

アスタキサンチンの微生物合成

東京研究所 バイオ・有機分野

今泉 暢
井出 輝彦
半澤 敏

1. はじめに

アスタキサンチン（図1、Axと略記する）はカロテノイドと呼ばれる一連の化合物の一種であり、オキアミ、カニ、エビなどの甲殻類やマダイ、サケ、マスなどの魚類、フラミンゴなどの鳥類の体色の元となる橙色から赤色の色素である。魚類や鳥類はAxを生合成することができず、藻類や微生物が生産したAxを食物連鎖により獲得するが、マダイやサケ類の養殖では通常の飼料では十分なAxを供給できないため飼料にAxが添加される。近年の世界的な魚類の消費需要増加とあいまって、Axの市場は年率5~7%の成長を続けており、2004年には約250億円に達した。またAxには抗酸化活性や抗癌活性などが確認され、医薬品や健康補助食品としての利用も広がっている。

飼料用途では主に化学合成品が流通しているが、消費者の自然志向等により天然物由来Axへの要求が高まっている。天然Axの供給源としてはオキアミ、赤色酵母（*Phaffia rhodozyma*）、藻類（*Hematococcus pluvialis*）などが知られている。しかしながら、い

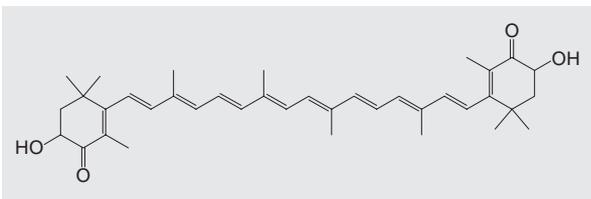


図1 アスタキサンチンの化学構造式

れも重量当りのAx含量が低いことや細胞壁が強固なために菌体のまま投与すると十分な色揚げ効率が得られないため抽出に複雑な工程を要するなどの問題があり、化学合成法に対してコスト競争力に劣るのが現状である。

我々は新たな天然Axの供給源として海洋バイオテクノロジー研究所の発見したAx生産性海洋細菌に注目した。¹⁾表1に赤色酵母や藻類との比較を示した。海洋細菌は酵母や藻類と比較して増殖が速い。また細胞壁が脆弱なため、Axを抽出せずに菌体のまま投与しても十分な色揚げ効果が得られるものと予想された。すなわち、海洋細菌による製造法を構築することで化学合成法に対してもコスト競争力があり、かつ安全性に優れた製品及び製造方法を提供できるものと考え、本技術の開発に着手した。

本稿では我々が開発した海洋細菌の培養によるAx製造法と製品の機能評価の結果を紹介する。

2. 製造方法

[1] 製造方法の特徴

我々が開発した製造方法の特徴は、生産性の高い改良菌株、菌体の高密度培養法、簡単な回収工程、の三点である。以下、これらを紹介する。

[2] 菌 株

海洋細菌*Paracoccus* sp. N81106株は海洋バイオテクノロジー研究所により世界で初めて発見されたAx生

表1 微生物によるAx生産法の比較

	増殖速度	細胞壁	他の色素	Ax蓄積量
海洋細菌 (N-81106)	速い ($\mu_{max} > 0.3h^{-1}$)	脆弱	なし	低 (0.1%)
海洋細菌 (当社変異株)	速い ($\mu_{max} > 0.3h^{-1}$)	脆弱	なし	高 (0.7~1.2%)
<i>Phaffia</i> 酵母	比較的遅い ²⁾ ($\mu_{max} \approx 0.2h^{-1}$)	強固	なし	中 (約0.5wt%)
<i>Haematococcus</i> 藻	遅い ($\mu_{max} < 0.03h^{-1}$)	強固	クロロフィル	特に高 (>3wt%)

産性の細菌である。¹⁾本細菌は細胞内にAxを蓄積するが、菌体単位重量当りAxの量は0.05重量%程度であり、既存の赤色酵母に比べて1/5程度の含量のもだった(表1)。そこで我々は菌株を改良し、菌体当りのAx蓄積量向上を試みた。近年は遺伝子組換えによる菌株改良技術が進歩しているが、遺伝子組換え体(GMO)を利用するためには、煩雑な許認可が必要である上に消費者のアクセプタンスに対するリスクがある。そこで我々は変異育種法による改良を主に進めた。

変異育種法とは紫外線や化学物質により微生物のDNAを損傷させ、それを微生物が修復する際に生じるエラーにより、性質を変化させる方法である。この方法は $10^8 \sim 10^{10}$ 個以上の細胞のDNAにランダムに変異を生じさせ、その中から目的の性質を持った微生物細胞を選別する方法である。この技術では 10^8 個以上もの多様な変異体の中にわずかに存在する目的の変異体を見付け出すスクリーニングの効率が要となる。我々はAx生産および生育が阻害される条件でも強い赤色を呈する細菌コロニーを選別することで生産性の向上した変異体を選別できることを見出し、最終的にAx蓄積量がN81106株の10倍に向上した変異体を得ることに成功した。^{3) 4)}

[3] 高密度培養法

(1) 高密度培養法の概要

Axの製造は上記の菌株を発酵槽の中で増殖させて大量に増やしたのちに、その菌体を回収・乾燥する工程よりなる(図3)。この乾燥菌体が製品である。培養工程において菌を大量に増やすために重要な因子は培養液中の1) 培地組成、2) 温度、3) pH、4) 酸素供給量等である。これらの制御が十分でない場合は菌体収量が数g~数10g/Lに留まるが、我々はこれらを厳密に制御することで菌体収量が100g/L前後に達する高密度培養の条件を確立した。発酵槽の概略を図4に示す。本培養技術において特に重要な因子であった酸

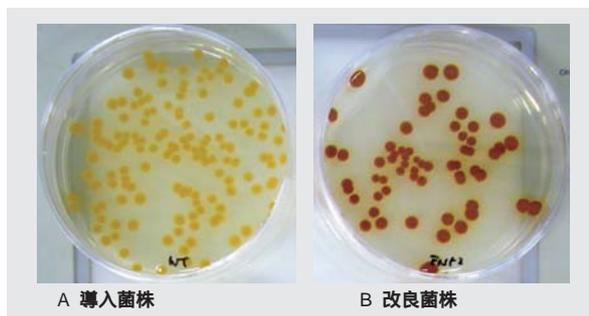


図2 アスタキサンチン生産性菌の平板培地上のコロニー外観

素供給量制御技術と栄養源濃度の制御技術を簡単に紹介する。

(2) 酸素濃度

Ax生産菌の増殖には酸素が必要だが、酸素が過剰に存在すると増殖が阻害される。⁵⁾また酸素が過剰であるとAx前駆体であるアドニキサンチンの段階で反応が停止してしまい、不足した場合には別の前駆体であるカンタキサンチンやフェニコキサンチンの段階で反応が停止してしまうことが知られていた。⁶⁾

本菌の酸素要求性を詳細に調べると、培養初期には十分な酸素濃度が必要だが、培養中期から後期にかけては溶存酸素濃度(DO)0.1ppm付近で過不足なく制御する必要があった。しかしながら通常のDO電極は0.1ppm付近に検出下限があり、その測定値を元に酸素供給量を制御する方法では適切な制御が出来なかった。この様な場合の制御方法として酸化還元電位(ORP)からDOを推定する方法が知られているが、本菌の培養では培地成分消費に由来するORP変化が大きく、この方法も適用出来なかった。我々は発酵排ガス中の酸素分圧に着目し、これを指標として酸素供給量を制御することにより最適条件を見出すことに成功した。その際に、酸素供給速度(Oxygen Transfer Rate、以下OTRとする)と呼ばれるパラメーターを指

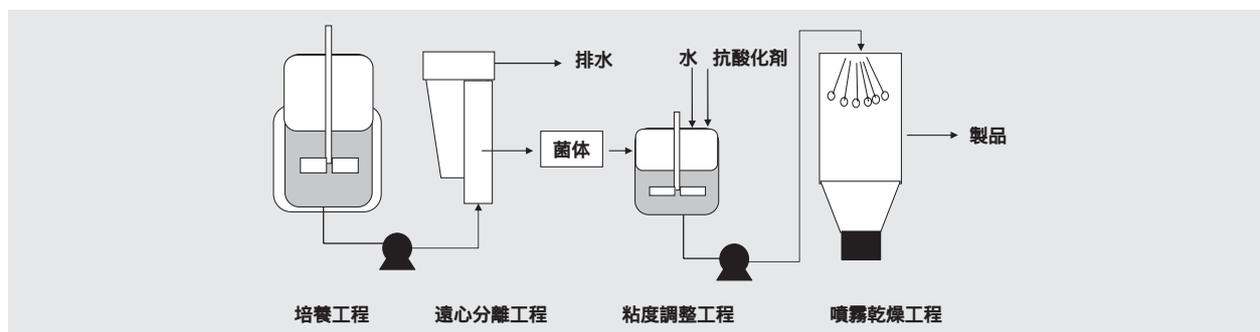


図3 製造工程概要

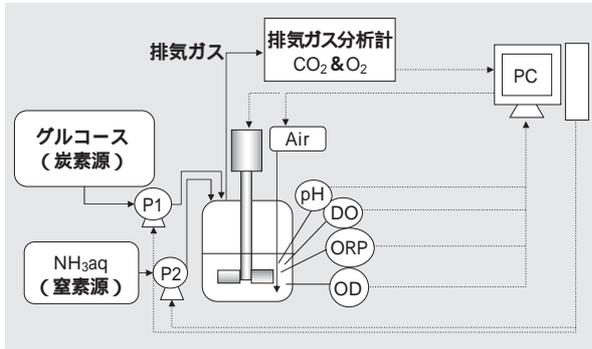


図4 培養装置概観
図中の実線は物質の移動、点線は信号の流れを示す。

標とする。OTRは排気ガス分析の結果より以下の式1により算出される。⁷⁾

$$OTR = \frac{7.32 \times 10^5}{V_L} (Q_i P_i y_i / T_i - Q_o P_o y_o / T_o) \dots \text{式1)}$$

式中、Qは通気量(L/h) Pは圧力(atm) Tは気体温度(K) yは気体中の酸素のモル分率、V_Lは培養液量(L)を示す。定数は単位を(mol/L・min)に変換するための係数である。また、各因子に下付のiおよびoはそれぞれ給気側および排気側の因子であることを示す。

一般的には培養液単位容量当りの移動速度係数である酸素移動容量係数(以下k_Laと略記する)を制御値として使用する。OTRとk_Laには式2のような相関がある。

$$k_{L}a = OTR / (C^* - C_L) \dots \text{式2)}$$

式中、C*は供給ガス(空気)と平衡な培養液中の溶存酸素濃度であり、C_Lは実際の溶存酸素濃度である。また、通気攪拌培養では、k_Laと攪拌回転数の間に相関性があり、式3により近似することが出来る。

$$k_{L}a = \dots \times \exp(r \times \dots) \dots \text{式3)}$$

式中、rは攪拌速度を示し、およびはrとk_Laの測定値から最小二乗法で求められる相関係数である。

この式に基づき、空気を一定速度で通気しつつ、k_La値を指標として培養液の攪拌速度の調節で酸素供給量を制御し、酸素を過不足なく供給することが出来た。さらに、この方法によって酸素供給量が一般化され、容量や製造元が異なる培養装置の間でも再現性を得ることが可能となった。⁵⁾

(3) 栄養源濃度制御

微生物の培養に用いられる培地はグルコースやシヨ糖等の炭素源、アンモニウムイオンやペプチド等の窒

素源、リン酸塩およびその他のミネラル(無機塩)類より構成される。菌はこれらを栄養源として消費して増殖しながらAxを生産する。これらのうち、炭素源と窒素源は大量に必要だが、必要量を培養開始時に投入すると増殖もAx生産も阻害される。そこで、これらを微生物による消費速度に合わせて追加して最適濃度に維持しながら培養する。これを流加培養という。⁷⁾本菌の培養では炭素源としてはグルコースを、窒素源としてはアンモニア水を選択した。予備実験の結果ではアンモニアは2g/L、グルコースは20g/L以上で増殖速度を低下させたため、制御目標をそれぞれ0.5g/L及び5g/Lに設定して検討を開始した。消費速度は菌体量の増加や代謝状態の変化に伴って大きく変化するため、これらを適切に流加するためには両者の消費量を培養槽に取り付けた各種モニターの測定値から推定する必要がある。

両者のうちアンモニア消費量はpH変化としてモニターでき、pHスタート法で0.5g/L前後で一定に制御可能だった。

一方、グルコース濃度は、オンライングルコース計による直接測定法、オンライン濁度計やpH変化から間接的に推定する方法等を試みたが、装置の応答が遅いことや増殖のフェーズにより推定値と実際の消費量が乖離する等の問題で、なかなか良好な制御法が見出せなかった。最終的に炭酸ガス発生量と増殖の間に比較的良好的な比例関係を見出すことができ、グルコース送液速度を炭酸ガス濃度に対して比例制御することで5g/L以下に維持することが可能となった。⁸⁾

[4] 回収工程

培養終了後、(1)遠心分離による菌体の回収、(2)抗酸化剤の添加および粘度調整、(3)乾燥の3工程により製品を回収する。カロテノイドは一般的に熱に不安定な物質であるが、噴霧乾燥機で加熱乾燥条件を検討したところ、抗酸化剤を添加しない場合でも90%のAx残存量を得る条件を見出した。さらに、抗酸化剤としてアスコルビン酸およびクエン酸ナトリウムを添加するとAx残存量は100%に向上した。

3. 製品のカロテノイド組成

本菌の乾燥菌体にはAx以外にも多様な機能性カロテノイド色素が含まれる。これらはAxの生合成前駆体であり、代表的なものとしてアドニキサンチン(全カロテノイド中約12%)、フェニコキサンチン(約10%)、カンタキサンチン(約15%)、エキネノン(約

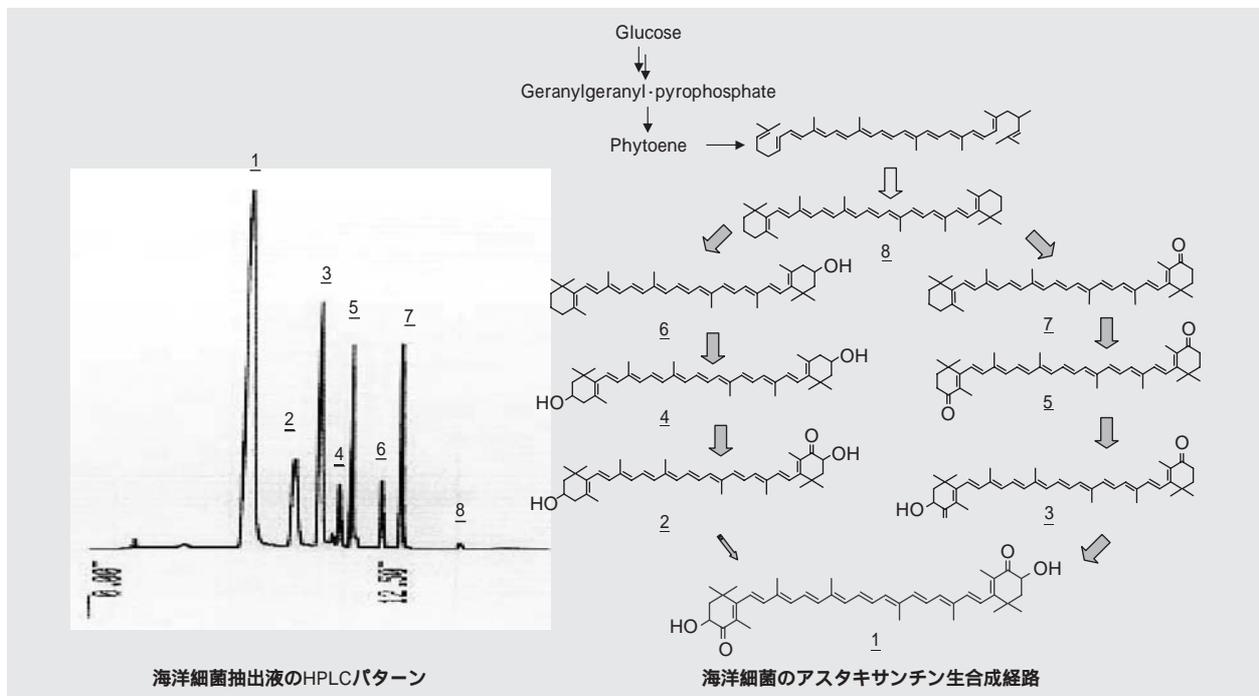


図5 海洋細菌のカロテノイド組成と生成経路

図中の下線を付した数字はHPLC上のピークと化学構造式の対応を示す。

1：アスタキサンチン、2：アドニキサンチン、3：フェニコキサンチン、4：ゼアキサンチン、
5：カンタキサンチン、6： β -クリプトキサンチン、7：エキネノン、8： β -カロテン

12%)があり、 β -カロテンその他を微量に含む。Axは全カロテノイドの約55%である。これら前駆体カロテノイドにも色素としての需要がある他、健康増進機能があるとされている。またこれら多様なカロテノイドは後述する魚の色揚げにおいて機能性を高める要因と考えている。

4. 機能評価

本菌乾燥菌体を含む飼料でマダイを飼育した結果を図6に示した。ここでは細菌細胞へのダメージを最低限とするため、乾燥菌体は凍結乾燥法で調製し、飼料調製の際にも加熱を避けた。飼料中のAx含量は30ppmとした。マダイの飼育期間は12週間とした。対照群には、赤色酵母抽出物または化学合成品を同様に添加した飼料、及びAx無添加のベース飼料を投与した。当海洋細菌菌体と酵母由来品投与群で化学合成品投与群より良好な色揚げが認められた。この結果は両天然品がAxのみならず、多様な前駆体カロテノイドを含むことによるものと推測された(合成品はAxのみを含むので総カロテノイドとしての投与量は1/2である)。また、本菌菌体をそのまま乾燥したもので、抽出工程を経た酵母品と同等の色揚げ性能があることが確認された。

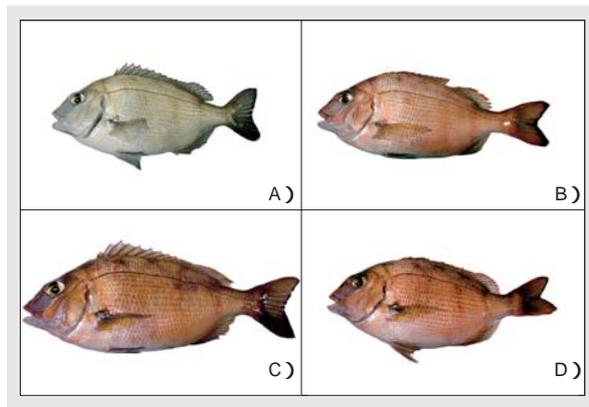


図6 アスタキサンチン配合飼料による飼育後のマダイの外観それぞれ、A) ベース飼料 (Ax無添加)、B) 化学合成品添加飼料、C) 赤色酵母抽出物添加飼料、D) 海洋細菌添加飼料を投与して飼育した後のマダイの外観を示した。

5. 安定性

Axは養魚飼料として他の成分と混合する際にゲル化のため加熱される他、流通の過程でも高温にさらされることがあるため、製品の加熱安定性は重要な要因である。そこで、本菌噴霧乾燥粉体を80℃で加熱し、Ax含量の変化を経時的に追跡した。本実験では本菌乾燥粉体として抗酸化剤無添加で乾燥したものをを用いた。比較として化学合成品についても同様の加速劣化試験を行った。この化学合成品は飼料添加用に製剤された市販品であり、増量剤を加えてAx含量は8重量%

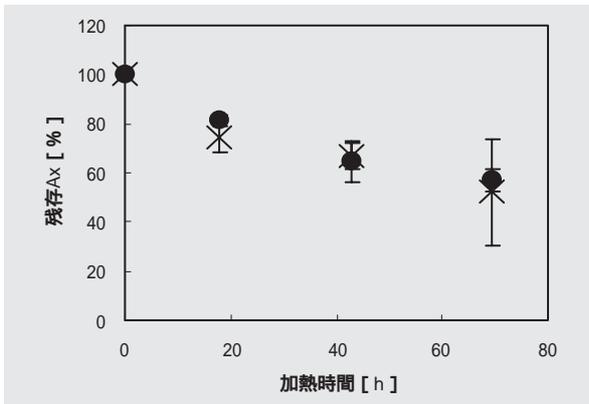


図7 合成品との安定性比較

海洋細菌噴霧乾燥菌体（抗酸化剤無添加、●）及び化学合成Ax製剤（抗酸化剤としてエトキシキンを0.8%含有、×）をそれぞれ空気中、80℃で加熱した場合の粉体中のAx残存量の経時変更。エラーバーはデータのばらつき（±SD）を示す。

に調整されている。また、LC・MSで分析したところ、抗酸化剤としてエトキシキンを0.8wt%含有していた。結果を図7に示すが、80℃での劣化速度は両者同等だった。すなわち本菌乾燥菌体中のAxは抗酸化剤を添加しなくとも抗酸化剤を添加した製品と同等の安定性を有していた。これは本菌の菌体成分がAxの安定化に寄与したことによるものと考えている。

6. 安全性

Ax生産菌の凍結乾燥粉体および噴霧乾燥粉体のラットへの急性毒性試験を実施した（単回投与試験、神奈川県衛生試験場に依頼）。これにより元株及び変異株ともにLD50が2000mg/kg以上であることが確認された。本菌の毒性は極めて低いものである。

7. まとめ

我々は海洋バイオテクノロジー研究所より導入した海洋細菌を改良し、その高密度培養によるAx生産技術を構築した。本技術によれば化学合成品に対してもコスト競争力があるものとの試算結果を得ている。また、色揚げ機能、安定性及び安全性の、最終的な結論を得るにはさらに進んだ試験が必要であるものの、既存品よりも優れた性能を有することを示す実験結果が得られている。以上、我々の構築したAx生産技術によれば、経済性・機能性に優れた天然Axを提供できるものと考えている。

8. 謝辞

培養技術の構築に当り多数のご助言を頂きました名古屋大学教授の山根恒夫先生（現、中部大学教授）に感謝いたします。また、マダイへの色揚げ試験を実施頂いた東京海洋大学教授の佐藤秀一先生に感謝いたします。さらに筆者らと共に本技術の開発に携わった村山敬一主席研究員、大江研究員、豊嶋研究員、田中亨研究員他多数の皆様へ感謝いたします。

参考文献

- 1) A. Yokoyama, et. al, *Biochem. Biotech. Biochem.*, 58, 1842 (1994)
- 2) Y. Yamane, et al, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 4417 (1997)
- 3) 大江正剛、半澤敏、今泉暢、豊嶋俊薫、特開2005-58216
- 4) 田中亨、井出輝彦、村山敬一、大江正剛、今泉暢、豊嶋俊薫、半澤敏、特開2007-181449
- 5) 今泉暢、大江正剛、豊嶋俊薫、半澤敏、平成18年度日本水産学会大会講演要旨集 p.263
- 6) A. Yokoyama, W. Miki, *FEMS Microbiol. Letters*, 128, 139 (1995)
- 7) 山根恒夫、“生物反応工学第三版”産業図書(2002)
- 8) 大江正剛、今泉暢、半澤敏、特開2007-143491