

魚介類種苗生産用酵母(油脂酵母)の開発

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者名	今田,克 影山,百合明 渡辺,武 北島,力 藤田,矢郎 米,康夫
発行元	日本水産學會
巻/号	45巻8号
掲載ページ	p. 955-959
発行年月	1979年8月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



魚介類種苗生産用酵母 (油脂酵母) の開発^{*1}今田 克・影山百合明・渡辺 武
北島 力・藤田 矢郎・米 康夫

(1979年3月6日受理)

Development of a New Yeast as a Culture Medium for Living Feeds Used in the Production of Fish Seed

Osamu IMADA^{*2}, Yuriaki KAGEYAMA^{*2}, Takeshi WATANABE^{*3},
Chikara KITAJIMA^{*4}, Shiro FUJITA^{*4}, and Yasuo YONE^{*5}

A new kind of yeast was developed as a culture medium for rotifer *Brachionus plicatilis* in order to improve the dietary value of rotifers cultured with baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* for fish larvae.

This new type of yeast (designated as ω -Yeast) was produced by adding fish oil or cuttlefish liver oil as a supplement to the culture medium of baker's yeast, resulting in a high content of lipid and ω 3 highly unsaturated fatty acids (ω 3 HUFA), the essential fatty acids for marine fish.

The rotifers cultured with ω -Yeast were high in the lipid content, in general, together with ω 3 HUFA, as a result of the oils added to the baker's yeast. The incorporation of ω 3 HUFA from ω -Yeast was observed to reach a maximum at around 12 h-feeding. Furthermore, the dietary value of the rotifers to fish larvae was found to be significantly improved, comparable to that of the rotifers cultured with marine chlorella *Chlorella minutissima*. These results clearly indicate that the newly developed yeast has superior food value for rotifers, one of the most important living feeds used in the production of fish seed.

先に^{1,2)}、魚類の種苗生産用初期餌料として多用されているシオミズツボワムシ(以下、ワムシと略記)の栄養価を、魚介類に対する必須脂肪酸(EFA)の観点から検討し、パン酵母で培養したワムシ(酵母ワムシ)と海産クロレラで培養したワムシ(クロレラワムシ)の栄養価の相違は、主にマダイなどのEFAである ω 3高度不飽和酸(ω 3 HUFA)含量の相違にあることを報告した。さらに、酵母ワムシを海産クロレラで二次培養し、海産クロレラに多量に含れるエイコサペンタエンサン(20:5 ω 3)を取り込ませることによつて、酵母ワムシの餌料効果を著しく改善できるが、 ω 3 HUFAを含まない淡水産クロレラで二次培養しても効果がないことを明らかにした³⁾。海産クロレラには ω 3 HUFAのみでなく、クロロフィルをはじめとする色素群、多量のビタミン群および

C.G.F.と略称される成長促進因子等が存在するので、これらの効果を見逃すことができないが、ワムシの栄養価を左右している最大の要因は、今までの結果から ω 3 HUFAであることはほぼ明らかである。ワムシの ω 3 HUFA含量は培養餌料の脂肪酸の影響を受けて容易に変化するもので⁴⁾、適当な餌料を用いてワムシの ω 3 HUFA含量を高めてやれば、ワムシの栄養価は改善されるものと推察される。また、種苗生産の実際面では海産クロレラを二次培養に用いる限り、ワムシの生産は天候、気温、水温等の自然条件にあくまで支配され、安定生産を得ることは困難である。

そこで今回、海産クロレラを用いないワムシ生産システムを案出すること、ならびにワムシの栄養価と ω 3 HUFAとの関連をより明確にすることを目的として、

*1 種苗生産における栄養学的研究—VIII. 昭和52年度水産学会秋季大会にて発表。

*2 協和醸造工業(株)(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. Ohtemachi, Chiyoda-ku, Tokyo 100).

*3 東京水産大学(Laboratory of Fish Nutrition, Tokyo University of Fisheries, Konan 4, Minato-ku, Tokyo 108).

*4 長崎県水産試験場増養殖研究所(Aquaculture Research Laboratory, Nagasaki Prefectural Institute of Fisheries, Nomozaki, Nagasaki 851-05, Japan).

*5 九州大学農学部附属水産実験所(Fish. Res. Lab. of Kyushu Univ., Tsuyazaki, Munakata, Fukuoka 811-33, Japan).

従来のパン酵母を改質することを試み、ほぼその目的を達したのでその結果について報告する。

実験方法

この報告で油脂酵母 (ω -Yeast) と呼称しているものは、パン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の培養途次、 $\omega 3$ HUFA を多量に含有する魚介油を培地に添加し、 $\omega 3$ HUFA を菌体に取り込ませたものを指す。この菌体は光学顕微鏡下で観察すると、細胞膜が厚く、ここに脂質が吸着あるいは摂取されていることが認められる。またこの菌体をワムシ等に投与するため海水中に懸濁すると、均一に分散し、含油量によつて相違するが、吸着された油脂の一部を僅かに分離するのみで菌体に吸着あるいは摂取したまま浮遊させることができる。

油脂酵母の製造 内容積 5 l のジャファーメンター (丸菱理化学機械製・本体: 硬質ガラス, 部品: ステンレス製) に 4 枚羽根二段攪拌機および底部リング式エアスパージャーを取り付け、予めオートクレーブにて容量 2.2 l の培地とともに、120°C, 15 分間蒸気加熱殺菌を施した。常法によつて恒温水槽内で冷却後、無菌空気をエアスパージャーにより送気し、攪拌機にて 600 rpm で攪拌し、これに別に予めフラスコ中で振盪培養にて生育させたパン酵母種母 (菌株, *Saccharomyces cerevisiae* DIA-38) 300 ml を植菌し培養を行った。培地、培養条件等の詳細を Table 1 に、培養経過を Fig. 1 に示す。培養はパン酵母培養の常法に基き糖液をフィードしつつ行い、植菌後約 24 時間、菌体の増殖が対数期を過ぎ定常期に入ったと思われる時点で予め殺菌しておいた魚介肝油 (イカ肝油またはタラ肝油) を添加し、さらに約 24 時間培養を継続した。この間培養液の性状は起泡性が減少しやや乳濁化したが、特に pH、攪拌トルク等に大きな変化は認められなかつたので、通気、攪拌、温度等の条件は一定のまま培養を持続した。培養終了後、菌体を遠心分離機 (3,000 rpm) にて集菌し、分析に用いたが、一部はワムシの飼育試験に供した。魚介油の添加時期、添加方法については種々検討した結果、24 時間以上の熟成を行えば遠心分離集菌後でも、同じ性能の菌体が得られることがわかつた。また集菌後の保存に関して、従来のパン酵母と同様に 4°C に保存する場合と -20°C に凍結保存する場合を比較検討したが、4°C では 2 週間後にカビの発生と油脂のかんりの酸敗が認められたが、-20°C ではカビの発生は皆無であり、油脂の酸化も比較的軽度であることがわかつた。

試料の分析法 油脂酵母およびワムシの試料は乾燥による成分の変質を防ぐため、生のまま可及的すみやかに分析に供し、別に生のものの水分を側定して実験相互間の対比を行うことにした。一般分析、ミネラルおよび脂

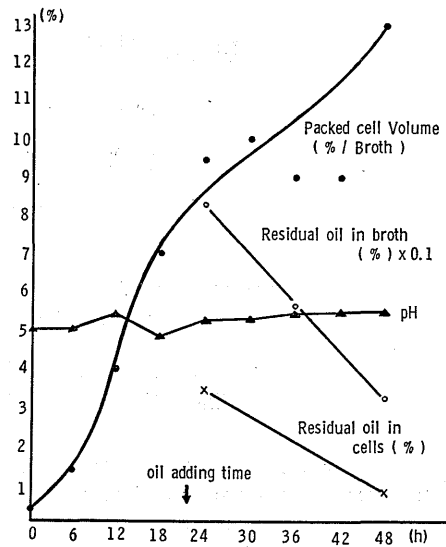


Fig. 1. Time course of ω -Yeast culture.

Table 1. Culture conditions of ω -Yeast (Baker's yeast supplemented with cuttlefish liver oil)

Strain	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> DIA-38	
Seed system	1) Stock slant	Malt ex. peptone glucose agar slant 4°C stored.
	2) Active slant	Malt ex. peptone glucose agar slant 28°C 24 h.
	3) Rotary shaker seed	Molasses (5% as sugar) (NH ₄) ₂ SO ₄ etc. 28°C 24 h 300 ml/2l flask.
Main culture	1) Culture medium	Cane molasses 9.4% (as sugar)
		(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.4
		(NH ₄)H ₂ PO ₄ 0.064
		Urea 0.4
		Cuttlefish liver oil 1.5
	2) Culture conditions	Vessel 5 l-Jar fermenter
		Temperature 30°C
		Agitation 600 rpm
		Aeration 3 l/min
		pH control 5.0 adjusted by NH ₄ OH
3) Liquid volume & Sug. contents	Liq. Vol. (l)	Sug. Cont. (g)
	Initial 2.2	0
	Seed 0.3	15
	Feed 1.07	321
	Total 3.57	336

Table 2. Proximate and mineral compositions of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*, ω -Yeast, marine chlorella *Chlorella vulgaris* and rotifers *Brachionus plicatilis*

	Yeast & chlorella			Rotifers cultured with ω -Yeast, baker's yeast, marine chlorella		
	Living ω -Yeast	Baker's yeast	Marine chlorella	Living ω -Yeast	Baker's yeast	Marine chlorella
Moisture (%)	62.1	68.2	75.8	86.8	89.6	87.9
Crude protein (%)	14.6	16.2	12.2	7.2	7.2	7.4
Crude lipid (%)	12.7	2.3	5.4	4.6	2.3	3.8
Crude ash (%)	2.2	1.9	2.3	0.5	0.4	0.5
Ca mg/g (dry basis)	0.14	0.10	1.20	0.18	0.12	0.21
Mg mg/g (")	0.60	0.68	3.43	0.16	0.14	0.14
P mg/g (")	6.66	5.01	25.41	1.58	1.48	1.37
Na mg/g (")	0.04	0.32	0.76	0.57	0.41	0.29
K mg/g (")	4.93	4.65	10.96	0.27	0.35	0.23
Fe μ g/g (")	65.8	22.9	173.3	16.6	15.9	43.3
Zn μ g/g (")	7.9	6.8	11.3	5.4	7.4	8.2
Mn μ g/g (")	1.4	2.5	105.5	0.5	0.4	1.1
Cu μ g/g (")	1.4	3.6	9.1	1.6	1.1	1.7

脂肪酸の分析は既報の方法に準じた^{1,4)}。

ワムシの飼育試験方法 ワムシの培養試験には1t パンライト製円筒水槽を用い、ワムシ 10^6 個体に対して1~1.5g(温重量)の油脂酵母あるいはパン酵母を1日2回に分けて与えた。培養条件その他の詳細は既報の通りである⁵⁾。また、パン酵母で飼育したワムシを海産クロレラで強化したと同様¹⁾油脂酵母で二次培養することも試みた。この場合、酵母ワムシをプランクトンネットで汙別採集し、予め油脂酵母を海水1t当たり500gを投入し分散させた水槽に500個体/mlになるように可及的速やかに収容し、通気攪拌をしながら二次培養を行った。この二次培養ワムシは定期的にサンプリングし、体脂肪酸組成の変化を追跡した。また逆に、油脂酵母を与えて育てたワムシを新たにパン酵母で飼育し、同様の分析を行った。

結果および考察

一般のパン酵母、パン酵母にイカ肝油を資化させた油脂酵母およびそれらで培養したワムシの一般分析の結果をTable 2に、脂肪酸組成の一部をTable 3に示した。なお、参考のため海産クロレラで培養したワムシの分析結果を併記した(海産クロレラの一般分析値は山口県内海水産試験場の*Chlorella vulgaris*の値であり他は長崎県水産試験場増養殖研究所の*Chlorella minutissima*の値である)。またワムシの二次培養による脂肪酸組成の経時的変化をTable 4および5にそれぞれ示した。Table 4は酵母ワムシを油脂酵母で二次培養した結果であり、Table 5はその逆の例を示す。またこの関係をFig. 2, Fig. 3にまとめた。

Table 2より明らかなように、油脂酵母はパン酵母に比して脂質含量が顕著に高く、その他の成分では鉄の含量が若干高い。高脂質の影響はそれを摂取したワムシにおいても認められ、ワムシが餌料によつてその成分を異にすることを示している⁴⁾。特にワムシの脂質含量が2倍にも達しているのは興味深い⁴⁾が、併記したクロレラワムシの場合にも同様の傾向が認められる。

一方、無機塩については、先に報告⁴⁾したように餌料の影響は明瞭でなく、クロレラで特に高含量の鉄、マンガ、銅はクロレラワムシで多少高いが、燐、カリウム、マグネシウムではその傾向が認められない。

次にTable 3の脂肪酸組成をみると、油脂酵母ではパン酵母が所有しなかつた $\omega 3$ HUFAを多量に含有し、これを用いて培養したワムシにも顕著に $\omega 3$ HUFAが取込まれていることがわかる。すなわち、油脂酵母では $\Sigma\omega 3$ として示した $\omega 3$ HUFAの含有量は酵母の段階でパン酵母の約150~300倍に達し、ワムシの段階でも22倍強に達している。また、参考を示した海産クロレラの脂肪酸組成およびこれを摂取したワムシの脂肪酸組成を対比すると、 $\omega 3$ HUFA含量はパン酵母に比してそれぞれ110倍および24倍に達しており、油脂酵母の場合と大略同じ含量レベルにあるといえよう。このワムシの $\omega 3$ HUFA含量が次報に述べるようにマダイ、クロダイ等の稚仔魚の成長に大きく作用したものと考えられる。油脂酵母で飼育したワムシ(油脂酵母ワムシ)と海産クロレラで飼育したワムシの $\omega 3$ HUFAの内容を比較すると、前者がドコサヘキサエン酸(22:6 $\omega 3$)をかなり多量に含むのに対し、後者は20:5 $\omega 3$ に集中しており、ワムシが餌料の脂肪酸をそのまま反映していることがわか

Table 3. Certain fatty acids of total lipids from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*, ω -Yeast, marine chlorella *Chlorella vulgaris* and rotifers *Brachionus plicatilis* cultured with yeasts and chlorella *Chlorella minutissima*

(area %)

Fatty acid	Yeast (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)			Marine chlorella*1	Rotifers cultured with			
	Baker's yeast	Living- Yeast	Frozen- Yeast		Baker's yeast	Living- Yeast	Frozen- Yeast	Chlorella
14:0	0.3	4.1	3.4	4.8	2.5	2.0	2.0	4.2
16:0	8.3	13.4	15.0	20.2	7.1	11.1	11.0	16.8
16:1 ω 7	38.2	6.6	6.1	29.5	26.5	10.8	10.6	24.3
18:0	4.1	2.4	2.3	t	4.3	2.3	2.7	1.7
18:1 ω 9	43.9	16.4	15.5	8.6	29.1	23.0	22.9	10.1
18:2 ω 6	2.8	1.1	1.1	4.1	6.9	2.1	2.1	3.2
18:3 ω 3	0.5	0.8	0.8		0.2	0.8	0.8	0.4
20:1	0.2	9.1	9.2	—	4.2	10.2	10.1	2.4
20:3 ω 3}		3.0	3.0	2.4	0.9	3.3	2.7	4.4
20:4 ω 6}								
20:4 ω 3		1.1	1.0		0.4	0.7	1.5	0.2
20:5 ω 3		17.7	17.4	26.6	1.4	11.9	11.4	24.1
22:1		2.1	2.1		0.9	1.6	1.5	1.3
22:5 ω 3		1.0	0.9		t	1.9	2.2	3.8
22:6 ω 3		12.8	13.5		—	9.0	7.2	0.5
24:1		1.3	1.6		0.9	0.8	0.4	—
$\Sigma\omega$ 3.	1.3	34.7	34.5	29.0	3.1	25.7	24.8	33.4
Crude lipid %	1.1	12.7	12.3	5.4	1.7	4.6	3.3	3.8

*1 Sample got from Yamaguchi Naikai Suisan Shikenjo.

Table 4. Effect of ω -Yeast on the fatty acid distribution of total lipids in rotifers *Brachionus plicatilis* cultured with baker's yeast

(area %)

Fatty acid	Initial*1	Cultured period with ω -Yeast					
		3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	7 days
14:0	1.7	2.0	1.9	2.0	1.9	2.4	2.6
16:0	6.1	7.9	7.9	9.6	8.2	10.3	10.5
16:1 ω 7*2	22.6	22.4	19.9	15.0	17.8	15.1	13.6
18:0	3.9	4.0	3.1	3.1	3.0	3.0	2.5
18:1 ω 9*2	31.8	32.4	29.8	27.2	27.7	24.9	21.1
18:2 ω 6	8.7	6.6	3.2	2.2	2.6	3.0	3.6
18:3 ω 3	0.4	0.5	0.7	0.9	0.7	0.6	0.5
20:1	4.8	4.7	5.3	6.2	6.0	6.3	6.4
20:4 ω 6}	0.6	0.7	1.3	1.7	1.5	1.7	2.0
20:3 ω 3}							
20:4 ω 3	0.8	0.5	1.0	1.0	1.0	1.0	1.4
20:5 ω 3	0.8	3.5	7.1	9.5	8.1	9.3	9.7
22:1	1.7	2.0	0.9	1.2	0.7	1.0	1.2
22:5 ω 3		0.4	0.6	0.9	1.6	1.0	1.7
22:6 ω 3	0.7	2.9	5.0	7.3	6.0	5.9	5.5
$\Sigma\omega$ 3	3.6	8.9	15.6	20.5	18.9	19.8	20.5
Crude lipid %	3.0	3.4	5.4	5.5	4.5	4.5	5.4

*1 Rotifers cultured with baker's yeast (at initial stage)

*2 Small amounts of the other monoenes were included.

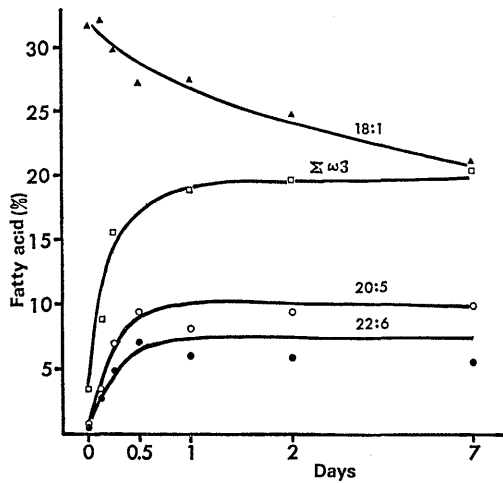


Fig. 2. Changes of fatty acid distribution of total lipid from rotifer *Brachionus plicatilis* cultured with baker's yeast due to the secondary feeding with ω -Yeast.

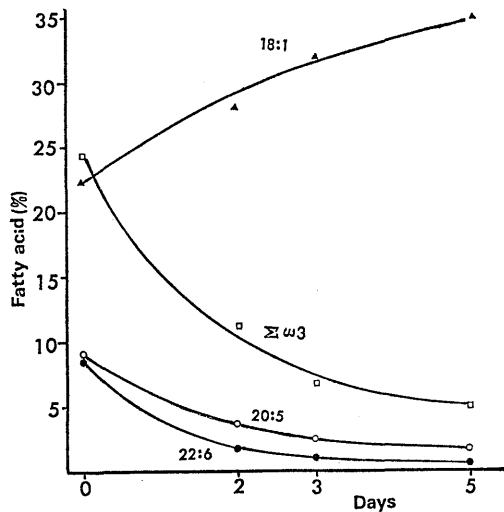


Fig. 3. Changes of fatty acid distribution of total lipid from rotifer *Brachionus plicatilis* cultured with ω -Yeast due to the secondary feeding with baker's yeast.

る。パン酵母ワムシを油脂酵母で再培養すると Table 4, Fig. 2 に示したように、ワムシは約 12 時間で油脂酵母ワムシにかなり近い ω 3 HUFA 含量を示し、24 時間ではほとんど差を認めない。したがって油脂酵母は、クロレラの代りに二次培養試料としても利用できることがわかった。また得られたワムシの形状、大きさ、抱卵数等に従来のワムシと比べて大差ないことがわかった。同種のことはまた逆に油脂酵母ワムシをパン酵母で再培養しても認められ、Table 5 に示すようにやや長時間を要するが 2~3 日で油脂酵母ワムシの ω 3 HUFA は減少しパン酵母ワムシのそれに近似した。

Table 5. Effect of baker's yeast on the fatty acid distribution of total lipids from rotifers *Brachionus plicatilis* cultured with ω -Yeast (area %)

Fatty acid	Initial*1	Culture period in days		
		1	3	5
14:0	1.7	2.2	1.7	1.9
16:0	10.6	7.3	6.6	6.2
16:1 ω 7	9.8	20.1	23.4	22.0
18:0	2.0	5.0	4.9	4.9
18:1 ω 9	23.7	27.9	31.9	34.9
18:2 ω 6	4.0	6.6	7.1	8.1
18:3 ω 3	0.7	0.4	0.3	0.3
20:1	8.3	5.9	5.2	4.6
20:4 ω 6	2.9	1.6	1.2	1.0
20:3 ω 3				
20:4 ω 3	1.9	1.4	1.0	0.6
20:5 ω 3	9.0	3.6	2.4	1.7
22:1	4.7	2.5	1.9	1.8
22:5 ω 3	2.2	1.5	1.0	0.5
22:6 ω 3	8.5	1.7	0.9	0.4
24:1	1.7	0.8	0.7	0.5
Crudelipid %	7.1	3.6	2.6	2.8
$\Sigma\omega$ 3	24.2	11.2	6.7	5.1

*1 Rotifers cultured with ω -Yeast (at the initial stage).

以上、ワムシの栄養価を脂質の面で改善する目的で作成した魚介油強化酵母(油脂酵母)は、ワムシに対して優れた餌料価値を有し、さらに油脂酵母で培養されたワムシは次報で述べるように、酵母ワムシの栄養欠陥を補い、クロレラワムシに匹敵する餌料効果を有することがわかった。このように、油脂酵母は海産クロレラの代用として、また生物餌料の培養餌料として有効であることが明らかになった。

終りにこの開発に終始御鞭達をたまわり、又発表の機会を許可いただいた協和醸酵工業(株)宇部工場長吉本信夫氏に深謝いたします。また分析に協力いただいた東京水産大学 竹内俊郎氏、ワムシ培養実験に協力いただいた長崎県水産試験場増養殖研究所の諸氏、油脂酵母の製造、海産クロレラの採集、各種分析に協力いただいた協和醸酵工業(株)防府工場技術研究所、宇部工場水産開発室、技術課の諸氏に感謝いたします。

文 献

- 1) 渡辺 武・北島 力・荒川敏久・福所邦彦・藤田矢郎: 日水誌, **44**, 1109-1114 (1978).
- 2) 渡辺 武・大和史人・北島 力・藤田矢郎・米康夫: 日水誌, **45**, 883-889 (1979)
- 3) 北島 力・藤田矢郎・大和史人・米 康夫・渡辺 武: 日水誌, **45**, 469-471 (1979).
- 4) 渡辺 武・荒川敏久・北島 力・福所邦彦・藤田矢郎: 日水誌, **44**, 979-984 (1978).
- 5) 北島 力・耕田隆彦: 長崎水試研報, **2**, 113-116 (1976).