

# 機能性脂質を生産する海洋微生物の発酵生産率に対する磁場印可効果 Field Dependence of the Production of Functional Lipids by Microorganism

佐世保高専 重松 利信, 山崎 隆志  
東北大・金研. 野島 勉, 淡路 智  
T. Shigematsu<sup>1</sup>, T. Yamasaki<sup>1</sup>, T. Nojima<sup>2</sup>, T. Awaji<sup>2</sup>  
<sup>1</sup> SASEBO National College of Tech.,  
<sup>2</sup> Institute for Materials Research, Tohoku University

## 1. はじめに

高度不飽和脂肪酸やカロテノイドに代表される脂質には、様々な生理的活性があり、機能性脂質と呼ばれている。その中でも、ドコサヘキサエン酸(22:6n-3; DHA)やエイコサペンタエン酸(20:5n-3; EPA)などの高度不飽和脂肪酸(PUFA)は、脳や神経組織の発育、機能維持には不可欠の成分であるとして、最近注目されている[1]。一方、カロテノイドは、以前から養殖魚の体色を人工的により鮮やかにする色揚げ飼料として使われており、最近では抗酸化作用や免疫賦活作用をもつことで注目されている[2]。このように生理活性がある機能性脂質は、栄養補助食品、機能性食品や医薬品素材として多く利用されてきた。

従来、これらの物質は、魚介類から得られてきたが、最近の健康ブームにより魚の需要が増し、魚の乱獲などの問題や魚介類への有害な化学物質の蓄積などの問題が懸念されている。これらの問題を解決する方法として、魚油に代わりに、微生物の生産する PUFA やカロテノイドを含んだシングルセルオイルの開発が望まれている。その中でも、細胞内の油滴中に脂質を含む特徴があるラビリンチュラ類の微生物には、高い関心が寄せられている。つまり、この微生物の増殖性と脂肪酸生産性を更に高めることができれば、微生物油脂の利用範囲がますます広がり、魚油由来のものへの代替となる可能性が大いに高まる。そこで本研究ではラビリンチュラ類のヤブレットコカビ科に属する微生物を用いて、増殖性と脂肪酸生産を高める外因として磁場に着目し、その有効性を議論することが本研究の目的である。

微生物への磁場の影響に関する研究は、1980年代から盛んに行われており[3,4,5]、特に正田は大腸菌や枯草菌などの原核微生物を用いた場合、約5~6Tの変動磁場下で培養実験を行ったところ、地磁気下と比べて10万倍もの増殖促進効果があったと報告している[6]。そこで、本研究では、先に示した機能性脂質を生産するラビリンチュラ類の微生物を用いて磁場印可による培養実験を行い、微生物の脂質の生産への磁場の影響を検討した。

## 2 材料と方法

本研究で用いた微生物は細胞中の油滴内に高度不飽和脂肪酸の一種である DHA を高蓄積するとともに、アスタキサンチンやカンタキサンチンなどのカロテノイドも同時に生産するという特徴を持っている。また、本株はラビリンチュラ類の他の株に比べて、せん断応力に高

い耐性があり、魚油に代わる DHA 供給源として、工業規模の生産が期待されている。さらに、水産養殖に用いられているワムシやアルテミアなどの動物性プランクトンへの DHA 等の脂肪酸の蓄積が成功し、栄養強化飼料としての利用が可能であるということが報告されている[7]。また、この微生物のカロテノイドや脂肪酸の生産は、培地成分の種類や量または pH や温度など培養条件を変えることで DHA 生産性が大きく変化することが報告されている[8, 9]。

## 2.1 微生物の培養

微生物の培養には液体培地を用いた。液体培地の組成は、以下の通りである。50%濃度の人工海水 1L にグルコース 30g、ポリペプトン 15g、酵母エキス 5g を含むものをオートクレーブで滅菌し培地として用いた。まず、この培地に微生物を植菌し、振とう培養を行い、種培養液を作成した。この種培養液を本培養液に接種し、培養を行う。磁場を印加する時期は、多く候補が考えられるが、今回の実験では本培養時に行うこととした。

これまで 0.38-0.40 T および 3 T での培養実験を行ってきた。0.38-0.40 T の磁場印可実験には、ネオジウム磁石を用い、培養速度に磁場が有用に作用する事を確認した。2009年に行った 3.0 T の磁場印可実験は、東北大学金属材料研究所の無冷媒型超伝導磁石(CSM 6T220)を使用して行った。しかし冷凍機の冷気が培養液に伝わり、温度環境が微生物の活性を奪い、印可磁場の影響だけを純粋に議論する域に達することができなかった。そこで、2010年に計画した培養実験では培養液を恒温槽で 25℃ に保ちながら、4 T と 6 T の磁場を印可しながらの培養実験を行った。

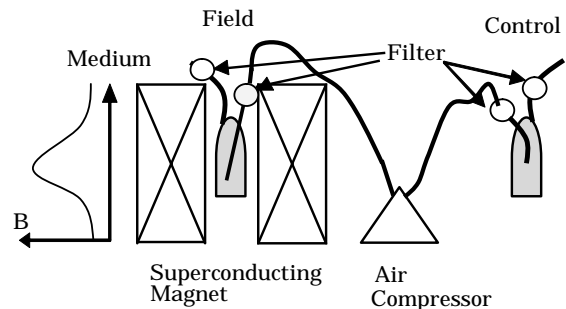


Fig.1 Experimental Setup. The field and the control were incubated simultaneously.

Fig.1 に実験システムの簡単な模式図を示す。それぞれの実験では、磁場を印加して培養したもの(Field)と地磁気下で培養したもの(Control)を同時に培養し、比較実験を行った。通気は、孔径 0.2  $\mu\text{m}$  のフィルターで滅菌した空気をエアコンプレッサーにより送りこむことで行った。本培養後、培養液を回収した。培養した細胞は、培養液を 3,000  $\times$  g で遠心分離することにより集められ、蒸留水で洗浄される。その後、1~3 の分析を行う。

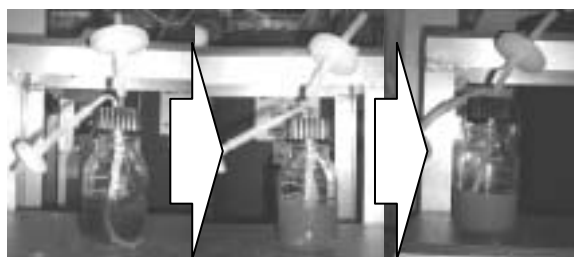
1. 5-10 倍量のアセトン/メタノール(7:3, vol/vol)に懸濁することでカロテノイドを抽出する。抽出物は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に供し、アスタキサンチン、カンタキサンチン等の分析を行う。
2. カラムは Luna 5u C18 (phenomenex)を用い、波長 475nm で分析する。
3. クロロホルム-メタノール(2:1, v/v)により脂質を抽出した後、10%塩酸メタノールでメチルエステル化を行った。メチルエステル化された脂肪酸は、ヘキサンにより抽出して、キャピラリーカラム(TC-70, 0.25 mm  $\times$  30 m; GL Science)および flame-ionization detector(FID)を装備したガスクロマトグラフィー (Autosystem XL, パーキンエルマージャパン)を用いて分析する。

これら分析には数週間から数カ月を要する。この度の 4T, 6T 磁場印加培養実験の分析結果は未だ出ていない。そこで、本報告書では、実験中に撮影した培養状態の写真を示し、議論する。

### 3 結果と考察

微生物を植菌した直後の液体培地(培養液)は茶褐色をしているが、培養が進み微生物が繁殖すると濁りが生じる。繁殖が進めば進むほど、その濁りは増す。本報告書では、その濁り具合から菌体の培養量を推察し、議論する。

Fig.2 に地磁気下での培養状況を示す。植菌直後の初期状態では透明度が高く、培養液中に挿入しているエアバブリング用のシリコンチューブが見えている。次に 3 日間培養した後の培養液は濁り、菌体が増殖していることが予想できる。4 日間培養した後の培養液の濁りはより増しており、より一層菌体が増殖したことが判る。



(初期状態) (3日間培養) (4日間培養)

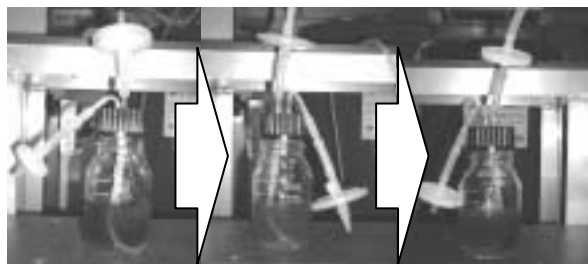
Fig. 2 Externals of the experimental medium are shown. The effect of zero field.



(初期状態) (3日間培養) (4日間培養)

Fig.3 Externals of the experimental medium are shown. The effect of magnetic field (4T).

Fig.3 に 4T 印可実験での培養状況を示す。左端に植菌直後の初期状態の培養液を示し、矢印に従って培養 3 日, 培養 4 日の状態を示している。徐々に白濁が進んでいるが、地磁気下での培養状態と比べると、培養 3 日目は増殖率が低く、4 日目は高くなっているようである。Fig.4 に 6T 印可実験での培養状況を示す。徐々に白濁が進んでいるが、地磁気下での培養状態と比べると、増殖率が非常に低くみえる。



(初期状態) (3日間培養) (4日間培養)

Fig.4 Externals of the experimental medium are shown. The effect of magnetic field (6T).

### 4 まとめ

地磁気下での培養に比べて、4 T, 6T の磁場を印加すると微生物の増殖率は下がっているように見える。DHA, DPA などの詳細な脂質に関して、同様なことが言えるかどうかはまだ不明であり、今後の分析結果によるところが大きい。しかしながら、実験前の大方の予測に反して、磁場印可が培養抑制効果を示す結果となっている。その要因究明は今後の課題である。

### 参考文献

- [1] W. Connor et al., Nutrition reviews, 50, 21 (1992)
- [2] T. W. Goodwin, Annual Review of Nutrition, 6, 273 (1986), Chemists' Society, 80(8), 789 (2003)
- [3] N. Wertheimer and E. Leeper, Am. J. Epidemiol., 109, 273 (1979)
- [4] A. Ahlbom et al., Br. J. Cancer, 83, 692 (2000)
- [5] S. Greenland et al., Epidemiology, 11, 624 (2000)
- [6] 正田誠, 現代化学, 393, 18-21 (2003)
- [7] T. Yamasaki et al., Journal of Bioscience and Bioengineering, 104(3), 200 (2007)
- [8] T. Yamasaki et al., Journal of Bioscience and Bioengineering, 102(4), 323 (2006)
- [9] T. Aki et al., Journal of American Oil
- [10] 秋庸裕ら, 化学と生物, 38(8), 520 (2000)