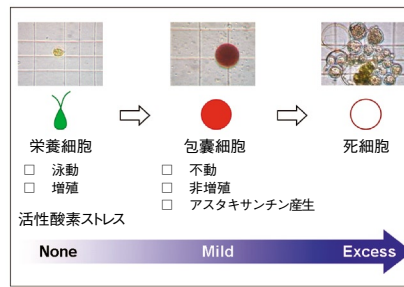


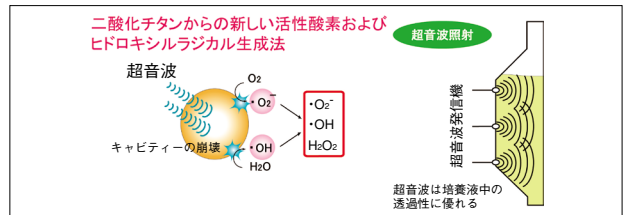
## 生活習慣病予防に効果のある機能性バイオプロダクトを効率よく生産。 微細藻類に適度なストレスを負荷して生産を促す。

藻類や植物の細胞が活性酸素ストレスに対する防御手段として産生する天然抗酸化物質を効率的に工業生産するため、細胞へ適度な活性酸素ストレスを簡便に負荷する手法を開発しました。二酸化チタン触媒と超音波を利用するこの手法により、近年、高い抗酸化作用からサプリメントとして注目されるアスタキサンチンの生産量が速度で約30%、収量が約10%向上することを実証しました。

- 機能性バイオプロダクトの工業的スケールにおける効率的な生産に向け、適切かつ簡便に活性酸素ストレスを負荷し、細胞生理を制御する技術です。
- 細胞の生理的变化を誘発する生育環境の変化が、一方では所望の生成経路を抑制するといった、従来あった問題点を解決します。



◀ 微細藻ヘマトコッカス・プルビアリスの形態変化。ヘマトコッカスは栄養細胞のとき増殖し、包囊細胞となりアスタキサンチンを生産ようになります。この生理的变化は活性酸素ストレスに起因するが、過度のストレスは細胞死に至らしめます。適切なレベルの活性酸素ストレス負荷はこうした生理的变化を効率的に誘導します。



▲ 活性酸素種 (ROS) の生成法。超音波が水中の二酸化チタン粒子中を透過する際に超音波音圧と水蒸気圧の差により、粒子後方に生じる空洞 (キャビティー) が崩壊すると、熱エネルギーが放出され、水の熱分解によりヒドロキシルラジカル等の活性酸素種が生成します。超音波は藻類や植物の細胞懸濁液を低損失で透過するため、装置の大型化が容易です。

ンチン生産量が向上することが示されました。

さらに、二酸化チタン—超音波励起法における活性酸素種生成は、二酸化チタンと水媒体との回液界面に起因し、その表面積に比例するが、水媒体中を伝播する超音波と二酸化チタンを伝播する超音波との間に生じる位相差のために活性酸素種生成を抑制するということが分かりました。そこで、二酸化チタンの表面積を大きくとり、かつ活性酸素種生成の抑制を回避すべく、二酸化チタン充填物に微細格子 (ハニカム) 構造を付与し、その空隙方向に超音波を照射することで、位相差を生じさせないようにする方式を開発しました。

### ブレイクスルーへの道のり

**2002年**：天然抗酸化物質への関心の高まりを受け、ヘマトコッカスの光培養に青色LEDを利用したアスタキサンチン生産の研究を開始。その一方、研究分担者の清水・萩野により、水中の二酸化チタンに超音波を照射すると、活性酸素種が生成することが見出される。これらに基づき、平成14年度産業技術研究助成事業に応募するが、機能性バイオプロダクト生産の効率化に活性酸素ストレス負荷がどのように役立つのかが不明瞭との指摘を受け、不採択となる。

**2003年**：細胞の至適生育条件を保ったまま生理的变化を直接制御することが、アスタキサンチンのような二次代謝産物の誘導生産において効率化のカギとなることを示す実験結果を得て、本研究のコンセプトを着想。

**2004年**：平成16年度産業技術研究助成事業に応募するが、二酸化チタン—超音波励起法に関して確証が不足しているとの指摘を受け、不採択。

**2005年**：二酸化チタン—超音波励起法の実験データを集積するとともに、合目的な分担テーマとそれを分担するのにふさわしい参画者を要請し、平成17年度第1回産業技術研究助成事業に応募し、採択される。しかし、細胞に与えるダメージが少ないと予測していた高周波超音波は、微細藻類に強力すぎるということが分かり、壁にぶつかる。

**2006年**：エネルギー密度が低いため効果が薄いのではと考えていた低周波超音波で試みたところ、細胞へのダメージの問題をクリアするだけでなく、抗酸化物質生産も高周波超音波と同程度、促進できることが分かった。さらに、超音波照射下でのヒドロキシルラジカル生成が触媒表面性状に依存することが分かり、表面性状を改善・最適化した結果、ヒドロキシルラジカル等の活性酸素種を効率的に生成する二酸化チタン触媒が得られた。

**2007年**：本研究のコンセプトに関し特許出願する

### 競合技術への強み

	目的物質の生成環境	アスタキサンチン生産速度	最終アスタキサンチン生産量
自発的誘導法 (従来法)	× 生理的变化を得るため、栄養源が枯渇	△ (0.118 μg mL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) 生産期間7日間	△ (12.2 μg mL <sup>-1</sup> ) 細胞密度: 8×10 <sup>5</sup> cells mL <sup>-1</sup>
TiO <sub>2</sub> 超音波照射法 (本技術)	○ 活性酸素ストレスにより生理的变化を促すことで、栄養源は枯渇しない	○ (0.153 μg mL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) 約1.3倍 生産期間を1-2日短縮	○ (13.5 μg mL <sup>-1</sup> ) 約1.1倍 同細胞密度で高含有率の細胞を取得

▲ 従来法と本技術の生成環境、および生産性の違い

① 簡便性：超音波は強弱の調節を容易に行うことができるため、本二酸化チタン—超音波励起法は、活性酸素ストレスの負荷による細胞生理の制御を簡便に行えます。

② 大型化が容易：超音波は細胞懸濁液中を低損失で透過できるため、機能性バイオプロダクトの生産装置を大型化するのも容易です。

③ 効率化が可能：二酸化チタン—超音波励起法の応用による機能性バイオプロダクト生産の効率化に役立ちます。

### ここがポイント

カテノイドやポリフェノール、アスタキサンチンなどの天然抗酸化物質は、生活習慣病予防に効果があるとして注目されていますが、こうした機能性バイオプロダクトは、元来、活性酸素ストレスへの防御手段として産出される物質であり、逆にこの点を利用して、天然抗酸化物質を生産する微細藻類に適度な活性酸素ストレスを負荷することで抗酸化物質の生産を促進することができます。本研究では、二酸化チタン—超音波励起法の応用による微細藻類のヘマトコッカスにおけるアスタキサンチンの効率的誘導生産を目的とし、二酸化チタンを添加した培養液への超音波照射がヘマトコッカスの細胞生存率と活性酸素種生成に及ぼす影響を明らかにしました。

周波数42kHzと1MHzの超音波を照射する実験では、42kHzの超音波で照射音圧4.7kPaとしたとき20分間90%以上の細胞生存率を維持し、1MHz超音波では、数秒で細胞生存率が10%以下になるという結果を得ました。また、42kHz超音波では、超音波音圧に比例してヒドロキシルラジカル、ならびに過酸化水素といった活性酸素種の生成が増大することが分かりました。さらに、42kHz超音波照射下では、二酸化チタン添加量を増加すると活性酸素種生成が促進するが1MHz超音波照射下では抑制されること、および活性酸素種生成は二酸化チタンの表面積に依存することが分かりました。これらの結果から、42kHz、4.7kPaの超音波を15分程度照射するのが最も好適であり、ヘマトコッカスのアスタキサ

とともに、工業的規模の設備に応用可能な構造をもつ活性酸素ストレス負荷装置を設計・製作し、実業への応用を視野に入れて研究開発を推進。

### ■ サクセス・キー

バイオプロセス工学者を中心に、超音波化学、光触媒反応工学といった専門分野を異にする研究者が、各々独自に開発または発見した研究成果をもとに、それぞれブラッシュアップし、最終目標としての新規バイオ生産技術の開発に協力して取り組んだことが一番の成功の要因です。また、二酸化チタン触媒の製作に、連携していた日下部機械 (株) の技術者の支援を受けられたことも大きな要因として挙げられます。

### ■ ネクスト・ストーリー

微細藻類による機能性バイオプロダクト生産は、これまではほとんど海外で行われていましたが、最近になって、国内で屋内型の培養設備によりヘマトコッカス細胞を集約的に培養し、アスタキサンチンを商業的に生産する企業が現れています。生活習慣病予防への関心の高まりを背景に、アスタキサンチン等機能性バイオプロダクトの国内生産に取り組む企業は増えていくものと思われます。今後、このような二酸化チタン—超音波励起法を応用した活性酸素ストレス負荷による細胞生理の制御技術の実用化に向け、企業・研究機関と本技術のライセンス供与を含めて意見交換を行う予定です。



プロジェクトID・研究テーマ名・年度

05A33020a 「活性酸素ストレスによる細胞生理の制御に基づいた機能性バイオプロダクト生産技術の開発」(平成17年度第1回公募)

代表研究者・所属機関・所属部署名・役職名

勝田 知尚 神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻 助教