

令和 4 年 5 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2019～2021

課題番号：19KT0012

研究課題名(和文) 強靱な養殖漁業を実現するための食農副産物からの代替魚油の生産

研究課題名(英文) Production of fish oil-alternatives from food waste toward to realizing robust aquaculture

研究代表者

中井 智司 (Nakai, Satoshi)

広島大学・先進理工系科学研究科(工)・教授

研究者番号：80313295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：ラビリンチュラ類はDHAやEPAを生産する。本研究では、有機性廃棄物や有機性排水を用いながらも、ラビリンチュラ類の滅菌操作を必要としない培養と代替魚油として利用を目的とした。有機性廃液や有機性排水、有機性廃棄物を用いたラビリンチュラ類の培養は、pHや塩分を調整により非滅菌下でも実施できた。また、ラビリンチュラ類は魚類によって消化可能であり、ラビリンチュラ類の給餌によるマダイ稚魚体内のDHAやEPAの含有量増加を確認した。これより、ラビリンチュラ類は代替魚油として利用できることが確認された。なお、食品廃棄物を用いたラビリンチュラ類の培養において、病原菌は検出されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海産魚の育成において、ドコサヘキサエン酸(DHA)、エイコサペンタエン酸(EPA)が必須であり、養魚飼料にはこれらを含む魚油が添加されてきた。一方、DHAやEPA含有食品の消費の拡大により魚油の需要は増加の一途にあり、魚油の原料となる魚の漁獲量には限界がある。本研究では、有機性廃棄物や有機性排水などを用い、DHAやEPAを生産するラビリンチュラ類を培養する方法を見出すと共に、得られるバイオマスが代替魚油として魚の餌に加えることが可能であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Certain Labyrinthuleans produce DHA and EPA. The objective of this study was to cultivate the microorganisms using organic wastes and organic wastewaters without sterilization and to use the biomass as an alternative fish oil. The microorganisms could be cultivated using organic wastes and organic wastewaters under unsterile conditions by adjusting pH and salinity. Biomass of the microorganisms were digestible by fish, and we confirmed that feeding the biomass increased the content of DHA and EPA in the sea bream juveniles. This confirms that Labyrinthuleans can be used as an alternative fish oil. No pathogenic bacteria were detected in the culture solution of the microorganisms using the food wastes.

研究分野：環境化学工学

キーワード：ラビリンチュラ類 代替魚油 有機性廃液 有機性排水 海産魚養殖

1. 研究開始当初の背景

海産養殖魚の成長にはドコサヘキサエン酸(DHA)、エイコサペンタエン酸(EPA)などの n-3/n-6 多価不飽和脂肪酸(以下、PUFAs)が不可欠であり、PUFAs を含む魚油が養殖魚飼料に最大で 15% 程度まで添加されてきた。世界の養殖漁業生産量はこの 20 年で 4 倍となる一方で、DHA や EPA 含有食品の消費も拡大しており、原料となる魚油の需要は増加の一途にある。さらに、魚油の原料となる魚の漁獲には限界がある。しかしながら、DHA や EPA といった PUFAs は植物油には含まれず、有用な代替物がない。このため、魚油価格はこの 10 年で 2 倍に達しており、養殖漁業の持続と発展には代替魚油の確保が不可欠である。

そこで本研究では、PUFAs を産生するラビリンチュラ類に着目した。同類は従属栄養性藻類であり、資源循環利用という観点から、これまでに排水や有機性廃棄物を用いた培養が検討された。しかしながら、滅菌や加水分解といった前処理、培養後の藻体バイオマスからの PUFA 抽出後の残渣処理が、社会実装への妨げとなっている。

2. 研究の目的

本研究では、有機性排水や有機性廃棄物など未利用資源を用いながらも滅菌操作を伴わないラビリンチュラ類の培養と、PUFAs を含む藻体バイオマスを代替魚油として利用する方法論を確立することを目的とした。非滅菌下の培養は、pH や塩分の調整により同伴微生物の増殖を抑制して達成する。また、有機性排水としては食品工場由来の排水、有機性廃棄物としては、レモン外皮など養殖魚飼料に加えられる植物性残渣を利用する。これにより、培養後に残った植物性残渣と藻体バイオマスを混合物のまま飼料に添加できる。さらに、適切な植物残渣を用いてフルーツ魚のように養殖魚製品を差別化できれば、地域産業の活性化に資する。

3. 研究の方法

1) PUFAs 産生に好適な有機性排水や有機廃棄物の検討

まず、水温や pH、塩分によるラビリンチュラ類の増殖への影響を評価した。結果、pH3~8、10~40 psu での増殖が可能であった。そこで、発酵食品工場の有機性廃液 (pH4、48 psu)、有機性排水 A (pH5.0、4.5 psu)、B (pH4.2、6.4 psu)を用いた培養において、前者では 10 倍希釈後に pH 調整し、後者の A 及び B を用いた培養では 5 倍希釈して塩分を 30 psu に調整した後にラビリンチュラ類の培養に供した。なお、希釈には砂ろ過海水を用いた。また、当該実験ではオートクレーブ滅菌したものも実験に用いた。さらに、レモン外皮などの有機性廃棄物を用いた培養試験では、粉碎した廃棄物を砂ろ過海水に入れて pH 調整を行った。なお、PUFAs は質量分析計、あるいは水素炎イオン化検出器を装着したガスクロマトグラフ(GC/MS、GC/FID)を用いて分析した。

2) バイオマスの代替魚油としての利用可能性の評価

ラビリンチュラ類バイオマス中の PUFAs の利用を確認するため、人工培地により培養して得られたバイオマスをニジマスの消化管から抽出した酵素を用いて処理し、バイオマスの分解を予備的に確認した。さらに、バイオマスを市販の魚飼育用の餌に、それぞれ乾燥重量相当の 0%、3%、5%、10% にて混合し、それぞれを体長約 10 cm のマダイ稚魚に給餌する試験も行い、魚体全体を凍結乾燥して抽出操作を施し、DHA や EPA など PUFAs の蓄積を GC/MS、GC/FID を用いて評価した。

3) 非滅菌培養時に同伴する微生物の評価

1)において、広島県特産の発酵性食品の製造廃液にて良好な増殖と DHA、EPA の生成が認められた。そこで、地域特有の有機性廃棄物の利用を想定し、粉碎した発酵性食品廃棄物 A 及び調味料の製造廃棄物 B を人工海水に加え、pH7 及び 4 としてラビリンチュラ類を培養した。得られたバイオマスと廃棄物の混合物に対して DNA 抽出を行い、515F-806R のプライマーセットを用いて PCR、16SrRNA 領域を増幅させた。次世代シーケンサーを用いてアンプリコンシーケンサーを行い、微生物叢解析を行った。

4. 研究成果

1) 培養条件と PUFAs 産生に好適な有機性排水や有機廃棄物の検討

図 1 に pH 調整した発酵食品製造廃液の 10 倍希釈液、及び有機性排水 A におけるラビリンチュラ類の増殖の様子を示す。滅菌しないことにより、ラビリンチュラ類の増殖量は見かけ上滅菌系よりも少なくなったが、元々 pH4 であった発酵食品製造廃液を用いた培養では pH7 とすることにより、元々 4.5 psu であった有機性排水 A を用いた培養では 30 psu とすることにより、増殖量の低下を軽減することができた。また、レモン外皮といった植物系廃棄物を用いた培養では pH4 への調整が増殖量の低下軽減に有効であった。この結果、表 1 に示すように、DHA や EPA を含むバイオマスやバイオマス混合物を得ることができた。

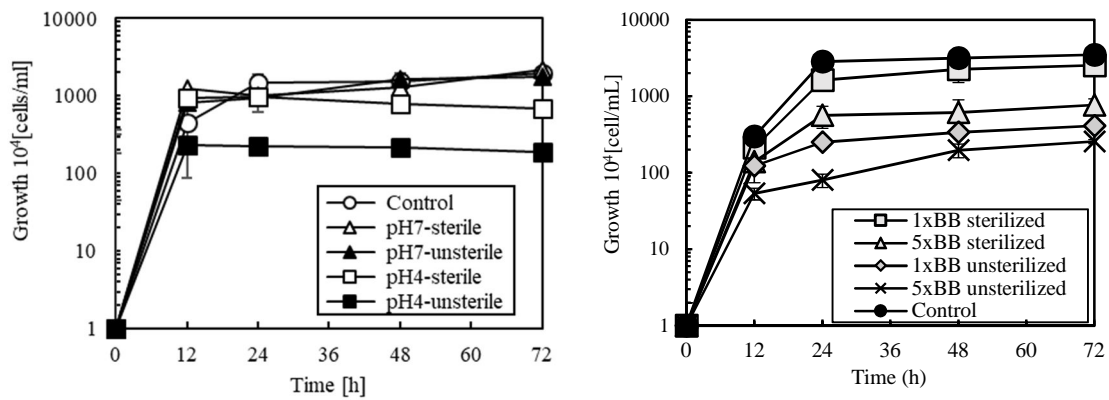


図 1 pH 調整した発酵食品製造廃液の 10 倍希釈液、及び塩分 30 psu とした有機性排水 A におけるラビリンチュラ類の増殖

表 1 発酵食品工場の有機性廃液や有機性排水、植物性有機物を用いた培養産物の DHA、EPA 含有量[mg/g]

	Sterile			Unsterile			
	Liquid waste 10x	Wastewater A 1x	Wastewater B 1x	Wastewater A 1x	Wastewater B 1x	Lemon pH4	Lemon pH7
DHA	45	96	97.8	61	7.83	26	35
EPA	1.1	1.8	1.40	1.2	N.D.	N.D.	N.D.

2) バイオマスの代替魚油としての利用可能性の評価

ニジマスの消化器から抽出した消化酵素の曝露前及び 4 時間後におけるラビリンチュラ類の細胞の様子を図 2 に示す。曝露 4 時間後には細胞の形態が維持できておらず、魚による消化が起こることが認められた。

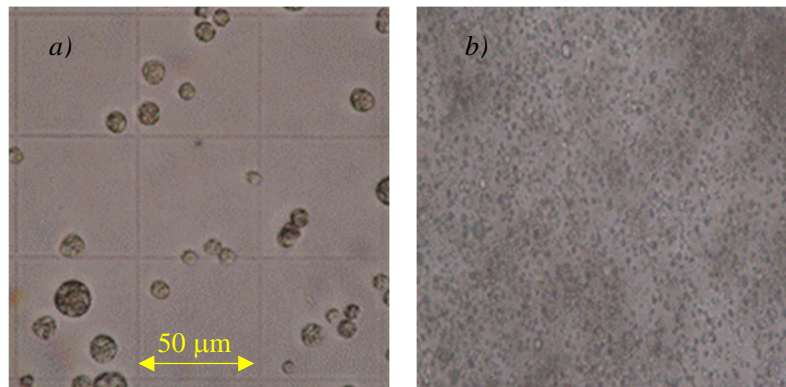


図 2 ニジマス消化管から抽出した消化酵素への曝露前(a)と曝露 4 時間後(b)のラビリンチュラ類

大量培養したラビリンチュラ類を市販の魚飼育用の餌に、それぞれ乾燥重量相当の 0%、3%、5%、10%の比率で混合した。なお、同類バイオマスには、DHA、EPA が市販の餌の 13 倍、8 倍多く含まれた。マダイの体重の増加は、一次反応の動力学を用いて表現でき、同類バイオマスを 3%、5%、10%系列加えることで成長速度定数は対照系の 1.2 倍まで増加した。また、飼育最終日のマダイ稚魚の脂肪酸含有量を分析した結果、図 3 に示すように、同類バイオマス添加量が多いほど、脂肪酸含有量、特に DHA、EPA が増加しており、同類バイオマスの DHA や EPA が利用されたことが明らかとなった。さらに、実験期間中に給餌した DHA、EPA とそれらのマダイ稚魚への取り込み量を評価した結果、対照系と比較して、同類バイオマスを 3%、5%、10%系列加えることで DHA の利用率が高まったことより、ラビリンチュラ類バイオマスの DHA、EPA のアベラビリティは餌よりも高いことが明らかとなった。

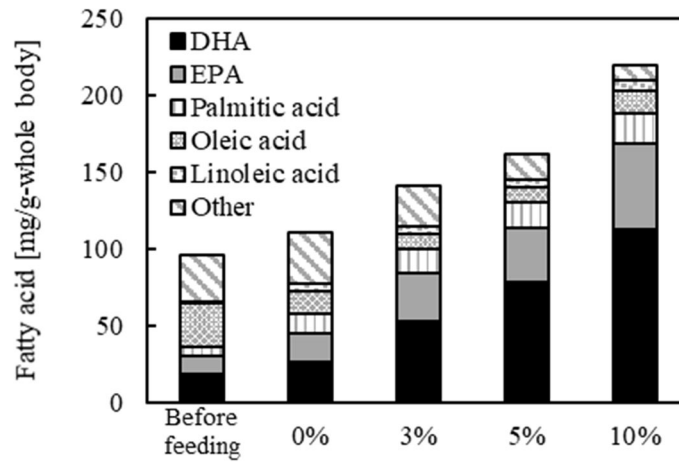


図3 給餌35日後のマダイ稚魚体内の脂肪酸組成

3) 非滅菌培養時に同伴する微生物の評価

存在率5%以上で検出された微生物叢を図4に示す。サルモネラ菌、ビブリオ菌といった病原細菌は検出されなかった。一方、pH4で培養して得られた産物には食品廃棄物由来の *Lactobacillus fructivorans* が含まれていた。*L. fructivorans* にはプロバイオティクス効果が知られており、ギンダラ小魚に給餌した結果、個体の体重増加や免疫系も向上したことも報告されている。従って、未利用資源を用いたラビリンチュラ類の培養では、元々含まれる有用微生物に適した条件も考慮することで、プロバイオティクスのような副次的効果も得られる可能性が見出された。

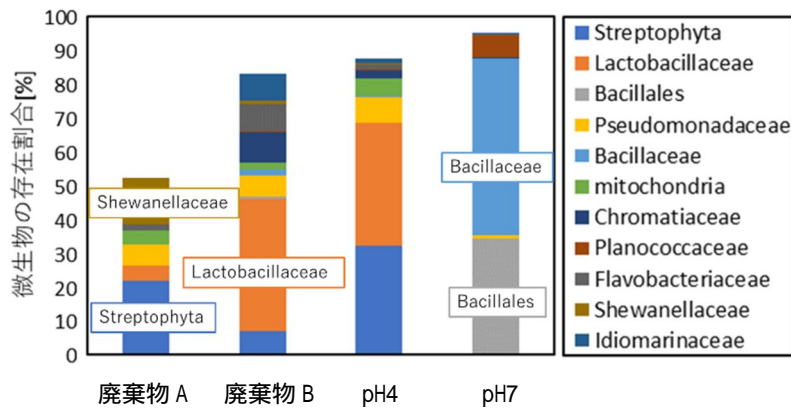


図4 原料と96時間後の培養液にて検出された微生物叢(存在率>5%)

有機性廃液や有機性排水、植物性の廃棄物を用いたラビリンチュラ類の培養は、pHや塩分を調整により非滅菌下でも実施できることが確認された。また、ラビリンチュラ類は魚類によって消化可能であり、ラビリンチュラ類バイオマスを経飼したマダイ稚魚では、体内のDHAやEPAの含有量が増加した。これより、ラビリンチュラ類は代替魚油として利用できることが確認された。なお、食品廃棄物を添加した人工海水を用いたラビリンチュラ類の培養において、病原菌は検出されなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nurlaili Humaidah, Satoshi Nakai, Wataru Nishijima, Takehiko Gotoh, Megumi Furuta	4. 巻 743
2. 論文標題 Application of Aurantiochytrium sp. L3W for food-processing wastewater treatment in combination with polyunsaturated fatty acids production for fish aquaculture	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science of The Total Environment	6. 最初と最後の頁 140735
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scitotenv.2020.140735	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Satoshi Nakai, Asmit Das, Yuya Maeda, Nurlaili Humaidah, Masaki Ohno, Wataru Nishijima, Takehiko Gotoh, Tetsuji Okuda	4. 巻 19
2. 論文標題 A novel strain of Aurantiochytrium sp. strain L3W and its characteristics of growth and lipid production including valuable fatty acids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Water and Environment Technology	6. 最初と最後の頁 24-34
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2965/jwet.20-087	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 志村映里奈、中井智司、末永俊和、西嶋渉、後藤健彦
2. 発表標題 食品廃棄物を用いた Aurantiochytrium sp. L3W 株の非滅菌下での培養における同伴微生物叢の解析
3. 学会等名 第56回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中井智司
2. 発表標題 炭素循環による持続的な食料生産への一歩
3. 学会等名 第34回環境工学連合講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 孫キチン・中井 智司・後藤 健彦・西嶋 涉・海野徹也
2. 発表標題 Aurantiochytrium sp.バイオマスのマダイ稚魚への給餌効果
3. 学会等名 化学工学会広島大会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 孫キチン・中井 智司・後藤 健彦・西嶋 涉・海野徹也
2. 発表標題 漬物製造排液を用いた Aurantiochytrium sp. の培養とバイオマスのマダイ稚魚への給餌
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Satoshi NAKAI
2. 発表標題 Challenges to utilization of waste and wastewater for microalgal lipid production without sterilization
3. 学会等名 International Symposium on Applied Chemistry (ISAC2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nurlaili HUMAIDAH, Satoshi NAKAI, Wataru NISHIJIMA, Takehiko GOTOH, Megumi FURUTA
2. 発表標題 Cultivation of Aurantiochytrium sp. L3W in Food-processing Wastewater and Possible Utilization of Biomass for Fish Feed Additive
3. 学会等名 Water and Environment Technology Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	堀 知行 (Hori Tomoyuki) (20509533)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・エネルギー・環境領域・主任研究員 (82626)	
研究分担者	梅原 亮 (Umehara Akira) (40825791)	広島大学・環境安全センター・助教 (15401)	
研究分担者	海野 徹也 (Umino Tetsuya) (70232890)	広島大学・統合生命科学研究科(生)・教授 (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------