総 説

海産藻類による多不飽和脂肪酸の
生産とその利用

瀬 戸 明

日清ファインケミカル(株) (〒221 横浜市神奈川区千若町1-3)

Production of Polyunsaturated Fatty Acids by a Marine
Microalgae and Its Commercial Utilization

Akira SETO

Nisshin Finechemical Co. Ltd. (1-3, Chiwaka-cho, Kanagawa-ku, Yokohama-shi, 〒221)

Nannochloropsis oculata (also called marine chlorella) is a marine unicellular algae used as a feedstuff in the Japanese aquaculture industry. Due to the high fat and icosapentaenoic acid (EPA) content, it serves as high nutritional feed in the food chain for fish hatchlings. EPA content of the organism could be modulated from 20 % to 40 % total extractable fat by varying the culture conditions. The maximum fat content of *Nannochloropsis* was about 30 % by weight, and the optimal cell density of 2.5×10^8 cells/mL achieved using a specially developed outdoor tank technology. *Nannochloropsis* lipid was predominantly polar (phospholipid and glycolipid), and the glycolipid fractions (mono- and digalactosyl diacylglycerols) contained over 70 % EPA in their fatty acid moieties. Due to the absence of docosahexaenoic acid (DHA), EPA from *Nannochloropsis* could be easily purified to over 95 %. Dietary supplementation of spontaneously hypertensive rats with intact *Nannochloropsis* cells resulted in a significant reduction of the salt-induced increase in blood pressure. However, these high fat/high EPA microalgae may be of the greatest use to the aquaculture industry as feed for zooplankton (brine shrimp and rotifers) cultures. *Nannochloropsis*-fed zooplankton was found to serve as a highly nutritious live feed which significantly increased the survival of the hatchlings of many cultured fish.

1 緒 言

イコサペンタエン酸 (EPA) をはじめとする多不飽和脂肪酸は、魚油中に多量に含まれていることがよく知られていたが、その存在意義はほとんど知られていなかった。1960年代半ばに、これらがプロスタグランジンの前駆体であることが発見されてから、にわかにその生体内代謝の研究が開始されるに至った。これまでに明らかとなっている EPA の生理作用の中でも「血小板凝集能の抑制作用」は特に顕著なものであり、すでに魚油から精製された EPA エチルエステルが医薬品として認可され、商品化されている。

このように EPA の医薬あるいは食品素材としての可能性は大きなものがあるが、その原料に関してはほとんどすべて魚油を中心に進められて来た。これに対して、EPA を微生物に生産させるための研究が数年前にス

タートし、①海産藻類、②海洋細菌¹⁾、③糸状菌²⁾などによる生産法が発表されている。これらの各技術については、本編において別の著者が発表されているので参照いただきたい。

本報では、当社が開発した海産藻類 (マリンクロレラ) の EPA に関する情報を中心として、微生物由来の EPA の特徴とその利用法開発について紹介する。

2 マリンクロレラに含まれる EPA

2・1 マリンクロレラとは

いわゆるクロレラと呼ばれるものの中には、健康食品素材として広く知られている淡水産クロレラと、古くから水産養殖業界で種苗生産時に使用されていた EPA を多量に含むマリンクロレラ (以下 MC と略す) とがある。近年、後者の分類に関して、これがナンノクロロプシス属の海産藻類であることが知られるようになった

が、本報では便宜上、古くから使われている「MC」という名称で呼ぶことにする。

この MC は、マダイやヒラメの種苗生産時の生物じ(餌)料であるシオミズツボフムシ用のえさとして利用されていた。近年、渡辺らにより、種苗生産過程で稚魚の成長に、飼料中の EPA・ドコサヘキサエン酸 (DHA) のような ω -3 系高度不飽和脂肪酸が重要な役割を果たしていることが証明された³⁾。すなわち海産魚において EPA は必須脂肪酸の一つであり、これを摂取しないと正常な成長を示さない。そのため各種苗生産場では EPA を含む MC を各々個別に生産していたが、いずれも培養細胞密度が低く、EPA 含量も不安定であった。

2・2 マリクロレラ培養法

各地の栽培漁業センターなどで培養されている通常の MC 密度は 2,000 万~4,000 万細胞/mL であるとともに、その密度に到達するために必要な培養期間も、種苗生産のピーク時が冬~春であるため、かなり長かかっていた。そこで我々は MC の基本的な培養条件を種々検討し⁴⁾、最も効率の良い培地組成と培養条件を開発するとともに、高密度培養に適した EPA 含量の高い MC 株のスクリーニングを行った。特に EPA 含量の安定化

Table-1 Effect of culture temperature on growth rate and fatty acid composition of *Nannochloropsis*.

Culture temp. (°C)	20	25
Culture (d)	6	6
Final wet cell (g/L)	1.16	1.20
Total lipid content (% by dry weight)	14.5	23.2
Fatty acid composition		
14 : 0	11.9 %	9.4 %
16 : 0	13.4	14.5
16 : 1	21.2	11.2
18 : 0	—	0.4
18 : 1	1.4	8.6
18 : 2	1.7	2.2
18 : 3	—	7.9
20 : 4	3.4	3.2
20 : 5	44.7	20.3
Others	2.6	22.3

Table-2 Fatty acid composition of complex lipid fractions of *Nannochloropsis*.

	14 : 0	16 : 0	16 : 1	18 : 0	18 : 1	18 : 2	20 : 4	20 : 5 ^a
Total lipid (%)	5.2	16.1	22.0	0.5	4.8	3.9	6.3	37.4
Triacylglycerol (%)	8.7	28.8	49.7	0.1	3.8	—	0.4	2.4
Phospholipid (%)	4.6	24.9	35.6	0.2	6.7	4.9	5.0	13.1
Glycolipid (%)	7.7	4.3	4.5	—	0.8	1.1	5.2	72.5

^aEPA

においては、培養の最高温度をある一定の条件内に調整したり、増殖に必要なビタミン類の濃度を調整するなどして、EPA 含量が常に 35~40 % (総脂肪酸中) の MC を、従来法の 10 倍以上の培養密度で製造することが可能となった。Table-1 に MC の培養温度と脂肪酸組成の関係を一例として示した。培養温度が 20°C から 25°C になると EPA 含量は低下することが示唆された。

2・3 マリクロレラの脂質成分

MC 脂質を構成する脂肪酸の組成は、魚油のそれとは大きく異なり EPA は多量にあるが DHA は存在しない。このため EPA を高度に精製する場合には魚油を原料とする場合よりも容易となる。

また、MC の構成脂質成分は大部分が極性脂質であり、その含量比はおおむね糖脂質 30~50 %、リン脂質 20~40 %、クロロフィル 10~20 %、トリアシルグリセリン 5~10 % で、他の成分は微量である。また、これら各成分中に含まれる構成脂肪酸の組成を Table-2 に示す⁵⁾。

このように EPA は特に糖脂質に局在しており、トリアシルグリセリン中には少ない。このような糖脂質は、いうまでもなく細胞膜の構成成分として重要な役割を持つものであり、MC 中の EPA と魚油中の EPA の生理活性の違いの主要因と推定されている。またこの糖脂質の構造を調べた結果、糖部分はすべてガラクトースから成っており、モノ及びジガラクトシルジアシルグリセリンであった。

2・4 マリクロレラの用途開発

MC は前述のように EPA を多く含有するという点で大変興味深い微生物であるが、これを原料として高純度の EPA を生産するとなると、よほど純度の高いものでないとコスト的に合わないのが現状である。そのため我々は、MC の持つ EPA の特徴をそのまま生かすための商品化を検討し、次のような成果を得ている。

2・4・1 血圧上昇抑制作用 (ラット)

このような特徴を持つ MC の生理作用を調べる一連の研究の中で、SHR ラット (自然発症高血圧ラット) の食塩負荷による血圧上昇を抑制する作用は興味深い⁶⁾ (Fig.-1)。これは高食塩食摂取による血圧の上昇が、25 % の MC 粉末を食じ(餌)中に添加することにより、低食塩食レベルの血圧にまで抑制されることを示したも

ので、その後の通常食への切りかえにより再びその差は見られなくなる。これに対して脂質成分以外はあまり著しい栄養成分の差が認められない淡水クロレラ粉末には、このような血圧上昇抑制作用は見られなかった⁶⁾。

2.4.2 水産養殖餌料への応用

MC がもともと水産種苗生産に利用されていたことは前に述べたが、我々は次にこの MC の商業的利用法として、従来の MC にはなかった新しい機能を付与した種苗生産用餌料の開発を行った。

水産業の中でも栽培漁業が「作り育てる漁業」として注目されている。この栽培漁業の1つの重要なかきとなるのがし(仔)稚魚のえさとなる植物性プランクトンや動物性プランクトンの安定供給体制である。我々はこれまでに次のような種類のえさを、MC をベースとして開発した。

(1) アルテミア用飼料

アルテミアは、ヒラメなどの海産魚やエビ類の稚仔養成用飼料として広く使われている。通常アルテミアは、乾燥卵の形で販売されており、これを 28℃ 位の海水中で 24 h かけてふ(孵)化させたノープリウス幼生(体長 0.5 mm)の形で生物餌料として利用されている。このような生物餌料は、人工配合飼料の技術が進んだ現在でも、やはり稚魚が好んで摂取するため種苗生産上の重要

なえさとなっている。通常、ヒラメなどは、孵化直後はシオミズツボムシ(体長 0.2~0.3 mm)を食べ、次にアルテミアに移るわけであるが、これらの動物性プランクトンの栄養価は、その培養飼料となるものの栄養価が直接に反映される。我々が開発したアルテミア用飼料(商品名: マリンオメガー A)は、仔稚魚にとって必須とされる EPA を含有する MC を、アルテミアにも容易に消化されるように細胞壁を加工した製品である。従来、アルテミアの栄養強化は、乳化魚油や生の MC 細胞をノープリウスに投与して行われていたが、いずれ

Diets included a standard low salt diet (○), a high salt diet (●), a high salt diet containing 25 % *Nannochloropsis* powder (△), and a high salt diet containing 25 % freshwater *Chlorella* powder (▲).

Fig.-1 Effect of dietary regimen on blood pressure of spontaneous hypertensive rats.

(a)

(b)

Diet included digestive enzyme treated *Nannochloropsis*-DTMC (○), untreated *Nannochloropsis*-live cells (●), rice bran (△), or baker's yeast (□).

Fig.-2 Effect of dietary source on the survival (a) and growth rates (b) of brine shrimp nauplii in culture.

Table-3 Changes in fatty acid composition of cultured brine shrimp when fed a diet containing digestive enzyme treated *Nannochloropsis* (DTMC).

Day	Body length (mm)	16 : 0 (%)	16 : 1 (%)	18 : 0 (%)	18 : 1 (%)	18 : 2 (%)	18 : 3 (%)	20 : 4 (%)	20 : 5 (%)	22 : 6 (%)
0	0.5	13.4	18.2	8.3	32.1	5.7	5.7	5.6	8.1	0.1
1	0.9	13.2	18.1	7.9	23.3	5.7	5.3	2.2	17.3	0.2
2	1.2	6.4	19.0	5.4	24.5	9.7	8.0	3.3	17.9	0.8
3	1.5	14.9	16.5	4.8	18.8	8.6	5.5	3.7	19.7	1.5
4	1.8	13.5	16.2	4.4	16.1	9.2	6.4	4.0	23.4	1.0
5	2.1	12.0	15.4	3.7	16.0	9.3	6.9	3.9	23.5	1.4

もアルテミアにとって消化できるえさではないため、短期間の栄養強化の間に著しい活力低下をひきおこすことが多かった。その結果、生きていることが最大の良さであるべき生物飼料に大きなダメージがあった訳である。すなわちマリンオメガー A を使用することにより、従来は栄養強化や養成飼育が困難であったアルテミアを、体長 0.5 mm から数 mm サイズにまで容易に養成し、かつ栄養強化も同時にできるようになった⁷⁾。Fig.-2 (a) 及び (b) に各種の飼料で養成した場合のアルテミアの生残率と成長を示した。また、この中で、マリンオメガー A (DTMC) で養成したものの脂肪酸組成の経時変化を Table-3 に示した。このように従来から用いられていた飼料と比較して、マリンオメガー A は優れた成長と栄養強化の効果が認められた。

(2) シオミズツボワムシ用飼料

MC はもともとシオミズツボワムシ (ワムシと略記) のえさとして古くから使われていたことは前にも述べたが、MC 培養が天候に左右されて不安定になることが多いため、多くの種苗生産関係者は常に MC 生産に多大な労力と設備を投入しなければならなかった。これに対して、数年前からワムシ増殖用の飼料として生の淡水産クロレラ濃縮液が使われるようになり、ワムシ生産が大きく効率化された。しかしこうして培養されたワムシの栄養価は MC による培養ワムシと比較して全く低いものであり、そのため仔稚魚に投与する直前に高濃度の MC で 2 次培養する必要があった。

我々は、このような用途に対応する目的で、MC を高度に濃縮した後に無菌状態で長期保存できるタイプのワムシ用栄養強化飼料 (商品名: マリンアルファ) を開発した。Fig.-3 に、マリンアルファによるワムシの 2 次培養の効果 (EPA 含量の経時変化) を示すが、6~24 h の二次培養で急速な栄養価の改善が起きていることがわかる。

すなわち、淡水クロレラ濃縮液によるワムシ培養 (ワムシ増殖ステップ) と、マリンアルファによる二次培養 (ワムシの栄養強化ステップ) を組み合わせることにより、常に安定した条件で品質の良いワムシが生産できる

Nannochloropsis was added as a paste (150 g algae/L) to a rotifer culture containing 1000 individuals/mL. Supplementation with algae paste was at 750 g/1000 L (●), 300 g/1000 L (○), or 150 g/1000 L (▲).

Fig.-3 Enrichment of the omega-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) content of rotifers providing a dietary regimen including *Nannochloropsis*.

システムが完成された。

すでにこのようなシステムは、前述のアルテミア用飼料も含めて全国の種苗生産施設で多く使用されており、種苗生産量の向上に貢献している。

(3) 種苗生産フィールドへの応用

前述のような特徴を持つマリンオメガー A, マリンアルファを実際に生産現場で使用した場合の有効性を示すデータとして、Fig.-4 にヒラメ種苗生産の一例を示した。

Diets included standard brine shrimp nauplii plus artificial feed (●), and nutritionally-enriched (with *Nannochloropsis*) brine shrimp nauplii plus artificial feed (○). The experiment was started 32 d after hatching of the flounder and the fish density of the culture was 300 individuals/200 L tank.

Fig.-4 Effect of diet on survival rate of juvenile Japanese flounder.

Table-4 Effect of diet on growth of 17-day-old Japanese flounder larvae held at a density of 1000 individuals/200 L tank.

	Contol ^a	Enriched ^a
Survival rate (%)	6.9±0.5	29.8±6.9
Metamorphosis (%)	0	14.6±9.4
Body length (mm)	9.1±0.4	10.7±0.9
Body weight (g)	9.3±0.8	16.0±3.8
Activity test ^b	36.7	73.0

^aControl diets consisted of standard brine shrimp nauplii plus rotifers, and the enriched diet consisted of nutritionally enriched (with *Nannochloropsis*) brine shrimp plus rotifers.

^bActivity is measured by dipping up fish larvae with a scoop net five times (1 min per time) at 15 min intervals.

このように、特に種苗生産初期の段階における生残率に対して、これら飼料による栄養強化が著しい効果を示すことがわかる。また Table-4 に、栄養強化がヒラメ仔魚の成長と活力に及ぼす影響を示したが、いずれも栄養強化区で著しい有効性が認められている。

このほか我々は、クルマエビ用の初期餌料として MC を高度に可消化処理した飼料も開発し⁸⁾、商品化してい

Table-5 Fatty acid composition of *Isochrysis* sp. (Tahichian strain).

	<i>Isochrysis</i> sp.
14 : 0	14.1 %
16 : 0	15.8
16 : 1	5.5
18 : 0	0.8
18 : 1	13.3
18 : 2	4.3
18 : 3	5.5
18 : 4	16.4
20 : 5	2.5
22 : 6	15.4
Others	6.0

* % in total fatty acid

Table-6 Effect of fatty acid composition in rotifer fed *Isochrysis* sp. (Tahichian strain).

	Start	24 h
14 : 0	1.3 %	6.2 %
16 : 0	13.8	12.2
16 : 1	8.1	4.5
18 : 0	6.4	4.2
18 : 1	22.7	12.8
18 : 2	29.6	6.1
18 : 3	5.3	9.6
18 : 4	—	12.8
20 : 5	—	4.5
22 : 6	—	11.1
Others	12.8	16.0

* % in total fatty acid

る。

3 イソクリシスに含まれる DHA

近年、EPA と並んでその生理活性が注目されている PUFA として DHA がある。DHA の生理作用は EPA と共通する部分も多いが、特に水産養殖の分野などでは DHA に特異的な効果もいくつか見いだされている⁹⁾。この DHA も魚油由来の高純度製品などが医薬用途等に開発中であるが、種苗生産分野では微細藻類由来の DHA に対する要望が多い。そこで我々はいくつかの DHA 含有海産藻類のスクリーニングを行い、DHA 含量、細胞の形状、動物性プランクトン用飼料としての有効性などの観点からイソクリシス属の単細胞藻類が水産種苗生産用に適することを見いだした¹⁰⁾。Table-5 に

Isochrysis sp. (タヒチ株) の一種の脂肪酸組成を示す。なお本株の総脂質含量は培養条件によって異なるが、約 30~40 % である。

また、本株で 24 h にわたりワムシの栄養強化を行った結果、スタート時には認められなかった DHA が約 10 % 以上にまで高まることが示された (Table-6)。

このような DHA を含有する藻類については、本株以外にもいくつか知られているが、培養のしやすさ、動物性プランクトンの取り込まれやすさなどの視点からもさらに良いものが見いだされることが期待できると考えている。

[平成 5 年 (1993 年) 2 月 1 日受理]

文 献

- 1) K. Yazawa, K. Araki, K. Watanabe, C. Ishikawa, A. Inoue, K. Kondo, S. Watabe, K. Hashimoto, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54, 1835 (1988)
- 2) H. Yamada, S. Shimizu, Y. Shinmen, K. Aki-moto, H. Kawashima, S. Jareonkitmongkol "Industrial Applications of Single Cell Oils" American Oil Chemist's Soc., Illinois, p. 118 (1992)
- 3) T. Watanabe, F. Oowa, C. Kitajima, S. Fujita, *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 46, 35 (1980)
- 4) A. Seto, H.L. Wang, C.W. Hesseltine, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 61, 892 (1984)
- 5) A. Seto, *BIO INDUSTRY*, 3, 284 (1986)
- 6) 渡辺聡一郎, 間納由美子, 瀬戸 明, 藤田 匡, 昭和 60 年度日本栄養食糧学会講演要旨集, p. 180 (1985)
- 7) 小島栄司, 北川清弘, 瀬戸 明, 中村章彦, 高野瀬和治, 藤田征作, 安元 進, 北島 力, 酒本秀一, 日本水産学会講演要旨集 (昭和 61 年度春季大会), p. 47 (1986)
- 8) 小島栄司, 北川清弘, 瀬戸 明, 酒本秀一, 日本水産学会講演要旨集 (昭和 61 年度秋季大会), p. 127 (1986)
- 9) 竹内俊郎, 古板博文, 渡辺 武, 関谷幸生, 今泉圭之輔, 日本水産学会講演要旨集 (平成 4 年度春季大会), p. 211 (1992)
- 10) 山田 理, 佐野美代子, 公開特許, 平 4-346760