(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2006-506065
(P2006-506065A)
(43)公表日　平成18年2月23日(2006.2.23)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A23K 1/18	(2006.01)	A23K	1/18	102B	2B005
A23K 1/16	(2006.01)	A23K	1/16	304B	2B150
		A23K	1/16	304C	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 20 頁）

(21)出願番号	特願2004-551696 (P2004-551696)
(86)(22)出願日	平成15年11月13日 (2003.11.13)
(85)翻訳文提出日	平成17年7月5日 (2005.7.5)
(86)国際出願番号	PCT/US2003/035043
(87)国際公開番号	WO2004/043139
(87)国際公開日	平成16年5月27日 (2004.5.27)
(31)優先権主張番号	60/426,022
(32)優先日	平成14年11月14日 (2002.11.14)
(33)優先権主張国	米国 (US)

(71)出願人　504102530
アドバンスド　バイオニュートリション　コーポレーション
アメリカ合衆国，メリーランド州　２１０４５，コロンビア，ドゥビン　ロード　６４３０－シー
(74)代理人　100079108
弁理士　稲葉　良幸
(74)代理人　100080953
弁理士　田中　克郎
(74)代理人　100093861
弁理士　大賀　眞司

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ワムシ、幼生エビおよび海産濾過食性動物の培養に適する餌料

(57)【要約】
本発明は、ワムシ、エビ、仔魚、および、カキ、二枚貝、軟体動物、イガイなどの他の濾過食性動物を大量生産するための、安価で栄養価の高い餌料源を提供する。本発明は、動物プランクトンの増殖を促進し、それにより、前記動物プランクトンの最終消費者である目標養殖種を増加させるために、蛋白源、例えば酵母、大型藻類生成物および微細藻類生成物の組み合わせを含む餌料を提供する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
酵母および微細藻類、またはそれらの成分を含む水産養殖用餌料。
【請求項２】
平均粒子径が約５μｍ～約１００μｍの範囲である請求項１に記載の水産養殖用餌料。
【請求項３】
前記餌料成分がドライ混合され、微粉末に粉砕されている請求項１に記載の水産養殖用餌料。
【請求項４】
前記酵母は、前記餌料の約３０～約９５パーセント含まれる請求項１に記載の水産養殖用餌料。
【請求項５】
前記酵母は、Saccharomycesspp.、Saccharomyces cerevisiae、Phaffia spp.、Phaffia rhodozyma、Pichia spp.、Pichiapastoris、Kluyveromyces spp.、Kluyveromyces aestuarii、Kluyveromyces marxianusおよびKluyveromycesyarrowiiから選択される請求項２～４のいずれかに記載の水産養殖用餌料。
【請求項６】
前記酵母は、ビール酵母である請求項２～４のいずれかに記載の水産養殖用餌料。
【請求項７】
少なくとも約５重量パーセントの微細藻類源を含む請求項１に記載の水産養殖用餌料。
【請求項８】
微細藻類源は、Tetraselmissp.、Tetraselmis suecica、Myrmecia sp.、Myrmecia bisecta、Lyngbya sp.、Lyngbya majuscula、Cytospora sp.、Scenedesmus sp.、Scenedesmus obliquus、Scytonema sp.、Scytonema hofmanni、Nostoc sp.、Nostoc weissfloggia、Chaetoceros sp.、Chaetoceros lauderi、Ecklonia sp.、Ecklonia maxima、Dunaliella sp.、Dunaliella salina、Dunaliella tertiolecta、Dunaliella bardiwal、Pseudoanabaena sp.、Anabaena sp.、Prorocentrum sp.、Prorocentrum minimum、Polysiphoniasp.、Polysiphonia denudata、Spirulina sp.、Arthrospira sp.、Spirulina platensis、Aphanotheaeosp.、Aphanotheae nidulans、Hydrodictyon sp.、Hydrodictyon reticulatum、Navicula sp.、Naviculadelongei、Phaeodactylum sp.、Phaeodactylum tricornutum、Pseudonitzschia sp.、Nitzschia sp.、Nitzschia navis-varingica、Chlorella sp.、Chlorella pyrenoidosa、Chlorella vulgaris、Chlamydomonas sp.、Chlamydomonas reinhardii、Prennioporia sp.、Prennioporia medullaeparis、Pandorina sp.、Pandorina morum、Isochrysis spp.、Isochrysis galbana、Schizochytrium sp.、Crypthecodinium sp.、Crypthecodinium cohniiおよびThraustochytrium sp.から選択される請求項７に記載の水産養殖用餌料。
【請求項９】
前記微細藻類は、Schizochytriumsp.、Crypthecodinium sp.、Crypthecodinium cohnii、Thraustochytrium sp.およびこれらの成分から選択される請求項７に記載の水産養殖用餌料。
【請求項１０】
プロバイオティック成分をさらに含む請求項１に記載の水産養殖用餌料。
【請求項１１】
前記プロバイオティック成分は、Lactobacillus sp.、Lactobacillus casei、Lactobacillus rhamnosus、Pseudoalteromonas sp.およびPseudoalteromonas undinaから選択される請求項１０に記載の水産養殖用餌料。
【請求項１２】
酵母、微細藻類および大型藻類を含む水産養殖用餌料。
【請求項１３】
平均粒子径が約５μｍ～約１００μｍの範囲である請求項１２に記載の水産養殖用餌料

。
【請求項１４】
前記餌料成分がドライ混合され、微粉末に粉砕されている請求項１２に記載の水産養殖用餌料。
【請求項１５】
前記酵母は、前記餌料の約３０～約９５パーセント含まれる請求項１２に記載の水産養殖用餌料。
【請求項１６】
前記酵母は、Saccharomyces spp.、Saccharomyces cerevisiae、Phaffia spp.、Phaffia rhodozyma、Pichia spp.、Pichia pastoris、Kluyveromyces spp.、Kluyveromyces aestuarii、Kluyveromyces marxianusおよびKluyveromyces yarrowiiから選択される請求項１２～１５のいずれかに記載の水産養殖用餌料。
【請求項１７】
前記酵母は、部分的に消化されている請求項１２～１５のいずれかに記載の水産養殖用餌料。
【請求項１８】
少なくとも約５重量パーセントの大型藻類を含む請求項１２に記載の水産養殖用餌料。
【請求項１９】
大型藻類源は、Tetraselmissp.、Tetraselmis suecica、Myrmecia sp.、Myrmecia bisecta、Lyngbya sp.、Lyngbya majuscula、Cytospora sp.、Scenedesmus sp.、Scenedesmus obliquus、Scytonema sp.、Scytonema hofmanni、Nostoc sp.、Nostoc weissfloggia、Chaetoceros sp.、Chaetoceros lauderi、Ecklonia sp.、Ecklonia maxima、Dunaliella sp.、Dunaliella salina、Dunaliella tertiolecta、Dunaliella bardiwal、Pseudoanabaena sp.、Anabaena sp.、Prorocentrum sp.、Prorocentrum minimum、Polysiphoniasp.、Polysiphonia denudata、Spirulina sp.、Arthrospira sp.、Spirulina platensis、Aphanotheae sp.、Aphanotheae nidulans、Hydrodictyon sp.、Hydrodictyon reticulatum、Navicula sp.、Naviculadelongei、Phaeodactylum sp.、Phaeodactylum tricornutum、Pseudonitzschia sp.、Nitzschia sp.、Nitzschia navis-varingica、Chlorella sp.、Chlorella pyrenoidosa、Chlorellavulgaris、Chlamydomonas sp.、Chlamydomonas reinhardii、Prennioporia sp.、Prennioporia medullaeparis、Pandorina sp.、Pandorina morum、Isochrysis spp.、Isochrysis galbana、Schizochytrium sp.、Crypthecodinium sp.、Crypthecodinium cohniiおよびThraustochytrium sp.から選択される請求項１８に記載の水産養殖用餌料。
【請求項２０】
少なくとも約０．５重量パーセントの大型藻類を含む請求項１２に記載の水産養殖用餌料。
【請求項２１】
大型藻類源は、Laminariaspp.、Padina sp.、Gracillaria sp.およびUlva sp.から選択される請求項２０に記載の水産養殖用餌料。
【請求項２２】
前記大型藻類源は、大型藻類の抽出物を含む請求項２０に記載の水産養殖用餌料。
【請求項２３】
前記大型藻類抽出物は、エタノール抽出生成物を含む請求項２２に記載の水産養殖用餌料。
【請求項２４】
プロバイオティック成分をさらに含む請求項１２に記載の水産養殖用餌料。
【請求項２５】
前記プロバイオティック成分は、Lactobacillus sp.、Lactobacillus casei、Lactobacillus rhamnosus、Pseudoalteromonas sp.およびPseudoalteromonas undinaから選択される請求項２４に記載の餌料。

【請求項２６】
前記酵母は、部分的に消化されている請求項１２に記載の水産養殖用飼料。
【請求項２７】
請求項１に記載の飼料を養殖種に給餌することを含む方法。
【請求項２８】
請求項１に記載の飼料を動物プランクトン種に給餌することを含む方法。
【請求項２９】
前記動物プランクトン種は、ブラインシュリンプ、ワムシ、Artemia spp.、Artemia salina、Artemia franciscana、Brachionus spp.、Brachionus plicatilis、カイアシ類および枝角類から選択される請求項２８に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
優先権主張
この出願は、２００２年１１月１４日に米国特許商標局に「ワムシ、幼生エビおよび海産濾過食性動物の培養に適する飼料(Feed Suitable for Culturing Rotifers, Larval Shrimp, and MarineFilter Feeders)」の名称で出願した米国仮出願第６０／４２６，０２２号に基づく優先権を主張するものであり、そこでの開示はその全体が参照としてここに組み込まれる。
【０００２】
技術分野
本発明は、ワムシ、幼生エビおよび濾過食性動物などの水生生物の飼料に関する。この飼料は、藻類もしくは酵母、または、藻類もしくは酵母の抽出物を含み、水生生物に対して補助栄養、例えば、ビタミンＢ１２などのビタミン類、脂肪酸、アミノ酸、成長因子、抗菌剤および色素などを与えることができる。
【背景技術】
【０００３】
過去２０年にわたって、水産養殖は最も成長の速い経済事業の一つに数えられるようになってきた。水産養殖の生産量は、地球人口の増大によってもたらされる将来の需要を満たすために、急速に拡大すると予想される。しかしながら、研究者らは、乱獲により全ての漁業産業が衰退している状況では、天然魚の漁獲量が拡大する可能性は殆どないと考えている。さらに、技術的なブレークスルーがなされなければ、水産養殖の拡大は、予想される需要を満たすに十分であるとはみられていない。その結果、シーフードの供給に対する要求は、乱獲、生息地の破壊および汚染によって天然魚資源が着実に減少することと関連して、魚の養殖業者や孵化場の生産能力を増大させ強化するように働いている。しかしながら、不十分な生餌の給餌や餌の品質低下に因る海産仔稚魚の生存率の低さや成長の遅さが、商業的に重要な海産養殖の魚種に対して要求されている発展を阻んでいる。商業生産規模においては、成長と生存率が最適化されていないことは、タンクスペースの追加や仔稚魚飼育期間の延長、および、それに伴う運転経費の増大（すなわち、ビジネスとして生き残るか失敗するかの相違）を意味する。
【０００４】
海産養殖の発展強化に支障となることの一つは、商業的に重要な海産魚種の多くが、最初の飼料（仔魚飼育）として生きた生物を必要とすることである。人工の代替物を開発しようとする広範な努力（ダブロウスキー（Ｄａｂｒｏｗｓｋｉ）およびカルバー（Ｃｕｌｖｅｒ）１９９１；カナザワ（Ｋａｎａｚａｗａ）１９９２）にもかかわらず、孵化場は未だ生餌、主に各種の微細藻類、ワムシのBrachionus plicatilisおよびブラインシュリンプのAltemia salinaまたはAltemia franciscanaに大きく頼っている。魚類と甲殻類の孵化場で使用されている全ての生餌の中で、ブラインシュリンプは、実用上の便利さと入手のしやすさのために、主要な飼料品目となっている。今日、ブラインシュリンプは、乾燥卵で年間２０００トンを超える生産量で、主に天然から収穫されている。それにもかか

わらず、Altemia卵の市場の大部分は、今なお、一箇所、グレート・ソルト・レイクから供給されている。この状況は、この湖の気候や生態系の変化に対して、市場を極めて脆弱なものにしており、このことは過去４年間において卵が異常な低収穫であったことで例示されている。結果として、価格は、乾燥卵１ｋｇ当たり２０～４０ドルの適度な範囲から、１ｋｇ当り８０～１００米ドルへと跳ね上がり、全ての魚介類養殖業に深刻な影響を与えた。他の主要な支障は、新たに孵化したブラインシュリンプの幼生は、大部分の海産魚類の仔魚には摂取できず、したがって、そのような仔魚にはより適切なプランクトン性の代替物を給餌しなければならない、ということにある。

【０００５】

多くの海産魚と無脊椎動物は、ワムシが最も豊富で支配的な動物プランクトンである河口で幼生期間を過ごす。何百年以上もかけて、この自然の生態系の群集が生み出された結果、多くの仔稚魚と無脊椎動物はワムシを捕食し、栄養として利用するように適応してきた。ワムシのプランクトンとしての性質、それらの幅広い環境条件への適応性、高い再生産率（０．７～１．４子孫／メス／日）、数年間休眠できる耐久卵を生産する能力、より小さいサイズ（ロリカ長１００～５００μｍ）および遅い遊泳速度は、海産幼生の養殖用として理想的な生餌候補である。海産魚類の仔魚期に、ワムシを生餌生物として使用することに成功したことによって、制御された条件でワムシを大量培養するための改良研究が盛んになっている。実際、最初の大量培養の試行から２５年後、ワムシは世界中で大量に生産されており、６０種を超える海産魚、数種の淡水魚および１８種の甲殻類の孵化場における生産の成功に寄与している（ナガタ（Ｎａｇａｔａ）およびホワイト（Ｗｈｙｔｅ）１９９２）。しかしながら、ワムシの培養が有している最大の発展性は、近年、日本およびヨーロッパで成功裡に実施されているように、濃縮微細藻類の餌と酸素補給を行うことによって、これらを非常に高密度（２，０００～１０，０００個体／ｍＬ）で培養できる可能性にある（ヨシムラ（Ｙｏｓｈｉｍｕｒａ）ら１９９４）。高密度でも、ワムシは急速に再生され、商業的な幼生養殖の試行を開始する前の比較的短い期間に、大量の生餌を供給することに貢献する。

【０００６】

生きた藻類による従来の培養法によっては、今後の水産養殖のニーズおよび天然資源増進計画のために、海産魚の仔稚魚および甲殻類を期待する数だけ生産することはできない。従来法では、ワムシを一般に１００～３００個体／ｍｌの低密度に維持し、生きた微細藻類を補った、主として酵母ベースの低品質製品を給餌するために、１００～１０００m^3の大容積のタンクを必要とする（キタジマ（Ｋｉｔａｊｉｍａ）１９８３）。その結果、他の全ての目的よりもワムシの培養のために、さらに２～３倍のタンクスペースが必要となる（ヨシムラ（Ｙｏｓｈｉｍｕｒａ）ら１９９６）。したがって、従来の孵化場では、マンパワーとタンクスペースの９０％までが、生餌の生産に使用される。さらに、最近、いくつかの孵化場から、水質や環境条件の何らかの変化が原因と考えられるワムシのかなりの減産が報告されている（ヨシムラ（Ｙｏｓｈｉｍｕｒａ）ら１９９６）。実際、ワタナベ（Ｗａｔａｎａｂｅ）（ワタナベ（Ｗａｔａｎａｂｅ）ら１９８３ａ；ワタナベ（Ｗａｔａｎａｂｅ）ら１９８３ｂ）は、先ずワムシとそれらの餌料の集約的培養を確立しないことには、海産仔稚魚の養殖はさほど発展しないであろうと述べている。こうして、仔稚魚の生産は、事実上、生きた藻類とワムシの入手量によって限られるということが広く受け入れられてきている（ヒラタ（Ｈｉｒａｔａ）ら１９８３；フクショ（Ｆｕｋｕｓｈｏ）およびヒラヤマ（Ｈｉｒａｙａｍａ）１９９２）。

【０００７】

水産養殖用餌料として使用するのに適した粒子状材料を微生物バイオマスから製造する方法は、米国特許第６，１０３，２２５号明細書、同第６，４５１，５６７号明細書および同第６，３７２，４６０号明細書（バークレー（Ｂａｒｃｌａｙ）２０００；バークレー（Ｂａｒｃｌａｙ）２００２；グラデュー（Ｇｌａｄｕｅ）およびベーレンス（Ｂｅｈｒｅｎｓ）２００２）に開示されている。これらの方法には、ＤＨＡ残分の含有量が高い藻類の細胞を発酵させる方法が記載されている。これらの開示の主要な目的は、Artemia

またはワムシのＤＨＡレベルを高め、その後、仔稚魚のＤＨＡレベルを高めることである。濾過食性動物のような生物に対しては、材料は微小な粒子として供給でき、ＤＨＡを直接強化した餌料を与えることができる。ThraustochytriumおよびSchizochytriumおよびCrypthecodiniumsp.およびこれらの混合物から選択される微細植物を含むＤＨＡ強化水産養殖用餌料は、水産養殖に有用であり、特に幼生エビおよび軟体動物の餌料として有用である（バークレー（Ｂａｒｃｌａｙ）２０００；グラデュー（Ｇｌａｄｕｅ）およびベーレンス（Ｂｅｈｒｅｎｓ）２００２）。藻類細胞の凝集サイズは小さいので、微細植物は、幼生エビ、ブラインシュリンプ、ワムシおよび軟体動物に摂取され得る（ラングドン（Ｌａｎｇｄｏｎ）ら１９９９）。別のアプローチとして、本発明は、水産養殖餌料として栄養強化した酵母の使用を開示する。栄養強化した酵母は、部分的に消化した酵母または薄い細胞壁を有する酵母を選択し、ＤＨＡ生産微細藻類などの水産養殖に使用されるある種の微細藻類と微細藻類抽出物との混合物を含むことによって得られ、こうして、完全で高栄養の水産養殖用餌料を配合することができる。酵母と発酵液中で成長した微細植物または光合成自己栄養成長性藻類をベースとするこれらの藻類餌料は、ワムシ、ブラインシュリンプ、エビの幼生、二枚貝、イガイおよび軟体動物用の餌料として使用するのに適している。上述したように、そのような条件で成長した微細植物の細胞の大きさは、通常、約５０μｍ未満である。

【０００８】

仔稚魚用餌料を、従属栄養菌由来の成分、藻類および酵母からのみ配合することができれば、孵化場で生きた藻類を生産することや、天然魚から得られるミールおよびオイルを使用することが、ともに必要なくなる。これらの藻類由来の餌料は、現在用いられている餌料よりはるかに安価であろう。商業的孵化場でこれらを使用した場合には、十分な量の藻類が培養されることによってコストが低減され、操業効率が向上し、それによって水産養殖の生産が増大することになろう。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【０００９】

本発明は、酵母および微細藻類、またはそれらの成分を含む水産養殖用餌料を提供する。平均粒子径は、約５μｍ～約１００μｍの範囲であってよく、餌料成分はドライ混合し、微粉末に粉砕することができる。酵母は、餌料の約３０～約９５パーセント含むことができる。適した酵母としては、Saccharomyces spp.、Saccharomyces cerevisiae、Phaffia spp.、Phaffia rhodozyma、Pichia spp.、Pichia pastoris、Kluyveromyces spp.、Kluyveromyces aestuarii、Kluyveromyces marxianusおよびKluyveromyces yarrowiiが挙げられるが、これらに限定されるものではない。酵母は、ビール酵母であってもよい。

【００１０】

本餌料は、少なくとも約５重量パーセントの微細藻類を含むことができる。適した藻類としては、Tetraselmis sp.、Tetraselmis suecica、Myrmecia sp.、Myrmecia bissecta、Lyngbyasp.、Lyngbya majuscula、Cytospora sp.、Scenedesmus sp.、Scenedesmus obliquus、Scytonema sp.、Scytonema hofmanni、Nostoc sp.、Nostoc weissfloggia、Chaetoceros sp.、Chaetoceros lauderi、Ecklonia sp.、Ecklonia maxima、Dunaliella sp.、Dunaliella salina、Dunaliella tertiolecta、Dunaliella bardiwal、Pseudoanabaena sp.、Anabaena sp.、Prorocentrumsp.、Prorocentrum minimum、Polysiphonia sp.、Polysiphonia denudata、Spirulina sp.、Arthrospirasp.、Spirulina platensis、Aphanotheae sp.、Aphanotheae nidulans、Hydrodictyon sp.、Hydrodictyon reticulatum、Navicula sp.、Navicula delongei、Phaeodactylum sp.、Phaeodactylum tricornutum、Pseudonitzschia sp.、Nitzschia sp.、Nitzschia navis-varingica、Chlorellasp.、Chlorella pyrenoidosa、Chlorella vulgaris、Chlamydomonas sp.、Chlamydomonas reinhardii、Prennioporia sp.、Prennioporia medullaeparis、Pandorina sp.、Pandorinamorum、Isochrysis spp.、Isochrysis galbana、Schizochytrium sp.、Crypthecodinium sp.、Crypthecodinium cohniiおよびThraustochytrium sp.が挙げられるが、これらに限定されるもので

はない。適した微細藻類には、また、Schizochytrium sp.、Crypthecodinium sp.、Crypthecodinium cohnii、Thraustochytrium sp.およびこれらの成分も挙げられるが、これらに限定されるものではない。餌料は、また、プロバイオティック成分を含んでいてもよい。適したプロバイオティック成分としては、Lactobacillus sp.、Lactobacillus casei、Lactobacillus rhamnosus、Pseudoalteromonas sp.およびPseudoalteromonas undinaが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【００１１】

一実施形態においては、水産養殖用餌料は、酵母、微細藻類および大型藻類を含むことができる。平均粒子径は約５μｍ～約１００μｍの範囲であってよく、餌料成分はドライ混合し、微粉末に粉砕することができる。酵母は、餌料の約３０～約９５パーセント含むことができる。適した酵母としては、Saccharomyces spp.、Saccharomyces cerevisiae、Phaffia spp.、Phaffiarhodozyma、Pichia spp.、Pichia pastoris、Kluyveromyces spp.、Kluyveromyces aestuarii、Kluyveromyces marxianusおよびKluyveromyces yarrowiiが挙げられるが、これらに限定されるものではない。酵母は部分的に消化されていてもよい。

【００１２】

本餌料は少なくとも約５重量パーセントの大型藻類を含んでいてもよい。適した大型藻類としては、Tetraselmis sp.、Tetraselmis suecica、Myrmecia sp.、Myrmecia bisecta、Lyngbyasp.、Lyngbya majuscula、Cytospora sp.、Scenedesmus sp.、Scenedesmus obliquus、Scytonemasp.、Scytonema hofmanni、Nostoc sp.、Nostoc weissfloggia、Chaetoceros sp.、Chaetoceros lauderi、Eckloniasp.、Ecklonia maxima、Dunaliella sp.、Dunaliella salina、Dunaliella tertiolecta、Dunaliella bardiwal、Pseudoanabaena sp.、Anabaena sp.、Prorocentrum sp.、Prorocentrum minimum、Polysiphoniasp.、Polysiphonia denudata、Spirulina sp.、Arthrospira sp.、Spirulina platensis、Aphanotheaesp.、Aphanotheae nidulans、Hydrodictyon sp.、Hydrodictyon reticulatum、Navicula sp.、Navicula delongei、Phaeodactylum sp.、Phaeodactylum tricornutum、Pseudonitzschia sp.、Nitzschiasp.、Nitzschia navis-varingica、Chlorella sp.、Chlorella pyrenoidosa、Chlorellavulgaris、Chlamydomonas sp.、Chlamydomonas reinhardii、Prennioporia sp.、Prennioporia medullaeparis、Pandorina sp. 、Pandorina morum、Isochrysis spp.、Isochrysis galbana、Schizochytrium sp.、Crypthecodinium sp.、Crypthecodinium cohniiおよびThraustochytrium sp.が挙げられるが、これらに限定されるものではない。水産養殖用餌料は、Laminariaspp.、Padina sp.、Gracillaria sp.およびUlva sp.から選択される大型藻類を、少なくとも約０．５重量パーセント含んでいてもよい。大型藻類は、大型藻類の抽出物を含んでいてもよく、これはさらに、エタノール抽出生成物を含んでいてもよい。この餌料は、また、プロバイオティック成分を含んでいてもよい。適切なプロバイオティック成分としては、Lactobacillussp.、Lactobacillus casei、Lactobacillus rhamnosus、Pseudoalteromonas sp.およびPseudoalteromonas undinaが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【００１３】

本発明は、また、養殖種に上記餌料を給餌することを含む方法を提供する。

【００１４】

本発明は、さらに、動物プランクトン種に上記餌料を給餌することを含む方法を提供する。適した動物プランクトン種としては、ブラインシュリンプ、ワムシ、Artemia spp.、Artemia salina、Artemia franciscana、Brachionus spp.、Brachionusplicatilis、カイアシ類および枝角類が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【発明を実施するための最良の形態】

【００１５】

概要

本発明の目的は、ワムシ（ｒｏｔｉｆｅｒ）、エビ、仔魚、および、カキ、二枚貝、軟体動物、イガイなどの他の濾過食性動物の大量生産のために、細菌、藻類および／または

酵母の発酵による安価で栄養価の高い飼料源を提供することにある。現在、海産魚の養殖に対する障害は、エネルギーと労働の高コスト（ボルトン（Ｂｏｌｔｏｎ）およびフルクス（Ｆｕｌｋｓ）によれば全運転コストの８５％まで（ボルトン（Ｂｏｌｔｏｎ）１９８２；フルクス（Ｆｕｌｋｓ）およびメイン（Ｍａｉｎ）１９９２））と高品質の藻類を培養することに関連する操業上の難しさにある。孵化場が１年を通じて十分な量の藻類を供給することが困難であることはしばしばである。単細胞藻類は、一般に、光合成自己栄養性であり、そうしたものであるから、二酸化炭素を有機炭素に還元し、酸素を放出する光合成を行うために光を必要とする。孵化場では、通常、屋内の藻類培養に電気照明を使用しているか、または、気候条件が許せば、藻類を屋外タンクで培養することができる。しかしながら、細胞の密度と成長速度は、培養液中への光の浸透によって制限される。光合成自己栄養培養法は、エネルギー的に非効率であり、コストがかかり、孵化場は藻類培養システムを維持管理するのに熟練者を雇用しなければならない。

【００１６】

ワムシ、エビ、仔魚および濾過食性動物に、光合成または従属栄養で培養した細菌、藻類および酵母から製造される、安価で高品質の乾燥飼料を提供することが、本発明の目的の一つである。

【００１７】

ワムシ、エビ、仔魚および濾過食性動物に、消化性の高い乾燥酵母を提供することが、本発明の目的の一つである。この酵母は、セルラーゼで部分消化したパン酵母、または、薄く容易に消化できる細胞壁を有するビール酵母であってもよい。

【００１８】

ワムシ、エビの幼生および濾過食性動物に、ある種の淡水種および海水種の藻類を光合成または従属栄養で培養したものを提供することが、本発明の目的の一つである。微細藻類の例としては、淡水性Chlorella sp.、海水性Chlorella(Nannochloropsis oculata)Tetraselmis sp.、Caetocerossp.、Crypthecodinium sp.、Schizochytrium sp.、Chlorella spp.(Chlorella vulgarisk-22などであるが、これに限定されるものではない）およびIsochrysis galbana（T-イソ　クローン）が挙げられるが、これらに限定されるものではない。これらの藻類は、栄養価が高く、人工培養が容易なことから、水産養殖業に広く使用されており、また、ワムシの飼料源としても広く使用されている（ヘルナンデス（Ｈｅｒｎａｎｄｅｚ）ら１９８６；ナガタ（Ｎａｇａｔａ）およびホワイト（Ｗｈｙｔｅ）１９９２；ベルギネリ（Ｖｅｒｇｉｎｅｌｌｉ）ら１９９４；リー（Ｌｉｅ）ら１９９７；プラナス（Ｐｌａｎａｓ）およびクンハ（Ｃｕｎｈａ）１９９９）。Crypthecodinium cohniiおよびSchizochytrium sp.は、例外的に、海産魚の仔稚魚の飼料において必須の脂肪酸サプリメントであるドコサヘキサエン酸（ＤＨＡ、２２：６ｎ－３）を高濃度で含有している（カナザワ（Ｋａｎａｚａｗａ）（カナザワ（Ｋａｎａｚａｗａ）１９９３）およびワタナベ（Ｗａｔａｎａｂｅ）（ワタナベ（Ｗａｔａｎａｂｅ）１９９３）によるレビュー）。

【００１９】

ワムシ、エビの幼生および濾過食性動物に、藻類のビタミンB_{12}を添加した廃水共生成物（最大で４００μｇ／１００ｇ乾燥物まで）を提供することが、本発明の目的の一つである。より具体的には、これらの飼料には、ドコサヘキサエン酸（ＤＨＡ、２２：６ｎ－３）やアラキドン酸（ＡＲＡ、２０：４ｎ－６）などの必須脂肪酸に豊富なリン脂質が含有された藻類由来の生成物を補うことができる。

【００２０】

ワムシ、エビの幼生および他の濾過食性動物に、乾燥した大型藻類のミール、または、これらの方法に限定されるものではないが、例えば、大型藻類バイオマスをエタノールもしくは熱水で抽出する方法によって得られた抽出物を提供することが、本発明の目的の一つである。これらの抽出物は、さらに必須成長因子、抗菌剤、静菌性化合物、色素および必須アミノ酸を含むことができる。大型藻類としては、Laminaria sp.、Padina sp.およびGracillaria sp.などが例示できるが、これらに限定されるものではない。

【００２１】
定義
本発明の記述には、以下に記載する定義に従って、次の用語が使用されている。
【００２２】
ここで使用されている「動物プランクトン」（複数形）もしくは「動物プランクトン」（単数形）という用語は、３つの主要な無脊椎動物グループ、すなわち、ワムシ、カイアシ類および枝角類、のメンバーを意味する。これらの３つの主要グループは全て、外洋性（開水面）、沿岸性（植物性）および底生性（底）環境に適応した種を有しており、淡水環境および海水環境双方に広く分布している。
【００２３】
ここで使用されている「ワムシ」という用語は、しばしば高速回転する輪のような外観を与える強い繊毛の輪を有する伸縮自在な円盤の形の前端を有する、微細で、通常顕微鏡サイズであるが、しかし多細胞の水生無脊椎動物の網を意味する。ワムシは、幼生初期の水生動物に対する生餌源として使用される。
【００２４】
ここで使用されている「ブラインシュリンプ」という用語は、節足動物門甲殻網に属するArtemia系統のものを意味する。これらの小さな甲殻類は、世界中の塩湖や海水池で見出される。Artemiaブラインシュリンプは、水生仔魚の初期および後期の生餌源として使用される。
【００２５】
ここで使用されている「水産養殖用餌料」という用語は、動物プランクトンや水生仔魚の培養、養殖に使用される微粉末状の乾燥餌料を意味する。
【００２６】
ここで使用されている「藻類餌料」という用語は、藻類成分のいずれかの部分を含む乾燥餌料形態を意味する。
【００２７】
ここで使用されている「強化餌料」という用語は、乾燥または湿潤状のいずれかの餌料を意味し、水生動物プランクトンの収穫に先立つ短期間に、これらの動物プランクトンに餌料を与えた際に水生仔魚に必須栄養素を提供する目的で、使用されるものである。
【００２８】
「濾過食性動物」という用語は、何らかの機構により微小な粒子もしくは生物を分離することによって、餌を水生媒体から摂取する無脊椎動物を意味する。
【００２９】
「大型藻類」という用語は、一生の内の少なくともある段階で、肉眼により容易に認識できる大きな構造体を形成する藻類を意味する。通常、これらの生物は、二次的な維管束や器官を有している。大型藻類を含む異なるグループとしては、これらに限定されるものではないが、chlorophyta、rhodophytaおよびphaeophytaが例示される。
【００３０】
「微細藻類」という用語は、多くの異なる種に分類される原核細胞性および真核細胞性藻類を意味する。通常、原核細胞性藻類は、藍色細菌または藍藻類と称する。真核細胞性藻類は多くの属に分類されており、その属のいくつかは大型藻類と重なっていて、それらとはサイズと特定の器官の欠如によって区別される（それらも分化した細胞タイプを有してはいるが）。微細藻類を含む異なるグループとしては、これらに限定されるものではないが、chlorophyta、rhodophyta、phaeophyta、dinophyta、euglenophyta、cyanophyta、prochlorophytaおよびcryptophytaが例示される。
【００３１】
「ビール酵母」という用語は、ビール、ワインまたは他の発酵製品の製造によく使用される酵母に由来する酵母生成物と定義される。そのような酵母には、Saccharomyces cerevisiae、Saccharomyces carlsbergensis、Saccharomyces diastaticus、Saccharomyces uvarum、Saccharomyces bayanusおよびKluyveromyces sp.などが含まれるが、これらに限

定されるものではない。
【００３２】
発明の実施形態
ワムシおよびブラインシュリンプの生産
ワムシおよびブラインシュリンプの培養システムは、実効容積が各２０～２０００Ｌのファイバグラスタンクを含む。このシステムは、２００～１０，０００個体／ｍＬの範囲の密度で、ワムシ５×１０^{9}個／日／タンクまでの生産が、あるいは、ブラインシュリンプ湿潤バイオマス１０ｋｇ／日／タンクまでの生産が可能である。温度は各タンク毎にサーモスタットヒーターで、ワムシの系統に応じて２８～３２℃に調整される。ｐＨコントローラは、各培養タンク毎に連続的にｐＨを監視し、ペトリ（Ｐｅｔｒｉ）ポンプによって１０％塩酸（ＨＣｌ）を自動的に注入し、ｐＨを６．５～７．０の間に制御する。あるいは、ヒドロキシメタンスルホン酸ナトリウムを含む緩衝液を注入し、アンモニアを無毒の形態に維持する。ワムシの成長と生殖の速度は高濃度の毒性を有するイオン化アンモニア（ユ（Ｙｕ）およびヒラヤマ（Ｈｉｒａｙａｍａ）、１９８６に報告されているように、例えば、７．８ｍｇ／Ｌを超える濃度）に敏感であるため、培養液は、特に高密度培養システムでは、ｐＨをわずかに酸性に維持する。
【００３３】
餌料は各培養タンクに手動、またはペトリ（Ｐｅｔｒｉ）計量ポンプを使って連続的に配給する。藻類餌料および他のサプリメントの一日分の量を、冷却（０～４℃）した速度の遅い攪拌装置付懸濁容器に保存してもよい。ワムシは、培養容積の３分の１までを毎日交換して、別の収穫タンクに連続的に収穫し、その後、仔稚魚に給餌する前に、必須栄養素でさらに強化する。
【００３４】
ワムシまたはブラインシュリンプの密度が増加し、それに伴い給餌量と有機負荷が増大すると、酸素が不足することが予想される。従って、酸素ボンベまたは酸素発生器から、純酸素を各タンクにエアーストーンを通して拡散させ、最小酸素レベルを３ｐｐｍに維持する。培養密度が高いと、粒子状有機物質や混入した原生動物が蓄積される可能性があり、その場合、生産に影響したり収穫時にプランクトンネットが詰まるおそれがある。したがって、ワムシもしくはブラインシュリンプの培養液は、ナイロンのマットフィルタ（１ｃｍ厚さ）を通して連続的に循環させる。このような簡単な濾過システムでも、最小限の損失で固形物を効果的に除去し、培養成績を安定化させる（ヨシムラ（Ｙｏｓｈｉｍｕｒａ）ら、１９９６；ヨシムラ（Ｙｏｓｈｉｍｕｒａ）ら、１９９５）。
【００３５】
藻類餌料の配合
ビール酵母または部分的に加水分解したパン酵母（少なくとも細胞壁の外層は、酵素的または化学的に消化されている）は、ブラインシュリンプおよびワムシに消化性の高い栄養物を供給する。藻類餌料の組成における酵母含有量は、餌料の３０％～９５％、より好ましくは７０％～９０％の範囲である。本発明は、それらを食する動物の消化酵素には到達可能であるが、細胞壁は細胞の内容物が消費される前に水の中に出てしまうことのないようにそのままの状態が維持される酵母を提供する。
【００３６】
乾燥パン酵母は、これらに限定されるものではないが、セルラーゼまたはマンナーゼなどの酵素または化学薬剤を使用して製造される。適した酵素とそれらの使用条件（ｐＨ、濃度、温度および培養期間など）は、当業者に知られている（ラベンス（Ｌａｖｅｎｓ）ら１９９２）。
【００３７】
長鎖ポリ不飽和脂肪酸に富む微細藻類は、必須脂肪酸、特にＤＨＡ、ＡＲＡおよびＥＰＡの供給源として提供される（バークレー（Ｂａｒｃｌａｙ）およびゼラー（Ｚｅｌｌｅｒ）１９９６；キュレ（Ｃｕｒｅ）ら１９９６；フルイタ（Ｆｕｒｕｉｔａ）ら１９９８；アブ－レスク（Ａｂｕ－Ｒｅｚｑ）ら２００２；プレース（Ｐｌａｃｅ）およびハレル

（Ｈａｒｅｌ）２００２ａ；プレース（Ｐｌａｃｅ）およびハレル（Ｈａｒｅｌ）２００２ｂ）。ＤＨＡに富む藻類の含有量は、餌料の０．５％～５０％の範囲であり、より好ましくは餌料の５％～２０％である。ＤＨＡ（ドコサヘキサエン酸）は、仔魚の成長や生存率に大きく寄与する重要な栄養素であると認められてきている（キュレ（Ｃｕｒｅ）ら１９９６）。仔魚は、ポリ不飽和脂肪酸を高レベルで含む藻類の直接給餌、または、藻類によってポリ不飽和脂肪酸に富むようになったワムシやブラインシュリンプを給餌することによって、最終的に藻類からのこれらの脂肪酸を摂取する（バークレー（Ｂａｒｃｌａｙ）およびゼラー（Ｚｅｌｌｅｒ）１９９６）。ＤＨＡに富む微細藻類は、発酵体の中で、糖をエネルギー源として使用するか、または光合成で生産される。これらの藻類はワムシの成長と再生に必須なビタミンB_{12}が強化され、生産期間中は少なくとも２００μｇ／１００ｇ乾燥物を含有する。

【００３８】

アラキドン酸（ＡＲＡ）に富む微細藻類または真菌類は必須脂肪酸源として供給される。ＡＲＡに富む藻類の含有量は、餌料の０．５％～１０％の範囲であり、より好ましくは餌料の２％～８％である。ＡＲＡは、仔魚の成長や生存率ばかりでなく、浸透性の調節やストレスに対する抵抗に大きく寄与する重要な栄養素であると認められてきている。

【００３９】

プロバイオティックまたはプレバイオテック菌（例えば、Lactobacillus sp.、Bacillus sp.、Bifidobacterium sp.およびEnterococcussp.など）が、０．０１％～５％の範囲で添加される。これらの細菌は生物の腸にコロニーを作るか、または有益な活性もしくは栄養素を分配する働きをする。そのようなプロビオントは、摂取する動物のストレスを和らげ、病原体の負荷を減少させるであろう。

【００４０】

大型藻類抽出物もまた、約０．１％～約１０％、より好ましくは約０．５％～約１％の範囲で組成に含まれる。これらの抽出物は、ワムシやブラインシュリンプに、さらに追加の必須成長因子、抗菌性および静菌性化合物、色素、並びに、必須アミノ酸を与える。

【００４１】

藻類は全て、生産過程でビタミンB_{12}が強化される。これは、ワムシのBrachionus plicatilisが、餌料中に約１００～２００μｇ／１００ｇ乾燥物の量のビタミンB_{12}を要求するからである（ヒラヤマ（Ｈｉｒａｙａｍａ）ら１９８９；ヒラヤマ（Ｈｉｒａｙａｍａ）およびマルヤマ（Ｍａｒｕｙａｍａ）１９９１；マルヤマ（Ｍａｒｕｙａｍａ）およびヒラヤマ（Ｈｉｒａｙａｍａ）１９９３）。藻類の栄養価は、藻類に３種の脂溶性ビタミン（ビタミンＡ、ＤおよびＥ）とビタミンＣを強化することによって、さらに高められる。これらビタミンは全てサプリメント効果を示し、ワムシの増殖率を大きく増大させた（サツイト（Ｓａｔｕｉｔｏ）およびヒラヤマ（Ｈｉｒａｙａｍａ１９８６；サツイト（Ｓａｔｕｉｔｏ）およびヒラヤマ（Ｈｉｒａｙａｍａ１９９１）。

【実施例】

【００４２】

次に本発明の実施形態を以下の実施例によりさらに詳細に記載する。これらの実施例は、選択された本発明の実施形態をより完全に記載するための助けとすることを単に意図するものであって、本発明の特許請求の範囲を制限するものと決して考えるべきものではない。

【００４３】

実施例１．ワムシ培養用藻類餌料の配合

ビール乾燥酵母は、米国、イリノイ州、ペキンのウィリアム・バイオプロダクツ（Ｗｉｌｌｉａｍ　Ｂｉｏｐｒｏｄｕｃｔｓ）より購入した。ＤＨＡに富むSchizochytrium sp.は、米国、メリーランド州、コロンビアのアドバンスド・バイオニュートリション・コーポレーション（Ａｄｖａｎｃｅｄ　ＢｉｏＮｕｔｒｉｔｉｏｎ　Ｃｏｒｐ．）から入手した。Padinasp.乾燥粉末抽出物は、ＩＣＰ（マルタ（Ｍａｌｔａ））から入手した。

【００４４】

成分を表１に示す割合で混合してワムシ用餌料を配合した。全ての成分を、乾燥重量基準で混合し、ミルで粉砕して、約５～約１５μｍのサイズの微粒子を製造した。

【００４５】

【表１】

表1. ワムシ用餌料組成物(g乾燥重量／100g)

ビール酵母	90
Schizochytrium sp.	9
Padina sp.	1

【００４６】

ワムシに、ワムシ１００万個当たり１日量０．５ｇ乾燥物で連続的に給餌した。ワムシを、毎日、全培養容積の３０～５０％を交換することによって、連続的に収穫した。温度、酸素量、全てのフリーのアンモニア、並びに、ｐＨを、前記概略のように連続的に監視した。ワムシは、仔稚魚、甲殻類または他の水生生物の生餌として直接使用した。

【００４７】

実施例２．ブラインシュリンプ用藻類餌料の配合

ＤＨＡに富むCrypthecodinium sp.およびTetraselmis sp.は、ＡｑｕａＧｒｏｗ（登録商標）の商標名で製造されたものである。他の全ての成分は、実施例１で示したように入手し、表２にしたがって調製した。

【００４８】

【表２】

表2. ブラインシュリンプ用餌料組成(g乾燥重量／100g)

ビール乾燥酵母	50
部分的消化パン酵母	40
Crypthecodinium sp.	5
Tetraselmis sp.	5

【００４９】

ブラインシュリンプへの給餌を、最初、１日分の給餌量を体重の１００％として、孵化約８時間後（２齢幼生期）に開始した。１日の給餌量を、毎日１０％ずつ減少させ、必要な大きさに達したときに、培養タンクから部分的に収穫することができる。完全な収穫は、孵化後１０日目、ブラインシュリンプがタンク中で最大のサイズ、または、最大のバイオマスに達したときに、行うことができる。温度、酸素量、全てのフリーアンモニア、並びに、ｐＨを、前記概略のように連続的に監視した。

【００５０】

実施例３．イガイ用藻類餌料の配合

スプレードライしたSpirulina sp.は、ハワイ州、カイルアーコナ（Ｋａｉｌｕａ－Ｋｏｎａ，ＨＩ）のシアノテック・コーポレーション（Ｃｙａｎｏｔｅｃｈ　Ｃｏｒｐ．）から入手した。他の全ての成分は、実施例１および２で示したように入手し、表３にしたがって調製した。乾燥ミールを混合し、５０μｍ未満の微粒子に粉砕した。

【００５１】

【表３】

表3. イガイ用餌料組成(g乾燥重量／100g)

ビール乾燥酵母	83
Crypthecodinium sp.	5
Schizochytrium sp.	5
Padina sp. 抽出物	2
Spirulina sp.	5

【００５２】

イガイ（M.galloprovincialis）の幼生を、一水槽当たり２０個体の密度で、２５Ｌのプラスチック水槽に入れる。培養系は、閉鎖循環水システムに組み込まれており、バイオフィルタ、１０μｍメッシュフィルタおよびＵＶ処理装置を具備している。温度は２４～２６℃に維持する。藻類ミールを水に懸濁し、ブレンダで激しく混合し、１日に２回、全量で２ｍｇ／Ｌとなるようにイガイに与える。この動物の成長速度および生存率を、週ベースでモニターする。

【００５３】

実施例４．エビ幼生用藻類餌料の配合

Chaetoceros sp. は、フォトバイオリアクター中、５０％インスタント・オーシャン（Ｉｎｓｔａｎｔ　Ｏｃｅａｎ）培地で、標準の照明と文献（ディー・ソウザ（Ｄ’Ｓｏｕｚａ）ら２００２）で知られている方法により培養する。Ｌａｍｉｎａｒｉａ抽出物は、カリフォルニア州、メンローパークのパシフィック・スタンダード・ディストリビューターズ・インコーポレイテッド（Ｐａｃｉｆｉｃ　Ｓｔａｎｄａｒｄ　Ｄｉｓｔｒｉｂｕｔｏｒｓ　Ｉｎｃ）より入手する。全ての成分は、実施例１および２で示したように入手し、表４にしたがって調製した。乾燥ミールを混合し、５０μｍ未満の微粒子に粉砕した。

【００５４】

【表４】

表4. 幼生エビ用餌料組成(g乾燥重量／100g)

部分消化パン酵母	83
Crypthecodinium sp.	5
Laminaria sp. 抽出物	2
Chaetoceros sp.	5

【００５５】

幼生期のエビ（Penaeus vannameiまたはLitopenaeus vannamei）を、一水槽当たり５０個体の密度で、２５Ｌのプラスチック水槽に入れる。培養系は、閉鎖循環水システムに組み込まれており、バイオフィルタ、１０μｍメッシュフィルタおよびＵＶ処理装置を具備している。温度は２４～２６℃に維持する。藻類ミールを水に懸濁し、ブレンダで激しく混合し、１日に２回、全量で２ｍｇ／Ｌとなるように幼生に与える。この動物の成長速度および生存率を、週ベースでモニターする。

【００５６】

実施例５．ワムシ培養用藻類餌料の配合

乾燥ビール酵母は、米国、イリノイ州、ペキンのウィリアム・バイオプロダクツ（Ｗｉｌｌｉａｍ　Ｂｉｏｐｒｏｄｕｃｔｓ）より購入した。ＤＨＡに富むSchizochytrium sp.

は、米国、メリーランド州、コロンビアのアドバンスド・バイオニュートリション・コーポレーション（Ａｄｖａｎｃｅｄ　ＢｉｏＮｕｔｒｉｔｉｏｎ　Ｃｏｒｐ．）から入手した。Padinasp.乾燥粉末抽出物は、ＩＣＰ　マルタ（Ｍａｌｔａ）から入手した。

【００５７】

９０ｇのビール酵母、９ｇのSchizochytriumバイオマスおよび１ｇの乾燥Padina抽出物を混合してワムシ用餌料を配合した（表５）。全ての成分を、乾燥重量基準で混合し、その後、ミルで粉砕して、５～１５μｍのサイズの微粒子を製造した。

【００５８】

【表５】

表5. ワムシ用餌料組成(g乾燥重量／100g)

ビール酵母	90
Schizochytrium sp.	9
Padina sp.	1

【００５９】

ワムシには、ワムシ１００万個当たり１日量０．５ｇ乾燥物で連続的に給餌した。ワムシは、毎日、全培養容積の３０～５０％を交換することによって、連続的に収穫した。温度、酸素量、全てのフリーアンモニア、並びに、ｐＨを連続的に監視した。ワムシは、仔稚魚、甲殻類または他の水生生物の生餌として直接使用した。標準培養餌料（生パン酵母と藍藻類）、商業的に入手できる培養餌料（カルチャー・セルコ（Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｓｅｌｃｏ））および本発明の藻類餌料を与えたワムシの結果を表６に示す。

【００６０】

【表６】

表6. 異なる培養餌料を与えたワムシの生産速度、2倍増殖時間、卵生産および全体の外観

餌料	生産速度	2倍増殖時間	卵生産	外観
	(ワムシ／mL／日$^{-1}$)*	(日)	(高／低**)	
藻類餌料	51.4	4.28	高	+/-
カルチャー セルコ	31.5	7	低	-
酵母+生きた藻類	96.5	2.27	高	+

* 最初の4日間の培養の平均

** 高い卵生産は、>70%のワムシが卵を有することと定義した

*** ワムシの全体の外観は、次のように決定した:(+)印はワムシの泳ぎが速そうであり、1個を超える卵を有し、培養水が清澄であるときに与えられた;(-)印はワムシの泳ぎが遅そうであり、卵の数が1個または0個であって、培養水が暗色であるときに与えられた

【００６１】

実施例６．プロバイオティックのLactobacillus rhamnosusを添加したワムシ培養用藻類餌料の配合

藻類餌料は実施例１に記載したように調製し、凍結乾燥したLactobacillus rhamnosusは、日本、神奈川県の森永乳業株式会社から入手した。

【００６２】

８９．９ｇのビール酵母、９ｇのSchizochytrium、１ｇのPadinaおよび０．１ｇのL.rhamnosusを混合してワムシ用餌料を配合した（表７）。全ての成分を、乾燥重量基準で混

合し、ミルで粉砕して、約５～１５μｍのサイズの微粒子を製造した。

【００６３】

【表７】

表7．ワムシ用餌料組成(g乾燥重量／100g)

ビール酵母	89.9
Schizochytrium sp.	9
Padina sp.	1
L. rhamnosus	0.1

【００６４】

ワムシには、ワムシ１００万個当たり１日量１ｇ乾燥物で連続的に給餌した。培養条件は、外気によるチューブ曝気、温度２８±１℃、塩分濃度２０ｐｐｔ、ｐＨ８±０．５、酸素飽和度１００±５％、培養容積約２０～１００Ｌとした。１日の給餌量を４～５回／日で与えた。

【００６５】

温度（℃）、酸素（％飽和度）、ｐＨ、塩分濃度（ｐｐｔ）およびワムシの数／ｍＬを毎日測定した。毎日のワムシの収穫を、培養中のワムシの数の約３０％とした。図１に、標準培養餌料（生パン酵母および藍藻類の混合物）、商業的に入手できる培養餌料（カルチャー・セルコ（Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｓｅｌｃｏ））、および本発明に係るプロバイオティックのラクト菌を添加した藻類餌料を与えた場合のワムシの日産量を示す。

【００６６】

実施例７．ビール酵母およびSchizochytriumを添加したワムシ培養用藻類餌料の配合

乾燥ビール酵母は、米国、イリノイ州、ペキンのウィリアム・バイオプロダクツ（Ｗｉｌｌｉａｍ　Ｂｉｏｐｒｏｄｕｃｔｓ）より購入した。ＤＨＡに富むSchizochytrium sp.は、米国、メリーランド州、コロンビアのアドバンスド・バイオニュートリション・コーポレーション（Ａｄｖａｎｃｅｄ　ＢｉｏＮｕｔｒｉｔｉｏｎ　Ｃｏｒｐ．）から入手した。ワムシは、表８に記載の特定の添加物を添加した以外は、実施例６に記載したように培養した。ビール酵母およびSchizochytriumを９０：１０の比で含有する餌料（２つの異なるタイプのビール酵母）は、新鮮な藻類と酵母を供給する対照餌料に十分に匹敵していた。オリーブ抽出物またはパディナ（Ｐａｄｉｎａ）抽出物の添加は、３日間の投入では１ｍＬあたりのワムシの数に大きな変化をもたらさなかった。これらの餌料は全て、カルチャー・セルコ（Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｓｅｌｃｏ）より優れていた。

【００６７】

【表８】

表8．培養3日後の1ミリリットル当たりのワムシの数の比較

餌料の詳細	ワムシ／mL
藻類および酵母含有対照餌料	48.0
ビール酵母2／Schizochytrium 90:10	40.5
ビール酵母1／Schizochytrium 90:10	39.0
ビール酵母1／Schizochytrium 90:10オリーブ抽出物添加	36.9
ビール酵母1／Schizochytrium 90:10 Padina抽出物添加	33.9
カルチャー セルコ	30.0

本明細書は、以下に示す参考文献を参照することによって最もよく理解され、これら全

体を本明細書に参照として援用する。

米国特許

6,451,567 Barclay, W. September 17,2002
6,372,460 Gladue and Behrens April 16,2002
6,103,225 Barclay, W. August 15,2000
5,739,006 Abe, et al. April 14,1998
5,688,500 Barclay, W. November 18,1997
5,158,788 Lavens,et al. October 27, 1992
5,047,250 Prieels, etal. September 10,1991

その他の参考文献

Abu-Rezq T et al. (2002) Studies on the effect of using the rotifer,Brachionus plicatilis, treated with different nutritional enrichment media andantibiotics on the growth and survival of blue-fin sea bream, Sparidentex hasta(Valenciennes), larvae. AquacultureRes 33: 117-128.

Barclay W (2000)Methods of aquaculture by feeding larval shrimp Thraustochytriumand/orSchizochytrium microflora. In: U. S. Patent No. 6,103, 225;Omegatech, Inc. , USA.

Barclay W (2002)Fermentation process for producing long chain omega-3 fatty acids witheuryhaline microorganisms. In: U. S. Patent No. 6,451, 567 B1. Omegatech, Inc. , USA.

Barclay W,Zeller S (1996) Nutritional enhancementof n-3 and n-6 fatty acids in rotifersandArtemia nauplii by feeding spray dried Schizochytrium sp. J. WorldAquaculture Soc. 27: 314-322.

Bolton ET (1982)Intensive marine bivalve cultivation in a controlled recirculated seawaterprototype system. In. University of Delaware Sea GrantPublication, p 165.

Cure K,GajardoG, Coutteau P (1996) The effectof DHA/EPA ratio in live feed on the fatty acidcomposition, survival, growth and pigmentation of turbot larvae Scophthalmusmaximus L. Improvement of the Commercial Production of Marine AquacultureSpecies 26 : 57-67.

Dabrowski K,Culver D (1991) The physiology of larval fish. Aquaculture Mag 17: 49-61.

D'Souza FML,Knuckey RM, Hohmann S, Pendrey RC (2002) Flocculated microalgae concentrates asdiets for larvae of the tiger prawnPenaeus monodonFabricius. AquacultureNutrition 8: 113-120.

FukushoK,HirayamaKE (1992) The First Live Feed-Brachionus plicatilis. In. The OceanicInstitute. , Honolulu, HI.

Fulks W, Main KL(1992) Rotifer and microalgae culture systems, 364.

Furuita H,Takeuchi T, Uematus K (1998) Effects of eicosapentaenoic and docosahexaenoicacids on growth, survival and brain development of larval Japanese flounder(Paralichthys olivaceus). Aquaculture 161: 269-279.

Gladue RM,Behrens PW (2002) DHA-containing nutritional compositions and methods for theirproduction. In: U. S. PatentNo. 6,372,460.

HernandezCM,Portilla Y, Fernandez Palacios H, Gonzalez JA (1986) Maintenance and massculture of the rotifer Brachionus plicatilis O. F. Mueller, 1786, Bs strain, inthe Canary Islands. Inf. Tec.Inst. Esp. Oceanogr.

HirataH,Yamasaki S, Kawaguchi T, Ogawa M (1983) Continuous culture of the rotiferBrachionus plicatilis fed recycled algal diet. Hydrobiol. 147: 269-270.

Hirayama K,MaruyamaI (1991) Vitamin B sub (12) content as a limiting factor for massproduction of the rotifer Brachionus plicatilis. Larvi'15: 101-103.

Hirayama K, MaruyamaI,Maeda T (1989) Nutritional effect of freshwater Chlorell a on growth of therotifer Brachionus plicatilis. Rotifer Symposium: 186-187.

Kanazawa A (1992) New directions inmicrodiet research in Japan. Isr. J. Aquacu lt.Bamidgeh 44 : 123.

Kanazawa A (1993) Finfish Hatchery In Asia: Importance of dietarydocosahexaeno ic acid on growth and survival of fish larvae. In: ProceedingsOfFinfish Hatchery In Asia, pp87-95.

Kitajima C(1983) Actual examples of mass cultures. In : Koseikaku K (ed) The R otiferBrachionus plicatilis-Biology and Mass Cultue. Japanese Fisheries Society, pp102-128.

Lavens P,Coutteau P, Sorgeloos P, Vandamme E (1992) Feed for aquaculture. In: USPT05,158,788. Synfina-Oleofina, S.A., USA.

Lie O et al.(1997) Nutritional composition of rotifers following a change in d iet fromyeast and emulsified oil to microalgae. Aquacult. Int. 5: 427-438.

MaruyamaI,Hirayama K (1993) The culture of the rotifer Brachionus plicatilis w ithChlorella vulgaris containing vitamin B sub (12) in its cells. J.WorldAquacul t. Soc. , 24,194-198. J. World Aquaculture Soc. 24: 194-198.

Nagata WD, WhyteJNC (1992) Effects of yeast and algal diets on the growth and biochemicalcomposition of the rotifer Brachionus plicatilis (Mueller) in culture . Aquacult.Fish Manage. 23: 13-21.

Place A,R.,Harel M (2002a) Use of Arachidonic acid for enhanced culturing of f ish larvaeand broodstock.h : PCT WO 00219839, UMBI.

Place AR, Harel M(2002b) Use of arachidonic acid for enhanced culturing of fis h larvae andbroodstock. In : US Pat. Appl. 20020110582Al.

Planas M, CunhaI(1999) Larviculture of marine fish: problems and perspectives. Aquacult. 177:171-190.

SatuitoCG,Hirayama K (1986) Fat-soluble vitamin requirements of the rotifer Br achionusplicatilis. In : The First Asian Fisheries Forum. Proceedings Of The Fir stAsian Fisheries Forum,Manila, Philippines, pp 619-622.

SatuitoCG,Hirayama K (1991) Regulation of the amino acid and fatty acid conten ts ofbaker's yeast to improve its nutritional value for the population growth of therotifer Brachionus plicatilis. Bull. Fac. Fish Nagasaki Univ. ChodaiSuikenpo :13- 20.

Verginelli R,Marin N, Lodeiros C (1994) [Mass culture of the rotiferBrachionus plicatilisunder three different microalgae diets.]. Rev. Latinoam. Acuicult. 4 3: 68-71.

Watanabe T(1993) Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish. J. WorldAquaculture Soc. 24: 152-161.

Watanabe T,Kitajima C, Fujita S (1983a) Nutritional value of live food organis ms used in Japan for mass culture of fish : A review.Aquacult. 34: 115-143.

Watanabe T,Tamiya T, Oka A, Hirata M, Kitajima C, Fujita S (1983b) Improvement of dietaryvalue of live foods for fish larvae by feeding them on omega 3 highly unsaturated fatty acids and fat-soluble vitamins. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish./Nus suishi. 49: 471-479.

YoshimuraK,Hgiwara A, Yoshimatsu T, Ktajima C (1996) Culture technology of mar ine rotifersand theimplications for intensive culture of marine fish in Japan. M ar.Freshwater Res. 47: 217-222.

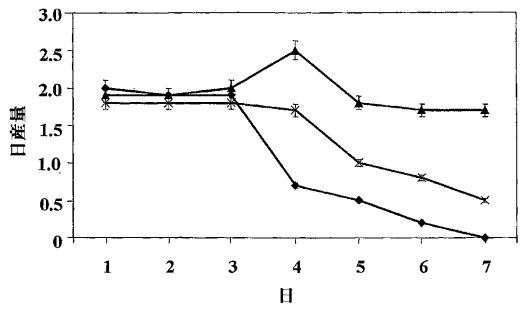
YoshimuraK,Kitajima C,Miyamoto Y, Kishimoto G (1994) Factors inhibiting growth of therotifer Brachionus plicatilis in high density cultivation by feeding cond ensedChlorella. Nippon SuisanGakkaishi/Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 60: 207-213.

【図面の簡単な説明】

【００６８】

【図１】ワムシ１００万個当たりＤ．Ｗ．ベーカーズ　イースト（Ｄ．Ｗ．Ｂａｋｅｒｓ　ｙｅａｓｔ）０．４ｇおよび生きた藻類Nanochloropsis sp.４０×１０^{6}個与えた場合（▲）、ワムシ１００万個当たり藻類餌料１ｇおよび０．１％L.rhamnosusを与えた場合（×）、並びに、カルチャー・セルコ（Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｓｅｌｃｏ）（ＩＮＶＥ，バスロード　ベルギー（ＩＮＶＥ，Ｂａｓｓｒｏｄｅ　Ｂｅｌｇｉｕｍ））を与えた場合（◆）のワムシの１日の収穫量（全培養量の３０％）。

【図１】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US03/35043

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) : A01K 61/00; A01K; A23L
US CL : 119/212,230,242; 426/2,62,1
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 119/212, 230, 242; 426/2, 62, 1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BRS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US 5,698,244 A (BARCLAY) 12 December 1997 (12.12.1997), see entire document.	1 --- 2-29
X	US 6,451,567 B1 (BARCLAY) 17 September 2002 (17.9.2002), see entire document	1-29
A	US 4,640,227 A (BLANCHETON et al) 3 February 1987 (3.2.1987), see entire document.	1-29
A	US 4,906,479 A (KITAGAWA et al) 6 March 1990 (6.3.1990), see entire document.	1-29
A	US 4,931,291 A (KOJIMA et al) 5 June 1990 (05.06.1990), see entire document.	1-29
A	US 5,047,250 A (PRIEELS et al) 10 September 1991 (10.09.1991), see entire document.	1-29
A	US 5,156,788 A (LAVENS et al) 27 October 1992 (27.10.1992), see entire document.	1-29

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
03 April 2004 (03.04.2004)

Date of mailing of the international search report
17 MAY 2004

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. (703)305-3230

Authorized officer
Judith A. Nelson
Telephone No. 306-4180

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ハレル，モティ
アメリカ合衆国，メリーランド州 ２１２０９，バルチモア，マスターズ ドライブ ２０１２

Ｆターム(参考) 2B005 GA06 GA08 JA04 MB02 MB05
2B150 AA07 AC06 AC24 AC25 DD12 DD47