

間欠的な曝気攪拌が海産珪藻 *Chaetoceros gracilis* の生産性に与える影響

大竹正弘^{1)*}、家後幸一²⁾、平原南萌^{1a)}、ファティマ・ユソフ³⁾、戸田龍樹¹⁾

1) 創価大学理工学部 〒192-8577 東京都八王子市丹木町 1-236

2) 創価大学大学院理工学研究科 〒192-8577 東京都八王子市丹木町 1-236

3) マレーシアプトラ大学生物科学研究所 43400 UPM Serdang, Selangor Darul Ehsan, Malaysia

a) マッハコーポレーション株式会社 〒220-0004 神奈川県横浜市西区北幸 2-5-15 プレミア横浜西口ビル 7 階

Effect of intermittent agitation on the productivity of the marine diatom *Chaetoceros gracilis*

Masahiro Ohtake^{1)*}, Kouichi Yago²⁾, Minamo Hirahara^{1a)}, Fatimah Md. Yusoff³⁾, Tatsuki Toda¹⁾

1) Faculty of Science and Engineering, Soka University, 1-236 Tangi-machi, Hachioji, Tokyo 192-8577, Japan

2) Graduate School of Science and Engineering, Soka University, 1-236 Tangi-machi, Hachioji, Tokyo 192-8577, Japan

3) Institute of Bioscience, Universiti Putra Malaysia, 43400 UPM Serdang, Selangor Darul Ehsan, Malaysia

* Corresponding author: bigbamboo@soka.gr.jp

a) Mach Corporation, Puremia Yokohama Nishiguchibiru 7 floor, 2-5-15, Kitasaiwai, Nishi-ku, Yokohama, Kanagawa, 220-0004, Japan

2021 年 3 月 31 日受付, 2021 年 5 月 21 日受理

Abstract The demand for global fisheries protein source continues to increase with the increase of the world's population, causing decrease of natural fishery resources due to the overfishing and the degradation of habitats. Under these circumstances, the fisheries industry for marine products has rapidly grown in recent decades to promote the stable production and utilization of fishery resources while managing and conserving them. Mass cultivation of microalgae is essential for efficient production of artificial seedlings of bivalves whose resources are rapidly decreasing. Diatoms can provide high utility as a primary feed because they contain a high content of fucoxanthin, a carotenoid pigment. The marine diatom, *Chaetoceros gracilis* which can accumulate fucoxanthin, is a promising feed for fishery products. However, marine diatoms are known as a taxonomic group in which stable cultivation is difficult, and it is necessary to establish a cultivation method that enables high-density cultivation.

In previous studies, the factors involved in the growth of marine diatoms have been investigated by controlling the external environment such as light intensity, water temperature and nutrient concentration. However, the establishment of high-density cultivation for marine diatoms under each optimal environmental condition has still not been achieved. A problematic point in the high-density cultivation involves the heterogeneity of the light intensity, water temperature,

and nutrient concentration in the culture tank, which limits the growth of algae. Previous studies have reported that “agitation” of the culture solution has the effect of promoting the supply of CO₂, as a carbon source, and the removal of dissolved oxygen by equalizing the internal environment of the culture tank, and is essential to improve the productivity of microalgae. However, the performance of using the agitation method remain to be solved in mass culture operation. Intermittent agitation frequency is one of the solutions for low-energy cost operation. There is no previous research comparing biomass productivity per unit of agitation energy input between the same species using both continuous and intermittent agitation methods. The objective of this study was to evaluate the productivity per aeration energy under different agitation frequencies toward high-density cultivation of marine diatom *C. gracilis*.

C. gracilis (UPMC-A0010-2) isolated from Malaysian coastal waters was semi-continuously cultured using modified Conway medium in 1.2-L bubble column reactors (n=2). The culture was conducted under stable light intensity 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (12 hours cycle of light and dark) and temperature (25°C). The dilution rates were adjusted at 0.3 d⁻¹. The aeration rate in each reactor was set to 0.2 L min⁻¹ (2% CO₂), and aeration frequency was set to the following three conditions: (1) continuous agitation condition, (2) intermittent agitation condition once 9 every minutes, and (3) intermittent agitation condition once 18 every minutes. The cultivation period was a stationary phase of the biomass for up to 5 days, and the absorbance (750 nm) and pH of the culture, and the dry weight were measured.

The biomass productivity per algal volume was equivalent to that under continuous agitation conditions even with relatively high frequency of intermittent agitation once 9 every minutes. This may be caused by the high light utilization efficiency of the cells because the cells in the culture are distributed on an average without sedimentation even after the aeration pause period without agitation. The biomass productivity per unit of agitation energy input in the intermittent agitation conditions showed a higher value than the continuous agitation condition by several times. Intermittent agitation performance can be evaluated as an environmental control technology that can maintain biomass productivity equivalent to continuous agitation conditions. The reduction of energy consumption by intermittent agitation is expected to significantly contribute to the reduction of operating costs for outdoor closed-system reactors.

Keywords: agitation frequency, biomass productivity, bubble column reactor, mass culture, power input

1. 緒 言

世界の水産タンパク源の需要は人口の増加に伴って年々拡大の一途をたどり、一方で、水産資源の乱獲や生息環境の悪化による天然水産資源の減少が問題

となっている。こうした背景から、水産資源を管理・保全しつつ、安定的に生産・利用するため、近年では魚介類の養殖産業が急成長している（農林統計協会 2000）。天然資源の減少が著しい二枚貝の人工種苗生産を効率的に行うためには、餌料である微細藻

類の大量生産が不可欠である (Su et al. 1997, Dueer et al. 1998, 生田 2001)。餌料用の微細藻類の中でも、特に、珪藻類はカロテノイド系色素であるフコキサンチンを多く含有する (Peng et al. 2011, Tokushima et al. 2016) ことから、初期餌料としての利用価値が高いことで知られる。フコキサンチンは、抗酸化作用、抗肥満作用、白血病細胞の増殖抑制効果 (Ganesan et al. 2011, Peng et al. 2011) が知られ、サプリメントや健康食品としての利用が期待される。特に、*Chaetoceros gracilis* や *C. calcitrans* などの海産珪藻は、緑藻類と比べて増殖速度や有価物生産性が高く、高密度培養による商業利用に適した生理的特性を有している。しかし、安定的なバイオマス生産を要する商業利用は、これまで、淡水産藻類であるスピルリナやクロレラの2種に限定され (Lee 1997, Kitto et al. 1999, 丸山 1998)、世界全体の藻類生産量の99%以上を占めているのが現状である。この理由は、エネルギー効率の高いレースウェイなどの開放型の藻類培養槽にて単一種の純粋培養が可能な藻類種がスピルリナとクロレラだけであることに起因している。海産珪藻は安定的な培養が困難な分類群として知られ (奥村 2000)、海産珪藻の高密度培養が可能な培養手法の確立が求められている。

これまで、光強度、水温、栄養塩濃度などの外部環境を制御し、海産珪藻の増殖に関わる因子の検討試験が活発に行われてきたが、各種固有の最適環境条件下での高密度培養の確立には未だ至っていない。高密度培養における問題点として、培養槽内の光強度、水温、栄養塩濃度が不均一となり (Carvalho et al. 2006, Leupold et al. 2013b)、藻類の増殖が制限されることが挙げられる。培養液の「攪拌」は、培養槽内の環境を均一化し、炭素源であるCO₂の供給や活性酸素ストレスの要因となる溶存酸素の除去を促す効果があることが報告され (Carvalho et al. 2006, Leupold et al. 2013a)、微細藻類の生産性向上に不可欠である。しかし、攪拌にかかるエネルギーは、微細藻類バイオマスの生産コストの40%以上を占めると

報告され (Leupold et al. 2013b, Kim et al. 2013)、高密度培養にかかる攪拌コストの低減が課題となっている。曝気コスト削減の一つの技術的な解決策として、「間欠攪拌」が挙げられ、曝気の頻度や時間を制御することで、バイオマス生産コストの削減が期待できる。*Chlorella* 属の投入エネルギーあたり生産性 (dry g W⁻¹ d⁻¹) を調査した既往研究を比較すると、連続攪拌により得られた *Chlorella* sp. の生産性は 0.12 dry g W⁻¹ d⁻¹ から 0.16 dry g W⁻¹ d⁻¹ (Tang et al. 2011, Ryu et al. 2009) の範囲であったのに対し、間欠攪拌を用いた *C. vulgaris* や *C. lessleri* の培養では、それぞれ 0.40 dry g W⁻¹ d⁻¹ および 0.51 dry g W⁻¹ d⁻¹ (Morais & Costa 2007) と高いエネルギーあたり生産性を示した。しかし、これまでの報告では、連続攪拌と間欠攪拌の両手法を用いて、同種間のエネルギーあたり生産性を比較した研究例はなく、攪拌頻度に対するバイオマス生産性の評価が必要である。本研究では、海産珪藻 *C. gracilis* の高密度培養に向けて、異なる曝気攪拌頻度下におけるバイオマス生産性および曝気エネルギーあたり生産性を評価することを目的とした。

2. 材料と方法

供試藻類は、マレーシア沿岸から単離された *Chaetoceros gracilis* (UPMC-A0010-2) を利用した。本株を実験に供試するまで、改変 Conway 培地 (Tomkins et al. 1995) を用いて下記の条件下で馴致培養を行った。本実験では、バブルカラムリアクター (有効容積 1.2 L) を2連準備し、水温 25°C、光強度 300 μmol photons m⁻² s⁻¹ (明暗周期 12 時間) の条件下で半連続培養を行った。リアクターはアクリル製の水浴内に横一列に固定し、培養中の水温を一定に保つため、水浴内を水道水で満たし、ヒーターを用いて温度制御を行った。光強度は LED ライトと水浴との設置間隔を微調整して調節した。培地の引き抜き速度 (毎日交換する培地の割合) は 0.3 d⁻¹ とした。培養初期の pH は 8.2 に調整した。各リアクター内の曝気速度は 0.2

$L \text{ min}^{-1}$ (2% CO_2 添加)に統一し、曝気攪拌の頻度を以下の3条件とした:(1)連続曝気攪拌(24時間連続曝気)、(2)高頻度間欠曝気攪拌(9分間のうち1分間の攪拌)、(3)低頻度間欠曝気攪拌(18分間のうち1分間の攪拌)。培養期間はバイオマスの定常期で5日間経過までとし、培養液の吸光度(750 nm)およびpHを24時間毎に測定した。供試株の乾燥重量(DW)は、前実験により算出した吸光度と乾燥重量の関係式($\text{DW} = 0.4127 \times \text{吸光度} + 0.0318$)を用いて、吸光度の測定値から算出した。

面積生産性($\text{g-DW m}^{-2} \text{ d}^{-1}$)は、乾燥重量(DW; g L^{-1})と前日の培地引き抜き直後のDWの差分を比表面積($0.021 \text{ m}^2 \text{ L}^{-1}$)と時間(day)で割ることにより算出した。単位体積あたり生産性($\text{g-DW L}^{-1} \text{ d}^{-1}$)は、面積生産性に比表面積を乗じて算出した。

以下の式を用いて、藻類培養槽の体積あたり曝気エネルギー投入量 E_G (W m^{-3})を算出した(Ketheesan & Nirmalakhandan 2012) :

$$E_G = \frac{Q_G \gamma h}{V_R} \quad (1)$$

Q_G :ガス供給量($\text{m}^3 \text{ s}^{-1}$)、 γ :培養液の比重(N m^{-3})、 h :培養液の深度(m)、 V_R :藻類培養槽における運転容量(m^3)。曝気エネルギーあたり生産性は、面積生産性を E_G で割ることにより算出した。

また、藻類培養槽の体積あたりの光エネルギー投入量 E_L (W m^{-3})は、以下の式を用いて算出した(Ketheesan & Nirmalakhandan 2012) :

$$E_L = \frac{0.22 I_L A_R}{V_R} \quad (2)$$

I_L :光量子束密度($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)、 A_R :受光面積(m^2)、 V_R :藻類培養槽における運転容量(m^3)。

以上により、藻類培養槽の体積あたり曝気エネルギー投入量および光エネルギー投入量から、式(3)を用いて、投入エネルギーあたり生産性 $P_{B/P}$ ($\text{g W}^{-1} \text{ d}^{-1}$)を算出した(Ketheesan & Nirmalakhandan 2012) :

$$P_{B/P} = \frac{1000P}{(E_G + E_L)} \quad (3)$$

培養期間中にバイオマス増加によるpHの急激な変化があった際は、pH緩衝剤であるトリシンまたは炭酸水素ナトリウムの添加量を適宜調整することでpHを安定させた。

3. 結果

吸光度(750 nm)は、すべての条件において、培養開始時から培養40日後半にかけて増加し、培養50日前半にかけて減少傾向を示し、その後比較的安定した値で推移した(Fig. 1a)。培養終盤にて吸光度が5日以上安定して推移したことから、定常期を迎えたと判断し、培養63日目で本培養実験を終了した。定常期であった吸光度の値を比較すると、連続曝気攪拌条件および高頻度曝気攪拌条件では約0.58、低頻度曝気攪拌条件では約0.48で推移し、高頻度な攪拌条件にて高い値を示した。pHはすべての条件において、類似した変動を示した(Fig. 1b)。培養5日目および18日目にはpHは9.5付近まで増加したため、トリシンを添加したところ、培養24日目にかけてpH7.5まで急激に減少した。そこで、炭酸水素ナトリウムの供給量を規定量よりも減らしたところ、培養終盤の50日目以降のpHは、すべての条件において8.7付近で安定した。関係式より吸光度から算出した乾燥重量は、すべての条件において、培養47日目前後にてピークを記録し、培養終盤にはピーク時の約50%程度の値に収束した(Fig. 1c)。

単位体積あたり生産性は、定常期であった52日目から63日目の期間において、連続攪拌条件で平均 $0.087 \pm 0.005 \text{ g-DW L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ 、9分間に1分間の間欠攪拌条件で $0.086 \pm 0.006 \text{ g-DW L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ 、18分間に1分間の間欠攪拌条件で $0.074 \pm 0.003 \text{ g-DW L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ を示し、9分間に1分間の間欠的な曝気攪拌でも連続攪拌と同等の生産性を維持できることが明らかとなった(Fig. 2)。

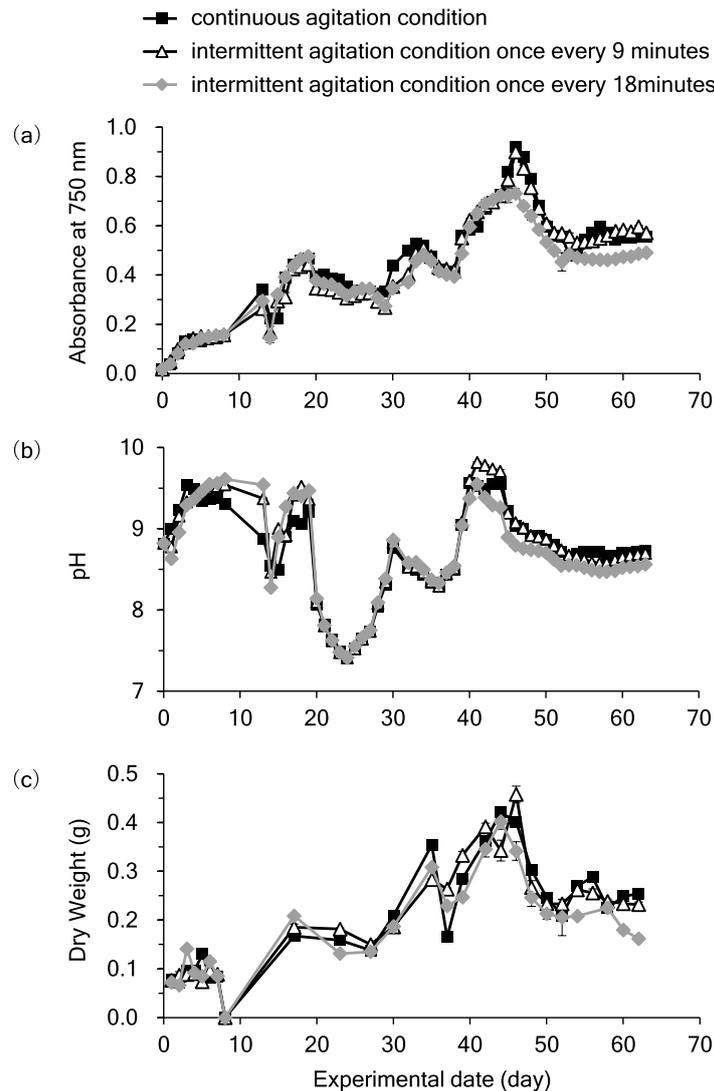


Figure 1. Changes in absorbance at 750 nm (a), pH (b), and dry weight (c) in each agitation frequency condition. The agitation frequencies were as follows: ■ continuous agitation condition, △ intermittent agitation condition once every 9 minutes, and ◆ intermittent agitation condition once every 18 minutes. Each plot is expressed as mean \pm standard deviation.

曝気エネルギーあたり生産性は、連続攪拌条件で 0.410 ± 0.024 g-DW $W^{-1} d^{-1}$ 、9分間に1分間の間欠攪拌条件で 3.883 ± 0.303 g-DW $W^{-1} d^{-1}$ 、18分間に1分間の間欠攪拌条件で 6.669 ± 0.106 g-DW $W^{-1} d^{-1}$ を示し、曝気による攪拌頻度が少ないほど高い生産性を示した (Fig. 3)。

曝気と光供給による投入エネルギーあたり生産性 ($P_{B/P}$) は、連続攪拌条件で 0.124 ± 0.000 g-DW $m^{-2} d^{-1}$ 、9分間に1分間の間欠攪拌条件で 0.122 ± 0.006

g-DW $m^{-3} d^{-1}$ 、18分間に1分間の間欠攪拌条件で 0.105 ± 0.004 g-DW $m^{-3} d^{-1}$ を示し、光照射によるエネルギー消費を考慮すると、18分間に1分間の間欠攪拌条件では生産性が比較的低くなることがわかった (Fig. 4)。

4. 考 察

体積あたり生産性は、比較的高頻度な間欠攪拌でも連続攪拌条件と同等の生産性が得られた (Fig. 2)。こ

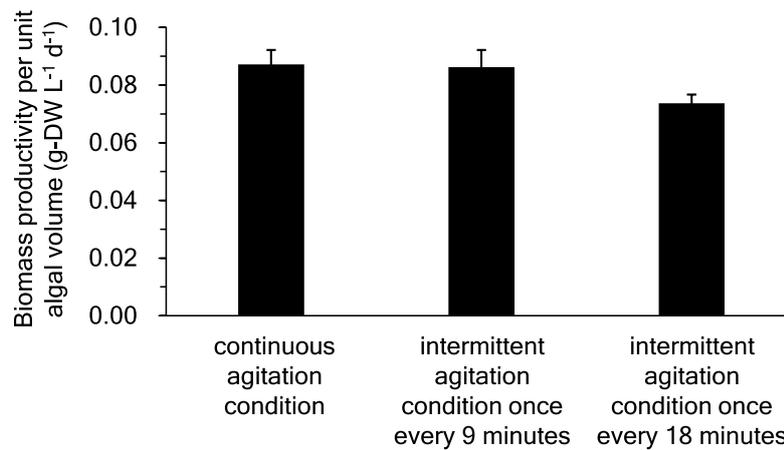


Figure 2. Biomass productivity per unit algal volume in each agitation frequency condition. Each bar is expressed as means \pm standard deviation (n=6).

れは、攪拌を行わない曝気休止期間を挟んでも、培養液内の細胞が沈殿せず平均的に分布しているため、細胞の光利用効率が高く維持されているためと考えられる。一方で、低頻度の間欠攪拌条件(18分間に1分間の間欠攪拌)における生産性の低下は、長期の曝気休止により細胞が沈殿し、培養液の底に濃密に局在することから、細胞の光利用効率が低下したためと想定される。光利用効率は、培養液内の細胞密度と反比例の関係にあり(Yoon et al. 2008)、細胞密度が低いときは、光源からの照射光が培養液の深く(遠く)まで届くため、培養液内の多くの細胞に光が供給されやすい環

境となる。そのため、曝気による培養液の適度な攪拌は、細胞の光利用効率に影響を与え、高い生産性の維持に重要である。本研究では、間欠攪拌条件として、9分間のうち1分間の攪拌と、18分間のうち1分間の攪拌を行ったが、後者の条件で体積あたり生産性の低下がみられたことから、17分間よりも長い曝気休止を行うと、生産性がより低下する傾向がみられると想定される。以上の点から、1分間の曝気攪拌と8分間の曝気休止を組み合わせた間欠的な曝気攪拌は、連続曝気攪拌条件と同等の生産性を維持できる環境制御技術として一定の評価ができる。

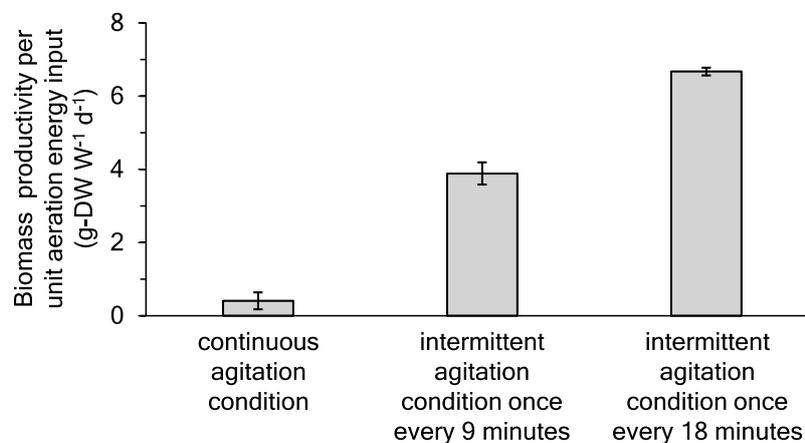


Figure 3. Biomass productivity per unit aeration energy input in each agitation frequency condition. Each bar is expressed as means \pm standard deviation (n=6).

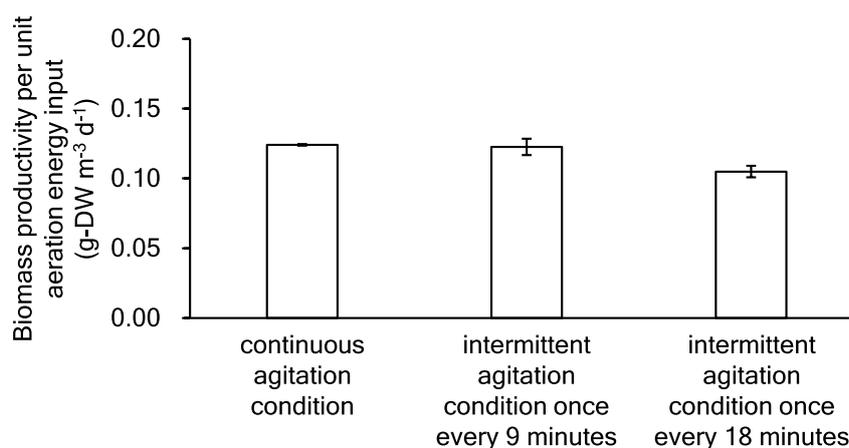


Figure 4. Biomass productivity per unit power input in each agitation frequency condition. Each bar is expressed as means \pm standard deviation (n=6).

Table 1. Comparison in biomass productivity per unit algal volume and unit power input of various microalgae in a different agitation condition.

Algal species	Aeration rate (L L ⁻¹ min ⁻¹)	Agitation	Biomass productivity per unit algal volume (dry g L ⁻¹ d ⁻¹)	Biomass productivity per unit power input (dry g W ⁻¹ d ⁻¹)	Reference
<i>Chlorella</i> sp.	0.25	Continuous	0.38	0.12	[1]
	0.20	Continuous	0.34	0.16	[2]
<i>Nanochloropsis oculata</i>	0.25	Continuous	0.48	0.13	[3]
	1.00	Continuous	0.28	0.10	[4]
<i>Scenedesmus obliquus</i>	0.25	Continuous	0.16	0.15	[5]
<i>Chlorella kessleri</i>	0.30	Intermittent	0.18	0.51	[6]
<i>Chlorella vulgaris</i>	0.30	Intermittent	0.14	0.40	[6]
<i>Scenedesmus dimorphous</i>	0.50	Intermittent	0.24	0.41	[7]
<i>Chaetoceros gracilis</i>	0.20	Continuous	0.09	0.12	This study
	0.20 (1 min 9 min ⁻¹)	Intermittent	0.09	0.12	This study
	0.20 (1 min 18 min ⁻¹)	Intermittent	0.07	0.11	This study

[1] Tang et al., 2011, [2] Ryu et al., 2009, [3] Chiu et al., 2009a, [4] Hsueh et al., 2009, [5] Chiu et al., 2009b, [6] Morais & Costa, 2007, [7] Eustance et al., 2015

曝気エネルギーあたり生産性は、間欠曝気攪拌条件において、連続曝気攪拌条件よりも数倍高い値を示し、曝気休止によりエネルギーコストを抑えつつ、高い生産性を維持できることが明らかとなった (Fig. 3)。一方で、曝気エネルギーに加えて光供給エネルギーを考慮した、投入エネルギーあたり生産性 ($P_{B/P}$) は、18 分間に 1 分間の間欠曝気攪拌条件では比較的低い生産性を示した (Fig. 4)。これは、投入エネルギーに占める光エネルギー投入量 (E_L) は、曝気エネルギー投入量 (E_G) の約 70 倍であり、室内における藻類培養では光供給によるエネルギー消費の割合が大きいためであると示唆される。しかし、微細藻類の大量培養は装置の大規模化に伴い屋外で行われており、屋外培養では太陽光による豊富な照射光を利用でき、屋内培養において不可欠であった、LED ライトなどの人工的な光源を用いた光エネルギーの供給は不要となる。屋外での藻類大量培養に用いられているチューブ型やフラットパネル型の閉鎖系リアクターは、生物汚染 (コンタミネーション) を抑制できることから高い生産性を有するが、曝気や攪拌のためのエネルギー消費が多く、そのコスト低減が課題となっている。Norsker et al. (2011) は、フラットパネル型リアクターを用いた培養プロセスにかかるコストを試算し、そのコスト全体のうち約 40% が電気代に当たり、そのうち約 98% が曝気によるコストであると見積もられた。このことから、間欠曝気攪拌によるエネルギー消費の削減は、屋外閉鎖系リアクターの運転コスト削減に大きく寄与すると期待される。間欠曝気攪拌における曝気の頻度や供給量の調節は屋内や屋外を問わず容易ではあるが、リアクターの容積や形状を変化させると、同様の曝気条件でも攪拌効率が変わると想定される。屋外での大規模培養システムへの応用に向けて、今後の研究課題としては、攪拌休止後の時間と培養液の深度ごとの細胞密度の関係を調べ、攪拌頻度ごとの細胞の光利用効率の変動を明らかにすることが挙げられる。

本研究では、バブルカラムリアクターを用いて、連続曝気攪拌および間欠曝気攪拌による *C. gracilis* の半連

続培養を行い、間欠曝気攪拌条件において高い曝気エネルギーあたり生産性が得られた。緑藻類を供試した様々な先行研究によると (Morais & Costa 2007, Chiu et al. 2009a, Chiu et al. 2009b, Hsueh et al. 2009, Ryu et al. 2009, Tang et al. 2011, Eustance et al. 2015)、間欠攪拌では連続攪拌に比べ、投入エネルギーあたり生産性が高い傾向がみられる (Table 1)。*C. gracilis* の生産性は先行研究の他種と比較すると低いことから (Table 1)、培養液中の栄養塩の枯渇など生産性低下の要因を探索することが課題である。今後の展望として、供試株の最適な間欠攪拌条件を評価するため、細胞の沈殿速度を把握し、光利用効率を最大化できる曝気攪拌頻度を調査する。

謝辞

本研究は、微細藻類の大量培養技術の確立による持続可能な熱帯水産資源生産システムの構築プロジェクト (COSMOS; Grant No. JPMJSA1509) の一環で実施され、国立研究開発法人科学技術振興機構 (JST) および国際協力機構 (JICA) が共同で実施している地球規模課題対応国際科学技術プログラム (SATREPS) によるご支援を賜った。本研究では、長尾宣夫博士ならびに今泉雄貴氏より藻類培養に関する技術指導を賜った。本研究で使用した藻類株は、マレーシア・トレンガヌ大学 (UMT) の Mohd. Effendy Abd Wahid 教授と東京大学の高橋一生教授による素材移転契約 (MTA) の締結により、使用許可が得られた。この場をお借りして厚く御礼申し上げたい。

引用文献

- Carvalho AP, Meireles LA, Malcata FX (2006) Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnol Progr* 22: 1490–1506.
- Chiu SY, Kao CY, Tsai MT, Ong SC, Chen CH, Lin CS (2009a) Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. *Bioresour Technol* 100: 833–838.
- Chiu SY, Tsai MT, Kao CY, Ong SC, Lin CS (2009b)

- The air-lift photobioreactors with flow patterning for high density cultures of microalgae and carbon dioxide removal. *Eng Life Sci* 9: 254–260.
- De Morais MG, Costa JAV (2007) Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. *Biotechnol Lett* 29: 1349–1352.
- Duerr EO, Molnar A, Sato V (1998) Cultured microalgae as aquaculture feeds. *J Mar Biotechnol* 6: 65–70.
- Eustance E, Wray JT, Badvipour S, Sommerfeld MR (2015) The effects of limiting nighttime aeration on productivity and lipid accumulation in *Scenedesmus dimorphous*. *Algal Res* 10: 33–40.
- Ganesan P, Noda K, Manabe Y, Ohkubo T, Tanaka Y, Maoka T, Sugawara T, Hirata T (2011) Siphonaxanthin, a marine carotenoid from green algae, effectively induces apoptosis in human leukemia (HL-60) cells. *Biochim Biophys Acta* 1810: 497–503.
- Hsueh HT, Li WJ, Chen HH, Chu H (2009) Carbon bio-fixation by photosynthesis of *Thermosynechococcus* sp. CL-1 and *Nanochlropsis oculata*. *J Photochem Photobiol* 95: 33–39.
- 生田義明 (2001) 貝類養殖の新たな挑戦 (1) 微細藻を利用した陸上での二枚貝栽培. *養殖* 38: 70–73.
- Ketheesan B, Nirmalakhandan N (2012) Feasibility of microalgal cultivation in a pilot-scale airlift-driven raceway reactor. *Bioresour Technol* 108: 196–202.
- Kim TH, Lee Y, Han SH, Hwang SJ (2013) The effects of wavelength and wavelength mixing ratios on microalgae growth and nitrogen, phosphorus removal using *Scenedesmus* sp. for wastewater treatment. *Bioresour Technol* 130: 75–80.
- Kitto MR, Regunathan C, Rodrigues A (1999) An industrial photosynthetic system for *Skeletonema costatum* in arid regions. *J Appl Phycol* 11: 391–397.
- Lee YK (1997) Commercial production of microalgae in the Asia-Pacific rim. *J Appl Phycol* 9: 403–411.
- Leupold M, Hindersin S, Kerner M, Hanelt D (2013a) The effect of discontinuous airlift mixing in outdoor flat panel photobioreactors on growth of *Scenedesmus obliquus*. *Bioprocess Biosyst Eng* 36: 1653–1663.
- Leupold M, Hindersin S, Gust G, Kerner M, Hanelt D (2013b) Influence of mixing and shear stress on *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, and *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Appl Phycol* 25: 485–495.
- 丸山 功 (1998) クロレラ培養の最新技術と今後の展望. *養殖* 35: 48–51.
- Norsker NH, Barbosa MJ, Vermuë MH, Wijffels RH (2011) Microalgal production—a close look at the economics. *Biotechnol Adv* 29: 24–27.
- 農林統計協会 (2000) 図説漁業白書平成 11 年度. 農林統計協会, 東京, 327 pp.
- 奥村裕弥・中島幹二・増田篤稔・高橋光男・向阪信一・洞口公俊・松山恵二・村上克介 (2000) 植物餌料研究の現状と課題. *植物工場学会誌* 12: 261–267.
- Peng J, Yuan JP, Wu CF, Wang JH (2011) Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: metabolism and bioactivities relevant to human health. *Mar Drugs* 9: 1806–1828.
- Ryu HJ, Oh KK, Kim YS (2009) Optimization of the influential factors for the improvement of CO₂ utilization efficiency and CO₂ mass transfer rate. *J Ind Eng Chem* 15: 471–475.
- Su HM, Su MS, Liao IC (1997) Collection and culture of live foods for aquaculture in Taiwan. *Hydrobiologia* 358: 37–40.
- Tang D, Han W, Li P, Miao X, Zhong J (2011) CO₂ bio-fixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. *Bioresour Technol* 102: 3071–3076.
- Tokushima H, Inoue-Kashino N, Nakazato Y, Masuda A, Ifuku K, Kashino Y (2016) Advantageous characteristics of the diatom *Chaetoceros gracilis* as a sustainable biofuel producer. *Biotechnol Biofuels* 9: 1–19.
- Tompkins J, Deville MM, Day JG, Turner MF (1995) Culture Collection of Algae and Protozoa Catalogue of Strains. *Culture Catalogue of Algae and Protozoa*. Ambleside, 204 pp.
- Yoon JH, Shin JH, Park TH (2008) Characterization of factors influencing the growth of *Anabaena variabilis* in a bubble column reactor. *Bioresour Technol* 99: 1204–1210.