

7 マンノシルエリスリトールリピッド生産に及ぼす炭素源の種類の影響

玉井正弘, 三好省三*, 田村幸吉*, 太田雅也**, 松浦史登**

Effect of various carbon sources on mannosylerythritol lipid production

TAMAI Masahiro, MIYOSHI Shouzou, TAMURA Yukiyoishi., OOTA Masaya and MATUURA Fumito

The production of mannosylerythritol lipid (MEL) from the carbon sources such as hydrocarbons other than the vegetable oil by *Kurtzmanomyces* sp. I-11 was examined. By the addition of the 1 % glycerol to the medium, the MEL production from n-octadecane, stearic acid, stearin alcohol, and methyl stearate became possible. It has decreased gradually in 10 % or more though MEL of 36.8 g/L was produced with especially 8 % n-octadecane. MEL of 5.2 and 12.1g/L was produced in the tridecane and the hexadecane. The production varied by the kind of sugar though the MEL production was possible even by the addition of sugar other than the glycerol. The addition of the glycerol and glucose supported the MEL production most.

キーワード: バイオサーファクタント, マンノシルエリスリトールリピッド, *Kurtzmanomyces*

1 緒言

マンノシルエリスリトールリピッド^{1)~4)} (以下MELと略) は, バイオサーファクタント^{5)~7)} と呼ばれる微生物などが生産する界面活性物質の一種であり, 合成では作りにくい構造, 生分解性, 生理活性を有し, 菌体外に大量に分泌されることより, 食品・医薬品・化粧品・環境分野などでの実用化が期待されている。

ここで, *Kurtzmanomyces* sp. I-11 株⁸⁾ は, 大豆油を炭素源として増殖し, MELを生産する。しかしながら, 同じ疎水性のステアリン酸, ステアリン酸アルコール, ステアリン酸メチル, n-オクタデカンからはMELを生産しなかった。一方, *Candida* sp. B-7 株や *Pseudozyma* (*Candida*) *antarctica* T-34 株は, 植物油脂からMELを生産すると共に, *Candida* sp. B-7 株⁹⁾ は, アルカン混合物から 25.3g/L, *Candida antarctica* T-34 株¹⁰⁾ は, ラウリルアルコール(14g/L), n-オクタデカン(140g/L) やオレイン酸メチル(23g/L)からMELを生産した。

本研究では, 植物油脂以外の炭化水素などの炭素源からのMELの生産の可能性について検討したので以下に報告する。

2 実験方法

2.1 供試菌株

植物の葉より分離した *Kurtzmanomyces* sp. I-11 をM

EL生産菌として用いた。菌株はポテトデキストロース培地 (寒天濃度: 1.5%) で保存 (5°C) した。

2.2 培地組成

酵母エキス 1g/L, NH₄NO₃ 0.5g/L, KH₂PO₄ 0.5g/L, MgSO₄·7H₂O 0.5g/L に所定量の各種炭素源を加えて 121°C で 15 分間殺菌した。揮発性の炭素源は, 培養開始時に添加し, MELは, エタノールに溶解させて添加した。

2.3 培養

2.3.1 試験管培養

グルコース濃度を 2%とした培地 4mL にスラントに保存した菌株を 1白金耳接種し, 30°C, 120rpm で 2 日間培養した。

2.3.2 坂口フラスコ培養

培地 50mL に試験管培養を行った培養液を接種し, 30°C, 120rpm で 7 日間培養した。

2.4 MELの抽出

培養液 5mL をねじ口試験管にとり, 酢酸エチル 10mL を加え, 複合脂質を抽出するために 2 分間激しく振とうし, 一夜静置後, 上層の酢酸エチルを回収した。

2.5 分析

糖脂質の分析は, イアトロスキャン TH-10 (株ヤトロン製) を用いた。クロマトロッドに酢酸エチル抽出液を 1μL チャージし, ベンゼン:クロロホルム:酢酸=50:20:0.7の溶媒で 30 分間展開した。標準物質として MELには *Kurtzmanomyces* sp. I-11 の精製MELを用いた。

乾燥菌体濃度は, 酢酸エチル層を除いた後の水層を酢酸エチルと蒸留水で洗浄した後, 105°Cで 24 時間乾燥した。

¹⁾ 丸善製薬株式会社 ** 福山大学 生命工学部

3 実験結果と考察

3.1 各種炭素源におけるMEL生産

ステアリン酸, ステアリン酸アルコール, ステアリン酸メチル, n-オクタデカン, リノール酸と大豆油を炭素源として培養を行った。結果を図-1に示す。

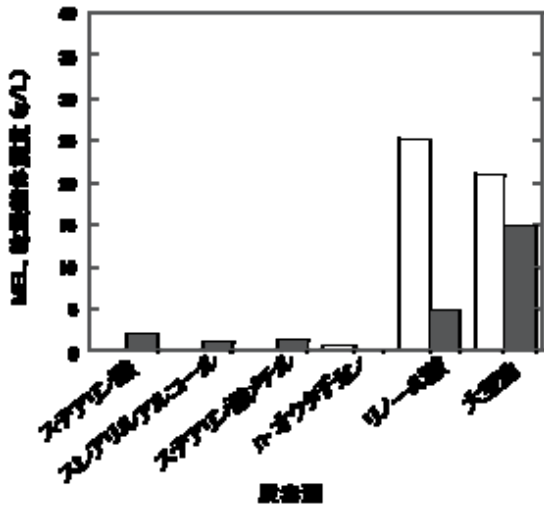


図1 MEL生産に及ぼす炭素源の種類の影響

リノール酸と大豆油からはMELが生産できた。ステアリン酸, ステアリンアルコール, ステアリン酸メチル, n-オクタデカンからはジャーファメンター培養の場合と同様に生産できなかった。

3.2 グリセロールの添加効果

図1より, MELを生産できたリノール酸と大豆油では, 菌体が生産したリノール酸で4.7g/L, 大豆油で14.8g/Lまで増殖しているのに対して, 他の炭素源ではほとんど増殖していない。MELを生産するためには, 菌体の増殖

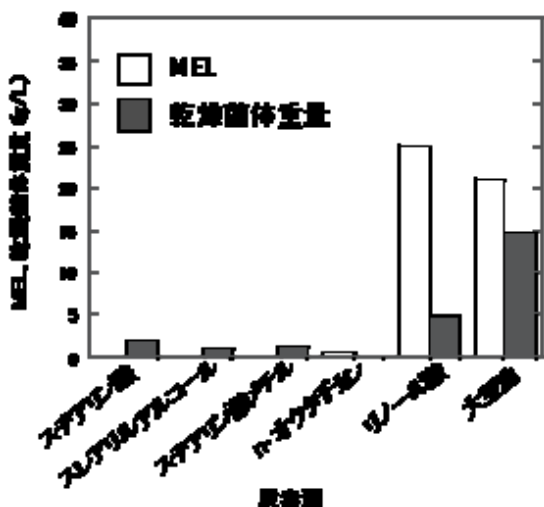


図2 MEL生産へのグリセロールの添加効果

が必要である。大豆油では, 酵母がリパーゼを菌体外に分泌して脂肪酸とグリセロールに分解してから, 菌体内に取り込む。そこで, まず菌体を増殖させるためにMELを生産しなかった4種の炭素源についてグリセロールを1%添加して, 培養を行った。結果を, 図2に示す。

グリセロールの添加により, n-オクタデカンでは菌体が6.8g/Lまで増殖し, 35.9g/L(収率:90%)のMELを生産した。また, リノール酸では生産量が增大した。ステアリン酸を除いて菌体の増殖は増加し, グリセロールの添加は有効であった。

3.3 MELの添加効果

MELの機能として細胞外の疎水性物質の取り込みが予想されている。そこで, グリセロール添加培地に2g/LのMELを添加して培養を行った。結果を図3に示す。

MELの添加により, 培養液中には添加した濃度以上のMELが確認された。少量ではあるが今までMELが生産できなかったステアリン酸, ステアリンアルコール, ステアリン酸メチルからのMEL生産が可能となった。

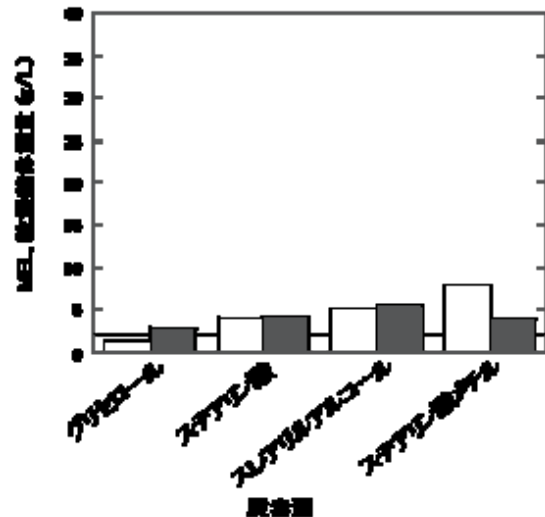


図3 MEL生産へのMELの添加効果

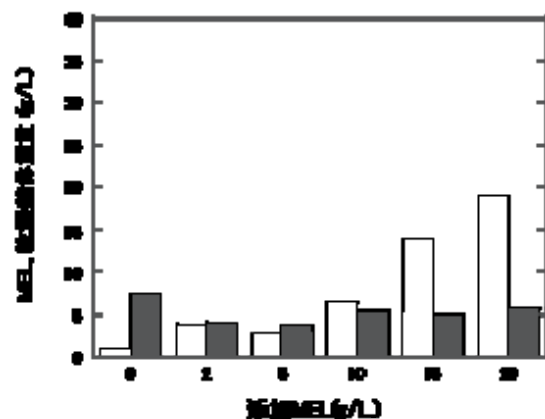


図4 MEL生産に及ぼすMEL添加量の影響

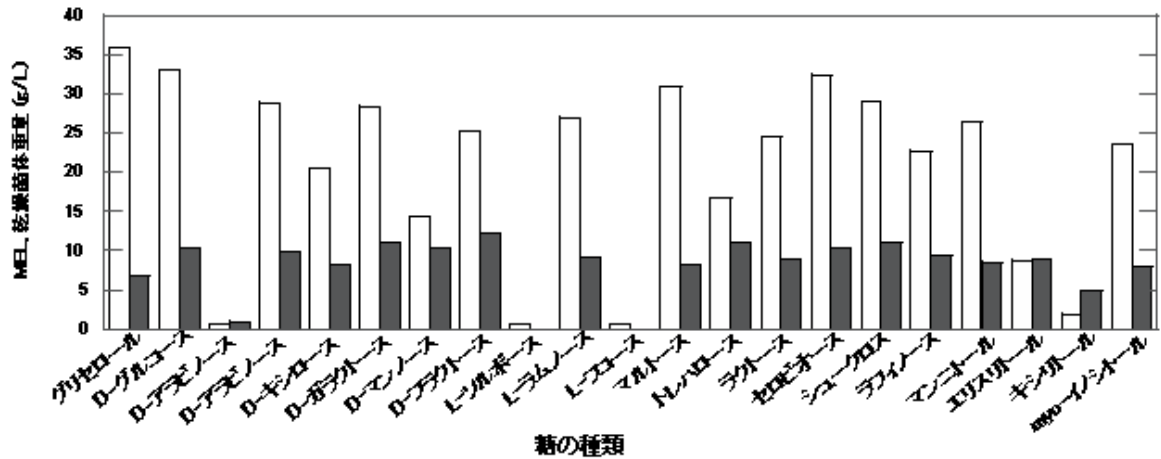


図5 MEL生産に及ぼす糖の種類の影響

そこで、ステアリン酸を炭素源とし、MELの添加量を20g/Lまで増加させてその影響を調べた。結果を図4に示す。

MEL添加量の増加により、培養液中のMEL濃度は増加したが何れも添加したMELの量と変わりがなく、添加量の増加の効果はなかった。ステアリン酸、ステアリンアルコール、ステアリン酸メチルは、培養温度である30℃では何れも固形であり、培養中は比較的大きな粒子状で存在している。このために、酵母細胞がこれらを取り込めないと考えられる。大豆油中には30℃において固形のパルミチン酸とステアリン酸が平均で11と4%含まれている。大豆油を炭素源として培養を行った場合、脂肪酸は残存していないためこれらを細胞内に取り込んでいる。この時、大豆油から遊離される脂肪酸は、微細化されているために、細胞内に取り込みやすくなっていると考えられる。本研究では、MELによるステアリン酸の微細化、可溶化ができていないためにMEL生産が行われていないと考えられる。

3.4 糖種類の影響

n-オクタデカンを炭素源として、グリセロールの代わりに20種類の糖(単糖、二糖、糖アルコール)を添加してその影響を調べた。結果を図5に示す。糖の種類によりMEL生産量と菌体増殖量に違いが生じた。アラビノース、ソルボース、フコース、キシロースはほとんど生産しなかった。最もMELを生産したのは、グリセロールであり、次いでグルコースであった。グリセロールは、植物油を分解した時に生成される糖であり、本菌株が最も利用しやすいと考えられる。

3.5 n-オクタデカン濃度の影響

菌体増殖用の炭素源としてグルコースを10g/L添加し、n-オクタデカン濃度を140g/Lまで増加させてその影響を調べた。結果を図6に示す。

菌体濃度は、あまり影響がなかった。MEL濃度は、4%まで次第に増加し、10%までほぼ35g/Lの一定値であった。10%以上では初発n-オクタデカン濃度の増加につれて次第に低下した。残存n-オクタデカン濃度は、初発n-オクタデカンの増加により急激に増加した。

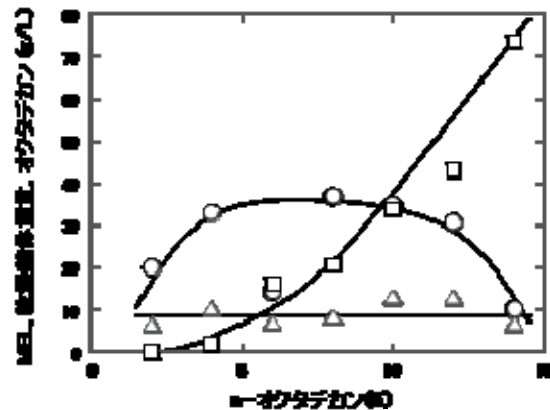


図6 MEL生産に及ぼすn-オクタデカン濃度の影響

北本らは、*Pseudozyma antarctica* T-34の休止菌体を用いたn-オクタデカンからのMEL生産において、6%(MEL濃度:35g/L)以上ではMEL生産が抑制されることを報告している。これらの原因は、高濃度のn-オクタデカンによる基質阻害と考えられる。北本らは、初発n-オクタデカン濃度を6%として培養を開始し、培養途中でn-オクタデカンを3回に分けて流加することにより、4週間で140g/LのMEL生産を報告した。本菌株も同程度の生産量であるため、同様の方法を用いることにより高濃度化を達成できると考えられる。

3.6 炭化水素の種類の影響

菌体増殖用の炭素源としてグルコースを10g/L添加し、何れも液状であるトリデカン、ヘキサデカン、オクタデカン、軽油と重油を炭素源(各4%)として培養を

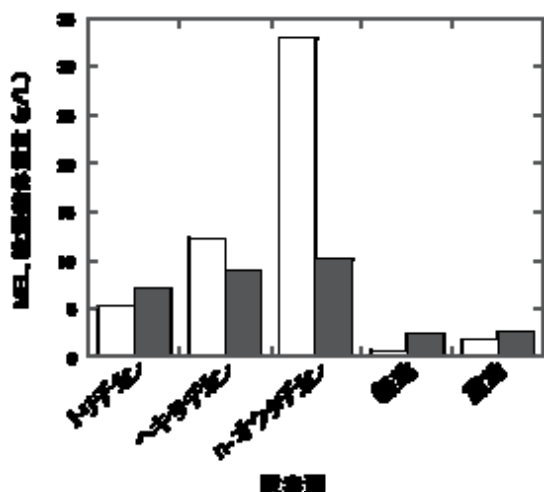


図7 MEL生産に及ぼす炭素源の影響

行った。結果を図7に示す。

トリデカンとヘキサデカンでは5.2と12.1g/LのMELを生産した。*Pseudozyma antarctica* T-34では、それぞれ10と14g/Lを生産し、本研究よりも少し高い値であった。軽油と重油では0.5と1.6g/Lと生産量は少なかった。

4 結 言

Kurtzmanomyces sp. I-11による植物油脂以外の炭化水素などの炭素源からのMELの生産の可能性について検討した。

- (1) グリセロールの添加により、n-オクタデカンでは35.9g/L (収率: 90%) のMELを生産した。
- (2) グリセロールの添加により、ステアリン酸、ステアリンアルコール、ステアリン酸メチルから少量のMEL生産が可能となった。
- (3) 糖の種類によりMEL生産量と菌体増殖量に違いが生じた。最もMELを生産したのはグリセロール、次いで

グルコースであった。アラビノース、ソルボース、フコース、キシロースはほとんど生産しなかった。

(4) 初発 n-オクタデカン 8% で 36.8g/L のMELを生産し、10%以上では次第に低下した。

(5) トリデカンとヘキサデカンでは5.2と12.1g/LのMELを生産した。

文 献

- 1) T. Nakahara, H. Kawasaki, T. Sugisawa, Y. Takamori, and T. Tabuchi : J. Ferment. Technol., 61 (1983), 19
- 2) D. Kitamoto, K. Akiba, C. Hiroki and T. Tabuchi : Agric. Biol. Chem., 54 (1990), 31
- 3) H.-S. Kim, B.-D. Yoon, D.-H. Choung, H.-M. Oh, T. Katsuragi and Y. Tani : Appl Microbiol Biotechnol., 52 (1999), 713
- 4) G. Deml, T. Anke, F. Oberwinkler, B. M. Ginnetti, W. Stelich : Phytochemistry, 19 (1980) 83
- 5) 井上恵雄 : BIO INDUSTRY, Vol. 2, No. 8, (1985), 605
- 6) 石上 裕 : FREGRANCE JOURNAL, (1995), 73
- 7) 北本 大 : オレオサイエンス, 第1巻, 第1号 (2001), 17
- 8) K. Kakugawa, M. Tamai, K. Imamura, K. Miyamoto, S. Miyoshi, Y. Morignaga, O. Suzuki and T. Miyakawa : Boisci. Biotechnol. Biochem., 66 (2002), 188
- 9) H. Kawashima, T. Nakahara, M. Oogaki and T. Tabuchi : J. Ferment. Technol. 61 (1983) 143
- 10) D. Kitamoto, T. Ikegami, G. T. Suzuki, A. Sasaki, Y. Takeyama, Y. Idemoto, N. Koura and H. Yanagishita: Biotechnology Letter, 23 (2001) 1709