

氏 名(本籍) あお き ひで ゆき
青 木 秀 之

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 農 第 6 9 1 号

学位授与年月日 平 成 17 年 3 月 3 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文題目 糸状菌及び酵母を用いた高度不飽和脂肪酸の応用に関する研究

論文審査委員 (主 査) 教 授 藤 本 健四郎
(副 査) 教 授 佐 藤 實
教 授 大 島 泰 克
助教授 遠 藤 泰 志

論文内容要旨

第1章 緒言

エイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) などのn-3系高度不飽和脂肪酸 (n-3系HUFA) は、抗血栓作用、抗動脈硬化作用などの様々な生理作用を有していることが報告されている。これらEPAやDHAが、その脂質形態の違いによりその吸収性や生理機能が異なる場合があることが判り、EPAやDHAを摂取する際の脂質形態が注目されている。現在、高純度EPAのエチルエステル型は、医薬品としてのみ使用されており、食品への使用はされていない。また、エチルエステル型に比べトリアシルグリセロール型や遊離脂肪酸型で摂取した方が吸収利用されやすいとの報告がある。しかしながら、遊離脂肪酸型は、トリアシルグリセロール型と比較し酸化安定性が劣るなど問題点があり、食品素材としては適さないことから、天然油脂の分子構造であるトリアシルグリセロール型が最も食品素材として適した脂質形態であると考えられている。以上のことから、EPAやDHAを高濃度に含有するトリアシルグリセロールは、医薬品、健康食品、各種食品素材として期待されており、このEPAやDHAを高含有するトリアシルグリセロールの調製法が研究されている。一方、人のみでなく魚類においても必須脂肪酸としてEPAやDHAを要求することが知られている。特にDHAは、EPA等の他のn-3系HUFAと比較し稚魚の活力や生残率を向上させることが知られており、稚魚の生物餌料であるワムシやアルテミアのDHA含量を高めるための飼料が要望されている。

本研究では、これらEPA、DHAに関し、糸状菌を用いEPAを豊富に含有するトリアシルグリセロールの生合成法検討及びEPA、DHAなどの脂肪酸の菌体内への取り込みと蓄積に適した培養条件の研究、また、DHAを高含有する酵母の開発及びその酵母の水産飼料への応用を検討し、考察を行った。

第2章 *Mucor hiemalis* HA-30を用いた高エイコサペンタエン酸含有トリアシルグリセロールの生産

1%EPA (EPA純度97%) を添加したYeast-Malt液体培地を用いて、菌体内にEPAを蓄積する微生物のスクリーニングを行った結果、EPAを菌体内に取り込み、トリアシルグリセロールの形態で蓄積するHA-30株を見出した。本菌株を形態学及び生化学的性状から同定した結果、接合菌の一種である*Mucor hiemalis* であった。本菌株を用いて高EPA含有トリアシルグリセロールを生産するための方法を検討した。各種炭素源及びその濃度、培養温度、EPA添加濃度の影響を調べた結果、炭素源は、3%可溶性デンプンでトリアシルグリセロール蓄積量が最も多く (Fig. 1-1, Fig. 1-2)、また、培養温度は、25°Cで良好であった。EPA添加濃度については、培地に添加したEPAを含む脂肪酸の添加量を増加すると、菌体中のトリアシルグリセロール量及びトリアシルグリセロール中のEPA含量が増加した (Fig. 1-3)。しかし、EPAを含む遊離脂肪酸の添加量が増加すると菌の生育は低下した。培地に添加したEPAの菌体からの回収率は、EPA純度97%の遊離脂肪酸を0.1%添加した場合、約50%であり、トリアシルグリセロール中のEPA純度は60%であった。一方、EPA純度97%の遊離脂肪酸を1%添加した場合、EPA回収率は、20%であったが、トリアシルグリセロール中のEPA純度は80%であった。高EPA含有トリアシルグリセロールを生産するための最適培養条件を調べた結果、3%可溶性デンプン、0.5%ポリペプトン、0.3%酵母エキス、0.5%遊離EPA、pH6、25°C、2日間が最適培養条件で

あり、本条件にて、EPA純度79%のトリアシルグリセロールが1.77mg/ml medium得られた (Table 1-1)。 *M. hiemalis* HA-30の菌体内の主な脂質クラスはトリアシルグリセロールであり、培地に添加する脂質のEPA濃度にトリアシルグリセロール中のEPA純度は依存していた。培地に添加した脂質形態の影響を調べた結果、エチルエステル型の脂質形態では、遊離型の脂質形態と比較し、トリアシルグリセロール中のEPAの取り込みが良くなかった (Fig. 1-4)。また、本菌株の生合成したトリアシルグリセロールの分子種分析を行った結果、総トリアシルグリセロール中の73%が、trienicosapentaenoyl glycerolであった (Fig. 1-5)。

以上のことより、*M. hiemalis* HA-30を利用してEPAを高濃度に含有するトリアシルグリセロールを調製する方法を開発した。

第3章 *Mucor hiemalis* HA-30による添加脂肪酸の取り込みと蓄積

M. hiemalis HA-30菌体内のトリアシルグリセロールへの各種多価不飽和脂肪酸 (リノール酸 (18:2n-6)、 γ -リノレン酸 (18:3n-6)、アラキドン酸 (20:4n-6)、エイコサペンタエン酸 (20:5n-3)、ドコサヘキサエン酸 (22:6n-3)) の取り込みと蓄積を調べた結果、多価不飽和脂肪酸が無添加の場合と比較し、全ての多価不飽和脂肪酸は、菌重量、総脂質量、トリアシルグリセロール量を増加させた (Table 2-1)。菌体内のトリアシルグリセロール量は、菌重量、総脂質量と同様に添加した多価不飽和脂肪酸の種類に依存しており、18:2n-6 > 18:3n-6 > 20:4n-6 > 20:5n-3 > 22:6n-3の順で高かった。また、18:2n-6、18:3n-3、18:3n-6、20:4n-6、20:5n-3は、いずれもトリアシルグリセロールに良好に取り込まれ、各多価不飽和脂肪酸の純度は約80%となったが、22:6n-3は、他の多価不飽和脂肪酸と比較し、トリアシルグリセロールへの取り込みが良くなく約60%であった。モデル脂肪酸を使用し各種脂肪酸の菌体への取り込み及び蓄積を調べた結果、菌体内への脂肪酸の取り込みは、飽和及び一価不飽和脂肪酸と比較し、多価不飽和脂肪酸で良好であった (Table 2-2, Table 2-3, Table 2-4)。また、各種脂肪酸の取り込みは、二重結合数が奇数群 (18:3n-6, 18:3n-3, 20:5n-3) > 二重結合数が偶数群 (18:2n-6, 20:4n-6, 22:6n-3) > 二重結合数が1以下群 (16:0, 18:0, 18:1) の順で良かった (Fig. 2-1)。一方、各種脂肪酸の菌体内への蓄積は、培養18時間では、18:3n-6、18:3n-3、20:5n-3が、培養44時間後において、16:0、18:0、18:1が顕著に増加した (Fig. 2-2)。

以上のことから、*M. hiemalis* HA-30のEPA、DHAなどの各種脂肪酸の菌体内への取り込みを調べた結果、飽和及び一価不飽和脂肪酸と比較し、多価不飽和脂肪酸の取り込みが良好であり、また、各種脂肪酸の取り込み傾向は、大きく18:3n-6、18:3n-3、20:5n-3 > 18:2n-6、20:4n-6、22:6n-3 > 16:0、18:0、18:1の順に良好であった。

第4章 *Pichia methanolica* HA-32による培養液からのドコサヘキサエン酸の取り込みと蓄積

0.5%遊離DHA (DHA純度28%、DHA-FFA) 添加したYeast-Malt液体培地を用いて、酵母30株についてDHAの取り込みのスクリーニングを行った結果、菌体内の総脂質中のDHA純度が約40%とであるHA-32株を見出した。HA-32株は、*Pichia methanolica* HA-32と同定された。本菌株におけるDHAの蓄積条件検討を行った。炭素源/窒素源比

の影響を調べた結果、菌体乾燥重量は、C/Nの比率が増加する程減少したが、総脂質量は、ほぼ一定していた (Fig. 3-1)。また、C/N比を1.25に一定とし、栄養素の濃度を換え、脂質の蓄積に与える影響を調べた結果、3%グルコースの場合、乾燥菌体重量が最も高くなったが、総脂質量は、5%グルコースの場合、最も高くなった (Fig. 3-2)。また、総脂質中のDHA純度は、グルコース濃度が増加するにつれ減少した。続いて培地に添加した脂肪酸濃度の影響を調べた結果、添加脂肪酸量が増加すると共に総脂質量が増加し、3%DHA-FFA添加時において、最大値 (120mg/g dry cells) を示した。酵母エキス濃度の影響を調べた結果、総脂質量及び総脂質中のDHA純度は、酵母エキスの増加と共に増加した (Fig. 3-3)。酵母エキス20%の時に総脂質量は、205mg/g dry cells、総脂質中のDHA純度は、32%であった。以上のことから、DHAを含有する酵母の最適培養条件は、5%グルコース、20%酵母エキス、3%DHA-FFA、pH6、25℃、3日間が最適であり、本条件下で、総脂質量約200mg/g dry cells (総脂質中のDHA純度32%)、DHA含量約60mg/g dry cellsが得られた。培地へ添加する脂質クラスの影響を調べた結果、トリアシルグリセロール型及びエチルエステル型と比較し、遊離脂肪酸型で約7倍脂質含量の高い菌体 that 得られた (Table 3-1)。培地に添加した脂質クラスは、酵母菌体中の脂質組成に反映されており、トリアシルグリセロール及びエチルエステルは、添加した場合にのみ検出された。DHAの菌体内への取り込みも遊離脂肪酸型で最も良好であった。一方、エチルエステル型が最も菌体内へのDHAの取り込みが良くなかった。さらにビタミン及びミネラルの菌体内へのDHA取り込みに対する影響を調べた。その結果、コリン及び K_2HPO_4 が最も脂質の蓄積やDHAの取り込みを促進した。コリンの場合、総脂質量は、0.25%コリンの時、最大となったが、総脂質中のDHA含量は、0.5%コリンの時、最大であり、濃度が下がっても上がってもDHA含量は低下した。(Fig. 3-4)。一方、 K_2HPO_4 の場合、総脂質量は5% K_2HPO_4 の濃度において最大となったが、総脂質中のDHA純度は、5%濃度まで K_2HPO_4 濃度に依存しなかった (Fig. 3-5)。コリン及び K_2HPO_4 を添加すると、オートクレーブによる滅菌の際に著しい褐変が見られ、この褐変物質が、脂質の蓄積及びDHAの取り込みに関与していることが考えられた。このことを確かめるため、グルコース溶液を個別に滅菌し、褐変をさせなかった場合の影響を調べた。その結果、褐変させなかった場合、脂質含量及びDHAの取り込みが減少した (Fig. 3-6)。さらに褐変の影響を調べるため、5%グルコース、2%酵母エキスを含む培地の初期pHを水酸化ナトリウムで各種pHに調整後、オートクレーブで濃度を変えた褐変物質を産生させ培養を行った。その結果、初期pHが約9までの褐変濃度 (OD値約18) で総脂質量及び総脂質中のDHA純度が褐変濃度依存的に増加した。しかし、OD値20以上で菌の生育阻害が認められた (Fig. 3-7)。

以上の研究結果から、*P. methanolica* HA-32にDHAを蓄積させることにより、水産初期飼料として重要なDHA強化酵母の新しい製造方法として利用できるものと期待された。

第5章 DHA含有酵母 (*Pichia methanolica* HA-32) 投与によるワムシへのドコサヘキサエン酸の蓄積

海水魚養殖において、孵化直後の仔魚の最初の飼料として、しばしばワムシが利用されるが、必須栄養成分であるDHAなどのn-3系高度不飽和脂肪酸を強化する必要があり、そ

のための餌料としてDHA強化酵母*P. methanolica* HA-32を使用した。

P. methanolica HA-32は、コリン及び K_2HPO_4 から誘導される褐変反応（おそらくはメイラード反応）により菌体内へのDHAの取り込み及び蓄積が促進されることが分かった。本実験でも0.5%コリンと1% K_2HPO_4 を含む培地を使用し、*P. methanolica* HA-32を2L ジャーファーマンターで培養した。その結果、湿菌体重量40g/L、総脂質量246mg/g dry cell、DHA含量69mg/g dry cellであった。総脂質中のn-3系の高度不飽和脂肪酸は、約33%であり、この内DHAは、27.5%であった（Table 4-1）。

約800個/mlの密度としワムシに *P. methanolica* HA-32を10L 培養液に対し2.7g（DHA含量58mg/10L）又は8.0g（DHA含量170mg/10L）添加しワムシ培養を行った。また、コントロールとして、DHAシーオイルパウダーを10L 培養液に対し1.3g（DHA含量180mg/10L）をタンクに添加しワムシ培養を行った。ワムシの培養は、十分通気を行い3-24時間培養を行った。その結果、ワムシ総脂質中のEPAとDHA純度は、DHA含有酵母の添加量に依存して増加した。ワムシ中の総脂質量及びDHA含量は、培養6時間で最大となった（Fig. 4-1）。DHA含有酵母を8.0g添加し培養6時間で、ワムシの総脂質量及びDHA純度は、246mg/g dry cells及び21%であった。ワムシ中の脂肪酸組成（特にn-3系高度不飽和脂肪酸組成）は、DHA含有酵母の脂肪酸組成と類似していた（Table 4-2）。

市販DHA含有パウダー1.3g（総脂質量780mg、DHA含量180mg、EPA含量50mg）/10Lにてワムシを6時間培養した結果、ワムシ中の総脂質量、DHA含量、EPA含量は、220mg、30mg、10mgとなった（Fig. 4-2）。一方、DHA含有酵母2.7g（総脂質量210mg、DHA含量58mg、EPA含量10mg）/10Lにてワムシを6時間培養した結果、ワムシ中の総脂質量、DHA含量、EPA含量は、200mg、27mg、6mgとなった。さらにDHA含有酵母8.0g（総脂質量620mg、DHA含量170mg、EPA含量30mg）/10Lにてワムシを6時間培養した結果、ワムシ中の総脂質量、DHA含量、EPA含量は、240mg、51mg、15mgとなった。

以上のことから、*P. methanolica* HA-32は、ワムシのDHA含量を高めるに優れた飼料であることが明らかになった。

第6章 総括

微生物を利用したエイコサペンタエン酸（EPA）を高含有するトリアシルグリセロールの調製方法の開発を目的とし、各種微生物をEPAを含有する培地で培養を行いスクリーニングを行った結果、EPAを菌体内に取り込み、トリアシルグリセロールで蓄積する *Mucor hiemalis* HA-30を見出した。本菌株における高EPA含有トリアシルグリセロールを生産するための最適培養条件を調べた結果、3%可溶性デンプン、0.5%ポリペプトン、0.3%酵母エキス、0.5%遊離脂肪酸型EPA、pH6、25℃、2日間が最適培養条件であった。培地に添加する脂質のEPA濃度にトリアシルグリセロール中のEPA純度は依存していた。*M. hiemalis* HA-30の菌体内の主な脂質クラスはトリアシルグリセロールであり、その分子種分析は、総トリアシルグリセロール中の73%が、trienicosapentaenoyl glycerolであった。以上のことより、*M. hiemalis* HA-30を利用してEPAを高濃度に含有するトリアシルグリセロールを調製する方法を開発した。

次に高EPA含有トリアシルグリセロールを生産する *M. hiemalis* HA-30のEPA、DHA

などの各種脂肪酸の菌体内への取り込みと蓄積に関する研究を行った。*M. hiemalis* HA-30菌体内のトリアシルグリセロールへの各種多価不飽和脂肪酸の取り込みと蓄積を調べた結果、多価不飽和脂肪酸が無添加の場合と比較し、添加した全ての多価不飽和脂肪酸において、トリアシルグリセロール量の増加したが、その増加は多価不飽和脂肪酸の種類に依存しており、 $18:2n-6 > 18:3n-6 > 20:4n-6 > 20:5n-3 > 22:6n-3$ の順で高い含量となった。各種脂肪酸の菌体への取り込み及び蓄積を調べた結果、飽和及び一価不飽和脂肪酸と比較し、多価不飽和脂肪酸の取り込みが良好であり、また、各種脂肪酸の取り込み傾向は、大きく $18:3n-6$ 、 $18:3n-3$ 、 $20:5n-3 > 18:2n-6$ 、 $20:4n-6$ 、 $22:6n-3 > 16:0$ 、 $18:0$ 、 $18:1$ の順に良好であった。

水産飼料に利用できるDHAを含有する酵母の生産方法の開発を目的とし、各種酵母をDHAを含有する培地で培養を行った結果、培地に添加したDHAを菌体内に取り込む*Pichia methanolica* HA-32を見出した。DHAを含有する酵母の最適培養条件を調べた結果、5%グルコース、20%酵母エキス、3%DHA含有遊離脂肪酸、pH6、25℃、3日間が最適培養条件であった。*P. methanolica* HA-32は、優先的に菌体内にDHAが蓄積され、遊離脂肪酸型で最もDHA取り込みが良好であった。また、コリン及び K_2HPO_4 から誘導される褐変反応が、菌体内へのDHAの取り込み及び蓄積を促進していることが推察された。以上の研究結果から、*P. methanolica* HA-32にDHAを蓄積させることにより、水産初期飼料として重要なDHA強化酵母の新しい製造方法として利用できるものと期待された。

さらにDHA強化酵母*P. methanolica* HA-32について、ワムシのDHA富化効果について検討した。その結果、*P. methanolica* HA-32でワムシを培養した場合のワムシ中のDHA含量は、市販DHAパウダーでワムシを培養した場合のワムシ中のDHA含量より1.6倍高い値となった。ワムシを*P. methanolica* HA-32で培養を行った結果、ワムシ中の総脂質量及びDHA含量は、培養6時間で最大となり、本菌株を10L培養液に対し8.0g添加しワムシを6時間培養を行った場合、ワムシ乾燥重量中のn-3系高度不飽和脂肪酸は、約6.5%となっており、魚のn-3系高度不飽和脂肪酸の要求量を十分満たしていた。以上のことから、*P. methanolica* HA-32は、ワムシのDHAを高めるに優れた飼料であることが示唆された。

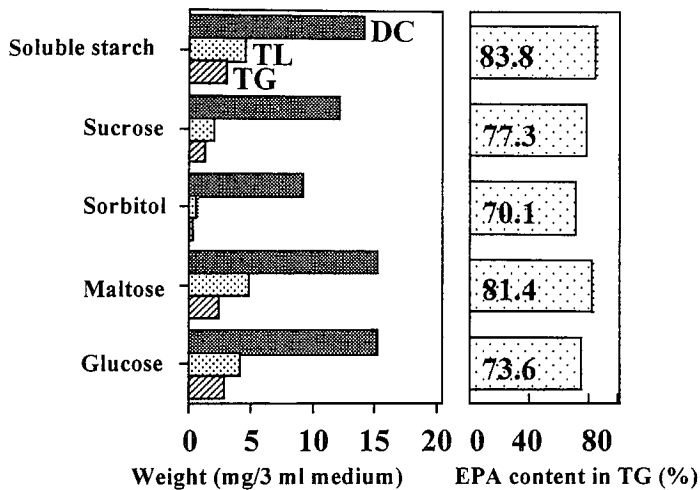


Fig. 1-1. Effects of Carbon Sources on Production of the EPA-enriched Triacylglycerol.

Culture medium: 0.3% yeast extract, 0.5% polypeptone, 1.0% EPA-FFA (EPA purified to 97%), 1.0% of each indicated carbon source.

Three ml of the medium adjusted to pH 6.0 was inoculated with *Mucor hiemalis* HA-30 and incubated at 30 °C for 2 days.

DC; Dry cells, TL; Total lipids, TG; Triacylglycerol.

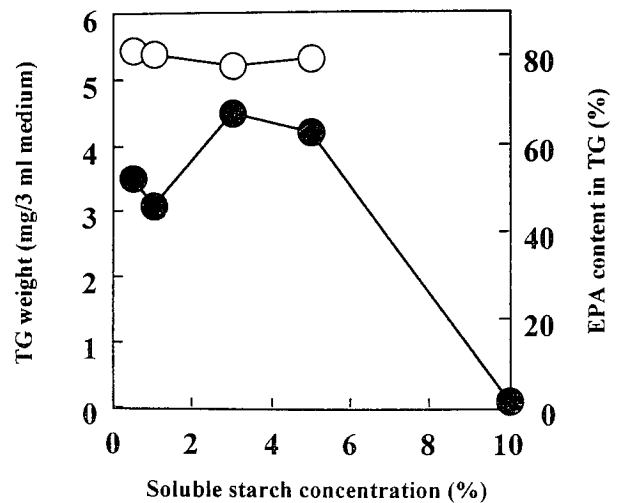


Fig. 1-2. Effects of Soluble Starch Concentration on Production of the EPA-enriched Triacylglycerol.

Culture medium: 0.3% yeast extract, 0.5% polypeptone, 1.0% EPA-FFA (EPA purified to 97%), each concentration of soluble starch. Three ml of the medium adjusted to pH 6.0 was inoculated with *Mucor hiemalis* HA-30 and incubated at 30 °C for 2 days.

Three ml of the medium adjusted to pH 6.0 was inoculated with *Mucor hiemalis* HA-30 and incubated at 30 °C for 2 days.

Symbols; ●, Triacylglycerol; ○, EPA content in triacylglycerol.

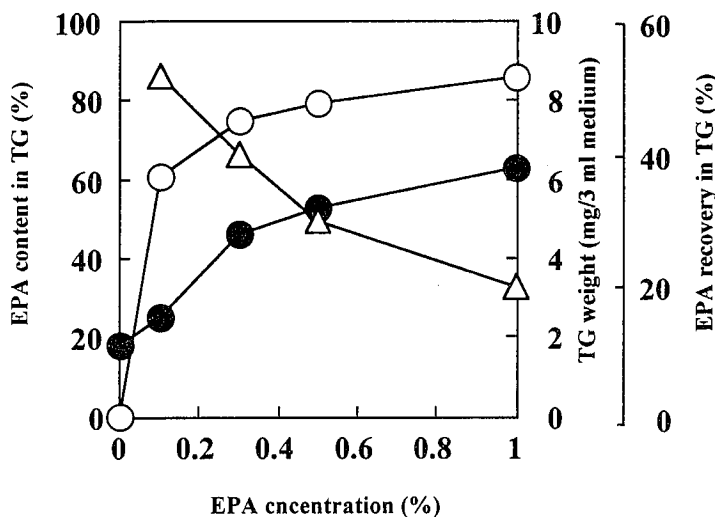


Fig. 1-3. Effects of EPA Concentration on the Production of the EPA-enriched Triacylglycerol.

Culture medium: 0.3% yeast extract, 0.5% polypeptone, 3.0% soluble starch, each concentration of EPA-FFA (EPA purified to 97%). Three ml of the medium adjusted to pH 6.0 was inoculated with *Mucor hiemalis* HA-30 and incubated at 25 °C for 2 days.

Symbols; ●, Triacylglycerol; ○, EPA content in triacylglycerol; △, EPA recovery in triacylglycerol.

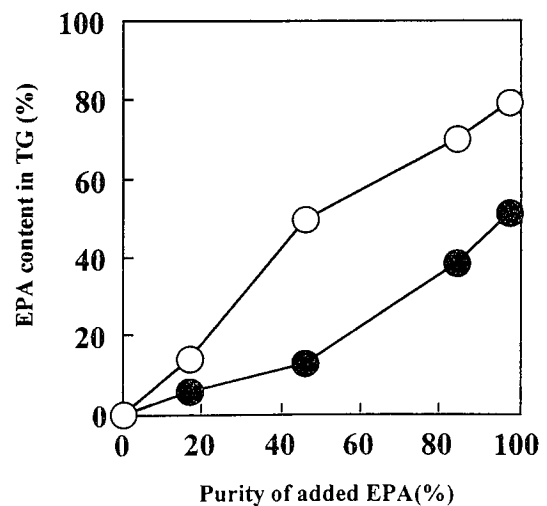


Fig. 1-4. Relationship between the Purity of Added EPA and EPA Content in Triacylglycerol.

Culture medium: 0.3% yeast extract, 0.5% polypeptone, 3.0% soluble starch, 0.5% each purity of EPA-EE or EPA-FFA. Three ml of the medium adjusted to pH 6.0 was inoculated with *Mucor hiemalis* HA-30 and incubated at 25 °C for 2 days.

Symbols; ●, EPA-EE; ○, EPA-FFA.

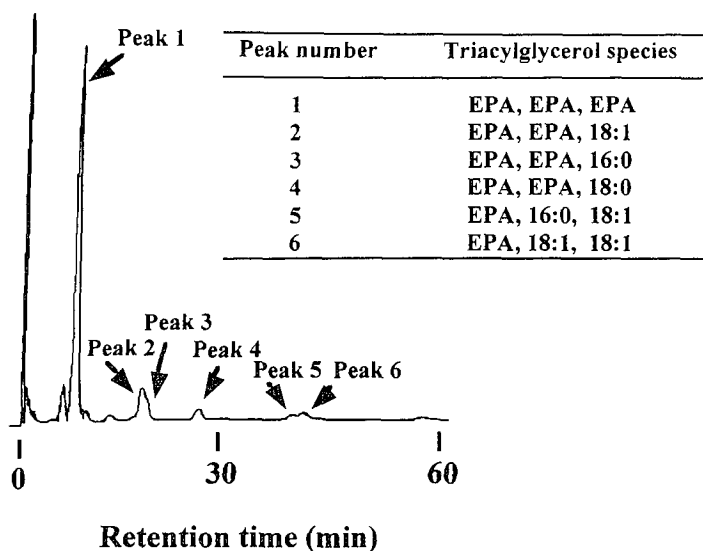


Fig. 1-5. Reversed-phase HPLC of EPA-enriched Triacylglycerol.

Column: ODS 4.6X150mm; Mobile phase:acetonitrile/acetone (3 : 2, vol/vol) ; Detector: refractive index ; Flow rate: 1ml/min; Temperature: 30°C.

Table 1-1. Analytical Data of Lipid in *Mucor hiemalis* HA-30

	Non additive	Free EPA added	EPA-EE added
Dry cell weight (mg/ml)	4.57	6.86	4.03
Total lipid (mg/ml)	0.76	2.00	0.83
Triacylglycerol (mg/ml)	0.63	1.77	0.57
Lipid class (%)			
Ethyl ester	-	-	4.6
Triacylglycerol	84.4	88.9	74.4
Free fatty acid	0.7	3.7	9.6
Polar lipid	13.9	6.3	10.3
Others	1.0	1.1	1.1
Fatty acid composition			
14:0	1.6	0.6	1.8
16:0	18.7	3.3	9.8
16:1	3.4	0.1	1.2
18:0	9.8	2.8	6.7
18:1	46.1	6.9	18.3
18:2 (n-6)	8.7	0.3	2.3
18:3 (n-6)	7.1	0.3	2.7
20:5 (n-3)	-	79.1	51.1
Others	4.6	6.3	6.1

Culture medium: 0.3% yeast extract, 0.5% polypeptone, 3.0% soluble starch, EPA added; 0.5% Free EPA (EPA purified to 97%), EPA ethyl ester (EPA purified to 97%), or non additive of fatty acid, 3 ml/test tube, pH 6.0. Incubated at 25 °C for 2 days.

Table 2-1. Accumulation of Added Free Unsaturated Fatty Acids into the Cellular Triacylglycerol

Supplemented fatty acids	Non-addition	18:2n-6	18:3n-6	20:4n-6	20:5n-3	22:6n-3
Dry cell weight (mg/ml)	4.65 ± 0.23	6.97 ± 0.14	6.81 ± 0.25	6.09 ± 0.07	6.88 ± 0.29	6.14 ± 0.47
Total lipid (mg/ml)	0.77 ± 0.12	2.75 ± 0.21	2.55 ± 0.23	2.60 ± 0.06	1.99 ± 0.18	2.05 ± 0.07
Triacylglycerol (mg/ml)	0.65 ± 0.11	2.45 ± 0.11	2.39 ± 0.24	2.28 ± 0.14	1.75 ± 0.16	1.77 ± 0.05
Fatty acid composition in TG (%)						
14:0	1.6 ± 0.2	0.6 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.7 ± 0.1
16:0	18.7 ± 0.5	4.7 ± 0.5	4.1 ± 0.9	3.0 ± 0.5	3.3 ± 0.3	6.4 ± 0.8
16:1	3.4 ± 0.3	0.4 ± 0.1	0.2 ± 0.2	N.D.	0.1 ± 0.2	0.9 ± 0.2
18:0	9.8 ± 0.3	2.5 ± 0.3	3.3 ± 0.8	3.2 ± 0.8	2.8 ± 0.6	3.9 ± 0.9
18:1	46.1 ± 0.4	6.0 ± 0.9	7.1 ± 2.4	3.4 ± 1.2	6.9 ± 2.1	17.3 ± 1.3
18:2	8.7 ± 0.2	80.6 ± 2.1	0.6 ± 0.3	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.2	2.0 ± 0.3
18:3	7.1 ± 0.3	3.3 ± 0.2	82.4 ± 4.6	2.0 ± 0.1	0.3 ± 0.1	1.8 ± 0.4
20:4	N.D.	N.D.	N.D.	84.8 ± 2.6	N.D.	N.D.
20:5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	79.1 ± 3.1	4.5 ± 0.2
22:6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	58.7 ± 3.8

Values are mean ± standard deviation (n=3).

N.D.: not detected (less than 0.1%).

Table 2-2. Course of the Content and Composition of Fatty Acids in Exocellular (Culture Medium) Lipids during the Cultivation of *M. hiemalis* HA-30 on a Model of Fatty Acid Mixture

	Fatty acid content (mg/3ml medium)			Fatty acid composition (GC area %)		
	0hr	18hr	44hr	0hr	18hr	44hr
16:0	0.78	0.28±0.04	0.07±0.02	6.9	8.9±0.9	10.3±1.4
18:0	0.16	0.08±0.01	0.02±0.01	1.4	2.4±0.3	3.4±0.4
18:1	0.65	0.25±0.04	0.05±0.02	5.8	8.1±1.1	7.7±0.4
18:2n-6	0.92	0.25±0.03	0.05±0.02	8.1	7.7±0.1	6.8±0.4
18:3n-6	1.27	0.27±0.07	0.05±0.03	11.3	8.3±1.6	8.0±0.5
18:3n-3	1.21	0.23±0.06	0.05±0.02	10.7	7.1±1.3	6.8±0.5
20:4n-6	2.00	0.60±0.08	0.10±0.06	17.8	18.7±0.4	16.3±1.0
20:5n-3	0.90	0.19±0.06	0.04±0.02	8.0	6.0±1.2	5.8±0.4
22:6n-3	1.43	0.43±0.05	0.07±0.04	12.7	13.6±0.6	11.5±0.9

Table 2-3. Course of the Content and Composition of Fatty Acids in Exocellular (Cell-Adsorped) Lipids during the Cultivation of *M. hiemalis* HA-30 on a Model of Fatty Acid Mixture

	Fatty acid content (mg/3ml medium)		Fatty acid composition (GC area %)	
	18hr	44hr	18hr	44hr
16:0	0.18±0.02	0.27±0.05	8.6±0.5	8.5±0.4
18:0	0.05±0.01	0.08±0.01	2.3±0.1	2.7±0.2
18:1	0.15±0.02	0.25±0.06	7.3±0.3	8.0±0.1
18:2n-6	0.16±0.02	0.25±0.05	7.9±0.2	7.8±0.0
18:3n-6	0.20±0.03	0.29±0.07	9.7±0.3	9.3±0.2
18:3n-3	0.17±0.03	0.24±0.06	8.3±0.3	7.6±0.3
20:4n-6	0.38±0.05	0.57±0.13	18.3±0.2	18.1±0.3
20:5n-3	0.15±0.03	0.20±0.06	6.8±0.3	6.4±0.3
22:6n-3	0.27±0.04	0.40±0.10	12.8±0.1	12.8±0.5

Table 2-4. Course of the Content and Composition of Fatty Acids in Endocellular Lipids during the Cultivation of *M. hiemalis* HA-30 on a Model of Fatty Acid Mixture

	Fatty acid content (mg/3ml medium)		Fatty acid composition (GC area %)	
	18hr	44hr	18hr	44hr
16:0	0.16±0.02	0.56±0.00	6.7±0.1	11.9±0.6
18:0	0.05±0.01	0.30±0.04	1.8±0.0	6.3±0.4
18:1	0.11±0.01	0.81±0.03	4.6±0.1	17.2±1.5
18:2n-6	0.21±0.04	0.41±0.01	8.9±0.1	8.6±0.4
18:3n-6	0.37±0.06	0.49±0.03	15.6±0.0	10.4±0.0
18:3n-3	0.30±0.05	0.34±0.04	12.8±0.1	7.1±0.3
20:4n-6	0.40±0.06	0.58±0.06	16.9±0.0	12.2±0.6
20:5n-3	0.22±0.04	0.25±0.01	9.2±0.3	5.3±0.1
22:6n-3	0.20±0.04	0.29±0.04	8.3±0.2	6.2±0.6

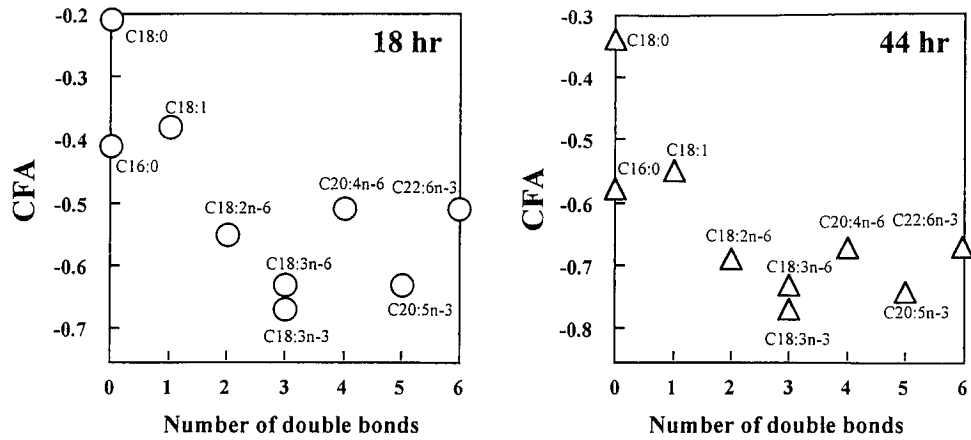


Fig. 2-1. Effect of the Number of Double Bonds of the Fatty Acids on the CFA Values in Exocellular Lipids after Cultivations of *M. hiemalis* HA-30 on a Model of Fatty Acid Mixture for 18 hr and 44 hr. Symbols represent mean in triplicate.; ○, 18hr cultivation; △, 44hr cultivation.

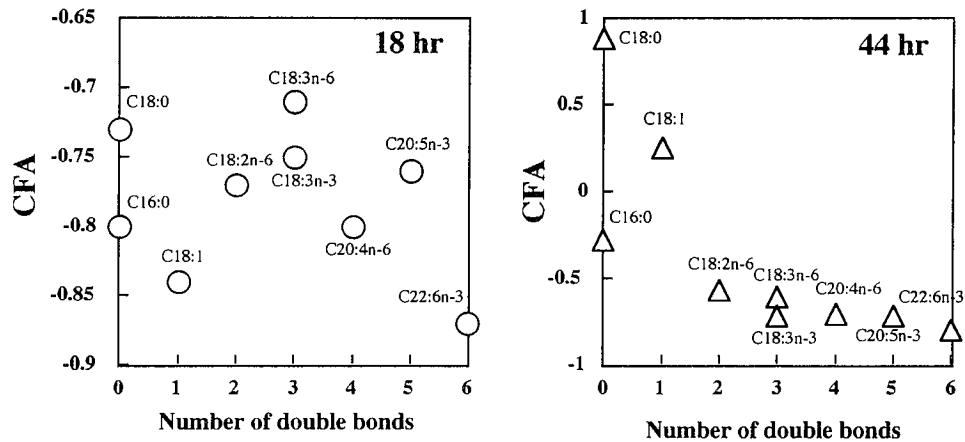


Fig. 2-2. Effect of the Number of Double Bonds of the Fatty Acids on the CFA Values in Endocellular Lipids after Cultivations of *M. hiemalis* HA-30 on a Model of Fatty Acid Mixture for 18 hr and 44 hr. Symbols represent mean in triplicate.; ○, 18hr cultivation; △, 44hr cultivation.

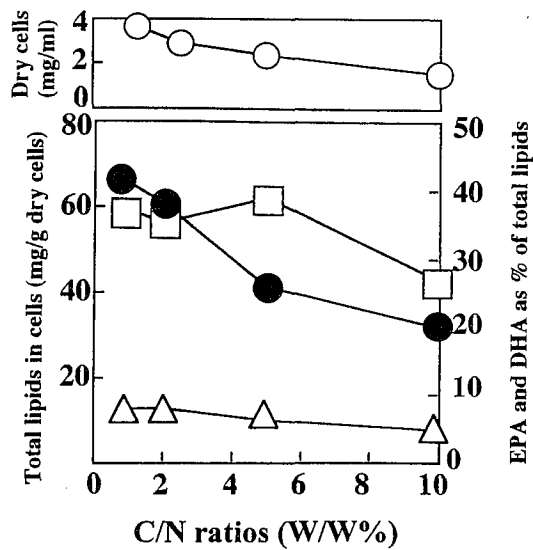


Fig. 3-1. Effects of C/N Ratio on Accumulation of Lipids, EPA and DHA.

The culture medium was 1.0% glucose and 0.5% DHA-FFA when C/N was 1.25; it was 0.3% yeast extract and 0.5% polypeptone when CN was 2.50; 0.15% yeast extract and 0.25% polypeptone when CN was 5.00; 0.075% yeast extract and 0.125% polypeptone when CN was 10.0; 0.038% yeast extract and 0.063% polypeptone. *P. methanolica* HA-32 was used to inoculate 3mL of the medium (pH 6.0) and the culture was incubated at 25 °C for 3 days.

Symbols; ○, Dry cells; □, Total lipids; ●, DHA as a percentage of total lipids; △, EPA as a percentage of total lipids.

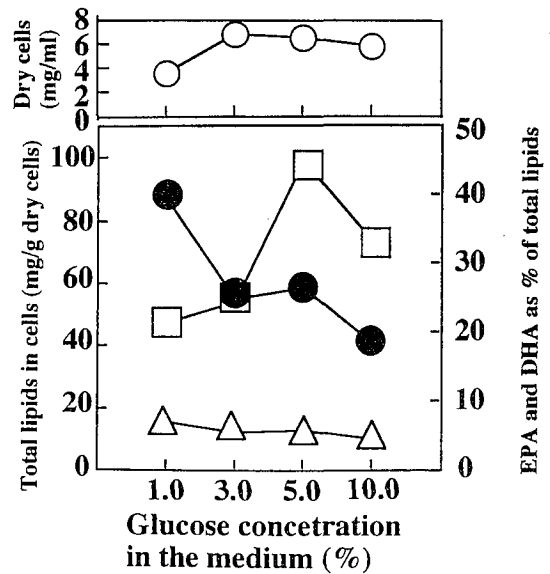


Fig. 3-2. Effects of Nutrient Concentration with a Constant C/N Ratio on Accumulation of Lipids, EPA and DHA.

Culture media: Medium 1: 1.0% glucose, 0.3% yeast extract, 0.5% polypeptone, 0.5% DHA-FFA. Medium 2: 3.0% glucose, 0.9% yeast extract, 1.5% polypeptone, 0.5% DHA-FFA. Medium 3: 5.0% glucose, 1.5% yeast extract, 2.5% polypeptone, 0.5% DHA-FFA. Medium 4: 10.0% glucose, 3.0% yeast extract, 5.0% polypeptone, 0.5% DHA-FFA.

P. methanolica HA-32 was used to inoculate 3mL of the medium (pH 6.0) and the culture was incubated at 25 °C for 3 days.

Symbols; ○, Dry cells; □, Total lipids; ●, DHA as a percentage of total lipids; △, EPA as a percentage of total lipids.

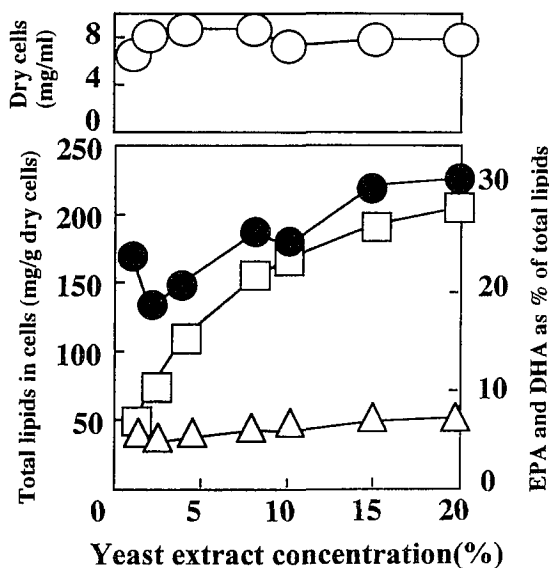


Fig. 3-3. Effects of the Concentration of Yeast Extract on Accumulation of Lipids, EPA and DHA.

Culture medium: 5.0% glucose, 3.0% DHA-FFA, and the concentration of yeast extract shown. *P. methanolica* HA-32 was used to inoculate 3mL of the medium (pH 6.0) and the culture was incubated at 25 °C for 3 days.

Symbols; ○, Dry cells; □, Total lipids; ●, DHA as a percentage of total lipids; △, EPA as a percentage of total lipids.

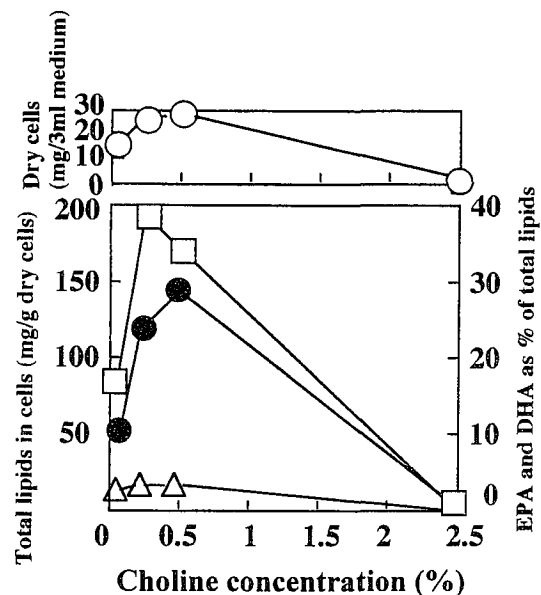


Fig. 3-4. Effects of Choline Concentration on Accumulation of Lipids, EPA and DHA.

Culture medium: 5.0% glucose, 2.0% yeast extract, 3.0% DHA-FFA, and choline at concentrations shown.

After the pH of 3mL on the medium was adjusted to about pH 6.5, it was inoculated with *P. methanolica* HA-32 and incubated at 25 °C for 3 days.

Symbols; ○, Dry cells; □, Total lipids; ●, DHA as a percentage of total lipids; △, EPA as a percentage of total lipids.

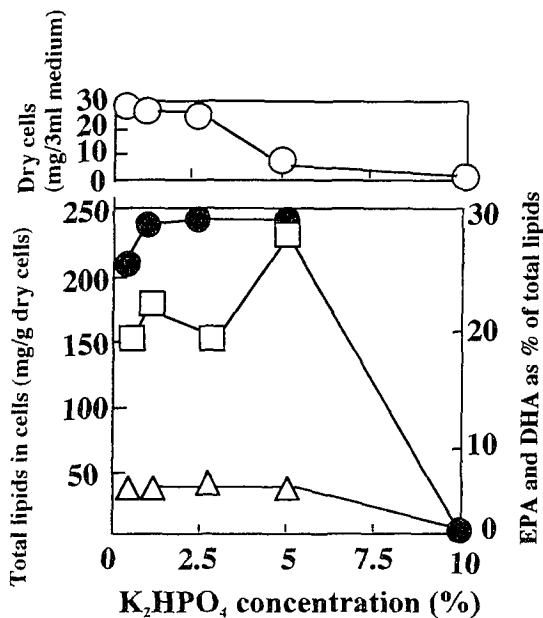


Fig. 3-5. Effects of K₂HPO₄ Concentration on Accumulation of Lipids, EPA and DHA.

Culture media: 5.0% glucose, 2.0% yeast extract, 3.0% DHA-FFA, and K₂HPO₄ at the concentrations shown. *P. methanolica* HA-32 was used to inoculate 3mL of the medium (about pH 6.5) and the culture was incubated at 25 °C for 3 days.
 Symbols; ○, Dry cells; □, Total lipids; ●, DHA as a percentage of total lipids; △, EPA as a percentage of total lipids.

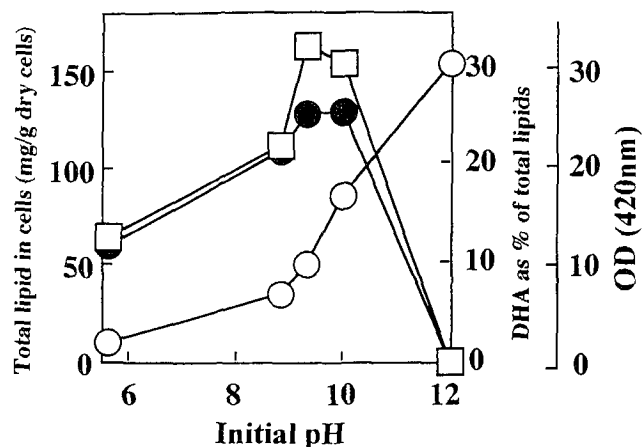


Fig. 3-7. Effects of Additive NaOH Concentration on Browning of the Medium and Accumulation of Lipids and DHA.

Culture medium: 5.0% glucose, 2.0% yeast extract, and 3.0% DHA-FFA. The pH of media was adjusted with NaOH and then the media were sterilized to bring about different extents of browning (as judged by the optical density at 420 nm). each concentration of derived materials from NaOH. *P. methanolica* HA-32 was used to inoculate 3mL of the medium (about pH 6.0) and culture was incubated at 25 °C for 3 days.
 Symbols; ○, Optical density of the medium at 420 nm after being autoclaved; □, Total lipids; ●, DHA as percentage of total lipids.

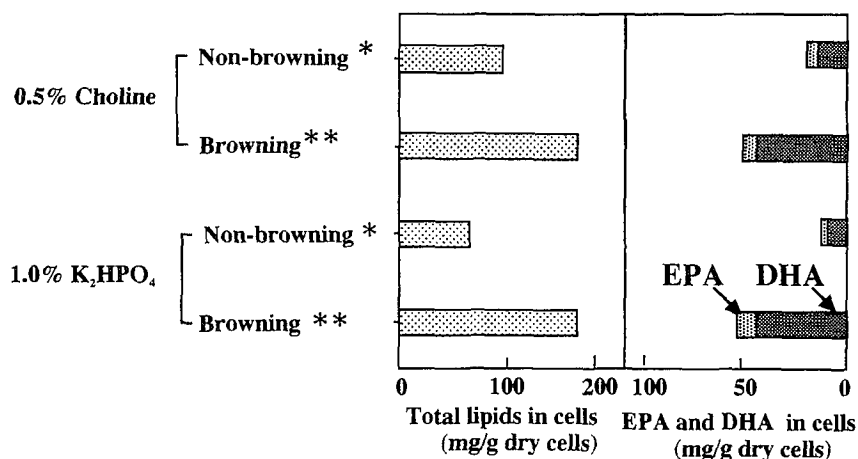


Fig. 3-6. Effects of Materials Derived from Choline and K₂HPO₄ on Accumulation of Lipids, EPA and DHA.

Culture medium: 5.0% glucose, 2.0% yeast extract, 3.0% DHA-FFA (DHA purified to 28%), and 0.5% choline or 1.0% K₂HPO₄. *P. methanolica* HA-32 was used to inoculate to 3mL of the medium (about pH 6.5) and the culture was incubated at 25 °C for 3 days.
 A glucose solution was mixed with the medium before (**) or after (*) sterilization.

Table 3-1. Effects of the Structure of Lipids on Incorporation of DHA.

Supplemented lipids	Non additive	Triacylglycerol added	Ethyl ester added	Free fatty acid added
Dry cell weight (g/L)	6.3	4.6	5.3	7.8
Total lipids (mg/g dry cell)	42.1	28.8	25.2	205.0
Lipid class (%)				
Ethyl ester	-	-	39.6	-
Triacylglycerol	-	35.1	-	-
Free fatty acid	-	11.5	10.6	93.1
Polar lipids	-	9.4	7.7	3.3
Other	-	44.0	42.1	3.6
Fatty acid composition (GC%)				
14:0	2.2	4.8	6.2	2.9
16:0	14.0	26.7	23.7	15.8
16:1	8.9	4.7	6.1	4.8
18:0	3.2	8.6	4.9	3.0
18:1	30.5	16.7	12.0	15.9
18:2	23.2	2.4	3.6	1.8
20:4 (n-6)	0	1.4	3.7	2.5
20:5 (n-3)	0	4.0	2.2	7.2
22:6 (n-3)	0	17.9	4.6	31.6
Others	18.0	15.2	36.6	16.3
(EPA+DHA) in dry cells (mg/g dry cells)	0	6.3	1.7	79.5

Culture medium: 5.0% glucose, 3.0% fish oil (DHA content 28%) or its derivatives, 20% yeast extract. *P. methanolica* HA-32 used to inoculated to 3mL of the medium (pH 6) and incubated at 25 °C for 3 days.

Table 4-1. Yield, Lipid and Fatty Acid Compositions of the DHA-enriched Yeast, *P. methanolica* HA-32

Wet cell weight (g/L)	40
Total lipids (mg/g dry cells)	246
DHA content (mg/g dry cells)	69
Fatty acid composition of total lipids (%)	
14:0	2.9
16:0	17.8
16:1	6.0
18:0	4.2
18:1	16.2
18:2n-6	1.7
20:5n-3	5.1
22:6n-3	27.5
Others	18.6

Table 4-2. Fatty Acid Composition of Rotifer Fed with *P. methanolica* HA-32

Amount of the additive DHA-enriched yeast*	Additive-free	2.7g	8.0g
Fatty acid composition in total lipids (%)			
14:0	1.2	1.7	1.6
16:0	14.2	14.4	12.2
16:1	1.6	4.6	4.1
18:0	3.8	4.2	3.5
18:1	1.6	11.0	8.6
18:2n-6	39.7	18.6	15.9
20:5n-3	0.5	3.7	6.0
22:6n-3	0.3	13.6	21.5
Others	37.1	28.2	26.6
(EPA+DHA) in dry rotifers (mg / g dry rotifers)	1.5	35.2	65.9

* Amount (g) of the DHA-enriched yeast (wet basis) added to 10L of the cultivating water.

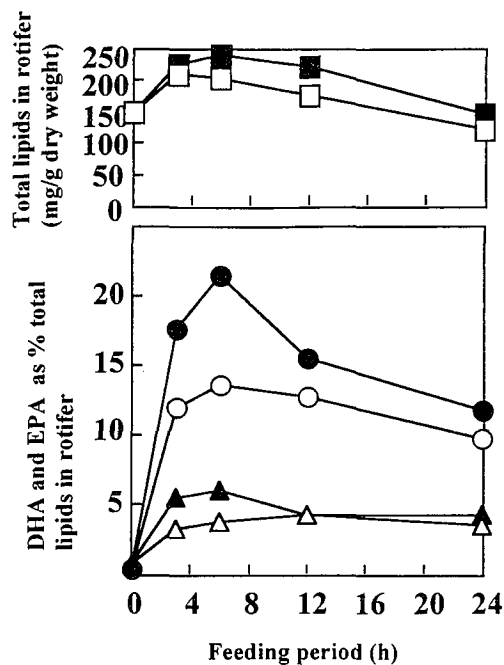


Fig. 4-1. Changes in the DHA and EPA Content in the Total Lipids of Rotifer after Feeding the DHA-enriched Yeast, *P. methanolica* HA-32.

Symbols; 1. □, Total lipids in rotifer after feeding the DHA-enriched yeast at the level of 2.7 g wet basis / 10 L culture medium; 2. ○, DHA content in rotifer lipids after feeding the DHA-enriched yeast at the level of 2.7 g wet basis / 10 L culture medium; 3. △, EPA content in rotifer after feeding the DHA-enriched yeast at the level of 2.7 g wet basis / 10 L culture medium; 4. ■, Total lipids in rotifers after feeding the DHA-enriched yeast at the level of 8.0 g wet basis / 10 L culture medium; 5. ●, DHA content in rotifer after feeding the DHA-enriched yeast at the level of 8.0 g wet basis / 10 L culture medium; 6. ▲, EPA content in rotifer after feeding the DHA-enriched yeast at the level of 8.0 g wet basis / 10 L culture medium.

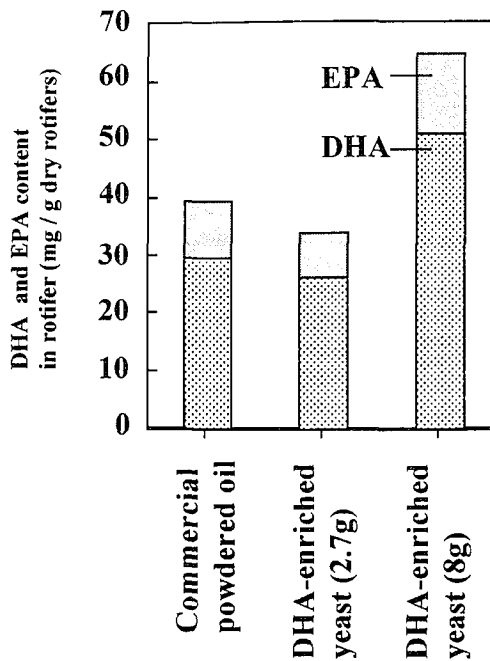


Fig. 4-2. Comparison of DHA and EPA Accumulation in Rotifer Between the Commercial Powdered Oil and DHA-enriched Yeast, *P. methanolica* HA-32.

1. The commercial powdered oil was fed to rotifer for 6 h at the level of 1.3 g per 10 L of cultivating water. 2. The DHA-enriched yeast was fed to rotifer for 6 h at the level of 2.7 g (wet basis) per 10 L of cultivating water. 3. The DHA-enriched yeast was fed to rotifer for 6 h at the level of 8.0 g (wet basis) per 10 L of cultivating water.

論文審査結果要旨

エイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) などの n-3 系高度不飽和脂肪酸は抗血管梗塞作用を初めとする特有な生理作用を有していることから、医薬品や健康機能を重視した食品に利用されている。しかし、これらの脂肪酸は膵臓リパーゼの基質となりにくいことから、脂質形態が消化管からの吸収性に影響し、エチルエステルの吸収性はトリアシルグリセロールより劣ると報告されている。また、これらの高度不飽和脂肪酸は、通常の植物油脂に含まれる多価不飽和脂肪酸よりも著しく酸化しやすいことが知られており、空気酸化されにくい食品の形態が望ましい。このように、高度不飽和脂肪酸を食品として有効利用するには、天然油脂と同じトリアシルグリセロール型が望ましいが、高度不飽和脂肪酸を含む魚油の組成は極めて複雑であり、また、高度不飽和脂肪酸含量もそれほど高くない。一方、n-3 系高度不飽和脂肪酸は、海産魚類の必須栄養成分であり、稚魚の活力や生残率を高めるために、稚魚用のワムシなどの生物餌料を強化するための高度不飽和脂肪酸含有飼料が要求されている。本研究では、これらの n-3 系高度不飽和脂肪酸を糸状菌や酵母などの微生物を用いて、有効利用しやすい形態に変換することを目的とした。

まずはじめに著者は EPA を高濃度を含むトリアシルグリセロールの生産を目的とし、EPA 添加培地を用いて土壌から採取した微生物を用いて EPA を菌体に取り込んで増殖する菌をスクリーニングした。その結果、培地に添加した遊離 EPA を効率よくトリアシルグリセロールとして菌体内に蓄積する微生物として、接合菌の 1 種、*Mucor hiemalis* を分離した。最適な培養条件では、本菌株は培地に加えた遊離 EPA の 50% を菌体内にトリアシルグリセロールとして蓄積し、EPA の純度は 60% であった。*M. hiemalis* は、多価不飽和脂肪酸とくに奇数個の二重結合を有する多価不飽和脂肪酸を優先的に取り込んだ。菌増殖、菌体脂質蓄積量も添加脂肪酸の種類に依存し、C18 酸でとくに生育がよいことを見出した。

次いで、海産魚類の稚魚養殖用の生物餌料中の DHA を強化するための飼料として、高 DHA 含有酵母を開発した。各種酵母菌株の中から、菌体に DHA を効率よく蓄積する菌株を選別した結果、*Pichia methanolica* が最も蓄積効率が優れていた。種々培養条件を検討した結果、培地にコリンを添加すると DHA の取り込みが促進され、乾燥菌体 1g 当たり 69mg の DHA が遊離脂肪酸として蓄積した。コリンの促進効果は、pH を上昇させることで培地の加熱滅菌時の褐変を促進することに依存していた。本酵母を飼料として、ワムシを培養したところ、市販の DHA 含有粉末油脂よりも効率よく DHA を強化できた。また、DHA が酵母菌体に取り込まれていることから培養海水の魚油による汚染が防げ、DHA の酸化からの保護作用が期待でき、ワムシ強化用飼料として有効と示唆された。

これらの研究結果は、適切な微生物を選抜することにより、n-3 系高度不飽和脂肪酸を高濃度を含む油脂を生産し、また、海産稚魚のための生物餌料を栄養強化する飼料を生産する新しい方法を開発すると共に、培地からの微生物による脂肪酸の選択的な取り込みに関する基礎的な知見を与えるもので、著者の研究は博士（農学）の学位を授与するに値すると判断した。