

# 未利用海藻資源の有効利用法開発に関する研究

## 単細胞化技術の開発

坂口 研一

### 目的

養殖ノリの色落ちは毎年発生し、板ノリに加工した状態で3円以上で売れる見込みのない原藻は加工されずに大量に処分されている。一方、色落ちノリは栄養状態の良いノリに比べると、タンパク質含量は低下しているものの、高タンパク、高ビタミン、高ミネラル、また不飽和脂肪酸も豊富である。これら栄養価的にポテンシャルが高い未利用の色落ちしたスサビノリを魚介類の初期餌料等に有効利用するため、酵素処理等を行わない低コストの単細胞化技術を開発する。

### 方法

本年度の実験には、鈴鹿市白子地先のノリ漁場で育苗を行い、冷凍保存しておいたものを室内で培養し、色落ちさせたスサビノリの藻体を用いた。

#### 1. 高塩分処理と成熟処理の併用による単細胞化試験

色落ちさせたノリ藻体0.5g(湿重量)を水温22℃、明期12時間、暗期12時間で、1Lの枝付フラスコ中でエアレーションしながら2週間培養した。培養期間中に毎日5分間、塩分濃度3%(天然海水)、0%(蒸留水)、10%、15%、20%、25%、30%の溶液で浸漬処理を行った。培養海水は毎日換え水するとともに培養後の海水は目合い80μmのナイロンメッシュで藻体と分別後、遠心分離(500×g,5min.)で濃縮し、血球算定盤を用いて遊離細胞数と精細胞数を計数した。

#### 2. 酸処理と成熟処理の併用による単細胞化試験

色落ちさせたノリ藻体0.5g(湿重量)を水温22℃、明期12時間、暗期12時間で、1Lの枝付フラスコ中でエアレーションしながら2週間培養した。培養期間中に毎日5分間、水素イオン濃度pH8(天然海水)、pH6、pH5、pH4、pH3、pH2、pH1の溶液で浸漬処理を行った。培養海水は毎日換え水するとともに培養後の海水は目合い80μmのナイロンメッシュで藻体と分別後、遠心分離(500×g,5min.)で濃縮し、血球算定盤を用いて遊離細胞数と精細胞数を計数した。

#### 3. 遊離細胞と精細胞の浸透圧耐性

遊離細胞と精細胞の混合溶液を血球算定盤に入れ、その後少量の蒸留水を算定盤内に加え、それぞれの細胞の高浸透圧に対する耐性を顕微鏡下で確認した。

#### 4. 遊離細胞と精細胞の保存方法の検討

遊離細胞と精細胞の保存方法を検討するため、2つの方法により比較を行った。一つは目合い80μmのナイロンメッシュにより藻体と遊離細胞・精細胞に分別し、本城式濾過器を用いた重力濾過により100倍の細胞浮遊液に濃縮後、そのまま-30℃で凍結保存し、3日後に30℃のぬるま湯で解凍する方法、もう一つは目合い80μmのナイロンメッシュにより藻体と遊離細胞・精細胞に分別し、本城式濾過器を用いた重力濾過により100倍に濃縮後、遠心分離でさらに濃縮し、細胞をペレット状にしたものを-30℃で凍結保存し、3日後に少量の海水を加えて解凍する方法で保存した細胞の状態を比較した。

### 結果

#### 1. 高塩分処理と成熟処理の併用による単細胞化試験

試験中に得られた遊離細胞と精細胞を図1に示した。試験期間中に得られた遊離細胞の合計数は海水処理区(コントロール)で $2.0 \times 10^7$ 、塩分濃度0%試験区で $2.7 \times 10^7$ 、10%で $1.2 \times 10^7$ 、15%で $2.0 \times 10^7$ 、20%で $3.5 \times 10^7$ 、25%で $3.9 \times 10^7$ 、30%で $1.8 \times 10^7$ 個であった。遊離細胞が最も多く得られたのは25%試験区で、コントロールと比べて2.0倍の細胞を得ることができた。また、30%の試験区で、遊離細胞数が極端に減少した。塩分濃度30%の処理区では葉体に死細胞が増加することから、遊離細胞を得るためには、刺激が強すぎるものと考えられた。(図2)。

一方、試験期間中に得られた精細胞の合計数は海水処理区(コントロール)で $7.4 \times 10^7$ 、塩分濃度0%試験区で $8.7 \times 10^7$ 、10%で $3.6 \times 10^8$ 、15%で $4.4 \times 10^8$ 、20%で $3.6 \times 10^8$ 、25%で $1.8 \times 10^8$ 、30%で $6.1 \times 10^8$ 個であった。精細胞が最も多く得られたのは15%試験区で、コントロールと比べて6.0倍の細胞を

得ることができた。また、30%の試験区で、精細胞数が極端に減少した。塩分濃度30%の処理区では葉体に死細胞が増加することから、精細胞を得るためには、刺激が強すぎるものと考えられた(図3)。

## 2. 酸処理と成熟処理の併用による単細胞化試験

試験期間中に得られた遊離細胞の合計数は海水処理区(コントロール)で $2.2 \times 10^7$ 、pH6試験区で $3.6 \times 10^7$ 、pH5で $3.9 \times 10^7$ 、pH4で $3.7 \times 10^7$ 、pH3で $4.0 \times 10^7$ 、pH2で $4.0 \times 10^7$ 、pH1で $2.8 \times 10^6$ 個であった。遊離細胞が最も多く得られたのはpH3とpH2の試験区で、コントロールと比べて1.8倍の細胞を得ることができた。また、pH1の試験区で、遊離細胞数が極

端に減少した。遊離細胞を得るためにはpH1の処理処理区では葉体に死細胞が増加することから、遊離細胞を得るためには、刺激が強すぎるものと考えられた(図4)。

一方、試験期間中に得られた精細胞の合計数は海水処理区(コントロール)で、 $1.1 \times 10^8$ 、pH6試験区で $1.1 \times 10^8$ 、pH5で $1.5 \times 10^8$ 、pH4で $1.7 \times 10^8$ 、pH3で $1.7 \times 10^8$ 、pH2で $5.8 \times 10^8$ 、pH1で $8.6 \times 10^6$ 個であった。精細胞が最も多く得られたのはpH4とpH3の試験区で、コントロールと比べて1.6倍の細胞を得ることができた。また、pH2とpH1の試験区で、精細胞数が極端に減少した(図5)。

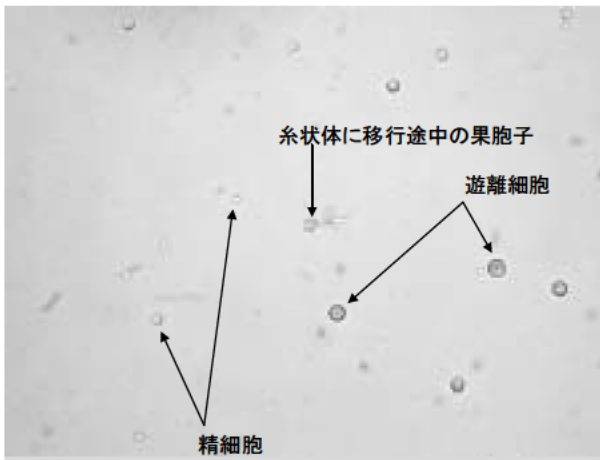


図1 遊離細胞と精細胞

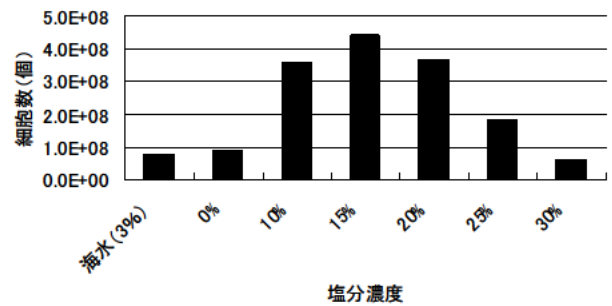


図3 塩分濃度別精細胞数

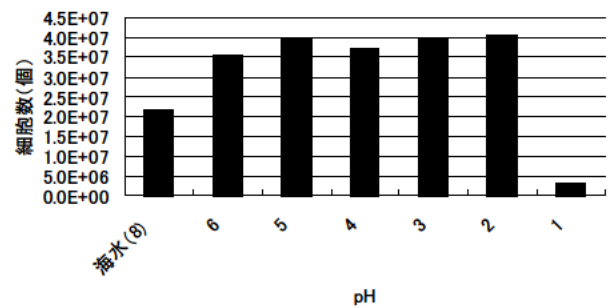


図4 水素イオン濃度別遊離細胞数

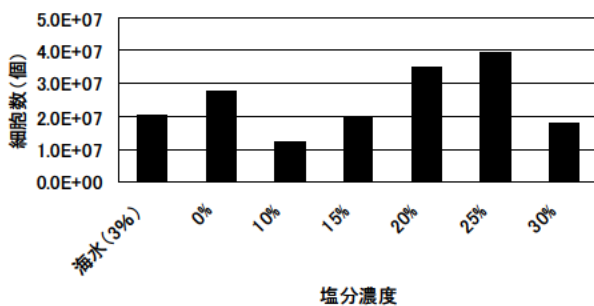


図2 塩分濃度別遊離細胞数

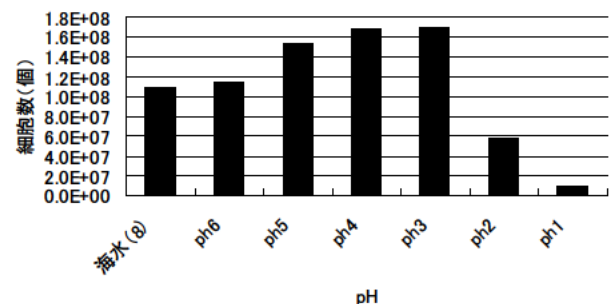


図5 水素イオン濃度別精細胞数

### 3. 遊離細胞と精細胞の浸透圧耐性

精細胞は浸透圧に対する耐性はほとんどなく、細胞は破裂し細胞内容物を放出した。遊離細胞は精細胞に比べて浸透圧に対する耐性が強いが、細胞内部の破裂がみられた。(図6, 7)。これらの結果から、精細胞は細胞壁を持っていないこと、遊離細胞の細胞壁は葉体中の細胞のような完全な形態ではない可能性が考えられた。

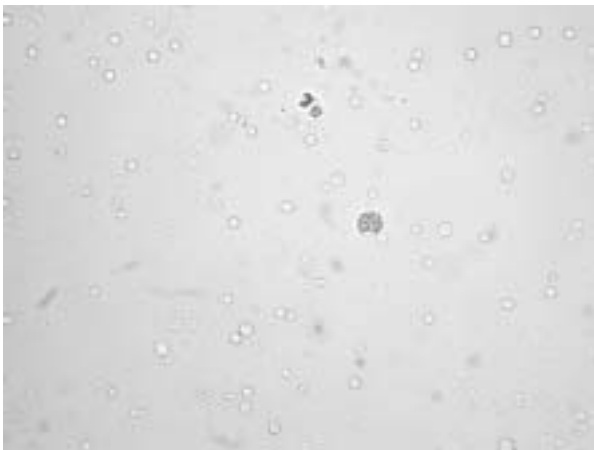


図6 低張液により破壊途中の細胞

### 4. 遊離細胞と精細胞の保存方法の検討

どちらの手法とも、精細胞と遊離細胞の一部は破壊されたが、大部分は破壊されなかった。ペレット状にして凍結したサンプルは破壊された細胞の微小な内容物が見られたが、解凍後に濃縮したサンプルではほとんど微小な内容物はみられなかった。これは、濃縮により、微小な内容物は沈殿せず、結果的にサンプルの洗浄効果になったものと考えられた。遊離細胞と精細胞の保存には効率性や非破壊性において、さらに検討することは望ましいが、今回の方法で作製した細胞を一定期間保存できることが確認された(図8)。

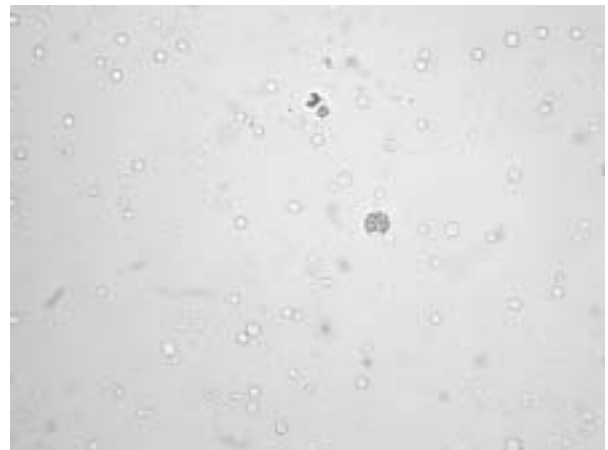


図8 凍結保存後の遊離細胞と精細胞

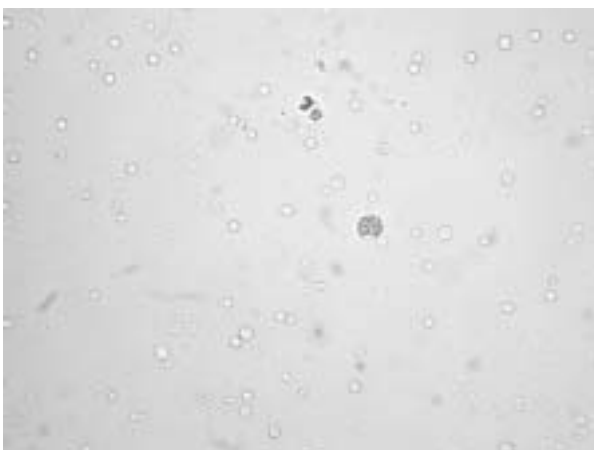


図7 低張液により破壊された細胞