

水産用希少餌料キートセラス・カルシトランスの高濃度大量培養

High-density Mass Culturing of *Chaetoseros calcitrans* as a Valuable Feed for Aquaculture

山内 一郎 Ichirou Yamauchi

●研究開発センター フロンティアプロジェクト室

Abstract

At the same time that Yamaha Motor Co., Ltd. (YMC) has been conducting engineering research aimed at developing more fuel-efficient environment-friendly engines and vehicles that contribute to the prevention of global warming by reducing CO₂ emissions, we have also been engaging in bio-engineering type research and development efforts that utilize the photosynthetic function of microalgae to make effective use of CO₂ as a natural resource.

Also, as a way to use CO₂ absorption and fixation technology, we have conducted research into effective use of cultured microalgae. We focused our efforts on developing the means for mass propagation of the diatom *Chaetoseros calcitrans*, which is a necessary but rare feed in the aquaculture of shellfish and crustaceans during their larval stage. Until now, it was considered extremely difficult to mass-produce this diatom in high concentration, but we have succeeded in developing a highly efficient method for raising it at six times the concentration (60 million cells/ml) of conventional methods.

YMC has gone on to conduct tests to evaluate the functionality of the *Chaetoseros calcitrans* raised by this method as a feed for commercial aquaculture. The results of the tests showed that it indeed has potential commercial value as a feed for aquaculture.

要旨

ヤマハ発動機株式会社（以下、当社と言う）は地球温暖化をはじめとする環境問題への対応として、二酸化炭素低減に向けたエンジンや車体の工学的研究に加え、微細藻類の光合成能力を活用し二酸化炭素を資源として有効利用する生物工学的研究開発を進めてきた。

また二酸化炭素吸収・固定化技術の応用として増殖した微細藻類を有効利用する開発も進めてきた。貝類・甲殻類の水産養殖における幼生期に必須な希少餌料であり、これまで高濃度で大量培養が非常に難しいとされていた珪藻「キートセラス・カルシトランス」をターゲットとして応用開発を進めた。従来培養技術の約6倍の高濃度（6,000万細胞/ml）まで効率的に培養することに成功した。

当社にて培養したキートセラス・カルシトランスの水産養殖用餌料としての機能評価試験を行った。その結果、ビジネス上、有望な水産養殖用餌料であることが確認できた。

1 はじめに

当社は二輪車メーカーとしてエンジンや車体などの工学的観点から地球の温暖化原因ガスの二酸化炭素の排出量低減に取り組んできた。一方、新たな取り組みとして生物工学的（バイオテクノロジー）な

研究開発も進めてきた。微細藻類の光合成（図1）を利用した二酸化炭素固定により地球の温暖化防止に役立つ技術開発を進めてきた。

温帯森林が持つCO₂固定能力は5g-CO₂/m²/日（二酸化炭素固定速度）といわれており、その20倍を目標に研究開発を進めてきた。現在の段階では10倍程度で、生物処理としては最高レベルに達している。技術要素としては

- (1) 高性能な微細藻類の探索と育種
- (2) 培養水の構成成分の最適化
- (3) 高効率で高濃度培養を可能とする光合成装置や制御技術の開発

などで、当社の保有技術を活かした研究開発を進めた結果である。

二酸化炭素固定の結果、微細藻類が生産される。この大量に生産される微細藻類を有効に利用できるかどうか重要なキーファクターであり、当社はその有効利用する方法を模索していた。他方、日清オイリオ株式会社（旧：日清製油株式会社）は（財）マリノフォーラム 21 からの委託研究として新しい水産用珪藻餌料キートセラス・カルシトランスの開発を行っていて大量培養方法を検討されていた。そこで両社の技術を持ち寄り、共同開発を行った。

ここではこのキートセラス・カルシトランスの高濃度大量培養や水産養殖用餌料としての機能試験の結果を中心に述べることにする。

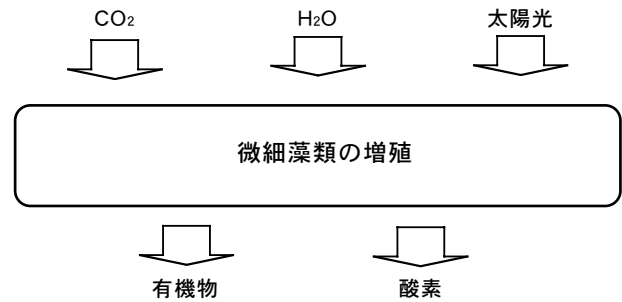


図1 光合成

2 貝類、甲殻類の種苗生産の背景

貝類、甲殻類などの種苗生産において珪藻類は初期餌料として利用価値が非常に高いことが知られている。

しかしながら、現在までのところ、珪藻類を用いた商品やそれに代わる商品は少なく、実際には生産現場でこれらの珪藻類を培養して使用していることが多い。また、珪藻類は一般に安定的な培養が難しく、必要な時期に必要な量を確保することに問題があることから、手軽に入手できる安定供給の可能な貝類・甲殻類向け餌料の開発が望まれてきた。

3 貝類、甲殻類の種苗生産の現状調査

高密度培養の可能な高機能植物餌料の開発を目的として、まずはじめに、カキ、アワビ、アコヤガイ、イセエビ等の生産の現状および初期餌料についての調査を行った。

調査の結果、各生産現場では実に様々な餌料用藻類が使用されており、それらの多くは生産現場で培養され、少なからず培養安定性に不安のあることがわかった。また、いくつかの生産現場では市販の配合餌料も使われているが、飼育水の汚れがひどかったり、単独給餌での飼育が不可能であるなどの問題を抱えていることがわかった。

生産現場で使用されている藻類はそれぞれ種類によって特徴があり(表1)、二枚貝・甲殻類の種苗生産や二枚貝の親貝の維持確保には浮遊性珪藻が多く使用されている。その中でもキートセラス・カルシトランスは他の浮遊性珪藻や同属のキートセラス・グラシリスよりも栄養価やサイズなどの面で餌料としての価値が高く評価されており、なおかつ安定培養の難しいことがわかった。

表1 水産餌料用藻類一覧

藻種	<i>Chaetoceros calcitrans</i>	<i>Chaetoceros gracilis</i>	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	<i>Pavlova lutheri</i>
分類	珪藻類、中心目	珪藻類、中心目	珪藻類、羽状目	ハプト藻類
特徴	小型の <i>Chaetoceros</i> 属。二枚貝類の浮遊期幼生の餌料として利用される。ただし、安定培養が難しいため、種苗生産現場ではそれほど普及していない。	<i>calcitrans</i> に比べやや大型の <i>Chaetoceros</i> 属。屋外での大量培養が可能であるため、二枚貝類の他、甲殻類やナマコ幼生の好適餌料である。 <i>Chaetoceros</i> 属では最も培養されており、利用用途も広い。	15℃より低水温でも増殖するため、北部の地方で多く培養されている。ワムシやアルテミアの栄養強化餌料として用いられている。	培養も比較的容易で、餌料価値の高い餌料として知られ、二枚貝の種苗生産には最も頻繁に利用される。
水産における利用例	カキ、アコヤ貝、ホッキガイ、ムラサキウニ、クルマエビなど	アコヤ貝、ハマグリ、アカガイ、クルマエビ、タイワンガザミなど	ワムシ、アルテミア	アコヤ貝、アカガイ、ナマコ、ヒオウギガイなど
餌料価値	餌料価値は高く、カキの初期餌料のうち主力餌料である。アコヤ貝などに関しても要望が強い。	餌料価値は高く、今回の調査地ではアコヤ貝の初期餌料として使われていた。	DHA や EPA を含むため、栄養価はある。イセエビの種苗生産では、アルテミアを <i>Phaeodactylum</i> で栄養強化し、幼生のフィロゾーマに与えている。	餌料価値は高い部類に属し、アコヤ貝の孵化直後の餌料として使われている。
問題点	安定培養が難しい。屋外での大量培養は困難である。アコヤ貝の初期餌料として要望が強いが、安定培養維持に多大な労力を要するため、 <i>Pavlova</i> を代替餌料として利用している。	アコヤ貝の初期餌料として利用されているが、サイズがやや大きいため、孵化直後は使えない。魅力的な餌料だが、孵化直後は代替餌料が必要。	25℃以上の高水温に弱く、また悪天候が続くと減少し易いので、屋外培養には向かない。	高水温で培養できないため、屋内培養設備が必要になる。
藻種	<i>Nannochloropsis</i> sp.	<i>Isochrysis</i> sp.	<i>Tetraselmis</i> sp.	
分類	真正眼点藻類	ハプト藻類	プラシノ藻類	
特徴	EPA 含量が多く、屋外でも容易に大量培養できるため、ワムシの餌料として利用されている。本種は海産魚類の種苗生産に不可欠である。	二枚貝類幼生の餌料として利用される。 <i>galbana</i> は EPA、DHA とも多く含み栄養的に優れているが、培養不調に陥ることがある。Tahiti 株と呼ばれるものは欧米でも二枚貝類幼生の餌料として用いられる。	25℃以上の高水温でも増殖するため、屋外での大量培養が可能であり、比較的培養し易い。	
水産における利用例	ワムシ、ミルクイガイなど	アコヤ貝、ナマコ、ヒオウギガイなど	アコヤ貝、ガザミ、ヨシエビ、クルマエビなど	
餌料価値	EPA 含量が多い。ワムシの餌料として大変餌料価値が高い。	<i>galbana</i> は EPA、DHA とも多く含み栄養的に優れている。Tahiti 株は EPA、DHA が <i>galbana</i> よりも低く、栄養面でやや劣る。	アコヤ貝の初期餌料として、 <i>Chaetoceros gracilis</i> や <i>Isochrysis</i> sp. と混ぜて使われる。EPA 含量は <i>Nannochloropsis</i> などに比べれば低く、DHA も含まないため、餌料価値は劣る。	
問題点	培養は容易だが、貝類に対する餌料価値は低い。	アコヤ貝の初期餌料として、 <i>Chaetoceros gracilis</i> や <i>Tetraselmis</i> sp. と混ぜて使われているが、3者の中で餌料価値は最も低いようである。	培養は容易だが、貝類に対する餌料価値はあまり高くない。	

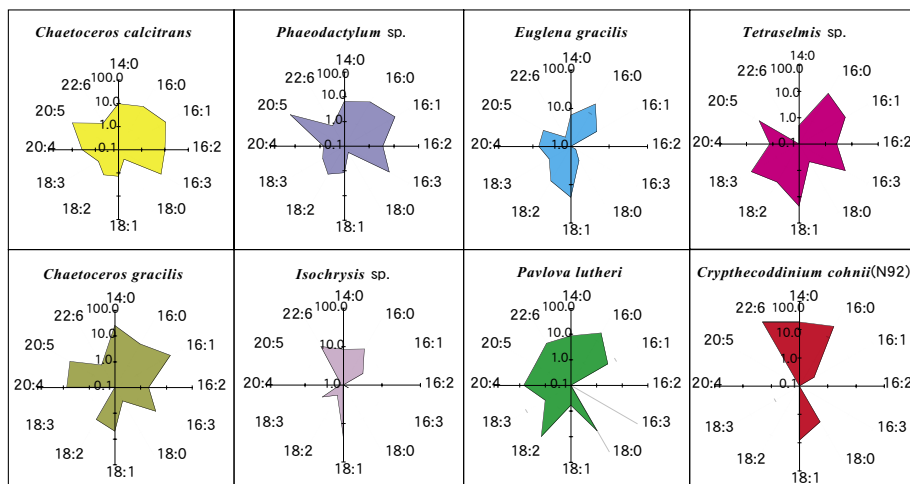
4 餌料用藻類のスクリーニング

安定的に低コストで供給することを目的とするキートセラス・カルシトランスの高密度・大量培養技術の確立においては、最初にキートセラス・カルシトランスが要望される理由を指標として明確にし、培養技術が確立された時点でもこの指標がクリアされていることが求められた。

指標には細胞の大きさや栄養価などを用いたが、各種の脂肪酸をバランスよく含有している藻類の方が餌料効果があるものと仮定して脂肪酸組成に着目した。分析の結果、餌料用藻類がそれぞれ種類ごとに異なる組成を持つ中で、キートセラス・カルシトランスが比較的バランスよく各種の脂肪酸をもっていることがわかった(表2)。よってキートセラス・カルシトランスの高密度・大量培養の開発に着手することにした。

表2 水産餌料用藻類の脂肪酸組成

脂肪酸	<i>Chaetoceros calcitrans</i>	<i>Chaetoceros calcitrans</i> 2	<i>Chaetoceros gracilis</i>	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	<i>Phaeodactylum</i> sp.	<i>Pavlova lutheri</i>
14:0	9.4	13.5	25.1	6.3	6.4	8.6
16:0	13.8	14.1	8.8	11.3	11.4	22.8
16:1	22.1	20.7	29.7	19.8	22.3	4.6
16:2	10.0	8.5	2.0	5.4	3.6	0.1
16:3	13.1	10.0	6.8	14.1	12.2	0.1
18:0	0.3	0.3	0.4	0.3	0.2	11.5
18:1	1.4	1.4	5.0	1.8	1.2	0.6
18:2	1.8	1.6	2.7	2.2	2.0	20.3
18:3	1.0	0.9		0.3	1.0	1.4
20:4	3.7	7.0	7.3	2.3	0.7	6.8
20:5	18.9	17.4	10.2	32.1	33.3	3.9
22:6	2.0	2.0	1.0	0.8	0.9	7.7
脂肪酸	<i>Isochrysis</i> sp.	<i>Euglena gracilis</i>	<i>Euglena gracilis</i> 2	<i>Cryptocodinium cohnii</i> (N92)	<i>Tetraselmis</i> sp.	<i>Tetraselmis</i> sp. 2
14:0	8.5	6.6	6.7	18.2	0.5	0.2
16:0	12.2	18.7	12.9	27.2	16.6	12.6
16:1	3.9	6.1	6.1	0.4	10.6	7.8
16:2					2.7	10.0
16:3	1.4	1.4	2.0		10.6	6.0
18:0		2.7	2.1	2.9	0.6	0.8
18:1	21.4	21.5	13.1	8.2	23.0	7.9
18:2	2.0	10.9	5.4	-	4.7	28.7
18:3	4.3	4.5	2.8		12.3	20.3
20:4	1.2	6.9	11.5		1.3	
20:5	1.2	6.7	17.8		5.5	0.5
22:6	14.3	1.9	4.9	39.8		



5 培養

5.1 使用藻類

キートセラス・カルシトランスは単細胞浮遊珪藻・海洋性植物プランクトンで、長方形をした珪藻のひとつである。4つの角に長い棘を持ち、通常2分裂で増殖していく。大きさは $4 \times 6 \mu\text{m}$ 程度である(図2)。

このキートセラス・カルシトランスは、高度不飽和脂肪酸をはじめ、ビタミンバランスも良く、捕食にも優れ、貝類(カキ、アコヤガイ、ハマグリなど)、棘皮動物(ナマコやウニなど)、さらに甲殻類(エビ・カニ類など)などの水産養殖の幼生や親の飼育に必要な飼料であるが、安定的な培養が困難であったため、供給に問題があった。

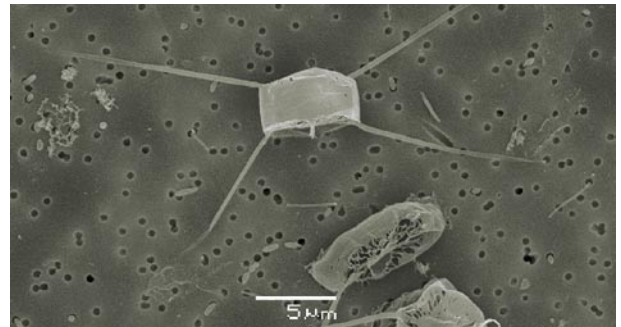


図2 電子顕微鏡写真



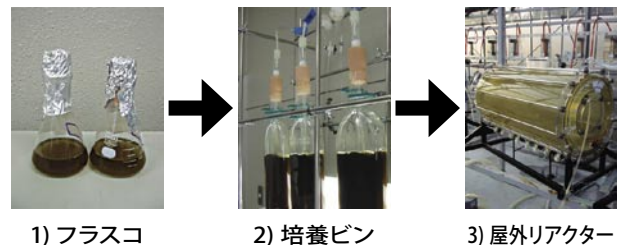
5.2 培養装置

微細藻類の拡大培養においては、細胞濃度をおよそ10倍ごとにスケールアップすることがポイントである。例えば順調に培養できた高い細胞濃度の微細藻類を極端に希釈して低い細胞濃度にしてしまうと、微細藻類は極端な環境変化に対応できず活性が低下してしまう。そのため培養装置は、蛍光灯による室内培養ではフラスコから扁平培養ビンにステップアップした。さらに太陽光を用いる屋外のバイオ・リアクターにスケールアップして培養を行った(図4)。

なおバイオ・リアクターは東京大学大学院工学系研究科環境海洋工学専攻の佐藤徹助教授と当社で特許出願中である。太陽光の受光性能や流動(攪拌)性能を数値計算して高効率の珪藻の培養が達成できた。バイオ・リアクター内の培養液の流れについてCFD(Computational Fluid Dynamics)によるシュミレーションした結果の1例を示す(図5)。



図3 細胞観察作業



1) フラスコ

2) 培養ビン

3) 屋外リアクター



図4 スケールアップカルチャー

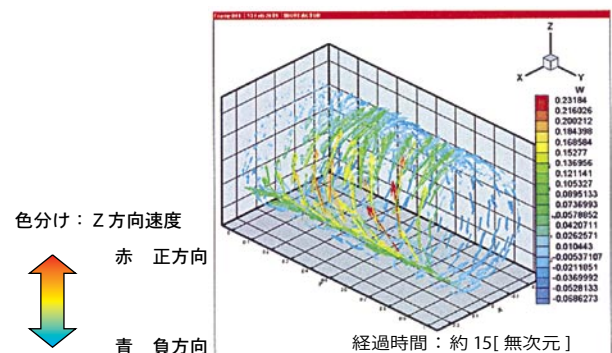


図5 バイオリアクター内の培養液の流れの様子
速度ベクトルのCFDシュミレーション結果

5.3 培養条件

キートセラス・カルシトランスの予備培養工程は室内で蛍光灯を24時間照射して、温度は25℃に保持し、3%のCO₂を含んだ空気を培養液に通気攪拌することにより培養を行った。他方、大量培養工程は屋外で太陽光により培養した。季節による変動があるが、温度は15～35℃に保持して、3%のCO₂を含んだ空気を培養液に通気して培養を行った。

5.4 培養結果

従来の培養技術では1,000万細胞/mlが最大の到達細胞数であった。本研究では、培養時のpHの安定化（図6）、光条件や培地条件などの検討を行った結果（図7）、これまでの6倍（約6,000万細胞/ml）の高密度に培養することに成功し、それを効率的に大量培養することにも成功した。

貝類・甲殻類種苗の実生産現場に対して供給できる規模の培養が可能となった。

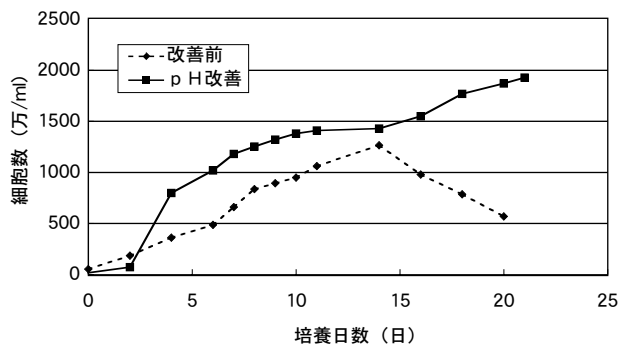


図6 pHの安定化の効果

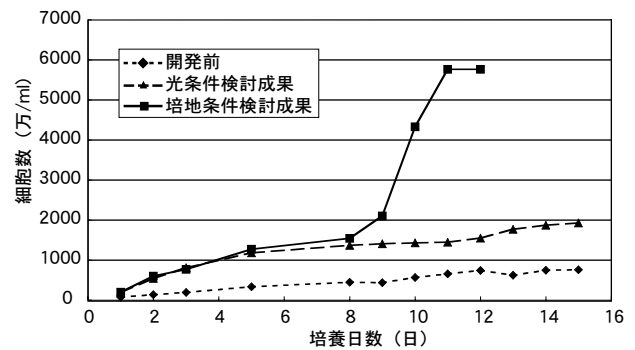


図7 高密度培養検討の成果

6 餌料効果の機能試験

生産されたキートセラス・カルシトランスの餌料効果の確認を目的として、カキ、アサリの生育実験を行った。

カキ種苗生産では、供試した本製品と対照区に生産現場で培養されていたキートセラス・カルシトランスを用いて浮遊期の成長およびホタテガイ殻への付着率の比較実験を行い、実生産においても使用可能との見解を得た（図8、9）。

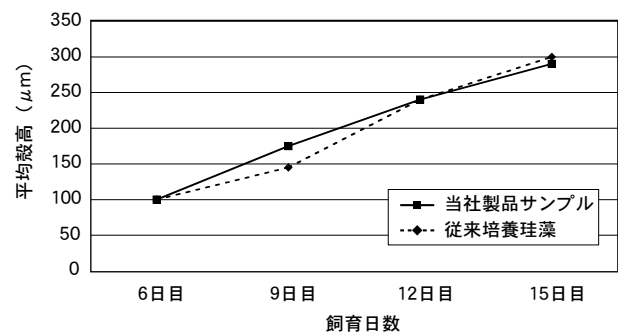


図8 カキ成長実験（浮遊期）

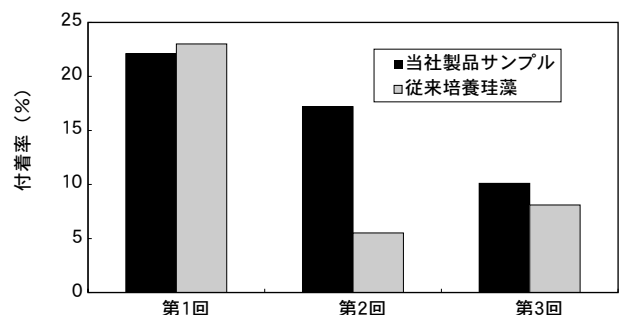


図9 カキのホタテガイ殻付着実験

アサリ種苗生産ではキートセラスと同様に多く使用されているイソクリシスを対照区とした成長比較実験を行い、飼育2週間目まではイソクリシスよりも成長が早く、それ以降もほぼ同等の成長を示す結果を得た（図10）。

いずれの実験においても、高密度・大量培養で生産されたキートセラス・カルシトランスは対照区に比べて餌料として有効であることが確認できた。

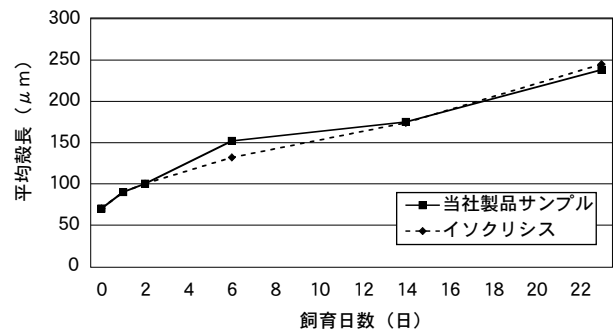


図10 アサリ成長実験（浮遊期）

7 製品化にあたり

このようにして高密度・大量培養が可能となったキートセラス・カルシトランスの製品化にあたり、全国的へ安定供給するために、周年生産・輸送安定性と保存性の確認を行った。

本研究ではこれまでに20ヶ所以上の貝類・甲殻類の生産機関・施設に対して商品形態に調整したサンプルを送付し、10種類以上の貝類・甲殻類の種苗生産での評価を得た。また年間を通して安定して5,000万細胞/ml以上の培養ができた。また5℃の保冷で1ヶ月間生きたままで保存できる



図11 サンカルチャー

こと、また1ヶ月後でも餌料としての性能が遜色ないことを確認した。以上より周年安定供給および保存期間の確認とその餌料としての性能評価を得ることができた。

5,000万細胞/mlの高密度培養が出来た事で、キートセラス・カルシトランスに遠心、あるいは膜濃縮工程によるストレスを与えることなく種苗生産現場へ直接届けることが可能となった。

2002年12月より日清マリンテック株式会社より「サンカルチャー」の商標で量的限定販売を実施している。10リットルキュービテナー（図11）に培養液を封入してクール便にてユーザーに出荷している。

ユーザーとなる種苗センター、水産試験場にとってのメリットをまとめてみると次の様になる。

- (1) 自前で餌となる珪藻を培養する必要がなくなる。
- (2) その結果省スペース、作業負担の軽減が可能となる。
- (3) 年間を通じて利用できる。
- (4) 高濃度であり低容積化したためハンドリングが容易となる。
- (5) 人工海水を利用していることから海水由来の病原菌の持込が無い。

8 今後の課題

8.1 増殖速度の改善

今後さらに培養条件を検討することで現状以上の高密度・短期間安定培養を実現し、品質の向上とユーザーへの低コスト供給の開発に注力したい。

8.2 培養藻類の多様化

貝類・甲殻類の生産現場のニーズとして、多種類の藻類商品を期待する声が多かった。例として、アコヤガイの種苗生産では変態期によって餌料効果の高い藻類の種類が異なっており、イソクリスなどの商品化を望む意見があった。

このような意見を受け、現在は本藻類を商品化したノウハウを基として、藻類の多様化を目指した研究も視野に入れている。

8.3 培養藻類の応用

微細藻類は、発見されているだけでも2万種以上に及び、さまざまな有用成分を生産するものが存在する。水産養殖以外の分野でも広く応用できる可能性を持っている。今後の研究テーマとして検討していきたい。

9 総括

水産養殖用餌料キートセラス・カルシトランスの高濃度培養に成功し、事業化のめどをつけた。水産試験場や養殖業者に量的限定販売中である。

その高濃度大量培養の開発のポイントを2つにまとめてみた。

1つめは、光合成装置「バイオ・リアクター」であり、キートセラス・カルシトランスにとっての適切な光量、攪拌を実現させることができた。

2つめは水環境制御であり、キートセラス・カルシトランスにとっての培養水の構成成分を最適化することが出来た。

以上の2点がシステムの的に機能したときにキートセラス・カルシトランスの高濃度培養が行える。

これはキートセラス・カルシトランスにかぎったことではなく、違った藻類でも光合成装置「バイオ・リアクター」と水環境制御の組合せにより目的の藻類の高濃度培養が行える。

10 おわりに

本研究は、キートセラス・カルシトランスの製品として成果を残すことができた。これまでにご協力いただいた皆様に感謝の意を表すると同時に、今後は本藻類がより多くの甲殻類・貝類生産者の皆様に使用され、この分野の研究開発の可能性について広くご意見をいただきたい。

本論文作成にあたり、ご援助頂いた東京大学の佐藤徹助教授、日清オイリオ株式会社、日清マリンテック株式会社の方々に厚くお礼申し上げます。

■参考文献

- 1) 「珪藻類の高密度・大量培養技術と種苗生産への可能性」, 養殖第 40 巻 2 号, 緑書房

■筆者



山内 一郎