

## *In vitro*でのルーメン微生物による共役リノール酸合成

河原 聡・目 和典・新見光弘<sup>1)</sup>・川村 修<sup>1)</sup>・六車三治男

宮崎大学農学部応用生物科学科食品機能化学講座

<sup>1)</sup> 宮崎大学農学部生物環境科学科草地環境科学講座

(2007年1月26日 受理)

## *In vitro* synthesis of conjugated linoleic acids by rumen bacteria

Satoshi KAWAHARA, Kazunori SAKKA, Mitsuhiro NIIMI<sup>1)</sup>, Osamu KAWAMURA<sup>1)</sup>,  
Michio MUGURUMA

Division of Food Science and Nutrition, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki

<sup>1)</sup> Division of Grassland Science, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki

**Summary :** The objective of this study was to develop a method for selective preparation of *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid (c9, t11 CLA) by use of rumen bacterial culture. Rumen bacteria cultured in a medium containing sodium linoleate or free linoleate as a precursor at 38 °C for 3 hours successfully produced c9, t11 CLA in the culture medium. On the other hand, trilinoleate was not satisfactory precursor for c9, t11 CLA preparation by rumen bacteria. A small amount of *trans*-10, *cis*-12 CLA (t10, c12 CLA) was also produced by the culture. Although c9, t11 CLA produced was gradually saturated to *trans*-vaccenic acid (t-vaccenic acid), t10, c12 CLA remained increasing. These results suggest that *cis*-9 double bond of c9, t11 CLA might be saturated by  $\Delta^9$ -saturase expressed on rumen bacteria. For selective production of c9, t11 CLA, pH of culture medium was important. When rumen bacteria cultured in acidic pH conditions (from pH 6.0 to 7.0), t10, c12 isomer was predominantly produced, whereas c9, t11 isomer was preferentially produced in high pH conditions (i.e., pH 7.5 to 8.0). In addition, large amount of t-vaccenic acid was produced in low pH conditions. Therefore, acceleration of saturation of the CLA by rumen bacteria in lower pH might cause the lower yield of c9, t11 CLA. The present results suggest that the c9, t11 CLA production by use of rumen bacteria requires satisfactory precursors and regulating saturation of c9, t11 CLA.

**Key words :** Conjugated linoleic acid, Linoleic acid, pH, Rumen bacteria, Saturation.

### 緒 言

共役リノール酸 (conjugated linoleic acid, CLA) は抗がん作用 (Ip *et al.* 1995) や成長促進作用 (Dugan *et al.* 1997), あるいは体脂肪率低下作用 (West *et al.* 1998) を有することで注目されている機能性脂肪酸である。CLAは反芻家畜の第一胃 (ルーメン) 内に存在する微生物に

より生合成されることが知られている (Kepler & Tove 1967)。そのことを反映して、牛肉、牛乳、およびそれらの加工食品は比較的多量のCLAを含有しており (Chin *et al.* 1992), これらの食品はCLAの天然の摂取源と考えられている。これまで、健康に対するマイナスイメージばかりが強調されてきた動物性脂肪、とくに牛肉脂

質にとって、CLAが有する様々な生理機能の解明は動物性脂肪に新たな付加価値を与える材料であると見なされている (Dhiman *et al.* 1999).

一方、米国においては、CLAは栄養補助食品として市販されており、その市場規模は年々大きくなっている。このようなサプリメント剤として流通しているCLAはアルカリ異性化反応を用いて化学合成されている (河原他 2004)。アルカリ異性化反応により化学合成したCLAの場合、主要なCLA異性体である *cis*-9, *trans*-11異性体 (c9, t11 CLA) および *trans*-10, *cis*-12異性体 (t10, c12 CLA) がほぼ同じ割合で生成する。

近年、共役リノール酸研究の進展にともない、CLA異性体ごとにその生理作用が異なっているということが明らかになってきた。すなわち、t10, c12異性体は体脂肪率低下作用や免疫系活性化作用を有しており、抗がん作用や成長促進作用はc9, t11異性体およびt10, c12異性体の何れもが有している生理作用である (Banni *et al.* 2002)。一方で、天然には僅かしか存在せず、ヒトの食経験が乏しいt10, c12 CLAには何らかの副作用があることも懸念されており (Larsen *et al.* 2003)。それ故、化学合成したCLA からc9, t11異性体およびt10, c12異性体を効率良く分離する、あるいはそれぞれを選択的に合成する技術の開発が求められている。

先にも述べたとおり、反芻家畜由来の脂肪に含まれているCLAの大半はc9, t11異性体であることが知られている。これは、反芻家畜脂肪中のCLAがルーメン微生物により生合成されたものであることに起因していると推測される。そこで、ルーメンに生息する微生物を利用してc9, t11 CLAを選択的に合成する技術を開発することを目標として、本研究を実施した。

#### 材料および方法

##### ルーメン微生物の採取および培養

アルファルファ・ヘイキューブを給餌したフィストラ装着ヤギ (オス, 10歳) よりルーメン液を採取した。3層ガーゼでろ過することでルーメン液中の固形物を除去し、Tilley & Terry (1963)の方法に準じてルーメン微生物の培養を行った。培養液には、CLAの前駆脂肪酸であるリノール酸を遊離リノール酸、リノール酸ナトリウム、あ

るいはトリグリセリドとして培養チューブあたり5 mg添加した。また、培養液のpHは終濃度100 mMのリン酸緩衝液により調整した。窒素ガス通気下、38 °Cで一定時間培養した後、培養液を回収し、直ちに脂肪酸抽出に供した。

##### 脂肪酸抽出および脂肪酸分析

培養上清からの総脂質の抽出はBligh & Dyer (1959)の方法に準じて行った。抽出した総脂質中の脂質含量を重量法により測定した後、Takenoyamaら (1999)の方法に準じて脂肪酸メチルエステルの調製を行い、Supelcowax-10™ (0.32 mmφ × 60 m, 0.25 μm film thickness)を装着したキャピラリー・ガスクロマトグラフィ (島津GC-17A)による分析に供した。脂肪酸の定量はトリコサン酸 (C23:0)を用いた内部標準法により行った。

##### 結果および考察

リノール酸ナトリウムを添加した培養液中でルーメン微生物を最長3時間まで培養した結果、培養開始時からリノール酸は経時的に減少し、CLAが生成した (図1)。CLAの生成は培養開始後2時間まで増加したが、培養開始から3時間後にはわずかに減少する傾向を示した。生成したCLAにはc9, t11異性体のみでなく、t10, c12異性体も含まれていたが、c9, t11 CLAの生成量はt10, c12 CLAのそれより5倍以上多かった。Kepler & Tove

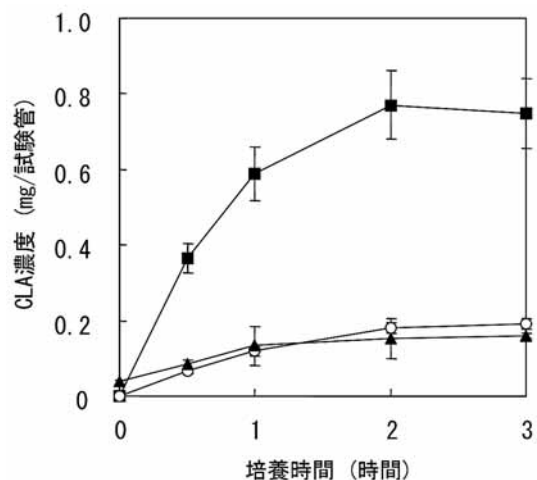


図1. リノール酸ナトリウムを含有する培地中で培養したルーメン微生物によるCLAの生成

■—c9, t11 CLA, ○—t10, c12 CLA, ▲—other CLAs

(1967) は、ヒツジのルーメンから採取したセルロース分解菌である *Buthyrvibrio fibrisolvents* 菌体から linoleate <sup>12</sup>-*cis*, <sup>11</sup>-*trans*-isomerase を初めて単離・精製した。その後、*B. fibrisolvents* 以外にも linoleate <sup>12</sup>-*cis*, <sup>11</sup>-*trans*-isomerase を生合成するルーメン微生物が数種類存在することが報告されている (Kemp *et al.* 1984)。本研究において、リノール酸から c9, t11 CLA を生成した細菌の菌種は不明であるものの、ヤギルーメン内にも linoleate <sup>12</sup>-*cis*, <sup>11</sup>-*trans*-isomerase を発現する細菌が棲息していることが示された。また、僅かではあるものの t10, c12 CLA が生成した事実から、linoleate <sup>12</sup>-*cis*, <sup>11</sup>-*trans*-isomerase による異性化が 12 位の二重結合のみでなく 9 位の二重結合にも作用し <sup>9</sup>-*cis* の二重結合を <sup>10</sup>-*trans* に異性化する、あるいは、ヤギルーメン内には linoleate <sup>9</sup>-*cis*, <sup>10</sup>-*trans*-isomerase をもつ微生物が存在することが示唆された。

また、培養時間が延長するのに伴い、*trans*-バクセン酸 (*trans*-7-octadecenoic acid) の増加も観察された (図 2)。バクセン酸の生成量は c9, t11 CLA の生成に伴い増加したことから、c9, t11 CLA の *cis*-9 位の二重結合が飽和化されたものであると考えられた。このことから、ルーメン微生物の培養中に生成した正味の c9, t11 CLA 生成量は更に多くなると考えられたが、培養液中で CLA の飽和化が同時に進行するため、その収量は限定されると考えられた。それ故、c9, t11 CLA

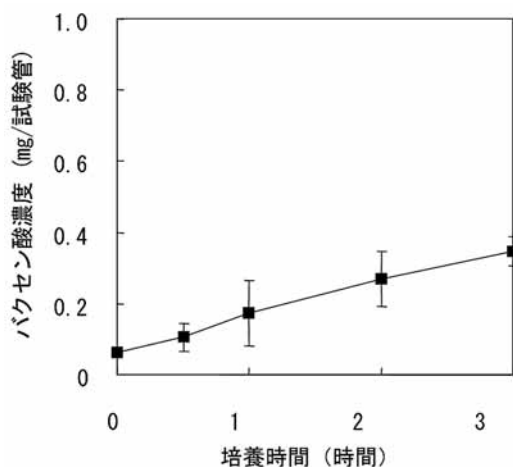


図 2. リノール酸ナトリウムを含有する培地中で培養したルーメン微生物によるバクセン酸の生成

の収量を上げるためには、生成した c9, t11 CLA の飽和化反応を抑制することが重要であると推測された。

CLA の前駆脂肪酸であるリノール酸を遊離脂肪酸あるいはトリグリセリドとして培養液に添加した場合、トリグリセリドよりも遊離脂肪酸の方が CLA の生成量が多くなった (図 3)。しかしながら、遊離リノール酸からの CLA の生成量はナトリウム塩の場合の 1/3 程度にとどまった。このことは、リノール酸の水溶性が高まることで、ルーメン微生物の linoleate <sup>12</sup>-*cis*, <sup>11</sup>-*trans*-isomerase とリノール酸が酵素-基質複合体を形成しやすくなったことに起因しているものと考えられた。

リノール酸ナトリウムの共存下、弱酸性から弱アルカリ性まで pH を調整した培養液中でルーメン微生物を培養すると、細菌により生合成された CLA の量に特徴的な変化が認められた (図 4)。すなわち、pH 6.5 から pH 7.0 の弱酸性域あるいは中性域では主に t10, c12 CLA が生成したのに

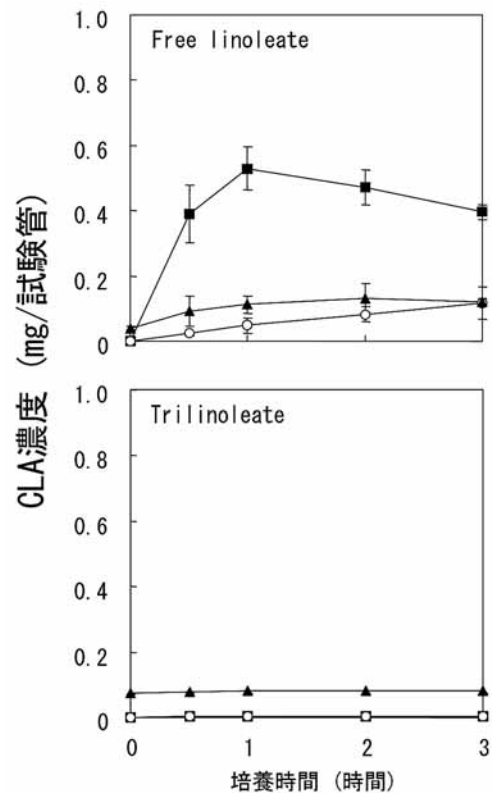


図 3. 遊離リノール酸およびトリリノール酸を含む培地中で培養したルーメン微生物による CLA の生成

■— c9, t11 CLA, ○— t10, c12 CLA, ▲— other CLAs

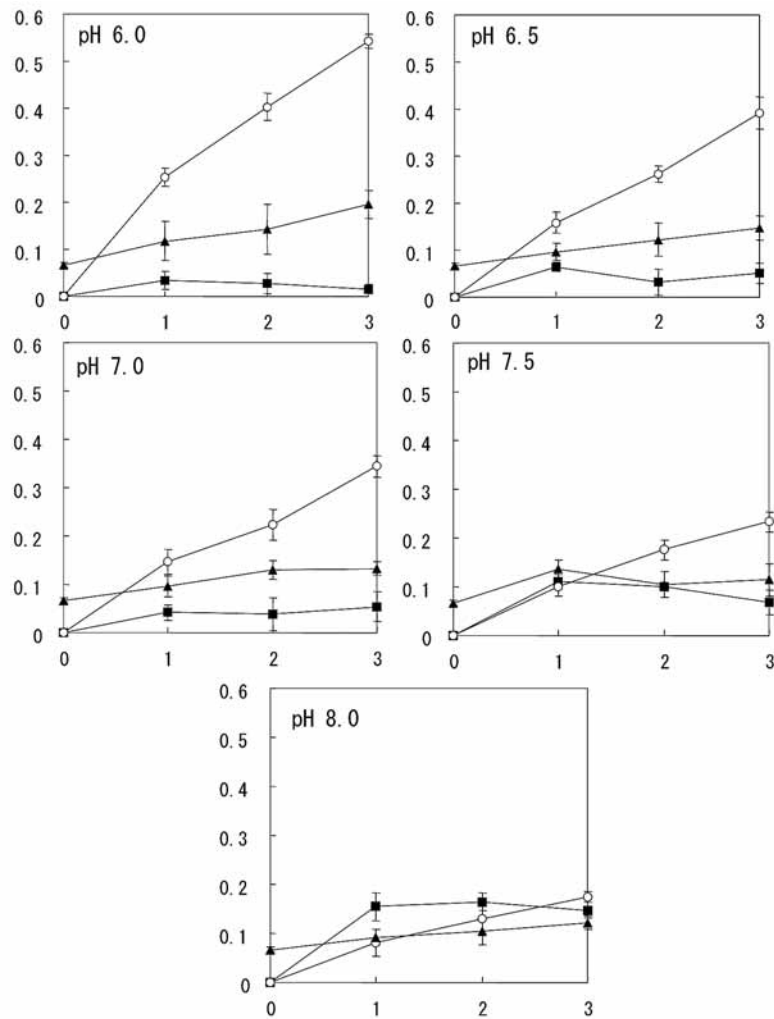


図4. ルーメン微生物によるCLA生成に及ぼす培養液pHの影響. 全ての図において縦軸はCLA濃度 (mg/試験管),

■— c9, t11 CLA, ○— t10, c12 CLA, ▲— other CLAs

対し, pH 7.5からpH 8.0の弱アルカリ性域ではc9, t11 CLAが優勢に生成した. Linoleate<sup>12</sup>-*cis*,<sup>11</sup>-*trans*-isomerase標品の至適pHは7.0~7.2と報告されている (Kepler & Tove 1967). このことから, ルーメン微生物によるc9, t11 CLA合成量の多少は必ずしも異性化酵素の至適pHに依存してはいないということが示唆された.

興味深いことに, 酸性条件下において, ルーメン微生物は多量のt10, c12 CLAを生成した. このt10, c12 CLA生成量の圧倒的な増大から, 弱酸性域に至適pHを持つlinoleate<sup>9</sup>-*cis*,<sup>10</sup>-*trans*-isomeraseが存在することが示唆された. 一方で, 牛肉脂肪や牛乳脂肪中に検出されるCLAの大半はc9, t11 CLAであることが報告されている (Takenoyama *et al.* 2001). このことは, 反芻

動物の消化管から吸収されたc9, t11 CLAは脂肪組織や乳中に移行するのに対し, t10, c12 CLAは動物体内で何らかの代謝を受け, 少なくともt10, c12 CLAとしては組織中に蓄積しにくいことを示唆している.

培養液のpHが弱酸性域のとき, *trans*-バクセン酸の生成量が多くなる傾向が観察された (図5). このことから, 弱酸性条件下ではc9, t11 CLAの飽和化が促進され, リノール酸から生成したc9, t11 CLAが速やかに*trans*-バクセン酸に還元されるものと推察された. 現在のところ, この反応に関与する微生物起源の飽和化酵素 (<sup>9</sup>-saturase)に関する知見はほとんどないが, おそらく弱酸性域に至適pHを持つ酵素であることが推測された. このことから, 培養ルーメン微生物によるCLA

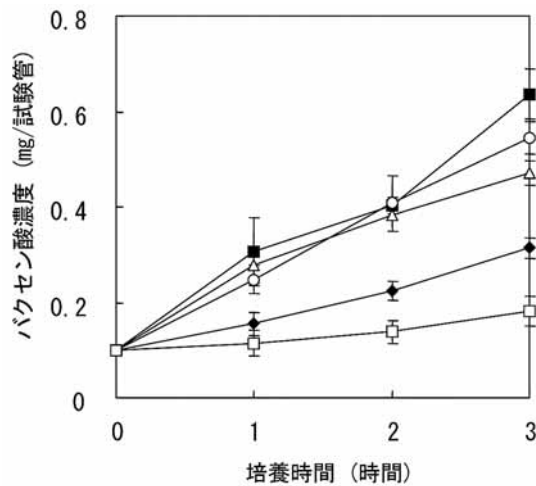


図5. ルーメン微生物によるバクセン酸生成に及ぼす培養液pHの影響

—■— pH 6.0, —○— pH 6.5, —△— pH 7.0, —◆— pH 7.5, —□— pH 8.0.

合成においては、CLAの飽和化反応を抑制することが重要であるということが確認された。

以上の結果より、ルーメン微生物を用いたc9, t11 CLA合成量はCLAの合成速度とCLAの飽和化速度という2つの因子により左右され、その両者のバランスにより収量が影響されることが示唆された。CLAの合成および飽和化には培養液のpHが大きく関与することが推測され、c9, t11 CLAの飽和化は弱酸性条件下において促進されるものと考えられた。また、ルーメン微生物によりt10, c12異性体も生合成されることが確認されたことから、これらCLA異性体を選択的に合成できる可能性も示された。さらに、これらの結果は食肉生産において、反芻家畜の飼養形態や飼料構成を最適化することにより、CLAを多量に含有する乳や肉を生産する可能性を暗示するものである。今後、一層の検討を行い、研究成果の幅広い応用を図りたい。

## 要約

ルーメン内微生物によるc9, t11 CLAの選択的調製法を確立するための基礎的研究を行った。ヤギ第一胃より採取したルーメン微生物を種々の化学構造を有するリノール酸と共に培養したところ、リノール酸ナトリウムおよび遊離リノール酸を添加した場合に、c9, t11 CLAが生成した。また、同時にt10, c12 CLAも生成することが示された。

弱酸性から中性pHの培地中ではc9, t11 CLAの飽和化反応が促進されたため、c9, t11 CLAの収量は減少した。一方、弱アルカリ性培地ではc9, t11 CLAの生成量が増加した。ルーメン微生物によるCLA合成には添加する前駆脂肪酸の化学構造が重要であり、また、培養液のpHを最適化することにより生成したCLAの飽和化を抑制することが重要であることが示唆された。

キーワード：共役リノール酸, 飽和化, リノール酸, ルーメン微生物, pH.

## 引用文献

- Banni, S., E. Murru, E. Angioni, G. Carta, M. P. Melis (2002) Conjugated linoleic acid (CLA): good for everything? *Sci. Aliments* **22**, 371-380.
- Bligh, E. G., W. J. Dyer (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911-917.
- Chin, S.F., W. Liu, J.M. Storkson, Y.L. Ha, M.W. Pariza (1992) Dietary sources of conjugated dienoic isomer of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J. Food Comp. Anal.* **5**, 185-197.
- Dhiman, T.R., E.D. Helmink, D.J. McMahon, R.L. Fife, M.W. Pariza (1999) Conjugated linoleic acid content of milk and cheese from cows fed extruded oil seeds. *J. Dairy Sci.* **82**, 412-419.
- Dugan, M.E.R., J.L. Aalhus, A.L. Schaefer, J.K.G. Kramaer (1997) The effect of conjugated linoleic acid on fat to lean repartitioning and feed conversion in pigs. *Can. J. Anim. Sci.* **77**, 723-725.
- Ip, C., J.A. Scimeca, H. Thomson (1995) Effect of time and duration of dietary conjugated linoleic acid on mammary cancer prevention. *Nutr. Cancer* **24**, 241-247.
- 河原 聡・田丸静香・窄野昌信・福田亘博・池田郁男 (2004) 共役リノール酸の食品中の含量と生理機能. *栄養学雑誌*, **62**, 1-7.
- Kemp, P., D.J. Linder, R.T. Holman (1984) The hydrogenation of the series of methylene-interrupted *cis, cis*-octadecadienoic acids by pure cultures of six rumen bacteria. *Br. J. Nutr.* **52**, 171-177.

- Kepler, C. R., K. P. Hirons, J. J. McNeill, S. B. Tove (1967) Biohydrogenation of unsaturated fatty acids . Purification and properties of a linoleate <sup>12</sup>-*cis*, <sup>11</sup>-*trans*-isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.* **242**, 5686-5692.
- Larsen, T.M., S. Toubro, A. Astrup (2003) Efficacy and safety of dietary supplements containing CLA for the treatment of obesity : evidence from animal and human studies. *J. Lipid Res.* **44**, 2234-2241.
- Takenoyama, S., S. Kawahara, H. Murata, K. Yamauchi (1999) Investigation of some preparation procedures of fatty acid methyl esters for capillary gas-liquid chromatographic analysis of conjugated linoleic acid in meat. *Anim. Sci. J.* **70**, 336-342.
- Takenoyama, S., S. Kawahara, M. Muguruma, H. Murata, K. Yamauchi (2001) Studies on the 9 *cis*, 11 *trans* conjugated linoleic acid contents of meats and dairy products. *Anim. Sci. J.* **72**, 63-71.
- Tilley, J.M.A., R.A. Terry (1963) A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J. Brit. Grassl. Soc.* **18**, 104-111.
- West, D.B., J.P. Delany, P.M. Camet, F. A.A. Truett, J. Scimeca (1998) Effect of conjugated linoleic acid on body fat and energy metabolism in the mouse. *Am. J. Physiol.* **275**, R667-672.