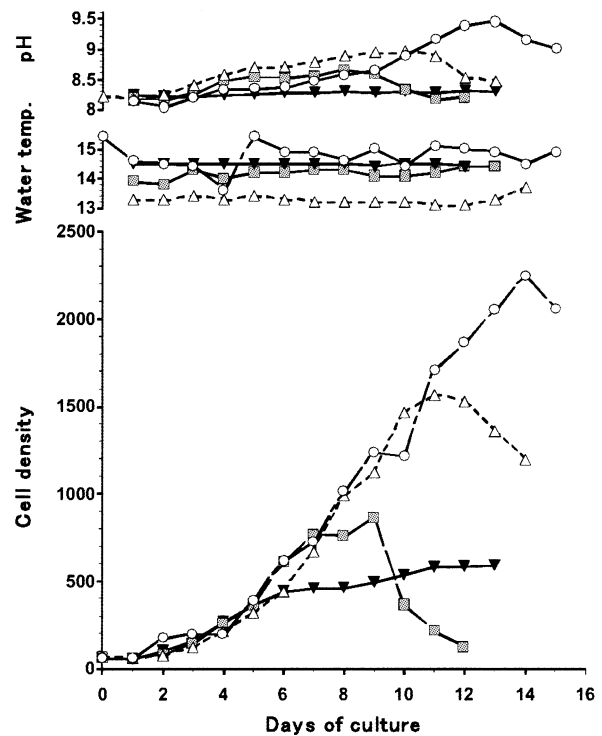


Fig.2-1 Effects of water temperature, pH and growth rate on *P. lutheri* cultured in 200L chamber receiving irradiation of 10%, 30%, 60% and full light intensity at 15°C and aeration of 30L per  $\text{min}^{-1}$ .  
 ▼: 10% light intensity, ■: 30% light intensity, △: 60% light intensity, ○: full light intensity

付近で推移したが、以降徐々に上昇し、7日目に8.7、9日目に8.9に達した。ここでも密度増加が停止すると同時にpHが8.2まで急落した。

100%PPFDでは、3日目から5日目に一時密度が停滞するが、6日目に  $5.0 \cdot 10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、9日目に  $1.0 \cdot 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、12日目に  $1.5 \cdot 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、13日目に  $2.0 \cdot 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$  に達した。14日目には  $2.2 \cdot 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$  の最高密度となった。水温は14℃から15℃の間で推移し、培養開始当初8.0であったpHは培養日数とともに上昇し、7日目に8.5、11日目に9.0を上回り、13日目に9.5となった。

Fig.2-2に各PPFDでの最高密度の関係を示した。これからPPFDの増加により最高密度は直線的に増加した。Fig.2-3に細胞密度が  $2.0 \cdot 10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、 $5.0 \cdot 10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、 $1.0 \cdot 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、 $1.5 \cdot 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、 $2.0 \cdot 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$  に達するのに要した培養日数を示した。10%PPFDでは  $3.0 \cdot 10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$  まで、30%PPFDでは  $5.0 \cdot 10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$  まで、60%PPFDでは  $1.5 \cdot 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$  までの間では100%PPFDでの日数と大差がなかった。

## 考察

本研究で得られたPPFDと培養時の最高密度との関係は、より高いPPFDを用いることによって、より高密度な餌料生産を行える可能性を示している。餌料の高密度化は、餌料培養に関わる作業の削減と給餌作業などの種苗生産にかかる作業量の削減が可能となる。

高越ら<sup>31)</sup>では5klxから15klxへ照度が増加するのに伴って到達密度が増加し、15klxでの培養が好ましいことが報告されている。また、大滝ら<sup>28)</sup>や酒井ら<sup>29)</sup>での報告に比べて、100%PPFDが $1800 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、照度で128.6klxに相当する高照度でも培養が可能であった。高いPPFDでは培養開始時の低密度時に光阻害による細胞の枯死が考えられるが、初期接種密度 $5.0\cdot 10^6 \text{cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ で枯死は生じなかった。これは細胞の吸光により培養槽の中心部まで高いPPFDとならなかったこと、攪拌により高いPPFDにさらされる時間が限られたこと、藻体耐性があったことが考えられる。

培養槽内の光環境は密度の増加に伴って著しく変化する。100%PPFDで光合成に有効な光環境が確保できる容積割合は、 $1.0\cdot 10^7 \text{cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ で約70%、 $1.0\cdot 10^7 \text{cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ で約40%まで減少する。<sup>16)</sup>これは、攪拌によって*P.lutheri*の光合成を行える時間が減少し、暗部に存在する時間が増加することを示している。暗部の増大は培養槽のパルス効果<sup>41)</sup>が低下し、培養槽自体の生産性を低下させる。

本研究ではPPFDの変化により最高密度は変化した、増殖期の培養速度は変化しなかった。酒井ら<sup>29)</sup>では、*Isochrysis*を用いた照度の試験から、0.5klxから15klxの間では、照度の増加に伴って増殖速度が増加する事を報告している。また、村瀬ら<sup>57)</sup>は*P.lutheri*の光合成最大速度が $200\sim 300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 付近に現れ、それ以上のPPFDでは徐々に低下することを報告した。10%PPFDでも約 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ となり、各PPFDでは最大光合成速度付近かそれを上回るPPFDであったため増殖速度に差が見られなかった。

人工光を用いたバッチ式培養法では高い生産コストが問題であり、消費電力の削減や培養期間の短縮は直接培養コストの削減につながる<sup>26)</sup>。運転時のエネルギーコストの大半を占めるのが光源であり、100%PPFDでは、培養期間を14日間とすると約665kWhとなり、約50円 $\cdot\text{L}^{-1}$ (業務電力:11円 $\cdot\text{kWh}^{-1}$ )の生産コストとなる。エネルギーコスト削減には、培養期間の短縮による生産性の向上と照射方法の効率化による電力の削減が考えられる。培養期間の短縮のためには増殖速度の増加が必要であり、照射方法の効率化には過剰なPPFDの削減が必要である。

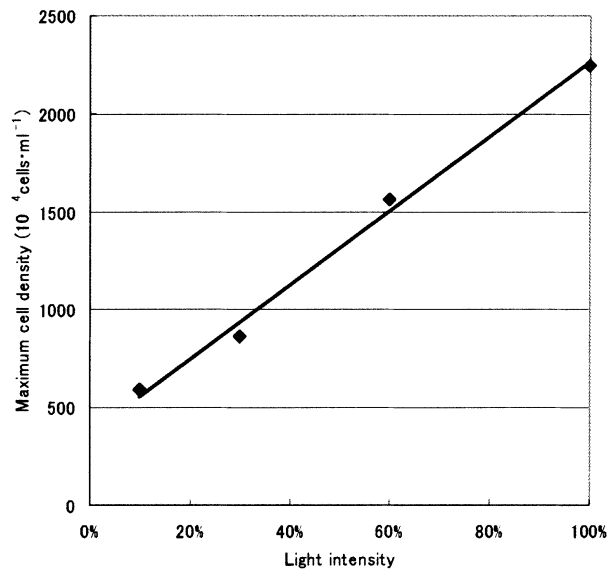


Fig.2-2 Relationship between maximum cell density of *P. lutheri* obtained and light intensity. Each was raised under  $15^\circ\text{C}$  and received aeration of  $30\text{-liter}\cdot\text{min}^{-1}$  in 200-liter chamber.

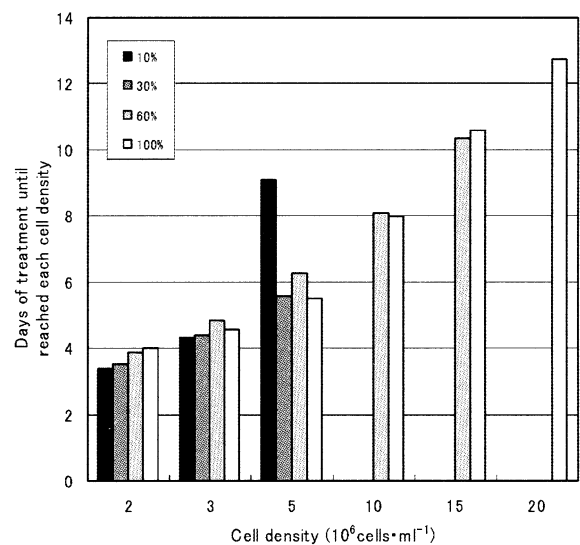


Fig.2-3 Relationship between the number days required to reached various cell densities and light intensity.

直線的な増殖期の増殖率が培養槽の生産性に関わることから<sup>41)</sup>、水温や光源の光質による増殖速度変化とパルス効果を考慮した効率的な光環境を検討する必要がある。また、培養期間中の培養水のpHが9.5を上回り、炭酸源が不足したと考えられることから<sup>58)</sup>、炭酸ガスの添加による生産性の向上を検討する必要がある。

## 第3章 無段階調光による効率化の検討

### 目的

本章では、藻体に過度となるPPFDを削減し、PPFDの最適化を図ることにより、低生産コストを目指した無段階調光による培養法について検討する。

方法

用いた培養記録について

供試藻類である*P.lutheri*を以下の条件で培養した。培養溶液は海水を次亜塩素酸ナトリウム（有効塩素濃度50ppm, 2時間）で殺菌し、たから培養液（第一製網社製）を1ml・L<sup>-1</sup>で添加することで作成した。3L平底フラスコで予備培養した*P.lutheri*を初期接種密度5.0~6.0×10<sup>5</sup>cells・ml<sup>-1</sup>の範囲で接種した。40μmの気孔径の散気管から培養槽内に30L・s<sup>-1</sup>で通気し、水温は14~16℃とした。

培養時のPPFDは一定とし、24時間連続点灯とした。PPFD条件は、全ての55Wコンパクト型蛍光灯を定格電圧で点灯した状態を100%PPFD、インバーター制御で60%に減光した状態を60%PPFD、半分の18本の蛍光灯を60%減光した状態を30%PPFD、等間隔の照明器具3台に各2本のランプをインバーター制御で60%に減光した状態を10%PPFDとした。各PPFDでの培養結果をFig.3-1に示す。

培養槽内の光環境と計算設定について

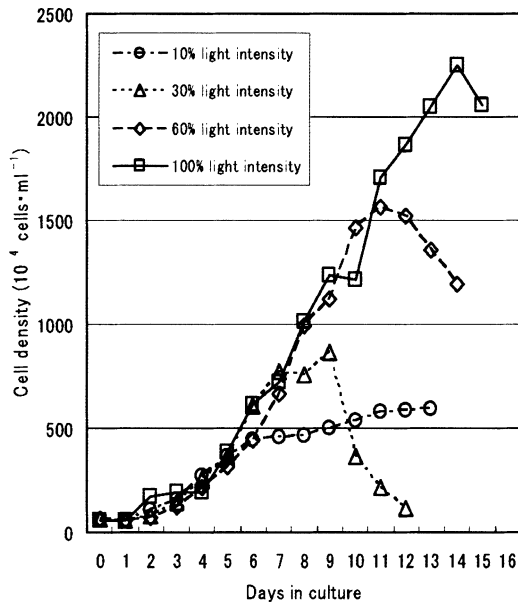


Fig.3-1 Effect of light on the growth of *P. lutheri* cultured in chamber with 10%, 30%, 60% and 100% light intensities at 15℃ and aeration of 30-liter·min<sup>-1</sup>. ○, 10% light intensity; △, 30% light intensity; ◇, 60% light intensity; □, 100% light intensity.

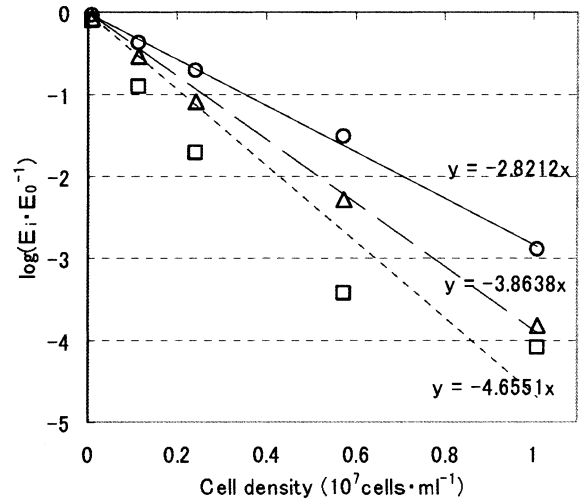


Fig.3-2 The effect of light intensity on *P. lutheri* at 3 different distances from chamber wall. The distances from light were ◇, 137mm; □, 187mm; △, 237mm. Vertical axis indicated relative reduction of light, E<sub>0</sub> was intensity of light, and E<sub>i</sub> was light intensity measured at different cell densities.

培養槽の体積計算を容易とするため、培養槽の形状を半径35cm、深さ30cmの円筒形とした。培養槽内の1μmol・m<sup>-2</sup>・s<sup>-1</sup>以下の領域を暗部とし、1μmol・m<sup>-2</sup>・s<sup>-1</sup>以上の領域を明部とした。*P.lutheri*の吸光係数はFig.3-2に示した1.08×10<sup>5</sup>, 1.15×10<sup>6</sup>, 2.43×10<sup>6</sup>, 5.76×10<sup>6</sup>, 1.01×10<sup>7</sup> cells・ml<sup>-1</sup>の密度での87, 187, 287mmでの透過強度から求めた。求めた吸光係数から各PPFDでの最高密度 (D<sub>max</sub>) と直線的増殖期の終点となる密度 (D<sub>i</sub>) での培養槽の暗部の比率を求めた。ここで、暗部の比率は式 3-1.として表される。

$$R=(r-d)^2 \cdot r^{-2} \tag{3-1}$$

rは培養槽半径(m), dは培養槽外壁から1μmol・m<sup>-2</sup>・s<sup>-1</sup>までの距離(m)を表す。

また、1.0×10<sup>7</sup> cells当たりの藻体に与えられた光量子数は式 3-2として、光源のPPFDは式 3-3.として表される。

$$L(\mu\text{mol} \cdot 10^7 \text{cells}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}) = (\text{Li} \cdot \text{M}) \cdot (1-R)^{-1} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{CD}^{-1} \tag{3-2}$$

$$\text{Li} = L \cdot (1-R) \cdot \text{V} \cdot \text{CD} \cdot \text{M}^{-1} \tag{3-3}$$

このときのLiはincident light intensity(μmol・m<sup>-2</sup>・s<sup>-1</sup>), Mは照射面積(m<sup>2</sup>), Rは暗部の比率, Vは培養槽容積(m<sup>3</sup>), CDは細胞密度(10<sup>7</sup> cells・m<sup>-3</sup>)を表す。

各PPFDのD<sub>i</sub>での暗部の比率から直線的増殖期を維持できる暗部の比率を仮定した。仮定した暗部領域から各PPFDでの直線的増殖期に必要な明部で受け取る光量子数を求め、この値から直線的増殖期を維持できる光量子数の値を直線内層して推定した。得られた光量子数から光



源のPPFDを算定した。

結果および考察

87, 187, 287mmの各位置での密度増加による各PPFDでの透過強度をFig.3-3に示した。各PPFDでの $D_{max}$ と $D_i$ は10%PPFDで $6.0 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$  ( $D_{max10}$ ),  $4.0 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$  ( $D_{i10}$ ), 30%PPFDで $8.0 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$  ( $D_{max30}$ ),  $6.0 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$  ( $D_{i30}$ ), 60%PPFDでは $1.500 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$  ( $D_{max60}$ ),  $1.4 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$  ( $D_{i60}$ ), 100%PPFDでは $2.0 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$  ( $D_{max100}$ ),  $2.200 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$  ( $D_{i100}$ )であった。各PPFDでの暗部の割合, incident light intensityと照射面積と細胞密度から求めた光子と暗部の割合をFig.3-4aに示した。培養槽内では密度増加に伴い明部で受け取ったエネルギーが暗部で消費される。最高密度は明部で受け取るエネルギー量と暗部で消費されるエネルギー量が等しいと仮定すると, 求めた光子は暗部で消費されるエネルギー量を示す。暗部が20%から25%に増加するに従い光子量が2倍以上増加したが, 25%から50%では1.5倍程度の増加にとどまった。50%から60%では1.5倍の増加となった。暗部が25~50%の間では, 暗部の増加に関わらずそれに要するエネルギー量がそれほど増加しない。Fig.3-4bに示した $D_i$

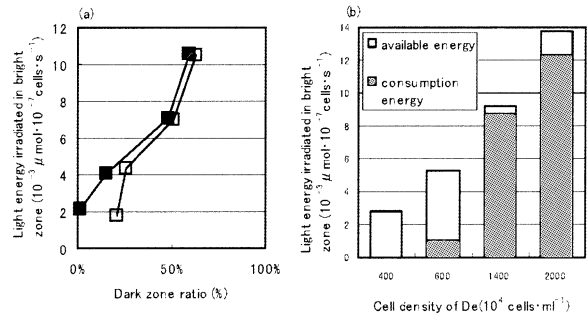


Fig.3-4 The relationship between dark zone ratio of chamber and light energy irradiated in bright zone per  $10^7$  cells (a), and between cell densities at the end of liner growth phase ( $D_e$ ) and light energy irradiated in bright zone per  $10^7$  cells. (a), gray symbol is maximum density in culture and open symbol is density at the end of liner growth phase. (b), gray scale is consumption energy, open scale is available energy to grow cells.

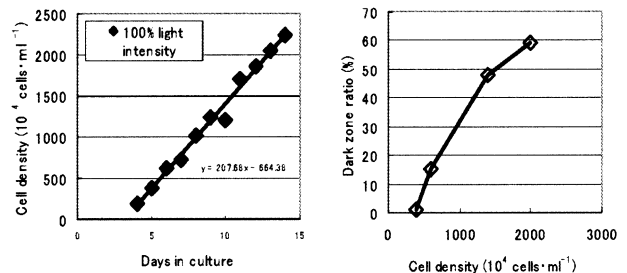


Fig.3-5 Relationship between time and cell density (a), and between cell density and dark zone ratio of chamber (b). (a), straight line fitted at cell density on 100% light intensity; (b), assuming dark zone ratio according to cell growth

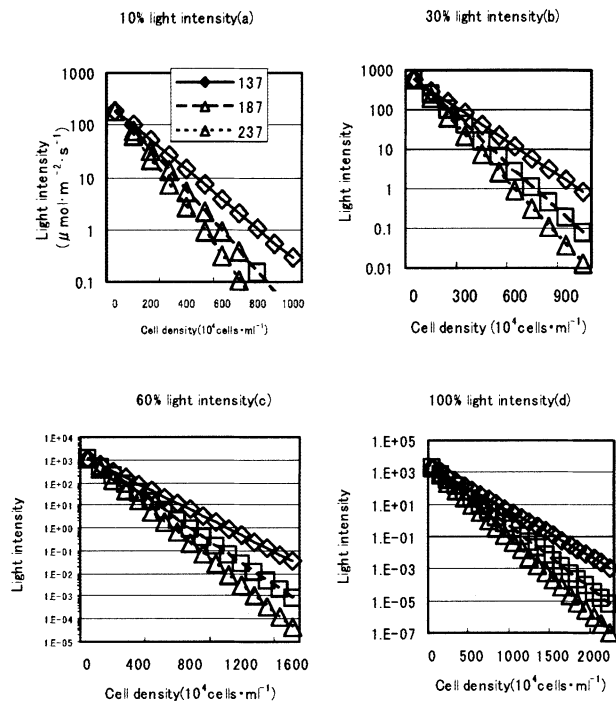


Fig.3-3 Relationship between cell density and light intensity at 3 distances from the wall. (a): 10% irradiation, (b): 30% irradiation, (c): 60% irradiation, (d): 100% irradiation.  $\diamond$ : 137mm distance,  $\square$ : 187mm distance,  $\triangle$ : 237mm distance.

での光エネルギーの暗部で消費を除いた余剰分では, 暗部のほとんど存在しない $D_{i10}$ ,  $D_{i30}$ で多く, 暗部が50%以上を占める $D_{i60}$ ,  $D_{i100}$ で小さな値となった。これは増殖期を維持するエネルギー(余剰分)は, 暗部が存在すると少なくなることを示しており, 与えられたエネルギーが効率よく増殖に向けられていることを示している。これは, 通気によって生じる攪拌による藻体の移動によるパルス効果の可能性があり, この暗部が30%から50%を占める領域での高効率はそのよると考えられる<sup>41)</sup>。細胞密度も25%では $6.0 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ , 50%では $1.5 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ と2.5倍となり, PPFDの増加(2倍)を大きく上回ったことから推察できる。

培養に必要な培養光源のPPFDの最適値はFig.3-4aに示した各 $D_i$ の値を結んだ線で表される。光源のPPFDの推定に必要な条件, 暗部の比率と光源のPPFDを式 3-4. に, 各 $D_i$ から仮定した暗部の比率の変化 (Fig.3-5b)を式 3-5.に, 時間による密度増加 (Fig.3-5a)を式 3-6.とし, 培養光源のPPFDを算定した。

$$L=0.135 \cdot R+2.013 \quad (\text{until } 15.1\%) \quad 3-4.1.$$

$$L=0.0923 \cdot R+2.659 \quad (\text{from } 15.1\% \text{ until } 48\%) \quad 3-4.2.$$

$$L=0.307 \cdot R+7.648 \quad (\text{from } 48\% \text{ until } 59.4\%) \quad 3-4.3.$$

$$R=0.0695 \cdot CD-26.6 \quad 3-5.1.$$

(from  $4.0 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$  until  $6.0 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ )

$$R=0.041125 \cdot CD-9.575 \quad 3-5.2.$$

(from  $6.0 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$  until  $1.4 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ )

$$R=0.019 \cdot CD+21.4 \quad 3-5.3.$$

(from  $1.6 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$  until  $2.0 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ )

$$CD=29.04 \cdot T+50 \quad (\text{less than 4 days}) \quad 3-6.1.$$

$$CD=207.68 \cdot T-664.38 \quad (\text{after 4 days}) \quad 3-6.2$$

求めたPPFDの推移Fig.3-6に示す。これは培養初期には過大なPPFDは必要とせず、細胞密度が直線的増殖期となる5日目以降にPPFDが増加する。

Borowizka, M. A.<sup>59)</sup>は、培養規模によるスケールメリット、高密度化が図れないこと、培養不調によるコスト、人工光の利用によるコスト、培養にかかる人件費などが培養コストを引き上げる原因としている。また、完全人工光利用型のシステムでは太陽光利用型に比べて高い生産コストとなるため<sup>28)</sup>、生産コストの削減が問題となる。本培養システムでは培養不調によるコストと人工光の利用などによるエネルギーコストが培養コストを引き上げる主要因となる。光源にかかるコストの削減は光源からの熱量を低下させるため、室温の管理を含めた培養全体のエネルギーコストを低下させる。100%PPFDでの培養では、光源だけで1L当たり4.4kwhのエネルギーが必要となるが、100%PPFD一定条件に比べて、今回設定した初期のPPFDを10%としても光源エネルギーの60%が削減可能である。このことから、細胞密度に応じてPPFDを変化させることによって、エネルギーコストの大幅な削減が可能であろう。Ogbonnaらが検討したように、培養時の光源を連続点灯でなく、12時間点灯の半日周期を持たせた点灯制御<sup>43)</sup>によってさらにコスト削減が可能である。

また、PPFD、分光特性、水温、増殖状態などによって、細胞中の栄養素の質的・量的な変化が指摘されており<sup>16, 38, 60, 61)</sup>、高品質な餌料生産のためには細胞の収穫時期に合わせた制御を検討する必要がある。

#### 第4章 PPFDの最適化による培養

##### 目的

本章では、培養時の生産コストを削減する効率的な培養法の実証としてPPFDの最適化のため段調光を用いた培養について検討した。

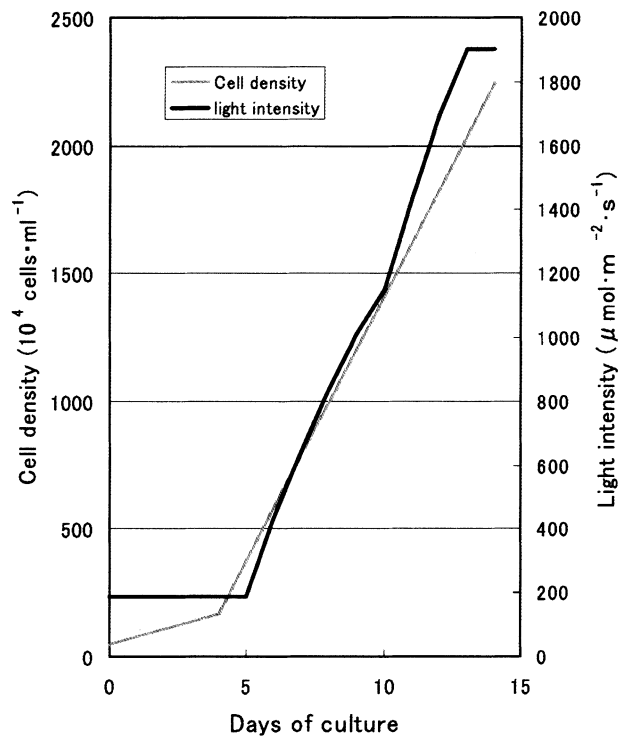


Fig.3-6 Effect of light intensity simulated from cell density. The gray line is cell density assumed growth curve 100% light intensity. The black line is light intensity of light.

##### 材料および方法

供試藻類として*P.luhteri*を用い、のり糸状体培養液である「たから培養液」(第一製網社製)を海水中に $1 \text{ ml} \cdot \text{L}^{-1}$ の割合で添加して培養溶液とした。海水は、 $0.1 \mu \text{m}$ のフィルターで濾過し、次亜塩素酸ナトリウムで殺菌(50ppm, 2時間)し、チオ硫酸ナトリウムで中和して用いた。培養には、3L平底フラスコで予備培養した株を初期接種密度 $5.0 \sim 10.0 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ で接種した。<sup>9)</sup> $0.1 \mu \text{m}$ のフィルターで濾過した空気を、 $40 \mu \text{m}$ の気孔径の散気管から培養槽内に $30 \text{ L} \cdot \text{s}^{-1}$ で通気した。培養試験中の培養槽の水温が $14 \sim 16^\circ \text{C}$ に保たれるように、ウォーターバスで冷却した。

培養時のPPFDは、全ての蛍光ランプを定格電圧で点灯した状態を100%PPFDとし、インバーター制御で全ての蛍光ランプを60%に減光した状態を60%PPFDとした。半分の18本の蛍光ランプをインバーター制御で60%減光した状態を30%PPFDとした。等間隔の照明器具3台に各2本のランプを取り付け、定格電圧で点灯した状態を16.5%とし、インバーター制御で60%に減光した状態を10%PPFDとした。

段調光を用いた培養試験1回目は10%, 30%, 60%, 100%の4段階のPPFDを設定し、2回目の試験では10%, 16.7%, 30%, 60%, 100%の5段階に設定した。

細胞の増殖速度を求めるために、細胞の分裂回数を計算した。細胞分裂回数(D)は以下の式で示される。<sup>62)</sup>

$$D(\text{cycle per day}) = 3.322 \frac{\log(d_1 - d_0)}{(t_1 - t_0)} \quad 4-1.$$

ここで $d_1$ は $t_1$ 日での細胞密度、 $d_0$ は $t_0$ 日での細胞密度を表す。

PPFDの変更時の判断は、各PPFDでの増殖曲線の直線的増殖期の変化と増殖曲線の分裂回数の変化から判断した。

培養中はHP-25c(東亜電波社製)を用いてpHの測定を行った。細胞密度はトーマ血球計算盤(エルマ社製)を用いて毎日1回計数した。試験は、細胞密度の増加が見られないもしくは減少する、または細胞に異常が見られた場合に終了した。

結果

PPFD変更時期

各PPFDでの増殖曲線をFig.4-1に示した。光源のPPFDの差は各増殖曲線の最高密度の相違となって現れた。また、各増殖曲線での直線的増殖期での増殖速度には、PPFDの差は見られず、各増殖曲線で同様に推移した。100%PPFDでの培養と同様な増殖曲線を得るためには、最高密度となる前にPPFDを切り替える必要がある。各PPFDでの直線的増殖期からの変化は10%PPFDで4日目、30%PPFDで7日目、60%PPFDでは10日目に生じた。

各PPFDでの分裂回数をFig.4-2に示した。培養開始1日目では各PPFDともに小さな値となっており、誘導期にあることを示している。2日目は10%PPFDで1に近い値となった他は、0.5を下回る値となった。3日目と4日目は同様な傾向となり、30%PPFDで最も高い値となり、次に60%PPFD区となった。6日目では30%PPFD区が0.7以上の値となり100%PPFD区が5日目に続いて高い値となっている。7日目には60%PPFD区が最も高い値となり30%PPFD区の値は減少した。8日目も60%PPFD区が最も高い値となり、100%PPFD区が続く形となった。9日目に100%PPFD区が60%PPFD区を上回り、以降10日目を除いて最も高い値となった。これらのことから、10%PPFDから30%PPFDへの切り替えは30%PPFDの細胞分裂回数が10%PPFD区を上回る3日目が、30%PPFDから60%PPFDへの切り替えは6日目が、60%から100%PPFDへの切り替えは9日目が妥当と思われた。

以上のことから、PPFDの切り替えは、10%から30%PPFDには3日目(細胞密度 $1.5 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ )、30%から60%PPFDには6日目(細胞密度 $6.0 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ )、60%から100%PPFDには9日目(細胞密度 $1.1 \times 10^7 \text{ cells} \cdot$

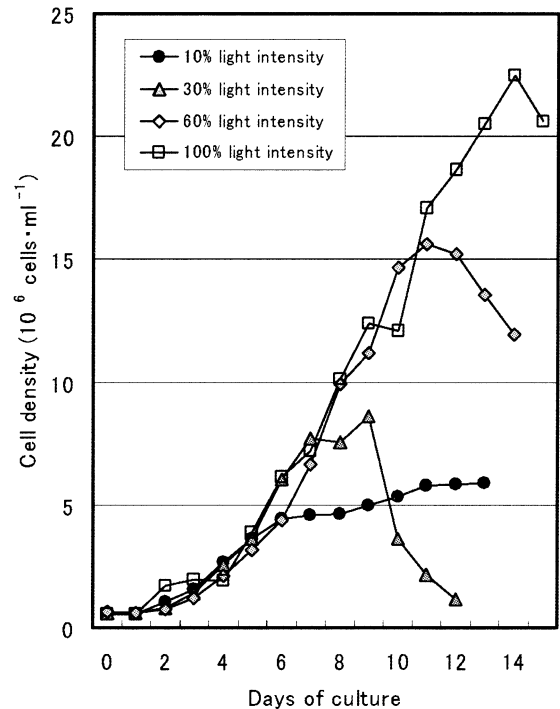


Fig.4-1 Effect of light on the growth curve on *P. lutheri* cultured on 10%, 30%, 60% and 100% light intensity at 15°C and aeration of 30-liter·min<sup>-1</sup>. ○: 10% light intensity, △: 30% light intensity, ◇: 60% light intensity, □: 100% light intensity.

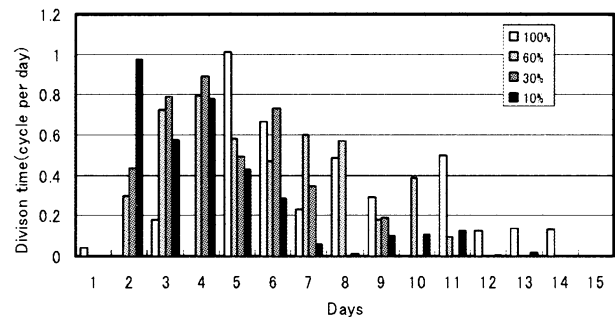


Fig.4-2 Daily change of division time calculated from growth curve of *P. lutheri* on 10%, 30%, 60% and 100% light intensity at 15°C and aeration ratio is 30-liter · s<sup>-1</sup>.

ml<sup>-1</sup>) が最適と思われた。

培養結果

段調光を用いた培養試験と100%PPFDでの水温、pH、細胞密度の推移をFig.4-3に示す。段調光に伴うPPFDの増加は、光源からの放射熱量を増加させ、細胞密度の増加により全ての熱量が培養水に吸収されるため、水温の上昇を引き起こした。しかし、冷却により試験期間を通して14から16°Cで水温を維持した。pHは培養開始時8.3から、PPFDの増加に伴い緩やかに上昇し、60%PPFDの

7日目に9.2と9.0を上回った。7日目以降試験終了まで常にpHは9.0を上回って推移し、10日目に9.6の最高値となった。

細胞密度では、10%PPFDで培養を開始し、1日間の誘導期の後に順調に増殖を開始した。 $1.0 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ となった3日目に30%強度へと切り替えた。30%PPFDでも順調に増殖し、6日目にPPFDの切り替え目安である $6.0 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ にほぼ等しい $5.1 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ となり、60%PPFDに切り替えた。60%PPFDでも細胞密度は順調に増加し、8日目に $1.0 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ を上回り、9日目 $1.3 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ となり、100%PPFDとした。10日目以後も、順調に細胞密度は増加し、13日目に $2.0 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ を上回った。

2回目の培養試験では、これまでの4段階のPPFDに加えて、16.7%PPFDを加えた5段階のPPFDとした。培養水温は、1回目と同様に、PPFDの増大に伴う放射熱量の増加に対応した水温調節が遅れたためPPFDの変更時に水温上昇が生じたが、培養期間を通じて14℃から16℃であった。培養期間中のpHは10%、16.7%PPFDでは、8.2付近で安定していたが、PPFDの増加に伴い上昇し、6日目に8.5を、8日目には9.0を上回った。10日目に9.5の最高値となり、13日目には8.5まで低下した。

細胞密度も10%PPFDではこれまでと同様に誘導期の後に細胞密度が増加し始め、3日目、 $1.3 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ の細胞密度で16.7%PPFDとした。16.7%PPFDで5日目に $3.9 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ の細胞密度に達した。5日目に30%PPFDに切り替え、7日目に $9.0 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ となった。8日目 $9.7 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ に、60%PPFDに切り替えた。60%PPFDの切り替えの目安である $6.0 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ を上回った切り替え密度で切り替えたため、8日目の密度増加は鈍化した。細胞密度が増加した9日目に100%PPFDに切り替えた。PPFDの増加により、10日目に細胞密度は $1.5 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ まで増加したが、徐々に密度増加が鈍化し、12日目に $1.6 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ に達した後に急激に低下した。

100%PPFDでの培養と段調光の培養による電力消費量を計算した。培養期間は14日間とし、9日目以降は100%PPFDとした。100%PPFDでは光源にかかる電力消費量が670kWhとなり、段調光を用いた1回目の試験では40%程度少ない420kWhの電力使用量となり、調光段階を増加させた2回目の試験ではより少ない400kWhの電力使用量となった。

## 考察

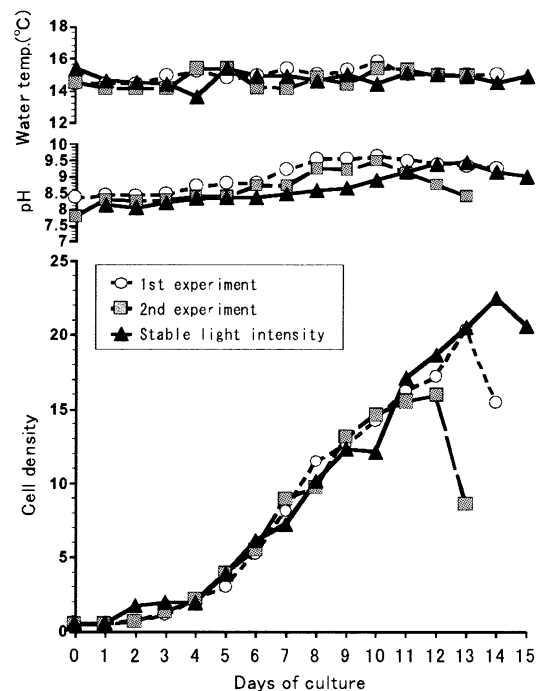


Fig.4-3 Effect of light intensity control method to cell density. The dark symbol is cell density at 100% light intensity. The open and gray symbols are cell density of step-style light control method.

培養コストに關与する要因の中で、本培養システムでは培養不調によるコストと人工光の利用などによるエネルギーコストが培養コストを引き上げる主要因となる。多くの培養施設で光源のPPFDを一定として用いており、実験室レベルではPPFDをオンデマンドに変化させる培養が近年行われているが、大量培養を目指した大型のシステムで細胞密度に対応したPPFDの制御した実証試験は行われていない。<sup>63)</sup> エネルギーコストは温度管理にかかるコストと光源に關わるコストが主なものであり、光源にかかるコストの削減は光源から発生する熱量を減少させるため、室温の管理を含めた培養全体のエネルギーコストを低下させる。段調光による培養法によって100%PPFDの培養と同様の増殖曲線が得られたことから、光源のエネルギーコストを大幅に削減することが可能である。100%PPFDでの培養では、光源だけで1L当たり約45円(事業電力11円・kWh<sup>-1</sup>)のエネルギーコストが必要となるが、段調光を用いることによって約27円までのコストダウンが可能である。よりきめ細かなPPFDの設定制御によって、さらなる電力の削減が可能であろう。

求めた分裂回数の推移では60%では10日目、100%PPFDでは11日まで0.4近い分裂回数を維持し、以後分裂回数が急激に低下した。このことは、60%、100%PPFDで細胞密度 $1.5 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 以上では生産効率が低下する事を示している。これはこの培養槽で効率的に餌料培

養が行える細胞密度が $1.5 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ までである事を示している。そのため、高い最高密度での培養より、 $1.5 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ までに密度を抑えた培養法が望ましいと考えられる。最高密度を抑えることにより、高いPPFDで照射する必要がなくなるためコストの削減に寄与すると思われる。

培養効率を増大させる要因として、通気による培養槽内の攪拌によって細胞が暗部と明部を移動することが考えられる。<sup>20, 63)</sup>より効率的な培養には、培養槽内の攪拌を検討する必要がある<sup>40)</sup>、効率的な細胞密度を増加させるためには、培養槽の形状も大きく関わると予想されることから十分に形状を検討する必要がある。

### 第5章 最適な光源の光色と培養水温の検討

#### 目的

本章では異なる分光特性を持つ光源を用いることで、培養特性がどのように変化するか、あわせて培養水温の変化により培養状態がどのように変化するか検討し、それらの結果からより効率的な培養法について検討した。

#### 材料及び方法

##### 培養光源（蛍光灯）の分光特性

培養光源として使用した55Wコンパクトタイプ蛍光灯4種（白色：FPL-55EX-N、青色：FPL55-EB、赤色：FPL55-ER、緑色：FPL55-EG、松下電器産業(株)製の分光分布をFig.5-1に、ランプ性能をTable 5-1に示す。白色光源として用いた3波長域発光形蛍光灯(EX-N、以後白色)は400~500nmの青色域（ピーク波長：450nm）、500~600nmの緑色域（ピーク波長：540nm）、600~700nmの赤色域（ピーク波長：610nm）の3つの波長域に光放射の波長を集中させた高効率高演色性のランプである。青色蛍光灯(EB、以後青色)では、450nmをピーク波長に400~500nmに主波長域を、赤色蛍光灯(以後赤色)では、

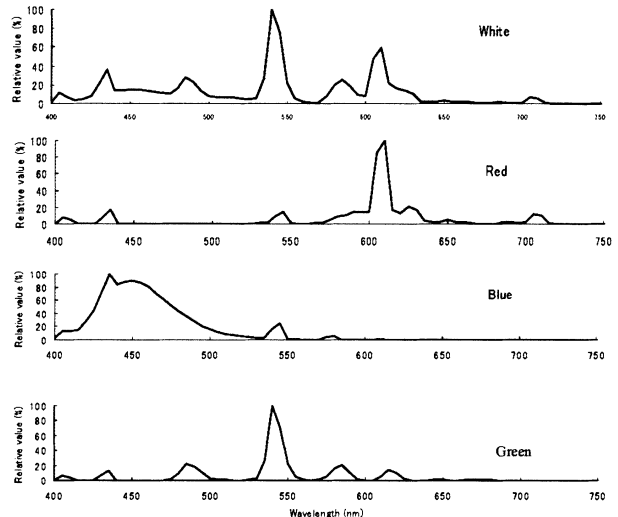


Fig.5-1 Spectral distribution on 4 kinds of fluorescent lamp, white, red, green and blue.

610nmピーク波長に600~700nmに主波長域を、また、緑色蛍光灯(EG、以後緑色)は540nmをピーク波長に500~600nmに主波長域を有している。赤色・青色・緑色の各蛍光灯の発光効率は、Table 5-1に示したように白色の90%程度しかなく、定格電圧で点灯した場合、200L大型培養槽内の平均PPFD分布が白色で $1900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ であったのに比べて、 $1700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ しか得られない。

##### フラスコ培養試験区および200L大型培養槽について

フラスコ培養試験区は、調温可能な室内に設置した。3L平底フラスコ1本が1試験区に収容可能であり、2本の55Wコンパクト型蛍光灯をフラスコ側面に設置した。他の試験区から光を遮断するため試験区をパーティションで仕切り、暗幕で覆い遮光した。

200L大型器は200Lアルテミア孵化槽を用いた培養槽、光源や培養水温調整用ヒートポンプなどの機械類、制御パネルで構成されている。培養槽に付帯したウォータバスで培養水温を制御し、培養槽周囲に配置した9台の照明器具に計36本の55Wコンパクト型蛍光灯を光源

Table 5-1 Electrical power at rated lamp voltage, photosynthetic photon flux, Photosynthetic photon flux density per illuminance, peak wave length at four lamps, which are white , red, green and blue.

Lamp color	Rated lamp wattage (W)	Photosynthetic photon flux ( $\mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$ )	Photosynthetic photon flux density per illuminance ( $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{lx}^{-1}$ )	Peak wave length (nm)
White	55	63.0 (100)	0.014	540
Red	55	60.8 (96.5)	0.019	610
Blue	55	57.2 (90.8)	0.044	450
Green	55	57.5 (91.3)	0.01	540

として取り付けた。海水を満した培養槽内のPPFD分布は、定格電圧点灯時 $1900\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ でほぼ一様であった。<sup>69)</sup>

試験条件

供試藻類として*P.lutheri* (北海道立栽培漁業総合センター保存株)を用いた。

フラスコ培養試験

4種類の蛍光ランプの全組み合わせについて、3L平底フラスコで2回培養した。

培養時のPPFDは光量子計(LI-193+LI250, LiCor社製)で測定し、フラスコ側面で $300\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ とした。培養には、たから培養液(第一製網社製)を $1\text{ml}\cdot\text{L}^{-1}$ の割合で海水に希釈した培養溶液を低温殺菌( $75^\circ\text{C}$ , 30分)して用いた。フラスコ内へは滅菌したガラス管(内径4mm)を通して $0.1\mu\text{m}$ の中空糸フィルター(CNN-010, ADVANTEC社製)で濾過した空気を $3\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ で通気した。培養時の水温は $20^\circ\text{C}$ として室温により調温した。1Lフラスコの継代培養株を無菌操作により初期接種密度 $5.0\sim 10.0\times 10^4\text{ cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ で接種した。

細胞密度計数のため、ガラス管を用いて毎日数mlを採取した培養溶液を、トーマ血球計算盤(エルマ)用いて計数した。培養期間は10日間を基本としたが、密度増加が認められる場合には延長した。

大量培養試験

フラスコ試験で培養期間の短縮が可能であった光源と比較のため白色光を用いて15, 18, 20, 22,  $25^\circ\text{C}$ の各水温で培養した。海水の滅菌効果を高めるため、 $0.01\mu\text{m}$ の中空糸フィルター(CNN-010, ADVANTEC社製)で濾過し、次亜塩素酸ナトリウム溶液を用いて塩素殺菌(有効塩素濃度50ppm, 2時間)した。遊離塩素を中和した

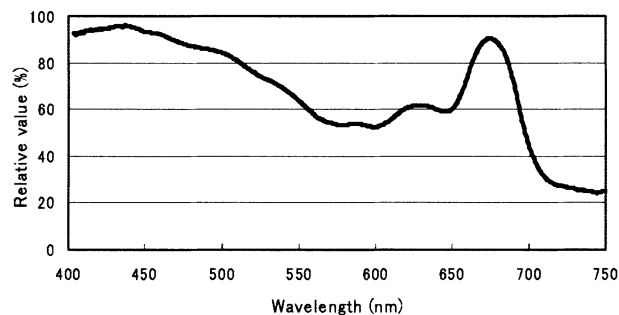


Fig.5-2 Absorption spectrum at microalgae *P.lutheri*.

後に、たから培養液を $1\text{ml}\cdot\text{L}^{-1}$ で添加して培養溶液とした。 $0.1\mu\text{m}$ フィルターで濾過した空気を、気孔径 $40\mu\text{m}$ の散気管から通気量 $30\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ で培養槽に通気した。3L平底

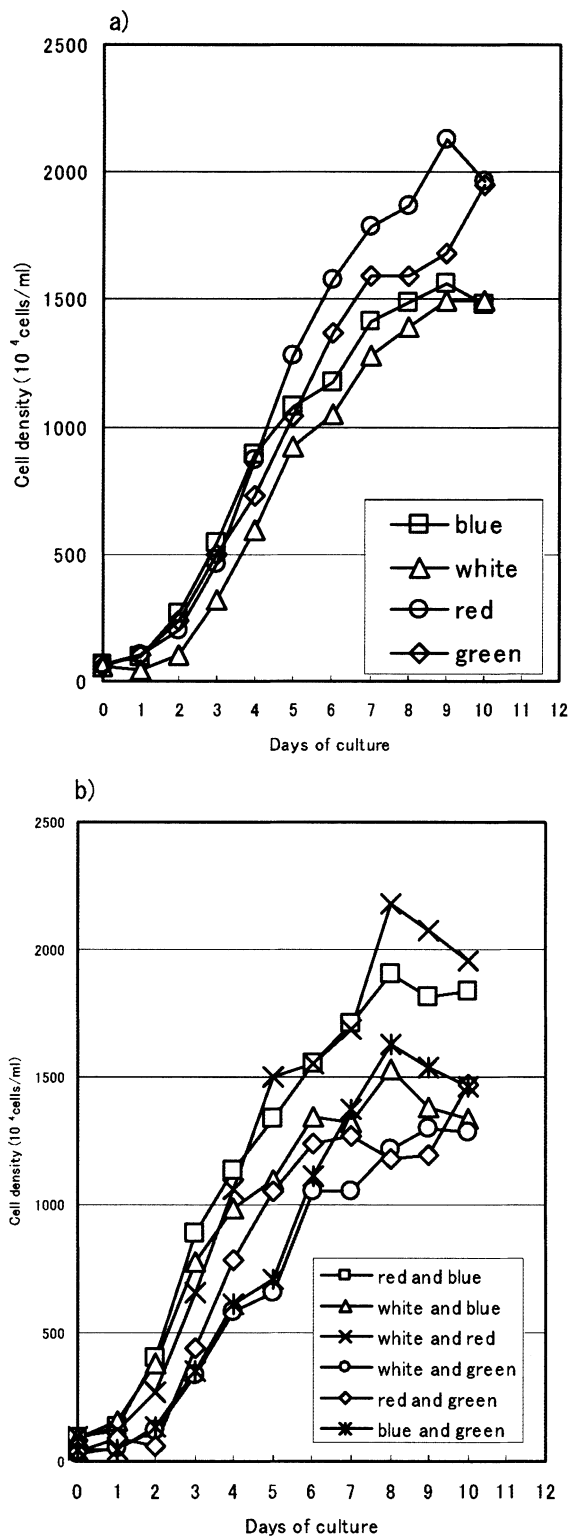


Fig.5-3 Effect of light combined 4 lamps on the growth curve on *P.lutheri* cultured in 3-liter flask at  $20^\circ\text{C}$  and aeration of  $3\text{ liter min}^{-1}$ , a) is cultured on light combined same lamp, b) is cultured on light combined different lamp.

フラスコで細胞密度 $1.0 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 以上の予備培養株を、 $5.0 \sim 10.0 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ の初期接種密度で接種した。培養槽内の環境を把握するため、細胞密度と培養溶液のpHを1日1回測定した。細胞密度が数日間増加しない場合に培養を終了した。

## 結果

### *P. lutheri*の吸光分布

Fig.5-2に示した*P. lutheri*の吸光分布では、青色側の400から450nmと赤色側の600nmから670nmで吸光率が高く、緑色域の550nm付近と、700nm以上で吸光率が低下した。青色側の400から450nmはクロロフィルと補助色素であるキサントフィルにより、600~670nmの吸光のピークはクロロフィルによると思われる。緑色光500~600nmに吸光率の低下見られるが、青色側から緑色側への吸収率の減少が緩やかであり、補助色素による適応の高さが予想された。吸光分布は藍藻や緑藻のそれとは異なり、珪藻<sup>70)</sup>に近い吸光分布であった。

### フラスコ培養試験

Fig.5-3aに各蛍光ランプ単色光での増殖曲線を示した。各光源の培養区での最高密度は、赤色光の培養区で9日目の $2.2 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、緑色光の培養区で10日目の $1.9 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、青色光の培養区で9日目の $1.6 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ であった。Table 5-2に各光源での1日毎の細胞増加量を示した。各培養区共に細胞密度が $1.0 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ を上回ると増殖量が減少した。各区の中で最も高い増殖量 $4.0 \times 10^6 \text{ cells}$ を示したのは赤色光の培養区であり、培養開始から5日目 $1.3 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ まで高い増殖量となった。

4種の蛍光ランプを組み合わせた光源を用いた増殖曲線をFig.5-3bに各培養区での1日当たりの増殖量をTable 5-3に示す。増殖曲線は用いた組み合わせ光源の種類により異なる結果となり、赤色光と青色光を組み合わせた光源（赤色光・青色光）の培養区と白色光・赤色光の培養区が他の培養区よりも高密度に推移した。赤色光・青色光の培養区では、3日目に $4.8 \times 10^6 \text{ cells}$ まで増加し、 $1.5 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ に達した4日目以降に増殖量が減少した。緑色光を含む培養区では密度増加が鈍く、最高密度も $1.5 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 程度であった。

細胞密度 $1.0 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ に達するまでの日数をFig.5-4に示した。白色光・緑色光、青色光・緑色光の培養区を除いた7培養区で、白色光の5.6日間を短縮した。特に、赤色光・青色光の培養区は、白色光の約60%の3.5

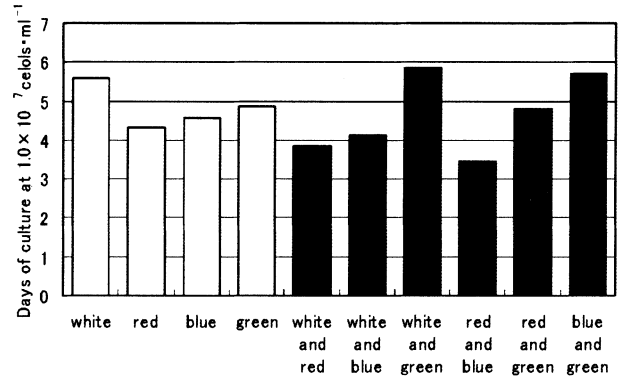


Fig.5-4 Relationship between growth ratio on *P. lutheri* cultured in 3-liter flask until  $10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$  at  $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  and irradiation combined 4 lamps.

日、白色光・赤色光の培養区が3.8日であった。

### 大量培養試験

水温 $15^\circ\text{C}$ での白色光、赤色光・青色光、白色光・赤色光の培養区の増殖曲線とpHの変化をFig.5-5に示す。赤色光・青色光の培養区では、7日目 $1.0 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、9日目 $1.7 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ を上回り、11日目に $1.9 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ となった。赤色光・青色光、白色光・赤色光の培養区では、最高密度では白色光の培養区におよばないが、 $0.5 \sim 1.8 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ までの細胞密度では、常に白色光の培養区より高密度で推移した。pHの変化では、白色光の培養区で10日目に9.0を上回ったが、白色光・赤色光の培養区では5日目に、赤色光・青色光の培養区では4日目に9.0を、7日目から11日目まで10.0を上回った。

赤色光・青色光の培養区と白色光の培養区で水温 $15^\circ\text{C}$ 、 $18^\circ\text{C}$ 、 $20^\circ\text{C}$ 、 $23^\circ\text{C}$ 、 $25^\circ\text{C}$ とした各水温の増殖曲線とpHの変化をFig.5-6とFig.5-7に示した。白色光の培養区では $23^\circ\text{C}$ まで増殖曲線の傾きが増加するが、 $25^\circ\text{C}$ では逆に減少した。赤色光・青色光の培養区でも、 $23^\circ\text{C}$ で最も高密度に推移したが、 $25^\circ\text{C}$ では逆に低下した。両培養区ともに最高密度は $15^\circ\text{C}$ で最も高く、水温の高いほど増殖期を維持できずに最高密度が低下した。pHでは、両培養区ともに水温が高い培養区ほど、値の上昇が早まったが、 $25^\circ\text{C}$ では鈍った。

各水温での $1.0 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ に達するまでの培養日数をFig.5-8に示した。白色光の培養区では、 $15^\circ\text{C}$ で7.9日間、 $23^\circ\text{C}$ では5.3日間、 $25^\circ\text{C}$ では5.8日間となった。赤色光・青色光の培養区では、 $15^\circ\text{C}$ の6.8日間から $18^\circ\text{C}$ の5.0日間まで急激に短縮されるが、 $18^\circ\text{C}$ から $23^\circ\text{C}$ では培養日数が変化しなかった。

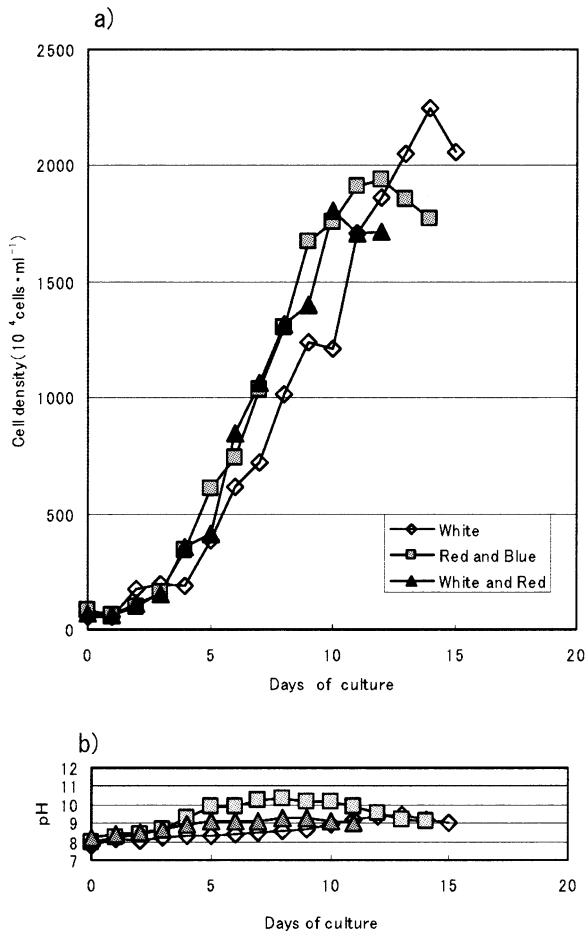


Fig.5-5 Effect of light combined lamps on growth curve and pH curve on *P. lutheri* cultured in 200-liter chamber at 15°C and aeration of 30-liter min<sup>-1</sup>, a is growth curve, b is pH curve.  
 □; light combined red and blue lamp, ◇; white lamp, △;light combined white and red lamp.

考察

藻類は種や生息環境によって大きく光環境への適応が異なる<sup>64, 68)</sup>。緑藻種でも深所に生育する種と浅所に生育する種では含有する色素が異なり<sup>66, 67)</sup>，光合成曲線が異なることが知られている。これは吸収スペクトルの緑色域での低下<sup>70)</sup>で見ることができる。今回試験に用いた *P.lutheri*はFig.5-2で示したように500~550nmでの吸光値の低下が少なく，緑色光に対応した種<sup>65)</sup>と思われる。これは緑色光の培養区で白色光の培養区に近い細胞増殖が得られたことから考えられる。しかし，高い増殖速度が得られたのは，赤色光・青色光の培養区であった。

餌料培養の効率化には，高密度化もしくは培養時間の短縮による手法が考えられる。高密度化では培養時間が伸張して，培養規模が拡大するため培養効率が低下する。培養設備を縮小して効率を増大させるには，培養期間の短縮が必要である。

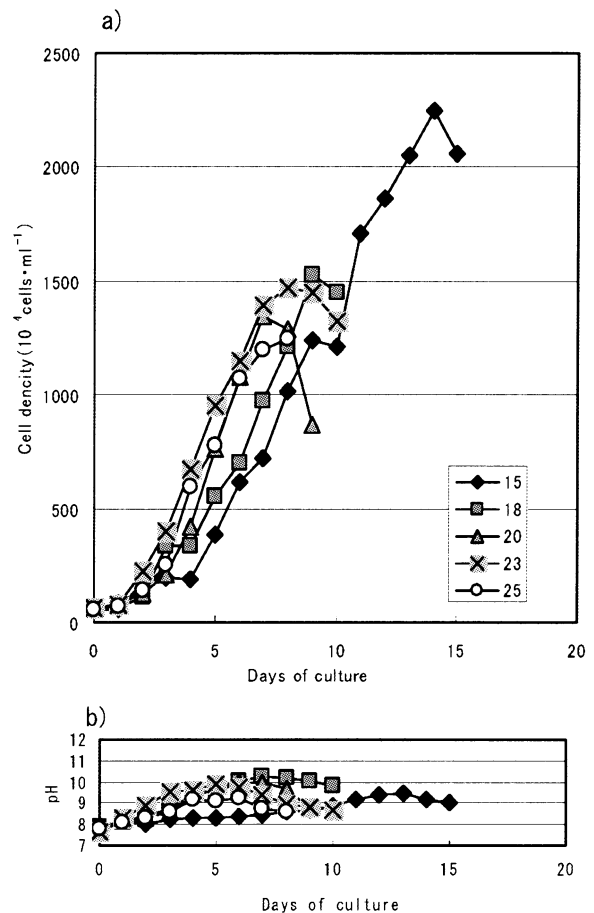


Fig.5-6 Effect of water temperature on growth curve and pH curve on *P. lutheri* cultured in 200-liter chamber irradiated by white lamp at aeration of 30-liter min<sup>-1</sup>, a is growth curve, b is pH curve.  
 ◇; 15°C, □;18°C, △; 20°C, ■; 23°C, ○;25°C.

今回の試験では，白色光から赤色光と青色光を組み合わせた光源に培養光源を変えることで増殖速度の増加が期待できる事を示している。

PPFDでは，白色光に比べて赤色と青色の蛍光ランプを組み合わせた光源が1割程度低い値と考えられるが，フラスコ培養で1.0×10<sup>7</sup> cells·ml<sup>-1</sup>に達するまでの培養日数が白色光を大きく下回る3.5日間となった。白色光では，PPFDの増減にも培養期間が短縮しないにもかかわらず，光源を赤色と青色の組み合わせ光源とすることで大型培養槽でも白色光よりも最大で約40%（18°C培養時）培養期間を短縮した。この増殖速度の違いは，PPFDの差<sup>69)</sup>から生じたものではなく，混合光によるエマーソン効果<sup>72)</sup>が生じたと思われる。Fig.5-8から大型培養槽での18°Cの白色光の培養区では，増殖速度が15°Cに比べて1.3倍に増加し，培養期間を12%短縮する事を示している。一方，赤色光・青色光の培養区では，15°Cから18°Cの間で約30%培養期間を短縮した。このことは光源によって水温への感受性が異なる事を示している。赤色光・青色光の



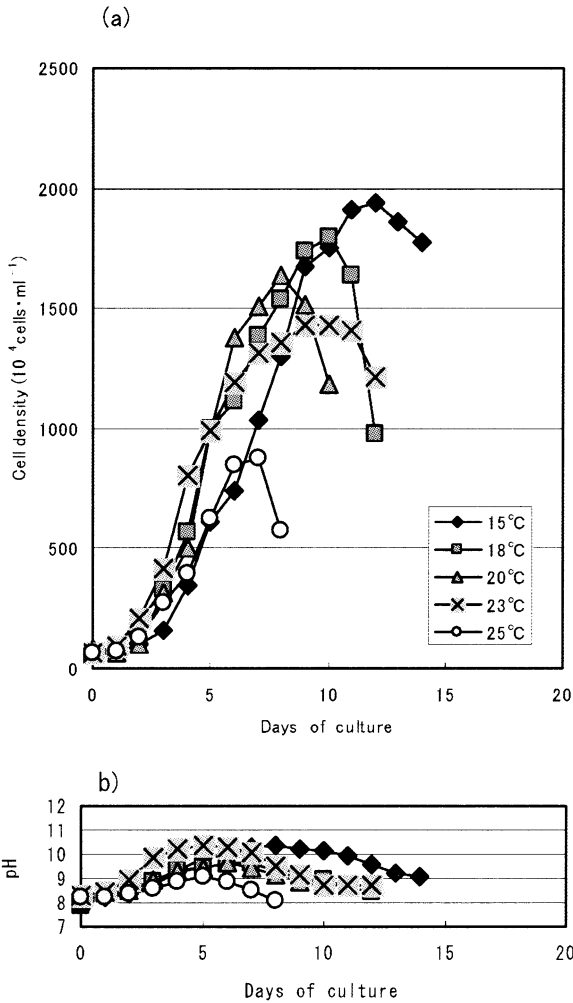


Fig.5-7 Effect of water temperature on growth curve and pH curve on *P. lutheri* cultured in 200-liter chamber irradiated by red and blue lamps at aeration of  $30\text{-liter min}^{-1}$ , a is growth curve, b is pH curve.  
 ◇; 15°C, □; 18°C, △; 20°C, ■; 23°C, ○; 25°C.

培養区では、18°Cから23°Cの間で培養日数を短縮できず、5日間の定常状態となった。培養期間の短縮を妨げる要因としては、培養液、攪拌による効果、 $\text{CO}_2$ の供給が考えられる。

大量培養試験で用いた培養溶液はフラスコ培養試験と同一であることから、5日間で定常状態となる要因とは考えがたい。一方、通気条件は両試験で大きく異なっており、容器形状も球形と円筒状で異なる。単位容積当たりの通気量もフラスコ培養の $1\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ から、大型器の $0.27\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ へと大きく減少した。

単位体積当たりの通気量の差は炭酸ガスなどの供給状態がフラスコ培養と大型器では異なる可能性を示していると共に、攪拌状態が異なっている事を示している。高いpHの状態では培養不調や増殖速度の低下が生じやすく、pH上昇を抑えるためにトリスなどのバッファを培

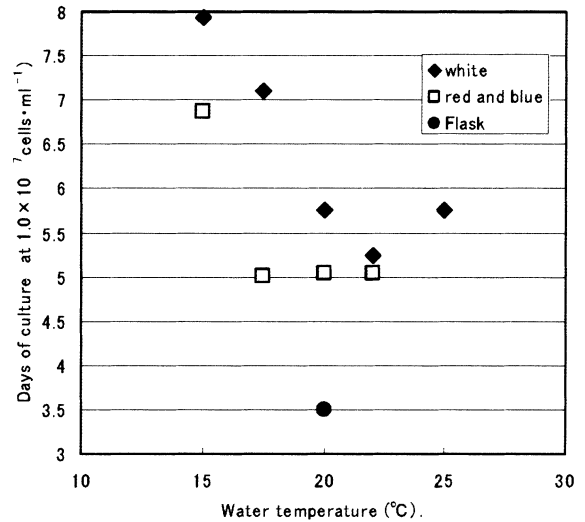


Fig.5-8 Relationship between number of days on *P. lutheri* cultured in 200-liter chamber until  $10^7 \text{ cells ml}^{-1}$  at full light intensity. ◆: white lamp, □: combined red and blue lamps.

養溶液に添加する。pHは炭酸塩の濃度と炭酸ガス分圧<sup>71)</sup>を反映しており、pHの上昇によって、海水中の炭酸ガスと重炭酸イオンが減少する。

赤色光・青色光の培養区では、培養開始から数日でpH9.0を超える値となることから、炭酸ガスの不足が増殖を妨げる主要因と考えられる。増殖速度の頭打ちを解消してより早い増殖速度得るためには、炭酸ガスの添加によってpH9.0以下に培養溶液を維持することが有効である。<sup>34)</sup>しかし、設備を増大させると共に、添加した炭酸ガスの再利用が困難な通気経路が開放系の培養では炭酸ガスの添加は非効率である<sup>17)</sup>。そのため、通気を閉鎖系にした炭酸ガスの添加<sup>44)</sup>が有効と考えられる。

これまでの培養条件である15°Cで白色光を用いた培養では10日間あたりに $1.0 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ の餌料を150L生産可能だが、今回の培養条件では20°Cで赤色と青色の組み合わせ光源を用いることで300L弱の生産が可能となる。15°Cで白色光を用いた培養での餌料生産では1Lあたりの光源にかかる消費電力が4.4kWhであり、エネルギーコストが49円(業務電力11円 $\cdot \text{kWh}^{-1}$ )であり、光合成有効光量子束密度を削減した段調光を用いることで24円 $\cdot \text{L}^{-1}$ までのコストダウンが可能となった。赤色と青色の組み合わせ光源と培養温度を20°Cとすることでさらに12円 $\cdot \text{L}^{-1}$ 程度まで削減可能である。これは15°Cで白色光での培養コストの約35%程度であり、種苗生産コストの削減に大きく寄与すると思われる。

## 終章

現在は、海外を含め、餌料用に微細藻類の培養に関する研究が活発に行われており、培養に関する特許が取得されている<sup>73)</sup>。本研究に用いた培養システムでも、培養槽への光源の照射法として、培養槽外周部に光源を配置するサークル照明での特許を松下電工(株)とヤンマー(株)が取得した。

本研究の成果は以下のようにまとめられる。第1章では、培養水内の光の減衰は、海洋内での光の減衰と同様に、Rambert-Bear則によっており、培養槽内では、細胞密度 $1.0 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ では壁面から10cmで $1 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 以下にまで減衰する。最も高密度となった気孔径 $40 \mu \text{m}$ 、 $30 \text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ を通気条件の適値とした。気孔径よりも通気量変化による細胞密度の変動が著しく、通気による攪拌効率が増殖に関与すると考えられた。

第2章では、PPFDの変化では、光源のPPFDの違いは増殖速度(曲線の傾き)に影響なく、直線的増殖期を維持できる期間が異なった。増殖期間中の最高密度とPPFDは正の相関関係を示し、PPFDを増加させる事により高密度での餌料生産が可能であることを示した。

第3章では、直線的増殖期の終点で受け取る光子数と細胞密度の関係から、細胞密度とPPFDの関係を求め、PPFDの時系列関数を求めた。計算通りに光源のPPFDを無段階に調光することで、培養時の光源の消費電力を定格電圧点灯時の40%近くまで削減可能である。また $1.5 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 以上の細胞密度での培養は培養効率の低下が大きく効率的でない考えられた。

第4章では、実際の培養過程で消費電力の削減を検討した。段調光を用いることで全灯を定格電圧で点灯した場合の消費電力の45%を削減した。これにより、PPFDを時間と細胞密度によって制御する培養が可能であることを示した。

第5章では、赤色と青色を1:1の割合で組み合わせた光源(組み合わせ光源)は、大型培養槽でも白色光源の培養に比べ最大1.7倍の増殖速度を示し、 $20 \sim 23^\circ \text{C}$ が適した培養水温と考えられた。9.5を上回る高いpHに起因した組み合わせ光源の増殖速度の停滞解消には、増殖速度の向上のためには、炭酸ガスの添加が望まれる。

これらの成果は、餌料培養槽の設計・性能向上のためのみならず、フラスコなどを用いた培養法にでも十分な効果が期待できる。

本研究成果の一部を取り込んだ餌料培養システムが、厚岸町立カキ種苗センターに納入された。この施設は日本最大の餌料生産能力を誇り、日産2t~3tの餌料を生産し、これにより殻長5mm 1,000万個体の人工種苗が生産

可能となった。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、多大なるご指導並びにご教授をいただいたとき、本論文を審査いただきました大阪府立大学農学生命科学研究科 農学環境科学専攻 植物システム生産科学分野 村瀬治比古教授、藤浦建史教授、村上克介助教授(現 三重大学教授)ならびに同、応用生命化学専攻 生物機能化学分野、中野長久教授に深く感謝いたします。

大阪府立大学先端科学研究所生物資源開発センターにおける、同大学と北海道立栽培漁業総合センターとの共同研究において、研究の推進にご尽力下さいました宮武和孝センター長、乾 博助教授に深く感謝いたします。また、藻類の光合成について研究協力いただきました同センター大学院生松本隆仁氏、鎌田基司氏に深く感謝いたします。

本研究を始める機会を与えていただきました旧北海道立栽培漁業総合センター、元場長 西川信良博士(現 北海道東海大学教授)、同 西浜雄二博士(現、網走市水産センター場長)、共同研究に参加いただきました同 貝類部長、松山恵二博士(現、北海道東海大学教授)同 貝類第一科長中島幹二氏(現、北海道立稚内水産試験場主任研究員)に深く感謝いたします。また、同 貝類第一科長多田匡秀氏(現 網走水産試験場主任研究員)、研究職員酒井勇一氏(現 栽培水産試験場貝類科長)には、藻類に関して機知に富む教唆をいただき、深く感謝いたします。同 企画主査 高須賀茂之氏(現、北海道庁水産林務部)には、研究の調整等にご尽力いただき深く感謝いたします。

多端な業務の中、本論文のとりまとめの時間を与えていただきました、函館水産試験場室蘭支場の皆様に深く感謝いたします。

元 松下電工株式会社森田富彦氏、元 松下電工照明研究所 洞口公俊博士、ヤンマーディーゼル株式会社増田篤稔博士、同 高橋光男氏、松下電工株式会社 向阪信一氏には実験機器のご提供、共同研究者として数々の機知に富む教唆をいただき、光放射環境の測定解析を教授いただきました。ここに深く感謝いたします。

## 文献

- 1) 水産庁：平成11年度漁業動向に関する年次報告.No. 1, 社団法人日本栽培漁業協会, 東京, 水産庁. 1999. 168-172.
- 2) 図説漁業白書平成11年度. 東京. 農林統計協会, 2000, 8
- 3) 日本資源保護協会20年史. 東京. (社)日本栽培漁業協会. 1986.
- 4) 竹内宏之, 升間主計, 山崎英樹：日本栽培漁業協会事業年報平成9年度. 東京. 社団法人日本栽培漁業協会. 1999. 70-78
- 5) Duer, E. O., Molnar, A. and Sato, V.: Cultured (1998) microalgae as aquaculture feeds. *J. Marine Biotech.* 6 (2), 168-172 (1998)
- 6) Su, H. M., Su, M. S. and Liao, I. C.: Collection and culture of live foods for aquaculture in Taiwan. *Hydrobiologia.* 358, 37-40 (1997)
- 7) 生田義明：微細藻を利用した陸上での二枚貝栽培. 東京. 養殖 1. (2001) 70-73
- 8) 高島葉二, 児玉正碩：二枚貝の餌料藻類と投与系列. 微小藻類の大量培養技術開発研究 (特定研究開発促進事業総括報告書 (茨城県)). 東京. 水産庁養殖研究所. 1-8 (1996)
- 9) 松岡祐輔：餌料生物大量培養技術研究(総括), 京都府水産試験場業績. 29. 1-23 (1967)
- 10) 千原光男, 原慶明：餌料藻類の分離と培養：昭和62年度栽培漁業技術研修事業基礎理論コーステキスト集No.2. 社団法人日本栽培漁業協会. (1987)
- 11) Xi M., Kah W. C. and Yuan K. L.: Growth of *Chlorella* outdoors in a changing light environment, *J. Applied Phycol.*, 9, 425-430 (1997)
- 12) Yuan-Kun Lee: Commercial production of microalgae in Asia-Pacific rim, *J. Applied Phycol.*, 9, 403-411 (1997)
- 13) M. R. Kittc, C. Regunathan, A. Rodrigues: An industrial photosynthetic system for *Skeletonema costatum* in arid regions, *J. Applied Phycol.*, 11, 391-397 (1999)
- 14) 深田哲夫：クロレラの大量培養と水産への応用, 昭和62年度栽培漁業技術研修事業基礎理論コーステキスト集No.1, 社団法人日本栽培漁業協会. 19-16 (1987)
- 15) 丸山 功, 重野生郎：クロレラ培養の最新技術と今後の展望, 養殖. 10. 48-51 (1998)
- 16) 岡内正典：植物餌料研究の現状と課題, 水産庁養殖研究所遺伝育種部・育種研究室. 2-24 (1999)
- 17) 岡内正典：テトラセルミスについて, 昭和62年度栽培漁業技術研修事業基礎理論コーステキスト集No.1, 社団法人日本栽培漁業協会. (1987)
- 18) Kuntsen, G. and Skjanes, K.: Simple growth chambers for culturing microalgae with precision at different temperatures and irradiance, *J. Applied Phycol.*, 11, 487-491 (1999)
- 19) Eriksen, N. T., Poulsen, B. R. and Iversen, J. J. L.: Dual sparging laboratory scale photobioreactor for continuous production of microalgae: *J. Applied Phycol.*, 10, 377-382 (1998)
- 20) Torzillo, G., Carozzi, P. B., Pushparaj, Montaini, E. and Materassi, R.: A two-plane tubular photobioreactor for outdoor culture of *Spirulina*, *Biotechnol. Bioengner.*, 42, 981-998 (1993)
- 21) Suh, I. S. and Lee, S. B.: Cultivation of a cyanobacterium in an internally radiating air-lift photobioreactor, *J. applied phycol.*, 13, 381-388 (2001)
- 22) Muller-Feuga, Guedes, R. L., Herve, A. and Durand, P.: comparison of artificial light photobioreactors and other production systems using *Porphyridium cruentum*: *J. Applied Phycol.*, 10, 83-90 (1998)
- 23) Grobelaar, J. U., Nedbal, L., Ticky, L. and Setlik, I.: Variation in some photosynthetic characteristics of microalgae culture in outdoor thin - layer sloping reactors, *J. Applied Phycol.*, 7, 175-184 (1995)
- 24) Fernandez, F. G. A., Camacho, F. G., Perez, J. A. S., Sevilla, J. M. F. and Grima, E. M.: Modeling of Biomass productivity in tubular photobioreactors for micrialgal cultures: Effects of Dilution rate, tube diameter, and solar irradiance, *Biotechnol. Bioengner.*, 58, 605-616 (1998)
- 25) Cogor, Z., Herrenbauer, M., Schmit, K and Poten, C.: Light distribution in a novel photobioreactor-modelling for optimization, *J. Applied Phycol.*, 7, 175-184 (1995)
- 26) Poulsen, B. R. and Iversen, J. L.: Characterization of gas transfer and mixing in bubble column equipped with a Rubber membrane diffuser, *Biotechnol. Bioengner.*, 58(6), 633-641 (1998)
- 27) 渡部良朋, 齋木 博：フォトバイオリアクターを用いた微細藻類の光合成生産, 日本農芸学会誌. 72(4), 523-527 (1998)

- 28) 大滝勝久, 下園栄昭, 涌井邦浩, 山廻邊昭文, 渋谷武久: *Pavlova lutheri*大量培養手法の検討, 微小藻類の大量培養技術開発研究報告書, 福島県水産種苗研究所, 1-20 (1993)
- 29) 大滝勝久, 高越哲男, 下園栄昭, 秋山雅浩, 山廻邊昭文: *Pavlova lutheri*の育成特性の検討, 微小藻類の大量培養技術開発研究報告書, 福島県水産種苗研究所, 1-11 (1992)
- 30) 酒井美恵, 鳥羽光晴, 深山義文: イソクリシス・タヒチ株の大量培養, 微小藻類の大量培養技術開発研究 (特定研究開発促進事業中間報告書(千葉県)), 水産庁養殖研究所, 1-48 (1994)
- 31) 岡内正典, 福所邦彦: プラシノ藻類テトラセルミス *Tetraselmis tetraele*の培養特性, 養殖研究所研究報告, 5, 10-26 (1984)
- 32) 高越哲男, 下園栄昭, 秋山雅浩, 山廻邊昭文, 渋谷武久, 根本昌宏: 微小藻類の大量培養技術開発研究, (特定研究開発促進事業総括報告書(福島県)), 水産庁養殖研究所, 10-26 (1996)
- 33) 林政博, 瀬古慶子: アコヤガイの種苗生産について, 三重水産技研報, 39-68 (1986)
- 34) 吉松定昭, 小野知足: 鞭毛藻 *Pavlova lutheri*(Droop) Greenとその炭酸ガス通気培養試験, 栽培技研, 9 (2), 27-32 (1980)
- 35) 磯上孝太郎, 渋谷武久: *Pavlova lutheri*の連続培養手法の検討, 微小藻類大量培養技術開発報告書, 福島県水産種苗研究所, 11-24 (1994)
- 36) 瀬古慶子: *Pavlova lutheri*の培養における照度の影響について, 三重県栽培漁業センター事業報告書, 財団法人三重県水産振興事業団, 89-93 (1985)
- 37) 押野昭夫, 關 哲夫, 谷口和也: 二枚貝の餌料となる微小藻類ハンドブック, 水産庁東北海区水産研究所, (1995)
- 38) 押野昭夫, 細谷正弘, 關 哲夫: 餌料培養ハンドブック, 社団法人かき研究所 (1987)
- 39) 北海道立栽培漁業総合センター: 北方性餌料生物の探索と大量培養-I, 指定調査総合助成事業報告書, 北海道立栽培漁業総合センター, 152-157 (1975)
- 40) Ogbonna, J.C., Hirokazu Yada and Hideo Tanaka: Effect of Movement by Random Mixing Between the Surface and Bottom of Photobioreactors on Algal Productivity, *J. of Fermentation and Bioengineering*, 79(2), 152-157 (1995)
- 41) Ogbonna, J.C., Hirokazu Yada and Hideo Tanaka: Kinetic Study on light-limited Batch Cultivation of Photosynthetic Cells, *J. of Fermentation and Bioengineering*, 80(3), 259-264 (1995)
- 42) Ogbonna, J. C., Hirokazu Yada, Hideo Tanaka: Light Supply Coefficient: A New Engineering Parameter for Photobioreactor Design, *J. fermentation and Bioengineering*, 80(4), 369-376 (1995)
- 43) Ogbonna, J. C., Hideo Tanaka: Cyclic Autotrophic/Heterotrophic Cultivation of Photosynthetic Cells: A Method of Achieving Continuous Cell Growth under Light/Dark Cycles, *Bioresour Technol.*, 65, 65-72 (1998)
- 44) 相賀一郎, 村上克介, 清田 信, 松本隆仁, 山地亮一, 中野長久, 宮武和孝, 竹中重雄, 増田 渉, 神田 毅, 洞口公俊, 和佐清孝, 近藤次郎: 光合成藻類, ユーグレナの光ダイオードによる生育, CELSS学会誌, 9 (2), 7-12 (1997)
- 45) Lee, C. J., and Palsson, B. O.: High-density algal photobioreactors using Light Emitting Diodes, *Biotechnol. Bioengner.*, 44, 1161-1167 (1994)
- 46) 西島敏隆, 深見公雄: 深層海水による植物プランクトンの培養および深層細菌との混合培養による増殖の促進, *Bull.Mar. Fish. Kouchi Univ.*, 15 23-51 (1995)
- 47) Suminto and Hirayama, K.: Effects of Bacterial Coexistence on the Growth of a Marine Diatom *Chaetoceros gracilis*, *Fisheries Science*, 62(1), 40-43 (1996)
- 48) 今井一郎: 海洋植物プランクトンと細菌の関係, 月刊海洋号外21, 海洋出版, 169-177 (2000)
- 49) Chuecas, L. and Riley, J. P.: Component fatty acids of the total lipids of some marine phytoplankton, *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, 49, 97-116 (1969)
- 50) Reitan, K. I., Rainuzzo, J. R., Oie, G. and Olsem, Y.: A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae, *Aquaculture*, 143, 379-391 (1996)
- 51) 高島葉二, 児玉正碩, 柳田洋一, 川野辺 誠: 微小藻類5種の培養試験と二枚貝に対する餌料価値, 茨城水試研報, 31, 23-28 (1993)
- 52) 岸野元彰, 高橋正征: 光利用と光合成, 海洋植物プランクトン, 月刊海洋号外 No.10, 海洋出版, 40-49 (1996)
- 53) Suh, I. S. and Lee, S. B.: Cultivation of cyanobacterium in an internally radiating air lift photobioreactor, *J. Applied Phycol.*, 13, 381-388 (2001)
- 54) Grobbelaar, J. U., Nedbal, L. and Tichy, V.: Influence of high frequency light/dark fluctuations on photosynthetic characteristic of micro-algae photoacclimated to different light intensities and

- implications for mass algal cultivation, *J. applied phycol.*, 8, 335-343 (1996)
- 55) Nedbal, L., Tichy, V., Xiong, F. and Grobbelaar, J. U.: Microscopic green algae and cyanobacteria in high-frequency intermittent light, *J. applied phycol.*, 8, 325-333 (1996)
- 56) 洞口公俊, 奥村裕弥, 中島幹二, 松山恵二, 向阪信一, 増田篤稔, 高橋光男, 村上克介: 微小藻類の培養と光放射環境に関する実験研究, 平成10年度照明学会全国大会講演論文集, 271-272 (1998)
- 57) 村瀬治比古, 村上克介, 穂波信雄, 瀧川 博, 西浦芳史, 鎌田基司, 洞口公俊, 奥村裕弥: PPFによるパプロバ光合成活性の変化, 農業機械学会関西支部報, 88, 77-78 (2000)
- 58) 北野 康: 溶液科学—炭酸物質の挙動を中心として, 海洋無機化学, 海洋学講座6, 東京大学出版会, 7-44 (1975)
- 59) Borowitzka, M. A.: Microalgae for aquaculture, Opportunities and constraints, *J. Applied Phycol.*, 9, 393-401 (1997)
- 60) Mortensen, S. H., Borsheim, K. Y., Rainuzzo, J. R. and Knutsen, G.: Fatty acid and elemental composition of marine diatom *Chaetoceros Gracilis* Schutt. Effect of silicate deprivation, temperature, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 122, 173-185 (1988)
- 61) Zhu, Lee, Y. K. and Chao, T. M.: Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1, *J. Applied Phycol.*, 9, 451-457 (1997)
- 62) Phytoplankton manual I, unesco (1978) 300-306
- 63) Eriksen, N. T., Geest, T. and Iversen, J. J. L.: Photobioreactor with on-line optimization of light intensity, *J. applied phycol.*, 8, 345-352 (1996)
- 64) 河地正伸: ハプト藻類, 海洋植物プランクトンII月刊海洋号外No.21, 海洋出版, 51-56 (2000)
- 65) 河地正信, 井上 勲: ハプト植物門, 藻類の多様性と系統, 裳華房 236-242 (1999)
- 66) 横浜康継: 生育深度を異にする紅藻の光合成特性, 藻類, 21(4), 119-124 (1973)
- 67) 横浜康継: 海産緑藻における緑色吸収色素, その生態的意義と系統的意義, 藻類, 29, 209-222 (1981)
- 68) 藤田善彦: 水界環境と藻類の生理, 藻類の生態, 内田老鶴圃, 17-36 (1986)
- 69) 洞口公俊, 奥村裕弥, 中島幹二, 松山恵二, 向阪信一, 増田篤稔, 高橋光男, 村上克介: 微小藻類の培養と光放射環境に関する実験研究, 平成10年照学全国大, 271-272 (1998)
- 70) 生物海洋学1 プランクトンの分布/化学組成, 東海大学出版会, 59-73 (1996)
- 71) 猿橋勝子: 炭酸ガスと炭酸物質, 海水の科学, 海洋科学基礎講座10, 東海大学出版会, 242-252 (1972)
- 72) 柴田和雄: 光と植物, 培風館, 7-17 (1982)
- 73) Borowitzka, M. A.: Patents, *J. applied phycol.*, 13, 523-526 (2001)