

## 藻類を活用する食品素材開発

林 雅弘

クロレラ、スピルリナ、ユーグレナなどの微細藻類は工業的な大量培養が可能で、各所で工業生産されている。その用途としては、最近ではバイオプラスチックなどの「ものづくり」を目指す動きもあるが、やはり食品素材としての用途が中心で、現在サプリメントなどとして市販されている。本稿ではサプリメントとして利用の歴史が長いクロレラの高付加価値化を目指して検討した、ドコサヘキサエン酸 (DHA) 含有クロレラの特性と機能性について紹介するとともに、光合成は行わないもののいくつかの微細藻類と近縁なラビリンチュラ類の利用可能性について紹介する。

## DHA 含有クロレラ

**DHA クロレラの脂質特性** クロレラはタンパク質をはじめ、ビタミンやクロロフィルが豊富なことから古くから食品としての研究が行われ、機能性食品として利用されてきた。

一方、DHAはn-3系多価不飽和脂肪酸 (n-3 PUFA) の一種で、これまでに脳・神経・網膜の発達や機能性の維持に重要であることが示されている機能性脂質である。さらに血清脂質低下作用、血圧降下作用、抗血栓作用などの循環器系に対する作用や抗うつ、視力改善、脳卒中抑制、記憶改善作用などが魚油投与あるいは高純度のDHAエチル投与実験によって報告されている。

クロレラは元来、DHAなどのPUFAを含有せず、その生合成系をもたない。したがって、培養条件の変更や前駆体添加によるPUFAの細胞内への蓄積は期待できない。しかし、遊離脂肪酸 (FFA) の形で培養液に添加された脂肪酸を細胞内に取込み、主としてトリアシルグリセロール (TG) の形で蓄積するため特定の脂肪酸をクロレラ細胞に富化することができる<sup>1)</sup>。暗黒下で定常期まで従属栄養培養した *Chlorella vulgaris* K-22 株の培養液に、DHA源として魚油 (総脂肪酸中にDHAを26.8%含有)、あるいはその魚油をアルカリ処理により加水分解して得たFFAをそれぞれ0.5%添加して、さらに培養を24時間継続すると、魚油のようなTGは細胞内に取り込まれないが、FFAは細胞内に取り込まれ、魚油中のDHAがクロレラ脂質中に検出される (図1)。

また、培養液に添加するDHAの添加量や純度をコントロールすることにより、クロレラ細胞中のDHA含量、脂肪酸組成をかなり自由にコントロールすることが可能

である。電子顕微鏡観察によると、DHAクロレラ細胞中には、通常のクロレラ細胞にない油滴が多数観察され、DHAが細胞内に取り込まれて蓄積している様子が確認できる (図2)<sup>1)</sup>。

培養液へのDHA添加によるクロレラ細胞の脂質含量増加は主として中性脂質の増加に起因するものであり、なかでもTGの増加が著しい。高純度のDHAを培養液に添加した場合、クロレラ細胞中のTGはグリセリン骨格にDHAが3分子結合したトリドコサヘキサエノインが主成分となることが示されており、細胞内に取り込まれたDHAが既存のTG分子に取り込まれるのではなく、新たなTG分子を形成していることが示唆されている。一方、クロレラ細胞中の極性脂質含量はDHA添加により増加しない。クロレラ細胞の主たる極性脂質はリン脂質、およびグリセロ糖脂質であるが、これらの極性脂質

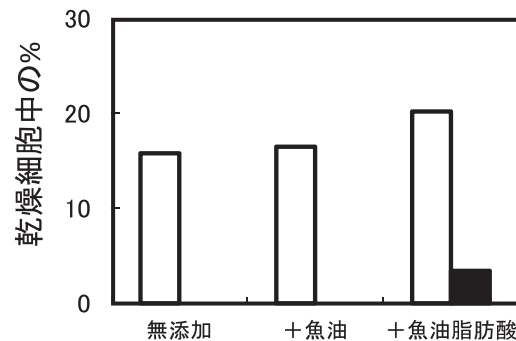


図1. 魚油添加によるクロレラ細胞の脂質含量・DHA含量の変化 (□: 総脂質含量, ■: DHA含量)

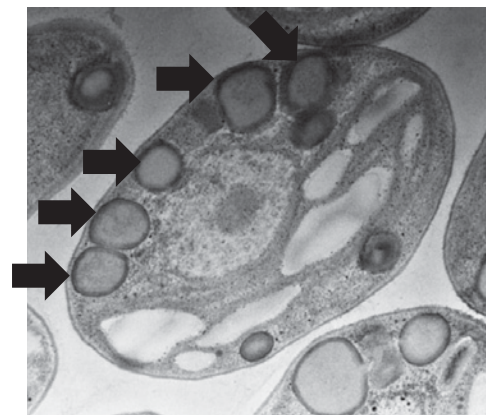


図2. DHAクロレラの電子顕微鏡写真 (➡: 油滴)

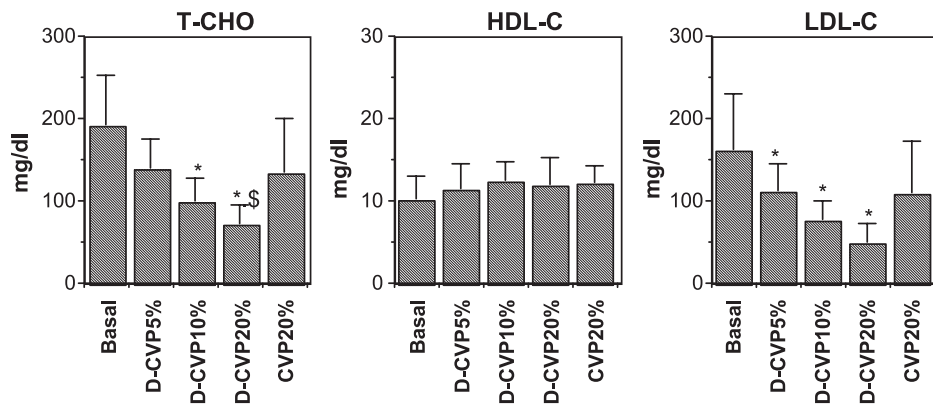


図3. ラットに対するDHAクロレラの血清コレステロール上昇抑制作用. Basal: コレステロール負荷飼料, D-CVP5%: DHAクロレラ5%添加区, D-CVP10%: DHAクロレラ10%添加区, D-CVP20%: DHAクロレラ20%添加区, CVP20%: クロレラ20%添加区.

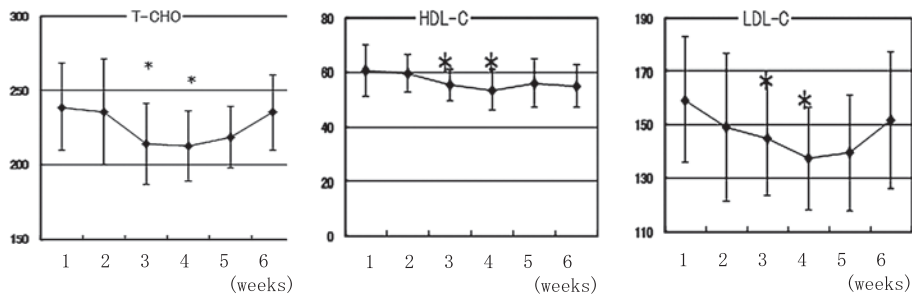


図4. 中年健常人におけるDHAクロレラの血清脂質低下作用. T-CHO: 血漿総コレステロール濃度 (mg/dl), HDL-C: 血漿HDL濃度 (mg/dl), LDL-C: 血漿LDL濃度 (mg/dl).

分子中にも一部のDHAは取り込まれる。クロレラのもつリン脂質はホスファチジルコリン (PC), ホスファチジルエタノールアミン (PE), ホスファチジルグリセロール (PG) が主要なリン脂質であるが, DHAはPGにより多く取り込まれ, PE, PCにはPGほど取り込まれない。0.2%のDHA (純度92.9%, FFA) を培養液に添加して得られたクロレラ細胞の, 各リン脂質の構成脂肪酸中のDHA含有率はPC 5.3%, PE 9.3%, PG 15.6%となる<sup>2)</sup>。

また, クロレラのもつグリセロ糖脂質はモノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG), ジガラクトシルジアシルグリセロール (DGDG), スルホキノボシルジアシルグリセロール (SQDG) が主要成分であるが, DHAクロレラ細胞では, 上記リン脂質同様に一部のDHAはグリセロ糖脂質分子中にも取り込まれる。各グリセロ糖脂質の構成脂肪酸中のDHA含有率はMGDG 3.0%, DGDG 4.0%, SQDG 3.8%と報告されている<sup>2)</sup>。

**DHAクロレラの機能性** クロレラは機能性食品として古くから利用されているが, DHAクロレラはクロレラの機能性に加え, DHAの機能性を併せ持つことが期待される。さらにリン脂質やグリセロ糖脂質中にDHAが取り込まれることにより, 魚油中のDHAと比

較してより高い機能性が期待される。

コレステロール負荷飼料に通常のクロレラ, あるいはDHAクロレラを添加してラットに4週間投与すると, コレステロール負荷飼料投与区では総コレステロール (T-CHO) やLDL-コレステロール (LDL-C) が顕著に上昇し, ラットは高コレステロール血症を呈するが, DHAクロレラ投与区ではDHAクロレラの投与量依存的にT-CHOおよびLDL-Cレベルの上昇抑制作用が認められた(図3)<sup>3)</sup>。

また, DHAクロレラと同量の通常クロレラ投与区でも上昇抑制作用は認められたが, その効果はDHA富化により増強された。

さらに, DHAクロレラを中年健常人に投与し, 血清脂質に対する影響を検討した結果<sup>4)</sup>, 9週間のDHAクロレラ投与で血清中のT-CHOやLDL-Cは有意な低下を示した。投与中止後3週間はこの状態は維持されたが中止後6週間で投与前のレベルに戻った(図4)。DHAクロレラの血清コレステロール低下作用は通常のクロレラより強いことが示され, 新たな機能性食品素材としての利用が期待される。また, DHAは多岐にわたる生理機能をもつことから, DHAクロレラの新たな機能性検討の

展開が期待される。

また、 $\gamma$ -アミノ酪酸（GABA）を富化したクロレラも開発され、血圧上昇抑制作用が確認されている<sup>5)</sup>。クロレラに限らずユーグレナや後述のラビリンチュラ類についても、その細胞内にPUFAや共役脂肪酸、ビタミン類など特定の成分を富化することが可能であり、各成分を富化した細胞の機能性が検証されつつある。このような細胞レベルのマイクロカプセル化技術や、細胞内でDHAをリン脂質やグリセロ糖脂質の構成脂肪酸として取り込み、新たな機能性を付与するといった分子レベルでの加工・変換技術は微生物による機能性脂質生産においてさらなる展開が期待される。

### ラビリンチュラ類の利用

海洋性の微生物や微細藻類の中には、DHAやエイコサペンタエン酸（EPA）などのn-3 PUFAを生産するものがいくつも知られているが、高い増殖性及び脂質蓄積性からラビリンチュラ類の産業利用が各方面で検討されている。ラビリンチュラ類のなかでもヤブレッツボカビ科に属するスラウストキトリッド（Thraustochytrids）は増殖性及び脂質蓄積性の点から産業利用には適していると考えられる。スラウストキトリッドには、これまで応用面での検討例が多いオーランチオキトリウム（*Aurantiochytrium*）、シゾキトリウム（*Schizochytrium*）などの11属が含まれることが最近の分子系統解析<sup>6,7)</sup>によって示されており、いずれの属のスラウストキトリッドもDHAやEPA、ドコサペンタエン酸（DPA）、アラキドン酸（ARA）などのPUFAを細胞内に蓄積する。

筆者らはこれまでにさまざまなスラウストキトリッドを天然海から分離し、現在およそ2000株の菌株ライブ

ラリーを保有しているが、その中でも沖縄県波照間島の沿岸海水から分離した*Aurantiochytrium limacinum* mh0186株（図5）は高い増殖性と著量のDHAを細胞内に蓄積することを特徴とする分離株である<sup>8)</sup>。

15%グルコースのような高い糖濃度でも増殖が可能で、グルコースの流加培養で100 g/L以上の高いバイオマス収量を得ることができる。さらに、培養温度については15～35°Cの広い温度帯で良好な増殖を示し、増殖速度は落ちるものの、10°Cでも増殖が認められる<sup>9)</sup>。

また、*A. limacinum* mh0186株の乾燥細胞中の脂質含量は60–65%に達し、脂肪酸組成（図6）をみると、培養条件にかかわらず細胞の主要な脂肪酸はパルミチン酸、n-6 DPA、DHAであり、EPAやARA、モノエン酸～トリエン酸はほとんど含まれない。培養温度が低いほど総脂肪酸中のDHAの割合が高くなる傾向にあり、10°Cで培養した細胞では、総脂肪酸中に占めるDHAの割合は70%近くに達する。

培養条件によってはC15:0やC17:0といった奇数鎖飽和脂肪酸が総脂肪酸中に数%～10数%含有されるが、これら奇数鎖脂肪酸は培地中にビタミンB<sub>12</sub>を添加することで消失する（図7<sup>10)</sup>。

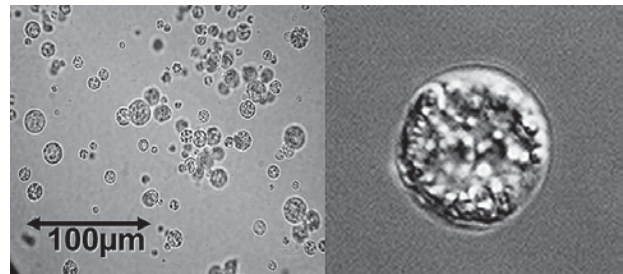


図5. *Aurantiochytrium limacinum* mh0186株

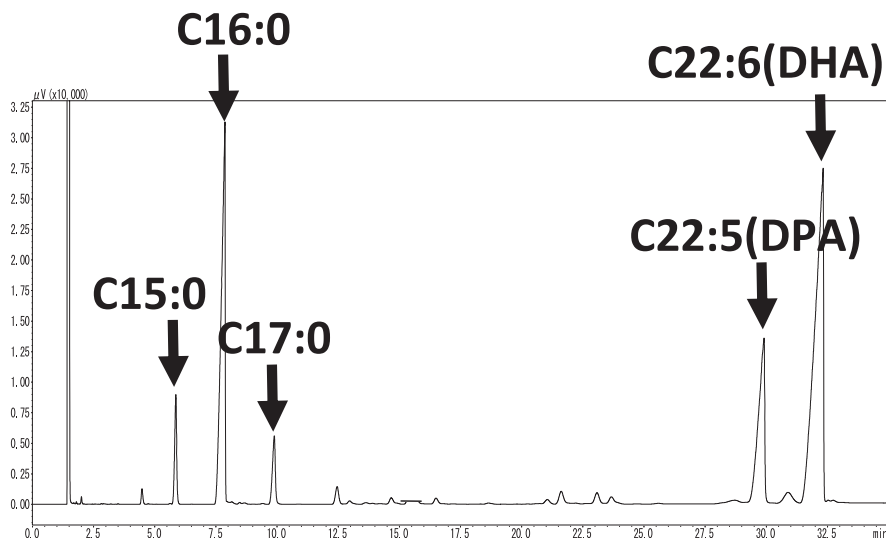


図6. *A. limacinum* mh0186株の脂肪酸組成

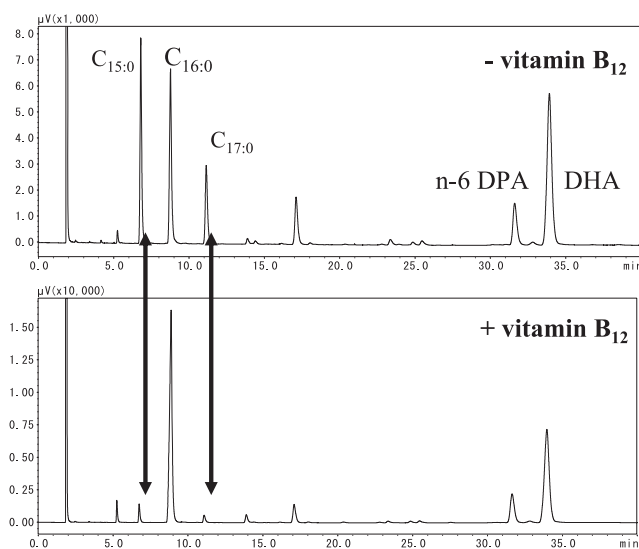


図7. ビタミンB<sub>12</sub>添加による脂肪酸組成の変化

これはビタミンB<sub>12</sub>無添加の場合、ビタミンB<sub>12</sub>を補酵素とするメチルマロニルCoAムターゼがアポ酵素として細胞内に存在するために機能せず、プロピオニルCoAがTCAサイクルに流れずに脂肪酸合成のプライマーとして利用されることによる。ビタミンB<sub>12</sub>を培地に添加することで、メチルマロニルCoAムターゼがビタミンB<sub>12</sub>を補酵素として利用可能になり、ホロ酵素として機能することによってプロピオニルCoAがTCAサイクルで消費されることにより奇数鎖脂肪酸が消失する<sup>11)</sup>。

A. limacinum mh0186株の細胞脂質は大部分が中性脂質、特にTGであり、培養条件などによって脂質含量が変動する場合はTG量が増減する。そのほか、少量の糖脂質とステロールやスクワレン、細胞重量の数%のグリセロリン脂質を含有し、主要なリン脂質クラスはホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトールなどである。

スラウストキトリッドは著量のDHAを細胞内に蓄積することから、DHAをはじめとするPUFAの生産者として注目されてきた。しかしながら、最近ではPUFA以外の脂質素材の生産についても検討されはじめ、その高い脂質蓄積性を生かしてさまざまな脂質素材の生産に利用することが検討されている。

スラウストキトリッドは少量のカロテノイドをもっており、属によってβ-カロテンのみをもつグループ (Schizochytrium など)、β-カロテン、カンタキサンチンをもつグループ (Oblongichytrium など)、β-カロテン、カンタキサンチン、アスタキサンチンを持つグループ (Aurantiochytrium など) が知られており分類指標としても利用されてきた。しかしほとんどのスラウストキト

リッドではカロテノイド含有量はわずかで、培養条件によって若干黄色～ピンク色を呈する程度である。しかし我々が鹿児島県薩南諸島中之島近海から分離した *Thraustochytrium* sp. NE-03株は寒天培地上で濃赤色のコロニーを形成し、ジャーファーメンターで培養してもその培養液は濃い赤色を示す。細胞の主要なカロテノイドはアスタキサンチンで、若干のカンタキサンチン、β-カロテンをも含有する。現在、培養条件の最適化による生産量の改善を図るとともに、アスタキサンチン生合成経路の解明と生産性の増強を進めている。今後はDHAのようなPUFAと同時に、アスタキサンチンなどのカロテノイドが発酵生産可能な系の構築が期待される。

EPAやDHAなどのn-3PUFAの生理機能が注目されて以来、EPAは医薬・食品素材に、DHAは食品素材として利用されてきたが、現在のところその供給源は魚類に頼っている。海外のメーカーにおいては藻類などにより発酵生産したn-3 PUFAを食品素材として供給しているところがあるが、コスト的には魚由来の方が、はるかにメリットがあるようだ。しかし、将来的に水産資源が減少・枯渇する可能性もあるし、各国の水産資源管理の状況によっては世界中からいつでも水産資源を調達できる時代がいつまで続くかわからない。そういった水産資源を取り巻く状況を考えると、魚類からの抽出・精製にかわる生産技術の開発を進めておく意義は大きいと考えられる。またn-3 PUFAを発酵生産するメリットとしては、持続的生産が可能な点以外にも、複雑な脂肪酸組成を持つ魚油に比べて比較的シンプルな組成の脂肪酸を提供して精製コストを抑えることができる可能性もあげられる。そのような意義やメリットを考えると今後、分子育種による生産性の向上や、さらに高密度での効率的培養をめざして、スラウストキトリッドの脂質蓄積性や培養特性に大きな期待を寄せていきたい。

## 文 献

- 1) Hayashi, M. et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 202 (2001).
- 2) 雪野繼代ら：日本栄養食糧学会誌, **55**, 331 (2002).
- 3) 小西史子ら：日本栄養食糧学会誌, **55**, 215 (2002).
- 4) 田中邦明ら：日本栄養食糧学会誌, **55**, 323 (2002).
- 5) 中村寿雄ら：日本農芸化学会誌, **74**, 907 (2000).
- 6) Yokoyama, R. and Honda, D.: *Mycoscience*, **48**, 199 (2007).
- 7) Yokoyama, R. and Honda, D.: *Mycoscience*, **48**, 329 (2007).
- 8) Nagano, N. et al.: *J. Oleo Sci.*, **58**, 623 (2009).
- 9) Taoka, Y. et al.: *Mar. Biotechnol.*, **11**, 368 (2009).
- 10) Hayashi, M. et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 222 (2007).
- 11) Miyamoto, E. et al.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **53**, 471 (2007).