◇◇◇◇ 原著論文 ◇◇◇◇

緑豆発芽野菜を対象とした高密度従属栄養栽培における 生長挙動の解析

玉手晴香¹, 中居 藍¹, 中森康幸¹, 江刺雅大¹, 岩元 靖¹,
塚田義弘^{1,†}, 石川大太郎², 藤井智幸²

¹ 太子食品工業株式会社, ² 東北大学大学院農学研究科

Engineering Analysis of Growth Behavior of the High Density Heterotrophic Cultivation of Mung Bean Sprouts

Haruka TAMATE¹, Ran NAKAI¹, Yasuyuki NAKAMORI¹, Masahiro ESASHI¹,
Yasushi IWAMOTO¹, Yoshihiro TSUKADA^{1,†}, Daitaro ISHIKAWA², Tomoyuki FUJII²

¹Taishi Food Inc., 68 Okinaka, Kawamorita, Sannohe, Aomori 039-0141, Japan

²Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University

1-1 Amamiya-machi, Tsutsumidori, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 981-8555, Japan

To establish a cultivation process in high density cultivation of mung bean sprouts, heterotrophic growth behavior and the efficiency in high density cultivation were evaluated. In a growing test of mung bean in individual cultivation in test tubes and high density cultivation in single beds, courses of temperature, fresh weight, oxygen concentration, carbon dioxide concentration were measured, and specific growth rate, specific oxygen uptake rate, specific carbon dioxide evolution rate were investigated. In the individual cultivation and the high density cultivation, it was shown that the growth stage was divided by different physiological states into the early stage of cultivation, the middle stage, and the late stage. When amount of sprinkled water is 0.6 t/h/cart in high density cultivation, effectiveness factor on fresh weight value maintained higher during cultivation time. Compared with 0.6 t/h/cart sprinkled water, high density cultivation with 0.4 t/h/cart sprinkled water has decreased effectiveness factor on fresh weight, and increased temperature in the lower layer and varied distribution of fresh weight and sprouts shape in a vertical direction in packed bed were investigated. These results suggest controlling the amount of sprinkled water may promote mass transfer and heat exchange, which contribute high productivity of high density cultivation.

Keywords: mung bean sprouts, high density cultivation, heterotrophic growth, productivity

1. 緒 言

植物の多くは光合成によって炭素源を獲得し、食物連鎖の起点となっている。人間は植物を人為的に選抜し栽培して食用に供し、生命を維持している。栽培技術は時代とともに改良され、現代では施設内で栽培環境をシステム制御する植物工場にまで発展している [1,2]。とくに、完全人工光型植物工場内では、光、温度、湿度、二酸化炭素濃度、培養液などの植物の生長に必要な要素のほとんど全てが制御可能になっている [3]。

このような高度な環境制御設備を備えた植物工場は、周年計画栽培を可能とするのみならず、閉鎖系での遺伝子組換え植物による医薬品原材料、ワクチンなどを生産するための好適な生産施設として注目されている [4,5]。しかし、植物工場産の農作物はそれほど普及していない。それは、設備コスト、電気代が高く、結果として製品価格が高くなりすぎるを得ないためである。一方、光合成を伴う独立栄養型の栽培方式と対照的な栽培方式として、光を必要としない従属栄養型の栽培方式がある。従属栄養型の栽培方式は恒暗条件で栽培するもので、照明設備を使用しないため比較的簡便な施設で生産が可能である。また、水のみを供給する従属栄養型栽培では外部からの有機物の供給がなくても、水の吸収により新鮮重量は大きく増加する [6] という特

(受付 2015 年 5 月 13 日, 受理 2015 年 8 月 18 日)

1 〒 039-0141 青森県三戸郡三戸町川守田字沖中 68

2 〒 981-8555 仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1

† Fax: 0229-26-4113, E-mail: y-tsukada@taishi-food.co.jp

微から、水分含量を高く栽培することができれば低コスト化が容易となる。とくに、発芽野菜を対象とした場合には播種から収穫までの期間が短いというメリットがある。緑豆も発芽野菜に応用される食材の1つであり、その発芽・生育過程においてタンパク質やアミノ酸が増加することが報告されている [7]。近年、様々な種類の発芽野菜について生理活性やその活性物質が明らかになってきたことから [8-11]、発芽野菜は機能性食品として注目され、量、種類ともにその生産、消費が拡大しつつある。

一般に植物工場での栽培において重要なことは、安価に安定的に大量に栽培することである。そのためには、栽培プロセスにおける物質収支や生長速度に関する解析が必要であり、それに基づいたプロセス設計や最適制御が求められる。独立栄養栽培の場合には、光源を備えた栽培ベッドが必要となるため、多段ベッド式が採用されることが多い。しかし、多段ベッド方式は、施設設計上単位体積当たりの栽培個体数を増やして収量を上げるには限界がある。従属栄養栽培の場合には、光源も土壌も必要としないため、栽培施設に関する自由度が高い。したがって、回転型の栽培装置や、単一ベッド型の栽培装置などが使われている。とくに、単一ベッド型栽培装置ではベッド内に植物個体が充填された状態で栽培されるため、高密度栽培が可能である。しかし、一般に高密度で播種すると栽培効率が低下する [12-14] と考えられるが、充填層の場合については明らかにされていない。充填層に由来する栽培上の問題をコントロールしながら高密度栽培を可能とするプロセス技術を確立することができれば、あらゆる従属栄養栽培に応用することが可能となる。

これまで植物体の生長挙動については、同化箱法による植物体の器官（葉、茎、根）や個体の二酸化炭素交換や [15]、デシケータ中の植物体の温度と呼吸量の関係が測定されている [16]。ところが、発芽野菜の従属栄養型の栽培方式における高密度栽培系が反応工学的に解析された例は皆無である。そこで本研究では、もやしの原料として用いられている緑豆の従属栄養生長挙動を把握することを目的として、密閉試験管を用いた栽培試験法を構築し、生長に伴う重量変化を経時的に測定することによって、一個体の生長曲線、試験管内の酸素および二酸化炭素の濃度を測定し酸素消費速度および二酸化炭素生成速度を求めた。次に、単一ベッド式栽培装置における個体群の栽培特性の解析を試み、高密度栽培における効率性について評価し考察を加えた。

2. 実験方法

2.1 材料

材料は、緑豆（2011年中国産）を使用した。また、

一個体従属栄養栽培に用いた緑豆は、篩を用いて粒径選別を行い、重量比率 [%] の最も高かった粒径 4.0 mm 以上 4.2 mm 未満のものを使用した。また、異常粒は目視で除き、正常粒のみを試料に供した。

2.2 酸素、二酸化炭素、エチレンの定量

酸素および二酸化炭素の濃度は、ヘッドスペース O_2/CO_2 濃度計（PBI Dansensor 社, CheckMate 9900）で測定した。エチレン濃度の測定には、ガスクロマトグラフ（ジーエルサイエンス社, GC-4000）を使用した。

2.3 一個体での従属栄養栽培

栽培試験には、長さ 150 mm、内径 27 mm の栽培用試験管を用いた。培地は、精製水に最終濃度が 0.8% 寒天、10 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ となるように添加し、湯せんで溶解させ、栽培用試験管に培地 17 ml を分注し、室温で凝固させた (Fig. 1)。緑豆 80 粒は、1 粒ずつ生豆重量 [g] を測定した後、38℃ に予備加熱した 3 ml の精製水が入った試験管に 1 粒ずつ入れた。シリコン栓で蓋をし、38℃ の恒温器内に 5 時間保持した。浸漬終了後、1 粒ずつザルを用いて水切りし、キムワイプで表面の水滴を拭き取った後、重量を測定し、発芽の有無を確認した。発芽した種子を選んで、栽培用試験管中の寒天培地に播種した。この時、種瘤が培地に触れるようにピンセットで向きを整えた。播種した栽培用試験管に、試験管内から気体をサンプリングするためのガラス管を 2 本取り付けたシリコン栓で蓋をし、24℃ の恒温器内に保持した。その後、12 時間おきに 7 検体ずつヘッドスペースの気体を、ガラス管に注射器をつないで 15 ml サンプリングし、サンプリングした気体を酸素、二酸化炭素測定、エチレンの測定に供した。もやしはキムワイプで表面の水分を拭き取り、種皮も含めた重量を測定した。栽培時間は 38℃ の湯で浸漬し吸水を開始

Plant cultivation unit (test tube)

●Capacity of test tube = 84 ml

●Test tube — (Silicon + Glass tube) = 76 ml

Fig. 1 Plant cultivation unit (test tube system) of mung bean sprouts for individual cultivation.

させた時点をゼロとした。乾燥重量は、105℃の定温乾燥器で24時間加熱乾燥させて測定した。

栽培時間毎のもやしの重量の平均値から自在曲線定規を用いて近似線を求め、生長曲線とした。この生長曲線を図微分することで生長速度を算出し、比生長速度（単位重量あたりの生長速度）を求めた。酸素量および二酸化炭素量 [mol] は、栽培用試験管内の気体体積を 59 ml とみなして算出し、酸素量および二酸化炭素量の経時変化から、図微分によってそれぞれ酸素消費速度および二酸化炭素生成速度を求めた。そして、比酸素消費速度（単位重量あたりの酸素消費速度）および比二酸化炭素生成速度（単位重量あたりの二酸化炭素生成速度）を求めた。

2.4 単一ベッド式高密度従属栄養栽培

単一ベッド式高密度従属栄養栽培には、栽培台車を用いた。栽培台車の形状は台形で、体積が 4.8 m³ のものである。

緑豆 240 kg を、タンク中において湯で浸漬し吸水膨潤させた。栽培時間はこの吸水膨潤を開始させた時点をゼロとした。その後、緑豆をホースで栽培台車内に移し、栽培を開始した。栽培開始時に緑豆ベッド表面を均した後、24℃の栽培室内に保持し、栽培中は 20～22℃の水を散水した。給水量は約 0.4 t/h/台車または 0.6 t/h/台車とした。もやし層の高さは、測定箇所にも長さ既知の棒を垂直に立て、棒の先端からもやし層表面までの長さ [m] を測定することによって求めた。品温の測定には、熱電対センサー（日置電機、温度ロガー 3650）を使用した。緑豆を栽培台車に移した後、熱電対センサーを栽培台車のおおよそ下段・中段・上段となるように埋め込み、もやしの生長と共に相対的に下段・中段・上段となるようにセンサーの位置を移動させた。非散水期にはもやしの代謝熱により温度は上昇し、散水によって温度は低下することになる。また、非散水期の温度上昇を散水間隔で除し、温度上昇速度を求めた。

もやしを毎日ほぼ同じ位置から 7 検体ずつサンプリングし、キムワイプで表面の水分を拭き取り、重量を測定し、平均値から 1 個体あたりの重量を求めた。また、

栽培終了時に台車の上段・中段・下段からそれぞれ 10 検体ずつサンプリングし、重量と胚軸の長さを測定した。栽培台車内には約 3,700,000 粒の緑豆があるため、1 個体あたりの重量から栽培台車内のもやし全体の重量を推定し、高密度栽培での生長曲線を求めた。高密度栽培における 1 個体あたりの重量を、一個体栽培で測定した重量で除した値をもやし重量の有効係数とした。図微分することで高密度栽培における生長速度を算出し、さらに比生長速度を求めた。高密度栽培における比生長速度を、一個体栽培で測定した比生長速度で除した値を比生長速度の有効係数とした。もやし層内の酸素濃度は、栽培台車内にチューブを差し込み、台車内の空気をサンプリングして測定した。

2.5. 統計処理

統計処理は R2.13.2 を使用した。Tukey の多重比較検定の結果、有意水準 $\alpha < 0.05$ で有意差が認められた場合、図表中に異なるアルファベットを付した。

3. 結果および考察

3.1 一個体栽培におけるもやしの生長挙動

発芽野菜の従属栄養栽培においては、水しか供給しないため生長に伴い生合成される組織の構成成分は貯蔵物質のみから得られることになる。まず、栽培用試験管を用いて 1 個体での従属栄養栽培を行い、もやしの生長過程における貯蔵物質の動態を実験的に把握することを試みた。栽培期間中のもやしの子葉と幼植物体の乾燥重量の変化を測定した結果を Fig. 3(a) に、もやしの生長過程を Fig. 2 の写真に示す。もやしはまず根が生じ、栽培開始から 36 時間を過ぎた時期に茎の伸長が始まった (Fig. 2(a))。そして、Fig. 2(c) に示すようにもやしは 108 時間を過ぎると、シリコン栓に接触しながら生長した様子が観察された。幼植物体の乾燥重量は栽培開始から 48 時間、96 時間、144 時間の時それぞれ 7.5 mg, 24.0 mg, 33.5 mg となった。一方で、もやしの総乾燥重量は生長に伴い次第に減少し、栽培開始時、48 時間、96 時間、144 時間の時それぞれ 57.5 mg, 52.5 mg, 44.9 mg, 39.4 mg となった。減少した

Fig. 2 Photographs of mung bean sprout 36 hours (a), 72 hours (b), and 108 hours (c) after soaking in individual cultivation.

Fig. 3 Course of dry weight of mung bean sprouts in individual cultivation (a). Courses of fresh weight of mung bean sprout (◆), and concentrations of oxygen gas in test tube (○) and of carbon dioxide in test tube (×) and concentration of ethylene gas in test tube (△) in individual cultivation (b).

固形分は呼吸に使われ二酸化炭素として放出されたと仮定するとき、栽培開始時の総乾燥重量を貯蔵物質総量とみなすと、栽培0時間～48時間(栽培初期)、栽培48時間～96時間(栽培中期)、栽培96時間～144時間(栽培後期)のそれぞれの栽培段階において貯蔵物質(57.5 mg)の8.7%, 13.2%, 9.6%が呼吸に使われたと見積もられた。トウモロコシにおいては種子中の貯蔵物質を消費している場合、種子重の減量に対して30%が呼吸に消費され、70%が幼植物体の乾物生産に使われる[17]のに対し、もやしにおいては栽培初期では13.0%, 栽培中期では28.7%, 栽培後期では16.6%が幼植物体の乾物生産に使われることがわかった。したがって、貯蔵物質が呼吸1に対して乾物生産に栽培初期では1.5, 栽培中期では2.2, 栽培後期では1.8の割合で使われると考えられた。この乾物生産が著しい栽培中期では茎の伸長が顕著であった(Fig. 2(b))。このように、水と酸素しか供給されない従属栄養栽培では、乾物基準の重量は生長に伴い呼吸によって常に減少する。したがって、もやしの生長を直接的に反映しているのは新鮮重量であり、これを用いて生長過程を評価し、もやしの生産性(収率)を検討することが適当と考えられた。

一定時間毎にもやしの重量と栽培用試験管内のヘッドスペースの酸素、二酸化炭素およびエチレンの濃度を測定した結果をFig. 3(b)に示す。生長曲線は栽培初期には生長が緩慢で、吸水膨潤前の緑豆が平均0.064 g, 吸水膨潤後には0.13 gであったのに対して24時間で0.17 gとなった。その後生長が次第に加速し、96時間を越えたあたりから緩やかになって、栽培144時間では0.68 gとなった。従属栄養栽培での収率は、吸水した種子の新鮮重量を基準とすると、5.2 [g/g]となった。この結果は、生長を新鮮重量で評価した生産性(収率)においては、吸水の寄与が大きいことを示していると考えられた。

栽培用試験管内の酸素は生長に伴って消費され、9.6%まで低下した。一般的な野菜種子では酸素濃度が5%以上であれば発芽可能であり、10%以上であれば空気条件下と同等の発芽率を得ることが可能であると考えられている[18]。オオムギでは、酸素濃度が9.5%以下になると酸素濃度の低下に伴い発芽率が減少し酸素消費および生長が低下することが知られている[19]。本研究での緑豆においては、酸素濃度が10%以上であったにもかかわらず生長が減速したことから、この生長抑制は酸素濃度が制限要因になったのではなく、幼植物体組織の生合成に必要な成分が不足したことが原因と考えられた。

二酸化炭素濃度は、最大4.8%まで上昇したが、シリコン栓に接触しはじめた108時間あたりからほぼ一定となった。エチレン濃度は、120時間付近から急激に増加した。エンドウでは茎の伸長を発泡ネオプレン製ストッパーまたはガラスビーズで物理的に制限すると、エチレンの生成が増加し、伸長の抑制と茎直径の増加をもたらすことが知られている[20]。故に、エチレン濃度が急激に増加したのは、もやしの物理的ストレスに応答した結果である可能性が考えられた。このように栽培用試験管を用いた従属栄養栽培において、エチレン濃度をモニタリングすることによって発芽野菜の物理的ストレスに対する応答に関する知見が得られる可能性が示された。

一般に生物は炭素源、窒素源、酸素を基質として利用して生長する。光合成を行う独立栄養植物の場合には、細胞生理に必要な炭素源と窒素源は常に産生され、生理的に安定な状態が維持される。従属栄養植物の場合、外部からの炭素源、窒素源の供給がないため常に生理的状态が変化する。したがって生長挙動を把握する場合には微分型パラメータを用いる必要があると考えられた。

もやし重量の生長速度と酸素消費速度および二酸化炭素生成速度を求めた結果を Fig. 4 に示す。生長速度は 100 時間付近で極大となり、その後低下した。酸素消費速度および二酸化炭素生成速度は 50 時間付近で極大となった。ブロッコリースプラウトにおいては酸素消費速度のピークと伸長のピークは一致しており、呼吸によるエネルギーの供給が伸長と連動していると考えられている [21]。もやしにおいては生長速度と酸素消費速度の挙動は異なっており、生長と酸素消費が連動しないことが示された。

新鮮重量基準の比生長速度、比酸素消費速度および比二酸化炭素生成速度の結果を Fig. 5 に示す。栽培開始から 50 時間程度の栽培初期では、比生長速度と比二酸化炭素生成速度は経時的に増加した。そして栽培 40 時間頃に極大となった。一方、比酸素消費速度は傾向が異なり、栽培初期が最大となった。この時、Fig. 2 (a) のように根の伸長は顕著である一方、胚軸の伸長は小

Fig. 4 Courses of growth rate of mung bean sprout (◆), oxygen uptake rate (○), and carbon dioxide evolution rate (×) in individual cultivation.

Fig. 5 Courses of specific growth rate of mung bean sprout (◆), specific oxygen uptake rate (○) and specific carbon dioxide evolution rate (×) in individual cultivation.

さく肥大が観察された。栽培 50~100 時間程度の栽培中期では、比生長速度、比酸素消費速度および比二酸化炭素生成速度はともに低下した。形態的には、Fig. 2 (b) のように胚軸の伸長が増大した。栽培 100 時間以降の栽培後期は、比生長速度の低下がさらに顕著になり、比二酸化炭素生成速度はほぼ停止状態となった。この時期には、Fig. 2(c) のようにもやししがシリコン栓に接触し、物理的ストレスを受けていることと関係しているものと考えられた。このように本研究で構築した一箇体栽培システムを用いることによって緑豆もやしの発芽過程における生理的状態の異なる生長ステージの存在を把握することが可能であることが示された。

もやしの生長と酸素消費および二酸化炭素生成の関連性を調べるために、比生長速度と酸素濃度、二酸化炭素濃度、比酸素消費速度、比二酸化炭素生成速度の相関関係を検討した結果をそれぞれ Fig. 6 (a), (b), (c), (d) に示す。栽培初期 (20~40 時間) では、酸素濃度および二酸化炭素濃度と比生長速度との相関関係は認められなかった。しかし、栽培中期 (50~100 時間) では、酸素濃度の低下に伴い比生長速度は低下し、両者に関連が認められた。栽培後期 (110~150 時間) では、酸素濃度は 10% 程度、二酸化炭素濃度は 4% 程度で変化がない状態でも、比生長速度が低下しているため、酸素濃度および二酸化炭素濃度が生長に及ぼす影響は小さく、基質となる貯蔵物質が枯渇したため生長が抑制されたものと考えられた。生理的に定常状態にあると考えられる栽培中期での比生長速度について検討したところ酸素濃度に比例した。また、栽培初期、中期においては比生長速度が大きく、もやししがシリコン栓に接触した栽培後期では比生長速度が低い値となった。

生長過程の酸素消費量は、生長段階に応じて変化すると考えられる。酸素消費は多くの場合、生長が著しい時期に大きくなることが知られている [22] が、Fig. 6 (c) の結果から、栽培初期では比酸素消費速度と比生長速度には相関がなかった。栽培中期では比酸素消費速度が低下するにしたがい、比生長速度が低下する傾向が認められた。この外挿から酸素に依存しない生長の寄与が比生長速度 8.0 mg/h/g (比酸素消費速度がゼロの時の切片) 程度と見積もられた。このことから、酸素消費を伴わない生長の存在が示された。栽培後期では比酸素消費速度と比生長速度は比例し、酸素消費と生長速度が連動している可能性が示唆された。また、Fig. 6 (d) の結果から、栽培初期から栽培中期では比二酸化炭素生成速度の増加に伴い比生長速度が増加する傾向があり、エネルギー代謝が高いほど生長速度が高い傾向が認められたが、一方で二酸化炭素の生成を伴わない生長の寄与が比生長速度 11 mg/h/g 程度と見積もられた。このような酸素消費および二酸化炭素生成を伴わない生長はもやし個体の吸水量の増加によるも

Fig. 6 Relationship between specific growth rate and oxygen concentration (a), between specific growth rate and carbon dioxide concentration (b), between specific growth rate and specific oxygen uptake rate (c) and between specific growth rate and specific carbon dioxide evolution rate (d) in individual cultivation.

のと考えられる。Fig. 6(a) 上において、比生長速度 8.0 mg/h/g を差し引いた正味の比生長速度を推定してみると、栽培中期の酸素濃度依存性の外挿線の交点から限界酸素濃度が 8.6% と算出された。したがって、酸素濃度が 8.6% を下回ると酸素欠乏による生長阻害が顕著になる可能性が示唆された。

このように恒暗条件で発芽させた場合、生長は、呼吸、組織形成および吸水の諸因子から影響を受け、生長ステージによってその挙動が異なることが示された。

比酸素消費速度と比二酸化炭素生成速度の関係を、Fig. 7 に示す。栽培中期では直線関係が認められたが、二酸化炭素生成がない時でも酸素が消費されており、二酸化炭素生成を伴わない酸素消費代謝反応の存在が示唆された。比酸素消費速度と比二酸化炭素生成速度の比である呼吸商は栽培中期では近似線の傾きから 0.78 となったが、もやしが生シリコン栓に接触した栽培後期にはほぼゼロになった。

呼吸商 RQ は、呼吸基質の種類によって異なると思われる [23]。炭水化物が基質の場合は $RQ=1$ 、脂質が用いられる場合は $RQ<1$ 、有機酸が用いられる場合は $RQ>1$ となる。ブラックマッペもやしにおいて、発芽

Fig. 7 Relationship between specific carbon dioxide evolution rate and specific oxygen uptake rate in individual cultivation.

過程の脂質の経日的な変動は、中性脂質が減少、糖脂質が増加、リン脂質が大きな変動なしとなり、中性脂質はとくにトリアシルグリセロールが減少した [24,25]。トリアシルグリセロールは種子発芽の際にリパーゼにより加水分解されて脂肪酸になり、酸素を消費しながら β 酸化されアセチル CoA を生じることが一般的に知

られている [26]. 緑豆もやしの場合は二酸化炭素生成を伴う酸素消費代謝反応と伴わない酸素消費代謝反応が存在し、呼吸以外の酸化反応の寄与が大きいことが示唆された. 栽培中期の近似線の傾きを呼吸商とすると, RQ は 0.78 となったことから, 呼吸基質に炭水化物のみならず脂質も消費している可能性が考えられた.

3.2 栽培台車による単一ベッド式高密度従属栄養栽培における移動現象論的解析

野菜類の水耕栽培に関しては, 古くは春日井によって, 根に対する酸素の供給が重要であることが明らかにされ, 根が十分に空気に触れ, 而も培養液で濡れているように培養すると栽培できることが示されていた [27].

一般に充填層を形成した生物生産システムでは, 充填層内の水分供給の最適化, 酸素濃度分布および温度分布の均一化が課題となることが多く, 充填層内の混合を充分に行うことが重要となる. もやしの場合, 生長により, もやし充填層は次第に厚くなる. この時, 混合により, 熱交換およびガスなどの物質交換を速くすると, 充填層内の不均一が抑制され, 一箇体栽培とほぼ同じ収率を実現することができると予想される. 本研究では高密度栽培系内部の混合・均一化を図るために流下型散水方式をとることによって, 充填層に流下した水が充填物の間隙を流れることで水分供給, 酸素供給および伝熱が促される方式とした.

高密度栽培における散水の影響を把握するために, 散水量を変えて栽培実験を行った. 散水量が少ないとあるいは充填層が厚いと混合が制限されると予想されたため, 酸素供給について検討した. もやし充填層内部の酸素濃度は, 非散水期ではもやしの呼吸によって低下し, 散水によって酸素を含む外気が充填層内に流入して上昇する. 散水条件を 0.4 t/h/台車と 0.6 t/h/台車に設定して栽培することによって得られたもやし充填層の内部の酸素濃度測定値について, 非散水期間

の平均を平均酸素濃度として比較した結果を Fig. 8(a) に示す. 0.4 t/h/台車においては, 栽培開始時は 18% 程度であった酸素濃度が, 栽培 50 時間頃まで経時的に減少しおよそ 11% となった. 栽培 50 時間から栽培 100 時間の栽培中期では酸素濃度は 11~13% で推移し, 栽培 100 時間以降の栽培後期では酸素濃度は 13~17% まで経時的に上昇した. 0.6 t/h/台車においては, 栽培 50 時間で 11% まで低下したが, その後経時的に上昇し, 栽培中期で 11~15%, 栽培後期で 15~17% と推移した. 酸素濃度は 0.4 t/h/台車の条件のほうが, とくに栽培中期に酸素濃度が低く推移した. 0.6 t/h/台車の条件では散水により充填層内に酸素が充分供給されているが, 0.4 t/h/台車の条件では充填層内のガス混合が不充分なために酸素濃度が低くなった可能性が示唆された. また, 流加培養における充填層内の酸素濃度は, 酸素流入量, 酸素流出量および酸素消費量のバランスで決定されるが, 栽培後期では散水に伴う酸素流入量はそれほど変化しない一方, 生物活性が低下して酸素消費量が減少したために, 充填層内酸素濃度が経時的に増加したと考えられた. 次に, 栽培台車内の温度分布について検討した. 台車内温度は, 非散水期ではもやしの代謝熱によって上昇し, 散水によって冷却されて低下する. 非散水期間の温度の平均を平均温度として経時的に測定した結果を Fig. 8(b) に示す. 充填層上部の平均温度は 0.4 t/h/台車においても 0.6 t/h/台車においても 22~24℃ の範囲でほぼ一定であり, 散水に用いた水の水温に近い値で維持されていた. したがって充填層上部では散水量による差がないことが示された. 充填層下部の平均温度は 0.4 t/h/台車においては栽培開始時におよそ 23℃ であったが栽培 60 時間頃までは上昇し極大を経て, その後は低下した. 充填層下部での平均温度と比較すると最大で 2.3℃ 高くなったことから, 下段では散水による冷却が不充分であったことが示唆された. 0.6 t/h/台車においても栽培開始時におよそ

Fig. 8 Courses of oxygen concentration (a) and temperature (b) in a cultivation cart after imbibitions in high density cultivation. A value is the average of a non-watering period.

23℃であったが次第に平均温度が上昇し栽培時間 80 時間頃に極大となりその後低下する傾向が認められた。最大平均温度と充填層下部での平均温度との差は 0.4 t/h/ 台車における差よりも小さい値となった。このように、散水量が少ないと充填層内の冷却効率が低下し上部と下部の温度差が大きくなることが実験的に示された。また、非散水期の温度上昇と散水時の温度低下の変動幅も栽培時間が長くなるにつれて増加し、その後栽培時間の経過に伴い変動幅は小さくなった（結果は示していない）。この変動幅は呼吸による熱生成と関連していると考えられ、栽培初期から 60~80 時間頃までは呼吸が活発に行われ、その後栽培時間の経過に伴い呼吸活性が低下していったと考えられた。呼吸活性が低下したために、熱生成が小さくなり充填層内平均温度が低下したのと考えられた。

高密度栽培における生長曲線を Fig. 9 に示す。0.4 t/h/ 台車の条件でも 0.6 t/h/ 台車の条件でも一個体栽培と類似の生長曲線となった。一個体栽培の生長曲線に台車内の個体数 3,700,000 を乗じて予測した生長曲線を併せて示す。0.4 t/h/ 台車の条件では予測値に比べて低い値で推移したのに対し、0.6 t/h/ 台車の条件は予測値と近い値となった。さらに台車内のもやしの状況を把握するために、充填層の垂直方向について栽培終了時（栽培 155 時間後）のもやしの重量および形状を比較した。結果を Fig. 10 に示す。もやし重量は、0.4 t/h/ 台車の条件では上段と比較して中段および下段で有意に大きくなったが ($p < 0.05$)、0.6 t/h/ 台車の条件では上段、中段、下段のいずれも有意差がなく ($p < 0.05$)、0.4 t/h/ 台車の条件と比べて垂直方向の顕著なばらつきは認められなかった。もやしの重量と胚軸長について散水条件の違いを検討すると、台车上段での重量は 0.4 t/h/ 台車で 0.56 g、0.6 t/h/ 台車で 0.71 g、胚軸長は 0.4 t/h/ 台車で 33.2 mm、0.6 t/h/ 台車で 54.2 mm となり 0.6 t/h/

h/ 台車の条件のほうが大きくなったが、台車下段では重量は 0.4 t/h/ 台車で 0.84 g、0.6 t/h/ 台車で 0.72 g、胚軸長は 0.4 t/h/ 台車で 70.1 mm、0.6 t/h/ 台車で 54.9 mm となり 0.4 t/h/ 台車の条件のほうが大きくなった。

0.4 t/h/ 台車の条件において、垂直方向でもやしの重量および形状に大きなばらつきが生じたことは散水による物質および熱の均一化が不充分であったと考えられた。上段のもやしに伸長抑制が認められた結果は空気より軽いエチレンが充填層上段に移行し、滞留したエチレンの効果により上段の胚軸の伸長が抑制された可能性が考えられた。下段の伸長促進は、エチレンの移行に加えて温度上昇の効果の可能性も考えられた。

このように 0.6 t/h/ 台車の条件では散水による均一化効果が充分であったために、重量と形状のばらつきが小さくなったと考えられた。

0.6 t/h/ 台車の条件において高密度栽培したもやし重

Fig. 9 Courses of fresh weight of bed of mung bean sprout (○: amount of sprinkled water is 0.4 t/h/cart, ◆: amount of sprinkled water is 0.6 t/h/cart), fresh weight predicted from experimental value of individual cultivation (solid line).

Fig. 10 Fresh weight (a) and length of hypocotyls (b) (upper position, ■; middle position, □; lower position, ▨) of mung bean sprout samples cultivated for 155 hours in high density cultivation. Error bars indicate standard deviations ($n=10$). Different letters represent significant differences at the 5% level according Tukey's test.

量と一個体栽培から予測されるもやし重量の比を重量の有効係数として求めた結果を Fig. 11(a) に、高密度栽培と一個体栽培の比生長速度の比を比生長速度の有効係数として求めた結果を Fig. 11(b) に示す。重量の有効係数は栽培期間中すべてで 0.8~1 の高い値を維持していた。散水により、水分供給と内部の物質移動や熱交換が促進されたために、高密度で栽培しても高い効率性を維持できることが示された。

比生長速度の有効係数（高密度栽培と一個体栽培の比生長速度の比）に関しては、栽培初期は 0.6~0.7、栽培中期では 0.8~1.0、栽培後期では見かけ上比生長速度の有効係数が 1 よりも大きくなり、段階的に変動した。栽培後期において有効係数が 1 よりも大きな値となったのは、栽培用試験管における一個体栽培において 100 時間を超えると植物体がシリコン栓に接触し (Fig. 3(c))、生長が抑制されていたことの反映と考えられた。散水による充填層内の混合が充分である時、栽培台車による栽培は酸素濃度や温度が保たれた連続培養系とみなすことができる。このような特性を有した栽培システムで栽培したもやしが一個体で栽培した時と類似した生長挙動を示したことから、このシステムは同調的栽培とみなすことができると考えられた。緑豆もやしの栽培は、栄養については種子中の貯蔵物質のみを消費する従属栄養型の回分式の栽培となるが、生育に必要な水分と酸素については、散水によって供給される流加法といえる。物質移動の観点からの検討によって、0.6 t/h/ 台車の条件においては、充填層内の水分供給、温度の均一化、ガスなどの物質の移動が充分に行われていることが示唆された。

以上の結果から、野菜の水耕栽培においてその重要性が指摘されている酸素と水分の供給に着目して散水量を変えて栽培特性を把握したところ、散水量が小さいと充填層内の混合が不十分となり、顕著な酸素濃度分布、

温度分布が生じることが明らかとなった。また、散水量を制御することによって、充填層内の不均一さを抑制することが可能であった。そして、もやしの高密度栽培に関して、散水量を変化させる実験から植物体外での移動現象に関係した因子について、充分な混合が達成できる散水量での実験から植物体内の生理的状态に影響を与える因子について検討することによって両者を分離して評価することができることが示された。

植物の代謝物質の工業生産のためにバイオリアクタを用いた植物細胞の大量培養が行われている [28,29]。本研究で検討した高密度栽培系は、これを緑豆種子の充填層とみなすと、水を間欠的に供給する流加培養型のバイオリアクタと考えることができる。植物細胞のバイオリアクタにおいては細胞などが分散相となり培地などの液体が連続相となっているが、もやしの高密度栽培系の場合は気体が連続相となっている反応系とみなせる。植物細胞の高濃度培養においては、細胞への酸素供給が課題の 1 つとなっている [30]。もやしの高密度栽培系においても、もやしが高密度に充填されていて気相中の攪拌・混合が困難であるため、酸素供給が課題となると考えられる。本研究の結果から、散水のような水分供給と同時に流加によりもやしの気相を入れ替え酸素が供給される形式を選ぶことによって、散水量を適切にコントロールすれば、物質移動や熱交換を促進し、高い生産性を維持した高密度栽培が実現できる可能性が示された。

4. 結 論

本研究では、もやしの原料として用いられている緑豆の従属栄養生長挙動を把握することを目的として、密閉試験管を用いた栽培試験法を構築し、生長に伴う重量変化を経時的に測定することによって、一個体の

Fig. 11 Effectiveness factors on fresh weight (a) and specific growth rate (b) at 0.6 t/h/cart watering in high density cultivation. Effectiveness factor is the ratio of each value of fresh weight or specific growth rate in high density cultivation and in individual cultivation.

生長曲線, 試験管内の酸素および二酸化炭素の濃度を測定し酸素消費速度および二酸化炭素生成速度を求めた。次に, 単一ベッド式栽培装置における個体群の栽培特性の解析を試み, 高密度栽培における効率性について評価し考察を加えた。散水量が小さいと充填層内の混合が不十分となり, 顕著な酸素濃度分布および温度分布が生じるが, 散水量を制御することによって, 充填層内の不均一さを抑制し効率的な高密度栽培システムを構築することが可能であることが示された。

謝 辞

本研究は国立研究開発法人科学技術振興機構「復興促進プログラム (マッチング促進)」の支援によって行われました。深甚から感謝いたします。

引 用 文 献

- 1) H. Murase, H. Fukuda; "Innovative Hi-Tech plant factory" (in Japanese). J. SHITA., **24**, 167-173 (2012).
- 2) N. Noguchi; "Plant factory based on ICT toward next generation" (in Japanese). J. SHITA., **24**, 174-179 (2012).
- 3) M. Takatsuji; "The basic and practices of plant factories (Shokubutsukojo No Kiso To Jissai)", Shokabo, Tokyo, Japan, 1996, p. 164.
- 4) L. B. Andrews, W. R. Curtis; Comparison of Transient Protein Expression in Tobacco Leaves and Plant Suspension Culture. Biotechnol. Prog., **21**, 946-952 (2005).
- 5) K. M. O'Neill, J. S. Larsen, W. R. Curtis; Scale-up of *Agrobacterium*-mediated transient protein expression in bioreactor-grown *Nicotiana glutinosa* plant cell suspension culture. Biotechnol. Prog., **24**, 372-376 (2008).
- 6) K. Matsumoto, Y. Tada, H. Shimizu, S. Shibusawa; "Effect of water supply levels on growth and antioxidative activity of *Raphanus sativus* L. 'Kaiwaredaikon (Japanese radish sprout)'" (in Japanese). J. SHITA., **21**, 79-85 (2009).
- 7) T. Tajiri; "Growth and Changes of amino acid Contents in the Cultivation Process and During Storage of Thick Bean Sprouts by Different Cultivation Methods (Studies on the Cultivation and Keeping Quality of Bean sprouts Part -XIX)" (in Japanese). Jpn. Assoc. Food Preserv. Sci., **28**, 33-39 (2002).
- 8) T. Mizuno, K. Yamada; "Variation in the composition of g-aminobutyric acid and free amino acids during the growing process of commercially available soybean sprouts" (in Japanese). J. Integr. Stud. Diet. Habits., **17**, 329-335 (2007).
- 9) T. Nanmori, A. Mitsumatsu, A. Kohno, K. Miyatake; "Nutritional Features of Dry and Germinating Alfalfa Seeds" (in Japanese). J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci., **44**, 221-224 (1991).
- 10) F. M. V. Pereira, E. Rosa, J. W. Fahey, K. K. Stephenson, R. Carvalho, A. Aires; Influence of temperature and ontogeny on the levels of glucosinolates in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) sprouts and their effects on the induction of mammalian phase 2 enzymes. J. Agric. Food Chem., **50**, 6239-6244 (2002).
- 11) M. Uhl, B. Laky, E. Lhoste, F. Kassie, M. Kundi, S. Knasmüller; Effects of mustard sprouts and allylisothiocyanate on benzo(a)pyrene-induced DNA damage in human-derived cells: A model study with the single cell gel electrophoresis/Hep G2 assay. Teratog. Carcinog. Mutagen., **23**, 273-282 (2003).
- 12) S. Waite, M. J. Hutchings; The effects of sowing density, salinity and substrate upon the germination of seeds of *Plantago coronopus* L. New Phytol., **81**, 341-348 (1978).
- 13) N. Watanabe; "Studies on the germination of cultivated Tobacco seeds as affected by sowing density and interspecific interaction" (in Japanese). Jpn. J. Breed., **34**, 62-68 (1984).
- 14) B. R. Murray; Density-dependent germination and the role of seed leachate. Aust. J. Ecol., **23**, 411-418 (1998).
- 15) H. Noda, H. Muraoka; "CO₂ gas exchange measurements of a whole-plant" (in Japanese). Low Temp. Sci., **67**, 95-101 (2009).
- 16) S. Murata, K. miyauchi, Y. Yang; "Measurement of Respiration of Fresh Vegetable" (in Japanese). J. Jpn. Soc. Agric. Mach., **55**, 69-75 (1993).
- 17) A. Tanaka, J. yamaguchi; "Studies on the growth efficiency of crop plants (Part 1) : The growth efficiency during germination in the dark" (in Japanese). Jpn. J. Soil Sci. Plant Nutr., **40**, 38-42 (1969).
- 18) Y. Hori, T. Sugiyama; "Germination of vegetable seeds under various concentrations of oxygen and carbon dioxide" (in Japanese). J. Japan. Soc. Hort. Sci., **22**, 72-80 (1953).
- 19) J. Vlamis, A. Davis; Germination, growth, and respiration of rice and barley seedlings at low oxygen pressures. Plant Physiol., **18**, 685-692 (1943).
- 20) J. D. Goeschl, L. Rappaport, H. K. Pratt; Ethylene as a factor regulating the Growth of pea epicotyls subjected to physical stress. Plant Physiol., **41**, 877-884 (1966).
- 21) Y. Gu, Q. Guo, L. Zhang, Z. Chen, Y. Han, Z. Gu; Physiological and biochemical metabolism of germinating broccoli seed and sprouts. J. Agric. Food. Chem., **60**, 209-213 (2012).
- 22) S. Shimizu; "College biology plant physiology revised edition (Daigaku No Seibutsugaku Shokubutsu Seirigaku", Shokabo, Tokyo, Japan, 1980, p.106.
- 23) S. Shimizu; "College biology plant physiology revised edition (Daigaku No Seibutsugaku Shokubutsu Seirigaku", Shokabo,

Tokyo, Japan, 1980, p.107.

要 旨

- 24) Y. Kondo; "Changes of Neutral Lipid Fractions during Germination of black matpe" (in Japanese). J. Agric. Chem. Soc. Japan., **52**, 181-186 (1978).
- 25) Y. Kondo, K. Masuda; "Changes in phospholipids during germination of black matpe (Gram)" (in Japanese). J. Agric. Chem. Soc. Japan., **56**, 203-208 (1982).
- 26) Y. Masuda; "Plant physiology revised edition (Shokubutsu Seirigaku)", Baifukan, Tokyo, Japan, 1977, p. 244.
- 27) S. Kasugai; "Studies on water-culture" (in Japanese). Jpn. J. Soil Sci. Plant Nutr., **13**, 669-822 (1939).
- 28) S. Takayama, N. Mera, M. Akita; "Plant biotechnology for industrial production" (in Japanese). J. SHITA., **24**, 224-232 (2012).
- 29) M. I. Georgiev, J. Weber, A. Maciuk; Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds. Appl. Microbiol. Biotechnol., **83**, 809-823 (2009).
- 30) H. Tanaka; "Technological problems in cultivation of plant cells at high density" (in Japanese). Hakkokogaku kaishi., **63**, 245-257 (1985).

高密度栽培系における緑豆発芽野菜の栽培プロセス確立のため、緑豆の従属栄養生育挙動の把握と、高密度栽培における効率性について評価した。試験管一個体栽培と単一ベッド式高密度栽培試験を実施し、品温、重量、栽培容器内の酸素濃度、二酸化炭素濃度変化の測定と、重量基準の比生長速度と比酸素消費速度および比二酸化炭素生成速度を求めた。一個体栽培および高密度栽培において、栽培初期、中期、後期と区分される生理的状態の異なる生育ステージの存在が示された。また、高密度栽培において散水量 0.6 t/h/ 台車では重量の有効係数が栽培期間中、高い数値に維持された。散水量 0.6 t/h/ 台車と比べ 0.4 t/h/ 台車では重量の有効係数が低下し、充填層下段の品温上昇と垂直方向で重量と形状のばらつきがみられた。以上の結果から、散水量を制御することで物質移動や熱交換を促進し、高い生産性を維持した高密度栽培が実現できる可能性が示された。