

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 13 日現在

機関番号：52501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580271

研究課題名(和文) レーザー誘起蛍光法による海苔養殖管理技術の開発

研究課題名(英文) Development of evaluation methods of Susabi-nori by laser-induced fluorescence method.

研究代表者

岡本 保 (Okamoto, Tamotsu)

木更津工業高等専門学校・電気電子工学科・教授

研究者番号：80233378

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、レーザー誘起蛍光法(LIF法)による海苔の養殖管理技術を確立することを目的としている。今回、様々な栄養塩を用いて培養した海苔の蛍光スペクトルを測定し、栄養欠乏の影響を検討した。十分な栄養分が含まれた栄養強化培地(PES)、栄養分を添加しない天然ろ過滅菌海水(SW)、リン源を除いたP-Free、窒素源を除いたN-Freeの4種類の培地で培養した海苔藻体を測定した。PESの場合と比較して、P-Freeの場合にはフィコエリスリンに起因する波長580nm付近の蛍光強度が大きく、N-Free、SWの場合には蛍光強度が相対的に弱くなった。さらに、温度特性についても検討した。

研究成果の概要(英文)：In this work, the diagnosis of Susabi-nori (*Porphyra yezoensis*) by fluorescence spectroscopy was proposed and the effects of nutrient deprivation on fluorescence spectra was investigated. It was found that the intensity of the 580-nm peak increased in the samples cultivated in the P-free media and that the fluorescence intensity decreased in the N-free media and in the filtered sea water without P and N. The studies on the temperature dependence revealed that fluorescence spectra did not change at the temperature below 40 degree C and that the intensity of the 580-nm peak increased by heating above 40 degree C.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：スサビノリ 海苔 レーザー誘起蛍光法 蛍光計測 栄養欠乏 色落ち

1. 研究開始当初の背景

海苔養殖は海を生産の場とするため、気象、海象の影響が大きく、さらに生態系の生物の相互の関係によっても影響を受ける。また、赤潮や疾病などによる被害も問題となっている。これまでは、海苔養殖の漁業従事者が、これらの影響を目視などの経験則によって状態の判断していた。しかし、より安定な生産を行うためには、疾病や障害を定量的に判断する方法が必要である。また、可視判断ができる状態以前の早期の段階で診断する手法も求められている。

2. 研究の目的

本研究では、その計測手段として非破壊で簡便かつ迅速に定量的な測定が行える LIF 法 (Laser-Induced Fluorescence method ; レーザー誘起蛍光法) を提案した。この手法は、レーザーをある物質に照射したときにその物質が発する物質固有の蛍光を分光分析することでその物質の性質を調べる方法である。この手法は、非破壊検査であるため従来の成分抽出による化学分析等と比べて迅速かつ効率的な測定であるとともに、遠隔計測も可能である。本研究では、LIF 法を用いた海苔養殖管理技術の開発を行うことを目的としている。

3. 研究の方法

LIF 法を用いた養殖管理技術の実用化を目指して、本研究では海苔の生育条件の影響の検討、温度依存性の検討などを実施した。海苔の培養などについて千葉県水産総合研究センターと連携して研究を進めた。また、金田漁業協同組合、新富津漁業協同組合とも連携して、試料の提供を依頼するとともに、漁業従事者の要望を聞きながら研究を進めた。

4. 研究成果

4-1. 栄養欠乏の影響

海苔の色落ち判定技術の確立を目的として、窒素欠乏、リン欠乏などの様々な栄養塩を用いて培養した海苔の蛍光スペクトルを測定し、海苔の蛍光スペクトルへの栄養欠乏の影響を検討した。海苔の栄養分としては、窒素とリンが必要不可欠である。今回測定に用いた試料は、全ての栄養分を添加した海水で育成させた場合 (PES)、それらの栄養分を添加せず海水のみで育成させた場合 (SW)、リンのみを抜いた場合 (P-Free)、窒素のみを抜いた場合 (N-Free) の 4 種類の栄養塩を用いて培養を行った。PES とは強化海水培地 (Provasoli's Enriched Sea water)、SW は天然ろ過滅菌海水 (Sea Water : 栄養塩を含んでいない海水)、P-Free は PES 原液からリン源であるグリセロリン酸ナトリウムを除いた場合、N-Free は PES 原液から窒素源を除いた場合である。再現性の確認をするために、同条件で 2 回の培養を行った。各試料の外観を図 1 から図 4 に示す。栄養欠乏により退色

現象を起こしていることがわかる。これらの試料について蛍光スペクトルおよび透過スペクトルの測定を行った。透過スペクトル測定には紫外可視分光光度計 UV-2550 を用い、波長 400nm~700nm の範囲で測定を行った。



図 1. PES で培養した試料の外観



図 2. SW で培養した試料の外観



図 3. P-Free で培養した試料の外観



図 4. N-Free で培養した試料の外観

PES、SW、P-Free、N-Free の 4 種類の培地で 1 週間培養したスサビノリの蛍光スペクトルを図 5 に示す。この図より、PES の場合と比較して、P-Free の場合にはフィコエリスリンに起因する波長 580nm 付近の蛍光強度が大きいことがわかる。一方、N-Free、SW の場合には蛍光強度が相対的に弱いことがわかる。再現性の確認をするために、同条件で 2 回の培養を行い、蛍光スペクトルの測定を行ったところ、同様の結果が得られた。以上の結果より、蛍光スペクトル計測により栄養欠乏状態を診断することができると考えられる。

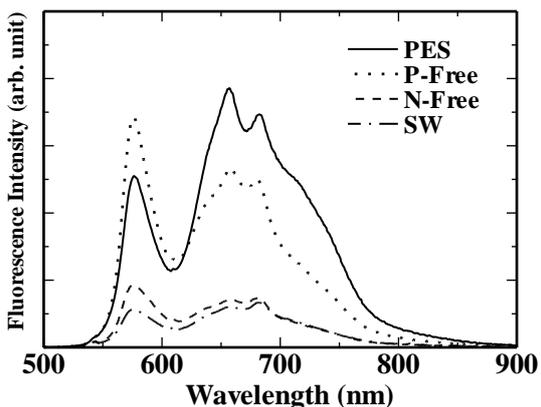


図 5. 栄養塩で培養した試料の蛍光スペクトル

次にこれらの試料の透過スペクトルの測定を行った。図 6 に培養した試料の透過スペクトルを示す。PES に比べて栄養欠乏した場合には透過率が大きくなっている。このことは栄養欠乏により各色素の密度が低下したためと考えられる。各条件の透過スペクトルを拡大したものを図 7 に示す。各条件で見ると、PES で培養した試料では 430nm 付近および 685nm 付近のクロロフィル a による吸収ピーク、500nm 付近および 570nm 付近のフィコエリスリンによる吸収ピークが明確に観測されている。P-Free の場合にも各吸収ピークは観測されている。一方、SW および N-Free の場合には 685nm 付近のクロロフィル a による吸収ピーク以外のピークが不鮮明に

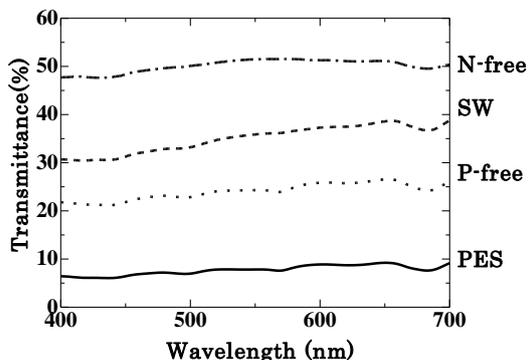


図 6. 透過スペクトルへの栄養欠乏の影響

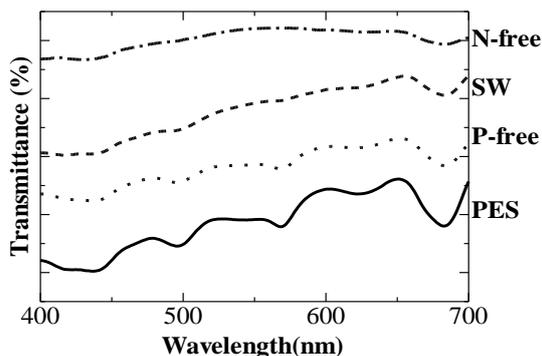


図 7. 透過スペクトルへの栄養欠乏の影響 (拡大図)

なっている。これらの結果からも栄養欠乏、特に窒素欠乏が色素の密度に大きな影響を与えていることがわかる。

4-2. 温度特性

海水温を上昇させたときのスサビノリの蛍光スペクトルを図 8 に示す。この結果から、40℃以下の温度範囲では蛍光スペクトルに大きな変化は見られないが、海水温を 40℃まで加熱すると波長 580 nm の蛍光強度が強くなる。40℃に加熱したスサビノリの蛍光スペクトルの可逆性を調べるために海水温を常温まで戻して一日経過させたが、加熱前の正常な蛍光スペクトルの形状には戻らないことが確認された。これは、加熱によりスサビノリの細胞が変成してしまったためであると考えられる。また、海水温を低下させた場合には、蛍光強度には大きな変化は見られなかった。

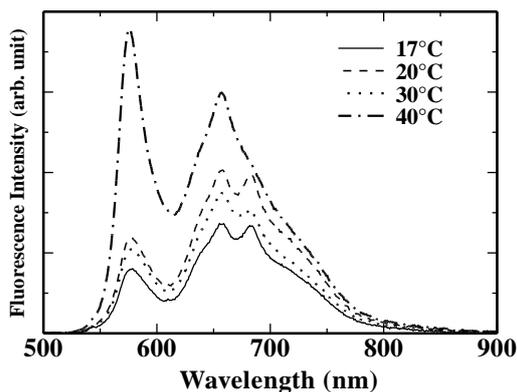


図 8. スサビノリの蛍光スペクトルの温度特性

4-3. まとめ

海苔の色落ち判定技術の確立を目的として、窒素欠乏、リン欠乏などの様々な栄養塩を用いて培養した海苔の蛍光スペクトルを測定し、海苔の蛍光スペクトルへの栄養欠乏の影響を検討し、以下の結果を得た。

- (1) 蛍光スペクトル測定を行ったところ、P-Free の場合には、フィコエリスリンに起因する波長 580nm 付近の蛍光強度が大きくなった。
- (2) N-Free、SW の場合には蛍光強度が弱くなった。
- (3) 透過スペクトル測定を行ったところ、PES に比べて栄養欠乏した場合には透過率が大きくなった。このことは栄養欠乏により各色素の密度が低下したためと考えられる。
- (4) PES および P-Free で培養した試料では 430nm 付近および 685nm 付近のクロロフィル a による吸収ピーク、500nm 付近および 570nm 付近のフィコエリスリンによる吸収ピークが明確に観測された。一方、SW および N-Free の場合には 685nm 付近のクロロフィル a による吸収ピーク以外のピークが不鮮明になった。

以上の結果より、蛍光スペクトルを用いて栄養欠乏状態を診断することができると考えられる。

さらに、温度特性を検討し、海水温を 40℃ まで加熱すると波長 580 nm の蛍光強度が強くなった。これは、加熱によりスサビノリの細胞が変成してしまっただけであると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- 1) 岡本保, 高橋邦夫, 林俊裕, 島田裕至, 「蛍光分光による海苔の生育診断」; 照明学会誌 95 [4] (2011) 223-229.

〔学会発表〕(計 8 件)

- 1) 平野朝陽, 岡本保, 高橋邦夫, 林俊裕, 島田裕至, 「スサビノリの蛍光寿命測定」, 第 12 回 照明学会ヤングウェーブフォーラム, 2014 年 3 月 6 日, 東京.
- 2) 平野朝陽, 岡本保, 高橋邦夫, 林俊裕, 島田裕至, 「スサビノリにおける蛍光寿命測定」, 2013 年(第 9 回)電気学会東京支部千葉支所研究発表会, 2013 年 11 月 23 日~24 日, 山梨, 2-6, 講演論文集, pp. 15 (2012). (優秀論文発表賞受賞)
- 3) 平野朝陽, 大野(嘉数)祐子, 岡本保, 高橋邦夫, 林俊裕, 島田裕至, 「スサビノリの蛍光寿命測定」, 平成 25 年度(第 46 回)照明学会全国大会, 13-7, 2013 年 9 月 5 日~7 日, 愛知. (全国大会優秀ポスター発表者賞受賞)
- 4) 平野朝陽, 大浦理寛, 向後友貴, 鶴岡準也, 岡本保, 高橋邦夫, 「スサビノリにおける色素定量分析」, 2012 年(第 8 回)電気学会東京支部千葉支所研究発表会, 2012 年 11 月 24 日~25 日, 新潟, 講演論文集, pp. 4-4 (2012). (敢闘賞受賞)

- 5) 平野朝陽, 向後友貴, 鶴岡準也, 大浦理寛, 大野(嘉数)祐子, 岡本保, 高橋邦夫, 林俊裕, 島田裕至, 「蛍光寿命を用いたスサビノリの生育診断への可能性」, 平成 24 年度(第 45 回)照明学会全国大会, 12-4, 2012 年 9 月 6 日~8 日, 山口.
- 6) 岡本保, 平野朝陽, 竹内仁, 大野(嘉数)祐子, 高橋邦夫, 林俊裕, 島田裕至, 「蛍光分光法によるスサビノリの生育診断」, 電気学会光応用・視覚/計測合同研究会, LAV-12-002, IM-12-010, 2012 年 2 月 2 日~3 日, 三重, 電気学会研究会資料, pp. 7-10 (2012).
- 7) 竹内仁, 平野朝陽, 岡本保, 大野(嘉数)祐子, 高橋邦夫, 林俊裕, 島田裕至, 「蛍光寿命測定によるスサビノリの生育診断」, 2011 年(第 7 回)電気学会東京支部千葉支所研究発表会, 2011 年 12 月 10 日, 千葉, 講演論文集, pp. 18 (2011).
- 8) 平野朝陽, 竹内仁, 村田和貴, 大野(嘉数)祐子, 岡本保, 高橋邦夫, 林俊裕, 島田裕至, 「スサビノリの蛍光スペクトルへの栄養欠乏の影響」, 平成 23 年度(第 44 回)照明学会全国大会, 13-8, 2011 年 9 月 15 日~17 日, 愛媛, 講演予稿集, pp. 266 (2011).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称: 大型藻類の生育診断装置及び大型藻類の生育診断方法
 発明者: 岡本保
 権利者: 独立行政法人国立高等専門学校機構
 種類: 特許
 番号: 特願 2013-183284 号
 出願年月日: 2013 年 9 月 4 日
 国内外の別: 国内

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 保 (木更津工業高等専門学校・電気電子工学科・教授)

研究者番号: 80233378

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

高橋 邦夫 (木更津工業高等専門学校・基礎学系・名誉教授)

研究者番号: 40042642