

PERTUMBUHAN DAN KOMPOSISI BIOKIMIA ALGA *CHLORELLA SP*

Tjandra Chrimadha, Nofdianto, Rosidah,

Yayah Mardiaty

ABSTRAK

Penelitian dilakukan untuk mengkaji pertumbuhan dan kandungan biokimia jenis alga *Chlorella sp.* Alga tersebut ditumbuhkan secara *batch culture* dalam kolom tumbuh gelas berdiameter 5 cm dan 20 cm, dan sampel untuk analisa kandungan biomasa, khlorofil, karbohidrat, protein, lemak dan asam lemak diambil pada hari ke 4 (fase eksponensial) dan hari ke 11 (fase stasioner). Laju tumbuh alga terukur adalah 0,81 pembelahan sel/hari dan 0,61 pembelahan sel/hari berturut-turut pada kolom diameter 5 cm dan 20 cm, sementara konsentrasi biomasa maksimumnya 1,57 g/l dan 0,95 g/l berat organik. Komposisi proksimat alga terdiri dari karbohidrat 27,00-44,35% berat organik, protein 34,70 - 36,90% berat organik dan lemak 6,32 -21,05% berat organik, dimana konsentrasi karbohidrat dan lemak yang lebih tinggi didapat pada kultur dalam kolom berdiameter lebih kecil. C18:1 merupakan jenis asam lemak yang paling dominan, diikuti oleh C16:0, C18:2, dan aC18:3. Peningkatan konsentrasi C18:1 terjadi pada kolom berdiameter kecil, yang diikuti oleh penurunan konsentrasi C18:2 dan aC18:3.

[Kata kunci: Alga, *Chlorella sp.*, pertumbuhan, karbohidrat, protein, lemak, asam lemak]

PENDAHULUAN

Mikroalga merupakan organisme yang potensial sebagai sumber asam lemak tak jenuh rantai panjang. Keberadaan asam lemak tak jenuh rantai panjang ini menjadikan mikroalga pakan alami yang merupakan salah satu faktor kunci keberhasilan pada pembenihan ikan, udang dan berbagai komoditas perikanan lainnya (Chu & Dupuy, 1980; Watanabe et al, 1983; De Pauw et al, 1984). Kebutuhan asam lemak tak jenuh rantai panjang saat ini juga terus meningkat, seiring dengan semakin banyaknya laporan yang menyebutkan pentingnya asam-asam lemak tersebut untuk pertumbuhan bayi, terutama pada pertumbuhan sistem syaraf, serta untuk tambahan makanan kesehatan (Simopoulos, 1986; Von Schacky, 1987; Koletzko et al, 1989).

Penelitian-penelitian untuk mempelajari kandungan asam lemak mikroalga telah banyak dilakukan. Meskipun demikian masih sangat sedikit penelitian-penelitian tersebut dilakukan pada jenis-jenis mikroalga di daerah tropis. Seperti diketahui,

keberhasilan kultur suatu organisme, termasuk mikroalga sangat tergantung pada kesesuaian jenis yang dikultur dengan kondisi lingkungannya, sehingga jenis-jenis mikroalga dari daerah tropis lebih potensial untuk komoditas kultur mikroalga di daerah tropis, karena tidak lagi memerlukan proses adaptasi terhadap kondisi lingkungan yang ada. Sukenik (1991) melaporkan produktivitas asam lemak pada mikroalga sangat tergantung pada produktivitas biomasanya, sehingga produktivitas biomasa juga harus diperhatikan dalam pengembangan kultur mikroalga untuk produksi asam lemak.

Chlorella sp yang digunakan pada penelitian ini merupakan jenis mikroalga lokal hasil isolasi dari Kolam Kebun Raya Bogor. Jenis ini telah diketahui dapat dengan mudah dikultur dengan produktivitas biomasa yang cukup tinggi (Chrismadha *et al.* 1997a). Sebagai evaluasi lanjutan terhadap potensi jenis alga tersebut, pada penelitian ini dilakukan uji komposisi biokimia serta asam lemak jenis alga tersebut.

BAHAN DAN METODE

Jenis mikroalga *Chlorella sp* yang digunakan pada penelitian ini merupakan koleksi Puslitbang Limnologi LIPI, dan merupakan hasil isolasi dari Kebun Raya Bogor. Innokulum diambil dari kultur 400 ml berumur 2 minggu dalam botol gelas yang dilengkapi aerasi dan intensitas cahaya 2.000 luks dari lampu TL. Percobaan dilakukan dengan menumbuhkan alga tersebut pada kolom gelas yang dilengkapi aerasi dan pengaduk magnetik. Dua ukuran diameter kolom digunakan, yaitu 5 cm dan 20 cm, agar sekaligus dapat dievaluasi pengaruh variasi diameter kolom tumbuh tersebut pada pertumbuhan serta komposisi biokimia dan asam lemak alga tersebut. Masing-masing diameter mempunyai dua kali ulangan.

Media yang digunakan adalah media PHM dengan pH awal 6, sedangkan sumber cahaya didapat dari 8 buah lampu TL 40 watt yang dipasang pada satu sisi dengan intensitas cahaya terpasang pada permukaan kolom 5.500 luks. Setelah innokulasi kultur dibiarkan tumbuh secara batch selama 12 hari, dimana perkembangan kepadatan selnya diamati setiap 2 hari, sementara pengambilan sampel untuk parameter-parameter biomasa, khlorofil, karbohidrat, protein, lemak dan asam lemak dilakukan pada hari ke 4 dan hari ke 11 untuk mewakili fase tumbuh eksponensial dan fase tumbuh stasioner.

Penghitungan kepadatan sel dilakukan pada haemasitometer di bawah mikroskop. Biomasa alga diekspresikan dalam berat organiknya, yang ditentukan dengan menyaring 3 ml sampel melalui filter Whatman GF/A yang sebelumnya telah dipanaskan pada 450 °C semalam. Setelah itu filter dioven pada suhu 100 °C selama 1 jam dan ditimbang. Untuk menentukan berat organik, filter kemudian diabukan pada 450 °C semalam, dan setelah disimpan di dalam desikator yang berisi silika gel semalam, filter tersebut ditimbang kembali. Bobot organik alga didapat dengan mengurangi bobot filter setelah dioven 100 °C dengan berat setelah diabukan. Antara 2 - 5 ml sampel juga difilter pada filter Whatman GF/A untuk analisa kadar khlorofil, total karbohidrat, total protein dan total lemak. Kandungan khlorofil ditentukan dengan metode ekstraksi dengan 90% aseton (Jeffrey & Humprey 1975). Kandungan total karbohidrat dianalisa dengan metode fenol-asam sulfat (Kochert 1978), sementara total protein ditentukan dengan metode folin-fenol (Lowrey *et al* 1951).

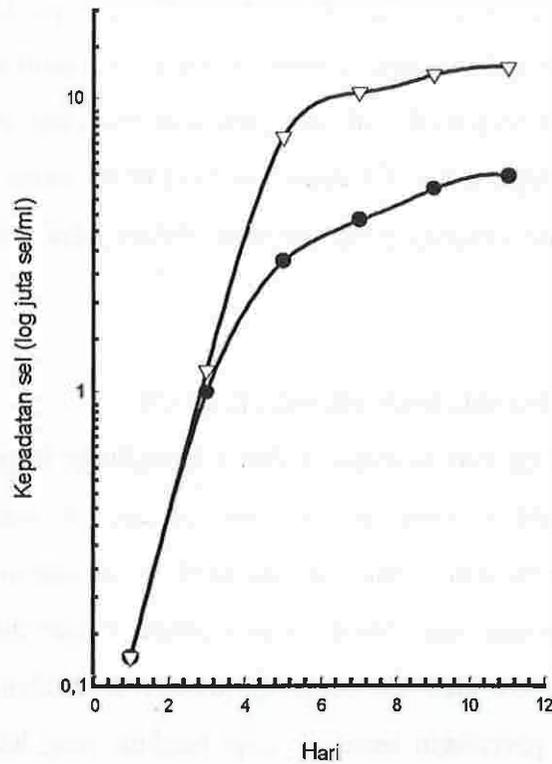
Ekstraksi lemak dilakukan menurut metode Bligh & Dyer (1959) yang telah dimodifikasi oleh Kates & Volcani (1966), yaitu dengan larutan metanol : khloroform : air destilasi (2:1:0,8; v:v:v) yang diikuti dengan pemisahan lapisan lemak terlarut dengan penambahan khloroform dan air destilata. Bobot lemak ditentukan dengan menuangkan lemak terlarut ke dalam botol kecil (vial) yang telah ditimbang terlebih dahulu, dan dikeringkan secara evaporasi dengan udara bebas oksigen (aliran N₂ murni). Botol yang berisi lemak kering kemudian ditimbang kembali, setelah disimpan dalam desikator semalam. Berat lemak didapat dengan mengurangi bobot kosongnya.

Untuk analisa komposisi asam lemak, lemak kering tadi dilarutkan kembali dengan 1 ml khloroform. Asam lemak kemudian diesterifikasi dengan jalan mereaksikan dalam 2% H₂SO₄ dalam metanol selama 16 jam pada 50 °C dalam udara bebas oksigen (Christie 1989). Ester asam lemak kemudian diekstraksi dengan heksana dan dipindahkan ke botol kecil (vial) untuk dikeringkan dengan aliran N₂ murni. Setelah kering ester asam lemak tersebut dilarutkan kembali dalam 2 ml khloroform dan komposisinya dianalisa dengan gas kromatograf (Shimadzu GC-14B), yang dilengkapi kolom kapiler (Shimadzu CBP1-M25-025; 25 m x 0,22 mm; 0,25 mm film) dan *flame ionization detector* (FID), serta data integrator Shimadzu C-R5A yang dapat memonitor dan melaporkan kehadiran *peak area* setiap jenis asam lemak. Suhu detektor dipasang pada 250 °C, sementara suhu injektornya 240 °C dan suhu

ruang kolom diprogram dari 150 °C sampai 220 °C dengan kenaikan 0,5 °C per menit setelah ditahan pada suhu awalnya selama 5 menit. Tiap-tiap jenis asam lemak tersebut diidentifikasi berdasar kisaran waktu kemunculan (retention time) dengan 20 jenis asam lemak standar yang sudah diketahui (Sigma; C_{14:0}, C_{15:0}, C_{16:0}, C_{16:1}, C_{17:0}, C_{18:0}, C_{18:1}, C_{18:2}, C_{18:3}, C_{18:3}, C_{20:0}, C_{20:1}, C_{20:2}, C_{20:3}, C_{20:4}, C_{20:5}, C_{21:0}, C_{22:0}, dan C_{22:6}). Sementara kandungan relatif masing-masing jenisnya ditentukan berdasarkan persentasi peak areanya terhadap total peak area yang ada. Penulisan jenis asam lemak berdasarkan formula C_{x,y}, dimana huruf x menunjukkan jumlah rantai C, sementara y menunjukkan jumlah ikatan rangkap yang terdapat dalam jenis asam lemak yang bersangkutan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

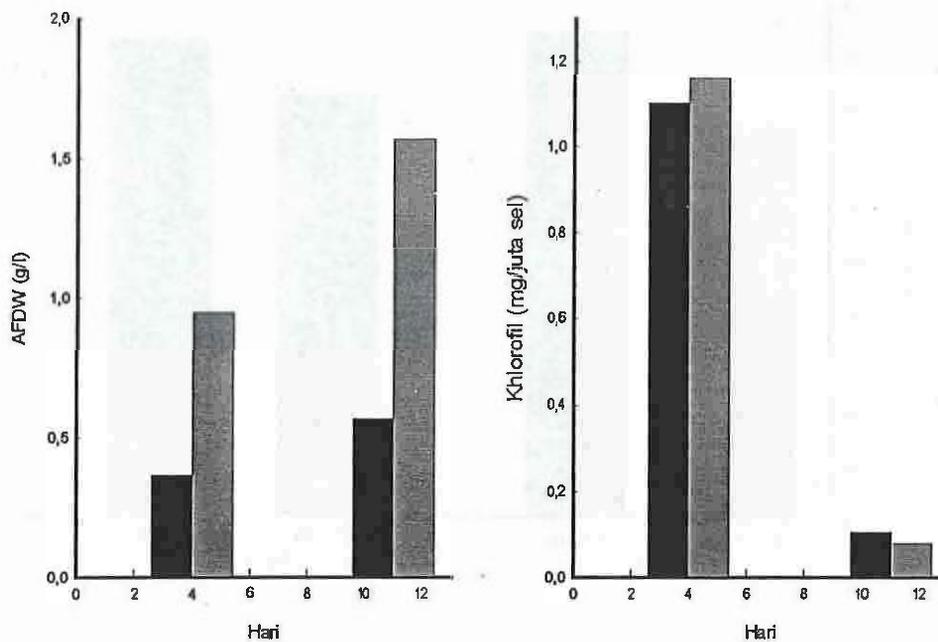
Setelah inokulasi pada hari pertama, kultur *Chlorella sp* langsung memasuki fase tumbuh eksponensialnya yang berlangsung selama 4 hari. Setelah itu pertumbuhan kultur melambat dan memasuki fase tumbuh stasionernya (Gambar 1). Media dan kondisi lingkungan yang hampir sama antara kultur inokulum dengan kultur percobaan menyebabkan alga tak perlu lagi melalui fase adaptasi (lag phase) untuk dapat tumbuh pada percobaan tersebut. Laju tumbuh yang lebih tinggi, yaitu 0,81 pembelahan sel/hari terlihat pada kultur dalam kolom berdiameter 5 cm, dibanding dengan laju tumbuh 0,61 pembelahan sel/hari pada kultur dalam kolom berdiameter 20 cm. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian sebelumnya pada jenis *Ankistrodesmus convolutus* (Chrismadha *et al* 1997b), dan diduga berkaitan erat dengan nilai rasio permukaan/volume dari kolom-kolom tumbuh tersebut. Semakin besar diameter kolom tumbuh menyebabkan nilai rasio permukaan/volume yang semakin kecil. Rendahnya nilai rasio tersebut mengakibatkan terhambatnya distribusi cahaya sampai ke tengah kolom, terutama bila kepadatan kulturnya tinggi. Penelitian-penelitian bioenergetik fotosintesis telah menunjukkan bahwa sel-sel alga hanya memberikan respon pada radiasi cahaya yang jatuh ke permukaan selnya (Rabe & Benoit, 1962; Raven, 1988). Pada kultur yang padat radiasi cahaya hanya mencapai beberapa mm dari permukaan kultur, sehingga laju fotosintesis sangat tergantung pada distribusi sel-sel alga ke bagian permukaan. Rasio permukaan/volume yang tinggi memberikan kesempatan pada sel-sel alga di dalamnya untuk lebih sering



Gambar 1. Kurva tumbuh *Chlorella sp.*, \bullet kolom ϕ 20 cm, dan ∇ kolom ϕ 5 cm.

terekspose ke bagian permukaan, sehingga dapat melakukan proses fotosintesis lebih baik. Kepadatan sel maksimum yang dicapai adalah 12,69 juta sel/ml pada kolom diameter 5 cm dan 5,40 juta sel/ml pada kolom diameter 20 cm.

Gambar 2 memperlihatkan konsentrasi biomasa yang diekspresikan dalam berat organik serta kandungan khlorofil sel *Chlorella sp.* Terlihat kenaikan biomasa kultur sejalan dengan waktu. Hal ini wajar mengingat terjadinya pertumbuhan sel selama masa pengamatan tersebut. Demikian juga konsentrasi

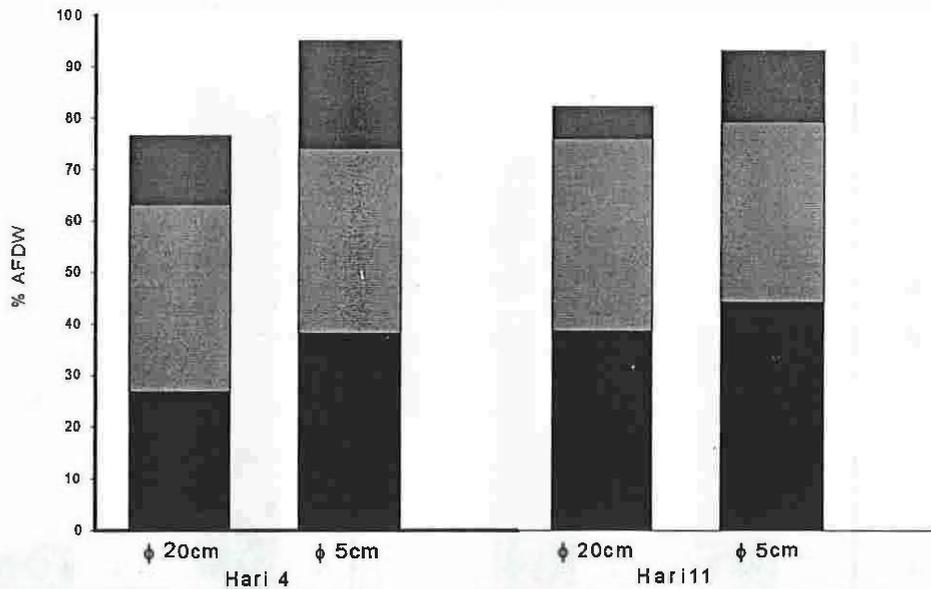


Gambar 2

Gambar 2. Konsentrasi biomasa dan khlorofil *Chlorella sp.*, ■ kolom ϕ 20 cm, dan ■ kolom ϕ 5 cm.

biomasa kultur yang lebih tinggi pada kolom berdiameter 5 cm dibandingkan dengan pada kolom berdiameter 20 cm terjadi sejalan dengan peningkatan laju pertumbuhan selnya. Konsentrasi biomasa maksimum terukur pada hari ke 11, yaitu 1,57 g /l berat organik pada kolom diameter 5 cm dan 0,95 g/l berat organik pada kolom diameter 20 cm.

Diameter kolom tidak mempengaruhi kandungan khlorofil sel alga. Akan tetapi kandungan khlorofil tersebut menurun sejalan dengan perubahan fase tumbuh



Gambar 3

Gambar 3. Komposisi biokimia *Chlorella sp.*, karbohidrat, protein, dan lemak

dari fase eksponensial ke fase stasioner, yaitu dari 1,10- 1,16 mg/juta sel pada hari ke 4 menjadi 0,08 - 0,11 mg/juta sel pada hari ke 11 (Gambar 2). Turunnya kandungan khlorofil pada fase tumbuh stasioner telah dilaporkan terjadi pada berbagai jenis alga (Piorreck & Pohl, 1984). Hal ini diduga sangat berkaitan dengan telah terserap habisnya salah satu unsur nutrien yang menjadi faktor pembatas tumbuh alg-alga tersebut.

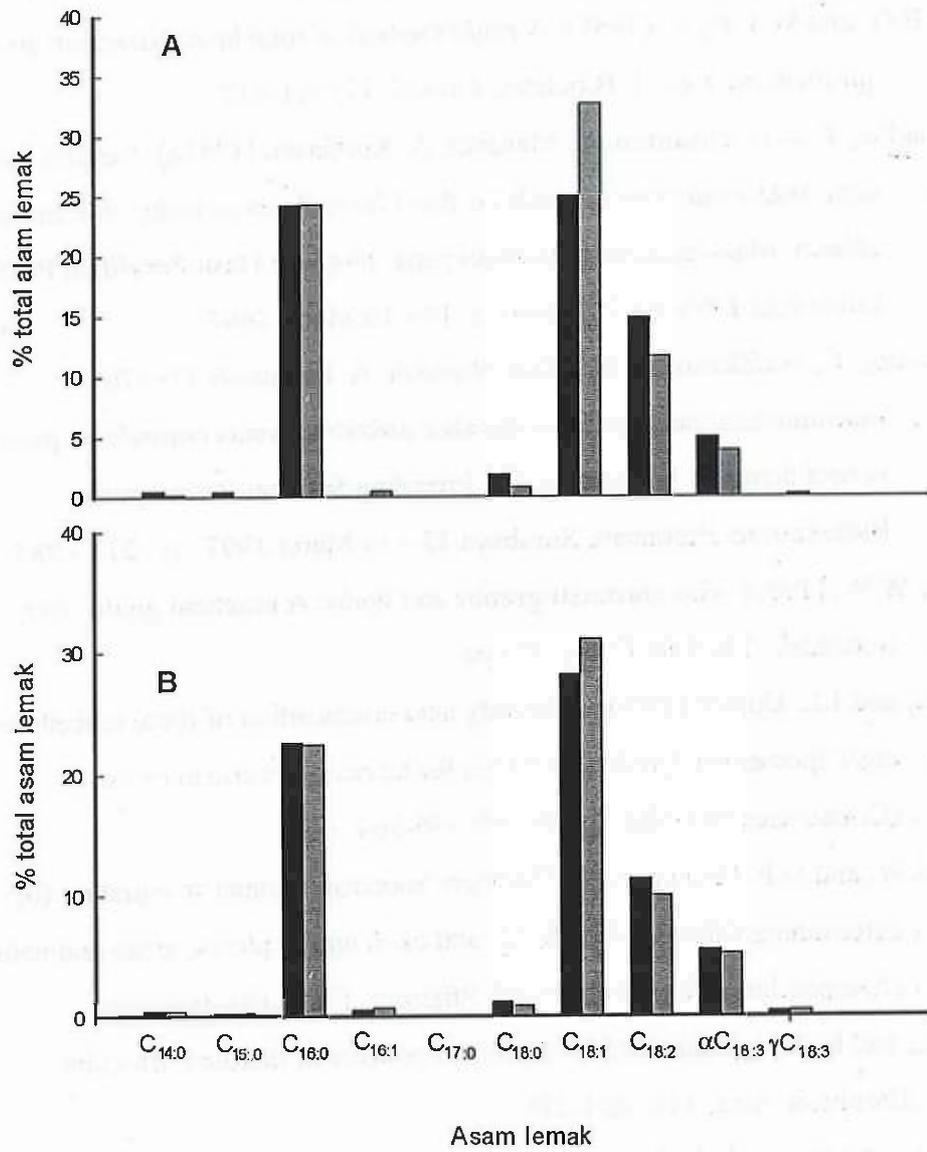
Komposisi proksimat alga *Chlorella sp.* dapat dilihat pada gambar 3. Kandungan total karbohidrat berkisar antara 27,00% - 38,40% berat organik pada fase eksponensial dan meningkat menjadi antara 38,90% - 44,35% berat organik pada fase stasionernya. Peningkatan konsentrasi karbohidrat ini diiringi dengan menurunnya

kandungan total lemak alga, yaitu dari 13,51% - 21,05% berat organik pada fase eksponensial menjadi 6,32% - 14,01% berat organik pada fase stasioner. Sementara itu kandungan total protein alga relatif stabil, yaitu 35,50% - 35,95% berat organik pada fase eksponensial dan 34,70% - 36,90% berat organik pada fase stasioner. Diameter kolom tumbuh ternyata juga mempengaruhi komposisi proksimat jenis alga ini. Kenaikan kandungan total karbohidrat dan total lemak terjadi sejalan dengan menyempitnya diameter kolom tumbuh tersebut. Total karbohidrat meningkat dari 27,00% - 38,90% berat organik pada kolom diameter 20 cm menjadi 38,40% - 44,35% berat organik pada kolom diameter 5 cm. Sedangkan total lemak naik dari 6,32% - 13,51% berat organik menjadi 14,01% - 21,05% berat organiknya. Hal ini sangat erat terkait dengan energi cahaya yang lebih banyak tersedia untuk sel-sel alga yang tumbuh pada kolom berdiameter kecil akibat nilai rasio permukaan/volume-nya yang lebih besar seperti yang telah dijelaskan sebelumnya. Renaud *et al* (1991) telah melaporkan terjadinya peningkatan kandungan karbohidrat sejalan dengan naiknya intensitas cahaya pada jenis alga *Isochrysis sp* dan *Plannochloropsis oculata*.

Kisaran kandungan total protein antara 34,70% - 36,90% berat organik yang didapat pada penelitian ini konsisten dengan kandungan protein yang dilaporkan untuk *Chlorella vulgaris* (Piorreck & Pohl, 1984). Namun pada penelitian ini tidak terlihat adanya penurunan kandungan protein pada fase stasioner sampai dengan hari ke 11. Hal ini diduga karena media yang digunakan pada penelitian ini mempunyai kandungan nitrat yang sangat tinggi (10 mM), sehingga nitrogen bukan merupakan faktor pembatas yang menghambat laju tumbuh alga pada fase stasioner tersebut. Seperti telah dilaporkan oleh Parish & Wangersky (1987) penurunan kandungan protein terutama disebabkan oleh keterbatasan unsur nitrogen didalam media yang mengakibatkan hilangnya kemampuan sel-sel alga untuk mensintesa senyawa-senyawa organik yang mengandung unsur tersebut, termasuk protein, sementara hasil fotosintesisnya digunakan untuk sintesa bahan-bahan yang tidak mengandung nitrogen, seperti lemak dan karbohidrat (Roessler, 1990). Pada penelitian ini terlihat bahwa sel-sel *Chlorella sp* pada fase stasionernya lebih banyak menyimpan karbohidrat. Bahkan pada fase stasioner kandungan lemak sel-sel alga tersebut berkurang, yang dapat diartikan adanya penurunan kemampuan sintesa senyawa tersebut.

Komposisi asam lemak *Chlorella sp* didominasi oleh 4 jenis asam lemak utama, yaitu $C_{16:0}$, $C_{18:1}$, $C_{18:2}$ dan $\alpha C_{18:3}$, sementara jenis-jenis asam lemak yang juga ditemukan dalam konsentrasi yang sangat kecil adalah $C_{14:0}$, $C_{15:0}$, $C_{16:1}$, $C_{18:0}$, dan $\gamma C_{18:3}$. Tidak terlihat perubahan nyata komposisi asam lemak ini akibat perubahan fase tumbuh alga. Sedangkan pengaruh diameter kolom hanya terlihat pada asam-asam lemak yang mempunyai 18 rantai karbon. Kenaikan konsentrasi $C_{18:1}$ yang mencapai 10 - 31% terjadi pada kultur dalam kolom diameter lebih kecil, yang diikuti dengan penurunan asam lemak $C_{18:2}$ sebesar 12 - 22% dan $C_{18:3}$ sebesar 2 - 22%.

Adanya dominasi 4 jenis asam lemak, yaitu $C_{16:0}$, $C_{18:1}$, $C_{18:2}$ dan $\alpha C_{18:3}$ juga telah dilaporkan pada jenis *Chlorella homosphaera* (Ahlgren *et al*, 1992) dan *Chlorella vulgaris* (Piorreck & Pohl, 1984). Akan tetapi pada kedua jenis terakhir konsentrasi tertinggi asam lemaknya didominasi oleh $\alpha C_{18:3}$, sementara pada *Chlorella sp* pada penelitian ini lebih didominasi oleh $C_{18:1}$. Hal ini diduga disebabkan oleh kondisi tumbuh yang berlainan, yaitu kondisi intensitas cahaya dan suhu pada kultur *Chlorella sp* yang lebih tinggi dibanding dengan baik jenis *C. homosphaera* yang ditumbuhkan pada intensitas cahaya 500 - 1.000 luks dan suhu 15°C, maupun *C. vulgaris* yang ditumbuhkan pada 800 luks dan 22 °C. Thompson *et al* (1990) telah melaporkan adanya kenaikan tingkat kejenuhan asam lemak pada 8 jenis alga akibat naiknya intensitas cahaya. Demikian juga kenaikan tingkat kejenuhan asam lemak terjadi sejalan dengan naiknya suhu kultur pada jenis *Spirulina platensis* (Tedesco & Duerr, 1989). Kenaikan konsentrasi $C_{18:1}$ yang diikuti menurunnya kandungan $C_{18:2}$ dan $\alpha C_{18:3}$ pada alga yang tumbuh dalam kolom berdiameter kecil juga sejalan dengan hasil-hasil penelitian tersebut di atas.



Gambar 4

Gambar 4. Komposisi asam lemak *Chlorella sp.*, A hari ke 4, B hari ke 11;

■ kolom ϕ 20cm, dan □ kolom ϕ 5 cm.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahlgren, G., L.-B Gustafsson, and M. Boberg. (1992). Fatty acid content and chemical composition of freshwater microalgae. *J. Phycol.* 28: 37-50
- Bligh, E.G. and W.J. Dyer. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917
- Chrismadha, T., S.H. Nasution, Y. Mardiaty, A. Kurniasih. (1987a). Respon tumbuh alga *Ankistrodesmus convolutus* dan *Chlorella sp* terhadap intensitas cahaya. Makalah dipresentasikan pada: Ekspose Hasil Penelitian Puslitbang Limnologi 1996/1997. Cibinong, 18 - 19 Maret 1997.
- Chrismadha, T., Noflianto, Y. Mardiaty, Rosidah, A. Kurniasih. (1997b). Pertumbuhan dan produktivitas alga *Ankistrodesmus convolutus* pada variasi diameter kolom tumbuh. Prosiding Seminar Perhimpunan Bioteknologi Pertanian. Surabaya 12 -14 Maret 1997. p 277-285
- Christie, W.W. (1989). Gas chromatography and lipids: A practical guide. Ayr, Scotland: The Oily Press. 499 pp
- Chu, F.E. and J.L. Dupuy. (1980). The fatty acid composition of three unicellular algal species used as food sources for larvae of american oyster (*Crassostrea virginia*). *Lipids.* 15: 356-364
- Jeffrey, S.W. and G.F. Humphrey. (1975). New Spectrophotometric equation for determining chlorophyll a, b, c1, and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochim. Physiol. Pflanzen.* 1967: 191-194
- Kates, M., and B.E. Volcani. (1966). Lipid components of diatoms. *Biochim. Biophysic. Acta.* 116. 264-278
- Kochert, G. (1978). Carbohydrate determination by phenol-sulphuric acid method. In: Handbook of: Phycological Methods: Physiological and Biochemical Methods. Hellebust, J.A. and Craigie, J.S. (Eds). Cambridge: Cambridge University Press. Pp: 95-75
- Koletzo, B., E. Schmidt, H.J. Bremer, M. Haug, and G. Harzer (1989). Effects of dietary long-chain polyunsaturated fatty acids on the essential fatty acid status of premature infants. *Europ. J. Paediatrics.* 148: 669-675

- Lowrey, O.H., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, and R.J. Randall (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-275
- Parrish, C.C., and P.J. Wangersky (1990). Growth and lipid classes in cultures of *Phaeodactylum tricorutum* grown in cage culture turbidostats with a range of nitrogen supply rates. *Mar. Ecol. Progress Series*. 35: 119-128
- DePauw, N., J. Morales, and G. Persoone (1994). Mass culture of microalgae in aquaculture systems: Progress and constraints. *Hydrobiologia*. 116/117: 121-134
- Piorreck, M., and P. Pohl (1984). Formation of Biomass, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids in blue green algae during one growth phase. *Phytochemistry*. 23: 217-223.
- Rabe, A.E., and J. Benoit (1962). Mean light intensity - A useful concept in correlating growth rates of dense culture of microalgae. *Biotech. Bioeng.* 4: 377-390
- Raven, J.A. (1988). Limits to grow. In: *Microalgal Biotechnology*. Borowitzka, M.A. and Borowitzka, L.J. (Eds). Cambridge: Cambridge University Press. Pp. 331-356
- Renaud, S.M., D.L. Parry, T. Luong-Wan, C. Kuo, S. Padovan, and N. Sammy (1991). Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis sp.* and *Plamochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. *J. App. Phycol.* 3: 43-53
- Roessler, P.G. (1990). Environmental control of glycerolipid metabolism in algae: Commercial implication and future research direction. *J. Phycol.* 26: 393-399
- Simopoulos, A.P. (1986). Omega-3 fatty acid in health and disease. *J. Nutrition Growth and Cancer*. 3: 69-81
- Sukenik, A. (1991). Ecophysiological consideration in optimization of eicosapentaenoic acid production by *Nannochloropsis sp.* (Eustigmatophyceae). *Bioresource Tech.* 35: 263-269

- Tedesco, M.A., and E.O. Duerr (1989). Light, temperature, and nitrogen starvation effects on the total lipid and fatty acid content and composition of *Spirulina platensis* UTEX1928. *J. Appl. Phycol.* 1: 201-209
- Thompson, P.A., M. Guo and P.J. Harrison (1992). Effects of variation in temperature. I. On the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton. *J. Phycol.* 28: 481-488
- Von Schacky, C. (1987). Prophylaxis of arteriosclerosis with marine omega-3 fatty acids. *Annals of Internal Medicine.* 107: 890-899
- Watanabe, T., C. Kitajama, and S. Fujita (1983). Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish. *Aquaculture.* 34: 115-143.