

藻由来新奇多糖の特性と利用

茨城大学 農学部 食生命科学科 教授 朝山 宗彦
茨城大学 農学部 食生命科学科 准教授 中村 彰宏
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、藻によるモノつくり「バイオリファイナリー」が国内外で活発に行なわれている。微細藻類由来の有用物質としては、図1に示すように燃料油や機能性多糖、光合成色素など多岐にわたる。

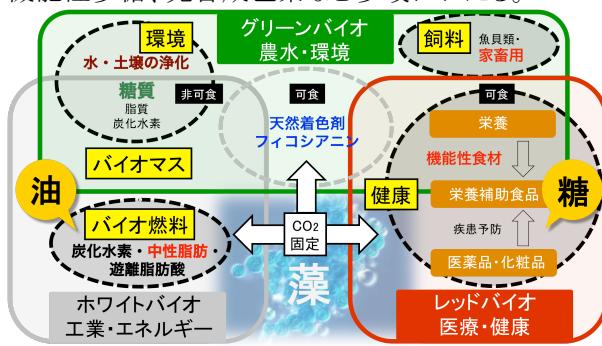


図1 藻類が貢献する分野

微細藻類のうち緑藻 *Parachlorella*(パラクロレラ)は、細胞の大きさが比較的小さい(直径数 μm)真核光合成微生物であり、これまで主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)を細胞内に乾燥重量で数十%に及ぶまで蓄積することが報告されている。一方、発明者(朝山 宗彦)と Biox 化学工業株式会社(佐々木 大作)の共同研究により、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)の生産・製造に成功している[特許資料1]。

この場合、中性脂肪をメチルエステル化した化合物(FAMEs)を分析したところ、培養条件に依存して細胞内にリノール酸(C18:2)と α リノレン酸(C18:3, オメガ3 脂肪酸)の顕著な蓄積が認められ、これらは飲食品の優れた原料になりえる事が明らかとなっている。

本発明では、BX1.5 株が細胞外に分泌する新奇多糖の特性を明らかにし、その利用に関する検証を行った。以下に実施例を示す。

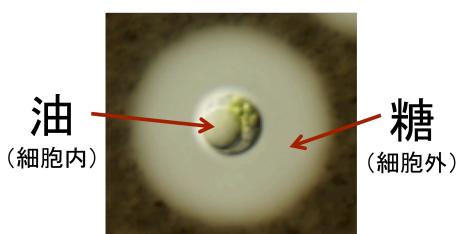


図2 BX1.5の油と細胞外多糖(EPS)

ろ、培養条件に依存して細胞内にリノール酸(C18:2)と α リノレン酸(C18:3, オメガ3 脂肪酸)の顕著な蓄積が認められ、これらは飲食品の優れた原料になりえる事が明らかとなっている。

本発明では、BX1.5 株が細胞外に分泌する新奇多糖の特性を明らかにし、その利用に関する検証を行った。以下に実施例を示す。

「実施例」

1) 菌体外多糖(EPS)の抽出

BX1.5 純化株を BG11 培地 [特許資料1] で 6 日間本培養した。この時、通常 BG11 培養液(通常生育条件: +N/+P)に加え、窒素欠乏(-N)並びに 200mM 塩化ナトリウム添加(+NaCl)、及び人工海水用粉末を添加した BG11 培地を同時に準備し培養した。培養後に BG11-N 培地より抽出した菌体を墨汁液で染色した結果、細胞内には油、菌体外には EPS と思われる層が認められた(図2)。等量の本培養液から同条件下で EPS をエタノール抽出を行なった結果を図3に示した。すると BG11-N 培地で培養した場合、他の培養条件下のそれに比べて、EPS + 細胞(バイオマス)=白層体積が著しく多い

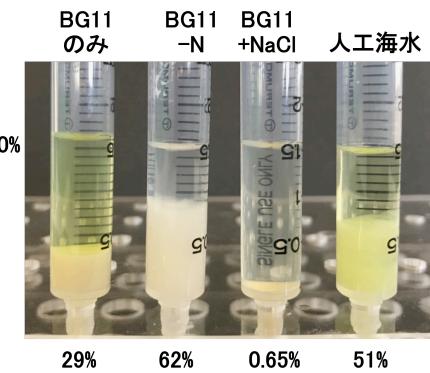


図3 EtOH抽出過程のBX1.5EPS

ことが明らかとなった。以下、BG11-N 培地で培養した BX1.5 の EPS を用いて試験を行った。

2) EPS の分子量と形状

抽出・精製した EPS の絶対分子量をゲル濾過に供して解析した結果、 2.11×10^6 ダルトンであることが明らかとなった(図4上)。この値は、今までに知られて

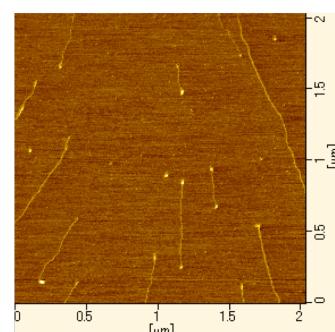
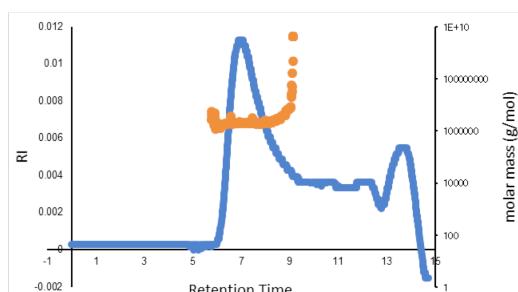


図4 BX1.5EPSの分子量(上)と形状(下)

る EPS の中でも最も高分子の一つにあげられる。更に原子間力顕微鏡(AFM)により EPS の形状を観察したところ、多糖鎖には殆ど分岐が認められず、直鎖であった。

4) EPS の糖等組成と分子構造の予測

EPS を硫酸を用いて単糖に分解後、これを HPLC 分析した。ラムノース(Rha):ガラクトース(Gla):グルコース(Glc):キシロース(Xyl) = 53:18.4:14.4:14.3 を主成分とし、ウロン酸残基を全体の約 10% 含む新規組成からなる酸性ラムナン(グルカン)であることが判明した(図5上)。この組成を元に、可能な分子構造を予測した(図5下)。

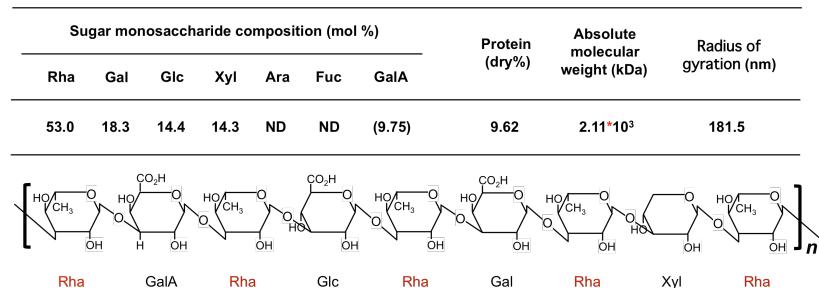


図5 BX1.5EPSの糖組成と想定される分子構造

5) EPS の粘性特性

食品添加素材の可能性を検証するため、BX1.5EPS を 10 度から 40 度で加熱後、粘度測定を行なった。その

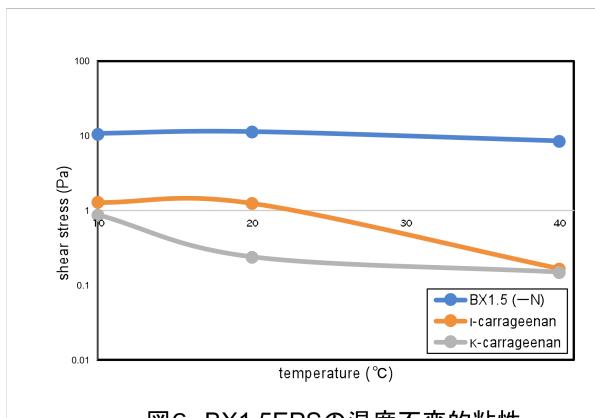


図6 BX1.5EPSの温度不变的粘性

際、対照区として海藻由来多糖のカラギーナン(XG、ゲル化剤)を用いた。その結果、BX1.5EPS は温度変化に強く、その粘性は常に一定であり、食品添加剤として適

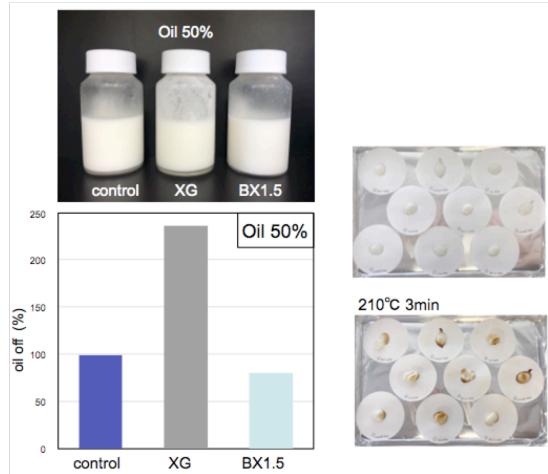


図7 BX1.5EPSの食品添加剤としての可能性

していることが明らかとなった(図6)。

6) EPS の食品添加剤としての可能性

マヨネーズを作製する際、食用油 50% に BX1.5EPS を一定量添加し混合した後、oil-off 分離状況を観察した。対照区として EPS 無添加(コントロール)と同条件下で XG 添加した場合と比較した。その結果、BX1.5EPS 添加の試料は、その他と比較して食用油と馴染みが良く、分離があまり見られないことが判り、食品添加剤向きであった(図7)。

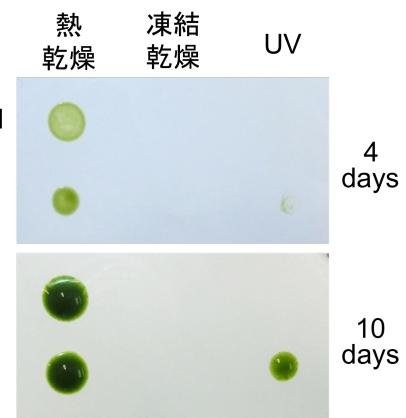
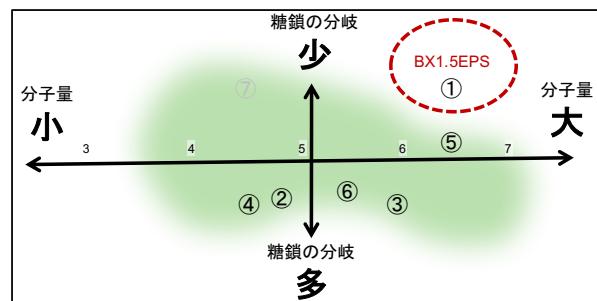


図8 BX1.5EPSの化粧品添加剤としての可能性

7) EPS の化粧品添加剤としての可能性

BG11 培養後の BX1.5 細胞を回収し、これに一定量の BX1.5EPS を添加して、乾燥ストレスと紫外線(UV)に晒した。これを BG11 寒天培地上にスポットし、4 日目と 10 日目の様子を観察した(図8)。その結果、熱乾燥と UV 照射に対して抵抗性を示していた。これは、BX1.5EPS 添加が、乾燥と UV ストレスに対して有効に働く効果を示した興味深いものであり、化粧品添加剤とし



名称	由来細胞	分子量 (ダルトン)	鎖	糖組成	用途候補	資料
① 酸性ラムナン	綠藻 バラクロレラ <i>Parachlorella</i> sp. BX1.5	2.1×10^6	直鎖	Rha: Glc : Gic : Xyl = 53 : 18 : 14 : 14 Uronic acid 10%	飲食品、化粧品、医療品 etc	本願特許1
② バイオゼリー	綠藻 バラクロレラ <i>Parachlorella kessleri</i>	$5-8 \times 10^4$	分岐	Gal, Man (Ara, Rha, Xyl) Gal 50-75%	飲食品、化粧品、医療品 etc	特許2
③ 酸性ラムナン	綠藻 アオサリ <i>Monostroma nitidum</i>	8.7×10^5	分岐	Rha: Glc : Gic : Xyl = 79 : 53 : 18 : 14 Sulfate ester 28.2% Uronic acid 7.62%	飲食品、化粧品、医療品 etc	文献1, 2, 3
④ グリコプロテイン	綠藻 イカモ <i>Scenedesmus</i> sp.	4×10^5	分岐	Gla: Glu: Man: Rha: Fucose Glucosamine: Xyl = 29 : 18 : 16 : 16 : 14 : 4 : 3 (+ Uronic acid)	医療品 etc	特許3
⑤ サクラン	藍藻 シノバクテリア <i>Aphanothrix sacrum</i>	2.0×10^6	分岐	Rha: Glc: Glc: Xyl: Glc = 52:25:20:5	飲食品、日用品、化粧品 etc	特許4
⑥ スピルラン	藍藻 シノバクテリア <i>Arthrosphaera platenis</i> (<i>Spirulina</i> sp.)	2.6×10^5	分岐	Rha: Man: Flu: Glc: Xyl: Glc: Glc: Agl: A = 60 : 1 : 4.6 : 3 : 0.8 : 6 : 10 : 5	飲食品、化粧品、医療品 etc	特許5
⑦ カードラン	細菌 アルカリゲネス <i>Alcaligenes</i> sp.	?	直鎖 (β1,3)	Rha: Glc: Glc: Xyl: Glc = 52:25:20:5	飲食品、化粧品、医療品 etc	特許

図9 微細藻類および細菌の細胞外多糖(EPS)

ての可能性を示唆している。

以上をまとめ、他菌体由来のEPSとの特性を比較をした(図9)。BX1.5EPSの特徴を一言で言えば、従来EPS(図9上、緑色ゾーン)に比べ、超高分子量で直鎖型の酸性グルカン(ラムナン)構造を有していること、食品添加剤や化粧品添加剤としての可能性があること、などが挙げられる。図9下表で示されるように、微細藻類由来EPSは、抗血液凝集剤、抗ガン剤、抗ウイルス感染など医療品として有効であるので、BX1.5EPSも今後そのような効果についても検証してゆく予定である。何れにしてもBX1.5株は、細胞内に飲食品向け有用脂質、細胞外にも有用多糖を同時に生産できる(細胞の内側も外側も丸ごと利用できる)ことが今回初めて明らかにされた。この点、油と多糖を生産する場所が細胞内と細胞外に分かれているので、それぞれの生産場所が拮抗せず、他種藻を利用した生産系と比較しても物質生産効率が良く、極めて有利である。

「引用資料」

➤ 学術論文

1. Whe-Jun et al. Carbohydrate Polymers (2008) 74巻, 834–839頁
2. Lee et al. Carbohydrate Polymers (2010) 81巻, 572–577頁
3. Supatra et al. International Journal of Biological Macromolecules (2011) 48巻, 311–318頁

➤ 特許

1. 特願 2017-140281: 緑藻を用いた有用油脂製造法
2. 特開 2014-25035: 新規多糖体
3. 特開平 6-253881: 糖タンパク複合体およびその製造方法
4. 特許第 406644 (国際特許公開 WO2008/062574): 糖誘導体とその利用
5. 特開平 9-176022: 腫瘍転移抑制剤