

微生物による機能性脂質生産における磁場依存性

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

∴ T. Shigematsu¹, T. Yamasaki¹ and T. Nojima²

¹Sasebo National College of Technology

²Institute 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は、脂質に分類され、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注目されている[1]。また、カロテノイドは、以前から養殖魚の色揚げ用として使われていたが、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いる。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、ラビリンチュラ類の微生物は、細胞内の油滴中に脂質を含む特徴がある。この微生物の増殖性と脂肪酸生産性を高めることができれば、微生物油脂の利用範囲がさらに広がり、魚油由来のものを代替しうると考えられている。

本研究では、ラビリンチュラ類のヤブレツボカビ科に属する微生物を用いている。本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[3]。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[4, 5]。

近年、大腸菌や枯草菌などの原核微生物の生育や様々な酵素の生産について、磁場印加がどのような影響を及ぼすか検討されている[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、磁場印加による培養実験を行い、この微生物の機能性脂質の生産への磁場の影響を検討した。

2 材料と方法

2.1 微生物の培養

本研究における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、培養を行った。本研究では、本培養時に 0.38-0.40 T の磁場と 3.0 T の磁場を印加した。0.38-0.40 T の磁場の印加実験には、ネオジウム磁石を用いた。3.0 T の磁場の印加実験には、東北大学金属材料研究所の冷凍機冷却超伝導マグネット 6T220 により磁場を印加した。Fig. 1 に実験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対照となるもの(Control)を同時に培養し、比較を行った。本研究で用いた微生物は、好気性の微生物のため、通気を行った。通気は、孔径 0.2 μm 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 × g で遠心分離することにより集められ、蒸留水で洗浄された。

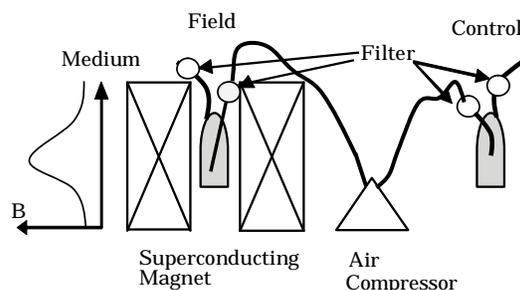


Fig. 1 Experimental Setup. The field and The control were incubated simultaneously.

2.2 カロテノイドの抽出と分析

2.1 の方法により、培養・回収・洗浄された細胞を 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した。抽出物は、-20 の暗所に保存した。この試料を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った。本研究では、カラムは Luna 5u C18 (phenomenex)を用い、波長 475nm で分析した。菌体中のカロテノイド含有量および、後に示す脂肪酸含有量は、測定後、Student's t-test による統計処理を行った。

2.3 脂肪酸の抽出と分析

地磁気下と磁石下で培養し、回収・洗浄後に得られた細胞をクロロホルム-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×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)を用いて分析された。クロマトグラムで得られた全てのピークより全ての脂肪酸の量を全脂肪酸量(TFA)として求めた。

3 結果と考察

3.1 カロテノイド含有量への磁場の影響

微生物の培養時にネオジウム磁石を用いて 0.38-0.40 T の低磁場を印加した後に、細胞を回収し、菌体に含まれるカロテノイドの量を求めた結果、細胞内に含まれるアスタキサンチンとカンタキサンチンの量は、地磁気下で培養したコントロールと比べてほとんど差がなかった。さらに、冷凍機冷却超伝導マグネットにより 3.0 T の磁場を印加した時の細胞中に含まれるカロテノイド量をコントロールと比較した結果を Fig. 2 に示した。この結果からも、磁場を印加しながら培養したときの細胞中のカロテノイドの含有量は、コントロールのカロテノイド含有量に比べてあまり差がみられなかった。また、菌体に含まれるカロテノイドの組成にもほとんど変化が見られなかった。これらの結果より、3 T までの磁場印加では、本株のカロテノイドの含有量には、あまり影響が見られないのではないかと示唆された。

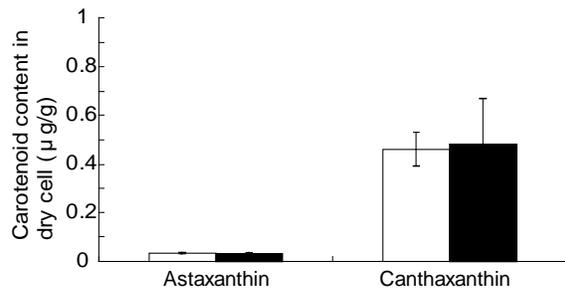


Fig. 2 Effect of magnetic field (3.0 T) on carotenoid production. Open bars, control; shaded bars, field. Error bars shows the standard deviation.

3.2 高度不飽和脂肪酸(PUFA)含有量への磁場の影響

ネオジウム磁石を用いて培養中に 0.38-0.40 T の磁場を印加することにより、菌体に含まれる PUFA の量はわずかに増加していた(Data not shown)。さらに、3.0 T の磁場を印加した時の菌体中の脂肪酸含有量と、コントロールとなる地磁気下で培養した時の脂肪酸含有量を比較したものを Fig.3 に示した。3.0 T の印加により DHA 含有量は、約 2 倍になった。また、微生物が生産・蓄積した脂肪酸の合計である TFA も約 2 倍になった。標準偏差が大きいですが、統計学的にも有意な増加であった

($P < 0.05$)。これらのことから、細胞内の高度不飽和脂肪酸含有量は、磁場印加により増加することが示唆された。

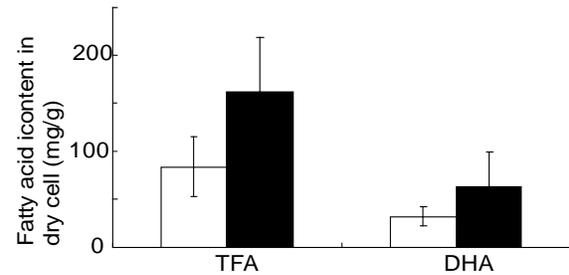


Fig. 3 Effect of magnetic field (3.0 T) on fatty acid production. Open bars, control; shaded bars, field. Error bars shows the standard deviation.

正田は、大腸菌や枯草菌の培養時に 5.2~6.1 T の磁場を印加することで、これらの微生物内の酵素が活性化されたことを報告している[6]。本研究において、磁場印加により、微生物内への PUFA 蓄積を増加させる効果を示したことから、脂肪酸を生産する酵素活性を高めると考えている。これまでに本研究で用いた微生物の PUFA の生合成経路やカロテノイド生合成経路は予測されているので[5, 7]、酵素の活性化の機構について、追求したいと考えている。また、本研究では、最高 3.0 T までの磁場印加しか行っていない。今後、さらに高い磁場を印加することにより、磁場依存性の影響についても検討したい。また、磁場印加が微生物自身に影響しているのか、培地成分や溶存酸素や水素イオン濃度などの環境に影響しているのかについても検討したいと考えている。

4 まとめ

本研究において、地磁気下での培養に比べて、約 0.4 T の磁場を印加することにより PUFA 含有量がわずかに増加した。また、3 T の磁場を印加することで PUFA 含有量の有意な増加が見られた。これらのことより、磁場印加により、脂肪酸の合成に影響があることが示唆された。

参考文献

- [1] W. Connor et al., Nutrition reviews, 50, 21-29 (1992)
- [2] T. W. Goodwin, Annual Review of Nutrition, 6, 273-297 (1986)
- [3] T. Yamasaki et al., Journal of Bioscience and Bioengineering, 104(3), 200-206 (2007)
- [4] T. Yamasaki et al., Journal of Bioscience and Bioengineering, 102(4), 323-327 (2006)
- [5] T. Aki et al., Journal of American Oil Chemists' Society, 80(8), 789-794 (2003)
- [6] 正田誠, 現代化学, 393, 18-21 (2003)
- [7] 秋庸裕ら, 化学と生物, 38(8), 520-527 (2000)