

機関番号：84421

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580093

研究課題名（和文） 微生物による天然油脂からの新規で希少な油脂の創生

研究課題名（英文） Microbial conversion of vegetable oil to rare oils.

研究代表者

永尾 寿浩 (NAGAO TOSHIHIRO)

地方独立行政法人大阪市立工業研究所・研究員

研究者番号：30416309

研究成果の概要（和文）：

植物油を基質として、菌体内にワックス（脂肪酸と脂肪族アルコールのモノエステル体）を蓄積する微生物 *Aeromonas hydrophila* N-6 株を単離した。この菌株が生産するワックスは、天然油脂中にはあまり存在しない希少不飽和脂肪酸および希少不飽和脂肪族アルコールで構成されていた。これらの物質は、化学法での合成が困難であることから、本研究で開発した微生物変換法は、希少不飽和脂肪酸および希少不飽和脂肪族アルコールの新たな合成法として期待される。

研究成果の概要（英文）：

We isolated a new microorganism capable of converting vegetable oil to wax esters (mono-ester of fatty acid and fatty alcohol) which were accumulated inside the cells. The wax esters produced by the strain were composed of rare unsaturated fatty acids and rare unsaturated fatty alcohols. These compounds are not commonly observed in natural oils and are difficult to synthesis by industrial chemical method. Thus, we suggest that new bioprocess (microbial conversion) using this strain can be developed to generate those rare unsaturated fatty acids and rare unsaturated fatty alcohols.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：応用微生物学、油化学、酵素工学

科研費の分科・細目：農学、農芸化学、応用微生物学

キーワード：脂質、不飽和脂肪酸、不飽和脂肪族アルコール、植物油、ワックス、微生物変換

1. 研究開始当初の背景

炭素の鎖長数が 14～16 個で二重結合が 1～3 個の不飽和脂肪酸および不飽和脂肪族アルコールは、天然油脂中には殆ど存在しない。

これらの物質を化学法で合成することも困難（特に不飽和脂肪族アルコールは困難）である。そこで、天然油脂中には殆ど存在しないこれらの希少不飽和脂肪酸および希少不

飽和脂肪族アルコールを効率的に製造する方法の確立が求められている。

2. 研究の目的

我々は、植物油を基質として菌体内にワックス（不飽和脂肪酸と不飽和脂肪族アルコールのモノエステル体）を蓄積する微生物を単離している。本研究では、これらの微生物を用いた微生物変換法を用いて、天然油脂を構成する脂肪酸（主に鎖長数18個、二重結合1~3個）の鎖長数を減少させること、および脂肪酸の分子内カルボキシル基をヒドロキシル基に還元することにより、ユニークで希少な不飽和脂肪酸および不飽和脂肪族アルコールをそれぞれ創生することを目的とする。

本研究期間内では、菜種油、サフラワー油、アマニ油から効率良く目的物質を生産させるための培養条件の検討、目的物質の精製、不飽和脂肪酸および不飽和脂肪族アルコールの組成分析、および生成物のガスクロマトグラフィー質量分析計による構造解析を行う。

3. 研究の方法

微生物を NB 液体培地（1%魚肉エキス、2%ペプトン、0.1%塩化ナトリウム、pH7.0）に植菌し、27℃で1晩、振盪しながら培養した。さらに、培地容量に対して5%の植物油を添加し、27℃で振盪しながら所定の時間、培養を継続した。培養後、培地容積に対して2倍量のクロロホルム/メタノール（2:1, vol/vol）で菌体内外の粗油分を抽出した。この粗油分のガスクロマトグラフィー（GC）分析により（トリカプロインを内部標準とする）、培養液1 mL当たりのワックス生産量を求めた。菌体から抽出した粗油分のシリカゲルクロマトグラフィーによりワックスを精製後、このワックスを、エタノール/水酸化ナトリウム存在下でケン化分解し、遊離脂肪酸画分と脂肪族アルコール画分に分離し、それぞれの画分の組成をGCで分析した。遊離脂肪酸画分と脂肪族アルコール画分は、3-ピリジンメタノールまたは3-ピリジン酢酸でカルボキシル基またはヒドロキシル基をそれぞれ修飾後、ガスクロマトグラフィー質量分析計で分析することにより、不飽和脂肪酸および不飽和脂肪族アルコールの二重結合の位置を調べた。

4. 研究成果

植物油を基質として菌体内にワックスを蓄積する微生物11株を保持している。そこで、菜種油を基質として、これらの11株を培養したところ、9株が生産するワックスを

構成する脂肪酸画分中の脂肪酸組成は、基質である菜種油の脂肪酸組成と有意な差がなかった。ところが、残りの2株が生産するワックスを構成する脂肪酸画分中の脂肪酸組成は、菜種油の脂肪酸組成と大きく異なり、鎖長数が2または4個短くなった不飽和脂肪酸含量が有意に高かった。この結果は、既報には報告されていない新規な発見であった。なお、ワックスは培養上清中には存在せず、菌体内に存在していた。

これらの2株の微生物の属・種名を同定したところ、共に同じ属・種に属していることが分かったので、それらのうちの1株、*Aeromonas hydrophila* N-6株（図1）を選択し、以降の実験に用いた。



図1. *Aeromonas hydrophila* N-6株の電子顕微鏡写真

次に、菜種油を基質とした時の *A. hydrophila* N-6株の培養における培地組成などの影響について検討した。その結果、培地はNB液体培地（1%魚肉エキス、2%ペプトン、0.1%塩化ナトリウム）、培地のpHは7.0、培養温度は25-30℃、基質はトリアシルグリセロール（油脂）、基質量は培地容量に対して5 wt%が最適であった。

菜種油を基質とした時の *A. hydrophila* N-6株の培養の経時変化を図2に示す。菜種油は、培養開始から24時間後に添加した。菜種油の添加以降、菌体内のワックス含量が増加し、培養液中の基質が減少した。120時間後に培地中の基質がほぼ消費されると、ワックス含量は徐々に低下した（図2(A)）。ワックスを構成する脂肪酸画分中の脂肪酸組成を調べたところ、培地中の基質がほぼ消費される120時間目以降、鎖長の短くなった脂肪酸の含量が、それ以前と比べて有意に上昇した（図2(B)）。一方、ワックスを構成する脂肪族アルコール画分中の脂肪族アルコール組成は、培養期間を通じてほぼ一定であった（図2(C)）。

そこで、この鎖長の短くなった脂肪酸含量

が有意に上昇する時点で培養を終了させることとし、菜種油、サフラワー油、アマニ油を基質とした時の不飽和脂肪酸および不飽和脂肪酸アルコールの組成およびそれらの構造を調べた。

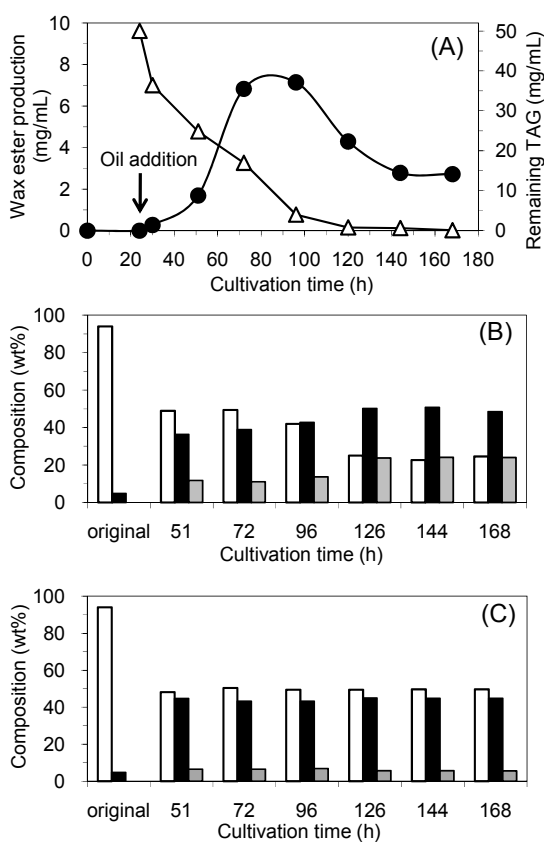


図 2. 菜種油を基質とした時の *A. hydrophila* N-6 株の培養の経時変化。

(A)培地に残存する基質(△)と菌体内のワックス(●)含量、(B)ワックスを構成する遊離脂肪酸画分中の脂肪酸組成(白色ボックス; C18 脂肪酸の合計, 黒色ボックス; C16 脂肪酸の合計, 灰色ボックス; C14 脂肪酸の合計)、(C)ワックスを構成する脂肪酸アルコール中の脂肪酸組成(記号は(B)と同じ)。

菜種油を基質とした時、原料中にはオレイン酸(*cis*9-C18:1)が 62.4 wt%含まれていたのに対して、ワックスを構成する脂肪酸画分中には、オレイン酸が 23.8 wt%に減少し、これに代わって 9-C18:1 の脂肪酸のカルボキシル末端側から 2 および 4 個の炭素が減少した 7-C16:1 および 5-C14:1 の脂肪酸がそれぞれ 28.1 wt%、および 8.0 wt%含まれていた。一方、ワックスを構成する脂肪酸アルコール画分中には、7-C16:1 および 5-C14:1 の脂肪酸アルコールがそれぞれ 32.4 wt%、および 4.6 wt%含まれていた。

サフラワー油およびアマニ油を基質とし

て生産されたワックスを構成する不飽和脂肪酸の組成および構造を調べたところ、7,10-C16:2、5,8-C14:2 (以上、サフラワー油由来)、7,10,13-C16:3 (アマニ油由来) の不飽和脂肪酸がそれぞれ 34.3、15.6、12.3 wt%含まれていた。一方、ワックスを構成する脂肪酸アルコール画分中には、9,12-C18:2、7,10-C16:2 (以上、サフラワー油由来)、9,12,15-C18:3、7,10,13-C16:3 (以上、アマニ油由来) の不飽和脂肪酸アルコールがそれぞれ 45.4、30.2、30.0、13.2 wt%含まれていた。

以上の物質はいずれも天然油脂中には殆ど存在しない希少な物質であった。

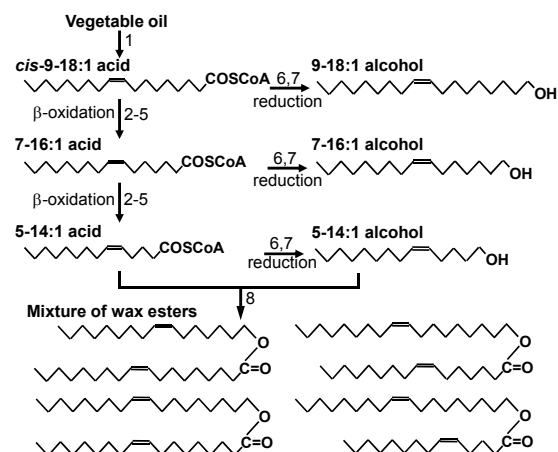


図 3. 菜種油を基質とした時の *A. hydrophila* N-6 株が生産するワックスの推定生産機構。

関与する酵素: 1, アシル-CoA 合成酵素; 2, アシル-CoA 脱水素酵素; 3, エノイル-CoA ヒドラターゼ; 4, 3-ヒドリキシアシル-CoA 脱水素酵素; 5, 3-オキソアシル-CoA チオラーゼ; 6, アシル-CoA 還元酵素; 7, 脂肪酸アルデヒド還元酵素; 8, アシル-CoA 脂肪酸アルコールトランスフェラーゼ。

A. hydrophila N-6 株が生産するワックスの推定生産機構を図 3 に示す。始めに、植物油が遊離脂肪酸に加水分解されて菌体内に取り込まれた後、アシル Co-A に変換される。このアシル Co-A は、 β -酸化系に導入され、カルボキシル基側から 2 個ずつ鎖長が減少していく。通常の場合は、一旦、脂肪酸が β -酸化系に導入されると、全ての鎖長(炭素)が消費されるのに対して、*A. hydrophila* N-6 株では、鎖長数が 2 または 4 個減少した段階で停止したアシル Co-A が多く蓄積する。この後、2 種類の還元酵素によりアシル Co-A が不飽和脂肪酸アルコールに還元される。最後に、アシル Co-A と不飽和脂肪酸アルコールがエステル結合し、ワックスとして菌体内に蓄積する。

本研究の特徴は、天然油脂から希少な不飽和脂肪酸と希少な不飽和脂肪族アルコールを製造することに成功した事である。現在、化学法を用いて、不飽和脂肪酸のカルボキシル基側から2または4個の炭素数を減少させることは困難である。また、工業的に適用可能な化学法により脂肪酸を脂肪族アルコールに変換可能であるが、その条件が苛酷であるため、飽和脂肪族アルコールまたは二重結合が1個だけのオレイルアルコール(C18:1)の製造に限定されている。実験室レベルでは、 LiAlH_4 を用いて二重結合が2個以上ある不飽和脂肪酸の分子内カルボキシル基を還元し、不飽和脂肪族アルコールに変換することができる。しかし、 LiAlH_4 を用いる方法は、用いる試薬の危険性から、工業的プロセスへの適用が困難である。これに対して、本研究で開発した *A. hydrophila* N-6 株を用いる微生物変換法は、温和な条件下で、不飽和脂肪酸のカルボキシル基側から2または4個の炭素数を減少させることができ、また二重結合が2個以上ある不飽和脂肪酸のカルボキシル基だけを選択的に還元して不飽和脂肪族アルコールに変換することができる。しかも、このバイオプロセスを用いる微生物変換法は、発酵タンクなどを用いることによってスケールアップが可能であり、希少な不飽和脂肪酸と希少な不飽和脂肪族アルコール（特に、二重結合が2個以上）の新規な製造プロセスとして期待できる。

今後は、不飽和脂肪酸と不飽和脂肪族アルコールの更なる培養条件の最適化（生産量向上）、機能性のある不飽和脂肪酸の不飽和脂肪族アルコールへの変換、およびこれらの物質の利用用途の検討を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計6件）

- ① T. Nagao, Y. Shimada, Microbial production of rare unsaturated fatty acids and alcohols., *Lipid Technology*, 査読有, Vol. 22, 2010, pp. 250-252.
 - ② T. Nagao, Y. Watanabe, K. Maruyama, Y. Momokawa, N. Kishimoto, Y. Shimada, One-pot enzymatic synthesis of docosahexaenoic acid-rich triacylglycerols at the *sn*-1(3) position using by-product from selective hydrolysis of tuna oil., *New Biotechnology*, 査読有, Vol. 28, 2011, pp. 7-13.
 - ③ T. Nagao, Y. Watanabe, K. Hiraoka, N. Kishimoto, T. Fujita, Y. Shimada, Microbial conversion of vegetable oil to rare unsaturated fatty acids and fatty alcohols by an *Aeromonas hydrophila*
- isolate., *Journal of American Oil Chemical Society*, 査読有, Vol. 86, 2009, pp. 1189—1197.
 - ④ Y. Watanabe, T. Nagao, Y. Shimada, Control of regiospecificity of *Candida antarctica* lipase by polarity., *New Biotechnology*, 査読有, Vol. 26, 2009, pp. 23-28.
 - ⑤ 永尾寿造, リパーゼ反応を利用した工程による植物油脱臭留出物からの植物ステロールの精製, *科学と工業*, 査読無, 82 巻, 2008, pp. 504-512.
 - ⑥ 島田裕司, 永尾寿造, 渡辺 嘉, リパーゼ反応を利用した工程による油脂加工, *オレオサイエンス*, 査読有, 8 巻, 2008, pp. 3-9.
- 〔学会発表〕（計13件）
- ① T. Nagao, Y. Watanabe, N. Kishimoto, Y. Shimada, Microbial Conversion of vegetable oil to rare unsaturated fatty acids and fatty alcohols and their culture conditions., 第101回アメリカ油化学会, 2010年5月18日, フェニックスコンベンションセンター（アメリカ・アリゾナ州）
 - ② 永尾寿造, 静間基博, 渡辺 嘉, 島田裕司, 新規微生物によるアラキドン酸の C20:4 脂肪族アルコールへの変換, 第49回日本油化学会, 2010年9月15日, 北海道大学（函館市）
 - ③ 永尾寿造, 静間基博, 渡辺 嘉, 島田裕司, 微生物反応を用いた希少な不飽和脂肪酸および不飽和脂肪族アルコールの製造, 第1回機能油脂懇話会, 2010年10月2日, 湘南国際村センター（神奈川県三浦郡葉山町）
 - ④ T. Nagao, Y. Watanabe, K. Maruyama, N. Kishimoto, Y. Shimada, One-pot enzymatic synthesis of docosahexaenoic acid-rich triacylglycerols at the *sn*-1(3) position using by-product from selective hydrolysis of tuna oil., 6th Internal Symposium of Biocatalysis and Biotechnology (ISBB) (招待講演), 2010年11月18日, ソウル大学（韓国ソウル市）
 - ⑤ 永尾寿造, バイオ技術を用いた機能性油脂、新規油脂およびバイオ燃料の製造, けいはんな新産業創出交流センター・シーズフォーラム（招待講演）, 2010年10月28日, 関西経済連合会会議室（中之島センタービル、大阪市）
 - ⑥ 永尾寿造, 酵素法による植物油精製工程の廃棄物からの植物ステロールとトコフェロールの精製, 環境ビジネスシーズ発表会 ～ニーズとの出会いを求めて～,

2010年12月15日, おおさかATCグリーンエコプラザ(大阪市)

- ⑦ 永尾寿浩, 酵素法による機能性脂質の精製とその応用, 食品の開発や安全に関する講演会(招待講演), 2011年2月17日, (社)大阪生活衛生協会(大阪市)
- ⑧ 永尾寿浩, 渡辺 嘉, 島田裕司, 微生物を用いた希少不飽和脂肪酸および希少不飽和脂肪族アルコールの生産, 日本生物工学会大会シンポジウム「脂質工学の将来像」(招待講演), 2009年9月25日, 名古屋大学
- ⑨ 永尾寿浩, 渡辺 嘉, 島田裕司, Microbial conversion of vegetable oil to rare unsaturated fatty acids and fatty alcohols., 5th Internal Symposium of Biocatalysis and Biotechnology (ISBB), (招待講演) 2009年11月19日, 台中大学(台湾)
- ⑩ 永尾寿浩, 渡辺 嘉, 丸山一輝, 島田裕司, リパーゼ反応による廃脂肪酸からの *sn*-1,3位のDHA含有率が高いトリアシルグリセロールの合成, 第48回日本油化学会年会, 2009年9月11日, 名古屋工業大学
- ⑪ 永尾寿浩, 渡辺 嘉, 丸山一輝, 島田裕司, リパーゼ反応による廃脂肪酸からの *sn*-1,3位のDHA含有率が高いトリアシルグリセロールの合成, 酵素工学研究会, 2009年11月13日, 東京大学
12. 永尾寿浩, ドコサヘキサエン酸(DHA)を高濃度含む油, 分析機器展と講演・技術発表会(大阪工研協会), 2010年2月24,25日, 大阪市立工業研究所(大阪市)
13. 永尾寿浩, 渡辺 嘉, 島田裕司, 微生物を用いた植物油からの新規な脂肪酸およびアルコールへの変換, 日本油化学会, 2008年9月19日, 日本大学(東京)

[図書] (計2件)

- ① 永尾寿浩, 渡辺 嘉, 島田裕司, NTS出版, “リパーゼによる油脂加工”, 酵素利用技術大系, 2010, pp. 748-752
- ② 渡辺 嘉, 永尾寿浩, 島田裕司, CMC出版, 生体触媒による加水分解反応を利用したバイオディーゼル燃料製造法, (月刊ファインケミカル), 2009, pp. 24-31

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永尾 寿浩 (NAGAO TOSHIHIRO)

地方独立行政法人大阪市立工業研究所・研究員

研究者番号: 30416309

(2) 研究分担者

渡辺 嘉 (WATANABE YOMI)

地方独立行政法人大阪市立工業研究所・研究員

研究者番号: 60416310

(3) 連携研究者

()

研究者番号: