

屋外大規模培養由来の藻を用いた有用脂質製造法

茨城大学 農学部 資源生物科学科 分子遺伝学研究室 教授 朝山 宗彦
Biox 化学工業株式会社 代表取締役 佐々木 大作

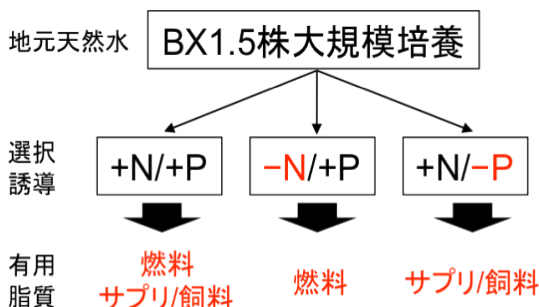
「背景と概要」

微細藻類は、優れた炭酸固定能を持ち、光合成能は高等植物のそれと比較して数十倍とも言われている。こうした能力を利用して、近年、微細藻類に地球温暖化の主因とされる排気炭酸ガスを光合成により固定させ、それにより生産されるブドウ糖を介して、最終的に藻細胞に燃料等の有用有機物を蓄積させる試みが国内外で活発に行なわれている [学術論文 1, 2]。

	記号	常用名	融点℃	用途、効果
飽和脂肪酸	16:0	パルミチン酸	63.1	固形燃料、化粧品・界面活性剤
	18:0	ステアリン酸	69.6	固形燃料(ロソク)、単分子膜形成可能
	20:0	アラキジン酸	76.5	食用(ピーナッツ・大豆)油、界面活性剤
	22:0	ヘン酸	81.5	食用(アブラナ)油、血中コレステロール上昇原因、整髪料
不飽和脂肪酸	16:1	パルミト オレイン酸	0	液体燃料、食用(マカデミアナッツ)油、脳卒中予防効果
	18:1	オレイン酸	16	液体燃料、食用(オリーブ)油、サプリメント、飼料、過酸化脂質の抑制効果
	18:2	リノール酸	5	ω6必須脂肪酸、食用(亜麻・ヘニバ(マ・コーン)油、サプリメント、飼料、悪玉コレステロール抑制効果
	18:3	αリノレン酸 (ALA)	-11	ω3必須脂肪酸、葉・海藻・植物プランクトン油、サプリメント、飼料、動脈硬化防止・うつ病やアレルギー抑制効果、体内でEPAやDHAに変換
	20:4	アラキドン酸 (ARA)	-90	ω6必須脂肪酸、肉・魚・卵(リノール酸由来)油、サプリメント、飼料、脳に多く存在、調整乳
	20:5	エイコサペンタエン酸 (EPA)	-53	ω3必須脂肪酸、青魚油 (ALA由来)、サプリメント、飼料、中性脂肪低下・血小板凝集抑制、血液粘度を低下、炎症抑制効果
	22:6	ドコサヘキサエン酸 (DHA)	-44	ω3必須脂肪酸、青魚油 (ALA由来)、サプリメント、飼料、記憶・判断力向上、認知症抑制、視力回復・精神安定効果、悪玉コレステロール抑制効果

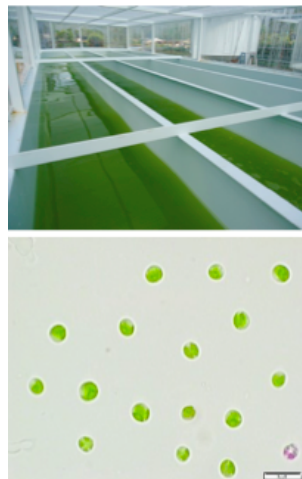
微細藻類由来の有用脂質としては、**上図**のようにバイオディーゼル燃料の元となる中性脂肪(トリアシルグリセロール, TAG) や遊離脂肪酸(FFA)などが挙げられる。微細藻類の中でも、クロレラやパラクロレラなど緑藻(真核光合成微生物)は、TAGやFFAの生産能が高い種として知られている [学術論文 3, 4]。また緑藻などを用いた機能性多糖や油脂の生産法は報告されている [特許関連 1, 2] もの、従来法では、ある藻株を用いると出口産物が限定され、例えば「バイオ燃料」と「サプリメント(サプリ)や飼料」などを一種類の藻から用途にあわせて選択的に、かつ有用脂質を屋外大規模培養由来の藻から製造する技術は知られていなかった。

そこで本発明では、発明者が自然界より発見した新種緑藻 *Parachlorella* sp. BX1.5 株細胞を用い、地元天然水で育つパラクロレラ優先種の屋外大(10 トン)規模培養液を由来とした選択的誘導(+N/+P, -N, -P 培地による培養)により生産される有用脂質(多価不飽和脂肪酸を含む中性脂肪)製造法を開発した(下図)。



「実施例」

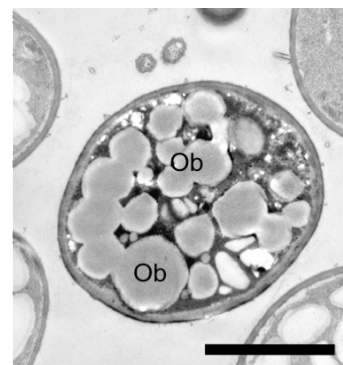
自然界より発見された微細藻類の 18S 遺伝子塩基配列を解析したところ、クロレラと近種のパラクロレラ藻の新種であることが明らかとなり、これを緑藻 *Parachlorella* sp. BX1.5 と暫定的に命名した。この株を広島の地元天然水をベースに作製した主に窒素・リン源などを主成分とする培養液を用い、10 トン規模の培養液で数週間~2 ヶ月程度生育させた(右図: 上パネル)。この藻培養液(通常生育条件: +N/+P)に存在する細胞を光学顕微鏡で観察したところ、直径 3~4 μm 程度の BX1.5 株細胞が優先的に認められた(右図: 下パネル)。通常生育条件での菌体収穫量は、年間を通して良好であり、藻乾燥重量 約 100g ~ / 1 トン培養液 / 日であった。



従来の屋外大規模培養では、高温(20~30℃)・強光が必要とされるため低緯度地域での培養に制限されたり、雑菌が優先的に繁殖したりする場合があります。目的藻種の培養が困難だったりするが、BX1.5 株と天然水を組み合わせた培養により、それら屋外大規模培養での雑菌繁殖の危険性と培養経費を大幅に軽減できる。

一方、上記通常培養条件下(+N/+P)で生育した

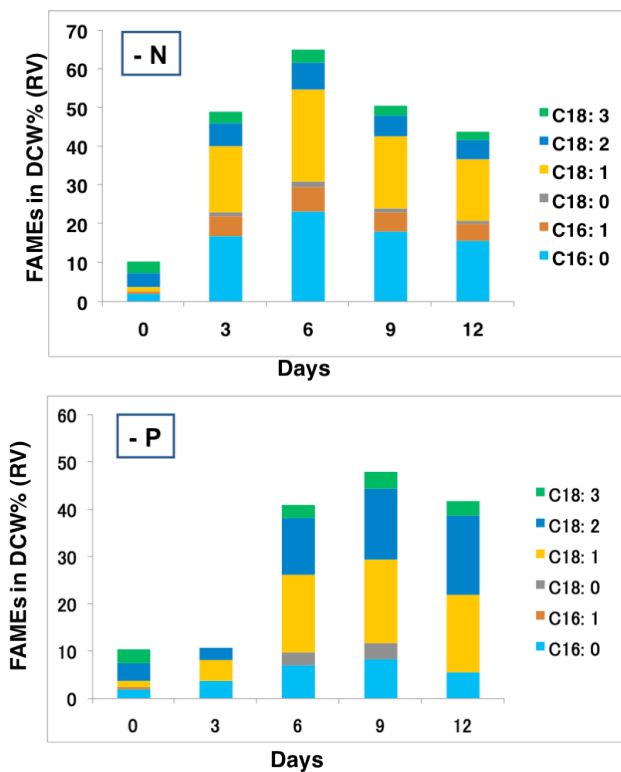
BX1.5 株細胞液を一旦集菌し、約 10 倍に濃縮してから窒素源(NaNO₃)を培地から抜いた新しい BG11-N 液体培地(-N/+P)に菌体を移しかえて、2%炭酸ガスで充満したインキュベーター内で更に引き続き6日間培養した。同様に、リン源(K₂HPO₄)を抜いた新しい BG11-P 液体培地(+N/-P)に菌体を移しかえて、2%炭酸ガスで充満したインキュベーター内で更に引き続き9日間培養した。



このようにして得られたそれぞれの培地から BX1.5 細胞を遠心分離により回収し、全脂質を抽出し、これを脂肪酸メチルエステル化した後、FAMES 量(%)を FID-MS で分析した。

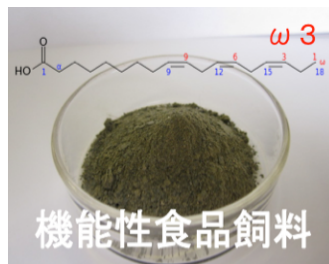
その結果、通常培養条件下(+N/+P)で生育させた細胞では、C16:0 と C16:1 と C18:0 の FAMES(燃料相当)が FAMES 総和(100%)の約 26%であり、18:1 と 18:2

と 18:3 (サプリ/飼料相当) の FAMES 量は約 70%であった。一方、窒素源欠乏培養条件下(-N/+P)で生育させた細胞では、C16:0 と C16:1 と C18:0 の FAMES (燃料相当) が FAMES 総和 (100%) の約 47.5%であり、18:1 と 18:2 と 18:3 (サプリ/飼料相当) の FAMES 量は約 52%であった。この条件下での細胞より脂質を抽出し薄層クロマトグラフィーと電子顕微鏡(前頁図)で分析すると中性脂肪 (TAG) の細胞内大量蓄積(細胞当たり約 55~70%と予測)が明らかとなった。更にリン源欠乏培養条件下(+N/-P)で生育させた細胞内に蓄積する脂質を薄層クロマトグラフィーで分析すると遊離脂肪酸 (FFA) の大量蓄積が明らかとなった。この場合、C16:0 と C16:1 と C18:0 の FAMES (燃料相当) が FAMES 総和 (100%) の約 24%であり、18:1 と 18:2 と 18:3 (サプリ/飼料相当) の FAMES 量は約 75%であった(下図)。

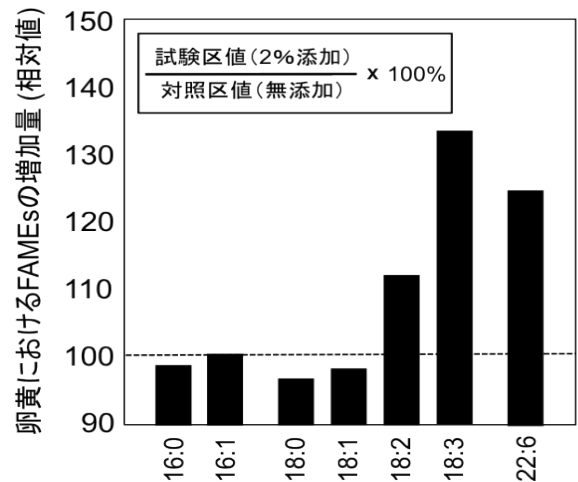


以上の結果、選択的誘導培地により、通常培養条件下(+N/+P)で生育させた細胞は燃料とサプリ/飼料に適し、窒素源欠乏培養条件下(-N/+P)で生育させた細胞は燃料製造に適し、またリン源欠乏培養条件下(+N/-P)で生育させた細胞はサプリ/飼料に適していることが明らかとなった。

これらを踏まえ、屋外大規模培養より通常培養条件下で生育させた BX1.5 培養液より細胞の乾燥粉末を調製し(右図)、これを用いて BX1.5 細胞の飼料としての安全性試験と鶏卵成分に与える効果を試験した。先ず「単回経口投与毒性試験」では、ラットに BX1.5 細藻乾燥粉末を投与したことによる死亡発現は認められず、順調に体重増加し毒性は認



められなかった。次に「復帰突然変異試験」についても遺伝子突然変異誘発性は認められず、両試験ともに良好な結果を得た。更に、BX1.5 細胞粉末を鶏の飼料に 2%になるように配合し、摂食試験や鶏卵成分への影響を試験した。その結果、鶏卵中の有用多価不飽和脂肪酸 C18:2 (リノール酸、 $\omega 6$ 脂肪酸) 並びに C18:3 (α リノレン酸、ALA、 $\omega 3$ 脂肪酸) と C22:6 (ドコサヘキサエン酸、DHA、 $\omega 3$ 脂肪酸) 量が無添加の対照区と比較して 12~33% 増加する傾向にあった。



以上、新種 BX1.5 緑藻は地元天然水を培地に用い、通年を通した屋外大規模培養が可能であり、かつ有用脂質製造にも適している。更に選択的培養条件下に晒すことで出口産物を燃料やサプリ/飼料に自由に設定することができる。本新技術により、安全な有用脂質がコスト安に製造でき、それ故に地域の藻産業創成に資する発明と思われる。

「引用資料」

➤ 学術論文

1. Schirmer A *et al.* (2010) Science 329 巻, 559-562 頁 doi: 10.1126/science.1187936.
2. Choi YJ *et al.* (2013) Nature 502 巻, 571-574 頁
3. Mizuno Y *et al.* (2013) Biores. Technol. 129 巻, 150-155 頁
4. Takeshita T *et al.* (2014) Biores. Technol. 158 巻, 127-134 頁

➤ 特許

1. PCT/JP2009/065025 (優先日 2008.8.21) : パラクローレラ属新規微細藻類
2. 特開 2015-231363 : 燃料油および機能性油を産生する微細藻類