

海洋性微生物によるエイコサペンタエン酸(EPA)の生産

小 田 顕 彦
植 松 原 一

Production of Eicosapentaenoic Acid by Marine Bacteria

Akihiko ODA
Gen-ichi UEMATSU

A marine bacterium *Alteromonas putrefaciens* (SCRC-2738) isolated from marine fish was found to contain eicosapentaenoic acid (EPA) as the sole polyunsaturated fatty acid. The ratio of EPA to the total cellular fatty acids ranged from 25% to 40% depending on the culture conditions.

In this report we describe our efforts to optimize the fermentation conditions for SCRC-2738 and develop an efficient extraction / purification procedure. Under the optimal condition EPA production was improved more than seven fold, yielding 250mg acid per litre of the culture medium. EPA of over 95% purity was obtainable from the cultured bacteria by the combined use of super critical fluid extraction and super critical fluid chromatography techniques.

1. はじめに

1970年代のダイヤーベルグ等の疫学調査^{1),2)}により、グリーンランドエスキモー人に血管性疾患あるいは動脈硬化性疾患の発症頻度が低いことが示された。彼等は、魚油中のエイコサペンタエン酸 (EPA と略記) が生体内に取り込まれて様々な生理活性を示すことを提唱し、EPA に関する研究が発展してきた。EPA は、リノール酸、リノレン酸、アラキドン酸などと共に必須脂肪酸 (ビタミンF) の範ちゅうに含まれる高度不飽和脂肪酸である。生体内では、種々の重要な生理活性を示すプロスタグランジン類の前駆体³⁾ となり、それ自身も生体膜の構成脂肪酸として、重要な役割を持っていると言われている (Table 1)。今日、魚食が推奨され、欧米での日本食ブームや健康食品としての EPA, EPA 含有食品が市販されている理由もここにある。

魚油中に占める EPA の割合は、総脂肪酸に対し約5~7%であり、これを20~30%程度に濃縮した油状物が健康食品として市販されている。しかしながら、独特の魚臭や品質管理の面での問題が大きく、一時のブームが去っているのが現状である。

しかしながら、高純度あるいは高品質な EPA に対する潜在的な需要は大きく、機能性食品、食品添加物のみならず、医薬品原体、機能性材料への展開も可能である

Table 1 Pharmacological Functions of EPA

- | |
|--------------------------------------|
| 1) Prevention of thrombosis |
| 2) Prevention of atherosclerosis |
| 3) Lowering of blood viscosity |
| 4) Lowering of blood pressure |
| 5) Lowering of triglyceride in blood |
| 6) Anti-inflammatory function |
| 7) Anti-tumorigenic function |

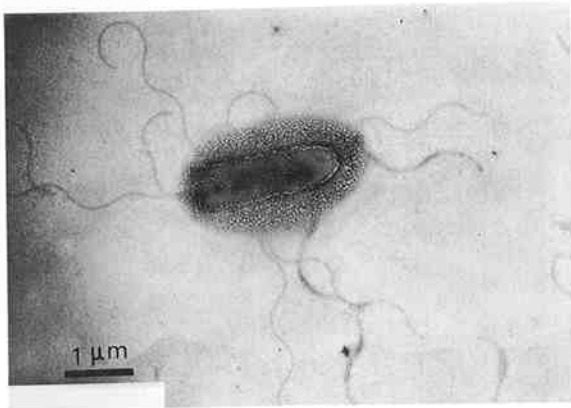


Fig. 1 Electronmicrograph of a New EPA-producing Bacterium SCRC-2738

と推測される。

そのような意味から、供給原料を魚油に求めず、クロレラ⁴⁾、藻類⁵⁾あるいは糸状菌⁶⁾などの微生物油脂に求めようとする動きがある。相模中央化学研究所の矢沢ら^{7),8)}は、EPAを豊富に持つ青背の魚(マイワシ、サバなど)の腸内に棲息する微生物から、EPAを産生するバクテリアを発見した。

我々は、本微生物の培養及び菌体内からのEPAの回収、精製を試み、EPAの大量生産プロセスの可能性を検討した。

2. 海洋性微生物 *Alteromonas putrefaciens* SCRC-2738 の特性

発見された微生物のうち、EPA産生能の良好な株(SCRC-2738)についてその基本的な性質を検討した結果、幾つの特徴が明らかにされた。すなわち、

- 1) 本菌は、新種の海洋性細菌であり、グラム陰性の好気性桿菌で、周鞭毛を有する⁷⁾。(透過型電子顕微鏡写真参照 (Fig. 1); ×20000)
- 2) 高度不飽和脂肪酸はEPAのみで、総脂肪酸に対する割合は、25~40%と高い。
- 3) 菌体成分にステロール、魚臭成分(トリメチルアミンなど)等の夾雑物を含まない為、EPAの分離・精製が容易である可能性が高い。
- 4) 食塩の存在下で、通常の微生物と同様の生育速度(約30分に1回の分裂速度)を示し、カビ、クロレラ、藻類の生育と比べ極めて早い。

これらの諸性質は、従来の魚油及び微生物油脂と比較し、極めて優れたものであり、高品質なEPAを製造できる可能性が大きい。

3. SCRC-2738株を使用したEPA高生産条件の検討

(1) SCRC株の生育パターン

スクリーニング培地 (Table 2) を用いて、25°Cにて好気条件下で培養し、その生育、EPA産生量及び総脂質に対するEPAの割合(%)を経時変化で示した (Fig. 2)。EPAの産生は、growth-associatedであり、対数増殖後期で最大値を示し、その後減少した。培養期間を通じて、培養上清中にはEPAは検出されず、菌体構成成分として菌体内に留まっていると考えられる(後述)。一方、EPAの割合はEPA産生の最大時にピークを示し、その後EPAのみ特異的にその比率が低下することから、菌体内での消費または分解が進行したものと考えられる。現在のところ、EPAはその構造から考えて高エネルギー化合物であることから、本菌のエネルギー貯蔵物であると推測できるが、今後の生化学的解明が待たれる。

Table 2 Culture Medium

Peptone (Bacto)	1 %
Yeast extracts	0.5 %
Meat extracts	0.25 %
Glucose	2 %
Artificial Sea Water*	1/2 Conc.
pH 7	

*Jamarin S (Jamarin Laboratory, Osaka)

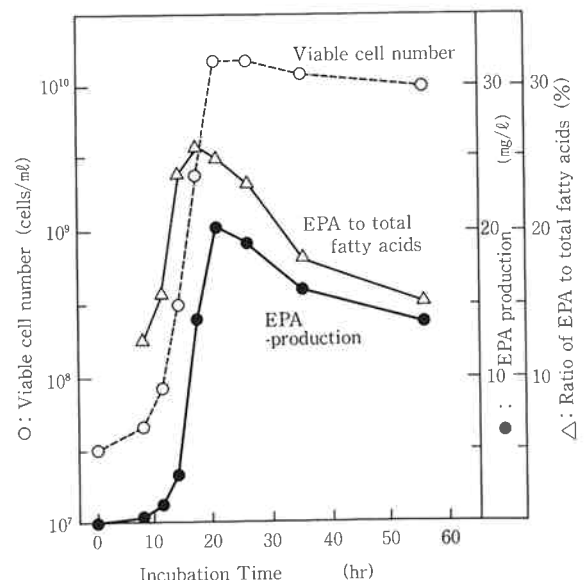


Fig. 2 Cell Growth, EPA Production and Ratio of EPA to Total Fatty Acids

(2) EPA 産生の至適条件の検討

上述の知見を基に EPA 産生の至適条件を求めべく、培養条件 (pH, 温度, 酸素供給量など)、培地条件 (食塩濃度, 生育因子, EPA 産生因子など) の検討を行った。

まず培養条件について述べる。pH については (Fig. 3), 生育・EPA 産生とも至適条件が一致しているが、その幅は狭く (pH 7.0±0.2), 厳密なコントロールが必要である。一方、温度及び供給酸素量については、若干の違いを示した (Fig. 4 及び Table 3)。生育に関して

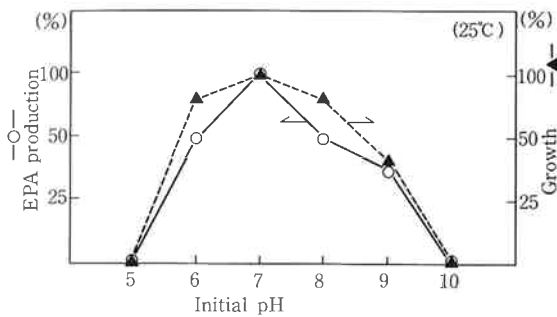


Fig. 3 Effect of pH on Cell Growth and EPA Production

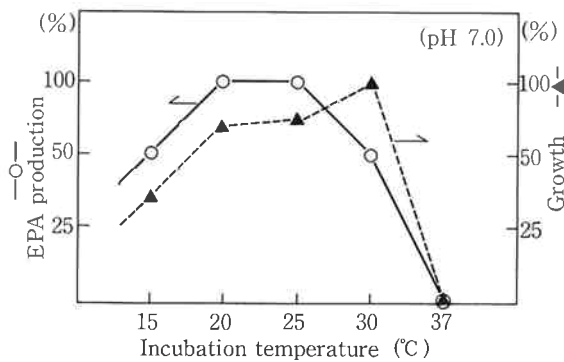


Fig. 4 Effect of Temperature on Cell Growth and EPA Production

Table 3 Effect of Dissolved Oxygen Concentration on Cell Growth and EPA Production (25°C, 12 hrs)

	Dissolved Oxygen (ppm)		
	0-1	1-2	3-4
Cell mass (g/l)	3.0	4.7	5.0
EPA content (mg/gcell)	3.5	8.0	15.0
EPA yield (mg/l)	10	38	75

(PYM medium)

は、温度 30°C, 培養液中の溶存酸素濃度 1~2 ppm で十分であるのに対し、EPA 産生は、むしろ 20~25°C が望ましく、酸素濃度は、より高い要求量 (3~4 ppm) を示した。

次に培地条件について述べる。本菌株のもう1つの特徴として、一般の微生物の基質となるグルコース、グリセロール等の炭素源では生育せず、アミノ酸系の基質に対し良好な生育が見られる点が挙げられる。また、食塩の要求性が確認されたことから⁷⁾、典型的な好塩微生物であることがわかった。そこで、ここではアミノ酸系の基質と食塩濃度について述べる。

食塩濃度に関しては (Fig. 5), 生育には 1.2%以上の要求量を示すのに対し、EPA 産生は、1.6%を至適条件とし、1.6%以上では、むしろ産生能が低下する。ところで、その至適値が海水中の食塩濃度に比べ、低いのは興味ある現象である。一方、アミノ酸系基質については、各種天然物 (ペプトン, 酵母エキス, 魚肉エキス, カザ

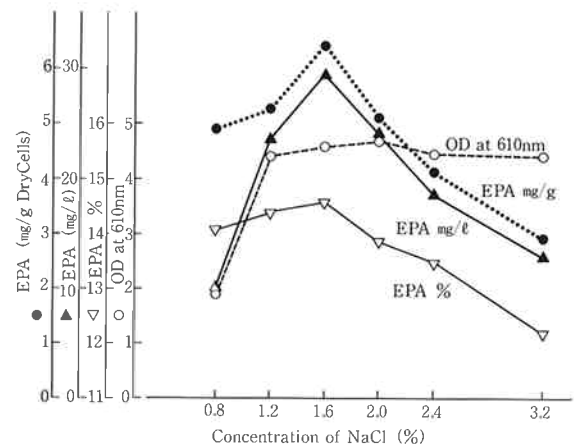


Fig. 5 Effect of NaCl concentration on Cell Growth and EPA Production

Table 4 Effect of CSL concentration on Cell Growth and EPA Production (25°C, 18 hr)

	control	CSL 50% +NaCl	CSL 10% +NaCl
Cell mass (g/l)	5.5	4.0	5.5
EPA content (mg/gcell)	7.6	11.3	9.1
EPA yield (mg/l)	42	45	50

Control: screening medium
CSL: Corn Steep Liquor

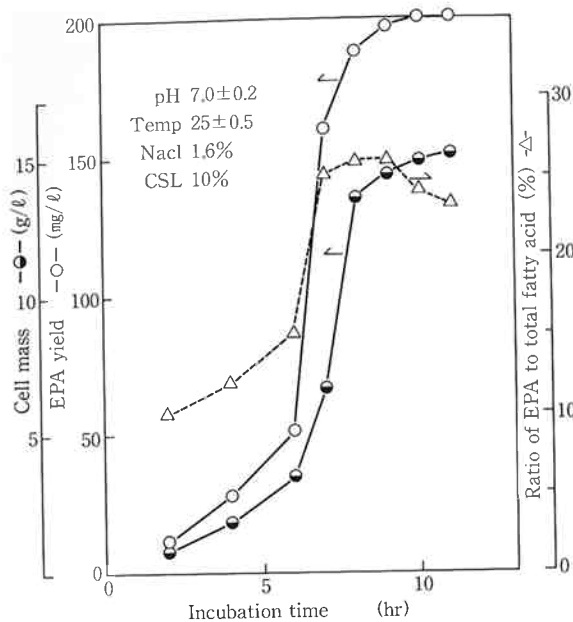


Fig. 6 Incubation Result under Optimum Incubation Conditions

ミノ酸など), アミノ酸を検討した結果, 安価で比較的良好な生育, EPA 産生の見られたコーンステープリカー (CSL と略記) を用いた (Table 4)。CSL は, とらもろこしでんぷん製造時の廃棄物であり, 極めて安価で安定供給が可能であり, アミノ酸醗酵, 抗生物質製造の培地として実績がある。

以上の知見を基に, 最適条件下で培養した結果, 当初 20~40 mg/l の EPA 産生に約20時間を必要としたのに対し (Fig. 2), 8~10時間で 200~250 mg/l の EPA を産生することに成功した (Fig. 6)。さらに, 200 l 醗酵槽を用いてスケールアップ実験を行ったところ, 120 l の培養液から, 約 25 g の EPA を回収できた。

4. EPA の回収, 精製法の検討

一般に魚油から EPA を抽出精製する場合, まず加熱, 破碎, 攪拌などの物理的手段により, ホモジナイズし有機溶媒により抽出を行なう⁹⁾。さらに精製する場合には, 低温分別結晶, 尿素付加などにより部分濃縮し, 分子蒸留, HPLC などにかける。しかしながら高度不飽和脂肪酸は, その構造上, 極めて酸化され易く, 異性化或いは重合を起こしやすい。また, それらの副生物の分離が困難である。この為, 多段階の精製では, 目的物の変性, 収率の低下, 溶剤の残留などの問題を生じているのが現状である。最近, これらの問題点を解決する抽出精製方法として, 超臨界抽出法が注目されている^{10)~14)}。この方法は, 比較的低温で操作でき, 使用する抽出溶媒が溶

質に対し化学的に不活性なガスである場合が多く, 回収した溶質からの溶媒の除去が容易であり, 脂質の変性を抑えることが可能である。また, 固形原料, 例えば菌体から EPA を直接回収・精製することが可能であると考えられる。そこで我々は, 超臨界抽出法による EPA の回収精製を試みた。

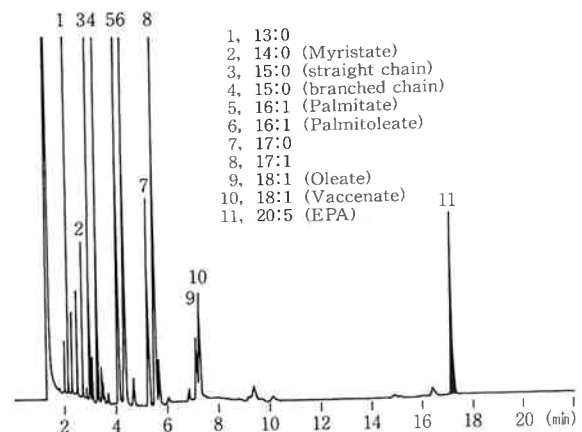
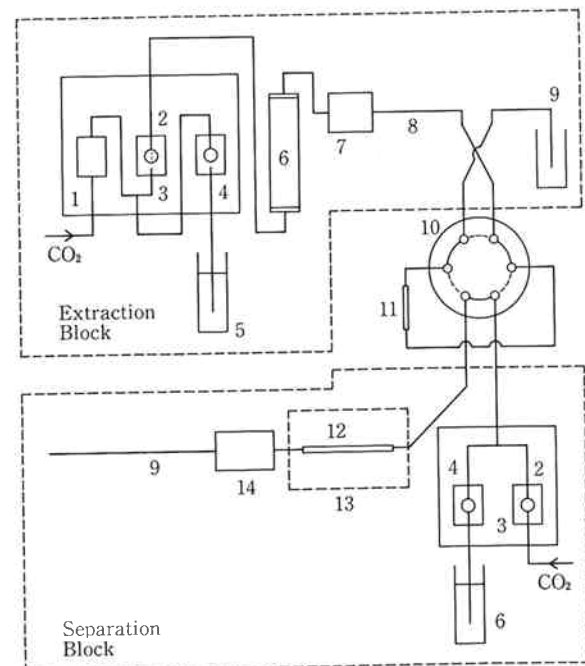


Fig. 7 Fatty Acid Composition of the Bacterium SCRC-2738 by GLC



- | | |
|--------------------------|--------------------------|
| 1 : Pre-Cooling Block | 8 : Restricting Pipe |
| 2 : CO ₂ pump | 9 : Fractionation Vessel |
| 3 : Pump Cooler | 10 : 6-Ports Value |
| 4 : Modifier Pump | 11 : Adsorption Column |
| 5 : Modifier | 12 : Analytical Column |
| 6 : Extraction Vessel | 13 : Column Over |
| 7 : UV Detector | 14 : UV Detector |

Fig. 8 Block Diagram of Supercritical Fluid Chromatography

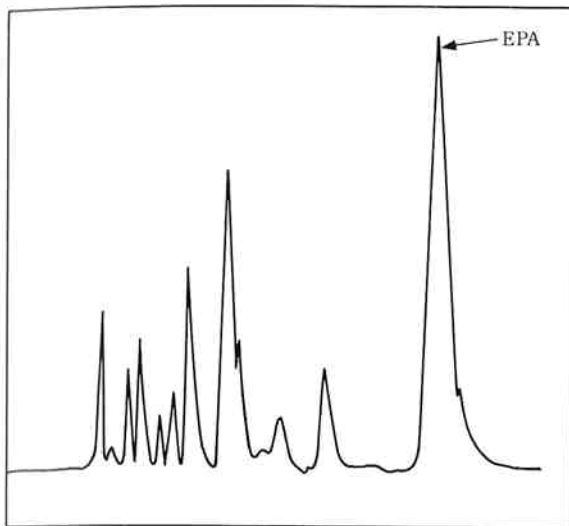


Fig. 9 Supercritical Fluid Chromatogram of Cell Crude Extract (CO₂ gas 60°C, 120 atm)

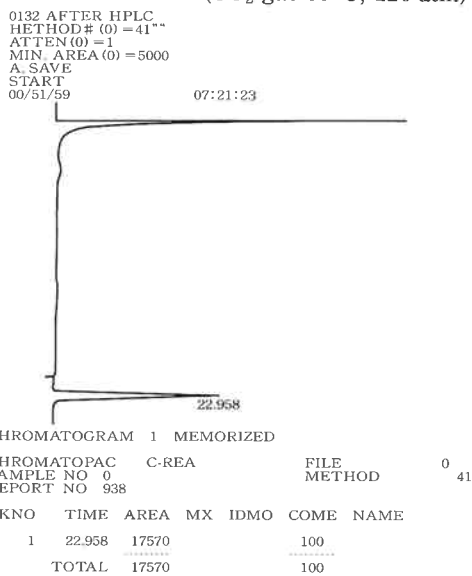


Fig. 10 Gas Chromatogram of EPA Fraction of Fig. 9

(1) 粗抽出物からの精製

まず、脂肪酸粗抽出物について検討を行った。粗抽出物の調製は、培養液から遠心分離した湿潤菌体を、10%塩酸/メタノール溶液に懸濁し、脂肪酸をメチルエステル化物として粗抽出した。Fig. 7 にその脂肪酸のガスクロマトグラフパターンを示す。この粗抽出物を原料とし超臨界ガスクロマトグラフィー (Fig. 8) に供した。炭酸ガスを、60°C、160気圧下で超臨界ガスとし、これを抽出剤として、粗抽出物から脂肪酸エステルを抽出し、さらに、その脂肪酸含有ガスを TSK ゲル ODS-80TM (3 μm, 46 mm×250 mm) にかき、EPA の分離を行った。溶出パターンを Fig. 9 に示す。EPA を含むフラクション (図中の矢印) を、ガスクロマトグラフィーで分

析した (Fig. 10)。超臨界ガスクロマトグラフィーの分離能は、同じカラムを用いた HPLC の分離能とほぼ同じであり、脂肪酸エステルの場合には、粗抽出物から容易に精製できることが明らかになった。

(2) 湿潤菌体からの抽出

次に、遠心分離直後の湿潤菌体からの直接抽出を試みた。前述の原料と異なり、半固形原料から、遊離状態の脂肪酸を抽出するので、抽出効率、分離効率の低下が予想された。そこで、あらかじめ、原料を10%リン酸に浸漬しさらに、エントレーナーとして10%のエタノールを混合した炭酸ガスを抽出溶媒とし、まず、菌体からの脂肪酸の回収を試みた。60°C、100気圧条件下で抽出したところ、Fig. 11 に示す様に、8時間ではほぼ脂肪酸を回収できた。一方、圧力条件を変え、抽出特性を検討したところ、低圧条件下 (60~80気圧) では、EPA 以外の低度不飽和脂肪酸が抽出されるのに対し、高圧条件下

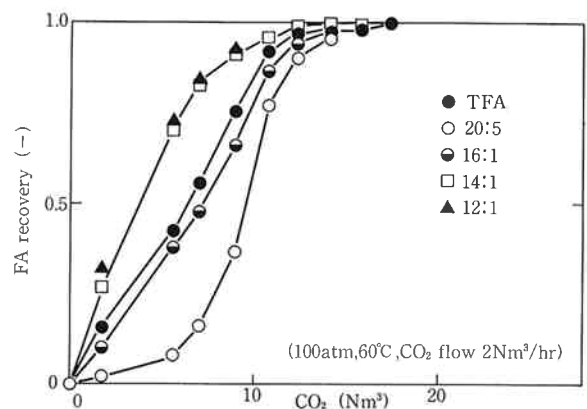


Fig. 11 Recovery of Fatty Acids by Supercritical Fluid Extraction

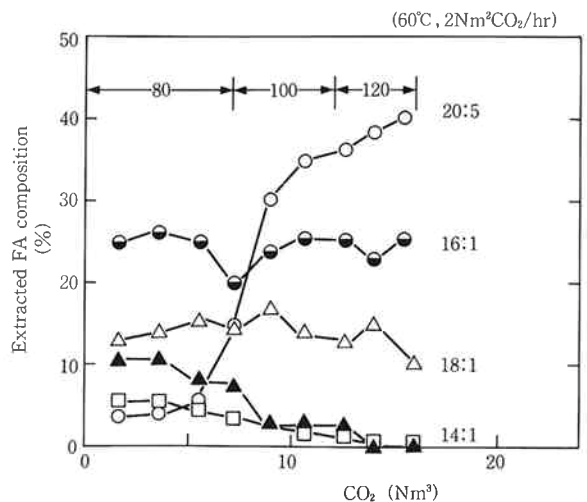


Fig. 12 Concentration of EPA by Pressure Gradient

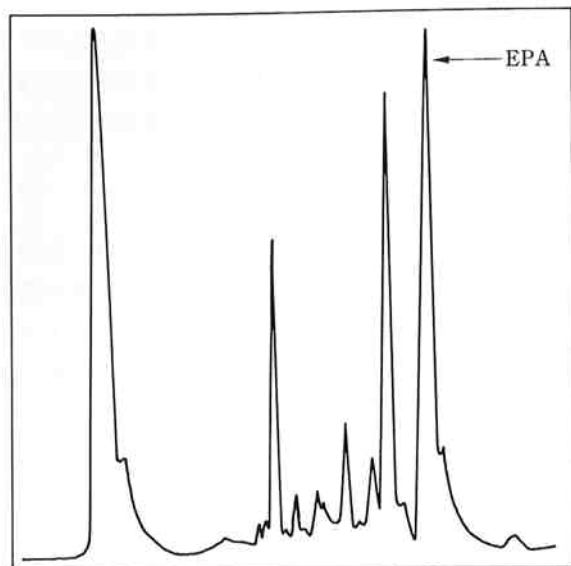


Fig. 13 Supercritical Fluid Chromatogram of Wet Cell (15% Ethanol+CO₂ gas; 75°C, 120 atm)

(100気圧以上)では、EPA を含む高度不飽和脂肪酸が抽出されることが明らかになった。この圧力特性を基に、EPA の濃縮精製を試みたところ (Fig. 12), 40~60%濃度の EPA 回収の可能性が示唆された。

(3) 湿潤菌体からの超臨界ガスクロマトグラフィーによる精製

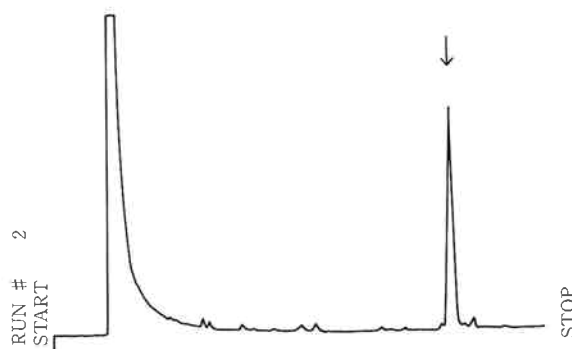
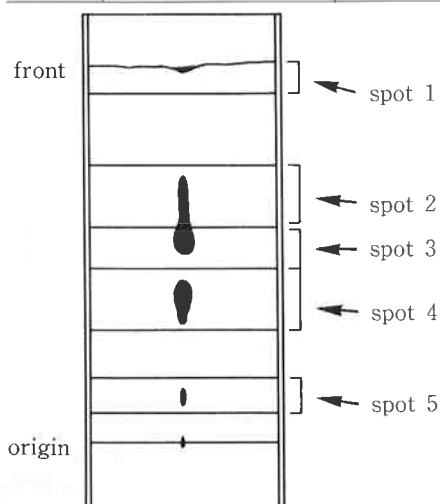


Fig. 14 Gas Chromatogram of EPA Fraction of Fig. 13

次に、湿潤菌体からの直接抽出に加えて、さらに超臨界クロマトによる精製を試みた。エントレーナーとしてエタノールを10%混合した炭酸ガスを抽出溶媒とした。まず、40°C, 160気圧条件下で、10%リン酸処理菌体から遊離脂肪酸を抽出し、脂肪酸含有ガスを分離カラムに導入し、70°C, 160気圧条件下で溶出した。溶出パターンを Fig. 13 に示す。EPA を含むフラクション (矢印で示す) を分取し、ガスクロマトグラフィーで分析した (Fig. 14)。脂肪酸エステルに比べ、遊離脂肪酸の分離能はやや悪く、今後エントレーナーの選択を含めた分離条件の検討が必要であるが、技術的には菌体からの直接精

Table 5 Characterization of Lipid Fraction of the bacterium SCRC-2738

spot No.	detection by			Identification	Distribution of EPA
	I ₂ vapor	Dittmer	Ninhydrin		
1	+	-	-	FFA	5-10%
2	+	+	+	PE	45-48%
3	+	+	+	PE	0
4	+	+	-	PG	45-48%
5	+	-	-	-	0



FFA: free fatty acid
 PE: phosphatidyl ethanolamine
 PG: phosphatidyl glycerol
 Solvent of TLC:
 CHCl₃:MeOH:Acetate:H₂O
 = 100 : 20 : 12 : 5

製が十分に可能であると考えられた。

5. おわりに

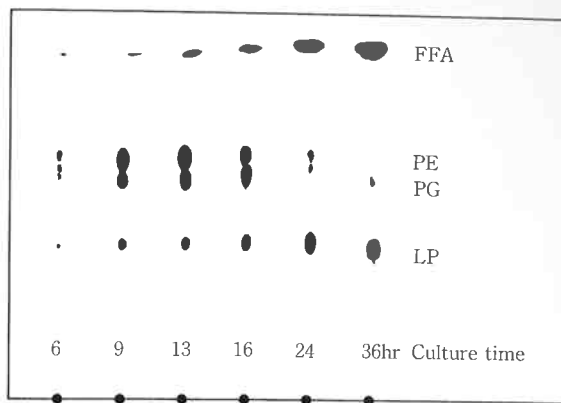
以上の結果より、海洋性微生物からの高純度 EPA 製造の可能性が示唆されたが、生産性の面では多くの検討余地がある。例えば、本株を 15°C で20~30時間培養した場合、産生する EPA の約90%がリン脂質の形態をとっていることが分かった (Table 5)。詳細な検討の結果、EPA のほとんどが細胞膜に局在しており、リン脂質として細胞膜を形成していることが明らかになった¹⁷⁾。しかしながら、対数増殖中期以降、遊離状態の EPA が出現し、その後 EPA が特異的に減少することが判明した。(Fig. 15) この現象は、培養温度の上昇に伴い顕著になる。EPA の遊離化の原因は、菌体内の高活性なホスホリパーゼによるものと推定され、従って EPA の減少は、ホスホリパーゼの阻害或いは遺伝的欠損により回避されると思われる。今後この方面からの検討が必要と思われる。一方、抽出・精製の面では精製品の品質評価及びプロセスとしての優位性の評価が必要である。しかし、超臨界抽出法は、生体からの新しい抽出法として注目すべき技術であると思われる。

6. 謝辞

本研究を行なうに際し、終始御協力下さいました相模中央化学研究所の矢沢一良氏、渡部和郎氏に感謝致します。

文 献

- 1) J. Dyerberg et al.; *Lancet*, ii, 117 (1978)
- 2) Dyerberg J. et al.; *Haemostasis* 8, 227 (1979)
- 3) 森田育男; “プロスタグランジンと病態” 現代化学増刊 1, p. 248, 東京化学同人 (1984)
- 4) 公開特許公報, 昭61-63624 (1986)
- 5) 公開特許公報, 昭63-185390 (1985)
- 6) 清水 昌ら; 昭和61年度日本醗酵工学大会講演要旨集, p. 91 (1986)
- 7) K. Yazawa et al.; *J. Biochem.*, 103, 5-7 (1988)
- 8) K. Yazawa et al.; *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54, 1835 (1988)
- 9) 佃 信夫; “食品工業”, 9, 30 (1985)
- 10) 斎藤功夫; “食品工業”, 9, 37 (1985)
- 11) M. Taniguchi et al.; *Agric. Biol. Chem.*, 49, 2347 (1985)
- 12) W. Eisenbach; *Ber. Bunsenges. Phy. Chem.*, 88,



Abbr.	FFA	Free Fatty Acid
	PE	Phosphatidyl Ethanolamine
	PG	Phosphatidyl Glycerol
	LP	Lisoform of Phospholipid

TLC Solvent
CHCl₃:MeOH:H₂O=75:20:5

Fig. 15 Change of EPA Form with Advancing Culture Time

- 882 (1984)
- 13) 鈴木 修ら; 化学工学協会第52年会要旨集, p. 64 (1987)
- 14) S. Peter and G. Bruner; *Angrew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 17, 746 (1978)
- 15) 公開特許公報, 昭58-38215 (1983)
- 16) 公開特許公報, 昭63-53968 (1988)
- 17) 矢沢一良; “化学と工業”, 41(12), 1137 (1988)



著 者
氏名 小 田 顕 彦
Akihiko ODA
入社 昭和59年4月2日
所属 研究本部
生物学研究所
第一研究室
副主任研究員



著 者
氏名 植 松 原 一
Gen-ichi UEMATSU
入社 昭和59年4月2日
所属 科学計測事業部
企画開発部
システム開発室