

## 藻類の濃縮保存と再生について

小林 真人

(日本栽培漁業協会能登島事業場)

## 緒 言

種苗生産における藻類, 特にナンクロロプシス (*Nannochloropsis oculata*) はワムシの餌料, 飼育水の環境コントロール, 栄養強化などに利用され, 環境の変動に対して強いことから日本各地の種苗生産機関などで培養されている. 日本栽培漁業協会能登島事業場では, ハタハタ, マガレイ, マダラと冷水系魚種に利用しており, 供給は12~5月と冬期が中心である. この時期の日本海側の気候は, 降雨, 雪による曇天が多いため日照量が少なく気温も氷点下になるなど, 藻類の培養には厳しい気象条件である. そのため, ナンクロロプシス (以下ナンクロと記す) の増殖率は低く, 大量需要に対し, 限られた施設では全てを賄うことは困難な状況にある. このため昭和57年の開所以来, 藻類の供給方式について様々な対策を検討してきた. 本稿では, この不足分を大量にかつ安定的に供給できる方式として濃縮保存による供給補助対策について, その導入の経緯や特長, 栄養成分の変動, 低温株として利用されている珪藻 (フェオダクチラム) の濃縮保存と利用について紹介する.

## 濃縮保存の導入の経緯と特長

## 1 濃縮保存の導入の経緯

先に述べたように日本栽培漁業協会能登島事業場での種苗生産期におけるナンクロの供給量増大のため, 種々の対策について検討を行ってきたが (表1), 多くの対策は大量にかつ安定的に供給するという条件を満たすことは困難であった. この中で, 濃縮保存による供給補助対策は, 日本栽培漁業協会上浦事業場で大型の遠心分離機を利用し, その有効性が報告されていたことから (日本栽培漁業協会 1982), 昭和58年に大量処理型のノズルセパレーター式遠心分離機と高濃度濃縮型のデスラッジ式遠心分離機の2台を導入した. そして, ワムシの餌料や栄養強化, 元種確保の検討を行ってきた.

表1 大量供給手法の検討

対 策	実 施 方 法
1 培養施設の増加	水槽数の増加による保有量の向上
2 増殖率の向上	人工照明による照度補助 培養水の加温
3 供給補助対策	濃縮保存*)
4 代替え餌料	冬期に適した藻類の探索, 馴化*)
5 市販品の利用	濃縮淡水クロレラの利用

\*) 重点取り組み.

## 2 濃縮保存の特長

通常培養時の細胞数は2000～3000万セル/mlであるが、濃縮することにより100～400億セル/mlと高濃度になり、保存スペースが非常にコンパクトになるため、大量保存が可能である。これまでの試験から、保存期間は冷凍保存では1～1.5年、冷蔵保存（4℃）して種として利用する場合は3～6か月の長期保存が可能であることから、必要量を事前に培養し濃縮保存することにより、大量にかつ安定的な供給ができるようになった。これ以外にも、濃縮したものを水温2～5℃で通気して冷蔵保存したものは、保存後3～6か月目でも増殖し培養不調時の緊急拡大用元種として利用できることもわかった。冷蔵保存したものは輸送にも耐えることから、他の機関へも10m<sup>3</sup>（2000万セル/ml換算）単位の送付が可能で、他場での培養不調に対応することも可能である。

## ナンクロロプシスの栄養成分の変動

### 1 材料と方法

海産魚類の種苗生産において、高度不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸（以下EPAと記す）やドコサヘキサエン酸（以下DHAと記す）は必須脂肪酸として注目されており、ワムシ培養においてはビタミンB<sub>12</sub>が増殖促進に関わっていることが知られるようになり、市販の濃縮淡水クロレラにはこれを強化したものが売られている。そして、ナンクロにはEPAやビタミンB<sub>12</sub>が含まれていることも知られている。

そこで、濃縮保存中の脂肪酸組成と特に効果が多いとされているEPAやビタミンB<sub>12</sub>の含有量の変化について、日本食品分析センターに依頼して分析を行った。また、周年培養を行っている中で、栄養成分がどう変動するかについても調査した。

冷蔵保存は70ℓテンタルで、水温5℃で通気保存した。冷凍保存は濃度を200億セル/mlにし、-45℃で凍結後保存した。分析は、濃縮ナンクロは製造時を0か月目とし、1、3、6、12か月目で行い、培養時の季節変動は5月（春）、8月（夏）、10月（秋）、12月（冬）を目安として、濃縮後直ちに送付して分析した。分析値は細胞数を200億セル/mlに換算し、サンプル100g中の含有量で表わした。

### 2 結果と考察

#### (1) ビタミンB<sub>12</sub>

季節毎の変動をみると、春と夏よりも秋と冬のほうが含有量は多く、約2倍もあることがわかった（表2、図1）。そして、保存期間中の変動では冷凍保存したものは、保存直後から保存後12か月经過してもほとんど変化はみられなかった。冷蔵保存したものは、保存期間が長くなるにしたがって含有量が増加し、保存12か月目では濃縮時の約6倍も高くなることが分かった（表3、図2）。

#### (2) EPAと脂肪酸組成

季節毎の脂肪酸の含有量に占めるEPA含有割合は28.9～41.8%であったが、秋と冬に高い傾向がみられた。EPA量は全体に変動は小さかったが、夏にやや低い傾向がみられた（表2、図3）。保存期間中の変動については、冷凍保存したものは分析値にばらつきがあるものの、保存後12か月目まで大きな変化はないと思われる。冷蔵保存したものは、保存後6か月目までは大きな増減はみられなかった

が、保存後12か月目の分析では濃縮時の約4分の1まで低下した（表3,図4）.

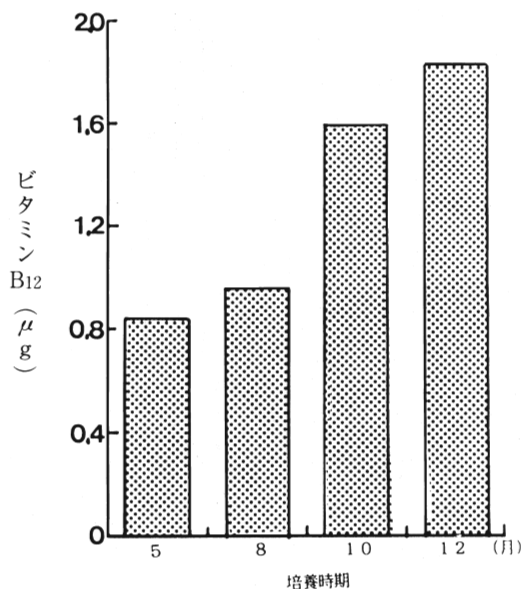


図1 ナンノクロロプシスのビタミンB<sub>12</sub>含有量の季節変動.

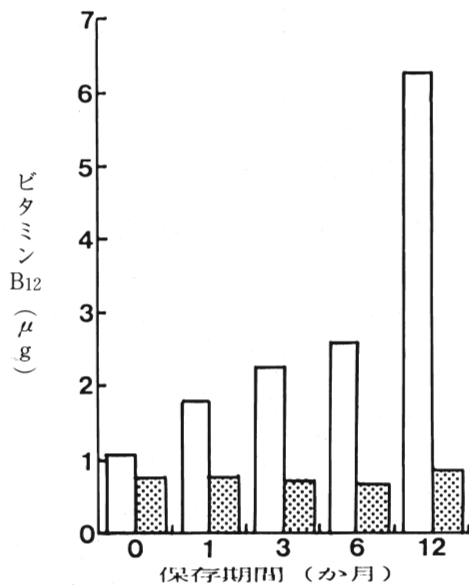


図2 ナンノクロロプシスのビタミンB<sub>12</sub>含有量の保存期間中の変動. 〇: 冷凍保存, □: 冷蔵保存.

表2 培養時期によるナンノクロロプシスのビタミンB<sub>12</sub>, EPAの含有量と脂肪酸中のEPA割合の分析結果

時期	ビタミン B <sub>12</sub> (μg)	EPA (g)	脂肪酸中のEPA割合 (%)
5月	0.84	0.73	32.8
8月	0.96	0.53	28.9
10月	1.60	0.63	41.6
12月	1.83	0.72	41.8

表3 濃縮保存したナンノクロロプシスのビタミンB<sub>12</sub>, EPAの含有量と脂肪酸に含まれるEPAの割合の分析結果

保存期間	ビタミン B <sub>12</sub> (μg)		EPA (g)		脂肪酸中のEPA割合 (%)	
	冷凍保存	冷蔵保存	冷凍保存	冷蔵保存	冷凍保存	冷蔵保存
0か月目	0.77	1.07	0.74	0.72	41.5	36.2
1か月目	0.77	1.76	0.77	0.50	43.4	44.0
3か月目	0.71	2.25	0.62	0.59	40.1	39.7
6か月目	0.64	2.59	1.06	0.81	44.5	45.4
12か月目	0.86	6.27	0.71	0.22	41.1	26.2

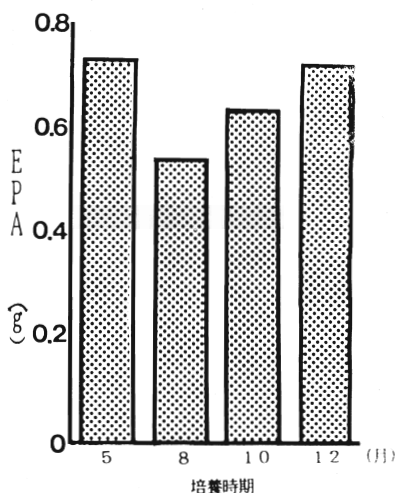


図3 ナンノクロプシスのEPA含有量の季節変動.

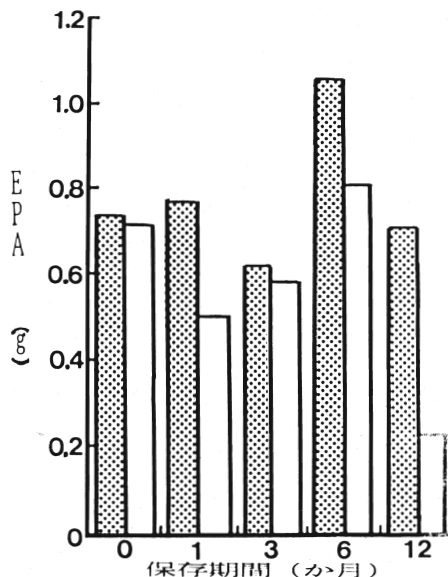


図4 ナンノクロプシスのEPA含有量の保存期間中の変動. 罫: 冷凍保存, □: 冷蔵保存.

以上のことから、ビタミンB<sub>12</sub>などの含有量は秋と冬に高くなる傾向がある。これは、細胞増殖が著しい春や夏は細胞内に蓄積される栄養は少なく、それらは細胞分裂にまわされることが考えられる。また、濃縮保存については、冷凍することで細胞の活性が停止し変化は少ないが、水温5℃前後では細胞の活力は抑制されるが、活性がみられることから変動は大きい。しかし、細胞自体は生きていることから、これを通常の培養に戻した場合、増殖が期待できることが予想される。したがって、ワムシなどの餌料として使用する場合は冷凍を使用し、元種として再生を期待する場合には冷蔵が適していると思われる。また、6か月目の冷蔵保存と12か月目の冷蔵保存では、その値に大きな変化がみられることを考えると、冷蔵保存は6か月を目安とし、更新していくことが望ましいと思われる。

### 遠心分離機によるフェオダクチラムの濃縮保存方法と再生試験

#### 1 材料と方法

日本栽培漁業協会能登島事業場では、フェオダクチラム (*Phaeodactylum tricornutum*) はホッコクアカエビの餌料として培養している珪藻であるが、低水温での培養が可能なることから、冬期に培養可能な藻類として利用範囲は広いと思われる。しかし、これまで遠心分離機による濃縮では細胞が破壊され、保存が困難であるとされていたことから (日本栽培漁業協会 1991)、保存方法について再度試験を試みた。

試験は2回行い、第1回はノズルセパレーター式遠心分離機で前処理し、次にデスラッジ式遠心分離機にかける方式で行い、デスラッジ式の濃縮時間を1, 5, 15, 30分に設定した。第2回はノズルセパレーター式遠心分離機のみを使用し、濃縮を1~4回繰り返す方式で行った。

これらの方法で濃縮したものを冷蔵保存して、保存期間毎に再生試験を行い、元種として利用できるか否か確認した。試験は100ℓパンライト水槽に種を10万セル/mlになるように接種し、施肥を行い、エアーストーン1個で通気して自然水温で培養した。

## 2 結果と考察

- (1) 濃縮結果 第1回の試験では濃縮時間30分で細胞数は8.5億セル/mlに達したが、収穫割合は濃縮前を100%として濃縮時間が5分を越えると40%前後に低下し、ロスが多かった。第2回の試験では濃縮回数4回目で3.4億セル/mlと第1回の試験より低いものの、収穫割合は4回目でも60%と第1回の試験よりロスが少なかった(図5, 6)。
- (2) 再生試験 第1回の試験では保存後1, 32日目に再生試験を行ったが、全て増殖しなかった。これに対し、第2回の試験では保存後1, 32, 72, 104日目に再生試験を行ったところ、全ての試験区で増殖がみられた(図7, 8)。

以上の結果から第1回の試験では高濃度に濃縮できるものの収穫割合も低く、再生しないことから、元種として利用することはできないと思われる。第2回の試験では第1回の試験にはおよばないが、高濃度濃縮は可能で収穫割合も高い。そして、保存後104日目でも再生し長期保存も可能であると思われたことから、濃縮方法を考慮し適切な方法で行えば、細胞を破壊せずに濃縮することは可能で、元種として十分利用できることがわかった。

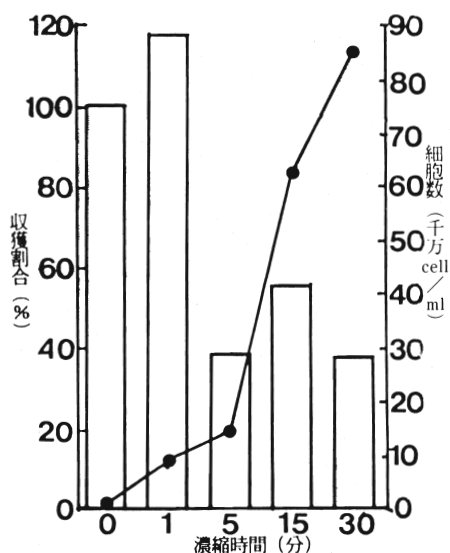


図5 ノズルセパレーター式とデスラッジ式遠心分離機によるフェオダクチラムの濃縮試験結果。●：細胞数，□：収穫割合。

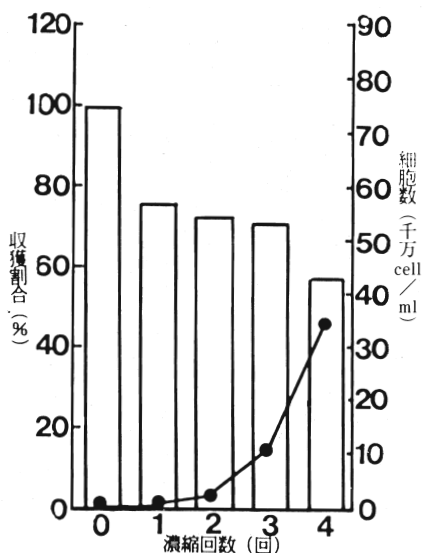


図6 ノズルセパレーター式遠心分離機によるフェオダクチラムの濃縮試験結果。●：細胞数，□：収穫割合。

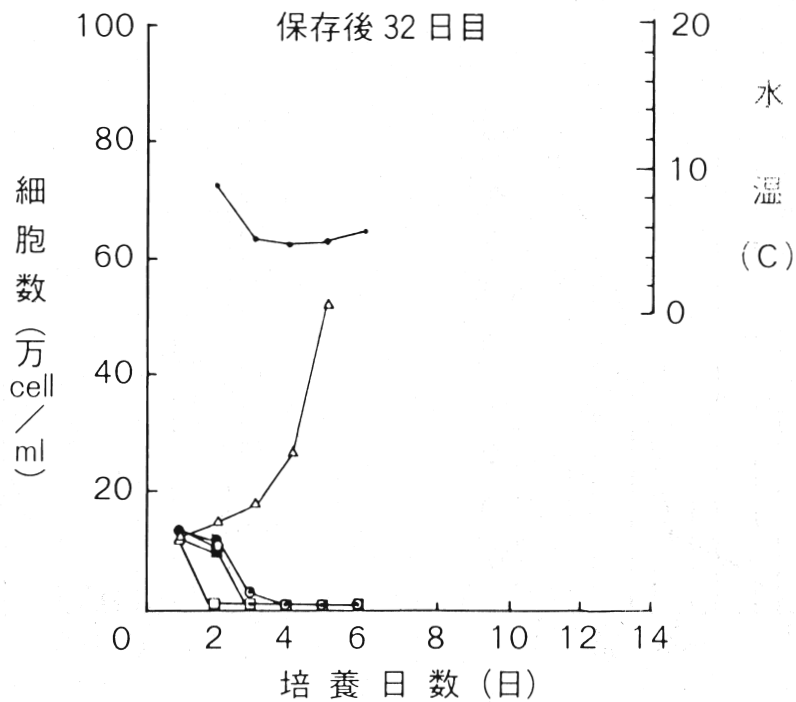
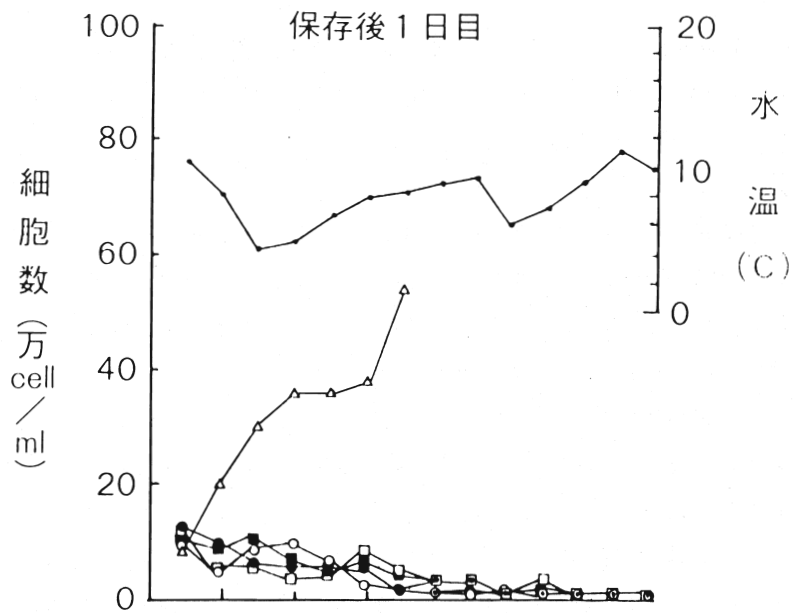


図7. デスラッジ式濃縮試験における保存期間毎の再生試験結果.

水温は各試験区ともほぼ同様であったことから、対照区のみを記した.

○：1分間濃縮，□：5分間濃縮，●：15分間濃縮，■：30分間濃縮，△：対照区，••：水温.

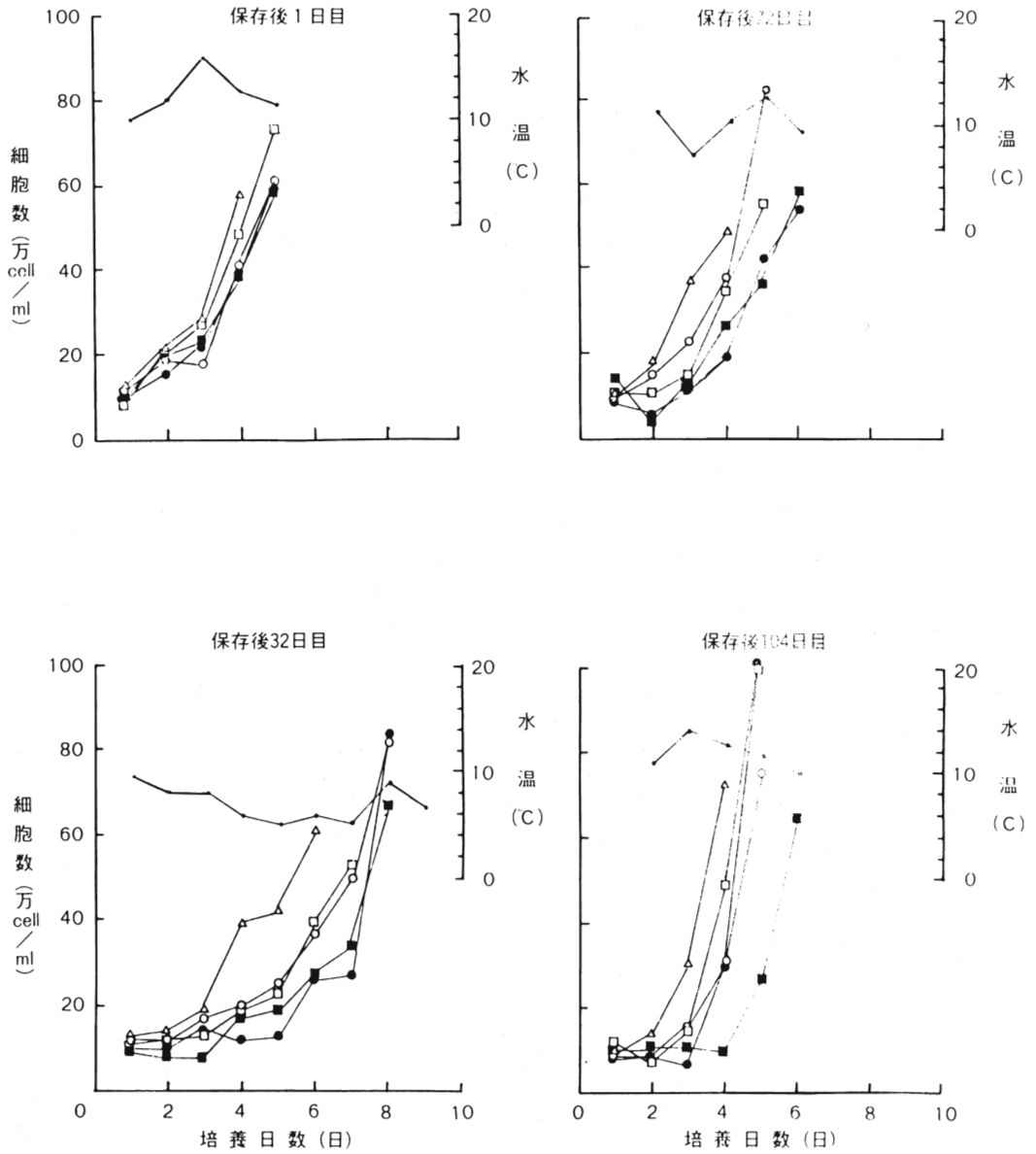


図8 ノズルセパレーター式濃縮試験における保存期間毎の再生試験結果。  
 水温は各試験区ともほぼ同様であったことから、対照区のみを記した。  
 ○：1回濃縮，□：2回濃縮，●：3回濃縮，■：4回濃縮，△：対照区，・：水温。

## 濃縮フェオダクチラムを用いたホッコクアカエビの飼育試験

### 1 材料と方法

フェオダクチラムはホッコクアカエビの種苗生産には欠くことのできない餌料であるが、環境変動によって培養不調になり、供給に支障をきたすことが考えられる。このことから、濃縮保存したフェオダクチラムを餌料として利用することを検討した。

試験は濃縮フェオダクチラムの冷凍保存したものを給餌する区と冷蔵保存したものを給餌する区、水槽で通常培養したものを給餌する対照区の3区を設定した。試験は500ℓパンライト水槽にホッコクアカエビのふ化幼生各6000尾を収容し、エアーストーン1個で通気して自然水温で飼育した。給餌は10万セル/mlを目安に、2回/日添加し、アルテミアなどは給餌しなかった。

### 2 結果と考察

試験は平成4年2月29日のゾエア1期から4月7日(39日間)のゾエア5期まで行った。ただし、冷凍保存区はゾエア2期で全滅したため、3月18日(19日間)で終了した。試験期間中の水温は8.3~13.1℃とホッコクアカエビの飼育には高かったことから、脱皮時に斃死が比較的多くみられた。その結果、ゾエア5期の取揚げ時の生残率は冷蔵保存区が27.0%(TL9.28mm)、対照区が40.5%(TL9.60mm)であった(図9)。

今回の試験から、濃縮フェオダクチラムの冷蔵保存区は、対照区と比較して生残や成長などはやや劣ってはいるものの、餌料として可能性はあると思われた。ただ、今回の試験は飼育環境が悪く、対照区でも通常の生産飼育より生残率が低かったことから、好条件下で再試験を行って見る必要があると思われる。

表4 濃縮フェオダクチラムを用いたホッコクアカエビの飼育試験結果

試験区	水 槽	収容尾数 (尾)	収容サイズ (mm)	飼育期間	水 温 (℃)	取り揚げ尾数 (尾)	取り揚げサイズ (mm)	生残率 (%)
対照区	500ℓ パンライト	6000	5.10	平4.2.29~3.28	10.4 (7.4~13.1)	2430	9.60	40.5
冷蔵 保存区	500ℓ パンライト	6000	5.10	平4.2.29~3.29	10.4 (7.3~13.1)	1620	9.28	27.0
冷凍 保存区	500ℓ パンライト	6000	5.10	平4.2.29~3.18	10.3 (8.3~12.4)	0	—	0.0

注) 冷凍保存区はゾエア2期で全滅したため試験を中止した。  
冷蔵保存区と対照区も大量斃死が続いたためゾエア5期で取り揚げた。



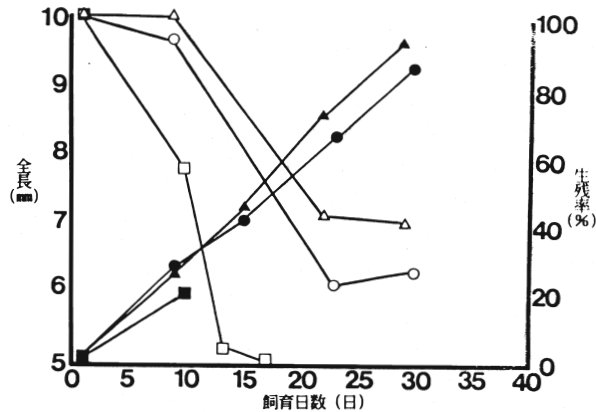


図9 濃縮フェオダクチラムを用いたホッコクアカエビの飼育試験結果.

▲：対照区成長，●：冷蔵保存区成長，■：冷凍保存区成長，△：対照区生残，○：冷蔵保存区生残，□：冷凍保存区生残.

## 文 献

日本栽培漁業協会 (1982) 昭和57年度日本栽培漁業協会事業場年報. 124-126.

日本栽培漁業協会 (1991) 平成元年度日本栽培漁業協会事業場年報. 110-111.

### [質 疑 応 答]

岡部 (京都栽七) 冷凍温度と冷凍に要する時間、及び保存温度は.

小林 (日栽協能登島) -45℃の凍結庫で1晩で凍結する. その後も、そのままの温度で管理する.

渡辺 (富山水試) ナンノクロロプシスを冷蔵保存するとビタミンB<sub>12</sub>の含有量が保存期間に比例して増加するということであるが、たとえば5月頃における常温で培養したナンノを使用し、ワムシを培養した場合と、2~5℃で冷蔵保存したナンノを使用した場合にワムシ個体数の増殖傾向に差が出るか否か.

小林 冷蔵との比較はしていないので、増殖に差があるか否かについては不明である. ただ、冷蔵を使用するとフロックが出やすいという事がある.

宮崎 (富山栽七) ナンノクロロプシスを冷蔵保存すると、ビタミンB<sub>12</sub>含量が増加するとの事だが、培養液中にビタミンB<sub>12</sub>が含まれているのではないか.

小林 培養液に特にビタミンB<sub>12</sub>を添加することはない.