

オゾンファインバブル処理による マガキの生理活性および品質の向上

角田 出¹・高瀬 清美²

Enhancing the Physiological Conditions and the Quality of Japanese Oyster *Crassostrea gigas* by Using Ozone Fine Bubbles

Izuru KAKUTA¹ and Kiyomi TAKASE²

¹Faculty of Science and Engineering, Ishinomaki Senshu University, Miyagi 986-8580, Japan

²Research Center for Creative Partnerships, Ishinomaki Senshu University, Miyagi 986-8580, Japan

Abstract

This study examined the effect of ozone fine bubbles (O-FB) processing (bubble size ; 0.8 -5.0 μm , the number of bubbles ; 1.6×10^{14} individuals) at 8 $^{\circ}\text{C}$ on the physiological conditions and the quality of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. In the group reared in the O-FB treated seawater for 48 hours, a significant decrease in the number of total bacteria in the soft body, in comparison with those of the control group treated with the sterilized sea water. The phagocytic activity against zymosan of hemocytes collected from the hemolymph and the creeping speed of the gill piece of the oyster increased significantly. The contents of free amino acids and succinic acid of the oyster's soft body elevated also significantly by the O-FB treatment. These results suggest that O-FB treatment is very effective in improving the bioactivity and quality of shelled oysters.

1. 緒言

マガキ *Crassostrea gigas* は、アジア沿岸を原産地とするイタボガキ科マガキ属の二枚貝である。同属は、水産経済動物として世界最大の年間生産量を持つが故に、国内でも産地間競争の激しい水産物の一つでもある。

マガキは生活排水の影響を受け易い河口域や浅海・内湾海域で養殖されることが多く、体内に病原性細菌を保有している可能性がある。そのため、生食用の殻付きマガキは安全性確保の観点から紫外線、オゾン、塩素系薬剤等により処理した清浄（衛生的な）海水をかけ流し水槽内等で洗浄し、体表面や内臓に存在している細菌や汚れを排出させる、すなわち浄化処理が課せられている⁽¹⁻³⁾。

オゾンは強い殺菌能力と水質改善効果を有することからマガキの浄化にも有効であると考えられる。実際、1929年にはフランスの Violle⁽⁴⁾ はオゾンが貝類の浄化に有用であることを報告してい

る。水中の細菌は、0.1~1.0 mg/L のオゾン濃度で1~2分の処理を行うと99%が死滅すると言われているが、カキの浄化処理では、海水を1.0~1.5 mg/L のオゾンで6~10分間処理した後、残留オゾン濃度を0.1 mg/L まで下げてから使用している例がある⁽⁵⁾。しかし、オゾンには毒性があり、残留オゾン濃度が許容範囲をわずかに越えただけでも水生生物の正常な生理機能が阻害される⁽⁶⁾。そのため、オゾン注入による殺菌・浄化処理を行っている飼育・環境浄化系では、対象生物にとって安全な濃度以下になるように、活性炭を用いた溶存態オゾンの低下処理や残留オキシダント除去等が行われるのが常である⁽⁷⁾。

オゾンファインバブル (O-FB) は、気体にオゾンを利用した気泡径 50 μm 以下の微細な気泡である。自己加圧や圧壊等により強い殺菌作用を示すことが知られており⁽⁸⁻¹⁰⁾、特に水産生物由来食品の安全性を確保する技術として注目されている。我々も、粒径 0.8 - 5.0 μm 、粒子密度 1.6 ×

¹石巻専修大学理工学部生物科学科

²石巻専修大学共創研究センター特別研究員

10^{14} 個/L の O-FB を含有する海水で処理（オゾン発生量：1 – 2 g/h、流量：3 – 10 m³/h）したところ、ホヤの鮮度色調改善や細菌の増殖抑制等を通して鮮度の保持に極めて有効であることを認めている⁽¹¹⁾。

マガキの外観向上や細菌増殖の抑制のみでなく、生理活性を高めたり、呈味（旨み）をコントロールしたりすることができれば、新たなブランド養殖マガキの開発に繋がると考える。しかし現状では、マガキの呈味は養殖中の飼育条件により変動することが報告（山口、1993）されているものの、採捕後の処理過程によってこれらの資質向上が可能であるとの報告はない。そこで本研究では、高品質な水産物の均一化、および、養殖マガキのブランド化を目指す取り組みを支援する一環として、殻付きマガキの O-FB 処理がマガキの生理活性並びに呈味成分の変化、すなわち、品質に及ぼす影響を調べた。

2. 材料と方法

2.1 供試生物と処理条件

実験には、2017 年 2 月に宮城県石巻周辺海域で水揚げした直後の殻付きの全重量が 250 g 強、軟体部の湿重量が 34 g 前後の殻付きマガキ *Crassostrea gigas* を使用した。O-FB の発生にはオゾナイザーを附設した旋回式超微細気泡発生装置（タンノ冷機工業株式会社製）を用い、粒径 0.8 – 5.0 μm （最頻粒子径は 1.1 μm ）、粒子密度 1.6×10^{14} 個/L の FB を含有するファインバブル含有海水を調製した（オゾン発生量：1 g/h、流量：3 – 5 m³/h）。ファインバブルの粒径はセイシン企業社製 SK レーザーマイクロサイザー LMS-2000e により、粒子密度はメイワフォーシス株式会社製ナノパーティカルカウンターを用いて計測した。

水揚げした殻付きマガキを、外部に付着した汚れを取り除いた後、角カゴ型メッシュコンテナに収容し、大型プラスチック製コンテナ中に同カゴを吊り下げ、UV・塩素殺菌したろ過海水（sterilized sea water：S-SW）、または、O-FB 処理海水をかけ流し状態で 48 時間の洗浄処理を行った。洗浄処理時の水温は約 10 $^{\circ}\text{C}$ であった。

洗浄開始から 48 時間後、殻付きマガキを取り

出し、鰓の繊毛運動（ほふく速度）、心臓から採取した血リンパ中血球細胞の異物取込み（貪食）活性を調べた。また、軟体部の生細菌数、遊離アミノ酸とコハク酸の含有量を測定した。

2.2 マガキ生理活性の把握

2.2.1 鰓のほふく速度の測定

マガキの殻の一方を除去して鰓を露出させ、測定用の長方形容器に鰓片（一片 2～5 mm 程度の小片）の表面が水平になるように置いた後、鰓片が浸るまで海水を入れ、同小片の移動する速度（小片の移動速度、mm/m）を 5 分間隔で 3 回測定し、その平均値を試験個体の鰓のほふく速度とした。同速度測定時の水温は約 10 $^{\circ}\text{C}$ であった。

2.2.2 血球細胞の貪食活性の測定

マガキの心臓からエチレンジアミン四酢酸（EDTA）を塗布した 24G 注射針付のツベルクリンシリンジを用いて、血リンパを採取し、直ちにスライドグラスに滴下した。同スライドグラスを湿潤箱の中に置き、30 分間静置させて血球を接着・伸展させた後、マガキ血球用平衡塩類溶液（Oyster BSS：NaCl 446.6 mM、KCl 14.5 mM、MgSO₄ 14.2 mM、MgCl₂ 10.6 mM、CaCl₂ 8.6 mM、NaHCO₃ 3.0 mM、NaH₂PO₄ 0.08 mM、グルコース 5.6 mM、pH 7.8）を用いて接着していない血球を洗い流した。その後、スライドグラスに付着した血球に、ザイモサン粒子を Oyster BSS に懸濁させ、超音波処理により分散させた液を滴下（ザイモサン粒子の密度が血球密度の約 100 倍となるようにザイモサン懸濁液を添加）し、約 20 $^{\circ}\text{C}$ で、60 分間反応させた。貪食されなかったザイモサンを Oyster BSS で洗浄・除去し、メイ・グリュンワルド・ギムザ染色を施して、顕微鏡下で血球の形態と貪食の有無を観察した。貪食率は以下に示す式に基づいて求めた：貪食率（%）＝（異物を貪食している血球数／観察した血球の総数） $\times 100$ 。

2.2.2 軟体部の生細菌数の調査

色調測定用の写真を撮り終えたマガキ軟体部に等量の滅菌海水を加え、食品用ミキサーを用いてホモジナイズした後、トリプトソイ寒天培地に塗

布して3日間20℃で培養し、軟体部の生菌数を算出した。

2.3 マガキ軟体部の呈味成分測定

マガキ軟体部に4倍量の2%スルホサリチル酸を加え、ドリル型ホモジナイザーを用いて均一化した後、2,000 gで10分間遠心操作を行い、(脂肪等を含まない)中間層を採取し、孔径0.22 μm のフィルターでろ過した後、ろ液を水酸化ナトリウムでpH 2.0に調整した。これを定容後に12,000 gで20分間の遠心操作を行い、上清をアミノ酸分析用の試料とし、超高速液体クロマトグラフ質量分析システム(Waters社製 超高速液体クロマトグラフUPLC:H Class、PDA、質量装置MS:SQD2)を使用して遊離アミノ酸の分析を行った。

また、マガキ軟体部のコハク酸含有量は、同組織を均一化後、BioVision社製のコハク酸測定キット Succinate(Succinic Acid) Colorimetric Assay Kitを用いて行った。

2.4 統計処理

各種指標の結果については、一元配置分散分析(ANOVA)を行い、 $p < 0.05$ を有意の限界とした。また、文中では、特に記載しない限り、平均値 $\pm$ 標準偏差(n=5)で表した。

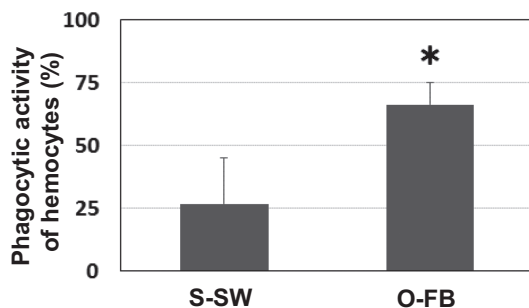


Fig. 1 Effect on the creeping speed of the gills taken from Japanese oyster, *Crassostrea gigas*, treated by using ozone fine bubbles for 48 hours

S-SW : the group kept for 48 hours in the seawater sterilized by UV after filtration through a membrane module with a pore size of 0.5 μm (an ordinary sterilized seawater) for after the picking up from the sea, O-FB : the group kept for 48 hours in the seawater treated by ozone fine bubbles after the picking up from the sea, Data are given as mean $\pm$ S.D., n = 5.

* : Significant difference to the S-SW ($p < 0.05$)

3. 結果

オゾンファインバブル O-FB 処理海水による洗浄処理を経たマガキの軟体部は、通常の滅菌処理海水(S-SW)による洗浄処理を施した個体のそれと比べて、少し明るい色調となるとともに、付着する粘液量が少し減ってベトツキ感が軽減されたが、それ以外に外観的に大きな違いは認められなかった。

O-FBによる洗浄処理とS-SWによる洗浄処理を施したマガキの鰓のほふく速度をFig. 1に示す。O-FB海水で浄化処理されたマガキ鰓の平均ほふく速度は、S-SWで処理された鰓の同値の約2.5倍となり、前者は後者に比べ有意に大きな値となった。

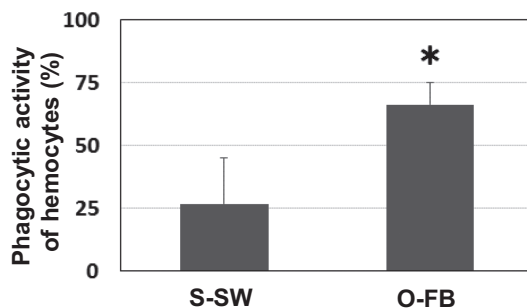


Fig. 2 Effect on the phagocytic activity of the hemocytes taken from Japanese oyster, *Crassostrea gigas*, treated by using ozone fine bubbles for 48 hours Data are given as mean $\pm$ S.D., n = 5.

* : Significant difference to the S-SW ($p < 0.05$)

S-SW and O-FB : Refer to the footnote in Fig. 1.

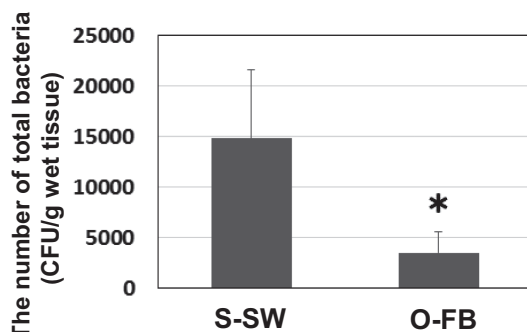


Fig. 3 Effect on the number of total bacteria in the soft tissues taken from Japanese oyster, *Crassostrea gigas*, treated by using ozone fine bubbles for 48 hours Data are given as mean $\pm$ S.D., n = 5.

* : Significant difference to the S-SW ($p < 0.05$)

S-SW and O-FB : Refer to the footnote in Fig. 1.

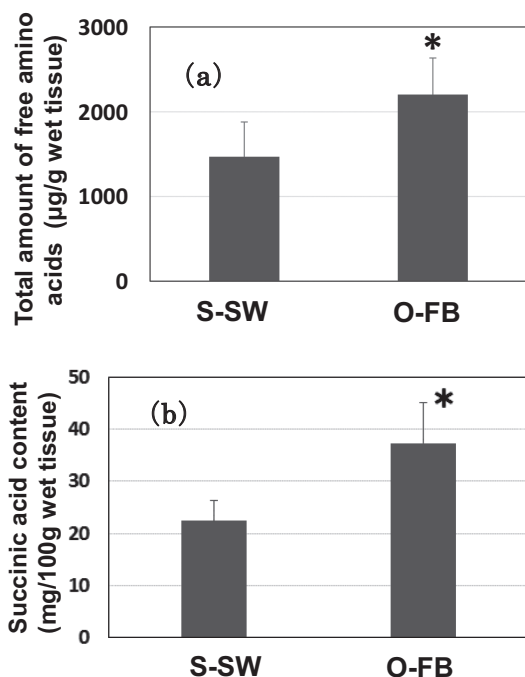


Fig. 4 Effect on the amount of free amino acids (a) and succinic acids (b) in the soft tissues taken from Japanese oyster, *Crassostrea gigas*, treated by using ozone fine bubbles for 48 hours
Data are given as mean $\pm$ S.D., $n = 5$.
*: Significant difference to the S-SW ($p < 0.05$)
S-SW and O-FB : Refer to the footnote in Fig. 1.

O-FB による洗浄処理と S-SW による洗浄処理を施したマガキ血球細胞の貪食活性を Fig. 2 に示す。O-FB 処理群におけるマガキの血球細胞の貪食活性は、S-SW 処理群の同値の 2.5 倍強となり、前者は後者に比べ有意に大きな値となった。

O-FB による洗浄処理と S-SW による洗浄処理を施したマガキ軟体部の生細菌数を Fig. 3 に示す。O-FB 処理群におけるマガキ軟体部の生細菌数は、S-SW 処理群の同値の約 1/4 となり、前者は後者に比べ有意に小さな値となった。

O-FB による洗浄処理と S-SW による洗浄処理を施したマガキ軟体部の遊離アミノ酸とコハク酸の含有量を Fig. 4 に示す。O-FB 処理群におけるマガキ軟体部の遊離アミノ酸 (Fig. 4a) およびコハク酸 (Fig. 4b) の含有量は、ともに S-SW 処理群の 1.5 倍程度となり、前者は後者に比べ有意に大きな値となった。なお、マガキ軟体部の遊離アミノ酸組成では、S-SW 処理群で 65%、O-FB

処理群では約 70% がアラニン、グルタミン酸、グリシンおよびプロリンの 4 種類で構成されていた。また、後者は前者に比べて、グルタミン、リジン、セリンおよびトレオニンの含有量も有意(それぞれ、4.4、2.4、2.1、2.5 倍)に高かった。

4. 考察

オゾン微細気泡で曝気処理した環境水域内でカキやマダイ等の水産生物を養殖すると、それらの生理機能は向上し、生残率や成長率が高まるとの報告がある^(13,14)。著者らも、マボヤの外部刺激に対する膨張反応、筋膜体の色調、剥き身中の生菌数等を指標とした調査で、旋回式超微細気泡発生装置 (オゾナイザーを付設: オゾン発生量: 1 – 2 g/h、流水量: 3 – 10 m³/h) で発生させた粒径が 0.8 – 5.0 μm (最頻粒子径は 1.1 μm) で粒子密度が 1.6×10^{14} 個/L の気泡を含有する O-FB を含有する海水でマボヤを 24 時間処理したところ、当該指標値が良好な値となる、すなわち、高品質化が図れることを報告した⁽¹¹⁾。

そこで本研究では、マボヤの高品質化に有効であった気泡条件とほぼ同等のサイズ、粒子数の O-FB を含む海水で、冬期に殻付きマガキを 48 時間処理した際のマガキの生理活性指標を調べるとともに、高品質化に欠くことのできない軟体部の呈味成分 (遊離アミノ酸とコハク酸) の含有量を測定し、それらの数値を通常の浄化処理を施した殻付きマガキのものと比較した。その結果、O-FB 処理はマガキ軟体部の色調を明るくしたり表面の粘りを軽減したりするとともに、マガキの生理活性を高め、生体防御活性の賦活化に働くこと、同処理を経たマガキでは軟体部の細菌数が激減し、かつ同部の遊離アミノ酸やコハク酸の含有量が増加することが分かった。遊離アミノ酸の組成でも、旨味成分であるグルタミン酸、甘味成分であるアラニン、グリシン、プロリン、グルタミン、セリンおよびトレオニンが増加していたことから、O-FB 処理がマガキ軟体部の呈味性強化に働くことが示唆された。すなわち同処理は、マガキの健全性および食品としての安全性の向上に貢献することに止まらず、呈味成分の増加を含めた質の向上に有効であることが分かった。

このことは、殻付きマガキの O-FB 処理は養殖

マガキの新たなブランド開発を支援する有効なメソッドとなることを示している。加えて、養殖中の飼育条件を変えることで呈味成分の増加を図る試みとは異なり、付加的にせよ浄化処理という必須のしかも短期間の処理によって、マガキ軟体部の呈味成分が増加したことはブランド化に際しても大いに歓迎されるべきものであろう。

オゾン微細気泡による浄化処理は、気泡の圧壊時に発生するフリーラジカルに加え、外部からオゾンを供給するために多量のフリーラジカルが発生すると考えられている⁽¹⁵⁾。O-FB 処理によって浄化処理海水中に発生した多量のフリーラジカルは、マガキ内外の細菌を死滅・激減させることによって体内での生菌数増加を抑制し、その後の輸送・保存期間中の品質保持に有効に作用するであろう。加えて、マガキの血球細胞の貪食活性が O-FB 処理により高まっていたことから、賦活化された自身の生体防御活性も品質の維持に貢献するものと考えられる。

一方、前述した如く、残留オゾンの有害性に関する報告は多くあり、例えば魚はオゾンと直接接触させると赤血球の膨潤や溶血、ヘモグロビンの酸化が惹起され、ガス交換が上手くできずに窒息死することが報告されている⁽¹⁶⁾。そのため、オゾン注入水は、その殺菌・分解能を利用した後は活性炭等を用いて残留オゾンを除去する等の処置が必要となる等、生物への使用に際しては濃度管理に課題が残る。

残留オキシダント（オゾン等）濃度が 6.12 mg/ℓ (6.12 g/m³) の海水で殻付きアコヤガイを 2 時間処理した場合は酸素摂取量等の生理活性に大きな障害は認められないが、曝露時間が 24 時間程度と長期になると、残留オキシダント濃度は 0.63 mg/ℓ (0.63 g/m³) 未満に設定する必要があるとの報告⁽¹⁷⁾がある。ただし近年では、低濃度オゾン処理により濾過槽の微生物活性が高まり、同所での浄化能力が向上するとの報告⁽¹⁸⁾もある。

今回の浄化実験では、殻付きマガキを 48 時間処理したが、オゾン使用量は約 0.1~0.7 g/m³程度と、アコヤガイで推奨されている残留オキシダント濃度をほぼクリアするものであったことから、通常のオゾン水への曝露を想定すると、マガ

キの生理活性に負の影響を及ぼすことはなく、逆にその生理活性を高める方向に作用したのと思われる。ただし、O-FB を用いた浄化実験では、上述の如く、微細気泡の自己加圧や圧壊等によって生じるフリーラジカルと相まって発生したフリーラジカルの総量は極めて多くなっていることが予想される。しかし、微細気泡のサイズが多様である O-FB 水中で実際に生物体と接触・反応するフリーラジカルの量については把握が難しく、現状では O-FB 処理による正の効果を述べるとともに、負の影響が軽微であったことを述べるに留めたい。

浄化対象となるマガキの数や換水量、浄化の形式等によって浄化に必要な時間は異なるが、三重県では 18 時間以上⁽¹⁹⁾、宮城県では 22 時間以上⁽²⁰⁾の浄化処理が求められている。マガキの人工浄化の 1 つの形式であるプール型浄化装置を用いた処理では 48 時間⁽²¹⁾との記述もあることから、今回は浄化処理を 48 時間と長時間側で行った。今後、浄化処理の有効性や安全性と効率化、そして付加価値化による恩恵を勘案して、O-FB による浄化処理に絡む種々のコスト削減や施用時間の短縮等を目指した最適稼働条件の検討が必要であろう。特に、浄化処理機能を損なうことの無い範囲の気泡のサイズと密度、オゾン注入量を特定できれば、汎用型 O-FB 発生装置の普及にも弾みがつくと考える。

文献

- (1) 生かき生産管理における各作業工程の注意点、宮城県 <https://www.pref.miyagi.jp/uploaded/attachment/69088.pdf>
- (2) 生かきの取扱いに関する指導要領、広島県 <https://www.pref.hiroshima.lg.jp/uploaded/attachment/189629.pdf>
- (3) 【牡蠣の安全】牡蠣の浄化ってなんですか？薬剤で殺菌しているのですか？ <https://www.umaikaki.com/diary-detail/9>
- (4) H. Violle, "De la sterilisation de l'eau de mer par l'ozone", Revue d'Hygiene et de Medecine Preventive, 51, 42-46 (1929)
- (5) Y. Fauvel, "Seawater ozonation and shell fish depuration", Ozone Sci. engineer., 1 (2), 147-165

オゾンファインバブル処理によるマガキの生理活性および品質の向上

- (1979)
- (6) G.Richards, "Microbial purification of shellfish. A review of depuration and Relaying", J.Food. Prot., 51 (3), 218-251 (1988)
- (7) 伊藤慎悟、吉水守、呉明柱、日向進一、渡辺研一、早川豊、絵面良男、"海水のオゾン処理による飼育水の殺菌効果とヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) およびマツカワ (*Verasper moseri*) の生存率に及ぼす影響"、水産増殖、44(4)、457-463 (1996)
- (8) 大成博文、"マイクロ・ナノバブルが切り拓く新しい扉"、日本高専学会、日本混相流学会、第1回マイクロ・ナノバブル技術シンポジウム 講演論文集、39-48 (2006)
- (9) 大成博文、"マイクロバブルのすべて"、日本実業出版社、東京、166-279 (2006)
- (10) 大成博文、"マイクロ・ナノバブルの発生機構と光マイクロバブル"、日本高専学会、日本混相流学会、第2回マイクロ・ナノバブル技術シンポジウム 講演論文集、46-53 (2007)
- (11) 高瀬清美、末永寛太、角田 出、"オゾンファインバブルを用いたマボヤの高品質化"、日本水産学会誌、86(4)、328-334 (2020)
- (12) 山口勝己、"養殖ガキの呈味改善用飼料の開発に関する基礎的研究"、科学研費報告書、研究課題/領域番号 05660227、一般研究 C (1993)
<https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-05660227/>
- (13) 大成博文、佐賀孝徳、渡辺勝利、前田邦男、松尾克美、"マイクロバブルの高機能性と水質浄化"、資源処理技術、46、238-244 (2009)
- (14) 大成博文、前田邦男、"マイクロ・ナノバブルによる生物活性技術の開発"、農業電化、57、37-42 (2004)
- (15) M. Takahashi, k. Chiba and P. Li, "Formation of Hydroxyl Radicals by Collapsing Ozone Microbubbles under Strongly Acidic Conditions", J.Phys. Chem.B., 111, 11443-11446 (2007)
- (16) 福永健治、"オゾンの魚類に対する急性毒性の発現機構"、日本医療オゾン研究会、4(2)、1-3 (1997)
- (17) 山元憲一、近藤昌和、半田岳志、中村真敏、"アコヤガイの鰓換水に及ぼすオゾン処理海水の影響"、SUISANZOSHOKU、48(3)、509-516 (2000)
- (18) 高砂熱学工業株式会社、"活性汚泥処理の高性能化技術 オゾン利用排水処理システム" <https://www.tte-net.com/solution/pdf/ozon201704.pdf>
- (19) 三重県 医療保健部 食品安全課 食品衛生班、"かき取扱いに関する指導要領"、<https://www.pref.mie.lg.jp/SHOKUSEI/HP/shokuhinsoudan/35432030830.htm>
- (20) 宮城県 水産業基盤整備課、"生かき生産管理における各作業工程の注意点"、生かき生産管理マニュアル <https://www.pref.miyagi.jp/uploaded/attachment/69088.pdf>
- (21) 小川博美、"カキ衛生と微生物制御"、広島県保健環境センター研究報告、6、1-13 (1998)

本研究の遂行に当たっては、試料となる殻付きマガキの入手および浄化処理については株式会社末永海産の、オゾンファインバブルの発生や性状の調製等についてはタンノ冷機工業株式会社の関係者各位に多大なるご支援を頂いた。ここにお礼申し上げる。また本研究の一部は、平成 28・29 年度 石巻専修大学 共創センター プロジェクト事業「マイクロ・ナノ技術を用いた水産物の高品質化」の支援を受けて行われたことを付記する。

和文要旨

殻付きマガキを、通常の滅菌処理海水 (S-SW)、あるいは、オゾンファインバブル (O-FB) 曝気海水 (気泡粒径: 0.8 - 5.0 μm 、粒子密度: 1.6×10^{16} 個/L) を用いて、8℃の水温下で 48 時間蓄養後、殻を除去し、心臓より採血して、血リンパ内細胞の数および異物取り込み活性を測定するとともに、鰓片を切り取り、同片のほふく運動速度を計測した。また、軟体部全体を均一化した後にトリプトソイ寒天培地を用いて生菌数を計数した。加えて、上記 O-FB 処理がマガキ軟体部の呈味要素であるアミノ酸やコハク酸含有量に及ぼす影響を調べた。その結果、O-FB 曝気海水下での蓄養はマガキ血リンパ内細胞の異物取り込み活性や鰓のほふく運動活性を有意に高めること、軟体部の生細菌数を有意に減少させることが分かった。また、O-FB 処理により殻付きマガキの軟体部のアミノ酸含有量およびコハク酸含有量が有意に増加した。以上のことは、O-FB 処理が殻付きマガキの生理活性向上、並びに、品質向上に極めて有効であることを示唆する。

Key words: オゾンファインバブル (O-FB) 処理、マガキ、生理活性向上、品質向上