

助成番号 9911

有用微細藻類のフォトバイオリアクターによる大量培養に関する研究

助成研究者：平林 征四郎 ((社)国際農業教育研究開発協会)

共同研究者：ヘーベル・T・ゲハラ(元フイリピン大学 ロスマニョス校 自然科学部)

生物界において食物連鎖の底辺を支えている有用微細藻類のフォトバイオリアクターによる効率的野外大量培養技術の開発を目的として、新しい発想によるフォトバイオリアクターの設計・試作を行い、有用微細藻類の野外大量培養試験を行った。

従来の藻類大量培養はすべてが巨大な開放型の培養池方式で行われている。そのため、1) 他生物の混入(コンタミン)により、極少数の特殊な藻類以外では単独培養が困難である、2) 培養濃度を高く維持できないため生産効率が低い、3) 培養温度のコントロールができない、4) 培養液の攪拌に多量のエネルギーを要する、5) 大量培養に広大な土地面積を要する。などの欠点があり生産性・生産コストの面で問題がある。

そこで、これらの欠点を解決し他の多くの有用微細藻類を高濃度で効率的に大量培養できる新型フォトバイオリアクターを試作・開発(詳細は前年度の報告書に記載)し、栽培漁業における種苗生産において極めて重要で生餌としての評価が高い海洋性藻類6種類を用いて本年3月から11月にかけて野外大量培養試験を行った。

供試した海洋性藻類は以下の通りである。

1. *Nannochloropsis oculata*
2. *Palvola lutheri*
3. *Phaeodactylum triconutum* (珪藻類)
4. *Chaetoceros calcitrans* (珪藻類)
5. *Isochrysis galbana*
6. *Tetraselmis suecica*

その結果、フォトバイオリアクターを用いることにより、1) *Nannochloropsis oculata*、*Phaeodactylum triconutum* (珪藻類) および *Tetraselmis suecica* はかなり長期間安定して培養を継続できることが判明し、実用化への手掛かりを得た。2) その他の3種(*Palvola lutheri*、*Chaetoceros calcitrans* (珪藻類) *Isochrysis galbana*) は生育適温の範囲が比較的狭く(15-25℃)、その範囲を越えると生育に支障を来すことが認められた。従って、特に当試験地でのこれら3種の冬季低温期および夏季高温期における野外大量培養は難しい面があることが示唆された。今後更に、培養温度のコントロール方法についてフォトバイオリアクターの改良を検討する。

助成番号 9911

有用微細藻類のフォトバイオリアクターによる大量培養に関する研究

助成研究者：平林 征四郎 ((社)国際農業教育研究開発協会)

共同研究者：ヘゼル・T・ケバラ(元フィリピン大学 ロスバニョス校 自然科学部)

1. 研究目的

本研究は、有用微細藻類（海洋性及び淡水性）を野外において単独大量培養するための培養装置（フォトバイオリアクター）に関するものである。

生物界において食物連鎖の底辺を支えている有用微細藻類のフォトバイオリアクターによる効率的野外大量培養技術の開発を目的として、新しい発想によるフォトバイオリアクターの設計・試作を行い、有用微細藻類の野外大量培養試験を行った。

従来から実用化されている藻類大量培養方法は、巨大な開放型の培養池方式を用いて行われている。そのため、1) 不純物や他生物の混入（コンタミン）等により、単独培養を維持することが困難であるため高品質のバイオマスの生産が難しい、2) 培養濃度を高く維持できないため生産効率が低い、3) 培養温度のコントロールができない、4) 培養液の攪拌を効率的に行うのに多量のエネルギーを要する、5) 培養濃度が薄いため大量培養には広大な土地面積を要する。などの欠点があり生産性・生産コストの面で問題がある。

そこで、本研究はこれらの欠点を解決できる新型フォトバイオリアクターを試作・開発（詳細は前年度の報告書に記載）し、他の多くの有用微細藻類の野外大量培養技術を開発することを目的として行った。本年は特に栽培漁業における種苗生産において極めて重要な位置を占め、生餌としての評価が高い海洋性藻類6種類を用いて3月から11月にわたり野外大量培養試験を行った。

2. 研究方法

2-1 フォトバイオリアクターの試作

リアクターの基本コンセプトは以下の通りである。その他、構造、容量等は昨年試作したものと同仕様のものを数基試作し、実験に供した（詳細は前年度の報告書に記載）。

(基本コンセプト)

1. 太陽光の受光効率が高い形状、耐候性のある材質
2. 効率的攪拌機構を持つ
3. 培養温度コントロールシステム
4. コンタミン防御構造
5. スケールアップの容易性
6. 人工照明も利用可能

7. シンプル構造

2-2 供試材料

供試した海洋性藻類は以下の6種である。これらの海洋性藻類は現在、種苗生産における生餌料としての価値が高いと考えられている海洋性藻類である。

Table 1. 供試海洋性藻類

種 類	Strains	主 な 用 途
フェオダクチラム (珪藻類)	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	アワビ、アサリ、アルテミア等
イソクリシス	<i>Isocrysis galbana</i>	アサリ、カキ等
キートセロス (珪藻類)	<i>Chaetoceros gracilis</i>	ホッキガイ、アコヤガイ、アワビ、 ナマコ幼生等
パプロバ	<i>Pavlova lutheri</i>	ホッキガイ、アコヤガイ等
テトラセルミス	<i>Tetraselmis suecica</i>	クルマエビ、ブラックタイガー、 アルテミア等
ナンノクロロプシス	<i>Nannochloropsis oculata</i>	ワムシ、アルテミア等（ヒラメ、 タイなどの種苗の生餌）

2-3 培養方法

上記6種の海洋性藻類について、実験室内においてフラスコおよび扁平培養ビンを用いて下記の培養条件下でそれぞれ単独培養し調製したものを接種株とし、試作したフォトバイオリアクター（培養容量、約120L）を用いて野外培養試験を行った。

試験地は静岡県沼津市足高尾上441-14、標高約200mの南向き傾斜地（傾斜勾配約8%）において行った。

2-3-1 接種用藻類の培養

300 mlのフラスコを用いて、培養温度20℃、光強度70 μ E/m²/s（連続照明）、CO₂約2%含有空気を通気した振とう培養器内で上記海洋性藻類を無菌培養した。その後培養液を扁平ビンに移し、以後拡大培養を行い野外培養試験の接種株とした。

2-3-2 培養条件

接種後、培養濃度が約1.5~2.0g/L以上に達した時点から、各バイオドームから約35%を2日~4日間の間隔で収穫し、その後直ちに新しい培地を添加して培養を継続した。空気の通気量は各リアクター当たり約30~40L/minとし、これに炭酸ガスを混ぜてCO₂2%含有の空気として通気した。培地のpHはCO₂供給量をコントロールして、それぞれの藻

類の至適 pH に近い値を維持できるように操作した。

2-3-2 培地組成

下記の人工海水 (ASW) を調製して培養を行った。

Table 2. Receipt of Medium

<u>Artificial Sea Water (ASW)</u>	
<u>Chemical components</u>	<u>Final concentration (g/L)</u>
1. NaCl	35.1
2. MgSO ₄ 7H ₂ O	6.6
3. MgCl ₂ 6H ₂ O	5.6
4. CaCl ₂ 2H ₂ O	1.5
5. KNO ₃	1.0
6. KH ₂ PO ₄	0.070
7. Iron solution	微量
8. Micro elements	微量

2-2-3 調査項目

顕微鏡観察、乾物重 (バイオマス量)、クロロフィル含量

3. 結果

3-1 *Phaeodactylum tricornutum* の野外培養

- * 培養期間：4月21日～5月21日 (30日間)
- * 培養中の pH：6.7～9.7 (至適 pH：8.0)
- * 培養温度：14.3～25.2℃ (至適温度：25～28℃)
- * 野外培養経過

培養中の藻体バイオマスの濃度変化とクロロフィル含量の変化は、Fig 1 および Fig 2 にそれぞれ示した。培養開始時の濃度は約 2g/L で、約 2 週間後には 3.5g/L に達した。以後は培養濃度を約 3.5g/L～4.0g/L の範囲を維持しながら 2～4 日置きに約 35% づつ収穫を行い、約 6 ヶ月間殆どコンタミンなく連続培養が可能であった。また、培養中 Protozoa (原生動物) の混入が認められたが、培地中の塩分濃度 (salinity) を若干高めるとの操作により Protozoa の増殖を抑えることができた。本藻体バイオマスは収穫後濃縮 (約 40～50g/L) して 4℃ で保存すれば、殆ど藻体細胞の損傷はなく約 12 ヶ月間接種用として利用可能であった。

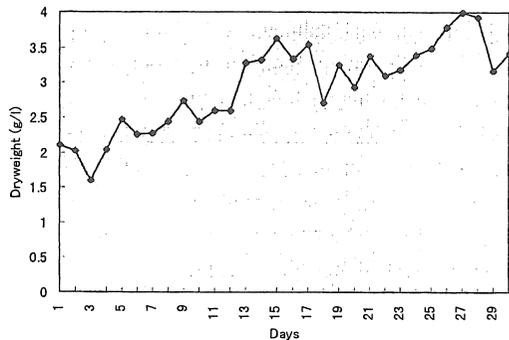


Fig. 1. Growth curve of *Phaeodactylum tricornutum* cultivated outdoors in 120 L biodome reactor from 21 April to 21 May 1999.

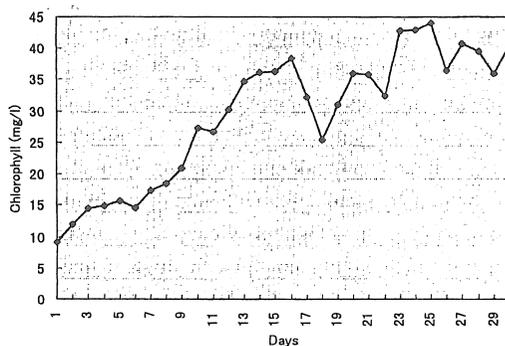


Fig. 2. Growth curve of *Phaeodactylum tricornutum* cultivated outdoors in 120 L biodome reactor from 21 April to 21 May 1999.

3-2 *Isocrysis galbana* の野外培養

* 培養期間：1) 3月17日～4月22日 (37日間)

2) 6月4日～7月14日 (37日間)

* 培養中の pH：7.2～8.5 (至適 pH：7.0～7.5)

* 培養温度：14.0～30.0℃ (至適温度：15～25℃)

* 野外培養経過

1) 3月17日～4月22日 (春季、37日間)

培養中の藻体バイオマスの濃度変化とクロロフィル含量の変化は、Fig 3 および Fig 4 にそれぞれ示した。培養開始時の濃度は約 1.2 g/L でスタートしたが、最初の3日間増殖が停滞し濃度が 0.7 g/L まで減少したが、その後は増殖を続け約3週間後には 2.0 g/L に達した。以後は培養濃度を約 2.0 g/L～2.5 g/L の範囲を維持しながら2～3日置きに約35% づつ収穫を行い、37日間野外で培養試験を行った。本種は比較的低温条件下 (15℃～25℃) で培養は安定した。また、冬季に外気温度が2℃まで下がっても培養液が凍結しなければ生存は可能であった。

1) 3月17日～4月22日

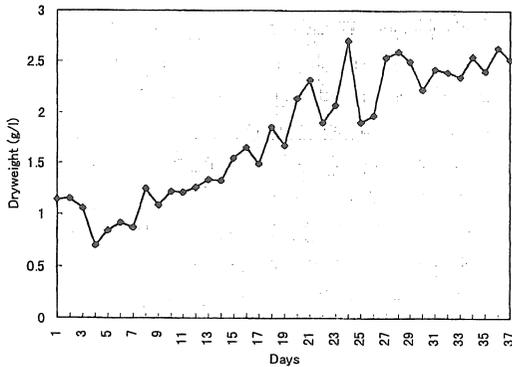


Fig. 3. Growth curve of *Isochrysis galbana* cultivated outdoors in 120 L biodome reactor from 17 March to 22 April 1999.

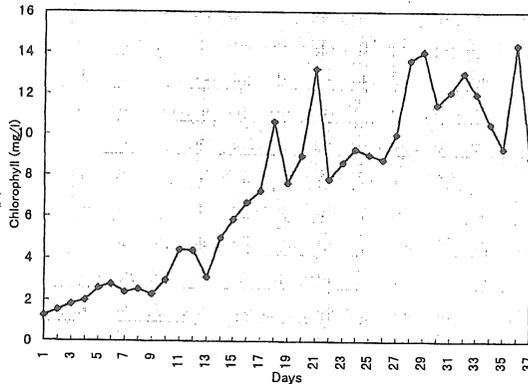


Fig. 4. Growth curve of *Isochrysis galbana* cultivated outdoors in 120 L biodome reactor from 17 March to 22 April 1999.

2) 6月4日～7月14日 (夏季、37日間)

培養濃度を1.0g/Lでスタートし、17日後に1.6g/Lに達したが、以後増殖は停滞し培養濃度は減少した(Fig. 5)。これは明らかにこの時期の外気温が高いため、リアクターの外側への散水による温度調節にも拘らず培養温度が30℃以上となり、至適温度を大きく越えたことに原因がある。本種は培養温度が30～35℃になると発泡 (Foaming) して増殖が止まった。

以上の結果から見ると、本種の野外培養は当試験地では冬季、春季、秋季は十分可能であるが、夏季の培養は外部散水と20～30%程度のShadingの併用によって培養温度を28℃以下に維持できるような操作ができれば可能であるが、それが不可能な場合には培養を正常に維持するのは当試験地では難しい。

3-3 *Tetraselmis suecica* の野外培養

* 培養期間：8月4日～9月10日 (37日間)

- * 培養中の pH : 7.3~8.9 (至適 pH : 8.0)
- * 培養温度 : 20.0~35.0°C (至適温度 : 25~28°C)
- * 野外培養経過

培養中の藻体バイオマスの濃度変化は、Fig 6 に示した。培養開始時の濃度は約 1.8 g/L でスタートし、1 週間後に約 3.0g/L に達したので 3~5 日置きに約 35%の収穫を行い、以後約 3.0~5.0g/L の濃度を維持しながら 37 日間培養を続けた。本種は増殖至適温度の幅が広いので外気の温度変化にも対応可能で、冬季および夏季でも生育に大きな支障は認められなかった。また、培養中他の藻類のコンタミンや Protozoa 等の混入は殆ど認められず、バクテリアの増殖も比較的少なかった。従って本種は当地において年間を通して野外培養が可能であった。

2) 6月4日~7月14日

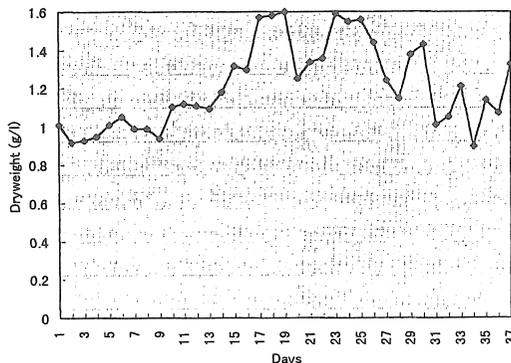


Fig. 5. Growth curve of *Isochrysis galbana* cultivated outdoors in 120 L biodome reactor from 4 June to 14 July 1999.

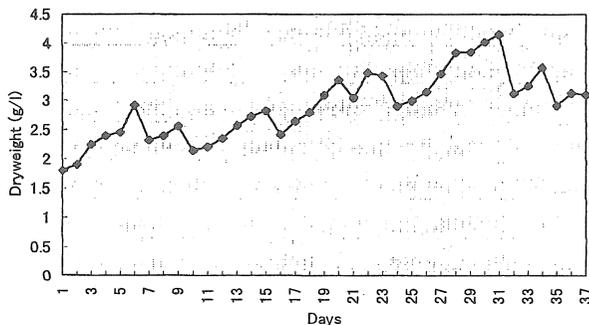


Fig. 6. Growth curve of *Tetraselmis suecica* cultivated outdoors in 120 L biodome reactor from 4 August to 10 September 1999.

3-4 *Palvola lutheri* の野外培養

- * 培養期間 : 8月4日~9月10日 (37日間)

- * 培養中の pH : 7.2~8.5 (至適 pH : 7.0~7.5)
- * 培養温度 : 20.0~32.0°C (至適温度 : 15~25°C)
- * 野外培養経過

培養中の藻体バイオマスの濃度変化とクロロフィル含量の変化は、Fig 7および Fig 8 にそれぞれ示した。培養開始時の濃度は約 1.0 g/L でスタートしたが、その後の増殖は遅く濃度は 1.0g/L から 1.5g/L の範囲に止まった。クロロフィル含量も 2mg/L から 6mg/L の範囲の変化に止まった。本種は *Isochrysis galbana* と同様に生育の至適温度は 15°C~25°C と比較的低位のため、夏季 (8月~9月) における野外培養は増殖が進まず不安定で難しいことが認められた。

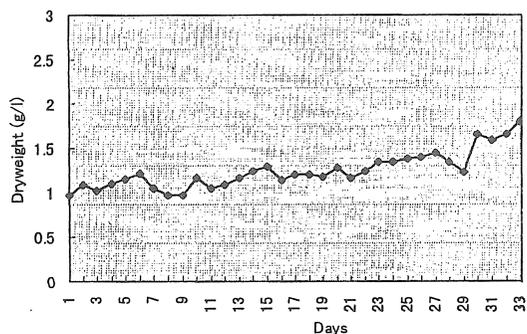


Fig. 7. Growth curve of *Pavlova lutherii* cultivated outdoors in 120 L biodome reactor from 4 August to 10 September 1999.

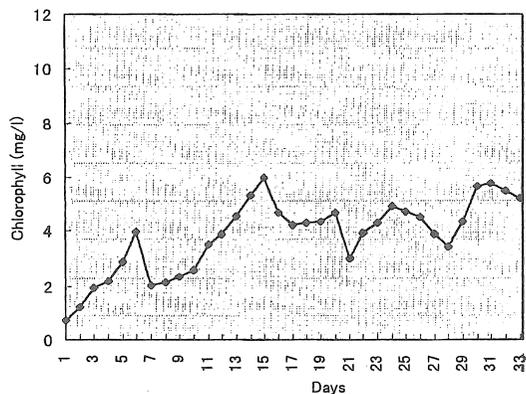


Fig. 8. Growth curve of *Pavlova lutherii* cultivated outdoors in 120 L biodome reactor from 4 August to 10 September 1999.

3-5 *Nannochloropsis oculata* の野外培養

本種については、昨年冬季に野外培養試験を行い比較的安定した培養結果を得たが、本年は春季、夏季に同様な野外培養を実施し、培養濃度 1.5g/L から 3.0g/L の範囲を安定的に維持することができ、生産性も 0.25~0.32g/L/day という比較的高い値を得、長期間当試験地において培養を維持することができた。

4. 考察及び今後の課題

フォトバイオリアクターによる有用微細藻類の効率的野外培養技術の開発を目的として、本年は特に栽培漁業における種苗生産において重要な生餌としての評価が高い海洋性藻類を用いて、長期間の野外培養試験を行った。その結果、フォトバイオリアクターを用いることにより、1) *Nannochloropsis oculata*, *Phaeodactylum triconutum* (珪藻類) および *Tetraselmis suecica* はかなり長期間当試験地において安定して培養を維持できることが判明し、実用化への手掛かりを得た。2) その他の3種 (*Palvola lutheri*, *Caetoceros calcitrans* (珪藻類) *Isochrysis galbana*) は生育適温の範囲が比較的狭く (15 - 25℃)、その範囲を越えると生育に支障を来すことが認められた。従って、本試験地においてこれら3種の冬季および夏季における野外培養は、試作したリアクターに設置している散水装置のみによる温度制御では生育適温を維持することは困難であった。特に、夏季では散水に用いる水の水量の増加および水温を約3℃程度下げる方法について新たな方法の検討が必要であり、また冬季の低温期 (1月, 2月) には当試験地の外気温度は氷点下まで下がるため、試作したバイオリアクターを用いても上記藻類の野外大量培養は難しい面があることが示唆された。

4. 参考文献等

- Richmond, A.(1990) Large scale microalgal culture and application. Progress in Phycological Research, Vol.7, 269-329
- Richmond, A.(1986) Microalgae of economic potential in: Handbook of Microalgal Mass culture pp. 199-244. CRC Press Boca Raton, FL.
- Richmond, A. and Becker, E.W.(1986) Technological aspects of mass cultivation a general outline, Handbook of Microalgal Mass culture pp.245-263
- Torzillo, G., Sacchi, A. and Materassi, R. Effect of temperature on the yield and night biomass losses in *Spirulina platensis* grown outdoors in tubular photobioreactors. J. Applied Phycology 1. 3: 103-109. (1991)
- Acien Fernandez, F. G., F. Garcia Camacho, J. A. Sanchez Perez et al. Modeling of Biomass Productivity in Tubular Photobioreactors for Microalgal Culture : Effect of Dilution Rate, Tube Diameter, and Solar Irradiance. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 58, No. 6. pp.

605-615. (1998)

- Qiang Hu, Faiman, D. and Richmond, A. (1998). Optimal Tilt Angles of Enclosed Reactors for Growing Photoautotrophic Microorganisms Outdoors. *J. Fermentation and Bioengineering* Vol. 85, No. 2, pp. 230-236 (1998)
- Richmond, A. and Hu Qiang. Principles for Efficient Utilization of Light for Mass Production of Photoautotrophic Microorganisms. *Applied Biochemistry and Biotechnology* Vol. 63-65, 649-658 (1997)
- Gitelson, A., Hu Qiang and Richmond, A. Photic volume in Photobioreactors Supporting Ultra high Population Densities of the Photoautotroph *Spirulina platensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 62. No. 5, 1570-1573.
- 山村健治, 末広文一、小島英嗣: CO₂ 固定フォトバイオリアクターの開発、住友重機械技報 Vol.144, No.131.13-16 (1996)
- 渡部良明、斉木博: 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 *Nippon Nougai Kagaku Kaishi* Vol. 72, No. 4 pp. 523-527 (1998)
- Richmond, A., Boussiba, S. Vonshak, A. and Kopel, R.: A new tubular reactor for mass production of microalgae outdoors. *J. Applied Phycology* 5. pp 327-332 (1992)
- Tredici, M. R. and Materassi R.: From open ponds to vertical alveolar panel: The Italian experience in the development of reactor for the mass cultivation of photoautotrophic microorganisms. *J. Applied Phycology*, 4, pp 221-231 (1992)
- Qiang, Hu, Guterman, H. and Richmond, A.: A flat inclined modular photobioreactor for outdoor mass cultivation of photoautotrophs. *Biotechnology and Bioengineering.*, Vol. 51, No. 1 (1996)
- Qiang, Hu, Guterman, H. and Richmond, A.: Physiological characteristics of *Spirulina platensis* (Cyanobacteria) cultured at ultrahigh cell densities. *J. Applied Phycology* Vol. 32 pp 1066-1073 (1996)

The Mass culture of the Valuable Microalgae by Using the New-type Photobioreactor

Seishiro Hirabayashi (Society for Agricultural Education-Research Development Abroad)

Hazel T. Gevarra (Former, Dept. of Natural Science, Los banos campus, Philippine University)

Summary

A newly designed photobioreactor that can efficiently work to mass culture of the valuable microalgae for application was developed and the mass culture of 5 species of marine algae were tested outdoor by using the photobioreactor. which is described in detail on the last year report.

Hitherto, microalgal mass production on a commercial basis have been operated in a huge open pond with a paddle wheel. However, there are many technical problems for examples, contamination, low cell density culture, no temperature control and non-efficient mixing system etc., in this conventional method of microalgal mass production. It, therefore, is not capable to have a high productivity, high quality products and a low cost performance. Moreover, there is a limit in microalgal species that can be cultured in the open pond system, since a only few species such as *Chlorella*, *Spirulina* and *Dunaliella* with special biological and physiological characters as tolerance to high pH, resistance to high salt concentration can be cultured in the open pond.

In order to resolve above mentioned problems, we have developed a more practical and useful photobioreactor that can efficiently work to mono-culture outdoor in many kind of microalgal species.

In this study, we tested mass culture outdoor of the following marine algae that are the very important species for aquaculture during from March to November in 1999:

- 1) *Nannochloropsis oculata*
- 2) *Palvola lutheri*
- 3) *Phaeodactylum tricornutum* (diatom)
- 4) *Chaetoceros calcitrans* (diatom)
- 5) *Isochrysis galbana*
- 6) *Tetraselmis suecica*

The results in mass culture outdoors of these marine algae by using photobioreactor showed the followings : 1) the mass culture in *Nannochloropsis oculata*, *Phaeodactylum tricornutum* (diatom) and *Tetraselmis suecica* showed the stable productivity for a long-term and then the possibility of commercial production was shown. 2) the mass culture outdoors in *Palvola lutheri*, *Chaetoceros calcitrans* (diatom) and *Isochrysis galbana* were difficult to maintain the stable culture on the cold winter and hot summer season in this area because these marine algae have a relatively narrow range in optimum temperature (15-25°C) and were sensitive to growth temperature. We are going to study the effects of culture condition and environmental condition outdoor on the productivity and fatty acid composition of these marine algae.