

## 保存クロレラの脂肪酸組成の変化について\*

木 村 創

海産魚の種苗生産における初期餌料であるシオミズツボワムシ(以下ワムシという)の生産は、従来主として海産クロレラを餌料としている。しかし、海産クロレラ(現在ナンノクロロプシス族の一種である *Nannochloropsis oculata* またはその近縁種であることが示唆されている<sup>1)</sup>)は高水温時における生産が不安定なことから、当场ではワムシの夏場の餌料としてテトラセルミスや油脂酵母を与えている。テトラセルミスで培養したワムシは、マダイ<sup>2)</sup>・クロダイ<sup>3)</sup>・ヒラメ<sup>4)</sup>・<sup>5)</sup> 仔魚に対しては栄養的には問題ないことが報告されているが、他の魚種については不明なことが多く、また、油脂酵母は小さな水槽でワムシを培養している場合には水槽の汚れが早く、管理に多大な労力を要するなどの問題がある。そこで春先の海産クロレラの培養が安定している時期に濃縮し、この濃縮クロレラを冷凍或いは冷蔵で保存し、保存したクロレラを夏場に利用することを検討した。本報では濃縮クロレラを冷凍や冷蔵で長期保存することにより、栄養価、とくに海産魚の必須脂肪酸(EFA)である $\omega$ 3高度不飽和酸( $\omega$ 3 HUF A)量の低下状況やクロレラの生存状況を調べた。

### 材 料 お よ び 方 法

材 料 : 使用クロレラは当场で長期にわたって培養している海産クロレラであり、培養は100ℓパンライト水槽を用い、気温18~20°Cの室内で、強く通気しながら水槽上部なら白色蛍光灯を24時間照射して行った。なお、培養水には4/5海水(水道水1, 砂濾過海水4)とし、肥料は培養開始時に硫酸100 g/m<sup>3</sup>, 過リン酸石灰30 g/m<sup>3</sup>, 尿素10 g/m<sup>3</sup>, クレワット32 20 g/m<sup>3</sup>を添加した。

濃縮方法 : 細胞濃度 $5.0 \sim 6.0 \times 10^7$  個/mlにまで増殖した海産クロレラを高速冷却遠心機を用いて12,000 rpm, 10°Cで連続遠心して濃縮クロレラを得た。冷凍保存のサンプルは遠心によってできたバター状のものをそのままサンプルビンに5 gずつ入れ-30°Cで保存した。冷蔵のサンプルはバター状の濃縮クロレラに滅菌海水を加え40~50億個/mlに調整後2°Cで保存した。その後、冷凍したクロレラは保存30・50・70・90・120日後に、冷蔵したクロレラは保存15・30・50・70・90・120・150日後に脂肪酸組成を調べた。

脂肪酸組成の分析 : 濃縮クロレラをFolchら<sup>6)</sup>の方法で総脂肪を抽出し、常法によりけん化・メチル化した後、ガスクロマトグラフィー(島津製作所製, GC-6A, 水素炎イオン化検出器付き)で脂肪酸組成の分析を行った。分析条件はWatanabeら<sup>7)</sup>に準じた。また、当场で使用している種クロレラ(室内培養クロレラ)・大量培養クロレラ・テトラセルミスについても脂肪酸組成を調べた。

\* 種苗生産技術開発研究費による。

なお、以上の分析は東京水産大学の渡辺武教授に依頼した。

**保存クロレラの培養試験**：冷蔵保存したクロレラを保存10・20・30・40・50日後に取り出し、初期濃度 $1.0 \sim 1.5 \times 10^7$ 個/mlに調整し培養した。培養は気温 $18 \sim 22^\circ \text{C}$ の室内で24時間照射し、5ℓフラスコで行った。培養水は4/5海水、肥料は硫安 $100 \text{ g/m}^3$ 、過リン酸石灰 $30 \text{ g/m}^3$ 、尿素 $10 \text{ g/m}^3$ 、クレワット32 $20 \text{ g/m}^3$ とした。培養開始後は赤血球計数盤により10日目まで毎日クロレラの細胞数を計数した。

### 結果および考察

種クロレラ・大量培養クロレラ・テトラセルミスの脂肪酸組成を表1に、主な脂肪酸組成の組成率を図1に示す。クロレラはモノエン酸の含量が低く、 $\omega 3$ HUFA、とくにエイコサペンタエン酸(20:5 $\omega 3$ )の含量が多い。大量培養クロレラでは、20:5 $\omega 3$ が種クロレラより少なくなり、モノエン酸含量が高くなる傾向が認められた。これは種クロレラは10日くらいの短期培養をしているのに対し、大量培養クロレラは2週間以上の長期間培養を実施していることが原因と思われる。すなわち、クロレラの増殖は7~10日でピークに達することから、10日以上培養を実施することは強い通気をしているものの、保存しているのと同じ状態となり、エイコサペンタエン酸などの不飽和脂肪酸が酸化されモノエン酸に変化すると考えられる。また、渡辺ら<sup>8)</sup>は長崎県水産試験場で生産されているクロレラの脂肪酸組成は20:5 $\omega 3$ が22.8~27.7%、EFAの一つであるドコサヘキサペンタエン酸(22:6 $\omega 3$ )が0.5%前後含まれていることを報告してい

表1 各餌料藻類の脂肪酸組成

脂 肪 酸	種クロレラ	大量培養 クロレラ	テトラセルミス
12:0			
14:0	5.5	11.0	1.9
15:0	0.3	0.9	0.3
16:0	14.6	11.9	16.9
16:1	26.2	31.0	9.1
16:2 $\omega 7$	0.4	0.5	0.6
16:3	0.4		
16:4 $\omega 3$		—	16.2
16:4 $\omega 1$		—	—
17:0	1.0	0.5	1.5
18:0	0.1	—	0.2
18:1	1.6	1.4	13.8
18:2	2.6	2.8	4.7
18:3 $\omega 6$	0.4	0.4	0.2
18:3 $\omega 3$	0.2	0.2	14.2
18:4 $\omega 3$	0.1	0.1	5.4
18:4 $\omega 1$			
19:0			
20:0	—	0.2	0.3
20:1 $\omega 9$	0.1	—	0.7
20:2 $\omega 9$	0.2		
20:2 $\omega 6$	0.1	0.9	0.4
20:3 $\omega 9$			
20:3 $\omega 6$	0.5	0.2	—
20:4 $\omega 9$			
20:4 $\omega 6$	4.8	2.7	1.1
20:3 $\omega 3$	0.1	—	—
20:4 $\omega 3$	0.1	—	—
20:5 $\omega 3$	36.2	29.0	7.8
21:0	—		
22:1 $\omega 11+13$			
22:4 $\omega 9$			
$\Sigma \omega - 3$	36.7	29.3	27.4
$\Sigma \omega 3$ HUFA	36.4	29.0	7.8

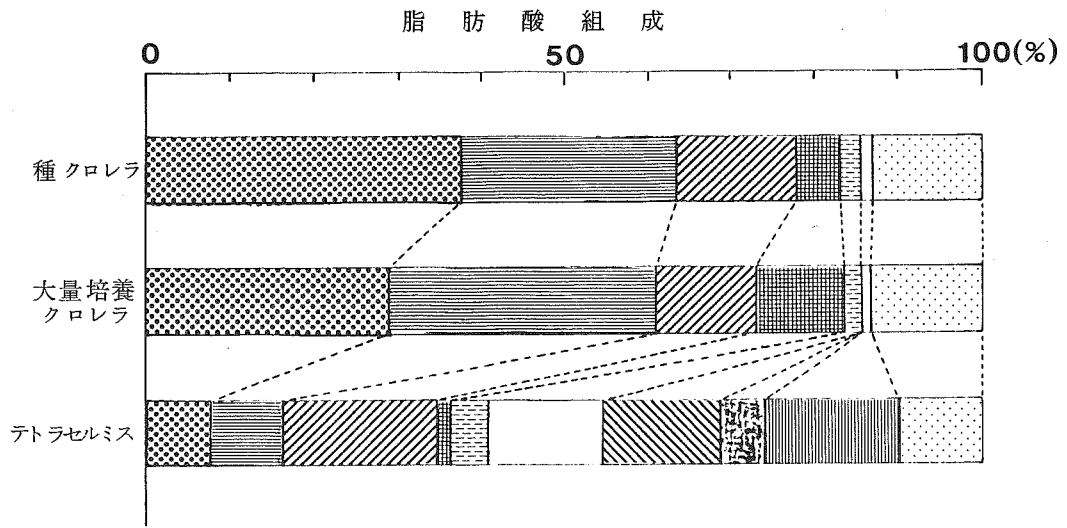


図1 餌料藻類の脂肪酸組成

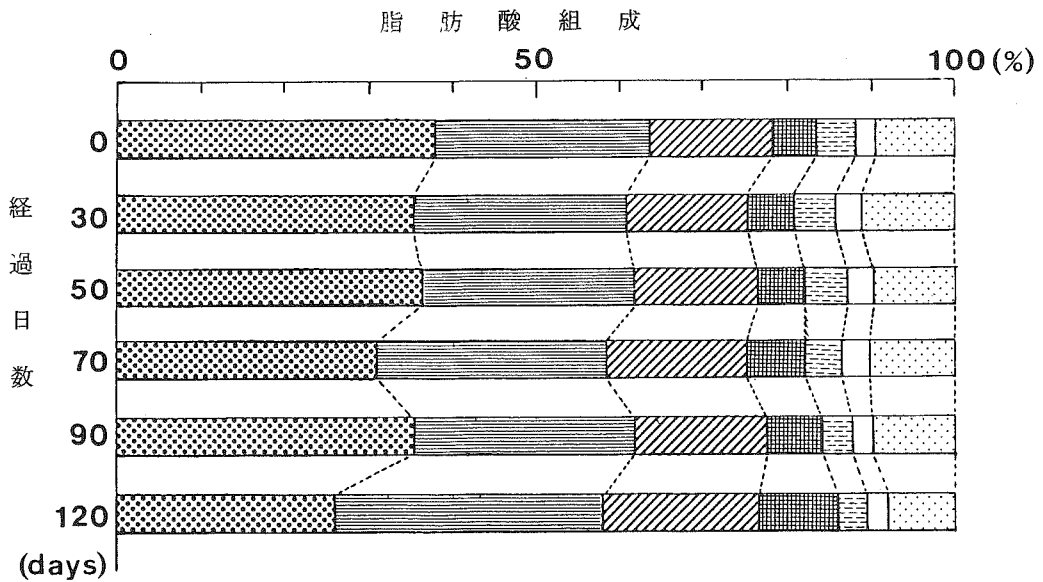
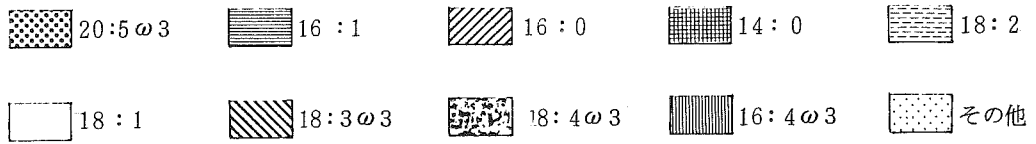
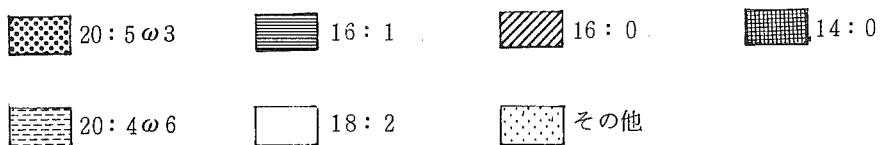


図2 冷凍保存クロレラの脂肪酸組成の変化



木村：保存クロレラの脂肪酸組成の変化について

る。それに対し、当場の種クロレラは20:5 $\omega$ 3の濃度が36.2%と高いが、22:6 $\omega$ 3のないのが特徴である。これは海産クロレラの種類が異なるのか、培養方法による差なのかについては不明である。一方テトラセルミスはリノレン酸(18:3 $\omega$ 3)やオイレン酸(18:1)の濃度が高いのに対し、 $\omega$ 3 HUF Aの濃度は7.8%とクロレラの1/5程度しか含まれていなかった。テトラセルミスについては福所ら<sup>3)</sup>も同様の結果を報告しており、また、テトラセルミスで培養したワムシがクロダイの仔魚に対して有効な餌料であることを明らかにしている。

表2・図2に冷凍保存中の脂肪酸組成の変化を示す。-30°Cで保存したクロレラの $\omega$ 3 HUF A濃度は、保存90日後まではほとんど低下せず、保存120日後には26.2%と大量培養クロレラのレベルまで低下した。このことから冷凍保存クロレラは90日間の保存でも濃縮時と同じだけの20:5 $\omega$

表2 冷凍保存クロレラの脂肪酸組成の変化

脂 肪 酸	冷 凍					
	0 日 後	30 日 後	50 日 後	70 日 後	90 日 後	120 日 後
12:0				0.6	0.4	
14:0	5.5	5.7	5.6	7.2	6.7	9.4
15:0	0.3	0.4	0.3	0.4	0.3	0.5
16:0	14.6	14.6	14.7	16.8	15.7	18.7
16:1	26.2	25.9	25.9	27.7	16.8	31.1
16:2 $\omega$ 7	0.4	0.4	0.4	0.6	0.8	0.9
16:3	0.4	0.1	0.4			
16:4 $\omega$ 3				0.1	0.1	0.2
16:4 $\omega$ 1				0.2	0.2	—
17:0	1.0	0.6	0.7	1.0	1.3	0.4
18:0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
18:1	1.6	2.5	2.2	2.3	1.4	1.9
18:2	2.6	3.3	3.3	3.5	2.6	3.0
18:3 $\omega$ 6	0.4	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2
18:3 $\omega$ 3	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1
18:4 $\omega$ 3	0.1	—	0.1	0.2	0.5	0.1
18:4 $\omega$ 1				0.1	0.1	
19:0				0.2	0.4	
20:0	—	—	0.2			0.2
20:1 $\omega$ 9	0.1	0.1	—	0.2	0.4	—
20:2 $\omega$ 9	0.2	0.3	—	0.1	0.1	
20:2 $\omega$ 6	0.1	0.2	0.3	0.1	tr.	0.2
20:3 $\omega$ 9				0.2	0.2	
20:3 $\omega$ 6	0.5	0.5	0.6	0.1	tr.	0.4
20:4 $\omega$ 9				tr.	—	
20:4 $\omega$ 6	4.8	5.0	5.2	4.4	3.8	3.4
20:3 $\omega$ 3	0.1	0.1	0.2	0.3	0.5	—
20:4 $\omega$ 3	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1
20:5 $\omega$ 3	36.2	33.6	34.8	29.6	33.7	25.9
21:0	—	—	—	0.6	0.5	
22:1 $\omega$ 11+13				0.1	—	
22:4 $\omega$ 9				0.7	0.5	
$\Sigma\omega$ -3	36.7	34.0	35.4	30.3	34.9	26.2

3が含まれており、栄養的な低下はなかったと考えられる。さらに、120日間の保存でも若干20:5 $\omega$ 3の低下は認められるものの大量培養クロレラと同じ程度の20:5 $\omega$ 3が存在しており、栄養的には特に問題ないと思われる。

表3・図3に冷蔵保存中の脂肪酸組成の変化を示す。冷蔵保存クロレラの20:5 $\omega$ 3濃度は、保存30日後までは36%程度の濃度を保っていたが、30日目以降徐々に低下がみられ、保存150日目には25.6%となった。20:5 $\omega$ 3が減少したのに対し、パルミトオレイン酸(16:1)やミリスチン酸(14:0)などのモノエン酸系の脂肪酸が増加していた。これは種クロレラと大量培養クロレラの脂肪酸組成の差と同じ理由と考えられる。すなわち、クロレラは長期保存なり、長期間培養することにより、不飽和脂肪酸である $\omega$ 3 HUF A含量が酸化され、飽和脂肪酸であるモノエン酸系に変化する

表3 冷蔵保存クロレラの脂肪酸組成の変化

脂 肪 酸	0 日 後	15 日 後	30 日 後	50 日 後	70 日 後	90 日 後	120 日 後	150 日 後
12:0					0.7	0.7		
14:0	5.5	6.1	5.5	7.6	7.1	7.1	8.2	8.5
15:0	0.3	0.3	0.5	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
16:0	14.6	14.7	14.8	17.0	17.4	17.3	19.3	19.6
16:1	26.2	25.8	26.0	27.7	28.7	27.9	29.4	29.1
16:2 $\omega$ 7	0.4	0.4	0.5	0.4	0.7	0.7	1.0	0.6
16:3	0.4	0.4	0.4	0.4				
16:4 $\omega$ 3					0.1	0.1	—	—
16:4 $\omega$ 1					0.2	0.2	—	0.2
17:0	1.0	0.8	0.9	1.2	1.2	1.1	0.5	1.1
18:0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	—	—
18:1	1.6	2.2	1.5	1.2	1.5	1.5	1.9	2.1
18:2	2.6	3.2	2.7	2.6	2.7	2.6	2.2	2.1
18:3 $\omega$ 6	0.4	0.2	0.4	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2
18:3 $\omega$ 3	0.2	—	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	—
18:4 $\omega$ 3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.3	0.1	—
18:4 $\omega$ 1					0.1	0.1		
19:0					0.3	0.3		
20:0	—	0.2	0.2	0.2			0.2	0.2
20:1 $\omega$ 9	0.1	0.1	0.1	—	0.2	0.2	—	—
20:2 $\omega$ 9	0.2	—	—	—	0.1	0.1		
20:2 $\omega$ 6	0.1	0.3	0.2	0.1	tr	0.2	0.9	1.3
20:3 $\omega$ 9					0.1	0.1		
20:3 $\omega$ 6	0.5	0.6	0.5	0.4	0.1	0.1	—	0.4
20:4 $\omega$ 9					—	0.6		
20:4 $\omega$ 6	4.8	5.1	4.9	3.8	3.8	3.6	4.2	5.0
20:3 $\omega$ 3	0.1	0.2	0.1	0.1	0.6	2.1	3.7	4.1
20:4 $\omega$ 3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	—	0.1
20:5 $\omega$ 3	36.2	33.9	35.7	31.3	28.0	27.5	22.0	21.4
21:0	—	—	—	0.4	0.5	0.4		
22:1 $\omega$ 11+13					—	0.3		
22:4 $\omega$ 9					1.0	0.9		
$\Sigma \omega-3$	36.7	34.3	36.1	31.7	29.1	30.2	25.9	25.6



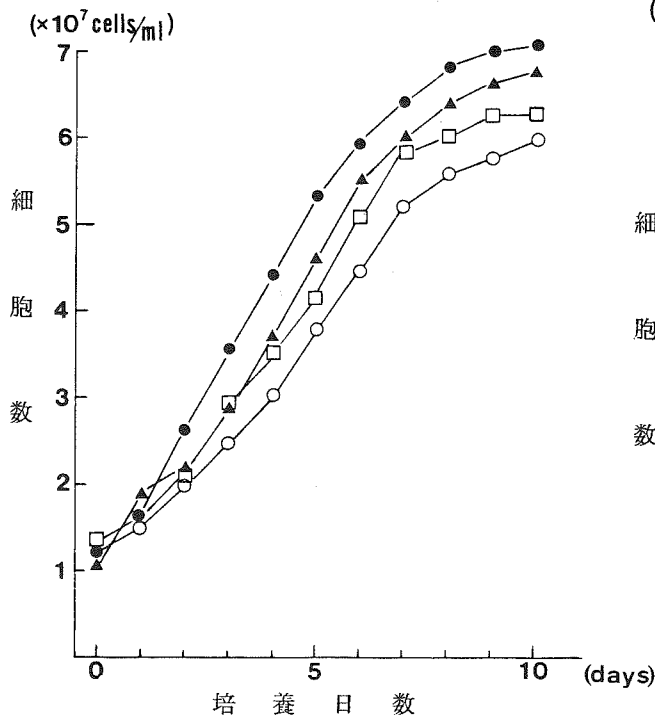


図4 冷蔵保存クロレラの増殖曲線

●—● コントロール ○—○ 保存10日目  
▲—▲ 保存20日目 □—□ 保存30日目

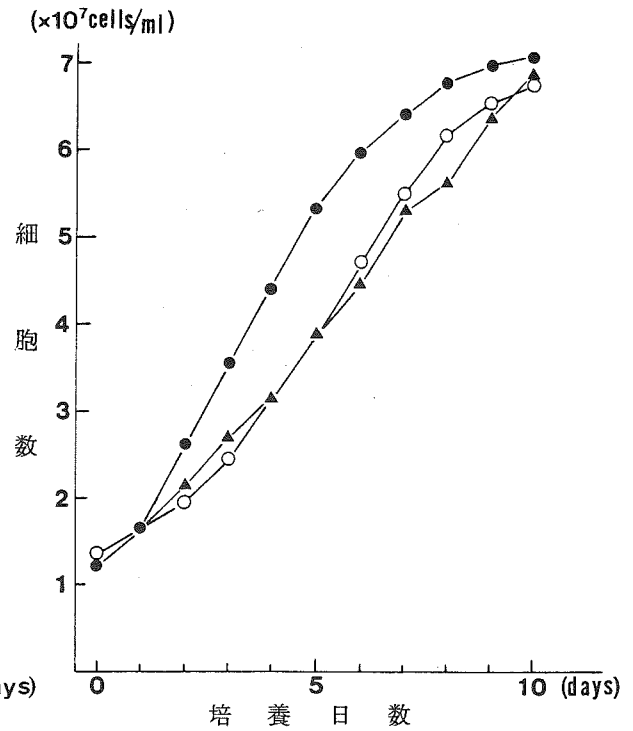


図5 冷蔵保存クロレラの増殖曲線

●—● コントロール ○—○ 保存40日後  
▲—▲ 保存50日後

終わりに、終始御懇切なご指導を承ると共に、脂肪酸組成の分析を快くお受けくださった東京水産大学の渡辺武教授に深謝の意を表します。

## 文 献

- 1) Maruyama, I., T. Nakamura, T. Matubayashi, V. Ando, and T. Maeda, 1986 : Identification of the alga known as "marine Chlorella" as a member of the Eustigmatophyceae. *Japan. J. Phycol.*, 34(10), 319-325.
- 2) 福所邦彦・岡内正典・Siti Nuraini・辻ヶ堂諦・渡辺武 1984 : テトラセルミスで培養したシオミズツボワムシのマダイ仔魚に対する餌料価値. *日水誌*, 50(8), 1439-1444.
- 3) 福所邦彦・岡内正典・P. Kraisingdecha・S. I. Wahyuni・渡辺武, 1985 : テトラセルミスで培養したS型ワムシのクロダイ仔稚魚に対する餌料価値, *養殖研報*, 8, 5-13.
- 4) 福所邦彦・岡内正典・田中秀樹・S. I. Wahyuni・渡辺武, 1985 : テトラセルミスで培養したシオミズツボワムシのヒラメ仔魚に対する餌料価値, *養殖研報*, 7, 29-36.
- 5) 木村 創, 1986 : テトラセルミスで培養したシオミズツボワムシのヒラメ仔稚魚に対する料価値の検討, *本誌* 17号, 28-35.

- 6) Folch J., M. Lees, and G. H. Stanley 1957 : A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, 497-507.
- 7) T. Watanabe and Takeuchi, 1976 : Evaluation of pollack liver oil as a supplement of diets for rainbow trout. *Bull. Japan. Soc. Sci. fish.*, 42(8), 893-906.
- 8) 渡辺武・大和史人・北島力・藤田矢郎・米康夫 ; 1979 : シオミズツボウムシ *Braehinus plicatilis* の栄養価と $\omega$ 3高度不飽和酸, 日水誌, 45(7), 883-889.