

# 海洋微生物による未利用バイオマスの再資源化

望月智代、比嘉永彦

*Labyrinthula* 類は脂質蓄積性、特にドコサヘキサエン酸（DHA、C22:6）などといった高度不飽和脂肪酸生産の特徴を持つことから、近年大きく注目されるようになった原生生物であり、沖縄県内でも多くの *Labyrinthula* 類が分離されている。そこで沖縄県内の食品製造工場から排出される副産物から高度不飽和脂肪酸を生産するため、県内企業によって収集された *Labyrinthula* 類などを用いて、優良株の選抜と培養試験を行った。その結果、3株を選抜し、豆腐廃液を用いた培養により脂肪酸生産の可能性を確認できた。また、DHA含量を高めるためには、培養中の溶存酸素を制御する必要があることがわかった。

## 1 はじめに

*Labyrinthula* 類は、海洋沿岸域、特に熱帯・亜熱帯のマングローブ域の海水や海草、落葉などに多く存在する単細胞真核生物である。葉緑素を持たない従属栄養生物で、その生活環には不等長2鞭毛性の遊走子という運動性細胞の世代を有することから、動物界や植物界と並ぶ系統群であるクロミスタ界のストラメノパイル生物群に、門または綱の階級として分類されている<sup>1)、2)</sup>。脂質蓄積性、海藻や貝等への病原性、有機物分解能力など興味深い特徴を持ち、菌類のようでありながら系統的には褐藻や珪藻に近いと言われている<sup>3)</sup>。*Labyrinthula* 類は、2科7属に分けられていたが、2007年に属レベルの分類体系が再編成される<sup>4)、5)</sup>など、未知の部分が多く残されている生物である。

近年、環境問題や健康食品などへの関心が高まる中、脂質蓄積性を持つ *Labyrinthula* 類が注目されるようになった。特に DHA やエイコサペンタエン酸（EPA）といった高度不飽和脂肪酸を多く蓄積する *Labyrinthula* 類の属の一つ、*Aurantiochytrium* 属の分離やシングルセルオイルの生産方法が盛んに検討されるようになってきた<sup>6)~8)</sup>。また、炭水素生産性を持つ *Botryococcus braunii* と複合した培養方法の研究<sup>9)、11)</sup>が話題を呼んだが、*Labyrinthula* 類の産業的利用は、他の微生物や藻類と比較して、あまり進んでいないのが現状である<sup>10)、11)</sup>。

沖縄県では、廃糖蜜や豆腐製造廃液、廃澱粉などのような食品製造業者から排出される副産物が存在しているが、一方で平成21年度に改正された「食品循環資源の再生利用等の促進に関する法律」（食品リサイクル法）<sup>12)</sup>によって、副産物を再利用が全国的に促進されており、副産物の処理に苦慮している事業所も少なくない。このような食品系副産物は有機物を豊富に含んでおり、バイオマス資源として有効活用できると考えられる。そこで本研究では、これらのバイオマス資源の有効利用を

目的に、*Aurantiochytrium* 属や沖縄県内で収集された *Labyrinthula* 類の培養方法を検討し、付加価値の高い高度不飽和脂肪酸生産技術の開発を試みた。

## 2 実験方法

### 2-1 供試菌株および培地組成

本研究では、*Aurantiochytrium limacinum* SR21（以下、SR21株）および平成23~25年度「知的クラスター形成に向けた研究拠点構築事業」にて県内企業により収集された *Labyrinthula* 類216株の中から任意に選んだ50株（以下、収集株）と平成24年度に同事業で選抜された4株（以下、H24選抜株）を供試菌株とした。

未利用バイオマスをを用いない培養では、人工海水（ピュアソルト、株式会社アクアシステム製）の50%水溶液に、各種培養基材を溶解させて用いた。

基本的な培地組成は、グルコース2%、トリプトン1%、酵母エキス0.5%とし、前培養にはこの組成の1/10濃度の培地を、斜面培地は1/10濃度培地に寒天を2%添加して用いた。

菌株は、上述の1/10濃度培地もしくは斜面培地を用いて保持し、3週間ごとに植継ぎを行った。

### 2-2 試験材料

培養試験に用いる未利用バイオマスは、廃糖蜜（球陽製糖製）および県内の豆腐製造工場より排出された豆腐製造廃液とした。廃糖蜜は適宜希釈したのち、8000rpm 30分間遠心分離した。豆腐廃液は定量ろ紙 No.2（アドバンテック社製）にてろ過したのち、3000rpm 30分間遠心分離した。得られた上清を各種培養試験に用いた。

### 2-3 各種培養試験

基本培地へ菌株のコロニーを1白金耳、もしくは保持菌液を培地の2%量接種し、28℃ 2日間 140rpm で前培養を行い、種培養液とした。本培養では、40mlの各種

培地へ5%量の種培養液を添加し、28℃ 4日間 140rpmで振とう培養したのち、各種測定および分析を実施した。

#### 2-4 2Lスケールでの培養試験

選抜株について、卓上培養装置（MDL-8C、丸菱バイオエンジニア製）を用い2Lスケールで培養試験を実施した。種培養液は2-3で示した前培養により得たものを用い、基本的な培養条件は28℃、pH5.5、7日間、通気量およびペラの回転数は、培地の溶存酸素量により適宜調整した。一日ごとに培養液のサンプリングを行い、各種測定および分析を実施した。

#### 2-5 各種測定および分析

培養液2mlをガラスチューブに採取し、3000rpm 10分間遠心分離後、上清を除去した。その後、イオン交換水により菌体洗浄を2回行い、ペレットにした。ペレットにした菌体は、105℃ 3時間乾燥させ重量測定を行い、培養液1L当たりの乾燥菌体重量（DCW）を算出した。

菌体に蓄積した脂肪酸の分析は、メチルエステル化しガスクロマトグラフ質量分析計（GCMS）を用いて行った。反応試薬としては、氷冷したメタノールに10%量の塩化アセチルを少量ずつ加えて調製した10%塩酸メタノール溶液、100ppmヘプタデカン酸（内標準）を含んだジクロロメタン、飽和食塩水、ヘプタンを用いた。脂肪酸の標準試薬は、脂肪酸メチルエステル混合液、ラウリン酸メチルエステル、ミリスチン酸メチルエステル、パルミチン酸メチルエステル、ステアリン酸メチルエステル、オレイン酸メチルエステル、リノール酸メチルエステル、リノレン酸メチルエステル、ドコサヘキサエン酸メチルを用いた。

乾燥菌体にジクロロメタン0.5mlを加え、よく浸潤させたのち、10%塩酸メタノール溶液を1ml添加して60℃ 3時間反応させ、脂肪酸をメチルエステル化した。反応終了後、飽和食塩水2ml、ヘプタン1mlを添加し、3分間振とうさせ、有機層（上層）をGCMSへ導入して脂肪酸分析を行った。各種脂肪酸を定量し、その合計数を総脂肪酸量（TFA）とした。分析条件を以下に示す。

装置：GCMS Agilent5973N、オートインジェクター Agilent7693

分離カラム：DB-23（60m×0.25mmid、df=0.15um）

注入口：スプリット注入（50:1）250℃

カラム温度：50℃（1分）-25℃/分（5分）-4℃（13.75分）-230℃（5分）

グルコース、スクロース、フルクトースの分析には、

酵素試薬 F-キット（J. K. インターナショナル社製）を用いた。

#### 2-6 中性脂質のズダンブラック染色

収集株の一次スクリーニングは、ズダンブラック染色により行った。染色液は、70%エタノール溶液100mlにズダンブラック B 0.1gを60℃で加温溶解させたのち、ろ過したものを使用した。基本培地により4日間培養した培養液0.5mlを、1000rpm 3分間遠心分離して上清除去し、ペレットにした。ペレットにした菌体に、ズダンブラック溶液とpH8.0リン酸緩衝液の6:4混合液500ul、5%Tween80溶液56ulを添加し30分間静置した。染色後、1000rpm 3分間遠心分離して上清除去し、0.05% tween80溶液500ulを加え、洗浄した。同様に遠心分離と上清除去を行い、再び0.05% tween80溶液500ulに懸濁した。この菌液を血球計測板を用い、光学顕微鏡（OPTIPHOTO-2、ニコン製）下で染色の有無で細胞数を計測し、脂質生産性を評価した。

### 3 実験結果と考察

#### 3-1 収集株の一次スクリーニング

収集株とH24選抜株の分離源を表1に示す。このうち収集株50株は、ズダンブラック染色により中性脂質を染色した。その結果、脂質生産性の高い株、すなわち染色率が80%以上の株は、12株確認された（図1）。そのうち培養液0.5ml中に存在する全菌体数が比較的多いNo.4、7、10、22、24、31、33、40、43の8株を選抜した。

表1 収集株の分離源

分離源	本島 北部	本島 中部	本島 南部	宮古 島	石垣 島	西表 島	合計
砂			1	1	6	9	17
海水	1			1		3	5
海藻	1					1	2
海草					1	3	4
マングローブ		1			4	10	15
陸上植物					2	1	3
泥						2	2
貝殻	2					1	3
ザコ						1	1
不明						2	2

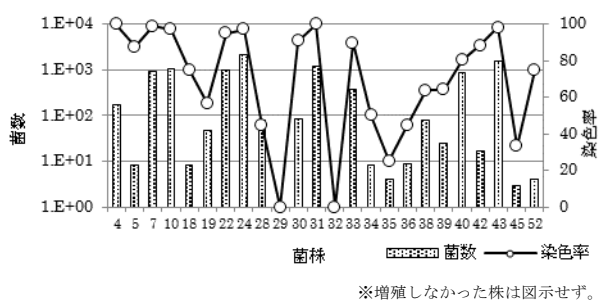


図1 ズダンブラック染色による染色率および菌体数

これら選抜 8 株を基本培地にて 4 日間培養し、DCW と脂肪酸分析を行った結果、No.31 および 40 で良好な増殖と脂質生産性があることがわかった。また、主要な脂肪酸はパルミチン酸 (C16) および DHA で、特に DHA を 1g/L 以上生産することがわかった (図 2)。この 2 株を、ズダンブラック選抜株として以下の培養試験に用いることとした。

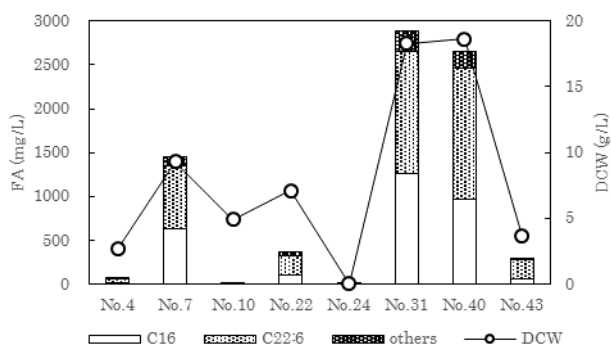


図2 ズダンブラック選抜株の増殖と脂質生産

### 3-2 豆腐廃液を用いた培養試験

SR21 株、H24 選抜株 (No.51~54) およびズダンブラック選抜 2 株 (No.31、40) について、豆腐廃液を用いた培養試験を行った。豆腐廃液には、菌体が資化できる炭素源が十分に含まれていないと考えられたため、豆腐廃液にグルコースを 5%量添加し、オートクレーブして試験に用いた。その結果、豆腐廃液に適した株は、SR21 株、No.31、No.54 であることがわかった。いずれの株も、DCW 7~8g/L、TFA 2.5g/L 以上生産し、そのうち DHA 含量は約 1g/L で、TFA 量の約 40%を占めた (図 3)。

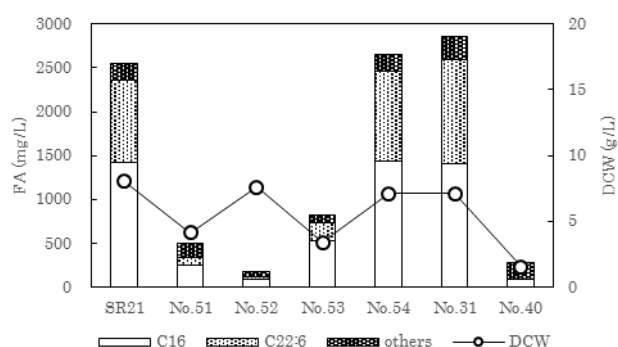


図3 5%グルコース-豆腐廃液培地での増殖と脂質生産

### 3-3 豆腐廃液と廃糖蜜を用いた培養試験

廃糖蜜は、製糖工場から排出される副産物で、糖質 (グルコース、フルクトース、スクロース) を約 30% 含有している<sup>1,3)</sup> ため、炭素源として利用できる可能性がある。そこで、豆腐廃液へ 10%、20%量の廃糖蜜を添加した培地を用いて、培養試験を行った。

10%および 20%廃糖蜜の単糖量は、それぞれ 1.1%、2.2%である。そのため、単糖量の多い 20%添加培地で、TFA 量が増加する傾向が見られた (図 4)。またグルコースのみを添加した場合 (図 3) と比較すると、TFA 量は半分以下となっていることから、廃糖蜜が脂肪酸合成に何らかの影響を及ぼしていると考えられた。

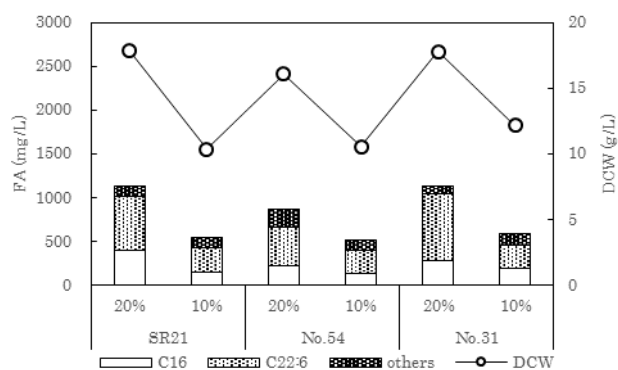


図4 廃糖蜜-豆腐廃液培地での増殖と脂質生産

### 3-4 2L スケールにおける培養試験

選抜 3 株のうち、No.31 株を用い、5%グルコース添加および 20%廃糖蜜添加の豆腐廃液培地による培養試験を行った。卓上型培養装置は、攪拌 300~500rpm、エアレーション 4~5 SL/min に設定した。その結果、5%グルコース添加は、4 日目で単糖をすべて消費し、その後は脂肪酸を蓄積する傾向を示したが、その組成は、60% 以上を C16 が占めていた (図 5)。20%廃糖蜜添加は、2 日目で単糖を消費し、3 日目以降は DCW および

脂肪酸量は一定となった。脂肪酸の組成は3日目でC16が47.3%、DHAが38.7%を占めていた(図6)。また、培養期間中の溶存酸素量(DO)は、5%グルコース添加で4~5mg-O/L、20%廃糖蜜添加で約4mg-O/Lを示した。

40mlスケールの場合と比較して、DCW、脂肪酸量、脂肪酸の組成で大きな違いが見られた。特に脂肪酸組成において、C16を多く含有し、DHAの含量は低下した。

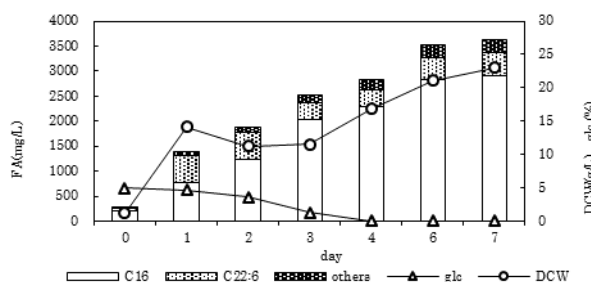


図5 5%グルコース-豆腐廃液培地での増殖と脂質生産

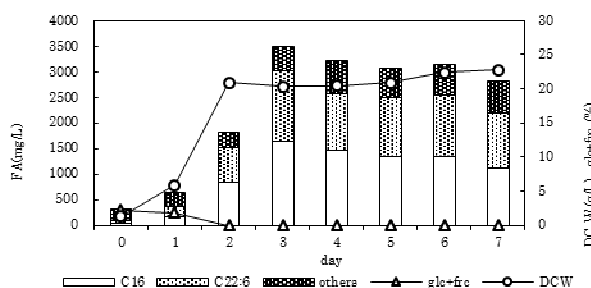


図6 20%廃糖蜜-豆腐廃液培地での増殖と脂質生産

これまでに、*Aurantiochytrium* 属では、脂肪酸合成酵素による経路とポリケチド合成酵素による経路の2種類の脂肪酸合成系が確認されており、前者は好氣的で主に直鎖脂肪酸の合成、後者は嫌氣的で高度不飽和脂肪酸合成に関与すると考えられている<sup>14), 15)</sup>。また、合成培地を用いた溶存酸素制御による高度不飽和脂肪酸の大量生産なども検討されている<sup>8) 16), 17)</sup>。培養中における溶存酸素の制御により、合成される脂肪酸組成が変化する可能性があることから、ジャーファメンターの攪拌を100~200rpm、エアレーション 1SL/min に制限し、DO 3mg-O/L 以下とした条件下で培養試験を行った。No.31株、20%廃糖蜜添加の豆腐廃液により培養した結果、2日目に単糖をすべて消費し、3日目で TFA は最大となった。3日目に得られたデータを表2に示す。OD 4mg-O/L のデータは、先に示した培養試験の結果より抽出した。

OD 3mg-O/L 条件では、これまでの試験結果と同様に、脂肪酸は C16 と DHA で占められていた。OD 4mg/L 条件と比較すると、DCW および TFA はやや低下するものの、TFA 中の DHA 含有率が50%を超える値を示した。

このことから、溶存酸素量の制御は、高度不飽和脂肪酸の生産に効果があると示唆された。Huang TY らは、グリセロール、酵母エキス、ポリペプトンを用いた合成培地にて、OD50%以下の環境下で SR21 株を培養した結果、TFA 中の C16 含量を5%以下に、DHA 含量を70%に改変できたと報告している<sup>17)</sup>。本試験に用いた、豆腐廃液や廃糖蜜などのような未利用バイオマス資源の場合、溶存酸素の他、粘性や夾雑物など様々な因子があることから、さらなる詳細な条件を検討する必要がある。

表2 溶存酸素条件の異なる培養試験結果

OD (mg-O/L)	DCW (g/L)	TFA (mg/L)	DCW(g/L), glc (%)	
			C16(%)	C22:6(%)
4	20.4	3496	47.3	38.7
3>	16.4	3098	31.2	52.2

#### 4 まとめ

*Aurantiochytrium limacinum* SR21 および沖縄県内で収集された *Labyrinthula* 類 54 株を用いて、スクリーニングおよび培養試験を実施した。

収集株 50 株を、ズダンブラック染色および基本培地培養によって、No.31、No.40 を選抜した。この2株、SR21 株および H24 選抜株 4 株を、5%グルコースを添加した豆腐廃液培地にて培養したところ、増殖と脂肪酸生産の良好な SR21 株、No.31、No.54 を優良株として選抜した。

これら3株は、豆腐廃液培地にて、いずれも同等の増殖と脂肪酸生産性を示した。豆腐廃液のみでは炭素源が不足するため、5%グルコースや20%廃糖蜜を添加して試験を行ったところ、廃糖蜜を添加すると脂肪酸生産量が低下した。

No.31 を 2L スケールの豆腐廃液培地にて培養を行ったところ、溶存酸素量を制御することで DHA 含有率が高まった。未利用バイオマスを用いた培養における溶存酸素制御については、さらなる検討が必要である。

本研究は「海洋微生物による未利用バイオマスの再資源化 (2012 技 003)」で行ったものである。

#### 謝辞

本研究を行うにあたり、試験材料および供試株を提供いただきました(株)なかむら食品様、オーピーバイオファクトリー(株)様に感謝申し上げます。

参考文献

- 1)岩槻邦男ら, 菌類・最近・ウイルスの多様性と系統, 裳華房
- 2)井上勲, 藻類 30 億年の自然史, 東海大学出版会
- 3)海洋と生物, 生物研究社, Vol.23, No.1, (2001)
- 4)R. Yokoyama, D. Honda, Taxonomic rearrangement of the genus *Schizochytrium* sensu lato based on morphology, chemotaxonomic characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): ementation for *Schizochytrium* and erection of *Aurantiochytrium* and *Oblongichytrium* gen.nov., *Mycoscience*, 48, 199-211(2007)
- 5)R. Yokoyama, B. Shelleh, D. Honda, Taxonomic rearrangement of the genus *Ulkenia* sensu lato based on morphology, chemotaxonomical characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): ementation for *Ulkenia* and erection of *Botryochytrium*, *Parietichytrium*, and *Sicyoidochytrium* gen.nov., *Mycoscience*, 48, 329-341(2007)
- 6) T. Nakahara, T. Yokochi, T. Higashihara, S. Tanaka, T. Yaguchi, D. Honda, Production of docosahexaenoic and docosapentaenoic acids by *Schizochytrium* sp. isolated from Yap ilands, *JAOCS*, 73, 1421-1426(1996)
- 7)T. Yokochi, D. Honda, T. Higashihara, T. Nakahara, Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21, *Appl Microbiol Biotechnol*, 49, 72-76(1998)
- 8)A. N. Jakobsen, I. M.Aasen, K. D. Josefsen, A. R. Strom, Accumulation of docosahexaenoic acid-rich lipid in thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. strainVT66 : effects of N and P starvation and O2 limitation, *Appl Microbiol Biotechnol*, 80, 297-306(2008)
- 9)渡邊信ら,平成 26 年度東北復興次世代エネルギー研究開発プロジェクト研究成果報告書, 18-24(2015)
- 10)三井物産戦略研究所, 戦略レポート バイオマス資源としての微細藻類,(2011)
- 11)平成 24 年度藻類バイオマス可能性調査事業報告書, 沖縄県商工労働部, (2013)
- 12)農林水産省 HP, <http://www.maff.go.jp/j/shokusan/recycle/syokuhin/>
- 13)翔南製糖株式会社, 平成 15 年度バイオマス等未活用エネルギー事業調査報告書,(2004)
- 14)J. G. Metz, P. Roessler, D. Facciotti, C. Levering, F. Dittrich, M. Lassner, R. Valentine, K. Lardizabal, F. Domergue, A. Yamada, K. Yazawa, V. Knauf, J. Browse, Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthase in both Prokaryotes and Eukaryotes, *Science*, 293, 290-293(2001)
- 15)櫻谷英治, 生化学, 82, 1128-1132(2010)
- 16)L. Ren, X. Ji, H. Huang, L. Qu, Y. Feng, Q. Tong, P. Ouyang, Development of stepwise aeration control strategy for efficient docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp., *Appl Microbiol Biotechnol*, 87, 1649-1656(2010)
- 17)T. Y. Huang, W. C. Lu, I. M. Chu, A fermentation strategy for producing docosahexaenoic acid in *Aurantiochytrium limacinum* SR21 and increasing C22:6 proportions in total fatty acid, *Bioresource Technology*, 123, 8-14(2012)

編 集 沖縄県工業技術センター

発 行 沖縄県工業技術センター

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 12 番 2

T E L (098)929-0111

F A X (098)929-0115

U R L <https://www.pref.okinawa.lg.jp/site/shoko/kogyo/>

著作物の一部および全部を転載・翻訳される場合は、当センターに

ご連絡ください。