

35

助成番号 0035

スピルリナの栄養成分強化に関する研究

助成研究者：渡辺 文雄(高知女子大学 生活科学部 健康栄養学科)
共同研究者：宮本 恵美(高知女子大学 生活科学部 健康栄養学科)

栄養補助食品素材としてのスピルリナのこの栄養的欠点を克服するために、開放系によるスピルリナの培養条件を検討することで生理的に有効なビタミン B₁₂ (B₁₂) を強化する方法の基礎的知見を得ることを目的として、スピルリナの生育および B₁₂ 含有量に及ぼす Co と B₁₂ の影響について検討した。

開放培養系において *S. platensis* NIES-39 の生育に及ぼす CoSO₄ と B₁₂ の影響について検討した。その結果、*S. platensis* NIES-39 の生育において B₁₂ は全く影響を与えなかった。一方、CoSO₄ 添加培地においては B₁₂ 添加・無添加に関係なく対数増殖初期に若干生育が促進される傾向を示したが、有意なものではなかった。また、定常期において CoSO₄ 無添加培地のものと同一レベルとなった。以上の結果から CoSO₄ と B₁₂ は *S. platensis* NIES-39 の生育に必須でないことが示唆された。

各種培養条件下で 20 日間生育させた *S. platensis* NIES-39 乾燥藻体から B₁₂ を抽出し、微生物学的定量法で B₁₂ 含有量を測定した。その結果、培地中に B₁₂ を添加することによる有意な B₁₂ の増加は認められなかった。一方、培地中に CoSO₄ を添加することにより顕著に B₁₂ 含有量が増加した。

B₁₂ 結合タンパク質の内因子を用いた化学発光法では、いずれのものも微生物学的定量法の値に比べ非常に低い値を示した。また、化学発光法では微生物学的定量法で認められた CoSO₄ 添加による顕著な B₁₂ 含有量の増加がまったく認められなかった。一方、培地中に B₁₂ を添加することにより有意に B₁₂ 含有量が増加した。しかし、この B₁₂ 含有量の増加は、培地に添加した B₁₂ の 1% 未満であることから、*S. platensis* NIES-39 は外界の B₁₂ を細胞内に取込み・蓄積する能力を有しないことが示唆された。

CoSO₄ 添加による顕著な B₁₂ 含有量の増加が生理的に不活性な B₁₂ 化合物によるものかどうかを検討するために、C18 逆相 HPLC を用いて B₁₂ 化合物の分離・同定を行った。その結果、微生物学的定量法において CoSO₄ 添加により顕著に増加した B₁₂ 化合物は、真の B₁₂ ではなく Pseudo-B₁₂ の溶出位置と同一の挙動を示した。この結果は、CoSO₄ 添加により顕著に増加した B₁₂ 化合物は哺乳動物において生理的に不活性な Pseudo-B₁₂ の生成に由来ことを示唆している。

3.5

助成番号 0035

スピルリナの栄養成分強化に関する研究

助成研究者：渡辺 文雄 (高知女子大学 生活科学部 健康栄養学科)
 共同研究者：宮本 恵美 (高知女子大学 生活科学部 健康栄養学科)

1. 研究目的

藍藻のスピルリナ(*Spirulina sp.*)の食品としての利用の歴史は長く、タンパク質含有量が高く栄養的にも優れている。また、現代人が不足しがちな微量栄養素(ビタミンやミネラル)も豊富に含まれており、スピルリナ藻体自体が栄養的に優れた食品として利用されている。近年、スピルリナには抗ウイルス作用¹⁾、肝臓・腎臓障害の予防作用²⁾、抗アレルギー作用³⁾などの機能性因子も含まれていることも明らかとなった。また、スピルリナの全生産量の50%以上は飼料添加物に使われており、鑑賞魚や養殖魚介類の色揚げ・肉質改善・抗病原性向上などに利用されている。

現在、スピルリナを食糧や飼料として利用する場合に唯一問題となっている因子はビタミン B₁₂ (B₁₂) である。近年、B₁₂ の欠乏などによるホモシステイン代謝異常が心臓血管系疾病への危険因子となることが明らかとなり、また睡眠障害・男性不妊症の治療薬としての薬理的作用も報告され、現在注目されているビタミンである⁴⁾。食用藻類の中でもスピルリナは動物性食品にのみ含まれる B₁₂ を多量に含むことが栄養的特徴であるが、栄養補助食品として流通しているスピルリナ錠剤に含まれる B₁₂ は哺乳動物が利用することができない B₁₂ 化合物であることを示唆する論文が報告されていた⁵⁾。そこで、我々は市販されているスピルリナ錠剤に含まれる B₁₂ 化合物を単離し詳細に検討した結果、哺乳動物において生理的に不活性な Pseudo-B₁₂ であるところをはじめて明らかにした (Fig. 1)⁶⁾。

そこで、栄養補助食品素材としてのスピルリナのこの栄養的欠点を克服するために、開放系によるスピルリナの培養条件を検討することで生理的に有効な B₁₂ を強化する方法の基礎的知見を得ることを目的として、スピルリナの生育および B₁₂ 含有量に及ぼす Co と B₁₂ の影響について検討した。

2. 研究方法

2.1. 実験生物と培養条件

スピルリナは、財団法人地球・人間環境フォーラムつくば研究所から購入した *Spirulina platensis* NIES-39 を用いた。*S. platensis* NIES-39 は、500 mL 容コルベンをを用いて 100 mL の SOT 培地 (Table 1) で 25°C、光照射下 (40 μmol photon/m²/s) で振盪培養し定常期まで生育した細胞を実験に用い

た。

2.2. CoSO₄ と B₁₂ 添加培養実験

透明なアクリル水槽 (28 x 44 x 29 cm) を用いて 25 L の SOT 培地に CoSO₄ (12 µg/L) あるいは B₁₂ (10 µg/L) (あるいは両方) を添加した実験培地に上述の定常期まで生育した *S. platensis* NIES-39 培養液 500 mL を加えて、開放系で空気を通気しながら 25°C で 20 日間培養した。光照射は培養初期 (0~10 日目) は 40 µmol photon/m²/s で、培養後期 (11~20 日目) は 80 µmol photon/m²/s で培養した。*S. platensis* NIES-39 の細胞増殖度は、培養液を 2 日おきにサンプリングし島津社製 UV-1600 分光光度計で 750 nm の吸光度を測定することで評価した。

培養 20 日目で定常期に達した培養液を 3000 g 10 分間の遠心分離することで細胞を集めた。集めた細胞は蒸留水で洗浄した後、EYELA 社製凍結乾燥機 (freeze dryer FDU-830; dry chamber DRC-1N) により凍結乾燥した。乾燥藻体は秤量後、-80°C で貯蔵した。

2.3 B₁₂ の抽出法と定量法

スピルリナからの B₁₂ の抽出は KCN 法を用いて行った⁷⁾。貯蔵した各種乾燥藻体を 0.5 g 秤量し、0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 50 mL に懸濁後、超音波破碎機で細胞を均一にした。この懸濁液に 20 mg の KCN を加え、ドラフト内沸騰浴中で 30 分間加熱抽出した。室温まで冷却後、5000 g 10 分間の遠心分離上清液を回収し B₁₂ 抽出液として B₁₂ の定量に用いた。

B₁₂ の定量は、*Lactobacillus delbruekii* (旧名 *L. leichmannii*) ATCC7830 による微生物学的定量法と B₁₂ 結合タンパク質の内因子を用いた化学発光法で定量を行った⁷⁾。

2.4. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による B₁₂ 化合物の分析

上述の B₁₂ 抽出液 1.0 mL を Sep-pak Plus C18 カートリッジを用いて部分精製した後、Wakosil 5C18RS-II (4.6 x 150 mm) カラムを用いて HPLC 分析を行った⁶⁾。B₁₂ 化合物は 1% (v/v) 酢酸を含む 20% (v/v) メタノール水溶液で溶出した。HPLC カラムからの溶出液をバイオラド社製フラクションコレクターで 1 mL づつ分取し、減圧下で遠心エバポレーターにて乾固させた。蒸留水 1 mL を各画分に加え攪拌した後、微生物学的定量法により各画分の B₁₂ 含有量を測定した。

3. 研究結果

3.1. スピルリナの生育に及ぼす CoSO_4 および B_{12} の影響

開放培養系において *S. platensis* NIES-39 の生育に及ぼす CoSO_4 と B_{12} の影響について検討した (Fig. 2)。その結果, *S. platensis* NIES-39 の生育において B_{12} は全く影響を与えなかった。一方, CoSO_4 添加培地においては B_{12} 添加・無添加に関係なく対数増殖初期に若干生育が促進される傾向を示したが, 有意なものではなかった。また, 定常期において CoSO_4 無添加培地のものと同一レベルとなった。以上の結果から CoSO_4 と B_{12} は *S. platensis* NIES-39 の生育に必須でないことが示唆された。

3.2. スピルリナの細胞収量に及ぼす CoSO_4 および B_{12} の影響

各種培養条件下で 20 日間生育させた *S. platensis* NIES-39 の培地 1 L 当りの細胞収量を比較した (Fig. 3)。その結果, いずれの培養条件においても約 0.5 g 乾燥重量/L 培地となり, CoSO_4 と B_{12} は *S. platensis* NIES-39 の細胞収量を増加させることはなかった。この結果は, 上述の *S. platensis* NIES-39 の生育に及ぼす影響の結果とよく一致していた。

3.3. スピルリナの B_{12} 含有量に及ぼす CoSO_4 および B_{12} の影響

各種培養条件下で 20 日間生育させた *S. platensis* NIES-39 乾燥藻体から B_{12} を抽出し, 微生物学的定量法で B_{12} 含有量を測定した。その結果, 培地中に B_{12} を添加することによる有意な B_{12} の増加は認められなかった。一方, 培地中に CoSO_4 を添加することにより顕著に B_{12} 含有量が増加した (Fig.4 A)。

B_{12} 結合タンパク質の内因子を用いた化学発光法では, いずれのものも微生物学的定量法の値に比べ非常に低い値を示した。また, 化学発光法では微生物学的定量法で認められた CoSO_4 添加による顕著な B_{12} 含有量の増加がまったく認められなかった。一方, 培地中に B_{12} を添加することにより有意に B_{12} 含有量が増加した (Fig.4 B)。しかし, この B_{12} 含有量の増加は, 培地に添加した B_{12} の 1%未満であることから, *S. platensis* NIES-39 は外界の B_{12} を細胞内に取込み・蓄積する能力を有しないことが示唆された。

種々の食品中の B_{12} 含有量の測定において真の B_{12} に対しては微生物学的定量法と化学発光法は非常によい相関性を示すことが報告されている⁷⁾ことから, *S. platensis* NIES-39 の開放培養系で認められた CoSO_4 添加による顕著な B_{12} 含有量の増加は, 内因子との結合性の低い B_{12} 化合物の生成に由来することが推定された。

3.4. スピルリナに含まれる B₁₂ 化合物の分析

CoSO₄ 添加による顕著な B₁₂ 含有量の増加が生理的に不活性な B₁₂ 化合物によるものかどうかを検討するために、C18 逆相 HPLC を用いて B₁₂ 化合物の分離・同定を行った。その結果、微生物学的定量法において CoSO₄ 添加により顕著に増加した B₁₂ 化合物は、真の B₁₂ ではなく Pseudo-B₁₂ の溶出位置と同一の挙動を示した (Fig. 5)。この結果は、CoSO₄ 添加により顕著に増加した B₁₂ 化合物は哺乳動物において生理的に不活性な Pseudo-B₁₂ の生成に由来ことを示唆している。

4. 考察

今回開放系で培養した *S. platensis* NIES-39 の B₁₂ 含有量は、微生物学的定量法ならびに化学発光法とも、栄養補助食品として市場に流通しているスピルリナ錠剤に含まれる B₁₂ 含有量とよく一致していた。市販されているスピルリナ錠剤に含まれる主な B₁₂ 化合物が Pseudo-B₁₂ であるという知見とも一致していた。

Pseudo-B₁₂ はヒトを含む哺乳動物において生理的に不活性であるが、B₁₂ 拮抗阻害作用は認められていない。しかし、Herbert は⁸⁾ スピルリナ錠剤中に正体不明の B₁₂ 代謝阻害活性を有する B₁₂ 化合物が存在する可能性を報告している。今回の研究からスピルリナは Co 不含培地で培養することによりこれら生理的に不活性な B₁₂ 化合物の生成を抑えることができることが明らかとなった。

微細藻類の中には外界の B₁₂ を活発に取込み・蓄積する能力を有するものもあるが⁹⁾、スピルリナにはそのような能力がないことが明らかとなった。このことは、培地中に B₁₂ を添加しスピルリナ細胞に B₁₂ を取込ませることで B₁₂ を強化する方法が利用できないことを示している。

以上の結果から、現時点で最も現実的なスピルリナへの B₁₂ 強化法は、生理的に不活性な (あるいは B₁₂ 拮抗阻害活性を有する) B₁₂ 化合物の生成を抑えるために Co 不含培地でスピルリナを大量培養し、乾燥後錠剤へ成型する時に結晶 B₁₂ を添加することで B₁₂ を強化する方法が考えられる。

5. 今後の課題

開放系で培養されたスピルリナに存在する Pseudo-B₁₂ は、スピルリナ自身が合成しているのか、あるいは培養液に混在する細菌によるものかを明確にする必要がある。スピルリナ自身が Pseudo-B₁₂ の合成能を有するならば、B₁₂ 合成系に関与する酵素を遺伝子改変することにより真の B₁₂ 合成能を有するスピ

ルリナの分子育種を検討する必要性がある。

また、一部の細菌で報告されているような塩基置換反応により、培地中にジメチルベンズイミダゾールを添加することにより Pseudo-B₁₂ から真の B₁₂ への転換が可能かどうかについても検討の余地がある。

6. 引用文献

- 1) Hayashi, K., Hayashi, T. & Kojima, I. A natural sulfated polysaccharide, calcium spirulan, isolated from *Spirulina plantesis*: in vitro and ex vivo evaluation of anti-herpes simplex virus and anti-human immunodeficiency virus activities. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 12, 1463-1471 (1996).
- 2) Vadiraja, B. B., Gaikwad, N. W. & Madyastha, K. M. Hepatoprotective effect of C-phycocyanin: protection for carbon tetrachloride and R-(+)-pulegone-mediated hepatotoxicity in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 249, 428-431 (1998).
- 3) Yange, H. N., Lee, E. H. & Kim, H. M. *Spirulina platensis* inhibits anaphylatic reaction. *Life Sci.*, 61, 1237-1244 (1997).
- 4) 渡辺文雄, 中野長久 ビタミン B₁₂, 日本臨床, 57, 2205-2210 (1999).
- 5) Herbert, V. & Drivas, G. *Spilurina* and vitamin B₁₂. *J. Am. Med. Assoc.*, 248, 852-858 (1982).
- 6) Watanabe, F., Katsura, H., Takenaka, S., Fujita, T., Abe, K., Tamura, Y., Nakatsuka, T. & Nakano, Y. Pseudovitamin B₁₂ is the predominant cobamide of an algal health food, spirulina tablets. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 4736-4741 (1999).
- 7) Watanabe, F., Takenaka, S., Abe, K., Tamura, Y. & Nakano, Y. Comparison of a microbiological assay and fully automated chemiluminescent system for the determination of vitamin B₁₂ in foods. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 1433-1436 (1998).
- 8) Herbert, V. Vitamin B₁₂: plant sources, requirements, and assay. *Am. J. Clin. Nutr.*, 48, 852-858 (1988).
- 9) Watanabe, F., Abe, K., Takenaka, S., Tamura, Y., Maruyama, I. & Nakano, Y. Occurrence of cobalamin coenzymes in the photosynthetic green alga, *Chlorella vulgaris*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 61, 896-897 (1997).

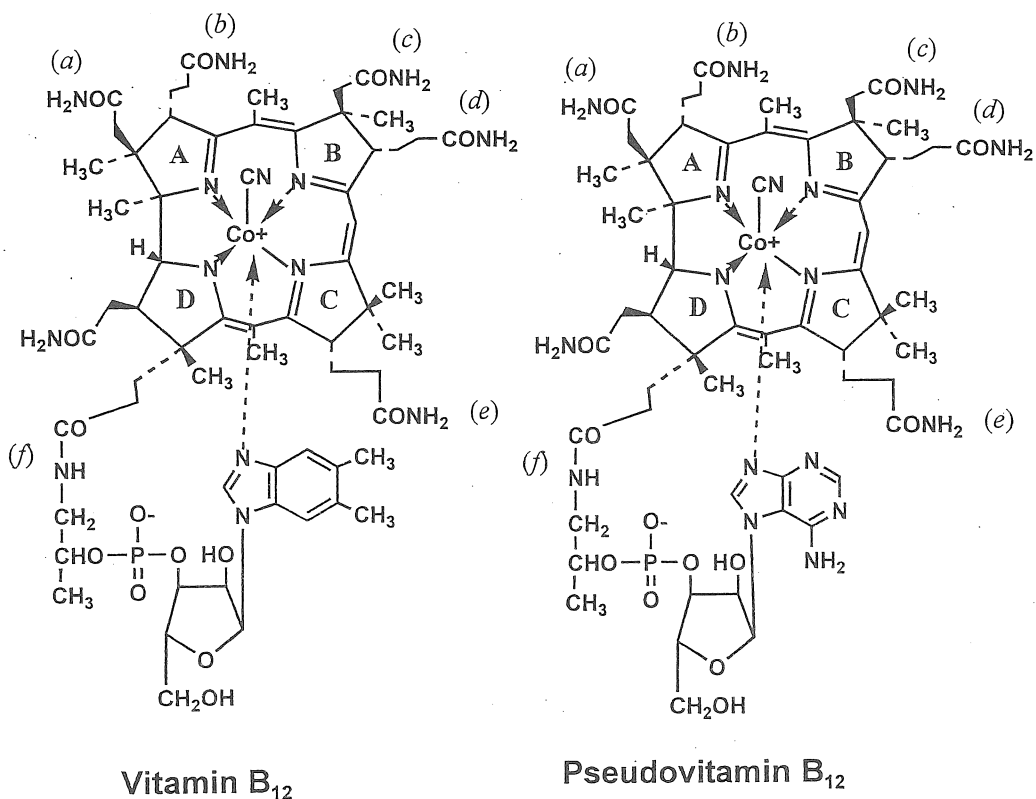


Fig. 1. Structure of vitamin B₁₂ and pseudovitamin B₁₂.

Table 1. SOT medium.

NaHCO ₃	16.8 g		
K ₂ HPO ₄	0.5 g		
NaNO ₃	2.5 g		
K ₂ SO ₄	1.0 g		
NaCl ₂	1.0 g	A ₅ solution	
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2 g	H ₃ BO ₃	286 mg
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.04 g	MnSO ₄ 7H ₂ O	250 mg
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.01 g	ZnSO ₄ 7H ₂ O	22.2 mg
Na ₂ EDTA	0.08 g	CuSO ₄ 5H ₂ O	7.9 mg
A ₅ solution	1 mL	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	2.1 mg
Distilled water	999 mL	Distilled water	100 mL

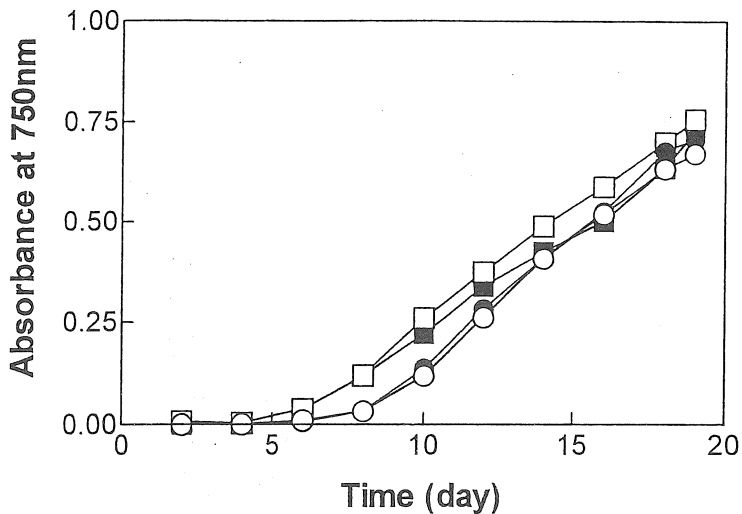


Fig. 2. Effect of the addition of CoSO₄ and B₁₂ on the growth of *Spirulina platensis* NIES-39.

(○) - CoSO₄ - B₁₂; (●) - CoSO₄ + B₁₂; (□) + CoSO₄ - B₁₂; (■) + CoSO₄ + B₁₂. The data are representative of growth pattern in the presence or absence of CoSO₄ and/or B₁₂ from three independent experiments.

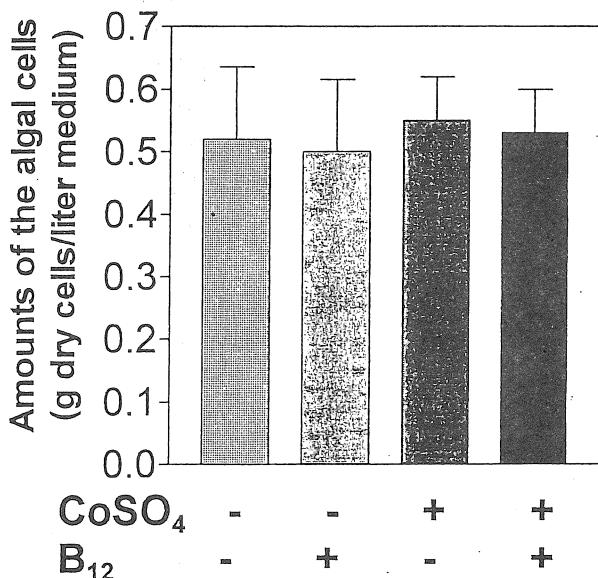


Fig. 3. Effect of the addition of CoSO₄ and B₁₂ on the dry cell weight of *Spirulina platensis* NIES-39. Data represent means ± SD (n = 3).

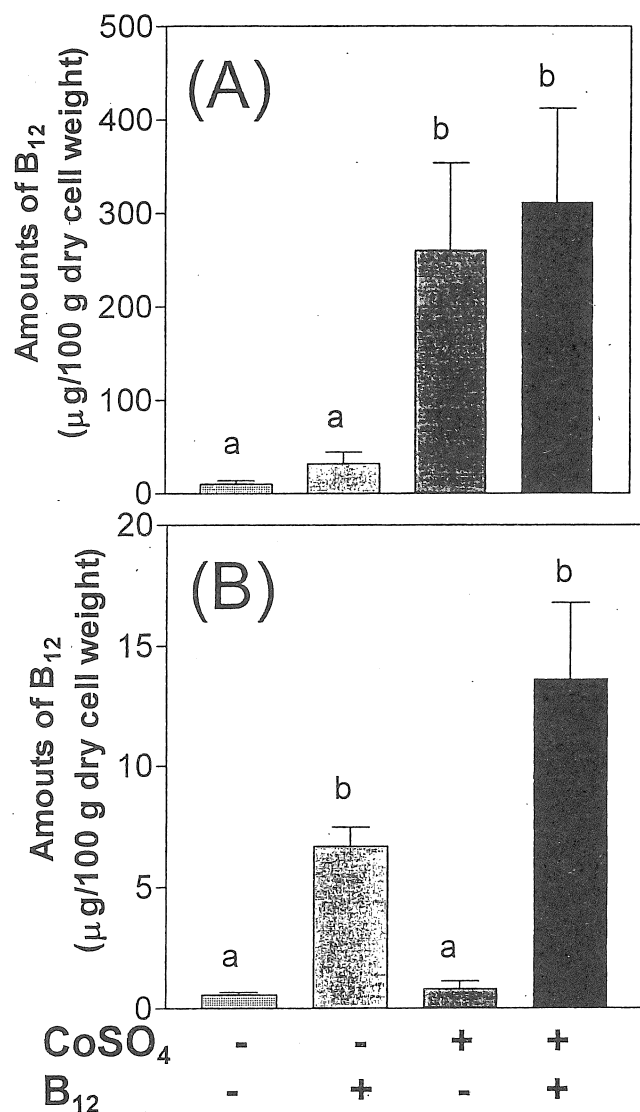


Fig. 4. Effect of the addition of CoSO₄ and B₁₂ on the amounts of B₁₂ in *Spirulina platensis* NIES-39. (A) microbiological assay, (B) IF-chemiluminescence assay. Group means with different letters are significant different ($p < 0.05$). Data represent means \pm SD (n=3).

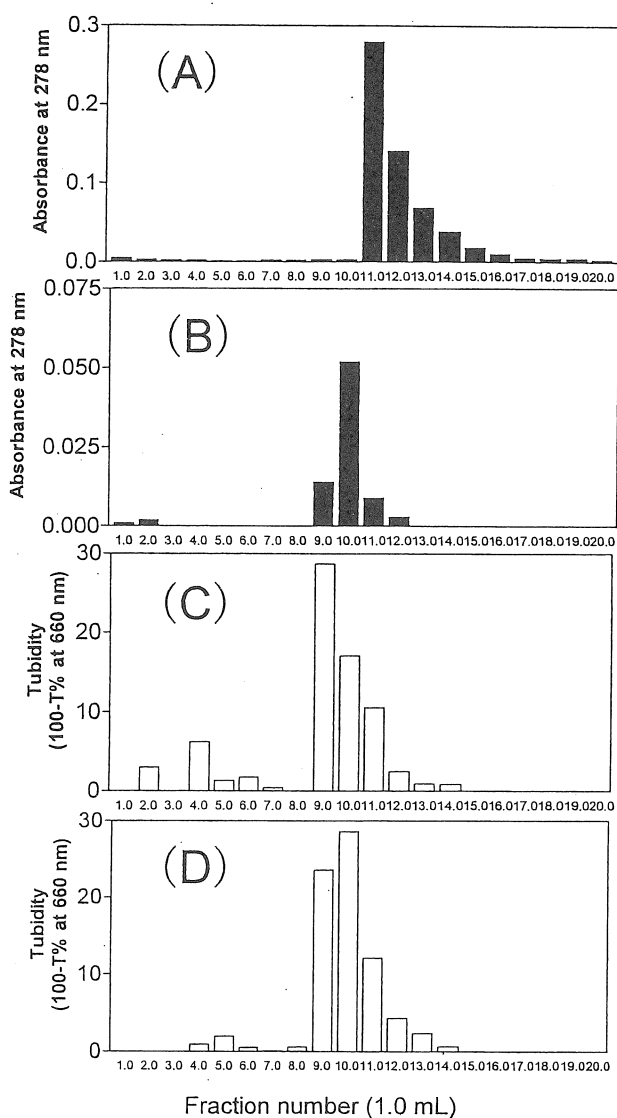


Fig. 5. HPLC patterns of B₁₂ compounds found in *Spirulina platensis* NIES-39 grown in the CoSO₄ (and B₁₂)-supplemented media.

(A) authentic B₁₂; (B) authentic pseudo-B₁₂;

(C) B₁₂ compounds found in the algal cells grown in the CoSO₄-supplemented medium; (D) B₁₂

compounds found in the algal cells grown in the CoSO₄ and B₁₂-supplemented medium. The data

are representative of HPLC pattern of B₁₂ compounds found in the algal cells from three independent experiments.

Study on Preparation of Nutrient-fortified *Spirulina platensis*
(Inactive Vitamin B₁₂-Compound Significantly Decreases in *Spirulina platensis* Grown in a
Cobalt-Deficient Medium)

Fumio WATANABE (Department of Health Science, Kochi Women's University)

Emi MIYAMOTO (Department of Health Science, Kochi Women's University)

Summary

Spirulina platensis NIES-39 was grown under open culture system in the presence or absence of CoSO₄(12 µg/L) and/or vitamin B₁₂(10 µg/L) to confirm whether CoSO₄ and/or vitamin B₁₂ stimulate or are essential for growth of the algal cells and for accumulation of vitamin B₁₂-compound. The addition of CoSO₄ and/or vitamin B₁₂ could not affect both cell growth and cell yield of the alga.

The amount of vitamin B₁₂-compound in the algal cells was determined. The amount of B₁₂-compound was increased significantly by the addition of CoSO₄, but not by vitamin B₁₂. A C18 reversed-phase HPLC pattern of the *Spirulina* B₁₂-compound increased by the addition of CoSO₄ was identical to that of authentic pseudovitamin B₁₂, which is inactive for human. These results indicate that the algal cells grown in the absence of CoSO₄ are suitable for use of human health foods because the inactive vitamin B₁₂-compound can be reduced significantly.