茶系飲料によるシナノユキマス受精卵の粘着性除去

誌名	長野県水産試験場研究報告
ISSN	02893045
著者名	小松,典彦 茂木,昌行 小原,昌和
発行元	長野県水産試験場
巻/号	17号
掲載ページ	p. 1-6
発行年月	2017年3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

茶系飲料によるシナノユキマス受精卵の粘着性除去

小松典彦・茂木昌行・小原昌和

The use of tea drinks to remove adhesiveness from fertilized eggs of whitefish *Coregonus lavaretus maraena*

Norihiko Komatsu, Masayuki Moteki, Masakazu Kohara

シナノユキマス *Coregonus lavaretus maraena* の受精卵は弱い粘着性を有しており、ふ化飼育用水が濁った場合に、卵が互いに付着して塊状になることがある。塊状になると、ふ化器に収容された卵間の通水性が悪化し、酸欠よる死亡を招き、その後、ミズカビの繁殖やふ化器外への卵流出等の問題が生じる。このため、本種のふ化飼育においては、卵の粘着性を除去する必要がある。

卵に粘着性のあるコイ、ウグイ、ワカサギでは尿素やタンニン酸等による薬品処理をすることで、粘着性を除去できることが知られている[1-4]。これらの方法を参考として、長野県水産試験場佐久支場では 0.2%タンニン酸水溶液を用いてシナノユキマス受精卵の粘着性除去を行っている[5-6]。

粘着性の除去効果は、タンニンの持つタンパク質変性作用によると考えられるが、茶葉に多く含まれるカテキン類もタンニンの一種であることから、同様の効果が期待される。茶系飲料が有効であれば、近年の食の安全・安心への関心の高まりに対しても寄与できると考える。

そこで、市販の茶系飲料の粘着性除去効果を調べ、実用化のための用法・用量を検討した。

材料と方法

供試卵

2013 年 12 月 20 日-1 月 7 日と 2014 年 12 月 16-25 日に、佐久支場で継代飼育しているシナノユキマスから採卵した卵を用いた。受精後、4 時間吸水させた卵を試験に供した。

茶系飲料

市販の煎茶および紅茶の茶葉 (ティーバッグ) 各 1 種とペットボトル入り茶系飲料 3 種を供試した (表 1) 。煎茶および紅茶に含まれるカテキン類の量は日本標準食品成分表 5 訂におけるタンニン量の記載値 (それぞれ 13%および 11%) とし、浸出液のカテキン濃度が煎茶で 0.1%および 0.2%、紅茶で 0.2%となるよう、桑原ら[7]、山本 (前田) ら[8] の条件で抽出した。

茶系飲料の粘着性除去効果の判定

各茶系飲料および 0.2%タンニン酸水溶液で粘着性除去処理を行った受精卵約 200 粒を、100 mL の 0.5 g/L 白陶土液中で 1 分間振盪した。互いに付着して 2 粒以上の塊を形成した卵数と、付着せずに分離していた卵数を計数し、分離卵率（分離卵数/供試卵数×100）を求めた。0.2%タンニン酸処理における分離卵率を 100%とした場合のそれぞれの処理液の分離卵率を「有

表1 茶系飲料の種類とカテキン類の成分濃度

区分	種類	処理液の内容	カテキン類の成分濃度 (%)	メーカー
茶葉	煎茶	浸出液（100℃、1分静置）	0.1*1	
		浸出液（100℃、30分煮沸）	0.2*2	
	紅茶	浸出液（100℃、30分煮沸）	0.2*2	
ペットボトル飲料	ヘルシア緑茶	原液	0.15	(株) 花王
	カテキン緑茶	原液	0.06	(株) 伊藤園
	黒烏龍茶	原液	0.02	(株) サントリー

*1 桑原ら[7] の条件で想定される濃度

*2 山本 (前田) ら[8] の条件で想定される濃度

効率」とし、各茶系飲料の粘着性除去効果を評価した。なお、受精卵の浸漬処理では、各茶系飲料および0.2%タンニン酸水溶液の温度が飼育水 (3.0-5.8℃) と同じになるまで冷却して用いた。

用法・用量の検討

現在の 0.2%タンニン酸処理条件を基本条件とした。受精卵 1 万粒を、系飲料処理液、0.2%タンニン酸水溶液および飼育水各 350 mL に浸漬する方法で、有効率を調べた。実用化に向けて目標とする有効率を 80%以上に設定し、有用と考えられる茶系飲料をスクリーニングした。

有用と判断された茶系飲料については、処理液の濃度 (原液、2 倍希釈、5 倍希釈) 、処理時間 (1 分、5 分、10 分)、処理卵数 (0.5、1、2、4 万粒/350 mL)および反復使用 (8 回まで) による有効率の変化を調べ、最適な用法・用量を検討した。

大量処理試験

最適な用法・用量により事業規模の受精卵を処理し、実用上の有効率を検証した。処理した卵数は 20 万粒であり、処理液は 6.9 L であった。茶系飲料および 0.2%タンニン酸水溶液ともに 8 回まで反復使用し、処理時間については、茶系飲料で 5 分、0.2%タンニン酸水溶液で 0.5 分とした。また、対照区 (無処理) として、飼育水 4.7 L に 13.6 万粒の卵を 5 分浸漬した。

緑茶抽出物の粘着性除去効果

緑茶に含まれるカテキン類のうち、最も含有量が多く、生理活性の強いエピガロカテキンガレート (以下、EGCg) を 90%以上含む緑茶抽出物 (サンフェノン EGCG-OP : (株) 太陽化学) の 0.012%、0.06%および 0.2%水溶液 350 mL に、受精卵 1 万粒を 1、5、10 分浸漬し、0.2%タンニン酸処理に対する有効率を調べた。

安全性試験

大量処理試験で粘着性を除去した受精卵をビン式ふ化器に収容した。発眼までは一週間に 2 回、ブロノポール (パイセス : (株) エランコジャパン) 50 mg/L 溶液に卵を 30 分浸漬して、卵消毒を行った。死卵については、通常の飼育作業のとおり、吸引式で毎日取り除いた。発眼後に一部の卵を抽出して、正常な発眼卵を計数して、その比率を調べた。発眼時に重量法で求めたふ化器内の総卵数に、抽出法で調べた発眼卵の比率を乗じて、総発眼卵数を算出した。総発眼卵数を受精卵収容時に重量法で求めた総卵数で除して、発眼率とした。また、発眼卵約 200 粒を採取して、ふ化まで飼育した。正常にふ化した尾数を調べ、発眼卵のふ化率を算出した。発眼率とふ化率の比較には Mann-Whitney の *U*-検定を用いた。

粘着性除去費用の算出

有用と判断された茶系飲料を用いて事業規模で処理を実施した場合の、一採卵期における費用を算出し、0.2%タンニン酸処理の場合と比較した。算出では、一年の採卵数量を 1,000 万粒とし、各処理液を 8 回まで反復使用する条件とした。

結　果

茶系飲料のスクリーニング

茶葉の中で目標とした有効率 (80%以上) を上回っ

表2　茶系飲料のシナノユキマス受精卵粘着性除去の有効率 (%)

処理液	作製条件	浸漬時間 (分)				
		0.5	1	5	10	30
煎茶葉浸出液	100℃、1分静置	-	26.8	-	73.7	93.6
	100℃、30分煮沸	26.1	42.0	52.5	52.8	-
紅茶葉浸出液	100℃、30分煮沸	40.8	55.2	58.7	43.8	-
ヘルシア緑茶	原液	8.6	10.3	22.1	14.1	-
カテキン緑茶	原液	54.9	91.1	90.0	101.6	-
黒烏龍茶	原液	65.4	94.9	80.1	95.9	-
タンニン酸水溶液	0.2%	100.0 (94.8) *	-	-	-	-
飼育水 (無処理区)	-	-	-	-	3.4	-

* 括弧内の数値は分離卵率を示す

た浸漬条件は、煎茶葉を100℃の熱水に1分静置した浸出液の30分処理のみであった (表2) 。また、市販のペットボトル飲料の中で目標の有効率を上回った条件は、カテキン緑茶および黒烏龍茶に1、5、10分浸漬した場合であった。なお、全体として、浸漬時間が長い程、有効率が高くなる傾向がみられた。

上記の結果より、以降の試験を進めるための処理液として、有効率の高かったカテキン緑茶を選定した。

用法・用量の検討

カテキン緑茶の濃度と浸漬時間を検討した結果、目標の有効率を上回る条件は、5倍希釈液に10分、2倍希釈液に5、10分、原液に5、10分浸漬した場合であった (表3) 。処理卵数を検討したところ、原液に0.5万粒を1、5、10分、1万粒、2万粒および4万粒を5、10分浸漬した場合に、目標の有効率を上回った (表4) 。さらに、反復使用の影響を調べたところ、原液に1万粒を浸漬した場合に、8 回まで有効率の低下がみられなかった (表5) 。

緑茶抽出物の粘着性除去効果

EGCG-OP 水溶液の有効率はいずれの濃度および浸

表3　異なる濃度におけるカテキン緑茶の有効率 (%)

処理液	濃度	処理卵数 (万粒/350 mL)	浸漬時間 (分) 0.5	1	5	10
カテキン緑茶	5倍希釈	1	-	64.7	79.8	91.9
	2倍希釈	1	-	69.1	97.1	95.5
	原液	1	-	78.7	91.8	94.9
タンニン酸水溶液	0.2%	1	100.0 (98.9)*	-	-	-
飼育水 (無処理区)	-	1	-	-	-	1.9

*括弧内の数値は分離卵率を示す

表4　異なる処理卵数におけるカテキン緑茶の有効率 (%)

処理液 (濃度)	処理卵数 (万粒/350 mL)	浸漬時間 (分) 0.5	1	5	10
カテキン緑茶 (原液)	0.5	-	84.3	89.5	94.4
	1	-	79.1	93.9	93.9
	2	-	62.1	90.1	94.7
	4	-	60.5	95.8	97.1
タンニン酸水溶液 (0.2%)	1	100.0 (97.7)*	-	-	-
飼育水 (無処理区)	1	-	-	-	9.2

*括弧内の数値は分離卵率を示す

表5　カテキン緑茶の反復使用における有効率 (%)

処理液	濃度	処理時間 (分)	処理卵数 (万粒/350 mL)	使用回数 1	3	5	8
カテキン緑茶	2倍希釈	5	1	94.3	72.1	80.5	1.4
	原液	5	1	88.6	78.1	83.2	85.3
	原液	5	2	77.8	84.3	67.3	1.6
タンニン酸水溶液	0.2%	0.5	1	100.0 (96.2)*	-	-	-
飼育水 (無処理区)	-	10	1	2.4	-	-	-

*括弧内の数値は分離卵率を示す

表6　緑茶抽出物サンフェノンEGCG-OPの有効率 (%)

処理液	濃度 (%)	処理卵数 (万粒/350 mL)	浸漬時間 (分) 0.5	1	5	10
EGCG-OP水溶液	0.012	1	-	6.1	7.0	10.1
	0.06	1	-	3.2	6.9	2.8
	0.2	1	-	1.5	4.3	2.3
タンニン酸水溶液	0.2	1	100.0 (96.4)*	96.9	96.5	96.4
飼育水 (無処理区)	-	1	-	-	-	2.7

*括弧内の数値は分離卵率を示す

漬時間において、1.5-10.1%であり、粘着性の除去効果は認められなかった (表 6) 。

大量処理試験

事業規模の卵処理を行った場合、カテキン緑茶の有効率は目標以上であり、反復使用による有効率の低下もみられなかった (表 7) 。

受精卵に対する安全性

カテキン緑茶で処理した場合の発眼率は、66.3-75.9%であった (表 8) 。0.2%タンニン酸水溶液では 64.8-76.8%であり、処理液による差はなかった (p>0.05) 。また、ふ化率はカテキン緑茶で 76.0-89.6%、0.2%タンニン酸水溶液で 87.7-92.6%であり、差がなかった (p>0.05) 。

粘着性除去費用

一採卵期の生産目標である 1,000 万粒を処理する場合、カテキン緑茶では 44 L を要し、費用は 16,104 円となった (表 9) 。これに対して、0.2%タンニン酸処理でのタンニン酸必要量は 86 g で、費用は 1,121 円であった。

考 察

本研究により、カテキン類を含む茶系飲料にシナノユキマス受精卵の粘着性除去効果があることが分かった。煎茶葉を 100℃の熱水に 1 分静置した浸出液、カテキン緑茶および黒烏龍茶で目標とする有効率を上回る処理条件が得られ、タンニン酸に代替できることが分かった。しかし、煎茶葉浸出液では、30 分の浸漬が必要であること、黒烏龍茶はカテキン緑茶に比べるとやや有効率が低いことから、カテキン緑茶が最も有用であると判断した。

次に実用上の用法・用量を設定するために、カテキン緑茶の最適な処理条件を検討した。カテキン緑茶の濃度および浸漬時間が有効率に与える影響を調べたところ、有用な処理条件は 5 倍希釈液に 10 分、原液および 2 倍希釈液に 5 分または 10 分浸漬した場合であった。実際の採卵事業では 1 日に 200-300 万粒を処理するため、浸漬処理時間はできる限り短時間であることが望ましい。採卵後の受精卵収容作業に要する時間も考慮すると、原液および 2 倍希釈液に 5 分浸漬する条件が適当と判断した。次いで、処理卵数が有効率に与える

表7 大量処理試験におけるカテキン緑茶の有効率 (%)

処理液	処理時間 (分)	使用回数 1	3	5	8
カテキン緑茶 (原液)	5	86.5	90.0	86.9	92.8
タンニン酸水溶液 (0.2%)	0.5	100.0 (95.6)*	101.9	94.9	91.6
飼育水 (無処理区)	5	3.3	-	-	-

*括弧内の数値は分離卵率を示す

表8 浸漬処理した受精卵の発眼率およびふ化率 (%)

処理液	発眼率 1*	3	5	8	ふ化率 1	3	5	8
カテキン緑茶 (原液)	75.9	66.8	66.3	75.6	76.0	80.8	88.2	89.6
タンニン酸水溶液 (0.2%)	70.0	64.8	73.9	76.8	92.6	91.1	87.7	90.7
飼育水 (無処理区)	65.6	-	-	-	90.8	-	-	-

*数値は反復使用した回次を示す

表9 一採卵期の粘着性除去にかかる費用

項目	カテキン緑茶	タンニン酸
1万粒あたりの必要量	0.35 L	0.8 g
1,000万粒の処理に必要な量*	44 L	86 g
単価	366円 /L	13円 /g
一採卵期に必要な費用	16,104円	1,121円

*1,000万粒の処理に必要な量は、8回まで反復使用した場合を示す

影響を調べた試験において、原液に5分浸漬した場合、350 mLに対して、最大4万粒まで処理できることが分かった。さらに、処理液の反復使用の影響を調べた試験では、2倍希釈液に1万粒の浸漬では5回、原液に2万粒の浸漬では3回で有効率が低下したが、原液に1万粒の浸漬では8回まで安定した除去効果が認められた。以上の結果から、1回の用法・用量をカテキン緑茶原液350 mLに受精卵1万粒を5分間浸漬することとし、8回まで処理液を反復使用する方法が最も実用的であると判断した。大量処理試験においても、この条件の妥当性が検証され、受精卵に対する安全性に問題が無いことも確認した。

実用化において、経費も重要な問題である。カテキン緑茶処理は、タンニン酸処理の14倍の経費がかかるが、一採卵期に要する費用として算出された1.6万円という金額は十分許容できると考える。

本研究においては当初、茶葉材料の粘着性除去効果が期待された。しかし、煎茶葉および紅茶葉を30分煮沸した浸出液では除去効果が低かった。これらの浸出液は試験時に用水と同じ温度まで冷却すると、強い濁りが生じた。これは、タンニンとカフェインが結合して沈殿するクリームダウン[9]と思われ、これによって有効率が低下したと考えられる。

中川[10]はタンニン酸、エピカテキンガレート (ECg) およびEGCgがゼラチンと不溶性複合体を形成することを見出している。そこで、カテキン緑茶に含まれるEGCg等のガレート型カテキンがタンニン酸と同様にタンパク質に結合する事で粘着性を除去しているのではないかと考え、EGCgの高純度粉末であるサンフェノンEGCG-OPの有効率を調べた。しかし、予想に反して、その有効率は非常に低かった。石井[11]はカテキン類同士の相互作用を解析したところ、EGCg溶液中でEGCg同士が高分子量の複合体を形成することを見出した。本研究においても、EGCg同士が複合体を形成した結果、粘着性除去効果が見られなかったと推察される。

このように、受精卵の粘着性除去効果に及ぼすカテキン成分とその作用機序には不明な点が残っているが、本研究で選定したカテキン緑茶は製品として市販され、入手が簡単であり、成分の均一性も高いと考えられる。粘着性の除去効果も高く、再現性もあることから、タンニン酸処理の代替方法として、十分実用できると考える。

要　約

1 茶に含まれるカテキン類に着目し、市販茶系飲料によるシナノユキマスの受精卵の粘着性除去方法を開発した。

2 煎茶葉、紅茶葉の浸出液および市販のペットボトル入り茶系飲料3種 (ヘルシア緑茶、カテキン緑茶および黒烏龍茶) を用いて、卵の粘着性除去効果を調べた結果、カテキン緑茶が最も有用であった。

3 カテキン緑茶の粘着性除去における用法・用量を検討した結果、カテキン緑茶原液を使用し、浸漬時間を5分、処理卵数を1万粒/350mL、8回まで反復使用する方法が最も実用的であった。

4 業務規模の大量処理を行ったところ、3の用法・用量が業務規模においても妥当であることと受精卵に対する安全性に問題がないことが確認できた。

5 カテキン緑茶を用いた場合の一採卵期あたりの費用は約1.6万円であった。

謝　辞

本研究において、サンフェノンEGCG-OPを提供いただいた (株) 太陽化学に感謝申し上げる。

文　献

1) 福田一衛・渡辺国夫 (1982) : コイ卵粘着性の新除去法. 埼玉県水産試験場研究報告 41 : 1-6.

2) 中村一雄 (1966) : ウグイ卵の粘着性をなくして人工ふ化する方法. 水産増殖 14 (1) : 37-40.

3) 小林良雄・石崎博美・小山忠幸 (1987) : ワカサギ受精卵の粘着性除去試験-1. 神奈川県淡水魚増殖試験報告 23 : 58-62.

4) 石崎博美 (1990) : ワカサギ受精卵の粘着性除去試験-2. 神奈川県淡水魚増殖試験報告 26 : 74-78.

5) 山本聡・佐藤竹治 (2000) : タンニン酸を用いたコ

レゴヌス卵の粘性除去. 平成10年度長野県水産試験場事業報告 : 39.

6) 川之辺素一・茂木昌行 (2003) : タンニン酸を用いたコレゴヌス卵の粘性除去-Ⅱ. 平成 13 年度長野県水産試験場事業報告 : 32.

7) 桑原穆夫・松田昌夫・竹尾忠一 (1959) : 紅茶の浸出条件に関する研究. 茶業研究報告 14 : 48-60.

8) 山本 (前田) 万里・前原明日香・江間かおり・水上裕造・加藤史子・廣野久子・物部真奈美 (2007) : ‘べにふうき’ 緑茶抽出条件の違いによるメチル化カテキン含量及びフェオホルビド精製量の変動. 茶業研究報告 104 : 43-50.

9) 小菅充子 (1998) : 茶浸出液の冷却時に見られるクリームダウンについて. 和洋女子大学紀要 38 (家政系編) : 43-55.

10) 中川致之 (1972) : 渋味物質のいき値とたんぱく質に対する反応性. 食品工誌 19 : 531-537.

11) 石井剛志 (2013) : 茶カテキン類の安定性の向上を目指した凝集・沈殿反応の解析. 東洋食品研究所研究報告書 29 : 183-189.